

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. D. Patzelt

**Lebensalterschätzung aus biologischem Material anhand der
4.977 bp-Deletion in menschlicher mitochondrialer DNA**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Silke Polzin
aus Höchberg

Würzburg, Oktober 2001

Referent: Prof. Dr. med. D. Patzelt

Koreferent: Prof. Dr. med. T. Grimm

Dekan: Prof. Dr. med. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 26.06.2002

Die Promovendin ist Ärztin

Das Alter ist ein höflich Mann,
Einmal übers andre klopft er an,
Aber nun sagt niemand herein,
Und vor der Türe will er nicht sein,
Da klinkt er auf, tritt ein so schnell,
Und nun heißt's, er sei ein grober Gesell.

Goethe

Für meine Eltern und meinen Bruder

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das Altern.....	2
1.1.1	Definition des Alterns	2
1.1.2	Molekulare Ursachen des Alterns	3
1.1.2.1	Genominstabilität.....	3
1.1.2.2	Genetisch programmierte Mechanismen.....	4
1.1.2.3	Zelltod	5
1.1.2.4	Systemische Kontrolle des Alterns	5
1.1.2.5	Oxidativer Schaden durch freie Radikale.....	5
1.2	Altersschätzung in rechtsmedizinischen Fragestellungen	6
1.2.1	Unsichere Alterszeichen.....	6
1.2.2	Methoden der Altersschätzung	7
1.2.2.1	Morphologische Altersschätzung.....	7
1.2.2.2	Biochemische und molekularbiologische Altersschätzung.....	9
1.3	Die mitochondriale DNA (mtDNA).....	10
1.3.1	Das Mitochondrium	10
1.3.2	Das mitochondriale Genom.....	12
1.3.3	Mitochondriale Alterstheorie und Entstehung mitochondrialer Genomveränderungen	13
1.3.4	Mitochondriale Mutationen und assoziierte Erkrankungen.....	14
1.4	Die 4.977 bp-Deletion in mitochondrialer DNA.....	16
1.4.1	Lokalisation der 4.977 bp-Deletion.....	16
1.4.2	Bisherige Untersuchungen der 4.977 bp-Deletion	18
1.5	Zielsetzung.....	20
2	MATERIAL UND METHODEN	21
2.1	Herkunft und Beschaffenheit des Untersuchungsmaterials.....	21
2.2	Instrumente und Reagenzien.....	22
2.2.1	Nukleotide und Oligonukleotide.....	22
2.2.2	Enzyme.....	22
2.2.3	Marker und Längenstandards	22
2.2.4	Chemikalien.....	22
2.2.5	Geräte	23
2.2.6	Sonstige Materialien.....	23
2.3	Extraktion der DNA	24
2.3.1	DNA-Extraktion aus formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe (modifiziert nach Banerjee et al., 1995 [7]).....	24
2.3.2	DNA-Extraktion aus Vollblut (Miller et al., 1988 [108]).....	25
2.3.2.1	Zellyse.....	25
2.3.2.2	Salzextraktion	26

2.3.3	DNA-Extraktion mit Chelex-100 (modifiziert nach Walsh et al., 1991 [176])	26
2.4	Reinigung der DNA mittels Diatomeen (Günther et al., 1995 [51])	27
2.5	DNA-Konzentrierung durch Alkohol-Fällung (Sambrook et al., 1989 [146])	28
2.6	Quantifizierung der extrahierten DNA-Menge	28
2.7	Enzymatische Amplifizierung mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (Saiki et al., 1985 [145])	29
2.7.1	Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion	30
2.7.2	Etablierung eines Multiplex-Amplifikationsansatzes	31
2.8	Reinigung des PCR-Produktes durch Fällung (Sambrook et al., 1989 [146])	32
2.9	Elektrophorese	33
2.9.1	Niedrigauflösende Polyacrylamid-Horizontal-Gelelektrophorese (Sambrook et al., 1989 [146])	33
2.9.2	Agarose-Gelelektrophorese	34
2.9.3	Anfärbung von Nukleinsäuren in Gelen	34
2.9.3.1	Silberfärbung (Budowle et al., 1991 [18])	34
2.9.3.2	Ethidiumbromidfärbung (Sambrook et al., 1989 [146])	35
2.9.4	Kapillarelektrophorese	35
2.9.4.1	Fragmentanalyse	36
2.9.4.2	Auftrennung des Sequenzierungsproduktes	36
2.10	Sequenzierung (modifiziert nach Sanger et al., 1977 [148])	37
2.10.1	Cycle-Sequencing	37
2.10.2	Reinigung des Sequenzierungsproduktes (Günther, 1997 [50])	38
2.11	Quantifizierung der 4.977 bp-Deletion	38
2.12	Statistische Auswertung	39
2.12.1	Spearman'scher Rangkorrelations-Test	39
2.12.2	Produkt-Moment-Korrelation logarithmierter Werte	40
2.12.3	Wilcoxon-Test für Paardifferenzen	40
2.12.4	Perzentilenkurven	41
3	ERGEBNISSE	42
3.1	Gewinnung der DNA	42
3.2	Etablierung der Methode	42
3.2.1	Die enzymatische Amplifizierung	42
3.2.2	Darstellung der Amplifikationsprodukte	43
3.3	Quantifizierung der 4.977 bp-Deletion in mtDNA	46
3.3.1	Spearman'scher Rangkorrelations-Test	46
3.3.2	Das formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Gewebe	47
3.3.3	Das Blut	51
3.3.3.1	Das venöse Vollblut	51
3.3.3.2	Getrocknete Blutflecken auf Leinenläppchen	54
3.3.4	Die Mundschleimhautabstriche	55

3.3.5	Gegenüberstellung verschiedener biologischer Materialien.....	58
3.4	Perzentilenkurven der 4.977 bp-Deletion	62
4	DISKUSSION.....	65
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	82
6	LITERATURVERZEICHNIS	84
7	ANHANG	97
7.1	Gene des mitochondrialen Genoms.....	97
7.2	Computeranalyisierte Rohdaten	98
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	112
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	114
	TABELLENVERZEICHNIS	117
	DANKSAGUNG	
	CURRICULUM VITAE	

1 Einleitung

In zahlreichen Bereichen des alltäglichen Lebens stößt man auf die Notwendigkeit einer Altersangabe. Von besonderer Relevanz ist die Lebensalterschätzung in der Rechtsmedizin, deren Aufgabe es u. a. ist bei einer Obduktion unbekannter Leichen oder menschlicher Überreste, das Alter des Verstorbenen anzugeben, um wichtige rechtliche und soziale Fragestellungen für den einzelnen und die Gemeinschaft zu klären.

Der Bedarf an genauen Techniken zur Altersschätzung begründet sich vornehmlich in der steigenden Zahl unbekannter Leichen und menschlicher Überreste, die derzeit in Deutschland jährlich ungefähr 50 bis 70 beträgt [139]. Die Feststellung der Identität eines Toten ist aus ethischen, verwaltungstechnischen sowie zivil- und strafrechtlichen Gründen von Bedeutung, denn der Tod einer Person darf nur bei eindeutiger Identifizierung erklärt werden. In zivilrechtlicher Hinsicht ändert die Todeserklärung neben dem bürgerlichen und juristischen Status des Toten auch den der Hinterbliebenen. Es entstehen u. a. erbschafts- und versicherungstechnische Fragen, die für die Angehörigen wirtschaftliche und finanzielle Auswirkungen haben. Eine nicht mögliche Identifizierung kann im Strafrecht beispielsweise sogar die Aufklärung eines Mordfalls hemmen. Durch falsche Identifizierung einer Leiche kann es darüber hinaus zu einem Missbrauch der Identitätsdokumente kommen, indem diese illegal auf andere übertragen werden. Das Alter ist neben dem Geschlecht ein Hauptfaktor bei der Vorselektion im Screeningverfahren, wenn es darum geht, unbekannte Leichen mit der Anzahl der vermissten Personen zu vergleichen. Die Altersschätzung ist somit eine der Standardanfragen der Polizei und der Gerichte im Ermittlungsfall bezüglich eines unbekanntem Leichnams.

Gerade in den letzten Jahren ist aber auch die Notwendigkeit einer Altersschätzung an lebenden Personen besonders aus sozialpolitischer Sicht gestiegen. Dies ist zum einen bedingt durch die Zunahme von Menschen ohne Identitätspapiere, wie bei Flüchtlingen oder illegalen Einwanderern. Zum anderen ist das Alter einer lebenden Person auch für die Klärung rechtlicher Fragen erforderlich, wenn beispielsweise die Schuldzumessung bei straffälligen jungen Erwachsenen, die Rentenforderungen älterer Menschen oder Beantragungen um politisches Asyl zu klären sind. Hieraus wird ersichtlich, welche Relevanz eine Altersschätzung auch an Lebenden in Zukunft haben wird.

Aus diesem Grund werden in den folgenden Kapiteln die notwendigen wissenschaftlichen Grundlagen entsprechend der derzeitigen Forschungslage zur Lebensalterschät-

zung dargestellt, bevor im Hauptteil dieser Arbeit eine Methode zur Altersschätzung aus unterschiedlichem biologischem Material vorgestellt und diskutiert wird.

1.1 Das Altern

1.1.1 Definition des Alterns

Unter Altern werden irreversible Veränderungen der Lebenssubstanz als Funktion der Zeit verstanden. Nach Abschluss einer Periode des Wachstums und der Differenzierung manifestieren sich physische und psychische Alterungsprozesse im menschlichen Organismus. „Was wir an Wachstum verlieren, jedoch an Differenzierung gewinnen, nennen wir Reifung. Die Reifung zahlen wir mit dem Tod. Das Zahlungsmittel ist dabei das Altern.“ Diese Feststellung von R. Rössle hat auch heute noch Gültigkeit [135]. Mit steigendem Alter betrifft der Verlust an Homöostasefähigkeit alle metabolischen, immunologischen und neuroendokrinen Prozesse im menschlichen Körper. Unsere Langlebigkeit verdanken wir als Individuen und als Spezies folgenden Faktoren: guten Umweltbedingungen, einer möglichst kleinen Zahl von Gendefekten, geringer exogener und endogener Schädigung des genetischen Apparates unserer Körperzellen sowie gut funktionierenden Reparatursystemen. Limitierend wirken letztlich thermodynamische und oxidative Rahmenbedingungen unserer biologischen Existenz, die keine dauerhafte Stabilität unseres genetischen Materials zulassen [68].

Der bisher bekannte älteste Mensch war die Französin Jeanne Calment, die am 04.08.97 im Alter von 122 Lebensjahren starb.

Der Altersvorgang lässt sich auf verschiedenen Ebenen wahrnehmen, im äußeren Erscheinungsbild einer Person (Abb. 1.1 *a-h*), auf Organebene sowie auf zellulärer und molekularer Ebene.



Abb. 1.1 *a-h*: Die britische Königinmutter, Queen Mother Elizabeth, geboren am 04.08.1900, im Alter von *a* 2, *b* 9, *c* 23, *d* 37, *e* 46, *f* 60, *g* 80 und *h* 100 Jahren

1.1.2 Molekulare Ursachen des Alterns

In der molekularbiologisch ausgerichteten Fachliteratur werden zum derzeitigen Forschungsstand über 300 verschiedene molekulare Gründe für das Altern diskutiert. Diese lassen sich grob in zwei Kategorien unterteilen: die Theorien über die genetischen Ursachen, denen 70 % der Alterungsgründe zugeschrieben werden, und die sogenannten Verschleißtheorien des Alterns, die 30 % ausmachen sollen. Zum genetisch bedingten Altern („aktives Altern“) zählen die Genominstabilität, insbesondere der Telomerenverlust, aber auch genetisch programmierte Mechanismen, wie der Zelltod und das systemische Altern. Innerhalb der Verschleißtheorien („passives Altern“) kann als Hauptursache der oxidative Schaden durch freie Radikale angesehen werden [80].

1.1.2.1 Genominstabilität

Schon seit langem sind Genomveränderungen, wie Punktmutationen, Rearrangements oder Veränderungen der Chromosomenzahl als Ursachen des Alterns bekannt [164].

Ein eindrucksvolles Beispiel für die Genominstabilität findet sich in den seit 1988 bekannten sogenannten Telomeren, den sich mehrfach wiederholenden DNA-Sequenzen am Ende jedes menschlichen Chromosoms [113]. Eine der Hauptaufgaben der Telomere besteht darin, die Chromosomen vor degenerativen Prozessen der Replikation zu schützen. Durch die Abhängigkeit der DNA-Polymerasen von Primern und der unidirektionalen 5'-3'-Syntheserichtung ergibt sich für die komplette Replikation der eukaryontischen Chromosomenenden ein Problem (Abb. 1.2), das durch die Telomere beseitigt werden kann [123].

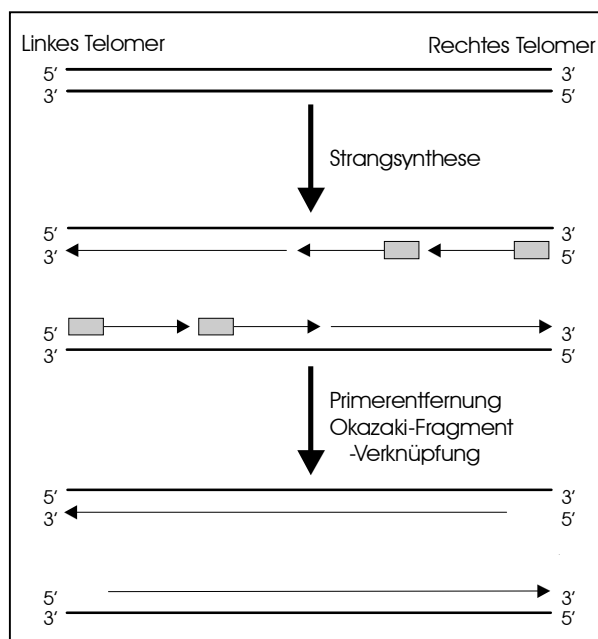


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des Replikationsproblems am DNA-Ende

Bei der Replikation eines linearen Doppelstranges (dicke Linien) erfolgt die Strangsynthese diskontinuierlich, bestehend aus Okazaki-Fragmenten, welche mit einem stabilen RNA-Primer (■) beginnen.

Nach der Primer-Entfernung und der Verlängerung und Verknüpfung der Okazaki-Fragmente bleibt das am weitesten 5'-gelegene Fragment

allerdings unvollständig. Bei den meisten eukaryontischen Spezies fügt nun die Telomerase, ein Ribonukleoprotein-Enzym, die fehlenden DNA-Sequenzen an das Chromosomenende an, wodurch terminale Deletionen kompensiert werden können [21].

Während des replikativen Wachstums der menschlichen Zellen verlieren die Telomere an Länge, da den meisten normalen, menschlichen, somatischen Zellen eine ausreichend schützende Telomerase-Aktivität fehlt [55]. Die initiale Telomerenlänge sagt die replikative Zellkapazität voraus. Eine bedenkliche Verkürzung der Telomere in einem oder mehreren Chromosomen signalisiert einen für das Altern typischen Wachstumsstopp im Zellzyklus. Diese Telomerenverkürzung wird mit einem fehlenden Nachweis der Telomerase in den Zellen assoziiert. Eine Reaktivierung der Telomerase in menschlichen Zellen kann die replikative Lebensspanne über die normale Grenze verlängern [11].

Die Alterstheorie der Genominstabilität wird durch Erkrankungen der vorzeitigen Vergreisung, wie der Progerie (Werner-Syndrom) und Progerie-ähnlichen Syndromen (Down-Syndrom, Ataxia teleangiectatica), bestätigt. Diese Erkrankungen charakterisieren sich durch eine verkürzte Lebenszeit und dem vorzeitigen Manifestieren von altersphänotypischen Veränderungen [100]. Klinisch auffällig sind die betroffenen, jungen Menschen durch Veränderungen, wie graue Haare, runzelig-atrophische, leicht lädierbare Altershaut mit durchscheinendem Venengeflecht, Alterskatarakt, Atherosklerose mit vorzeitiger Koronarsklerose und Minderwuchs [135]. Auf molekularer Ebene findet sich in den Zellen des Werner Syndroms eine erhöhte Rate an chromosomalen Rearrangements und Deletionen, die zu somatischen Mutationen führen und durch eine geringe Lebensspanne in einer *in vitro*-Kultur charakterisiert sind [186]. Beim Down-Syndrom ist ein zusätzliches Chromosom 21 und in der Ataxia teleangiectatica sind vermehrt spontane und strahlungserzeugte Chromosomenbrüche sowie Telomer-Telomerfusionen nachweisbar [187]. Zusätzlich lässt sich bei diesen Syndromen ein größerer Telomerenverlust als bei gesunden, gleichaltrigen Menschen nachweisen [169].

1.1.2.2 Genetisch programmierte Mechanismen

Ein Beispiel für die Regulation des Alterungsprozesses durch genetische Programme findet sich in *Caenorhabditis elegans*. Diese Würmer können durch vier Larvenstadien direkt zum Erwachsenenstadium übergehen, oder aber in eine „winterschlafähnliche“ Phase eintreten. Kommt es jedoch zu einer Verbesserung der Umweltbedingungen, dann kann die Entwicklung wieder aufgenommen werden, was in erster Linie abhängig

von der Konzentration an Pheromonen ist, die Umweltstress (z. B. Hungern, Lebensraumenge oder hohe Temperaturen) signalisieren. Im Schlafstadium können die Würmer bis zu 6 Monate überleben, viel länger als die wenigen Wochen in der Erwachsenenphase. Mutationen in Genen, die für das Schlafstadium verantwortlich sind, führen zu einer 2 bis 4fachen Lebensverlängerung [82]. Dieser Effekt wird als Einfluss eines genetischen Programms auf das Altern interpretiert.

1.1.2.3 Zelltod

Ein möglicher Zusammenhang zwischen einer Dysregulation des Zelltodes und dem Altern wird in der Fachliteratur diskutiert [177]. Zellen sterben zum einen durch einen passiven (Nekrose) zum anderen durch einen aktiven Mechanismus, den programmierten Zelltod (Apoptose). Dieser wird durch unzählige Stimuli, wie Steroidhormone, DNA-Schäden, Verminderung von Wachstumsfaktoren oder rezeptorvermittelt, z. B. in klonaler Deletion der Immunzellen, ausgelöst. Durch die Aktivierung von Proteasen und Nukleasen werden zelluläre Strukturen kontrolliert zerstört und die entstehenden Zelltrümmer werden durch phagozytierende Zellen beseitigt.

1.1.2.4 Systemische Kontrolle des Alterns

Neben diesen zellautonomen Mechanismen, die unabhängig von äußeren Signalen ablaufen, findet jedoch auch eine systemische Kontrolle des Alterns statt [39]. Humorale Faktoren (endokrine Hormone), ebenso wie lokale Mechanismen (Zell-Zell-Kontakte, parakrine Hormone) koordinieren den Vorgang des Alterns in verschiedenen Geweben. In der normalen, menschlichen Physiologie nimmt die Menge an endokrinen Faktoren, wie Östrogenen, Wachstumshormonen und Testosteron, mit dem Alter ab [85]. Degenerative Prozesse, wie Hautatrophie, Osteoporose und Atherosklerose, können z. B. durch eine Östrogen-Substitution postmenopausal verlangsamt und die Sterberate der betroffenen Frauen gesenkt werden [49]. Ähnliches zeigt sich nach Substitution von Wachstumshormonen in einer Zunahme an Muskelmasse, Hautdicke und Knochendichte [144].

1.1.2.5 Oxidativer Schaden durch freie Radikale

Die von Harman 1956 entwickelte Theorie besagt, dass im Laufe des Lebens freie Radikale, Nebenprodukte der oxidativen Phosphorylierung, beträchtlichen unspezifischen Schaden an Makromolekülen wie Proteinen, Lipiden und DNA verursachen können [56]. Ungefähr 2 bis 3 Prozent des aufgenommenen Sauerstoffes werden durch Addition

einzelner Elektronen chemisch reduziert und im Folgenden in Superoxidanione, Hydroperoxide und Hydroxylradikale umgewandelt [57]. Untersuchungen an *Drosophila*-Fliegen und *Caenorhabditis elegans*-Würmern zeigen bei Überexprimierung der Antioxidantien Cu/Zn SOD und Katalase eine erhöhte Resistenz gegenüber oxidativem Stress und somit eine Verlängerung der Lebenszeit um bis zu 50 % [124].

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass eine ganze Vielzahl von Ursachen für das Altern verantwortlich ist. Sie vollziehen sich parallel, bedingen sich gegenseitig und dürfen deshalb nicht unabhängig voneinander betrachtet werden. Sämtliche Schädigungen der Zellen auf molekularer Ebene bewirken gemeinsam eine eingeschränkte Zellfunktion mit Auswirkungen auf die Organfunktion und das Funktionieren ganzer Organsysteme, die zum Alterungsprozess beitragen und letztlich zum Tod eines Menschen führen. Als genetisches Programm existiert somit eine definitiv begrenzte, maximale Lebensspanne des Menschen von 110 bis 115 Jahren [68].

1.2 Altersschätzung in rechtsmedizinischen Fragestellungen

Eine Altersschätzung in rechtsmedizinischen Fragestellungen lässt sich durch Beurteilung alterstypischer Veränderungen auf makroskopischer, histologischer und molekularbiologischer Ebene durchführen. Die Genauigkeit der Altersangabe steigt dabei generell mit der Anzahl der erfassbaren altersabhängigen Merkmale.

1.2.1 Unsichere Alterszeichen

Der erste Schritt bei der Altersschätzung besteht in einer äußeren Besichtigung der Leiche oder der lebenden Person. Die hierbei gewonnenen Alterszeichen gelten als unsicher und sind für sich alleine genommen nur von geringem Wert. So können graue Haare bei manchen Menschen schon im Alter von weniger als 30 Jahren auftreten, bei anderen mit 60 Jahren noch fehlen. Die Altersspannen sollten allerdings mit einer Genauigkeit von ± 5 Jahren angegeben werden. Erfahrungsgemäß wird das Alter bei Leichen eher zu hoch als zu niedrig geschätzt.

Äußere Merkmale, die man für eine erste Altersschätzung heranziehen kann, sind z. B. die dünne, pergamentartig durchscheinende, in Falten abhebbare Haut, braune Alterspigmentierungen, ebenso wie die Fettgewebsverteilung im Gesicht (runde Wangen bei jüngeren, Doppelkinnbildung bei älteren Menschen) und die Hautfaltenbildung (Krähenfüße an den Augenwinkeln, Vertiefung der Nasolabialfalte) [151].

Weitere Anhaltspunkte auf das Alter können sich aus dem Obduktionsbefund ergeben. Die Altersrückbildungen der Organe manifestieren sich in einer verringerten Organmasse sowohl infolge einer volumetrischen als auch einer numerischen Zellverminderung. Zudem lässt sich in alternden Zellen ein eisenfreies, braunes Abnutzungspigment (Lipofuszin) nachweisen, beim physiologisch alternden Menschen aber erst nach dem 70. Lebensjahr. Im Alterungsprozess nimmt charakteristischerweise der Kollagenfasergehalt der Organe zu, was eine Organverfestigung zur Folge hat. Eine Beurteilung des Gefäßstatus kann arteriosklerotische Veränderungen als alterstypisch aufdecken [135].

1.2.2 Methoden der Altersschätzung

Die Anforderungen an die Methoden der Altersschätzung sind abhängig von den Umständen der einzelnen Fälle. Die Wahl der aussagekräftigsten Methode muss folglich individuell getroffen werden. So kann beispielsweise eine ungefähre Altersschätzung von einer geschulten und erfahrenen Person basierend auf dem anthropologisch/dentalen Status, welcher relativ schnell erstellt werden kann, ausreichend sein, wie z. B. zur Bestätigung der Identität eines Toten im Zusammenhang mit anderen Funden. Jedoch muss die Altersschätzung des öfteren so genau wie möglich sein, z. B. zur Aufklärung eines Mordfalles. Bei der Altersschätzung lebender Personen müssen die Prinzipien der medizinischen Ethik und rechtlichen Regeln eingehalten werden, besonders wenn medizinisches Eingreifen eingeschlossen ist [136]. Als derzeit geeignete, für die rechtsmedizinische Praxis empfohlene Methoden werden die morphologische, die biochemische und die molekularbiologische Altersschätzung angesehen.

1.2.2.1 Morphologische Altersschätzung

Vor allem im Kindes- und Jugendalter sind zur Altersschätzung morphologische Methoden zu empfehlen. Diese basieren auf radiologischen Untersuchungen der Zahn- und Skelettentwicklung. Die Beurteilung anhand der Zahnentwicklung ist bis zum 14. Lj. an allen Zähnen mit einer Genauigkeit von $\pm 0,5 - 1$ Jahren möglich [32]. Ab dem 14. Lj. bis zum 21. Lj. ist eine genaue Altersschätzung nur noch am dritten Molaren, dem Weisheitszahn, mit einer Exaktheit von $\pm 1 - 2,5$ Jahren durchführbar [89].

Die radiologische Auswertung der Skelettentwicklung ist bis zum 18. Lj. mit einer Präzision von $\pm 0,5 - 2$ Jahren aussagekräftig [179]. Als Analysegrundlage dient hier z. B. der Verknöcherungsgrad der Mittelhandknochen zur Beurteilung der Knochenreife

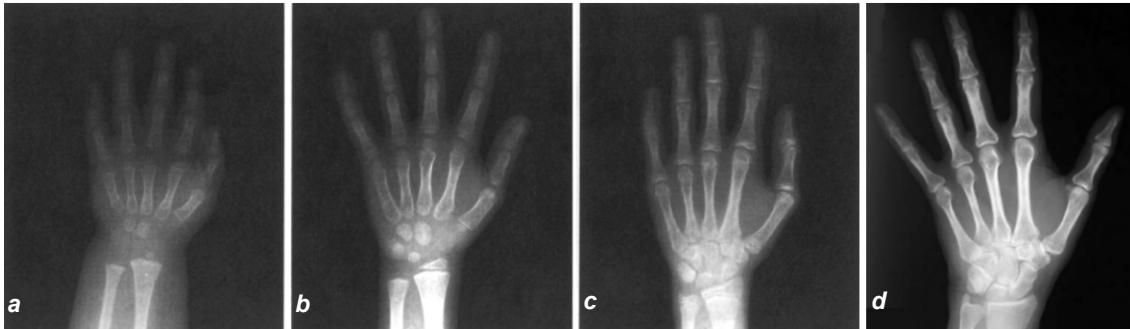


Abb. 1.3 a-d: Röntgenaufnahmen der Mittelhandknochen a eines 1 ½-jährigen, b eines 4-jährigen, c eines 14-jährigen Jungen [59] und d eines männlichen Erwachsenen [72]. An der Hand ist die Entwicklung der Knochenreife durch Beurteilung des Verknöcherungsgrades wegen der großen Anzahl knöcherner Strukturen mit Hilfe einer Röntgenuntersuchung leicht zu erfassen. Hierbei wird jeweils die ganze linke Hand geröntgt.

(Abb. 1.3 a-d) [140]. Diese Methoden können an Leichen, menschlichen Überresten, archäologischen Funden aber auch an lebenden Personen zur Anwendung kommen.

Im Erwachsenenalter ist die Aussagekraft der morphologischen Methoden jedoch wesentlich geringer als im Kindes- und Jugendalter. Zur Altersschätzung an Zähnen wird die „Gustafson-Methode“ verwendet, die im gesamten Erwachsenenalter eine Altersbestimmung mit Schwankungen von $\pm 5 - 12$ Jahren möglich macht [52]. Bei dieser Methode werden als altersabhängige Zahnveränderungen die Abnutzung der Kauflächen, die Rückbildung der Wurzelhaut, die Ablagerung von Sekundärzement, die Zahnsteinbildung sowie die Wurzelresorption und -transparenz beurteilt (Abb. 1.4).

Zusätzlich kann das Alter durch die Beurteilung der Zuwachsringe im Zement bleibender Zähne mit einer Genauigkeit von $\pm 4 - 10$ Jahren bestimmt werden [93].

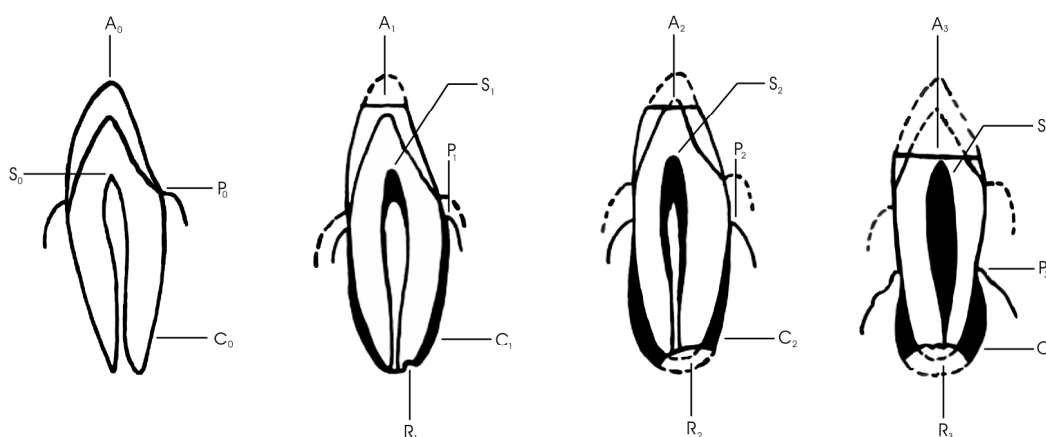


Abb. 1.4: Altersbestimmung anhand der „Gustafson-Methode“ [52] durch Untersuchung von Zahnveränderungen einer 12-, 32-, 58- und 67-jährigen Person (A = Abkennung, S = Sekundärzement, P = Parodontose, C = Zementanlagerung, R = Wurzelresorption). Das Ausmaß der Veränderungen ist in Stufen von 0 bis 3 eingeteilt, die nach Addieren das Lebensalter anhand einer Eichkurve bestimmbar machen.

Am Skelettsystem können makroskopisch bis zum 40. Lj. die pubische Symphyse [54] und die Rippen [76] jeweils mit einer Exaktheit von $\pm 2 - 4$ Jahren beurteilt werden. Diese speziellen Skelettuntersuchungen an Erwachsenen sind jedoch nicht an lebenden Personen durchführbar. Histologisch kann das Alter anhand der Knochenstruktur über das gesamte Erwachsenenalter mit einer Präzision von $\pm 5 - 12$ Jahren angegeben werden [168]. Um biologische Variationen einzelner Skelettveränderungen miteinbeziehen zu können, muss eine Vielzahl altersabhängiger Merkmale für einen Fall untersucht werden [71].

Anzumerken ist an dieser Stelle, dass bei allen morphologischen Methoden der Einfluss des Geschlechts, der Rasse und der sozioökonomischen Umwelt Berücksichtigung finden muss.

1.2.2.2 Biochemische und molekularbiologische Altersschätzung

Bei der Altersschätzung von Erwachsenen kommt den biochemischen (z. B. Bestimmung des Razemisierungsgrades der Asparaginsäure) sowie den molekularbiologischen Methoden (z. B. Bestimmung der Telomerenlänge) die größte Bedeutung zu.

Razemisierungsgrad der Asparaginsäure

Die Umwandlung der L-Asparaginsäure in ihre D-Form (Razemisierung) zeigt in zahlreichen permanenten Proteinen verschiedener Gewebe eine Altersabhängigkeit an. Eine altersabhängige Zunahme der D-Asparaginsäure wurde bisher für das Kronen- und Wurzelzementin in bleibenden Zähnen [65], den Zahnschmelz [64], die Augenlinse [101], das Gehirn [98] und die elastischen Fasern des Lungenparenchyms [154], ebenso wie für den Knochen [138] und den Knorpel (z. B. in Bandscheiben [137]) nachgewiesen.

Diese biochemische Methode ist an lebenden Personen nur insoweit durchführbar als extrahierte Zähne oder biopsiertes Material zur Verfügung stehen. Nicht eingesetzt werden sollte diese Methode zur Altersschätzung an verbrannten, menschlichen Überresten oder archäologischen Funden mit stark fortgeschrittener Verwesung, da es bei Temperaturen über 37 °C zu verfälschten Ergebnissen kommen kann [102]. Die Genauigkeit dieser Methode liegt bei $\pm 1,5 - 4$ Jahren.

Telomerenlänge und Aktivität der Telomerase in somatischen Zellen

Die sich mehrfach wiederholenden DNA-Sequenzen an den Enden der linearen Chromosomen, die sogenannten Telomere (s. Kapitel 1.1.2.1), verkürzen sich mit steigen-

dem Lebensalter. Der Telomerenverlust wird als Indikator („mitotische Uhr“) aber auch als Verstärker der replikativen Alterung der menschlichen Zellen angesehen [161]. Nachgewiesen werden konnte eine Abnahme der Telomerenlänge mit zunehmendem Alter bisher *in vitro* und *in vivo* in teilungsfähigen, somatischen Zellen, wie z. B. Epithel- und Endothelzellen sowie in Myoblasten und in Lymphozyten [2]. In peripheren Blutzellen beträgt die Telomerenlänge bei Personen unter 40 Jahren zwischen 7,0 und 18,9 kb und bei Personen darüber nur noch zwischen 6,2 und 12,8 kb, wobei die Telomerasenaktivität mit zunehmendem Alter deutlich abnimmt [77]. Die Telomerenverkürzung kann mit einer Genauigkeit von $41 \pm 2,6$ bp pro Jahr angegeben werden [169].

Eine weitere vielversprechende Methode zur Altersschätzung auf molekularbiologischer Ebene findet sich in der mitochondrialen DNA, die derzeit schon in einer Vielzahl rechtsmedizinischer Fragestellungen zum Einsatz kommt und vermehrt an Bedeutung gewinnt. Das mitochondriale Altern vereinigt in sich mehrere der in Kapitel 1.1.2 dargestellten molekularen Altersursachen, wodurch der Alterungsprozess gerade an den Mitochondrien und ihrem Genom erkennbar wird.

1.3 Die mitochondriale DNA (mtDNA)

1.3.1 Das Mitochondrium

Mitochondrien sind fadenförmige (Mitos, griech. Faden) bis kugelige (Chondros, griech. Körnchen) Zellorganellen mit einem Durchmesser von etwa $0,5 \mu\text{m}$ und einer Länge von $1 - 2 \mu\text{m}$. Aufgrund ihres bakterienähnlichen Aufbaus geht man heute davon aus, dass Mitochondrien aus Archaeobakterien hervorgegangen sind, die endosymbiotisch in primitiven Wirtszellen lebten [37]. Im Laufe der Evolution wanderten die meisten Gene der aeroben Prokaryontenzelle in das Kerngenom der Wirtszelle. So blieb bei höheren Tieren nur ein kleines Restgenom zurück, welches heute die mitochondriale Erbinformation ausmacht. Die meisten eukaryontischen Zellen besitzen somit zusätzlich zur genetischen Information im Zellkern ein extranukleäres, mitochondriales Genom.

In den Zellen sind jeweils mehr als einhundert Mitochondrien enthalten [171]. Ihre Anzahl, Größe und Form hängt stark von der Art der Zelle, ihrer Stoffwechselrate und ihrem Energiebedarf ab. Auch die Verteilung der Mitochondrien in den Zellen diver-

giert sehr. Sie sind meist in der Nähe von Energiequellen, wie Fettvakuolen oder ATP-bedürftigen Zellstrukturen, lokalisiert [175].

Aufgebaut ist ein Mitochondrium aus der äußeren und der inneren Membran sowie dem Membranzwischenraum und dem Innenraum der Organelle, der sogenannten Matrix. Im Gegensatz zu der glatten äußeren Membran ist die innere stark gefaltet. Diese Membranfaltungen werden als Cristae bezeichnet (Abb. 1.5 *a,b*).

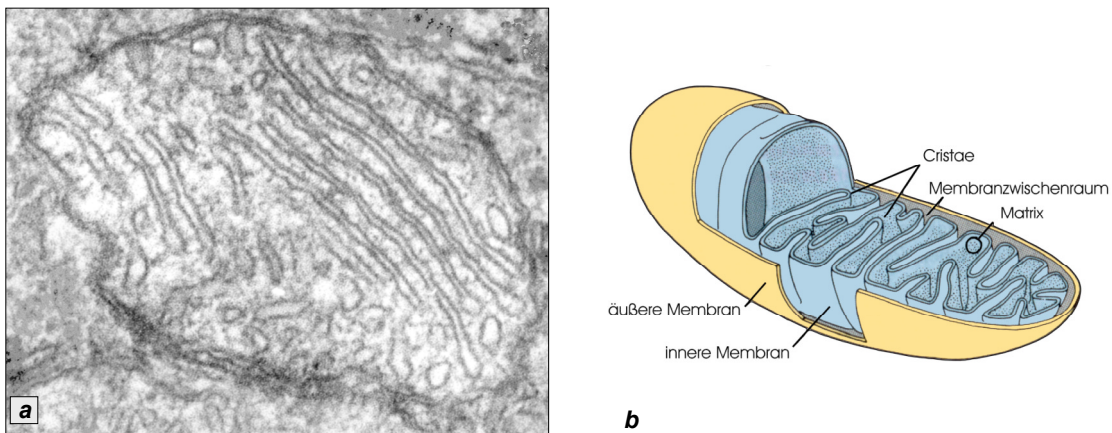


Abb. 1.5 *a,b*: Aufbau eines Mitochondriums
***a* Elektronenmikroskopische Aufnahme und *b* Schematische Darstellung [73]**

Um die Anzahl der Mitochondrien in jeder Zellgeneration konstant zu halten, nehmen die Mitochondrien in ihrer Größe zu und vermehren sich durch Querteilung. Die mitochondriale DNA, die in mehreren Kopien in jedem Mitochondrium vorliegt, wird unabhängig vom Zellkern repliziert. Während der Mitose werden die Mitochondrien gleichmäßig auf Mutter- und Tochterzellen verteilt. Die Lebensdauer der Mitochondrien wird mit durchschnittlich 10 bis 20 Tagen angegeben.

Mitochondrien beherbergen verschiedene Enzymsysteme des zellulären Metabolismus. Sie nehmen eine zentrale Stellung in der oxidativen Energieproduktion ein und liefern insgesamt 90 % der Energie für die Zellen in Form von ATP, weshalb sie auch als „Kraftwerke der Zellen“ bezeichnet werden. Zur ATP-Gewinnung von Bedeutung ist der Zitratzyklus sowie die Atmungskette (oxidatives Phosphorylierungssystem, OXPHOS). Mitochondrien spielen aber noch in weiteren anabolen und katabolen Stoffwechselreaktionen eine große Rolle, wie z. B. in der β -Oxidation der Fettsäuren, dem Pyruvatabbau und den Teilreaktionen der Gluconeogenese, des Harnstoffzyklus, der Lipogenese und der Ketogenese [149].

1.3.2 Das mitochondriale Genom

Jedes Mitochondrium besitzt mehrere Kopien des mitochondrialen Genoms [97]. Die mitochondriale Erbinformation des Menschen besteht aus einem zirkulären, in *supercoiled*-Konformation vorliegenden DNA-Doppelstrang mit einer Länge von ungefähr 16.500 Basenpaaren (bp), dessen Basenfolge erstmals 1981 von Anderson et al. bestimmt wurde [3]. In den darauffolgenden Jahren konnten die Sequenzinformationen einzelnen ribosomalen RNAs (rRNAs), essentiellen transfer-RNAs (tRNAs) und Proteinen zugeordnet werden [23]. Insgesamt kodiert das mitochondriale Genom für zwei rRNAs und 22 tRNAs sowie für 13 Proteine, die alle Bestandteile des oxidativen Phosphorylierungssystems und somit für die Energieerzeugung wichtig sind (Abb. 1.6).

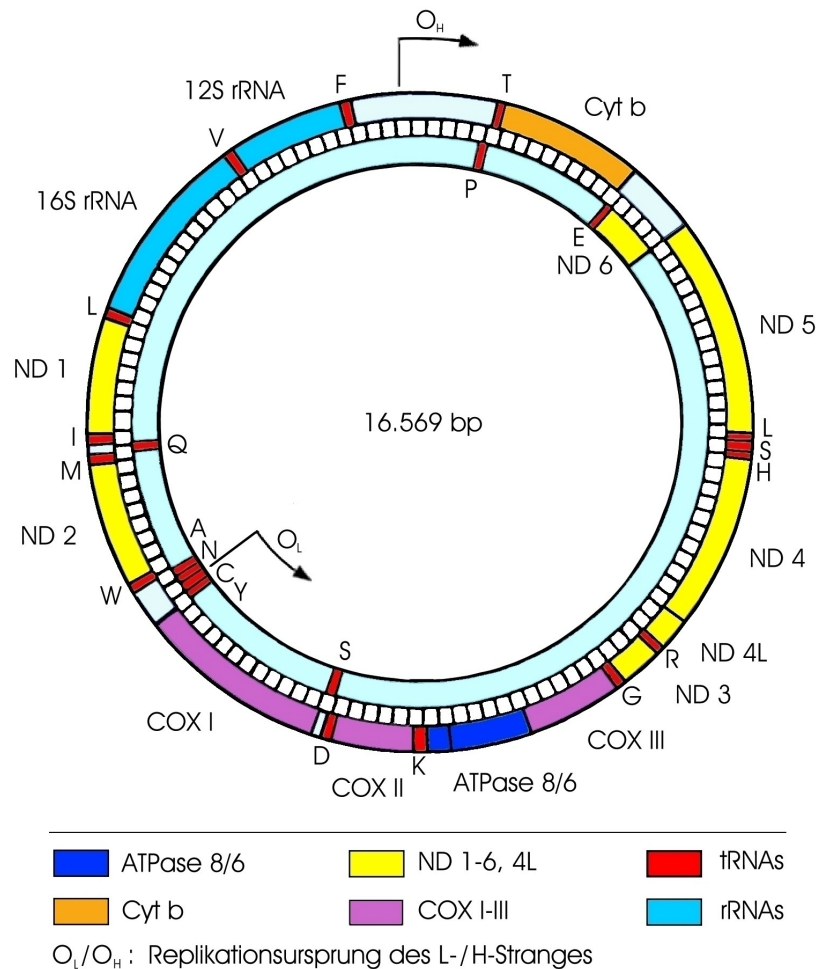


Abb. 1.6: Genkarte des menschlichen mitochondrialen Genoms
 Durch eine ungleiche Verteilung der Purin- und Pyrimidinbasen besitzen die beiden DNA-Stränge ein unterschiedliches Molekulargewicht. Der äußere Strang wird aufgrund der geringeren Molmasse als *light-strand* (L-Strang), der innere als *heavy-strand* (H-Strang) bezeichnet [24]. Die Lage der Gene sowie die üblichen Abkürzungen sind in Tab. 7.1 (s. Anhang S. 97) erläutert.

Im Vergleich zur nukleären DNA besitzt die mitochondriale DNA (mtDNA) eine kompaktere Struktur. Sie ist nicht mit Histonen verbunden und verfügt über keine Introns oder Startboxen (TATA-Boxen) [5]. Insgesamt gibt es nur drei nicht-kodierende Bereiche, deren größter 1123 bp umfasst und als Displacement-Loop (D-Loop) bezeichnet wird [3]. Dieser Bereich reguliert die Replikation und Transkription der mtDNA, beinhaltet den Startpunkt der Replikation des H-Stranges (O_H) und ist wahrscheinlich über Proteine mit der inneren Membran der Mitochondrien verbunden [1].

Das mitochondriale Genom unterliegt fast ausschließlich einem maternalen Vererbungsmodus, entgegen den Mendel'schen Regeln [46]. Das Oozyten-Zytoplasma enthält 2 bis 3×10^5 Kopien des Genoms [74]. Zwar sind geringe Mengen paternal vererbter Mitochondrien beschrieben, die aber mit einem Anteil von 10^{-4} an der gesamten mtDNA keine signifikante Rolle beim Vererbungsmodus spielen [53].

1.3.3 Mitochondriale Alterstheorie und Entstehung mitochondrialer Genomveränderungen

Jeder Zell- oder Gewebetyp benötigt zur Aufrechterhaltung der Zellfunktionen ein Minimum an Energie, welche vor allem durch mitochondrial synthetisiertes ATP bereitgestellt wird. Geschädigte mtDNA verursacht eine Dysfunktion der oxidativen Phosphorylierung und führt somit zu einer eingeschränkten Energiebereitstellung. Die Unterschreitung eines bestimmten Energieniveaus (Schwellenwert) führt zu einer Beeinträchtigung der Zell- und Gewebefunktionen und endet letztlich im Zell- und Gewebetod. Die mitochondriale bioenergetische Funktion wird aus verschiedenen Gründen gefährdet [190] (Abb. 1.7).

Da die mitochondriale DNA für einen Teil ihrer Atmungskettenenzyme selbst kodiert, können mitochondriale Mutationen eine Ursache für die Dysfunktion der oxidativen Phosphorylierung sein. Diese Mutationen, die sich bereits innerhalb

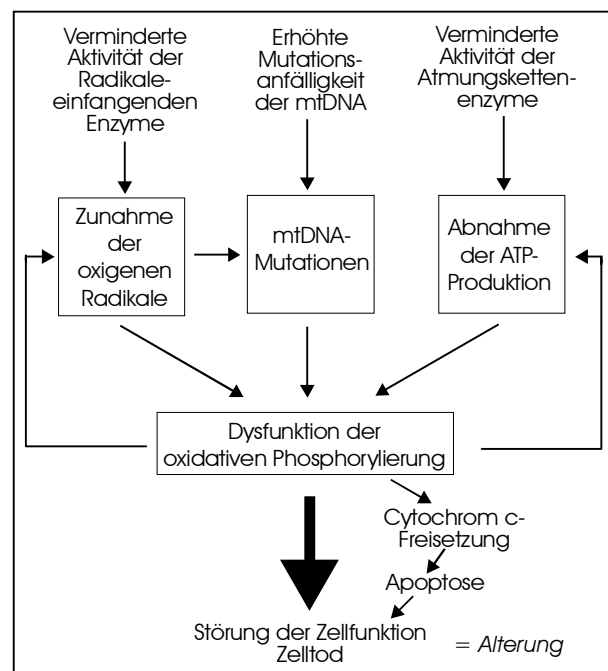


Abb. 1.7: Mitochondriale Alterstheorie

einer Generation manifestieren können [69], sind teilweise die Folge einer 10 bis 20fach höheren Mutationsanfälligkeit der mtDNA im Gegensatz zur nukleären DNA [17]. Hinzu kommt die besondere Verwundbarkeit der mtDNA gegenüber schädigenden Einflüssen, da ihr schützende Proteine, wie beispielsweise Histonen, fehlen. Mutationen führen somit unweigerlich zu funktionsunfähigen Genprodukten. Weiterhin findet eine hohe Replikationsrate ohne Kontrolllesen statt, mit einem im Vergleich zum Nukleus weniger gut ausgeprägten Repertoire an Reparaturenzymen [25].

Darüber hinaus können mitochondriale Mutationen zusätzlich durch oxidative Prozesse der Organellen bedingt sein (s. Kapitel 1.1.2.5). Zahlreiche reaktive Sauerstoffradikale aus den Redoxreaktionen der oxidativen Phosphorylierung, deren Produktionsrate im Alter bei vielen Säugern steigt [160], schädigen die mtDNA, die durch ihre Lage innerhalb der inneren Membran besonders gefährdet ist [126]. Hinzu kommt ein Anstieg der Radikale mit zunehmendem Alter. Dies ist einerseits bei vielen Säugern durch eine gesteigerte Produktionsrate im Alter bedingt, andererseits auch durch eine altersbedingte verminderte Aktivität der Peroxydasen, also Enzymen mit der Fähigkeit, Radikale zu neutralisieren. Darüber hinaus sind mitochondriale DNA-Schäden in menschlichen Zellen nach oxidativem Stress ausgeprägter und langlebiger als in nukleärer DNA [181].

Eine altersbedingte Aktivitätsabnahme der Elektronentransport-Komplexe verstärkt die Dysfunktion der oxidativen Phosphorylierung zusätzlich [131]. Schließlich kommt es bei einer gestörten Atmungskette durch die Freisetzung der mitochondrialen Vorräte an Kaspase-Aktivatoren (Cytochrome c eingeschlossen) zum mitochondrial vermittelten Zelltod in Form von Nekrose oder Apoptose [48].

Im mitochondrial bedingten Altern laufen somit Prozesse ab, die einmal in Gang gebracht, sich gegenseitig verstärken und nicht mehr aufzuhalten sind.

1.3.4 Mitochondriale Mutationen und assoziierte Erkrankungen

1988 wurde von Holt in Form einer Erblindung junger Erwachsener (Lebers hereditäre optische Neuropathie, LHON) das erste Krankheitsbild beschrieben, das mit pathogener Veränderung der mitochondrialen DNA in Zusammenhang gebracht wurde [70]. In den darauffolgenden Jahren wurden eine Reihe von mitochondrialen Veränderungen einem breiten Spektrum unterschiedlichster Krankheitsbilder von leichten Bewegungsstörungen bis hin zu komplexen Multisystem-Erkrankungen zugeordnet. Aufgrund der

klinischen Heterogenität der Krankheitsbilder und der beobachteten Variabilität der biochemischen Effekte wurde eine Einteilung nach den mit den Krankheitsbildern assoziierten genetischen Veränderungen in Genom- und Genmutationen vorgenommen.

Genommutationen führen entweder zu einem Verlust an genetischem Material (Deletionen) oder zu Duplikationen mitochondrialer Gene. Deletionen sind als Phänotypen vor allem durch das im jugendlichen Alter auftretende Kearns-Sayre-Syndrom (KSS) und der später auftretenden chronisch-progressiven, externen Ophthalmoplegie (CPEO-Syndrom) klinisch erfassbar [134]. Charakteristisch sind hierbei ophthalmologische Veränderungen und Defekte [111]. Deletionen mitochondrialer DNA entstehen in einem Großteil der Fälle bei den Reifeteilungen oder während der Embryogenese [153], können in seltenen Fällen aber auch maternal vererbt werden [129]. Inzwischen sind mehr als 100 Deletionen charakterisiert worden, wobei die 4.977 bp-Deletion mit 30 - 50 % am häufigsten vorkommt [172]. Duplikationen werden meistens mit ähnlichen Phänotypen in Verbindung gebracht wie Deletionen, treten aber viel seltener auf und entstehen vermutlich ebenfalls durch Störungen der Genom-Replikation [142].

Genmutationen betreffen entweder mitochondriale Strukturgene oder für deren Expression (Biogenese) funktionell notwendige Gene in Form von Aminosäure-Substitutionen (Punktmutationen). Diese Punktmutationen äußern sich unter anderem als ophthalmologische und neurologische Veränderungen in folgenden Erkrankungen:

- **L**ebers **h**ereditäre **o**ptische **N**europathie (LHON)
- **N**eurogene Muskelschwäche, **A**taxie und **R**etinitis **p**igmentosa (NARP)
- Subakute nekrotisierende Enzephalomyopathie (Morbus Leigh)
- **M** yoklonus-**E**pilepsie mit *ragged red fibers* (MERRF)
- **M**itochondriale **E**nzephalopathie, **L**aktat-**A**zidose und **S**chlaganfall (MELAS)
- **M**itochondriale, maternal vererbte **M**yopathie und **C**ardiomyopathie (MMC)
- **L**etale **i**nfantile **m**itochondriale **M**yopathie (LIMM).

Von allgemeinem Interesse dürfte die Tatsache sein, dass Mutationen in mitochondrialer DNA bei vielen Fällen von Diabetes mellitus, Herzversagen und chronisch-degenerativen Gehirn- und Muskelerkrankungen, wie z. B. der Alzheimer- oder Parkinson-Erkrankung sowie motorische Störungen, eine bedeutende Rolle spielen [75, 90, 191].

1.4 Die 4.977 bp-Deletion in mitochondrialer DNA

1.4.1 Lokalisation der 4.977 bp-Deletion

Die 4.977 bp-Deletion ist die bekannteste große (kbp) Deletion in mitochondrialer DNA, welche die Nukleotide von 8.483 bis 13.459 umfasst (Abb. 1.8 a,b) [4].

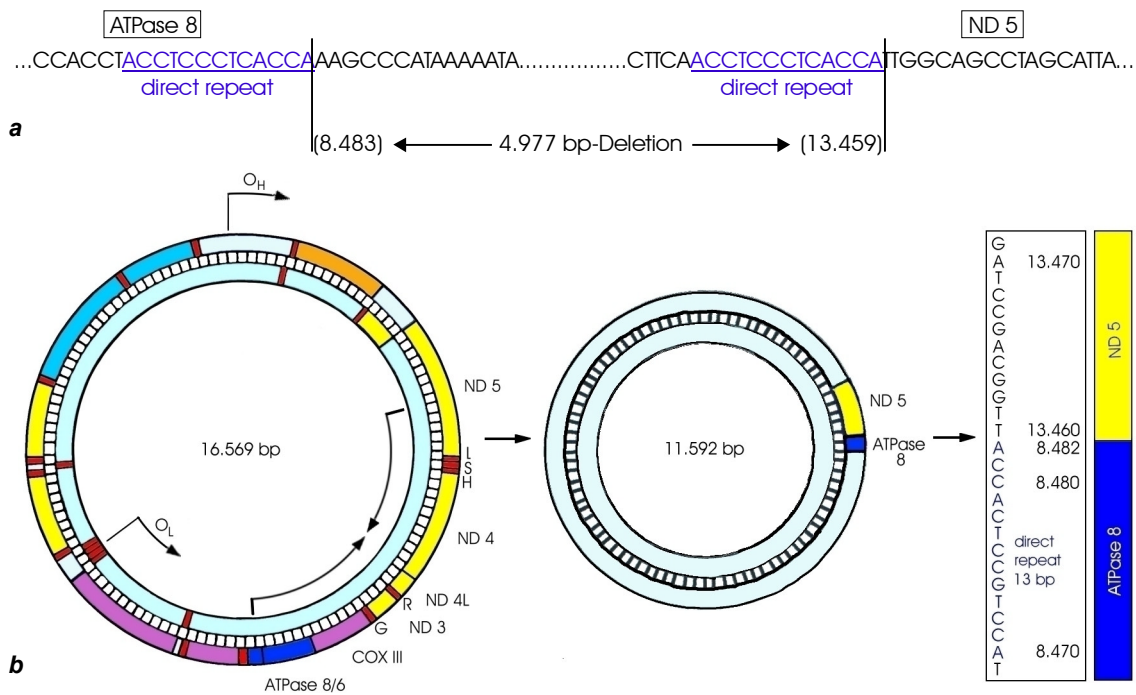


Abb. 1.8 a,b: Lage der 4.977 bp-Deletion in mitochondrialer DNA

a Darstellung der Nukleotidsequenz mit den die 4.977 bp-Deletion flankierenden identischen 13 bp-DNA-Sequenzen (*direct repeats*) und **b** der zirkulären mtDNA mit und ohne die 4.977 bp-Deletion. Dargestellt ist zusätzlich die DNA-Sequenz um die Fusionsstelle in deletierter mtDNA (gelesen vom L-Strang in 5' - 3'-Richtung).

Sie wird flankiert von zwei kurzen, identischen DNA-Sequenzen (*direct repeats*, DR 2: 8.470 - 8.482, DR 1: 13.447 - 13.459: ACCTCCCTCACCA) in einer Länge von 13 bp, die wahrscheinlich der Ausgangspunkt für das Entstehen dieser Deletion sind [150]. Diese ungewöhnlichen DNA-Strukturen könnten zum einen in der durch freie Radikale empfindlich gemachten mitochondrialen DNA (s. Kapitel 1.1.2.5 und 1.3.3) als Erkennungsmotive für die intramolekulare Rekombination dienen [109], zum anderen könnte es durch sie zum *slipped mispairing* kommen [156], was wahrscheinlicher ist.

Das *slipped mispairing* (Abb. 1.9 a-c) ist ein fehlgeleiteter Mechanismus, der während der Replikation der mtDNA stattfindet. Dieses Modell ist deshalb wahrscheinlich, da die DNA-Sequenzwiederholung an den Nukleotidpositionen von 13.447 bis 13.459 (DR 1) nach erfolgter Deletion erhalten bleibt, wohingegen die Sequenzwiederholung

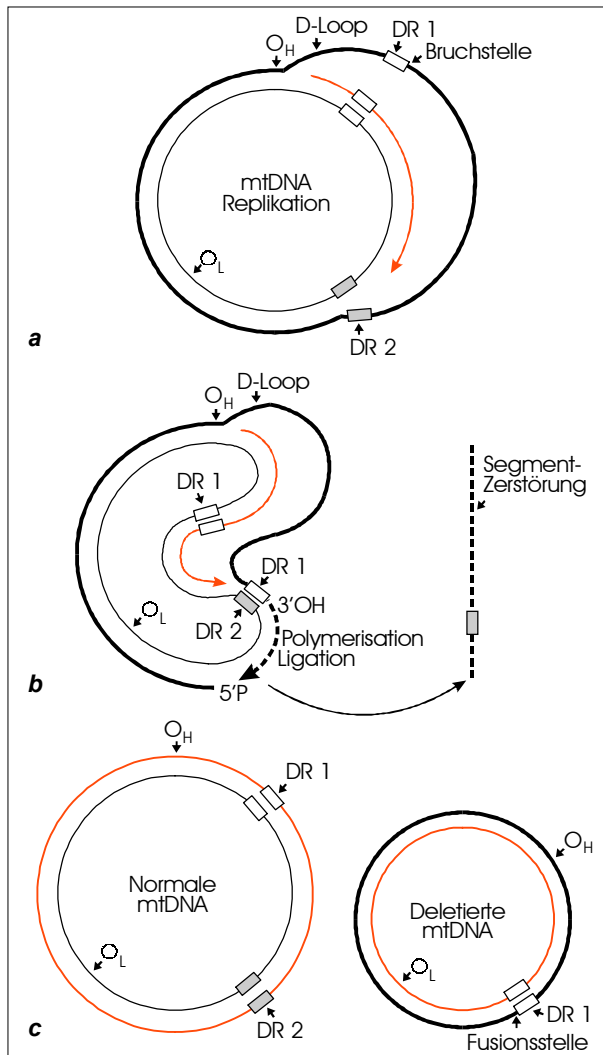


Abb. 1.9 a-c: Darstellung des hypothetischen *slipped mispairing* - Replikations - Modells zur Entstehung der 4.977 bp-Deletion in mtDNA. **a** Aufgabelung der Stränge **b** Anlagerung von DR 1 des H-Stranges an DR 2 des L-Stranges **c** Entstehung von normaler und deletierter mtDNA

an den Nukleotidpositionen von 8.470 bis 8.482 (DR 2) mit der 4.977 bp-Deletion verloren geht. Die Replikation mitochondrialer DNA ist ein bidirektionaler und asynchroner Prozess, der in der D-Loop-Region beginnt, die den Startpunkt der Replikation des H-Stranges (O_H) enthält. Der H-Strang wird im Uhrzeigersinn synthetisiert. Die Replikation des L-Stranges in umgekehrter Richtung beginnt erst nach 2/3 der H-Strang-Elongation, nachdem der Replikationsursprung des L-Stranges (O_L) freigesetzt wurde. Durch die Aufgabelung des H- und L-Stranges während der Replikation (Abb. 1.9 a) kann sich DR 1 des H-Stranges an DR 2 des L-Stranges anlagern (Abb. 1.9 b). Sobald ein Bruch innerhalb des H-Stranges nach DR 1 eintritt, schreitet die Replikation des H-Stranges entlang des L-Stranges weiter fort. Nach Zerstörung des freien H-Stranges und Ligation des ver-

längerten H-Stranges ergibt sich die 4.977 bp-Deletion (Abb. 1.9 b). Mit Vervollständigung der Replikation entsteht somit eine normale mtDNA aus dem zugrunde liegenden L-Strang und deletierte mtDNA aus dem durch *slipped mispairing* neu entstandenen H-Strang (Abb. 1.9 c).

Durch die 4.977 bp-Deletion gehen neben essentiellen tRNA-Genen wichtige Gene der Atmungskette verloren, wie ATPase 6, COX III, ND 3, ND 4, ND 4L sowie ein Teil von ATPase 8 und ND 5 (Tab. 7.1, s. Anhang S. 97). Durch die somit funktionsunfähigen Atmungskettenenzyme ATP-Synthase, Cytochrom c-Oxidase und NADH-CoQ-

Oxidoreduktase kann es je nach Anzahl der betroffenen Mitochondrien zu einer Störung der Energieversorgung der Zelle kommen (s. Kapitel 1.3.3).

1.4.2 Bisherige Untersuchungen der 4.977 bp-Deletion

Untersucht wurde die 4.977 bp-Deletion bisher in mitochondrialen und degenerativen Erkrankungen, wie dem Kearns-Sayre-Syndrom (KSS) [115], der chronisch-progressiven externen Ophthalmoplegie (CPEO) [83] und anderen okularen oder kardialen Myopathien [128], der Enzephalomyopathie [20], der Herzischämie [29], der peripheren arteriellen Gefäßerkrankung [9], der Parkinson- [75] und Alzheimer-Erkrankung [90], der Leberzirrhose [182] und dem Pearson's Pankreas Syndrom [159]. An den untersuchten Skelettmuskel- und Gehirngeweben wurde im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen eine starke Anhäufung der 4.977 bp-Deletion registriert. Bis zu 5 % der gesamten mtDNA können in diesen pathologisch veränderten Geweben deletiert sein. Kleine Mengen dieser Deletion wurden auch im Blut einiger Personen mit KSS [40], Pearson's Pankreas Syndrom [159] sowie mitochondrialen Myopathien [132] nachgewiesen. Bei einer Verstärkung der klinischen Manifestation der jeweiligen Erkrankung wurde auch ein zunehmender Anteil an deletierter mtDNA registriert.

Im Rahmen dieser Forschungen um mitochondriale Erkrankungen wurde von einer altersabhängigen Akkumulation der 4.977 bp-Deletion bei Personen aus den Kontrollgruppen zuerst von Linnane et al. (1990) [91], Cortopassi und Arnheim (1990) [30] und Yen et al. (1991) [185] berichtet. In den darauffolgenden Jahren konnte diese Deletion in verschiedenen menschlichen Geweben, wie Leber, Skelettmuskulatur, Gehirn, Herz, Lunge, Milz, Zwerchfell, Niere und Nebenniere gesunder Personen nachgewiesen werden. Neben der 4.977 bp-Deletion wurden auch weitere mit dem Alter assoziierte große Deletionen in mtDNA, wie die 7.436 bp-Deletion im Herzgewebe [61] und die 6.063 bp-Deletion im Lebergewebe [184], entdeckt. Jedoch ist unter physiologischen Bedingungen die gesamte deletierte mtDNA mit ungefähr 0,3 % sehr gering im Vergleich zu dem Deletionsanteil bei mitochondrialen Myopathien und Enzephalopathien [128, 190]. Aufgefallen war des Weiteren eine unterschiedliche Anhäufung der 4.977 bp-Deletion abhängig von der jeweiligen Gewebeart, wobei bisher im Gehirn und in der Skelettmuskulatur der größte Anteil deletierter mtDNA ermittelt wurde [27].

Widersprüchlich bleiben jedoch die Ergebnisse über das Vorkommen der 4.977 bp-Deletion im Blut gesunder Personen. In der Mehrzahl der Studien war diese Deletion

nicht nachweisbar [10, 88, 147, 185]. Einer Arbeitsgruppe gelang es 1995 deletionsspezifische Fragmente in einigen Blut- und Knochenmarkszellen gesunder Personen mit Hilfe der *nested PCR* zu erfassen [44]. Später gelang dies auch ohne *nested PCR* in postmortal und intravital entnommenem Blut von gesunden Personen über 20 Jahren, wobei hier eine eindeutig altersabhängige Akkumulation der Deletion nicht nachgewiesen werden konnte [180].

Die bisher gängigste Methode zum Nachweis der 4.977 bp-Deletion umfasst die Amplifikation deletionsspezifischer DNA-Fragmente und ihre anschließende Detektion in Polyacrylamid- oder Agarosegelen [88, 128, 185]. Mit dieser Methode kann jedoch lediglich das Vorhandensein der Deletion nachgewiesen werden. Ziel war es aber, die Menge der deletierten mtDNA über das gesamte Lebensalter zu quantifizieren, wofür die Entwicklung der quantitativen PCR entscheidend war [29, 30, 127, 158].

Alle bisherigen Quantifizierungsversuche der 4.977 bp-Deletion, die bisher lediglich an einzelnen Geweben vorgenommen wurden, blieben ungenau. Eine dieser angewandten Methoden war die Verdünnungsmethode. Hierbei wurde der Anteil der deletierten mtDNA durch den höchsten Verdünnungsgrad, bei dem ein deletionsspezifisches PCR-Fragment auf einem Gel gerade noch sichtbar ist, bestimmt [27, 88]. In einer weiteren Methode wurde mittels Laser-Densitometrie die Intensität der deletionsspezifischen Bande auf einem Gel mit der Bande der gesamten mtDNA verglichen [190].

Zwei deutsche Arbeitsgruppen, die sich zum Zeitpunkt der Entstehung dieser Arbeit mit der 4.977 bp-Deletion in mitochondrialer DNA beschäftigen, stammen aus dem Lübecker Institut für Rechtsmedizin und dem Münchner Institut für Pathologie. Die Methode der Lübecker Arbeitsgruppe beschränkt sich auf das bloße Nachweisen der 4.977 bp-Deletion in der Skelettmuskulatur [104] und dem Blut [180] gesunder Personen mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese und anschließender Silberfärbung. Die Münchner Arbeitsgruppe hingegen erarbeitete eine geeignete Quantifizierungsmethode an Herz-, Skelettmuskel-, Leber- und Nierengewebe einer Person mit KSS, die modifiziert grundlegend für diese Arbeit war [115, 152]. Zwei DNA-Fragmente, stellvertretend für deletierte und normale mtDNA, wurden in einem gemeinsamen Amplifikationsansatz (Koamplifikation) vervielfältigt. Die Quantifizierung erfolgte durch Registrierung der radioaktiv-markierten (^{32}P) mtDNA-Fragmente im Szintillationszähler bzw. durch densitometrische Analysen nach Auftrennung in Agarosegelen.

1.5 Zielsetzung

Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten der 4.977 bp-Deletion in menschlicher mitochondrialer DNA und dem Lebensalter einer Person ist von vielen Arbeitsgruppen bereits bestätigt worden. Die meisten der bisherigen Studien beschäftigen sich jedoch lediglich mit dem bloßen Nachweis dieser Deletion und bleiben eine geeignete Methode zur altersabhängigen Quantifizierung schuldig. Das bisher untersuchte biologische Material zum Nachweis dieser Deletion beschränkt sich vornehmlich auf einzelne Gewebearten, vor allem Gehirn-, Skelettmuskel- und Herzgewebe, geringer Probenanzahl. Ergebnisse über das Vorkommen der 4.977 bp-Deletion im Blut gesunder Personen bleiben widersprüchlich.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es deshalb, mittels einer geeigneten Methode den Anteil der 4.977 bp-deletierten mtDNA in seinem altersabhängigen Auftreten zu quantifizieren, um durch anschließende statistische Auswertung die Altersabhängigkeit der 4.977 bp-Deletion bewerten zu können. Des Weiteren soll ein breiteres Spektrum biologischer Materialien in diese Arbeit miteinbezogen werden, wobei gerade auch Materialien lebender Personen eingeschlossen sein sollen. Es sollen verschiedene formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Gewebearten, aber auch frisches Gewebe, Blut, Mundschleimhautabstriche und Haarwurzeln in statistisch ausreichender Probenanzahl von Personen eines breiten Altersspektrums untersucht werden. Zusätzlich soll durch Gegenüberstellung der untersuchten Materialien die Frage einer Abhängigkeit der 4.977 bp-Deletion von dem jeweiligen biologischen Material geklärt werden.

Mittels geeigneter DNA-Extraktionsmethoden soll aus diesen verschiedenen Materialien eine ausreichende DNA-Menge gewonnen werden, um mit Hilfe einer optimierten PCR jeweils ein Amplifikationsprodukt stellvertretend für die deletierte und die normale mtDNA in einem gemeinsamen Ansatz vervielfältigen zu können. Nach Auftrennung der Amplifizierungsprodukte in der Kapillarelektrophorese sollen mittels Computerprogrammen die Peakflächen der beiden relevanten DNA-Fragmente ermittelt und verglichen werden. Hieraus soll sich ein Quotient I_{Del}/I_{Norm} als Maß für den Anteil der deletierten zur normalen mtDNA errechnen lassen.

Abschließend wird die in dieser Arbeit angewandte Methode zur Quantifizierung der Deletion bewertet, um die 4.977 bp-Deletion auf ihre praktische Anwendbarkeit zur Lebensalterschätzung in rechtsmedizinischen Fragestellungen zu prüfen.

2 Material und Methoden

2.1 Herkunft und Beschaffenheit des Untersuchungsmaterials

Biologische Materialien, wie unterschiedliche Gewebearten, Blut, Mundschleimhautabstriche und Haarwurzeln, bildeten den Gegenstand der folgenden Untersuchung, die an insgesamt 324 Personen im Alter von 1 bis 96 Jahren durchgeführt wurde.

Analysiert wurde formalinfixiertes, in Paraffin eingebettetes Gewebematerial aus Fällen des Instituts für Rechtsmedizin der Universität Würzburg aus dem Zeitraum von 1/94 bis 10/99. Die verschiedenen Gewebearten Gehirn, Herz, Lunge, Milz, Niere, Leber und Haut wurden durch die zugehörigen histologischen Schnitte der einzelnen Gewebestücke mikroskopisch identifiziert.

Die untersuchten Blutproben wurden als venöses Vollblut aus der Ellenbeuge in EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)-Monovetten entnommen. Einerseits wirkt das darin enthaltene EDTA (1 mg/ml) durch die Bindung von Calcium gerinnungshemmend und verhindert so die Koagulation des Blutes, andererseits verhindert es durch Hemmung der Endonukleasen die Degradation der DNA. Zusätzlich stand getrocknetes Blut in Form von Blutflecken auf Leinenläppchen zur Verfügung.

Mundschleimhautepithelzellen wurden als Mundschleimhautabstrich (MSA) mittels eines Abstrichkämmchens durch Entlangstreichen an der Wangeninnenseite gewonnen. Die MSA-Proben stammen von Personen aus dem Umkreis Würzburgs. Sie wurden, geschützt vor Kontamination, luftgetrocknet und anschließend in sterilen Sarstedt-Röhrchen bei Raumtemperatur (RT) aufbewahrt.

Des Weiteren wurde noch biologisches Material von vier Leichen miteinbezogen, die im Zeitraum von 9/99 bis 11/99 ebenfalls im oben genannten Institut eingegangen waren. Bei diesen wurden zwischen 24 und 72 Stunden nach Todeseintritt, ohne Anzeichen einer beginnenden Fäulnis, Blut, MSAs, Haarwurzeln und frisches Gewebe, wie Gehirn, Skelettmuskulatur (M. iliopsoas), Herz, Leber und Haut entnommen. Die 1 cm³ großen Gewebestücke wurden anschließend in sterilen Sarstedt-Röhrchen eingefroren.

Es sei darauf hingewiesen, dass bei allen untersuchten Personen schwerwiegende mitochondriale und sonstige die Ergebnisse beeinflussende Krankheiten durch Befragung bzw. durch Einbeziehen der Fallakten ausgeschlossen werden konnten.

2.2 Instrumente und Reagenzien

Im Folgenden werden die verwendeten Instrumente und Reagenzien aufgelistet und mit den jeweiligen Herstellern angegeben.

2.2.1 Nukleotide und Oligonukleotide

dNTPs Amersham Pharmacia, Freiburg

Oligonukleotide (Tab. 2.1) MWG/Biotech, Ebersberg

(Nukleotidsequenzen aus der Literatur: Müller-Höcker et al., 1998 [115])

Tab. 2.1: Oligonukleotidprimer für die PCR und die Sequenzierung

Oligonukleotid	Primersequenz 5'-3'	Größe [bp]	Markierung ¹	Position bez. der 4.977 bp-Deletion ²	Nukleotidposition
Out fw (I)	CCC AAC TAA ATA CTA CCG TAT GG	184	FAM	außerhalb	8.370 - 8.392
Out rev (II)	GGT TTC GAT GAT GTG GTC TTT G		-	außerhalb	13.530 - 13.509
In fw (III)	CTG AGC CTT TTA CCA CTC CAG	142	FAM	innerhalb	9.500 - 9.520
In rev (IV)	GGT GAT TGA TAC TCC TGA TGC G		-	innerhalb	9.641 - 9.619
Out fw (V)	CCC AAC TAA ATA CTA CCG TAT GG		-	außerhalb	8.370 - 8.392
In fw (VI)	CTG AGC CTT TTA CCA CTC CAG		-	innerhalb	9.500 - 9.520

¹ 5'-Markierung des Oligonukleotids mit Fluoreszenzfarbstoff

² nt 8.483 – 13.459

2.2.2 Enzyme

Proteinase K (10 mg/ml) Merck, Darmstadt

Taq-Polymerasen (AmpliTaq®) Applied Biosystems, Foster City, USA (inklusive 10x Reaktionspuffer)

BigDye-TRR-Kit (inklusive Taq-Polymerase) Applied Biosystems, Foster City, USA

2.2.3 Marker und Längenstandards

100 bp-Leiter (100 bp bis 1.500 bp) Gibco BRL, Eggenstadt

Genescan-500 ROX Applied Biosystems, Foster City, USA

2.2.4 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Salze waren von höchstem analytischen Reinheitsgrad (p. a.) und wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Biorad (München), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

2.2.5 Geräte

Pipetten	Eppendorf-Mikroliter-Pipetten verschiedener Volumina, Hamburg
Computer-Software:	
<i>Genotyper 2.0</i>	} Applied Biosystems, Foster City, USA
<i>310 GeneScan Analysis 2.0.2</i>	
<i>ABI Prism Collection 2.0.2</i>	
<i>Sequencing Analysis 2.1.1</i>	
<i>Sequence Navigator 1.1</i>	
WinMEDAS (Statistik-Programm)	Fa. Grund, Margetshöchheim
Elektrophoresekammer	Amersham Pharmacia, Freiburg
Kapillarelektrophorese	ABI Prism™ Genetic Analyser 310, Applied Biosystems, Foster City, USA
Mikroskop	Zeiss, Frankfurt
Mikrotom	Microm HM 400, Walldorf
Spannungsgeräte	Amersham Pharmacia, Freiburg
Thermocycler	Applied Biosystems 2400/480, Foster City, USA und Biometra, Göttingen
UV-Photometer	Bio-Rad Smartspec 3000, München
Waagen	Satorius, Sauter Feinwaage
Wasserbad	Lauda
Zentrifugen	Hettich Mikroliter, Hereus Biofuge 17 RS

2.2.6 Sonstige Materialien

Auftragsplättchen (für die Gelelektrophorese)	Amersham Pharmacia, Freiburg
EDTA-Monovetten	Sarstedt, Nümbrecht
Filterpapierstreifen (für die Gelelektrophorese)	Schleicher und Schüll, Dassel
Gel-Bond-Film	Amersham Pharmacia, Freiburg
Mundschleimhautabstrich-Kämmchen (C.E.P. Swabs)	Gibco BRL, Karlsruhe
Plastikware	Eppendorf, Nunc, Greiner, ART sterile Filterspitzen
Zentrifugenfritte	Promega, Art.-Nr. A7211, Mannheim

2.3 Extraktion der DNA

2.3.1 DNA-Extraktion aus formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe (modifiziert nach Banerjee et al., 1995 [7])

Material

Verdauungspuffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8,5; 1 mM EDTA; 0,5 % Tween
Proteinase K (10 mg/ml)

Anhand einer modifizierten Methode zur DNA-Extraktion mittels Mikrowellen-Behandlung wurde die DNA aus Gewebestücken gewonnen, die formalinfixiert und in Paraffin eingebettet waren (Abb. 2.1). Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden Schnitte der archivierten Paraffin-Blöcke in einer Dicke von 5 µm angefertigt. Drei Schnitte jeder Gewebeprobe wurden in ein steriles 1,5 ml Sarstedt-Röhrchen gegeben und mit einer sterilen Pipettenspitze in 200 µl Verdauungspuffer vorsichtig zermahlen.

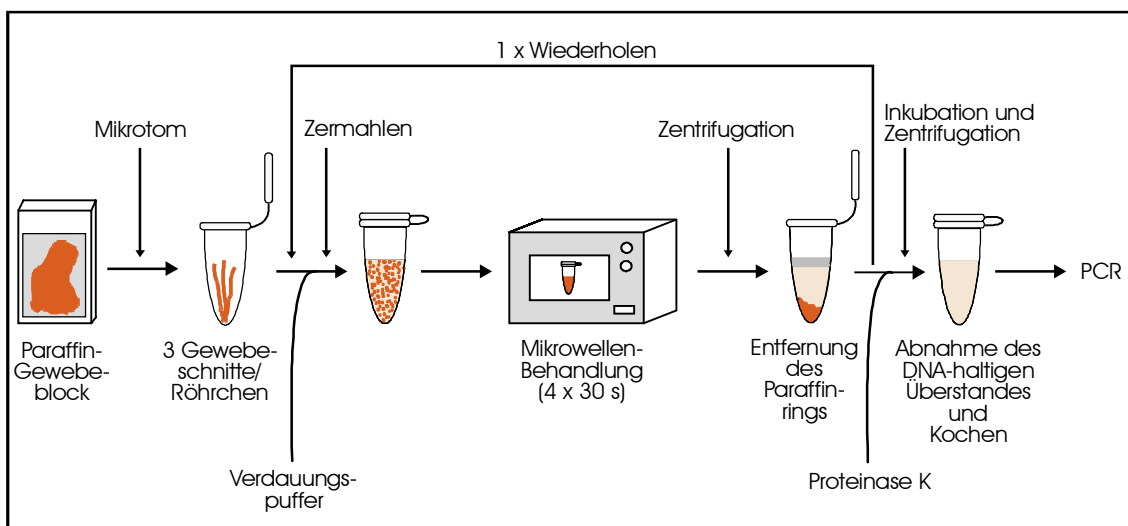


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der DNA-Extraktion aus formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe mittels Mikrowellen-Behandlung

Das Paraffin wurde durch Erhitzen mittels einer Mikrowellen-Behandlung verflüssigt, um es von den darin eingebetteten Gewebestücken zu trennen. Die Röhrchen wurden dicht verschlossen in einen Mikrowellenherd gestellt und bei voller Leistung 2 min lang bestrahlt. Um ein Überkochen der Proben und ein Aufplatzen der Röhrchen zu vermeiden, erfolgte die Bestrahlung in 30 s-Schritten, mit zwischenzeitlichem und abschließendem maschinellen Schütteln. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 12000 g und RT wurde der über dem Puffer entstandene feste Paraffinring vorsichtig mit einer sterilen Pipettenspitze gelöst und entfernt. Der Überstand wurde verworfen. Das Gewe-

besediment wurde erneut in 200 µl Verdauungspuffer resuspendiert, und die Mikrowellen-Behandlung und Zentrifugation wiederholt. Das nun weitgehend paraffinfreie Gewebesediment wurde nach Verwerfen des Überstandes in 20 µl Verdauungspuffer aufgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß mit 160 µl Verdauungspuffer überführt.

Um die DNA aus den Zellen freisetzen zu können, wurden 20 µl Proteinase K zu jedem Reaktionsgefäß zugegeben. Diese Proben wurden dann über Nacht bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurde 5 min lang bei 6.000 g und RT zentrifugiert, und der DNA-haltige Überstand in ein frisches Röhrchen überführt. Um Proteine, die spätere enzymatische Reaktionen stören würden, zu denaturieren, wurden die Proben 10 min lang gekocht. Nun konnte die DNA-Konzentration dieser Proben gemessen werden.

2.3.2 DNA-Extraktion aus Vollblut (Miller et al., 1988 [108])

2.3.2.1 Zellyse

Material

Erythrozyten-Lyse (EL)-Puffer: 150 mM NH₄Cl; 10 mM KHCO₃; 0,1 mM EDTA (pH 7,4)

PBS: 2,7 mM KCl; 137 mM NaCl; 1,5 mM KH₂PO₄; 1,5 mM Na₂HPO₄ (pH 7,4)

TEN-Puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 10 mM EDTA (pH 8,0); 150 mM NaCl

Zur DNA-Extraktion aus Vollblut wurde die schnelle Methode der Kältehämolysen von kernfreien Erythrozyten mit anschließender Salzfällung der DNA aus Leukozyten gewählt. Alle verwendeten Lösungen wurden hierzu auf 4 °C vorgekühlt. Da Porphyrinverbindungen die PCR empfindlich stören, wurden die roten Blutkörperchen lysiert und anschließend die Leukozyten abzentrifugiert. Zur Entfernung der Erythrozytenschatten wurden 5 ml venöses Vollblut mit 50 ml EL-Puffer gemischt und 15 min lang bei 4 °C und gelegentlichem Schütteln inkubiert. Die Leukozyten wurden dann abzentrifugiert (1.000 g, 10 min, 4 °C) und der Überstand verworfen. Dieser Lyseschritt wurde wiederholt. Das Zellsediment wurde danach in 20 ml eiskaltem PBS aufgenommen und erneut zentrifugiert (1.000 g, 10 min, 4 °C), um letzte vorhandene Erythrozyten zu entfernen. Die zurückbleibenden, kernhaltigen Zellen wurden in 3 ml TEN-Puffer resuspendiert. Es wurden 30 µl Proteinase K (10 mg/ml) und 30 µl 20 % Natriumdodecylsulfat (SDS) hinzugefügt. Diese Mischung wurde zur Lyse über Nacht bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert.

Anschließend erfolgte eine Salzextraktion, um die reine DNA zu gewinnen.

2.3.2.2 Salzextraktion

Material

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA (pH 8,0)

Der klaren viskösen Mischung aus 2.3.2.1 wurde am nächsten Tag 1,2 ml gesättigte NaCl-Lösung zugegeben. Nach kräftigem Schütteln für 15 s wurden die Zellbestandteile durch Zentrifugation des Röhrchens bei 5.000 g und RT in 15 min sedimentiert.

Der Überstand, der die deproteinisierte DNA enthielt, wurde abgenommen und 2 Volumina 100 % Ethanol hinzugegeben. Das Röhrchen wurde vorsichtig durchmischt, bis die DNA ausfiel. So konnte sie nun mit einer Glaspasteurpipette, deren Spitze zu einer Art Haken abgeschmolzen worden war, aus der Lösung gezogen werden. Die DNA wurde sofort in 70 % Ethanol gewaschen und der überschüssige Alkohol an der Luft abgetrocknet. Schließlich wurde die DNA je nach Größe des DNA-Gespinnstes in ca. 200 µl TE-Puffer gelöst und bei 4 °C gelagert.

2.3.3 DNA-Extraktion mit Chelex-100 (modifiziert nach Walsh et al., 1991 [176])

Material

5 % Chelex-100 Suspension (gelöst in Aqua bidest.)

Proteinase K (10 mg/ml)

Die Chelex-100-Methode zur DNA-Extraktion kam bei den MSAs, den Blutflecken auf Leinenläppchen, den frischen Leichengewebe und den Haarwurzeln zur Anwendung. Aus dem vorderen Anteil der MSA-Kämme wurde jeweils ein 1 mm³ großes Materialstück mit sterilem Besteck herausgeschnitten und in ein steriles Sarstedt-Röhrchen gegeben. Aus den Blutflecken wurde jeweils ein 1 mm² großes Stück Leinenläppchen und aus den frischen Gewebe jeweils ein 8 mm³ großes Gewebestück entnommen. Bei den Haarproben wurde jeweils der Haarschaft knapp über der Haarwurzel abgesetzt, und je 5 Haarwurzeln wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Die hierbei verwendeten Scheren und Pinzetten wurden nach jeder Probe mit 12 - 13 % Natriumhypochloridlösung gesäubert. Die jeweilige Probe wurde mit 150 µl der 5 % Chelex-100-Suspension und 10 µl Proteinase K versetzt, denn das Chelex, ein Chelatbildner, bindet bivalente Metallionen (Ca²⁺) und inhibiert somit DNA-abbauende Ca²⁺-abhängige Enzyme. Anschließend wurde die Suspension 10 s lang maschinell geschüttelt, bevor sie über Nacht (ca. 12 – 15 h lang) bei 37 °C in einem Wasserbad inkubiert wurde, damit

die Proteinase vorhandene Proteine abbauen konnte. Der Ansatz wurde erneut 10 s lang maschinell geschüttelt und anschließend für 8 min im Wasserbad gekocht, um die Proteinase K zu denaturieren. Nach erneutem Schütteln wurde die Suspension abschließend 2 bis 3 min lang bei 15.000 g und RT zentrifugiert.

Die Lagerung der DNA-haltigen Lösung erfolgte bei 4 °C.

2.4 Reinigung der DNA mittels Diatomeen (Günther et al., 1995 [51])

Material

Guanidinthiocyanat-Puffer (L6): 40mM Tris-HCL (pH 6,4); 17,5 mM EDTA (pH 8,0);
1 % Triton-X 100; 40 mM Guanidinthiocyanat;
ad 250 ml H₂O

Diatomeen-Suspension: 20 % (w/v) Diatomeenerde in 1% HCl

Die Extrakte der Chelex-100-Methode (aus Kapitel 2.3.3) wurden zur Reinigung der DNA mittels Diatomeen aufbereitet, um Stoffe, die nachfolgende Reaktionen inhibieren würden, herauszulösen (Abb. 2.2).

70 µl der jeweiligen Extrakte wurden mit 900 µl L6-Puffer versetzt und nach Zugabe von 50 µl Diatomeen-Suspension 5 min lang bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend mit einer Einwegspritze durch eine Zentrifugenfritte gedrückt, wobei sich die Diatomeen mit der daran gebundenen DNA in der Fritte sammelte. Vor allem hochmolekulare DNA bindet sich in Gegenwart des Guanidinthiocyanates an die in der Hülle der Kieselalgen vorhandenen Silikate. Zum Auswaschen des L6-Puffers wurden im Anschluss 2 ml 80 % Isopropanol durch die Fritte gedrückt. Die Zentrifugenfritte

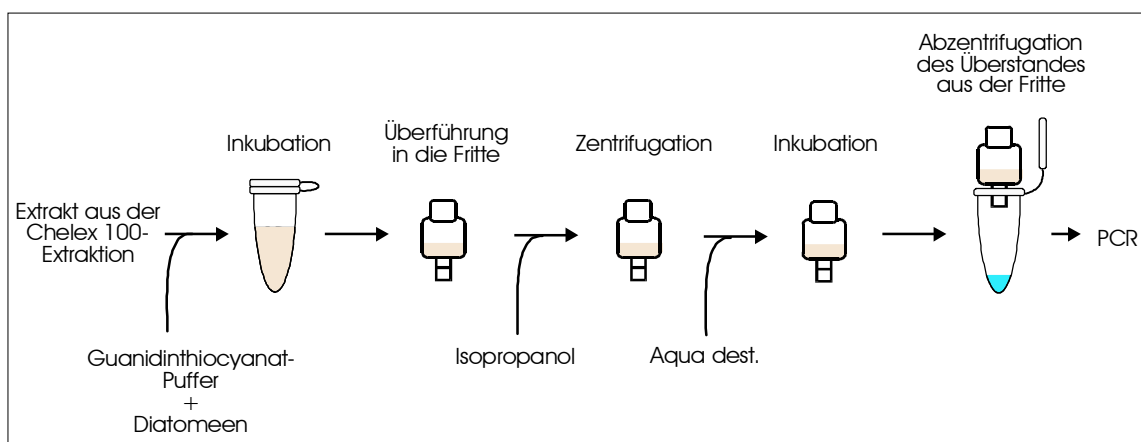


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Aufreinigung von Chelex-100-Extrakten mittels Diatomeen und Guanidinthiocyanat-Puffer (modifiziert nach Günther, 1997 [50])

wurde auf ein Eppendorf-Reaktionsgefäß aufgesetzt. Durch Zentrifugation für 20 s bei 15000 g und RT wurde der Alkohol entfernt. Das Reaktionsgefäß wurde mit dem Filtrat verworfen. Die Fritte wurde einem neuen Eppendorf-Reaktionsgefäß aufgesetzt, und die DNA wurde durch Zugabe von 50 µl Aqua dest. und nach 5-minütiger Inkubation bei RT eluiert. Durch erneutes Zentrifugieren für 1 min bei 15.000 g und RT konnte die DNA von den in der Fritte verbleibenden Diatomeen getrennt werden. Das DNA-haltige Filtrat konnte direkt für die PCR eingesetzt werden.

Die Lagerung der DNA-haltigen Lösung erfolgte bei 4 °C.

2.5 DNA-Konzentrierung durch Alkohol-Fällung (Sambrook et al., 1989 [146])

Ein Teil der gewonnenen DNA-Extrakte wurde einer 4fachen DNA-Konzentrierung unterzogen. Der 40 µl DNA-haltigen Lösung wurden 2,5 Volumina 100 % Ethanol zugegeben. Der nach Zentrifugieren bei 12.000 g und RT für 15 min entstandene Überstand wurde verworfen, das Sediment im Vakuum für 30 bis 45 min getrocknet und in 10 µl Aqua dest. aufgenommen.

2.6 Quantifizierung der extrahierten DNA-Menge

Mit einem Photometer wird die Konzentration von fein verteilten oder gelösten Stoffen in klinisch-chemischen Proben bestimmt. Licht definierter Wellenlänge wird durch eine probenhaltige Küvette geschickt und von den in der Probe enthaltenen Stoffen durch Streuung oder Absorption in seiner Intensität geschwächt. Diese veränderte Lichtintensität wird im Vergleich zum Lösungsmittel bestimmt [133].

Die Absorption der Nukleinsäurelösung im UV-Spektralphotometer bei Wellenlängen im UV-Bereich von 260 nm und 280 nm wurde zur Konzentrationsbestimmung der in wässriger Lösung vorliegenden, extrahierten DNA gemessen. 1 OD₂₆₀ entspricht dabei 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Die Reinheit der DNA konnte durch das Verhältnis der Messwerte bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge abgeschätzt werden. Das Absorptionsmaximum von DNA liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm, während eine hohe Absorption bei 280 nm auf Verunreinigungen hinweist. Das Verhältnis dieser beiden Messwerte, die sogenannte Ratio, sollte bei 1,8 bis 2,0 liegen.

2.7 Enzymatische Amplifizierung mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (Saiki et al., 1985 [145])

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR = *polymerase chain reaction*), 1985 von Kary B. Mullis entwickelt, ist eine *in vitro*-Technik, mit der man gezielt Desoxyribonukleinsäure-(DNA)-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen eingeraht werden, enzymatisch vervielfältigen (amplifizieren) kann (Abb. 2.3).

Der zu amplifizierende Bereich wird von zwei zueinander weisenden DNA-Oligonukleotiden, den Startermolekülen, eingeschlossen, die jeweils an einem der beiden Stränge hybridisieren (Annealing). Ausgehend von diesen beiden sogenannten Primern synthetisiert eine DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* den komplementären Strang der Zielregion von deren 3'-Ende aus (Elongation). Diese thermostabile Polymerase kam zur Anwendung, da sie die kontinuierliche Durchführung der PCR-Zyklen ohne Enzymzugabe ermöglicht. Durch eine Temperaturerhöhung auf ca. 94 °C lösen sich die komplementären Stränge voneinander und die DNA-Polymerase stoppt den Nukleotid-einbau (Denaturierung).

Das entscheidende Prinzip der PCR ist die zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte, d. h. der Denaturierung, des Annealing und der Elongation. Theoretisch

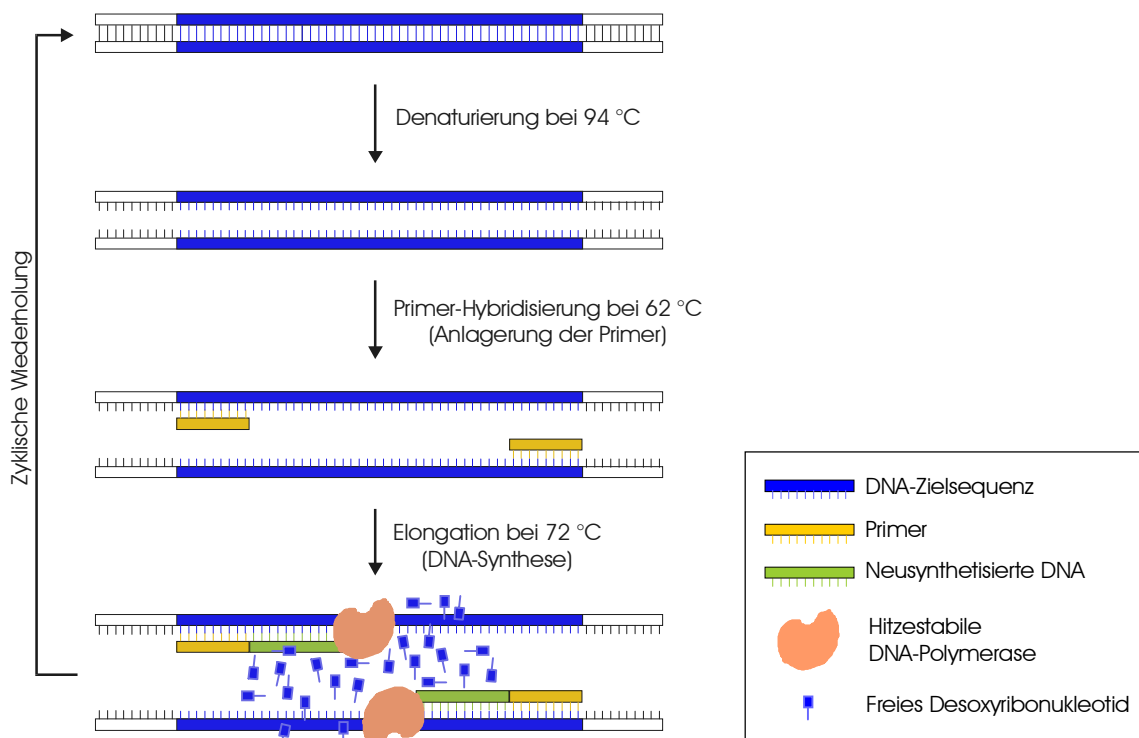


Abb. 2.3: Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Vervielfältigung der DNA-Zielsequenz

wird in jedem Zyklus die Menge des Zielbereiches verdoppelt und somit eine exponentielle Amplifizierung der DNA-Zielsequenz möglich.

Die PCR-Reaktionen werden in Thermocyclern durchgeführt. Darin wird ein zyklisches Temperaturprogramm automatisch gesteuert, wobei die jeweilige Temperatur, die Zeit pro Reaktionsschritt und die Anzahl der Zyklen entsprechend der jeweiligen Anforderungen programmierbar sind [43].

2.7.1 Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion

Material

10x PCR-Reaktionspuffer
 Magnesiumchlorid (MgCl₂)-Lösung (50 mM)
 Taq-Polymerase (5 U/μl)
 Nukleotid-Triphosphat (dNTPs 5 mM)
 Primer (je 5 pmol/μl)

Ausgehend von der entsprechenden Literaturangabe zur Amplifikation der 4.977 bp-Deletion (nach Müller-Höcker et al., 1998 [115]) wurden die Zyklusbedingungen individuell für beide Primerpaare (I, II und III, IV aus Tab. 2.1) optimiert. Angeglichen wurden hier die Temperatur und die Dauer der Primer-Hybridisierungs- und der Kettenverlängerungsphase sowie die MgCl₂-Konzentration, bis ungefähr gleiche Produktmengen beider Primerpaare erreicht wurden. Die Schmelztemperatur (T_m) der Primer errechnet sich annäherungsweise nach folgender Formel

$$T_m = (\sum G + C) \times 4^\circ C + (\sum A + T) \times 2^\circ C - 5^\circ C.$$

Die optimale Magnesiumchloridkonzentration wurde durch Zugabe von 1 bis 7 mM MgCl₂ in 0,5 mM-Schritten bestimmt.

Folgende Lösungen wurden für einen 25 μl PCR-Ansatz in ein steriles Reaktionsgefäß zusammenpipettiert:

gesamte (nukleäre und mitochondriale) DNA ¹
5 pmol/μl je Primer
5 mM dNTPs
10x PCR-Reaktionspuffer
1 - 7 mM MgCl₂
1 U Taq-Polymerase

¹ Die für die Amplifizierung jeweils eingesetzte DNA-Menge war von dem untersuchten biologischen Material abhängig.

Um eine unspezifische Amplifizierung zu vermeiden, wurde die Polymerase zuletzt zugegeben. Dem Ansatz wurden unter Verwendung eines Thermocyclers ohne beheizbaren Deckel zwei Tropfen Mineralöl (Sigma) hinzugefügt, damit es während der Amplifikation nicht zu einer Verdunstung des PCR-Ansatzes kommen konnte. Bei jeder PCR wurden neben den zu amplifizierenden DNA-Proben jeweils eine positive und eine negative Kontrolle mitgeführt.

Als Standardbedingungen der PCR-Reaktion wurden gewählt:

PCR-Schritte	Dauer	Temperatur	
Verzögerungsschritt	1 min	95 °C	erster Schritt
dsDNA-Denaturierung	30 s	94 °C	Zykluszahl
Primer-Hybridisierung	1 min	Primer-abhängige T	
Kettenverlängerung	1 min	72 °C	
Verzögerungsschritt	45 min	72 °C	letzter Schritt

Der letzte Zyklus wies eine um 45 min verlängerte Polymerisationszeit (Verzögerungsschritt) auf, um sicherstellen zu können, dass die noch unvollständig vorliegenden PCR-Produkte fertig synthetisiert wurden.

Schließlich wurde der Reaktionsansatz auf 4 °C abgekühlt.

2.7.2 Etablierung eines Multiplex-Amplifikationsansatzes

Für die vorliegende Untersuchung war es von Bedeutung, beide Amplifikationsprodukte in einem Reaktionsansatz zu vervielfältigen, um die PCR-Ergebnisse direkt miteinander vergleichen zu können. Für diese Koamplifikation beider Primerpaare (Abb. 2.4) war eine Optimierung des sogenannten Multiplex-Amplifikationsansatzes nötig.

In einem Gesamtansatz der Primerpaare wurde die Primerkonzentration in Schritten von 0,1 – 0,2 µM, die Hybridisierungstemperatur in 1 °C – Schritten und die Kettenverlängerungsdauer in Schritten von 30 s verändert.

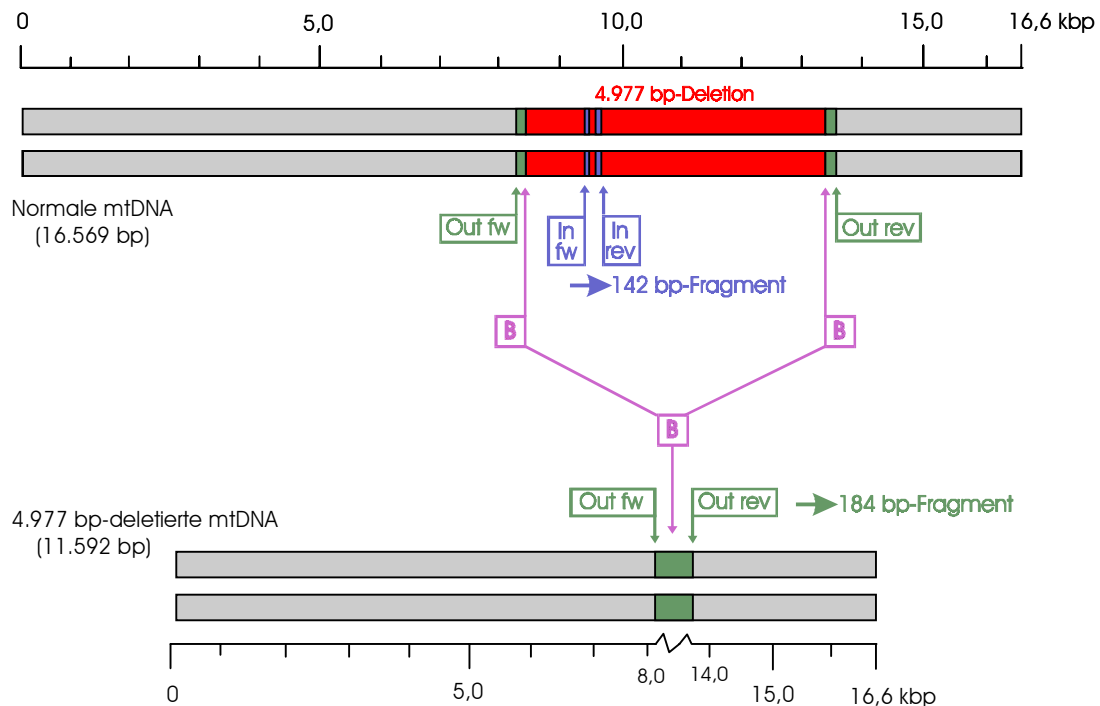


Abb. 2.4: Schematische Präsentation der Primer-Positionen für die Koamplifikation in normaler und deletierter linear dargestellter mtDNA. Die zwei entstehenden PCR-Produkte liegen zwischen nt 9.500-9.641 und nt 8.370-13.530, entsprechend der Cambridge-Sequenz nach Anderson et al. (1981) [3]. fw (*forward*) und rev (*reverse*) geben die Amplifikationsrichtung der Primer an. Das Primerpaar In fw/rev (aus Tab. 2.1) amplifiziert lediglich die normale mtDNA, da in deletierter mtDNA diese Region verlorengegangen ist. Es entsteht ein 142 bp-Fragment. Das Primerpaar Out fw/rev (aus Tab. 2.1) amplifiziert lediglich die deletierte mtDNA, da das 5.160 bp-Fragment zwischen diesen Primern in normaler mtDNA zu groß für eine Amplifikation unter den angewandten Bedingungen wäre. So entsteht ein 184 bp-Fragment. Die deletierte Region der mtDNA liegt zwischen den mit B bezeichneten Bruchstellen.

2.8 Reinigung des PCR-Produktes durch Fällung (Sambrook et al., 1989 [146])

Um überschüssige Oligonukleotide, dNTPs und Taq-Polymerase zu entfernen, erfolgte eine Reinigung des PCR-Produktes durch Fällung mit Ethanol. Zur Präzipitation der DNA wurde 1 Volumen PCR-Lösung mit 1 Volumen 4 M NH₄Ac und 6 Volumina 100 % Ethanol versetzt. Die monovalenten Kationen bildeten in geringen Konzentrationen in Alkohol einen Komplex mit Nukleinsäuren, der durch Zentrifugation für 15 min bei 12000 g und RT abgetrennt wurde. Der entstandene Überstand wurde bis auf 10 µl abgenommen. Unter Zugabe von 250 µl 70 % Ethanol wurde das die PCR-Produkte enthaltende Sediment gewaschen und erneut für 5 min bei 1200 g und RT zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das gereinigte Produkt für 30 - 45 min im Vakuum getrocknet und in 15 µl Aqua dest. aufgenommen.

2.9 Elektrophorese

Als Elektrophorese wird das Verfahren zur analytischen und präparativen Trennung verschiedener Substanzgemische bezeichnet, bei dem man die von den Molekülen getragene elektrische Ladung ausnutzt, durch die sie sich in einem elektrischen Feld bewegen. Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Produkte ist von verschiedenen Faktoren abhängig, wie der elektrischen Ladung, der Molekülgröße und der Beschaffenheit des Gelnetzwerkes. Lineare, doppelsträngige DNA-Moleküle eines eingeschränkten Größenbereiches bewegen sich durch eine Gelmatrix mit einer Geschwindigkeit, die umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus der Anzahl ihrer Basenpaare ist. Auf diese Weise werden bei konstanter elektrischer Ladung und Gelbeschaffenheit die DNA-Moleküle ihrer Größe nach aufgetrennt [16].

2.9.1 Niedrigauflösende Polyacrylamid-Horizontal-Gelelektrophorese (Sambrook et al., 1989 [146])

Material

Acrylamid-Stammlösung: 29,1 % Acrylamid; 0,9 % Bisacrylamid

Tris-Borat-Puffer mit EDTA (5x TBE; pH 9,0): 0,5 M Tris; 0,28 M Borsäure;
0,0125 M EDTA; 0,01 % Bromphenolblau

Ladepuffer: 0,25 % Bromphenolblau; 0,25 % Xylen Cyanol; 25 % Ficoll 400

Die PCR-Produkte aus Kapitel 2.7 wurden direkt in einer niedrigauflösenden Polyacrylamid-Horizontal-Gelelektrophorese analysiert, um die Effizienz der Amplifikation zu überprüfen. Hierbei erfolgte die Abschätzung der Amplifikatgröße anhand einer 100 bp-Leiter.

Um 21 ml Gellösung zu erhalten, wurden in 15,2 ml Aqua dest. 3,5 ml Acrylamid-Stammlösung, 200 µl 10 % Ammoniumperoxodisulfat (PER), 15 µl N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED) und 2,1 ml 5x TBE zugegeben. Die Gellösung wurde luftblasenfrei zwischen zwei 12,5 cm x 26 cm große Glasplatten gegossen, die durch einen Abstandshalter („spacer“) um 0,75 mm getrennt waren. Auf die untere Glasplatte war ein Gel-Bond-Film aufgebracht worden, der so beschichtet war, dass das Gel kovalent gebunden wurde. Nach Abschluss der Polymerisation des Gels (nach ca. 1 h) wurden die Glasplatten getrennt und 4 µl der Proben auf die Auftragsplättchen gegeben, die zuvor auf die Geloberfläche gelegt worden waren. Auf die beiden randbildenden Plättchen wurden jeweils 4 µl der 100 bp-Leiter als Fragment-Längenstandard pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte auf der Kühlplatte der Elektrophoresekammer bei einer

konstanten Temperatur von 10 °C. Um eine optimale Temperaturübertragung zu gewährleisten wurde zwischen die Gel-Bond-Folie und die Kühlplatte eine Schicht destilliertes Wasser gegeben. An die Enden des Geles wurde jeweils ein 0,5 cm breiter Filterpapierstreifen gelegt, der zuvor in 1x TBE mit 0,001 % Bromphenolblau getränkt worden war. Die Elektrophorese erfolgte bei 1000 V, 40 mA und 10 W bis die Bromphenolblau-Front das Gelende erreicht hatte. Zur Detektion der DNA wurde das Gel anschließend einer Silberfärbung (nach Kapitel 2.9.3.1) unterzogen.

2.9.2 Agarose-Gelelektrophorese

Material

Agarose (FMS)

5x TBE (Laufpuffer): 89 mM Tris-Borat pH 7,4; 1 mM EDTA pH 7,4

Ein Teil der PCR-Produkte aus Kapitel 2.7 wurde zur Überprüfung der Amplifikation in einer Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

Zur Herstellung einer 1 % TBE-Agarosegellösung wurde 0,5 g der als Pulver vorliegenden Agarose mit 50 ml 1x TBE versetzt und durch Erhitzen vollständig zur Lösung gebracht. Anschließend wurde die Lösung auf 50 °C abgekühlt und luftblasenfrei in eine mit Kämmen versehene, horizontale Gelkammer gegossen. Nach ca. 15 min war das Gel vollständig gefestigt und wurde nach Entfernen der Kämmen mit 1x TBE-Puffer überschichtet. Die Proben wurden in die entstandenen Taschen pipettiert, und die Elektrophorese erfolgte schließlich bei 80 V für 60 min. Zur Detektion der DNA wurde das Gel anschließend mit Ethidiumbromid (nach Kapitel 2.9.3.2) gefärbt.

2.9.3 Anfärbung von Nukleinsäuren in Gelen

2.9.3.1 Silberfärbung (Budowle et al., 1991 [18])

Material

Entwickler: 0,28 M NaCO₃ (wasserfrei); 0,019 % Formalin

Die Detektion der Banden der in der niedrigauflösenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) aufgetrennten Amplifikate (nach Kapitel 2.9.1) erfolgte durch Silberfärbung. Alle nachfolgenden Schritte wurden in einer Glasschale unter ständigem Schütteln durchgeführt. Nach der Elektrophorese erfolgte die 5-minütige Fixierung des Geles in 1 % Salpetersäure, anschließend wurde 10 s lang mit Aqua dest. gespült, bevor das Gel für 12 min in eine 12 mM Silbernitratlösung gegeben wurde. Nach erneuter

Spülung mit Aqua dest. für ca. 20 s wurde das Gel solange mit der Entwicklerlösung behandelt, bis die Banden deutlich zu erkennen waren. Bei bräunlich-schwarzer Verfärbung der Entwicklerlösung wurde diese erneuert. Nach Entfernung des Entwicklers wurde zum Stoppen der Entwicklerreaktion 10 % Essigsäure für 2 min zugegeben. Nach erneutem Spülen mit Aqua dest. wurde das Gel für 5 min in 5 % Glycerol geschwenkt und anschließend über Nacht bei 80 °C getrocknet.

2.9.3.2 Ethidiumbromidfärbung (Sambrook et al., 1989 [146])

Material

0,5 % Ethidiumbromidlösung (w/v)

Die Detektion der Banden der in der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennten Amplifikate (nach Kapitel 2.9.2) erfolgte mit der Ethidiumbromidfärbung. Zum Nachweis der DNA wurde das Gel 10 min lang unter ständigem Schütteln in eine Ethidiumbromidlösung gegeben. Nach anschließender Spülung des Gels mit Aqua dest. konnten die fluoreszierenden DNA-Fragmente in Form von Banden auf dem UV-Transilluminator betrachtet werden, da sich das Ethidiumbromid in die dsDNA eingelagert hatte. Die Dokumentation erfolgte mit einer Polaroidkamera.

2.9.4 Kapillarelektrophorese

Die Kapillarelektrophorese ist eine Methode zur hochauflösenden Auftrennung von fluoreszenzfarbmarkierten PCR-Produkten bzw. DNA-Fragmenten.

Hierbei wird zuerst die DNA der zu analysierenden Probe durch Hitzedenaturierung in ihre einzelsträngige Form überführt. Anschließend erfolgt die elektrophoretische Auftrennung in einer Glaskapillare. Zur Detektion der DNA-Fragmente wird bei dem angewandten System Fluoreszenzfarbstoff verwendet, der durch einen Argonlaser angeregt wird. Die so erzeugte Fluoreszenz wird von einer CCD (= *charge coupled device*)-Kamera registriert und als elektrisches Signal an den angeschlossenen Computer weitergeleitet und ausgewertet. Die Aufnahme und Auswertung der Rohdaten erfolgt mit speziellen Computerprogrammen.

Bei der vorliegenden Untersuchung wurde die Kapillarelektrophorese (ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) sowohl für die Fragmentanalyse als auch für die Auftrennung des Sequenzierungsproduktes angewandt.

2.9.4.1 Fragmentanalyse

Material

Formamid

Performance Optimized Polymer (POP) 4

10x 310 Genetic Analyser Buffer (mit EDTA)

Bei der Fragmentanalyse wurde die einzelsträngige Form der DNA durch Hitzedenaturierung in Gegenwart von Formamid erzeugt. 0,1 – 3 µl des PCR-Produkts wurden je nach Bandenstärke im Polyacrylamid- und Agarosegel (nach Kapitel 2.9.1 und 2.9.2) mit 12 µl Formamid und mit 0,5 µl fluoreszenzfarbmarkiertem ABI Prism GeneScan 500 (ROX) als internem Größenstandard versetzt. Die Probe wurde 2 min lang bei 95 °C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Nach dem Abkühlen der Probe erfolgte die elektrophoretische Auftrennung im ABI 310er in einer Glaskapillare mit dem Durchmesser von 50 µm und einer Trennstrecke von 36 cm in 24 min bei 15.000 V und einer konstanten Temperatur von 60 °C unter Verwendung von POP 4 (Applied Biosystems). Für die Detektion der PCR-Produkte wurden fluoreszenzmarkierte Primer (aus Tab. 2.1) verwendet. Die Aufnahme der Rohdaten erfolgte mit dem Computerprogramm *ABI Prism 310 Collection*, die Auswertung der Rohdaten und die weitere Analyse mit den Computerprogrammen *Genotyper 2.0* und *GeneScan Analysis 2.0.2*.

2.9.4.2 Auftrennung des Sequenzierungsproduktes

Material

Template Suppression Reagent (TSR)

Performance Optimized Polymer (POP) 6

10x 310 Genetic Analyser Buffer (mit EDTA)

Bei der Auftrennung des Sequenzierungsprodukts wurde die einzelsträngige Form der DNA durch Hitzedenaturierung in Gegenwart von TSR erzeugt. 4 µl des gereinigten Sequenzieransatzes (aus Kapitel 2.10.2) wurden mit 12 µl TSR (Applied Biosystems) versetzt. Die Kapillarelektrophorese der Sequenzierungsreaktion erfolgte entsprechend der Fragmentanalyse bei 50 °C und unter Verwendung von POP 6 (Applied Biosystems). Farbmarkiert sind bei dieser Auftrennung die 2',3'-Didesoxynukleotidtriphosphate, ddATP mit grünem, ddCTP mit blauem, ddGTP mit gelbem und ddTTP mit rotem Farbstoff. Die Aufnahme der Rohdaten erfolgte mit dem Computerprogramm *ABI Prism 310 Collection*, die Auswertung der Rohdaten und die weitere Analyse mit den Programmen *Sequencing Analysis* und *Sequence Navigator*.

2.10 Sequenzierung (modifiziert nach Sanger et al., 1977 [148])

Diese modifizierte Methode nach Sanger wurde zur Überprüfung der Richtigkeit der gewünschten PCR-Produkte angewandt. Sie wird auch als Kettenabbruch- oder Didesoxynukleotidverfahren bezeichnet, da die Fragmente durch kontrollierte Unterbrechung der enzymatischen Replikation erzeugt werden. Dabei wird die DNA zuerst in eine einzelsträngige Form, die Matrize, überführt. Diese Matrizen-DNA wird mit dem Sequenzierungsprimer, einem zu einer einzigen Stelle komplementären Oligonukleotid, hybridisiert. Zur DNA-Synthese wird der Matrizen-DNA in einem Reaktionsgefäß Primer, DNA-Polymerase, 2'-Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) und zusätzlich vier 2',3'-Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTPs, farbmarkierte dNTP-Analoga) zugegeben. In diesem Reaktionsansatz laufen nun zahlreiche Primerverlängerungen ab. Wird ein ddNTP eingebaut, stoppt die Reaktion (Kettenabbruch), denn aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxygruppe kann kein weiteres Nukleotid angefügt werden. Man erhält im Reaktionsansatz eine Vielzahl von DNA-Fragmenten unterschiedlichster Kettenlänge. Das 5'-Ende eines jeden Fragments wird vom Sequenzierungsprimer gebildet, während das 3'-Ende aus dem farbmarkierten Didesoxynukleotid besteht. Die Farbe des Fluoreszenzfarbstoffes signalisiert eine der vier Didesoxyreaktionen, so dass man jede Base anhand ihrer Fluoreszenz identifizieren kann. Im Anschluss an eine Fluoreszenzmessung kann die DNA-Sequenz abgelesen werden.

2.10.1 Cycle-Sequencing

Material

Terminator Ready Reaktion Kit (TRR)

Im Gegensatz zu Kapitel 2.7.1 erfolgte die Amplifizierung hier mit den unmarkierten Primern (aus Tab. 2.1) und einer Erhöhung der Zykluszahl auf 48. Für das Cycle-Sequencing wurden 30 ng aufgereinigtes PCR-Produkt (aus Kapitel 2.8) eingesetzt und mit 2 µl TRR (Applied Biosystems) und je 1 µl unmarkiertem Primer (40 ng/µl) versetzt. Hierbei wurden beide DNA-Stränge sequenziert, um eventuelle Sequenzierungsfehler durch Sekundärstrukturen auszuschließen. Der Ansatz wurde mit Aqua dest. auf 10 µl Gesamtvolumen aufgefüllt, gemischt und mit zwei Tropfen Mineralöl überschichtet. Das Cycle-Sequencing erfolgte im Thermocycler in 25 Zyklen je 30 s Denaturierung bei 95 °C, Primer-Hybridisierung und Kettenverlängerung für 4 min bei 60 °C.

2.10.2 Reinigung des Sequenzierungsproduktes (Günther, 1997 [50])

Da die Farbmakierung nicht eingebauter Didesoxynukleotide aus dem Cycle-Sequencing, sowie überschüssige Primer die Auftrennung des Sequenzierungsprodukts in der Kapillarelektrophorese stören, wurden die Sequenzierungsprodukte zur Abtrennung der ddNTPs und Primer einer Spin-Säulen-Reinigung unterzogen. Die Spin-Säule (Princeton) wurde mit 800 µl Aqua dest. gefüllt und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Wasser abgetropft und die Säule 2 min lang bei 750 g zentrifugiert, um das überschüssige Wasser zu entfernen. Der gesamte Sequenzierungsansatz wurde auf die Säule pipettiert und wie oben zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde im weiteren für die Kapillarelektrophorese vorbereitet und aufgetrennt (nach Kapitel 2.9.4.2).

2.11 Quantifizierung der 4.977 bp-Deletion

Nach Auftrennung der Amplifikate in der Fragmentanalyse der Kapillarelektrophorese (nach Kapitel 2.9.4.1) erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms *GeneScan Analysis 2.0.2* die Auswertung der Rohdaten und die Zuordnung der Bandengrößen. Aus den durch dieses Programm ermittelten Peakflächen (PF) der beiden relevanten 142 bp- und 184 bp-Banden ließ sich mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms *Excel* (Microsoft) der Quotient I_{Del}/I_{Norm} aus den beiden Peakflächen errechnen. Dieser Quotient setzt den Anteil der deletierten mtDNA (I_{Del}) mit dem Anteil der normalen mtDNA (I_{Norm}) einer untersuchten Probe in Zusammenhang (s. nachstehende Formel).

$$I_{Del} / I_{Norm} = PF_{Del} / PF_{Norm}$$

I_{Del} steht für den Anteil der deletierten mtDNA an der gesamten mtDNA in %.

I_{Norm} steht für den Anteil der normalen (nicht-deletierten) mtDNA an der gesamten mtDNA in %.

PF_{Del} bezeichnet den Wert für die Peakfläche der 184 bp-Bande, die das Vorhandensein der 4.977 bp-Deletion in mtDNA anzeigt und somit stellvertretend für den Anteil der deletierten mtDNA der Probe steht.

PF_{Norm} bezeichnet den Wert für die Peakfläche der 142 bp-Bande, die das Nicht-Vorhandensein der 4.977 bp-Deletion in mtDNA angibt und somit für den Anteil der normalen mtDNA der Probe steht.

2.12 Statistische Auswertung

Die statistischen Berechnungen und graphischen Darstellungen dieser prospektiv-beschreibenden, experimentellen Untersuchung erfolgten in dem Tabellenkalkulationsprogramm *Excel* (Microsoft) und dem Statistik-Programm *WinMEDAS* (Fa. Grund).

2.12.1 Spearman'scher Rangkorrelations-Test

Der Spearman'sche Rangkorrelations-Test wird angewandt, um Zusammenhänge zwischen nicht-normalverteilten Reihen einer beliebigen, stetigen Verteilung zu prüfen.

In der vorliegenden Untersuchung galt es herauszufinden, ob eine mögliche Korrelation zwischen dem Quotienten I_{Del}/I_{Norm} , stellvertretend für die Anhäufung der 4.977 bp-Deletion in mitochondrialer DNA, und dem Lebensalter einer Person besteht. Die Abhängigkeit der Variablen wurde anhand des Spearman'schen Rang-Korrelationskoeffizienten ρ beurteilt:

$$\rho = 1 - \frac{6 \sum D^2}{n(n^2 - 1)} \quad D = \text{Differenzen der Rangplätze} \quad n \geq 6.$$

Zur Berechnung der Rangkorrelationskoeffizienten wurden beide Reihen durch Zuordnung von Rangzahlen in Reihen transformiert, die Differenzen D der n Rangpaare gebildet, quadriert, zu $\sum D^2$ summiert und dieser so ermittelte Wert anschließend in obige Formel eingesetzt.

Die Korrelationskoeffizienten bewegen sich zwischen 1 und -1 und geben den Grad einer Abhängigkeit an.

- $\rho = 1$ erhält man bei mathematisch exakter Abhängigkeit.
- $\rho \geq 0,6$ liegt bei einer „guten“ Korrelation vor.
- $\rho \geq 0,3$ kann als „gewisse“ Abhängigkeit bezeichnet werden.

Zur vergleichbaren Quantifizierung der Testergebnisse wurden p-Werte angegeben, welche die Sicherheit einer Abhängigkeit ausdrücken. Der p-Wert ist die Irrtumswahrscheinlichkeit, wenn man die Nullhypothese ablehnt, d. h. p ist die wahre aus den Daten gewonnene, empirische Irrtumswahrscheinlichkeit.

Die p-Werte $\leq 0,05$ wurden als signifikant bezeichnet und als wesentlich interpretiert. Je näher p an Null lag, desto signifikanter war der hier angewandte Test.

Wie üblich wurden statistisch signifikante Befunde durch die dreistufige Sternsymbolik gekennzeichnet:

$$0,01 < p \leq 0,05 \quad [*] \quad 0,001 < p \leq 0,01 \quad [**] \quad p \leq 0,001 \quad [***].$$

Eine geeignete graphische Darstellungsform dieser Korrelation bot sich in Scatterdiagrammen, in denen die gewonnenen Werte als Punktwolke dargestellt wurden. Eine zusätzlich eingezeichnete Funktion beschreibt die Konzentrierung der Punktwolke entlang einer Trendlinie.

Der Spearman'sche Rangkorrelations-Test wurde auch angewandt, um Auswirkungen einer DNA-Konzentrationserhöhung auf den Quotienten $I_{\text{Del}}/I_{\text{Norm}}$ zu untersuchen.

2.12.2 Produkt-Moment-Korrelation logarithmierter Werte

Um die Korrelation zwischen dem Quotienten $I_{\text{Del}}/I_{\text{Norm}}$ und dem Lebensalter einer Person eindeutiger beschreiben zu können, wurden die Ergebnisse zusätzlich mit Hilfe der Produkt-Moment-Korrelation der logarithmierten Quotienten geprüft.

Unter Annahme relativ symmetrisch verteilter Werte wurde mittels Regressionsanalyse eine lineare Regressionsgleichung nach der Formel

$$\log(I_{\text{Del}}/I_{\text{Norm}}) = a + b \cdot (\text{Alter})$$

der beobachteten Punktwolke angepasst.

In einem Scatterdiagramm der logarithmierten Quotienten $I_{\text{Del}}/I_{\text{Norm}}$ wurden die Regressionsgerade und ihre begleitenden Schranken-Linien, der 95 %ige Vertrauensbereich für die Mittelwerte und der 95 %ige Vertrauensbereich für die Einzelwerte dargestellt. Mit der Logarithmierung war ein Ausschluss der Nullwerte verbunden.

Unter Herannahme dieses Tests wurde beurteilt, wie eng die beiden Variablen miteinander zusammenhingen. Je besser die Korrelation der beiden Variablen war, desto enger lagen die Schranken-Linien beieinander.

Zusätzlich wurden die Korrelationskoeffizienten r der Produkt-Moment-Korrelation ermittelt, deren Einteilung den Spearman'schen Rangkorrelationskoeffizienten ρ (s. Kapitel 2.12.1) entsprach. Die p-Werte wurden auch hier zur vergleichbaren Quantifizierung der Testergebnisse angegeben (Signifikanz-Stufen s. Kapitel 2.12.1).

2.12.3 Wilcoxon-Test für Paardifferenzen

Der Wilcoxon-Test für Paardifferenzen prüft die Reliabilität wiederholter Messungen bei einer Person und kann für Paare nicht-normalverteilter Messwerte verwendet wer-

den. Dieser Test gestattet die Prüfung, ob die Differenzen paarig angeordneter Beobachtungen symmetrisch mit dem Median gleich Null verteilt sind, d. h. unter der Nullhypothese H_0 entstammen die Paardifferenzen d_i einer Grundgesamtheit mit der Verteilungsfunktion $F(d)$ bzw. mit der Dichte $f(d)$, wobei gilt:

$$H_0: F(+d) + F(-d) = 1 \quad \text{bzw.} \quad f(+d) = f(-d).$$

Abgesehen von Paaren mit gleichen Einzelwerten bildet man für die restlichen n Wertepaare die Differenzen

$$d_i = x_{i1} - x_{i2}$$

und bringt die absoluten Beträge $|d_i|$ in eine ansteigende Rangordnung.

Bei fehlenden gemeinsamen Ergebnissen wird das Wertepaar der untersuchten Person nicht berücksichtigt. Wenn ein oder mehrere Messwerte sehr oft vorkommen und keine Normalverteilung angenommen werden kann, wird anstelle des Wilcoxon-Tests der Vorzeichentest angewandt.

In dieser Arbeit bestand das Ergebnis des Wilcoxon-Tests neben der Angabe von Mittelwerten und Streuungen aus den Wilcoxon p -Werten. Dargestellt wurden die Ergebnisse in einer Zeichnung der Mittelwerte im Verlauf.

2.12.4 Perzentilenkurven

Perzentilenkurven dienen der Erstellung von Normbereichen, die eine Altersabhängigkeit aufweisen. Mit ihrer Hilfe kann bei einer gegebenen Variable mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit auf das Alter des Probanden geschlossen werden.

Durch die altersabhängigen Werte wurde eine Kurve mit Perzentilengrenzen quadratisch angepasst. Die Verlaufslinie war ein Approximationspolynom zweiten Grades:

$$\log(I_{\text{Del}}/I_{\text{Norm}}) = a + b * (\text{Alter}) + c * (\text{Alter})^2.$$

Die in dieser Funktionsgleichung enthaltenen Variablen (a , b , c) ermöglichten eine optimale Anpassung der Perzentilenkurve an die gewonnenen Ergebnisse.

Gezeichnet wurde die 50 %-Perzentile, flankiert von der 10 %- und der 90 %-Perzentile und der 5 %- und der 95 %-Perzentile.

Zusätzlich wurden die jeweiligen Regressionskoeffizienten R^2 angegeben, deren Einteilung den Korrelationskoeffizienten aus Kapitel 2.12.1 entsprechend ist.

Üblich ist im weiteren eine tabellarische Darstellung der 5 %-, 10 %-, 50 %-, 90 %- und 95 %-Perzentilen.

3 Ergebnisse

3.1 Gewinnung der DNA

Die DNA-Mengen, die durch die jeweiligen Extraktionsmethoden (nach 2.3 - 2.5) gewonnen wurden, waren abhängig von dem jeweiligen biologischen Material. Die DNA-Konzentrationen der formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebe und des Vollblutes konnten mittels des UV-Spektralphotometers (nach 2.6) bestimmt werden, wobei sich aus allen Gewebearten, außer der Lunge, ähnliche DNA-Mengen extrahieren ließen. Aus den Lungenproben wurde erheblich weniger DNA gewonnen (Tab. 3.1).

Tab. 3.1: Erhaltene DNA-Mengen aus formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe und aus venösem Vollblut nach der jeweiligen Extraktionsmethode (nach Kapitel 2.3.1 und 2.3.2). Aufgeführt sind die Anzahl der untersuchten Proben (n), der minimale und maximale sowie der durchschnittliche DNA-Ertrag, jeweils ermittelt durch die DNA-Quantifizierung im UV-Spektralphotometer (nach Kapitel 2.6).

Art des biologischen Materials	n	DNA-Ertrag [ng/µl]		
		minimal	maximal	durchschnittlich
In Paraffin eingebettetes Gewebe				
Alle (außer Lunge)	215	97,4	295,1	152,6
Lunge ¹	49	8,7	70,3	31,9
Venöses Vollblut (5 ml)	154	502,8	2477,6	1028,3

¹ Bei 32 der 49 Lungenproben wurde eine geringere DNA-Menge als 50 ng/µl erzielt.

Für die DNA aus den Mundschleimhautabstrichen (MSAs), den Blutflecken, den frischen Geweben sowie den Haarwurzeln, die mit der Chelex-100/Diatomeen-Extraktion (nach 2.3.3, 2.4) gewonnen wurden, war eine spektralphotometrische DNA-Bestimmung (nach 2.6) nicht möglich, da Guanidinthiocyanat die Messung störte. Der DNA-Ertrag wurde hier nach Günther (1997) [50] abgeschätzt, wonach sich für die MSAs ungefähre DNA-Mengen von 5 - 20 ng/µl, für die Blutflecken 60 - 100 ng/µl, für die frischen Gewebe 100 - 150 ng/µl und für die Haarwurzeln max. 8 ng/µl ergaben.

3.2 Etablierung der Methode

3.2.1 Die enzymatische Amplifizierung

Durch die Anpassung der PCR-Bedingungen konnte eine reproduzierbare Amplifikation für alle untersuchten biologischen Materialien erreicht werden.

Die Schmelztemperaturen (T_m) der Primer (aus Tab. 2.1) wurden nach der Formel aus

Kapitel 2.7.1 mit 59 °C für die Primer II und III und mit 61 °C für die Primer I und IV errechnet. Um unspezifische Amplifikationsnebenprodukte möglichst gering zu halten, wurde die Hybridisierungstemperatur optimiert. Die Amplifizierung erfolgte mit Temperaturen von 59 - 63 °C in 1 °C-Schritten, wobei sich eine Hybridisierungstemperatur von 62 °C als optimal erwies (Abb. 3.1 a).

Die MgCl₂-Konzentration wurde ebenfalls optimiert. Sie erwies sich nach einer Amplifizierung mit unterschiedlichen Konzentrationen von 1 bis 7 mM mit einer Konzentration von 5 mM im Amplifikationsansatz als optimal (Abb. 3.1 b).

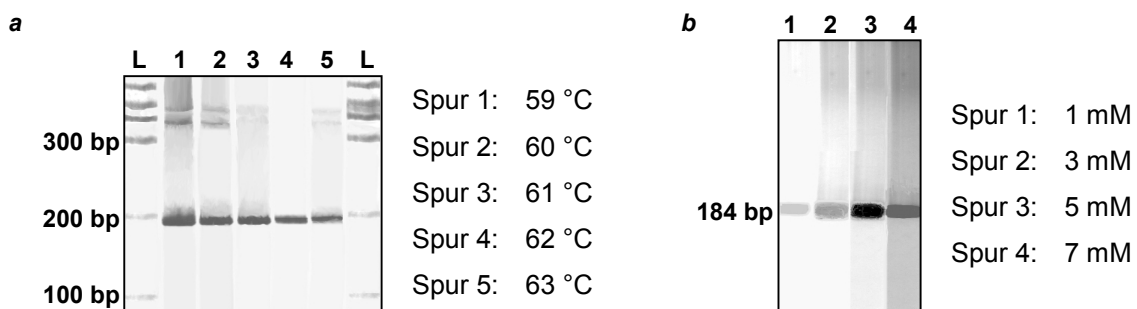


Abb. 3.1 a,b: Optimierung der PCR-Bedingungen: *a* der Hybridisierungstemperatur und *b* der MgCl₂-Konzentration. Im Polyacrylamidgel wurde die 180 bp-Bande, stellvertretend für die oft nur in geringen Mengen vorkommende deletierte mtDNA, beurteilt. Als optimal erwies sich eine Hybridisierungstemperatur von 62 °C und eine MgCl₂-Konzentration von 5 mM. L: 100 bp-Leiter

In die PCR wurde regelmäßig eine DNA-Konzentration von 2 ng/μl eingesetzt, bei Materialien mit geringerem DNA-Ertrag entsprechend die jeweilige Höchstmenge. Die venösen Vollblutproben wurden zusätzlich in DNA-Konzentrationen von 8 ng/μl, 16 ng/μl und 40 ng/μl amplifiziert.

Für die Etablierung des Multiplex-Amplifikationsansatzes zeigte sich für die Hybridisierungsphase eine Temperatur von 62 °C und eine Dauer von 1 min als optimal, für die Kettenverlängerungsphase eine Dauer von 1 min. Die eingesetzte Primerkonzentration betrug jeweils 5 pmol/μl bei einer Zykluszahl von 35.

3.2.2 Darstellung der Amplifikationsprodukte

Die zur Überprüfung der PCR-Produkte eingesetzte Sequenzanalyse (nach Kapitel 2.10) zeigte eine Übereinstimmung mit den zu erwarteten DNA-Fragmenten von 142 bp und 184 bp (Abb. 3.2 a,b). Die Sequenzanalyse wurde stichprobenhaft an formalinfixiertem,

in Paraffin eingebettetem Gehirn- und Herzgewebe, an Blut, an Mundschleimhautabstrichen und an frischem Gehirngewebe durchgeführt.

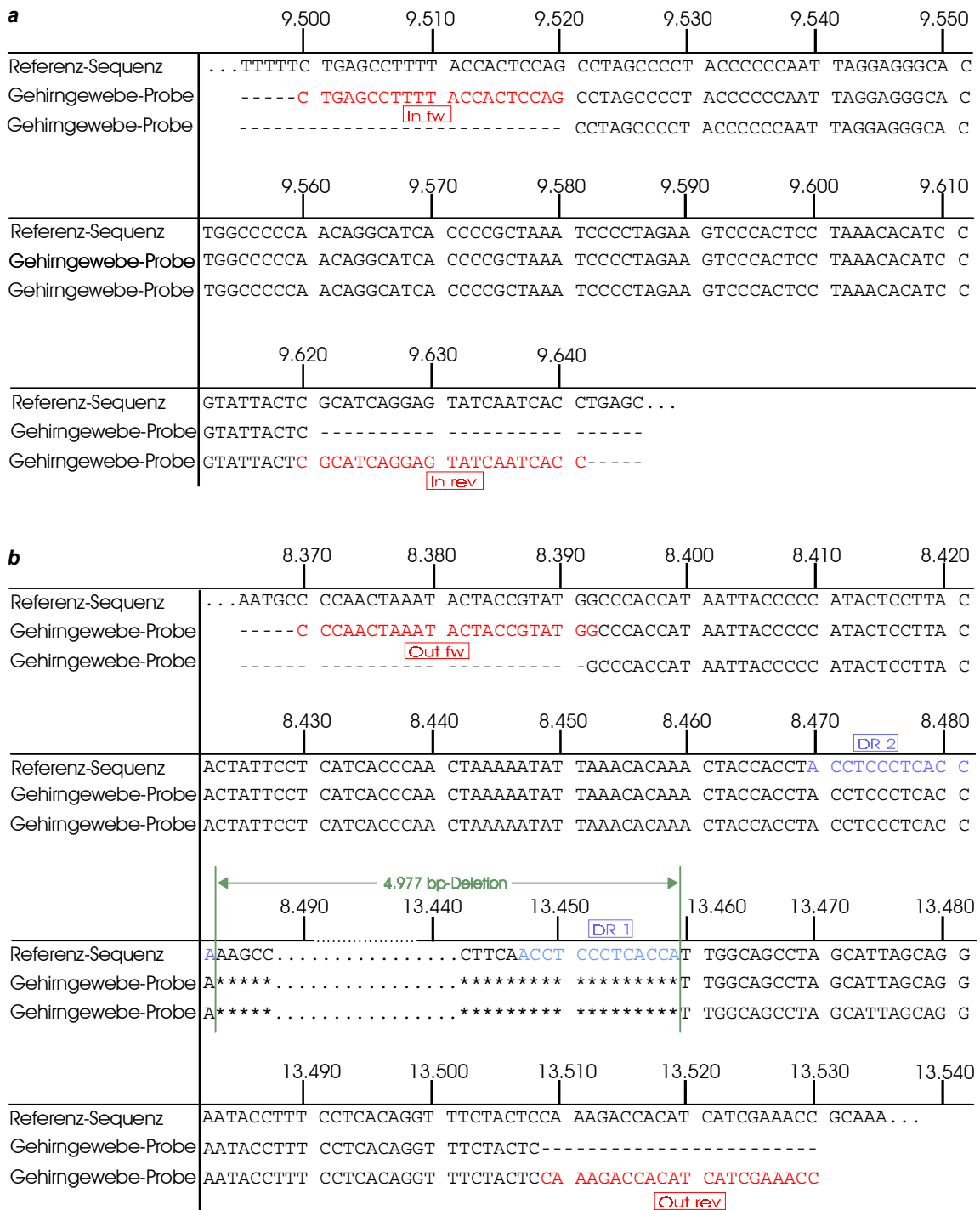


Abb. 3.2 a,b: Sequenzierungsergebnis einer formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gehirngewebe-Probe zur Überprüfung der Richtigkeit der amplifizierten Fragmente. **a** Dargestellt ist das 142 bp-Fragment, erhalten durch das Primerpaar In fw/rev (rot), stellvertretend für die normale mtDNA, und **b** das 184 bp-Fragment, erhalten durch das Primerpaar Out fw/rev (rot), stellvertretend für die deletierte mtDNA. In **b** sind zusätzlich die 4.977 bp-Deletion (grün) und die flankierenden 13 bp-DNA-Sequenzen DR 1 und 2 (direct repeats, blau) eingezeichnet. Als Referenz-Sequenz ist die Cambridge-Sequenz nach Anderson et al. (1981) [3] angegeben.

Die erfolgreiche Amplifikation der 142 bp- und 184 bp-Fragmente aus einem Multiplex-Ansatz zeigte sich in den nativen Polyacrylamid- und Agarosegelen (Abb. 3.3).

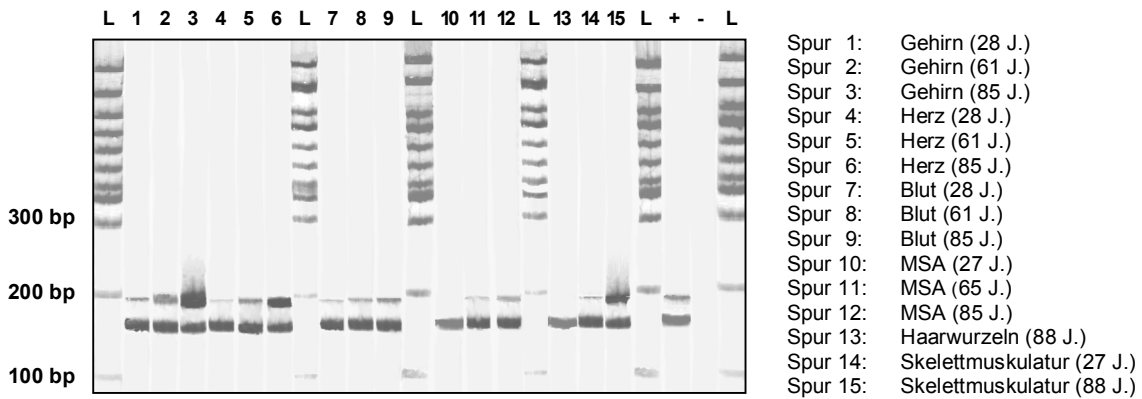
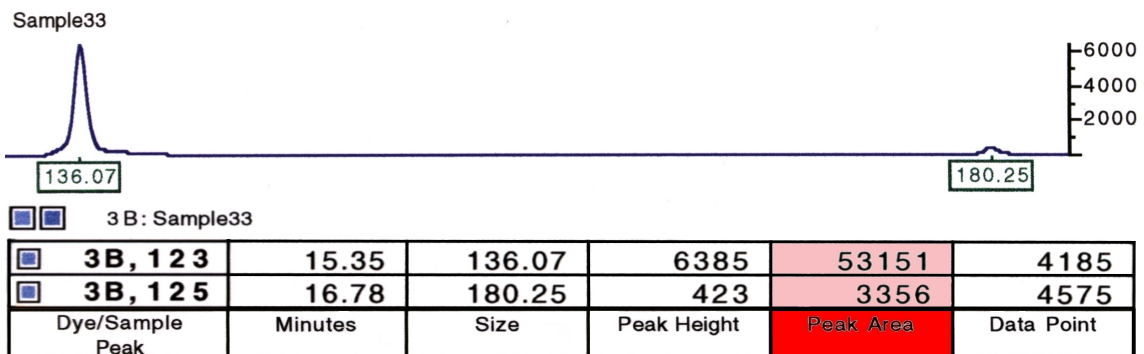
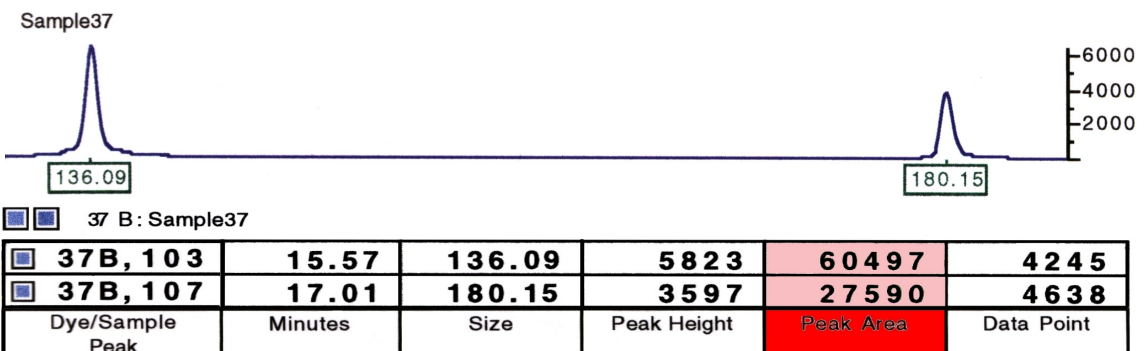


Abb. 3.3: Darstellung der erfolgreichen Amplifikation aus einem Multiplex-Ansatz im Polyacrylamidgel. Die 142 bp-Bande gibt den Anteil der normalen, die 184 bp-Bande den Anteil der deletierten mtDNA wieder. Spur 1-6 zeigt formalinfixiertes, in Paraffin eingebettetes Gewebe, Spur 7-9 Blut einer DNA-Konzentration von 40 ng/μl, Spur 10-12 Chelex-100/Diatomeen-aufgereinigte Mundschleimhautabstriche und Spur 14-15 frisches Gewebe. L : 100 bp-Leiter + : positive Kontrolle - : negative Kontrolle



a $I_{Del}/I_{Norm} = 0,063$



b $I_{Del}/I_{Norm} = 0,456$

Abb. 3.4 a,b: Ergebnis der Computeranalyse nach Auftrennung der Amplifikationsprodukte in der Kapillarelektrophorese (nach 2.9.4.1). Gezeigt werden die 142 bp- und 184 bp-Fragmente (zugeordnete Bandengröße 136 bp und 180 bp), die zugehörigen Peakflächen (Peak Area) und die daraus nach 2.11 errechneten Quotienten I_{Del}/I_{Norm} a einer Probe mit geringem und b mit erheblichem Anteil an 4.977 bp-deletierter mtDNA.

Zur qualitativen Analyse wurden den in der Kapillarelektrophorese (nach 2.9.4.1) aufgetrennten Amplifikaten mittels Computerprogrammen die Bandengrößen 136 bp und 180 bp zugeordnet. Zur quantitativen Analyse wurden aus den ebenfalls ermittelten Peakflächen der Banden (computeranalyisierte Rohdaten in Tab. 7.2, s. Anhang S. 98 - 111) mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms *Excel* die Quotienten I_{Del}/I_{Norm} für die sich anschließende statistische Auswertung (nach 2.11) errechnet (Abb. 3.4).

3.3 Quantifizierung der 4.977 bp-Deletion in mtDNA

3.3.1 Spearman'scher Rangkorrelations-Test

Mit Hilfe des Spearman'schen Rangkorrelations-Tests (nach 2.12) wurde im formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebe, im Blut und in den Mundschleimhautabstrichen die Korrelation des Quotienten I_{Del}/I_{Norm} mit dem Lebensalter geprüft (Tab. 3.2).

Tab. 3.2: Spearman'scher Rangkorrelations-Test für formalinfixiertes, in Paraffin eingebettetes Gehirn-, Herz-, Lungen-, Milz-, Nieren- und Lebergewebe, für Blut in den DNA-Konzentrationen von 2 - 40 ng/μl und für Mundschleimhautabstriche (MSAs) (y) mit dem Lebensalter (x). Angegeben ist die Anzahl der untersuchten Proben n, das Mittel der x- und y-Variablen M_x/M_y , der Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizient ρ sowie der p-Wert. Die Signifikanz-Stufen ($p \leq 0,05$) werden wie üblich mit Sternen bezeichnet (s. 2.12.1).

x-Variable y-Variable	n	M_x M_y	ρ p
x Alter y Gehirn	86	62,605 1,285	0,7626 0,0000***
x Alter y Herz	41	67,756 0,643	0,8304 0,0000***
x Alter y Lunge	49	69,878 0,130	0,4672 0,0007***
x Alter y Milz	18	54,167 0,276	0,7533 0,0003***
x Alter y Niere	29	62,448 0,226	0,8589 0,0000***
x Alter y Leber	31	62,806 0,122	0,7383 0,0000***
x Alter y Blut 2 ng/μl	154	52,532 0,005	0,7789 0,0000***
x Alter y Blut 8 ng/μl	154	52,532 0,018	0,8404 0,0000***
x Alter y Blut 16 ng/μl	154	52,532 0,032	0,8670 0,0000***
x Alter y Blut 40 ng/μl	154	52,532 0,065	0,8565 0,0000****
x Alter y MSA	55	76,564 0,067	0,4786 0,0002***

In allen untersuchten biologischen Materialien war die Korrelation zwischen dem Quotienten I_{Del}/I_{Norm} und dem Lebensalter einer Person eindeutig signifikant ($p \leq 0,05$) und wurde als wesentlich interpretiert.

Die Gewebe Gehirn, Herz, Milz, Niere und Leber zeigten ebenso wie das Blut in allen vier DNA-Konzentrationen mit einem Korrelationskoeffizienten von $\rho > 0,6$ eine „gute“ Korrelation der Quotienten mit dem Lebensalter. Eine „gewisse“ Abhängigkeit mit $0,3 < \rho < 0,6$ stellte sich im Lungengewebe und in den MSAs heraus.

3.3.2 Das formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Gewebe

Die 4.977 bp-Deletion wurde in den formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Geweben Gehirn, Lunge, Herz, Leber, Niere, Milz und Haut von 86 verschiedenen Personen in einer Altersspanne von 1 bis 90 Jahren untersucht.

Von den insgesamt 263 untersuchten Gewebeproben wies die Gewebeart Gehirn die größte Probenanzahl auf (Abb. 3.5), deren 86 Proben sich über das gesamte Lebensalter verteilten. Die restlichen Gewebearten Herz, Lunge, Milz, Niere, Leber und Haut konnten lediglich jeweils in den Altersextrema von ≤ 30 Jahren und > 60 Jahren untersucht werden.

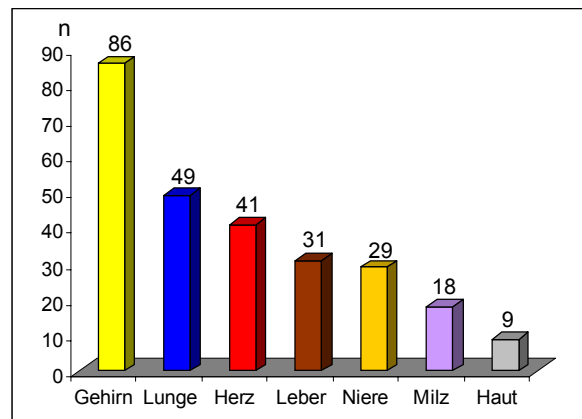


Abb. 3.5: Aufgliederung der 263 formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebeproben von Personen im Alter von 1 bis 90 Jahren in die unterschiedlichen Gewebearten Gehirn, Lunge, Herz, Leber, Niere, Milz und Haut. n bezeichnet die Anzahl der jeweils untersuchten Proben.

Nicht nachweisbar war die 4.977 bp-deletierte mtDNA in den neun untersuchten Proben des Hautgewebes. In allen anderen Geweben war die 4.977 bp-Deletion nachweisbar und der Anteil der deletierten mtDNA konnte jeweils anhand des Quotienten I_{Del}/I_{Norm} quantifiziert werden.

Der nach Kapitel 2.11 errechnete Quotient I_{Del}/I_{Norm} war einerseits abhängig von dem Lebensalter der untersuchten Person, andererseits zeigte auch die jeweilige Gewebeart erheblichen Einfluss auf den Quotienten (Abb. 3.6 a-f).

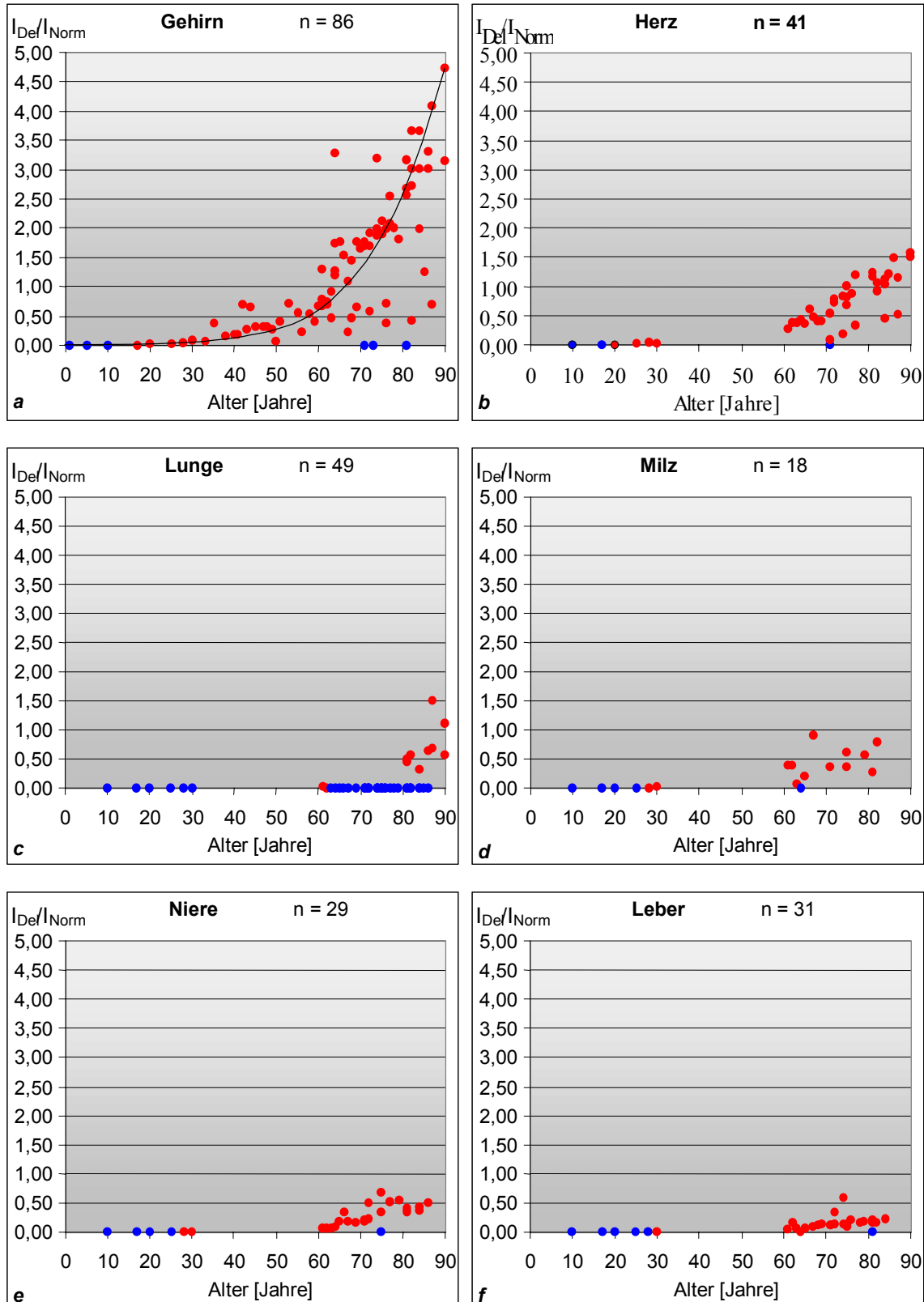


Abb. 3.6 a-f: Scatterdiagramme der Quotienten I_{De}/I_{Norm} a für formalinfixiertes, in Paraffin eingebettetes Gehirn-, b Herz-, c Lungen-, d Milz-, e Nieren- und f Lebergewebe in Abhängigkeit des Alters. Dargestellt ist der quantifizierte Anteil der deletierten mtDNA oberhalb der Nachweisgrenze (•) sowie die Proben ohne nachweisbaren Deletionsanteil (•). In a ist zusätzlich eine Trendlinie eingezeichnet. n bezeichnet die Anzahl der jeweils in dieser Gewebeart untersuchten Proben.

Das früheste Alter, in dem ein quantifizierbarer Anteil deletierter mtDNA nachgewiesen werden konnte, betrug im Gehirngewebe 17 Jahre und zwar mit einem Quotienten von 0,004. Im Herzgewebe ließ sich deletierte mtDNA ab 20 Jahren mit einem Quotienten von 0,004, im Milzgewebe ab dem Alter von 28 Jahren mit 0,008, im Nierengewebe ebenfalls ab 28 Jahren mit 0,004 und im Lebergewebe ab 30 Jahren mit 0,003 feststellen. Im Lungengewebe konnte die Deletion in der Altersgruppe ≤ 30 Jahren nicht registriert werden, bei einer 61-jährigen Person betrug der Quotient dann 0,017.

Mit steigendem Lebensalter nahm der Quotient I_{Del}/I_{Norm} in diesen sechs Geweben zu. Diese Zunahme erwies sich als von der jeweiligen Gewebeart abhängig und war unterschiedlich ausgeprägt. Im Gehirn stieg der Quotient bis auf einen Wert von 4,728 bei einer 90-jährigen Person, im Herzen auf einen Wert von 1,572 bei einem Probanden gleichen Alters. Der größte Quotient in der Lunge betrug 1,505 bei einer 87-jährigen Person, in der Milz 0,899 bei einer 67-jährigen, in der Niere 0,683 bei einer 75-jährigen und in der Leber 0,583 bei einer 74-jährigen.

Während in allen Geweben die 4.977 bp-Deletion bei ganz jungen Versuchspersonen nicht nachweisbar war, lag dies im Gehirngewebe zusätzlich auch bei drei älteren Probanden vor. Auch war dies der Fall im Herz-, Milz-, Nieren- und Lebergewebe bei jeweils einer älteren Person. Im Lungengewebe konnte die Deletion insgesamt nur in 11 von 43 untersuchten Proben der über 60-jährigen nachgewiesen werden.

Nach dem erstmaligen quantifizierbaren Auftreten erfolgte die Anhäufung der 4.977 bp-Deletion im Gehirngewebe mit zunehmendem Lebensalter nach einer Potenzfunktion. In den restlichen Geweben konnte allerdings ein eindeutiger Trend als Folge der Untersuchungslücke im Altersbereich von 31 bis 60 Jahren nicht abgelesen werden.

Um den Verlauf dieser Deletionszunahme genauer beschreiben zu können, wurden diese Gewebe zusätzlich mit Hilfe des Produkt-Moment-Korrelations-Tests der logarithmierten Quotienten (nach Kapitel 2.12) analysiert (Abb. 3.7 a-f).

Bei allen Geweben konzentrierten sich die Quotienten hierbei um die jeweilige Regressionsgerade. Die engsten Schrankenlinien waren hierbei im Lungengewebe zu finden, gefolgt vom Nieren-, Herz-, Milz-, Gehirn- und Lebergewebe, wobei die geringe Probenanzahl im Altersintervall ≤ 30 Jahre bei manchen Geweben zu berücksichtigen ist. Vereinzelt waren Quotienten außerhalb der Schranken zu finden, sieben Quotienten im Gehirngewebe, einer im Herzgewebe, je zwei im Nieren- und Lebergewebe. Im Lungen- und Milzgewebe gab es keine sogenannten Ausreißer.

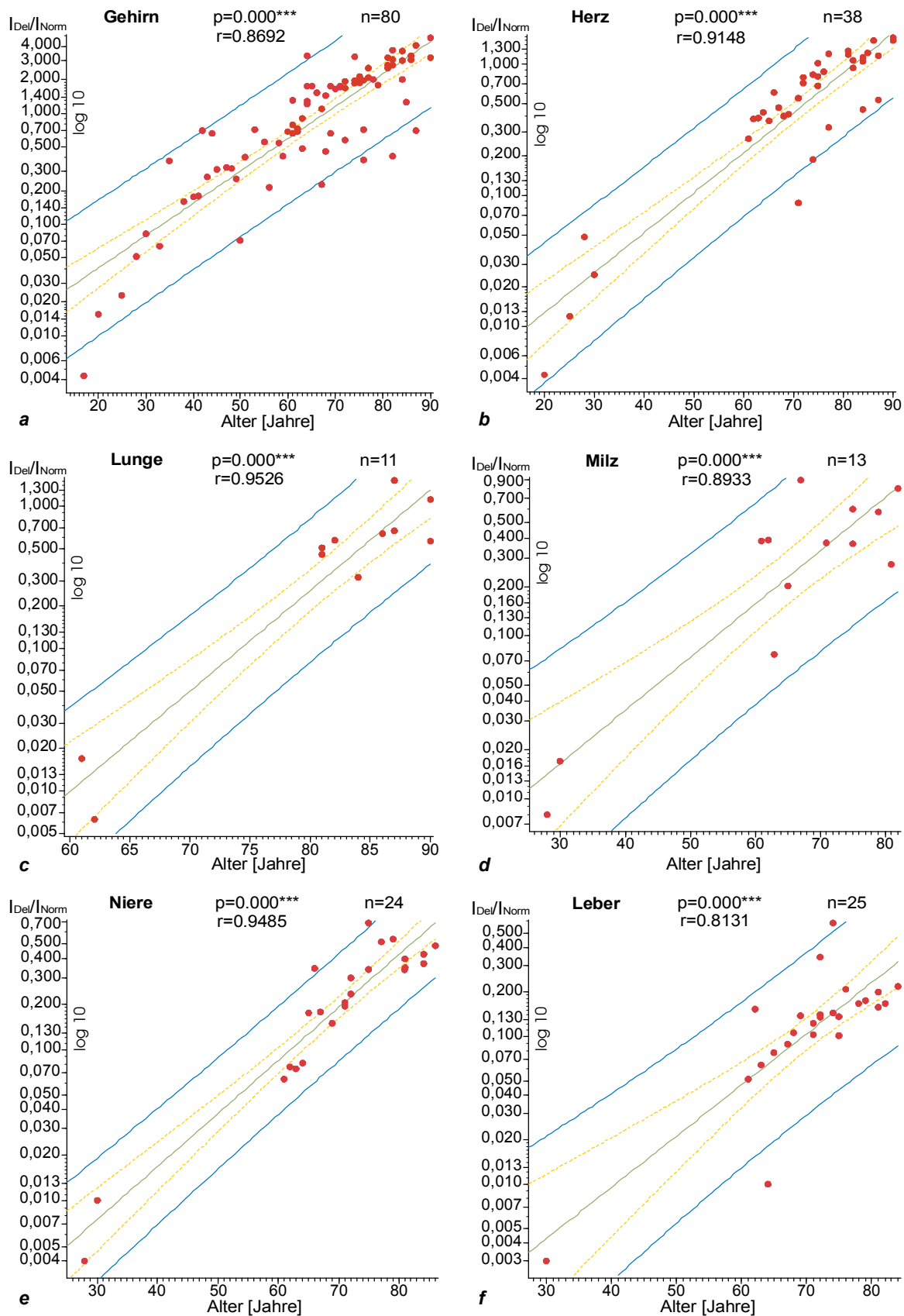


Abb. 3.7 a-f: Produkt-Moment-Korrelation der logarithmierten Quotienten I_{Del}/I_{Norm} für die Gewebearten: **a** Gehirn, **b** Herz, **c** Lunge, **d** Milz, **e** Niere und **f** Leber in Abhängigkeit des Alters. Aufgeführt sind die Proben mit quantifizierbarem Deletionsanteil. Eingezeichnet sind die Regressionsgerade (grün) und der 95 %ige Vertrauensbereich für Mittelwerte (gelb) und für Einzelwerte (blau). Weiterhin sind der Korrelationskoeffizient r , der p -Wert und die Anzahl der untersuchten Proben n angegeben. Die Signifikanzstufen ($p \leq 0,05$) werden wie üblich mit Sternen bezeichnet (s. Kapitel 2.12.1).

3.3.3 Das Blut

3.3.3.1 Das venöse Vollblut

Venöses Vollblut von 154 Personen im Alter von 1 bis 90 Jahren lag jeweils in den zur Amplifizierung eingesetzten DNA-Konzentrationen von 2 ng/μl, 8 ng/μl, 16 ng/μl und 40 ng/μl zur Untersuchung vor.

Die 4.977 bp-Deletion konnte im Blut nachgewiesen und der Anteil der deletierten mtDNA jeweils anhand des Quotienten I_{Del}/I_{Norm} quantifiziert werden. Dieser nach 2.11 errechnete Quotient war sowohl von dem Alter der untersuchten Person als auch von der zur Amplifizierung eingesetzten DNA-Konzentration abhängig (Abb. 3.8 a-d).

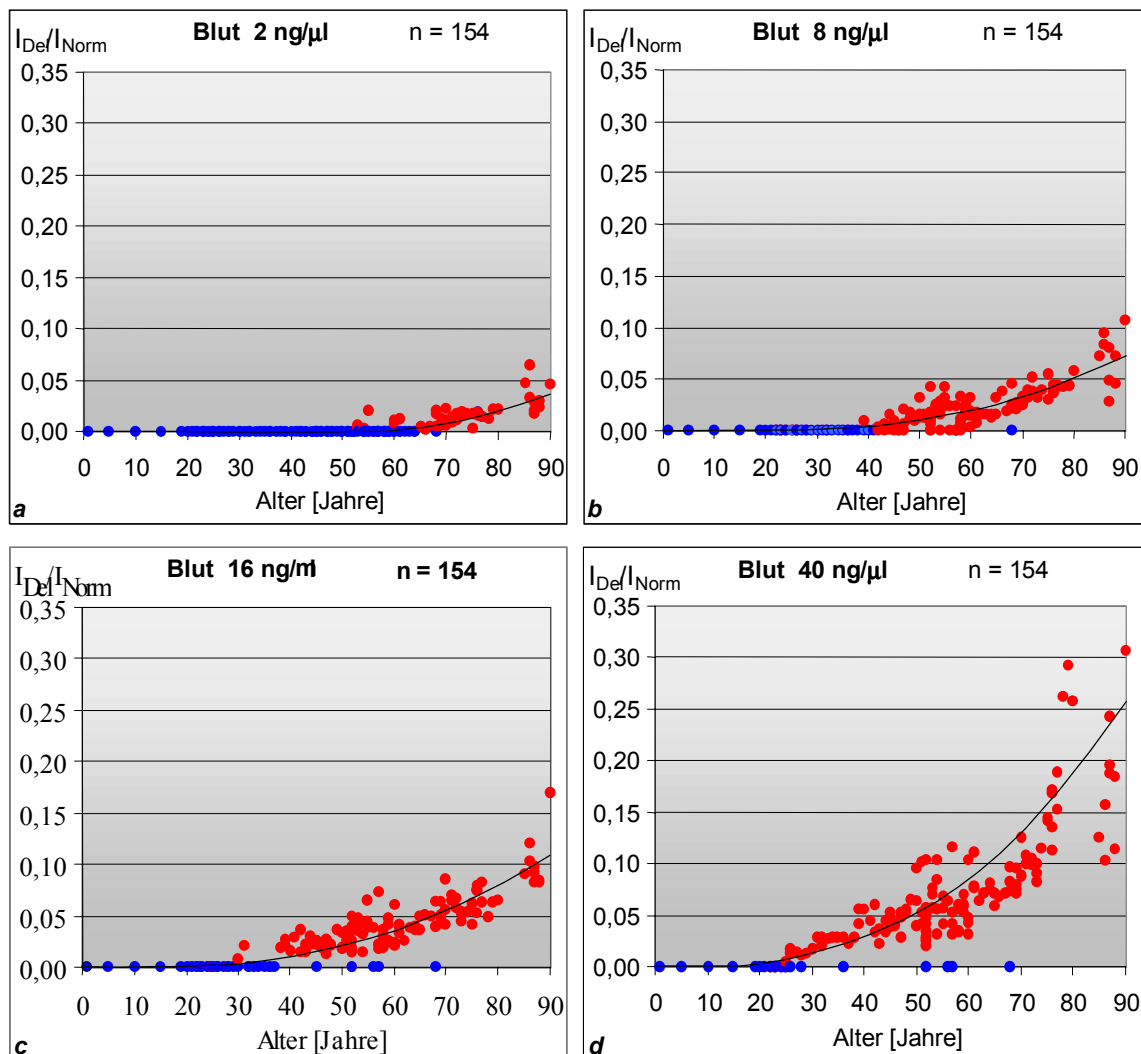


Abb. 3.8 a-d: Scatterdiagramme der Quotienten I_{Del}/I_{Norm} für venöses Vollblut in den DNA-Konzentrationen von a) 2 ng/μl, b) 8 ng/μl, c) 16 ng/μl und d) 40 ng/μl in Abhängigkeit des Alters. Dargestellt ist der quantifizierte Anteil der deletierten mtDNA oberhalb der Nachweisgrenze (•) sowie die Proben ohne nachweisbaren Deletionsanteil (•). Zusätzlich sind Trendlinien eingezeichnet. n bezeichnet die Anzahl der untersuchten Blutproben.

Die deletierte mtDNA ließ sich mit steigender DNA-Konzentration in immer früherem Lebensalter nachweisen. Während bei 2 ng/μl die Deletion erst ab 53 Jahren und bei 8 ng/μl ab 39 Jahren quantifiziert werden konnte, geschah dies bei 16 ng/μl schon mit 30 Jahren und bei 40 ng/μl sogar schon ab einem Alter von 25 Jahren. Wurde bei einer Person die 4.977 bp-Deletion bei 2 ng/μl oder 8 ng/μl nicht nachgewiesen, war dies bei einer höheren zur Amplifizierung eingesetzten DNA-Konzentration jedoch möglich (Abb. 3.9 a-c). Lediglich bei fünf Personen im Alter von 36, 52, 56, 57 und 68 Jahren konnte in keiner der DNA-Konzentrationen die 4.977 bp-Deletion quantifiziert werden.

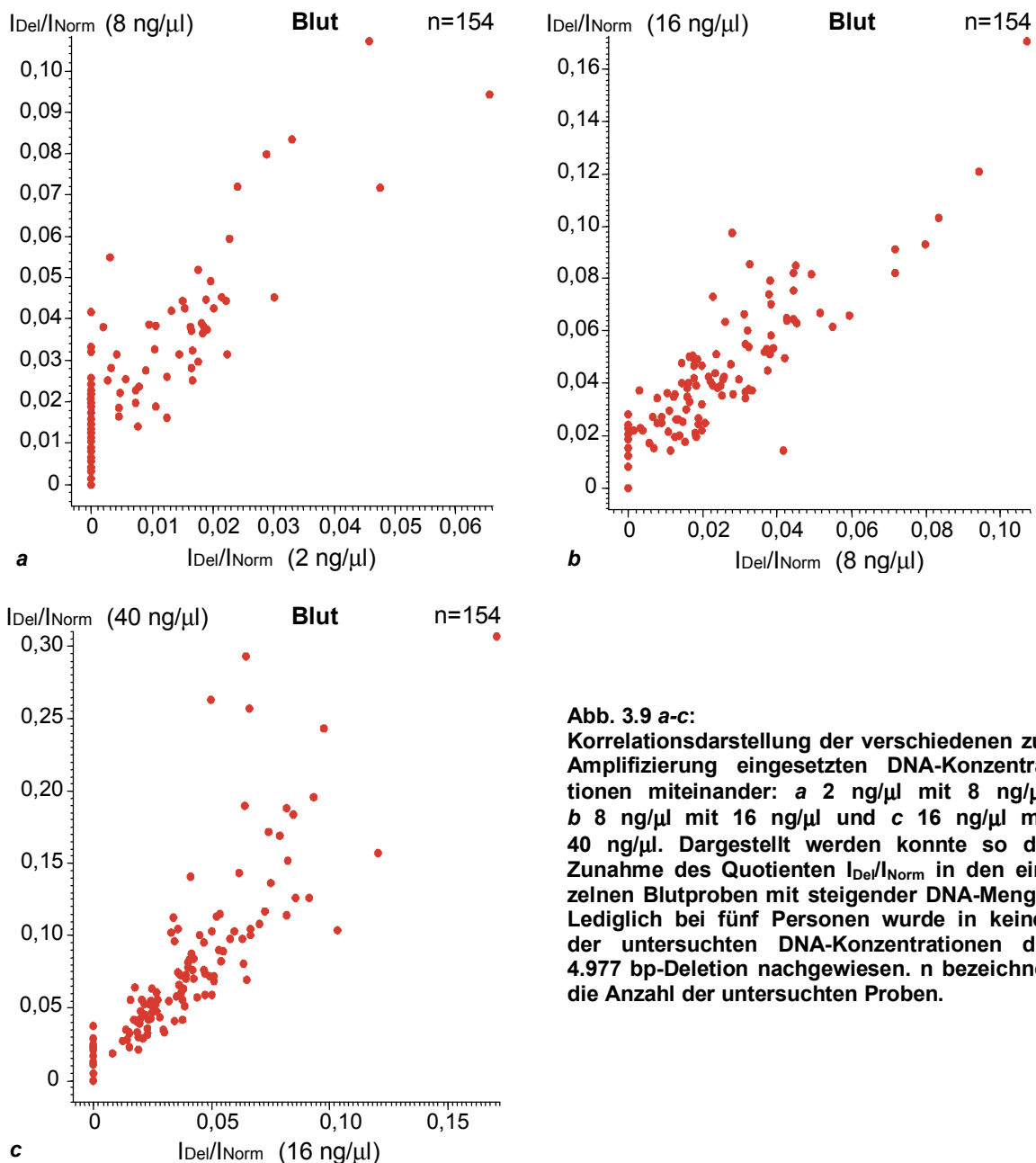


Abb. 3.9 a-c: Korrelationsdarstellung der verschiedenen zur Amplifizierung eingesetzten DNA-Konzentrationen miteinander: a 2 ng/μl mit 8 ng/μl, b 8 ng/μl mit 16 ng/μl und c 16 ng/μl mit 40 ng/μl. Dargestellt werden konnte so die Zunahme des Quotienten I_{Del}/I_{Norm} in den einzelnen Blutproben mit steigender DNA-Menge. Lediglich bei fünf Personen wurde in keiner der untersuchten DNA-Konzentrationen die 4.977 bp-Deletion nachgewiesen. n bezeichnet die Anzahl der untersuchten Proben.

Während der größte Quotient in der 2 ng/ μ l DNA-Konzentration mit 0,066 bei einer 86-jährigen Person zu finden war, lagen die größten Quotienten in den Konzentrationen von 8, 16 und 40 ng/ μ l mit 0,107, 0,171 und 0,307 bei einer 90-jährigen Person vor. Im venösen Vollblut zeigte sich in allen vier zur Amplifizierung eingesetzten DNA-Mengen eine Zunahme des Anteiles an 4.977 bp-deletierter mtDNA mit steigendem Lebensalter, wobei dieser Anstieg jeweils nach einer Potenzfunktion erfolgte.

Die Blutproben wurden zusätzlich mittels des Produkt-Moment-Korrelations-Tests der logarithmierten Quotienten (nach Kapitel 2.12) analysiert (Abb. 3.10 a-d).

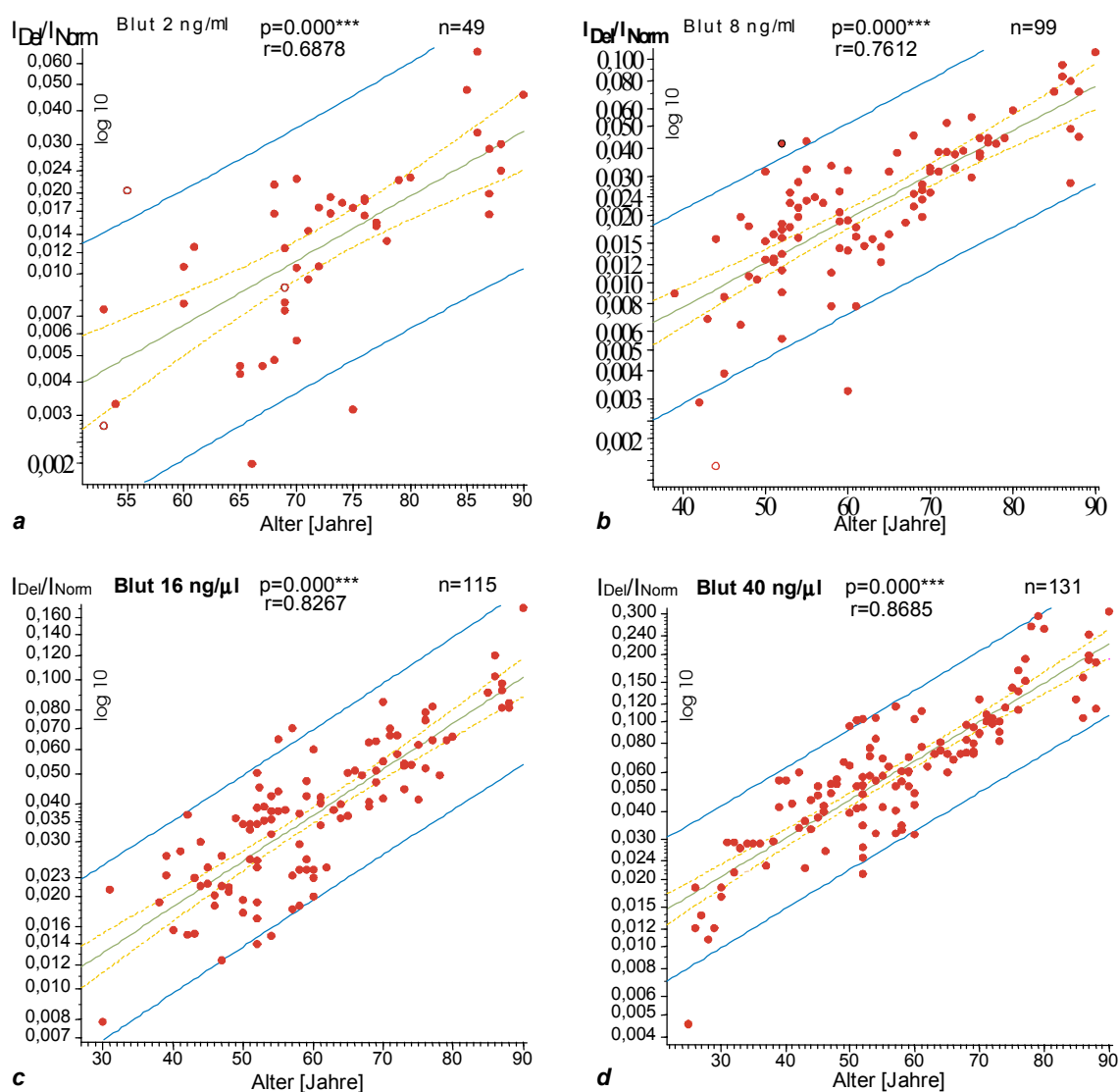


Abb. 3.10 a-d: Produkt-Moment-Korrelation der logarithmierten Quotienten I_{De}/I_{Norm} für Vollblut in DNA-Konzentrationen von: a 2 ng/ μ l, b 8 ng/ μ l, c 16 ng/ μ l und d 40 ng/ μ l in Abhängigkeit des Alters. Aufgeführt sind die Proben mit quantifizierbarem Deletionsanteil. Eingezeichnet sind die Regressionsgerade (grün) und der 95 %ige Vertrauensbereich für Mittelwerte (gelb) und für Einzelwerte (blau). Weiterhin sind der Korrelationskoeffizient r , der p -Wert und die Anzahl der untersuchten Proben n angegeben. Die Signifikanz-Stufen ($p \leq 0,05$) werden wie üblich mit Sternen bezeichnet (s. Kapitel 2.12.1).

Die Quotienten konzentrierten sich hierbei um die jeweilige Regressionsgerade. Bei einer eingesetzten DNA-Konzentration von 2 ng/μl befanden sich 6,1 % der Quotienten außerhalb der Schranken, bei 8 ng/μl 5,1 %, bei 16 ng/μl 3,5 % und bei 40 ng/μl 3,1 %. Mit zunehmender DNA-Menge verengten sich die Schrankenlinien deutlich.

Die Steigungen der Regressionsgeraden aus Abb. 3.10 a-d drücken den Grad der potentiellen Zunahme des Quotienten aus. Der Verlauf bei 8 ng/μl ist um den Faktor 1,69 steiler als bei 2 ng/μl, bei 16 ng/μl um 1,27 steiler als bei 8 ng/μl und bei 40 ng/μl sogar um den Faktor 2,28 steiler als bei 16 ng/μl (Tab. 3.3).

Tab. 3.3: Spearman'scher Rangkorrelations-Test der aufsteigenden Blut-DNA-Konzentrationen. Angegeben ist die Anzahl der untersuchten Proben n, das Mittel der x- und y-Variablen M_x/M_y , der Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizient ρ , der p-Wert und die Regressionsgleichung der jeweiligen Regressionsgeraden aus Abb. 3.10 a-d. Die Zunahme des Quotienten I_{Del}/I_{Norm} von einer DNA-Stufe auf die nächste wird durch den Steigungsfaktor (rote Zahl) ausgedrückt. Die Signifikanz-Stufen ($p \leq 0,05$) werden wie üblich mit Sternen bezeichnet (s. Kapitel 2.12.1).

x-Variable y-Variable	n	M_x M_y	ρ p	Regressionsgleichung
x Blut 2 ng/μl y Blut 8 ng/μl	154 154	0,005 0,018	0,7785 0,0000***	x = 0,43 y - 0,23 y = 1,69 x + 0,89
x Blut 8 ng/μl y Blut 16 ng/μl	154 154	0,018 0,033	0,8956 0,0000***	x = 0,63 y - 0,25 y = 1,27 x + 0,98
x Blut 16 ng/μl y Blut 40 ng/μl	154 154	0,033 0,075	0,9301 0,0000***	x = 0,17 y + 1,97 y = 2,28 x + 0,08

3.3.3.2 Getrocknete Blutflecken auf Leinenlappchen

Um die Zunahme der 4.977 bp-Deletion bei einzelnen Personen über eine bestimmte Zeitspanne verfolgen zu können, wurden 18 Leinenlappchen von 9 verschiedenen Probanden untersucht. Von diesen Personen stand DNA aus venösen Vollblutproben, isoliert mittels Zellyse und anschließender Salzextraktion (nach 2.3.2.1 und 2.3.2.2), in den DNA-Mengen von 8 ng/μl und 16 ng/μl zum Vergleich zur Verfügung. Unter Einbeziehung der Vergleichs-DNA ergab sich ein maximaler Untersuchungszeitraum von 12 Jahren. Nach der DNA-Extraktion aus den Blutflecken mit Hilfe der Chelex-100-Methode (nach 2.3.3) und Diatomeen-Aufreinigung der DNA (nach 2.4) konnte in allen 18 Proben lediglich die 142 bp-Bande, stellvertretend für die normale mtDNA, nachgewiesen werden. Erst nach einer DNA-Konzentrierung (nach 2.5) waren 184 bp-Banden, stellvertretend für die 4.977 bp-Deletion, im Polyacrylamidgel erkennbar (computeranalyisierte Rohdaten in Tab. 7.3, s. Anhang S. 111). Nach der Konzentrierung

wurden ungefähr maximal 12,8 ng/ μ l DNA zur Amplifizierung in die PCR eingesetzt. Mit zunehmendem Lebensalter einer Person war der Quotient I_{Del}/I_{Norm} erstmalig quantifizierbar und nahm dann mit steigendem Alter zu (Tab. 3.4). Bei einem 55-jährigen Probanden (Nr. 9) war keine deletierte mtDNA nachweisbar, ein Jahr später war dies mit einem Quotienten von 0,010 möglich. Nach einem weiteren Jahr stieg der Quotient auf 0,012 und wieder zwei Jahre später auf 0,015. In der Vergleichs-DNA des folgenden Jahres zeigte sich bei 8 ng/ μ l ein Quotient von 0,032 und bei 16 ng/ μ l von 0,060.

Tab. 3.4: Zunahme der Quotienten I_{Del}/I_{Norm} aus dem Blut neun verschiedener Personen über einen maximalen Zeitraum von 12 Jahren. Zur Verfügung standen maximal 12,8 ng/ μ l DNA aus getrockneten Blutflecken auf Leinenläppchen und Vergleichs-DNA aus venösem Vollblut in DNA-Konzentrationen von 8 ng/ μ l und 16 ng/ μ l.

Nr.	Quotienten I_{Del}/I_{Norm} der Blutflecken (maximal 12,8 ng/ μ l DNA)				Vergleichs-DNA (8 ng/ μ l / 16 ng/ μ l)	
1	0 (28 J.)				0 / 0	(33 J.)
2	0 (39 J.)				0,016 / 0,030	(44 J.)
3	0 (47 J.)	0,004 (48 J.)	0 (49 J.)	0,015 (51 J.)	0,028 / 0,036	(54 J.)
4	0 (51 J.)	0 (53 J.)			0 / 0,015	(54 J.)
5	0,042 (51 J.)				0,043 / 0,065	(55 J.)
6	0,003 (43 J.)	0,009 (46 J.)			0,032 / 0,038	(55 J.)
7	0,010 (52 J.)				0,024 / 0,038	(56 J.)
8	0 (50 J.)	0,003 (51 J.)			0,023 / 0,073	(57 J.)
9	0 (55 J.)	0,010 (56 J.)	0,012 (57 J.)	0,015 (59 J.)	0,032 / 0,060	(60 J.)

3.3.4 Die Mundschleimhautabstriche

Die DNA der Mundschleimhautabstriche (MSAs) wurde erstens durch direktes Einsetzen eines 2 mm³ großen Wattestückes in den Amplifikationsansatz, zweitens nach der Chelex-100/Diatomeen-Aufreinigung eines Wattestückes (nach 2.3.3 und 2.4) und drittens nach einer zusätzlichen DNA-Konzentrierung (nach 2.5) untersucht. Die MSAs der 99 Personen im Alter von 1 bis 96 Jahren wurden alle direkt in die PCR eingesetzt, 55 davon wurden zusätzlich aufgereinigt und 22 der aufgereinigten Proben anschließend konzentriert untersucht.

Durch direktes Einsetzen konnte in den 99 Proben lediglich die 142 bp-Bande in geringer Bandenstärke, stellvertretend für die normale mtDNA, nachgewiesen werden. Nach der DNA-Aufreinigung konnte erstmals deletierte mtDNA bei einem Alter von 63 Jahren mit einem Quotienten von 0,008 quantifiziert werden (Abb. 3.11). Bei den über 63-Jährigen konnte sie in 24 der 47 untersuchten Proben nachgewiesen werden.

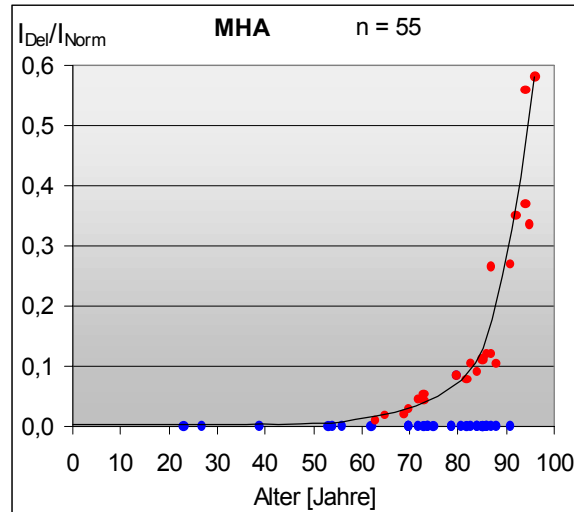


Abb. 3.11: Scatterdiagramm der Quotienten I_{Del}/I_{Norm} für Chelex-100/Diatomeen-aufgereinigte Mundschleimhautabstriche in Abhängigkeit des Alters. Dargestellt ist der quantifizierte Anteil der deletierten mtDNA oberhalb der Nachweisgrenze (●) sowie die Proben ohne nachweisbaren Deletionsanteil (●). Zusätzlich ist eine Trendlinie eingezeichnet. n bezeichnet die Anzahl der untersuchten MSA-Proben.

Den Proben mit nachweisbarer 4.977 bp-Deletion zufolge lässt sich die Zunahme des Quotienten I_{Del}/I_{Norm} mit steigendem Lebensalter nach einer Potenzfunktion konstatieren. Der Quotient stieg bis auf 0,582 bei einer 96-jährigen Person.

Zur genaueren Beurteilung der Deletionszunahme wurden die aufgereinigten Mundschleimhautabstriche zusätzlich mittels des Produkt-Moment-Korrelations-Tests der logarithmierten Quotienten (nach 2.12) analysiert (Abb. 3.12).

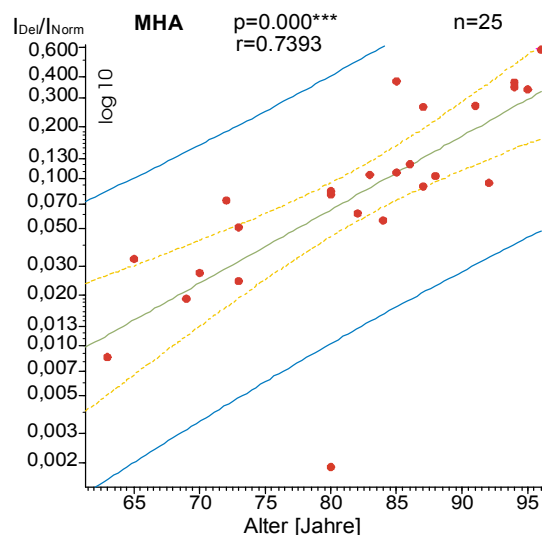


Abb. 3.12 Produkt-Moment-Korrelation der logarithmierten Quotienten I_{Del}/I_{Norm} für Chelex-100/Diatomeen-aufgereinigte Mundschleimhautabstriche in Abhängigkeit des Alters. Aufgeführt sind die Proben mit quantifizierbarem Deletionsanteil. Eingezeichnet sind die Regressionsgerade (grün) und der 95 %ige Vertrauensbereich für Mittelwerte (gelb) und für Einzelwerte (blau). Weiterhin sind der Korrelationskoeffizient r , der p -Wert und die Anzahl der untersuchten Proben n angegeben. Die Signifikanz-Stufen ($p \leq 0,05$) werden wie üblich mit Sternen bezeichnet (s. Kapitel 2.12.1).

Durch Ausschluss der Nullwerte als eine Folge der Logarithmierung zeigten die positiven Quotienten I_{Del}/I_{Norm} der Mundschleimhautabstriche eine „gute“ Korrelation mit dem Lebensalter einer Person (Korrelationskoeffizient $r = 0,7393$; s. Abb. 3.12).

Nach der Konzentrierung der DNA (nach 2.5) war die 4.977 bp-Deletion schon ab einem Alter von 54 Jahren mit einem Quotienten von 0,006 nachweisbar. Bei drei Personen ließ sich die Deletion nach der DNA-Konzentrierung mit einem Quotienten von 0,006, 0,009 und 0,010 registrieren, und bei weiteren drei Personen erhöhte sich eine bereits nachgewiesene Deletionsmenge (Abb. 3.13).

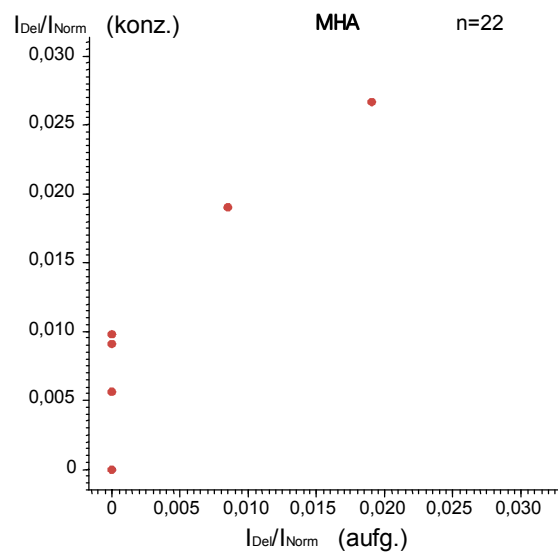


Abb. 3.13: Darstellung der Zunahme des Quotienten I_{Del}/I_{Norm} in den einzelnen Mundschleimhautabstrichen nach 4facher Konzentrierung der Chelex-100/Diatomeen-aufgereinigten Proben mittels Korrelationsdarstellung. Bei 15 Personen im Alter zwischen 23 und 91 Jahren konnte die Deletion selbst nach DNA-Konzentrierung nicht nachgewiesen werden. n bezeichnet die Anzahl der untersuchten Proben.
konz.: 4fach konzentriert aufg.: mit Chelex-100/Diatomeen aufgereinigt

Der Faktor der Zunahme des Quotienten I_{Del}/I_{Norm} betrug insgesamt 1,04 (Tab. 3.5).

Bei 15 Personen im Alter zwischen 23 und 91 Jahren konnte die Deletion selbst nach DNA-Konzentrierung nicht nachgewiesen werden.

Tab. 3.5: Spearman'scher Rangkorrelations-Test der Chelex-100/Diatomeen-aufgereinigten MSAs nach DNA-Konzentrierung (nach 2.5). Angegeben ist die Anzahl der untersuchten Proben n , das Mittel der x - und y -Variablen M_x/M_y , der Korrelationskoeffizient ρ , der p -Wert und die Regressionsgleichung der Regressionsgeraden aus Abb. 3.12. Die Zunahme des Quotienten I_{Del}/I_{Norm} wird durch den Steigungsfaktor (rote Zahl) ausgedrückt. Die Signifikanz-Stufen ($p \leq 0,05$) werden wie üblich mit Sternen bezeichnet (s. 2.12.1).

x-Variable y-Variable	n	M_x M_y	ρ p	Regressionsgleichung
x MSA aufg.	22	0,003	0,7605	$x = 0,79 y - 0,09$
y MSA konz.	22	0,005	0,0000***	$y = 1,04 x + 0,17$

3.3.5 Gegenüberstellung verschiedener biologischer Materialien

Um die verschiedenen formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebearten Gehirn, Herz, Lunge, Milz, Niere und Leber nach ihrer Anhäufung der 4.977 bp-Deletion sortieren zu können, wurden die gewonnenen Ergebnisse aus Kapitel 3.3.2 mit dem Wilcoxon-Test analysiert (nach Kapitel 2.12). Hierbei wurden die Quotienten I_{Del}/I_{Norm} verschiedener Gewebearten einer Person jeweils miteinander verglichen (Tab. 3.6).

Tab. 3.6: Wilcoxon-Test zum Vergleich der verschiedenen formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebe aus Gehirn, Herz, Milz, Niere, Leber und Lunge. n steht für die Anzahl der Personen, bei denen Proben von beiden zu vergleichenden Gewebearten untersucht wurden. Der Vergleich wird durch das Mittel ermöglicht. Zusätzlich sind die Streuung und der Wilcoxon p-Wert angegeben. Beim Vergleich Milz mit Lunge wurde an Stelle des Wilcoxon-Tests der Vorzeichentest gewählt. Die Signifikanz-Stufen ($p \leq 0,05$) werden wie üblich mit Sternen bezeichnet (s. Kapitel 2.12.1).

Variable	n	Mittel	Streuung	p
Gehirn	41	1,763	1,302	0,00000***
Herz	41	0,643	0,469	
Gehirn	18	1,216	1,156	0,00023***
Milz	18	0,276	0,293	
Gehirn	29	1,313	1,085	0,00001***
Niere	29	0,226	0,195	
Gehirn	31	1,362	1,066	0,00000***
Leber	31	0,122	0,119	
Gehirn	49	1,776	1,262	0,00000***
Lunge	49	0,130	0,315	
Herz	17	0,411	0,397	0,027*
Milz	17	0,258	0,292	
Herz	25	0,504	0,436	0,00005***
Niere	25	0,200	0,195	
Herz	25	0,482	0,384	0,00003***
Leber	25	0,123	0,130	
Herz	39	0,657	0,477	0,00000***
Lunge	39	0,152	0,343	
Milz	16	0,243	0,280	0,044*
Niere	16	0,152	0,205	
Milz	17	0,256	0,290	0,0019**
Leber	17	0,069	0,067	
Milz	18	0,276	0,293	0,0055**
Lunge	18	0,062	0,176	
Niere	22	0,177	0,193	0,0100**
Leber	22	0,092	0,092	
Niere	29	0,226	0,195	0,00006***
Lunge	29	0,039	0,143	
Leber	30	0,123	0,121	0,0037**
Lunge	30	0,052	0,158	

Den Ergebnissen zufolge enthielt das Gehirngewebe den größten Anteil an deletierter mtDNA, gefolgt von den Geweben Herz, Milz, dann Niere und zuletzt Leber (Tab. 3.6, Abb. 3.14). Während die Lunge in der Altersgruppe ≤ 75 Jahren am Ende einzusortieren war, fand sie in der Altersgruppe ≤ 90 Jahren schon nach dem Herzgewebe Platz.

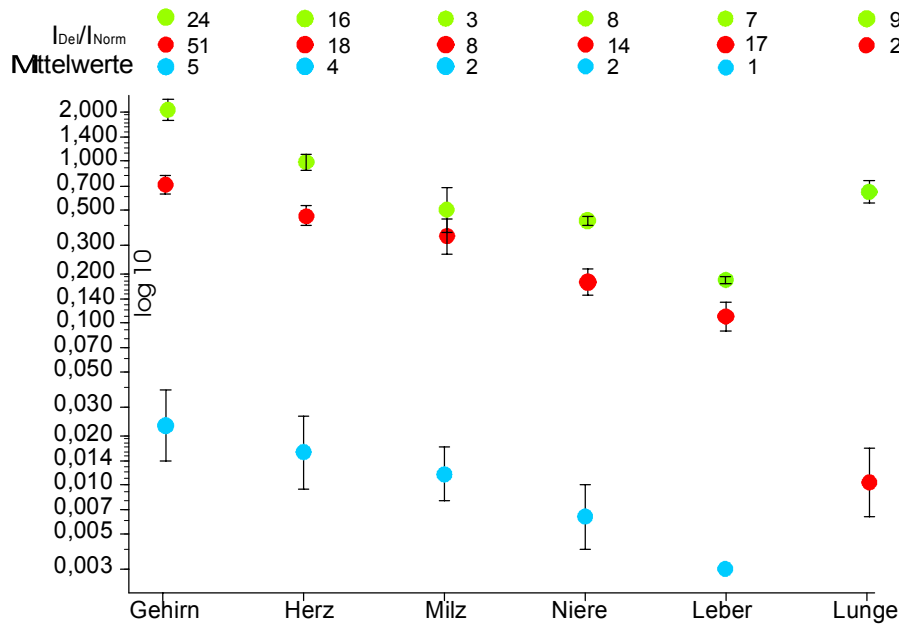


Abb. 3.14: Gegenüberstellung der formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebearten Gehirn, Herz, Milz, Niere, Leber und Lunge in ihrer altersabhängigen Anhäufung der 4.977 bp-Deletion. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung für die jeweilige Gewebeart in drei Altersgruppen von ≤ 30 Jahren (blau), ≤ 75 Jahren (rot) und ≤ 90 Jahren (grün). Zusätzlich ist die Anzahl der in der jeweiligen Altersgruppe untersuchten Proben angegeben.

Um neben den verschiedenen Gewebearten auch venöses Vollblut, Mundschleimhautabstriche und Haarwurzeln in eine direkte Gegenüberstellung miteinbeziehen zu können, wurden diese Materialien jeweils von vier Leichen im Alter von 23, 27, 39 und 88 Jahren untersucht.

Auch diese Chelex-100/Diatomeen-aufgereinigten (nach 2.3.3 und 2.4) Gewebe Gehirn, Skelettmuskulatur (M. iliopsoas), Herz, Leber und Haut konnten nach ihrer Anhäufung der 4.977 bp-Deletion sortiert werden (Abb. 3.15). Hierbei ergab sich für das Gehirn jeweils die höchste Menge an deletierter mtDNA, gefolgt von der Skelettmuskulatur und dem Herzen. In der Leber waren die geringsten Mengen deletierter mtDNA zu finden. In den Hautgeweben war bei keiner der vier Leichen die 180 bp-Bande, stellvertretend für die deletierte mtDNA nachweisbar.

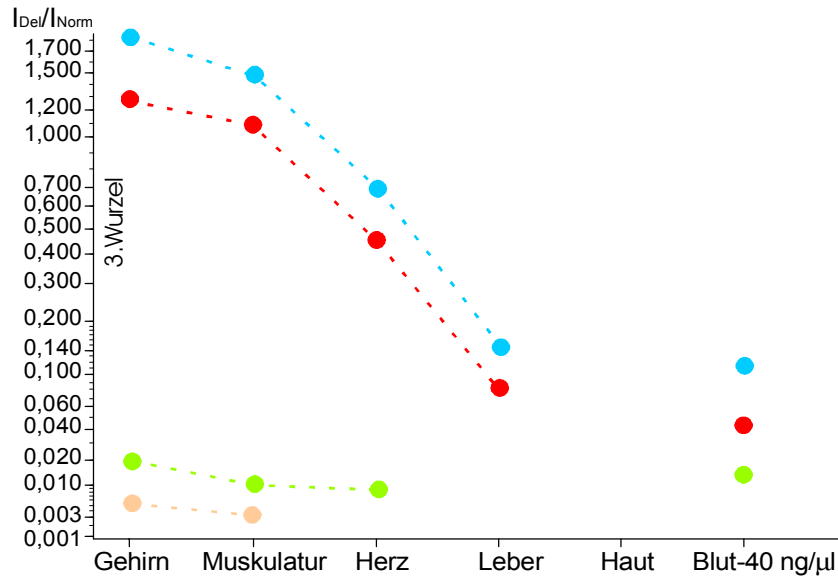


Abb. 3.15: Darstellung der Quotienten I_{Del}/I_{Norm} aus den Geweben Gehirn, Skelettmuskulatur, Herz, Leber, Haut und aus venösem Vollblut der vier Leichen im Alter von 23 (orange), 27 (grün), 39 (rot) und 88 Jahren (blau). Die DNA der Gewebeprobe wurde nach der Chelex-100 I_{Del}/I_{Norm} /Diatomeen-Aufreinigung (nach 2.3.3 und 2.4) und die Blutproben in einer DNA-Konzentration von 40 ng/μl untersucht.

In den Blutproben der DNA-Konzentrationen von 2 ng/μl, 8 ng/μl, 16 ng/μl und 40 ng/μl zeigte die Quantifizierung der 4.977 bp-Deletion dem Kapitel 1.1.1 entsprechende Ergebnisse. In der höchsten Blut-DNA-Konzentration von 40 ng/μl ergab sich für die 27-jährige Leiche ein Quotient von 0,014, für die 39-jährige ein Quotient von 0,066 und für die 88-jährige Leiche ein Quotient von 0,114 (Abb. 3.15).

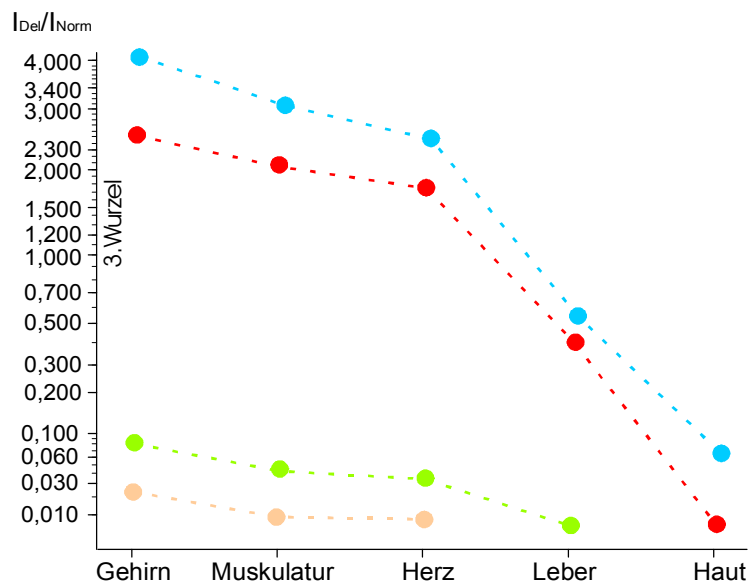


Abb. 3.16: Darstellung der Quotienten I_{Del}/I_{Norm} aus den Geweben Gehirn, Skelettmuskulatur, Herz, Leber und Haut der vier Leichen im Alter von 23 (orange), 27 (grün), 39 (rot) und 88 Jahren (blau) nach zusätzlicher DNA-Konzentrierung der Chelex-100/Diatomeen-aufgereinigten Gewebeprobe (nach Kapitel 2.5).

Selbst nach 4facher DNA-Konzentrierung gelang es nicht in den Mundschleimhautabstrichen oder in den Haarwurzeln neben der 142 bp-Bande die 184 bp-Bande, stellvertretend für die deletierte mtDNA, nachzuweisen.

In den Gewebeproben konnte hingegen bei gleicher Vorgehensweise ein Anstieg des Anteils der deletierten mtDNA verzeichnet werden (Abb. 3.16). So war es nun auch möglich, in den Hautproben der 39- und der 88-jährigen Leiche die 4.977 bp-Deletion zu quantifizieren. Nach der DNA-Konzentrierung stieg der Quotient im Gehirngewebe um den Faktor 2,16, im Muskelgewebe um 2,02, im Herzgewebe um 3,52 und im Lebergewebe um 3,88 an (Tab. 3.7).

Tab. 3.7: Spearman'scher Rangkorrelations-Test der Chelex-100/Diatomeen-aufgereinigten Leichengewebe Gehirn, Skelettmuskulatur, Herz und Leber nach DNA-Konzentrierung. Angegeben sind die Anzahl der untersuchten Proben n , das Mittel der x - und y -Variablen M_x/M_y , der Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizient ρ , der p -Wert und die Regressionsgleichungen. Die Zunahme des Quotienten I_{Del}/I_{Norm} wird durch den Steigungsfaktor (rote Zahl) ausgedrückt. Die Signifikanz-Stufen ($p \leq 0,05$) werden wie üblich mit Sternen bezeichnet (s. Kapitel 2.12.1). konz.: 4fach konzentriert aufg.: mit Chelex-100/Diatomeen aufgereinigt

x-Variable y-Variable	n	M_x M_y	ρ p	Regressionsgleichung
x Gehirn (aufg.) y Gehirn (konz.)	4 4	0,782 1,684	1,0000 0,0000***	$x = 0,46 y + 0,68$ $y = 2,16 x - 0,53$
x Skelettmuskulatur (aufg.) y Skelettmuskulatur (konz.)	4 4	0,647 1,305	1,0000 0,0000***	$x = 0,49 y + 0,29$ $y = 2,02 x - 0,20$
x Herz (aufg.) y Herz (konz.)	4 4	0,294 1,064	1,0000 0,0000***	$x = 0,28 y - 0,68$ $y = 3,52 x + 2,91$
x Leber (aufg.) y Leber (konz.)	4 4	0,056 0,238	0,9487 0,051	$x = 0,25 y - 0,29$ $y = 3,88 x + 2,00$

3.4 Perzentilenkurven der 4.977 bp-Deletion

Die Quotienten $I_{\text{Del}}/I_{\text{Norm}}$ des formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gehirngewebes, der venösen Vollblutproben einer DNA-Konzentration von 40 ng/ μl und der nach 2.3.3 und 2.4 aufgereinigten Mundschleimhautabstriche wurden in ihrer Altersabhängigkeit zusätzlich durch Perzentilenkurven dargestellt (Abb. 3.17 a-c).

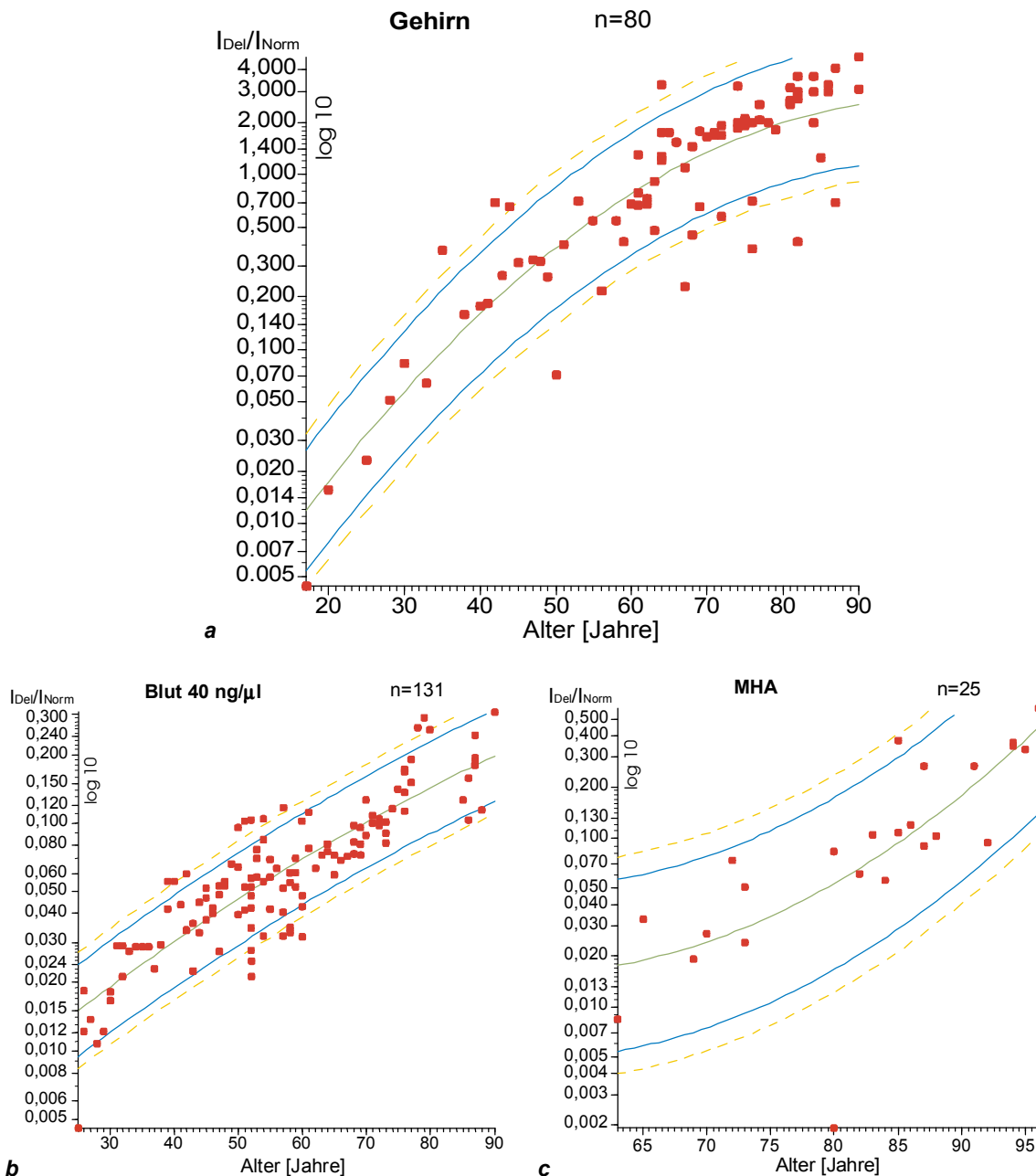


Abb. 3.17 a-c: Perzentilenkurven der logarithmierten Quotienten $I_{\text{Del}}/I_{\text{Norm}}$ **a** für formalinfixiertes, in Paraffin eingebettetes Gehirngewebe, **b** für venöses Vollblut einer DNA-Konzentration von 40 ng/ μl und **c** für Chelex-100/Diatomeen-aufgereinigte Mundschleimhautabstriche. Als mittlere Linie (grün) ist die 50 %-Perzentile gezeichnet, flankiert von der 10 %- und der 90 %-Perzentile (blau) und ganz außen von der 5 %- und der 95 %-Perzentile (orange).

Diese in der Medizin übliche Darstellung der Approximationspolynome zweiten Grades ermöglichte eine genauere Anpassung der Kurve an die gewonnenen Quotienten I_{Del}/I_{Norm} . Durch die tabellarische Darstellungsform der Perzentilen gewann man eine exakte Zuordnung der Quotienten zu dem entsprechenden Lebensalter (Tab. 3.8 - 3.10).

Tab. 3.8: Tabelle der approximierten 5 %-, 10 %-, 50 %-, 90 %- und 95 %-Perzentilen der Quotienten I_{Del}/I_{Norm} aus formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gehirngewebe von Personen im Alter von 17 bis 90 Jahren

Alter [Jahre]	approximierte Perzentile					Alter [Jahre]	approximierte Perzentile				
	5%	10%	50%	90%	95%		5%	10%	50%	90%	95%
17	0,004	0,005	0,012	0,026	0,033	54	0,188	0,232	0,518	1,155	1,428
18	0,005	0,006	0,014	0,030	0,037	55	0,202	0,249	0,556	1,241	1,535
19	0,006	0,007	0,015	0,034	0,042	56	0,216	0,268	0,597	1,331	1,646
20	0,006	0,008	0,017	0,039	0,048	57	0,232	0,287	0,639	1,425	1,763
21	0,007	0,009	0,020	0,044	0,055	58	0,248	0,307	0,684	1,524	1,886
22	0,008	0,010	0,022	0,050	0,062	59	0,265	0,327	0,730	1,627	2,013
23	0,009	0,011	0,025	0,057	0,070	60	0,282	0,349	0,778	1,735	2,146
24	0,010	0,013	0,029	0,064	0,079	61	0,300	0,371	0,828	1,846	2,284
25	0,012	0,014	0,032	0,072	0,089	62	0,319	0,395	0,880	1,962	2,427
26	0,013	0,016	0,036	0,081	0,100	63	0,338	0,419	0,933	2,081	2,575
27	0,015	0,018	0,041	0,091	0,113	64	0,358	0,443	0,989	2,204	2,727
28	0,017	0,021	0,046	0,102	0,126	65	0,379	0,469	1,045	2,331	2,884
29	0,019	0,023	0,051	0,114	0,141	66	0,400	0,495	1,104	2,461	3,045
30	0,021	0,026	0,057	0,128	0,158	67	0,422	0,522	1,164	2,595	3,210
31	0,023	0,029	0,064	0,143	0,177	68	0,444	0,549	1,225	2,731	3,379
32	0,026	0,032	0,071	0,159	0,197	69	0,466	0,577	1,287	2,870	3,550
33	0,029	0,036	0,079	0,177	0,219	70	0,489	0,605	1,350	3,011	3,725
34	0,032	0,040	0,088	0,197	0,243	71	0,513	0,634	1,414	3,154	3,902
35	0,035	0,044	0,098	0,218	0,270	72	0,536	0,663	1,479	3,298	4,080
36	0,039	0,049	0,108	0,241	0,299	73	0,560	0,693	1,544	3,444	4,261
37	0,043	0,054	0,120	0,267	0,330	74	0,584	0,722	1,610	3,590	4,442
38	0,048	0,059	0,132	0,295	0,365	75	0,607	0,751	1,676	3,737	4,623
39	0,053	0,065	0,146	0,325	0,402	76	0,631	0,781	1,741	3,883	4,804
40	0,058	0,072	0,160	0,357	0,442	77	0,655	0,810	1,807	4,029	4,985
41	0,064	0,079	0,176	0,393	0,486	78	0,678	0,839	1,872	4,174	5,163
42	0,070	0,087	0,193	0,431	0,534	79	0,702	0,868	1,936	4,316	5,340
43	0,077	0,095	0,212	0,472	0,584	80	0,725	0,896	1,999	4,457	5,514
44	0,084	0,104	0,231	0,516	0,638	81	0,747	0,924	2,061	4,595	5,685
45	0,092	0,113	0,253	0,563	0,697	82	0,769	0,951	2,121	4,730	5,852
46	0,100	0,123	0,275	0,614	0,759	83	0,790	0,978	2,180	4,861	6,014
47	0,109	0,134	0,300	0,668	0,826	84	0,811	1,003	2,237	4,987	6,170
48	0,118	0,146	0,325	0,726	0,898	85	0,830	1,027	2,291	5,109	6,321
49	0,128	0,158	0,353	0,787	0,974	86	0,849	1,051	2,343	5,226	6,465
50	0,139	0,171	0,382	0,853	1,055	87	0,867	1,073	2,393	5,336	6,602
51	0,150	0,185	0,413	0,922	1,141	88	0,884	1,094	2,440	5,441	6,731
52	0,162	0,200	0,446	0,995	1,231	89	0,900	1,114	2,484	5,538	6,852
53	0,174	0,216	0,481	1,073	1,327	90	0,915	1,132	2,524	5,628	6,963

Tab. 3.9: Tabelle der approximierten 5 %-, 10 %-, 50 %-, 90 %- und 95 %-Perzentilen der Quotienten I_{Del}/I_{Norm} aus Blut (40 ng/ μ l) von Personen im Alter von 25 bis 90 Jahren

Alter [Jahre]	approximierte Perzentile					Alter [Jahre]	approximierte Perzentile				
	5%	10%	50%	90%	95%		5%	10%	50%	90%	95%
63	0,004	0,005	0,018	0,057	0,077	80	0,012	0,017	0,054	0,173	0,236
64	0,004	0,006	0,018	0,059	0,080	81	0,013	0,018	0,059	0,191	0,261
65	0,004	0,006	0,019	0,061	0,083	82	0,015	0,020	0,066	0,213	0,290
66	0,004	0,006	0,020	0,063	0,086	83	0,017	0,023	0,074	0,238	0,324
67	0,005	0,006	0,021	0,066	0,090	84	0,019	0,026	0,083	0,267	0,364
68	0,005	0,007	0,022	0,070	0,095	85	0,021	0,029	0,093	0,300	0,410
69	0,005	0,007	0,023	0,073	0,100	86	0,024	0,033	0,105	0,339	0,463
70	0,005	0,007	0,024	0,078	0,106	87	0,027	0,037	0,119	0,385	0,526
71	0,006	0,008	0,026	0,083	0,113	88	0,031	0,422	0,136	0,439	0,599
72	0,006	0,008	0,027	0,088	0,120	89	0,035	0,048	0,156	0,503	0,686
73	0,007	0,009	0,029	0,095	0,129	90	0,041	0,056	0,179	0,578	0,789
74	0,007	0,010	0,032	0,102	0,139	91	0,047	0,064	0,207	0,667	0,910
75	0,008	0,011	0,034	0,110	0,150	92	0,054	0,074	0,240	0,773	1,055
76	0,008	0,011	0,037	0,119	0,163	93	0,063	0,086	0,279	0,899	1,227
77	0,009	0,013	0,040	0,130	0,178	94	0,074	0,101	0,326	1,051	1,433
78	0,010	0,014	0,044	0,142	0,194	95	0,087	0,118	0,382	1,232	1,682
79	0,011	0,015	0,049	0,157	0,214	96	0,102	0,140	0,450	1,452	1,981

Tab. 3.10: Tabelle der approximierten 5 %-, 10 %-, 50 %-, 90 %- und 95 %-Perzentilen der Quotienten I_{Del}/I_{Norm} aus Mundschleimhautabstrichen von Personen im Alter von 63 bis 96 Jahren

Alter [Jahre]	approximierte Perzentile					Alter [Jahre]	approximierte Perzentile				
	5%	10%	50%	90%	95%		5%	10%	50%	90%	95%
25	0,008	0,009	0,015	0,024	0,027	58	0,036	0,040	0,064	0,102	0,116
26	0,009	0,010	0,016	0,025	0,028	59	0,037	0,042	0,067	0,106	0,120
27	0,009	0,010	0,017	0,026	0,030	60	0,039	0,044	0,069	0,111	0,125
28	0,010	0,011	0,017	0,028	0,031	61	0,040	0,045	0,072	0,115	0,130
29	0,010	0,011	0,018	0,029	0,033	62	0,042	0,047	0,075	0,119	0,135
30	0,011	0,012	0,019	0,030	0,034	63	0,043	0,049	0,078	0,124	0,140
31	0,011	0,013	0,020	0,032	0,036	64	0,045	0,051	0,081	0,129	0,146
32	0,012	0,013	0,021	0,033	0,038	65	0,047	0,053	0,084	0,134	0,152
33	0,012	0,014	0,022	0,035	0,040	66	0,049	0,055	0,087	0,139	0,157
34	0,013	0,014	0,023	3,663	0,041	67	0,050	0,057	0,091	0,144	0,163
35	0,013	0,015	0,024	0,038	0,043	68	0,052	0,059	0,094	0,150	0,169
36	0,014	0,016	0,025	0,040	0,045	69	0,054	0,061	0,098	0,155	0,176
37	0,015	0,017	0,026	0,042	0,048	70	0,056	0,064	0,101	0,161	0,182
38	0,015	0,017	0,028	0,044	0,050	71	0,058	0,066	0,105	0,167	0,189
39	0,016	0,018	0,029	0,046	0,052	72	0,060	0,068	0,109	0,173	0,196
40	0,017	0,019	0,030	0,048	0,054	73	0,063	0,071	0,113	0,179	0,203
41	0,018	0,020	0,032	0,050	0,057	74	0,065	0,073	0,117	0,186	0,210
42	0,002	0,021	0,033	0,052	0,059	75	0,067	0,076	0,121	0,192	0,218
43	0,019	0,022	0,034	0,055	0,062	76	0,070	0,079	0,125	0,199	0,225
44	0,020	0,023	0,036	0,057	0,065	77	0,072	0,081	0,130	0,206	0,233
45	0,021	0,024	0,038	0,060	0,068	78	0,074	0,084	0,134	0,213	0,241
46	0,022	0,025	0,039	0,062	0,071	79	0,077	0,087	0,139	0,221	0,250
47	0,027	0,026	0,041	0,065	0,074	80	0,080	0,090	0,143	0,228	0,258
48	0,024	0,027	0,043	0,068	0,077	81	0,082	0,093	0,148	0,236	0,267
49	0,025	0,028	0,045	0,071	0,080	82	0,085	0,096	0,153	0,244	0,276
50	0,026	0,029	0,046	0,074	0,084	83	0,088	0,100	0,158	0,252	0,285
51	0,027	0,030	0,048	0,077	0,087	84	0,091	0,103	0,164	0,261	0,295
52	0,028	0,032	0,050	0,080	0,091	85	0,094	0,106	0,169	0,269	0,305
53	0,029	0,033	0,053	0,084	0,095	86	0,097	0,110	0,175	0,278	0,314
54	0,030	0,034	0,055	0,071	0,099	87	0,100	0,113	0,180	0,287	0,325
55	0,032	0,036	0,057	0,091	0,103	88	0,103	0,117	0,186	0,296	0,335
56	0,033	0,037	0,059	0,094	0,107	89	0,107	0,121	0,192	0,306	0,346
57	0,034	0,039	0,062	0,098	0,111	90	0,110	0,126	0,198	0,315	0,356

4 Diskussion

Um mit Hilfe der 4.977 bp-Deletion in mitochondrialer DNA verwertbare Ergebnisse zur Lebensalterschätzung gewinnen zu können, waren einige Vorbedingungen zu erfüllen. Es mussten zuerst geeignete DNA-Extraktionsmethoden gefunden und zum Teil modifiziert werden. Des Weiteren war es nötig, unter optimierten PCR-Bedingungen deletionspezifische DNA-Fragmente zu amplifizieren, um anschließend die quantitative Detektion dieser Fragmente zu ermöglichen.

Da in der vorliegenden Untersuchung unterschiedliche Ausgangsmaterialien zur Verfügung standen, war es notwendig, entsprechend dem jeweiligen Gewebematerial eine geeignete Präparationsmethode zu finden.

DNA-Extraktion aus formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe

Das formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Gewebe stellt eine besondere Anforderung an die Extraktionsmethode. Bedingt durch die Präparationsmethode, ist mit dem Gewebe auch die DNA besonderen Belastungen ausgesetzt. Von besonderer Relevanz ist hierbei die Qualität des Formalins, welches zur Fixierung des Gewebes in gepuffertem Zustand eingesetzt wird. Formalin minderer Qualität kann eine erhebliche Menge Ameisensäure enthalten, welche zu einer irreversiblen Schädigung der DNA führen kann. Da es im Laufe dieses Fixierungsprozesses zusätzlich zu einer Auswaschung der DNA kommt [78], hängt die DNA-Menge, die aus dem formalinfixierten Material isoliert werden kann, von der Dauer der Fixierung ab.

Die Menge und auch die Qualität der DNA hängt zudem von dem Zustand des Gewebes zum Zeitpunkt der Paraffin-Einbettung ab. Von Bedeutung sind hierbei vor allem die beginnenden autolytischen Prozesse, ebenso wie eine mögliche Verunreinigung des Gewebes.

Die Herauslösung des Gewebes aus dem Paraffin steht bei dem auf diese Art eingebetteten Material im Vordergrund. Die bisher in der Forschung angewandten Methoden zur DNA-Extraktion aus formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe bestanden meist in einer Entparaffinisierung mittels Xylen und anschließender Proteinverdauung [120]. Die Probleme der Entparaffinisierung mit organischen Lösungsmitteln liegen in der sehr zeitaufwendigen Arbeitstechnik und in der hohen Kontaminationsgefahr durch zahlreiche Zentrifugations- und Waschschrte [35].

In der vorliegenden Untersuchung wurde deshalb zur DNA-Extraktion eine Mikrowellen-Behandlung mit anschließender Proteinverdauung vorgezogen. Diese Methode ist zum einen weniger zeit- und arbeitsaufwendig, zum anderen weniger anfällig für Kontaminationen [7]. Des Weiteren ist von Vorteil, dass bei der Präparation der DNA aus den unterschiedlichen Gewebearten eine einheitliche Menge isolierter DNA gewonnen werden konnte. Einzig aus dem Lungengewebe stand erheblich weniger DNA zur Verfügung. Dies lässt sich möglicherweise auf die Gewebestruktur der Lunge zurückführen, da es bei der Einbettung dieses Gewebes in Paraffin zu großen Paraffininseln innerhalb des Gewebes kommen kann. Für die geringe DNA-Ausbeute aus Lungengewebe lassen sich daher keine methodische Ursachen vermuten.

Insgesamt kann die hier angewandte Methode für die DNA-Extraktion aus den formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebearten als äußerst geeignet angesehen werden. Die einfache Methodik und der Vorteil einer gleichzeitigen Behandlung zahlreicher Proben ermöglichte es, aus allen Gewebearten ausreichend DNA für die weiterführenden Untersuchungen gewinnen zu können.

DNA-Extraktion aus venösem Vollblut

Das venöse Vollblut stellt an eine geeignete Extraktionsmethode hingegen ganz andere Anforderungen. Der entscheidende Schritt bei der DNA-Gewinnung aus diesem Material ist die vollständige Entfernung des Hämoglobins und der Zellrückstände.

Insgesamt steht für die DNA-Präparation aus Blut eine große Anzahl geeigneter Methoden zur Verfügung. Arbeitsgruppen, die sich mit dem Nachweis der 4.977 bp-Deletion in Blut beschäftigten, wählten in der Regel DNA-Präparations-Kits [180] oder klassische Methoden, wie beispielsweise modifizierte Methoden der Phenol/Chloroform-Methode [103].

In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings für die DNA-Präparation die Zellyse mit anschließender Salzextraktion nach Miller et al. (1988) [108] angewandt. Die Vorteile dieser Methode bestehen in einer einfachen und schnellen Vorgehensweise, sowie in der Gewinnung reiner DNA durch die Möglichkeit intensiver Waschschriffe. Gerade das Erhalten äußerst reiner DNA war für die Untersuchung der 4.977 bp-Deletion von entscheidender Bedeutung, da die oft nur in geringer Menge vorhandene 4.977 bp-deletierte mtDNA nicht durch überschüssige Proteine oder degradierte DNA maskiert

werden durfte. Erwartungsgemäß konnte aus venösem Vollblut eine große Menge an DNA extrahiert werden, die in allen Fällen für die sich anschließenden Reaktionen ausreichte.

DNA-Extraktion mit Hilfe der kombinierten Chelex-100/Diatomeen-Methode

Bei der Präparation der DNA aus frischem Gewebe waren keine Schwierigkeiten zu erwarten, was durch die große Anzahl an verfügbaren Extraktionsmethoden, wie z. B. der Phenol/Chloroform-Methode [152], der Methoden mit Proteinase-Verdauung [27] oder einer Vielzahl an Präparations-Kits [104, 105], deutlich wird.

In der vorliegenden Untersuchung wurde für die DNA-Gewinnung aus frischem Gewebe die Chelex-100-Methode, modifiziert nach Walsh et al. (1991) [176], als einfache und effiziente Extraktionsmethode gewählt. Die Qualität der DNA unterliegt bei dieser Präparationsmethode jedoch relativ großen Schwankungen [51]. Da durch die alleinige Extraktion mit dem Chelatbildner Chelex-100 und der Proteinase K denaturierte Enzyme und degradierte DNA im Größenbereich unter 100 bp nicht vollständig abgetrennt werden, kann es zu einer Maskierung der DNA und zu einer Störung der anschließenden PCR kommen [122]. Deshalb wurde an die DNA-Extraktion durch Chelex-100 zusätzlich eine Aufreinigung der DNA durch Diatomeen nach Günther et al. (1995) [51] angeschlossen. Diese kombinierte Methode gewährleistet so eine hohe Qualität der gewonnenen DNA.

Gerade aus diesem Grund wurde diese Methodenkombination ebenfalls für die DNA-Extraktion aus den Mundschleimhautabstrichen, den auf Leinenläppchen getrockneten Blutflecken und den Haarwurzeln als geeignet angesehen. Besonders bei den Mundschleimhautabstrichen und den Haarwurzeln sollte im Allgemeinen großer Wert auf eine effektive DNA-Extraktionsmethode gelegt werden, denn in diesen Materialien ist aufgrund der niedrigen Zellzahl nur eine sehr geringe Menge an DNA zu erwarten.

Der einzige Nachteil dieser Methodik besteht in der nicht möglichen spektralphotometrischen DNA-Mengen-Bestimmung. Dies ist zum einen durch das Guanidinthiocyanat bedingt, das im DNA-Extrakt die Messung stört. Zum anderen wird möglicherweise die Messschwelle des UV-Spektralphotometers durch die geringe Menge an vorhandener DNA nicht erreicht, was auf die niedrigen Bindungsaffinitäten der Diatomeen für Nukleotide und Oligonukleotide zurückgeführt werden kann [13].

Optimierung der enzymatischen Amplifizierung

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, die 4.977 bp-Deletion nicht nur in verschiedenen biologischen Materialien nachzuweisen, sondern vor allem quantitative Aussagen über diese Deletion treffen zu können. Dieser quantitative Aspekt stellt besondere Anforderungen an die Methode. Mit Hilfe einer optimierten enzymatischen Amplifizierung müssen spezifische DNA-Fragmente, sowohl stellvertretend für die deletierte als auch für die normale mtDNA vervielfältigt werden, damit diese anschließend mit Hilfe einer geeigneten Quantifizierungsmethode erfasst werden können.

Frühere Versuchsansätze bedienten sich häufig der *nested PCR* zur Steigerung der Sensitivität. Zwar konnte hier die 4.977 bp-Deletion bei gesunden Personen nachgewiesen werden [44], doch sind die Ergebnisse aufgrund der hohen Kontaminationsgefahr dieser Methode fragwürdig. So hat sich die *nested PCR* beispielsweise in der Spurenanalytik deshalb nicht durchsetzen können [141].

Eine geeignete Methode zur Untersuchung der 4.977 bp-Deletion wurde von Müller-Höcker et al. (1998) [115] am Herzgewebe eines 26-jährigen Patienten mit Kearns-Sayre-Syndrom (KSS) entwickelt. Die Grundlage dieser Methode bildete die Koamplifikation zweier Primerpaare in einem gemeinsamen Reaktionsansatz, dem sogenannten Multiplex-Ansatz. Dies ermöglichte einen direkten Vergleich der spezifischen PCR-Resultate miteinander, da sie so denselben Bedingungen ausgesetzt waren. Die erheblich geringere Sensitivität im Vergleich zu einer „normalen“ PCR muss durch eine größere für die Amplifizierung benötigte DNA-Menge ausgeglichen werden [167].

Ebenfalls optimal waren in dieser Methode die Primer gewählt, die deshalb der vorliegenden Arbeit ebenfalls zu Grunde gelegt wurden. Die Primerlänge war mit 21 bis 23 bp so gewählt, dass mit einer geeigneten Hybridisierungstemperatur unspezifische Signale, die durch das Einsetzen einer großen Menge an DNA in die PCR entstehen können, vermieden werden konnten. Damit spezifische DNA-Fragmente als Basis einer geeigneten Quantifizierung entstehen können, ist des Weiteren die Primerposition von Bedeutung. Allgemein gilt: je kleiner die Amplifikationsfragmente sind, desto größer ist die Amplifizierungseffizienz [180]. Somit kann der Einfluss der DNA-Degradation auf die entstehenden Fragmente in den Größen von 142 bp und 184 bp als gering angesehen werden. Bei vielen Arbeitsgruppen dürften nicht optimal gewählte deletionspezifische DNA-Fragmente bei ungünstiger Primerwahl die Ursache für die aufgetretenen Schwierigkeiten sein.

rigkeiten ihrer Untersuchung an der 4.977 bp-Deletion sein [88, 104, 180]. Auch wiesen in manchen Studien die relevanten DNA-Fragmentgrößen zu große Differenzen auf [10], was die Vergleichbarkeit der entstehenden PCR-Produkte durch den Amplifikationsvorteil des kürzeren Fragments deutlich einschränkt.

Für eine reproduzierbare DNA-Vervielfältigung ist jedoch neben den Primern auch die Magnesiumchloridkonzentration, die Hybridisierungstemperatur, die eingesetzte DNA-Menge sowie die Zykluszahl relevant. Aufgrund der Heterogenität des in dieser Arbeit untersuchten Materials, vor allem aber aufgrund der Anwendung der Methode auch an gesunden Personen, konnte nicht auf weitere PCR-Bedingungen aus der Literatur zurückgegriffen werden. Eine Optimierung wurde deshalb notwendig. Die optimale Hybridisierungstemperatur lag um 3 °C höher als die errechnete Schmelztemperatur der jeweiligen Primer, die lediglich einen Anhaltspunkt für die Etablierung der PCR bedeuten sollte. Da der Anteil der 4.977 bp-deletierten mtDNA in gesunden Personen im Vergleich zu Patienten mit mitochondrialen Erkrankungen, wie z. B. dem KSS, um ungefähr das 100fache geringer ist [190], wurde in dieser Arbeit eine höhere als die von der Arbeitsgruppe um Müller-Höcker [152] vorgeschlagene Zykluszahl für deletionsspezifische Fragmente gewählt. Des Weiteren ist die benötigte Zykluszahl von der Größe der amplifizierten DNA-Fragmente sowie von dem untersuchten biologischen Material abhängig und bedarf deshalb einer Anpassung [152].

Durch die hier erfolgte Optimierung der PCR konnte die Sensitivität der PCR so gesteigert werden, dass eine reproduzierbare Amplifikation der deletionsspezifischen Fragmente erreicht werden konnte.

Quantitative Detektion der relevanten Amplifizierungsfragmente

Erste Untersuchungen der 4.977 bp-Deletion, durchgeführt von Linnane et al. (1990) [91], Cortopassi und Arnheim (1990) [30] und Yen et al. (1991) [185], erfüllten den hier geforderten quantitativen Aspekt nicht. Sie beschränkten sich auf den bloßen Nachweis der Deletion in einzelnen Gewebearten durch die Amplifizierung deletionsspezifischer DNA-Fragmente, ihrer elektrophoretischen Auftrennung in Polyacrylamid- oder Agarosegelen und dem dortigen Nachweis mittels verschiedener Färbemethoden.

Die ersten Versuchsansätze zur Quantifizierung der 4.977 bp-Deletion stammten von Lee et al. (1994) [88], die sich der Verdünnungsmethode bedienten. Hierbei wurde der

Anteil der deletierten mtDNA durch den höchsten Verdünnungsgrad, bei dem ein deletionsspezifisches PCR-Fragment auf einem Gel gerade noch sichtbar ist, bestimmt. Auch die Lübecker Arbeitsgruppe um Meissner et al. [105] griff 1999 die Verdünnungsmethode von Lee et al. (1994) [88] auf, nachdem sie anfangs ebenfalls nur das Vorhandensein der 4.977 bp-Deletion im Polyacrylamidgel prüften [104, 180]. Bis zum Zeitpunkt der Entstehung dieser Arbeit waren somit die Verdünnungsmethode und ihre Modifikationen die am häufigsten zur Quantifizierung angewandten Untersuchungsmethoden. Diese Methoden sind jedoch in ihren Quantifizierungsversuchen sehr ungenau, da zu viele unkontrollierbare Faktoren der DNA-Präparation und der Färbemethoden Einfluss nehmen können. Fluoreszierende Interkalatoren, wie das meist verwendete hochgiftige Ethidiumbromid, lagern sich bei doppelsträngiger DNA zwischen den Strangwindungen ein und markieren sie. Im Falle von Ethidiumbromid geschieht dies etwa alle 4 - 5 Nukleotide in Abhängigkeit von der DNA-Sequenz. Dieser Komplex ist zusätzlich abhängig von der vorliegenden Salzkonzentration und außerdem reversibel [67]. Aus diesen Gründen müssen diese Färbemethoden als sehr ungenau betrachtet werden und scheiden damit für die Quantifizierung von PCR-Produkten aus.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Detektion und Quantifizierung der beiden relevanten Amplifizierungsfragmente die Kapillarelektrophorese gewählt. Diese zeigt deutliche Vorteile gegenüber einer horizontalen Elektrophorese. So werden z. B. Doppelbanden trotz denaturierender Bedingungen vermieden, da nur ein Strang der Amplifikate aufgrund der Markierung des Primers mit einem Fluoreszenzfarbstoff nachgewiesen wird. Zu erwähnen ist auch die bis zu 100fach höhere Sensitivität dieser Methode im Vergleich zu mit Ethidiumbromid gefärbten Gelen [67]. Die guten Ergebnisse der automatischen Fragmentanalyse zeigen sich in zahlreichen Veröffentlichungen, bei denen diese Methode angewandt wurde [19]. Besonders positiv wirkte sich bei der Kapillarelektrophorese die Reproduzierbarkeit der Analyse aus, während bei der Gelelektrophorese Ausfälle durch elektrophoretische Probleme, z. B. den sogenannten „Smile“-Effekt an den Rändern des Gels durch Eigenschaften des elektrischen Feldes oder durch die störanfällige Silberfärbung zu beobachten waren.

Mit Hilfe der Kapillarelektrophorese konnte den in dieser Arbeit mit einer Größe von 142 bp und 184 bp sequenzierten DNA-Fragmenten eine jeweilige Bandengröße von 136 bp und 180 bp zugeordnet werden. Diese Abweichung ist sowohl durch die Farb-

markierung als auch durch die unterschiedlichen elektrophoretischen Eigenschaften von DNA-Fragmenten aufgrund ihrer Basenzusammensetzung bedingt und ist für die Beurteilung der Ergebnisse nicht relevant. Aus den computeranalytisierten Peakflächen der beiden DNA-Fragmente ließ sich der Quotient I_{Del}/I_{Norm} errechnen, der auch schon bei Seibel et al. (1991) [152] Anwendung fand. Dieser Quotient setzt den Anteil der deletierten mit dem der normalen mtDNA ins Verhältnis.

Abhängigkeit der 4.977 bp-Deletion von Lebensalter und Gewebematerial

Durch die vorausgehenden Untersuchungen stand ausreichend DNA guter Qualität aus den verschiedenen biologischen Materialien für eine Amplifizierung unter optimierten Bedingungen zur Verfügung. Nachdem durch die Kapillarelektrophorese eine Möglichkeit zur quantitativen Detektion der Amplifizierungsfragmente gefunden war, erfüllte sich auch die letzte Voraussetzung, um den Anteil der 4.977 bp-deletierten mtDNA genauer untersuchen zu können.

Die Anhäufung der 4.977 bp-Deletion zeigte sich von mehreren Faktoren abhängig. Hierbei spielte zum einen das Lebensalter der untersuchten Person eine große Rolle, zum anderen aber auch die Art des biologischen Materials, ebenso wie die zur Amplifizierung eingesetzte DNA-Menge.

Somit unterstützen die in dieser Arbeit gewonnenen Daten die von Linnane et al. (1990) [91], Cortopassi und Arnheim (1990) [30] und Yen et al. (1991) [185] aufgestellte Theorie einer Zunahme der 4.977 bp-Deletion mit steigendem Alter. Die Altersabhängigkeit dieser Deletion kann in der vorliegenden Arbeit am Anstieg des Quotienten I_{Del}/I_{Norm} mit zunehmendem Alter abgelesen werden.

Die statistische Grundlage hierfür bildete der Spearman'sche Rangkorrelation-Test, der für die Korrelation zwischen dem Quotienten I_{Del}/I_{Norm} und dem Lebensalter in allen biologischen Materialien eine eindeutige Signifikanz nachwies. Der mit diesem Test zusätzlich erstellte Rangkorrelationskoeffizient ρ , der den Grad des Zusammenhangs ausdrückt, ergab für alle Gewebematerialien eine „gute“ Korrelation. Lediglich im Lungengewebe und in den Mundschleimhautabstrichen zeigten jedoch die methodischen Schwierigkeiten ihre Auswirkungen. Vereinzelt Proben mit nicht nachweisbarer 4.977 bp-Deletion führten zu einer Verschlechterung des Korrelationsgrades. Um diese methodischen Einflüsse auszuschalten, wurde zusätzlich der Produkt-Moment-

Korrelations-Test für die logarithmierten Quotienten I_{Del}/I_{Norm} angewandt. Somit konnte auch für das Lungengewebe und die Mundschleimhautabstriche eine eindeutige Korrelation nachgewiesen werden. Dass in dieser Arbeit überhaupt eine derartig ausgedehnte statistische Erhebung und Auswertung der Ergebnisse möglich war, lag an der ausreichenden Probenanzahl in allen untersuchten Gewebematerialien.

Bei der Beschreibung des Verlaufs der zunehmenden Häufigkeit der 4.977 bp-Deletion mit steigendem Alter gehen die Meinungen in der Literatur auseinander. In einigen Studien wurde ein exponentieller Anstieg der 4.977 bp-Deletion mit zunehmendem Alter vermutet [27]. In den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit stieg der Quotient zwar nach einer Potenzfunktion an, für eine exponentielle Zunahme aber nicht schnell genug. Auch die Annahme mancher Arbeitsgruppen eines Sättigungswertes für die 4.977 bp-Deletion ab einem bestimmten Lebensalter [158] konnte nicht bestätigt werden.

Neben dieser, in allen biologischen Materialien nachweisbaren Altersabhängigkeit der 4.977 bp-Deletion, zeigten sich außerdem große Unterschiede in der Ausprägung der Quotienten I_{Del}/I_{Norm} abhängig vom untersuchten Material. Dies wurde sowohl im erstmaligen Auftreten der 4.977 bp-Deletion in jungen Jahren, als auch im Anstieg der Quotienten mit zunehmendem Lebensalter und in den unterschiedlichen Maximalwerten im hohen Alter deutlich.

In der Fachliteratur finden sich zwei mögliche Erklärungsansätze für diese unterschiedliche Akkumulierung der 4.977 bp-Deletion. Eine mögliche Theorie ist die der unterschiedlichen Mitoserate der verschiedenen Gewebe. Die Zellen mancher Gewebe verlieren nach Abschluss des Wachstums ihre Teilungsfähigkeit, wohingegen andere durch Abschilferung oder Apoptose verlorengegangene Zellen noch ersetzen können. Aufgrund dieser unterschiedlichen mitotischen Aktivität und damit auch der Regenerationsfähigkeit, lässt sich eine Einteilung in permanente, stabile und labile Gewebe vornehmen [165]. Permanente Gewebe bestehen aus hochdifferenzierten Zellen, die nach Abschluss des Wachstums ihre Fähigkeit zur Vermehrung verloren haben. Dies ist strenggenommen nur bei Ganglienzellen der Fall. Bis vor kurzem rechnete man auch die Skelettmuskulatur zu den permanenten Geweben, da den Muskelzellen jegliche Regenerationsfähigkeit fehlt und ihre endgültige Zahl schon vor der Geburt erreicht wird. In den letzten Jahren wurde allerdings nachgewiesen, dass die Satellitenzellen teilungsfähige undifferenzierte Muskelzellen (Myoblasten) sind, die zumindest unter patholo-

gischen Bedingungen zu einer geringen Muskelregeneration führen können. Auch der Herzmuskel besitzt eine wenn auch nur geringe Regenerationsfähigkeit. Die stabilen Gewebe hingegen bauen sich aus ausdifferenzierten Zellen auf, die sich aber in undifferenzierte Zellen zurückverwandeln können (flexible Gewebe). In der Regel befinden sich die meisten Zellen in der Ruhephase (G₀), nur wenige Zellen befinden sich in Teilung. Als stabile Gewebe bezeichnet man beispielsweise die Niere und die Leber. In der Niere können lediglich die Epithelzellen erneuert werden, wohingegen die Leber eine höhere Regenerationsfähigkeit besitzt. Beim Menschen ist hier eine vollständige Regeneration nach einer Teilhepatektomie in einem Zeitraum von 6 bis 8 Monaten möglich. Die meisten labilen Gewebe (Wechselgewebe) haben eine hierarchische Struktur, d. h. die Zellneubildung geht von „unsterblichen Stammzellen“ aus. Zu diesen Geweben zählen die meisten Epithelgewebe, das Knochenmark und die Gonaden. Abhängig von der jeweiligen mitotischen Aktivität besitzen die Gewebe eine unterschiedliche Fähigkeit, defekte Zellen zu erneuern, und somit deletierte mtDNA unterschiedlich stark anzuheufen.

Die zweite diskutierte Theorie ist die der unterschiedlichen Stoffwechselaktivität der verschiedenen biologischen Materialien. Gewebe, die metabolisch sehr aktiv sind und große Mengen an Energie verbrauchen, bedürfen einer hohen Sauerstoffaufnahme. Durch den großen Fluss in der Elektronentransportkette sind die Zellen und besonders die mitochondriale DNA einer erheblichen Peroxidbildung ausgesetzt [15, 40]. Diese entstehenden oxidativen Radikale führen in der Folge vor allem zu mtDNA-Mutationen mit Einschränkungen der respiratorischen Funktion der Mitochondrien, was für Gewebe mit hohem Energiebedarf wiederum besonders schädlich ist, wie z. B. im Gehirn oder in der Skelettmuskulatur.

Bei der Überlegung, welche biologischen Materialien theoretisch die größten Mengen an deletierter mtDNA tragen, kommt man aufgrund dieser Theorien zu folgender absteigender Rangfolge:

Gehirn > Skelettmuskulatur > Herz > Niere > Leber > Knochenmark > Epithelgewebe.

Im Idealfall stammen die biologischen Materialien, die miteinander verglichen werden sollen, von einer Person, um möglichst gleiche Voraussetzungen zu schaffen. In der vorliegenden Arbeit stellte der Untersuchungsversuch der vier Leichen mit unterschiedlichem biologischen Material einen Ansatz in diese Richtung dar.

Postmortal gewonnenes biologisches Material

Bei postmortal gewonnenem biologischen Material fand sich der höchste Anteil an 4.977 bp-deletierter mtDNA im Gehirngewebe, dann folgten, mit jeweils abnehmendem Anteil, die Gewebe Skelettmuskulatur, Herz, Lunge, Milz, Niere, Leber und zuletzt das der Haut. Eine Vielzahl verschiedener Studien über das Vorkommen der 4.977 bp-Deletion in unterschiedlichen Geweben stimmen mit diesen Ergebnissen überein [27, 158, 183, 185]. Eine weitere Bestätigung finden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in der aus der Theorie gewonnenen Gewebereihe.

Die Rangfolge ergab sich durch den statistischen Wilcoxon-Test, der, trotz der Untersuchungslücke im Altersbereich von 31 bis 60 Jahren, bei den Gewebearten Herz, Lunge, Milz, Niere, Leber und Haut, keinerlei Einschränkungen unterlag und eindeutig signifikant war. Bei diesem Test wurden jeweils die Quotienten I_{Del}/I_{Norm} verschiedener Gewebearten, die von einer Person stammten, miteinander verglichen.

Hierbei ist zu beachten, dass die Ableitung dieser Reihenfolge sowohl formalinfixiertes, in Paraffin eingebettetes als auch frisches Gewebe beinhaltete. Generell ergab sich aus dem frischen Gewebe ein etwas höherer Quotient I_{Del}/I_{Norm} . Dies wird vor allem im Hautgewebe deutlich, wo ein Nachweis der Deletionen nur in frischem Gewebe durchgeführt werden konnte. Erklären lässt sich dies für das formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Gewebe wahrscheinlich durch den Zustand und die Menge an verfügbarer DNA, die durch die Fixierung mittels Formalin, möglichen autolytischen Prozessen sowie durch die Methode der angewandten DNA-Extraktion eingeschränkt sein kann. Dies zeigt, dass es für die zukünftige Beurteilung der Häufigkeit der 4.977 bp-Deletion sinnvoll ist, die Untersuchungen unter möglichst ähnlichen Bedingungen, d. h. beispielsweise nur an formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem oder nur an frischem Gewebe, durchzuführen.

Das Lungengewebe wurde in der vorliegenden Arbeit an vierter Stelle eingeordnet. Wie bereits erwähnt, gab es bei diesem Gewebe, welches ausschließlich in Paraffin eingebettet vorlag, präparationsbedingte Ausfälle. Diese wurden bei der Einordnung in die Rangfolge außer Acht gelassen. Des Weiteren stellt sich bei der Betrachtung des Lungengewebes die Frage, warum dieses Gewebe, obwohl es zum Epithelgewebe zählt, einen doch erheblichen Anteil 4.977 bp-deletierter mtDNA trägt. Dies könnte, unter Berücksichtigung der geringen Probenanzahl mit nachweisbarer Deletion, durch die

erhöhte Belastung der Lunge in Folge exogen schädigender Faktoren erklärt werden. Die Lunge ist durch Inhalation verschiedensten Umweltgiften direkt ausgesetzt, besonders jedoch durch das Rauchen, durch das es zu einer starken Radikalenbildung kommt, die mtDNA-Schäden verursachen können [87].

Die Milz, ein Gewebe, das bisher nicht zur Untersuchung der 4.977 bp-Deletion herangezogen wurde, hebt sich etwas von der Gruppe der stabilen Gewebe ab. Soweit die geringe Probenanzahl eine Wertung erlaubt, könnte dies durch die Funktion des Organs bedingt sein. Die Milz, die in den Blutkreislauf eingeschaltet ist, filtert u. a. defekte Zellen aus dem Blut und sammelt diese bis zu ihrem Abbau in sich. Gerade diese beschädigten Zellen könnten einen erheblichen Anteil deletierter mtDNA tragen.

Unterschiede in der Akkumulierung der 4.977 bp-Deletion treten jedoch nicht nur zwischen den verschiedenen Gewebearten auf, sondern sind selbst innerhalb eines Gewebes zu finden. Dies wird vor allem im Gehirn- [27] und Skelettmuskelgewebe [116] deutlich und zeigt auch hier die Abhängigkeit von der metabolischen Aktivität, die innerhalb eines Gewebes von Region zu Region verschieden sein kann. Hierfür liefert das Gehirngewebe ein sehr eindrucksvolles Beispiel, denn im Kleinhirn wurde ein 500fach geringerer Anteil an 4.977 bp-deletierter mtDNA als in der Großhirnrinde registriert [14, 27]. Aber auch im Hautgewebe findet sich eine Abhängigkeit von verschiedenen Hautregionen. Hierfür kann das Sonnenlicht als exogener Faktor verantwortlich sein, wodurch es in lichtexponierten Hautregionen zu einem Anteil an deletierte mtDNA von 12,5 % kommen kann, im Gegensatz zu nur 0,4 % in nicht lichtausgesetzten Hautregionen [130]. Da diese Tatsache auch die Schwankungen des Quotienten I_{Del}/I_{Norm} innerhalb einer Gewebeart erklären könnte, sollte deshalb bei zukünftigen Untersuchungen der 4.977 bp-Deletion möglichst die gleiche Entnahmestelle für die Gewebeproben gewährleistet sein.

Intravital gewonnenes biologisches Material

Wie bereits erwähnt, ist gerade in den letzten Jahren der Bedarf einer Altersschätzung an lebenden Personen besonders aus sozialpolitischen Gründen gestiegen. Alle bisherigen morphologischen und molekularbiologischen Methoden zur Altersschätzung an lebenden Personen unterliegen ethischen Einschränkungen oder bestehenden rechtlichen Regelungen, gerade wenn ein medizinisches Eingreifen mit inbegriffen ist [136]. Ein

großer Vorteil wäre die Durchführung einer Lebensalterschätzung an einem Material, welches mit geringem Aufwand, möglichst nicht-invasiv gewonnen werden kann. Geeignet wären hierfür venöses Vollblut, Mundschleimhautabstriche oder auch Haare. Auf eine Untersuchung der 4.977 bp-Deletion gerade in diesen Materialien wurde deshalb in der vorliegenden Arbeit besonderer Wert gelegt.

Bisher nahm man an, die 4.977 bp-deletierte mtDNA fände sich nur in postmitotischem, gut differenzierten Gewebe, Blutzellen hingegen würden nicht lange genug überleben, um mitochondriale Mutationen anzuhäufen [10, 29, 30, 75, 128, 147, 158, 185]. Aus diesem Grund wurden Blutproben bei der enzymatischen Amplifizierung auch oft als Negativkontrollen benutzt [88]. Tatsache ist jedoch, dass ungefähr 40 % der zirkulierenden Lymphozyten ein Lebensspanne von bis zu 6 Monaten besitzen können. Viele Studien berichteten sogar von der Persistenz einiger Lymphozyten über 30 Jahre [170]. Dies sollte Zeit genug sein, mitochondriale Veränderungen zu entwickeln und auch anzuhäufen, welche dann durch sensitive PCR-Methoden nachweisbar wären.

Nur zwei Arbeitsgruppen haben bisher erfolgreich deletionspezifische Fragmente im Blut von Personen, die nicht von mitochondrialen Erkrankungen betroffen waren, nachgewiesen [44, 180]. Bei Gattermann et al. [44] waren die untersuchten Personen jedoch alle Patienten nach einer Herzoperation entweder bei koronarer Herzkrankheit oder bei Kardiomyopathie. Deshalb könnte die Menge der Deletion im Blut dieser Personen auch nur ein Beleg der Herzerkrankung sein. In beiden Arbeitsgruppen wurden diese deletionspezifischen DNA-Fragmente lediglich in einzelnen Blutproben nachgewiesen, nicht aber quantifiziert. Eine Altersabhängigkeit der 4.977 bp-Deletion im Blut gesunder Personen konnte hierbei allerdings nicht festgestellt werden. Die Defizite anderer Arbeitsgruppen im Nachweis der 4.977 bp-Deletion im Blut könnte der schlecht kontrollierbaren Nachweismethode auf Agarosegelen, einer zu geringen Menge eingesetzter DNA, sowie einer nicht optimal gewählten Primerlänge oder PCR-Fragmentlänge zuzuschreiben sein [10, 147].

Der Nachweis einer altersabhängigen Zunahme der 4.977 bp-Deletion im Blut gelang somit mit der hier angewandten Methode erstmalig. Weitere eindeutige Hinweise auf die Altersabhängigkeit dieser Deletion im Blut ergaben sich zusätzlich aus der Deletionszunahme im Alterungsprozess einer Person, in dieser Arbeit untersucht an den getrockneten Blutflecken auf den Leinenläppchen. Die Mengen deletierter mtDNA blieben

im Blut mit einem Anteil von 1 bis 1,5 % deutlich geringer als beispielsweise im Gehirngewebe.

Erklären lässt sich dies wiederum durch die bereits diskutierten Theorien. Die schnelle Zellteilung in hämatopoetischen Vorläuferzellen führt zur Selektion defekter Zellen [70], ein Vorgang, der im postmitotischem Gewebe, z. B. der Skelettmuskulatur oder dem Nervengewebe, nicht vorkommt [47]. Als Beleg dieser Selektion kann eine Studie herangezogen werden, die zeigt, dass deletionstragende Zellen in KSS-Patienten die 4.977 bp-Deletion in Kultur nach einigen Zellteilungen verlieren [111]. Diese Beobachtungen wurden *in vitro* auch an Hautfibroblasten mit hoher Proliferationsrate bestätigt [42]. Des Weiteren weisen Blutzellen, die sich meistens in der Ruhephase (G0-Phase) des Zellzyklus befinden, einen nur kleinen Energieumsatz auf, was die Gefährdung durch oxidative Radikale gering hält. Zum Beispiel befinden sich mehr als 99 % der peripheren Blutlymphozyten in dieser sogenannten G0-Phase [45]

Bei der Frage, welche Zellpopulationen die Deletionen im Blut tragen, sind die verfügbaren Daten nur spärlich. Bei Patienten mit KSS [125] oder Parkinson [147] wurde die Deletion in Thrombozyten gefunden. Auch wurde spekuliert, die 4.977 bp-Deletion käme in kleinen Mengen in Knochenmarksstammzellen vor [40]. Die Lebensfähigkeit dieser Zellen sollte jedoch durch die Deletion nicht beeinflusst sein, da sie sich im Allgemeinen in der G0-Phase befinden. Nur nach Beginn der Zellteilung, mit einem hierbei zunehmenden Bedarf an Zellenergie, werden sie empfindlicher gegenüber mitochondriale Defekten.

Die wenigen postmortal entnommenen Blutproben zeigten keine Abweichungen zu den Ergebnissen des intravital gewonnenen Blutes. Somit blieb die Frage nach postmortalen Einflüssen auf die 4.977 bp-Deletion in dieser Arbeit offen. In einer Studie über intravital und postmortal entnommene Blutproben ließ sich die 4.977 bp-Deletion in postmortalem Blut etwas häufiger nachweisen [180]. Dies könnte durch autolytische Prozesse verursacht sein, wodurch es zum Ablösen der Endothelzellen von den Gefäßwänden und des Weiteren zum Eindringen fremder Zellen über Gefäßdefekte kommen kann [36].

Gänzlich ohne invasiven Eingriff bei der Gewinnung von Untersuchungsmaterial für die 4.977 bp-Deletion kommen Mundschleimhautabstriche aus, was sie zur Altersschätzung an lebenden Personen noch geeigneter machen würde als das venöse Vollblut. Die ein-

fache Gewinnung lässt sie auch in der Vaterschaftsbestimmung und spurenkundliche Fragestellungen der Rechtsmedizin immer mehr an Bedeutung gewinnen.

Bei der hier erstmaligen Untersuchung der 4.977 bp-Deletion in Mundschleimhautabstrichen zeigte sich ebenfalls eine eindeutige Altersabhängigkeit der Quotienten I_{Del}/I_{Norm} . Die Schwierigkeit bei der Untersuchung der Mundschleimhautabstriche lag, wie bereits erwähnt, im Wesentlichen in der DNA-Gewinnung. Die Ergebnisse der Abstriche lassen sich nur eingeschränkt mit den anderen Materialien vergleichen, da die in die PCR eingesetzte DNA-Menge hier nur abgeschätzt wurde. Die Menge der deletierten mtDNA lag jedoch in der Größenordnung des venösen Vollblutes.

Ein weiterer interessanter Ansatz für Untersuchungen der 4.977 bp-Deletion liegt im Bereich der Haare. Obwohl die in dieser Arbeit untersuchten Haare postmortal entnommen waren, sollen sie trotzdem an dieser Stelle besprochen werden, da sie gerade für lebende Personen ebenfalls ein geeignetes Untersuchungsmaterial darstellen. Deshalb sind Haare auch für andere forensischen DNA-Untersuchungen von großem Interesse. Von Bedeutung ist hierbei die Haarwurzel, da sich in ihr der wesentliche Anteil der DNA befindet [178]. Ein Nachweis der 4.977 bp-Deletion anhand von aus Haarwurzeln präparierter DNA war in dieser Arbeit nicht möglich. Dies ist vornehmlich in Zusammenhang mit der schwierigen Präparation der DNA [178] und der bestehenden Detektionsschwelle der PCR und des Sequenzers zu sehen.

Sicherlich sollten sich aufgrund der in dieser Arbeit gezeigten Altersabhängigkeit der 4.977 bp-Deletion auch bei lebenden Personen weitere Untersuchungen gerade auf Blut, Mundschleimhautabstriche und Haare beziehen. Durch ihre leichte Verfügbarkeit und die nicht oder nur geringfügig invasive Gewinnung könnten sie in Zukunft eine Altersschätzung an lebenden Personen möglich machen.

Abhängigkeit der 4.977 bp-Deletion von der in die PCR eingesetzten DNA-Menge

Um vorhandene 4.977 bp-deletierte mtDNA, die physiologisch in Materialien gesunder Personen nur in geringen Mengen vorliegt, mit der hier angewandten Methode auch sicher nachweisen zu können, wurden einige Proben zusätzlich in einer höheren DNA-Konzentration untersucht. Somit sollte die Detektionsschwelle sowohl bei der PCR als auch bei der Kapillarelektrophorese überwunden werden.

Gerade bei der Untersuchung des Blutes fiel eine starke Abhängigkeit des Quotienten $I_{\text{Del}}/I_{\text{Norm}}$ von der eingesetzten DNA-Menge auf. Eine derartige Abhängigkeit der 4.977 bp-Deletion war in der Literatur bisher für die Skelettmuskulatur gesunder Personen beschrieben [104]. Mit zunehmender in die PCR eingesetzter DNA-Menge erreichte die Korrelation zwischen dem Quotienten $I_{\text{Del}}/I_{\text{Norm}}$ und dem Lebensalter somit im venösen Vollblut eine vergleichbare Aussagekraft wie im Gehirngewebe. Statistisch gesehen zeigt sich dies am zunehmenden Korrelationskoeffizienten ρ des Spearman'schen Rangkorrelations-Tests. Je größer die in die PCR eingesetzte DNA-Konzentration war, desto früher konnte der Quotient $I_{\text{Del}}/I_{\text{Norm}}$ nachgewiesen werden. Bei der höchsten eingesetzten DNA-Menge von 40 ng/ μ l konnte die 4.977 bp-Deletion 28 Jahre früher im Vergleich zur niedrigsten DNA-Menge von 2 ng/ μ l registriert werden. Die Maximalwerte im hohen Alter waren bei der höchsten DNA-Konzentration im Schnitt um das 5fache höher als bei der niedrigsten Konzentration. Jedoch vollzog sich der Anstieg der Quotienten $I_{\text{Del}}/I_{\text{Norm}}$ nicht im gleichen Ausmaß wie die Erhöhung der eingesetzten DNA-Menge.

Dieser Effekt einer Abhängigkeit des Quotienten $I_{\text{Del}}/I_{\text{Norm}}$ von der eingesetzten DNA-Konzentration zeigt sich auch bei den biologischen Materialien, deren DNA nach einer Chelex-100/Diatomeen-Extraktion einer anschließenden DNA-Konzentrierung unterzogen wurde. Hier kommt jedoch zu dem Effekt einer Abhängigkeit von der eingesetzten DNA-Menge eine Säuberung der DNA hinzu, was sicherlich erheblich zu den besseren Ergebnissen beiträgt.

In allen untersuchten biologischen Materialien gab es vereinzelt Personen, bei denen die 4.977 bp-Deletion selbst nach Erhöhung der DNA-Menge nicht nachweisbar war. Hierbei kann es sich einerseits um eine gewisse Resistenz dieser Personen gegen die Mutation handeln, wie beispielsweise durch Punktmutationen in der repeat-Sequenz oder durch einen genetischen Verteidigungsmechanismus gegen die Mutation. Andererseits muss jedoch auch an einen systematischen Fehler gedacht werden, z. B. durch falsche Lagerung oder Vorbehandlung der DNA-Extrakte. Bei Annahme eines systematischen Fehlers könnte ein Nachweis der 4.977 bp-Deletion beispielsweise mit Hilfe einer anderen angewandten Extraktionsmethode gelingen.

Diese Abhängigkeit des Quotienten von der in die PCR eingesetzten DNA-Menge ist umso erstaunlicher, als dass für eine „normale“ PCR eine DNA-Menge von weniger als 1 ng völlig ausreichend ist [110]. Dieser Effekt muss somit im Zusammenhang mit der unterschiedlichen Amplifizierungseffizienz der beiden relevanten Fragmente gesehen werden (Abb. 4.1 *a,b*).

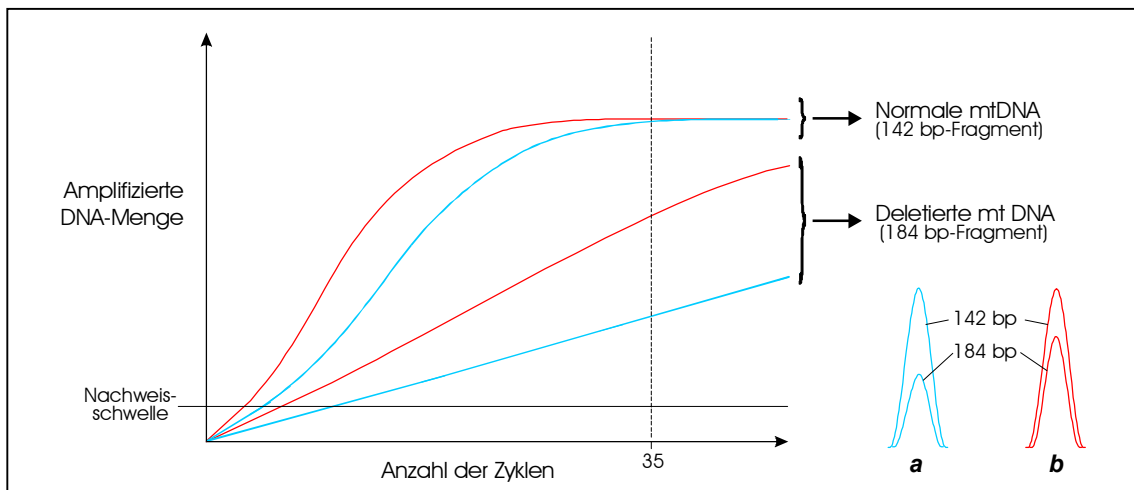


Abb. 4.1 *a,b*: Abhängigkeit der amplifizierten DNA-Menge von der Zykluszahl und der zugrundeliegenden DNA-Konzentration. Dargestellt sind zusätzlich die Ergebnisse der Kapillarelektrophorese bei einer Anzahl von 35 Zyklen *a* für eine untersuchte Probe mit geringer und *b* einer mit großer in die PCR eingesetzter DNA-Menge.

Das Vorkommen einer unterschiedlichen Amplifizierungseffizienz für spezifische DNA-Fragmente wurde u. a. von Meissner et al. (2000) [103] gezeigt, allerdings an anderen als den hier amplifizierten DNA-Fragmenten.

Besonders bei hohen DNA-Konzentrationen bleibt der Anteil der normalen mtDNA konstant, wohingegen sich der Anstieg der deletierten mtDNA auch bei höheren DNA-Konzentrationen noch nicht unbedingt in der stationären Phase der PCR befindet. Somit kann ein Anstieg der deletierten mtDNA hier eindeutig nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse zeigen allerdings, dass die hier angewandte Methode einer unkontrollierten Multiplex-PCR mit anschließender semi-quantitativer Detektion die Aussagekraft einschränkt. Zur weiteren Untersuchung der 4.977 bp-Deletion wäre eine *real-time* quantitative PCR zu empfehlen. In einer *real-time* PCR wird die amplifizierte DNA-Menge für die jeweiligen DNA-Fragmente im Verlauf ermittelt, wodurch der Amplifizierungsprozess kontrollierbar wird und Aussagen über die PCR-Produkte uneingeschränkt möglich sind [43].

Praxisrelevanz der 4.977 bp-Deletion zur Lebensalterschätzung

Trotz der oben genannten Einschränkungen bei der Interpretation der Ergebnisse, wurde versucht anhand von Perzentilentabellen bei gegebenen Quotienten $I_{\text{Del}}/I_{\text{Norm}}$ auf das Alter eines Probanden zu schließen. Wird beispielsweise bei einer formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gehirngewebe-Probe einer unbekannt Person ein Quotient $I_{\text{Del}}/I_{\text{Norm}}$ von 0,582 ermittelt, lässt sich mit 50 %iger Wahrscheinlichkeit für diese Person ein Alter zwischen 55 und 56 Jahren, mit 80 %iger Wahrscheinlichkeit zwischen 45 und 70 Jahren und mit 90 %iger Wahrscheinlichkeit zwischen 43 und 74 Jahren annehmen. Die Frage nach dem Alter kann somit durch die in dieser Arbeit angewandten Methode abhängig vom jeweiligen Untersuchungsmaterial mit der Angabe einer Altersspanne von ungefähr 30 Jahren beantwortet werden.

Dieses Beispiel zeigt, dass die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse für eine Abschätzung der Altersextrema geeignet scheinen, jedoch für eine genauere Altersschätzung eine Optimierung der Methode und eine Einbeziehung einer noch größeren Probenanzahl nötig wäre. Um wirklich eine praxisrelevante Grundlage zur Lebensalterschätzung zu schaffen, müssen die aus den verschiedenen biologischen Materialien gewonnenen altersabhängigen Quotienten $I_{\text{Del}}/I_{\text{Norm}}$ absolut kontrollierbar sein, d. h. es müssen nach Möglichkeit alle einflussnehmenden Faktoren aus dem Bereich des Untersuchungsmaterials sowie der angewandten Methoden ausgeschlossen sein. Dies würde sogenannte Ausreißer unwahrscheinlicher machen und bei engeren Perzentilenschranken eine genauere Altersschätzung ermöglichen.

5 Zusammenfassung

Neben der Frage nach dem Lebensalter als Kriterium zur Identifizierung unbekannter Leichen und menschlicher Überreste, wird der Bedarf einer Altersschätzung an lebenden Personen derzeit immer größer. Hinzu kommt die Hoffnung, aus Spuren Rückschlüsse auf das Alter des Spurenlegers ziehen zu können.

Ziel dieser Arbeit war es, aus verschiedenen biologischen Materialien das Alter anhand der 4.977 bp-Deletion in menschlicher mitochondrialer DNA abschätzen zu können, wobei der Schwerpunkt auf Material von lebenden Personen lag. Hierzu wurde mit Hilfe geeigneter DNA-Extraktionsmethoden aus verschiedenen Gewebearten, venösem Vollblut, Mundschleimhautabstrichen und Haarwurzeln ausreichend DNA guter Qualität gewonnen. Die Schwierigkeit dieser Untersuchung lag in der Ermöglichung einer Quantifizierungsmethode zur Erfassung der 4.977 bp-Deletion. Dieses Problem wurde, nach der Wahl optimaler Primer und Amplifizierung spezifischer DNA-Fragmente, für die deletierte und die normale mtDNA unter optimierten PCR-Bedingungen im Multiplex-Ansatz, mit Hilfe der Kapillarelektrophorese gelöst. Mit ihr konnte der Anteil der 4.977 bp-deletierten und der normalen mtDNA durch die computeranalysierten Peakflächen der beiden Fragmente bestimmt und miteinander in Verhältnis gesetzt werden. Dieses Verhältnis wurde durch den Quotienten I_{Del}/I_{Norm} ausgedrückt. Die gewonnenen Ergebnisse wurden anschließend ausgedehnten statistischen Erhebungen unterzogen.

Die 4.977 bp-Deletion zeigte in allen untersuchten Materialien eine eindeutige Altersabhängigkeit. Dies wurde an der Zunahme des Quotienten I_{Del}/I_{Norm} mit steigendem Alter ersichtlich. Für die verschiedenen Gewebearten war die Abhängigkeit dieser Deletion vom Alter bereits aus der Literatur bekannt. Im Blut wurde diese jedoch erstmalig gezeigt, ebenso wie in den Mundschleimhautabstrichen, die bisher noch nie für Untersuchungen der 4.977 bp-Deletion herangezogen wurden. In den Haarwurzeln konnte die Deletion nicht nachgewiesen werden.

Auffällig war hierbei, dass die Altersabhängigkeit von Material zu Material unterschiedlich ausgeprägt war. Der größte Anteil deletierter mtDNA fand sich im Gehirngewebe, gefolgt von Skelettmuskulatur, Herz, Lunge, Milz, Niere Leber und Haut. Für diese unterschiedliche Akkumulierung der 4.977 bp-Deletion finden sich zwei mögliche Erklärungsansätze, die Theorie einer unterschiedlichen Mitoserate und die einer unterschiedlichen Stoffwechselaktivität, die beide die gewonnene Rangfolge bestätigen.

Des Weiteren wurde eine Abhängigkeit der 4.977 bp-Deletion von der in die PCR eingesetzten DNA-Menge festgestellt. Dieser Effekt muss im Zusammenhang mit der unterschiedlichen Amplifizierungseffizienz der beiden relevanten DNA-Fragmente gesehen werden, wodurch jedoch die Einschränkungen der angewandten unkontrollierten Multiplex-PCR mit anschließender semi-quantitativer Detektion der Amplifikationsprodukte deutlich werden.

Unter Berücksichtigung der Einschränkungen gelang anhand von Perzentilentabellen eine Altersschätzung mit der Angabe einer Altersspanne von ungefähr 30 Jahren. Um eine genauere Altersschätzung zu erreichen, wäre eine Optimierung der Methode, z. B. durch Anwendung einer *real-time* quantitativen PCR, und eine Einbeziehung einer noch größeren Probenzahl nötig.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Albring M., Griffith J., Attardi G. (1977): Association of a protein structure of probable membrane derivation with HeLa cell mitochondrial DNA near its origin of replication. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 1348-1352
- [2] Allsopp R.C., Chang E., Kashefi-Azam M., Rogaev E.I., Piatyszek M.A., Shay J.W., Harley C.B. (1995): Telomere shortening is associated with cell division *in vitro* and *in vivo*. *Exp Cell Res* **220**: 194-200
- [3] Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G., Bruijn M.H. de, Coulson A.R., Drouin J., Eperon I.C., Nierlich D.P., Roe B.A., Sanger F., Schreier P.H., Smith A.J., Staden R., Young I.G. (1981): Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**: 457-465
- [4] Arnheim N., Cortopassi G. (1992): Deleterious mitochondrial DNA mutations accumulate in aging human tissues. *Mutation Res* **275**: 157-167
- [5] Attardi G., Chomyn A., Montoya J., Ojala D. (1982): Identification and mapping of human mitochondrial genes. *Cytogenet Cell Genet* **32**: 85-98
- [6] Bandy B., Davison A.J. (1990): Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: implications for carcinogenesis and aging? *Free Radic Biol Med* **8**: 523-539
- [7] Banerjee S.K., Makdisi W.F., Weston A.P., Mitchell S.M., Campbell D.R. (1995): Microwave-based DNA extraction from paraffin-embedded tissue for PCR amplification. *BioTechniques* **18**: 768-774
- [8] Baumer A., Zhang C., Linnane A.W., Nagley P. (1994): Age-related human mtDNA deletions: a heterogeneous set of deletions arising at a single pair of directly repeated sequences. *Am J Hum Genet* **54**: 618-630
- [9] Bhat H.K., Hiatt W.R., Hoppel C.L., Brass E.P. (1999): Skeletal muscle mitochondrial DNA injury in patients with unilateral peripheral arterial disease. *Circulation* **99**: 807-812
- [10] Biagini G., Pallotti F., Carraro S., Sgarbi G., Pich M.M., Lenaz G., Anzivino F., Gualandi G., Xin D. (1998): Mitochondrial DNA in platelets from aged subjects. *Mech Ageing Dev* **101**: 269-275
- [11] Bodnar A., Ouellette M., Frolkis M., Holt S., Chui C.P., Morin G., Harley C., Shay J., Lichsteiner S., Wright W. (1998): Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279**: 349-352
- [12] Bogenhagen D., Clayton D.A. (1974): The number of mitochondrial deoxyribonucleic acid genomes in mouse L and human HeLa cells. *J Biol Chem* **249**: 7991-7995
- [13] Boom R., Sol C.J.A., Salimans M.M.M., Jansen C.L., Wertheim-van Dillen P.M.E., Noordaa J. v.d. (1990): Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* **28**: 495-503

- [14] Bougeron T., Chretien D., Rötig A., Munnich A., Rustin P. (1993): Fate and expression of the deleted mitochondrial DNA differ between human heteroplasmic skin fibroblast and Epstein-Barr virus-transformed lymphocyte cultured. *J Biol Chem* **268**: 19369-19376
- [15] Boveris A., Cadenas E. (1982): Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. In: Oberley L.W. (Hrsg.): *Superoxide Dismutase*. CRC Press, Boca Raton FL 2
- [16] Brown T.A. (1993): *Moderne Genetik: Eine Einführung, deutsche Übersetzung der englischen Originalausgabe (1992)*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford: 20
- [17] Brown W.M., George M. Jr., Wilson A.C. (1979): Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 1967-1971
- [18] Budowle B., Chakraborty R., Giusti A.M., Eisenberg A.J., Allen R.C. (1991): Analysis of the VNTR Locus D1S180 By the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet* **48**: 137-144
- [19] Butler J.M., McCord B.R., Jung J.M., Allen R.O. (1994): Rapid analysis of the short tandem repeat HUMTH01 by capillary electrophoresis. *BioTechniques* **17**: 1062-1070
- [20] Carozzo R., Hirano M., Fromenty B., Casali C., Santorelli F.M., Bonilla E., DiMauro S., Schon E.A., Miranda A.F. (1998): Multiple mtDNA deletions features in autosomal dominant and recessive diseases suggest distinct pathogenesis. *Neurology* **50**: 99-106
- [21] Cech T. R., Lingner J. (1997): Telomerase and the chromosome end replication problem. In: *Telomeres and telomerase (Ciba Found Symp 211)*. Wiley, Chichester, S. 20-34
- [22] Chawluk J.B., Alavi A., Jamieson D.G. (1987): Changes in local cerebral glucose metabolism with normal ageing: the effect of cardiovascular and systemic health factors. *J Cereb Blood Flow Metab* **7**: S411
- [23] Chomyn A., Hunkapiller M.W., Attardi G. (1981): Alignment of the amino terminal amino acid sequence of human cytochrome c oxidase subunits I and II with the sequence of their putative mRNAs. *Nucleic Acids Res* **9**: 867-877
- [24] Clayton D.A., Davis R.W., Vinograd J. (1970): Homology and structural relationships between the dimeric and monomeric circular forms of mitochondrial DNA from human leukemic leukocytes. *J Mol Biol* **47**: 137-153
- [25] Clayton D.A., Doda J.N., Friedberg E.C. (1974): The absence of a pyrimidine dimer repair mechanism in mammalian mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* **71**: 2777-2781
- [26] Collombet J.M., Mandon G., Dumoulin R., Mousson B., Stepien G. (1996): Accumulation of mitochondrial DNA deletions in myotubes cultured from muscles of patients with mitochondrial myopathies. *Mol Gen Genet* **253**: 182-188

- [27] Corral-Debrinski M., Horton T., Lott M.T., Shoffner J.M., Beal M.F., Wallace D.C. (1992): Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age. *Nature Genetics* **2**: 324-329
- [28] Corral-Debrinski M., Shoffner J.M., Lott M.T., Wallace D.C. (1992): Association of mitochondrial DNA damage with ageing and coronary atherosclerotic disease. *Mutat Res* **275**: 169-180
- [29] Corral-Debrinski M., Stepien G., Shoffner J.M., Lott M.T., Kanter K., Wallace D.C. (1991): Hypoxemia is associated with mitochondrial DNA damage and gene induction. Implications for cardiac disease. *J Am Med Assoc* **266**: 1812-1816
- [30] Cortopassi G.A., Arnheim N. (1990): Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans. *Nucleic Acids Res* **18**: 6927-6933
- [31] Cortopassi G.A., Shibata D., Soong N.W., Arnheim N. (1992): A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 7370-7374
- [32] Demirjian A., Goldstein H. (1976): New systems for dental maturity based on seven and four teeth. *Ann Hum Biol* **3**: 411-421
- [33] Drayer B.P. (1988): Imaging of the ageing brain Part I. Normal findings. *Radiology* **166**: 785-796
- [34] Drayer B.P., Burger P., Darwin R. (1986): Magnetic resonance imaging of brain iron. *Am J Neuroradiol* **7**: 373-380
- [35] Eeles R.A., Stamps A.C. (1993): Polymerase Chain Reaction (PCR). The Technique and its Applications. R.G. Landes, Austin, TX
- [36] Egawhary D.N., Swoboda B.E., Chen J., Vince F.P. (1995): Damage to the vascular endothelium of diabetic patients can be assessed by analysing blood samples for the number of circulating endothelial cells with mitochondrial DNA deletions. *Biochem Soc Trans* **23**: 402S.
- [37] Ernster L., Schatz G. (1981): Mitochondria: a historical review. *J Cell Biol* **91**: 227-255
- [38] Evans D.A. et al. (1989): Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported. *JAMA* **262**: 2551-2556
- [39] Finch C. (1990): Longevity, senescence, and the genome. (Chicago: University of Chicago press)
- [40] Fischel-Ghodsian N., Bohlman M.C., Prezant T.R., Graham J.M., Cerderbaum S.D., Edwards M.J. (1992): Deletion in blood mitochondrial DNA in Kearns-Sayre-syndrome. *Pediatr Res* **31**: 557-560
- [41] Forman H.J., Boveris A. (1982): Superoxide radical and hydrogen peroxide in mitochondria. In: Pryor W.A. (Hrsg.): Free Radicals in Biology, 5, Academic Press, New York, NY

- [42] Fu K., Hartlen R., Johns T., Genge A., Karpati G., Shoubridge E.A. (1996): A novel heteroplasmic tRNA^{leu(CUN)} mtDNA point mutation in a sporadic patient with mitochondrial encephalomyopathy segregates rapidly in skeletal muscle and suggests an approach to therapy. *Hum Mol Genet* **5**: 1835-1840
- [43] Gassen H.G., Schrimpf G. (Hrsg.): Gentechnische Methoden. 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin 1999
- [44] Gattermann N., Berneburg M., Heinisch J., Aul C., Schneider W. (1995): Detection of the ageing-associated 5-kb common deletion of mitochondrial DNA in blood and bone marrow of hematologically normal adults. Absence of the deletion in clonal bone marrow disorders *Leukemia* **9**: 1704-1710
- [45] Gerdes J., Lemke H., Baisch H., Wacker H.H., Schwab U., Stein H. (1984): Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* **133**: 1710-1715
- [46] Giles R.E., Blanc H., Cann H.M., Wallace D.C. (1980): Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 6715-6719
- [47] Goldstein S. (1993): The biology of aging: looking to defuse the genetic time bomb. *Geriatrics* **48**: 76-82
- [48] Green D.R., Reed J.C. (1998): Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**: 1309-1312
- [49] Grodstein F., Stampfer M.J., Colditz G.A., Willet W.C., Manson J.E., Joffe M., Rosner B., Fuchs C., Hankinson S.E., Hunter D.J., Hennekens C.H., Speizer F.E. (1997): Postmenopausal therapy and mortality. *N Engl J Med* **336**: 1769-1775
- [50] Günther S. (1997): DNA-Polymorphismen: Methodische, spurenkundliche und evolutionsgenetische Betrachtungen unter besonderer Berücksichtigung Y-chromosomaler STR-Systeme. *Dissertation der Fakultät für Biologie*
- [51] Günther S., Herold J., Patzelt D. (1995): Extraction of high quality DNA from bloodstains using diatoms. *Int J Legal Med* **108**: 154-156
- [52] Gustafson G. (1950): Age determination on teeth. *J Am Dent Assoc* **41**: 45-54
- [53] Gyllensten U., Wharton D., Josefsson A., Wilson A.C. (1991): Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice see comments. *Nature* **352**: 255-257
- [54] Hanihara K., Suzuki T. (1978): Estimation of age from the pubic symphysis by means of multiple regression analysis. *Am J Phys Anthropol* **48**: 233-240
- [55] Harley C.B., Futcher A.B., Greider C.W. (1990): Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**: 458-460
- [56] Harman D. (1956): Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* **11**: 298-300
- [57] Harman D. (1981): The aging process. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 7124-7128
- [58] Harman D. (1986): in Free radical ageing and degenerative diseases. (Hrsg. Johnson J.E., Jr. et al.) 3-49

- [59] Harnack G.-A. v., Koletzko B. (Hrsg.): Kinderheilkunde. 10. Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg 1997
- [60] Hatefi Y. (1985): The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu Rev Biochem* **54**: 1015-1069
- [61] Hattori K., Ogawa T., Kondo T., Mochizuki M., Tanaka M., Sugiyama S., Ito T., et al. (1991): Cardiomyopathy with mitochondrial DNA mutations. *Am Heart J* **122**: 866-869
- [62] Hattori K., Tanaka M., Sugiyama S., Obayashi T., Ito T., Satake T., Hanaki Y., Asai J., Nagano M., Ozawa T. (1991): Age-dependent increase in deleted mitochondrial DNA in the human heart: Possible contributory factor to presbycardia. *Am Heart J* **121**: 1735-1742
- [63] Hayashi J.-I., Oohto S., Kikuchi A., Takemitsu M., Goto Y.-I., Nonaka I. (1991): Introduction of disease-related mitochondrial DNA results in mitochondrial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 10614-10618
- [64] Helfman P.M., Bada J.L. (1975): Aspartic acid racemization in tooth enamel from living humans. *Proc Natl Acad Sci USA* **72**: 2891-2894
- [65] Helfman P.M., Bada J.L. (1976): Aspartic acid racemization in dentine as a measure of ageing. *Nature* **262**: 279-281
- [66] Helling R.B., Goodman H.M., Boyer H.W. (1974): Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lamdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J Virol* **14**: 1235-1244
- [67] Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S., Griffith R. (1992): The use of analytical agarose ethidium bromide electrophoresis. *Biotechnology* **10**: 413
- [68] Höhn H. (1994): Gene oder Umwelt. Welche Faktoren bestimmen Langlebigkeit und Altern des Menschen. *Naturwissenschaftliche Rundschau* **12**: 453-459
- [69] Holmes G.E., Bernstein C., Bernstein H. (1992): Oxidative and other DNA damages as the basis of aging: a review. *Mutat Res* **275**: 305-315
- [70] Holt I.J., Harding A.E., Morgan Hughes J.A. (1988): Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* **331**: 717-719
- [71] Houck M.M., Ubelaker D., Owsley D., Craig E., Grant W., Tram R., Woltanski T., Sandness K. (1996): The role of forensic anthropology in the recovery and analysis of branch davidian compound victims: assessing the accuracy of age estimations. *J Forensic Sci* **41**: 796-801
- [72] <http://www.rad.washington.edu/radanat/Hand.html>
- [73] <http://www.uni-mainz.de/FB/Medizin/Anatomie/Workshop/EM/EMMito.html>
- [74] Hutchison CA., Newbold J.E., Potter S.S., Edgell M.H. (1974): Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature* **251**: 536-538

- [75] Ikebe S., Tanaka M., Ohno K., Sato W., Hattori K., Kondo T., Mizuno Y., Ozawa T. (1990): Increase of deleted mitochondrial DNA in the striatum in Parkinson's disease and senescence. *Biochem Biophys Res Commun* **170**: 1044-1048
- [76] Iscan M.Y., Loth S.R., Wright R.K. (1987): Racial variation in the sternal extremity of the rib and its effect on age determination. *J Forensic Sci* **32**: 452-466
- [77] Iwama H., Ohyashiki K., Ohyashiki J.H., Hayashi S., Yahata N., Ando K., Toyama K., Hoshika A., Takasaki M., Mori M., Shay J.W. (1998): Telomeric length and telomerase activity with age in peripheral blood cells obtained from normal individuals. *Hum Genet* **102**: 397-402
- [78] Jackson D.P., Lewis F.A., Taylor G.R., Boylston A.W., Quirke P. (1990): Tissue extraction of DNA and RNA and analysis by the polymerase chain reaction. *J Clin Pathol* **43**: 499
- [79] Jagow G. v., Engel W.D. (1980): Structure and function of the energy-converting system of mitochondria. *Angew Chem Int Ed Engl* **19**: 659-675
- [80] Johnson F.B., Sinclair D.A., Guarente L. (1999): Molecular biology of aging. *Cell* **96**: 291-302
- [81] Kadenbach B., Münscher C., Frank V., Müller-Höcker J., Napiwotzki J. (1995): Human aging is associated with stochastic somatic mutations of mitochondrial DNA. *Mutat Res* **338**: 161-172
- [82] Kenyon C., Chang J., Gensch E., Rudner A., Tabtiang R., (1993): A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* **366**: 461-464
- [83] Kim S.H., Chi J.G., Reith A., Kadenbach B. (1997): Quantitative analysis of mitochondrial DNA deletion in paraffin embedded muscle tissues from patients with KSS and CPEO. *Biochim Biophys Acta* **1360**: 193-195
- [84] Kovalenko S.A., Kopsidas G., Kelso J.M., Linnane A.W. (1997): Deltoid human muscle mtDNA is extensively rearranged in old age subjects. *Biochem Biophys Res Commun* **232**: 147-152
- [85] Lamberts S.W., van den Beld A.W., van der Lely A.J. (1997): The endocrinology of aging. *Science* **278**: 419-424
- [86] Larsson N.-G., Holme E., Kristiansson B., Oldfors A., Tulinius M. (1990): Progressive increase of the mutated mitochondrial DNA fraction in Kearns-Sayre syndrome. *Pediatr Res* **28**: 131-136
- [87] Lee H.-C., Lim M.L.R., Lu C.-Y., Liu V.W.S., Fahn H.-J., Zhang C., Nagley P., Wei Y.-H. (1999): Concurrent increase of oxidative DNA damage and lipid peroxidation together with mitochondrial DNA mutation in human lung tissues during aging - Smoking enhances oxidative stress on the aged tissues. *Arch Biochem Biophys* **362**: 309-316
- [88] Lee H.C., Pang C.Y., Hsu H.S., Wei Y.H. (1994): Differential accumulations of 4977 bp deletion in mitochondrial DNA of various tissues in human ageing. *Biochim Biophys Acta* **1226**: 37-43

- [89] Levesque G.-Y., Demirjian A., Tanguay R. (1981): Sexual dimorphism in the development, emergence and agenesis of the mandibular third molar. *J Dent Res* **60**: 1735-1741
- [90] Lezza A.M.S., Mecocci P., Cormio A., Beal M.F., Cherubini A., Cantatore P., Senin U., Gadaleta M.N. (1999): Mitochondrial DNA 4977 bp deletion and OH⁸dG levels correlate in the brain of aged subjects but not Alzheimer's disease patients. *FASEB J* **13**: 1083-1088
- [91] Linnane A.W., Baumer A., Maxwell R.J., Preston H., Zhang C., Marzuki S. (1990): Mitochondrial gene mutation: the ageing process and degenerative diseases. *Biochem Int* **22**: 1067-1076
- [92] Linnane A.W., Zhang C., Baumer A., Nagley P. (1992): Mitochondrial DNA mutation and the ageing process: bioenergy and pharmacological intervention. *Mutat Res* **275**: 195-208
- [93] Lipsinic F.E., Paunovich E., Houston G.D., Robison S.F. (1986): Correlation of age and incremental lines in the cementum of human teeth. *J Forensic Sci* **31**: 982-989
- [94] Liu V.W.S., Zhang C., Linnane A.W., Nagley P. (1997): Quantitative allele-specific PCR: Demonstration of age-associated accumulation in human tissues of the A→G mutation at nucleotide 3243 in mitochondrial DNA. *Hum Mutat* **9**: 265-271
- [95] Liu V.W.S., Zhang C., Nagley P. (1998): Mutations in mitochondrial DNA accumulate differentially in three different human tissues during ageing. *Nucl Acids Res* **26**: 1268-1275
- [96] Liu V.W.S., Zhang C., Pang C.-Y., Lee H.-C., Lu C.-Y., Wei Y.-H., Nagley P. (1998): Independent occurrence of somatic mutations in mitochondrial DNA of human skin from subjects of various ages. *Hum Mutat* **11**: 191-196
- [97] Lutz S., Weisser H.-J., Heizmann J., Pollak S. (1999): Mitochondrial heteroplasmy among maternally related individuals. *Int J Legal Med* **113**: 155-161
- [98] Man E.H., Sandhouse M.E., Burg J., Fisher G.H. (1983): Accumulation of D-aspartic acid with age in the human brain. *Science* **220**: 1407-1408
- [99] Manella C.A. (1982): Structure of the outer mitochondrial membrane: ordered arrays of porelike subunits in outer-membrane fractions from *Neurospora crassa* mitochondria. *J Cell Biol* **94**: 680-687
- [100] Martin G.M. (1978): Genetic syndromes in man with potential relevance to the pathobiology of aging. *Birth Defects Orig Artic Ser* **14**: 5-39
- [101] Masters P.M., Bada J.L., Zigler J.S. Jr. (1977): Aspartic acid racemization in the human lens during ageing and in cataract formation. *Nature* **268**: 71-73
- [102] Masters P.M., Zimmerman M.R. (1978): Age determination of an Alaskan mummy: morphological and biochemical correlation. *Science* **201**: 811-812
- [103] Meissner C., Mohamed S.A., Klueter H., Hamann K., Wurmb N.v., Oehmichen M. (2000): Quantitation of mitochondrial DNA in human blood cells using an automated detection system. *Forensic Sci Int* **113**: 109-112

- [104] Meißner C., Wurmb N.v., Oehmichen M. (1997): Detection of the age-dependent 4977 bp deletion of mitochondrial DNA. A pilot study. *Int J Leg Med* **110**: 288-291
- [105] Meissner C., Wurmb N.v., Schimansky B., Oehmichen M. (1999): Estimation of age at death based on quantitation of the 4977-bp deletion of human mitochondrial DNA in skeletal muscle. *Forensic Sci Int* **105**: 115-124
- [106] Melov S., Shoffner J.M., Kaufman A., Wallace D.C. (1995): Marked increase in the number and variety of mitochondrial DNA rearrangements in aging human skeletal muscle. *Nucleic Acids Res* **23**: 4122-4126
- [107] Merrill C.R., Zullo S., Ghanbari H., Herman M.M., Kleinman J.E., Bigelow L.B., Bartko J.J., Sabourin D.J. (1996): Possible relationship between conditions associated with chronic hypoxia and brain mitochondrial DNA deletions. *Arch Biochem Biophys* **326**: 172-177
- [108] Miller S.A., Sykes D.D., Polesky H.F. (1988): A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* **16**: 1215
- [109] Mita S., Rizzulo R., Moraes C.T., Shanske S., Arnaudo E., Fabrizi G.M., Koga Y., DiMauro S., Schon E.A. (1990): Recombination via flanking direct repeats is a major cause of large-scale deletions of human mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res* **18**: 561-567
- [110] Möller A., Schürenkamp M., Brinkmann B. (1995): Evaluation of an ACRBP2 ladder composed of 26 sequenced alleles. *Int J Legal Med* **108**: 75-78
- [111] Moraes C.T., Schon E.A., DiMauro S., Miranda A.F. (1989): Heteroplasmy of mitochondrial genomes in clonal cultures from patients with Kearns-Sayre syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* **160**: 765-771
- [112] Morris J.C., McManus D.Q. (1991): The neurology of ageing: Normal versus pathological changes. *Geriatrics* **46**: 47-54
- [113] Moyzis R.K., Buckingham J.M., Cram L.S., Dani M., Deaven L.L., Jones M.D., Meyne J., Ratliff R.L., Wu J.-R. (1988): A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 6622-6626
- [114] Müller-Höcker J. (1989): Cytochrome c oxidase deficient cardiomyocyte in the human heart - an age related phenomenon. *Am J Pathol* **134**: 1167-1173
- [115] Müller-Höcker J., Jacob U., Seibel P. (1998): The common 4977 base pair deletion of mitochondrial DNA preferentially accumulates in the cardiac conduction system of patients with Kearns-Sayre Syndrom. *Mod Pathol* **11**: 295-301
- [116] Müller-Höcker J., Seibel P., Schneiderbanger K., Kadenbach B. (1993): Different in situ hybridization patterns of mitochondrial DNA in cytochrome c oxidase deficient extraocular muscle fibres in the elderly. *Virchows Arch A Pathol Anat* **422**: 7-15
- [117] Münscher C., Müller-Höcker J., Kadenbach B. (1993): Human aging is associated with various point mutations in tRNA genes of mitochondrial DNA. *Biol Chem Hoppe-Seyler* **374**: 1099-1104

- [118] Nagley P., Zhang C. (1998): Mitochondrial DNA mutations in aging. In Singh K.K. (Hrsg.): Mitochondrial DNA mutations in aging, disease and cancer. Austin T.X.: R.G. Landes Biomedical Publisher (in press)
- [119] Nakase H., Moraes C.T., Rizzuto R., Lombes A., DiMauro S., Schon E.A. (1990): Transcription and translation of deleted mitochondrial genomes in Kearns-Sayre syndrome: implication for pathogenesis. *Am J Hum Genet* **46**: 418-427
- [120] Nicoll J.A.A.R., Kinrade E., Love S. (1992): PCR-mediated search for herpes simplex virus DNA in sections of brain from patients with multiple sclerosis and other neurological disorders. *J Neuro Sci* **113**: 144-151
- [121] Ogino T., Ogino H. (1988): Application to forensic odontology of aspartic acid racemization in unerupted and supernumerary teeth. *J Dent Res* **67**: 1319-1322
- [122] Ohhara M., Kurosu Y., Esumi M. (1994): Direct PCR of whole blood and hair shafts by microwave treatment. *BioTechniques* **17**: 726-728
- [123] Olovnikov A.M. (1971): Principles of marginotomy in template synthesis of polynucleotides. *Dokl Akad Nauk SSSR* **201**: 1496-1499
- [124] Orr W.C., Sohal R.S. (1994): Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* **263**: 1128-1130
- [125] Ota Y., Tanaka M., Sato W., Ohno K., Yamamoto T., Maehara M., Negoro T., Watanabe K., Awaya S., Ozawa T. (1991): Detection of platelet mitochondrial DNA deletions in Kearns-Sayre syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **32**: 2667-2675
- [126] Ozawa T. (1995): Mechanism of somatic mitochondrial DNA mutations associated with age and disease. *Biochim Biophys Acta* **1271**: 177-189
- [127] Ozawa T., Tanaka M., Ikebe S., Ohno K., Kondo T., Mizuno Y. (1990): Quantitative determination of deleted mitochondrial DNA relative to normal DNA in parkinsonian striatum by a kinetic PCR analysis. *Biochem Biophys Res Commun* **172**: 483-489
- [128] Ozawa T., Tanaka M., Sugiyama S., Hattori K., Ito T., Ohno K., Takahashi A., Sato W., Takada G., Mayumi B., Yamamoto K., Adachi K., Koga Y., Toshima H. (1990): Multiple mitochondrial DNA deletions exist in cardiomyocytes of patients with hypertrophic or dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* **170**: 830-836
- [129] Ozawa T., Yoneda M., Tanaka M., Ohno K., Sato W., Suzuki H., Nishikimi M., Yamamoto M., Nonaka I., Horai S. (1988): Maternal inheritance of deleted mitochondrial DNA in a family with mitochondrial myopathy. *Biochem Biophys Res Commun* **154**: 1240-1247
- [130] Pang C.Y., Lee H.C., Yang J.H., Wei Y.H. (1994): Human skin mitochondrial DNA deletions associated with light exposure. *Arch Biochem Biophys* **312**: 534-538
- [131] Papa S. (1996): Mitochondria oxidative phosphorylation changes in the life span. Molecular aspects and physiopathological implications. *Biochim Biophys Acta* **127**: 87-105

- [132] Poulton J., Deadman M.E., Ramacharan S., Gardiner R.M. (1991): Germ-line deletions of mtDNA in mitochondrial myopathy. *Am J Hum Genet* **48**: 649-653
- [133] Pschyrembel W. (Begr.): Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 256. Auflage, Walter de Gruyter Berlin, New York 1990
- [134] Reichmann H., Rohkamm R., Zeviani M., Servidei S., Ricker K., DiMauro S. (1986): Mitochondrial myopathy due to complex III deficiency with normal reducible cytochrome b concentration. *Arch Neurol* **43**: 957-961
- [135] Riede U.-N., Schaefer H.-E. (Hrsg.): Allgemeine und spezielle Pathologie. 4. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart New York 1999
- [136] Ritz S., Kaatsch H.-J. (1996): Methoden der Altersbestimmung an lebenden Personen: Möglichkeiten, Grenzen, Zulässigkeit und ethische Vertretbarkeit. *Rechtsmedizin* **6**: 171-176
- [137] Ritz S., Schütz H.W. (1993): Aspartic acid racemization in intervertebral discs as an aid to postmortem estimation of age at death. *J Forensic Sci* **38**: 633-640
- [138] Ritz S., Turzynski A., Schütz H.W., Hollmann A., Rochholz G. (1996): Identification of osteocalcin as a permanent aging constituent of the bone matrix: basis for an accurate age at death determination. *Forensic Sci Int* **770**: 13-26
- [139] Ritz-Timme S., Cattaneo C., Collins M.J., Waite E.R., Schütz H.W., Kaatsch H.-J., Borrman H.I.M. (2000): Age estimation: The state of the art in relation to the specific demands of forensic practise. *Int J Legal Med* **113**: 129-136
- [140] Roche A.F., Chumlea C. (1988): Assessing the skeletal maturity of the hand wrist: FELS method. Charles C Thomas, Springfield, Illinois
- [141] Roewer L., Arnemann J., Spurr N.K., Grzeschik K.-H., Epplen J.T. (1992): Simple repeat sequences on the human Y chromosome are equally polymorphic as their autosomal counterparts. *Hum Mol Genet* **3**: 115-123
- [142] Rötig A., Bessis J.L., Romero N., Cormier V., Saudubray J.M., Narcy P., Lenoir G., Rustin P., Munnich A. (1992): Maternally inherited duplication of the mitochondrial genome in a syndrome of proximal tubulopathy, diabetes mellitus, and cerebellar ataxia. *Am J Hum Genet* **50**: 364-370
- [143] Rötig A., Colonna M., Bonnefont J.P., Blanche S., Fischer A., Saudubray J.M., Munnich A. (1989): Mitochondrial DNA deletion in Pearson's marrow/pancreas syndrome. *Lancet* **1**: 902-903
- [144] Rudman D., Feller A.G., Nagraj H.S., Gergans G.A., Lalitha P.Y., Goldberg A.F., Schlenker R.A., Cohn L., Rudman I.W., Mattson D.E. (1990): Effects of human growth hormone in men over 60 years old. *N Engl J Med* **323**: 1-6
- [145] Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N. (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354

- [146] Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989): Molecular cloning, A laboratory manual. *Cold Spring Harbour Laboratory Press*, New York
- [147] Sandy M.S., Langston J.W., Smith M.T., Di Monte D.A. (1993): PCR analysis of platelet mtDNA: lack of specific changes in Parkinson's disease. *Movement Disorders* **8**: 74-82
- [148] Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5468
- [149] Schiebler T.H., Peiper U., Schneider Fr.: Histologie. 2. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo 1986
- [150] Schon E.A., Rizzuto R., Moraes C.T., et al. (1989): A direct repeat is a hotspot for a large-scale deletion of human mitochondrial DNA. *Science* **244**: 346-349
- [151] Schwerd W. (Hrsg.): Rechtsmedizin. Lehrbuch für Mediziner und Juristen. 5. Auflage, Deutscher Ärzte-Verlag, Köln 1992
- [152] Seibel P., Mell O., Hannemann A., Müller-Höcker J., Kadenbach B. (1991): A method for quantitative analysis of deleted mitochondrial DNA by PCR in small tissue samples. *Methods Mol Cell Biol* **2**: 147-153
- [153] Shanske S., Moraes C.T., Lombes A., Miranda A.F., Bonilla E., Lewis P., Whelan M.A., Ellsworth C.A., DiMauro S. (1990): Widespread tissue distribution of mitochondrial DNA deletions in Kearns-Sayre syndrome [see comments]. *Neurology* **40**: 24-28
- [154] Shapiro S.D., Endicott S.K., Provance M.A., Pierce J.A., Campell E.J. (1991): Marked longevity of human lung parenchymal elastic fibres deduced from prevalence of D-aspartate and nuclear weapons-related radiocarbon. *J Clin Invest* **87**: 1828-1834
- [155] Shenkar R., Navidi W., Tavare S., Dang M.H., Chomyn A., Attardi G., Cortopassi G., Arnheim N. (1996): The mutation rate of the human mtDNA deletion mtDNA⁴⁹⁷⁷. *Am J Hum Genet* **59**: 772-780
- [156] Shoffner J.M., Lott M.T., Voljavec A.S., Soueidan S.A., Costigan D.A., Wallace D.C. (1989): Spontaneous Kearns-Sayre/chronic external ophthalmoplegia plus syndrome associated with a mitochondrial DNA deletion: a slip-replication model and metabolic therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 7952-7956
- [157] Shoubridge E.A., Karpati G., Hastings K.E.M. (1990): Deletion mutants are functionally dominant over wild type mitochondrial genomes in skeletal muscle fiber segments in mitochondrial disease. *Cell* **62**: 43-49
- [158] Simonetti S., Chen X., DiMauro S., Schon E. (1992): Accumulation of deletions in human mitochondrial DNA during normal aging: analysis by quantitative PCR. *Biochim Biophys Acta* **1180**: 113-122
- [159] Smith O.P., Hamm M.J., Woodward C.E., Brockington M. (1995): Pearson's marrow/pancreas syndrome: haematological features associated with deletion and duplication of mitochondrial DNA. *British J Haematol* **90**: 469-472

- [160] Sohal R.S., Ku H.H., Agarwal S., Forster M.J., Lal H. (1994): Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mech Ageing Dev* **74**: 121-133
- [161] Stanulis-Praeger B.M. (1987): Cellular senescence revisited: a review. *Mech Ageing Dev* **38**: 1-48
- [162] Stout S.D. (1988): The use of histomorphology to estimate age. *J Forensic Sci* **33**: 121-125
- [163] Stout S.D., Gehlert S.J. (1980): The relative accuracy and reliability of histological aging methods. *Forensic Sci Int* **15**: 181-190
- [164] Szilard L. (1959): On the nature of the aging process. *Proc Natl Acad Sci USA* **45**: 30-45
- [165] Thomas C. (Hrsg.): Allgemeine Pathologie. 1. Auflage, Schattauer, Stuttgart, New York 1995
- [166] Trounce I., Byrne E., Marzuki S. (1989): Decline in skeletal muscle mitochondrial respiratory chain function: possible factor in aging. *Lancet* **1**: 637-639
- [167] Urquhart A., Oldroyd N.J., Kimpton C.P., Gill P. (1995): Highly discriminating heptaplex short tandem repeat PCR system for forensic identification. *BioTechniques* **18**: 116-121
- [168] Uytterschaut H.T. (1985): Determination of skeletal age by histological methods. *Z Morphol Anthropol* **75**: 331-340
- [169] Vaziri H., Schächter F., Uchida I., Wei L., Zhu X., Effros R., Cohen D., Harley C.B. (1993): Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes. *Am J Hum Genet* **52**: 661-667
- [170] Vrzk M., Petras M. (1997): Comparison of DNA damage in peripheral blood and spleen lymphocytes using the single-cell gel assay. *Mutat Res* **379**: 263-269
- [171] Wallace D.C. (1982): Structure and evolution of organelle genomes. *Microbiol Rev* **46**: 208-240
- [172] Wallace D.C. (1990): Report of the committee on human mitochondrial DNA. *Cytogenet Cell Genet* **55**: 395-405
- [173] Wallace D.C. (1992): Diseases of the mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem* **61**: 1175-1212
- [174] Wallace D.C. (1992): Mitochondrial genetics: A paradigm for ageing and degenerative diseases? *Science* **256**: 628-632
- [175] Wallace D.C. (1997): Mitochondrial DNA in aging and disease. *Scientific American* August 1997: 22-29
- [176] Walsh P.S., Metzger D.A., Higuchi R. (1991): Chelex® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* **10**: 506-513

- [177] Warner H.R., Hodes R.J., Pocinki K. (1997): What does cell death have to do with aging? *J Am Geriatr Soc* **45**: 1140-1146
- [178] Wilson M.R., Polansky D., Butler J., DiZinno J.A., Replogle J., Budowle B. (1995): Extraction, PCR amplification and sequencing of mitochondrial DNA from human hair shafts. *BioTechniques* **18**: 662-669
- [179] Workshop of European anthropologists (1980): Recommendations for age and sex diagnosis of skeletons. *J Hum Evol* **9**: 517-549
- [180] Wurmb N.v., Oehmichen M., Meissner C. (1998): Demonstration of the 4977 bp deletion in human mitochondrial DNA from intravital and postmortem blood. *Mutat Res* **422**: 247-254
- [181] Yakes F.M., Van H.B. (1997): Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 514-519
- [182] Yamamoto H., Tanaka M., Katayama M., Obayashi T., Nimura Y., Ozawa T. (1992): Significant existence of deleted mitochondrial DNA in cirrhotic liver surrounding hepatic tumor. *Biochem Biophys Res Commun* **182**: 913-920
- [183] Yang J.H., Lee H.C., Lin K.J., Wei Y.H. (1994): A specific 4977-bp deletion of mitochondrial DNA in human ageing skin. *Arch Dermatol Res* **286**: 386-390
- [184] Yen T.C., Pang C.Y., Hsieh R.H., Su C.H., King K.L., Wei Y.H. (1992): Age-dependent 6 kb deletion in human liver mitochondrial DNA. *Biochem Int* **26**: 457-468
- [185] Yen T.C., Su J.H., King K.L., Wei Y.H. (1991): Ageing-associated 5 kb deletion in human liver mitochondrial DNA. *Biochem Biophys Res Commun* **178**: 124-131
- [186] Yu C.E., Oshima J., Wijsman E.M., Nakura J., Miki T., Piussan C., Matthews S., Fu Y.-H., Mulligan J., Martin G.M., Schellenberg G.D. und Werner's Syndrome Collaborative Group (1997): Mutations in the consensus helicase domains of the Werner Syndrome gene. *Am J Hum Genet* **60**: 330-341
- [187] Zakian V.A. (1995): ATM-related genes: What do they tell us about functions of the human gene? *Cell* **82**: 685-687
- [188] Zhang C., Baumer A., Maxwell R.J., Linnane A.W., Nagley P. (1992): Multiple mitochondrial DNA deletions in an elderly human individual. *FEBS Lett* **297**: 34-38
- [189] Zhang C., Linnane A.W., Nagley P. (1993): Occurrence of a particular base substitution (3243 A to G) in mitochondrial DNA of tissues of ageing humans. *Biochem Biophys Res Commun* **195**: 1104-1110
- [190] Zhang C., Liu V.W.S., Addessi C.L., Sheffield D.A., Linnane A.W., Nagley P. (1998): Differential occurrence of mutations in mitochondrial DNA of human skeletal muscle during aging. *Hum Mutat* **11**: 360-371
- [191] Zhong S., Ng M.C.Y., Lo Y.M.D., Chan J.C.N., Johnson P.J. (2000): Presence of mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} A to G 3243 mutation in DNA extracted from serum and plasma of patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Path* **53**: 466-469

7 Anhang

7.1 Gene des mitochondrialen Genoms

Tab. 7.1: Lokalisierung der Gene des H- und L-Stranges im mitochondrialen Genom. Die Gene des H-Stranges sind mit H, die des L-Stranges mit L gekennzeichnet. Die Zuordnung der einzelnen Gene auf dem Genom wird durch den Zahlenbereich angegeben [3].

Genort (Symbol)	Nukleotid-Nr. von (nt) - bis (nt)	Genprodukt	Strang
O _H	110 - 441	Ursprung der H-Strang-Replikation	H
CSB I	213 - 255	konservierter Sequenz-Block	H
mtTFX	233 - 260	mtTF 1-Bindungsstelle	H
mtTFY	276 - 303	mtTF 1-Bindungsstelle	H
CSB II	299 - 315	konservierter Sequenz-Block	H
CSB III	346 - 363	konservierter Sequenz-Block	H
mtTFL	418 - 445	mtTF 1-Bindungsstelle	H
mtTFH	523 - 550	mtTF 1-Bindungsstelle	H
F	577 - 647	tRNA-Phenylalanin	H
12 S rRNA	648 - 1.601	12 S ribosomale RNA	H
V	1.602 - 1.670	tRNA-Valin	H
16 S rRNA	1.671 - 3.229	16 S ribosomale RNA	H
TTS	3.237 - 3.249	Transkriptions-Terminations-Sequenz	H
L	3.230 - 3.304	tRNA-Leucin	H
ND 1	3.307 - 4.260	NADH-Dehydrogenase Untereinheit 1	H
I	4.263 - 4.331	tRNA-Isoleucin	H
Q	4.400 - 4.320	tRNA-Glutamin	L
M	4.402 - 4.469	tRNA-Methionin	H
ND 2	4.470 - 5.510	NADH-Dehydrogenase Untereinheit 2	H
W	5.512 - 5.579	tRNA-Tryptophan	H
A	5.655 - 5.587	tRNA-Alanin	L
N	5.729 - 5.657	tRNA-Asparagin	L
O _L	5.730 - 5.760	Ursprung der L-Strang-Replikation	H
C	5.826 - 5.761	tRNA-Cystein	L
Y	5.891 - 5.826	tRNA-Tyrosin	L
COX I	5.904 - 7.442	Cytochrom c-Oxidase Untereinheit 1	H
S	7.516 - 7.445	tRNA-Serin	L
D	7.518 - 7.585	tRNA-Asparaginsäure	H
COX II	7.586 - 8.266	Cytochrom c-Oxidase Untereinheit 2	H
K	8.295 - 8.364	tRNA-Lysin	H
ATPase 8	8.366 - 8.569	ATP-Synthase Untereinheit 8	H
ATPase 6	8.527 - 9.204	ATP-Synthase Untereinheit 6	H
COX III	9.207 - 9.989	Cytochrom c-Oxidase Untereinheit 3	H
G	9.991 - 10.058	tRNA-Glycin	H
ND 3	10.059 - 10.403	NADH-Dehydrogenase Untereinheit 3	H
R	10.405 - 10.469	tRNA-Arginin	H
ND 4 L	10.470 - 10.763	NADH-Dehydrogenase Untereinheit 4 L	H
ND 4	10.760 - 12.136	NADH-Dehydrogenase Untereinheit 4	H
H	12.138 - 12.206	tRNA-Histidin	H
S	12.207 - 12.265	tRNA-Serin	H
L	12.266 - 12.336	tRNA-Leucin	H
ND 5	12.337 - 14.145	NADH-Dehydrogenase Untereinheit 5	H
ND 6	14.673 - 14.152	NADH-Dehydrogenase Untereinheit 6	L
E	14.742 - 14.674	tRNA-Glutaminsäure	L
Cyt b	14.747 - 15.886	Cytochrom b	H
T	15.888 - 15.953	tRNA-Theonin	H
P	16.023 - 15.955	tRNA-Prolin	L
TAS	16.157 - 16.172	Terminations-assoziierte Sequenz	H
att.	15.925 - 499	mit der Membran assoziierter Genombereich	H

7.2 Computeranalyisierte Rohdaten

Tab. 7.2: Tabelle der mittels *GeneScan Analysis 2.0.2* computeranalyisierten Rohdaten aller in dieser Arbeit untersuchten biologischen Materialien. Ermittelt wurde die Peakfläche (PF) der 142 bp- und 184 bp-Bande (PF_{142bp}/PF_{184e}) der jeweiligen untersuchten Probe.

Nr.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Alter [Jahre]		1	1	1	5	5	10	10	10	15	17	19	20	20	20	
in Paraffin eingebettetes Gewebe	Gehirn			96546 / 0					81560 / 0		66291 / 0		83873 / 234		44643 / 698	
	Herz										65196 / 0		61880 / 0		28737 / 123	
	Lunge										91661 / 0		84762 / 0		65400 / 0	
	Niere										83641 / 0		957860 / 0		68798 / 0	
	Leber										96546 / 0		74665 / 0		71156 / 0	
	Milz										92100 / 0		98643 / 0		86695 / 0	
	Pankreas															
	Haut															95420 / 0
	Blut	50 ng	86499 / 0			82165 / 0			88131 / 0			91616 / 0		62608 / 0	96546 / 0	
200 ng		98798 / 0			71456 / 0			71323 / 0			46548 / 0		78798 / 0	81326 / 0		
400 ng		64954 / 0			91316 / 0			61232 / 0			64984 / 0		54636 / 0	32131 / 0		
1000 ng		73695 / 0			85535 / 0			92584 / 0			54121 / 0		29286 / 0	71014 / 0		
MHA		direkt aufg. konz.		94565 / 0					78987 / 0						91235 / 0	
Leichengewebe	Gehirn	aufg. konz.														
	Muskel	aufg. konz.														
	Herz	aufg. konz.														
	Leber	aufg. konz.														
	Haut	aufg. konz.														
	Haarwurzel	aufg. konz.														
Nr.		15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
Alter [Jahre]		21	22	22	23	23	23	24	24	25	25	25	25	26	26	
in Paraffin eingebettetes Gewebe	Gehirn													55818 / 1282		
	Herz													730950 / 8771		
	Lunge													45880 / 0		
	Niere													46917 / 0		
	Leber													18903 / 0		
	Milz													37704 / 0		
	Pankreas															
	Haut															
	Blut	50 ng	79464 / 0	82165 / 0	76549 / 0	65496 / 0	91656 / 0	82136 / 0	31654 / 0	51615 / 0	73126 / 0	57656 / 0	13516 / 0		96569 / 0	66651 / 0
200 ng		51654 / 0	35468 / 0	32164 / 0	32165 / 0	32165 / 0	45546 / 0	82658 / 0	99595 / 0	89852 / 0	84598 / 0	53625 / 0		69879 / 0	21635 / 0	
400 ng		63391 / 0	98797 / 0	43216 / 0	94949 / 0	87416 / 0	91698 / 0	96216 / 0	81321 / 0	97898 / 0	65494 / 0	13542 / 0		71654 / 0	11080 / 0	
1000 ng		91746 / 0	92660 / 0	23533 / 0	35831 / 0	26900 / 0	41022 / 0	98490 / 0	25754 / 0	11457 / 0	25744 / 0	30619 / 139		38321 / 0	25278 / 307	
MHA		direkt aufg. konz.					78964 / 0				61654 / 0					
Leichengewebe	Gehirn	aufg. konz.				43957 / 0										
	Muskel	aufg. konz.				33951 / 0										
	Herz	aufg. konz.				53873 / 307										
	Leber	aufg. konz.				65783 / 1642										
	Haut	aufg. konz.				50620 / 166										
	Haarwurzel	aufg. konz.				77720 / 744										

Nr.		29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	
Alter [Jahre]		26	27	28	28	28	29	30	30	30	30	31	32	
in Paraffin eingebettetes Gewebe	Gehirn					25360 / 1303					56671 / 4704			
	Herz					295028 / 14161					72390 / 1810			
	Lunge					27731 / 0					69786 / 0			
	Niere					33544 / 134					879846 / 8798			
	Leber					91130 / 0					12986 / 39			
	Milz					33961 / 272					39712 / 675			
	Pankreas Haut										93935 / 0			
Blut	50 ng	98998 / 0	46965 / 0	43216 / 0	96561 / 0		83164 / 0	651464 / 0	55169 / 0			96566 / 0	61499 / 0	
	200 ng	83216 / 0	89876 / 0	82456 / 0	78758 / 0		65984 / 0	62165 / 0	12055 / 0			45646 / 0	68987 / 0	
	400 ng	11989 / 0	11156 / 0	12326 / 0	12780 / 0		12053 / 0	73906 / 0	30354 / 239			33249 / 701	11459 / 0	
	1000 ng	79605 / 176	93865 / 1290	25715 / 0	31914 / 345		257119 / 3123	20002 / 332	29230 / 533			24896 / 720	10409 / 302	
MHA	direkt		77989 / 0							98456 / 0				
	aufg. konz.		77681 / 0 64990 / 0											
Leichengewebe	Gehirn	aufg.	64427 / 1265											
		konz.	55232 / 4501											
	Muskel	aufg.	28737 / 302											
		konz.	60473 / 2726											
	Herz	aufg.	67871 / 585											
		konz.	70528 / 2528											
	Leber	aufg.	98798 / 0											
		konz.	60428 / 382											
	Haut	aufg.	54568 / 0											
		konz.	35481 / 0											
	Haar- wurzel	aufg.	79996 / 0											
		konz.	31316 / 0											

Nr.		41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	
Alter [Jahre]		32	33	33	34	35	35	35	36	36	37	38	38	
in Paraffin eingebettetes Gewebe	Gehirn			61874 / 3954				44517 / 16560					27054 / 4302	
	Herz													
	Lunge													
	Niere													
	Leber													
	Milz													
	Pankreas Haut													
Blut	50 ng	65694 / 0	36544 / 0		79849 / 0	41316 / 0			13216 / 0	32133 / 0	83654 / 0	54665 / 0		
	200 ng	95163 / 0	32165 / 0		86846 / 0	79937 / 0			68432 / 0	51489 / 0	39654 / 0	11231 / 0		
	400 ng	23930 / 0	23178 / 0		24113 / 0	95015 / 0			98765 / 0	79230 / 0	24927 / 0	85385 / 1640		
	1000 ng	31863 / 678	83815 / 2300		58395 / 241	15850 / 453			78837 / 0	68536 / 1972	11017 / 252	12402 / 365		
MHA	direkt						45678 / 0				16516 / 0			
	aufg. konz.													
Leichengewebe	Gehirn	aufg.												
		konz.												
	Muskel	aufg.												
		konz.												
	Herz	aufg.												
		konz.												
	Leber	aufg.												
		konz.												
	Haut	aufg.												
		konz.												
	Haar- wurzel	aufg.												
		konz.												

Nr.		53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	
Alter [Jahre]		39	39	40	40	40	41	41	41	42	42	42	43	43	
in Paraffin eingebettetes Gewebe	Gehirn					30563 / 5410					10232 / 1862		13618 / 9437		
	Herz														
	Lunge														
	Niere														
	Leber														
	Milz														
Blut	Pankreas														
	Haut														
	50 ng	38651 / 0	27059 / 0	65466 / 0			96566 / 0			73216 / 0	12160 / 0		13852 / 0	12321 / 0	
	200 ng	78298 / 0	43503 / 390	52750 / 0			27826 / 0			46135 / 0	39231 / 114		30322 / 208	30885 / 0	
	400 ng	13310 / 310	118320 / 3195	45176 / 703			49227 / 1383			34719 / 521	29418 / 1088		32438 / 494	55818 / 1282	
MHA	1000 ng	102415 / 4301	12782 / 703	13182 / 727			29145 / 1270			15027 / 508	29276 / 1750		47343 / 1066	50173 / 1814	
	direkt	65649 / 0	32136 / 0		60456 / 0			89870 / 0							
Leichengewebe	aufg.	74155 / 0													
	konz.	64482 / 0													
	Gehirn	aufg.	25132 / 32091												
		konz.	18434 / 46954												
	Muskel	aufg.	31299 / 34092												
		konz.	22009 / 45838												
	Herz	aufg.	60497 / 27590												
		konz.	2848 / 5011												
	Leber	aufg.	83082 / 6730												
		konz.	70740 / 29142												
	Haut	aufg.	98756 / 0												
		konz.	67647 / 449												
Haar- wurzel	aufg.	46598 / 0													
	konz.	61365 / 0													

Nr.		66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	
Alter [Jahre]		43	43	44	44	44	45	45	45	45	45	46	46	47	
in Paraffin eingebettetes Gewebe	Gehirn		10986 / 2928			28185 / 18461					47995 / 15070				
	Herz														
	Lunge														
	Niere														
	Leber														
	Milz														
Blut	Pankreas														
	Haut														
	50 ng			76160 / 0	32586 / 0		31284 / 0	54632 / 0	31502 / 0			65499 / 0	49879 / 0	31539 / 0	
	200 ng			54574 / 82	44643 / 698		65789 / 259	98984 / 0	67871 / 585			83568 / 0	33886 / 0	66828 / 434	
	400 ng			51151 / 1110	92060 / 2750		77729 / 1710	45646 / 0	73298 / 1817			18863 / 380	31057 / 581	40823 / 1105	
MHA	1000 ng			65999 / 2964	11376 / 379		11836 / 613	18831 / 708	49173 / 2315			10420 / 442	63801 / 2553	59263 / 2856	
	direkt	98797 / 0								94640 / 0					
Leichengewebe	aufg.														
	konz.														
	Gehirn	aufg.													
		konz.													
	Muskel	aufg.													
		konz.													
	Herz	aufg.													
		konz.													
	Leber	aufg.													
		konz.													
	Haut	aufg.													
		konz.													
Haar- wurzel	aufg.														
	konz.														

Nr.		79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
Alter [Jahre]		47	47	47	48	48	48	49	49	49	50	50	50
in Paraffin eingebettetes Gewebe	Gehirn			13652 / 4410			9696 / 3098			13821 / 3580			
	Herz												
	Lunge												
	Niere												
	Leber												
	Milz												
Blut	Pankreas												
	Haut												
	50 ng	79879 / 0	60251 / 0		42405 / 0	80636 / 0		76160 / 0		88289 / 0	11231 / 0	95892 / 0	
	200 ng	82885 / 0	52460 / 1036		58576 / 629	23203 / 416		32870 / 339		41990 / 645	59589 / 751	13807 / 436	
MHA	400 ng	61964 / 771	58060 / 1252		73459 / 1581	30994 / 641		13958 / 503		44576 / 789	78658 / 1527	14503 / 500	
	1000 ng	14573 / 401	12751 / 675		13975 / 741	28848 / 1604		12165 / 805		14605 / 932	13562 / 536	13315 / 1279	
Leichengewebe	direkt aufg. konz.				56564 / 0				69994 / 0				
	Gehirn aufg. konz.												
	Muskel aufg. konz.												
	Herz aufg. konz.												
	Leber aufg. konz.												
	Haut aufg. konz.												
	Haarwurzel aufg. konz.												

Nr.		91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102
Alter [Jahre]		50	50	51	51	51	51	51	52	52	52	52	52
in Paraffin eingebettetes Gewebe	Gehirn		11716 / 844					56623 / 22706					
	Herz												
	Lunge												
	Niere												
	Leber												
	Milz												
Blut	Pankreas												
	Haut												
	50 ng		92883 / 0	89206 / 0	13542 / 0		86177 / 0	79937 / 0	79879 / 0	59879 / 0	70251 / 0		
	200 ng		93057 / 1531	26531 / 340	44135 / 542		61951 / 837	53185 / 298	69879 / 0	46466 / 0	66254 / 1048		
MHA	400 ng		32281 / 1063	11118 / 292	26907 / 930		78760 / 2050	75895 / 1290	32518 / 0	61223 / 0	69994 / 2420		
	1000 ng		89260 / 9100	43239 / 2252	27834 / 1150		42274 / 2029	62405 / 2630	34525 / 860	92405 / 0	73190 / 4178		
Leichengewebe	direkt aufg. konz.	70546 / 0					94898 / 0						
	Gehirn aufg. konz.												
	Muskel aufg. konz.												
	Herz aufg. konz.												
	Leber aufg. konz.												
	Haut aufg. konz.												
	Haarwurzel aufg. konz.												

Nr.		103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114
Alter [Jahre]		52	52	52	52	52	52	52	53	53	53	53	53
in Paraffin eingebettetes Gewebe	Gehirn												15641 / 11156
	Herz												
	Lunge												
	Niere												
	Leber												
	Milz												
	Pankreas												
Haut													
Blut	50 ng	82750 / 0	71230 / 0	12055 / 0	12780 / 0	11459 / 0	82503 / 0		41032 / 113	57834 / 428	72885 / 0		
	200 ng	25803 / 294	30367 / 551	25162 / 1049	39196 / 353	36360 / 631	38205 / 699		62089 / 1564	10175 / 232	64315 / 1135		
	400 ng	36548 / 511	32060 / 1245	32280 / 453	27426 / 681	23898 / 1200	30756 / 590		33606 / 1186	56676 / 2221	10096 / 470		
	1000 ng	28362 / 985	25540 / 1311	29480 / 818	12359 / 648	33952 / 3506	27482 / 581		64180 / 3717	10904 / 765	37292 / 2855		
MHA	direkt							987979 / 0					46453 / 0
	aufg. konz.												73120 / 0 67158 / 0
Leichengewebe	Gehirn	aufg. konz.											
	Muskel	aufg. konz.											
	Herz	aufg. konz.											
	Leber	aufg. konz.											
	Haut	aufg. konz.											
Haar- wurzel	aufg. konz.												

Nr.		115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126
Alter [Jahre]		54	54	54	54	54	55	55	55	55	55	56	56
in Paraffin eingebettetes Gewebe	Gehirn										61460 / 33672		
	Herz												
	Lunge												
	Niere												
	Leber												
	Milz												
	Pankreas												
Haut													
Blut	50 ng	55685 / 185	41987 / 0	48675 / 0	11396 / 0	13695 / 0	59552 / 1206	12554 / 0	10904 / 0			10378 / 0	49894 / 0
	200 ng	61595 / 1729	58827 / 0	66254 / 1048	68797 / 1352	47715 / 1033	33178 / 1414	12883 / 300	12733 / 411			12411 / 299	98411 / 0
	400 ng	13772 / 490	28592 / 428	87440 / 3300	36266 / 1155	84375 / 3575	10882 / 705	103780 / 4570	12240 / 463			17402 / 666	56513 / 0
	1000 ng	6559 / 684	14046 / 449	72588 / 4008	74909 / 4099	28166 / 2369	11982 / 827	47995 / 2769	141990 / 5940			116220 / 7322	78845 / 0
MHA	direkt	32165 / 0	13213 / 0										84565 / 0
	aufg. konz.	98797 / 0 54206 / 306								91336 / 0	85165 / 0		76598 / 0 64644 / 585
Leichengewebe	Gehirn	aufg. konz.											
	Muskel	aufg. konz.											
	Herz	aufg. konz.											
	Leber	aufg. konz.											
	Haut	aufg. konz.											
Haar- wurzel	aufg. konz.												

Nr.		127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139
Alter [Jahre]		56	56	57	57	57	57	57	57	57	58	58	58	58
in Paraffin eingebettetes Gewebe	Gehirn		50503 / 10959											
	Herz													
	Lunge													
	Niere													
	Leber													
	Milz													
	Pankreas Haut													
Blut	50 ng			83212 / 0	71083 / 0	45123 / 0	76542 / 0	18047 / 0			20540 / 0	49068 / 0	98798 / 0	74807 / 0
	200 ng			12137 / 0	13041 / 296	59876 / 0	91417 / 0	34892 / 0			50061 / 1661	56562 / 441	19715 / 0	60729 / 670
	400 ng			19465 / 455	82300 / 5990	65413 / 0	19465 / 455	44106 / 805			48747 / 1819	25817 / 631	51801 / 964	13899 / 411
	1000 ng			64382 / 3330	9622 / 1121	15892 / 0	24177 / 776	48237 / 1955			34654 / 2103	8270 / 452	11111 / 369	40055 / 1386
MHA	direkt	99480 / 0							69879 / 0	51784 / 0		94946 / 0		
Leichengewebe	aufg. konz.	Gehirn												
		Muskel												
		Herz												
		Leber												
		Haut												
Haar- wurzel	aufg. konz.													

Nr.		140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152
Alter [Jahre]		58	58	59	59	59	59	59	59	59	60	60	60	60
in Paraffin eingebettetes Gewebe	Gehirn		20369 / 11115							70740 / 29142				
	Herz													
	Lunge													
	Niere													
	Leber													
	Milz													
	Pankreas Haut													
Blut	50 ng			17659 / 0	14076 / 0	50549 / 0	72273 / 0			42511 / 0	56094 / 598	56562 / 0	47120 / 365	
	200 ng			36248 / 751	67928 / 1740	79718 / 1133	27142 / 512			50109 / 1599	69483 / 1319	50620 / 166	61194 / 848	
	400 ng			69457 / 1700	8892 / 377	92800 / 4400	33345 / 882			39067 / 2338	48143 / 1175	43579 / 1002	24848 / 499	
	1000 ng			31989 / 1666	75867 / 5305	38813 / 2290	39355 / 2391			47725 / 794	11442 / 491	31216 / 987	29665 / 1424	
MHA	direkt	86540 / 0						69870 / 0	95464 / 0		46498 / 0			
Leichengewebe	aufg. konz.	Gehirn												
		Muskel												
		Herz												
		Leber												
		Haut												
Haar- wurzel	aufg. konz.													

Nr.		153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	
Alter [Jahre]		60	60	61	61	61	61	61	61	61	61	62	62	
in Paraffin eingebettetes Gewebe	Gehirn		16079 / 10916						16554 / 12983	18659 / 12390	19917 / 25852			
	Herz								67741 / 18222					
	Lunge								27963 / 474					
	Niere								18105 / 1156					
	Leber								14486 / 738					
	Milz								39928 / 15372					
Blut	Pankreas													
	Haut								79482 / 0					
	50 ng			61332 / 0	49770 / 0	39926 / 501						45100 / 0		
	200 ng			47767 / 846	43761 / 343	49254 / 789						58527 / 859		
	400 ng			13197 / 556	37906 / 1292	33537 / 1348						26774 / 667		
Leichtergewebe	1000 ng			38679 / 2958	10276 / 1153	49564 / 3849						21041 / 1326		
	MHA	96497 / 0					46849 / 0	89790 / 0					69790 / 0	
	aufg. konz.	Gehirn												
		Muskel												
		Herz												
		Leber												
		Haut												
	Haarwurzel													

Nr.		165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	
Alter [Jahre]		62	62	62	62	63	63	63	63	63	64	64	64	
in Paraffin eingebettetes Gewebe	Gehirn			14920 / 10939	28173 / 19242				8151 / 3904	18152 / 16510				
	Herz			18211 / 6948					22589 / 8765					
	Lunge			60428 / 382					98650 / 0					
	Niere			48140 / 3709					59687 / 4472					
	Leber			13268 / 2030					41563 / 2660					
	Milz			16747 / 6481					968491 / 74574					
Blut	Pankreas													
	Haut													
	50 ng					18198 / 0				91356 / 0	89498 / 0			
	200 ng					59778 / 938				40077 / 497	46623 / 675			
	400 ng					10793 / 412				70528 / 2528	50433 / 2012			
Leichtergewebe	1000 ng					50425 / 3645				59687 / 4472	46388 / 3758			
	MHA	98770 / 0	81359 / 0				96540 / 0	76540 / 0					98790 / 0	
	aufg. konz.	Gehirn		59873 / 0					59379 / 502					
		Muskel		46641 / 456					19484 / 371					
		Herz												
		Leber												
		Haut												
	Haarwurzel													

Nr.		177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188
Alter [Jahre]		64	64	64	64	64	65	65	65	65	66	66	66
in Paraffin eingebettetes Gewebe	Gehirn		39361 / 68419	613251 / 736514	25132 / 32091	29400 / 96697				2848 / 5011			
	Herz					18872 / 8068				14151 / 5196			
	Lunge					72065 / 0				98464 / 0			
	Niere					51207 / 4191				22912 / 3982			
	Leber					19930 / 199				7680 / 594			
MHA	Milz					16704 / 0				1120 / 227			
	Pankreas												
Blut	Haut			44560 / 0									
	50 ng						32842 / 151	67928 / 289			69457 / 138		
	200 ng						34769 / 574	7489 / 235			47247 / 1798		
	400 ng						86750 / 4360	7522 / 276			88270 / 4520		
MHA	1000 ng						42499 / 2526	57482 / 4164			57970 / 3945		
	direkt	89797 / 0										84656 / 0	71654 / 0
Leichengewebe	aufg. konz.								96546 / 0	57117 / 888			
	Gehirn								54889 / 1702				
	Muskel												
	Herz												
	Leber												
Haarwurzel	Haut												
	aufg. konz.												

Nr.		189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200
Alter [Jahre]		66	67	67	67	67	67	68	68	68	68	68	68
in Paraffin eingebettetes Gewebe	Gehirn	16071 / 24717				54089 / 59263	14680 / 3347						25640 / 11743
	Herz	17686 / 10665				13173 / 6123							7912 / 3149
	Lunge	54996 / 0				77896 / 0							
	Niere	12669 / 4333				41465 / 7381							
	Leber					37688 / 3345							
MHA	Milz					44654 / 40144							
	Pankreas												
Blut	Haut												
	50 ng		72741 / 332					59898 / 0	31233 / 524	52494 / 252	36062 / 773		
	200 ng		93905 / 1745					98794 / 0	65783 / 1642	52909 / 1165	14362 / 650		
	400 ng		55915 / 2755					65431 / 0	64158 / 2510	52073 / 2107	53151 / 3356		
MHA	1000 ng		59817 / 4297					76810 / 0	14331 / 1045	54764 / 4541	53093 / 5175		
	direkt			82131 / 0	93213 / 0							49879 / 0	
Leichengewebe	aufg. konz.												
	Gehirn												
	Muskel												
	Herz												
	Leber												
Haarwurzel	Haut												
	aufg. konz.												

Nr.		201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212
Alter [Jahre]		68	69	69	69	69	69	69	69	69	69	69	70
in Paraffin eingebettetes Gewebe	Gehirn	26023 / 37629									15991 / 10490	10564 / 18690	
	Herz										70740 / 29142		
	Lunge										987651 / 0		
	Niere										70528 / 10579		
	Leber	77480 / 8135									47345 / 6529		
	Milz												
	Pankreas												
	Haut												
Blut	50 ng	46229 / 338	32200 / 400	58613 / 525	43761 / 343								53873 / 307
	200 ng	53680 / 1052	66314 / 1726	58972 / 1619	18455 / 434								70350 / 1782
	400 ng	43782 / 2054	59315 / 3775	105650 / 4980	120800 / 6160								65405 / 2720
	1000 ng	95760 / 9110	79394 / 6390	38378 / 2837	35679 / 2573								60887 / 5316
MHA	direkt						65464 / 0	13213 / 0	46540 / 0	98797 / 0			
	aufg. konz.									71241 / 1354	67126 / 1787		
Leichengewebe	Gehirn												
	Muskel												
	Herz												
	Leber												
	Haut												
Haar- wurzel	aufg. konz.												

Nr.		213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224
Alter [Jahre]		70	70	70	70	70	70	70	71	71	71	71	71
in Paraffin eingebettetes Gewebe	Gehirn							42235 / 69434			96034 / 0	1339 / 2262	4821 / 8486
	Herz										47024 / 0	20764 / 1827	53634 / 29257
	Lunge										11321 / 0	98880 / 0	21641 / 0
	Niere										65464 / 12569		987974 / 202535
	Leber											42609 / 4398	11846 / 1457
	Milz												5565 / 2065
	Pankreas												
	Haut							69879 / 0					
Blut	50 ng	28737 / 302	65589 / 1473						38114 / 552	58618 / 562			
	200 ng	62906 / 2050	65172 / 2051						65392 / 2044	39773 / 1531			
	400 ng	75743 / 6480	57720 / 3167						64730 / 4287	35802 / 2506			
	1000 ng	77239 / 9742	37688 / 3345						66949 / 6714	34005 / 3670			
MHA	direkt			56464 / 0	49878 / 0	45646 / 0	52982 / 0						
	aufg. konz.			98798 / 0	56465 / 0	29313 / 0	8254 / 222	46874 / 0					
Leichengewebe	Gehirn												
	Muskel												
	Herz												
	Leber												
	Haut												
Haar- wurzel	aufg. konz.												

Nr.		225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	
Alter [Jahre]		72	72	72	72	72	72	72	73	73	73	73	73	
in Paraffin eingebettetes Gewebe	Gehirn					18514 / 31334	13762 / 7941	18249 / 35136						
	Herz					32177 / 22867		12189 / 9568						
	Lunge					68494 / 0	94987 / 0	77987 / 0						
	Niere					32130 / 7518	87831 / 26261							
	Leber					13699 / 4699	10986 / 1527	12334 / 1727						
	Milz													
Blut	Pankreas													
	Haut													
	50 ng	56790 / 998	61332 / 653						54473 / 897	37500 / 719	62517 / 1040			
	200 ng	37869 / 1958	61929 / 2374						38779 / 1442	16189 / 606	11210 / 363			
MHA	400 ng	61023 / 4062	88450 / 5130					60973 / 3240	26437 / 1180	130375 / 7035				
	1000 ng	49852 / 5217	46765 / 4565					65455 / 5914	75977 / 7655	65952 / 5422				
Leichengewebe	direkt aufg. konz.			35165 / 0	83213 / 0							70103 / 0	54649 / 0	
	Gehirn aufg. konz.			64321 / 0	14789 / 1080							46546 / 0	8196 / 197	
	Muskel aufg. konz.													
	Herz aufg. konz.													
	Leber aufg. konz.													
	Haut aufg. konz.													
	Haarwurzel aufg. konz.													

Nr.		237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248
Alter [Jahre]		73	73	74	74	74	74	74	74	75	75	75	75
in Paraffin eingebettetes Gewebe	Gehirn		66531 / 0				53464 / 99871	14449 / 28662	13634 / 43670			18474 / 39132	7985 / 15198
	Herz							27030 / 5082	7938 / 6630			12524 / 8517	15781 / 16015
	Lunge						98755 / 0	44654 / 0	31987 / 0			1133 / 0	77798 / 0
	Niere											98777 / 0	46584 / 15885
	Leber						91920 / 13240		494116 / 288070			11310 / 1540	
	Milz												
Blut	Pankreas												
	Haut		59321 / 0										
	50 ng			63569 / 1158						44520 / 140	57264 / 1007		
	200 ng			32716 / 1273						63993 / 3516	31083 / 920		
MHA	400 ng			11800 / 632					105680 / 6520	20418 / 841			
	1000 ng			50351 / 5801					8360 / 1200	63081 / 8895			
Leichengewebe	direkt aufg. konz.	84874 / 0			49789 / 0	32131 / 0				71649 / 0			
	Gehirn aufg. konz.	18979 / 968			97893 / 0	98749 / 0				97987 / 0			
	Muskel aufg. konz.					96849 / 0				65498 / 0			
	Herz aufg. konz.												
	Leber aufg. konz.												
	Haut aufg. konz.												
	Haarwurzel aufg. konz.												

Nr.		249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259
Alter [Jahre]		75	76	76	76	76	76	76	76	77	77	77
in Paraffin eingebettetes Gewebe	Gehirn	8003 / 15262					14170 / 10018	313114 / 622471	15231 / 5788			22009 / 45838
	Herz	23096 / 18527							8714 / 7594			14194 / 4656
	Lunge	33321 / 0						65409 / 0	98709 / 0			
	Niere	51310 / 35045										
	Leber	12124 / 1227								12355 / 2595		
	Milz	19089 / 7025										
Blut	Pankreas											
	Haut											
	50 ng	49547 / 909	29526 / 559	52478 / 857	51801 / 964				66383 / 995	45411 / 700		
	200 ng	92830 / 3400	40607 / 1806	36501 / 1383	34535 / 1314				16103 / 714	56671 / 2405		
	400 ng	125540 / 6550	53185 / 4000	35403 / 2617	55685 / 4398				30597 / 2514	61874 / 3954		
1000 ng	99420 / 11280	64857 / 8845	36628 / 6291	75434 / 12748				34683 / 5257	57128 / 10843			
MHA	direkt											
	aufg. konz.											
Leichengewebe	Gehirn											
	Muskel											
	Herz											
	Leber											
	Haut											
Haarwurzel	aufg. konz.											

Nr.		260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270
Alter [Jahre]		77	78	78	79	79	79	79	80	80	80	80
in Paraffin eingebettetes Gewebe	Gehirn	18434 / 46954	5761 / 11585					16071 / 29008				
	Herz	15627 / 18614										
	Lunge	98799 / 0	98790 / 0					33131 / 0				
	Niere	10533 / 5389						63297 / 33889				
	Leber		15644 / 2628					37688 / 6558				
	Milz							18337 / 10530				
Blut	Pankreas											
	Haut	29901 / 0										
	50 ng	43212 / 570	55610 / 1235					66072 / 1503				
	200 ng	57795 / 2421	121370 / 5380					120935 / 7170				
	400 ng	110830 / 5480	62426 / 4011					11396 / 750				
1000 ng	51630 / 13590	52940 / 15511					95030 / 24423					
MHA	direkt					93135 / 0	87998 / 0			78987 / 0	13213 / 0	65465 / 0
	aufg. konz.					32131 / 0	76546 / 0			326550 / 26124	168566 / 13991	121811 / 231
Leichengewebe	Gehirn											
	Muskel											
	Herz											
	Leber											
	Haut											
Haarwurzel	aufg. konz.											

Nr.		271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281
Alter [Jahre]		81	81	81	81	81	82	82	82	82	82	82
in Paraffin eingebettetes Gewebe	Gehirn		54442 / 139263	45090 / 0	9554 / 25684	9922 / 31514			42516 / 115516	64326 / 26695	15492 / 56840	4450 / 13441
	Herz				16405 / 20505	15380 / 18122					16534 / 15325	11076 / 11805
	Lunge		32130 / 0	60497 / 27590	99652 / 0	45598 / 23279			96546 / 0	54612 / 0	69489 / 0	17497 / 10109
	Niere		14361 / 5002	17409 / 6206	6307 / 2504							
	Leber			13898 / 0	10500 / 2081	11343 / 1781						33867 / 5698
	Milz					19646 / 5363						6751 / 5387
	Pankreas											
Blut	Haut											69901 / 0
	50 ng											
	200 ng											
	400 ng											
	1000 ng											
MHA	direkt	75785 / 0					44785 / 0	45487 / 0				
	aufg. konz.	93210 / 0					51236 / 0	13980 / 853				
Leichengewebe	Gehirn											
	Muskel											
	Herz											
	Leber											
	Haut											
Haarwurzeln												

Nr.		282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292
Alter [Jahre]		83	83	84	84	84	84	84	84	85	85	85
in Paraffin eingebettetes Gewebe	Gehirn						25258 / 50394	11449 / 41906	121440 / 364927			
	Herz						13069 / 5894	10550 / 11871	9530 / 9978			
	Lunge						98446 / 0	17217 / 5423	987654 / 0			
	Niere						55386 / 20606		49403 / 20978			
	Leber						61467 / 13418					
	Milz											
	Pankreas						14841 / 7695					
Blut	Haut											
	50 ng								32672 / 1558			
	200 ng								69046 / 4944			
	400 ng								34406 / 3139			
	1000 ng								68864 / 8679			
MHA	direkt	39879 / 0	69483 / 0	73131 / 0	59879 / 0	86435 / 0					65465 / 0	37979 / 0
	aufg. konz.	46546 / 0	126130 / 13071	96540 / 0	65468 / 0	23560 / 1319	83516 / 0				31321 / 0	65142 / 0
Leichengewebe	Gehirn										43654 / 0	32165 / 0
	Muskel											
	Herz											
	Leber											
	Haut											
Haarwurzeln												

Nr.		293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303
Alter [Jahre]		85	85	85	85	86	86	86	86	86	86	86
in Paraffin eingebettetes Gewebe	Gehirn				18620 / 23238						31215 / 94301	15531 / 51470
	Herz				19461 / 23684						8101 / 12123	
	Lunge				91230 / 0						16129 / 10298	36460 / 0
	Niere										38928 / 19021	
	Leber											
	Milz											
	Pankreas											
Blut	Haut											
	50 ng				64047 / 2116	29693 / 1949						
	200 ng				47628 / 3970	53995 / 5090						
	400 ng				38266 / 3953	57836 / 6976						
MHA	1000 ng				73041 / 7566	57247 / 9018						
	direkt aufg. konz.	32164 / 0 98788 / 0	35468 / 0 467222 / 50133	12922 / 0 304918 / 115259				84589 / 0 65465 / 0 24121 / 0	75465 / 0 23162 / 0	44654 / 0 226716 / 27206		
Leichengewebe	Gehirn aufg. konz.											
	Muskel aufg. konz.											
	Herz aufg. konz.											
	Leber aufg. konz.											
	Haut aufg. konz.											
Haarwurzel aufg. konz.												

Nr.		304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314
Alter [Jahre]		87	87	87	87	87	87	87	87	88	88	88
in Paraffin eingebettetes Gewebe	Gehirn							14964 / 10475	12948 / 52884			
	Herz							10694 / 5636	17389 / 19969			
	Lunge							12839 / 19323	22043 / 14905			
	Niere											
	Leber											
	Milz											
	Pankreas											
Blut	Haut											
	50 ng	20002 / 332	58381 / 1147	52637 / 1516						60655 / 1829	52053 / 1249	
	200 ng	14196 / 397	54611 / 2685	47709 / 3803						60473 / 2726	38405 / 2759	
	400 ng	52612 / 5131	52600 / 4300	73941 / 6874						33256 / 2819	69546 / 5693	
MHA	1000 ng	40280 / 9800	35493 / 6684	45279 / 8874						24195 / 4457	53889 / 6170	
	direkt aufg. konz.				81115 / 0 75554 / 0 96546 / 0	66518 / 0 3242 / 289	21458 / 0 29570 / 7846				64598 / 0 16549 / 0 99765 / 0	25886 / 0 64128 / 6610
Leichengewebe	Gehirn aufg. konz.										35025 / 63997	
	Muskel aufg. konz.										12948 / 52884	
	Herz aufg. konz.										29400 / 43712	
	Leber aufg. konz.										15090 / 46527	
	Haut aufg. konz.										32177 / 22867	
Haarwurzel aufg. konz.										16071 / 39391		
											77480 / 11157	
											63297 / 33889	
											97986 / 0	
											53151 / 3334	
											65498 / 0	
											89946 / 0	

Nr.		315	316	317	318	319	320	321	322	323	324
Alter [Jahre]		90	90	90	91	91	92	94	94	95	96
in Paraffin eingebettetes Gewebe	Gehirn		8985 / 28185	3760 / 17777							
	Herz		21796 / 34253	31299 / 47042							
	Lunge		18262 / 10354	17619 / 19522							
	Niere										
	Leber										
	Milz										
	Pankreas										
Blut	Haut			76931 / 0							
	50 ng	12507 / 572									
	200 ng	77069 / 8254									
	400 ng	65275 / 11139									
	1000 ng	61460 / 18868									
MHA	direkt aufg.				87911 / 0	49571 / 0	34956 / 0	54218 / 0	54912 / 0	75618 / 0	98495 / 0
	konz.				25655 / 0	3231 / 863	1968 / 183	1125 / 414	2083 / 725	36048 / 12128	2677 / 1558
Leichengewebe	Gehirn aufg. konz.				44454 / 0						
	Muskel aufg. konz.										
	Herz aufg. konz.										
	Leber aufg. konz.										
	Haut aufg. konz.										
	Haarwurzel aufg. konz.										

Tab. 7.3: Tabelle der mittels *GeneScan Analysis 2.0.2* computeranalysierten Rohdaten der getrockneten Blutflecken auf Leinenläppchen. Ermittelt wurde jeweils die Peakfläche (PF) der 142 bp- und 184 bp-Bande neun verschiedener Personen unterschiedlichen Alters (PF_{142 bp}/PF_{184bp}).

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
28 J.	65479 / 0								
39 J.		34669 / 0							
43 J.						13169 / 40			
46 J.						66791 / 601			
47 J.			98743 / 0						
48 J.			65465 / 262						
49 J.			22198 / 0						
50 J.							68761 / 0		
51 J.			54654 / 820	33697 / 0	69352 / 2913		87168 / 262		
52 J.						26816 / 268			
53 J.				46875 / 0					
55 J.								54693 / 0	
56 J.								93494 / 935	
57 J.								89763 / 1077	
59 J.								31654 / 475	

Abkürzungsverzeichnis

ρ	Spearman'scher Rangkorrelationskoeffizient
A	Adenin oder Ampere
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
B	Bruchstelle
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CCD	Charge Couplet Device
CPEO	Chronische-progressive, externen Ophthalmoplegie
ddNTPs	2',3'-Didesoxyribonukleotidtriphosphate
dest.	destilliert
D-Loop	Displacement-Loop
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	2'-Desoxyribonukleotidtriphosphate
DR	direct repeat
ds	doppelsträngig
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EL	Erythrozyten-Lysis-Puffer
et al.	et altera (lat. und andere)
fw	forward
G	Guanin
g	Fallbeschleunigung
H	H-Strang der mitochondrialen DNA
h	Stunde
kb	Kilobasen (DNA-Länge)
KSS	Kearns-Sayre-Syndrom
L	L-Strang der mitochondrialen DNA
Lj.	Lebensjahr
M.	Musculus
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MSA(s)	Mundschleimhautabstrich(e)
min	Minute
mtDNA	mitochondriale DNA

n	Nano-
OD	optische Dichte
OXPPOS	oxidatives Phosphorylierungssystem
p	Pico-
p. a.	per analysi
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte („buffered“) Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PER	Ammoniumperoxodisulfat
PF	Peakfläche
POP	Performance Optimized Polymer
r	Korrelationskoeffizient
rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natrium(„Sodium“)dodecylsulfat
T	Thymin
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TEN	Tris-EDTA-NaCl-Puffer
T _m	Schmelztemperatur der Primer
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminoethan
tRNA	transfer-RNA
TRR	Terminator Ready Reaction Kit
TSR	Template Suppression Reagent
UV	Ultraviolett
V	Volt
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 a-h: Die britische Königinmutter, Queen Mother Elizabeth, geboren am 04.08.1900, im Alter von <i>a</i> 2, <i>b</i> 9, <i>c</i> 23, <i>d</i> 37, <i>e</i> 46, <i>f</i> 60, <i>g</i> 80 und <i>h</i> 100 Jahren	2
Abb. 1.2: Schematische Darstellung des Replikationsproblems am DNA-Ende.....	3
Abb. 1.3 a-d: Röntgenaufnahme der Mittelhandknochen <i>a</i> eines 1 ½-jährigen, <i>b</i> eines 4-jährigen, <i>c</i> eines 14-jährigen Jungen und <i>d</i> eines männlichen Erwachsenen. An der Hand ist die Entwicklung der Knochenreife durch Beurteilung des Verknöcherungsgrades wegen der großen Anzahl knöcherner Strukturen mit Hilfe einer Röntgenuntersuchung leicht zu erfassen	8
Abb. 1.4: Altersbestimmung anhand der „Gustafson-Methode“ durch Untersuchung von Zahnveränderungen einer 12-, 32-, 58- und 67-jährigen Person (A = Abkauung, S = Sekundärdentin, P = Parodontose, C = Zementanlagerung, R = Wurzelresorption).....	8
Abb. 1.5 a,b: Aufbau eines Mitochondriums. <i>a</i> Elektronenmikroskopische Aufnahme und <i>b</i> Schematische Darstellung.....	11
Abb. 1.6: Genkarte des menschlichen mitochondrialen Genoms.....	12
Abb. 1.7: Mitochondriale Alterstheorie.....	13
Abb. 1.8 a,b: Lage der 4.977 bp-Deletion in mitochondrialer DNA. <i>a</i> Darstellung der Nukleotidsequenz mit den die 4.977 bp-Deletion flankierenden identischen 13 bp-DNA-Sequenzen (<i>direct repeats</i>) und <i>b</i> der zirkulären mtDNA mit und ohne die 4.977 bp-Deletion. Dargestellt ist zusätzlich die DNA-Sequenz um die Fusionsstelle in deletierter mtDNA.....	16
Abb. 1.9 a-c: Darstellung des hypothetischen slipped mispairing-Replikations-Modells zur Entstehung der mitochondrialen 4.977 bp-Deletion in mitochondrialer DNA. <i>a</i> Aufgabelung der Stränge <i>b</i> Anlagerung von DR 1 des H-Stranges an DR 2 des L-Stranges <i>c</i> Entstehung von normaler und deletierter mtDNA.....	17
Abb. 2.1: Schematische Darstellung der DNA-Extraktion aus formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe mittels Mikrowellen-Behandlung	24
Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Aufreinigung von Chelex-100-Extrakten mittels Diatomeen und Guanidinthiocyanat-Puffer	27
Abb. 2.3: Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Vervielfältigung der DNA-Zielsequenz.....	29
Abb. 2.4: Schematische Präsentation der Primer-Positionen für die Koamplifikation in normaler und deletierter linear dargestellter mtDNA. Die zwei entstehenden PCR-Produkte liegen zwischen nt 9.500-9.641 und nt 8.370-13.530. Das Primerpaar In fw/rev amplifiziert lediglich die normale mtDNA, da in deletierter mtDNA diese Region verlorengegangen ist. Es entsteht ein 142 bp-Fragment. Das Primerpaar Out fw/rev amplifiziert hingegen lediglich die deletierte mtDNA. So entsteht ein 184 bp-Fragment.....	32
Abb. 3.1 a,b: Optimierung der PCR-Bedingungen: <i>a</i> der Hybridisierungstemperatur und <i>b</i> der MgCl ₂ -Konzentration. Im Polyacrylamidgel wurde die 180 bp-Bande, stellvertretend für die oft nur in geringen Mengen vorkommende deletierte mtDNA, beurteilt. Als optimal erwies sich eine Hybridisierungstemperatur von 62 °C und eine MgCl ₂ -Konzentration von 5 mM.....	43

- Abb. 3.2 a,b:** Sequenzierungsergebnis einer formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gehirngewebe-Probe zur Überprüfung der Richtigkeit der amplifizierten Fragmente. *a* Dargestellt ist das 142 bp-Fragment, erhalten durch das Primerpaar In fw/rev, stellvertretend für die normale mtDNA, und *b* das 184 bp-Fragment, erhalten durch das Primerpaar Out fw/rev, stellvertretend für die deletierte mtDNA. 44
- Abb. 3.3:** Darstellung der erfolgreichen Amplifikation aus einem Multiplex-Ansatz im Polyacrylamidgel für formalinfixiertes, in Paraffin eingebettetes Gewebe, Blut, Mundschleimhautabstriche und frisches Gewebe. Die 142 bp-Bande gibt den Anteil der normalen, die 184 bp-Bande den Anteil der deletierten mtDNA wieder 45
- Abb. 3.4 a,b:** Ergebnis der Computeranalyse nach Auftrennung der Amplifikationsprodukte in der Kapillarelektrophorese. Gezeigt werden die 142 bp- und 184 bp-Fragmente (zugeordnete Bandengröße 136 bp und 180 bp), die zugehörigen Peakflächen (Peak Area) und die daraus errechneten Quotienten I_{Del}/I_{Norm} *a* einer Probe mit geringem und *b* mit erheblichem Anteil an 4.977 bp-deletierter mtDNA 45
- Abb. 3.5:** Aufgliederung der 263 formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebeproben von Personen im Alter von 1 bis 90 Jahren in die unterschiedlichen Gewebearten Gehirn, Lunge, Herz, Leber, Niere, Milz und Haut 47
- Abb. 3.6 a-f:** Scatterdiagramme der Quotienten I_{Del}/I_{Norm} *a* für formalinfixiertes, in Paraffin eingebettetes Gehirn-, *b* Herz-, *c* Lungen, *d* Milz-, *e* Nieren- und *f* Lebergewebe in Abhängigkeit des Alters. Dargestellt ist der quantifizierte Anteil der deletierten mtDNA oberhalb der Nachweisgrenze sowie die Proben ohne nachweisbaren Deletionsanteil. In *a* ist zusätzlich eine Trendlinie eingezeichnet 48
- Abb. 3.7 a-f:** Produkt-Moment-Korrelation der logarithmierten Quotienten I_{Del}/I_{Norm} für die Gewebearten *a* Gehirn, *b* Herz, *c* Lunge, *d* Milz, *e* Niere und *f* Leber in Abhängigkeit des Alters. Aufgeführt sind die Proben mit quantifizierbarem Deletionsanteil. Eingezeichnet sind die Regressionsgerade und der 95 %ige Vertrauensbereich für Mittelwerte und für Einzelwerte 50
- Abb. 3.8 a-d:** Scatterdiagramme der Quotienten I_{Del}/I_{Norm} für venöses Vollblut in den DNA-Konzentrationen von *a* 2 ng/μl, *b* 8 ng/μl, *c* 16 ng/μl und *d* 40 ng/μl. Dargestellt ist der quantifizierte Anteil der deletierten mtDNA oberhalb der Nachweisgrenze sowie die Proben ohne nachweisbaren Deletionsanteil. Zusätzlich sind Trendlinien eingezeichnet 51
- Abb. 3.9 a-c:** Korrelationsdarstellung der verschiedenen zur Amplifizierung eingesetzten DNA-Konzentrationen miteinander: *a* 2 ng/μl mit 8 ng/μl, *b* 8 ng/μl mit 16 ng/μl und *c* 16 ng/μl mit 40 ng/μl. Dargestellt werden konnte so die Zunahme des Quotienten I_{Del}/I_{Norm} in den einzelnen Blutproben mit steigender DNA-Konzentration ... 52
- Abb. 3.10 a-d:** Produkt-Moment-Korrelation der logarithmierten Quotienten I_{Del}/I_{Norm} für Vollblut in den DNA-Konzentrationen von: *a* 2 ng/μl, *b* 8 ng/μl, *c* 16 ng/μl und *d* 40 ng/μl in Abhängigkeit des Alters. Aufgeführt sind die Proben mit quantifizierbarem Deletionsanteil. Eingezeichnet sind die Regressionsgerade und der 95 %ige Vertrauensbereich für Mittelwerte und für Einzelwerte 53
- Abb. 3.11:** Scatterdiagramm der Quotienten I_{Del}/I_{Norm} für Chelex-100/Diatomeenaufgereinigte Mundschleimhautabstriche in Abhängigkeit des Alters. Dargestellt ist der quantifizierte Anteil der deletierten mtDNA oberhalb der Nachweisgrenze sowie die Proben ohne nachweisbaren Deletionsanteil. Zusätzlich ist eine Trendlinie eingezeichnet 56

- Abb. 3.12:** Produkt-Moment-Korrelation der logarithmierten Quotienten I_{Del}/I_{Norm} für Chelex-100/Diatomeen-aufgereinigte Mundschleimhautabstriche in Abhängigkeit des Alters. Aufgeführt sind die Proben mit quantifizierbarem Deletionsanteil. Ein-gezeichnet sind die Regressionsgerade und der 95 %ige Vertrauensbereich für Mittelwerte und für Einzelwerte **56**
- Abb. 3.13:** Darstellung der Zunahme des Quotienten I_{Del}/I_{Norm} in den einzelnen Mundschleimhautabstrichen nach DNA-Konzentrierung der Chelex-100/Diatomeen-aufgereinigten Proben mittels der Korrelationsdarstellung **57**
- Abb. 3.14:** Gegenüberstellung der formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebearten Gehirn, Herz, Milz, Niere, Leber und Lunge in ihrer altersabhängigen An-häufung der 4.977 bp-Deletion. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabwei-chung für die jeweilige Gewebeart in drei Altersgruppen von ≤ 30 Jahren, ≤ 75 Jahren und ≤ 90 Jahren **59**
- Abb. 3.15:** Darstellung der Quotienten I_{Del}/I_{Norm} aus den Geweben Gehirn, Skelettmusku-latur, Herz, Leber, Haut und aus venösem Vollblut der vier Leichen im Alter von 23, 27, 39 und 88 Jahren **60**
- Abb. 3.16:** Darstellung der Quotienten I_{Del}/I_{Norm} aus den Geweben Gehirn, Skelettmusku-latur, Herz, Leber und Haut der vier Leichen im Alter von 23, 27, 39 und 88 Jahren nach zusätzlicher DNA-Konzentrierung der Chelex-100/Diatomeen-aufgereinigten Gewebeprobe **60**
- Abb. 3.17 a-c:** Perzentilenkurven der logarithmierten Quotienten I_{Del}/I_{Norm} *a* für formalin-fixiertes, in Paraffin eingebettetes Gehirngewebe, *b* für venöses Vollblut einer DNA-Konzentration von 40 ng/ μ l und *c* für Chelex-100/Diatomeen-aufreini-gte Mundschleimhautabstriche **62**
- Abb. 4.1 a,b:** Abhängigkeit der amplifizierten DNA-Menge von der Zykluszahl und der zugrundeliegenden DNA-Konzentration. Dargestellt sind zusätzlich die Ergebnisse der Kapillarelektrophorese bei einer Anzahl von 35 Zyklen *a* für eine untersuchte Probe mit geringer und *b* einer mit großer in die PCR eingesetzter DNA-Menge **80**

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Oligonukleotidprimer für die PCR und die Sequenzierung	22
Tab. 3.1: Erhaltene DNA-Mengen aus formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe und venösem Vollblut nach der jeweiligen Extraktionsmethode. Aufgeführt sind die Anzahl der untersuchten Proben (n), der minimale und maximale sowie der durchschnittliche DNA-Ertrag, jeweils ermittelt durch die DNA-Quantifizierung im UV-Spektralphotometer	42
Tab. 3.2: Spearman'scher Rangkorrelations-Test für formalinfixiertes, in Paraffin eingebettetes Gehirn-, Herz-, Lungen-, Milz-, Nieren- und Lebergewebe, für Blut in den DNA-Konzentrationen von 2-40 ng/µl und für Mundschleimhautabstriche (y) mit dem Lebensalter (x)	46
Tab. 3.3: Spearman'scher Rangkorrelations-Test der aufsteigenden Blut-DNA-Konzentrationen. Die Zunahme des Quotienten I_{Del}/I_{Norm} von einer DNA-Stufe auf die nächste wird durch den Steigungsfaktor ausgedrückt.....	54
Tab. 3.4: Zunahme der Quotienten I_{Del}/I_{Norm} aus dem Blut neun verschiedener Personen über einen maximalen Zeitraum von 12 Jahren. Zur Verfügung standen maximal 12,8 ng/µl DNA aus getrockneten Blutflecken auf Leinenläppchen und Vergleichs-DNA aus venösem Vollblut in DNA-Konzentrationen von 8 und 16 ng/µl.....	55
Tab. 3.5: Spearman'scher Rangkorrelations-Test der Chelex-100/Diatomeen-aufgereinigten Mundschleimhautabstriche nach zusätzlicher DNA-Konzentrierung. Die Zunahme der Quotienten I_{Del}/I_{Norm} wird durch den Steigungsfaktor ausgedrückt	57
Tab. 3.6: Wilcoxon-Test zum Vergleich der verschiedenen formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebe aus Gehirn, Herz, Milz, Niere, Leber und Lunge. Der Vergleich wird durch das Mittel ermöglicht.....	58
Tab. 3.7: Spearman'scher Rangkorrelations-Test der Chelex-100/Diatomeen-aufgereinigten Leichengewebe Gehirn, Skelettmuskulatur, Herz und Leber nach DNA-Konzentrierung. Die Zunahme des Quotienten I_{Del}/I_{Norm} wird durch den Steigungsfaktor ausgedrückt.....	61
Tab. 3.8: Tabelle der approximierten 5 %-, 10 %-, 50 %-, 90 %- und 95 %-Perzentilen des Quotienten I_{Del}/I_{Norm} aus formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gehirngewebe von Personen im Alter von 17 bis 90 Jahren	63
Tab. 3.9: Tabelle der approximierten 5 %-, 10 %-, 50 %-, 90 %- und 95 %-Perzentilen des Quotienten I_{Del}/I_{Norm} aus Blut (40 ng/µl) von Personen im Alter von 25 bis 90 Jahren....	64
Tab. 3.10: Tabelle der approximierten 5 %-, 10 %-, 50 %-, 90 %- und 95 %-Perzentilen des Quotienten I_{Del}/I_{Norm} aus Mundschleimhautabstrichen von Personen im Alter von 63 bis 96 Jahren	64
Tab. 7.1: Lokalisierung der Gene des H- und L-Strangs im mitochondrialen Genom.....	97
Tab. 7.2: Tabelle der mittels <i>GeneScan Analysis 2.0.2</i> computeranalysierten Rohdaten aller in dieser Arbeit untersuchten biologischen Materialien. Ermittelt wurde die Peakfläche (PF) der 142 bp- und 184 bp-Bande (PF_{142bp}/PF_{184bp}).....	98
Tab. 7.3: Tabelle der mittels <i>GeneScan Analysis 2.0.2</i> computeranalysierten Rohdaten der getrockneten Blutflecken auf Leinenläppchen. Ermittelt wurde die Peakfläche (PF) der 142 bp- und 184 bp-Bande (PF_{142bp}/PF_{184bp})	111

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater *Herrn Prof. Dr. med. D. Patzelt* für die Vermittlung des Themas und die Bereitstellung des Laborplatzes mit allen erforderlichen Materialien und Untersuchungsgeräten sowie für das Interesse und die Anteilnahme an meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. T. Grimm danke ich sehr für die freundliche Übernahme des Ko-referates.

Herrn Dipl. Biol. S. Jung danke ich für seine geduldige Anleitung und Ratschläge bei der Organisation und Durchführung der experimentellen Arbeiten.

Bei den Mitarbeiterinnen des rechtsmedizinischen Instituts, *C. Laudенbacher, G. Hinkelmann, C. Schuldenzucker* und *T. Schantura*, bedanke ich mich für die fürsorgliche Betreuung und tatkräftige Unterstützung, mit der sie mir bei den experimentellen Arbeiten zu jeder Zeit zuverlässig zur Seite standen. Auch vielen Dank für die lustigen Stunden nicht nur im Labor.

Auch bin ich *allen eifrigen Organisatoren* und *Spendern von biologischen Proben* für ihre Hilfsbereitschaft zu großem Dank verpflichtet.

Frau Haubitz und der *Fa. Grund EDV-Systeme in Margetshöchheim* danke ich für die statistische Beratung.

Bei *Frau C. Fries* und *Frau C. Laudенbacher* bedanke ich mich für das zeitaufwendige Korrekturlesen und ihre sehr wertvollen Tipps zur sprachlichen Gestaltung der Arbeit.

Ganz besonders danken möchte ich auch *Herrn Dr. rer. nat. S. Günther* für seine wissenschaftliche Diskussionsbereitschaft und seine wertvollen Anregungen zur Fertigstellung dieser Arbeit, sowie *Frau B. Vollmer* für ihre stets selbstlose Hilfe in „Computer-Fragen“ und ihre Unterstützung und Aufmunterung in Vielem mehr.

Zuletzt möchte ich mich bei *meiner ganzen Familie* bedanken, die ich zu jeder Zeit und in jeder Situation hinter mir weiß.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name Silke Polzin
Geburtsdatum/-ort 04.09.1974 in Würzburg
Familienstand ledig

Schulbildung

09/1981 - 07/1985 Grundschule Höchberg/Hexenbruch
09/1985 - 07/1994 St.-Ursula-Gymnasium Würzburg
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,2)

Hochschulausbildung

11/1994 - 6/2001 Studium der Humanmedizin an der Universität Würzburg (Note: 1,99)
09/1996 *Ärztliche Vorprüfung*
Mündliche Prüfung: Physiologie/Biochemie
03/1997 - 04/1997 Famulatur: Chirurgie-Unfallchirurgie/Kreis Krankenhaus Marktheidenfeld
08/1997 *Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung*
10/1997 - 11/1997 Famulatur: Anaesthesiologie in der Orthopädie/Universitätsklinik Würzburg
04/1998 - 05/1998 Famulatur: Plastische-, Wiederherstellungschirurgie, Klinikum Offenburg
09/1999 *Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung*
Mündliche Prüfung: Innere Medizin/Radiologie
09/1998 - 10/1998 Famulatur: Rechtsmedizin/Institut für Rechtsmedizin Universität Würzburg
10/1998 Famulatur: Autopsie-Pathologie/Pathologisches Institut, Universität Würzburg
04/2000 - 03/2001 *Praktisches Jahr mit den Fächern:*
Pathologie (Pathologisches Institut der Universität Würzburg)
Chirurgie (Universitätsklinik Würzburg)
Innere Medizin (Universitätsklinik Würzburg)
05/2001 *Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung* (4. Fach: Pharmakologie)
06/2001 Erwerb der Teilapprobation im Fach Humanmedizin
09/2001 Beginn der *ÄiP-Tätigkeit* im Pathologischen Institut der Universität Würzburg bei Prof. Dr. med. H. K. Müller-Hermelink

Promotion

10/1998 Beginn der Dissertation unter der Leitung von Prof. Dr. med. D. Patzelt am Institut für Rechtsmedizin der Universität Würzburg
10/1999 - 03/2000 Ganztägiges wissenschaftliches Arbeiten im Bereich der Molekularbiologie am Institut für Rechtsmedizin der Universität Würzburg im Rahmen der Doktorarbeit

Sonstige Kenntnisse

Sprachen Latein, Französisch im Rahmen der Schulbildung
Englisch in Wort und Schrift
EDV MS-Office-Software, Corel DRAW, Corel PHOTO-PAINT, SPSS

Würzburg, den 04.10.2001