

---

# **Studien zum mRNA profiling an humanem postmortalem Gewebe**

Dissertation zu Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Dipl. Biol. Antje Huth (geb. Koppelkamm)

Freiburg, im Mai 2012

---

---

---

---

---

---

---

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: PD Dr. rer. nat. Dipl.-Biol. Sabine Lutz-Bonengel  
Institut für Rechtsmedizin  
Abteilung Forensische Molekularbiologie  
Universität Freiburg

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Dipl.-Biol. Georg Krohne  
Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie  
Universität Würzburg

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

---

---

gewidmet

Meinen Eltern

Petra und Günter Koppelkamm

und meinen Großeltern

Helga und Siegfried Renner

---

---

---

---

---

---

---

Unsere Wünsche sind die Vorboten der Fähigkeiten, die in uns liegen.

Johann Wolfgang von Goethe

---

---

---

# Inhalt

Abkürzungen.....	4
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>7</b>
1.1 Ribonukleinsäuren.....	7
1.2 Regulation der Genexpression auf RNA-Ebene.....	8
1.3 Analyse der Genexpression im forensischen Kontext.....	10
1.4 Stabilität von Ribonukleinsäuren.....	12
1.4.1 RNA Stabilität in der Zelle.....	13
1.4.2 Stabilität von mRNA in forensisch relevantem Spurenmaterial.....	14
1.4.3 Stabilität von mRNA in postmortalem Gewebe.....	14
1.5 Genexpressionsstudien an humanem Material.....	17
1.5.1 Biologische und technische Replikate.....	18
1.5.2 RNA Integrität.....	20
1.6 Datennormalisierung.....	23
1.6.1 Normalisierung gegen die eingesetzte Gewebemenge.....	24
1.6.2 Normalisierung gegen den DNA-Gehalt einer Probe.....	24
1.6.3 Normalisierung gegen den RNA-Gehalt einer Probe.....	25
1.6.4 Normalisierung gegen eine externe Kontrolle.....	25
1.6.5 Normalisierung gegen endogene Kontrollgene.....	26
1.7 Validierung endogener Kontrollgene.....	29
1.8 Datenauswertung und -interpretation.....	30
1.8.1 Datenanalyse nach dem $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Algorithmus.....	30
1.8.2 Softwaregesteuerte Datenanalyse unter Einbeziehung der wahren PCR-Effizienz.....	31
1.9 Genexpression nach Hypoxie.....	33
1.9.1 Hypoxie.....	33
1.9.2 HIF-1 $\alpha$ , VEGF und SLC2A1.....	34
1.10 Ziele der Arbeit.....	37
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>39</b>
2.1 Material.....	39
2.1.1 Reagenzien.....	39
2.1.2 Fertige Reaktionssysteme (Kits).....	40
2.1.3 Geräte.....	41
2.1.4 Verbrauchsmaterialien.....	42
2.1.5 Lösungen.....	42
2.1.6 Enzyme.....	43
2.1.7 Gewebeproben.....	43
2.2 Methoden.....	44
2.2.1 Anforderungen an die Arbeit mit RNA.....	45
2.2.2 RNA-Extraktion mittels Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol.....	46
2.2.3 Entfernen genomischer DNA mittels DNase.....	47
2.2.4 Aufreinigung von RNA-Extrakten.....	48
2.2.5 Quantifizierung der Gesamt-RNA.....	49
2.2.6 Messen der RNA-Integrität.....	50
2.2.7 Reverse Transkription.....	50

2.2.8	Quantitative Real-time PCR.....	51
2.2.9	Berechnung der Expressionsstabilität.....	54
2.2.10	qBase – Ermitteln der Expressionsunterschiede .....	57
2.2.11	Statistische Auswertung und Darstellung .....	57
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>58</b>
3.1	RNA-Integrität an postmortalen Gewebeproben .....	58
3.1.1	Probenaufbereitung und Qualitätskontrolle.....	58
3.1.2	Einfluss verschiedener Parameter auf die RNA-Integrität.....	60
3.2	Stabilität endogener Kontrollgene in postmortalen Gewebeproben .....	68
3.2.1	Probenaufbereitung und Qualitätskontrolle.....	68
3.2.2	Stabilität der Kontrollgene.....	72
3.2.3	Einfluss verschiedener Parameter auf das Transkriptlevel instabiler Gene .....	75
3.3	Einfluss der RNA-Integrität auf quantitative Genexpressionsanalysen.....	86
3.3.1	Gezielte Degradierung kommerziell bezogener RNA.....	86
3.3.2	Datennormalisierung bei verminderter RNA-Qualität .....	92
3.4	Einfluss der Todesursache auf die Expression von HIF-1 $\alpha$ , VEGF und SLC2A1 .....	94
3.4.1	RNA-Extraktion, RNA-Qualitätskontrolle und Transkriptquantifizierung	94
3.4.2	Datennormalisierung gegen vier validierte stabile Kontrollgene .....	106
3.4.3	Datennormalisierung gegen ein einzelnes Kontrollgen .....	109
3.4.4	Transkriptstabilität von GAPDH, HMBS, UBC, SDHA und B2M .....	112
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>114</b>
4.1	Vom RNA-Extrakt zum quantifizierten Gentranskript.....	114
4.1.1	Beurteilung der RNA-Quantität und Reinheit .....	114
4.1.2	Reverse Transkription.....	116
4.1.3	Beurteilung der RNA-Integrität.....	116
4.1.4	Quantitative Real-Time PCR.....	117
4.1.5	Resümee .....	120
4.2	RNA-Integrität in postmortalen Gewebeproben.....	121
4.2.1	Einfluss verschiedener Parameter auf die RNA-Integrität.....	121
4.2.2	Resümee der Teilstudie .....	132
4.3	Transkriptstabilität endogener Kontrollgene .....	133
4.3.1	Stabile Kontrollgene in postmortalem Gewebe .....	134
4.3.2	Mindestanzahl endogener Kontrollgene.....	135
4.3.3	Einfluss verschiedener Parameter auf das Transkriptlevel instabiler Gene .....	138
4.3.4	Resümee der Teilstudie .....	144
4.4	Einfluss der RNA-Integrität auf das Ergebnis der quantitativen Analyse..	145
4.4.1	RIN und C <sub>q</sub> -Verschiebung in RNA-Degradierungslinien .....	145
4.4.2	Einfluss der Datennormalisierung auf den Zusammenhang zwischen Integrität und quantitativen Genexpressionsdaten .....	148
4.4.3	Resümee der Teilstudie .....	151
4.5	Einfluss der Normalisierungsstrategie am Beispiel der Expression von HIF-1 $\alpha$ , VEGF und SLC2A1 .....	152
4.5.1	Vier versus eins: Die Folgen der gewählten Normalisierungsstrategie	155
4.5.1	Resümee der Teilstudie .....	161



---

5	<b>Zusammenfassung</b> .....	163
6	<b>Summary</b> .....	165
7	<b>Verzeichnis der wissenschaftlichen Veröffentlichungen</b> .....	167
8	<b>Anhang</b> .....	168
8.1	Datenerhebungsbogen.....	168
8.2	Individuen Übersicht.....	169
8.3	Ergebnisse aus einer Vorstudie.....	173
8.4	Ergebnisse von zusätzlichen Proben für die RIN-Studie.....	175
8.5	PMI versus RNA-Quantität.....	176
8.6	Literatur.....	179
9	<b>Danksagung</b> .....	199
10	<b>Erklärung</b> .....	201

---

## Abkürzungen

$\Delta$	delta
°C	Grad Celsius
$\mu\text{L}$	Mikroliter
<	kleiner als
>	größer als
%	Prozent
ACTB	Beta-Aktin
AFS-System	agonal factor score system
ARE	adenine rich element
asRNA	antisense RNA
B2M	Beta-2-microglobulin
BMI	Body Mass Index
bp	Basenpaare
BTM	Betäubungsmittel
bzw.	beziehungsweise
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cDNA	komplementäre DNA
CNQ	kalibrierte normalisierte Quantität
CNRQ	kalibrierte normalisierte relative Quantität
COHb	Carboxyhämoglobin
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CYCA	Cyclophilin A
C <sub>q</sub> -Wert	Cycle of quantification
DEPC-H <sub>2</sub> O	Diethylpyrocarbonat-Wasser
dNTP	Desoxy-Nukleotid-Triphosphat
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
evtl.	eventuell
EPO	Erythropoietin
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
g	gravity
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
ges	Gesamt
GLUT1	Glukosetransporter 1
h	Stunde
HBB	Hämoglobin Beta
HIF-1 $\alpha$	Hypoxie-induzierender Faktor 1 $\alpha$

H <sub>2</sub> O	Wasser
HMBS	Hydroxymethylbilansynthase
HPLC	high performance liquid chromatography
HPRT	Hypoxanthinguaninphosphoribosyltransferase
HRE	hypoxia response element
HW	Halswirbel
IEG	Immediately early Gene
k.A.	keine Angabe
l	Körperlänge / Körpergröße
LK	Leerkontrolle
mL	Milliliter
m	Molar
M	gene stability measure
M.	Musculus
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
miRNA	Micro RNA
Min	Minute
MMP7	Matrix-Metalloproteinase 7
mRNA	Messenger-RNA
NaAc	Natriumacetat
nm	Nanometer
NMD	nonsense-mediated decay
NF	Normalisierungsfaktor
n.m.	nicht messbar
NQ	Normalisierte Quantität
OD	optische Dichte
P-Bodies	processing bodies
PCR	polymerase chain reaction
pH	pH-Wert
piRNA	piwi interacting RNA
p.m.	post mortem
RIN	RNA Integritätsnummer
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RNase	Ribonuklease
Rpm	rounds per minute
RQI	RNA Qualitätsindex
RQ	Relative Quantität
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	reverse transcription quantitative real-time PCR
PMI	postmortales Intervall

---

qPCR	quantitative Real-time PCR
PRM	Protamin
s	Sekunde
SA	Standardabweichung
SDHA	Succinatdehydrogenase (Untereinheit A)
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
siRNA	short interfering RNA
SLC2A1	Bezeichnet das Gen des Glukose Transporters 1 (GLUT1)
snRNA	small nuclear RNA
snoRNA	small nucleolar RNA
SOD1	superoxide dismutase 1
TBP	TATAbox-binding protein
TH	Tyrosinhydroxylase 1
TRIS	2-amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol
tRNA	transfer RNA
UBC	Ubiquitin C
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
VEGF	vasculärer endothelialer Wachstumsfaktor
V	paarweise Variation
VHL-Protein	von Hippel-Lindau-Protein
WHO	World-Health-Organisation

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Ribonukleinsäuren

Die Analyse der Genexpression sowie der Regulierung dieses Prozesses ist seit vielen Jahren ein wichtiges Werkzeug bei der Untersuchung zellulärer Funktionen. Grundlage dafür ist die im Karyoplasma stattfindende Transkription der genomischen Desoxyribonukleinsäure (DNA) in eine Boten-Ribonukleinsäure (RNA). Das aus diesem Prozess resultierende Transkript wird zunächst als heterogene nukleäre RNA oder prä-messenger RNA (prä-mRNA) bezeichnet. Diese prä-mRNA reift durch Polyadenylierung am 3'-Ende und Capping am 5'-Ende sowie durch die Entfernung der noch im Transkript enthaltenen, nichtkodierenden Introns. Letzteres wird als *Splicing* bezeichnet. Das Capping-Enzym hängt demnach einen modifizierten Guanosin-Rest (7-Methylguanosin) als Methylgruppendonator an das 5'-Ende der prä-mRNA (5'-cap). Das 3'-Ende wird von einer Exonuklease gespalten, bevor der aus bis zu 200 Adenosinresten bestehende Poly-A-Schwanz annektiert wird [Wahle und Keller 1996]. Beide Modifikationen schützen die mRNA vor einem schnellen Abbau durch zelluläre Nukleasen. Das mRNA-Splicing geschieht mit Hilfe der so genannten small nuclear RNA (snRNA) [Egloff 2008], die gekoppelt an Proteine das Splicisom bildet [Wahl 2009, Staley 2009]. Schließlich wird die sog. mature mRNA, die einen Anteil von etwa 1-5 % an der Gesamt-RNA ausmacht, vom Zellkern ins Zytoplasma hin zum Ribosom transportiert. Gemäß dem genetischen Code werden dort die Basentriplets der mRNA im Prozess der Translation nacheinander mit den komplementären, nichtkodierenden transfer-RNAs (tRNA) [Rich 1978, Björk 1987] verbunden. Letztere sind am Ende mit der dem Codon entsprechenden Aminosäure gekoppelt. Die Aminosäuren benachbarter tRNAs können durch Peptidbindungen miteinander verknüpft werden. Nach Entfernen der tRNA entstehen in der Folge Aminosäureketten, die sich schließlich zum Protein falten können.

Neben der tRNA gibt es weitere Gruppen von nichtkodierenden RNA-Molekülen. Dazu gehört die sogenannte ribosomale RNA (rRNA) [Noller 1991]. Diese RNA-Klasse hat einen Anteil von ca. 80-85 % an der Gesamt-RNA. Mit einer Größe von bis zu 5000 Nukleotiden ist die rRNA gemeinsam mit der small nucleolar RNA (snoRNA) [Lafontaine 1998, Terns 2002, Dieci 2009] und den ribosomalen Proteinen am Aufbau sowie an der enzymatischen Aktivität der Ribosomen beteiligt [Ramakrishnan 2002].

Kleine RNAs oder small RNAs bezeichnen eine Gruppe von nichtkodierenden RNAs, die eine Länge von etwa 21 bis 28 Nukleotiden aufweisen. Dazu gehören unter anderem die sog. micro RNAs (miRNAs) und small interfering RNAs (siRNA). Sie erfüllen unterschiedliche Funktionen bei der Aufrechterhaltung und Regulierung von zellulären Prozessen [Elbashir 2001, He 2004, Iorio 2009]. Die sog. piwi interacting RNA (piRNA) findet sich ausschließlich in Geschlechtszellen. Mit einer Länge von 26 bis 31 Nukleotiden spielt diese RNA-Klasse eine essentielle Rolle bei der Regulation der Teilungsrate von Keimzellen bei der Spermatogenese [Grivna 2006, Lau 2006]. Die genannten RNA-Familien sind in Tabelle 1.1 zusammenfassend aufgeführt.

Tabelle 1.1: Funktionen und Halbwertszeiten verschiedener RNA-Familien

RNA-Familie	Abkürzung	Funktion	Halbwertszeit
Messenger RNA	mRNA	Template für die Translation	Minuten /Tage
Small nuclear RNA	snRNA	mRNA splicing	Tage
Transfer RNA	tRNA	Transport von Aminosäuren	Tage
Ribosomale RNA	rRNA	Struktur der Ribosomen	Tage
Small nucleolar RNA	snoRNA	Chemische Modifikation von tRNA, rRNA und snRNA	Tage
Micro RNA	miRNA	Gen-Regulation / Gen-silencing	Tage bis Wochen
Small interfering RNA	siRNA	Gen-Regulation / RNA-Interferenz	Tage bis Wochen
Piwi interacting RNA	piRNA	Gen-Regulation / Spermatogenese	Tage bis Wochen

## 1.2 Regulation der Genexpression auf RNA-Ebene

Eine mRNA kann im Laufe der Proteinsynthese mehrfach abgelesen werden, wobei die unkontrollierte Anreicherung des Protein-Produkts verhindert wird, indem die mRNA nach einer bestimmten Zeitdauer durch Nukleasen wieder in einzelne Ribonukleotide zerlegt wird [Eulalio 2007, Parker 2007]. Somit sind die Prozesse von mRNA Translation und mRNA Abbau eng miteinander verknüpft [Wilusz 2001].

Die Bildung der sogenannten antisense RNA (asRNA) ist eine natürliche Möglichkeit, die Expression eines Gens zu regulieren. asRNA entsteht, wenn bei der Transkription neben dem Matrizen-DNA-Strang auch der komplementäre DNA Strang abgelesen wird. Paaren sich die Basen der asRNA mit den Basen der komplementären mRNA, dann kann die Translation der jeweiligen mRNA inhibiert werden [Faghihi 2010, Werner 2010].

Die so genannten RNA-Schalter, eine weitere Möglichkeit zur Regulierung der Genexpression, befinden sich im 5' untranslatierten Bereich und können zwei sich gegenseitig ausschließende Konformationen einnehmen. Die Information über sich ändernde zelluläre Bedingungen wird meist durch Effektormoleküle übermittelt. Dazu gehören Sensorproteine, RNA-Moleküle (z.B. unbeladene tRNA-Moleküle) oder Stoffwechselzwischenprodukte [Winkler und Breaker 2005]. Anders verhält sich dies bei den so genannten Riboswitches, einer besonderen Klasse von RNA-Schaltern, die 2002 von der Arbeitsgruppe um Winkler beschrieben wurden [Winkler et al. 2002 und Winkler 2005, Nudler 2004, Sashital 2006]. Sie vereinen Sensor- und Regulatorfunktion in einem Molekül und sind dadurch nicht auf zusätzliche Sensormoleküle angewiesen. Riboswitches setzen sich aus zwei Domänen zusammen. Die Adapterdomäne detektiert durch direkte Wechselwirkung ihren Liganden. Die Effektordomäne interpretiert den Status der Adapterdomäne. Gegebenenfalls kann dies eine Modifizierung der Effektordomänenkonformation und somit der Genexpression bewirken [Süß 2006]. Das heißt, durch die Änderung der zellulären Bedingungen wird eine der beiden Konformationen stabilisiert. Die Genexpression kann dadurch sowohl während der Transkription als auch während der Translation reguliert werden. Solche RNA-Schalter sind an zahlreichen grundlegenden Stoffwechselwegen in Bakterien beteiligt. Sie bewirken dort entweder eine transkriptionelle Termination oder eine Maskierung der Bindestelle des Ribosoms [Mironov 2002, Winkler 2002]. Mandal et al. beschrieben zudem, dass die Bindung des Liganden auch eine stabilisierende Wirkung haben kann, was die Genexpression aktiviert oder erleichtert [Mandal 2004]. Da inzwischen in Pflanzen und Pilzen Sequenzen gefunden wurden, die Ähnlichkeit mit den aus Bakterien bekannten RNA-Schaltern aufweisen, wird angenommen, dass derartige Regulatoren nicht nur in Bakterien (Prokaryoten), sondern auch in Eukaryoten vorkommen könnten [Sudarsan 2003].

### 1.3 Analyse der Genexpression im forensischen Kontext

Bedingt durch seine jeweilige Aufgabe weist jeder Zelltyp des menschlichen Körpers ein gewebespezifisches charakteristisches Genexpressionsmuster auf. Gewebespezifische Genexpressionsmuster können folglich zur Identifizierung unbekannter Gewebe oder Körperflüssigkeiten herangezogen werden. Die exakte Identifizierung eines Körpersekrets kann im forensischen Kontext erheblich zur Aufklärung eines Delikts beitragen. Aus diesem Grund gewinnt die Analyse verschiedener Körpersekrete zunehmend an Bedeutung in der forensisch-molekularbiologischen Untersuchung. Herkömmliche Screening-Tests ermöglichen den Nachweis von Blut beispielsweise über Luminol-Fluoreszenz [Webb 2006, Barni 2007] oder über klinische Teststreifen. Mittels des Hexagon-Obti-Tests kann beispielsweise über eine Antikörperreaktion spezifisch humanes Blut detektiert werden [Penning 2006]. In der Klärung von Sexualdelikten können Spermien mikroskopisch nachgewiesen bzw. kann die sich in der Samenflüssigkeit befindliche saure Phosphatase durch einen Farbumschlagtest identifiziert werden [Allery 2001 und 2003]. Eine besondere Herausforderung ergibt sich bei Vorliegen von Sekretgemischen. Eine gefundene Spur kann sich aus verschiedenartigen Sekreten zusammensetzen, die zudem von mehr als einem Individuum stammen können. Die geringe Ausgangsmenge des zu prüfenden Sekrets limitiert jedoch die Durchführung mehrerer Tests [Virkler 2009]. Die Suche nach möglichen mRNA- [Virkler 2009, Bauer und Patzelt 2008, Haas 2009 und 2010, Setzer 2008, Juusola 2007, Zubakov 2008 und 2009] oder microRNA-Markern [Zubakov 2010, Hanson 2009], mit denen eindeutig und zweifelsfrei Blut, Schweiß, Sperma, Vaginalsekret oder Menstruationsblut in forensisch relevanten Fällen identifiziert werden können, scheint daher vielversprechend für die zukünftige Sekretanalyse [Juusola 2007]. In einer aktuellen Studie wurde Protamin (PRM) als Sperma-spezifischer mRNA-Marker und Hämoglobin Beta (HBB) als Humanblut-spezifischer mRNA-Marker identifiziert. Die mRNA der Matrix-Metalloproteinase 7 (MMP7) ermöglicht zudem eine Abgrenzung zu Menstruationsblut [Juusola 2007, Haas 2009].



Es erfolgen ständig zelluläre Antworten auf sich ändernde äußere Bedingungen oder innere Prozesse, die den gesamten Organismus betreffen. Solche zelluläre Antworten gehen direkt mit einer Aktivierung der Genexpression einher. Das heißt, genetische Informationen werden in Anpassung an diese Bedingungen in Proteine umgewandelt, die eine bestimmte Funktion erfüllen oder aufrechterhalten sollen [von Heydebreck 2004, Wilusz 2001]. Daher besteht die Hoffnung, dass RNA als intermediäres Template als möglicher Träger von Informationen über stattgefundene prä- und frühe postmortale Vorgänge dienen könnte. Beim bisherigen Wissenstand wird von einer Regulierung der Genexpression bis mindestens 30 Minuten postmortal ausgegangen [Ikematsu 2006]. Die zudem nachgewiesene postmortale Stabilität von RNA [Johnson 1986, Marchuk 1998, Fitzpatrick 2002, Inoue 2002, Preece 2003, Catts 2005, Heinrich 2007] ermöglicht die Analyse von todesursachenassoziierten Änderungen des Genexpressionsmusters [Ikematsu 2006]. Ikematsu et al. untersuchten beispielsweise die Genexpression so genannter immediately early-genes (IEG), die in Antwort auf intrazelluläre Signalkaskaden einer schnellen Aktivierung unterliegen. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Gentranskripte von c-fos und fos-B im Gehirngewebe von strangulierten Versuchsmäusen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe signifikant stärker exprimiert waren. c-fos und fos-B können demnach als mögliche Kandidatengene für einen hypoxischen Zustand, beispielsweise durch Strangulation, betrachtet werden [Ikematsu 2008]. Überdies wurde ein verändertes Gen-Expressionsmuster der IEG-Gentranskripte von c-fos, fos-B, c-jun und dusp-1 im Herzgewebe von Versuchsmäusen nach prämortaler Einnahme von Metamphetamin beobachtet [Matsuo 2009]. Die Gene des Hypoxie-induzierenden Faktors 1 $\alpha$  (HIF-1  $\alpha$ ), des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) sowie von Erythropoietin (EPO) wurden in humanem Nierenrindengewebe als mögliche Kandidatengene für das Versterben infolge eines hypoxischen Zustandes beschrieben [Zhao 2006]. Des Weiteren wies das Gentranskript der Tyrosinhydroxylase (TH) in der Nebenniere von Versuchsratten nach einer Quetschung der hinteren Extremität eine erhöhte Expression auf [Takahashi 2008]. Aktuelle Studien lassen weiterhin hoffen, dass Genexpressionsstudien an postmortalem Humangewebe dazu dienen können, die Pathophysiologie von Krankheiten wie Schizophrenie und Alzheimer zu verstehen [Coulson 2008, Parlapani 2010, Horesh 2010, Moreau 2011].

### 1.4 Stabilität von Ribonukleinsäuren

Der in den P-Bodies stattfindende, kontrollierte mRNA-Abbau durch ubiquitär exprimierte, hochaktive RNasen ist eine Möglichkeit, die Translation und damit die Menge an resultierendem Genprodukt zu regulieren. Die enge Verknüpfung von mRNA-Translation und mRNA-Abbau sowie die für die Regulierung der Gentranskription essentielle Aktivität der RNase sind essentielle Werkzeuge, um eine unkontrollierte Anreicherung spezifischer Proteine zu verhindern [Eulalio 2007, Parker 2007].

Transkriptionell können Gene aktiv durch das so genannte Genesilencing abgeschaltet werden. Verursacht wird diese Form der Genexpressionskontrolle durch DNA-Methylierung oder Histonmodifikation, wodurch die Wirkung der Transkriptionsmaschinerie verhindert und damit die Übersetzung der DNA in prä-mRNA gehemmt wird [Filipowicz 2005]. Die posttranskriptionell stattfindende RNA-Interferenz [Meister 2004, Faehnle 2007] ist eine besondere Form des Genesilencings. Dabei spielen die zu den kleinen RNAs gehörenden miRNAs [Guo 2010, Ambros 2007] und siRNAs [Bernstein 2001, Elbashir 2001] eine entscheidende Rolle [Valencia-Sanchez 2006, Liu 2008, Wu 2008]. Die doppelsträngige siRNA leitet den Abbau der mRNA ein, indem sie in einen RNA-Helikase- und RNA-Nuklease-aktiven Proteinkomplex (RISC = RNA-induced silencing complex) eingebaut wird. Dieser kann an der mRNA anknüpfen und sie damit entwinden [McManus 2002]. miRNAs binden an die 3'-untranslatierte Region der Zielgen-mRNA. Je nach Komplementarität zwischen der miRNA und der gebundenen mRNA-Sequenz sowie der daran beteiligten Proteine kann dadurch entweder die Translation gehemmt oder die mRNA durch Zerschneiden abgebaut werden [Wienholds 2005]. Inzwischen wird angenommen, dass 20-30 % aller menschlichen Gene durch miRNAs gesteuert werden [Lewis 2005, Yeom 2006]. Des Weiteren existieren Kontroll-Mechanismen, die zwischen intakten und fehlerhaften Transkripten unterscheiden können und die einen Abbruch von Translation oder Replikation einleiten. Dies erfolgt dann, wenn im komplexen Prozess der Genexpression Fehler auftreten, die zu nonsense-Mutationen führen.

Diese als *RNA surveillance* oder *Nonsense-mediated RNA Decay* (NMD) bezeichnete Reaktion setzt ein, wenn infolge einer Mutation oder einer fehlerhaften RNA-Synthese ein Stop-Codon im vorderen offenen Leseraster vorkommt oder wenn eine unvollständig gesplittede mRNA mit Intron-Resten auftaucht [Holbrook 2004, Silva 2009, Brogna 2009]. Der Prozess des NMD bewirkt die Detektion und anschließende Degradierung eines fehlerhaften mRNA-Transkripts und verhindert damit dessen Translation in ein unerwünschtes, verkürztes Protein [Wilusz 2001, Lewis 2003, Maquat 2005].

### 1.4.1 RNA Stabilität in der Zelle

Die Halbwertszeit von mRNAs wird im Wesentlichen durch spezifische Sequenzen, die so genannten cis-Elemente, festgelegt. Die cis-Elemente stehen in Wechselwirkung mit Proteinen (*trans-acting* Proteine) und befinden sich am 5'- oder am 3'-nichttranslatierten Ende (*untranslated region* = UTRs) der jeweiligen mRNA. Ein Beispiel für cis-Elemente sind IREs (*iron response elements*). Sie kommen in der Transferrin-Rezeptor-mRNA sowie der Ferritin-mRNA vor und sind im Eisenmetabolismus involviert. Reguliert werden sie durch das intrazelluläre Eisenvorkommen [Hollams 2002, Gingerich 2004]. AREs (*adenine rich elements*) gehören ebenso zu den in mRNAs vorkommenden cis-Elementen. Diese spezifischen Destabilisierungssequenzen am 3'-UTR weisen gehäuft Adenin- und Uracilreiche Sequenzelemente auf und bieten Ribonukleasen einen Anknüpfungsort, von dem aus die mRNA in 5'-Richtung degradiert werden kann [Gingerich 2004].

5'-3'-Exonukleasen und so genannte Decapping-Enzyme ermöglichen überdies den mRNA-Abbau in umgekehrter Richtung. Dabei beginnt die Degradierung an der Methylguanosin-Kappe und setzt sich in Richtung des 3'-Endes fort [LaGrandeur 1994]. Welcher Weg des Abbaus erfolgt, wird von der Art der jeweiligen mRNA im Prozess des *mRNA turnovers* festgelegt [Knippers 2006, Wilusz 2001].

### 1.4.2 Stabilität von mRNA in forensisch relevantem Spurenmaterial

Da die Halbwertszeit von mRNA in der lebenden Zelle verschiedenen Regulationsmechanismen unterliegt, stellt sich im forensischen Kontext die Frage, wie sich der Prozess der Degradierung in biologischen Spuren darstellt. Zubakov et al. konnten diesbezüglich zeigen, dass spezifische mRNA-Marker in Blut und Speichel selbst nach 180 Tagen stabile Genexpressionsmuster aufweisen [Zubakov 2008].

Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass eine auf mRNA-Markern basierte Körperflüssigkeitsanalyse auch noch nach langer Spurenliegezeit möglich ist. Weiterhin gelang eine erfolgreiche RNA-Extraktion aus Speichel- (nach bis zu 7 Tagen), Blut- (nach bis zu 30 Tagen) und Vaginalsekret-Proben (nach bis zu 180 Tagen), die unter dem Einfluss verschiedener äußerer Bedingungen aufbewahrt wurden [Setzer 2008]. Einschränkend ist hier zu bemerken, dass es sich bei den genannten Analysen um so genannte Endpunkt-PCR-Analysen handelt, bei denen festgestellt wird, ob ein bestimmtes Transkript qualitativ vorhanden ist. Diese Analysen erlauben keine quantitative Aussage. Entsprechend fanden Bauer et al. [Bauer 2003, Bauer und Patzelt 2003] stark variierende Transkriptmengen von Beta-Aktin und Cyclophilin A in bis zu 15 Jahre alten Blutspuren. Daraus entwickelte sich die Annahme, dass Gentranskripte mit einer gleichmäßigen Abbaurate einen Rückschluss auf das Alter einer Spur ermöglichen könnten [Anderson 2005].

### 1.4.3 Stabilität von mRNA in postmortalem Gewebe

Entgegen der einst bestehenden Befürchtung, dass die für die Regulierung der Gentranskription essentielle Aktivität der RNase eine Untersuchung der Gentranskripte post mortem unmöglich macht, konnte inzwischen mehrfach gezeigt werden, dass RNA auch aus Autopsiematerial erfolgreich isoliert werden kann [Johnson 1986, Preece 2003, Heinrich 2007, Partemi 2010, Parlapani 2010]. Somit könnte in Zukunft auch eine Analyse der Genexpression in Gewebeproben möglich sein, die im Zuge einer gerichtlich angeordneten Leichenöffnung entnommen wurden.

In der forensischen Genetik gewinnt demnach neben der Spurenarbeit die Untersuchung von postmortalem Gewebe zunehmend an Bedeutung (siehe 1.3). In der realen Fallarbeit wird man meist mit einer zumindest partiellen RNA-Degradierung konfrontiert. Es ist zu erwarten, dass der postmortale RNA-Abbau einerseits enzymatisch, andererseits hydrolytisch erfolgt, wobei sich zusätzlich externe Faktoren wie Sonnenlicht, Feuchtigkeit oder hohe Temperaturen negativ auf die Transkriptstabilität im Gewebe während des postmortalen Intervalls (PMI) auswirken. Das PMI beschreibt den Zeitraum zwischen Versterben und Gewebeentnahme. Sowohl aus praktischen als auch aus ethischen Gründen ist in der forensischen Fallarbeit ein PMI von mindestens mehreren Stunden die Regel [Barton 1993]. In einer 2005 erschienenen Studie zeigte die Arbeitsgruppe um Catts et al. am Mausmodell eine der PMI-Dauer entsprechende, steigende RNA-Degradierung in Gehirngewebe. Dieser Zusammenhang wurde jedoch speziell für mRNA-Transkripte beobachtet, die das Sequenzmotiv AUUUA in der 3'-nichttranslatierten Region aufwiesen [Catts 2005].

Inoue et al. [2002] beschrieben 2002 eine im Agarosegel abnehmende 28S rRNA- und 18S rRNA-Bandenstärke bei mRNA-Proben, die ein hohes PMI aufwiesen. Auch diese Arbeitsgruppe nutzte dafür das Mausmodell und präsentierte sich unterscheidende Degradierungsraten in unterschiedlichen Gewebearten. Die Beobachtung, dass ein zunehmendes Postmortalintervall gewebetypspezifischen Einfluss auf die mRNA-Integrität nimmt, wurde von Heinrich et al. an Humangewebe [Heinrich 2007] und von Bahar et al. an Rindergewebe [Bahar 2007] bestätigt.

Neben dem PMI [Tomita 2004] gehören weiterhin individuelle Eigenschaften eines Gewebespenders zu den Parametern, die die postmortale Stabilität von RNA beeinflussen können. Diesbezüglich werden das Geschlecht, das Alter zum Todeszeitpunkt [Preece und Cairns 2003, Durrenberger 2010], aber auch der Body Mass Index (BMI), der allgemeine Gesundheitszustand, die Fitness und die Lebensgewohnheiten sowie die Ursache bzw. die Umstände des Versterbens genannt [Barton 1993].

Speziell in Gehirngewebe begünstigt eine lange Agoniedauer vor Todeseintritt mit einhergehender Azidose des Gehirns den Prozess der mRNA-Degradierung in diesem Gewebetyp [Thorsell 2001, Atz 2007, Vawter 2006]. Verschiedene antemortale Faktoren, wie das Vorkommen einer terminalen Hypoxie [Buesa 2004, Zhao 2006, Zhu 2008], Pyrexie oder Dehydrierung sowie die prämortale Medikation, Drogen- [Atz 2007, Lehrmann 2003, Bannon 2005] und Alkoholkabhängigkeit [Liu 2004, Flatscher-Bader 2005, Johansson 2007] stellen weitere Einflussfaktoren dar. Schließlich werden auch unterschiedliche Stressformen als mögliche Parameter diskutiert [Barton 1993, Karssen 2007].

### 1.5 Genexpressionsstudien an humanem Material

Die molekularbiologische Arbeit am Tiermodell erlaubt eine gezielte Kontrolle und Festlegung der prä-mortalen Bedingungen [Barton 1993], weshalb die biologische Varianz innerhalb einer Probenzusammenstellung sehr gering bleibt. Frühere Studien haben jedoch gezeigt, dass die Ergebnisse von Experimenten am Tiermodell nur bedingt auf den Menschen übertragbar sind [Maloney 2007]. Dies erhöhte das Interesse an spezifischen Untersuchungen der Genexpression in humanem Gewebe. Inzwischen existieren daher Humangewebebanken [Bell 2008, Millar 2007, Sandusky 2009, Kort 2003, Ravid 2008], auf die in molekularbiologischen Studien zurückgegriffen werden kann. Das potentielle Material dafür wird durch operativen Eingriff oder bei postmortalen Untersuchungen entnommen [Bell 2008]. Letzteres hat den Vorteil, dass neben pathologisch verändertem auch gesundes Gewebe asserviert wird, das im Experiment als Kontrollgruppe dienen kann.

Der Weg von der Probe zum quantifizierten Gentranskript ist lang und kostenintensiv. Zudem ist man bei der Arbeit mit postmortalem Humangewebe oftmals auf Ausgangsmaterial angewiesen, das nur in sehr begrenzter Menge verfügbar ist, was einen erfolgreichen experimentellen Ablauf essentiell macht. Dieser schließt an die Extraktion von RNA (siehe 2.2.2) einen DNase-Verdau an (siehe 2.2.3), wodurch unerwünschte genomische DNA-Reste beseitigt werden. Im darauffolgenden Schritt der RNA-Aufreinigung (siehe 2.2.4) werden mögliche Protein- und Lösungsmittelreste entfernt, die bei der Quantifizierung der RNA (siehe 2.2.5) zu fehlerhaften Ergebnissen führen würden. Die Ribonukleinsäure wird schließlich mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) konvertiert (siehe 2.2.7). In dieser Form kann das zu untersuchende Transkript amplifiziert und mit Hilfe von Fluoreszenz quantifiziert werden (siehe 2.2.8).

### 1.5.1 Biologische und technische Replikate

Untersuchungen am Tiermodell ermöglichen die Kontrolle von antemortalen Faktoren wie beispielsweise Ernährungszustand oder allgemeine Fitness des Versuchsorganismus aber auch das Alter zum Todeszeitpunkt, die Todesursache bzw. die Umstände des Versterbens, die Dauer der agonalen Phase sowie die Lagerungsbedingungen des verstorbenen Körpers. Die eben genannten Parameter sind bei der Arbeit mit humanem Gewebe jedoch nicht kontrollierbar und das Probenet gestaltet sich dementsprechend äußerst heterogen [Barton 1993, Stan 2006, Durrenberger 2010]. Zudem besteht stets eine unvermeidbare Zeitspanne zwischen Versterben und Probenentnahme (postmortales Intervall), was eine partielle RNA-Degradierung im Gewebe mit sich bringen kann. Die Auswirkungen der RNA-Integrität, aber auch von Faktoren wie Geschlecht, PMI, Todesursache, Dauer der Agonie und weiterer Faktoren auf die Expression und Halbwertszeit von Gentranskripten ist daher fortwährend Gegenstand zahlreicher Studien [z.B. Barton 1993, Preece und Cairns 2003, Tomita 2004, Stan 2006, Popova 2008, Durrenberger 2010].

Die Verwendung biologischer Replikate, das heißt von Gewebeproben gleichen Typs, jedoch von unterschiedlichen Spendern (siehe Abbildung 1.1), erhöht einerseits die statistische Signifikanz einer Studie und gleicht andererseits eine interindividuelle, biologische Varianz aus [Bustin 2009, Kitchen 2010]. Letztere ergibt sich aus individuenspezifischen Faktoren wie z.B. Geschlecht, Alter zum Todeszeitpunkt, Todesursache und / oder Postmortalintervall (Abbildung 1.4). Je nach Fragestellung können die Replikate so gewählt werden, dass sie sich in definierten Parametern ähneln oder gleichen. Ausgehend von drei bis vier biologischen Replikaten, wird in der Literatur eine größtmögliche Erhöhung der Replikatanzahl empfohlen [Zakharkin 2006, Bustin 2009, Kitchen 2010].



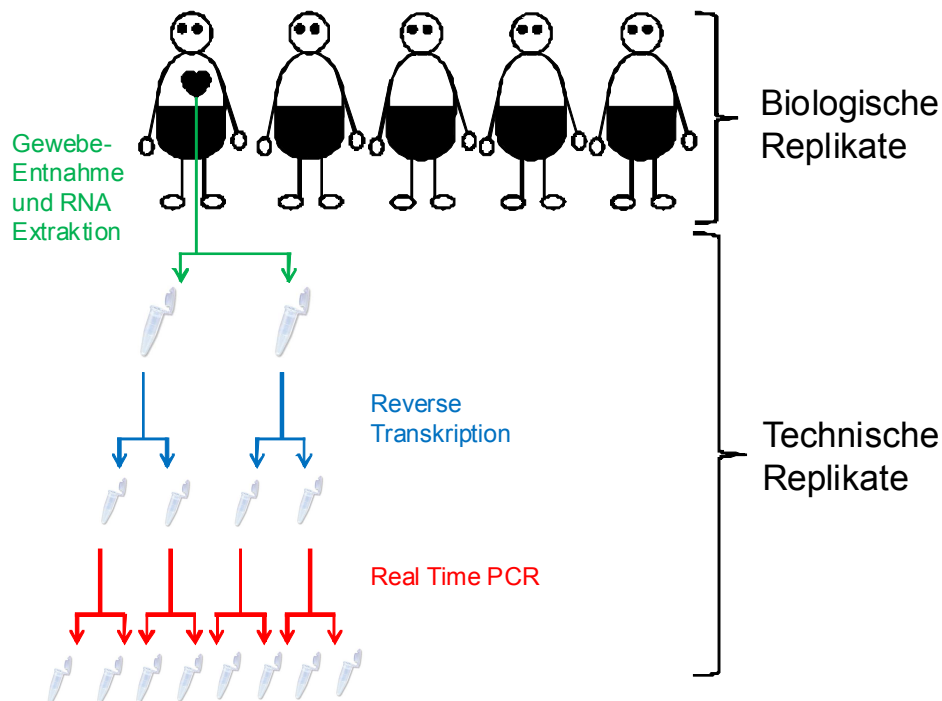


Abbildung 1.1: Schematische Übersicht zur Definition von biologischen und technischen Replikaten.

Außerdem ergibt sich eine experimentelle Varianz, beispielsweise aus minimalen Temperaturunterschieden im Schritt der Reversen Transkription oder der quantitativen Real-Time PCR, was sich auf deren Effizienz auswirken kann (Abbildung 1.4). Des Weiteren können Konzentrationsunterschiede auftreten, verursacht durch Pipettierungenauigkeiten oder stochastische Fehler [Bustin 2009]. Die Verwendung von technischen Replikaten kann diese Varianz aufzeigen und ausgleichen [Tichopad 2009]. Dabei durchläuft dasselbe biologische Replikat mindestens ein zweites, wenn möglich ein drittes Mal die Schritte der Extraktion und reversen Transkription sowie der anschließenden Quantifizierung mittels Real-Time PCR [Zakharkin 2006] (siehe Figur 1.1). Ähnliche oder bestenfalls nahezu gleiche Ergebnisse erhöhen die statistische Aussagekraft des Experiments.

### 1.5.2 RNA Integrität

In einer vorangegangenen Studie [Heinrich 2007] wurde bestätigt, dass die RNA-Isolierung aus postmortalem Gewebe möglich ist [Inoue 2002, Fitzpatrick 2002, Catts 2005]. Darin wurde RNA aus postmortalem Herzmuskel-, Skelettmuskel-, Gehirn-, Leber-, Nieren- und Milzgewebe mit einem Postmortalintervall bis 118 Stunden isoliert. Durrenberger et al. [2010] berichtete davon, dass dabei stets mindestens von einer partiellen Degradierung der RNA ausgegangen werden muss. In der Studie von Heinrich et al. [2007] wurde jedoch keine Korrelation zwischen dem Amplifikationserfolg des Gentranskripts von GAPDH beobachtet, weshalb davon ausgegangen werden muss, dass neben dem PMI weitere Faktoren bei der postmortalen RNA-Degradierung eine Rolle spielen.

Aktuelle Genexpressionsstudien stellen sich die zentrale Frage nach dem Ausmaß der Auswirkung verminderter RNA-Qualität auf nachfolgende Reaktionen sowie auf die letztendliche Datenanalyse [Phang 1994, Imbeaud 2005, Fleige und Pfaffl 2006, Fleige 2006, Bustin 2004]. Die Abschätzung der RNA-Integrität erfolgte ursprünglich mittels denaturierender Agarosegelelektrophorese mit Ethidiumbromid- [Bonini 1991] oder „Sybr Green“-Färbung [Schneeberger 1995]. Die Stärke der im Gel sichtbar gemachten 28S- und 18S rRNA-Banden wurde beurteilt und deren Verhältnis zueinander ermittelt. Ein Wert von 2 galt diesbezüglich als Hinweis für eine hohe RNA-Intaktheit [Baelde 2001, Schroeder 2006]. Die 28S rRNA Bande erscheint im Gel doppelt so stark wie die 18S rRNA Bande.

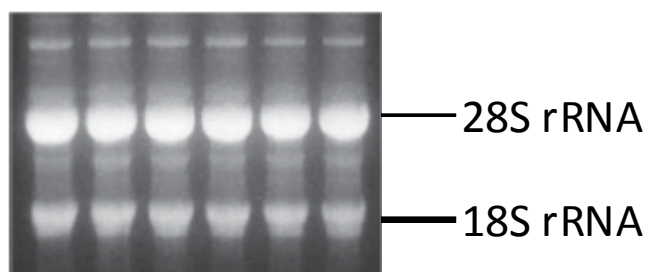


Abbildung 1.2: Agarosebild von extrahierter RNA zur Qualitätskontrolle. Erscheint die 28S rRNA Bande doppelt so stark wie die 18S rRNA Bande, dann wird eine hohe RNA Qualität angenommen. Bild entnommen aus Streit et al. (2009) *Northern Blot Analysis for detection and quantification of RNA in pancreatic cancer cells and tissue*. Nat Protoc. 4(1): 37-43

Alternativ dazu kann der Degradierungszustand einer cDNA-Probe über den so genannten 3'-5'-Assay analysiert werden. Da der RNA-Abbau bevorzugt vom 3'-Ende aus erfolgt [Gingerich 2004], liegt dieser Methode die quantitative Analyse von Gen-Transkripten zugrunde (z.B. GAPDH oder ACTB), deren Sequenzen sich eher im 3'-Bereich bzw. im 5'-Bereich der jeweiligen mRNA befinden. Die Berechnung eines 3':5'-Verhältnisses des mittels Microarray-Hybridisierung detektierten Signals erlaubt schließlich eine Aussage über den Degradierungsstatus der Probe [Dumur 2004, Ryan 2004, Popova 2008, Atz 2007]. Eine Probe hoher Integrität würde theoretisch einen Wert von 1 liefern. Bei einer partiell degradierten Probe, deren 5'-Transkript unterrepräsentiert erscheint, würde man demnach ein 3':5'-Verhältnis  $< 1$  erhalten.

Neben diesen herkömmlichen Methoden erwies sich, speziell für den Nachweis geringer RNA-Integritätsunterschiede innerhalb einer Probenzusammenstellung, die chipbasierte Kapillarelektrophorese mittels Bioanalyzer (Agilent Technologies USA) oder Experion (Biorad, München) als sensitive und objektive Methode der Qualitätsbestimmung, da die Interpretation des Ergebnisses nutzerunabhängig erfolgt [Schroeder 2006, Weis 2007, Imbeaud 2005, Strand 2007]. Bei dieser auf einem Chip basierenden Kapillarelektrophorese wandert die RNA spannungsinduziert durch die Mikroglaskanäle des Chips. Nach der erfolgten Auftrennung der Ribonukleinsäure entsprechend ihrem Molekulargewicht detektiert ein Laser schließlich die Fluoreszenzsignale und wandelt diese in Elektropherogramme um. Die gemessene Fluoreszenz korreliert mit der RNA-Menge einer bestimmten Größe [Schroeder 2006]. Eine datenverarbeitende Software ermittelt aus dem Verhältnis der Fluoreszenzsignale von 18S und 28S rRNA Molekülen, aus den Höhen der entsprechenden Peaks, aus dem „lower marker“ und der so genannten „fast area“ sowie aus verschiedenen anderen Regionen des Elektropherogramms eine RNA-Integritäts-Nummer, die auch kurz als RIN bezeichnet wird (Bioanalyzer 2100, Agilent Technologies) [Schroeder 2006], bzw. einen RNA Qualitätsindex (RQI, Experion, Bio-Rad) [Fleige 2006, Riedmaier 2010]. Der RIN- bzw. RQI-Wert kann zwischen 1 und 10 liegen. 1 beschreibt dabei einen Zustand starker Degradierung, 10 steht für eine hohe RNA-Integrität (siehe Abbildung 1.3) [Durrenberger 2010, Imbeaud 2005, Fleige 2006, Schroeder 2006].

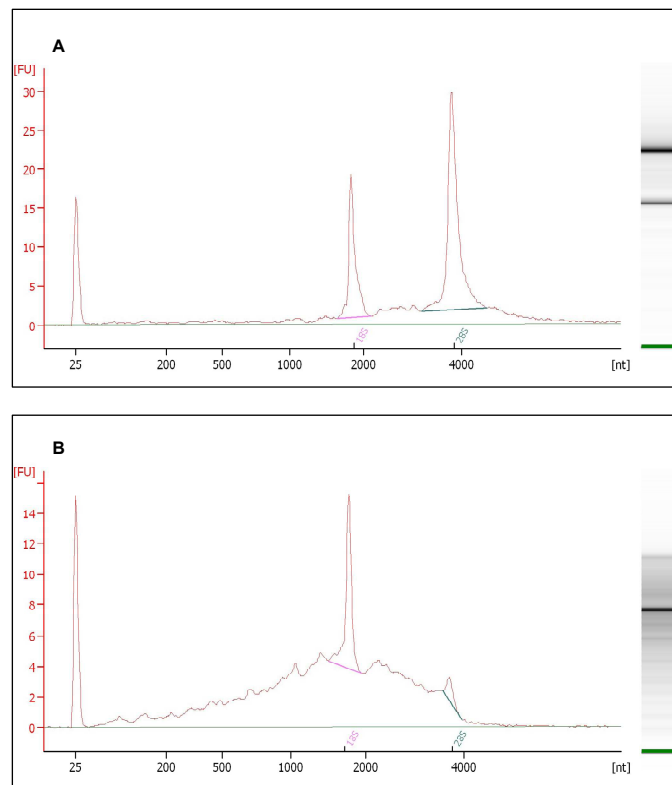


Abbildung 1.3: Ergebnis der Messung der Integrität einer humanen Herz-RNA mittels Bioanalyzer. **A:** RIN 9,1; **B:** RIN 4,9. FU = Fluoreszenz Units; nt = Nukleotide. Eine RNA hoher Integrität weist je einen hohen Peak für die Fraktion der 18S- sowie der 28S rRNA auf. Mit sinkender RNA Integrität nimmt die Höhe des 28S rRNA-Peaks ab. Im rechten Bereich jeder Abbildung befindet sich das der Probe entsprechende Abbild der elektrophoretischen Auftrennung. In RNA-Proben sehr niedriger Integrität sind die ribosomalen Peaks sehr klein, während Degradierungsprodukte im Hintergrund eine zunehmende Höhe zeigen (bis hin zu 1000 Nukleotiden)

## 1.6 Datennormalisierung

Die Verwendung von postmortalem Gewebe für Genexpressionsanalysen ist geprägt von zumeist stark variierenden, interindividuellen Faktoren des Untersuchungsgutes (siehe 1.4.3 und Abbildung 1.4). Die individuelle Todesursache nimmt dabei eine zentrale Stellung ein. Der Ernährungszustand, Stress, Drogen- bzw. Medikamentenkonsum oder die jeweilige Krankheitsanamnese sind prämortale Faktoren, die zudem eine Rolle spielen können. Postmortale Vorgänge beziehen sich auf die Lagerungsbedingungen des Körpers nach seinem Ableben. Dazu zählen beispielsweise die Umgebungstemperatur, Luftzirkulation oder Luftfeuchtigkeit. Schließlich müssen im experimentellen Prozess möglicherweise auftretende Variabilitäten berücksichtigt werden, da sie eine korrekte Dateninterpretation erschweren können (siehe 1.5.2 und Abbildung 1.4). Die Durchführung einer für den gewählten Probenumfang geeigneten Normalisierungstrategie ist daher für die Vermeidung einer fehlerhaften Interpretation von Genexpressionsprofilen essentiell. Zudem können dadurch gegebene Variablen (Abbildung 1.4) balanciert, reduziert und kontrolliert werden [Fleige 2006, Huggett 2005, Dheda 2004, Vandesompele 2002]. Basierend auf Tiermodellstudien sind unterschiedliche Normalisierungsstrategien bekannt [Huggett 2005, Bustin 2000].

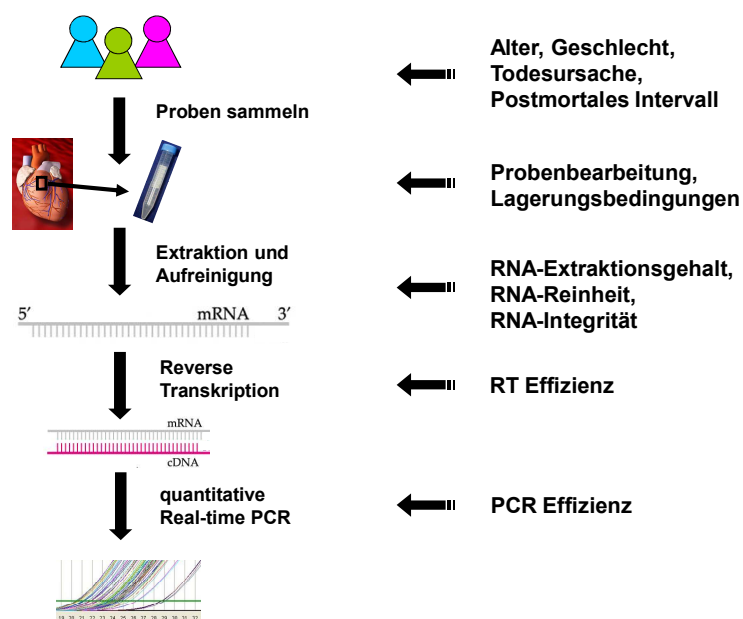


Abbildung 1.4: Interindividuelle sowie experimentelle Faktoren, die während des Prozesses von der RNA-Isolation bis zur Analyse der Genexpression als Variablen wirken können.

### 1.6.1 Normalisierung gegen die eingesetzte Gewebemenge

Die Normalisierung gegen die in die Extraktion eingesetzte Gewebemenge ist eine Möglichkeit, eine auftretende experimentelle Variable auszugleichen. Für eine verlässliche Datennormalisierung erscheint sie alleine allerdings nicht ausreichend, da selbst die Arbeit mit Zellkulturen keine Sicherheit über die exakt identische zelluläre Beschaffenheit verschiedener Proben des gleichen Gewebetyps bringt. Die Zellen können in einer unterschiedlichen Morphologie erscheinen oder sich in Clustern zusammenschließen, was eine fehlerhafte Dateninterpretation zur Folge haben würde. Zudem kann eine schwankende Effizienz im experimentellen Ablauf bei dieser Strategie nicht berücksichtigt werden [Huggett 2005].

### 1.6.2 Normalisierung gegen den DNA-Gehalt einer Probe

Die Datennormalisierung kann des Weiteren gegen den genomischen DNA-Gehalt einer Probe erfolgen. Diese Strategie würde den in 1.6.1 genannten nachteiligen Faktor der variierenden Zellmorphologie umgehen. Die Normalisierung gegen den DNA-Gehalt einer Probe fand erste Anwendung bei einer Microarray-basierenden Genexpressionsstudie an *Myobacterium tuberculosis* [Talaat 2002]. Für diese Studie wurden Zellkulturproben aus verschiedenen Wachstumsphasen verwendet. Dies basierte auf dem Wissen, dass proliferierende Zellen mehr genetische Information enthalten, als Zellen, die sich in der stationären Phase befinden. Die Arbeitsgruppe isolierte sowohl genomische DNA als auch RNA. Letztere wurde anschließend einer reversen Transkription in cDNA unterzogen. Die aus der Microarray-Hybridisierung resultierenden Signale von genomischer und komplementärer DNA wurden schließlich gegeneinander normalisiert. Es stellte sich jedoch heraus, dass beispielsweise Tumorzellen für diese Normalisierungsstrategie kaum geeignet scheinen, da sie zumeist stark variierende Haplotypen und daher eine vielfach höhere Menge bestimmter Gen-Transkripte im replizierten Zustand aufweisen als nicht proliferierende Zellen.

Diese Methode der Normalisierung erscheint zudem dadurch limitiert, dass RNA revers transkribiert wird, die co-extrahierte DNA jedoch nicht. Mögliche Schwankungen in der Effizienz der reversen Transkription blieben daher unberücksichtigt [Huggett 2005].

### 1.6.3 Normalisierung gegen den RNA-Gehalt einer Probe

Da das Ermitteln der RNA-Quantität einer Probe für weitere experimentelle Abläufe essentiell ist [Bustin 2002 und Bustin 2004], schien die Normalisierung gegen den gesamtRNA-Gehalt eine weitere erfolgversprechende Strategie. Die Menge der Nukleinsäuren wird dabei üblicherweise über die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm oder durch eine fluoreszierende Farbmarkierung ermittelt. Allerdings besteht die aus einer Probe extrahierte Gesamt-RNA hauptsächlich aus Molekülen ribosomaler RNA, wodurch der Anteil an mRNA nur ungenau repräsentiert wird [Vandesompele 2002]. Außerdem kann von einem in verschiedenen Probengruppen stets gleichbleibenden Verhältnis zwischen mRNA und rRNA nicht ausgegangen werden [Hansen 2001, Solanas 2001]. Zudem wird die Varianz der Effizienz von reverser Transkription [Stahlberg 2004] und Real-Time PCR auch in dieser Strategie nicht berücksichtigt [Huggett 2005].

### 1.6.4 Normalisierung gegen eine externe Kontrolle

Bei der Normalisierung gegen eine externe Kontrolle wird während der RNA-Extraktion neben den eigentlichen Proben eine künstliche RNA („spike-in RNA“ oder „Alien-Molekül“) festgelegter Konzentration mitgeführt [Bustin 2004, Huggett 2005, Yang 2006]. Sie durchläuft demnach sämtliche experimentelle Schritte analog der zu untersuchenden Ziel-RNA.

Der über einen Expressionsvektor hergestellten Spike-in RNA können pflanzliche oder bakterielle Gentranskripte zugrunde liegen, sie kann allerdings auch vollständig synthetisch hergestellt werden [Huggett 2005]. Der Vorteil dieser Normalisierungsstrategie liegt in der dadurch ermöglichten Vergleichbarkeit von Daten, die in unterschiedlichen Experimenten oder sogar Laboratorien generiert wurden. Bisher fand diese Methode hauptsächlich bei der Normalisierung von Microarray-Daten [Yang 2006; Lipka 2010] bzw. von Daten, die durch *reverse transcription quantitative real-time PCR* (RT-qPCR) gewonnen wurden Anwendung [Bower 2007, Zhang 2009].

Design und Synthese der „spike-in RNAs“ ist jedoch vergleichsweise aufwändig und kostenintensiv. Eine intensive Validierung ist zudem erforderlich, da die RNA in ihrer Herkunft zumeist nicht der Ziel-mRNA entspricht [Hugett 2005].

### 1.6.5 Normalisierung gegen endogene Kontrollgene

Die Normalisierung von Genexpressionsdaten gegen validierte, stabile endogene Kontrollgene ist inzwischen eine sehr häufig genutzte Strategie [Vandesompele 2002, Preece 2003; Huggett 2005]. Die Transkripte der Kontrollgene entstammen der gleichen Probe und durchlaufen die gleichen experimentellen Arbeitsschritte wie die der zu untersuchenden Zielgene. Sie unterliegen somit denselben experimentellen Bedingungen während der Bearbeitung sowie denselben Effizienzen in Extraktion und reverser Transkription wie das Zielgen, wodurch die Daten verlässlich miteinander verglichen werden können. Das im jeweiligen Gewebe als stabil nachgewiesene Expressionslevel der Kontrollgene kann als endogene Gegenprobe verwendet werden und somit eine falschpositive Transkriptlevelerhöhung, die ohne eine adäquate Normalisierung auftreten könnte, verhindern (Abbildung 1.5).

Endogene Kontrollgene haben eine fortwährende Aktivität in jeder Zelle. Sie kodieren Proteine, die essentielle, lebenswichtige Funktionen erfüllen. Lange Zeit hielt sich daher die Annahme, dass endogene Kontrollgene wie zum Beispiel Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH), Beta-Aktin (ACTB) und 18S rRNA ubiquitär und stabil in sämtlichen Gewebearten ohne den Einfluss äußerer Bedingungen oder biochemischer Prozesse exprimiert werden [Watson 1987]. Inzwischen ist jedoch bekannt, dass diese Stabilität nicht gegeben ist. Stattdessen zeigen die Gene ein unterschiedliches Expressionsmuster in Abhängigkeit von experimentellen Bedingungen sowie vom Gewebetyp [Hsiao 2001, Vandesompele 2002, Bas 2004, Dheda 2004, Bemeur 2004, Schmid 2003, Caradec 2010, Hoogewijs 2008]. Die Genexpression von GAPDH und ACTB variiert beispielsweise sowohl *in vitro* [Schmittgen 2000, Lupberger 2002, Dheda 2004, Synnergren 2007] als auch *in vivo*. Letzteres wurde an humanem Nierengewebe [Schmid 2003, Biederman 2004], an Melanomgewebe [Gircz 2008] oder an hepatozellulärem Karzinomgewebe [Cicinnati 2008] untersucht.



Der ursprünglich für diese Gene geprägte Begriff „Housekeeping Genes“ [Watson 1987] wurde daher ersetzt durch die Bezeichnung „Endogene Referenz- oder Kontrollgene“ [Bustin 2000].

Wie zuvor erwähnt, wurden bereits Gene wie beispielsweise GAPDH [Schmittgen 2000, Valenti 2006, Tanic 2007], ACTB [Schmittgen 2000, Goidin 2001] und 18S rRNA [Tanic 2007, Gutala 2004, Lupberger 2002, Tsuji 2002, Bas 2004] hinsichtlich deren Transkriptstabilität untersucht. Des Weiteren werden die Gentranskripte von CYCA [Schmid 2003, Langnaese 2008], B2M [Lupberger 2002, Gorzelniaik 2001], SDHA [Meller 2005, Langnaese 2008], HMBS [Bonanomi 2003, Stamova 2009], UBC [Mehta 2010], TBP [Meller 2005, Kreth 2010] und HPRT1 [McNeill 2007, Valente 2009] in der einschlägigen Literatur als mögliche Kontrollgene genannt. Tabelle 1.2 gibt eine kurze Übersicht über die Funktionen der genannten Gene.

Tabelle 1.2: Übersicht der in der Teilstudie untersuchten Kontrollgene sowie deren Funktionen im eukaryotischen Zellstoffwechsel.

Assay	Name des Gentranskripts	Funktion
ACTB	Beta-Aktin	Bestandteil des Zytoskeletts / Stabilisierung der äußeren Zellform
18S rRNA	18S rRNA	Beteiligt an Aufbau und enzymatischer Aktivität des Ribosoms
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	Oxidation von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Molekülen während der Glykolyse
TBP	TATA-Bindeprotein	Bindung an die TATA-Box; Bildung des Transkriptions-Initiationskomplexes
HPRT1	Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase 1	Wiederverwertung von Purinen / Salvage-Pathway
B2M	Beta-2-microglobulin	Plasmaprotein / Untereinheit des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) der Klasse I.
HMBS	Hydroxymethylbilane Synthase	Auch Porphobilinogen-Deaminase genannt; beteiligt an Porphyrin-Biosynthese
SDHA	Sukzinat-Dehydrogenase / Subunit A	SDH ist als Mitochondrienmembranständiges Protein im Zitratzyklus verantwortlich für Elektronen-Transport
CYCA	Cyclophilin A	Auch Peptidylprolylisomerase A genannt; Beteiligt an Signaltransduktion bei viralen Infektionen und entzündlichen Prozessen; beschleunigen die Umwandlung zwischen der cis- und trans-Form der Prolylpeptidbindung
UBC	Ubiquitin C	Posttranslationelle Modifikation durch reversible Bindung an Proteine; Regulation der Halbwertszeit, Funktion oder Lokalisation von Proteinen innerhalb der Zelle

Nach bisherigem Wissensstand wird demnach davon ausgegangen, dass es ein einzelnes endogenes Kontrollgen, welches unter allen Umständen eine beständige Transkriptstabilität aufweist, nicht gibt [Andersen 2004]. Daher wird in der Literatur auf die besondere Bedeutung der Validierung von Kontrollgenen im gegebenen Probenumfang sowie die Verwendung von mindestens drei stabilen endogenen Kontrollgenen hingewiesen. Dies wird dadurch begründet, dass die Kontrollgene in ihrer Gesamtheit und im Verhältnis zueinander eine höhere Stabilität aufweisen als ein einzelnes Kontrollgen sowie als sämtliche, zu untersuchende Zielgene [Vandesompele 2002, Huggett 2005]. Im Vergleich zur Verwendung einer einzelnen internen Kontrolle ermöglicht die Normalisierung gegen mehrere stabile endogene Kontrollgenen daher eine adäquatere Normalisierung.

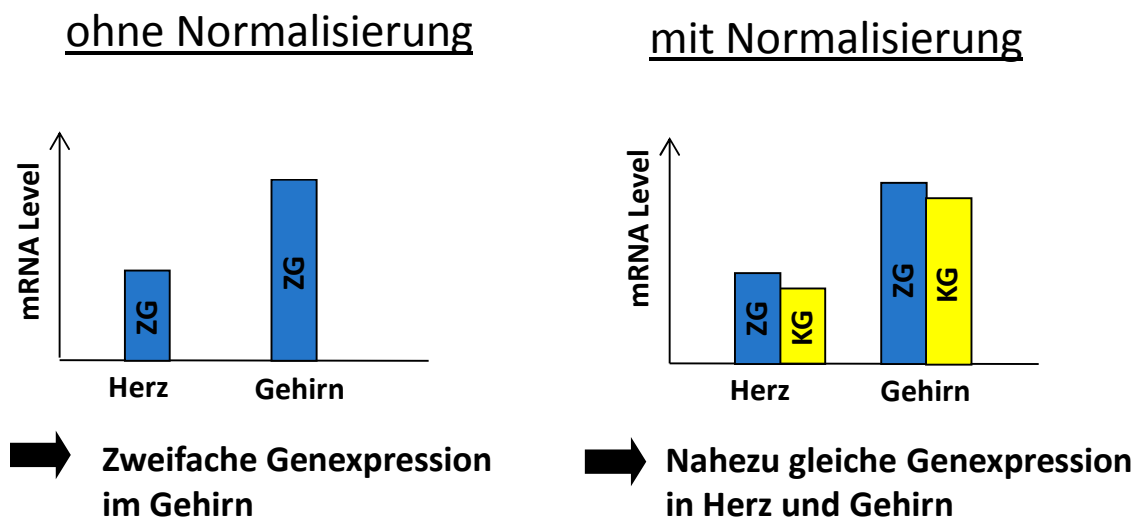


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Interpretation von Genexpressionsdaten. Wird das Genexpressionslevel des Transkripts eines einzelnen Zielgens (ZG) in verschiedenen Gewebeproben ohne Normalisierung gegen ein internes Kontrollgen (KG) betrachtet, kann daraus auf ein falsches Expressionslevel geschlossen werden. Die Grafik im linken Bereich der Abbildung würde eine etwa doppelt so starke Expression des Zielgens in Gehirngewebe signalisieren. Die Normalisierung setzt das Expressionslevel des Zielgens (ZG) in das Verhältnis eines stabilen Kontrollgens (KG) und verhindert dadurch falschpositive Ergebnisse (rechter Bereich der Abbildung).

### 1.7 Validierung endogener Kontrollgene

Für die Validierung endogener Kontrollgene stehen Software-Anwendungen wie „geNorm“ [Vandesompele 2002], „NormFinder“ [Andersen 2004] oder „BestKeeper“ [Pfaffl 2004] zur Verfügung. „GeNorm“ beispielsweise bildet aus den in der RT-qPCR generierten, nicht-normalisierten  $C_q$ -Rohdaten ( $C_q = \text{cycle of quantification}$ ; siehe 2.2.8) die jeweils entsprechenden  $\Delta C_q$ -Werte durch Subtraktion der einzelnen Werte vom höchsten  $C_q$ -Wert. Die kalibrierte, normalisierte, relative Quantität jedes Transkripts wird unter Einbeziehung der spezifischen Amplifikationseffizienz berechnet [Vandesompele 2002, Hellemans 2007] (siehe auch 2.2.9). Die untersuchten Gene werden schließlich entsprechend ihrer Expressionsstabilität grafisch dargestellt [Manual geNorm, Vandesompele 2002]. Die Software „NormFinder“ funktioniert nach einem der GeNorm-Software verwandten Prinzip. Im Vergleich zu geNorm, bei dem die Gene nach der Ähnlichkeit der Expressionsprofile zueinander angeordnet werden, bewertet Normfinder allerdings die Transkriptstabilität entsprechend einem Vergleich zwischen der Variation im Expressionslevel insgesamt und innerhalb von definierten Probenuntergruppen. Beide Programme liefern zudem Informationen über die Mindestanzahl von Kontrollgenen, die eine verlässliche Datennormalisierung erfordert. Das Programm „BestKeeper“ basiert auf der Annahme, dass die gewählten Referenzgene ähnliche Expressionsmuster zeigen. Findet sich dabei eine statistisch signifikante Pearson-Korrelation ( $p < 0,01$ ) zwischen den Genen, dann wird deren Expression als stabil angenommen.

Die Verwendung von endogenen Kontrollgenen und deren Transkriptstabilität im gegebenen Probenet sind die Voraussetzung für eine verlässliche Interpretation von Genexpressionsdaten [Vandesompele 2002]. Ein universell einsetzbares, ideales Kontrollgen konnte bisher jedoch noch nicht gefunden werden. Es wird vielmehr davon ausgegangen, dass ein derartiges Gen nicht existiert [Andersen 2004, Vandesompele 2002].

Allerdings beschränkt sich die Mehrzahl experimenteller Studien auf wenige Gewebearten bzw. umschriebene histologische Bereiche des zu untersuchenden Gewebes. Dies erleichtert die Validierung der Stabilität ausgewählter Gentranskripte [Andersen 2004]. Neben der Transkriptstabilität eines einzelnen Gens wird dabei der Expressionsstabilität mehrerer Kontrollgene insgesamt eine größere Bedeutung beigemessen [Huggett 2005, Vandesomele 2002].

### 1.8 Datenauswertung und -interpretation

Ist postmortales Gewebe Ausgangsmaterial von Genexpressionsstudien, dann gilt generell große Vorsicht bei der Dateninterpretation, da das Transkriptlevel in Autopsiegewebe von vielen zusätzlichen Parametern beeinflusst werden kann [Preece und Cairns 2003]. Zudem ist es erforderlich, eine mögliche RNA-Degradierung bzw. eine hohe biologische Varianz der Proben mit einzurechnen, da sich diese Faktoren auf die experimentelle Effizienz auswirken können [Fleige 2006, Pfaffl 2010].

#### 1.8.1 Datenanalyse nach dem $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Algorithmus

Grundlage des früher für die Berechnung von Expressionsunterschieden häufig genutzten  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Algorithmus [Livak 2001] war die Annahme einer 100%igen Effizienz der Polymerase Kettenreaktion (PCR), die eine Produktverdopplung pro Zyklus induziert [Bustin 2009, Regier 2010]. Abbildung 1.6 gibt eine schematische Übersicht über den Ablauf dieser Analyse. Demnach wurden die aus der Quantifizierung resultierenden  $C_q$ -Rohdaten der Zielgene sich entsprechender technischer Replikate gemittelt. Anschließend erfolgte die Berechnung der Differenz aus der Quantität der Zielgentranskripte und der des einzelnen Kontrollgentranskripts ( $\Delta C_q$ ). Dieser Wert wird als normalisierte Quantität (NQ) bezeichnet. Im Weiteren erfolgt die Kalibrierung der Daten gegen den gemittelten  $C_q$ -Wert sämtlicher Proben der Kontrollgruppe ( $\Delta\Delta C_q$ ). Die n-fache Expression der Zielgene in den nach spezifischen Parametern gruppierten Proben (z.B. Todesursache) wird schließlich durch Anwendung der Formel  $2^{-\Delta\Delta C_q}$  kalkuliert. Diese Daten können als kalibrierte normalisierte Quantitäten (CNQ) beschrieben werden.

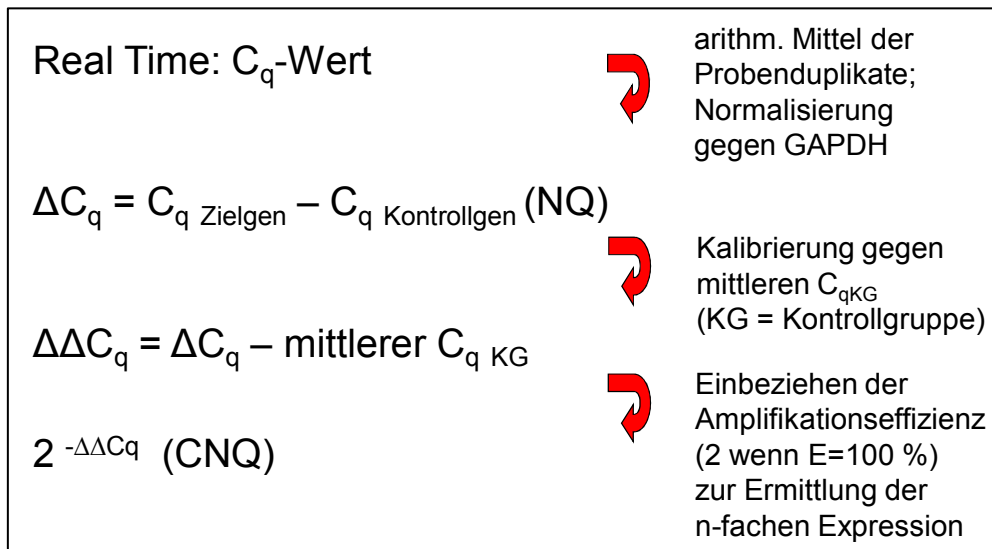


Abbildung 1.6: Weg der Datenanalyse vom  $C_q$ -Wert zur kalibrierten, normalisierten Quantität (CNQ) mittels  $2^{-\Delta\Delta C_q}$  nach Livak et al. (2006); E = Effizienz

### 1.8.2 Softwaregesteuerte Datenanalyse unter Einbeziehung der wahren PCR-Effizienz

In der Realität bewegen sich die zu erwartenden PCR-Effizienzen validierter PCR-Assays zumeist zwischen 90 und 110 % [Bustin 2009]. Zudem wurde darüber berichtet, dass selbst geringe Effizienz-Unterschiede im Prozess der Datenanalyse erhebliche Auswirkungen haben können [Ramakers 2003]. Aktuelle Studien arbeiten daher bevorzugt mit der wahren Effizienz eines Gen-Assays [Pfaffl 2001, Bustin 2009, Regier 2010]. Diese wird aus der Steigung der Standardkurve abgeleitet, die aus der Quantifizierung einer seriell verdünnten cDNA bekannter Ausgangskonzentration resultiert. Die tatsächliche Amplifikationseffizienz wird schließlich aus dem Anstieg des logarithmisch-linearen Abschnitts der Standardkurve berechnet (PCR-Effizienz =  $10^{-1 / \text{Steigung} - 1}$ ) [Bustin 2009].

Computerprogramme wie „REST“ (*relative expression tool*) [Pfaffl 2002], „GeneX“ (MultiD) [Mangalam 2001] und „qBase“ [Hellemans 2007], die die quantitative Analyse der Rohdaten erleichtern sollen und den x-fachen Unterschied zwischen zwei oder mehreren Transkriptmengen ermitteln, finden zunehmend Anwendung in aktuellen Genexpressionsstudien [Regier 2010].

Abbildung 1.7 fasst den Ablauf der Datenanalyse mittels qBase schematisch zusammen. Die Software bildet zunächst das arithmetische Mittel der  $C_q$ -Doppelwerte sich entsprechender technischer Replikate. Unter Einbeziehung der auf einer 3fach-seriellen Verdünnungsreihe basierenden genspezifischen PCR-Effizienz werden die Daten in relative Quantitäten (RQ) umgewandelt. Der Schritt der Normalisierung gegen stabile Referenzgene wird realisiert durch die Division der relativen Quantitäten durch den Normalisierungsfaktor dieser Referenzgene ( $NRQ = RQ/NF$ ). Aus dieser Berechnung gehen die normalisierten, relativen Quantitäten (NRQ) hervor. Die Kalibrierung der NRQ-Daten gegen ihren Mittelwert CF (*calibration factor*) ermöglicht schließlich auch die Analyse von Proben aus unterschiedlichen Real-Time Läufen ( $CNRQ = NRQ/CF$ ). Aus diesem Schritt resultieren kalibrierte, normalisierte, relative Quantitäten (CNRQ-Werte).

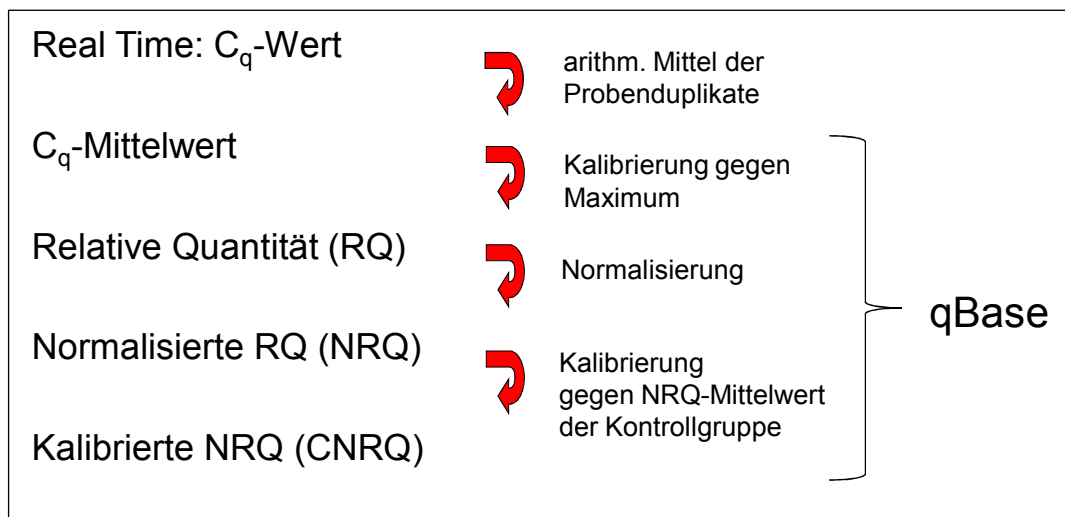


Abbildung 1.7: Weg der Datenanalyse vom  $C_q$ -Wert zur kalibrierten, normalisierten, relativen Quantität (CNRQ) mittels qBase nach J. Hellemans et al. 2007

### 1.9 Genexpression nach Hypoxie

Sauerstoffmangel spielt in der Pathophysiologie zahlreicher Erkrankungen wie z.B. Herzinsuffizienz oder Tumoren eine zentrale Rolle [Zhao 2006, Zhu 2008, Brahim-Horn 2006]. Neben einer morphologischen Beurteilung könnte eine quantitative Bewertung der pathophysiologisch verursachten Veränderungen des Transkriptlevels spezifischer Zielgene die Beweiskraft der morphologischen Diagnose untermauern [Zhao 2006]. Daher ist anzunehmen, dass postmortale Genexpressionsstudien im forensischen Kontext einen wichtigen Beitrag zur Bestimmung der Todesursache leisten können.

#### 1.9.1 Hypoxie

Bedingt durch systematische (z.B. Anämie, Herz-Kreislauf-Stillstand) oder lokale (z.B. Embolie) Prozesse, aber auch durch Prozesse, die einen Erstickungstod herbeiführen, ist Hypoxie als ein zellulärer Zustand, der mit einer für den metabolischen Stoffwechsel unzureichenden Sauerstoffversorgung einhergeht und im Prozess des Sterbens eine zentrale Rolle spielen kann [Jiang 1996, Zhao 2006]. Um die hypoxiebedingte Veränderung der Expression spezifischer Gene zu untersuchen, erscheint besonders die Untersuchung von Proben von Interesse, die nach Strangulation oder Ertrinken gewonnen wurden, da in solchen Fällen die Todesursache exakt bestimmt werden kann. Ein Kreislaufstillstand führt in kürzester Zeit zu einer ungenügenden Sauerstoffversorgung sämtlicher Organe. Daher kommen auch Probenspender, die einem plötzlichen Herztod erlegen waren, für die Untersuchung in Betracht. Beide müssen jedoch als unterscheidbare Gruppe behandelt werden.

Es sind verschiedene Formen des Ersticken bekannt. Hyperkapnisches oder asphyktisches Erstickten bezeichnet sämtliche Vorgänge, die in Zusammenhang mit einer lokalen Behinderung der Atmung stehen [Penning 2006, Madea 2007]. Mögliche Ursachen dafür können beispielsweise asthmatische Anfälle, Kehlkopfschwellung (Krupp), Lungenödem, eine Trachealstenose (z.B. durch Zysten oder Tumore), eine Verlegung der Atemwege durch Flüssigkeitsaspiration (Ertrinken) oder Festkörper (Bolustod) sowie Strangulation (Erhängen, Erdrosseln, Erwürgen) sein. Der Sauerstoffmangel wird von einer Behinderung der Kohlenstoffdioxid- ( $\text{CO}_2$ -) Abatmung begleitet. Als Folge dessen steigt der  $\text{CO}_2$ -Partialdruck im arteriellen Blutsystem an und es kommt zu einer Erhöhung von Atemfrequenz, Herzfrequenz und Blutdruck. Der Betroffene erleidet dadurch ein zunehmend quälendes Erstickungsgefühl.

Bei hypokapnischem oder nicht-asphyktischem Erstickten sind die Atemwege nicht verlegt [Brinkmann und Madea 2004]. Diese Form des Ersticken kann einerseits bei einem erniedrigten Sauerstoffdruck, zum Beispiel in großer geografischer Höhe (Höhentod), oder bei einem verminderten Sauerstoffvolumen, z.B. in luftdicht verschlossenen Räumen, auftreten. Andererseits kann der Sauerstofftransport in den Erythrozyten (z.B. durch Herz-Kreislauf-Stillstand) sowie die Verwertung von Sauerstoff in der Körperzelle behindert sein. Hypokapnisches Erstickten wird nicht von einer Reizung des Atemzentrums begleitet und die  $\text{CO}_2$ -Abatmung wird nicht behindert. Jedoch führt eine vollständige Unterbrechung der Sauerstoff-Zufuhr zum Gehirn innerhalb kürzester Zeit zur Bewusstlosigkeit und macht eine Rettung aus eigener Kraft unmöglich.

### 1.9.2 HIF-1 $\alpha$ , VEGF und SLC2A1

Der Hypoxie-induzierte-Faktor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), der vasculäre-endotheliale-Wachstumsfaktor (VEGF) sowie der Glucosetransporter 1 (GLUT1 bzw. SLC2A1) sind dafür bekannt, in Antwort auf eine mangelhafte Sauerstoffkonzentration mit einer Änderung des Expressionsmusters zu reagieren [Jiang 1996, Ozaki 1999, Zhao 2006, Zhao 2008, Zhu 2008].



Das Protein HIF-1 $\alpha$  ist ein Heterodimer [Loor und Schumacker 2008, Burrows 2011]. Es besteht aus einer konstitutiv exprimierten beta- ( $\beta$ -) Untereinheit sowie einer sauerstoffabhängig regulierten alpha- ( $\alpha$ -) Untereinheit. Die  $\alpha$ -Untereinheit wird unter normoxischen Bedingungen durch Bindung des sogenannten VHL-Proteins (Von-Hippel-Lindau Protein) und anschließender Ubiquitylierung proteasomal degradiert [Burrows 2011]. Bei Sauerstoffmangel bildet HIF-1 $\alpha$  mit der  $\beta$ -Untereinheit einen heterodimeren Komplex. Dieser bindet den sogenannten HRE- (*hypoxia response element*-) Promotorbereich von Genen und induziert die Expression weiterer Gene, wie beispielsweise VEGF und GLUT1 [Brahimi-Horn 2006, Hirota 2005, Tai 2009, Huang 1998 und 2003, Semenza 2007, Burrows 2011]. Abbildung 1.8 fasst die Wirkungsweise von HIF-1 $\alpha$  schematisch zusammen.

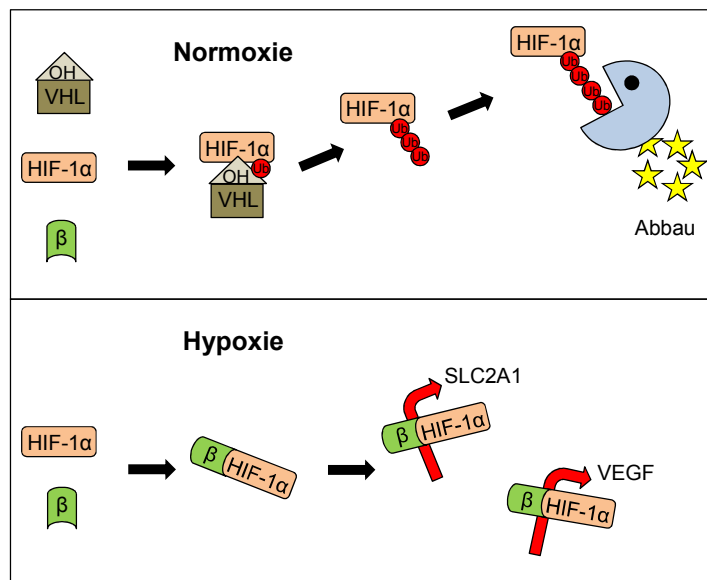


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung der Funktion von HIF-1 $\alpha$  im metabolischen Stoffwechsel. Der normoxische Zustand begünstigt die Bindung der sauerstoffabhängig regulierten  $\alpha$ -Untereinheit an das VHL-Protein. Die anschließende Ubiquitylierung (Ub) des HIF-VHL-Komplexes wird gefolgt vom proteasomalen Abbau. Unter hypoxischen Bedingungen binden  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit aneinander und induzieren die gesteigerte Expression weiterer Gene sowie die Umstellung auf einen anaeroben Energiemetabolismus.

Die Expression von VEGF wird ebenso angeregt, wenn Zellen nicht ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden. In diesem Fall werden verstärkt hypoxieinduzierte Faktoren (z.B. HIF-1  $\alpha$ ) exprimiert, die wiederum die Expression von VEGF einleiten. VEGF stimuliert die Teilung und Migration von vaskulären Endothelzellen.

Demnach ist der Gefäßwachstumsfaktor am Prozess der Angiogenese beteiligt. In der Gefäßwand fördert VEGF die Produktion von Stickstoffmonoxid. Dies wiederum führt zur Gefäßerweiterung (Vasodilatation) und zum Absinken des Blutdrucks [Liu 2002, Brahim-Horn 2006]. In rasch wachsenden Tumoren lässt sich zudem häufig ein erhöhtes VEGF-Expressionslevel nachweisen. In diesem Fall wird eine pathologisch veränderte, übermäßige Gefäßneubildung induziert, die den Tumor an das Kreislaufsystem anschließen und mit ausreichend Sauerstoff versorgen soll [Jalba 2011].

Der Glukose-Transporter-1 (GLUT1 bzw. SLC2A1) befindet sich in der Zellmembran aller Zelltypen. Er transportiert Glukose oder strukturähnliche Kohlenhydrate aus dem Blutkreislauf über die Membranbarriere. GLUTs werden von Genen der Familie SLC2 exprimiert. Davon sind 14 strukturhomologe Gene bekannt. Das Protein SLC2A1 ist an der basalen Glukoseversorgung vieler Gewebe sowie an der Regulierung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt. Tritt in der Zelle ein Sauerstoffmangel auf, werden verstärkt hypoxieinduzierte Faktoren exprimiert, die wiederum die Expression von GLUT1 anregen. Dies bewirkt eine Umstellung auf einen anaeroben Energiemetabolismus mit vermehrtem Substrattransport [Loor und Schumacker 2008].

### 1.10 Ziele der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Möglichkeiten und Grenzen von Genexpressionsstudien an postmortalem humanem Gewebe näher zu beleuchten. Dies soll langfristig eine Grundlage für zukünftige Studien im forensischen Kontext, aber auch im Bereich der medizinischen Grundlagenforschung bilden. Dafür sollte der Einfluss von RNA-Degradierung auf die Verlässlichkeit quantitativer Genexpressionsanalysen untersucht werden. Zudem sollte die Auswirkung individueller Faktoren auf die Integrität postmortaler RNA-Proben geprüft werden. Schließlich sollte die Expression dreier Gene am Beispiel der Hypoxie- sowie der Einfluss der Normalisierungsstrategie auf das Endergebnis dargestellt werden.

Ein Bestandteil der Arbeit soll die Untersuchung des Einflusses einer synthetischen mRNA-Degradierung auf die Verlässlichkeit von quantitativen Genexpressionsdaten sein. Dafür soll kommerziell erhältliche humane Herz-, Skelettmuskel- und Gehirn-RNA durch Hitze stufenweise degradiert und mittels quantitativer Real-time PCR untersucht werden. Dadurch soll geklärt werden, ob damit zu rechnen ist, dass in postmortalem Gewebe mit möglicherweise verminderter RNA-Integrität mit Verfälschungen der quantitativen Genexpressionsdaten zu rechnen ist.

In einer Vorstudie fanden sich Hinweise darauf, dass das Postmortalintervall nicht als alleiniger einflussnehmender Faktor in Betracht gezogen werden kann, der mit der RNA-Integrität korreliert [Heinrich 2007]. Die Untersuchung des Einflusses weiterer nichtkontrollierbarer prä- und postmortalen Bedingungen auf die RNA-Integrität sowie auf die Stabilität einzelner Gentranskripte ist daher ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Als Untersuchungsmaterial soll RNA dienen, welche aus postmortalem Herzmuskel-, Skelettmuskel- und Gehirngewebe isoliert wurde. Mittels RT-qPCR sollen die ersten zehn in Tabelle 2.11 dargestellten endogenen Kontrollgene untersucht und die Daten mit „geNorm“ und „qBase“ analysiert werden.

Um mögliche Unterschiede in der Stabilität der Kontrollgene zu erklären, soll überprüft werden, ob ausgewählte Parameter wie beispielsweise das postmortale Intervall, der Body Mass Index oder die Todesursache Einfluss auf die exprimierte Menge der Zielgenetranskripte nehmen. Detektierte Faktoren, die Einfluss auf die RNA-Integrität und auf die Stabilität einzelner Genetranskripte haben, sollten zukünftig besondere Beachtung finden und entsprechend die Auswahl des eingesetzten Probenguts beeinflussen.

Um die Bedeutung der gewählten Normalisierungsstrategie sowie die Folgen der jeweiligen Normalisierung für die Dateninterpretation zu untersuchen, sollen die Ergebnisse einer ersten Genexpressionsstudie an postmortalem Material nach zwei gängigen Strategien normalisiert werden. Für diese Teilstudie werden Gewebeproben von Verstorbenen, die entweder an Erstickten oder an einem Herzversagen verstorben sind, einer Kontrollgruppe gegenübergestellt und die Expression der Gene HIF-1 $\alpha$ , VEGF und GLUT1 in allen Gruppen analysiert. Die Methode der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Normalisierung wird der softwaregesteuerten Normalisierung mittels qBase gegenübergestellt. Während erstere Methode eine PCR-Effizienz von 100 % annimmt und ein einzelnes Kontrollgen zur Datennormalisierung verwendet, bezieht letztere Strategie die wahre PCR-Effizienz sowie ein Set von mehreren validierten stabilen endogenen Kontrollgenen in die Datenanalyse mit ein. Die unterschiedlichen Einflüsse der beiden Normalisierungsstrategien sollen am konkreten Beispiel der durch Hypoxie verursachten Genexpressionsänderung dargestellt werden.

Diese Arbeit soll somit eine generelle Basis schaffen für zukünftige Genexpressionsstudien an postmortalem Humangewebe.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Alle verwendeten Materialien und Chemikalien wurden über die Reagenzienzentrale des Universitätsklinikums Freiburg bezogen.

#### 2.1.1 Reagenzien

Tabelle 2.1: Übersicht über verwendete Reagenzien

Reagenz	Hersteller
DEPC	Neolab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
RNAgents Denaturing Solution	Promega, Mannheim
RNase Inactivation Reagent	Ambion, Austin, TX / USA
Ethanol, absolut	VWR International, Fontenay sous Bois, Frankreich
Ethanol, vergällt	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
H <sub>2</sub> O, nukleasefrei	Promega, Mannheim
Human Skeletal Muscle total RNA	Stratagene, Heidelberg
Human Heart total RNA	Stratagene, Heidelberg
Human Brain total RNA	Stratagene, Heidelberg
HPLC-H <sub>2</sub> O	VWR International, Fontenay sous Bois, Frankreich
Isopropanol	J.T. Baker, Deventer, Holland
Natriumacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Roti-Aqua Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol, pH 4 (25/24/1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
RNA Ladder	Agilent Technologies, Waldbronn
RNAlater <sup>®</sup>	Ambion, Austin, TX
RNaseAWAY <sup>®</sup>	Molecular Bioproducts Inc., San Diego, CA
Taq Man <sup>®</sup> Gene Expression Assay GAPDH	Applied Biosystems, Darmstadt
Taq Man <sup>®</sup> Gene Expression Assay 18sRNA	Applied Biosystems, Darmstadt
Taq Man <sup>®</sup> Gene Expression Assay ACTB	Applied Biosystems, Darmstadt
Taq Man <sup>®</sup> Gene Expression Assay TBP	Applied Biosystems, Darmstadt
Taq Man <sup>®</sup> Gene Expression Assay HPRT	Applied Biosystems, Darmstadt
Taq Man <sup>®</sup> Gene Expression Assay B2M	Applied Biosystems, Darmstadt

Taq Man <sup>®</sup> Gene Expression Assay HMBS	Applied Biosystems, Darmstadt
Taq Man <sup>®</sup> Gene Expression Assay SDHA	Applied Biosystems, Darmstadt
Taq Man <sup>®</sup> Gene Expression Assay CYCA	Applied Biosystems, Darmstadt
Taq Man <sup>®</sup> Gene Expression Assay UBC	Applied Biosystems, Darmstadt
Taq Man <sup>®</sup> Gene Expression Assay HIF1a	Applied Biosystems, Darmstadt
Taq Man <sup>®</sup> Gene Expression Assay VEGF	Applied Biosystems, Darmstadt
Taq Man <sup>®</sup> Gene Expression Assay GLUT1	Applied Biosystems, Darmstadt
Taq Man <sup>®</sup> Universal Master Mix, No AmpErase <sup>®</sup> UNG	Applied Biosystems, Darmstadt

## 2.1.2 Fertige Reaktionssysteme (Kits)

Tabelle 2.2: Fertige Reaktionssysteme und darin enthaltene Komponenten

<b>Kit</b>	<b>Enthaltene Komponenten</b>
RNAgents <sup>®</sup> Total RNA Isolation System (Promega, Mannheim)	RNAgent <sup>®</sup> Denaturing Solution, 2 M Natriumacetat, Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (25 : 24 : 1, pH 4,7), Isopropanol nukleasefreies Wasser
RNeasy <sup>®</sup> Mini Kit (Qiagen, Hilden)	RNeasy Mini Spin Columns, Collection Tubes (1,5 mL), Collection Tubes (2 mL), Buffer RLT, Buffer RW1, Buffer RPE, RNase-freies Wasser
TURBO DNA-free <sup>™</sup> (Ambion, Austin, TX, USA)	TURBO DNase (2 U/μL), 10 x TURBO DNase Buffer, DNase Inactivation Reagent, Nukleasefreies Wasser
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Darmstadt)	10 x RT Buffer, 10 x Random Primer, dNTP Mix 100 mM, Multiple Scribe Reverse Transcriptase (50 U/μL)

Agilent RNA Nano 6000 Kit (Agilent Technologies, Waldbronn)	25 RNA Nano 6000 Chips 2 Cleaning Chips Gel Matrix Nano Dye Konzentrat Nano Marker
--	--

### 2.1.3 Geräte

Tabelle 2.3: Übersicht über die verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
ABI7500 Sequence Detection System	Applied Biosysteme
2100 Bioanalyzer (LabChip)	Agilent Technologies
Chip Vortex-Station	IKA®-Werke GmbH & Co. KG
Bioanalyzer Priming Station	Agilent Technologies
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr
Gefrierschrank -80 °C	Dometic Medical Systems
IKA®T10 Basic Ultra-Turrax® (Homogenisator)	IKA®-Werke GmbH & Co. KG
LP 2200S (Feinwaage) 10 mg - 120 mg	Sartorius
Ikamag® RCT (Magnetheizrührer)	Milian AG
Megafuge 1.0	Heraeus Sepatech
Micro Centrifuge	Carl Roth GmbH & Co. KG
MS2 Minishaker (Vortex)	Janke & Kunkell, IKA® Labortechnik
NanoDrop® ND-1000	Thermo Fischer Scientific Inc
Pipette 20 µL	Abimed / Eppendorf / Pipetman
Pipette 200 µL	Abimed / Eppendorf / Pipetman
Pipette 1000 µL	Abimed / Eppendorf / Pipetman
Laborfuge 400 (Plattenzentrifuge)	Heraeus Sepatech
PTC-200 Peltier Thermal Cycler	MJ Research
Sigma Laborzentrifugen Z 15	Sigma
Speed Vac® Plus SC 110A	Savant
Sterilbank UVC/T-M-AR	G. Kisker
Thermomixer comfort	Eppendorf
Z 233 MK-2 (Zentrifuge) 6-22000 rpm	Hermle
VF2 Vortex	Janke & Kunkell, IKA® Labortechnik

## 2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.4: Übersicht über verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Filtertips 10 µL	NerbePlus, Winsen / Luhe
Filtertips 200 µL	NerbePlus, Winsen / Luhe
Filtertips 1000 µL	NerbePlus, Winsen / Luhe
Kimberly-Clark <sup>®</sup> Labortücher	Kimtech Science
MaiMed <sup>®</sup> Sensitive Latex Handschuhe	Neuenkirchen, Germany
MicroAmp <sup>®</sup> Splash Free Support Base	Applied Biosystems, Darmstadt
Nitra-Tex <sup>®</sup> Handschuhe	Ansell, Brüssel, Belgien
Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems, Darmstadt
Parafilm	Pechiney, Chicago, USA
PCR-Tubes 0,2 mL	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Skalpell zum Einmalgebrauch	Produkte für die Medizin AG, Köln
Tubes 1,5 mL	Eppendorf, Hamburg
Tubes 2 mL	Eppendorf, Hamburg
96-well Optical Reaction Plate	Applied Biosystems, Darmstadt
10 mL Falcons	Greiner bio-one, Frickenhausen
15 mL Falcons	Greiner bio-one, Frickenhausen
50 mL Falcons	Greiner bio-one, Frickenhausen

## 2.1.5 Lösungen

Tabelle 2.5: Lösungen und deren Herstellung

	Angaben zur Herstellung
DEPC-H <sub>2</sub> O	0,1 % DEPC in dH <sub>2</sub> O, 10 min rühren, über Nacht inkubieren bei RT, autoklavieren
2 M NaAcetat pH 4	8,2 g NaAc (FW 82,03) 40 mL HPLC Zugabe von HCL (bis pH 4) Ad 50 mL HPLC Zugabe von 0,1 % DEPC, 10 min rühren über Nacht inkubieren bei RT, autoklavieren



## 2.1.6 Enzyme

Tabelle 2.6: Übersicht über verwendete Enzyme

<b>Enzym</b>	<b>Hersteller</b>
DNase (2U/ $\mu$ L)	Ambion, Austin, TX, USA
rRNasin <sup>®</sup> 40 U/ $\mu$ L	Promega, Mannheim
Reverse Transkriptase	Applied Biosystems, Darmstadt

## 2.1.7 Gewebeproben

Bei dem entnommenen Gewebe handelte es sich um Herzmuskel, Skelettmuskel und Gehirn. Das zu untersuchende Herzmuskelgewebe entstammte der Hinterwand des linken Herzventrikels. Gehirngewebe wurden aus der frontalen bzw. frontobasalen Gehirnregion entnommen. Das Skelettmuskelgewebe war Teil des *M. iliopsoas*, des sog. Hüftenlendenmuskels.

Um das Gewebe optimal zu erhalten und die Intaktheit der RNA zu gewährleisten, wurden die Proben sofort nach der Entnahme in stabilisierende RNAlater<sup>®</sup>-Lösung überführt. In dieser Lösung wurden die Asservate bei 4 °C maximal 4 Wochen gelagert. Bis zur weiteren Bearbeitung wurde das Gewebe bei -80 °C eingefroren, nachdem der Überstand entfernt worden war.

## 2.2 Methoden

Zunächst erfolgte die Extraktion der RNA aus dem Gewebe. Die RNA-Extrakte wurden anschließend gereinigt und DNase-behandelt, bevor die Integrität gemessen wurde. Durch die Reverse Transkription wurde die RNA im Weiteren in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Als Voraussetzung für den Einsatz der Proben in die Real-time PCR lieferte das Messen der optischen Dichte Aussagen über die Quantität der RNA.

Für die RNA-Extraktion wurden im Rahmen gerichtlich angeordneter Routinesektionen an den Instituten für Rechtsmedizin in Freiburg und Münster jeweils drei Gewebeproben von insgesamt 54 Individuen entnommen (basierend auf dem Antrag 272/05 bei der Ethikkommission der Universität Freiburg). Darunter befanden sich 33 männliche und 21 weibliche Individuen. Eine Übersicht mit Todesursachen und Todesumständen, den Agoniezeiten und postmortalen Intervallen (PMI) sowie weiteren Faktoren befindet sich in Tabelle 8.1 und 8.2.

Für die Probenentnahme kamen prinzipiell Leichen mit einem PMI von maximal 50 Stunden in Frage. In vier Fällen wurden auch Proben von Individuen entnommen, die ein PMI > 50 h aufwiesen. Da diese Individuen jedoch, analog zu denen mit einem PMI < 50 h, keinerlei makroskopische Veränderungen (Herde, Narben, umgebendes Fett oder ähnliches) bzw. keinerlei Zeichen der Fäulnis aufwiesen, kamen auch sie als Probenspender in Betracht. Informationen zum betreffenden Individuum wie Größe, Gewicht, Alter und bestehende Vorerkrankungen wurden in einem speziellen Datenerhebungsbogen (siehe Abbildung 8.1) vermerkt. Zusätzlich wurden darin Angaben über die Todesursache und Todesumstände sowie über das PMI und, wenn vorhanden, über die Leichenlagerungsbedingungen dokumentiert.

### 2.2.1 Anforderungen an die Arbeit mit RNA

Nukleasen katalysieren die Hydrolyse der Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe des einen Nukleotids und der 3'-Hydroxylgruppe des benachbarten Nukleotids. Polynukleotide können durch die Restriktionsenzymaktivität der Nukleasen an mehr oder weniger spezifischen Stellen geschnitten werden. Je nach Substrat und Angriffspunkt lassen sich Nukleasen unterschiedlich klassifizieren. Exonukleasen spalten die Nukleinsäurekette von deren Enden ausgehend. Bei Endonukleasen erfolgt die Trennung dagegen innerhalb der Nukleinsäurekette. Desoxiribonukleasen (DNasen) spalten DNA und Ribonukleasen (RNasen) zerteilen RNA in kleinere Fragmente. RNasen sind allgegenwärtig. Im Gegensatz zu DNasen benötigen sie für ihre Aktivität keine Cofaktoren wie Magnesiumionen [Sambrook 1989] und sind sehr stabil, was deren außergewöhnlich hohe Reaktivität erklärt.

Durch konventionelle Oberflächenreinigung und Desinfektion (z.B. Alkohol) können RNasen nicht zerstört werden. Um eine erfolgreiche Analyse von RNA zu gewährleisten, ist jedoch streng auf eine RNase-freie Umgebung während der Bearbeitung zu achten. Daher wurde für die vorliegenden Studien ein gesonderter Arbeitsplatz für den ausschließlichen Umgang mit RNA eingerichtet, an dem die wesentlichen Chemikalien und Geräte, wie beispielsweise ein eigener Pipettensatz, zur Verfügung standen. Zusätzlich wurde ausschließlich mit sterilen, schwebstoffresistenten Einweg-Filter Spitzen gearbeitet, die den Transfer von RNasen durch die Pipette verhindern.

Zudem wurden Reagenzien verwendet, die RNasen inaktivieren. Dazu gehört Diethylpyrocarbonat (DEPC), das in entsprechender Konzentration (1:1000) zur Lösung (z.B. Wasser) gegeben, über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich autoklaviert wird. DEPC hydrolysiert dabei in  $\text{CO}_2$  und Ethanol. Diese Reaktion wird hauptsächlich durch 2-Amino-2-hydroxymethylpropane-1,3-diol (Tris) und andere primäre Amine vorangetrieben, die bei diesem Prozess selbst zerstört werden [Mühlhardt 2006]. Daher ist DEPC nicht für die Anwendung in Puffern geeignet, die Amine enthalten [Sambrook 1989]. Glaswaren und Verbrauchsmaterialien können des Weiteren für 2 h in 200 °C inkubiert oder mit Wasserstoffperoxid abgespült werden, um RNasen zu beseitigen.

Alternativ dazu werden kommerziell erhältliche, RNase inaktivierende Lösungen, wie z.B. RNase AWAY (Molecular Bioproducts), RNase ZAP (Applied Biosystems), RNase Off (Pure BioTech) oder RNase Exitus Plus (AppliChem) angeboten. RNasen können zudem durch Zugabe von RNase-Inhibitoren inaktiviert werden. Diese Möglichkeit fand ihre Anwendung während des DNase Verdaus (siehe 2.2.2).

Neben dem enzymatischen Abbau durch RNasen ist RNA von einer natürlichen postmortalen Degradierung betroffen. Um diesen Abbau zu begrenzen, wurde asserviertes Gewebe speziell gelagert (siehe 2.1.7). Arbeitsschritte, die eine kalte Umgebung verlangen, erfolgten zusätzlich auf Eis.

### 2.2.2 RNA-Extraktion mittels Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol

Die RNA wurde mittels des RNAgents® Total Isolation System-Kits der Firma Promega (Mannheim) extrahiert. Pro Probe wurden dafür 2 mL Denaturierungslösung in einem 15 mL Reaktionsgefäß vorgelegt. Diese Lösung dient dem Aufschließen von Zell- und Nukleoproteinkomplexen. Von dem bei -80 °C tiefgefrorenen Gewebe wurden jeweils 200 mg abgewogen, grob zerkleinert, in die Denaturierungslösung überführt und mit einem Homogenisierstab „IKA® T10 basic“ homogenisiert. Der Homogenisator wurde vor jeder zu bearbeitenden Probe mit RNaseAWAY® und DEPC-H<sub>2</sub>O gereinigt. Anschließend wurden 200 µL Natriumacetat (NaAc, pH 4) zugegeben und mit dem Homogenisat gut gemischt. Dadurch wird der saure pH-Wert des Zelllysats aufrecht gehalten. Natriumacetat verdrängt zudem größtenteils die Hydrathülle der RNA. Dies ist wichtig für das spätere Ausfällen der Nukleinsäuren. Nach Zugabe von 2 mL der organischen Phase eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (pH 4,7) wurden die Reaktionsansätze auf mittlerer Stufe kurz gevortext und 15 min auf Eis inkubiert. Der saure Zustand der Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung wirkt sich dabei hemmend auf eine vorhandene RNase-Aktivität aus. Die Proben wurden im Weiteren 20 min bei 10000 x g und 4 °C zentrifugiert. Denaturierte Nebenprodukte sammeln sich dabei in der organischen, unteren Phase sowie der Interphase an. Die extrahierten Nukleinsäuren befinden sich in der oberen, wässrigen Phase. Nach Überführen von etwa 1000 µL dieser oberen Phase in ein neues 2 mL Reaktionsgefäß erfolgte die Zugabe von Isopropanol im gleichen Volumen (1000 µL).

Die Fällung der RNA geschah durch eine einstündige Inkubation der Proben bei -20 °C. Nach erneuter Zentrifugation (10000 x g; 12 min; 4 °C) wurde der Überstand verworfen und 2000 µL eiskaltes Ethanol (75 %) zum RNA-Pellet hinzugegeben. Ethanol entfernt mögliche Reste von Phenol und Chloroform. Außerdem erhöht es aufgrund seiner chemischen Eigenschaften die Anziehungskraft zwischen unterschiedlich geladenen Teilchen. Es kommt dadurch zur Ionenbindung zwischen den Kationen aus dem anfangs zugegebenen NaAc und den Phosphatgruppen der RNA. Die RNA wird als Salz ausgefällt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 10000 x g und 4 °C und Verwerfen des Überstandes wurde das resultierende RNA-Pellet unter Vakuum und Wärme (ca. 43 °C) in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und schließlich in 100 µL nukleasefreiem H<sub>2</sub>O bei 56 °C gelöst. Die RNA Extrakte wurden schließlich bei -20 °C bzw. längerfristig bei -80 °C gelagert.

### 2.2.3 Entfernen genomischer DNA mittels DNase

Im RNA-Extrakt verbleibende genomische DNA wirkt sich störend auf nachfolgende Reaktionen und Analysen aus. Dies macht den DNase Verdau unumgänglich.

#### TURBO DNA-free™, Ambion

Für den DNase Verdau wurde der Turbo DNA-free Kit (Ambion) verwendet. Der Reaktionsansatz (Tabelle 2.7) beinhaltet neben dem Enzym DNase und einem Puffer einen RNase-Inhibitor (RNasin, Promega), der einen gleichzeitigen Abbau der RNA durch eventuell vorhandene RNasen verhindert.

Tabelle 2.7: Reaktionsansatz für eine DNase-Behandlung der RNA Extrakte

<b>Reaktionsansatz DNase Verdau</b>	
50 µL	RNA Extrakt
5 µL	10 x TURBO DNase Buffer (Ambion)
1 µL	TURBO DNase, 2 U/µL (Ambion)
1 µL	rRNAasin, 40 U/µL (Promega)

Der in Tabelle 2.7 dargestellte Reaktionsansatz wurde für 25 min bei 37 °C inkubiert. Durch die anschließende Zugabe von 5,7 µL „Stop-Reagenz“ erfolgte die DNase-Inaktivierung. Während der folgenden 2 min kühlten die Proben bei Raumtemperatur ab. Dabei wurde der Ansatz immer wieder kurz gevortext.

Die anschließende zweiminütige Zentrifugation erfolgte bei 10000 x g und 4 °C. Der Überstand, der die DNase-behandelte RNA enthielt, wurde schließlich vorsichtig abgenommen und in ein neues, RNase-freies 2 mL Eppendorfgefäß überführt.

### 2.2.4 Aufreinigung von RNA-Extrakten

#### RNeasy® Mini Kit, Qiagen

Für die Aufreinigung der RNA-Extrakte wurde das Aufreinigungsprotokoll des RNeasy® Mini Kits der Firma Qiagen GmbH (Hilden) verwendet. Theoretisch betrachtet wird die Aufreinigung der Extrakte durch eine Bindung der RNA an die Silika-Gel-Membran der RNeasy® Mini Spin Columns erreicht. Der Guanidin-Isothiocyanat-enthaltende RLT-Puffer inaktiviert RNasen. Das dem Puffer hinzugefügte Ethanol bewirkt eine Bindung der RNA an die Membran. Durch Waschen mit dem RPE-Puffer werden Verunreinigungen entfernt. Die aufgereinigte RNA kann schließlich mit nukleasefreiem Wasser eluiert werden.

Zu Beginn der Aufreinigung wurde jeder RNA-Extrakt zunächst mit nukleasefreiem Wasser auf ein Volumen von 100 µL aufgefüllt und anschließend mit 350 µL RLT-Puffer versetzt. Nach der Zugabe von 250 µL Ethanol (absolut) wurde die komplette Probe auf die Reinigungssäule aufgetragen. Es folgte eine einminütige Zentrifugation bei 8000 x g bei Raumtemperatur. Der Durchfluss wurde verworfen, die Säulchen auf ein neues 2 mL Reaktionsgefäß gesteckt und 500 µL RPE-Puffer hinzugegeben. Nach erneutem Zentrifugieren für 1 min bei 8000 x g und Raumtemperatur wurde der Durchfluss verworfen. Ein weiterer Zentrifugationsschritt beseitigte ungewünschte Flüssigkeitsreste. Schließlich wurden die Reinigungssäulen in ein neues, RNase-freies 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt und 50 µL nukleasefreies Wasser hinzu pipettiert. Ein letztes einminütiges Zentrifugieren bei 8000 x g und Raumtemperatur lieferte ein Eluat mit enthaltener aufgereinigter RNA.

DNase-verdaute (siehe 2.2.2) und aufgereinigte Proben wurden kurzfristig bei -20 °C und längerfristig bei -80 °C gelagert.

### 2.2.5 Quantifizierung der Gesamt-RNA

Die Konzentration von wässrigen Nukleinsäurelösungen kann photometrisch durch Messen der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt werden. Verantwortlich für die Absorption sind die konjugierten aromatischen Ringsysteme der Nukleinsäurebasen Adenin, Guanin, Cytosin und Uracil. Jedes Nukleotid hat dabei ein spezifisches Absorptionsspektrum und einen eigenen Extinktionskoeffizienten. Aus dem Verhältnis der  $OD_{260\text{nm}}$  und der  $OD_{280\text{nm}}$  (260/280) erhält man außerdem eine Aussage über die Proteinkonzentration der Lösung. Dieses Verhältnis sollte bei RNA zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Das NanoDrop®ND-1000 Gerät drückt die Information über die Reinheit der Proben neben dem 260/280 Verhältnis zusätzlich über eine Kurve aus (siehe Abbildung 2.1). Ein einzelner Peak bei einer Wellenlänge von etwa 260 nm korreliert mit einer hohen Quantität der RNA (Abbildung 2.1 A). Je höher der Peak, desto höher ist die RNA Konzentration der Probe. Eine mögliche Proteinverunreinigung würde durch einen Nebenpeak (oder eine „Schulter“ des Hauptpeaks) bei etwa 230 nm sichtbar werden (siehe Abbildung 2.1 B).

Die Quantifizierung und Reinheitsbestimmung der RNA-Extrakte erfolgte in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe eines NanoDrop®ND-1000 Gerätes. Dies ist ein Spezialphotometer zur Bestimmung der Lichtabsorption in sehr kleinen Volumina (1 bis 2  $\mu\text{L}$ ). Die Initialisierung des Gerätes erfolgt mit 2  $\mu\text{L}$  DEPC-Wasser, für die Einstellung des Nullpunktes werden 2  $\mu\text{L}$  nukleasefreies Wasser auf den Probenhalter pipettiert. Nach Entfernen des Wassers wird 1  $\mu\text{L}$  des unverdünnten, DNase verdauten und aufgereinigten RNA-Extrakts auf den Probenhalter gegeben und vermessen. Dabei muss darauf geachtet werden, dass der Probenhalter während der Messung nicht abreißt. Werden viele Messungen hintereinander durchgeführt, kann zwischenzeitlich nochmals Referenz-Wasser gemessen werden, um die Sauberkeit des Probenhalters sicherzustellen.

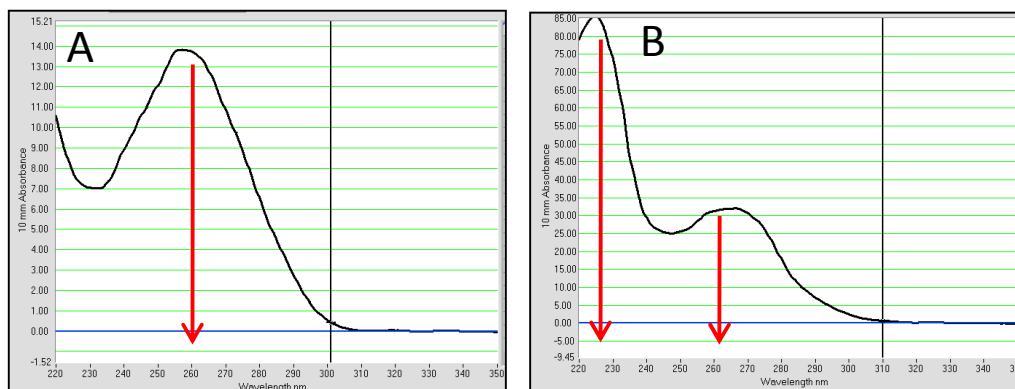


Abbildung 2.1: Messung der Quantität eines RNA-Extraktes mit Hilfe des NanoDrop ND-100 Gerätes. Neben der Menge des RNA Extraktes in  $\text{ng}/\mu\text{L}$  wird die Reinheit des Extraktes als Verhältnis der gemessenen Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm sowie 280 nm formuliert (260:280). Letzteres wird zusätzlich in Form einer Kurve dargestellt. A: DNase verdaute und aufgereinigte RNA-Probe, B: RNA-Probe, die weder DNase verdaut noch aufgereinigt wurde.

### 2.2.6 Messen der RNA-Integrität

Mit Hilfe eines Bioanalyser-Geräts und unter Verwendung des Agilent RNA 6000 Nano Kits wurde der Degradierungsstatus der RNA-Extrakte ermittelt. Nachdem ein RNA Nano-Chip in einem RNA-Mengenbereich von 50 – 500  $\text{ng}/\mu\text{L}$  optimal misst, wurden die RNA-Extrakte vor ihrer Integritätsmessung zum Teil entsprechend verdünnt.

### 2.2.7 Reverse Transkription

Mit Hilfe der Reversen Transkriptase wird ein cDNA-Strang synthetisiert, der komplementär zur extrahierten mRNA ist. Diese cDNA kann später als Matrize in einer PCR verwendet werden. Die Reverse Transkription wurde mit Hilfe des cDNA Archive Kits (Applied Biosystems) durchgeführt. Der dabei verwendete Reaktionsansatz ist im Folgenden aufgeführt (Tabelle 2.8)



Tabelle 2.8: Reaktionsansatz für die Reverse Transkription der RNA Extrakte

<b>Standard-Reaktionsansatz Reverse Transkription</b>	
5 µL	10 x RT Buffer (Applied Biosystems)
5 µL	10 x Random Hexamer Primers (Applied Biosystems)
2 µL	dNTP Mix 100 mM (Applied Biosystems)
2,5 µL	Multi Scribe Reverse Transcriptase, 50 U/µL (Applied Biosystems)
ad 25 µL	H <sub>2</sub> O, nukleasefrei

Nach Zugabe von 25 µL RNA-Extrakt wurde das PCR-Tube mit dem entsprechenden Reaktionsansatz in einen Thermocycler überführt. Die Reverse Transkription wurde gemäß dem in Tabelle 2.9 angegebenen Programm durchgeführt.

Tabelle 2.9: Cycler-Programm für die Synthese von cDNA

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur in °C</b>	<b>Dauer in h</b>
1	25	0 : 10
2	37	2 : 00
3	4	2 : 00

Die synthetisierten cDNAs wurden kurzfristig bei -20 °C, längerfristig bei -80 °C gelagert.

### 2.2.8 Quantitative Real-time PCR

Die in den vorangegangenen Schritten synthetisierte cDNA wurde im Weiteren in eine quantitative Real-time PCR (qPCR) eingesetzt.

Quantitative Real-time PCR zeichnet eine fluoreszierende Produktanreicherung in Real-Zeit auf. Zur Detektion des gebildeten PCR-Produktes werden interkalierende Farbstoffe oder Sonden mit fluoreszierenden Reportermolekülen verwendet (sog. FRET-Sonden). Die Fluoreszenz steigt dabei proportional zur gebildeten Menge des PCR-Produkts an. Weit verbreitet ist der Einsatz der TaqMan<sup>®</sup>-Sonden, die ebenfalls den Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) zu Detektion des PCR-Produktes nutzen. Die Detektion geschieht während der gesamten PCR-Reaktion, im Gegensatz zur herkömmlichen PCR, bei der mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese eine reine Endpunktbestimmung durchgeführt wird.

Die Quantifizierung von cDNA mittels Real-time PCR kann entweder als absolute oder als relative Quantifizierung durchgeführt werden. Die absolute Quantifizierung nutzt zur Berechnung der eingesetzten cDNA-Menge eine Standardkurve, die aus der Verdünnungsreihe einer cDNA bekannter Konzentration erstellt wird. Diese Standardkurve ergibt sich als lineare Beziehung zwischen dem  $C_q$ -Wert (cycle of quantification) und der eingesetzten Menge an cDNA und somit auch an RNA. Der  $C_q$ -Wert gibt den PCR-Zyklus an, bei dem die Fluoreszenz erstmals die Hintergrundfluoreszenz (Schwellenwert) übersteigt. Die Methode der absoluten Quantifizierung setzt voraus, dass bei allen Standards und Proben die gleiche Effizienz der Amplifikation zugrunde liegt. Da dies bei Genexpressionsuntersuchungen nicht als gegeben betrachtet werden kann, dient die relative Quantifizierung von cDNA häufig als Methode der Wahl. Bei der relativen Quantifizierung wird die gemessene Fluoreszenz ( $C_q$ -Wert) in das Verhältniss zum  $C_q$ -Wert einer weiteren Probe gesetzt. Beispielsweise werden die Daten einer Zielgruppe denen einer Kontrollgruppe gegenübergestellt. Der daraus resultierende Wert wird als die relative x-fache Änderung des mRNA-Levels eines Zielgens vom mRNA-Level einer internen Kontrolle ausgedrückt.

Der in dieser Arbeit verwendete Real-time PCR Standard-Reaktionsansatz ist in Tabelle 2.10 dargestellt.

Tabelle 2.10: qPCR Standard-Reaktionsansatz

<b>Standard-Reaktionsansatz qPCR</b>	
5 $\mu$ L	Universal Master Mix
0,5 $\mu$ L	Assay
4,5 $\mu$ L	cDNA

Jede cDNA wurde zunächst auf eine konstante Konzentration (z.B. 5 ng/ $\mu$ L) eingestellt, bevor sie zum qPCR-Reaktionsansatz gegeben wurde. Dazu diente UV-bestrahltes HPLC Wasser. Um die Expression gewählter Transkripte zu untersuchen, wurden die in Tabelle 2.11 aufgeführten Assays verwendet.

Die Quantifizierung einer 3fach seriellen Verdünnung von jedem dieser Assays diente der Erstellung einer Standardkurve. Auf Grundlage dieser Kurve wurde die Amplifikations-Effizienz E ( $E=10^{(-1/\text{Anstieg})}$ ) von jedem Assay berechnet.

Tabelle 2.11: Übersicht der Lage der Real-time PCR Assays im Gen (online unter <https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/direct/ab?cmd=ABGEResults>). k.A. = keine Angabe

Assay	Name des Gen-transkripts	Assay ID	Chromosom	Refseq.-Nr.	Exon-grenzen	Startpunkt	Amplikon-Länge [bp]
ACTB	Beta-Aktin	Hs00357333_g1	2	NM 001101.3	1-2	77	77
18S rRNA	18S rRNA	Hs99999901_s1	k.A.	k.A.	-	609	187
GAPDH	Glycerinaldehy-3-phosphat-Dehydrogenase	Hs00266705_g1	12	NM 002046.3	2 – 3	131	74
TBP	TATA-Bindeprotein	Hs00427620_m1	6	NM 003194.3	3 – 4	729	91
HPRT1	Hypoxanthin-phosphoribosyltransferase	Hs99999909_m1	X	NM 000194.1	6 – 7	562	100
B2M	Beta-2-Microglobulin	Hs00187842_m1	15	NM 004048.2	1 – 2	134	64
HMBS	Hydroxymethylbilane Synthase	Hs00609297_m1	11	NM 000190.3	1 – 2	186	64
SDHA	Sukzinat-Dehydrogenase	Hs00188166_m1	5	NM 004168.2	6 – 7	887	70
CYCA	Cyclophilin A	Hs99999904_m1	7	NM 021130.3	4 – 4	436	98
UBC	Ubiquitin C	Hs00824723_m1	12	NM 021009.4	1 – 2	444	71
HIF1 $\alpha$	Hypoxie induzierender Faktor I	Hs00936372_m1	14	NM 181054.2	2 – 3	631	77
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor	Hs00173626_m1	6	NM 001025366.2	1 – 2	1107	77
SLC2A1 (= Glut1)	Glukose Transporter I	Hs00197884_m1	1	NM 006516.2	2 – 3	645	70

Die Real-time PCR wurde in 96-well Platten (Applied Biosystems) pipettiert und mit einer optischen Folie bedeckt. Die Amplifikation erfolgte im 7500 Sequence Detection System-Gerät (Applied Biosystems) nach dem in Tabelle 2.12 dargestellten Programm.

Tabelle 2.12: Programm der quantitativen Real-time PCR im 7500 Sequence Detection System-Gerät (Applied Biosystems)

Real-time PCR		
Schritt	Temperatur in °C	Dauer in h
1	95	0 : 10 : 00
2	95	0 : 00 : 15
3	60	0 : 01 : 00
4	Go to 2	40 x

Die Ergebnisse der Real-time PCR wurden elektronisch gespeichert und mit der 7500 System SDS Software Version 1.2.3 (Applied Biosystems) ausgewertet.

Neben den zu untersuchenden Proben wurde in jedem Real-Time PCR-Experiment sowohl eine Negativ- als auch eine Positivkontrolle mitgeführt. Letztere sollte mögliche plate-to-plate Unterschiede detektieren. Als Positivkontrolle diente eine cDNA, die durch die reverse Transkription einer kommerziell erhältlichen Herz-RNA synthetisiert wurde.

### 2.2.9 Berechnung der Expressionsstabilität

Die in der qPCR gewonnenen Daten wurden in die Excel-basierte Software geNorm (<http://www.gene-quantification.info/>) importiert. Dieses Programm berechnet aus dem gegebenen Set untersuchter Gene das im jeweiligen Gewebe stabilste endogene Kontrollgen. Zusätzlich bestimmt es die minimale Anzahl an Genen, die zur Kalkulierung eines verlässlichen Normalisierungsfaktors benötigt werden.

Grundlage der geNorm-Analyse sind die in der qPCR ermittelten *cycle of quantification*-Werte ( $C_q$ -Werte) der doppelt aufgetragenen Proben. Aus diesen  $C_q$ -Doppelwerten wird der arithmetische Mittelwert gebildet, der anschließend nach absteigender Größe sortiert wird, um daraus den  $-\Delta C_q$  Wert zu berechnen. Der  $-\Delta C_q$ -Wert ergibt sich durch Subtraktion des höchsten  $C_q$ -Wertes eines qPCR-Ansatzes von jedem niedrigeren  $C_q$ -Wert. Unter Einbeziehung der wahren assayspezifischen PCR-Effizienz (siehe 2.2.8) ermittelt die exponentielle Funktion  $E^{-\Delta C_q}$  anschließend von jedem untersuchten Transkript die relative, nicht-normalisierte Quantität. Diese Quantitäten können schließlich zur Ermittlung der stabilsten endogenen Kontrolle in die geNorm Software importiert werden.

Die in der Software für alle Kontrollgene automatisch ermittelte Gen-Expressionsstabilität (*gene-stability measure*) wird über den sogenannten M-Wert ausgedrückt. Dieser Wert beruht auf der Tatsache, dass das Expressionsverhältnis von zwei idealen internen Kontrollgenen unabhängig von experimentellen Bedingungen in allen Proben identisch ist. Eine Änderung des Expressionsverhältnisses von zwei Genen würde daher bedeuten, dass eines der Gene oder beide Gene nicht konstant exprimiert werden. Der M-Wert ergibt sich aus der paarweisen Variation der Standardabweichung des logarithmierten Expressionsverhältnisses eines Kontrollgens mit dem Verhältnis der übrigen untersuchten Gene [Vandesompele 2002]. Die Gene mit dem niedrigsten M-Wert zeigen die Expression mit der größten Stabilität. Bei einer paarweisen Variation eines Gen-Sets wird schrittweise das Gen mit dem jeweils höchsten M-Wert ausgegrenzt und ein neuer M-Wert für die verbleibenden Gene errechnet [Formel 4, Vandesompele 2002]. Voraussetzung dafür ist das Fehlen einer Co-Regulation zwischen den Genen. Schließlich resultieren die zwei Gene mit dem im jeweiligen Gewebe niedrigsten M-Wert. Dieses Ergebnis wird in der Software grafisch dargestellt (siehe Abbildung 2.2).

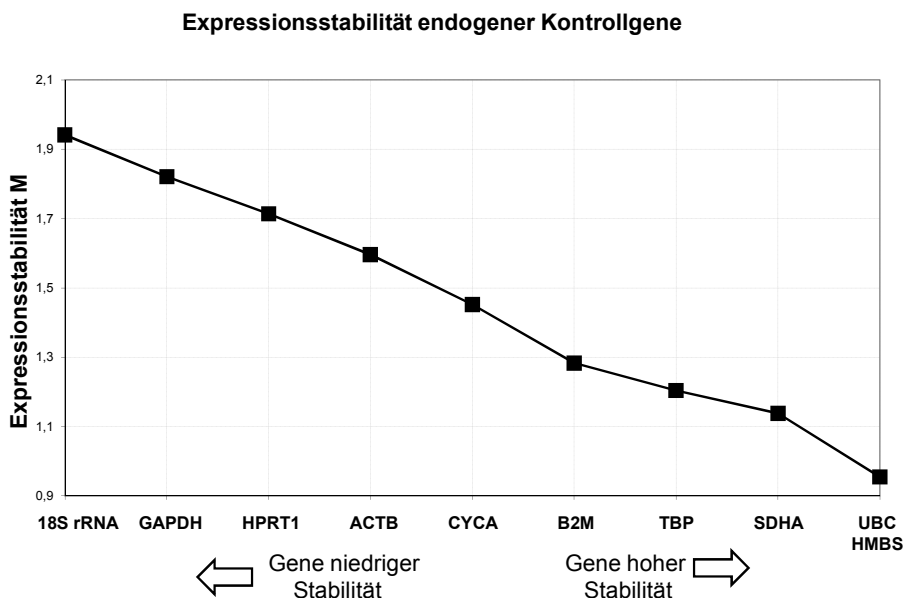


Abbildung 2.2: Ergebniss einer geNorm-Analyse. Die endogenen Kontrollgene werden grafisch in Abhängigkeit des ermittelten Expressionsstabilitätswertes M im Diagramm aufgetragen. Gene mit niedrigem M-Wert weisen eine hohe Transkriptstabilität auf.

Des Weiteren berechnet die geNorm-Software einen RT-PCR-Normalisierungsfaktor (NF). Dieser soll Varianzen im experimentellen Ablauf ausgleichen. Der Normalisierungsfaktor ergibt sich aus dem geometrische Mittel der Standardabweichungen einer bestimmten Anzahl von Referenzgenen. Durch die Bildung des geometrischen und nicht des arithmetischen Mittelwertes werden streuende Werte besser ausgeglichen [Szabo 2004].

Es wäre unvorteilhaft, mehr Gene zu quantifizieren, als eigentlich erforderlich sind. Dies trifft besonders dann zu, wenn alle untersuchten Kontrollgene relativ stabil exprimiert werden und sich der Normalisierungsfaktor auch bei einer größeren Anzahl an Referenzgenen nicht ändern würde. Ausgehend von den drei stabilsten endogenen Kontrollgenen werden daher schrittweise weitere Kontrollgene in die Kalkulation des NF mit einbezogen. Dies geschieht so lange, bis das neu hinzukommende ( $n+1$ te) Gen keinen signifikanten Einfluss mehr auf den Normalisierungsfaktor hat.

Die paarweise Variation  $V$  gibt zwischen zwei aufeinanderfolgenden, neu kalkulierten Normalisierungsfaktoren ( $NF_n$  und  $NF_{n+1}$ ) Auskunft über den Bedarf und Nutzen zusätzlicher Gene. Ausgehend von den drei stabilsten Genen ergibt sich der Wert  $V$  aus dem Quotient eines Gens ( $n$ ) mit einem hinzugefügten Gen ( $n+1$ ). Das heißt, mit der Formel  $V = n/n+1$  werden schrittweise weitere Kontrollgene in die Kalkulation der paarweisen Variation einbezogen. Ist  $V > 0,15$ , dann werden weitere Kontrollgene für eine Datennormalisierung benötigt. Erst wenn die paarweise Variation den Wert 0,15 erreicht oder unterschreitet, hätte ein zusätzliches endogenes Kontrollgen keinen relevanten Einfluss mehr auf den Normalisierungsfaktor und ist daher nicht mehr notwendig. Der Grenzwert  $V \leq 0,15$  wurde von Vandesompele et al. [Vandesompele 2002] festgelegt. Die Autoren wiesen jedoch darauf hin, dass er je nach Probenet veränderlich ist. Die dadurch ermittelte Mindestanzahl an stabilen endogenen Kontrollgenen, die für eine verlässliche Datennormalisierung erforderlich sind, wird in der Software grafisch dargestellt (siehe Abbildung 2.3).

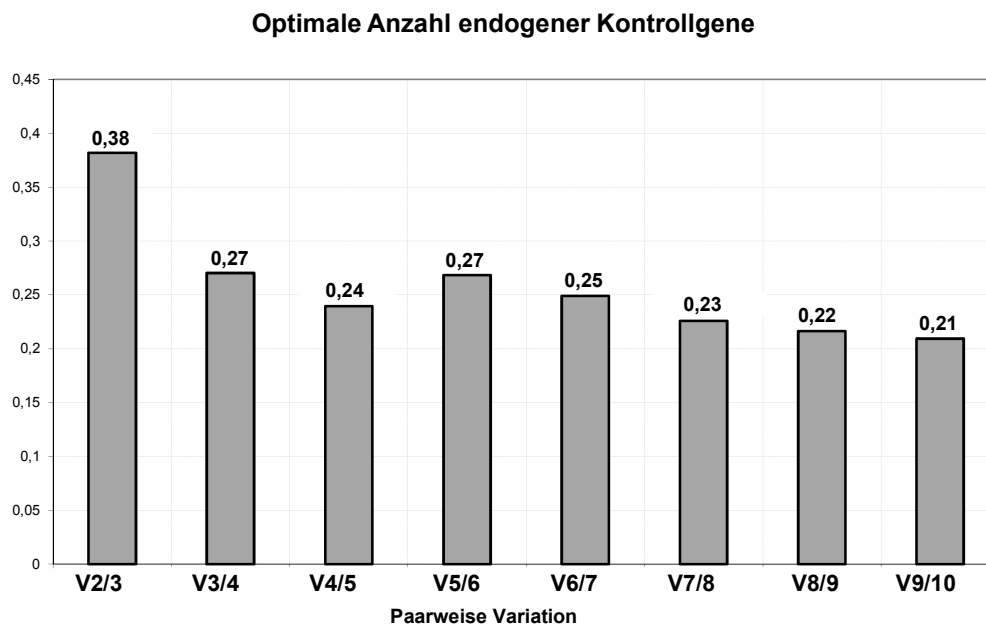


Abbildung 2.3: Ergebniss einer geNorm-Analyse. Der mathematisch ermittelte V-Wert (y-Achse) gibt die optimale Mindestanzahl endogener Kontrollgene (x-Achse) an, die für eine verlässliche Normalisierung von Genexpressionsdaten erforderlich ist.

### 2.2.10 qBase – Ermitteln der Expressionsunterschiede

Die aus der qPCR resultierenden  $C_q$ -Doppelwerte von instabilen Genen wurden schließlich in die Excel-basierte Software qBase [Hellemanns 2007] importiert. Dieses Programm normalisiert die Daten gegen stabile endogene Kontrollgene. Ein vorheriges Gruppieren der Proben z.B. nach der Todesursache ermöglicht schließlich das Ermitteln parameterspezifischer Unterschiede im Expressionslevel der untersuchten Gene. Verschiedene bei der qBase-Analyse angewendete Algorithmen ähneln denen, die in geNorm benutzt werden. Abschnitt 1.8.2 gibt eine Übersicht über den Ablauf der Datenanalyse. Die resultierenden Ergebnisse können für weiterführende statistische Analysen in die Excel-Software exportiert werden.

### 2.2.11 Statistische Auswertung und Darstellung

Für statistische Berechnungen (z.B. Mann-Whitney-U-Test) bzw. Plot-Darstellungen wurde das Programm SPSS (Version 15.0 oder 18.0) verwendet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 RNA-Integrität an postmortalen Gewebeproben

Anhand von 136 Proben (47 Herzmuskel-, 44 Skelettmuskel- und 45 Gehirngewebsproben), die von 49 Individuen (siehe Tabelle 8.1, 8.3 und 8.5) entnommen wurden, sollte die vorliegende Teilstudie den Einfluss verschiedener prä- und postmortaler Faktoren auf die Integrität von RNA aus postmortalem Gewebe untersuchen. Aufgrund der jeweiligen Todesart und Todesumstände konnten nicht von allen Individuen alle Gewebearten asserviert werden. Beispielsweise kann von einem Verstorbenen mit massivem Schädeltrauma nach Verkehrsunfall eventuell keine Gewebeprobe aus der relevanten Gehirnregion (Frontallappen) entnommen werden. Daraus resultiert eine Diskrepanz zwischen der Anzahl der Individuen und der Anzahl der einzelnen Gewebeproben.

#### 3.1.1 Probenaufbereitung und Qualitätskontrolle

##### Probencharakterisierung und RNA-Extraktion

Für die Isolation der RNA wurden, wie in 2.2.2. beschrieben, der RNagents Total Isolation System-Kit (Promega, Mannheim, Germany) und je 200 mg Gewebe verwendet. Die Extraktion verlief erfolgreich für alle 136 Proben, die von 31 männlichen- und 18 weiblichen Individuen während der Routinesektion asserviert wurden (siehe Tabelle 8.2). Das mittlere Alter der Probenspender zum Todeszeitpunkt lag bei 46 Jahren (12 bis 87 Jahre). Der Zeitraum zwischen Versterben und Probenentnahme (Postmortal-Intervall / PMI) bewegte sich in einem Rahmen von 4 bis 94 Stunden (mittleres PMI 26,9 Stunden). Basierend auf den routinemäßig stattfindenden makroskopischen, mikroskopischen, biochemischen und toxikologischen Untersuchungen wurde bei neun Individuen ein Tod durch Erstickten bzw. Ertrinken, bei 12 Individuen ein Tod aus kardialer Ursache, bei 13 Individuen ein Tod durch zentrale Dysregulation, bei 6 Individuen ein Tod infolge eines Polytraumas und bei sieben Individuen ein Tod durch Verbluten diagnostiziert. Ein Individuum verstarb infolge einer Pneumonie und ein Individuum infolge einer Rauchgasintoxikation.



### Photometrische Quantifizierung der RNA-Extrakte

Quantität und Reinheit der 136 erfolgreich-DNase-behandelten und aufgereinigten RNA-Extrakte wurden mit einem Nano Drop ND-1000-Gerät ermittelt (siehe 2.2.5). Dies ergab eine mittlere RNA-Menge von 378 ng/μL aus Herzgewebe (Bereich von 24,47 ng/μL bis 1089,48 ng/μL), von 228,13 ng/μL aus Muskelgewebe (Bereich von 21,97 ng/μL bis 522,54 ng/μL) bzw. von 264,27 ng/μL RNA aus Gehirngewebe (Bereich von 23,35 ng/μL bis 660,71 ng/μL) (siehe Tabelle 8.3 und Tabelle 8.5).

Das Verhältnis aus der bei 260 nm sowie 280 nm gemessenen optischen Dichte lag bei 129 der insgesamt 136 DNase-behandelten und aufgereinigten RNA Extrakte zwischen 1,9 und 2,1. Sieben der 136 Proben lieferten Werte, die davon abwichen (MS 184/07 Herzmuskel, Skelettmuskel und Gehirn; MS 230/07 Herzmuskel, Skelettmuskel und Gehirn; FR 01/08 Skelettmuskel) (siehe Tabelle 8.3 und Tabelle 8.5).

### Bestimmung der RNA Integrität

Die Integrität der RNA Extrakte wurde erfolgreich für 136 RNA-Extrakte mit einem Agilent Bioanalyser Gerät gemessen (siehe 2.2.6). Demnach ergab sich für die RNA aus Herzmuskelgewebe eine mittlere RIN von 3,8 (Bereich von 1,2 bis 8,0). In Skelettmuskelgewebe wurde eine mittlere RIN von 4,4 (Bereich von 1,6 bis 7,6) gemessen, in Gehirngewebe eine mittlere RIN von 2,8 (Bereich von 1,0 bis 6,2). Sämtliche Ergebnisse der Integritäts-Messung sind in Tabelle 8.3 sowie Tabelle 8.5 aufgeführt. Die Integritäts-Messung von neun RNA-Extrakten verlief ohne Ergebnis (zwei Proben aus Herzmuskel-, fünf Proben aus Skelettmuskel-, zwei Proben aus Gehirngewebe). Diese Proben wurden aus sämtlichen Analysen ausgeschlossen.

### 3.1.2 Einfluss verschiedener Parameter auf die RNA-Integrität

#### Einfluss des Gewebetyps

Die Ergebnisse der Integritäts-Bestimmung sämtlicher RNA-Proben (47 Herzmuskel-, 44 Skelettmuskel- und 45 Gehirn-RNA-Extrakte) wurde mit Hilfe von SPSS als Box-Whisker Plot grafisch dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den mittleren Integritäten der RNA jeden Gewebetyps wurden mittels Mann-Whitney-U-Tests (SPSS) kalkuliert. Die Berechnung ergab, dass im Vergleich zu postmortalem Herzmuskel- bzw. Skelettmuskelgewebe in RNA-Extrakten, die aus postmortalem Gehirngewebe isoliert wurden, statistisch signifikant niedrigere RNA-Integritäten vorlagen (Abbildung 3.1).

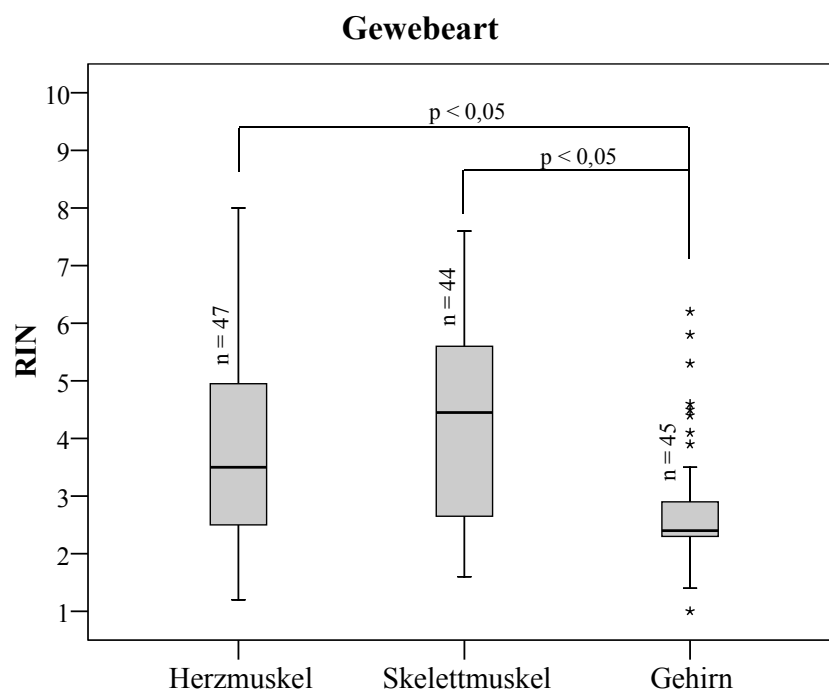


Abbildung 3.1: Box-Whisker Plot der RIN-Werte von 136 postmortalen Gewebeproben. Die aus Gehirngewebe extrahierten RNA-Proben wiesen statistisch signifikant niedrigere RNA-Integritäts-Nummern auf ( $p < 0,05$ ) als RNA-Proben, die aus Herzmuskel- bzw. Skelettmuskelgewebe isoliert wurden (berechnet mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests (SPSS)).

Einfluss des postmortalen Intervalls

Um den Einfluss des postmortalen Intervalls auf die Integrität der extrahierten RNA zu untersuchen, wurden die RIN-Nummern gegen das PMI der jeweiligen Probe aufgetragen (Abbildung 3.2). In die Analyse wurden ausschließlich RNA-Extrakte von Individuen einbezogen, die ein PMI von weniger als 50 Stunden aufwiesen.

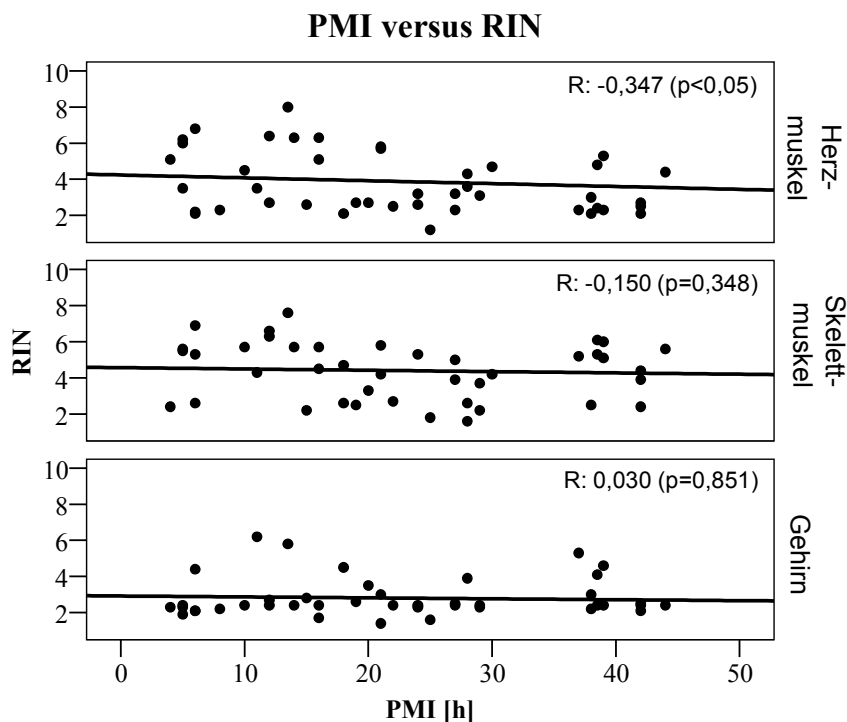


Abbildung 3.2: Streuungs-Diagramm der RNA-Integritäts-Nummern (RIN) von 126 postmortalen Gewebeproben und der Dauer des postmortalen Intervalls. Die Pearson-Korrelation (R) sowie die statistische Signifikanz (p) wurden mittels SPSS berechnet.

Die Berechnung der Pearson-Korrelation zwischen den Parametern RIN und PMI mittels SPSS erwies sich in postmortalem Herzmuskelgewebe statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ). Sowohl in Skelettmuskel- als auch in Gehirngewebe wurde keine statistisch signifikante Korrelation gefunden.

Einfluss des Alters zum Todeszeitpunkt

Für die Untersuchung des möglichen Einflusses des Sterbealters wurden sämtliche Probenspender auf drei Gruppen aufgeteilt. Die erste Gruppe (< 35 Jahre) umfasste alle Individuen, die das 35. Lebensjahr nicht erreicht hatten. Weiterhin wurden Probenspender gruppiert, die im Zeitraum von 35 bis 50 Jahren verstorben waren (35-50 Jahre) bzw. die älter als 50 Jahre wurden (> 50 Jahre). Die Ergebnisse der Analyse sind in Abbildung 3.3 grafisch dargestellt. Die Anzahl der Individuen, die den einzelnen Gruppen zugeordnet wurden, sind als n-Wert angegeben. Die statistische Berechnung mittels des Mann-Whitney-U-Tests (SPSS) ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den gewählten Altersgruppen und der Integrität der extrahierten RNA-Proben.

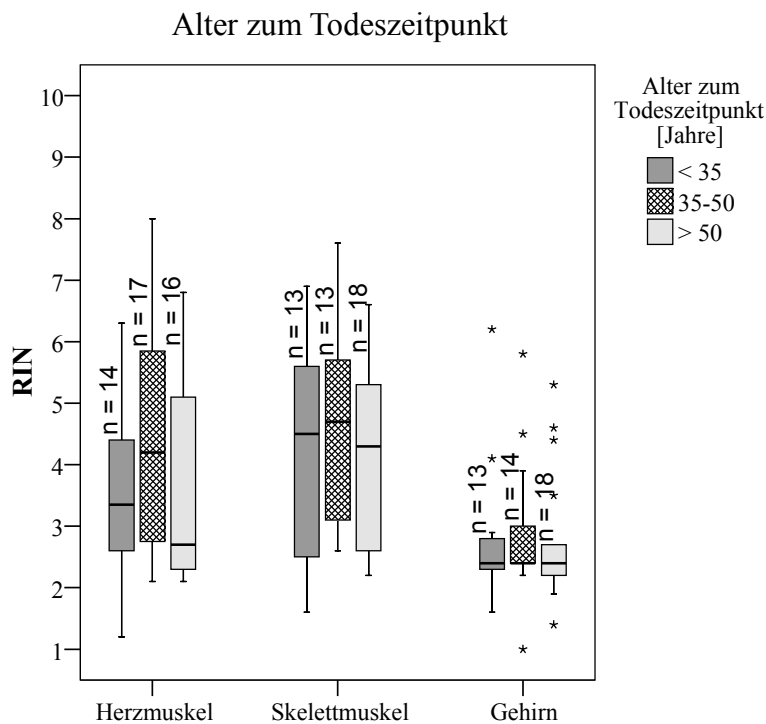


Abbildung 3.3: Box-Whisker Plot der RNA-Integritäts-Nummern (RIN) gruppiert nach dem Alter der Probenspender zum Todeszeitpunkt. In keinem der drei untersuchten Gewebe wurde ein signifikanter Unterschied zwischen der gemessenen RNA-Integrität der einzelnen Altersgruppen detektiert. Der jeweilige Probenumfang ist als n-Wert angegeben.

Einfluss des Geschlechts

Um einen möglichen Einfluss des Geschlechts auf die Integrität der aus postmortalem Gewebe extrahierten RNA aufzudecken, wurden die RIN Werte der 136 RNA-Extrakte nach dem Geschlecht des Probenspenders sortiert und im Diagramm gegeneinander geplottet (Abbildung 3.4). Die Anzahl der weiblichen bzw. männlichen Individuen sind in der Abbildung als n-Wert angegeben. Die statistische Berechnung mittels des Mann-Whitney-U-Tests (SPSS) ergab keinerlei signifikante Unterschiede zwischen dem Geschlecht des Probenspenders und der Integrität der extrahierten RNA-Proben.

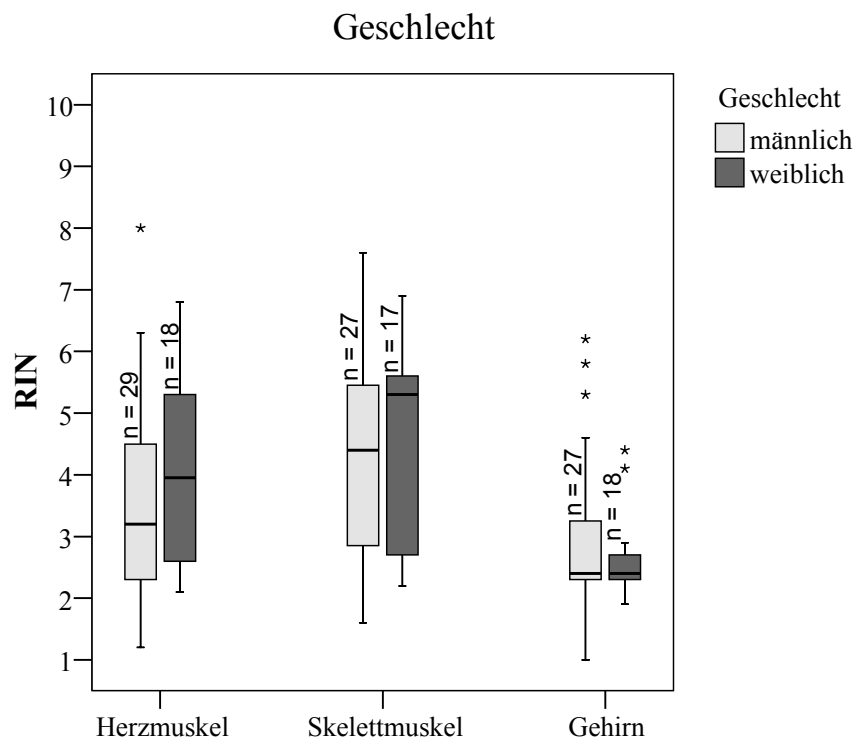


Abbildung 3.4: Box-Whisker Plot der RIN-Werte gruppiert nach dem Geschlecht der in die Studie einbezogenen 49 Probenspender. In keinem der drei untersuchten Gewebe wurde ein signifikanter Unterschied zwischen der gemessenen RNA-Integrität der männlichen und weiblichen Probenspender detektiert. Der jeweilige Probenumfang ist als n-Wert angegeben.

Einfluss der Agoniedauer

Die Agonie bezeichnet die Gesamtheit der prämortalen Vorgänge. Je nach Todesursache kann sie in ihrer Dauer variieren. Um zu untersuchen, ob ein agoniebedingter Einfluss auf die Integrität der extrahierten RNA besteht, wurden sämtliche Proben in zwei Untergruppen aufgeteilt. Die Gruppe „>1min“ umfasst die Proben von Individuen, deren Sterbeprozess länger als eine Minute andauerte. Bei einem sofort eintretenden Tod, zum Beispiel durch plötzliches Herzversagen oder per akut tödliches Trauma, ist die Dauer der agonalen Phase jedoch kürzer als eine Minute. Individuen mit derartigen Todesursachen wurden daher in der Gruppe „<1min“ zusammengefasst. Bei einer agonalen Phase von weniger als einer Minute kann angenommen werden, dass die Genexpression keine oder nur eine sehr geringe Änderung erfährt. In den meisten Fällen ist die exakte Dauer der agonalen Phase jedoch nicht bestimmbar, was eine Unterteilung in weitere Gruppen unmöglich macht. Abbildung 3.5 zeigt die Ergebnisse der statistischen Analyse. Die Anzahl der Individuen, die den Gruppen zugeordnet wurden, sind als n-Wert angegeben.

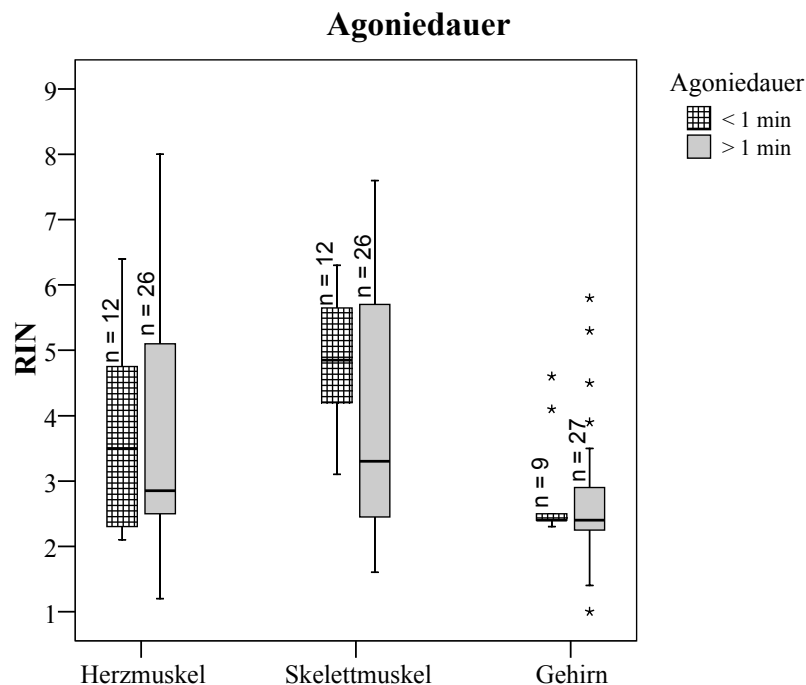


Abbildung 3.5: Box-Whisker Plot der RNA-Integritäts-Nummern (RIN) gruppiert nach der Dauer der Agonie der Probenspender. In keinem der drei untersuchten Gewebe wurde ein signifikanter Unterschied zwischen der gemessenen RNA-Integrität und der jeweiligen Agoniedauer gefunden. Der jeweilige Probenumfang ist als n-Wert angegeben.

Der Grund für den geringen Probenumfang bei diesem Vergleich ist der Mangel an Informationen über die Sterbephase. Es wurde vorzugsweise mit kleineren, jedoch gut definierten Gruppen gearbeitet, als mit größeren, dafür heterogeneren Gruppen.

Die statistische Berechnung mittels des Mann-Whitney-U-Tests (SPSS) ergab keinerlei signifikante Unterschiede zwischen der Agoniedauer und der Integrität der aus dem jeweiligen Gewebe extrahierten RNA-Proben.

### Einfluss der Todesursache

Für die Untersuchung eines möglichen Einflusses der Todesursache auf die Integrität der extrahierten RNA wurden die Probenspender in vier exakt umschriebene Gruppen eingeteilt. Das heißt, es wurden ausschließlich solche Proben für die Analyse verwendet, die laut Sektionsprotokoll eindeutig in eine der vier Kategorien „Zentrale Dysregulation“, „Ersticken“, „plötzlicher Herztod“ oder „Verbluten“ eingeordnet werden konnten.

Todesursachen, die von diesen festgelegten Gruppen abwichen, wurden aus der Analyse ausgeschlossen, um eine zu große Inhomogenität bzw. eine zu niedrige Replikanzahl in neu hinzukommenden Gruppen zu vermeiden. Die Ergebnisse der Analysen sowie die Anzahl der Individuen, die den Gruppen zugeordnet wurden (angegeben als n-Wert), sind in Abbildung 3.6 dargestellt.

Anders als in Gehirngewebe wiesen RNA-Proben, die nach einem plötzlichen Herztod aus Herzmuskel- und Skelettmuskelgewebe extrahiert wurden, eine niedrigere Integrität auf als RNA-Proben derselben Gewebe nach anderer Todesursache (in Skelettmuskel) bzw. nach Ersticken (in Herzmuskel). Die statistische Berechnung mittels des Mann-Whitney-U-Tests (SPSS) ergab jedoch keinerlei signifikante Unterschiede zwischen der Todesursache des Probenspenders und der Integrität der aus dem jeweiligen Gewebe extrahierten RNA-Proben.

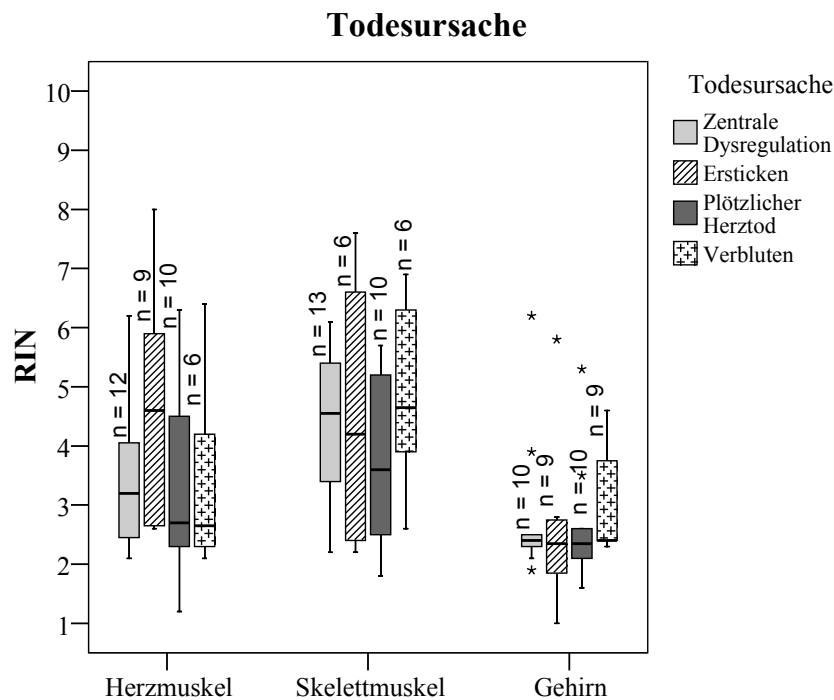


Abbildung 3.6: Box-Whisker Plot der RNA-Integritäts-Nummern (RIN) gruppiert nach der Todesursache der Probenpender. In postmortalem Herzmuskel- und Skelettmuskelgewebe wurden nach plötzlichem Herztod niedrigere RIN-Werte gemessen als nach anderer Todesursache. In keinem der drei untersuchten Gewebe wurde jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen der gemessenen RNA-Integrität und der jeweiligen Todesursache festgestellt. Der jeweilige Probenumfang ist als n-Wert angegeben.

### Einfluss des Body Mass Index

Der Body Mass Index ist ein grober Richtwert, der die Körpermasse eines Menschen in Relation zu seiner Körpergröße angibt. Er wird unter Anwendung der Formel  $BMI = m/l^2$  errechnet, wobei  $m$  die Körpermasse (in Kilogramm) und  $l$  die entsprechende Körpergröße (in Metern) angibt. Um den Einfluss des Body Mass Index auf die Integrität der RNA zu untersuchen, wurden sämtliche Proben in zwei Gruppen gegliedert. Diese ergaben sich in Anlehnung an die Bewertung der Weltgesundheitsorganisation WHO, die einen erwachsenen Menschen mit einem  $BMI > 25$  als prä-adipös bzw. übergewichtig definiert ([index.jsp?introPage=intro\\_3.html](http://index.jsp?introPage=intro_3.html)).



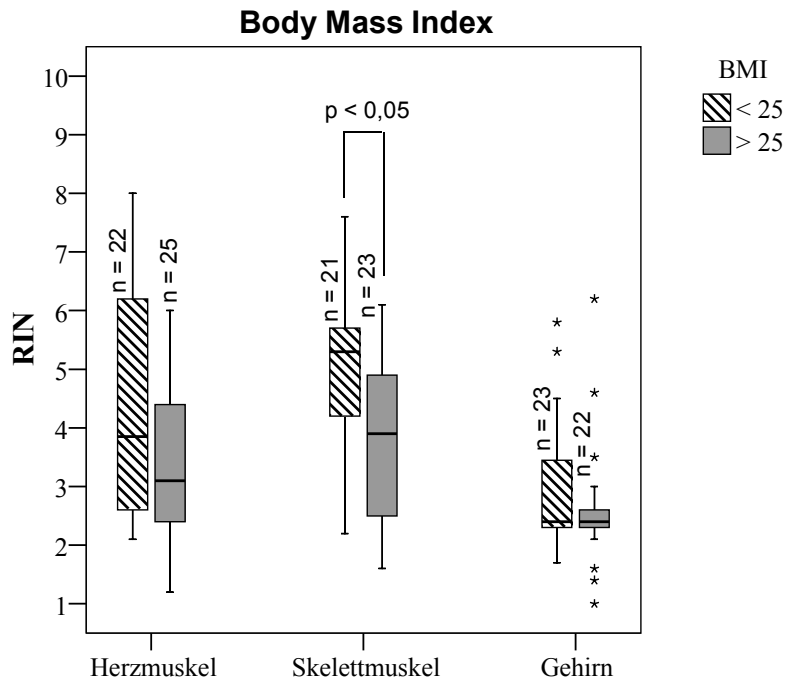


Abbildung 3.7: Box-Whisker Plot der RNA-Integritäts-Nummern (RIN) gruppiert nach dem Body Mass Index der Probenspender. In postmortalem Skelettmuskelgewebe wurden bei Individuen mit einem BMI < 25 statistisch signifikant höhere RIN-Werte gemessen als bei Probenspendern, die einen BMI > 25 aufwiesen. Der jeweilige Probenumfang ist als n-Wert angegeben.

Die statistische Berechnung mittels des Mann-Whitney-U-Tests (SPSS) deckte einen statistisch signifikanten Unterschied der Integrität von RNA-Extrakten auf, die aus postmortalem Skelettmuskelgewebe isoliert worden waren. Demnach zeigten die RNA-Extrakte von Individuen mit einem BMI > 25 signifikant niedrigere RNA-Integritäten als RNA-Proben von normal- oder untergewichtigen Individuen. Die Ergebnisse der Analyse sind in Abbildung 3.7 grafisch dargestellt. Darin ersichtlich ist ebenso der n-Wert, der die Anzahl der Individuen, die den Gruppen „BMI < 25“ bzw. „BMI > 25“ zugeordnet wurden, angibt.

### 3.2 Stabilität endogener Kontrollgene in postmortalen Gewebeproben

Für die Detektion von parameterabhängigen Unterschieden der Expression von Zielgenen ist die Normalisierung der Daten gegen validierte, stabile endogene Kontrollgene essentiell. Die vorliegende Teilstudie sollte daher 10 endogene Kontrollgene hinsichtlich deren Transkriptstabilität in postmortalem Herzmuskel-, Skelettmuskel- und Gehirngewebe untersuchen.

#### 3.2.1 Probenaufbereitung und Qualitätskontrolle

##### Ergebnisse aus einer Vorstudie

Aus 111 humanen postmortalen Gewebeproben (37 Herzmuskel-, 37 Skelettmuskel- und 37 Gehirnproben), die von 37 Individuen während der Routinesektionen asserviert wurden, erfolgte die Extraktion von RNA mittels Phenol-Chloroform (siehe 2.2.2). Die Quantität und Reinheit der DNase-behandelten und aufgereinigten RNA Extrakte wurde mit einem NanoDrop®ND-1000 Gerät gemessen (siehe 2.2.5). Dies ergab eine mittlere RNA-Menge von 363 ng/μL aus Herzmuskelgewebe (Bereich von 43,71 ng/μL bis 710,10 ng/μL), von 210 ng/μL aus Skelettmuskelgewebe (Bereich von 49,06 ng/μL bis 214,21 ng/μL) bzw. von 235 ng/μL RNA aus Gehirngewebe (Bereich von 52,44 ng/μL bis 140,79 ng/μL) (siehe Tabelle 8.3). Das Verhältnis aus der bei 260 nm sowie 280 nm gemessenen optischen Dichte wies bei 105 der insgesamt 111 DNase-behandelten und aufgereinigten RNA Extrakte ein Verhältnis zwischen 1,9 und 2,1 auf. Sechs der 111 Proben lieferten Werte, die davon abwichen (MS 184/07 Herzmuskel, Skelettmuskel und Gehirn; MS 230/07 Herzmuskel, Skelettmuskel und Gehirn) (siehe Tabelle 8.3).

### Integrität der RNA Extrakte

Die RNA Integritäts-Messung mittels Bioanalyzer (siehe 2.2.6) wurde für 98 der insgesamt 111 RNA-Extrakte erfolgreich durchgeführt. RNA, die aus Herzmuskelgewebe isoliert wurde, wies eine mittlere RIN von 3,9 (Bereich von 2,1 bis 6,8) auf. RNA aus Skelettmuskelgewebe lieferte eine mittlere RIN von 4,3 (Bereich von 1,6 bis 6,9), RNA aus Gehirngewebe eine mittlere RIN von 2,9 (Bereich von 1,4 bis 6,2). Sämtliche Ergebnisse aus dieser Vorstudie sind in Tabelle 8.3 zusammenfassend dargestellt.

### Quantitative Real-time PCR

Nach der reversen Transkription sämtlicher RNA-Proben in komplementäre DNA wurden die Gentranskripte von ACTB, 18S rRNA, GAPDH, TBP, HPRT1, B2M, HMBS, SDHA, CYCA und UBC mittels quantitativer Real-Time PCR (RT-PCR) quantifiziert. Vorher wurden zunächst die Effizienzen der dafür genutzten PCR-Assays ermittelt.

#### a) Assay-spezifische PCR-Effizienz

Aus der Quantifizierung einer 3fach seriell verdünnten cDNA wurde eine Standard-Kurve erstellt (Abbildung 3.8). Anhand deren Steigung sowie unter Anwendung der Formel  $E=10^{(-1/\text{Steigung})}$  wurde die Amplifikationseffizienz (E) der PCR-Assays der 10 endogenen Kontrollgene ACTB, 18S rRNA, GAPDH, TBP, HPRT1, B2M, HMBS, SDHA, CYCA und UBC ermittelt. Die niedrigste Effizienz erreichte mit 87 % das PCR-Assay von SDHA. Das Transkript-Assay von ACTB lieferte mit 110% (ACTB) die höchste PCR Effizienz. Die Effizienzen sämtlicher PCR-Assays sind in Tabelle 3.1 zusammenfassend aufgeführt.

Die für jede Verdünnungsreihe genutzte cDNA resultierte aus der reversen Transkription einer kommerziell erhältlichen Skelettmuskel-RNA sehr guter Qualität. Sämtliche Proben der Verdünnungsreihe wurden in Duplikaten in die quantitative Real-Time PCR (RT-qPCR) eingesetzt.

Der Korrelationskoeffizient  $R^2$  lieferte Hinweise über die Lage jeder cDNA auf ihrer Standardkurve. Für sieben PCR-Assays wurde ein  $R^2 > 0.9$  erreicht. Für drei Transkript-Assays lag der Wert von  $R^2$  bei 0,89 (siehe Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Aus Standardkurven abgeleitete PCR Effizienzen der einzelnen PCR-Assays. Der Korrelationskoeffizient  $R^2$  liefert Informationen über die Lage der doppelt aufgetragenen Proben auf ihrer Standardkurve. Aus dem Anstieg der Standardkurve und der Formel  $E=10^{(-1/\text{Steigung})}$  kann die Effizienz eines PCR-Assays ermittelt werden.

Assay	$R^2$	Anstieg	Effizienz [%]
ACTB	< 0,99	-3,10	110
GAPDH	< 0,99	-3,48	94
18S rRNA	0,98	-3,20	105
B2M	< 0,99	-3,52	92
HPRT	0,98	-3,16	107
TBP	< 0,99	-3,43	96
UBC	0,98	-3,19	106
SDHA	< 0,99	-3,68	87
HMBS	< 0,99	-3,51	93
CYCA	< 0,99	-3,63	89

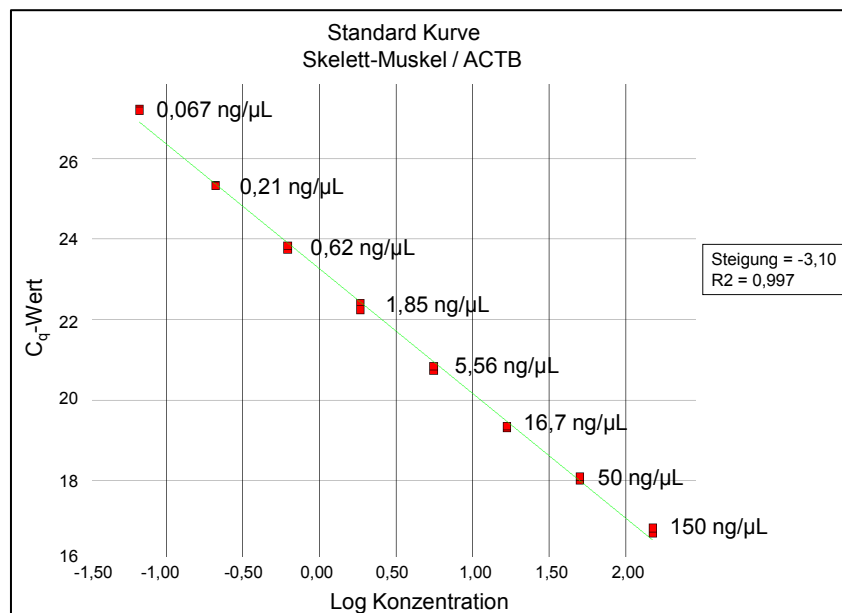


Abbildung 3.8: Standardkurve der Quantifizierung von ACTB einer seriellen Verdünnungsreihe von Skelettmuskel-cDNA. Anhand der Geraden-Steigung sowie der Formel  $E=10^{(-1/\text{Steigung})}$  kann die wahre PCR-Effizienz des Assays von ACTB berechnet werden.

### b) Real-time PCR der RNA Extrakte aus postmortalen Gewebeproben

Mittels RT-qPCR (siehe 2.2.8) wurde in jedem auf 5 ng/ $\mu$ L eingestellten RNA-Extrakt die Transkriptmenge von 10 endogenen Kontrollgenen (ACTB, 18S rRNA, GAPDH, TBP, HPRT1, B2M, HMBS, SDHA, CYCA und UBC, siehe auch Tabelle 2.11) in Duplikaten quantifiziert. Pro Gewebe und Kontrollgen wurde eine quantitative Real-time PCR durchgeführt. Jede cDNA-Probe wurde in Duplikaten aufgetragen.

Jedes einzelne Experiment enthielt des Weiteren eine als Duplikat mitgeführte Positivkontrolle (PK). Diese sollte, neben der Bestätigung einer erfolgreich stattgefundenen Amplifizierung, zugleich die Funktion einer so genannten „plate-to-plate“-Kontrolle übernehmen, mit der die Vergleichbarkeit verschiedener qPCRs gleicher endogener Kontrollen geprüft werden kann. Die Positivkontroll-cDNA (5 ng/ $\mu$ L) wurde mittels reverser Transkription einer kommerziell erhältlichen Herz-Gesamt-RNA hergestellt. Aus den gewonnenen  $C_q$ -Rohdaten wurden entsprechende Mittelwerte sowie Standardabweichungen ermittelt ( $SA_{ges}$ ). Diese sind in Tabelle 8.4 dargestellt. Den durchschnittlich höchsten PK- $C_q$ -Wert lieferten die RT-qPCRs von TBP. Er lag zwischen 25,90 (TBP\_Gehirn) und 26,29 (TBP\_Skelettmuskel). Den durchschnittlich niedrigsten PK- $C_q$ -Wert zeigten die RT-qPCRs von 18S rRNA. Dieser Wert schwankte zwischen 8,34 (18S rRNA\_Gehirn) und 8,39 (18S rRNA\_Herzmuskel / Skelettmuskel). Die Gesamt-Standardabweichung der  $C_q$ -Daten von RT-qPCRs gleicher endogener Kontrollen ( $SA_{ges}$ -Wert) schwankte zwischen 0,02 (18S rRNA) und 0,30 (HMBS). Der  $SA_{ges}$ -Wert einzelner qPCR-Läufe bewegte sich bei 27 von insgesamt 30 qPCRs zwischen 0,00 (18S rRNA\_Gehirn) und 0,21 (CYCA\_Skelettmuskel). Bei den übrigen drei qPCRs lag die Standardabweichung zwischen 0,38 (ACTB\_Herzmuskel) und 0,59 (SDHA\_Herzmuskel). Somit lag die Schwankung über verschiedene qPCR-Läufe hinweg jeweils im Bereich der Schwankung von Doppelwerten, die auf einer einzelnen Platte analysiert wurden. Es ist daher davon auszugehen, dass evtl. variierende PCR-Bedingungen keinen erkennbaren Einfluss auf die vergleichende Analyse von  $C_q$ -Daten haben, die in unterschiedlichen Experimenten generiert wurden.

### 3.2.2 Stabilität der Kontrollgene

Die in der quantitativen Real-time PCR generierten Rohdaten sämtlicher Proben wurden in die Excel-basierte Software geNorm (siehe 2.2.9) importiert, um die Gen-Transkripte hinsichtlich ihrer Expressionsstabilität zu untersuchen. Diese wird über den sogenannten M-Wert (*expression stability measure*) ausgedrückt. Tabelle 3.2 zeigt das Ergebnis dieser Analyse. Gene wie 18S rRNA, GAPDH, HPRT1 und ACTB zeigten im vorliegenden Probenumfang hohe M-Werte. Dagegen zählten HMBS, UBC, SDHA und TBP zu den Genen mit den niedrigsten M-Werten.

Neben dem M-Wert berechnet das Programm geNorm den V-Wert. Dabei handelt es sich um die sog. „paarweise Variation“ (siehe 2.2.9). Ausgehend von den drei stabilsten internen Kontrollgenen wird schrittweise das nächststabilere Gen in die Kalkulation einbezogen. Daher ergeben sich für 10 endogene Kontrollen stets nur acht V-Werte (siehe Tabellen 3.2 und 3.3).

Der V-Wert liefert einen Hinweis auf die Mindestanzahl an Kontrollgenen, die für eine verlässliche Datennormalisierung benötigt werden. Vandesompele et al. schlugen diesbezüglich  $V < 0,15$  als Grenzwert vor [Vandesompele 2002]. Das bedeutet, dass jedes weitere hinzugefügte Kontrollgen keinen merklichen Einfluss auf die Datennormalisierung hat, wenn bei der paarweisen Variation ein V-Wert von 0,15 bzw. ein V-Wert kleiner als 0,15 erreicht wird. Nach der gewebespezifischen geNorm-Analyse wären analog dazu im vorliegenden Probenumfang für die Normalisierung von Genexpressionsdaten aus postmortalem Human-Herzmuskel- und Skelettmuskelgewebe mindestens 5, aus Gehirngewebe mindestens 6 Referenzgene nötig.

Tabelle 3.2: In geNorm ermittelte M- und V-Werte. Die Rohdaten der Real-time PCR der Proben aus Herzmuskel, Skelettmuskel und Gehirngewebe wurden gemeinsam in die geNorm-Software importiert und entsprechend ihrer Transkriptstabilität (M) angeordnet. Je höher M, umso stabiler ist das Gen. V gibt den Wert für die ermittelte paarweise Variation an.

Assay	M	V
HMBS UBC	0,95	
SDHA	1,14	0,38
TBP	1,20	0,27
B2M	1,28	0,24
CYCA	1,45	0,27
ACTB	1,60	0,25
HPRT1	1,71	0,23
GAPDH	1,82	0,22
18S rRNA	1,94	0,21

Tabelle 3.2 liefert eine Übersicht über die Ergebnisse der geNorm-Analyse sämtlicher Proben. Wurden nur Proben analysiert, die aus Herzmuskel entnommen waren, erwiesen sich die Gentranskripte von CYCA, TBP, HMBS und SDHA als stabil. In postmortalem Skelettmuskelgewebe wiesen die Gene SDHA, TBP, HPRT1 und CYCA, in postmortalem Gehirngewebe die Gene HMBS, SDHA, GAPDH und UBC niedrige M-Werte auf (Abbildung 3.9 und Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3: in geNorm ermittelte M- und V-Werte. Die RNA Extrakte aus Herzmuskel, Skelettmuskel und Gehirngewebe wurden nach Gewebetyp getrennt in die geNorm-Software importiert und entsprechend ihrer Transkriptstabilität (M) angeordnet. Je höher M, umso stabiler ist das Gen. V gibt den Wert für die ermittelte paarweise Variation an.

Herz- muskel	M	V
CYCA TBP	0,52	
HMBS	0,69	0,23
SDHA	0,75	0,14
UBC	0,79	0,14
B2M	0,85	0,14
ACTB	0,93	0,14
HPRT1	1,01	0,14
GAPDH	1,10	0,17
18S rRNA	1,37	0,24

Skelett- muskel	M	V
SDHA TBP	0,68	
HPRT1	0,80	0,27
CYCA	0,87	0,20
B2M	0,89	0,15
HMBS	0,92	0,13
UBC	0,96	0,12
ACTB	1,01	0,13
GAPDH	1,14	0,16
18S rRNA	1,26	0,16

Gehirn	M	V
HMBS SDHA	0,67	
GAPDH	0,78	0,25
UBC	0,87	0,22
CYCA	0,92	0,16
TBP	0,95	0,14
B2M	1,02	0,15
ACTB	1,12	0,16
18SrRNA	1,35	0,23
HPRT1	1,53	0,21

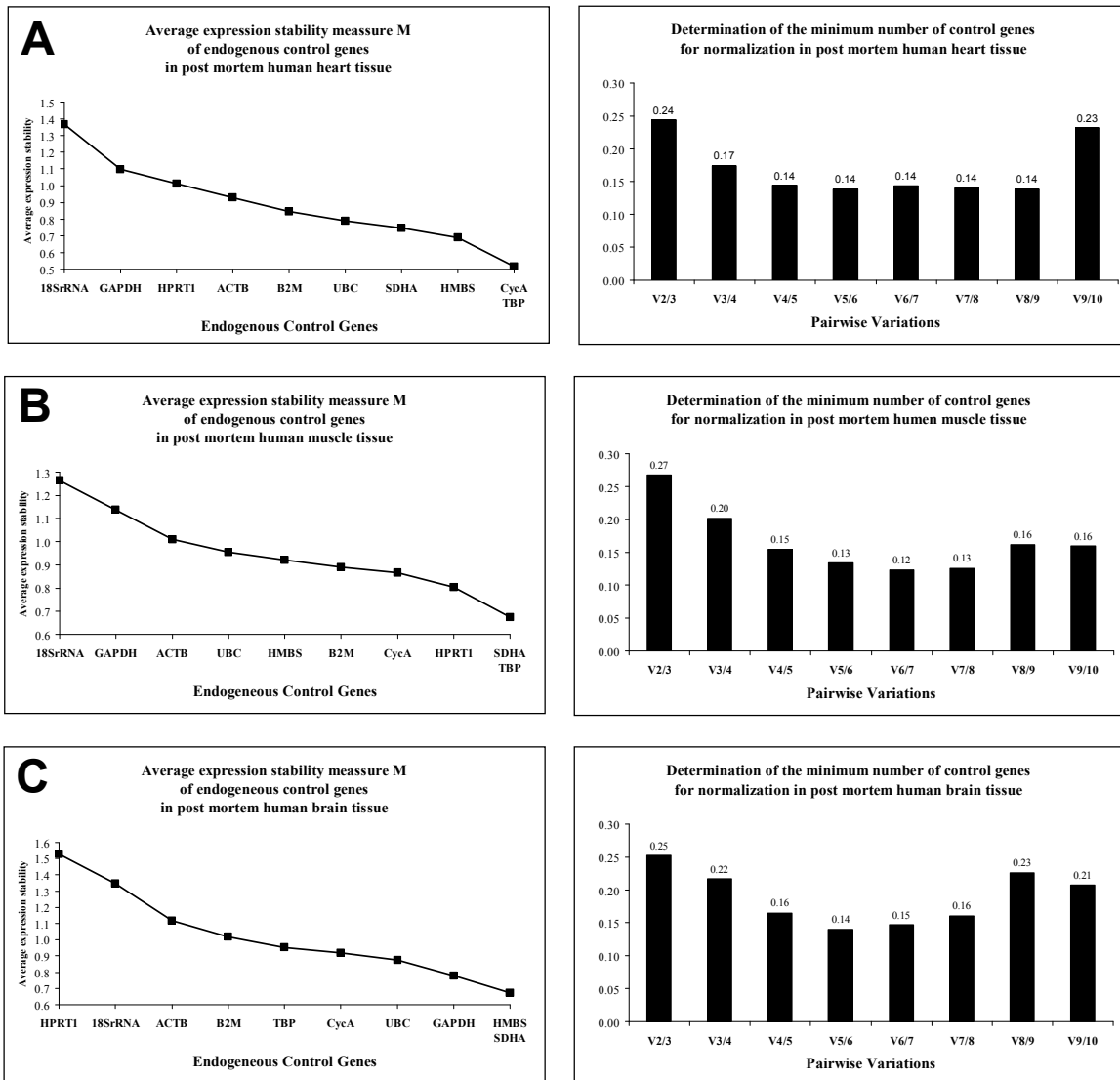


Abbildung 3.9: Ergebnisse der geNorm-Analyse von Proben, die aus postmortalem humanem **A**: Herzmuskelgewebe, **B**: Skelettmuskelgewebe und **C**: Gehirngewebe stammten. Gene mit niedrigem M-Wert zeigen eine hohe Transkriptstabilität.

Nach der geNorm-Analyse sämtlicher Proben, die nicht nach Gewebetyp oder sonstigen Parametern gruppiert waren, liegt der niedrigste erreichte V-Wert unter Einbeziehung der zehn untersuchten Referenzgene bei 0,21 (Abbildung 3.9 und Tabelle 3.3).



### 3.2.3 Einfluss verschiedener Parameter auf das Transkriptlevel instabiler Gene

Um zu untersuchen, ob sich das Transkriptlevel instabiler Gene in Abhängigkeit verschiedener Parameter ändert, wurden die  $C_q$ -Rohdaten sämtlicher Proben im Weiteren mit Hilfe der Excel-basierten Software qBase analysiert (siehe auch 1.8.2 und 2.2.10).

Als Zielgene wurden solche Gene verwendet, die sich in der vorangehenden Teilstudie als instabil erwiesen hatten. Gene, deren Transkripte im jeweiligen Gewebe Stabilität zeigten, dienten dagegen als Kontrollgene.

Das heißt, entsprechend den in Tabelle 3.3 aufgeführten geNorm-Voranalysen erfolgte die Normalisierung der Zielgen-Transkriptlevel mit Hilfe der in Herzmuskel-, Skelettmuskel bzw. Gehirngewebe validierten vier stabilsten endogenen Kontrollgene. In Herzmuskel-Proben wurden demnach die Gene 18S rRNA, GAPDH, HPRT1 und ACTB mit dem Faktor normalisiert, der für jede Probe als geometrisches Mittel der Mengen der stabilen Gene CYCA, TBP, HMBS und SDHA errechnet wurde. Analog erfolgte die Datenanalyse für RNA-Proben, die aus Skelettmuskel bzw. aus Gehirn isoliert wurden.

Als mögliche Einflussfaktoren wurden Postmortalintervall (PMI), Body Mass Index (BMI), Alter zum Todeszeitpunkt, Todesursache und Geschlecht untersucht.

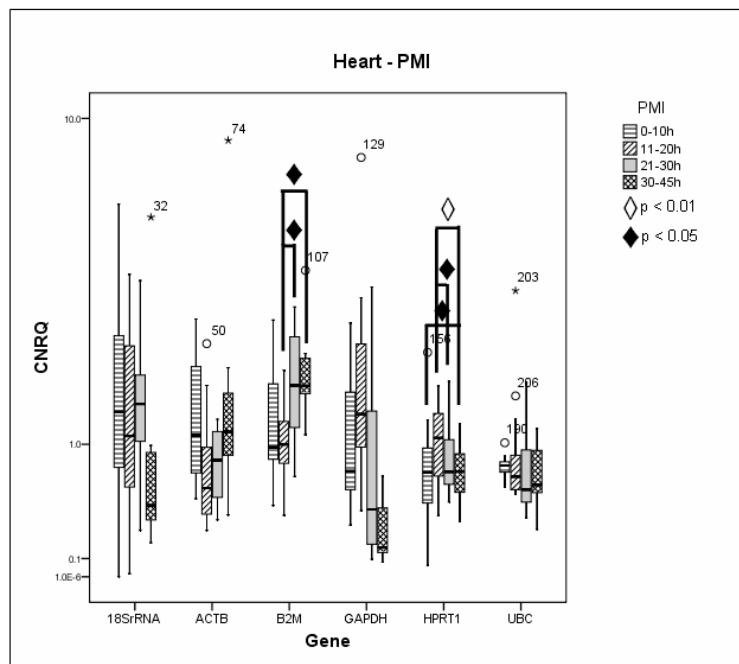
#### Einfluss des Postmortalintervalls

Für die Untersuchung des Einflusses des Postmortalintervalls auf das Transkriptlevel der instabilen Gene 18S rRNA, ACTB, B2M, GAPDH, HPRT1 und UBC wurde der vorliegende Probenumfang in vier Gruppen aus 10-Stunden-Intervallen aufgeteilt (0-10 h, 11-20 h, 21-30 h sowie 30 bis 45 h).

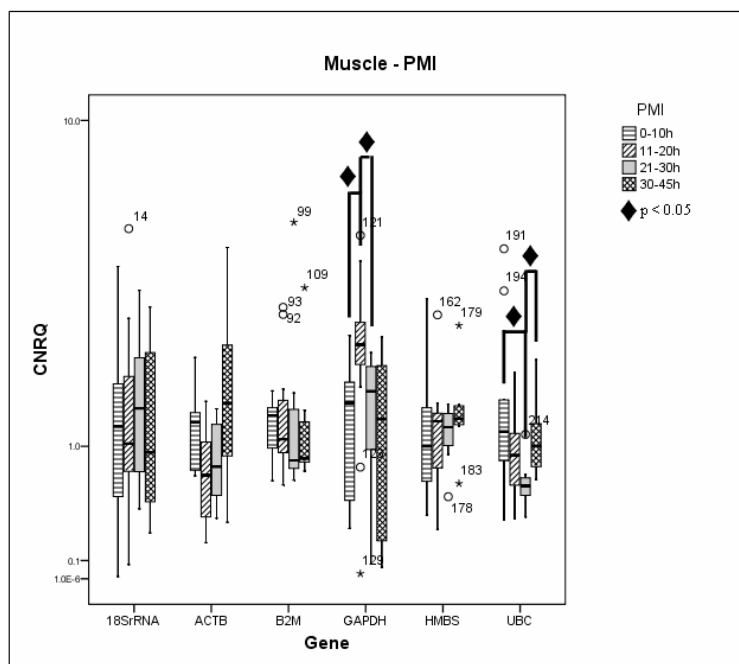
Die Gruppe „0-10 h“ schloss Proben von neun Individuen ein. Zur Gruppe „11-20 h“ zählten 13 Probenspender und zur Gruppe „21-30 h“ acht Individuen. Da ausschließlich Proben mit einem PMI < 50 h berücksichtigt wurden, zählten zur letztgenannten Gruppe sieben Individuen, die ein PMI von mehr als 30 Stunden aufwiesen (siehe auch Tabelle 8.1).

Wie aus Abbildung 3.10B ersichtlich, zeigte GAPDH in Skelettmuskel eine statistisch signifikant höhere Transkriptmenge in der Probengruppe „11-20h“ im Vergleich zu „0-10h“ und „21-30h“. UBC wies eine statistisch signifikant niedrigere Transkriptmenge im Probenumfang „21-30h“ im Vergleich zu Proben mit niedrigerem PMI auf. In Herzmuskel (Abbildung 3.10A) sind B2M Transkripte nach kurzem PMI statistisch signifikant weniger exprimiert; GAPDH zeigt in selbigem Gewebe einen Trend hin zu weniger Transkript bei längerem PMI. In Gehirn-RNA (Abbildung 3.10C) wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt.

**A**



**B**



C

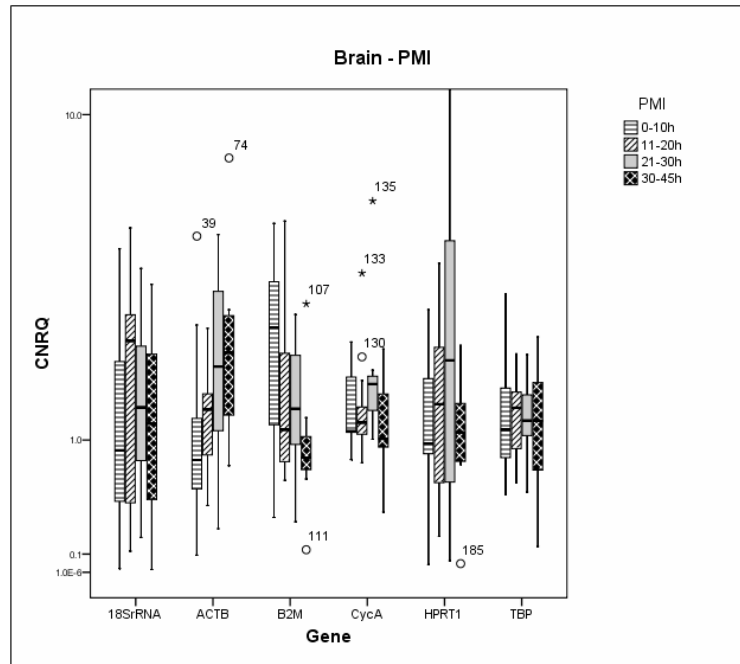


Abbildung 3.10: Box Plot Darstellung der kalibrierten, normalisierten, relativen Quantitäten der Zielgene (CNRQ-Werte) in **A**: Herzmuskel- **B**: Skelettmuskel- und **C**: Gehirngewebe entsprechend der gewählten Proben-Gruppierung (0-10 h, 11-20 h, 21-30 h sowie 30-45 h). In SPSS mittels Mann-Whitney-U-Test errechnete Signifikanzen sind symbolisch gekennzeichnet:  $\diamond = p < 0,01$   $\star = p < 0,05$ .

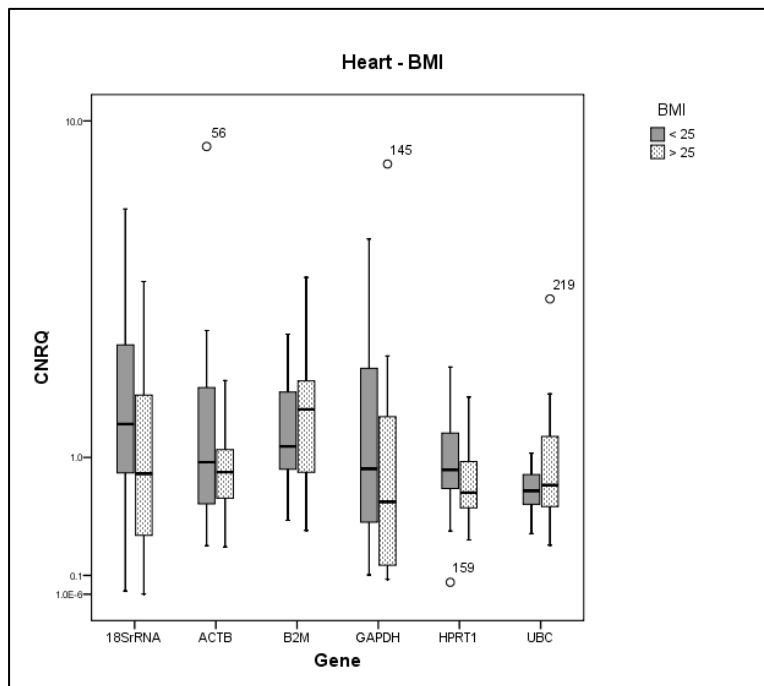
### Einfluss des Body Mass Index

Für die Untersuchung des Einflusses des Body Mass Index auf das Transkriptlevel der instabilen Gene 18S rRNA, ACTB, B2M, GAPDH, HPRT1 und UBC wurde der vorliegende Probenumfang in Anlehnung der Vorgaben der WHO (*World Health Organisation*) gruppiert, die einen BMI>25 als präadipös bzw. übergewichtig definiert.

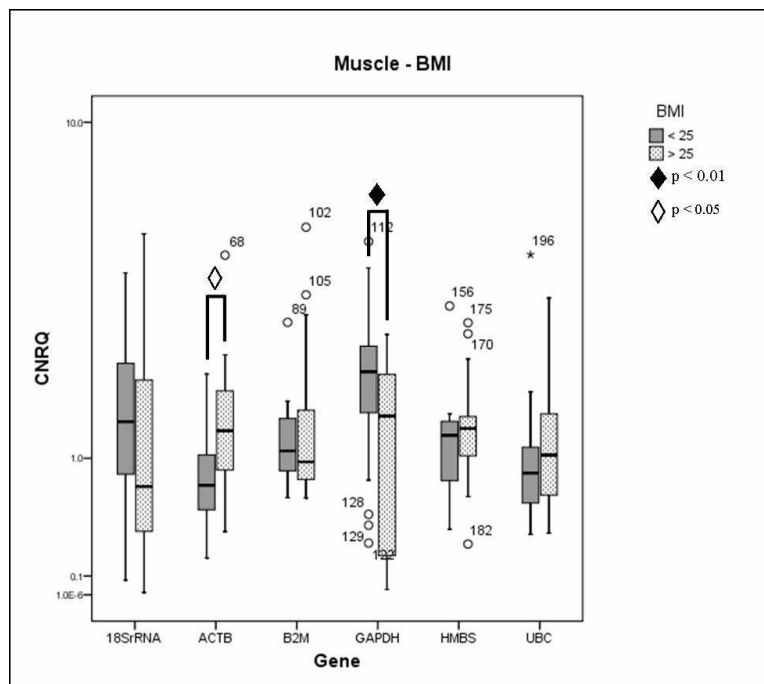
16 Individuen wurden demnach der Gruppe „BMI>25“, 21 Individuen der Gruppe „BMI<25“ zugeordnet (siehe auch Tabelle 8.2). Abbildung 3.11 fasst die Ergebnisse dieser Analyse grafisch zusammen.

Wie aus Abbildung 3.11 ersichtlich, zeigten Individuen mit einem BMI>25, im Vergleich zu unter- bzw. normalgewichtigen Individuen in postmortalem Skelettmuskel (Abbildung 3.11B) ein höheres Transkriptlevel von ACTB sowie ein niedrigeres Transkriptlevel von GAPDH. Beide Zusammenhänge erwiesen sich als statistisch signifikant. Sowohl in Herzmuskel (Abbildung 3.11A), als auch in Gehirngewebe (Abbildung 3.11C) wurden keine statistisch signifikanten Zusammenhänge nachgewiesen.

**A**



**B**



C

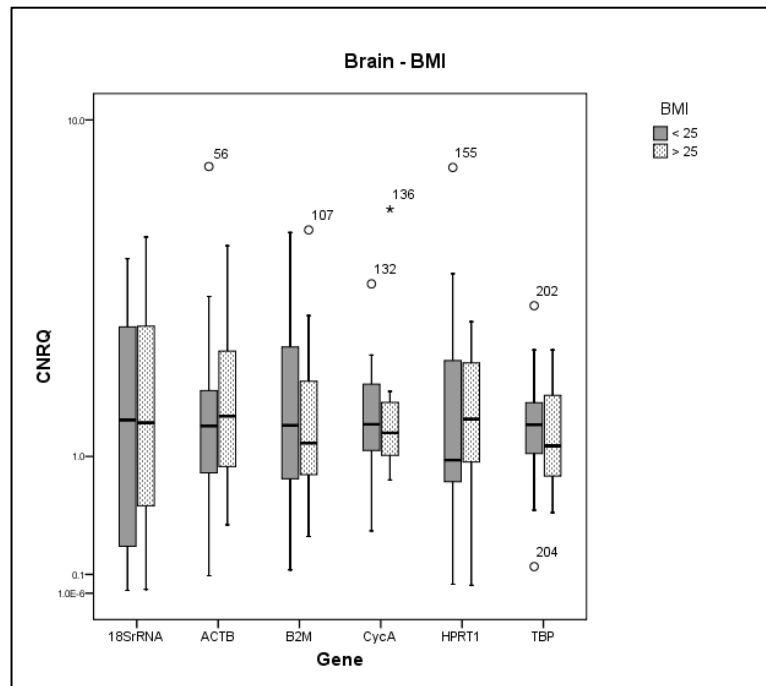


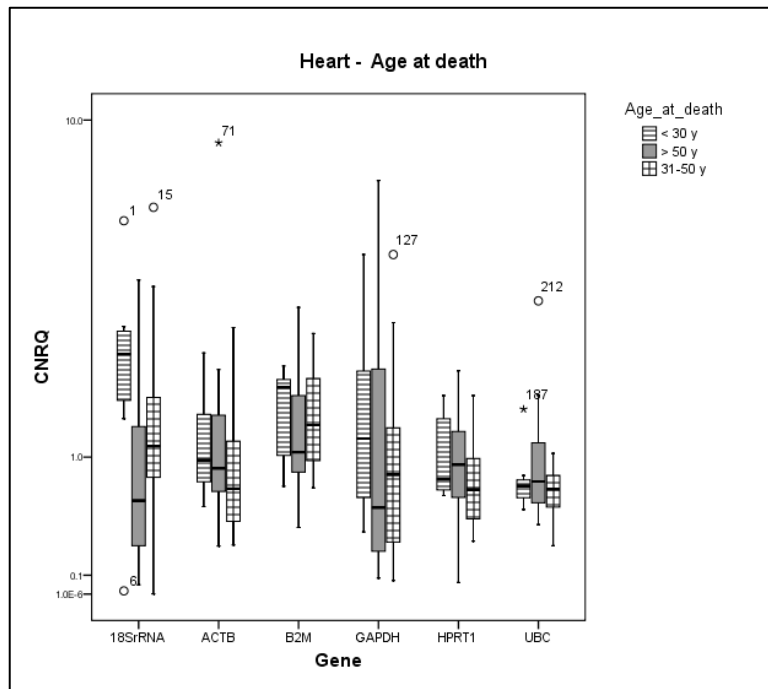
Abbildung 3.11: Box Plot Darstellung der kalibrierten, normalisierten, relativen Quantitäten der Zielgene (CNRQ-Werte) in **A**: Herzmuskel- **B**: Skelettmuskel- und **C**: Gehirngewebe entsprechend der gewählten Proben-Gruppierung (BMI<25, BMI>25). In SPSS mittels Mann-Whitney-U-Test errechnete Signifikanzen sind symbolisch gekennzeichnet:  $\diamond$  =  $p < 0,01$   $\blacklozenge$  =  $p < 0,05$ .

### Einfluss des Alters zum Todeszeitpunkt

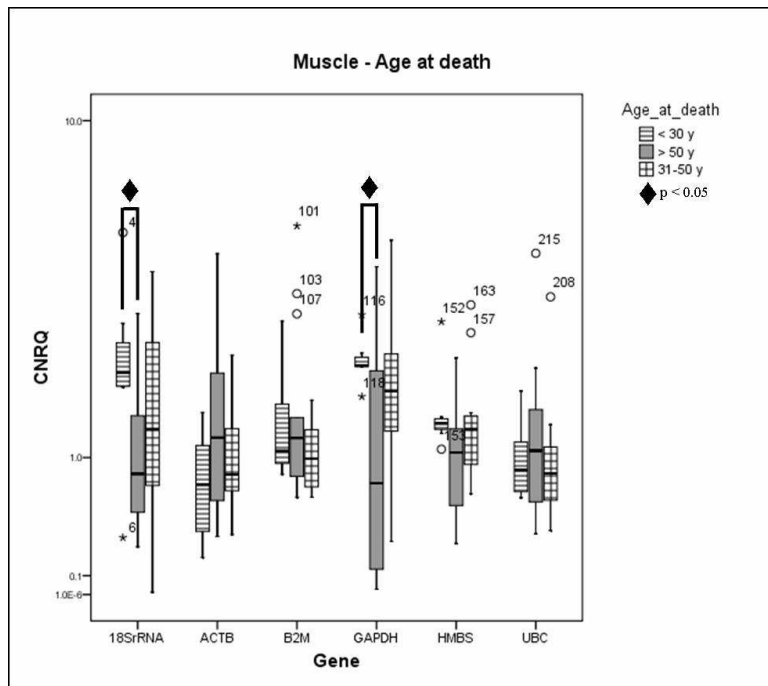
Für die Untersuchung des Einflusses des Alters zum Zeitpunkt des Versterbens auf das Transkriptlevel der instabilen Gene 18S rRNA, ACTB, B2M, GAPDH, HPRT1 und UBC wurden die Proben in drei Gruppen geordnet. Sieben Individuen verstarben, bevor sie das dreißigste Lebensjahr erreicht hatten („unter 30 Jahre“), 16 Individuen wurden 31 bis 50 Jahre alt („31 bis 50 Jahre“) und 14 Individuen wurden älter als 50 Jahre („über 50 Jahre“) (siehe auch Tabelle 8.2).

Abbildung 3.12 gibt eine Übersicht über das Ergebnis der Analyse. Bei jüngeren Individuen („unter 30 Jahre“) wurden die Transkripte von GAPDH und 18S rRNA in Skelettmuskel (Abbildung 3.12B) statistisch signifikant stärker exprimiert. In Herzmuskel (Abbildung 3.12A) und Gehirngewebe (Abbildung 3.12C) wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden.

A



B



C

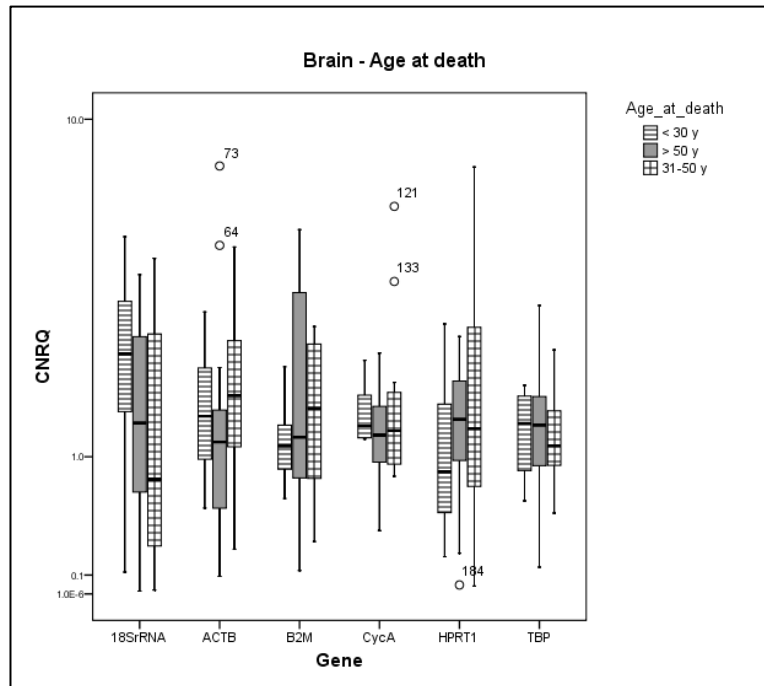


Abbildung 3.12: Box Plot Darstellung der kalibrierten, normalisierten, relativen Quantitäten der Zielgene (CNRQ-Werte) in **A**: Herzmuskel- **B**: Skelettmuskel- und **C**: Gehirngewebe entsprechend der gewählten Proben-Gruppierung nach dem Alter zum Todeszeitpunkt / Age\_at\_death (<30y = unter 30 Jahre, 31-50y = 31-50 Jahre, > 50 y = über 50 Jahre). In SPSS mittels Mann-Whitney-U-Test errechnete Signifikanzen sind symbolisch gekennzeichnet:  $\diamond$  =  $p < 0,01$   $\blacklozenge$  =  $p < 0,05$ .

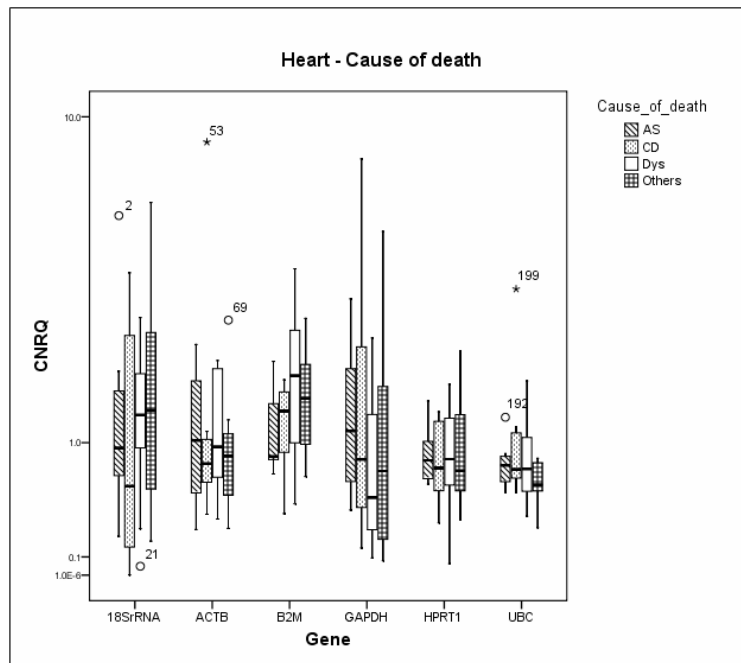
### Einfluss der Todesursache

Um den Einfluss der Todesursache auf das Transkriptlevel der instabilen Gene 18S rRNA, ACTB, B2M, GAPDH, HPRT1 und UBC zu untersuchen, wurden Gewebeprobe von Individuen verwendet, die an Ersticken, an einem plötzlichen Herztod, infolge einer zentralen Dysregulation oder an weiteren Ursachen verstorben sind. Letztere wurden unter der Bezeichnung „Sonstige“ gruppiert.

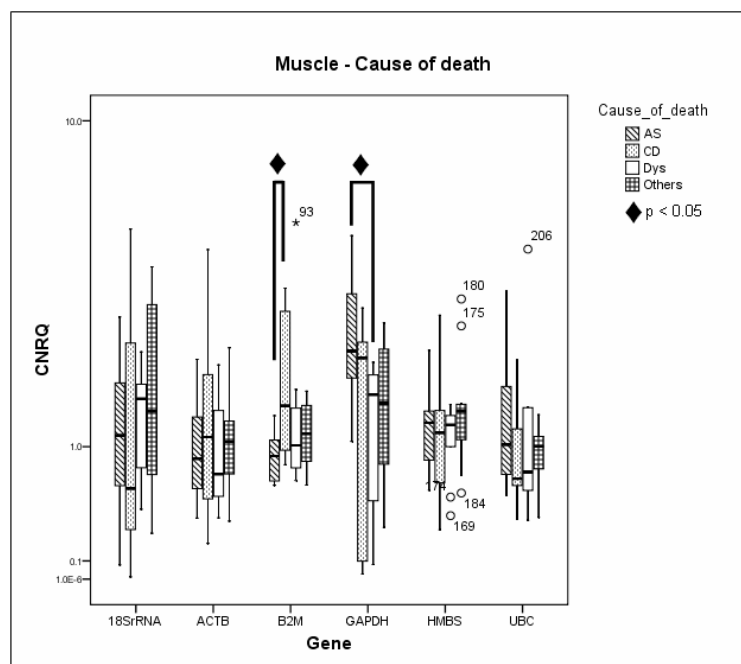
Abbildung 3.13 fasst die Ergebnisse dieser Analyse grafisch zusammen. In Skelettmuskel erwies sich der Transkriptlevel-Unterschied von B2M als statistisch signifikant. Demnach wurde dieses Gen nach einem plötzlichen Herztod stärker exprimiert als bei Individuen, die durch Ersticken verstorben waren.

Nach einem Tod infolge einer zentralen Dysregulation erwies sich im selben Gewebe das Expressionslevel von GAPDH als statistisch signifikant niedriger als bei Individuen, die an Erstickten verstorben waren. Verglichen mit dem Genexpressionslevel in Gehirngewebe von Probenspendern, die infolge einer zentralen Dysregulation verstorben waren, wurden sowohl für B2M als auch für HPRT1 und TBP statistisch signifikant niedrigere Genpressionslevel infolge des Versterbens nach einem plötzlichen Herztod beobachtet. In Herzmuskelgewebe wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden.

**A**



**B**





C

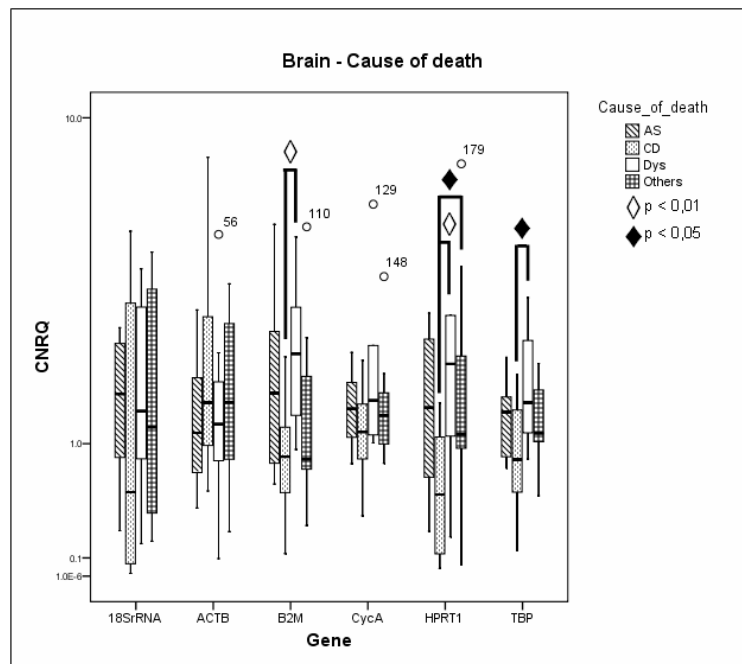


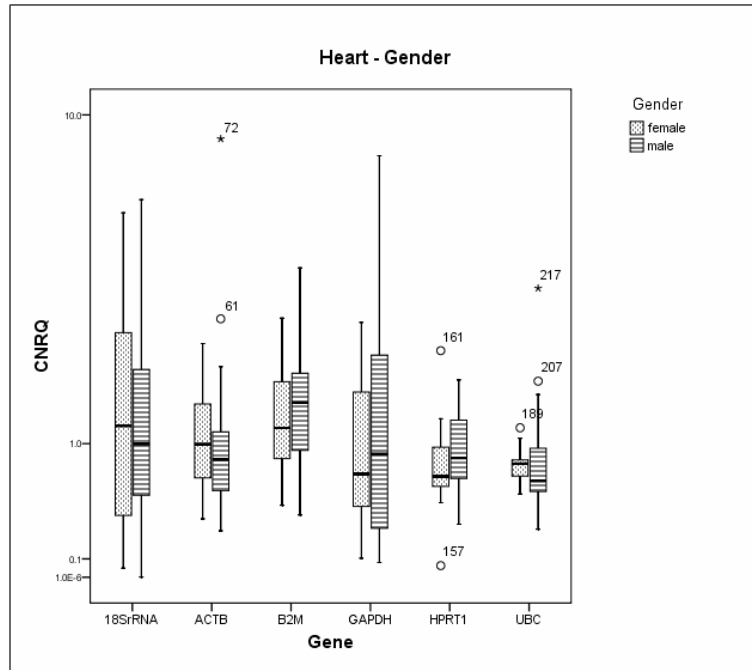
Abbildung 3.13: Box Plot Darstellung der kalibrierten, normalisierten, relativen Quantitäten der Zielgene (CNRQ-Werte) in **A**: Herzmuskel- **B**: Skelettmuskel- und **C**: Gehirngewebe entsprechend der gewählten Proben-Gruppierung (AS = Asphyxia / Erstickten; CD = Cardial disease / plötzlicher Herztod; Dys = Central dysregulation / Zentrale Dysregulation; Others = Sonstige Todesursachen). In SPSS mittels Mann-Whitney-U-Test errechnete Signifikanzen sind symbolisch gekennzeichnet: ◇ =  $p < 0,01$  ◆ =  $p < 0,05$ .

### Einfluss des Geschlechts

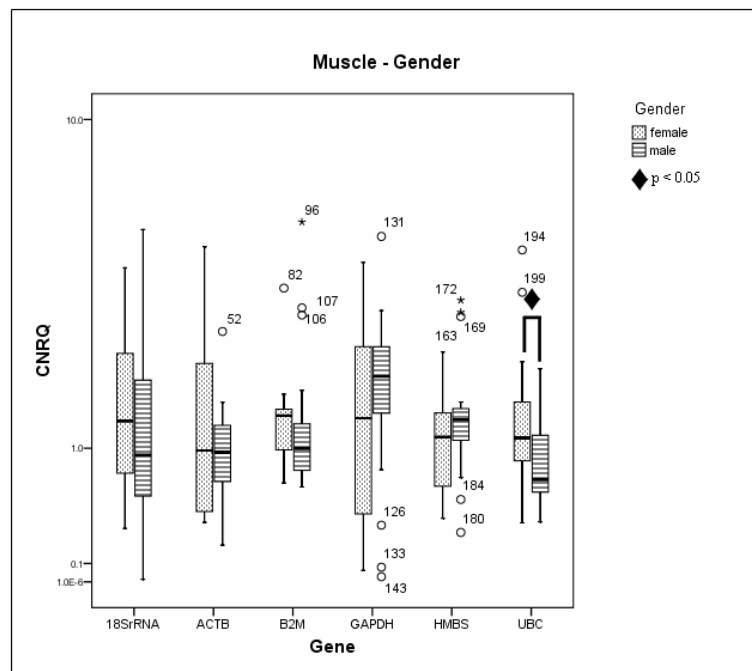
Der Einfluss des Geschlechts auf das Transkriptlevel der instabilen Gene 18S rRNA, ACTB, B2M, GAPDH, HPRT1 und UBC wurde durch die qBase Analyse der aus der Quantifizierung resultierenden Rohdaten von 14 Frauen und 23 Männern untersucht (siehe Tabelle 8.2 / Teilstudie 1).

Abbildung 3.14 liefert eine Übersicht über die Ergebnisse dieser Analyse. Das Gentranskript von UBC wurde im Skelettmuskel weiblicher Individuen statistisch signifikant stärker exprimiert als im Skelettmuskel männlicher Individuen. Für die übrigen fünf untersuchten Gentranskripte wurde in diesem Gewebe kein weiterer signifikanter Unterschied gefunden. Dies gilt ebenso für sämtliche in Herzmuskel- und Gehirngewebe untersuchten Transkripte.

A



B



C

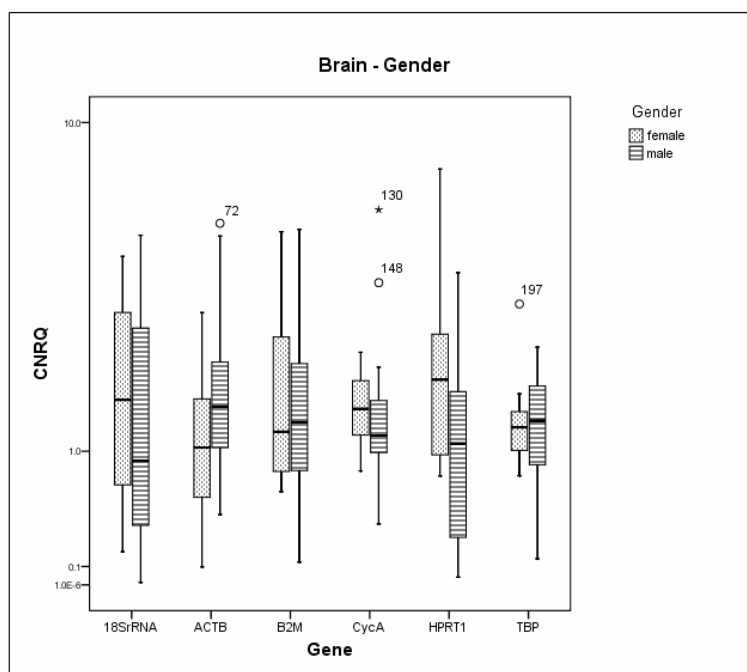


Abbildung 3.14: Box Plot Darstellung der kalibrierten, normalisierten, relativen Quantitäten der Zielgene (CNRQ-Werte) in **A**: Herzmuskel- **B**: Skelettmuskel- und **C**: Gehirngewebe entsprechend der gewählten Proben-Gruppierung (female = weiblich; male = männlich). In SPSS mittels Mann-Whitney-U-Test errechnete Signifikanzen sind symbolisch gekennzeichnet:  $\diamond = p < 0,01$   $\blacklozenge = p < 0,05$ .

### 3.3 Einfluss der RNA-Integrität auf quantitative Genexpressionsanalysen

Gegenstand dieser Teilstudie war die Frage nach dem Ausmaß der Folgen verminderter RNA-Integrität für das Ergebnis von quantitativen Real-time PCR-Daten. Dies wurde anhand gezielt degradiertes, kommerziell bezogener RNA untersucht, die in cDNA konvertiert und in der die Transkriptmenge verschiedener, für die vorliegende Arbeit relevanter Zielgene quantifiziert wurde.

#### 3.3.1 Gezielte Degradierung kommerziell bezogener RNA

Aliquots kommerziell erhältlicher Herz-, Skelettmuskel- und Gehirn-RNA (200 ng/µL, Stratagene, Heidelberg) wurden durch Inkubation bei 70 °C [Ho-Pun-Cheung 2009] gezielt degradiert. Die Inkubationszeit der RNA-Proben erstreckte sich in gleichmäßigen Intervallen von 5 Minuten über einen Zeitraum von 0-175 Minuten. Nach der Hitzebehandlung wurden die Proben direkt auf Eis überführt, um den Degradierungsprozess zu stoppen.

#### Integrität der degradierten RNA

Die Messung der RNA-Integrität erfolgte mittels eines Bioanalyser-Geräts (siehe 2.2.6). Für jedes der drei ausgewählten Gewebe resultierten daraus 10 Degradierungsstufen.

Wie in den Tabellen 3.4 bis 3.6 ersichtlich, wurden zwei Degradierungslinien (A = Degradierungslinie 1, B = Degradierungslinie 2) generiert. In Degradierungslinie 1 reichte die Integrität der Herz-RNA von RIN 8,1 bis zu RIN 1,5, die Integrität der Skelettmuskel-RNA von RIN 7,6 bis RIN 2,1. Für Gehirn-RNA wurden Degradierungsstufen von RIN 7,6 bis RIN 2,2 generiert. In Degradierungslinie 2 reichte die Integrität der Herz-RNA von RIN 9,4 bis zu RIN 3,2, die Integrität der Skelettmuskel-RNA von RIN 8,1 bis RIN 2,4. Für Gehirn-RNA wurden Degradierungsstufen von RIN 8,4 bis RIN 3,6 generiert.

### Reverse Transkription und Genexpressionsanalyse der Degradierungslinien

Die RNA-Aliquots jedes Gewebetyps sowie jeder Degradierungsstufe wurden in Triplikaten revers transkribiert und mit UV-bestrahltem HPLC-Wasser auf eine einheitliche Konzentration von 10 ng/ $\mu$ L eingestellt. In der darauf folgenden Quantifizierung der Transkripte von ACTB, B2M, 18S rRNA, HIF-1 $\alpha$ , VEGF, SLC2A1 und GAPDH mittels RT-qPCR wurde jede cDNA wiederum in Triplikaten mitgeführt. Im experimentellen Verlauf zeigte sich, dass die Quantifizierung des Transkriptes von 18S rRNA einen weiteren Verdünnungsschritt der Proben von 1:10 erforderte.

Durch die Arbeit in Triplikaten lieferte die Analyse für jede Degradierungsstufe neun  $C_q$ -Werte. Pro Gewebe und PCR-Assay wurden demnach 90  $C_q$ -Werte generiert. Die Mittelwerte der pro Degradierungsstufe gemessenen drei  $C_q$ -Werte sowie die entsprechenden Standardabweichungen sind in den Tabellen 3.4 bis 4.6 aufgeführt.

Tabelle 3.4: Ergebnisse der gezielten Degradierung kommerzieller Herz-RNA durch Inkubation der Proben bei 70 °C. **A:** Degradierungslinie 1 und Ergebnisse der Quantifizierung von ACTB, B2M und 18S rRNA. **B:** Degradierungslinie 2 und Ergebnisse der Quantifizierung von HIF-1 $\alpha$ , VEGF, SLC2A1 und GAPDH. Die Pearson-Korrelation (R) sowie die statistische Signifikanz (p) wurden mit SPSS berechnet. RIN = RNA integrity number; C<sub>q</sub> = Cycle of quantification; SA = Standardabweichung.

**A**

Degradierungs- stufe Herz-RNA	Mittlerer C <sub>q</sub> -Wert ACTB	SA	Mittlerer C <sub>q</sub> -Wert B2M	SA	Mittlerer C <sub>q</sub> -Wert 18S rRNA	SA
RIN 8,1	17,94	0,06	17,75	0,07	11,59	0,09
RIN 7,2	18,01	0,08	17,88	0,10	11,74	0,07
RIN 6,2	18,03	0,07	17,92	0,07	11,76	0,08
RIN 5,4	18,20	0,06	18,14	0,05	11,94	0,05
RIN 4,8	18,22	0,04	18,10	0,05	11,95	0,04
RIN 3,6	18,47	0,05	18,33	0,04	12,29	0,07
RIN 3,3	18,39	0,03	18,34	0,05	12,26	0,07
RIN 2,7	18,67	0,03	18,60	0,06	12,69	0,07
RIN 2,0	18,96	0,08	18,85	0,11	13,18	0,08
RIN 1,5	19,45	0,05	19,44	0,06	14,19	0,09
<b>C<sub>q</sub> Verschiebung</b>	<b>1,51</b>		<b>1,69</b>		<b>2,60</b>	
R	-0,902		-0,909		-0,891	
p	<0,01		<0,01		<0,01	

**B**

Degradierungs- stufe Herz-RNA	Mittlerer C <sub>q</sub> -Wert HIF-1 $\alpha$	SA	Mittlerer C <sub>q</sub> -Wert VEGF	SA	Mittlerer C <sub>q</sub> -Wert SLC2A1	SA	Mittlerer C <sub>q</sub> -Wert GAPDH	SA
RIN 9,4	22,30	0,07	24,16	0,03	24,50	0,07	17,44	0,05
RIN 8,8	22,33	0,08	24,08	0,10	24,51	0,09	17,49	0,08
RIN 8,4	22,35	0,07	24,21	0,13	24,62	0,17	17,59	0,12
RIN 7,5	22,33	0,06	24,29	0,09	24,63	0,07	17,72	0,05
RIN 6,8	22,46	0,05	24,37	0,06	24,68	0,06	17,75	0,06
RIN 6,2	22,56	0,07	24,50	0,12	24,72	0,09	17,78	0,08
RIN 5,4	22,50	0,04	24,42	0,16	24,69	0,11	17,77	0,07
RIN 4,9	22,69	0,15	24,54	0,11	24,75	0,04	17,93	0,06
RIN 3,7	23,02	0,06	24,60	0,11	24,82	0,09	18,07	0,06
RIN 3,2	23,19	0,04	24,75	0,09	24,91	0,03	18,19	0,04
<b>C<sub>q</sub> Verschiebung</b>	<b>0,89</b>		<b>0,59</b>		<b>0,41</b>		<b>0,75</b>	
R	-0,92		-0,97		-0,96		-0,98	
p	< 0,01		< 0,01		< 0,01		< 0,01	

Tabelle 3.5: Ergebnisse der gezielten Degradierung kommerzieller Skelettmuskel-RNA durch Inkubation der Proben bei 70 °C. **A:** Degradierungslinie 1 und Ergebnisse der Quantifizierung von ACTB, B2M und 18S rRNA. **B:** Degradierungslinie 2 und Ergebnisse der Quantifizierung von HIF-1 $\alpha$ , VEGF, SLC2A1 und GAPDH. Die Pearson-Korrelation (R) sowie die statistische Signifikanz (p) wurden mit SPSS berechnet. RIN = RNA integrity number; C<sub>q</sub> = Cycle of quantification; SA = Standardabweichung.

**A**

Degradierungs- stufe Skelettmuskel- RNA	Mittlerer C <sub>q</sub> -Wert ACTB	SA	Mittlerer C <sub>q</sub> -Wert B2M	SA	Mittlerer C <sub>q</sub> -Wert 18S rRNA	SA
RIN 7,6	21,10	0,04	21,57	0,08	12,35	0,05
RIN 7,1	20,97	0,03	21,32	0,04	12,31	0,03
RIN 6,8	21,01	0,05	21,36	0,09	12,35	0,04
RIN 5,9	21,06	0,06	21,41	0,08	12,42	0,03
RIN 5,3	21,06	0,06	21,50	0,07	12,45	0,03
RIN 4,8	21,16	0,03	21,52	0,06	12,53	0,03
RIN 4,2	21,21	0,02	21,82	0,05	12,60	0,04
RIN 3,5	21,09	0,06	21,63	0,05	12,49	0,06
RIN 2,6	21,78	0,10	22,16	0,06	13,49	0,08
RIN 2,1	22,03	0,03	22,36	0,08	13,96	0,05
<b>C<sub>q</sub> Verschiebung</b>	<b>1,06</b>		<b>1,04</b>		<b>1,65</b>	
R	-0,798		-0,850		-0,815	
p	<0,01		<0,01		<0,01	

**B**

Degradierungs- stufe Skelettmuskel- RNA	Mittlerer C <sub>q</sub> -Wert HIF-1 $\alpha$	SA	Mittlerer C <sub>q</sub> -Wert VEGF	SA	Mittlerer C <sub>q</sub> -Wert SLC2A1	SA	Mittlerer C <sub>q</sub> -Wert GAPDH	SA
RIN 8,1	27,41	0,11	24,16	0,06	27,33	0,09	18,69	0,04
RIN 7,5	27,57	0,07	24,15	0,09	27,42	0,09	18,71	0,10
RIN 6,8	27,55	0,13	24,21	0,18	27,38	0,17	18,80	0,10
RIN 6,3	27,77	0,12	24,51	0,10	27,68	0,10	19,04	0,04
RIN 5,6	27,65	0,27	24,42	0,09	27,51	0,06	18,91	0,09
RIN 5,1	28,11	0,06	24,67	0,15	27,69	0,12	19,17	0,04
RIN 4,1	27,92	0,10	24,54	0,17	27,64	0,12	19,08	0,06
RIN 3,5	28,16	0,09	24,69	0,10	27,68	0,07	19,33	0,11
RIN 2,8	28,41	0,06	24,84	0,09	27,80	0,10	19,53	0,04
RIN 2,4	28,83	0,14	25,01	0,04	28,04	0,06	19,87	0,06
<b>C<sub>q</sub> Verschiebung</b>	<b>1,42</b>		<b>0,85</b>		<b>0,70</b>		<b>1,18</b>	
R	-0,92		-0,94		-0,89		-0,93	
p	< 0,01		< 0,01		< 0,01		< 0,01	

Tabelle 3.6: Ergebnisse der gezielten Degradierung kommerzieller Gehirn-RNA durch Inkubation der Proben bei 70 °C. **A:** Degradierungslinie 1 und Ergebnisse der Quantifizierung von ACTB, B2M und 18S rRNA. **B:** Degradierungslinie 2 und Ergebnisse der Quantifizierung von HIF-1 $\alpha$ , VEGF, SLC2A1 und GAPDH. Die Pearson-Korrelation (R) sowie die statistische Signifikanz (p) wurden mit SPSS berechnet. RIN = RNA integrity number; C<sub>q</sub> = Cycle of quantification; SA = Standardabweichung.

**A**

Degradierungs- stufe Gehirn-RNA	Mittlerer C <sub>q</sub> -Wert ACTB	SA	Mittlerer C <sub>q</sub> -Wert B2M	SA	Mittlerer C <sub>q</sub> -Wert 18S rRNA	SA
RIN 7,8	18,08	0,06	19,52	0,06	12,22	0,02
RIN 6,0	18,17	0,09	19,56	0,20	12,24	0,08
RIN 5,1	18,17	0,08	19,71	0,15	12,34	0,07
RIN 4,7	18,25	0,07	19,67	0,07	12,39	0,06
RIN 4,0	18,28	0,07	19,84	0,11	12,44	0,06
RIN 3,7	18,32	0,05	19,98	0,06	12,55	0,08
RIN 3,2	18,48	0,06	20,22	0,17	12,83	0,08
RIN 3,0	18,45	0,08	20,37	0,06	12,98	0,04
RIN 2,6	18,52	0,08	20,55	0,15	13,21	0,08
RIN 2,2	18,99	0,06	21,35	0,05	14,28	0,06
<b>C<sub>q</sub> Verschiebung</b>	<b>0,91</b>		<b>1,83</b>		<b>2,06</b>	
R	-0,814		-0,818		-0,755	
p	<0,01		<0,01		<0,05	

**B**

Degradierungs- stufe Gehirn-RNA	Mittlerer C <sub>q</sub> -Wert HIF-1 $\alpha$	SA	Mittlerer C <sub>q</sub> -Wert VEGF	SA	Mittlerer C <sub>q</sub> -Wert SLC2A1	SA	Mittlerer C <sub>q</sub> -Wert GAPDH	SA
RIN 8,4	22,96	0,10	23,87	0,10	22,68	0,12	18,48	0,06
RIN 8,0	22,95	0,09	23,79	0,07	22,58	0,06	18,42	0,05
RIN 7,6	22,99	0,05	24,01	0,21	22,64	0,10	18,62	0,16
RIN 6,9	23,04	0,07	24,06	0,12	22,78	0,08	18,69	0,06
RIN 6,6	23,22	0,05	24,22	0,07	22,94	0,06	18,85	0,09
RIN 5,5	23,20	0,05	24,27	0,09	22,92	0,10	18,95	0,07
RIN 4,7	23,27	0,18	24,39	0,09	23,07	0,08	19,15	0,15
RIN 4,4	23,20	0,14	24,32	0,08	22,97	0,09	18,80	0,24
RIN 3,9	23,45	0,06	24,30	0,09	22,98	0,10	19,11	0,10
RIN 3,6	23,50	0,06	24,28	0,04	22,95	0,09	19,03	0,03
<b>C<sub>q</sub> Verschiebung</b>	<b>0,54</b>		<b>0,41</b>		<b>0,27</b>		<b>0,56</b>	
R	-0,93		-0,89		-0,89		-0,89	
p	< 0,01		< 0,01		< 0,01		< 0,01	



Der Bereich zwischen dem jeweils gemessenen niedrigsten- und höchsten  $C_q$ -Wert ist als „ $C_q$ -Verschiebung“ in den Tabellen 3.4 bis 3.6 sowie in Abbildung 3.15 angegeben. Sein Wert variiert nach PCR-Assay und Gewebetyp.

Für das Transkript von ACTB wurde in der cDNA aus Herzgewebe eine  $C_q$ -Verschiebung von 1,51 ermittelt. Für B2M lag der Wert im selben Gewebe bei 1,69, für 18S rRNA bei 2,60, für HIF-1 $\alpha$  bei 0,89, für VEGF bei 0,59, für SLC2A1 bei 0,41 sowie für GAPDH bei 0,75. In Skelettmuskel-cDNA wurden für die  $C_q$ -Verschiebung Werte von 1,06 (ACTB), 1,04 (B2M), 1,65 (18S rRNA), 1,42 (HIF-1 $\alpha$ ), 0,85 (VEGF), 0,70 (SLC2A1) bzw. 1,18 (GAPDH) ermittelt. Analog ergaben sich in Gehirn-cDNA  $C_q$ -Verschiebungs-Werte von 0,91 (ACTB), 1,83 (B2M), 2,06 (18S rRNA), 0,54 (HIF-1 $\alpha$ ), 0,41 (VEGF), 0,27 (SLC2A1) bzw. 0,56 (GAPDH). Die Pearson-Korrelation (SPSS) war für beide Degradierungslinien in postmortalem Herz-, Skelettmuskel- und Gehirngewebe statistisch signifikant ( $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,01$ ).

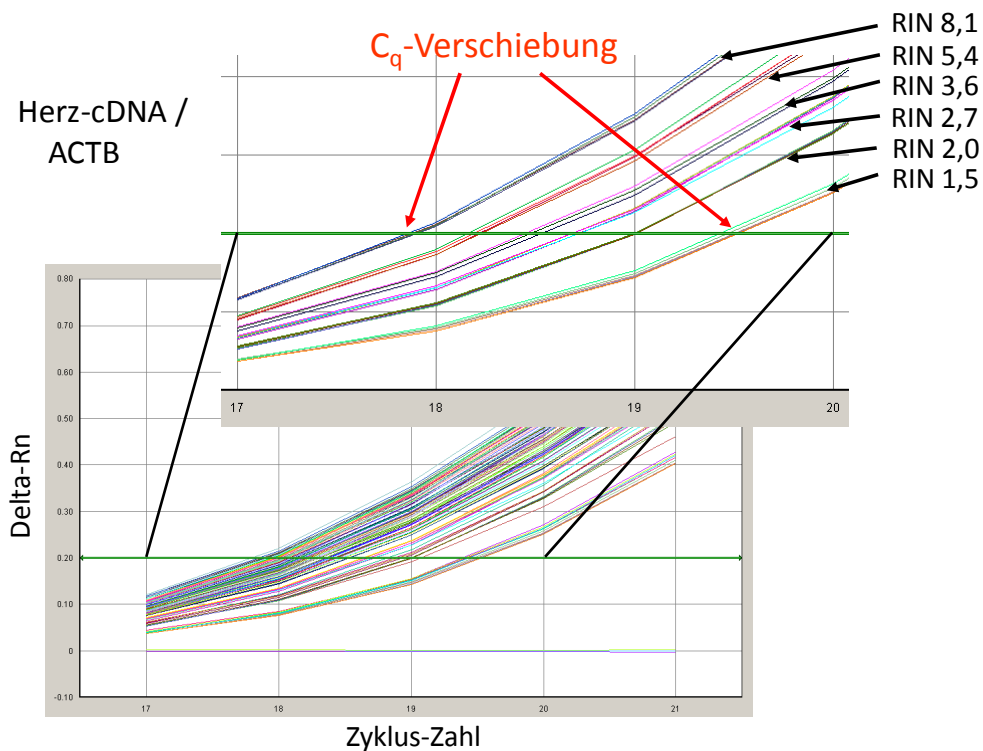


Abbildung 3.15: liefert ein Beispiel des Amplifikationsverlaufs der Quantifizierung von ACTB in hitzedeградierter Herz-cDNA. Zur besseren Anschauung wurden im vergrößerten Teil der Abbildung vier der 10 generierten Verdünnungsstufen nicht dargestellt, da sich deren Amplifikationskurven mit derjenigen von RIN 8,1 überlagern. Es ist zu erkennen, dass der  $C_q$ -Wert mit sinkender RIN ansteigt. Der Begriff „ $C_q$ -Verschiebung“ bezeichnet den Bereich zwischen niedrigstem und höchstem gemessenem  $C_q$ -Wert.

### 3.3.2 Datennormalisierung bei verminderter RNA-Qualität

Wie aus Abbildung 3.15 ersichtlich, führt RNA-Degradierung in der RT-qPCR zu einer Verschiebung des detektierten  $C_q$ -Wertes. In der vorliegenden Teilstudie sollte daher untersucht werden, ob eine validierte Datennormalisierung den Einfluss verminderter RNA-Integrität ausgleichen kann. Unter dieser Fragestellung wurde ein Teil der in 3.2 gesammelten Ergebnisse neu analysiert. Dafür wurden die  $C_q$ -Rohdaten von 102 Proben aus der quantitativen Analyse der Transkripte von ACTB, B2M und 18S rRNA sowie die kalibrierten, normalisierten, relativen Quantitäten (CNRQ-Werte) derselben Proben herangezogen. Die Normalisierung erfolgte mittels des in qBase berechneten gewebespezifischen Normalisierungsfaktors. Letzterer basierte auf den mittels geNorm validierten vier stabilen endogenen Kontrollgenen (siehe 2.2.10 und Tabelle 3.3).

Tabelle 3.7 zeigt das Ergebnis der Analyse. Für jedes Gewebe und jedes der drei analysierten Gentranskripte (ACT, B2M und 18S rRNA) wurde mittels SPSS (Version 15.0 oder 18.0) die Pearson-Korrelation R zwischen nicht-normalisiertem  $C_q$ -Wert und RIN-Wert bzw. zwischen CNRQ-Wert und RIN-Wert derselben Probe berechnet.

Die Korrelation zwischen  $C_q$ -Werten und RIN erwies sich nur für das Gentranskript von B2M in Herzmuskel-RNA als statistisch hoch signifikant ( $p < 0,01$ ). In Skelettmuskel- bzw. GehirnrNA wurde keine Signifikanz detektiert (Tabelle 3.7). Die Normalisierung von B2M gegen die im jeweiligen Gewebe als stabil nachgewiesenen vier endogenen Kontrollgene (siehe Tabelle 3.3) konnte den signifikanten Zusammenhang von B2M ausgleichen.

Abbildung 3.16 zeigt das Ergebniss der Analyse in Form eines Streudiagramms (SPSS). Der obere Teil der Abbildung stellt die Verteilung der  $C_q$ -Rohdaten-, der untere Teil die Verteilung der mittels qBase kalibrierten, normalisierten, relativen Quantitäten dar.

Tabelle 3.7: Ergebnis der Normalisierung der C<sub>q</sub>-Rohdaten, die aus der Quantifizierung der Gentranskripte von 18S rRNA, ACTB und B2M resultierten. Die Analyse erfolgte für 102 Proben, welche 34 Individuen entnommen wurden. NN-C<sub>q</sub>-Werte = nicht normalisierte C<sub>q</sub>-Werte, CNRQ-Werte = kalibrierte, normalisierte, relative Quantitäten. Die CNRQ-Werte resultieren aus der Normalisierung der NN-C<sub>q</sub>-Rohwerte gegen die im jeweiligen Gewebe stabilsten vier endogenen Kontrollgene. Die Pearson Korrelation (R) zwischen C<sub>q</sub>-Wert und RIN sowie die statistische Signifikanz (p) wurden mittels SPSS berechnet.

Gewebe	Assay	NN C <sub>q</sub> -Werte versus RIN		CNRQ-Werte versus RIN	
		R	P	R	p
Herz-muskel	18S rRNA	-0,24	0,20	-0,22	0,25
	ACTB	-0,23	0,21	-0,36	<0,05
	B2M	-0,59	<0,01	-0,14	0,44
Skelett-muskel	18S rRNA	0,06	0,74	-0,07	0,70
	ACTB	-0,21	0,27	-0,17	0,36
	B2M	-0,11	0,57	-0,29	0,12
Gehirn	18S rRNA	-0,10	0,59	0,17	0,37
	ACTB	-0,33	0,07	0,21	0,26
	B2M	-0,23	0,90	-0,23	0,22

### B2M in Herzmuskel

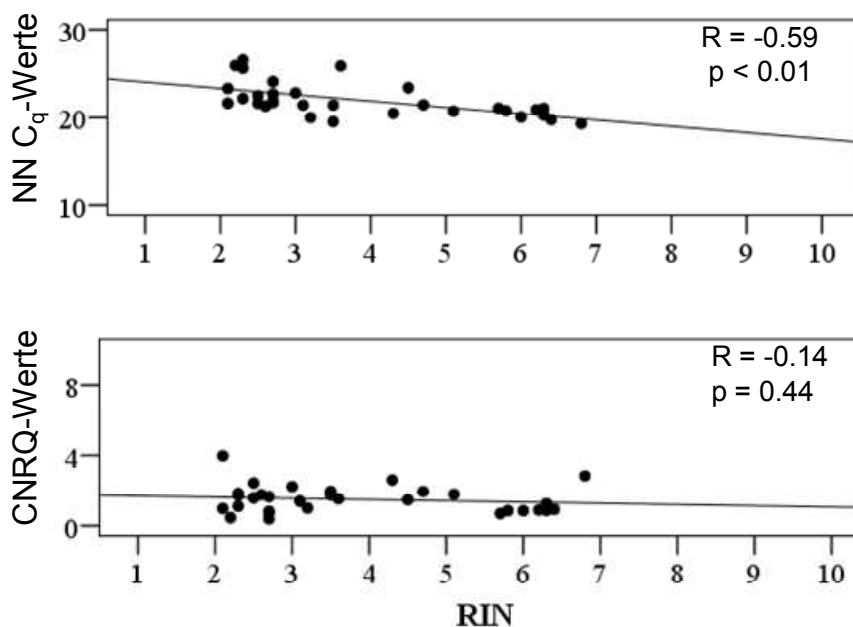


Abbildung 3.16: Streudiagramm der Datenanalyse von B2M in postmortalem humanem Herzmuskelgewebe. Im oberen Teil der Abbildung wurden die mittels RT-qPCR generierten, nicht normalisierten C<sub>q</sub>-Rohdaten (NN-C<sub>q</sub>-Werte) gegen die RIN derselben Proben aufgetragen. Der untere Teil der Abbildung zeigt die Ergebnisse nach deren Normalisierung gegen vier stabile endogene Kontrollgene (CNRQ = kalibrierte normalisierte relative Quantitäten). Die Pearson-Korrelation (R) sowie die statistische Signifikanz (p) wurden mittels SPSS berechnet.

### 3.4 Einfluss der Todesursache auf die Expression von HIF-1 $\alpha$ , VEGF und SLC2A1

Zielgruppe dieser Teilstudie waren Gewebeproben von Individuen, deren Tod mit einem hypoxischen Zustand einhergegangen war. Als Kontrollgruppe dienten Gewebespender, deren Sterbeprozess von einer möglichst kurzen Agoniedauer begleitet wurde, so dass theoretisch keine bzw. nur minimalste Reaktionen auf einen möglichen Sauerstoffmangel zu erwarten sind. Die aus den Gewebeasservaten gewonnenen RNA-Extrakte wurden revers transkribiert. Anschließend wurden die Transkriptmengen von Genen quantifiziert, deren Expression sich in Abhängigkeit der Sauerstoffversorgung im Gewebe ändert.

Einerseits war das Ziel der Analyse, den Einfluss der Todesursache (Ersticken, plötzlicher Herztod) auf die Transkriptlevel der Zielgene HIF-1 $\alpha$ , VEGF und SLC2A1 zu untersuchen und somit mögliche Kandidatengene zur Todesursachenunterscheidung zu identifizieren. Zum anderen wurde geprüft, ob sich das Ergebnis in Abhängigkeit der gewählten Normalisierungsstrategie ändert.

#### 3.4.1 RNA-Extraktion, RNA-Qualitätskontrolle und Transkriptquantifizierung

Die Extraktion der RNA aus je 200 mg postmortalem Herzmuskel-, Skelettmuskel- und Gehirngewebe erfolgte unter Anwendung des RNagents Total Isolation System-Kits wie in 2.2.2 beschrieben. Die Isolation verlief für 46 Gewebeproben (16 aus Herzmuskel, 16 aus Skelettmuskel und 14 aus Gehirn) erfolgreich, die von 16 Individuen während der Routinesektion asserviert worden waren (siehe Tabelle 8.2). Bei zwei Individuen konnte aufgrund einer schweren, prä mortal verursachten Kopfverletzung kein Gehirngewebe entnommen werden, was die Diskrepanz zwischen der Anzahl der Probespender und der Anzahl der einzelnen Gewebeproben erklärt. In die Studie wurden des Weiteren bereits vorhandene Proben von 14 weiteren Individuen aufgenommen, welche im Rahmen der in 3.2 beschriebenen Teilstudie generiert wurden.

### Probencharakterisierung

Das mittlere Alter zum Todeszeitpunkt der 19 männlichen- und 11 weiblichen Probenspender lag bei 47 Jahren (17 bis 84 Jahre). Der Zeitraum zwischen Versterben und Probenentnahme (Postmortalintervall) bewegte sich in einem Rahmen von vier bis 81 Stunden (mittleres PMI 30 Stunden). Basierend auf den routinemäßig stattfindenden makroskopischen, mikroskopischen, biochemischen und toxikologischen Untersuchungen wurde bei den Individuen ein plötzlicher Herztod (acht Individuen) bzw. ein Tod durch Erstickten (10 Individuen) diagnostiziert. Letztere Todesursache schloss neben dem Ertrinken den Tod durch Erstickten infolge mechanischer Einwirkung z.B durch Strangulation oder andere Obstruktion der Atemwege mit ein. Es lagen keinerlei Hinweise auf ein Versterben aus sonstiger Ursache vor. Als Kontrollgruppe dienten Gewebeproben von Individuen, die durch Verbluten bzw. Aortenruptur sowie durch eine zentrale Dysregulation infolge eines Polytraumas verstorben waren (12 Individuen). Auch in diese Gruppe wurden ausschließlich Proben von Individuen einbezogen, deren Todesursache eindeutig beschrieben werden konnte. Der Sterbeprozess der Probenspender, die der Kontrollgruppe zugeordnet wurden, war von einem sofortigen Blutdruckabfall begleitet, was einen unmittelbaren Todeseintritt zur Folge hatte. Das bedeutet, dass der Sterbeprozess an sich nur von einer sehr kurzen Agoniedauer begleitet wurde. Theoretisch waren somit keine bzw. nur geringste Reaktionen auf einen möglichen Sauerstoffmangel zu erwarten. Tabellen 8.1 und 8.2 geben einen Überblick über sämtliche Informationen, die zu jedem Probenspender gesammelt werden konnten.

### Quantitätskontrolle der RNA-Extrakte

Die Quantität und Reinheit der DNase-behandelten und gereinigten RNA-Extrakte (siehe 2.2.3 und 2.2.4) wurde in Einfachbestimmung mit Hilfe eines NanoDrop ND-1000 Gerätes gemessen (siehe 2.2.5). Die Integrität der Proben, ausgedrückt über die RNA-Integritätsnummer (RIN), wurde durch die chip-basierte Elektrophorese eines Agilent Bioanalyzers ermittelt (siehe 2.2.6).

Tabelle 3.8: Quantität, Reinheit und Integrität der RNA-Proben, die mittels Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol extrahiert wurden. Die Reinheit der RNA wird über das Verhältnis der gemessenen Absorption bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm angegeben. Die RNA-Integrität wird angegeben über die RNA Integritäts Nummer (RIN). Proben, deren RIN-Messung kein verwertbares Ergebnis lieferten, sind mit „-“ markiert. Probenspender, deren RNA-Extrakte von einer vorhergehenden Studie weiterverwendet wurden, sind mit „\*“ gekennzeichnet.

Individuum	Gewebe	RNA Quantität [ng/µL]	280/260	RNA Integrität [RIN]
MS 92/07	Herzmuskel	88,24	2,0	6,0
	Skelettmuskel	108,87	2,1	5,8
	Gehirn	12,90	1,8	2,4
MS 47/08	Herzmuskel	467,56	2,1	-
	Skelettmuskel	75,88	2,1	-
	Gehirn	9,18	2,1	-
MS 230/07 *	Herzmuskel	317,29	0,7	5,8
	Skelettmuskel	299,47	1,0	4,2
	Gehirn	37,20	0,5	1,4
MS 159/07 *	Herzmuskel	631,35	2,1	5,1
	Skelettmuskel	120,64	2,0	2,0
	Gehirn	84,13	2,0	2,3
MS 110/07 *	Herzmuskel	728,45	2,1	2,6
	Skelettmuskel	129,81	2,1	2,2
	Gehirn	318,04	2,1	2,8
MS 479/07 *	Herzmuskel	710,10	2,1	2,7
	Skelettmuskel	214,21	2,1	6,6
	Gehirn	140,79	2,1	2,7
MS 266/08	Herzmuskel	43,87	2,1	5,2
	Skelettmuskel	180,24	2,1	2,4
	Gehirn	196,71	2,1	2,1
FR 254/08	Herzmuskel	185,68	2,1	2,6
	Skelettmuskel	136,56	2,0	1,0
	Gehirn	52,03	2,0	2,3
FR 207/07	Herzmuskel	51,25	2,0	-
	Skelettmuskel	27,23	1,9	-
	Gehirn	130,51	2,1	-
FR 137/06	Herzmuskel	132,35	2,1	6,4
	Skelettmuskel	82,60	2,0	5,1
	Gehirn	251,71	2,1	2,5
MS 317/07	Herzmuskel	130,96	2,0	-
	Skelettmuskel	163,29	2,1	-
	Gehirn	102,14	2,1	-
MS 284/07 *	Herzmuskel	390,67	2,1	2,3
	Skelettmuskel	397,76	2,1	5,2
	Gehirn	305,13	2,1	5,3
MS 234/07 *	Herzmuskel	249,21	2,1	2,7
	Skelettmuskel	205,45	2,0	3,3
	Gehirn	629,77	2,1	3,5
MS 184/07 *	Herzmuskel	170,83	1,5	2,7
	Skelettmuskel	300,38	1,5	3,9
	Gehirn	234,57	1,5	2,1
MS 152/07 *	Herzmuskel	641,61	2,0	4,5
	Skelettmuskel	373,78	2,1	5,7
	Gehirn	282,01	2,1	2,4

Individuum	Gewebe	RNA Quantität [ng/µL]	280/260	RNA Integrität [RIN]
MS 122/07 *	Herzmuskel	85,68	2,0	2,7
	Skelettmuskel	45,14	2,0	2,5
	Gehirn	97,33	2,1	2,6
MS 111/07 *	Herzmuskel	102,02	2,0	2,5
	Skelettmuskel	78,74	2,0	2,4
	Gehirn	82,21	2,0	2,4
MS 01/08	Herzmuskel	35,52	2,1	2,1
	Skelettmuskel	522,54	2,3	2,5
	Gehirn	285,55	2,1	2,2
FR 67/06	Herzmuskel	845,02	2,1	4,2
	Skelettmuskel	219,36	2,1	4,2
	Gehirn	602,06	2,1	2,3
FR 520/05	Herzmuskel	405,99	2,1	2,5
	Skelettmuskel	150,12	2,1	4,8
	Gehirn	170,66	2,0	2,2
FR 491/07	Herzmuskel	645,70	2,1	3,2
	Skelettmuskel	347,44	2,1	5,0
	Gehirn	307,08	2,1	2,5
FR 490/07	Herzmuskel	300,88	2,1	2,4
	Skelettmuskel	330,51	2,1	6,1
	Gehirn	70,51	2,1	2,4
FR 34/06	Herzmuskel	145,40	2,1	2,3
	Skelettmuskel	210,30	2,1	3,9
	Gehirn	74,70	2,1	2,4
FR 320/06	Herzmuskel	1089,48	2,1	3,8
	Skelettmuskel	366,63	2,1	3,1
	-	-	-	-
FR 268/08	Herzmuskel	90,25	2,1	2,1
	Skelettmuskel	53,51	2,0	4,7
	-	-	-	-
MS 213/07 *	Herzmuskel	467,98	2,1	2,3
	Skelettmuskel	472,85	2,1	5,1
	Gehirn	539,35	2,1	4,6
FR 453/07 *	Herzmuskel	603,77	2,1	4,7
	Skelettmuskel	422,81	2,1	4,2
	Gehirn	17,30	2,1	1,0
MS 260/07 *	Herzmuskel	344,19	2,1	6,4
	Skelettmuskel	259,37	2,1	6,3
	Gehirn	435,87	2,1	2,4
FR 446/07 *	Herzmuskel	667,92	2,1	2,1
	Skelettmuskel	260,95	2,1	4,4
	Gehirn	157,69	2,1	2,5
MS 11/08	Herzmuskel	314,71	2,1	4,8
	Skelettmuskel	104,14	2,1	5,3
	Gehirn	441,73	2,1	4,1

Tabelle 3.8 liefert eine zusammenfassende Übersicht über die Ergebnisse der Messung von RNA-Quantität, -Reinheit und -Integrität. Proben, deren RIN-Messung kein verwertbares Ergebnis lieferte, sind entsprechend markiert. Individuen, deren RNA-Extrakte von einer vorhergehenden Studie weiterverwendet wurden, sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet.

Die Messung der Quantität der extrahierten RNA-Proben ergab eine mittlere RNA-Menge von 369,46 ng/μL aus Herzgewebe (Bereich von 35,52 ng/μL bis 1089,48 ng/μL), von 222,02 ng/μL aus Skelettmuskelgewebe (Bereich von 27,23 ng/μL bis 522,54 ng/μL) sowie von 216,74 ng/μL RNA aus Gehirngewebe (Bereich von 9,18 ng/μL bis 629,77 ng/μL) (siehe Tabelle 3.8).

Die des Weiteren mittels Nano-Drop ND-1000 ermittelte Extrakt-Reinheit, ausgedrückt über das Verhältnis der gemessenen Absorption bei 260 und 280 nm wies bei 80 der insgesamt 88 DNase-behandelten und aufgereinigten RNA-Extrakte ein Verhältnis zwischen 1,9 und 2,2 auf. Acht Proben (MS 230/07 Herz, Muskel, Gehirn; MS 184/07 Herz, Muskel; MS 92/07 Gehirn, MS 01/08 Muskel) lieferten Werte, die davon abwichen (siehe Tabelle 3.8).

27 der insgesamt 30 Herzmuskel-RNA-Extrakte wiesen eine mittlere RNA-Integrität von 3,6 auf (Bereich 2,1 bis 6,4). 27 der 30 Skelettmuskel-Proben zeigten eine mittlere RIN von 4,1 (Bereich 1,0 bis 6,6). 25 der 30 Gehirn-Proben zeigten eine mittlere RIN von 2,6 (Bereich 1,0 bis 5,3). Die RNA-Integrität konnte nicht von jeder Probe ermittelt werden. Die Mittelwerte beruhen daher ausschließlich auf den erfolgreich durchgeführten Messungen.

### Reverse Transkription und Quantifizierung von HIF-1 $\alpha$ , VEGF und SLC2A1

Die 46 DNase-behandelten und aufgereinigten RNA-Extrakte wurden im Weiteren wie in 2.2.7 beschrieben in cDNA konvertiert. Mittels quantitativer Real-Time PCR (RT-qPCR) erfolgte die Quantifizierung der Zielgen-Transkripte des Hypoxie-induzierten-Faktors-1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ), des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) sowie des Glukose-Transporters 1 (Glut 1 bzw. SLC2A1) in sämtlichen, in die Studie einbezogenen 88 RNA-Extrakten (30 Individuen).

Tabelle 3.9 gibt eine Übersicht über die mittleren  $C_q$ -Werte der in Triplikaten quantifizierten Zielgen-Transkripte sowie über die sich aus den Einzelwerten ergebenden Standardabweichungen. In sieben von 88 cDNA-Proben konnten keine gültigen  $C_q$ -Werte generiert werden. Diese sind in Tabelle 3.9 mit „-“ gekennzeichnet. Diese Proben wurden aus der weiteren Datenanalyse ausgeschlossen.



Tabelle 3.9: Ergebnisse aus der Quantifizierung der Gen-Transkripte von HIF-1 $\alpha$ , VEGF und SLC2A1 in RNA-Proben, die mittels Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol aus postmortalem Human-Herzmuskel-, Skelettmuskel- und Gehirngewebe isoliert wurden. Der mittlere C<sub>q</sub>-Wert beruht auf der Quantifizierung in Triplikaten.

Individuum	Gewebe	Mittlerer C <sub>q</sub> -Wert HIF-1 $\alpha$	Standard-abweichung	Mittlerer C <sub>q</sub> -Wert VEGF	Standard-abweichung	Mittlerer C <sub>q</sub> -Wert SLC2A1	Standard-abweichung
MS 92/07	Herzmuskel	28,61	0,03	28,98	0,04	28,89	0,06
	Skelettmuskel	31,35	0,43	28,26	0,39	30,96	0,94
	Gehirn	-	-	35,15	0,32	38,33	0,02
MS 47/08	Herzmuskel	27,62	0,04	27,81	0,12	28,84	0,05
	Skelettmuskel	31,80	0,14	28,43	0,34	35,75	0,27
	Gehirn	27,01	0,08	30,51	0,24	28,60	0,17
MS 230/07	Herzmuskel	26,48	0,03	27,79	0,03	28,28	0,03
	Skelettmuskel	28,82	0,82	27,11	0,58	32,64	0,49
	Gehirn	26,29	0,67	28,57	0,47	27,59	0,63
MS 159/07	Herzmuskel	27,96	0,18	27,27	0,08	28,32	0,03
	Skelettmuskel	30,75	0,60	28,09	1,08	35,51	0,49
	Gehirn	25,18	0,04	27,53	0,94	27,05	0,63
MS 110/07	Herzmuskel	28,32	0,05	28,12	0,08	29,77	0,16
	Skelettmuskel	27,96	0,72	25,06	0,80	27,10	0,47
	Gehirn	25,19	0,30	28,55	0,45	24,47	0,68
MS 479/07	Herzmuskel	28,28	0,56	28,65	0,17	29,95	0,17
	Skelettmuskel	28,09	0,21	25,98	0,71	28,22	0,09
	Gehirn	25,06	0,09	28,11	0,66	25,09	0,36
MS 266/08	Herzmuskel	29,42	0,12	27,34	0,11	29,11	0,03
	Skelettmuskel	34,23	1,00	29,93	0,58	33,51	1,13
	Gehirn	35,81	0,85	32,15	0,55	29,87	0,45
FR 254/08	Herzmuskel	28,47	0,05	29,26	0,07	28,01	0,19
	Skelettmuskel	38,01	0,54	33,13	0,23	-	-
	Gehirn	33,86	0,47	32,47	1,76	29,55	0,31
FR 207/07	Herzmuskel	25,59	0,02	28,32	2,69	26,95	0,04
	Skelettmuskel	28,33	0,13	25,54	0,11	33,59	0,25
	Gehirn	-	-	-	-	-	-
FR 137/06	Herzmuskel	25,47	0,03	26,38	0,07	26,64	0,03
	Skelettmuskel	29,62	0,44	27,38	0,37	31,87	0,43
	Gehirn	28,87	0,62	31,59	1,20	27,40	0,20
MS 317/07	Herzmuskel	30,11	0,08	28,01	0,11	31,58	0,16
	Skelettmuskel	32,18	0,58	28,78	0,23	34,91	0,22
	Gehirn	-	-	38,90	0,65	-	-
MS 284/07	Herzmuskel	30,59	0,33	25,70	1,11	33,10	0,62
	Skelettmuskel	32,59	0,43	33,75	0,59	33,90	0,30
	Gehirn	37,21	0,00	32,01	0,75	29,54	0,34
MS 234/07	Herzmuskel	28,66	0,12	25,98	0,39	31,61	0,25
	Skelettmuskel	27,64	0,19	27,14	0,10	28,27	0,32
	Gehirn	26,51	0,25	29,26	0,34	26,15	0,06
MS 184/07	Herzmuskel	31,69	0,52	29,72	0,62	32,24	0,23
	Skelettmuskel	29,25	0,08	27,37	0,08	30,01	0,12
	Gehirn	29,09	0,50	29,63	0,32	28,62	0,34
MS 152/07	Herzmuskel	29,28	0,07	29,74	0,14	30,96	0,06
	Skelettmuskel	28,74	0,17	26,27	0,63	35,09	0,50
	Gehirn	32,39	0,55	30,57	0,28	27,80	0,34
MS 122/07	Herzmuskel	28,19	0,28	26,29	1,46	28,94	0,96
	Skelettmuskel	28,90	0,09	26,72	0,29	31,59	0,22
	Gehirn	28,31	0,32	28,14	0,41	26,78	0,43
MS 111/07	Herzmuskel	28,23	0,25	26,87	0,94	29,46	0,31
	Skelettmuskel	28,43	0,66	26,31	0,59	30,87	0,34
	Gehirn	27,57	0,35	29,26	0,31	25,75	0,53
MS 01/08	Herzmuskel	34,12	0,10	28,27	0,13	34,65	0,46
	Skelettmuskel	30,60	0,40	30,00	0,14	33,11	0,11
	Gehirn	27,74	1,23	29,88	0,60	27,48	0,33

FR 67/06	Herzmuskel	32,32	0,02	32,86	0,19	33,52	0,39
	Skelettmuskel	29,36	0,61	31,19	0,18	30,69	0,29
	Gehirn	32,61	0,45	34,99	0,59	30,94	0,50
FR 520/05	Herzmuskel	34,40	0,35	33,98	0,09	33,97	0,22
	Skelettmuskel	29,87	0,10	29,11	0,09	32,45	0,14
	Gehirn	28,13	0,08	31,53	0,56	27,55	0,28
FR 491/07	Herzmuskel	34,33	0,20	33,96	0,24	34,71	0,29
	Skelettmuskel	31,20	0,04	28,86	0,11	34,14	0,37
	Gehirn	35,41	0,15	36,39	0,84	31,34	0,60
FR 490/07	Herzmuskel	39,39	0,00	37,37	0,07	35,58	0,52
	Skelettmuskel	30,25	0,02	27,77	0,39	33,13	0,18
	Gehirn	33,59	0,34	36,78	0,42	33,67	0,42
FR 34/06	Herzmuskel	33,18	0,12	32,75	0,61	33,50	0,21
	Skelettmuskel	31,86	0,08	30,29	0,05	36,05	0,18
	Gehirn	29,29	0,01	31,13	0,15	28,26	0,04
FR 320/06	Herzmuskel	33,98	0,19	33,95	0,30	35,08	0,45
	Skelettmuskel	32,44	0,38	30,23	0,24	36,39	1,02
FR 268/08	Herzmuskel	31,99	0,06	29,87	0,17	31,84	0,15
	Skelettmuskel	29,59	0,50	25,42	0,25	31,48	0,03
MS 213/07	Herzmuskel	32,83	0,14	32,76	0,09	34,62	0,26
	Skelettmuskel	30,70	0,46	28,92	0,41	34,54	0,82
	Gehirn	26,71	0,20	27,79	2,55	26,66	0,05
FR 453/07	Herzmuskel	28,88	0,05	28,51	0,09	29,80	0,12
	Skelettmuskel	29,13	0,01	27,55	0,02	31,97	0,06
	Gehirn	27,59	0,11	32,11	0,14	30,26	0,02
MS 260/07	Herzmuskel	26,11	0,01	26,56	0,00	27,06	0,07
	Skelettmuskel	28,54	0,05	25,43	0,17	33,00	0,14
	Gehirn	26,67	0,10	28,63	1,33	26,74	0,16
FR 446/07	Herzmuskel	31,75	0,11	31,60	0,12	33,61	0,28
	Skelettmuskel	29,40	0,11	25,70	0,71	33,14	0,56
	Gehirn	28,25	0,03	30,17	0,05	27,13	0,03
MS 11/08	Herzmuskel	29,44	0,58	30,31	1,43	29,94	0,49
	Skelettmuskel	28,66	0,35	26,93	0,62	32,79	0,63
	Gehirn	28,52	0,92	33,04	0,77	29,02	0,60

Neben den Zielgen-Transkripten wurden in den 46 neu generierten cDNA-Proben (16 Individuen) die Kontrollgen-Transkripte von HMBS, UBC, SDHA, B2M und GAPDH in Duplikaten bzw. Triplikaten quantifiziert. Diese Daten sollen im Weiteren der Normalisierung der Zielgene dienen. Die bereits ermittelten  $C_q$ -Werte dieser Kontrollgen-Transkripte der in Teilstudie 2 (siehe 3.2) generierten 42 cDNA-Proben (14 Individuen) wurden in den vorliegenden Probenumfang sowie in die aktuelle Datenanalyse einbezogen. Tabelle 3.10 sowie Tabelle 3.11 liefern eine Übersicht über die Ergebnisse sämtlicher Kontrollgen-Transkript-Quantifizierungen. Bei 31 der insgesamt 325 Messungen konnte kein gültiger  $C_q$ -Wert generiert werden. Diese Proben wurden aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die in den Tabellen mit „\*“ gekennzeichneten Proben wurden in Duplikaten gemessen. Die Gentranskript-Quantifizierung der übrigen Proben erfolgte in Triplikaten. Die in den Tabellen 3.10 und 3.11 angegebenen mittleren  $C_q$ -Werte wurden aus den drei bzw. zwei Einzelmessungen errechnet. Die Standardabweichung der Einzelwerte ist ebenso tabellarisch erfasst.

Tabelle 3.10: Ergebnisse aus der Quantifizierung der Gen-Transkripte von HMBS, UBC, SDHA und B2M in RNA-Proben, die mittels Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol aus postmortalem Human-Herzmuskel-, Skelettmuskel- und Gehirngewebe isoliert wurden. Bei den mit "\*" gekennzeichneten Individuen beruht der mittlere C<sub>q</sub>-Wert auf der Quantifizierung in Duplikaten. Der mittlere C<sub>q</sub>-Wert der übrigen Proben beruht auf der Quantifizierung in Triplikaten.

Individuum	Gewebe	Mittlerer C <sub>q</sub> -Wert HMBS $\alpha$	Standard-abweichung	Mittlerer C <sub>q</sub> -Wert UBC	Standard-abweichung	Mittlerer C <sub>q</sub> -Wert SDHA	Standard-abweichung	Mittlerer C <sub>q</sub> -Wert B2M	Standard-abweichung
MS 92/07 *	Herzmuskel	26,50	0,06	20,99	0,09	23,56	0,03	20,07	0,09
	Skelettmuskel	25,18	0,02	17,42	0,08	24,47	0,04	21,10	0,06
	Gehirn	30,26	0,15	22,73	0,17	28,41	0,03	22,62	0,04
MS 47/08 *	Herzmuskel	29,21	0,02	23,40	0,09	25,64	0,19	21,94	0,18
	Skelettmuskel	29,24	0,04	25,12	0,01	28,47	0,20	25,66	0,18
	Gehirn	28,99	0,14	-	-	-	-	-	-
MS 230/07*	Herzmuskel	27,76	0,10	21,02	0,21	24,32	0,21	20,78	0,10
	Skelettmuskel	26,27	0,00	20,20	0,42	24,99	0,10	22,73	0,18
	Gehirn	28,51	0,03	21,77	0,22	28,13	0,11	20,52	0,13
MS 159/07*	Herzmuskel	28,11	0,07	22,50	0,01	24,67	0,02	21,75	0,00
	Skelettmuskel	27,82	0,18	22,50	0,16	27,71	0,03	24,04	0,13
	Gehirn	27,98	0,08	21,14	0,20	26,93	0,22	21,89	0,02
MS 110/07*	Herzmuskel	29,21	0,06	23,86	0,09	26,39	0,04	21,30	0,17
	Skelettmuskel	24,46	0,06	19,35	0,11	23,06	0,14	20,32	0,01
	Gehirn	27,29	0,03	20,18	0,12	25,30	0,15	21,33	0,03
MS 479/07*	Herzmuskel	29,97	0,02	23,70	0,01	25,40	0,14	22,69	0,04
	Skelettmuskel	26,88	0,17	20,04	0,13	24,62	0,01	21,37	0,08
	Gehirn	27,87	0,01	21,50	0,17	26,12	0,10	21,92	0,06
MS 266/08	Herzmuskel	29,45	0,21	23,79	0,03	25,47	0,11	21,99	0,18
	Skelettmuskel	30,02	0,22	25,46	0,15	27,53	0,05	27,18	0,05
	Gehirn	32,68	0,36	28,13	0,06	31,53	0,09	30,43	0,07
FR 254/08	Herzmuskel	28,86	0,02	23,51	0,11	25,46	0,09	22,10	0,08
	Skelettmuskel	33,37	0,15	29,90	0,14	34,06	0,21	30,35	0,18
	Gehirn	32,83	0,23	28,03	0,09	31,03	0,14	28,30	0,16
FR 207/07	Herzmuskel	-	-	-	-	-	-	-	-
	Skelettmuskel	-	-	-	-	-	-	-	-
	Gehirn	-	-	-	-	-	-	-	-
FR 137/06	Herzmuskel	26,67	0,21	21,49	0,02	23,74	0,24	19,68	0,14
	Skelettmuskel	26,32	0,02	21,73	0,13	26,37	0,34	22,23	0,19
	Gehirn	30,90	0,17	25,11	0,09	29,08	0,31	24,40	0,14
MS 317/07	Herzmuskel	30,27	0,17	24,96	0,08	27,74	0,10	22,58	0,27
	Skelettmuskel	29,26	0,10	24,80	0,06	28,17	0,23	25,60	0,14
	Gehirn	-	-	-	-	-	-	-	-
MS 284/07*	Herzmuskel	34,22	0,10	27,25	0,07	32,37	0,33	26,54	0,14
	Skelettmuskel	27,05	0,01	21,94	0,12	25,19	0,16	23,06	0,04
	Gehirn	32,52	0,20	27,71	0,18	30,41	0,18	30,39	0,01
MS 234/07*	Herzmuskel	26,51	0,03	19,27	0,06	25,18	0,12	21,72	0,07
	Skelettmuskel	29,15	0,04	22,87	0,15	24,41	0,13	20,93	0,19
	Gehirn	29,35	0,02	22,85	0,01	26,80	0,01	23,08	0,04
MS 184/07*	Herzmuskel	31,66	0,01	26,80	0,34	28,38	0,05	24,10	0,15
	Skelettmuskel	29,39	0,03	23,36	0,04	28,50	0,13	22,18	0,13
	Gehirn	30,33	0,10	23,50	0,06	28,61	0,21	24,13	0,04
MS 152/07*	Herzmuskel	31,79	0,26	22,24	0,19	27,38	0,03	23,40	0,09
	Skelettmuskel	28,08	0,10	25,50	0,33	26,21	0,27	23,00	0,11
	Gehirn	32,01	0,01	25,78	0,08	28,50	0,15	27,03	0,10
MS 122/07*	Herzmuskel	26,95	0,13	22,62	0,12	24,88	0,05	21,86	0,04
	Skelettmuskel	25,28	0,13	21,59	0,05	25,26	0,13	22,58	0,24
	Gehirn	28,47	0,08	24,44	0,08	27,78	0,04	23,67	0,14
MS 111/07*	Herzmuskel	28,86	0,14	22,89	0,06	26,22	0,02	21,64	0,11
	Skelettmuskel	26,65	0,22	20,21	0,01	27,73	0,04	22,09	0,00
	Gehirn	28,34	0,06	22,51	0,05	27,07	0,09	23,10	0,09

## Ergebnisse

MS 01/08	Herzmuskel	30,47	0,27	26,80	0,13	27,95	0,12	26,21	0,12
	Skelettmuskel	33,69	0,62	27,03	0,02	30,56	0,19	23,41	0,05
	Gehirn	28,75	0,12	23,68	0,04	28,26	0,32	22,37	0,17
FR 67/06	Herzmuskel	29,39	0,12	23,24	0,17	25,33	0,08	22,73	0,17
	Skelettmuskel	27,30	0,07	21,03	0,09	23,70	0,11	21,01	0,02
	Gehirn	30,62	0,06	25,09	0,25	28,70	0,12	25,47	0,15
FR 520/05	Herzmuskel	29,87	0,24	24,09	0,38	25,57	0,06	23,10	0,03
	Skelettmuskel	27,07	0,14	20,31	0,15	24,58	0,16	21,62	0,13
	Gehirn	28,36	0,15	22,31	0,04	26,37	0,03	22,95	0,19
FR 491/07	Herzmuskel	30,73	0,22	25,54	0,09	26,41	0,09	23,89	0,16
	Skelettmuskel	27,09	0,05	21,55	0,11	25,08	0,06	22,95	0,05
	Gehirn	33,94	0,33	28,16	0,07	30,96	0,24	27,90	0,27
FR 490/07	Herzmuskel	33,87	0,18	29,00	1,69	29,71	0,01	29,72	0,06
	Skelettmuskel	28,18	0,06	21,59	0,10	25,50	0,00	23,44	0,04
	Gehirn	34,52	0,17	28,72	0,14	32,81	0,26	28,39	0,15
FR 34/06	Herzmuskel	31,32	0,09	26,78	0,09	28,24	0,10	23,27	0,09
	Skelettmuskel	27,57	0,06	22,95	0,09	24,92	0,14	24,59	0,40
	Gehirn	28,33	0,12	23,45	0,03	27,91	0,04	23,86	0,14
FR 320/06	Herzmuskel	30,81	0,15	25,77	0,80	26,65	0,06	23,69	0,03
	Skelettmuskel	28,32	0,15	22,56	0,24	26,10	0,09	23,23	0,05
FR 268/08	Herzmuskel	30,85	0,14	26,84	0,13	27,78	0,15	24,49	0,23
	Skelettmuskel	25,29	0,08	20,50	0,13	23,93	0,19	21,98	0,05
MS 213/07*	Herzmuskel	33,64	0,39	27,92	0,07	31,61	0,25	25,62	0,02
	Skelettmuskel	26,79	0,11	21,49	0,05	25,15	0,04	23,01	0,01
	Gehirn	28,47	0,02	21,93	0,01	26,30	0,10	22,89	0,14
FR 453/07*	Herzmuskel	29,63	0,11	24,13	0,03	25,94	0,10	21,46	0,03
	Skelettmuskel	26,73	0,24	21,48	0,01	24,81	0,00	22,73	0,04
	Gehirn	33,15	0,07	26,00	0,05	30,05	0,10	25,36	0,01
MS 260/07*	Herzmuskel	26,92	0,11	20,91	0,15	23,26	0,13	19,77	0,01
	Skelettmuskel	25,31	0,11	19,70	0,04	23,76	0,20	20,58	0,04
	Gehirn	29,60	0,02	22,57	0,23	26,87	0,15	23,21	0,05
FR 446/07*	Herzmuskel	33,39	0,21	26,81	0,14	30,11	0,12	23,32	0,04
	Skelettmuskel	26,33	0,04	20,55	0,23	25,47	0,27	22,57	0,05
	Gehirn	30,25	0,11	24,61	0,25	28,92	0,10	23,11	0,04
MS 11/08	Herzmuskel	-	-	-	-	-	-	-	-
	Skelettmuskel	-	-	-	-	-	-	-	-
	Gehirn	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 3.11: Ergebnisse aus der Quantifizierung des Gen-Transkripts von GAPDH in RNA-Proben, die mittels Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol aus postmortalem Human-Herzmuskel-, Skelettmuskel- und Gehirngewebe isoliert wurden. Bei den mit "\*" gekennzeichneten Individuen beruht der mittlere GAPDH-C<sub>q</sub>-Wert auf der Quantifizierung in Duplikaten. Der mittlere C<sub>q</sub>-Wert der übrigen Proben beruht auf der Quantifizierung in Triplikaten.

Individuum	Gewebe	Mittlerer C <sub>q</sub> -Wert GAPDH	Standard-abweichung
MS 92/07 *	Herzmuskel	22,62	0,06
	Skelettmuskel	21,27	0,08
	Gehirn	34,85	0,27
MS 47/08 *	Herzmuskel	21,19	0,13
	Skelettmuskel	21,86	0,05
	Gehirn	23,20	0,05
MS 230/07*	Herzmuskel	20,11	0,09
	Skelettmuskel	17,36	0,11
	Gehirn	22,77	0,07
MS 159/07*	Herzmuskel	23,67	1,14
	Skelettmuskel	20,79	0,10
	Gehirn	21,49	0,11
MS 110/07*	Herzmuskel	23,48	0,05
	Skelettmuskel	16,14	0,18
	Gehirn	18,97	0,09
MS 479/07*	Herzmuskel	22,90	0,09
	Skelettmuskel	16,29	0,10
	Gehirn	20,28	0,36
MS 266/08	Herzmuskel	22,96	0,02
	Skelettmuskel	22,96	0,04
	Gehirn	27,11	0,19
FR 254/08	Herzmuskel	23,01	0,08
	Skelettmuskel	28,25	0,09
	Gehirn	27,09	0,02
FR 207/07	Herzmuskel	20,40	0,07
	Skelettmuskel	18,06	0,09
	Gehirn	38,06	1,01
FR 137/06	Herzmuskel	19,19	0,07
	Skelettmuskel	19,09	0,04
	Gehirn	24,53	0,05
MS 317/07	Herzmuskel	25,08	0,06
	Skelettmuskel	22,67	0,12
	Gehirn	-	-
MS 284/07*	Herzmuskel	28,36	0,09
	Skelettmuskel	18,10	0,05
	Gehirn	26,35	0,02
MS 234/07*	Herzmuskel	18,24	0,03
	Skelettmuskel	24,06	0,00
	Gehirn	20,99	0,17
MS 184/07*	Herzmuskel	24,26	0,01
	Skelettmuskel	28,36	0,09
	Gehirn	24,05	0,09
MS 152/07*	Herzmuskel	24,30	0,08
	Skelettmuskel	18,28	0,11
	Gehirn	23,67	0,21

Individuum	Gewebe	Mittlerer C <sub>q</sub> -Wert GAPDH	Standard-abweichung
MS 122/07*	Herzmuskel	21,05	0,01
	Skelettmuskel	17,95	0,07
	Gehirn	23,29	0,10
MS 111/07*	Herzmuskel	23,48	0,05
	Skelettmuskel	21,88	0,21
	Gehirn	22,00	0,16
MS 01/08	Herzmuskel	23,73	0,16
	Skelettmuskel	27,23	0,10
	Gehirn	22,78	0,10
FR 67/06	Herzmuskel	22,11	0,07
	Skelettmuskel	18,04	0,13
	Gehirn	24,70	0,11
FR 520/05	Herzmuskel	23,38	0,08
	Skelettmuskel	18,03	0,02
	Gehirn	21,57	0,07
FR 491/07	Herzmuskel	25,06	0,08
	Skelettmuskel	17,87	0,06
	Gehirn	27,98	0,09
FR 490/07	Herzmuskel	30,21	0,17
	Skelettmuskel	18,22	0,01
	Gehirn	28,54	0,09
FR 34/06	Herzmuskel	28,60	0,06
	Skelettmuskel	20,02	0,02
	Gehirn	24,37	0,09
FR 320/06	Herzmuskel	24,97	0,10
	Skelettmuskel	19,69	0,03
FR 268/08	Herzmuskel	27,82	0,09
	Skelettmuskel	17,58	0,06
MS 213/07*	Herzmuskel	29,29	0,11
	Skelettmuskel	19,02	0,05
	Gehirn	21,07	0,07
FR 453/07*	Herzmuskel	24,29	0,05
	Skelettmuskel	18,69	0,13
	Gehirn	26,85	0,07
MS 260/07*	Herzmuskel	19,45	0,18
	Skelettmuskel	16,71	0,03
	Gehirn	21,76	0,28
FR 446/07*	Herzmuskel	27,92	0,20
	Skelettmuskel	17,94	0,06
	Gehirn	24,35	0,01
MS 11/08	Herzmuskel	21,92	0,02
	Skelettmuskel	21,88	0,21
	Gehirn	21,13	0,06

Analog zu den in Tabelle 3.10 aufgeführten Ergebnissen ergab die Quantifizierung der Zielgentranskripte in sämtlichen Herzmuskel-Proben der Zielgruppe einen mittleren  $C_q$ -Wert von 28,73 für HIF-1 $\alpha$  (Bereich 25,45 bis 34,25), von 27,81 für VEGF (Bereich von 24,13 bis 32,12) bzw. von 29,85 für SLC2A1 (Bereich 26,60 bis 35,29). In den Skelettmuskel-Proben der Zielgruppe lieferte die Quantifizierung einen mittleren  $C_q$ -Wert von 30,33 für HIF1 $\alpha$  (Bereich 26,99 bis 38,69), von 28,07 für VEGF (Bereich von 24,09 bis 34,49) bzw. von 32,29 für SLC2A1 (Bereich 26,74 bis 38,56). In den Gehirn-Proben der Zielgruppe ergab die Quantifizierung von HIF-1 $\alpha$  einen mittleren  $C_q$ -Wert von 28,97 (Bereich von 28,97 bis 37,21). Die Quantifizierung von VEGF lieferte einen mittleren  $C_q$ -Wert von 30,56 (Bereich von 26,33 bis 39,55). Für SLC2A1 lag der Wert bei 27,91 (Bereich von 23,61 bis 38,34).

Die Quantifizierung der Zielgentranskripte in sämtlichen Herzmuskel-Proben der Kontrollgruppe lieferte einen mittleren  $C_q$ -Wert von 31,97 für HIF-1 $\alpha$  (Bereich 26,09 bis 39,39), von 32,04 für VEGF (Bereich von 26,55 bis 37,44) bzw. von 32,77 für SLC2A1 (Bereich 26,96 bis 36,31). In den Skelettmuskel-Proben der Kontrollgruppe brachte die Quantifizierung einen mittleren  $C_q$ -Wert von 30,08 für HIF1 $\alpha$  (Bereich 28,33 bis 32,89), von 28,12 für VEGF (Bereich von 24,87 bis 31,44) bzw. von 33,31 für SLC2A1 (Bereich 30,41 bis 37,51). In den Gehirn-Proben der Kontrollgruppe ergab die Quantifizierung von HIF-1 $\alpha$  einen mittleren  $C_q$ -Wert von 29,68 (Bereich von 26,43 bis 35,57). Die Quantifizierung von VEGF lieferte einen mittleren  $C_q$ -Wert von 32,26 (Bereich von 24,19 bis 37,32). Für SLC2A1 lag der Wert bei 29,24 (Bereich von 26,61 bis 34,25).

Analog zu den in Tabelle 3.11 aufgeführten Ergebnissen ergab die Quantifizierung der Kontrollgentranskripte in sämtlichen Herzmuskel-Proben der Zielgruppe einen mittleren  $C_q$ -Wert von 29,20 für HMBS (Bereich 26,38 bis 34,32), von 23,61 für UBC (Bereich von 19,21 bis 27,32), von 26,14 für SDHA (Bereich 23,45 bis 32,69), von 22,38 für B2M (Bereich von 19,51 bis 26,67) bzw. von 22,81 für GAPDH (Bereich von 18,21 bis 28,45).

In Skelettmuskel-Proben der Zielgruppe lieferte die Quantifizierung einen mittleren  $C_q$ -Wert von 28,45 für HMBS (Bereich 24,39 bis 34,52), von 23,14 für UBC (Bereich von 17,34 bis 30,08), von 27,29 für SDHA (Bereich von 22,92 bis 34,33), von 23,75 für B2M (Bereich von 20,31 bis 30,51) bzw. von 21,24 für GAPDH (Bereich 15,96 bis 28,32). In Gehirn-Proben der Zielgruppe ergab die Quantifizierung von HMBS einen mittleren  $C_q$ -Wert von 29,88 (Bereich von 27,26 bis 33,04). Die Quantifizierung von UBC lieferte einen mittleren  $C_q$ -Wert von 24,21 (Bereich von 20,06 bis 28,20). Für SDHA lag der Wert bei 28,46 (Bereich von 25,15 bis 31,62), für B2M bei 24,58 (Bereich von 20,39 bis 30,51) bzw. für GAPDH bei 23,49 (Bereich von 18,88 bis 27,25).

Die Quantifizierung der Kontrollgentranskripte lieferte in sämtlichen Herzmuskel-Proben der Kontrollgruppe einen mittleren  $C_q$ -Wert von 30,95 für HMBS (Bereich 26,81 bis 34,12), von 25,63 für UBC (Bereich von 20,70 bis 30,26), von 27,27 für SDHA (Bereich 23,13 bis 31,86), von 23,90 für B2M (Bereich von 19,76 bis 29,80) bzw. von 25,81 für GAPDH (Bereich von 19,27 bis 30,40). In Skelettmuskel-Proben der Kontrollgruppe lieferte die Quantifizierung einen mittleren  $C_q$ -Wert von 26,99 für HMBS (Bereich 25,17 bis 28,46), von 21,31 für UBC (Bereich von 19,66 bis 23,07), von 24,77 für SDHA (Bereich von 23,56 bis 26,17), von 22,56 für B2M (Bereich von 20,54 bis 25,11) bzw. von 18,42 für GAPDH (Bereich 16,68 bis 20,04). In Gehirn-Proben der Kontrollgruppe ergab die Quantifizierung von HMBS einen mittleren  $C_q$ -Wert von 30,88 (Bereich von 28,19 bis 34,75). Die Quantifizierung von UBC lieferte einen mittleren  $C_q$ -Wert von 24,93 (Bereich von 21,92 bis 28,90). Für SDHA lag der Wert bei 28,89 (Bereich von 26,20 bis 33,16), für B2M bei 24,99 (Bereich von 22,69 bis 28,59) bzw. für GAPDH bei 24,76 (Bereich von 21,00 bis 24,76).

Die Standardabweichung der doppelt- bzw. dreifach pipettierten cDNA-Proben lag für die Zielgentranskripte in einem Bereich von 0,0 bis 2,7 sowie für die Kontrollgentranskripte in einem Bereich von 0,0 bis 1,7. Von einander abweichende Ergebnisse werden jedoch durch die Quantifizierung in Mehrfachbestimmung ausgeglichen. Des Weiteren werden bei der Datenanalyse mittels der qBase-Software Ausreißerwerte automatisch ausgeschlossen (siehe 3.1.2).

### 3.4.2 Datennormalisierung gegen vier validierte stabile Kontrollgene

Zielgene der vorliegenden Teilstudie waren HIF-1 $\alpha$ , VEGF und SLC2A1. Als endogene Kontrollen wurden HMBS, UBC, SDHA und B2M herangezogen, deren Stabilität im vorliegenden Probenumfang validiert und nachgewiesen wurde (siehe 3.2 und Tabelle 3.2). Die in den Tabellen 3.9 und 3.10 aufgeführten mittleren  $C_q$ -Werte, die aus der Quantifizierung der Zielgen-Transkripte von HIF-1 $\alpha$ , VEGF und SLC2A1 (Tabelle 3.9) sowie der Kontrollgen-Transkripte von HMBS, UBC, SDHA und B2M (Tabelle 3.10) resultierten, wurden in die qBase-Software importiert. Dort wurden die Daten entsprechend ihrer Funktion als endogene Kontrolle bzw. als Zielgen markiert. Des Weiteren wurden die Todesursachen gekennzeichnet, die den jeweiligen Probenspender charakterisieren (Ersticken, plötzlicher Herztod; Kontrollgruppe). Aus der Analyse gehen schließlich kalibrierte, normalisierte, relative Quantitäten, die als CNRQ-Werte bezeichnet werden, hervor (siehe 1.8.2 und 2.2.10). Diese ermöglichen Rückschlüsse auf etwaige todesursachenspezifische Unterschiede im Expressionslevel der untersuchten Zielgene.

#### Ergebnisse der Datennormalisierung

Die Ergebnisse der qBase-Analyse sind in Abbildung 3.17 als Box-Whisker Plot grafisch dargestellt. In der „Kontrollgruppe“ wurden die CNRQ-Werte sämtlicher Proben von Individuen zusammengefasst, deren Tod mit einer sehr kurzen Agoniedauer einhergegangen war. In der Annahme, dass sich das Transkriptlevel von HIF-1 $\alpha$ , VEGF und SLC2A1 in diesen Proben aufgrund der geringen Zeitspanne zwischen todesursächlichem Ereignis und dem Versterben nicht ändert, wurde der CNRQ-Mittelwert der Kontrollgruppe in Abbildung 3.17 als rote Linie markiert. Ausgehend davon wurde im Weiteren das Expressionslevel der normalisierten Zielgene der Proben von Individuen bewertet, die an Ersticken bzw. einem plötzlichen Herztod verstorben waren.



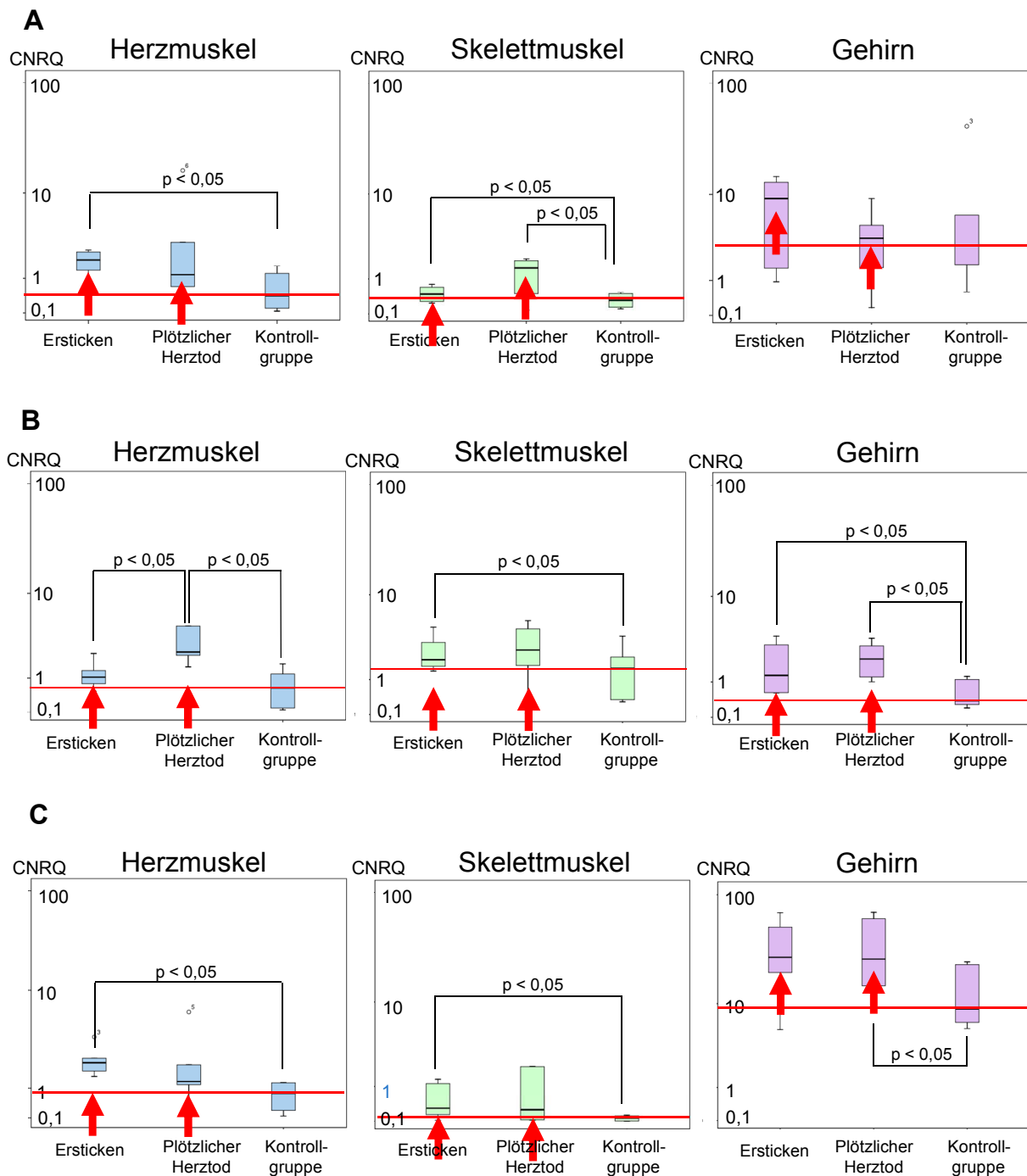


Abbildung 3.17: Ergebnisse der qBase Analyse von **A:** HIF-1 $\alpha$ , **B:** VEGF und **C:** SLC2A1 in postmortalem Herzmuskel-, Skelettmuskel- und Gehirngewebe dargestellt als Box-Whisker-Plot. Der CNRQ-Mittelwert der Daten aus der Kontrollgruppe ist als rote Linie gekennzeichnet. Eine bestehende Transkriptlevel-Erhöhung ist mit einem roten Pfeil markiert. Die statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ) wurde in SPSS mit Mann-Whitney-U-Test berechnet.

Jedes der drei untersuchten Zielgene zeigte eine Transkriptlevelerhöhung nach plötzlichem Herztod und nach Erstickungstod. Diese ist in Abbildung 3.17 entsprechend mit einem roten Pfeil markiert. Zudem wies das Transkript von HIF-1 $\alpha$  in der Proben-Gruppierung „Ersticken“ im Vergleich zur Kontrollgruppe in Herzmuskel- sowie in Skelettmuskel-Proben ein statistisch signifikant höheres Expressionslevel auf ( $p < 0,05$ ). Verglichen mit den Proben der Kontrollgruppe zeigte sich eine weitere statistisch signifikante Erhöhung ( $p < 0,05$ ) für das Transkript von HIF-1 $\alpha$  in den Skelettmuskel-Proben der Gruppe „Plötzlicher Herztod“.

Das Transkript von VEGF wies in der Proben-Gruppe „Ersticken“ im Vergleich zur „Kontrollgruppe“ in Skelettmuskel- sowie in Gehirn-Proben ein statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) höheres Expressionslevel auf. In Herzmuskel-Proben wurde, im Vergleich zu „Ersticken“ sowie zur „Kontrollgruppe“, ein statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) höheres VEGF-Expressionslevel nach „plötzlichem Herztod“ beobachtet. Verglichen mit den Proben der „Kontrollgruppe“ zeigte sich eine weitere statistisch signifikante Erhöhung ( $p < 0,05$ ) für das Transkript von VEGF in den Gehirn-Proben der Gruppe „Plötzlicher Herztod“.

Das Transkript von SLC2A1 wies, analog zu HIF-1 $\alpha$ , in der Proben-Gruppe „Ersticken“ im Vergleich zur „Kontrollgruppe“ in Herzmuskel- sowie in Skelettmuskel-Proben ein statistisch signifikant höheres Expressionslevel auf ( $p < 0,05$ ). Verglichen mit den Proben der „Kontrollgruppe“ zeigte sich eine weitere statistisch signifikante Erhöhung ( $p < 0,05$ ) für das Transkript von SLC2A1 in den Gehirn-Proben der Gruppe „Plötzlicher Herztod“.

### 3.4.3 Datennormalisierung gegen ein einzelnes Kontrollgen

Neben der in 3.1.2 beschriebenen Datennormalisierung gegen vier validierte, stabile endogene Kontrollgene wurden die in der vorliegenden Teilstudie generierten  $C_q$ -Rohdaten zudem nach der herkömmlichen, vielfach angewendeten  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode [Livak 2006] normalisiert. Diese Methode nutzt für die Datennormalisierung ein einzelnes endogenes Kontrollgen, zum Beispiel Glycerin-aldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).

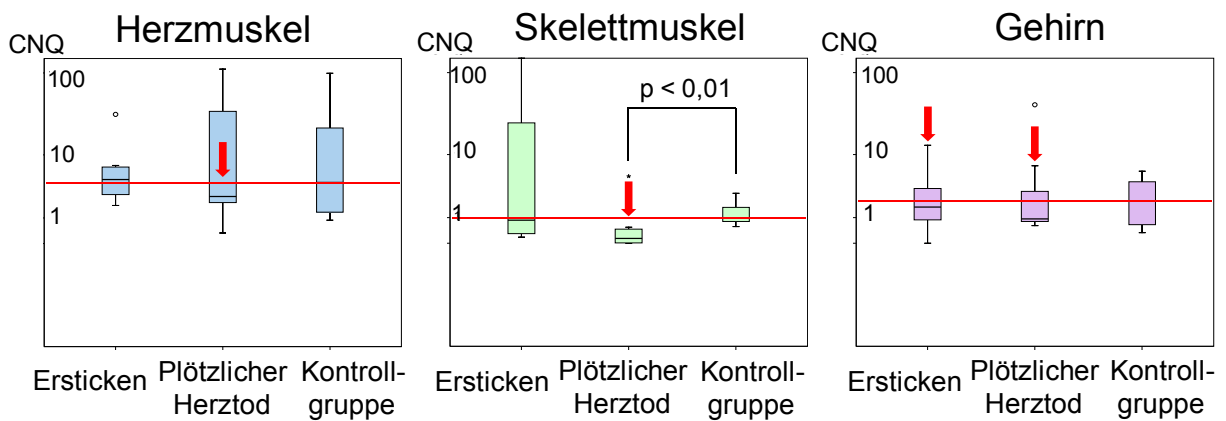
#### Ergebnisse der Datennormalisierung gegen GAPDH

Die mittels der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode generierten kalibrierten, normalisierten Quantitäten (CNQ) der Zielgen- $C_q$ -Werte wurden in SPSS importiert und in einem Box-Whisker-Plot grafisch dargestellt (Abbildung 3.18). Analog zu 3.1.2 wurden in der „Kontrollgruppe“ die Ergebnisse sämtlicher Proben von Individuen zusammengefasst, deren Tod mit einer sehr kurzen Agoniedauer einhergegangen war. In der Annahme, dass sich das Transkriptlevel von HIF-1 $\alpha$ , VEGF und SLC2A1 in diesen Proben aufgrund der geringen Zeitspanne zwischen todesursächlichem Ereignis und dem Versterben nicht ändert, wurde der CNQ-Mittelwert in der Kontrollgruppe als rote Linie markiert. Ausgehend davon wurde im Weiteren das Expressionslevel der gegen GAPDH normalisierten Zielgene der Proben von Individuen bewertet, die an Ersticken bzw. einem plötzlichen Herztod verstorben waren.

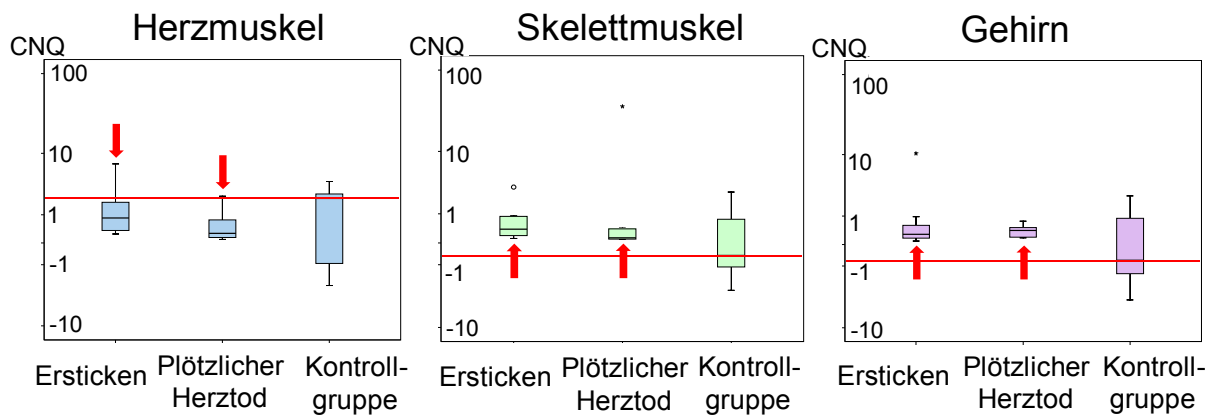
Anders als in 3.1.2 wurde nur für VEGF in Skelettmuskel- und in Gehirngewebe (Abbildung 3.18B) bzw. für SLC2A1 in Herzmuskelgewebe (Abbildung 3.18C) eine Transkriptlevel-Erhöhung nach einem mit Sauerstoffmangel einhergehenden Versterben beobachtet. In Proben von Individuen, die an Ersticken verstorben waren, wurde des Weiteren ein Trend hin zu einem erhöhten Transkriptlevel von SLC2A1 in Gehirngewebe beobachtet (Abbildung 3.18C).

Die Normalisierung von HIF-1 $\alpha$  gegen GAPDH zeigte in Skelettmuskel ein statistisch signifikant ( $p < 0,01$ ) niedrigeres Transkriptlevel nach Versterben infolge eines plötzlichen Herztodes. Auch in postmortalem Herzmuskel- und Gehirngewebe ist ein Trend hin zu einem erniedrigten Transkriptlevel von HIF-1 $\alpha$  nach Sauerstoffmangel erkennbar (Abbildung 3.19A).

**A**



**B**



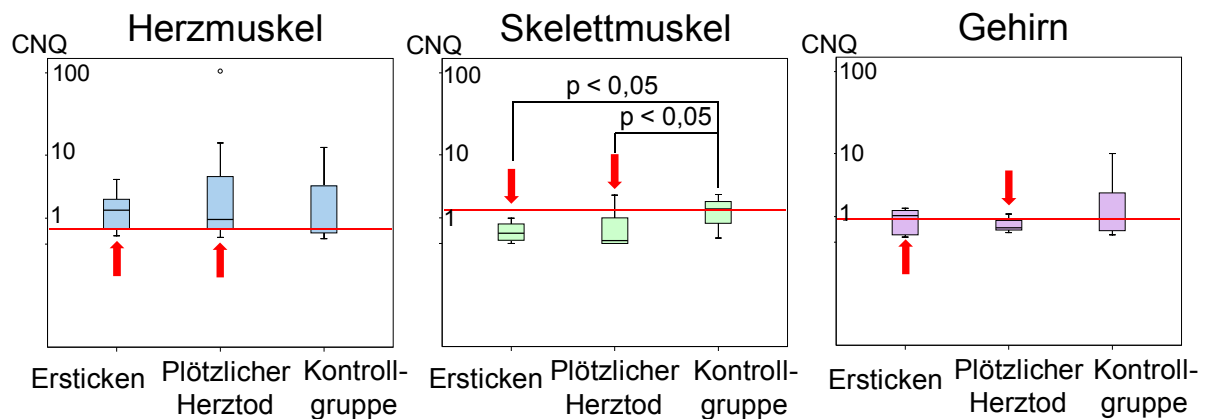
**C**

Abbildung 3.18: Ergebnisse der Normalisierung von **A**: HIF-1 $\alpha$ , **B**: VEGF und **C**: SLC2A1 in postmortalem Herzmuskel-, Skelettmuskel- und Gehirngewebe gegen ein einzelnes endogenes Kontrollgen (GAPDH) mittels der  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ -Methode nach Livak et al. 2006 dargestellt als Box-Whisker-Plot. Der CNQ-Mittelwert der Daten aus der Kontrollgruppe ist als rote Linie gekennzeichnet. Eine bestehende Transkriptlevel-Erhöhung bzw. -Erniedrigung ist mit einem roten Pfeil markiert.

Die Analyse lieferte weiterhin ein statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) erniedrigtes Expressionslevel von SLC2A1 in Gehirngewebe nach einem Tod durch Ersticken bzw. durch plötzliches Herzversagen (Abbildung 3.18C). Auch in postmortalem Gehirngewebe ist ein Trend hin zu einem erniedrigten Transkriptlevel von SLC2A1 nach einem plötzlichen Herztod erkennbar.

Die Tendenzen der jeweiligen Transkriptleveländerung wurden in Abbildung 3.18 entsprechend mit einem roten Pfeil markiert.

### 3.4.4 Transkriptstabilität von GAPDH, HMBS, UBC, SDHA und B2M

Die Normalisierung der aus der quantitativen Analyse der Zielgene hervorgehenden Rohdaten gegen ein bzw. vier endogene Kontrollgene lieferte widersprüchliche Ergebnisse. Um die Ursache dessen aufzudecken, wurde die Stabilität der Transkripte von GAPDH, HMBS, UBC, SDHA und B2M im vorliegenden Probenumfang geprüft. Zudem wurde GAPDH als Zielgen erklärt und gegen die validierten stabilen Kontrollgene HMBS, UBC, SDHA und B2M normalisiert. Letzterer Analyse-Schritt sollte eine möglicherweise hypoxiebedingte Ko-Regulation von GAPDH aufdecken bzw. widerlegen.

#### geNorm-Analyse von GAPDH, HMBS, UBC, SDHA und B2M

Aus den  $C_q$ -Doppelwerten bzw.  $C_q$ -Dreifachwerten, die aus der Transkript-Quantifizierung von GAPDH, HMBS, UBC, SDHA und B2M hervorgegangen waren, wurde zunächst der arithmetische Mittelwert gebildet (siehe Tabelle 3.8 und 3.9). Analog zu 2.2.9 wurden diese Daten entsprechend bearbeitet und zur Ermittlung der Expressionsstabilität in die geNorm Software importiert. Abbildung 3.19 zeigt das Ergebniss der Analyse. Verglichen mit den Gentranskripten von SDHA, UBC, B2M und HMBS zeigt das Gentranskript von GAPDH eine geringe Transkriptstabilität.

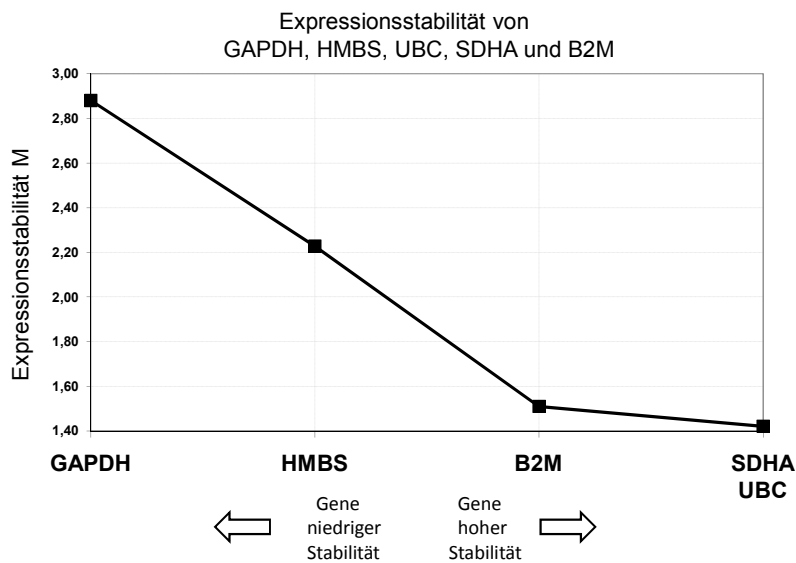


Abbildung 3.19: Genorm-Analyse von GAPDH, HMBS, UBC, SDHA und B2M. Im Vergleich zu den übrigen vier Gentranskripten zeigt GAPDH im vorliegenden Umfang eine geringe Transkriptstabilität.

Normalisierung von GAPDH gegen HMBS, UBC, SDHA und B2M

Im Weiteren wurden die Rohdaten der Quantifizierung von GAPDH, HMBS, UBC, SDHA und B2M in die qBase-Software (siehe 1.8.2 und 2.2.10) importiert. Dort wurde GAPDH als Zielgen erklärt; die übrigen genannten Gene wurden als Kontrollgene definiert. Daraus ergaben sich Hinweise auf eine mögliche Co-Regulation von GAPDH in Abhängigkeit von der Todesursache (siehe Abbildung 3.20). Demnach ist in postmortalem humanem Herzmuskel- und Gehirngewebe eine erhöhte Expression von GAPDH nach Versterben infolge von Ersticken oder einem plötzlichen Herztod ersichtlich. In postmortalem Skelettmuskelgewebe streuen die Ergebnisse in Proben von Gewebespendern, die nach einem plötzlichen Herztod verstorben waren, stark. Ein eindeutiger Trend lässt sich aus diesen Ergebnissen nicht ableiten. Wurde das Skelettmuskelgewebe von Individuen entnommen, die an Ersticken verstorben waren, dann konnte, analog zu den Ergebnissen in Herzmuskel- und Gehirngewebe, eine Hochregulierung des Gentranskripts von GAPDH beobachtet werden.

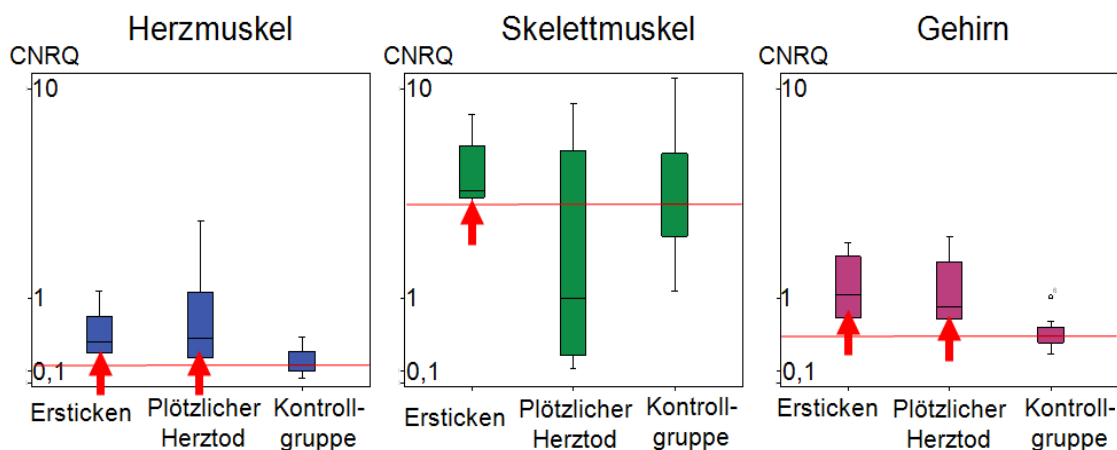


Abbildung 3.20: Ergebnis der Normalisierung von GAPDH gegen HMBS, UBC, SDHA und B2M. Nach einem Versterben durch Ersticken wurde das Transkript von GAPDH in postmortalem Herzmuskel-, Skelettmuskel- und Gehirngewebe stärker exprimiert. Nach einem plötzlichen Herztod erscheint die Expression von GAPDH in postmortalem Herzmuskel- und Gehirngewebe erhöht. In Skelettmuskel streuen die Ergebnisse stark. Ein eindeutiger Trend ist daher nicht erkennbar.

## 4 Diskussion

### 4.1 Vom RNA-Extrakt zum quantifizierten Gentranskript

Zur Untersuchung der Möglichkeiten und Grenzen von Genexpressionsstudien an postmortalem Human-Gewebe sowie der Normalisierung damit einhergehender nicht kontrollierbarer prä- und postmortalen Variablen und Einflussfaktoren war die erfolgreiche Extraktion der RNA grundlegend. Die generierten Ergebnisse von Gesamt-RNA-Ausbeute und Reinheit der Gesamt-RNA-Extrakte bewiesen eine erfolgreiche RNA-Extraktion aus sämtlichen, in der vorliegenden Arbeit einbezogenen Proben. Dass dies auch nach einem längeren PMI noch möglich ist, wurde bereits mehrfach beschrieben [z.B. Johnson 1986, Inoue 2002, Heinrich 2007, Langnaese 2008].

#### 4.1.1 Beurteilung der RNA-Quantität und Reinheit

Bei 228 der insgesamt 242 RNA-Extrakte dieser Arbeit lag das Verhältnis der Ergebnisse, die aus der Messung der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm resultierten, zwischen 1,9 und 2,1, was auf sehr reine RNA-Extrakte hindeutet [Sambrook 1989, Mühlhardt 2006]. Für 13 Proben lieferte die Messung mit dem NanoDrop ND-1000 einen 260/280-Wert, der zwischen 0,5 bis 1,7 lag. Dies lässt auf eine mögliche Verunreinigung des RNA-Extrakts mit Lösungsmittelresten, die aus dem Prozess der Extraktion mitgeschleppt wurden, schließen. Eine Probe wies ein Verhältnis von 2,3 auf. In diesem Fall ist eine Verunreinigung des RNA-Extraktes mit genomischer Rest-DNA zu vermuten, bedingt durch eine unzureichende DNase-Behandlung.

Die RNA-Ausbeuten innerhalb derselben Gewebeart variierten zum Teil erheblich. In der Literatur wird als mögliche Ursache dafür das Postmortalintervall angenommen [Preece 2003]. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch keine statistisch signifikante Korrelation zwischen PMI und der RNA-Ausbeute festgestellt (Abbildung 8.2).



Demnach ist zu vermuten, dass sich die interindividuellen Unterschiede in der extrahierten Gesamt-RNA-Menge auf weitere Variablen zurückführen lassen, die bei der Arbeit mit postmortalem Humangewebe kaum kontrolliert werden können. Diesbezüglich kommen beispielsweise Faktoren wie prämortale Fitness und Medikation, die Umstände des Versterbens oder postmortale Lagerungsbedingungen des Körpers in Betracht. Diese Parameter könnten die zelluläre Zusammensetzung oder die postmortale Persistenz von RNA-Molekülen beeinflussen. Eventuell kann diese Varianz in zukünftigen Studien etwas verringert werden, indem z.B. Proben von Individuen analysiert werden, die sich in festgelegten Parametern ähneln.

Die Notwendigkeit eines enzymatischen Abbaus der im RNA-Extrakt verbliebenen genomischen Rest-DNA wurde in einer vorangehenden Studie durch den Vergleich einer Probe vor und nach einer DNase-Behandlung bewiesen (Abbildung 8.3) [Heinrich 2007]. Wurde ein DNase-behandelter, aufgereinigter RNA-Extrakt revers transkribiert und das cDNA-Produkt anschließend in einem 2%-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, dann war unter UV-Licht eine einzelne, deutliche Bande bei etwa 114 bp erkennbar. Revers transkribierte RNA, die ohne DNase-Einwirkung in cDNA konvertiert wurde, lieferte in der elektrophoretischen Auftrennung eine Doppelbande, also eine Bande bei 114 bp und eine Weitere bei 218 bp. Letztere repräsentiert die im Extrakt verbliebene genomische Rest-DNA. Für RNA-Extrakte hoher Reinheit stellte sich demnach der DNase-Verdau mit anschließender Extrakt-Aufreinigung als essentiell heraus. Der mittels der NanoDrop ND-1000-Software generierte Kurvenverlauf macht die im Extrakt verbliebene genomische Rest-DNA durch einen hohen Peak bei ca. 260 nm kenntlich (Abbildung 2.1). Aus Vorstudien ist zudem bekannt, dass durch eine Aufreinigung mögliche PCR-Inhibitoren beseitigt werden, was als Voraussetzung für eine optimal verlaufende PCR gilt.

### 4.1.2 Reverse Transkription

Nach der Quantifizierung wurden die RNA-Extrakte revers transkribiert und damit in cDNA konvertiert (siehe 2.2.7). Als Basis für eine genaue Quantifizierung der zu untersuchenden Gentranskripte ist dieser Schritt für Genexpressionsstudien von großer Bedeutung, da die cDNA die in die reverse Transkription eingesetzte RNA-Menge möglichst exakt wiedergeben soll [Pfaffl 2004].

Paillard et al. beschrieben in ihrer Studie von 2003 eine Korrelation zwischen der RNA-Stabilität und der Länge des sich am 3'-Ende der jeweiligen RNA befindenden Poly(A)-Schwanzes [Paillard 2003]. Ursache dafür ist die Annahme, dass die RNA-Degradierung am 3'-Ende der RNA beginnt [Meyer 2004]. Für die reverse Transkription der RNA in komplementäre DNA ist daher die gezielte Auswahl und Validierung der dafür eingesetzten Primer essentiell, da diese unterschiedliche Bindungseigenschaften aufweisen können. Würde man für die reverse Transkription Oligo(dT)-Primer verwenden, die am Poly(A)-Schwanz der RNA binden, könnten ausschließlich intakte RNA-Transkripte revers transkribiert werden. RNA-Stränge, die durch Degradierungsprozesse einen Bruch unweit des Poly(A)-Schwanzes erlitten haben, wären für die cDNA-Synthese verloren [Bustin 2005, Atz 2007]. Für die reverse Transkription der in dieser Arbeit extrahierten RNA wurden daher *Random-Hexamer-Primer* eingesetzt. Diese Primer können selbst solche RNA-Fragmente in cDNA umschreiben, denen der Poly(A)-Schwanz fehlt, da sie gleichmäßig verteilt und zufällig am gesamten RNA-Strang binden können. Das heißt, die Reverse Transkriptase kann an verschiedenen Stellen des Transkripts gleichzeitig arbeiten. Daraus resultiert eine ausgeglichene Abdeckung des gesamten Transkriptoms.

### 4.1.3 Beurteilung der RNA-Integrität

Die RNA wird durch ubiquitär vorkommende RNasen schnell abgebaut. Aus diesem Grund ist die Überprüfung der Integrität und damit des Degradierungsstatus einer Probe essentiell für die Generierung verlässlicher Genexpressionsdaten [Schroeder 2006].

In der vorliegenden Arbeit wurden die Integritäten sämtlicher Proben mittels des Agilent 2100 Bioanalyzers gemessen (siehe 1.5.3 und 2.2.6). Fünf der insgesamt 242 durchgeführten Integritätsmessungen lieferten keinen gültigen RIN-Wert. In diesen Fällen zeigte das Bioanalyser-Gerät eine Fehlermeldung an. Als mögliche Ursache können in der Probe enthaltene, mitgeschleppte Verunreinigungen vermutet werden, die die laserinduzierte Signaldetektion störten. Bei 16 weiteren Proben konnte die Integrität nicht ermittelt werden, da zuvor der gesamte RNA-Extrakt in die reverse Transkription eingesetzt worden war. Bei entsprechender Fragestellung wurden diejenigen Proben, die nicht nach ihrem Degradierungsstatus beurteilt werden konnten, von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

### 4.1.4 Quantitative Real-Time PCR

Bekannt als eine sehr sensitive und verlässliche Methode [Bustin 2000, Libus 2006, Wong 2005], zeichnet die RT-qPCR über eine Messung des  $C_q$ -Wertes (cycle of quantification) die fluoreszierende Produktanreicherung während der exponentiellen Phase der PCR in Echtzeit auf (siehe 2.2.8). Die Transkriptmenge ausgewählter Gene kann dadurch quantifiziert werden. Für viele Transkripte des humanen Genoms sind inzwischen entsprechende PCR-Assays kommerziell erhältlich.

In der qPCR wurden sämtliche Proben, unter Einbeziehung der stets mitgeführten Positiv- und Negativkontrolle, in Duplikaten bzw. in Triplikaten aufgetragen, woraus anschließend der  $C_q$ -Mittelwert errechnet wurde. Die Ursache nicht exakt übereinander liegender qPCR-Kurven gleicher Proben ist möglicherweise auf eine Pipettierungenauigkeit zurückzuführen. Die Bildung des Mittelwertes aus den  $C_q$ -Duplikaten bzw.  $C_q$ -Triplikaten sollte diesen Fehler ausgleichen. Die dabei ermittelten Standardabweichungen zwischen den Mehrfachwerten sind an entsprechender Stelle in der vorliegenden Arbeit angegeben.

#### Assay-Auswahl

Die an der Quantifizierung beteiligten Sonden und Primer (siehe 2.2.8) erfordern je nach Experiment eine gezielte Auswahl und Validierung. Um sicherzustellen, dass die Primer spezifisch an cDNA binden, sollten sie stets eine Exon-Exon-Grenze überschreiten [Phang 1994]. Im Falle einer Primerbindung an genomische Rest-DNA würde sich das resultierende PCR-Produkt von demjenigen der cDNA-Sequenz unterscheiden.

Abbildung 4.1 gibt eine schematische Übersicht über die Lage der in der vorliegenden Arbeit amplifizierten PCR-Produkte. Diese wurden so gewählt, dass sie sich nahe dem 5'-Ende oder mittig in der jeweiligen mRNA-Sequenz befinden.

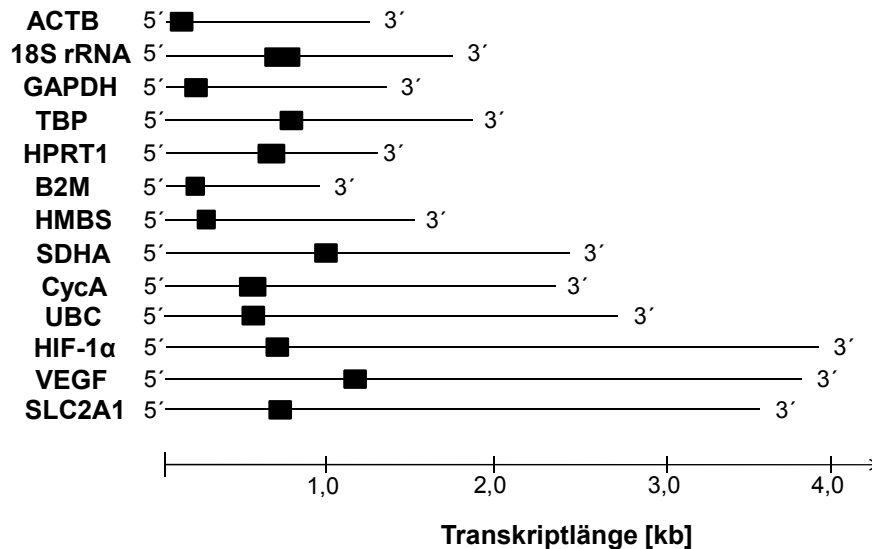


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der amplifizierten PCR-Produkte (schwarze Balken) innerhalb der jeweiligen mRNA-Sequenz (schwarze Linie; Richtung: 5' nach 3'). Weitere Angaben zu jedem Assay siehe Tabelle 2.11.

Ein Vergleich der im vorliegenden Probenumfang detektierten Transkriptstabilität (siehe 3.2) mit der Lage des jeweiligen PCR-Assays in der entsprechenden mRNA-Sequenz lässt nicht eindeutig darauf schließen, dass Gentranskripte, die näher am 3'-Ende lokalisiert sind, einer erhöhten Degradierungsanfälligkeit unterliegen. Einerseits weisen die Transkripte von ACTB und GAPDH trotz ihrer Nähe zum 5'-Ende im vorliegenden Probenumfang nur eine geringe Stabilität auf. Andererseits gehört das Transkript von SDHA trotz seiner Entfernung vom 5'-Ende zu den Transkripten hoher Stabilität. Fleige und Pfaffl wiesen in einer Studie von 2006 darauf hin, dass PCR-Produkte mit einer Länge von mehr als 400 bp stark von der RNA-Integrität abhängen. Kürzere PCR-Produkte (70 bis 250 bp) seien dagegen weniger von einer partiellen Degradierung der RNA betroffen [Fleige und Pfaffl 2006].

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich mit PCR-Assays gearbeitet, die eine Länge von 70 bis 187 bp aufwiesen. Dies ist möglicherweise die Erklärung für die lageunabhängige Stabilität der Transkripte.

### Quantität der cDNA

Sämtliche cDNA-Proben der vorliegenden Arbeit wurden zunächst auf eine einheitliche Quantität von 10 ng/ $\mu$ L eingestellt, bevor eine Transkriptquantifizierung mittels RT-qPCR erfolgte. Um den Einfluss schwankender Konzentrationen im cDNA-Produkt im experimentellen Ablauf auf ein Minimum zu beschränken, verfolgt man zudem inzwischen vielfach die Strategie, bereits gleiche RNA-Quantitäten in die reverse Transkription einzusetzen. Die daraus resultierenden cDNA kann schließlich in einem weiteren Schritt entsprechend verdünnt werden [Silberberg 2009].

### Positivkontrolle

Die bei sämtlichen qPCR-Experimenten stets mitgeführte Positivkontrolle fungiert als plattenübergreifende Kontrolle (*plate-to-plate-control*). Über den Wert der Standardabweichung  $SA_{ges}$  (siehe Tabelle 8.4) lieferte sie eine Aussage über eine mögliche ungleiche Effizienz durchgeführter qPCR-Experimente gleicher Gentranskripte. Da jedoch die Schwankung der  $SA_{ges}$  über verschiedene Läufe hinweg im Bereich der SA-Schwankung jedes einzelnen qPCR-Laufs lag, konnte davon ausgegangen werden, dass die Läufe gleicher Gentranskripte miteinander vergleichbar waren.

### 4.1.5 Resümee

Der Genexpressionsstudien kennzeichnende langwierige Prozess der experimentellen Probenbearbeitung wird von einer Vielzahl von Variablen begleitet. Diese können zum Teil begrenzt werden, wenn verschiedene Faktoren Beachtung finden. Demnach erscheint die Sicherstellung einer bestmöglichen RNA-Qualität essentiell. Um eine Co-Amplifikation von genomischen Sequenzen zu verhindern, sollte der RNA-Extrakt zudem frei von genomischer Rest-DNA sein. Eine weitere Anforderung an die experimentelle Probenbearbeitung stellt das Beseitigen möglicher Inhibitoren dar, da diese sowohl die Effizienz der reversen Transkription, als auch die finale Transkriptquantifizierung beeinträchtigen könnten. Zudem ist streng darauf zu achten, den RNA-Extrakt geschützt vor Nukleasen zu bearbeiten. Dadurch kann eine enzymbedingt fortschreitende Degradierung begrenzt werden [Bustin 2004]. Aufgrund unterschiedlicher Bindungseigenschaften sollten überdies die für die reverse Transkription der RNA in komplementäre DNA gewählten Primer umfassend validiert und dem Probengut entsprechend ausgewählt werden. Bei der Verwendung von postmortalem Herzmuskel, Skelettmuskel und Gehirngewebe hat sich der Einsatz von Random Hexamer-Primern bewährt. Zudem erwies es sich für die Quantifizierung von Gentranskripten sinnvoll, Primer zu wählen, die eine Exon-Exon-Grenze überschreiten. Grund dafür ist die Sicherstellung der Primerbindung an komplementäre DNA, die im Gegensatz zur genomischen DNA keine Introns enthält.

### 4.2 RNA-Integrität in postmortalen Gewebeproben

Bedingt durch eine unvermeidbare Variabilität zwischen den jeweiligen Lagerungs- und Umgebungsbedingungen, denen ein menschlicher Körper nach dem Versterben ausgesetzt sein kann, muss davon ausgegangen werden, dass die aus dem postmortalen Gewebe isolierte RNA von einer zumindest partiellen Degradierung betroffen ist [Buesa 2004, Durrenberger 2010]. Inzwischen ist bekannt, dass eine verminderte RNA-Qualität Einfluss auf die generierten qPCR-Daten nehmen kann [Fleige und Pfaffl 2006]. Zudem wiesen Barrachina et al. in einer Studie von 2006 darauf hin, dass eine falsch-positive Hochregulierung eines Zielgens beobachtet werden kann, wenn die Degradierung der RNA in den Proben der Kontrollgruppe weiter vorangeschritten ist als in den Proben der untersuchenden Zielgruppe [Barrachina 2006]. Der Degradierungszustand der RNA, die so genannte Integrität, ist daher ein Faktor, dem bei der Qualitätskontrolle des Extrakts große Bedeutung beigemessen werden muss [Bustin 2002, Schroeder 2006, Atz 2007]. In der vorliegenden Teilstudie (siehe auch 3.1) wurde daher anhand von postmortalem Herzmuskel-, Skelettmuskel- und Gehirngewebe der Einfluss verschiedener prä- und postmortaler Parameter auf die RNA-Integrität untersucht.

#### 4.2.1 Einfluss verschiedener Parameter auf die RNA-Integrität

In der Literatur wurden bereits verschiedene Faktoren diskutiert, die einerseits Einfluss auf die RNA-Integrität [Tomita 2004], andererseits auf die mRNA-Quantität verschiedener Gen-Transkripte nehmen [Preece 2003, Trabzuni 2011]. Dazu gehörten das Postmortalintervall (PMI), die Dauer der Agonie, das Alter zum Todeszeitpunkt sowie das Geschlecht des Probenspenders. Preece et al. konnten anhand von postmortalem humanem Gehirngewebe für die beiden zuletzt genannten Parameter einen statistisch signifikanten Einfluss auf das mRNA-Level der untersuchten Gen-Transkripte nachweisen, weshalb die Arbeitsgruppe empfahl, zumindest den Faktoren Alter zum Todeszeitpunkt und Geschlecht eine besondere Aufmerksamkeit bei der Auswahl des Probenguts zukommen zu lassen.

Da das für die vorliegende Arbeit entnommene Gewebematerial von Spendern mit unterschiedlichsten Vorgeschichten stammt, wurden sämtliche von Preece et al. [2003] untersuchten Parameter für die Prüfung eines möglichen Einflusses auf die RNA-Integrität herangezogen. Eine dieser Arbeit vorangegangene Studie hat ergeben, dass sich Herzmuskel-, Skelettmuskel- und Gehirngewebe für Genexpressionsstudien an humanem Autopsiematerial besser eignen als Leber-, Nieren- und Milzgewebe [Heinrich 2007]. Daher erschien auch der Gewebetyp für die Untersuchung eines möglichen parameterabhängigen Einflusses auf die RNA-Integrität von Interesse. Die sich interindividuell unterscheidende Masse des Körpers geht mit variierenden postmortalen Abkühlungsraten einher [Mall 2005]. Eine wärmebedingt beschleunigte RNA-Degradierung ist aus diesem Grund denkbar. Zusätzlich könnte die Todesursache bzw. die damit einhergehenden Agonie- und Lagerungsbedingungen Einfluss auf die Integrität der RNA im jeweils untersuchten Gewebe nehmen. Sowohl der Body Mass Index (BMI), die Dauer der Agonie, als auch die Todesursache des Probenspenders wurden daher in der vorliegenden Teilstudie zusätzlich als potentielle Einflussfaktoren untersucht.

Die genannten Parameter kennzeichnen jeden Probenspender individuell und sind, anders als in Studien am Tiermodell, nicht kontrollierbar [Barton 1993, Tomita 2004, Preece 2003, Durrenberger 2010]. Ihr Einfluss auf die RNA-Qualität erhält daher besondere Bedeutung für die vorliegende Arbeit, die eine Grundlage für zukünftige Genexpressionsstudien an humanem postmortalem Gewebematerial schaffen soll.

### Einfluss des Gewebetyps

Wie aus Abbildung 3.1 ersichtlich, scheint die Integrität der extrahierten RNA vom Gewebetyp abhängig zu sein, was die Ergebnisse verschiedener Studien bestätigt [Hsiao 2001, Inoue 2002, Lee 2005, Bahar 2007]. Im vorliegenden Probenumfang wiesen die RNA-Extrakte, die aus postmortalem Herzmuskel- bzw. Skelettmuskel isoliert wurden, statistisch signifikant höhere RIN-Werte auf als RNA-Extrakte aus postmortalem Gehirngewebe ( $p < 0,05$ ).



Verglichen mit den Gehirnisolaten, zeigen die RNA-Extrakte aus Herzmuskel und Skelettmuskel jedoch eine größere Streuung der gemessenen Integritäten. Diese interindividuellen Unterschiede lassen sich möglicherweise durch die Heterogenität des Probenmaterials (Unterschiede in der Todesursache, im Sterbealter usw.) erklären.

Insgesamt betrachtet weisen zudem die aus postmortalem Skelettmuskel isolierten RNA-Proben die durchschnittlich höchsten RIN-Werte auf. Skelettmuskel-Gewebe scheint demnach für Genexpressionsstudien an Autopsiematerial besonders geeignet, wobei möglicherweise auch aus anderen, bisher noch nicht untersuchten Gewebetypen RNA sehr guter Integrität isoliert werden kann. Dies würde besonders relevant werden in Fragestellungen, die sich mit der Genexpression nach Erkrankungen bzw. Verletzungen in Gewebe auseinandersetzen, das nicht muskulärer Natur ist. Die durchschnittlich niedrigsten RIN-Werte wurden in den aus postmortalem Gehirngewebe extrahierten RNA-Proben gemessen. Als mögliche Erklärung dafür wird in der Literatur eine antemortale Gehirnazidose genannt, die mit einer lang andauernden agonalen Phase einhergeht und zur Aktivierung der sauren Ribonuklease führt [Tomita 2004]. Als Begleitfaktoren der agonalen Phase werden beispielsweise ein komatöser Zustand, Hypoxie, Pyrexie, Dehydrierung, Hypoglykämie oder multiples Herzversagen genannt [Tomita 2004, Webster 2006, Atz 2007, Durrenberger 2010]. Die meisten der an der vorliegenden Studie beteiligten Probenspender wiesen eine kurze Agonie-Dauer im Minutenbereich auf (siehe Tabelle 8.1). Bei zehn Probenspendern konnte jedoch die Agoniephase vor dem Tod nicht exakt bestimmt werden und wurde auf mehrere Stunden geschätzt. Die Betroffenen waren an einem Schädel-Hirn-Trauma, an einer Aspirationspneumonie, an einer Betäubungsmittelintoxikation, an einer Herzmuskelentzündung, an Unterkühlung oder an zentraler Dysregulation verstorben. Da die Messung des pH-Wertes bisher nicht Teil des Experiments war, kann nicht eindeutig ausgeschlossen werden, dass auch im vorliegenden Probengut eine regelmäßig auftretende antemortale Gehirn-Azidose als Ursache der verminderten RNA-Integrität in Frage kommt.

Neben interindividuellen Unterschieden sowie einer möglicherweise prä mortal vorgelegenen Gehirn-Azidose können weiterhin die Grundbeschaffenheit der gewählten Gewebetypen sowie die angewendete Extraktionsmethode einen Einfluss auf das Ergebnis nehmen. Herz- und Skelettmuskelgewebe weisen eine straffe Struktur, Gehirngewebe eine vergleichsweise geringe Konsistenz auf. Dies führt zu Unterschieden in dem Verhalten des Gewebes während des Probenaufschlusses, also des ersten Schrittes der Extraktion. Einige Anbieter kommerzieller Kits zur Extraktion von RNA aus Gewebeproben bieten daher mittlerweile spezielle Reaktionsätze an, die auf die Struktur des jeweiligen Gewebetyps speziell angepasst wurden. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch unabhängig vom Gewebetyp für sämtliche Proben dieselbe Methode zur Gewinnung der RNA angewendet. Möglicherweise würde sich eine alternative Methode für die Extraktion von RNA aus postmortalem Gehirngewebe als geeigneter erweisen und würde RNA höherer Integrität liefern. Die Überprüfung dieser Annahme bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

### Einfluss des PMI

Neben dem Gewebetyp wird in der Literatur das Postmortalintervall als möglicher Parameter genannt, der die Integrität einer RNA-Probe beeinflussen kann [Tomita 2004, Atz 2007]. In Abbildung 3.2 wurden daher die gemessenen RIN-Werte gegen das postmortale Intervall der Probenspender geplottet. Drei der 49 Individuen wiesen ein Postmortalintervall von mehr als 50 Stunden auf. Um eine Ergebnisverfälschung durch Datenausreißer zu verhindern, wurden diese drei Probenspender aus der Analyse ausgeschlossen.

Die Arbeitsgruppe um Catts et al. [2005] untersuchte den Einfluss des PMI auf den RNA-Degradierungszustand am Gehirngewebe von Mäusen. Mit länger werdendem PMI wurde in dieser Studie eine abnehmende RNA-Integrität beobachtet. Analog dazu lässt sich aus den in Abbildung 3.2 dargestellten Ergebnissen in humanem postmortalem Herzmuskel eine mit länger werdendem PMI einhergehende Zunahme der RNA-Degradierung ableiten.

Die Korrelation zwischen beiden Parametern ist in diesem Fall, wie erwartet, statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ). Eine mögliche Erklärung für diesen Zusammenhang könnte in der Aktivität der RNasen begründet liegen, die vermutlich bei einem längeren Intervall zwischen Versterben und Probenentnahme erhöht ist. Auch eine voranschreitende hydrolytische Degradierung während der Autolyse kann einen Einfluss auf die postmortale Persistenz von RNA-Molekülen haben.

Überraschenderweise wurde für RNA-Proben, die aus postmortalem Skelettmuskel- oder Gehirngewebe entnommen wurden, keine signifikante Korrelation zwischen PMI und gemessener RNA-Integrität beobachtet. Dies lässt sich mit Studien in Einklang bringen, die analoge Ergebnisse beschreiben [Morrison und Griffin 1981, Barton 1993, Tomita 2004, Bahar 2007, Ervin 2007, Sherwood 2011]. Barton et al. [1993] erklärten dies mit der Annahme einer postmortal ansteigenden mRNA-Stabilität infolge der Inaktivierung der normalen Degradierungsprozesse. Zudem ist es möglich, dass der energieverbrauchende RNA-Abbau nach dem Versterben aufgrund der rasch abfallenden Bereitstellung von Adenosin-Triphosphat (ATP) zurückgeht [Morrison und Griffin 1981]. Tomita et al. [2004] diskutieren weiterhin, dass die postmortale Aktivität der endogenen Ribonuklease-Inhibitoren länger erhalten bleiben kann als die der Ribonuklease selbst, was die mRNA vor einem fortschreitenden Abbau schützt. Auch wenn bei unseren Herzmuskelproben eine statistisch signifikante Korrelation zwischen PMI und RNA-Integrität festgestellt wurde, dürfte das postmortale Intervall nicht der einzige ausschlaggebende Faktor sein, der darüber entscheidet, ob eine Genexpressionsstudie an Autopsiegewebe möglich ist oder nicht. Der Einfluss des PMI auf das Degradierungsverhalten der RNA könnte in einer weiterführenden Studie unter Einhaltung konstanter Rahmenbedingungen wie Temperatur und Luftfeuchtigkeit anhand eines Tiermodells weiter untersucht werden.

### Einfluss von Individualalter und Geschlecht

Die Arbeitsgruppe um Durrenberger et al. [2010] fand einen Einfluss des Geschlechts sowie des Alters zum Todeszeitpunkt auf die RNA-Integrität. RNA, die aus Gehirngewebe von männlichen Individuen entnommen wurde, wies demnach höhere RIN-Werte auf als RNA, die aus Gehirngewebe von weiblichen Probenspendern isoliert wurde. Außerdem wurde eine niedrigere RNA-Integrität bei Probenspendern gemessen, die älter als 70 Jahre waren [Durrenberger 2010]. Im vorliegenden Probenmaterial wurde für die beiden genannten Parameter (Abbildung 3.3 und 3.4) kein statistisch signifikanter Einfluss auf die RNA-Integrität gefunden, was den Ergebnissen von Durrenberger et al. widerspricht, jedoch diejenigen von Sherwood et al. [2011] bestätigt. Diese Arbeitsgruppe untersuchte den Einfluss prä- und postmortaler Faktoren auf die Qualität und die Quantität von RNA, die aus postmortalem Human-Gehirngewebe isoliert wurde. Die Proben entstammten einerseits Individuen, die an der Creutzfeld-Jakob Erkrankung litten. Andererseits dienten Proben von Spendern ohne pathologisch-neurologischen Hintergrund als Kontrollgruppe. Weder das Alter zum Todeszeitpunkt noch das Geschlecht der Individuen hatten Einfluss auf die RNA-Qualität und -Quantität [Sherwood 2011].

### Einfluss der Agoniedauer

Im Zusammenhang mit dem Einfluss des Gewebetyps auf die Integrität der RNA wurde bereits beschrieben, dass sich ein agoniebedingtes Absinken des pH-Wertes (antemortale Azidose) im Gehirngewebe negativ auf die Integrität der isolierten RNA auswirken kann [Li 2004, Tomita 2004, Atz 2007, Durrenberger 2010]. Das Auftreten einer Azidose im Gehirn wird in der Literatur stets mit verschiedenen agonalen Faktoren in Verbindung gebracht. Tomita et al. [2004] beschrieben daher das sogenannte AFS-System (*agonal factor score system*), bei dem verschiedene Faktoren wie Koma, Hypoxie, Pyrexie, Krämpfe, Dehydrierung, Hypoglykämie, multiples Herzversagen, Kopfverletzung und Aufnahme neurotoxischer Substanzen mit 0 oder 1 bewertet wurden. 0 wurde mit „nicht gegeben“, 1 wurde mit „gegeben“ gleichgesetzt [Tomita 2004]. Auch im vorliegenden Probenumfang wurde versucht, dieses Punkte-System anzuwenden.

Allerdings bedarf dies sehr genauer Informationen über die jeweilige Anamnese des Probenspenders sowie über verschiedenste prämortale Gegebenheiten. Wenn diese Angaben nicht lückenlos vorliegen, wird die Klassifizierung der Probe nach dem AFS-System problematisch.

Die überwiegende Zahl unserer Probenspender wiesen eine kurze Agoniedauer im Minutenbereich auf (siehe Tabelle 8.1). Bei zehn Probenspendern kann die Agoniephase todesursachenbedingt auch mehrere Stunden gedauert haben. Trotzdem wurde in keinem der untersuchten Gewebe ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den Parametern Agonie und RNA-Integrität gefunden (Abbildung 3.5). Die Dauer der Agonie scheint daher im vorliegenden Probenumfang keinen Einfluss auf die Integrität der RNA auszuüben, was die Ergebnisse von Popova et al [2008] bestätigt. Mit dem Fernziel die Genexpression nach psychiatrischen und neurodegenerativen Erkrankungen zu untersuchen, isolierte die Arbeitsgruppe RNA aus dem Gewebe von zehn verschiedenen humanen Gehirnregionen. Ein signifikanter Einfluss der agonalen Phase auf die Qualität der RNA wurde nicht nachgewiesen [Popova 2008].

### Einfluss der Todesursache

In einer Studie von 2006 beschrieben Ikematsu et al. [2006] den Einfluss der Todesursache auf das Expressionsmuster spezifischer Gene. Inzwischen ist bekannt, dass prämortale Effekte das Transkriptom beeinflussen [Popova 2008, Mexal 2006]. In zahlreichen Studien wird daher nach möglichen Kandidatengenen zur weiteren Aufklärung der Ursachen bzw. des Verlaufs verschiedener Funktionsstörungen gesucht. Gegenstand dieser Arbeiten sind beispielsweise neurodegenerative Erkrankungen wie Parkinson, Alzheimer oder Demenz [Barrachina 2006, Chevyreva 2008, Popova 2008], Schizophrenie oder Depression [Tomita 2004, Weis 2007, Atz 2007].

Im forensischen Kontext stehen vor allem Ursachen, die im Prozess des Versterbens eine Rolle gespielt haben könnten, im Mittelpunkt. So untersuchten Ikematsu et al. das Expressionsmuster verschiedener Gene am Mausmodell nach Strangulation [Ikematsu 2006]. Partemi et al. bestimmten die Genexpression in postmortalem humanem Herzmuskelgewebe bei Individuen mit kardiovaskulären Erkrankungen [Partemi 2010].

Die Stabilität der eukaryotischen mRNA kann stark variieren (siehe 1.4). Ihre Halbwertszeit wird im Wesentlichen durch spezifische Sequenzen, die sogenannten cis-Elemente, festgelegt. Diese stehen in Wechselwirkung mit trans-acting-Proteinen. In Antwort auf verschiedene äußere Gegebenheiten, wie z.B. Hypoxie, kann demnach ggf. der mRNA-Abbau eingeleitet werden [Hollams 2002]. Um pathologisch bedingte Änderungen des Transkripts eines Zielgens feststellen zu können, wird jedoch darauf hingewiesen, dass die Integrität der RNA-Probe so gut wie möglich sein sollte [Weis 2007, Fleige und Pfaffl 2006]. Daher stellt sich die Frage nach dem Einfluss der Todesursache bzw. der damit einhergehenden prä- und postmortalen Faktoren auf die Integrität der RNA. Als postmortale Parameter wären unterschiedliche Lagerungsbedingungen des Körpers zu nennen. Eine ertrunkene Person könnte sich beispielsweise über einen längeren Zeitraum in einem flüssigen Medium befinden. Eine Person, die an plötzlichem Herzversagen verstirbt, könnte bis zur Auffindung erhöhten Raumtemperaturen ausgesetzt sein.

Das in der vorliegenden Teilstudie verwendete Gewebe wurde ausschließlich aus Regionen entnommen, die keine, mit der Todesursache assoziierten makroskopischen Veränderungen, keine Narben und auch keine Zeichen der Fäulnis aufwiesen. Daher wurde vermutet, dass die Todesursache keinen Effekt auf die Integrität der isolierten RNA ausüben würde. Dementsprechend wurde im analysierten Probenmaterial kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den Parametern Todesursache und RNA-Integrität festgestellt (Abbildung 3.6), was die Ergebnisse von Weis et al. bestätigt [Weis 2007]. Die Arbeitsgruppe isolierte RNA aus Gehirngewebe von Spendern, die an einer Schizophrenie, einer bipolaren Störung oder einer Depression erkrankt waren. Der Vergleich mit der Integrität von RNA aus Gewebeproben von gesunden Individuen lieferte Hinweise darauf, dass unabhängig vom pathologischen Zustand stets RNA guter Qualität gewonnen werden konnte.

Im vorliegenden Untersuchungsgut lässt sich ein leichter, nicht signifikanter Trend hin zu niedrigeren RIN-Werten in Herzmuskel- und Skelettmuskelproben nach Versterben durch Myokardkardinfarkt feststellen. Dies lässt Raum für weitere Untersuchungen anhand eines größeren Probenumfangs.

### Einfluss des BMI

Nach Eintreten des Todes folgt die postmortale Angleichung der Körperkerntemperatur an die Umgebungstemperatur in Form einer sigmoidalen Verlaufskurve. Zunächst baut sich dabei ein Temperaturgefälle vom Körperkern zur Körperoberfläche auf. Das heißt, der Abfall der Körperkerntemperatur hinkt der Auskühlung der Körperoberfläche etwas hinterher. Somit bildet sich zunächst ein Temperaturplateau, das 2 bis 3 Stunden postmortem aufrecht erhalten bleibt. Der weitere annähernd lineare Abfall der Körperkerntemperatur beträgt ca. 0,5 bis 1,5 °C pro Stunde. Dieser geht schließlich in die asymptotische Endphase über, bei der sich Körperkerntemperatur und Außentemperatur angleichen [Madea 2007].

Die Geschwindigkeit der postmortalen Abkühlung des Körpers hängt von zahlreichen individuellen Parametern ab. Dazu gehören der Anteil des Körperfettes an der Gesamtkörpermasse, die Körperhaltung nach dem Tod, die Kleidung, eine etwaige Bedeckung oder die Luftbewegung bzw. die Luftfeuchtigkeit. Ist die Körpermasse bekannt, dann kann unter Zuhilfenahme des *Temperatur-Todeszeit-Bezugsnomograms nach Henßge* nach einmaliger Messung der Rektaltemperatur sowie der Umgebungstemperatur die Liegezeit eines Leichnams eingegrenzt werden. Abkühlungsverzögernde- bzw. abkühlungsbeschleunigende Effekte wie dicke / dünne oder trockene / feuchte Bekleidung, Wind oder Lagerung in einer feuchten Umgebung werden bei dieser Berechnung in Form von Korrekturfaktoren berücksichtigt [Penning 2006, Madea 2007]. In dem von Mall et al. [2005] eingeführten dreidimensionalen Finite-Elemente-Modell wird der menschliche Körper zusätzlich in Gewebekompartimente gegliedert. Jedes Kompartiment ist gekennzeichnet durch unterschiedliche thermale Eigenschaften. Neben dem Temperaturgradienten zwischen Körperkern und Körperoberfläche berücksichtigt das Modell zudem den Wärmeverlust durch Konduktion, Konvektion oder Abstrahlung bzw. die Wärmezufuhr durch supravitale Prozesse oder durch eine externe Wärmeeinstrahlung [Mall 2005].

Das in der vorliegenden Studie verwendete Gewebematerial wurde von Individuen entnommen, die unterschiedliche körperliche Proportionen aufwiesen. Da der postmortale Abkühlungsprozess nicht unerheblich von der Körpermasse beeinflusst wird, stellte sich die Frage, inwiefern sich das Körpergewicht auf die Integrität der aus dem Gewebe isolierten RNA auswirkt.

Starkes Übergewicht (Adipositas) ist gekennzeichnet durch eine übermäßige Vermehrung des Körperfettes. Krankhafte Auswirkungen sind häufig die Folge. Laut Definition der World-Health-Organization (WHO) unterscheidet man drei Schweregrade der Fettleibigkeit. Diesen liegt die Berechnung des jeweiligen Body Mass Index (BMI) zugrunde, der sich aus dem Quotienten aus Körpermasse [in Kilogramm] und dem Quadrat der Körpergröße [in Metern] ergibt. Normalgewichtige Personen weisen einen BMI zwischen 18 und 25 auf [[http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro\\_3.html](http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html)]. Ein BMI von über 25 deutet auf das Vorliegen von Übergewicht hin. Ein BMI von 30 bis 35 beschreibt den Grad 1 der Adipositas, ein BMI von 35 bis 40 den Grad 2 und ein BMI von größer / gleich 40 den Grad 3. Normal- und untergewichtige Personen weisen einen BMI zwischen 16 und 25 auf. In der vorliegenden Studie wurden Probenspender mit einem BMI < 25 zur Gruppe der Unter- bzw. Normalgewichtigen, Individuen mit einem BMI  $\geq$  25 wurden zur Gruppe der Übergewichtigen gezählt. Auf Grundlage dieser Einteilung wurde aus postmortalem Skelettmuskelgewebe von normal- oder untergewichtigen Individuen RNA isoliert, die statistisch signifikant weniger degradiert war, als RNA von übergewichtigen Individuen. Bei Herzmuskel- und Gehirngewebe scheint ein erhöhtes Körpergewicht keinen Einfluss auf den Degradierungsstatus der RNA auszuüben. Möglicherweise würde sich auch in diesen Geweben ein Trend hin zu einer niedrigeren RIN abzeichnen, wenn man den Probenumfang von Spendern mit einem BMI > 35 erhöht.

Die anatomische Lage des *M. iliopsoas*, aus dem das Skelettmuskelgewebe stets entnommen wurde, könnte eine mögliche Erklärung für die erhobenen Befunde liefern. Der Hüftbeugemuskel liegt tief im Zentrum des menschlichen Körpers an der Stelle des größten Körperumfangs im Falle eines Übergewichts. Ist er umgeben von einer größeren adipösen Schicht, dann ist eine längere Postmortalzeit erforderlich, damit trotz des Temperaturgradienten eine Abkühlung des Körperkerns zustande kommt.



Ein weiterer Faktor, der den Prozess der RNA-Degradierung möglicherweise begünstigen könnte, ist die Nähe des M. iliopsoas zum Darm. Vom Darm ausgehend können postmortem Bakterien in das umliegende Gewebe emigrieren. Als Folge dessen setzen Fäulnisprozesse ein und die Bauchdecke färbt sich grün. Es ist anzunehmen, dass eine übergewichtige Person, deren Körperkerntemperatur länger hoch bleibt, schneller von Fäulnis betroffen ist, was sich negativ auf die RNA-Integrität auswirken könnte. Um diese Vermutung näher zu untersuchen, bieten sich weiterführende Studien an, die den Zusammenhang zwischen einem erhöhten BMI und einer erniedrigten RIN in einem peripheren Muskel untersuchen. Möglicherweise stellt sich heraus, dass der Zusammenhang zwischen BMI und RNA-Integrität eher von der anatomischen Lage innerhalb des Körpers als vom Gewebetyp abhängig ist.

### 4.2.2 Resümee der Teilstudie

Am untersuchten Probenmaterial wurde der Gewebetyp als Parameter identifiziert, der einen signifikanten Einfluss auf die Integrität der isolierten RNA ausüben kann. Demnach scheint humanes Skelettmuskelgewebe für Genexpressionsstudien an Autopsiematerial besonders geeignet. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei der aus postmortalem Gehirngewebe isolierten RNA mit niedrigen Integritäten zu rechnen ist. Zusätzliche Validierungen in Abhängigkeit von der angewendeten Extraktionsmethode erscheinen angezeigt. Es kann davon ausgegangen werden, dass für relativ straffes Gewebe, wie z.B. Herz- und Skelettmuskel, eine andere Methode erfolgreich ist, als für ein Gewebe mit vergleichsweise geringer Konsistenz, wie z.B. Gehirngewebe.

Der Body Mass Index des Probenspenders erwies sich als weiterer Parameter, der die RNA-Integrität beeinflusst. Aus dem Skelettmuskelgewebe von unter- bzw. normalgewichtigen Individuen wurde RNA hoher Integrität isoliert. Mit ansteigendem Körpergewicht scheint die RNA einer zunehmenden Degradierung zu unterliegen. In Herzmuskel- und Gehirngewebe wurde ein solcher Zusammenhang nicht festgestellt. Eine plausible Erklärung für die gewichtsabhängige Degradierung in Skelettmuskelgewebe bietet die anatomische Lage des M. iliopsoas, aus dem die Skelettmuskelproben entnommen wurden. Vergleichende Analysen mit einem peripher lokalisierten Muskel könnten zukünftig weitere Erkenntnisse bringen.

Die Untersuchung des Einflusses von Geschlecht, PMI, Sterbealter, Dauer der Agonie und Todesursache lieferte keine eindeutigen Hinweise auf einen Zusammenhang mit der RNA-Integrität. Die Heterogenität der Probenzusammensetzung bedingt jedoch, neben den in der vorliegenden Teilstudie untersuchten Faktoren, zahlreiche weitere Faktoren, die Einfluss auf die RNA-Integrität und dadurch auf die Genexpressionsdaten haben können. Oftmals sind allerdings nur wenige Informationen über den jeweiligen Probenspender sowie über die ihn betreffenden prä- und postmortalen Vorgänge bekannt. Statt großer heterogener Gruppen sollten daher künftig eher klar definierte kleinere Fallgruppen miteinander verglichen werden. Das heißt, die Gruppen sollten ausschließlich aus biologischen Replikaten bestehen, die sich in klar definierten Parametern ähneln.

### 4.3 Transkriptstabilität endogener Kontrollgene

Die hochsensitive quantitative PCR ermöglicht die Quantifizierung von mRNA in vielen verschiedenen Proben. Selbst bei einer geringen Menge an Ausgangsmaterial kann das Expressionslevel von Genen reproduzierbar analysiert werden. Im langwierigen Prozess der Probenverarbeitung vom RNA-Extrakt bis hin zum quantifizierten mRNA-Transkript treten allerdings verschiedene Variablen auf, die gezielt kontrolliert werden müssen. Dazu gehören die Variabilitäten im Extraktionsschritt sowie Unterschiede der enzymatischen Effizienzen sowohl während der reversen Transkription als auch während der RT-qPCR. Um eine dadurch verursachte fehlerbehaftete Dateninterpretation zu vermeiden, ist eine für den jeweiligen Probenumfang geeignete Datennormalisierung unumgänglich [Vandesompele 2002, Dheda 2004, Huggett 2005]. Inzwischen gilt die Normalisierung gegen stabile, endogene Kontrollgene diesbezüglich als Methode der Wahl [z.B. Pérez 2007, Langnaese 2008, Kheirleid 2010]. Sie verhindert das Verschleiern bestehender Genexpressionsunterschiede bzw. die irriige Annahme von Unterschieden in der exprimierten Transkriptmenge des Zielgens [Dheda 2005, Bonefeld 2008, Lagnaese 2008].

Für die vorliegende Teilstudie, die der Validierung der Transkriptstabilität von Kontrollgenen in postmortalem Herzmuskel-, Skelettmuskel- und Gehirngewebe diente, wurden zehn Gene ausgewählt (siehe Tabelle 2.11), die im eukaryotischen Zellstoffwechsel unterschiedliche Funktionen erfüllen (siehe Tabelle 1.2). Dies verringert die Wahrscheinlichkeit einer bestehenden Co-Regulation dieser Gene. Diejenigen Gene, deren Expression nur in einem umschriebenen Maße variierte, wurden als Referenzgene erklärt, um das Expressionsverhalten instabiler Gentranskripte in Abhängigkeit verschiedener Parameter zu untersuchen.

### 4.3.1 Stabile Kontrollgene in postmortalem Gewebe

Mit Hilfe der excelbasierten Software geNorm [Vandesompele 2002] wurden aus einem Set von 10 Referenzgenen die Gene mit der höchsten Transkriptstabilität identifiziert. Bei Proben aus postmortalem Herzmuskelgewebe handelte es sich um die Gene CYCA und TBP, in Proben aus Skelettmuskelgewebe um SDHA und TBP sowie in Proben aus Gehirngewebe um SDHA und HMBS (siehe Tabelle 3.3). Wurden sämtliche Proben unabhängig vom Gewebetyp analysiert, dann erwiesen sich die Transkripte von HMBS, UBC, SDHA und TBP als stabil (siehe Tabelle 3.2).

Im Vergleich zu den Ergebnissen einer Studie von Langaese et al. [2008], die in Hippocampusgewebe von Ratten eine hohe Stabilität von CycA zeigen konnten, wurde für selbiges Gentranskript in humanem postmortalem Gehirngewebe nur eine mittlere Stabilität nachgewiesen. Kreth et al. [2010] untersuchten die Transkriptstabilität von 19 endogenen Kontrollgenen in humanem Gliomgewebe. TBP wies dabei eine hohe Stabilität auf. In einer weiteren Arbeit zur Validierung endogener Kontrollgene in humanem Plazentagewebe wurde aus einer Auswahl von sieben Kontrollgenen eine Transkriptstabilität für TBP und SDHA beschrieben [Meller 2005]. Die Resultate verschiedener Arbeitsgruppen lassen erkennen, dass jedes Gewebe hinsichtlich der Transkriptstabilität endogener Kontrollgene variieren kann. Analog dazu zeigten die Gentranskripte von GAPDH und HPRT1 bei Proben aus postmortalem Herzmuskel, Skelettmuskel und Gehirngewebe stark abweichende Stabilitäten (siehe Tabelle 3.3). Die beobachtete Variabilität der Transkriptstabilität lässt sich möglicherweise durch eine gewebe- und artspezifische Genregulation erklären. Ein bestimmtes Gentranskript kann demnach im Gehirngewebe einer Ratte sehr stabil sein, während es in postmortalem humanem Gehirngewebe nur eine sehr geringe Stabilität aufweist.

Zudem spielt möglicherweise die anatomische Region, aus der die Gewebeprobe entnommen wurde, eine Rolle. Es ist denkbar, dass sich die Transkriptstabilität bestimmter Gene in einem peripheren Muskel von derjenigen eines tief liegenden Muskels deutlich unterscheidet. Eine dem Probenmaterial angepasste Validierung der endogenen Kontrollgene erscheint daher essentiell [Bonefeld 2008, Ohl 2006, Pombo-Suarez 2008].

Die Transkripte von bisher häufig als endogene Kontrolle verwendeten Genen wie 18s rRNA, ACTB und GAPDH erwiesen sich in unserem Probengut als instabil. Sie sind daher für die vorliegende Probenzusammensetzung nicht als Kontrollgene zu empfehlen. Diese Ergebnisse bestätigen bereits beschriebene Studienresultate der Arbeitsgruppe von Coulson, die eine variierende Transkriptmenge der Gene von 18S rRNA und ACTB in postmortalem Human-Gehirngewebe fanden [Coulson 2008]. Trotzdem werden nach wie vor Studien zur Veröffentlichung akzeptiert, die ausschließlich 18S rRNA, ACTB oder GAPDH als einziges, nicht validiertes Kontrollgen für die Datennormalisierung verwenden [z.B. Mrazek 2002, Larysz 2011, Parker 2011, Deo 2011, Mauro 2011]. In einer eigenen Studie sollte daher untersucht werden, welche Folgen eine derartige (suboptimale) Normalisierung auf die Dateninterpretation haben kann (siehe 3.4 und 4.5).

Aufgrund der nachgewiesenen Transkriptinstabilität wurden die Gene von 18S rRNA und ACTB sowie von B2M, CYCA, HPRT1 und TBP in der weiteren Analyse als Zielgene erklärt.

### 4.3.2 Mindestanzahl endogener Kontrollgene

Ursprünglich verwendete man für Genexpressionsstudien ein einzelnes endogenes Kontrollgen zur Datennormalisierung. Endogene Kontrollgene, die auch als „Housekeeping Genes“ bezeichnet wurden, kodieren i.d.R. Proteine, die essentielle Funktionen im Zellstoffwechsel erfüllen. Daher wurde von deren ubiquitärer und stabiler Expression in sämtlichen Gewebearten ohne den Einfluss äußerer oder experimenteller Faktoren ausgegangen [Watson 1987]

Inzwischen ist jedoch bekannt, dass es ein universelles, stabiles endogenes Kontrollgen nicht gibt [z.B. Meller 2005, Ohl 2006, Pombo-Suarez 2008, Bonefeld 2008, Kreth 2010]. Die hochsensitive Methode der quantitativen Real-Time PCR konnte zeigen, dass auch die einst als endogene Kontrollen verwendeten Gene wie GAPDH, 18S rRNA und ACTB einer Regulation unterliegen und daher im jeweiligen Probengut unterschiedliche Transkriptstabilitäten aufweisen können [Zampieri 2010, Boujedidi 2011].

Die Validierung der Transkriptstabilität eines Kontrollgens stellt eine gewisse Herausforderung dar. Vandesompele et al. bezeichnen das Problem als Teufelskreis oder „*circular problem*“ [Vandesompele 2002]. Demnach würde die Validierung der Stabilität eines Kontrollgens das Wissen über die gegebene Stabilität weiterer Kontrollgene voraussetzen. Um dieser Schwierigkeit entgegenzutreten, entwickelten Vandesompele et al. [2002] eine Methode, bei der die Transkriptstabilität ausgewählter Gene basierend auf dem jeweils nicht-normalisierten Expressionslevel kalkuliert wird. Dabei wird davon ausgegangen, dass das Expressionsverhältnis der zwei stabilsten Kontrollgene unabhängig von experimentellen Bedingungen in jeder untersuchten Probe identisch ist. Wird bei einer derartigen paarweisen Variation von zwei Kontrollgenen ein variierendes Expressionsverhältnis im untersuchten Material detektiert, dann liefert dies einen Hinweis darauf, dass zumindest eines der gewählten Gene einer Regulation unterliegt und demnach nicht konstant exprimiert wird. Bei einer bestimmten Probenzusammensetzung kann man somit diejenigen Gene auswählen, die sich in Kombination als stabil erweisen. Daraus ging die Empfehlung hervor, stets mehrere validierte stabile endogene Kontrollgene für die Normalisierung von Genexpressionsdaten heranzuziehen, die gemeinsam eine höhere Stabilität aufweisen, als es ein einzelnes Referenzgen tun würde [Vandesompele 2002].)

Die mit der geNorm-Software kalkulierte paarweise Variation  $V_{n/n+1}$  liefert Informationen über die für das jeweilige Probengut notwendige Mindestanzahl von endogenen Kontrollgenen. Vandesompele et al. schlugen diesbezüglich einen Grenzwert von  $V_{n/n+1} = 0,15$  vor [Vandesompele 2002] (siehe 2.2.9). Die geNorm-Analyse aller in dieser Teilstudie analysierten Proben (unabhängig vom Gewebetyp) zeigte nach Einbeziehung von zehn untersuchten Referenzgenen einen V-Wert von 0,21 (siehe Tabelle 3.2).

Wurden die Proben nach Gewebetyp gruppiert, dann ergab die Einbeziehung von vier Kontrollgenen für Herzmuskelgewebe einen kalkulierten V-Wert von 0,14. Sollte der Wert von  $V_{n/n+1} < 0,15$  unterschritten werden, wären für die Datennormalisierung in postmortalem Skelettmuskelgewebe fünf, in Gehirngewebe sogar sechs Referenzgene nötig (siehe Tabelle 3.3). Allerdings erscheint es unpraktikabel fünf oder sechs Referenzgene zu verwenden, wenn nur ein oder zwei Zielgene untersucht werden sollen, oder wenn nur eine begrenzte Menge an RNA vorliegt. Um zu gewährleisten, dass sich Praktikabilität und eine verlässlichen Datenanalyse die Waage halten, wies die Arbeitsgruppe um Vandesompele darauf hin, dass mindestens drei stabile endogene Kontrollgene zur Kalkulation eines verlässlichen Normalisierungsfaktors herangezogen werden sollten. Der von Vandesompele vorgeschlagene Richtwert von  $V_{n/n+1} < 0,15$  ist daher nicht verpflichtend für jedes Probenmaterial [Vandesompele 2002], sondern kann entsprechend angepasst werden.

Im eigenen Untersuchungsgut wurde eine relativ große Datenstreuung beobachtet. Aus diesem Grund wurden für jedes untersuchte Gewebe anstatt drei sogar vier endogene Kontrollgene zur Datennormalisierung herangezogen. Dies bedeutet eine Verschiebung des  $V_{n/n+1}$ -Werts auf 0,2 (Abbildung 3.9 und Tabelle 3.3).

### 4.3.3 Einfluss verschiedener Parameter auf das Transkriptlevel instabiler Gene

Postmortalgewebe unterliegt dem Einfluss verschiedener Faktoren. Diese können einerseits individuenbezogen, andererseits methodisch bedingt sein. Die methodische Komponente schließt beispielsweise Varianzen in der PCR-Effizienz oder in der Aktivität von Enzymen wie der reversen Transkriptase ein. Nur eine Konstanz im praktischen Arbeitsablauf sowie eine sehr gute Datennormalisierung können diese Varianzen begrenzen bzw. ausgleichen. Wird beispielsweise die spezifische PCR-Effizienz rechnerisch in die Datenanalyse einbezogen, dann können die Ergebnisse besser miteinander verglichen werden.

Die Todesursache, das PMI, das Geschlecht, das Sterbealter und die relative Körpermasse, die durch den Body Mass Index charakterisiert ist, sind individuelle Parameter, die das Probengut sehr heterogen erscheinen lassen. Die Tabellen 8.1 und 8.2 geben diesbezüglich eine Übersicht über die Probenspender. Um zu untersuchen, ob diese spenderbezogenen Faktoren Ursache des hohen M-Werts und damit der geringen Transkriptstabilität eines Gens sind, wurde das jeweilige Transkriptlevel der im Probengut validierten instabilen Gene (18S rRNA, ACTB, B2M, GAPDH, HPRT1, UBC) gegen die vier stabilsten Kontrollgene des jeweiligen Gewebes normalisiert und in Abhängigkeit von den genannten Parametern analysiert.

#### Einfluss der Todesursache auf die Transkriptstabilität von sechs Genen

Entsprechend den individuellen Todesumständen wurden die vorliegenden Proben je nach ihrer Todesursache in drei Gruppen eingeteilt: „zentrale Dysregulation“, „Ersticken“ und „plötzlicher Herztod“. Der Oberbegriff „zentrale Dysregulation“ umfasst dabei Todesfälle mit zerebraler Pathologie aus traumatischer oder natürlicher Ursache. Dazu wurden Individuen gezählt, deren Tod beispielsweise durch ein schweres Schädel-Hirn-Trauma oder ein Polytrauma verursacht war. In diese Gruppe wurden 10 Individuen einbezogen.



Neun weitere Individuen verstarben an einem plötzlichen Herztod. Darunter versteht man einen unerwartet und plötzlich eintretenden Tod aus kardialer Ursache. Klinische und pathologische Befunde weisen darauf hin, dass Patienten, die an einer koronaren Herzkrankheit, an Kardiomyopathie, an Herzrhythmusstörungen oder an Bluthochdruck leiden, einem erhöhten Risiko eines plötzlichen Herztodes ausgesetzt sind. In den meisten Fällen führt eine ventrikuläre Tachykardie zum Kammerflimmern [Zheng 2001]. Die einzelnen Herzmuskelfasern kontrahieren sich dabei unkoordiniert. Nach wenigen Sekunden erfolgt ein Bewusstseinsverlust, weil das Gehirn nur ungenügend mit Blut versorgt wird. Ohne Reanimationsmaßnahmen (Defibrillation) tritt aufgrund mangelnder Sauerstoffversorgung der Hirntod ein [Zipes 1998, Moss 1980].

Todesfälle durch Blutaspilation, Ertrinken oder Strangulation wurden in einer weiteren Gruppe von neun Individuen zusammengefasst. In diesem Kollektiv war die Sauerstoffaufnahme nach Art einer Erstickung beeinträchtigt.

Eine Gruppe aus 10 Individuen, die aus diversen Ursachen verstorben waren, wurden unter dem Überbegriff „Sonstige“ subsumiert. Als Todesursachen wurden Aortenruptur, Verblutung, Unterkühlung, Aspirationspneumonie und Rauchgasintoxikation diagnostiziert.

Bereits 2006 beschrieben Ikematsu et al. den Einfluss der Todesursache auf das Expressionsmuster spezifischer Gene [Ikematsu 2006]. Auch in den vorliegenden Proben aus postmortalem Skelettmuskel- und Gehirngewebe scheint die Todesursache von allen untersuchten Parametern den stärksten Einfluss auszuüben. Die Gentranskripte von B2M, HPRT1 und TBP zeigten im Gehirngewebe bei kardialen Todesfällen signifikant niedrigere mRNA-Mengen an als in der Gruppe der Todesfälle durch eine zentrale Dysregulation (B2M, HPRT1 und TBP) und in der Gruppe der sonstigen Ursachen (HPRT1) (Abbildung 3.13). In postmortalem Skelettmuskelgewebe wurde ein signifikant höheres Transkriptlevel von B2M nach Herztod ermittelt. Eine Erklärung für diesen Befund ist nicht direkt aus der Funktion der betroffenen Gene ableitbar. Weitere Analysen scheinen daher Analysen erforderlich.

Die nachgewiesene Änderung des Transkriptlevels spezifischer Zielgene nach einem Versterben aus kardialer Ursacher gibt Anlass zu der Annahme, dass die klassische Obduktion zur Todesursachenfindung zukünftig von einer „molekularen Autopsie“ begleitet werden könnte. Bestimmte Gentranskripte könnten demnach als spezifische Biomarker für bestimmte Todesursachen herangezogen werden. Aus morphologischer Sicht können ein plötzlicher Herztod oder ein spurenarmes Ersticken schwierig zu erkennen sein und die Abgrenzung zu anderen, nichtnatürlichen Todesursachen stellt sich manchmal als nahezu unmöglich heraus. Ein Beispiel dafür wäre die Abgrenzung zwischen dem plötzlichen Säuglingstod und einer nichtnatürlichen Todesursache durch Ersticken mittels eines weichen Gegenstandes (Kissen). Diese Hypothese könnte bei Verfügbarkeit eines ausreichend großen Probenkollektivs Gegenstand einer weiteren Studie sein.

### Einfluss des PMI

In der vorliegenden Studie wurde ein Einfluss des PMI auf das Transkriptlevel von GAPDH im Herzmuskel sowie von GAPDH und UBC im Skelettmuskel nachgewiesen (siehe Abbildung 3.10). In beiden Gewebetypen sank die detektierte Transkriptmenge nach einem Postmortalintervall von 21 bis 45 Stunden. Die darauf basierende Vermutung einer mit steigendem PMI abnehmenden Gesamt-RNA-Menge wurde jedoch nicht bestätigt. Die Berechnung der Pearson-Korrelation zwischen beiden Parametern ergab keine statistische Signifikanz (Abbildung 8.2). Dies steht in Einklang mit Ergebnissen von Barrachina et al. [2006]. Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass das Transkriptlevel der Zielgene SOD1 (superoxide dismutase 1) und ADAM22 (metalloproteinase domain 22) in humanem Gehirngewebe nach einer Normalisierung gegen Beta-Aktin vom postmortalen Intervall unbeeinflusst bleibt [Barrachina 2006].

Erstaunlicherweise wurde in der vorliegenden Studie eine mit zunehmendem PMI ansteigende Transkriptmenge von B2M in postmortalem Herzmuskelgewebe festgestellt. Für GAPDH und HPRT1 wurde dies bei kurzen PMI-Intervallen beobachtet (Abbildung 3.10 A). Zudem ist in Abbildung 8.2 am Skelettmuskelgewebe ein Trend zu erkennen, wonach bei länger werdendem PMI die Gesamt-RNA-Menge ansteigt.

Die gemessenen Quantitäten der RNA-Extrakte streuen allerdings in den untersuchten Geweben erheblich. Anhand des vorliegenden Probenmaterials kann keine generelle Aussage über den Einfluss des PMI auf die Transkriptmenge der RNA spezifischer Zielgene getroffen werden. Hauptursachen dürften die Heterogenität der Proben sowie die mangelhafte Verfügbarkeit von Informationen über die postmortalen Bedingungen sein. Studien an Versuchstieren, die eine Kontrolle der postmortalen Gegebenheiten erlauben, erscheinen diesbezüglich sinnvoll.

### Einfluss des Geschlechts und des Individualalters

Preece und Cairns berichteten über geschlechtsspezifisch auftretende Unterschiede in den Transkriptmengen von GAPDH und Beta-Aktin [Preece und Cairns 2003]. Demnach wurde in postmortalem Gehirngewebe von weiblichen Probenspendern weniger Transkript quantifiziert als bei männlichen Individuen. In der vorliegenden Studie wurde in der Skelettmuskulatur von weiblichen Probenspendern eine statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) höhere Transkriptmenge von UBC detektiert als bei männlichen Individuen (siehe Abbildung 3.14 B). Im Herzmuskel und im Gehirngewebe wurden für die untersuchten Zielgene keine signifikanten Transkriptmengenunterschiede errechnet (siehe Abbildung 3.14 A, C), was gegen einen erheblichen Einfluss des Geschlechts spricht.

Das Protein Ubiquitin kommt in allen eukaryotischen Zellen vor und ist an der posttranslationalen Modifikation weiterer Proteine beteiligt. Durch seine reversible Bindung werden Halbwertszeit, Funktion oder die Lokalisation anderer Proteine innerhalb der Zelle reguliert [Li und Ye 2008]. Man geht davon aus, dass Ubiquitin auch an der Entstehung von Krankheiten mitwirkt [z.B. Ralston und Albagha 2011]. Die Annahme, dass die Pathologie verschiedener krankhafter Veränderungen geschlechtsspezifisch variieren kann, würde einen möglichen Ansatz zur Erklärung des in unserer Studie nachgewiesenen Anstiegs des Transkriptlevels von UBC bei weiblichen Probenspendern liefern.

Neben dem Einfluss des Geschlechts berichteten Preece und Carins außerdem über einen Einfluss des Alters zum Todeszeitpunkt auf die Transkriptmenge von Beta-Aktin in postmortalem humanem Gehirngewebe. In unserem Untersuchungsgut wurden variierende Transkriptmengen von 18S rRNA und GAPDH in postmortalem Skelettmuskelgewebe detektiert (siehe Abbildung 3.12 B). Sowohl in Herzmuskel- als auch in Gehirngewebe wurden für die untersuchten Zielgene jedoch keine signifikanten Transkriptmengenunterschiede errechnet (siehe Abbildung 3.12 A, B), was darauf hindeutet, dass das Individualalter der Probenspender in beiden Gewebetypen keinen Einfluss auf die Transkriptmengen der untersuchten Zielgene hat. Dies lässt sich mit den Ergebnissen von Gutala et al. in Einklang bringen [Gutala 2004]. Die Arbeitsgruppe um Gutala quantifizierte die Transkriptlevel von 18S rRNA und GAPDH in postmortalem humanem Gehirngewebe von Alzheimer-Patienten. Ein Einfluss des Alters zum Todeszeitpunkt wurde in deren Probengut nicht festgestellt.

### Einfluss des Body Mass Index

Übergewicht wird vielfach als eine polygene Krankheit angesehen. Sie ist von einer erhöhten Körpermasse in Relation zur Körperhöhe geprägt und geht häufig einher mit weiteren Erkrankungen wie Diabetes mellitus oder Bluthochdruck. Dies kann eine Änderung der Transkriptmenge bestimmter Gene hervorrufen [Aberle 2008]. In der vorliegenden Studie wurde für die Gentranskripte von ACTB und GAPDH in postmortalem Skelettmuskelgewebe ein statistisch signifikant höheres (ACTB) bzw. ein statistisch signifikant niedrigeres (GAPDH) Transkriptlevel bei übergewichtigen Probenspendern ermittelt. Ein Erklärungsversuch für die Befunde könnte mit folgenden Überlegungen beginnen: Bei der Gewinnung von Adenosintriphosphat (ATP) im Prozess der Glykolyse ist das Enzym Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase, das durch Glut1 kodiert wird, am Abbau von Monosacchariden (z.B. Glukose) beteiligt [Stryer 1996]. Aktine sind dagegen Strukturproteine und demnach Bestandteil des Zytoskeletts. Infolge einer hypertonen Mehrbelastung der Blutgefäße induziert Fettleibigkeit möglicherweise die verstärkte Translation von ACTB mit dem Ziel, die äußere Zellform verstärkt zu stabilisieren.

Das signifikant niedrigere Transkriptlevel von GAPDH hingegen ist eventuell erklärbar durch die signaltransduktionsinduzierte Überzuckerung des Blutes. Das Gewicht des Probenspenders sollte daher bei der Auswahl der biologischen Replikate stets berücksichtigt werden.

### 4.3.4 Resümee der Teilstudie

Aus zehn endogenen Kontrollgenen, die im eukaryotischen Stoffwechsel unterschiedliche Funktionen erfüllen, wurden die Gene HMBS, UBC, SDHA und TBP als diejenigen mit der höchsten Transkriptstabilität in postmortalem Herzmuskel-, Skelettmuskel- und Gehirngewebe identifiziert. In der gewebespezifischen Analyse stellten sich CYCA und TBP in Herzmuskelgewebe, SDHA und TBP in Skelettmuskelgewebe sowie SDHA und HMBS in Gehirngewebe als die Gentranskripte mit der höchsten Stabilität heraus. Die gewebespezifische Analyse lässt zudem darauf schließen, dass eine der Probenzusammensetzung angepasste Validierung der Kontrollgene sowie der damit einhergehenden Normalisierungstrategie unumgänglich scheint. Um zu gewährleisten, dass Praktikabilität und Verlässlichkeit der Datenanalyse in einem angemessenen Verhältnis stehen, wird in der Literatur die Verwendung von mindestens drei stabilen endogenen Kontrollgenen empfohlen. Für das vorliegende Probenmaterial stellte sich jedoch heraus, dass mindestens vier validierte Kontrollgene benötigt werden, um zuverlässige Genexpressionsdaten generieren zu können.

Die Todesursache sowie der Body Mass Index des Probenspenders wurden als Parameter identifiziert, die Einfluss auf das Transkriptlevel der instabilen Gene 18S rRNA, ACTB, B2M, CYCA, HPRT1 und TBP ausüben. Diese Faktoren sollten daher bei der Probenauswahl stets berücksichtigt werden. Um falschpositive oder falschnegative Transkriptleveländerungen zu vermeiden, wäre es denkbar, nur solche Probenspender in die Analyse einzubeziehen, die sich in der Todesursache und im BMI ähneln.

Bei der Verwendung von postmortalem Gewebe sollten außerdem geringe Änderungen im Transkriptlevel von Zielgenen stets kritisch betrachtet werden, da nicht sicher entschieden werden kann, ob es sich um eine tatsächliche oder um eine scheinbare Änderung handelt, die durch die genannten Faktoren verursacht wurde und nicht mit der eigentlichen Fragestellung korreliert.

## 4.4 Einfluss der RNA-Integrität auf das Ergebnis der quantitativen Analyse

In 4.1 wurde bereits erwähnt, dass es Faktoren gibt, die sich negativ auf die Integrität postmortalen RNA-Proben auswirken können. Darauf basierend sollte in der vorliegenden Teilstudie geprüft werden, welche Folgen eine partielle RNA-Degradierung für die Quantifizierung mittels RT-qPCR hat. Dafür wurde kommerziell bezogene Gesamt-RNA von sehr guter Qualität aus postmortalem Herz- und Skelettmuskel- und aus Gehirngewebe durch Hitzeeinwirkung gezielt degradiert. Daraus resultierten RNA-Proben unterschiedlicher Integritäten. Die generierten Degradierungsstufen wurden schließlich revers transkribiert und die Transkripte von verschiedenen Genen mittels RT-qPCR quantifiziert.

### 4.4.1 RIN und $C_q$ -Verschiebung in RNA-Degradierungslinien

Die Integrität der hithdegradierten RNA-Proben wurde mittels des Agilent Bioanalyzer-Geräts gemessen (siehe 1.5.2 und 2.2.6). Für die Quantifizierung wurden die Gentranskripte von ACTB, B2M, 18S rRNA, GAPDH, HIF-1 $\alpha$ , VEGF und SLC2A1 herangezogen. Jedes dieser Gene nahm in den Teilstudien der vorliegenden Arbeit eine zentrale Rolle ein. Für die Gene ACTB, B2M und 18S rRNA wurde zudem eine gewisse Transkriptinstabilität nachgewiesen (siehe Tabelle 3.2 und 3.3), was einen möglichen Einfluss der RNA-Integrität auf das Ergebnis der Quantifizierung vermuten lässt.

Anders als für die Quantifizierung der übrigen Gentranskripte war eine Verdünnung der cDNA-Proben auf eine Konzentration von 10 ng/ $\mu$ L für die Quantifizierung von 18S rRNA nicht ausreichend. Die  $C_q$ -Werte streuten in großem Umfang und Mehrfachwerte lieferten sehr unterschiedliche Ergebnisse. Eine zusätzliche Verdünnung der cDNA-Proben konnte dieses Problem beheben. Als Ursache kommt die starke Expression des Gentranskripts von 18S rRNA in Betracht.

Durch seine Mitwirkung am Aufbau sowie der enzymatischen Aktivität des Ribosoms trägt die 18S rRNA entscheidend zur Aufrechterhaltung zellulärer Grundfunktionen bei (siehe auch Tabelle 4.1). Zudem macht die ribosomale RNA mit ca. 80-85 % einen Großteil der Gesamt-RNA aus.

Tatsächlich wurde eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der RIN und den ermittelten nichtnormalisierten  $C_q$ -Daten festgestellt, was die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen bestätigt [Durrenberger 2010, Imbeaud 2005, Schroeder 2006, Fleige und Pfaffl 2006]. Die größte gemessene  $C_q$ -Verschiebung ergab sich in der Degradierungslinie von Herz-RNA für das Transkript von 18S rRNA. Sie lag bei 2,60  $C_q$ -Werten, was bei einer gemessenen PCR-Effizienz von 105 % (siehe Tabelle 3.1) einer 7-fachen Änderung der ursprünglichen Targetmenge entsprechen würde. Das heißt, mit dem Assay von 18S rRNA können in einem Probenumfang, der dem vorliegenden ähnelt, minimale n-fache Transkriptlevel-Änderungen (mit  $n < 7$ ) nicht verlässlich detektiert werden, da eine Abgrenzung zwischen degradierungsbedingten Transkriptleveländerungen und einem tatsächlich vorliegenden Unterschied in der Genaktivität nicht möglich ist. Allerdings kann gleichzeitig auch ausgeschlossen werden, dass eine starke, beispielsweise hundertfache Änderung der Transkriptmenge dieses Gens allein durch Degradierung hervorgerufen wird. Bei einer sehr starken n-fachen Änderung muss vielmehr davon ausgegangen werden, dass es sich um eine tatsächliche Änderung der Genaktivität aufgrund eines oder verschiedener äußerer Parameter, z.B. der Todesursache, handelt.

Aus der Quantifizierung des Gentranskripts von ACTB in der Degradierungslinie von Gehirn-RNA wurde eine  $C_q$ -Verschiebung von annähernd 1 errechnet, was bei einer gemessenen PCR-Effizienz von 110 % (siehe Tabelle 3.1) einer zweifachen Änderung der ursprünglichen Targetmenge entspricht. Das heißt, dieses Gen-Assay scheint weniger anfällig für eine partielle Degradierung als 18S rRNA und somit ist für ACTB eine verlässliche Detektion von Transkriptlevelunterschieden bereits bei geringen n-fachen Änderungen möglich.



Die Ergebnisse dieses Experiments lassen vermuten, dass der Einfluss der Integrität gewebe- und assayabhängig ist. Letzteres kann durch das Design des Assays begrenzt werden. Das heißt, binden die Primer an einer Region des RNA-Stranges, der weniger oder kaum von Degradierungsprozessen betroffen ist (zum Beispiel nahe des 5'-Endes bei solchen Transkripten, die eher vom 3'-Ende her degradieren), dann kann unabhängig von einer verminderten Integrität ein verlässliches Abbild des Zielgentranskripts erhalten werden. Abbildung 4.1 gibt eine schematische Übersicht über die Lage der PCR-Assays für sämtliche in der vorliegenden Arbeit relevanten Gene. Demnach binden die Primer entweder an einer mRNA-Sequenz, die sich mittig oder nahe dem 5'-Ende befindet. Unter der Annahme, dass die RNA-Degradierung vieler Transkripte am 3'-Ende beginnt und sich dann in Richtung des 5'-Endes fortsetzt [Meyer 2004], wären die hier verwendeten qPCR-Assays von einer partiellen mRNA-Degradierung nicht oder nur in geringem Maße betroffen.

Neben der Lage des PCR-Assays scheint zudem die Länge des zu amplifizierenden Zieltargets einen Einfluss auf den Erfolg der quantitativen Analyse zu haben [z.B. Hsiao 2001]. Fleige und Pfaffl wiesen in einer Studie von 2006 darauf hin, dass die erfolgreiche Amplifikation von PCR-Produkten mit einer Länge von mehr als 400 bp stark von der RNA-Integrität abhängt. Kürzere PCR-Produkte (70 bis 250 bp) seien dagegen weniger von einer partiellen Degradierung betroffen [Fleige und Pfaffl 2006]. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich mit PCR-Assays einer Länge von 70 bis 187 bp gearbeitet. Nach den Ergebnissen von Fleige et al. wären damit sämtliche in der vorliegenden Arbeit verwendeten qPCR-Assays von einer partiellen mRNA-Degradierung unbetroffen.

Anhand der gezielt degradierten Herz-, Skelettmuskel- und Gehirnproben konnte dennoch ein Einfluss verminderter RNA-Integrität auf das Ergebnis der RT-qPCR festgestellt werden. Dieser wird in Form der jeweils angegebenen  $C_q$ -Verschiebung deutlich. Das Ausmaß der  $C_q$ -Verschiebung variierte von Assay zu Assay und sollte in jedem Fall bei der Interpretation von Genexpressionsdaten Berücksichtigung finden.

Für Genexpressionsstudien, die postmortales Ausgangsmaterial verwenden und demnach mit einer partiellen Degradierung rechnen müssen, sollte daher stets geprüft werden, inwiefern sich eine verminderte Integrität auf die quantitativen Daten auswirkt. Dies kann beispielsweise durch die Analyse von Degradierungsassays geschehen, wie es in dieser Teilstudie beschrieben wurde. Einen ähnlichen Ansatz beschrieben die Arbeitsgruppe um Zhao [Zhao 2006, 2008 und 2009] und Zhu [Zhu 2008], die vergleichbare Assays für die Transkripte der Gene von HIF-1 $\alpha$ , VEGF und GAPDH durchführten. Durch solche Assays kann ermittelt werden, welche Änderungen der Transkriptmenge sich sicher detektieren und von einer degradierungsbedingten Verschiebung der  $C_q$ -Werte klar unterscheiden lassen. Nur so ist es möglich, verlässliche Ergebnisse zu produzieren und wahre Transkriptleveländerungen zu detektieren.

#### 4.4.2 Einfluss der Datennormalisierung auf den Zusammenhang zwischen Integrität und quantitativen Genexpressionsdaten

In der Literatur wird darüber berichtet, dass der Einfluss verminderter RNA-Integrität auf die RT-qPCR-Daten durch Anwendung einer adäquaten Normalisierung verringert werden kann [Fleige 2006, Wittwer 1997]. Anhand eines größeren Probenumfangs wurden daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit die  $C_q$ -Rohdaten der Gentranskripte von ACTB, B2M und 18S rRNA mittels der qBase-Software (siehe 1.8.2 und 2.2.10) gegen die vier in Teilstudie 2 validierten endogenen Kontrollgene (siehe Tabelle 3.3) normalisiert. Tabelle 3.7 fasst die Pearson-Korrelation zwischen nichtnormalisierten  $C_q$ -Daten und den der jeweiligen Probe entsprechenden RIN-Werten zusammen. Sowohl in Herzmuskel, als auch in Gehirngewebe zeichnet sich für die drei untersuchten Gentranskripte (ACTB, B2M und 18S rRNA) mit sinkender RIN ein Trend hin zu einem höheren  $C_q$ -Wert ab. Diese Ergebnisse bestätigen die Resultate von Fleige und Pfaffl [2006], die unter anderem die Genexpression von 18S rRNA und Beta-Aktin in Rindergewebe (z.B. in Lymphknoten, Colon, Caecum, Niere, Labmagen, Netzmagen sowie in weißen Blutzellen) untersuchten und eine deutliche Korrelation der Werte zur Integrität der Proben fanden.

Im hiesigen Untersuchungsgut erwies sich jedoch nur für das Gentranskript von B2M in Herzmuskelgewebe die Pearson-Korrelation zwischen den beiden untersuchten Parametern als statistisch hoch signifikant ( $p < 0,01$ ). Für die Transkripte von ACTB und B2M wurden in den vorliegenden Proben aus Skelettmuskelgewebe mit sinkender RIN ebenso höhere  $C_q$ -Werte beobachtet, die allerdings keine statistisch signifikante Korrelation aufwiesen. Für die übrigen Untersuchungen ergab sich keinerlei Zusammenhang zwischen der Integrität und den erzielten  $C_q$ -Werten. Das heißt, die anhand der Degradierungslinie kommerziell bezogener RNA beobachtete, sehr starke Korrelation zwischen RIN und  $C_q$ -Rohdaten (siehe 4.3.1) spiegelte sich bei den realen Proben nicht oder nur teilweise wieder. Eine mögliche Ursache dafür könnte die heterogene Natur der Proben sein, die von Spendern stammen, die äußerst unterschiedliche Anamnesen aufweisen. Dies kann dazu führen, dass ein möglicherweise bestehender, durch eine verminderte RIN verursachter Effekt durch den starken Einfluss individueller Faktoren (z.B. PMI, Körpergewicht, Todesursache usw.) überlagert und maskiert wird.

Die Berechnung der Pearson-Korrelation zwischen der RNA-Integrität und den CNRQ-Werten, die aus der Normalisierung der  $C_q$ -Rohdaten mittels qBase resultierten, ergab, dass der in postmortalem Herzmuskelgewebe vorgelegene signifikante Zusammenhang zwischen RIN und detektierter B2M-Transkriptmenge nach der Datennormalisierung nicht mehr bestand (siehe Abbildung 3.16). Dies bestätigt die Ergebnisse von Fleige et al. [2006]. Diese Arbeitsgruppe normalisierte die  $C_q$ -Rohdaten von 18S rRNA, Beta-Aktin und IL-1 $\beta$  gegen 28S rRNA. 18S rRNA wurde als Kontrollgen gewählt, da es bei der zuvor durchgeführten gezielten Degradierung den geringsten Effekt im Sinne einer Verminderung der RNA-Integrität zeigte. Die Arbeitsgruppe um Ho-Pun-Cheung et al. [2009] schlug vor, einen Korrektur-Faktor in die Datenanalyse einzubeziehen, um den Einfluss der RIN in degradierten Proben zu korrigieren. Anhand von hitzebehandelten Zellkulturproben untersuchte die Arbeitsgruppe zunächst den Einfluss verminderter Integrität auf die Quantifizierung des relativen Expressionslevels von neun verschiedenen Genen. Daraus lies sich ein Algorithmus ableiten, der für die Normalisierung der Genexpressionsdaten von EGFR-, HER2- und HER3-mRNA in Colon-, Brust- und Rektumkarzinomzelllinien Anwendung fand.

Auf diesem Weg stellte die Arbeitsgruppe Geneexpressionslevelunterschiede fest, die ohne die RIN-basierte Datennormalisierung unentdeckt blieben. Dies ist zwar ein Lösungsansatz, doch besteht dabei die Gefahr der Datenbeschönigung. Basierend auf der Arbeit mit Rindergewebe und Zellkulturproben wiesen andere Autoren darauf hin, dass sämtliche RNA-Extrakte mit einer  $RIN \geq 5$  verlässliche, von einer Degradierung nahezu unbeeinflusste Genexpressionsdaten liefern [Pfaffl 2006]. Weis et al. [2007] legten in ihrer Studie zu postmortalem humanem Gehirngewebe diesbezüglich einen Grenzwert von  $RIN \geq 3,95$  fest. Aus den beiden genannten Arbeiten ist ersichtlich, dass die RNA-Integrität der Proben stets so hoch wie möglich sein sollte. Ist postmortales humanes Autopsiegewebe das Ausgangsmaterial für Genexpressionsstudien, dann ist die Prozessierung einer ausreichend hohen Anzahl von RNA-Extrakten, deren Integrität die eben genannten Grenzwerte erreicht, häufig nicht möglich. Ein Kompromiss, der sich daraus ergibt, könnte die Verwendung von biologischen Replikaten in Ziel- und Kontrollgruppe sein, die zumindest ähnliche RIN-Werte aufweisen. Die verminderte Integrität hätte demnach in sämtlichen Proben einen ähnlichen Einfluss, was die Daten schließlich wieder miteinander vergleichbar machen würde.

### 4.4.3 Resümee der Teilstudie

Die Ergebnisse dieser Teilstudie machen deutlich, dass trotz einer zumeist verminderten RNA-Integrität Genexpressionsstudien an postmortalem Herzmuskel-, Skelettmuskel- und Gehirngewebe realisierbar sein können, sofern die notwendigen Vorarbeiten wie die Validierung geeigneter endogener Kontrollgene sowie die Analyse von Degradierungsassays durchgeführt werden. Vor allem große Änderungen des Expressionslevels zwischen Kontroll- und Zielgruppe können wahrscheinlich verlässlich detektiert werden.

Die RNA-Qualitätskontrolle scheint bei Studien an postmortalem Gewebe eine essentielle Bedeutung zu haben. Sie sollte in jeder Studie, die auf eine Untersuchung von Genexpressionsunterschieden hinzielt, geprüft werden. Neben der Verwendung von RNA mit möglichst hoher Integrität sollte eine RIN von 3,95 (speziell in Gehirngewebe) nicht unterschritten werden. Bei Einhaltung derartiger Grenzen kann davon ausgegangen werden, dass die generierten Genexpressiondaten von einer partiellen Degradierung nahezu unbeeinflusst bleiben und verlässliche Hinweise auf Expressionsunterschiede untersuchter Zielgene liefern.

Grundsätzlich erscheint es bei Genexpressionsstudien an Autopsiegewebe sinnvoll, zunächst ein Degradierungsprofil für den Assay des zu untersuchenden Zielgens anzufertigen. Dadurch soll die Grenze detektiert werden, unter der es degradierungsbedingt unmöglich wird, zu erkennen, ob die gefundenen Expressionsänderungen tatsächlichen biologischen Unterschieden entsprechen oder durch die verminderte RNA-Qualität verursacht wurden.

### 4.5 Einfluss der Normalisierungsstrategie am Beispiel der Expression von HIF-1 $\alpha$ , VEGF und SLC2A1

Der RNA-Pool verändert sich in Reaktion auf die Bedürfnisse der Zelle, d.h. die Menge eines spezifischen mRNA-Transkripts ändert sich als Reaktion auf pathophysiologische Ereignisse. Geht man von einer maximalen Genexpressionsaktivität bis 30 Minuten postmortem aus [Ikematsu 2006], dann ist zu vermuten, dass man aus dem Gewebe einer verstorbenen Person möglicherweise Hinweise über prä- oder perimortal stattgefundene Prozesse erhalten kann [Zhao 2006].

Die vorangestellten Teilstudien dienten der Validierung verschiedener Parameter, die bei Genexpressionsstudien an Autopsiegewebe Beachtung finden sollten. Mit dem Fernziel Kandidatengene für spezifische physiologische und pathologische Vorgänge zu detektieren, sollte in einem ersten Ansatz das Expressionslevel spezifischer Gene (HIF-1 $\alpha$ , VEGF und SLC2A1) untersucht werden, deren Anpassung an einen Sauerstoffmangel im Gewebe bereits beschrieben wurde [Jiang 1996, Ozaki 1999, Zhao 2006, 2008 und 2009; Zhu 2008]. Als Ausgangsmaterial wurde in der vorliegenden Teilstudie postmortales Herzmuskel-, Skelettmuskel- und Gehirngewebe verwendet. Als Zielgruppe dienten Probenspender, deren Tod mit einem hypoxischen Zustand einhergegangen war. Als Kontrollgruppe wurden Individuen herangezogen, deren Agonie vor dem Versterben von sehr kurzer Dauer war. Theoretisch sind in diesem Fall keine bzw. nur minimale Reaktionen auf den stets mit einem Sterbeprozess einhergehenden Sauerstoffmangel zu erwarten.

Die Arbeitsgruppen um Zhao und Zhu et al., die den Einfluss der Hypoxie auf das Transkriptlevel von u.a. HIF-1 $\alpha$ , VEGF und SLC2A1 in Nieren-, Lungen-, Herzmuskel- und Skelettmuskelgewebe (*M. sartorius*) untersuchten, erstellten jeweils ein Degradierungsassay für HIF-1 $\alpha$ , VEGF und GAPDH. Da GAPDH ein Degradierungsmuster zeigte, das jenem von HIF-1 $\alpha$  und VEGF ähnelte, wurde GAPDH als endogenes Referenzgen für die Normalisierung der detektierten Genexpressionsdaten herangezogen [Zhao 2006, 2008 und 2009; Zhu 2008].

Das Gentranskript von GAPDH kodiert das Enzym Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase. Dieses erfüllt im Prozess der Glykolyse eine essentielle enzymatische Funktion, welche mit dem Abbau von Monosacchariden (z.B. Glukose) dem Ziel der Gewinnung von Adenosintriphosphat (ATP) dient [Stryer 1996]. Im Speziellen katalysiert GAPDH die Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-phosphat in 1,3-bisphosphoglycerat (siehe Abbildung 4.2) [Higashimura 2011].

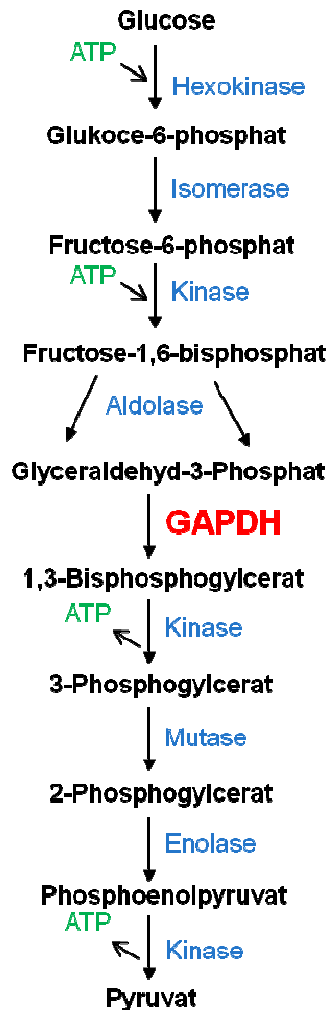


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung des Ablaufs der Glykolyse [nach Stryer 1996]. Das für die jeweilige Reaktion benötigte Enzym ist blau angegeben. Eingesetzte oder produzierte Energie (ATP) ist grün markiert. Eine Aldolase spaltet das Fructose-1,6-bisphosphat in Glyceraldehyd-3-phosphat und Dihydroxyacetonphosphat (in der Abbildung nicht gezeigt). Letzteres kann leicht in Glyceraldehyd-3-phosphat isomerisiert werden. Das Enzym GAPDH (Glyceraldehyd-3-dehydrogenase) katalysiert die Umwandlung der beiden resultierenden Glyceraldehyd-3-phosphate in zwei 1,3-bisphosphoglycerate. Insgesamt betrachtet werden im Prozess der Glykolyse zwei Moleküle ATP (Adenosintriphosphat) gewonnen (2 verbraucht, 4 gewonnen).

Neben seiner Funktion in der Glykolyse wurde inzwischen darüber berichtet, dass GAPDH des Weiteren an verschiedensten physiologischen und pathophysiologischen Prozessen, wie z.B. dem nukleären tRNA-Transport, der Apoptose, der DNA-Replikation sowie am vesikulären Transport oder an Membranfusionen beteiligt ist [Higashimura 2011, Sirover 1999, Harada 2007, Yamaji 2005]]. Es wird zudem angenommen, dass HIF-1 $\alpha$  im Fall einer mangelhaften Sauerstoffversorgung in der Zelle u.a. die gesteigerte Expression des Glukose-Transporters 1 (GLUT1), der Glukose oder strukturähnliche Kohlenhydrate aus dem Blutkreislauf über die Membranbarriere transportiert, induziert [Yamaji 2003]. Das heißt, die hypoxieinduzierte Signalkaskade würde neben anderen Zielgenen, wie z.B. HIF-1 $\alpha$ , VEGF und SLC2A1 auch weitere Gene, wie GAPDH erreichen [Foldager 2009, Higashimura 2011]. Die Beobachtung einer erhöhten Expression des Gentranskripts von GAPDH in verschiedenen Tumoren [z.B. Kim 1998, Revillion 2000, Higashimura 2011] untermauert diese Annahme, da Tumoren, die durch rasches Wachstum nur ungenügend von Blutgefäßen durchsetzt sind, einer mangelhaften Sauerstoffversorgung unterliegen [Knowles 2001]. GAPDH würde demnach bei Hypoxie eine Co-Regulation erfahren. Seine Verwendung als Kontrollgen würde folglich ungeeignet erscheinen. Im Widerspruch dazu stehen Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Tan [2012]. Mit dem Fernziel zukünftig die Genexpression nach Herzinfarkt zu untersuchen, wurden in dieser aktuellen Arbeit sechs Kontrollgene hinsichtlich deren Transkriptstabilität validiert. Anhand von Herzstammzellen, die Versuchsratten entnommen wurden, konnte die Stabilität der Transkripte von GAPDH und ACTB nach Sauerstoffmangel aufgezeigt werden [Tan 2012]. Diese konträren Ergebnisse bekräftigen die Bedeutung der Validierung von Kontrollgenen entsprechend des jeweiligen Probenguts. Kontrollgene, die sich in einem Versuchsmodell als stabil erweisen, können sich in einer anderen Probenzusammenstellung als ungeeignet erweisen [Foldager 2009]. Vandesompele et al. und andere Autoren heben zudem die besondere Bedeutung der Verwendung mehrerer validierter stabiler Kontrollgene für die Generierung verlässlicher Genexpressionsdaten hervor [Vandesompele 2002, Preece 2003; Huggett 2005].



### 4.5.1 Vier versus eins: Die Folgen der gewählten Normalisierungsstrategie

Neben der Untersuchung einer hypoxiebedingten Transkriptleveländerung sollte in der vorliegenden Teilstudie geprüft werden, inwiefern sich die gewählte Normalisierungsstrategie auf das Ergebnis der Genexpressionsstudie auswirkt. Die Normalisierung der Genexpressionsdaten gegen ein einzelnes Kontrollgen (GAPDH) wurde dafür der Normalisierung gegen ein Set von vier validierten endogenen Kontrollgenen (HMBS, UBC, SDHA und B2M) gegenübergestellt. Zudem sollte überprüft werden, welche Änderung das Transkriptlevel der Zielgene erfährt, wenn das gewählte einzige Kontrollgen (GAPDH) im Probenumfang keine Stabilität aufweist, sondern einer vermutlich todesursachenbedingten Co-Regulation unterliegt.

Die Untersuchung des Expressionsmusters spezifischer Gene lässt auf ein wachsendes Verständnis komplexer regulatorischer Zusammenhänge in der Zelle hoffen [Zhao 2008]. Gegenstand von Studien zur Genexpression greifen häufig auf Zellkulturen oder Tiermodelle zurück [z.B. Ikematsu 2006, Takahashi 2009, Wansbury 2011, Elstner 2011, Mori 2011, Brennand 2011]. Zudem gewinnen Untersuchungen an postmortalem Humangewebe zunehmend an Bedeutung [z.B. Wierschke 2010, Partemi 2010, Bernard 2011].

In Abschnitt 4.1 wurde bereits diskutiert, dass der Validierung der einzelnen experimentellen Schritte (Beurteilung von RNA-Quantität, Reinheit und Integrität, Primerauswahl für die reverse Transkription sowie Assayauswahl für die quantitative Real-Time PCR) bei Genexpressionsanalysen besondere Aufmerksamkeit beigemessen werden sollte. Die unvermeidbaren Variablen im experimentellen Ablauf fordern zudem eine geeignete Normalisierung der mittels quantitativer Real-Time PCR gewonnenen Daten. Nur eine dem Probenumfang angepasste und auf ihre Verlässlichkeit geprüfte Normalisierungsstrategie erlaubt die zuverlässige Analyse und Interpretation der gewonnenen Ergebnisse (siehe 1.6 und 1.8).

Sowohl der 2001 von Livak et al. beschriebene  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ -Algorithmus [Livak 2001], der zur Datennormalisierung ein einzelnes Kontrollgen verwendet, als auch die 2002 von Vandesompele et al. vorgestellte Strategie zur Validierung endogener Kontrollgene, die auf mehreren stabilen Kontrollgenen basiert [Vandesompele 2002] (siehe 1.8) arbeitet nach einem ähnlichen Grundprinzip. In Bezug auf das eigene Untersuchungsgut erschien es daher interessant, welche Folgen die Zahl der gewählten Kontrollgene auf das Endergebnis einer Genexpressionsstudie hat. Dafür wurde das Expressionslevel der Gene HIF-1 $\alpha$ , VEGF und SLC2A1 ermittelt.

### Ergebnisse nach Normalisierung gegen HMBS, UBC, SDHA und B2M

Wurden die Ergebnisse der RT-qPCR gegen die am Untersuchungsgut validierten, stabilen endogenen Kontrollgene HMBS, UBC, SDHA und B2M (siehe 3.2 und Tabelle 3.2) mittels qBase normalisiert und gegen die Ergebnisse der Kontrollgruppe kalibriert, dann zeigte jedes der drei untersuchten Zielgene (HIF-1 $\alpha$ , VEGF und SLC2A1) in Herzmuskel-, Skelettmuskel- und Gehirngewebe von Probenspendern, die an Erstickten oder an einem plötzlichen Herztod verstorben waren, einen Trend hin zu einer erhöhten Expression nach Sauerstoffmangel (siehe Abbildung 3.17 A, B, C). Dies steht in Einklang mit Ergebnissen von Zhao et al., der in postmortalem Nieren- und -Skelettmuskelgewebe eine erhöhte Expression von VEGF nach einem Tod durch Erstickten [Zhao 2006 und 2008] sowie in postmortalem Skelettmuskelgewebe (*M. sartorius*) nach einem Tod durch akuten Myokardinfarkt beobachtete [Zhao 2008]. Weiterhin bestätigt dies die Ergebnisse von Zhu et al., der in postmortalem Herzmuskelgewebe eine gesteigerte Expression von HIF-1 $\alpha$  und VEGF nach einem plötzlichen Herztod fand [Zhu 2008].

Bezogen auf den in Abbildung 3.17 als schwarze Linie gekennzeichneten Median der CNRQ-Werte von HIF-1 $\alpha$ , VEGF und SLC2A1 wurden relativ zur Kontrollgruppe zwei- bis sechsfache Transkriptleveländerungen detektiert (Abbildung 8.4). Analog zu der in den Tabellen 3.4 bis 3.6 angegebenen gewebespezifischen und integritätsabhängigen  $C_q$ -Verschiebungen von HIF-1 $\alpha$ , VEGF und SLC2A1 erlauben die in der vorliegenden Teilstudie verwendeten PCR-Assays jedoch keine verlässliche Detektion von zweifachen Transkriptleveländerungen. Das bedeutet, solch geringe Transkriptleveländerungen müssen mit Vorsicht betrachtet werden, da sie derzeit nicht sicher von einer Transkriptleveländerung durch Degradierung zu unterscheiden sind. Möglicherweise würde sich durch weitere Untersuchungen an einem größeren Probenumfang der bisher erkennbare Trend hin zu einer Transkriptlevelerhöhung deutlicher abzeichnen und die assaybedingte Detektionsgrenze überschreiten.

Weiterhin ist aus den Box-Plot-Darstellungen in den Abbildungen 3.17 und 8.4 erkennbar, dass die CNRQ-Werte der Proben erheblich streuen. Dies war besonders bei Proben aus Skelettmuskel nach plötzlichem Herztod sowie bei Proben aus Gehirngewebe nach einem Tod durch Ersticken der Fall. Eine mögliche Erklärung dafür könnte in der Zusammensetzung des Probenmaterials liegen. Es ist denkbar, dass die Probenspender nach strikteren Kriterien ausgewählt werden müssen, um eine größere Homogenität des Probenguts zu gewährleisten.

### Detektion eines möglichen Kandidatengens zur Unterscheidung zweier Todesursachen

Nach der Datennormalisierung gegen vier validierte Kontrollgene erwies sich das Gentranskript von VEGF nach einem plötzlichen Herztod im Herzmuskel als statistisch signifikant stärker exprimiert als in den Herzmuskelproben der Kontrollgruppe. Nach einem Versterben durch Erstickten wurde ein solcher Zusammenhang nicht beobachtet. Dies lässt vermuten, dass VEGF als mögliches Kandidatengens zur Unterscheidung zwischen den genannten Todesursachen herangezogen werden könnte. Um diese Befunde zu untermauern wäre eine Untersuchung an einer unabhängigen Kohorte in Zukunft wünschenswert.

### Ergebnisse nach Normalisierung gegen GAPDH mittels der $2^{-\Delta\Delta Cq}$ -Methode

Wurden die Ergebnisse der RT-qPCR mittels der  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ -Methode nur gegen GAPDH normalisiert und ebenso gegen die Ergebnisse der Kontrollgruppe kalibriert, dann zeigte HIF-1 $\alpha$  in postmortalem Herzmuskel-, Skelettmuskel- und Gehirngewebe nach plötzlichem Herztod einen Trend hin zu einer erniedrigten Expression (siehe Abbildung 3.19 A, B, C). Analoge Ergebnisse wurden für VEGF in postmortalem Herzmuskelgewebe sowie für SLC2A1 in postmortalem Skelettmuskelgewebe ermittelt.

Einerseits bestätigt dies die Befunde von Zhu et al., die eine erniedrigte Expression von VEGF in postmortalem Humanherzmuskel nach einem Tod durch Ertrinken beschrieben, [Zhu 2008] sowie die Ergebnisse von Zhao et al., denen zufolge sich eine erniedrigte Expression von VEGF nach einem Tod durch Erhängen abzeichnete [Zhao 2006]. Auch waren im eigenen Untersuchungsgut Individuen vertreten, die an Erhängen oder Ertrinken verstorben waren (siehe auch 3.4 / Probencharakterisierung). Andererseits steht dies im Gegensatz zu den Ergebnissen, die am selben Probenmaterial jedoch mit einer alternativen Normalisierungsmethode (Normalisierung gegen HMBS, UBC, SDHA und B2M mittels qBase) generiert wurden.

Als mögliche Ursache für diese scheinbare Diskrepanz kann eine hypoxiebedingt stattfindende Co-Regulation von GAPDH angenommen werden (Abbildung 4.3).

Auswirkung der Co-Regulation von GAPDH auf das Ergebnis der Genexpressionsdaten

Wird das Transkript von GAPDH im hypoxischen Zustand co-reguliert und somit zu einer gesteigerten Expression angeregt, dann kann die Normalisierung eines Zielgens wie HIF-1 $\alpha$  gegen GAPDH mittels des  $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -Algorithmus eine scheinbare Transkriptlevelerniedrigung des Zielgens vortäuschen, was eine Erklärung für die diskrepanten Befunde geben könnte (Abbildung 4.3).

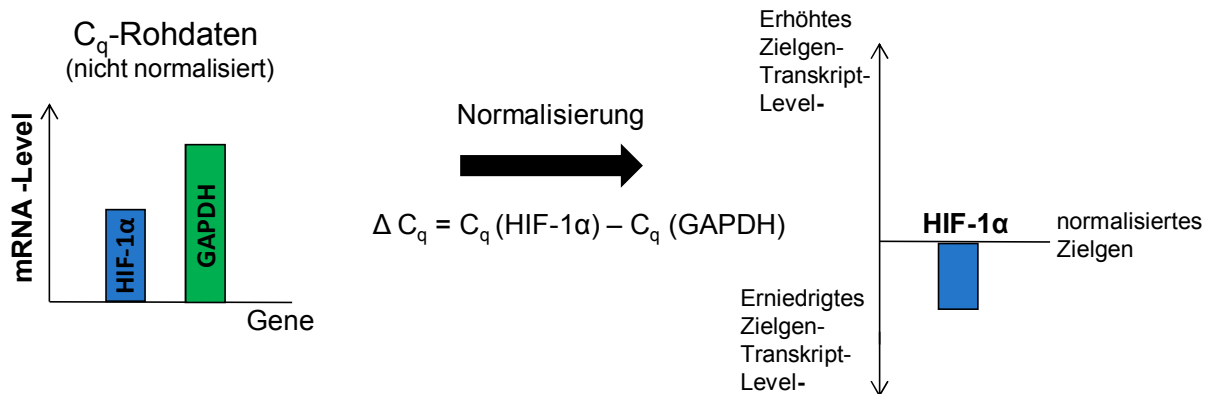


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung einer Datennormalisierung mittels des  $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -Algorithmus. GAPDH dient als Kontrollgen. HIF-1 $\alpha$  stellt das Zielgen dar. Wird das Transkript von GAPDH im hypoxischen Zustand zu einer gesteigerte Expression angeregt, dann kann die Normalisierung des Zielgens HIF-1 $\alpha$  gegen GAPDH eine möglicherweise fehlerhafte Transkriptlevel-Erniedrigung anzeigen.

Um die Vermutung einer todesursachenbedingten Co-Regulation der Expression von GAPDH weiter zu untersuchen, wurde zusätzlich die Transkriptstabilität der in der vorliegenden Teilstudie verwendeten endogenen Kontrollen (GAPDH, HMBS, UBC, SDHA und UBC) erneut überprüft (Abbildung 3.19).

### Transkriptstabilität von GAPDH, HMBS, UBC, SDHA und B2M

Für die Analyse der Transkriptstabilität von GAPDH, HMBS, UBC, SDHA und B2M wurden die  $C_q$ -Rohdaten sämtlicher an der Teilstudie beteiligter Proben in die geNorm-Software importiert. Wie aus Abbildung 3.19 ersichtlich, erwies sich das Transkript von GAPDH als instabiler als die Transkripte von HMBS, UBC, SDHA oder B2M. Eine mögliche Co-Regulation von GAPDH kann aus diesem Grund nicht ausgeschlossen werden. Bei der gegebenen Fragestellung scheint GAPDH daher als Kontrollgen für die Normalisierung von Genexpressionsdaten nicht geeignet. Außerdem scheinen die Ergebnisse, die durch die Normalisierung der Expressionsdaten von HIF-1 $\alpha$ , VEGF und SLC2A1 mittels der  $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -Methode und GAPDH gewonnen wurden, fraglich. Vielmehr kann davon ausgegangen werden, dass ein todesursachenbedingter, stark hypoxischer Zustand von einer Erhöhung des Transkriptlevels der untersuchten Zielgene gefolgt wird, wie es die Datennormalisierung gegen vier validierte stabile Kontrollgene zeigte bzw. wie es auch in anderen Studien über die Rolle dieser Gene in der zellulären Antwort auf einen Sauerstoffstress beschrieben wurde (siehe auch 1.9).

### 4.5.1 Resümee der Teilstudie

Anhand eines Probenguts aus postmortalem Herzmuskel-, Skelettmuskel- und Gehirngewebe untersuchte die vorliegende Teilstudie den Einfluss der Normalisierungsstrategie auf das Transkriptlevel von HIF-1 $\alpha$ , VEGF und SLC2A1. Zur Zielgruppe gehörten Proben von Individuen, deren Tod von einem hypoxischen Zustand begleitet wurde (Ersticken, plötzlicher Herztod). Proben von Individuen, deren Todesursache eine sehr kurze Agoniedauer vermuten lässt, dienten als Kontrollgruppe, da hierbei keine oder nur minimale Reaktionen auf Sauerstoffmangel im Rahmen jedes Sterbeprozesses zu erwarten sind.

Die Normalisierung der aus der quantitativen Real-Time PCR hervorgegangenen Rohdaten gegen vier validierte, stabile endogene Kontrollgene (HMBS, UBC, SDHA oder B2M) mittels qBase lieferte Hinweise auf eine mögliche Transkriptlevelerhöhung der untersuchten Zielgene im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Datenanalyse mittels des  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ -Algorithmus sowie des Kontrollgens GAPDH deutete im vorliegenden Probenumfang hingegen eine abnehmende Expression der Zielgene an.

Als mögliche Ursache für die gegensätzlichen Ergebnisse kann die im Untersuchungsgut nachgewiesene Transkriptinstabilität von GAPDH infolge einer todesursachenbedingten GAPDH-Co-Regulation vermutet werden. Demnach scheint das Ergebnis, das aus der Datennormalisierung gegen ein Set von vier stabilen endogenen Kontrollen hervorging, verlässlicher und realistischer, als das Ergebnis, das die Normalisierung gegen ein einzelnes, instabiles Kontrollgen lieferte. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die Expression von HIF-1 $\alpha$ , VEGF und SLC2A1 nach einem stark hypoxischen Zustand ansteigt. Das Gentranskript von GAPDH ist bei der konkreten Fragestellung als Kontrollgen nicht zu empfehlen, weil es scheinbar eine Transkriptlevelerniedrigung vortäuscht.

Die vorliegende Teilstudie sollte einen ersten exemplarischen Ansatz für eine gezielte Genexpressionsanalyse darstellen. Es konnte gezeigt werden, dass die Wahl der Normalisierungsstrategie entscheidenden Einfluss auf die Dateninterpretation ausüben kann. Die Verwendung von mehreren validierten Kontrollgenen scheint adäquat, da die Kontrollgene in ihrer Gesamtheit eine höhere Stabilität aufweisen als ein einzelnes Kontrollgen sowie die zu untersuchenden Zielgene. Zudem lieferte die Analyse Hinweise darauf, dass VEGF als mögliches Kandidatengen zur Unterscheidung des Versterbens durch Ersticken bzw. durch einen plötzlichen Herztod Anwendung finden könnte. Durch eine Erweiterung des Probenumfangs könnten zukünftige Studien die statistische Aussagekraft der Ergebnisse erhöhen und die Identifizierung von weiteren Kandidatengenen ermöglichen.



## 5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, inwieweit quantitative Genexpressionsstudien an postmortalen humanen Proben mit erhöhtem Postmortalintervall und somit möglicherweise verminderter RNA-Integrität realisierbar sind und in Zukunft als zusätzliches diagnostisches Werkzeug zur Determinierung der Todesursache im forensischen Kontext herangezogen werden können. Dafür wurden in mehreren Teilstudien Faktoren untersucht, die die Verlässlichkeit quantitativer Genexpressionsdaten beeinflussen können.

Es konnte zunächst für postmortales Skelettmuskelgewebe festgestellt werden, dass Verstorbene mit erhöhtem BMI statistisch signifikant niedrigere RIN-Werte aufweisen als normalgewichtige Personen. Zudem wurde eine Korrelation zwischen dem Gewebetyp und der Integrität der daraus extrahierten RNA gefunden. Unter Anwendung der in dieser Arbeit gewählten Extraktionsmethode scheint postmortales Skelettmuskelgewebe für Genexpressionsstudien an Autopsiematerial besonders geeignet. Dagegen wurde im vorliegenden Probengut kein Zusammenhang zwischen verminderter RNA-Integrität und Parametern wie Geschlecht, PMI, Sterbealter, Dauer der Agonie und Todesursache gefunden.

In einer weiteren Teilstudie wurde anhand von postmortalem Herzmuskel-, Skelettmuskel- und Gehirngewebe aus einer Auswahl von zehn funktionell verschiedenen endogenen Kontrollgenen HMBS, UBC, SDHA und TBP als die Gene mit der größten postmortalen Transkriptstabilität identifiziert. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von vier stabilen endogenen Kontrollen am untersuchten Probenmaterial eine verlässliche Datennormalisierung erlaubt. Die validierten Kontrollgene können auch zukünftig für quantitative Genexpressionsstudien eingesetzt werden, solange die untersuchte Probenzusammensetzung der hier vorgestellten ähnelt. Für die Todesursache sowie für den Body Mass Index des Probenspenders wurde in der vorliegenden Arbeit ein statistisch signifikanter Einfluss auf das Expressionslevel instabiler Gene festgestellt. Diese Parameter sind daher geeignet, die gefundenen Instabilitäten möglicher Kontrollgene zu erklären.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen des Weiteren darauf schließen, dass das Erstellen von Degradierungslinien aus kommerziell erhältlicher RNA für jedes verwendete qPCR-Assay ein wichtiges Instrument der Qualitätsprüfung ist. Mit der Degradierungslinie kann die Detektionsgrenze des verwendeten qPCR-Assays validiert werden kann. Nur so ist die Festlegung des Bereichs möglich, in dem ein verändertes Expressionslevel tatsächlich mit dem Einfluss eines spezifischen Parameters in Verbindung gebracht werden kann und klar von einer nur scheinbaren Genexpressionsänderung unterscheidbar ist, die durch eine Degradierung der Probe vorgetäuscht wird. Zudem scheint es praktikabel, in zukünftigen Studien nur Proben mit ähnlichen Integritäten miteinander zu vergleichen.

Pathologische Prozesse im menschlichen Körper, auch solche, die die Funktion von Organen sowie die Morphologie betreffen, sind hoch komplex und können interindividuell variieren, weshalb die Genexpression im forensischen Kontext ergänzende Hinweise auf die Diagnose liefern könnte. Als erstes anwendungsbezogenes Beispiel wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Hypoxie auf das Transkriptlevel von HIF-1 $\alpha$ , VEGF und SLC2A1 untersucht. Bei Normalisierung der Daten gegen vier stabile Kontrollgene ergaben sich anhand der untersuchten Gewebeproben Hinweise auf eine todesursachenbezogene Hochregulierung der drei Zielgene. Die Studie unterstrich die besondere Bedeutung der gewählten Normalisierungsstrategie. Wurden die Daten nur gegen GAPDH als einzelnes, nicht validiertes Kontrollgen normalisiert, deuteten die Ergebnisse eine überraschende Herunterregulierung der Zielgene an. Als mögliche Ursache für diese scheinbare Diskrepanz kommt die im weiteren Verlauf dieser Studie nachgewiesene Instabilität infolge einer Co-Regulation von GAPDH unter hypoxischen Bedingungen in Betracht.

Mit dem Fernziel postmortale Genexpressionsstudien als zusätzliches Instrument in der forensischen Todesursachenbestimmung einzusetzen, schafft die vorliegende Arbeit durch die Einführung von validierten Kontrollgenen sowie durch die Analyse weiterer Einflussnehmender Faktoren eine Basis für die verlässliche Durchführung künftiger Genexpressionsstudien an humanem Autopsiegewebe.

## 6 Summary

Using quantitative gene expression studies could form a valuable innovative tool for the determination of the cause of death in forensic pathologies. Thus, the present work focuses on the questions around the possibilities and limitations of gene expression analysis in postmortem human tissue from donors with prolonged postmortem interval (PMI) and probably decreased RNA integrity. Therefore several parameters influencing the reliability of quantitative gene expression data were examined.

First, it was found that in postmortem skeletal muscle deceased with an increased body mass index (BMI) reveal decreased RIN values compared to normal weight donors. Moreover, a correlation was found between the type of tissue and the integrity of RNA that was isolated from it. When extracting RNA as presented in this work, postmortem skeletal muscle tissue showed the overall highest RIN values and seems to be best suited for gene expression studies using autopsy material. Using the presented sample set no correlation was found between RNA integrity and parameters like gender, PMI, age at death, duration of agony and cause of death.

Second, using postmortem cardiac muscle, skeletal muscle and brain tissue the stability of ten endogenous control genes with different functionality was assessed and HMBS, UBC, SDHA and TBP were identified as genes of high transcript stability. Furthermore, it was shown that four stable endogenous control genes seem to be adequate for a reliable data normalisation. Thus, the four validated control genes mentioned may be used in future quantitative gene expression studies if sample composition is similar to the one presented in this work. Donors cause of death and body mass index were found to significantly influence the expression level of instable genes. Thus, these parameters may be adducted to explain the instability found in some of the assessed potential reference genes.

Third, identifying the limit of detection due to degradation processes was found to be an important quality control test for every qPCR assay used. The results of this work confirm the importance of analyzing degradation lines of commercially available RNAs.

This information allows the correct interpretation of gene expression levels and an identification of apparent changes in transcript abundances which are the result of degradation rather than biological processes. Finally, it was found that even though it is not always possible to collect only samples with high RIN values, it seems to be workable to use RNA samples of similar integrities in future gene expression studies.

Fourth, pathological processes in the human body affecting the function of organs as well as their morphology show high complexity and may vary between individuals. Therefore, analysis of the gene expression status at the time point of death might give valuable hints about donors' forensically relevant diagnose. Examining the impact of hypoxia on expression levels of HIF-1 $\alpha$ , VEGF and SLC2A1 was conducted as a first example. Normalising data against four stable reference genes gave hints to an increased gene expression in donors who died of a hypoxia associated cause of death compared to the control group. Moreover, this study confirmed the particular importance of the elected normalisation strategy. Surprisingly, the four genes of interest suggested a decrease in gene expression after its normalisation against GAPDH as a single nonvalidated control gene. A possible reason for this discrepancy may be found in the apparent instability and the co-regulation of GAPDH under hypoxic conditions.

To summarize, the presentation of validated control genes as well as the analysis of parameters affecting RNA integrity and quantitative gene expression data provide a basis for the reliable performance of future gene expression studies using human autopsy samples. This raises hope for the successful implementation of postmortem gene expression studies as additional tool in forensic pathology to assist the determination of somebody's cause of death.

## 7 Verzeichnis der wissenschaftlichen Veröffentlichungen

Heinrich M, **Koppelkamm A** (2009) RNA profiling: Ein neues Feld in der Forensischen Genetik. Rechtsmedizin – Festschrift für Prof. Dr. med. Drs. H. c. Stefan Pollak zum 60. Geburtstag (Hrsg. Michael Bohnert). Schmidt-Römhild Verlag Lübeck, 145-165

**Koppelkamm A**, Vennemann B, Fracasso T, Lutz-Bonengel S, Schmidt U, Heinrich M (2010) Validation of adequate endogenous reference genes for the normalisation of qPCR gene expression data in human post mortem tissue. Int J Legal Med. 124(5): 371-80

Vennemann M, **Koppelkamm A** (2010) mRNA profiling in forensic genetics I: Possibilities and limitations. Forensic Sci Int. 203(1-3): 71-75

Vennemann M, **Koppelkamm A** (2010) Postmortem mRNA profiling II: Practical considerations. Forensic Sci Int. 203(1-3): 76-82

**Koppelkamm A**, Vennemann B, Lutz-Bonengel S, Fracasso T, Vennemann M (2011) RNA integrity in post-mortem samples: influencing parameters and implications on RT-qPCR assays. Int J Legal Med. 125(4): 573-580

## 8 Anhang

### 8.1 Datenerhebungsbogen

Gewebeproben zur RNA-Gewinnung: Datenerhebungsbogen		12/2007	
		<input type="checkbox"/> FR	<input type="checkbox"/> MS <input type="checkbox"/> Hel
<b>Obduktion</b>	Nr:	Obduzent:	
Datum:	Beginn:	Uhr	Ende: Uhr
<input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> W Alter:	Größe:	cm	Gewicht: kg
Todesursache:			
Agoniezeit:	<input type="checkbox"/> Ultrakurz (< 1 min)	<input type="checkbox"/> Minuten	<input type="checkbox"/> Stunden
wesentl. Befunde:			
andere Vorerkrankungen: <input type="checkbox"/> keine <input type="checkbox"/> erheblich			
<b>Todesumstände/Bedingungen vor Obduktion</b>			
<b>todesurs. äußeres Ereignis?</b>	<input type="checkbox"/> Verkehrsunfall	<input type="checkbox"/> Brand	<input type="checkbox"/> Suizid:
<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> Intoxikation	<input type="checkbox"/> BTM	<input type="checkbox"/> anderes:
am: um: Uhr	<input type="checkbox"/> Körperverletzung/Tötung		
<b>Todesertritt-feststellung am: um: Uhr</b>			
<input type="checkbox"/> Notarzt <input type="checkbox"/> vor Ort	<input type="checkbox"/> Wohnung	<input type="checkbox"/> Pflegeheim	<input type="checkbox"/> Intensivstation
<input type="checkbox"/> Transport <input type="checkbox"/> Krankenhaus	<input type="checkbox"/> draußen	<input type="checkbox"/> anderes:	
<b>Liegebedingungen vor Obduktion</b>			
<input type="checkbox"/> Kriminaltechnische Maßnahmen vor Ort		<input type="checkbox"/> Obduktion unmittelbar durchgeführt	
Rektaltemp./Uhrzeit:		<input type="checkbox"/> Kühlhauslagerung vor Obduktion, Beginn:	
Umgebungstemp./Uhrzeit:			
<b>Umgebungsbedingungen vor Ort / vor Kühlhauslagerung:</b>			
Temperatur: ca. °C	<input type="checkbox"/> draußen	<input type="checkbox"/> Wohnung	<input type="checkbox"/> Krankenhaus
Liegezeit vor Kühlhauslagerung: ca. Std.			
Bekleidung: <input type="checkbox"/> keine <input type="checkbox"/> dünn (sommerlich) <input type="checkbox"/> dick (Pullover/Jacke) <input type="checkbox"/> sehr dick (winterlich)			
Bedeckung: <input type="checkbox"/> keine <input type="checkbox"/> dünn <input type="checkbox"/> dick :			
<input type="checkbox"/> sonstige Isolierung od. Wärmequellen:			
Bitte drei Gewebeproben je Individuum erheben (intaktes, makroskopisch unauffälliges Gewebe):			
1 Herz: Arbeitsmyokard linker Ventrikel, Hinterwand			
2 M. iliopsoas			
3 Gehirn: Großhirn frontal/frontobasal			
Bitte zügig arbeiten und die Gewebeprobe direkt nach Exenteration des Organs entnehmen. Bitte jeweils einen max. 0,5 cm breiten, etwa 2-3 cm langen Streifen schneiden und <u>sofort</u> in RNAWasser überführen. Bitte die Röhrchen mit LOP und Gewebe beschriften. VIELEN DANK!			
Ausschlusskriterien: Lebensalter: < 18 Jahre			
Postmortalintervall: > 50 Std.			
Makroskopische Fäulniszeichen: z. B. Grünfärbung der Haut im rg. Unterbauch/peitumbilical			

Abbildung 8.1: Exemplar eines Datenerhebungsbogens, der für jedes Individuum, von dem Probenmaterial entnommen werden konnte, ausgefüllt wurde.

## 8.2 Individuen Übersicht

Tabelle 8.1: Übersicht Individuen 1. Eine Zusammenstellung der im Datenbogen dokumentierten Informationen. Der Spalte „Teilstudie“ ist zu entnehmen, welche Proben in jeder Teilstudie analysiert wurden (1 – siehe 3.2; 2 – siehe 3.1; 3 – siehe 3.4)

Sektionsnummer	Todesursache	Todesumstände	Agoniezeit	PMI (h)	Teilstudie
FR 446/07	Zentrale Dysregulation	Kopfdurchschuss (Suizid)	< 1 min	42	1/2/3
FR 453/07	Zentrale Dysregulation	Polytrauma (Verkehrsunfall)	< 1 min	30	1/2/3
FR 479/07	Ersticken	Sturz aus großer Höhe, Blutaspiration	min	12	1/2/3
MS 277/07	Pneumonie	Aspirationspneumonie	h	6	1/2
MS 284/07	Herzinfarkt	natürlicher Tod	min	37	1/2/3
MS 287/07	zentrale Dysregulation	SHT, Treppensturz	min/h	24	1/2
MS 235/07	Plötzlicher Herztod	natürlicher Tod	min	16	1/2
MS 217/07	Plötzlicher Herztod	natürlicher Tod	min	16	1/2
MS 261/07	Zentralen Dysregulation	Fraktur 3. HW, Treppensturz	min/h	5	1/2
MS 234/07	Herzinfarkt	natürlicher Tod	min	20	1/2/3
MS 260/07	Verbluten	Sturz aus großer Höhe/ Aortenruptur	< 1 min	12	1/2/3
MS 213/07	Verbluten	Polytrauma Aortenruptur (Verkehrsunfall)	< 1 min	39	1/2/3
MS 197/07	Zentrale Dysregulation	Kopfschuss	min	28	1/2
MS 152/07	Herzinfarkt	natürlicher Tod	min	10	1/2/3
FR 200/07	Ersticken/Luftembolie	Blutaspiration, SHT, Arbeitsunfall	min	14	1/2
MS 92/07	Ersticken	Erhängen	min	5	1/2/3
MS 184/07	Herzinfarkt	natürlicher Tod	min	41	1/2/3
MS 230/07	Ersticken	Erhängen	min	20	1/2/3
FR 56/07	Verbluten	singulärer Bruststich	min	18	1/2
FR 205/07	Verbluten	Stichverletzung Hals	min	38	1/2
MS 263/07	Zentrale Dysregulation	BTM-Intoxikation	min/h	11	1/2
MS 111/07	Herzinfarkt	natürlicher Tod	min	42	1/2/3
MS 150/07	Intoxikation	Rauchgasintox 47% COHb (Brand)	min	22	1/2
MS 128/07	Verbluten	Stichverletzung Hals	min	6	1/2
MS 122/07	Herzinfarkt	natürlicher Tod	min	19	1/2/3
MS 233/07	zentrale Dysregulation/Ersticken	SHT / Blutaspiration	min	21	1/2
MS 258/07	zentrale Dysregulation	Subarachnoidalblutung	h	29	1/2
MS 166/07	zentrale Dysregulation	SHT (Arbeitsunfall)	h	45,5	1/2
MS 159/07	Ersticken	Erdrosseln	min	4	1/2/3
MS 156/07	Herzbeutelamponade	Herzbeutelamponade (Bruststich)	min	8	1/2
MS 110/07	Ersticken	Strangulation	min	15	1/2/3
MS 148/07	Zentrale Dysregulation	2 x Kopfdurchschuss	min	29	1/2
MS 187/07	Zentrale Dysregulation	Subarachnoidalblutung	min/h	6	1/2
FR 326/07	Ersticken	Blutaspiration, SHT	min	37	1
FR 233/07	Polytrauma	Blutaspiration, SHT	min	28	1/2
MS 167/07	Verbluten/Ersticken	Stumpfe Gewalt gegen Kopf, Blutaspiration	min	19	1

Sektionsnummer	Todesursache	Todesumstände	Agoniezeit	PMI (h)	Teilstudie
MS 79/07	Intoxikation Unterkühlung	Alkoholintoxikation terminale, Mageninhaltsaspiration (4 Promille)	h	15	1
FR 485/05	Herzmuskelentzündung	im Schlaf verstorben	h	94	2
FR 487/05	Zentrale Dysregulation	Betäubungsmittel-Intoxikation	h	44	2
FR 520/05	Polytrauma	Schädel-Hirn- und Polytrauma nach Verkehrsunfall	< 1 min	39	2/3
FR 67/06	Verbluten	Polytrauma mit Herzereißung	< 1 min	58	2/3
FR 320/06	Zentrale Dysregulation	Polytrauma mit offenem Schädel-Hirn-Trauma / Enthirnung	< 1 min	81	2/3
FR 34/06	Verbluten	Polytrauma mit Aortenabriss und Schädel-Hirn-Trauma	< 1 min	27	2/3
FR 01/08	Herzinfarkt	Reinfarkt	Min	38	2/3
MS 317/07	Herzinfarkt	Herzinfarkt	Min	25	2/3
FR 207/07	Ertrinken	Ertrinken	Min	73	2/3
FR 137/06	Ersticken	Stumpfe Gewalt gegen Kopf und Thorax; Blutaspiration; BAK 3,25	Min	13	2/3
MS 47/08	Ertrinken	Sturz ins Wasser mit BAK 2,06	Min	24,5	3
FR 254/08	Ersticken	Erhängen	Min	20,5	2/3
FR 266/08	Ersticken	Strangulation	Min	15,5	3
FR 490/07	Polytrauma	Polytrauma durch Verkehrsunfall	< 1 min	38,5	2/3
MS 11/08	Polytrauma	Verkehrsunfall mit Fraktur zwischen Schädelbasis und 1.HWK	< 1 min	38,5	2
FR 268/08	Schädel-Hirn-Trauma	Verkehrsunfall; SHT mit Enthirnung und multiplen Frakturen	< 1 min	17	2/3
FR 491/07	Polytrauma	Sturz von 30 m Höhe	< 1 min	27	2/3



Tabelle 8.2: Übersicht Individuen 2. Eine Zusammenstellung der im Datenbogen dokumentierten Informationen. Zu den mit „-“ gekennzeichneten Feldern wurden im Datenerhebungsbogen keine Angaben gemacht. BMI steht für Body Mass Index. Dieser errechnet sich aus Körpergröße und Gewicht nach der Formel  $BMI = \text{Masse} / (\text{Größe})^2$ .

Sektionsnummer	Geschlecht	Alter (Jahre)	Größe (cm)	Gewicht (kg)	BMI	Auffindeort	Umgebungs-temp. (°C) bzw. Monat	Zeit ungekühlt (h)	Zeit gekühlt (h)
FR 446/07	m	70	170	109	37,72	Wohnung	20	2	40
FR 453/07	m	44	188	102	28,86	draußen (Fahrzeug)	10	2	28
FR 479/07	w	52	164	67	24,91	draußen	5	nein	nein
MS 277/07	w	80	160	59	23,05	Klinik	-	2.5	3.5
MS 284/07	m	56	170	65	22,49	Wohnung	-	3	35
MS 287/07	m	52	182	80	24,15	Wohnung	-	3.5	8
MS 235/07	m	12	156	40	16,44	-	-	4	12
MS 217/07	m	16	180	80	24,78	Intensivstation	-	-	-
MS 261/07	w	54	167	56	20,08	Wohnung	-	3	3
MS 234/07	m	84	-	-	-	Klinik	-	4	17
MS 260/07	w	50	162	65	24,77	Wohnung	-	2.5	9.5
MS 213/07	m	55	191	97	26,59	draußen	August	3	36
MS 197/07	m	37	-	78	-	Wohnung	-	3	25
MS 152/07	m	36	185	96	28,05	Wohnung	-	1.5	9.5
FR 200/07	m	39	180	74	22,84	draußen	-	-	Ja
MS 92/07	w	45	170	75	25,95	Wohnung	6	4.5	1.5
MS 184/07	w	53	168	84	29,76	Wohnung	-	3	38
MS 230/07	m	69	162	69	26,29	-	August	-	-
FR 56/07	m	45	182	75	22,64	Wohnung	23	-	Ja
FR 205/07	m	40	181	107	32,66	draußen	-	4	32
MS 263/07	m	30	190	96	26,59	Wohnung	-	-	-
MS 111/07	w	80	163	80	30,11	Intensivstation	-	1.5	41.5
MS 150/07	w	41	155	55	22,89	Klinik	-	>1	21
MS 128/07	w	32	177	54	17,24	draußen	Mai	3	3
MS 122/07	m	29	181	92	28,08	draußen	Mai	1.5	17.5
MS 233/07	m	42	180	70	21,60	draußen	August	8	13
MS 258/07	w	32	170	76	26,30	Wohnung	-	2	27
MS 166/07	m	37	175	69	22,53	Klinik	-	1	44.5
MS 159/07	w	58	159	64	25,32	Wohnung	23	5	nein
MS 156/07	m	40	170	72	24,91	Wohnung	24	nein	nein
MS 110/07	w	20	172	72	24,34	Wohnung	20	3	12
MS 148/07	m	78	183	104	31,05	Klinik	-	2	27
MS 187/07	w	87	160	55	21,48	Wohnung	25.6	6	nein
FR 326/07	w	18	160	50	19,53	draußen	20	2	35
FR 233/07	m	20	181	95	29,00	draußen	10	-	Ja
MS 167/07	m	45	183	68	20,31	Wohnung	20	-	-
MS 79/07	m	34	175	65	21,22	draußen	5.2	6.5	8.5
FR 485/05	w	31	166	75	27,22	Wohnung	25	-	-

Sektionsnummer	Geschlecht	Alter (Jahre)	Größe (cm)	Gewicht (kg)	BMI	Auffindeort	Umgebungs-temp. (°C) bzw. Monat	Zeit ungekühlt (h)	Zeit gekühlt (h)
FR 487/05	w	31	170	89	30,80	Klinik	20	2,5	41,5
FR 520/05	w	57	173	87	29,07	draußen	-	-	-
FR 67/06	w	55	157	51	20,69	draußen	-	-	-
FR 320/06	m	41	170	78	26,99	draußen	-	-	-
FR 34/06	m	41	191	111	30,43	draußen	-	-	-
FR 01/08	m	68	172	91	30,76	draußen	0	-	-
MS 317/07	m	32	171	105	35,91	Wohnung	20	-	-
FR 207/07	m	35	166	84	30,48	draußen	-	-	-
FR 137/06	m	42	157	51	22,07	draußen	12,7	5	8
MS 47/08	m	17	162	61	23,24	draußen	4	4	20,5
FR 254/08	m	32	186	86	24,86	Wohnung	27	3	17,5
FR 266/08	w	36	171	60	20,52	Wohnung	20	5	10,5
FR 490/07	m	68	177	84	26,81	draußen	5	2	36,5
MS 11/08	w	18	168	53	18,78	draußen	4	1	37,5
FR 268/08	w	36	171	60	20,52	Wohnung	20	5	10,5
FR 491/07	m	17	182	72	21,74	draußen	5	1	26

### 8.3 Ergebnisse aus einer Vorstudie

Tabelle 8.3: Übersicht der Ergebnisse einer Vorstudie. Von 37 Individuen wurde jeweils Herzmuskel, Skelettmuskel und Gehirngewebe asserviert. RNA Quantität und Reinheit (260/280) wurden in Duplikaten ermittelt mit Hilfe eines Nano Drop ND 100-Gerätes. Die Integrität ist als RIN-Nummer angegeben. Proben, deren RIN nicht ermittelt wurde, sind mit „-“ gekennzeichnet.

Sektionsnummer	Gewebe	RNA Quantität [ng/µL]	260/280	RNA Integrität [RIN]
FR 446/07	Herzmuskel	667,92	2,1	2,1
	Skelettmuskel	260,95	2,1	4,4
	Gehirn	157,69	2,1	2,5
FR 453/07	Herzmuskel	603,77	2,1	4,7
	Skelettmuskel	422,81	2,1	4,2
	Gehirn	17,30	2,1	1,0
FR 479/07	Herzmuskel	710,10	2,1	2,7
	Skelettmuskel	214,21	2,1	6,6
	Gehirn	140,79	2,1	2,7
MS 277/07	Herzmuskel	97,55	2,1	6,8
	Skelettmuskel	230,33	2,1	5,3
	Gehirn	106,67	2,1	4,4
MS 284/07	Herzmuskel	390,67	2,1	2,3
	Skelettmuskel	397,76	2,1	5,2
	Gehirn	305,13	2,1	5,3
MS 287/07	Herzmuskel	215,91	2,1	3,2
	Skelettmuskel	152,84	2,1	5,3
	Gehirn	187,49	2,1	2,4
MS 235/07	Herzmuskel	195,89	2,1	6,3
	Skelettmuskel	71,93	2,0	4,5
	Gehirn	150,22	2,1	2,3
MS 217/07	Herzmuskel	219,98	2,1	5,1
	Skelettmuskel	294,71	2,1	5,7
	Gehirn	126,06	2,1	1,7
MS 261/07	Herzmuskel	333,06	2,1	6,2
	Skelettmuskel	474,01	2,1	5,5
	Gehirn	57,85	2,0	1,9
MS 234/07	Herzmuskel	249,21	2,1	2,7
	Skelettmuskel	205,45	2,0	3,3
	Gehirn	629,77	2,1	3,5
MS 260/07	Herzmuskel	344,19	2,1	6,4
	Skelettmuskel	259,37	2,1	6,3
	Gehirn	435,87	2,1	2,4
MS 213/07	Herzmuskel	467,98	2,1	2,3
	Skelettmuskel	472,85	2,1	5,1
	Gehirn	539,35	2,1	4,6
MS 197/07	Herzmuskel	685,28	2,1	4,3
	Skelettmuskel	21,97	1,9	2,6
	Gehirn	419,99	2,1	3,9
MS 152/07	Herzmuskel	641,61	2,0	4,5
	Skelettmuskel	373,78	2,1	5,7
	Gehirn	282,01	2,1	2,4
FR 200/07	Herzmuskel	462,02	2,1	6,3
	Skelettmuskel	204,06	2,1	5,7
	Gehirn	613,45	2,1	2,4
MS 92/07	Herzmuskel	704,81	2,1	6,0
	Skelettmuskel	273,92	2,1	1,1
	Gehirn	966,24	2,1	2,4
MS 184/07	Herzmuskel	170,83	1,5	2,7
	Skelettmuskel	300,38	1,5	3,9
	Gehirn	234,57	1,5	2,1
FR 205/07	Herzmuskel	304,77	2,1	3,0
	Skelettmuskel	611,60	2,1	-
	Gehirn	104,58	2,1	3,0
MS 263/07	Herzmuskel	86,68	2,0	3,5
	Skelettmuskel	66,38	2,0	4,3
	Gehirn	73,11	2,0	6,2
MS 111/07	Herzmuskel	102,02	2,0	2,5
	Skelettmuskel	78,74	2,0	2,4
	Gehirn	82,21	2,0	2,4
MS 150/07	Herzmuskel	43,71	2,0	2,5
	Skelettmuskel	49,06	2,0	2,7
	Gehirn	52,44	2,0	2,4
MS 128/07	Herzmuskel	393,24	2,1	2,1
	Skelettmuskel	111,79	2,1	6,9
	Gehirn	180,60	2,1	2,4
MS 122/07	Herzmuskel	85,68	2,0	2,7
	Skelettmuskel	45,14	2,0	2,5
	Gehirn	97,33	2,1	2,6
MS 233/07	Herzmuskel	410,71	2,1	5,7
	Skelettmuskel	126,69	2,0	5,8
	Gehirn	212,90	2,0	3,0
MS 258/07	Herzmuskel	443,31	2,1	3,1
	Skelettmuskel	152,96	2,1	3,7
	Gehirn	167,37	2,0	2,3
MS 166/07	Herzmuskel	389,47	2,1	3,5
	Skelettmuskel	117,63	2,0	5,6
	Gehirn	369,80	2,1	2,3
MS 159/07	Herzmuskel	631,35	2,1	5,1
	Skelettmuskel	120,64	2,0	2,0
	Gehirn	84,13	2,0	2,3
MS 156/07	Herzmuskel	275,26	2,1	2,3
	Skelettmuskel	70,34	2,1	-
	Gehirn	585,32	2,1	2,2
MS 110/07	Herzmuskel	728,45	2,1	2,6
	Skelettmuskel	129,81	2,1	2,2
	Gehirn	318,04	2,1	2,8
MS 148/07	Herzmuskel	427,39	2,1	-
	Skelettmuskel	393,88	2,1	2,2
	Gehirn	501,98	2,0	2,4
MS 187/07	Herzmuskel	515,12	2,1	2,2
	Skelettmuskel	90,70	2,0	2,6
	Gehirn	157,77	2,0	2,1
FR 326/07	Herzmuskel	427,01	2,1	-
	Skelettmuskel	169,70	2,1	-
	Gehirn	227,69	2,0	-
FR 233/07	Herzmuskel	542,36	2,1	3,6
	Skelettmuskel	290,35	2,1	1,6
	Gehirn	343,97	2,1	2,0
MS 167/07	Herzmuskel	310,36	2,1	-
	Skelettmuskel	166,59	2,1	-
	Gehirn	206,52	2,1	-

Sektionsnummer	Gewebe	RNA Quantität [ng/ $\mu$ L]	280/260	RNA Integrität [RIN]
MS 230/07	Herzmuskel	317,29	0,7	5,8
	Skelettmuskel	299,47	1,0	4,2
	Gehirn	37,20	0,5	1,4
FR 56/07	Herzmuskel	102,04	2,1	-
	Skelettmuskel	41,07	2,0	2,6
	Gehirn	214,42	2,1	4,5

Sektionsnummer	Gewebe	RNA Quantität [ng/ $\mu$ L]	280/260	RNA Integrität [RIN]
MS 79/07	Herzmuskel	502,23	2,1	-
	Skelettmuskel	204,61	2,1	-
	Gehirn	34,69	1,9	-

Tabelle 8.4: Übersicht der  $C_q$ -Mittelwerte ( $C_q$ -MW) der in jedem qPCR-Lauf mitgeführten, doppelt aufgetragenen Positivkontrollen mit daraus errechneten Standardabweichungen (SA).  $C_q$ -MW und SA wurden für jede einzelne quantitative Real-time PCR angegeben. Zusätzlich wurden Mittelwert und Standardabweichung der qPCRs gleicher endogener Kontrollen berechnet ( $C_q$ -MW<sub>ges</sub> und SA<sub>ges</sub>). SA<sub>ges</sub> wurde auf Grundlage der  $C_q$ -Mittelwerte ermittelt. Der Wert dient als Mass für den Unterschied zwischen den einzelnen qPCR-Experimenten („plate to plate“ control).

	Ct Mittelwerte der PK und Standardabweichungen (SA)						„plate to plate“ Kontrolle	
	Herzmuskel		Skelettmuskel		Gehirn		$C_q$ -MW <sub>ges</sub>	SA <sub>ges</sub>
Assay	$C_q$ -MW	SA	$C_q$ -MW	SA	$C_q$ -MW	SA		
GAPDH	17,76	0,07	17,59	0,03	17,85	0,15	17,73	0,11
18S rRNA	8,39	0,07	8,39	0,04	8,34	0,00	8,37	0,02
ACTB	24,79	0,38	24,64	0,07	24,73	0,10	24,72	0,06
TBP	26,24	0,06	26,29	0,01	25,90	0,08	26,14	0,17
HPRT	24,45	0,02	24,53	0,01	24,79	0,49	24,59	0,15
B2M	18,25	0,08	18,20	0,04	18,13	0,03	18,19	0,05
HMBS	24,57	0,08	24,42	0,05	25,12	0,01	24,70	0,30
SDHA	21,92	0,59	21,73	0,19	22,00	0,03	21,88	0,11
CYCA	20,98	0,08	21,55	0,21	20,93	0,18	21,15	0,28
UBC	20,08	0,02	20,05	0,04	20,47	0,13	20,20	0,19

## 8.4 Ergebnisse von zusätzlichen Proben für die RIN-Studie

Tabelle 8.5: Übersicht der Ergebnisse der zusätzlich einbezogenen Proben für RIN Studie. Die Quantität der RNA-Extrakte wurde mit einem NanoDrop ND 1000 Gerät gemessen. Die Messung erfolgte zumeist in Duplikaten. In einzelnen Fällen war nur eine einfache Messung aufgrund zu geringer RNA-Ausgangsmenge möglich.

Sektionsnummer	Gewebe	RNA Quantität [ng/µL]	280/260	RNA Integrität [RIN]
FR 485/05	Herzmuskel	308,09	2,1	3,7
	Skelettmuskel	264,29	2,0	5,6
	Gehirn	451,55	2,1	2,9
FR 487/05	Herzmuskel	349,70	2,1	4,4
	Skelettmuskel	260,00	2,1	5,6
	Gehirn	304,33	2,1	2,4
FR 520/05	Herzmuskel	485,43	2,1	5,3
	Skelettmuskel	521,72	2,0	6,0
	Gehirn	457,26	2,1	2,4
FR 67/06	Herzmuskel	845,02	2,1	4,2
	Skelettmuskel	219,36	2,1	4,2
	Gehirn	602,06	2,1	2,3
FR 320/06	Herzmuskel	1089,48	2,1	3,8
	Skelettmuskel	366,63	2,1	3,1
	Gehirn	-	-	-
FR 34/06	Herzmuskel	145,40	2,1	2,3
	Skelettmuskel	210,30	2,1	3,9
	Gehirn	74,70	2,1	2,4
FR 01/08	Herzmuskel	35,52	2,1	2,1
	Skelettmuskel	522,54	2,3	2,5
	Gehirn	285,55	2,1	2,2
FR 268/08	Herzmuskel	90,25	2,1	2,1
	Skelettmuskel	53,51	2,0	4,7
	Gehirn	-	-	-

Sektionsnummer	Gewebe	RNA Quantität [ng/µL]	280/260	RNA Integrität [RIN]
MS 317/07	Herzmuskel	24,47	1,9	1,2
	Skelettmuskel	72,47	2,0	1,8
	Gehirn	29,41	1,9	1,6
FR 207/07	Herzmuskel	25,05	1,9	4,1
	Skelettmuskel	-	-	-
	Gehirn	23,35	1,9	1,0
FR 137/06	Herzmuskel	338,62	2,1	8,0
	Skelettmuskel	293,31	2,1	7,6
	Gehirn	394,48	2,1	5,8
FR 254/08	Herzmuskel	185,68	2,1	2,6
	Skelettmuskel	136,56	2,0	-
	Gehirn	52,03	2,0	2,3
FR 490/07	Herzmuskel	300,88	2,1	2,4
	Skelettmuskel	330,51	2,1	6,1
	Gehirn	70,51	2,1	2,4
MS 11/08	Herzmuskel	314,71	2,1	4,8
	Skelettmuskel	104,14	2,1	5,3
	Gehirn	441,73	2,1	4,1
FR 491/07	Herzmuskel	645,70	2,1	3,2
	Skelettmuskel	347,44	2,1	5,0
	Gehirn	307,08	2,1	2,5

## 8.5 PMI versus RNA-Quantität

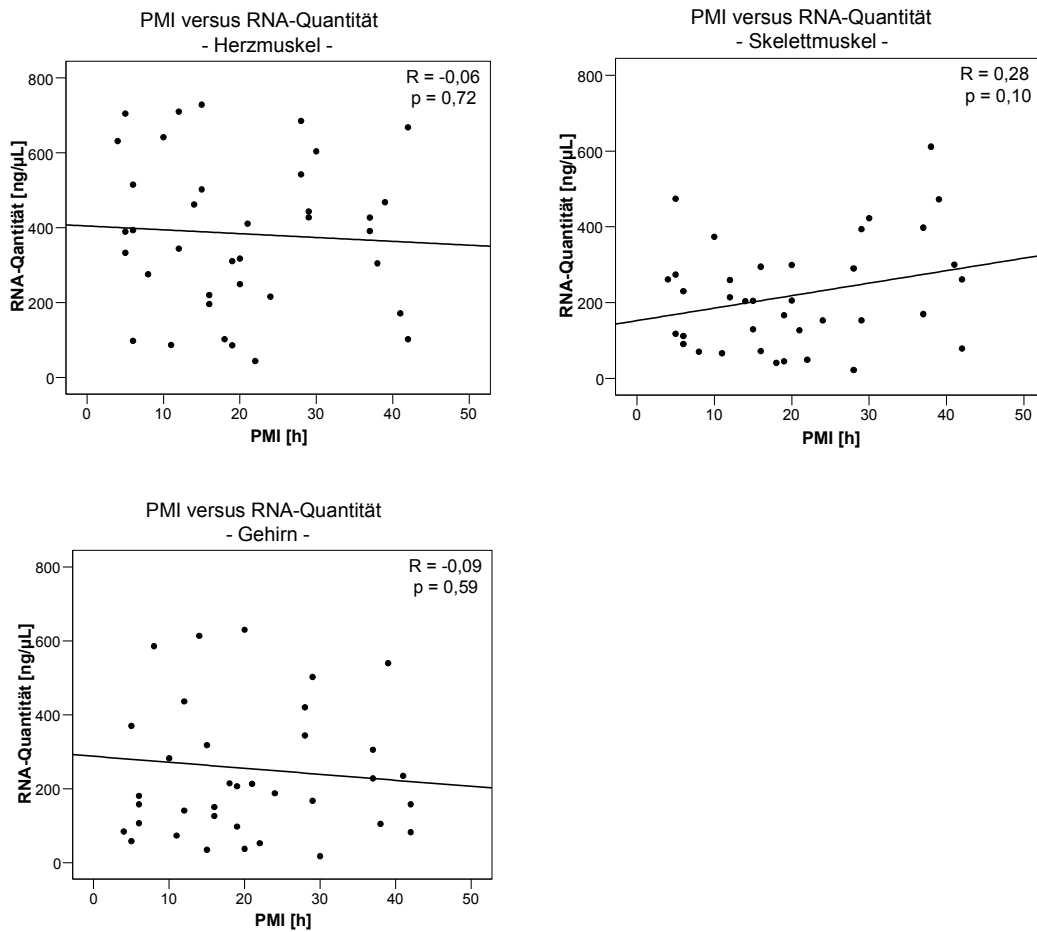


Abbildung 8.2: Box-Whisker Plot Darstellung zwischen Postmortalintervall und der der jeweiligen Probe entsprechenden, extrahierten RNA-Menge. R = Pearson-Korrelation, p = Signifikanz. In keinem der untersuchten Gewebearten wurde ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den beiden Parametern detektiert.

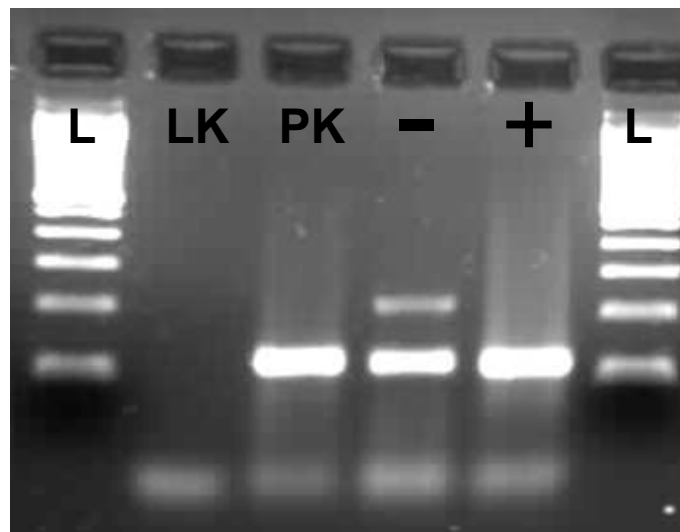


Abbildung 8.3: Vergleich zwischen einer DNase-behandelten (+) sowie einer DNase-unbehandelten (-) RNA-Probe, die revers transkribiert und anschließend elektrophoretisch in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt wurde. L = 100 bp Leiter, LK = Leerkontrolle, PK = Positivkontrolle. Die DNase-behandelte Probe zeigt eine deutliche Bande bei 114 bp. Die DNase-unbehandelte Probe weist eine zusätzliche Bande bei 218 bp auf, welche die Kontamination mit genomischer Rest-DNA deutlich macht. Bild entnommen aus experimentellen Vorarbeiten, die im Rahmen der Bachelor-Arbeit von Katja Matt durchgeführt wurden.

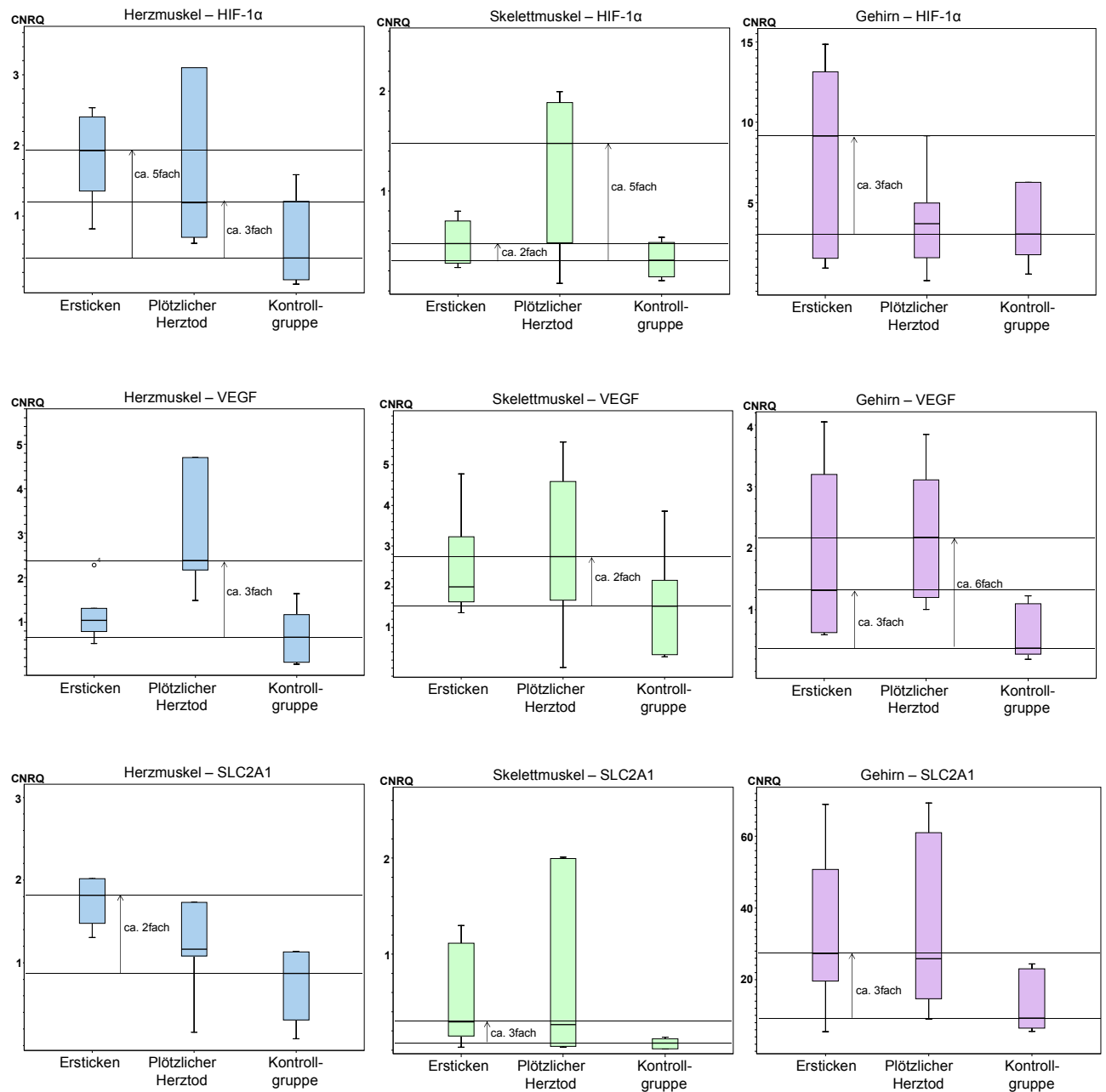


Abbildung 8.4: Lineare Darstellung der CNRQ-Werte von HIF-1α, VEGF und SLC2A1 in postmortalem Herzmuskel-, Skelettmuskel- und Gehirngewebe zur Detektion des n-fachen Transkriptlevelunterschieds zwischen den Zielgruppen „Erstickten“ und „Plötzlicher Herztod“ und der „Kontrollgruppe“. Fehlt die Angabe, dann wurde entweder kein n-facher Expressionslevelunterschied (Plötzlicher Herztod/Gehirn- HIF-1α, Erstickten/Herzmuskel-VEGF, Erstickten/Skelettmuskel-VEGF, Erstickten/Herzmuskel-SLC2A1) oder ein Expressionslevelunterschied, der sich ähnlich zur jeweils anderen Zielgruppe verhält (Plötzlicher Herztod/Skelettmuskel-SLC2A1, Plötzlicher Herztod/Gehirn-SLC2A1), festgestellt.



## 8.6 Literatur

- Allery JP, Telmon N, Mieusset R, Blanc A, Rougé D** (2001) Cytological detection of spermatozoa: comparison of three staining methods. *J Forensic Sci.* 46(2): 349-351
- Allery JP, Telmon N, Blanc A, Mieusset R, Rougé D** (2003) Rapid detection of sperm: comparison of two methods. *J Clin Forensic Med.* 10(1): 5-7
- Ambros V et al.** (2003) A uniform system for microRNA annotation. *RNA*9(3): 277-279
- Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF** (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 64(15): 5245-5250
- Anderson S, Howard B, Hobbs GR, Bishop CP** (2005) A method for determining the age of bloodstain. *Forensic Sci Int.* 148(1): 37-45
- Atz M et al,** (2007) Methodological considerations for gene expression profiling of human brain. *J Neurosci Methods.* 163(2): 295-309
- Baelde HJ, Cleton-Jansen AM, van Beerendonk H, Namba M, Bovée JV, Hogendoorn PC** (2001) High quality RNA isolation from tumours with low cellularity and high extracellular matrix component for cDNA microarrays: application to chondrosarcoma. *J Clin Pathol.* 54(10): 778-82
- Bahar B, Monahan FJ, Moloney AP, Schmidt O, MacHugh DE, Sweeney T** (2007) Long-term stability of RNA in post-mortem bovine skeletal muscle, liver and subcutaneous adipose tissues. *BMC Mol Biol.* 8: 108
- Bannon M, Kapatos G, Albertson D** (2005) Gene expression profiling in the brains of human cocaine abusers. *Addict Bio.* 10(1): 119-26
- Barni F, Lewis SW, Berti A, Miskelly GM, Lago G** (2007) Forensic application of the luminal reaction as a presumptive test for latent blood detection. *Talanta* 72(3): 896-913
- Barrachina M, Castano E, Ferrer I** (2006) TaqMan PCR assay in the control of RNA normalization in human post-mortem brain tissue. *Neurochem Int.* 49(3): 276-284
- Barton AJL, Pearson RCA, Najlerahim A, Harrison PJ** (1993) Pre- and Postmortem Influences on Brain RNA. *J Neurochem.* 61: 1-11

- Bas A, Forsberg G, Hammarström S, Hammarström M-L** (2004) Utility of the housekeeping genes 18SrRNA,  $\beta$ -Actin and Glyceraldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase for normalization in Real-time Quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Analysis of Gene Expression in Human T Lymphocytes. *Scand J of Immunol.* 59: 566-573
- Bauer M, Polzin S, and Patzelt D** (2003) Quantification of RNA degradation by semi-quantitative duplex and competitive RT-PCR: a possible indicator of the age of bloodstains? *Forensic Sci Int.* 138(1-3): 94-103
- Bauer M und Patzelt D** (2003) A method for simultaneous RNA and DNA isolation from dried blood and semen stains. *Forensic Sci Int.* 136(1-3): 76-8
- Bauer M, Gramlich I, Polzin S, Patzelt D** (2003) Quantification of mRNA degradation as possible indicator of postmortem interval-a pilot study. *Leg Med (Tokyo).* 5(4): 220-7
- Bauer M, Patzelt D** (2008) Identification of menstrual blood by real time RT-PCR: technical improvements and the practical value of negative test results. *Forensic Sci Int.* 174(1): 55-9
- Bell JE et al.** (2008) Management of a twenty-first century brain bank: experience in the BrainNet Europe consortium. *Acta Neuropathol.* 115(5): 497-507
- Bémeur C, Ste-Marie L, Desjardins P, Hazell AS, Vachon L, Butterworth R, Montgomery J** (2004) Decreased beta-actin mRNA expression in hyperglycemic focal cerebral ischemia in the rat. *Neurosci Lett.* 357(3): 211-4
- Bernard R et al.** (2011) Altered expression of glutamate signaling, growth factor, and glia genes in the locus coeruleus of patients with major depression. *Mol Psychiatry.* 16(6): 634-46.
- Bernstein E, Denli AM, Hannon GJ** (2001) The rest is silence. *RNA,* 7(11): 1509-21
- Biederman J, Yee J, Cortes P** (2004) Validation of internal control genes for gene expression analysis in diabetic glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 66: 2308-2314
- Björk RG et al.** (1987) Transfer RNA modification. *Ann Rev Biochem.* 56: 263-87
- Bonefeld BE, Elfving B, Wegener G** (2008) Reference genes for normalization: a study of rat brain tissue. *Synapse.* 62(4): 302-309
- Bonini JA, Hofmann C** (1991) A rapid, accurate, nonradioactive method for quantitating RNA on agarose gels. *Biotechniques.* 11(6): 708-710

- Bower NI, Moser RJ, Hill JR, Lehnert SA** (2007) Universal reference method for real-time PCR gene expression analysis of preimplantation embryos. *Biotechniques*. 42(2): 199-206
- Brinkmann B, Madea B** (2004) *Handbuch gerichtliche Medizin Band 1*. Springer Verlag: 699-788
- Boujedidi H et al.** (2011) Housekeeping Gene Variability in the Liver of Alcoholic Patients. *Alcohol Clin Exp Res*. doi: 10.1111/j.1530-0277.2011.01627.x.
- Brennan KJ et al.** (2011) Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature*. 473(7346): 221-5.
- Bonanomi A et al.** (2003) Quantitative cytokine gene expression in human tonsils at excision and during histoculture assessed by standardized and calibrated real-time PCR and novel data processing. *J Immunol Methods*. 283(1-2): 27-43
- Brahimi Horn C, Pousségur J** (2006) The role of the hypoxia-inducible factor in tumor metabolism growth and invasion. *Bull Cancer*. 93(8): E73-80
- Brogna S, Wen J** (2009) Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms. *Nat Struct Mol Biol*. 16(2): 107-13
- Bruge F, Venditti E, Tiano L, Littarru GP, Damiani E** (2011) Reference gene validation for qPCR on normoxia- and hypoxia-cultured human dermal fibroblasts exposed to UVA: Is  $\beta$ -actin a reliable normalize for photoaging studies? *J Biotechnol*. 156(3): 153-162
- Buesa C, Maes T, Subirada F, Barrachina M, Ferrer I** (2004) DNA chip technology in brain banks: confronting a degraded world. *J Neuropathol Exp Neurol*. 63(19): 1003-1014
- Burrows N, Babur M, Resch J, Williams KJ, Brabant G** (2011) Hypoxia-inducible factor in thyroid carcinoma. *J Thyroid Res*.
- Bustin SA** (2000), Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25. 169-193
- Bustin SA** (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol*. 29(1): 23-39
- Bustin SA and Nolan T** (2004) Pitfalls of Quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction. *J Biomolecular Techniques* 15: 155-166
- Bustin SA** (2005) Real-time, fluorescence-based quantitative PCR: a snapshot of current procedures and preferences. *Expert Rev Mol Diagn*. 5(4): 493-498

- Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW** (2005) Quantitative real-time PCR – a perspective. *J Mol Endocrinol* 34(3): 597-601
- Bustin SA** (2009) *The PCR Revolution – Basic Technologies and Applications*. Cambridge University Press
- Bustin SA** et al. (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 55(4): 611-22
- Caradec J, Sirab N, Revaud D, Keumeugni C, Loric S** (2010) “Desperate house genes”: the dramatic example of hypoxia. *Br J Cancer*. 102: 1037-1043
- Catts VS** et al. (2005) A microarray study of post-mortem mRNA degradation in mouse brain tissue. *Molecular Brain Research* 138: 164-177
- Chevyreva Ia, Faull RL, Green CR, Nicholson LF** (2008) Assessing RNA quality in postmortem human brain tissue. *Exp Mol Pathol*. 84(1): 71-77
- Cicinnati VR, Shen Q, Sotiropoulos GC, Radtke A, Gerken G, Beckebaum S** (2008) Validation of putative reference genes for gene expression studies in human hepatocellular carcinoma using real-time quantitative RT-PCR. *BMC Cancer* 8: 350
- Coulson DTR, Brockbank S, Quinn JG, Murphy S, Ravid R, Brent Irvine G, Johnston JA** (2008) Identification of valid reference genes for the normalization of RT qPCR gene expression data in human brain tissue. *BMC Mol Biol*. 9: 46
- Deo SS, Bhagat AR, Shah RN** (2011) Genetic variations in nalp1 mRNA expressions in human vitiligo. *Indian J Dermatol*. 56(3): 266-71.
- Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A** (2004) Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR, *Biotechniques*, 37(1): 112-4, 116, 118-9
- Dieci G, Preti M, Montanini B** (2009) Eukaryotic snoRNAs: A paradigm for gene expression flexibility, *Genomics* 94(2): 83-8
- Dumur CI** et al. (2004) Evaluation of quality-control criteria for microarray gene expression analysis. *Clin Chem*. 50(11): 1994-2002
- Durrenberger PF et al.** (2010) Effects of antemortem and postmortem variables on human brain mRNA quality: a BrainNet Europe study. *J Neuropathol Exp Neurol*. 69(1): 70-81
- Egloff S, O'Reilly D, Murphy S** (2008) Expression of human snRNA genes from beginning to end. *Biochem Soc Trans*. 36(Pt 4): 590-4

- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T** (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 411(6836): 494-8
- Elstner M, Turnbull DM** (2011) Transcriptome analysis in mitochondrial disorders. *Brain Res Bull*.
- Ervin JF et al.** (2007) Postmortem delay has minimal effect on brain RNA integrity. *J Neuropathol Exp Neurol*. 66(12): 1093-1099
- Eulalio A, Behm-Ansmant I, Izaurralde E** (2007) P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8(1): 9-22
- Faghihi MA et al.** (2010) RNAi screen indicates widespread biological function for human natural antisense transcripts. *PLoS One*. 5(10). pii: e13177
- Faehle CR, Joshua-Tor L** (2007) Argonautes confront new small RNAs. *Curr Opin Chem Biol*. 11(5): 569-77
- Filipowicz W et al.** (2005) Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Int Curr Opin Struct Biol* 15(3):331-41
- Fitzpatrick R et al.** (2002) Postmortem stability of RNA isolated from bovine reproductive tissues. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1574: 10-14
- Flatscher-Bader T et al.** (2005) Alcohol-responsive genes in the frontal cortex and nucleus accumbens of human alcoholics. *J Neurochem*. 93(2): 359-70,
- Fleige S, Walf V, Huch S, Prgomet C, Sehm J, Pfaffl MW** (2006) Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnol Lett*. 28(19): 1601-13
- Fleige S, Pfaffl MW** (2006) RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine*. 27: 126-139
- Foldager CB, Munir S, Ulrik-Vinther KS, Soballe K, Bünger C, Lind M** (2009) Validation of suitable house keeping genes for hypoxia-cultured human chondrocytes. *BMC Mol Biol*. 10: 94
- Gingerich TJ, Feige JJ, LaMarre J** (2004) AU-rich elements and the control of gene expression through regulated mRNA stability. *Anim Health Res Rev*. 5(1): 49-63
- Giricz O, Lauer-Fields JL, Fields GB** (2008) The normalization of gene expression in data in melanoma: investigating the use of glyceraldehydes 3-phosphate and 18S ribosomal RNA as internal reference genes for quantitative real-time PCR. *Anal Biochem*. 380: 137-139

- Goidin D, Mamessier A, Staquet MJ, Schmitt D, Berthier-Vergnes O** (2001) Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations. *Anal Biochem.* 295(1): 17-21
- Gorzelnia K, Janke J, Engeli S, Sharma AM** (2001) Validation of endogenous controls for gene expression studies in human adipocytes and preadipocytes. *Horm Metab Res.* 33(10): 625-627
- Griffiths-Jones S, Marshall M, Matzke M, Ruvkun G, Tuschl T** (2003) A uniform system for microRNA annotation. *9(3): 277-9*
- Grivna ST, Beyret E, Wang Z, Lin H** (2006) A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells. *Genes Dev.* 20(13): 1709-14
- Grundy FJ, Henkin TM** (2004) Regulation of gene expression by effectors that bind to RNA. *Curr Opin Microbiol.* 7(2): 126-31
- Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP** (2010) Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature.* 466(7308): 835-40
- Gutala RV, Reddy PH** (2004) The use of real-time PCR analysis in a gene expression study of Alzheimer's disease post-mortem brains. *J Neurosci Methods.* 132(1): 101-107
- Haas C, Klessner B, Maake C, Bär W, Kratzer A** (2009) mRNA profiling for body fluid identification by reverse transcription endpoint PCR and realtime PCR *Forensic Sci Int Genet,* 3(2):80-8
- Haas C, Hanson E, Kratzer A, Bär W, Ballantyne J** (2010) Selection of highly specific and sensitive mRNA biomarkers for the identification of blood, *Forensic Sci Int Genet,* 2010
- Hammerle-Fickinger A, Riedmaier I, Becker C, Meyer HH, Pfaffl MW, Ulbrich SE** (2010) Validation of extraction methods for total RNA and miRNA from bovine blood prior to quantitative gene expression analyses, *Biotechnol Lett,* 32(1): 35-44
- Hansen MC, Nielsen AK, Molin S, Hammer K, Kilstrup M** (2001) Changes in rRNA levels during stress invalidates results from RNA blotting: fluorescence in situ rRNA hybridization permits renormalization of estimation of cellular mRNA levels. *J Bacteriol.* 183(16): 4747-4751
- Hanson EK, Lubenow H, Ballantyne J** (2009) Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs, *Anal Biochem,* 387(2): 303-14
- Harada N et al.** (2007) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase enhances transcriptional activity of androgen receptor in prostate cancer cells. *J Biol Chem.* 282(3): 22651-22661

- He L, Hannon GJ** (2004) MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation, *Nat Rev Genet*, 5(7): 522-31
- Heinrich M, Matt, K, Lutz-Bonengel S, Schmidt U** (2007) Successful RNA extraction from various human postmortem tissues, *Int J Legal Med* 121, 136-142
- Heinrich M, Lutz-Bonengel S, Matt K, Schmidt U** (2007) Real time PCR detection of five different „endogenous control gene“ transcripts in forensic autopsy material, *Forensic Sci Int* 27, 163-169
- Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J** (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data, *Genome Biol*, 8(2):R19
- Higashimura Y, Nakajima Y, Yamaji R, Harada N, Shibasaki F, Nakano Y, Inui H** (2011) Up-regulation of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase gene expression by HIF-1 activity depending on Sp1 in hydroxic breast cancer cells. *Arch Biochem Biophys* 509(1): 1-8
- Hirota K, Semenza GL** (2005) Regulation of hypoxia-inducible factor 1 by prolyl and asparaginyl hydroxylases. *Biochem Biophys Res Commun*. 338(1): 610-616
- Holbrook JA, Neu-Yilik G, Hentze MW, Kulozik AE** (2004) Nonsense-mediated decay approaches the clinic *Nat Genet*. 36(8): 801-8
- Hollams EM, Giles KM, Thomson AM, Leedman PJ** (2002) mRNA stability and the control of gene expression: implications for human disease. *Neurochem Res*. 27(10): 957-980
- Hoogewijs D, Houthoofd K, Matthijssens F, Vandesompele J, Vanfleteren JR** (2008) Selection and validation of a set of reliable reference genes for quantitative sod gene expression analysis in *C. elegans*. *BMC Mol Biol*. 9:9
- Ho-Pun-Cheung A** et al. (2009) Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction: description of a RIN-based algorithm for accurate data normalization. *BMC Mol Biol*. 10: 31
- Horesh Y, Katsel P, Haroutunian V, Domany E** (2010) Gene expression signature is shared by patients with Alzheimer's disease and Schizophrenia at the superior temporal gyrus. *Eur J Neurol*.
- Hsiao LL** et al. (2001) A compendium of gene expression in normal human tissues. *Physiol. Genomics*. 7(2): 97-104
- Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF** (1998) Reagulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O<sub>2</sub>-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(14): 7987-7992

- Huang LE, Bunn HF** (2003) Hypoxia-inducible factor and its biomedical relevance. *J Biol Chem.* 278(22): 19575-19578
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A** (2005) Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 6(4): 279-284
- Hynd MR, Lewohl JM, Scott HL, Dodd PR** (2003) Biochemical and molecular studies using human autopsy brain tissue. *J Neurochem.* 85(3): 543-62
- Ikematsu K, Tsuda R, Nakasono I** (2006) Gene response of mouse skin to pressure injury in the neck region. *Legal Medicine* 8: 128-131
- Ikematsu K, Takahashi H, Kondo T, Tsuda R, Nakasono I** (2008) Temporal expression of immediate early gene mRNA during the supravital reaction in mouse brain and lung after mechanical asphyxiation. *Forensic Sci Int.* 179(2-3): 152-6
- Imbeaud S et al.** (2005) Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces, *Nucleic Acids Res*, 30; 33(6): e56
- Inoue H, Kimura A, Tuji T** (2002) Degradation profile of mRNA in a dead rat body: basic semi-quantification study. *Forensic Sci International* 130: 127-132
- Iorio MV, Croce CM** (2009) MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. *J Clin Oncol.* 27(34): 5848-5856
- Jalba CS et al.** (2011) Clinical relevance of vascular endothelial growth factor-A in colorectal cancer. *Rom J Morphol Embryol.* 52(3): 775-781
- Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH** (1996) Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O<sub>2</sub> tension. *Am J Physiol.* 271(4 Pt 1):C1172-80
- Johansson S et al.** (2007) Validation of endogenous controls for quantitative gene expression analysis: application on brain cortices of human chronic alcoholics, *Brain Res*, 1132(1):20-8
- Johnson SA, Morgan DG, Finch CE** (1986) Extensive post-mortem stability of RNA from rat and human brain. *J, Neurosci Res.* 16: 267-280
- Juusola J, Ballantyne J** (2007) mRNA profiling for body fluid identification by multiplex quantitative RT-PCR. *J Forensic Sci.* 52(6): 1252-1262
- Karszen AM et al.** (2007) Stress-induced changes in primate prefrontal profiles of gene expression. *Mol Psychiatry.* 12(12): 1089-102
- Kheirleiseid EA, Chang KH, Newell J, Kerin MJ, Miller N** (2010) Identification of endogenous control genes for normalization of real-time quantitative PCR data in colorectal cancer. *BMC Mol Biol.* 11: 12



- Kim JW** et al. (1998) Increased glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase gene expression in human cervical cancers. *Gynecol Oncol.* 71(2): 266-269
- Kitchen RR, Kubista M, Tichopad A** (2010) Statistical aspects of quantitative real-time PCR experiment design. *Methods.* 50(4): 231-236
- Knowles HJ, Harris AL** (2001) Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Hypoxia and tumourigenesis. *Breast Cancer Res.* 3(5): 318-322
- Kort EJ, Campbell B, Resau JH** (2003) A human tissue and data resource: an overview of opportunities, challenges, and development of a provider/researcher partnership model. *Comput Methods Programs Biomed.* 70(2): 137-50
- Kreth S, Heyn J, Grau S, Ketzschmar HA, Egensperger R, Kreth FW** (2010) Identification of valid endogenous control genes for determining gene expression in human glioma. *Neuro Oncol.* 12(6): 570-579
- Lafontaine DLJ, Tollervey D** (1998) Birth of the snoRNPs: the evolution of the modification-guide sno-RNAs. *Trends Biochem Sci* 23(10): 383-8
- Lagnease J, John R, Schweizer H, Ebmeyer U, Keilhoff G** (2008) Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in rat asphyxial cardiac arrest model. *BMC Mol Biol.* 9: 53
- LaGrandeur TE, Hüttenhofer A, Noller HF, Pace NR** (1994) Phylogenetic comparative chemical footprint analysis of the interaction between ribonuclease P RNA and tRNA. *EMBO J.*13(17): 3945-52
- Larysz D** et al. (2011) Epidermal growth factor receptor gene expression in high grade gliomas? *Folia Neuropathol.* 49(1): 28-38.
- Lau NC, Seto AG, Kim J, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Bartel DP, Kingston RE** (2006) Characterization of the piRNA complex from rat testes. *Science* 313(5785): 363-7
- Lee J, Hever A, Willhite D, Zlotnik A, Hevezi P** (2005) Effects of RNA degradation on gene expression analysis of human postmortem tissues. *The FASEB Journal.*
- Lehrmann E** et al. (2003) Transcriptional profiling in the human prefrontal cortex: evidence for two activational states associated with cocaine abuse. *Pharmacogenomics J.* 3(1): 27-40
- Lewis BP, Green RE, Brenner SE** (2003) Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Int Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100(1): 189-192
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP** (2005) Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets. *Cell.* Vol. 120: 15-20

- Li JZ et al.** (2004) Systematic changes in gene expression in postmortem human brains associated with tissue pH and terminal medical conditions. *Hum Mol Genet.* 13(6): 609-616
- Li W, Ye Y** (2008) Polyubiquitin chains: functions, structures and mechanisms. *Cell Mol Life Sci.* 65(15): 2397-2406
- Libus J, Storchova H** (2006) Quantification of cDNA generated by reverse transcription of total RNA provides a simple alternative tool for quantitative RT-PCR normalization. *Biotechniques* 41(2): 156-160
- Lippa KA, Duewer DL, Salit ML, Game L, Causton HC** (2010) Exploring the use of internal and external controls for assessing microarray technical performance. *BMC Res Notes.* 3(1): 349
- Liu LX et al.** (2002) Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun.* 291(4): 908-914
- Liu J, Lewohl JM, Dodd PR, Randall PK, Harris RA, Mayfield RD** (2004) Gene expression profiling of individual cases reveals consistent transcriptional changes in alcoholic human brain. *Journal of Neurochemistry* 90. 1050-1058
- Liu X, Fortin K, Mourelatos Z** (2008) MicroRNAs: biogenesis and molecular functions. *Brain Pathol.* 18(1): 113-21
- Livak KJ, Schmittgen TD** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>( $\Delta\Delta C_T$ )-Method. *Methods.* 25(4): 402-8
- Loor G, Schumacker PT** (2008) Role of hypoxia-inducible factor in cell survival during myocardial ischemia-reperfusion. *Cell Death Differ.* 15(4): 686-690
- Lupberger J, Kreuzer KA, Baskaynak G, Peters UR, le Coutre P, Schmidt CA** (2002) Quantitative analysis of beta-actin, beta-2-microglobulin and porphobilinogen deaminase mRNA and their comparison as control transcripts for RT-PCR. *Mol Cell Probes.* 16: 25-30
- Madea B** (2007) *Praxis Rechtsmedizin.* Springer Verlag. 2. Auflage: 152-174
- Mall G, Eisenmenger W** (2005) Estimation of time since death by heat-flow Finite-Element model. Part I: method, model, calibration and validation. *Leg Med (Tokyo).* 7(1): 1-14
- Mall G, Eisenmenger W** (2005) Estimation of time since death by heat-flow Finite-Element model. Part II: application to non-standard cooling conditions and preliminary results in practical casework. *Leg Med (Tokyo).* 7(2): 69-80

- Maloney B, Ge YW, Alley GM, Lahiri DK** (2007) Important differences between human and mouse APOE gene promoters: limitation of mouse APOE model in studying Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 103(3): 1237-57
- Mandal M, Lee M, Barrick JE, Weinberg Z, Emilsson GM, Ruzzo WL, Breaker RR** (2004) A glycine-dependent riboswitch that uses cooperative binding to control gene expression. *306(5694):* 275-9
- Mangalam H et al.** (2001) GeneX: An open source gene expression database and integrated tool set. *IBM Systems J.* 40(2)
- Maquat LE** (2005): Nonsense-mediated mRNA decay in mammals. *J Cell Sci.* 118(Pt 9): 1773-1776
- Marchuk L, Sciore P, Reno C, Frank CB, Hart DA** (1998) Postmortem stability of total RNA isolated from rabbit ligament, tendon and cartilage. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1379: 171-177
- Matsuo A, Ikematsu K, Nakasono I** (2009) C-fos, fos-B, c-jun and dusp-1 expression in the mouse heart after single and repeated methamphetamine administration. *Leg Med (Tokyo).* 11(6): 285-90
- Mauro MO, Sartori D, Oliveira RJ, Ishii PL, Mantovani MS, Ribeiro LR** (2011) Activity of selenium on cell proliferation, cytotoxicity, and apoptosis and on the expression of CASP9, BCL-XL and APC in intestinal adenocarcinoma cells. *Mutat Res.* 715(1-2): 7-12.
- McManus MT, Sharp PA** (2002) Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet.* 3(10): 737-47
- McNeill RE, Miller N, Kerin MJ** (2007) Evaluation and validation of candidate endogenous control genes for real-time quantitative PCR-studies of breast cancer. *BMC Mol Biol.* 8: 107
- Mehta R et al.** (2010) Validation of endogeneous reference genes for qRT-PCR analysis of human visceral adipose samples. *BMC Mol Biol.* 11: 39
- Meister G, Tuschl T** (2004) Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431(7006): 343-9
- Meller M, Vadachkoria S, Luthy DA, Williams MA** (2005) Evaluation of housekeeping genes in placental comparative expression studies. *Placenta.* 26(8-9): 601-607
- Mexal S, Berger R, Adams CE, Ross RG, Freedman R, Leonard S** (2006) Brain pH has a significant impact on human postmortem hippocampal gene expression profiles. *Brain Res.* 1106(1): 1-11
- Meyer S, Temme C, Wahle E** (2004) Messenger RNA turnover in eukaryotes: pathways and enzymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 39(4): 197-216

- Millar T** et al. (2007) Tissue and organ donation for research in forensic pathology: the MRC Sudden Death Brain and Tissue Bank. *J Pathol.* 213(4): 369-375
- Mironov AS** et al. (2002) Sensing small molecules by nascent RNA: a mechanism to control transcription in bacteria. *Cell* 111(5): 747-56
- Moreau MP, Bruse SE, David-Rus R, Buyske S, Brzustowicz LM** (2011) Altered microRNA expression profiles in postmortem brain samples from individuals with schizophrenia and bipolar disorder. *Biol Psychiatry.* 69(2): 188-93
- Mori R** et al. (2011) Release of TNF- $\alpha$  from macrophages is mediated by small GTPase Rab37. *Eur J Immunol.* doi: 10.1002/eji.201141640
- Morrison MR, Griffin WS** (1981) The isolation and in vitro translation of undegraded messenger RNAs from human postmortem brain. *Anal Biochem.* 113(2): 318-24.
- Moss AJ** (1980) Prediction and prevention of sudden cardiac death. *Annu Rev Med.* 31: 1-14
- Mrazek F, Sekerova V, Drabek J, Kolek V, du Bois RM, Petrek M** (2002) Expression of the chemokine PARC mRNA in bronchoalveolar cells of patients with sarcoidosis. *Immunol Lett.* 84(1): 17-22.
- Mühlhardt C** (2006) *Der Experimentator. Molekularbiologie / Genomics.* Spektrum Verlag. 5. Auflage: 117-129
- Noller HF** (1991) Ribosomal RNA and translation. *Annu Rev Biochem.* 60: 191-227
- Nudler E, Mironov AS** (2004) The riboswitch control of bacterial metabolism. *Trends Biochem Sci.* 29(1): 11-7
- Ohl F, Jung M, Radonic A, Sachs M, Loening SA, Jung K** (2006) Identification and validation of suitable endogenous reference genes for gene expression studies of human bladder cancer. *J Urol.* 175(5): 1915-1920
- Ozaki H** et al. (1999) Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  is increased in ischemic retina: temporal and spatial correlation with VEGF expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40(1): 182-9
- Paillard L, Osborne HB** (2003) Est of EDEN was a poly(A) tail. *Bio Cell.* 95(3-4): 211-219
- Parker R, Seth U** (2007) P Bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell.* 25(5): 635-46
- Parker RA, Clegg PD, Taylor SE.** (2011) The in vitro effects of antibiotics on cell viability and gene expression of equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Equine Vet J.* doi: 10.1111/j.2042-3306.2011.00437.x.

- Parlapani E et al.** (2010) Gene expression of neuregulin-1 isoforms in different brain regions of elderly schizophrenia patients. *World J Biol Psychiatry* 11(2 Pt 2): 243-250
- Partemi S et al.** (2010) Forensic Sci Int. Analysis of mRNA from human heart tissue and putative applications in forensic molecular pathology. 203(1-3): 99-105
- Penning R** (2006) Rechtsmedizin systematisch. Uni-Med Verlag AG. 2. Auflage: 104-118
- Pérez S et al.** (2007) Identifying the most suitable endogenous control for determining gene expression in hearts from organ donors. *BMC Mol Biol.* 8: 114
- Pfaffl MW** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res*, 29(9):e45
- Pfaffl MW, Tichopad A, A, Prgomet C, Neuvians TP** (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity--BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett.* 26(6): 509-515
- Pfaffl MW** (2010) The ongoing evolution of qPCR. *Methods.* 50(4): 215-216
- Phang TW, Shi CY, Chia JN, Ong CN** (1994) Amplification of cDNA via RT-PCR using RNA extracted from postmortem tissues. *J Forensic Sci.* 39(5): 1275-1279
- Pombo-Suarez M, Calaza M, Gomez-Reino JJ, Gonzales A** (2008) Reference genes for normalization of gene expression studies in human osteoarthritic articular cartilage. *BMC Mol Biol.* 9: 17
- Popova T, Mennerich D, Weith A, Quast K** (2008) Effect of RNA quality on transcript intensity levels in microarray analysis of human post-mortem brain tissues. *BMC Genomics.* 9: 91
- Preece P et al.** (2003) An optimistic view for quantifying mRNA in post-mortem human brain. *Molecular Brain Research* 116: 7-16
- Preece P, Cairns NJ** (2003) Quantifying mRNA in postmortem human brain: influence of gender, age of death, postmortem interval, brain pH, agonal state and inter-lobe mRNA variance. *Molecular Brain Research* 118: 60-71
- Ralston SH, Albagha OM** (2011) Genetic determinants of Paget's disease of bone. *Ann N Y Acad Sci.* 1240: 53-60
- Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF** (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett.* 339(1): 62-66

- Ramakrishnan V** (2002) Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell*. 108(4): 557-72
- Ravid R** (2008) Standard Operating Procedures, ethical and legal regulations in BTB (Brain/Tissue/Bio) banking: what is still missing? *Cell Tissue Bank*. 9(3): 151-6
- Regier N, Frey B** (2010) Experimental comparison of relative RT-qPCR quantification approaches for gene expression studies in poplar. *BMC Mol Biol*. 11: 57
- Révillion F, Pawlowski V, Hornez L, Peyrat JP** (2000) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression in human breast cancer. *Eur J Cancer*. 36(8): 1038-1042
- Rich A, Kim SH** (1978) The three-dimensional structure of transfer RNA. *Sci Am* 238(1): 52-62
- Riedmaier I, Bergmaier M, Pfaffl MW** (2010) Comparison of two available platforms for determination of RNA quality. *Biotechnol & Biotechnol Eq*. 24(4): 2154-2159
- Ryan MM, Huffaker SJ, Webster MJ, Wayland M, Freeman T, Bahn S** (2004) Application and optimization of microarray technologies for human postmortem brain studies. *Biol. Psychiatry*. 55(4): 329-336
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY
- Sandusky GE, Teheny KH, Esterman M, Hanson J, Williams SD** (2007) Quality control of human tissues--experience from the Indiana University Cancer Center-Lilly Research Labs human tissue bank. *Cell Tissue Bank*. 8(4): 287-95
- Sashital DG, Butcher SE** (2006) Flipping off the riboswitch: RNA structures that control gene expression. *ACS Chem Biol*. 1(6): 341-5
- Schneeberger C, Speiser P, Kury F, Zeillinger R** (1995) Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. *PCR Methods Appl*. 4(4): 234-8
- Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T** (2006) The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*. 7: 3
- Schmid H, Cohen CD, Henger A, Irrang S, Schlondorff D, Kretzler M** (2003) Validation of endogeneous controls for gene expression analysis in microdissected human renal biopsies. *Kidney Int*. 64(1): 356-360

- Schmittgen TD, Zakrajsek BA** (2000) Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative PCR. *J Biochem Biophys Methods*. 46: 69-81
- Semenza GL** (2007) Hypoxia-inducible factor 1 (HIF1) pathway. *Sci STKE*. 2007(407): cm8
- Setzer M, Juusola J, Ballantyne J** (2008) Recovery and stability of RNA in vaginal swabs and blood, semen, and saliva stains. *J Forensic Sci*. 53(2): 296-305
- Sherwood KR, Head MW, Walker R, Smith C, Ironside JW, Fazakerley JK** (2011) RNA integrity in post mortem human variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) and control brain tissue. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 37(6):633-42. doi: 10.1111/j.1365-2990.2011.01162.x.
- Silbergerg G, Baruch K, Navon R** (2009) Detection of stable reference genes for real-time PCR analysis in schizophrenia and bipolar disorder. *Anal Biochem*. 391(2): 91-97
- Silva AL, Romão L** (2009) The mammalian nonsense-mediated mRNA decay pathway: to decay or not to decay! Which players make the decision? *FEBS Lett*. 583(3)
- Sirover MA** (1999) New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta*. 1432(2): 159-184
- Solanas M, Moral R, Escrich E** (2001) Unsuitability of using ribosomal RNA as loading control for Northern blot analyses related to the imbalance between messenger and ribosomal RNA content in rat mammary tumors. *Anal Biochem*. 288(1): 99-102
- Ståhlberg A, Håkansson J, Xian X, Semb H, Kubista M** (2004) Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification. *Clin Chem*. 50(3): 509-15
- Ståhlberg A, Kubista M, Pfaffl M** (2004) Comparison of reverse transcriptases in gene expression analysis. *Clin Chem*. 50(9): 1678-80
- Staley JP, Woolford JL Jr** (2009) Assembly of ribosomes and spliceosomes: complex ribonucleoprotein machines. *Curr Opin Cell Biol*. 21(1): 109–118
- Stamova BS et al.** (2009) Identification and validation of suitable endogenous reference genes for gene expression studies in human peripheral blood. *BMC Med Genomics*. 2: 49
- Stan AD, Ghose S, Gao XM, Roberts RC, Lewis-Amezcuca K, Hatanpaa KJ, Tamminga CA** (2006) Human postmortem tissue: what quality markers matter? *Brain Res*, 1123(1): 1-11
- Strand C, Enell J, Hedenfalk I, Fernö M**, (2007) RNA quality in frozen breast cancer samples and the influence on gene expression analysis--a comparison of three evaluation methods using microcapillary electrophoresis traces. *BMC Mol Biol*. 8: 38

- Streit S, Michalski CW, Erkan M, Kleeff J, Friess H** (2009) Northern Blot analysis for detection and quantification of RNA in pancreatic cancer cells and tissues. *Nat Protoc.* 4(1): 37-43
- Sudarsan N, Barrick JE, Breaker RR** (2003) Metabolite-binding RNA domains are present in the genes of eukaryotes. *RNA.* 9(6): 644-7
- Süß B** (2006) RNA-Schalter, *Nachrichten aus der Chemie* 54
- Synnergren J et al.** (2007) Differentiating human embryonic stem cells express a unique house-keeping gene signature. *Stem Cells.* 25: 473-480
- Tai TC, Wong-Faull DC, Claycomb R, Wong DL** (2009) Hypoxic stress-induced changes in adrenergic function: role of HIF1 alpha. *J Neurochem.* 109(2): 513-524
- Takahashi S** (2008) Expression levels of mRNAs for catecholamine biosynthetic enzymes as markers of acute response to contusion stress during the early postmortem period. *Tohoku J Exp Med.* 216(3)
- Takahashi H, Ikematsu K, Tsuda R, Nakasono I** (2009) Increase in dual specificity phosphatase 1, TGF-beta stimulated gene 22, domain family protein 3 and Luc7 homolog (*S. cerevisiae*)-like messenger RNA after mechanical asphyxiation in the mouse lung. *Leg Med (Tokyo).* 11(4): 181-5
- Talaat AM, Howard ST, Hale W 4th, Lyons R, Garner H, Johnston SA** (2002) Genomic DNA standards for gene expression profiling in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nucleic Acids Res.* 30(20): e104
- Tan SC et al.** (2012) Identification of valid housekeeping genes for quantitative RT-PCR analysis of cardiosphere-derived cells preconditioned under hypoxia or with prolyl-4-hydroxylase inhibitors. *Mol Biol Rep.* 39(4): 4857-4867
- Tanic N, Perovic M, Mladenovic A, Ruzdijic S, Kanazir S** (2007) Effects of aging, dietary restriction and glucocorticoid treatment on housekeeping gene expression in rat cortex and hippocampus-evaluation by real-time RT-PCR. *J Mol Neurosci.* 32(1): 38-46
- Terns MP, Terns RM** (2002) Small nucleolar RNAs: versatile trans-acting molecules of ancient evolutionary origin. *Gene Expr.* 10(1-2): 17-39
- Thorsell A, Gruber SH, Mathé AA, Heilig M** (2001) Neuropeptide Y (NPY) mRNA in rat brain tissue: effects of decapitation and high-energy microwave irradiation on post mortem stability. *Neuropeptides.* 35(3-4): 168-73
- Tichopad A, Kitchen R, Riedmaier I, Becker C, Stahlberg A, Kubista M** (2009) Design and optimization of reverse-transcription quantitative PCR experiments. *Clin Chem.* 55(10): 1816-1823



- Tomita H** et al. (2004) Effect of agonal and postmortem factors on gene expression profile: quality control in microarray analyses of postmortem human brain. *Biol Psychiatry*. 55(4): 346-52
- Trabzuni D** et al. (2011) Quality control parameters on a large dataset of regionally-dissected human control brains for whole genome expression studies. *J Neurochem*. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07432.x.
- Tsuji N** et al. (2002) Selection of an internal control gene for quantification of mRNA in colonic tissues. *Anticancer Res*. 22(6C): 4173-4178
- Valencia-Sanchez, MA, Liu J, Hannon GJ and Parker R** (2006) Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes & Dev*, 20, 515-524
- Valente** et al. (2009) Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR. *BMC Mol Biol*. 10: 17
- Valenti MT et al.** (2006) The effect of biphosphonates on gene expression: GAPDH as a housekeeping or a new target gene? *BMC Cancer*. 6: 49
- Vandesompele J** et al. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*. 3 No. 7
- Vawter MP** et al. (2006) Mitochondrial-related gene expression changes are sensitive to agonal-pH state: implications for brain disorders. *Mol Psychiatry*. 11(7): 615, 663-679
- Virkler K, Lednev IK** (2009) Analysis of body fluids for forensic purposes: from laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. *Forensic Sci Int*. 188(1-3): 1-17
- von Heydebreck A, Sperling S, Kaynak B, Lehrach H, Vingron M** (2004) Genexpressionsanalyse komplexer klinischer Phänotypen mittels cDNS-array. *Information Technology*. 1: 26-30
- Wahl MC, Will CL, Lührmann R** (2009) The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell*. 136(4): 701–718
- Wahle E, Keller W** (1996) The biochemistry of polyadenylation. *Trends Biochem Sci*. 21(7): 247-50
- Wansbury O** et al. (2011) Transcriptome analysis of embryonic mammary cells reveals insights into mammary lineage establishment. *Breast Cancer Res*. 13(4):R79
- Watson JD** et al. (1987), *Molecular Biology of the Gene* (4<sup>th</sup> ed). Benjamin / Cummings 1, 704
- Webb JL, Creamer JI, Quickenden TI** (2006) A comparison of the presumptive luminal test for blood with four non-chemiluminescent forensic techniques. *Luminescence* 21(4): 214-220
- Webster MJ** (2006) Tissue preparation and banking. *Prog Brain Res*. 158: 3-14

- Weis S, Llenos IC, Dulay JR, Elashoff M, Martínez-Murillo F, Miller CL** (2007) Quality control for microarray analysis of human brain samples: The impact of postmortem factors, RNA characteristics, and histopathology. *J Neurosci Methods*. 165(2): 198-209
- Werner A, Swan D** (2010) What are natural antisense transcripts good for? *Biochem Soc Trans*. 38(4): 1144-9
- Wienholds E, Plasterk RH** (2005) MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett*. 579(26): 5911-22
- Wierschke S** et al. (2010) Evaluating reference genes to normalize gene expression in human epileptogenic brain tissues. *Biochem Biophys Res Commun*. 403(3-4):385-90.
- Wilusz CJ, Wang W, Peltz SW** (2001) Curbing the nonsense: the activation and regulation of mRNA surveillance. *Genes Dev*. 15(21): 2781-5
- Wilusz CJ, Gao M, Jones CL, Wilusz J, Peltz SW** (2001) Poly(A)-binding proteins regulate both mRNA deadenylation and decapping in yeast cytoplasmic extracts. *RNA*. 7(10): 1416-24
- Wilusz CJ, Wormington M, Peltz SW** (2001) The cap-to-tail guide to mRNA turnover. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2(4): 237-46
- Winkler WC** (2005) Metabolic monitoring by bacterial mRNAs. *Arch Microbiol*. 183(3): 151-9
- Winkler WC, Breaker RR** (2005) Regulation of bacterial gene expression by riboswitches. *Annu Rev Microbiol*. 59:487-517
- Winkler WC, Cohen-Chalamish S, Breaker RR** (2002) An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99(25): 15908-13
- Winkler W, Nahvi A, Breaker RR** (2002) Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature* 419(6910): 952-6
- Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP** (1997) Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*. 22(1): 134-138
- Wong ML, Medrano JF** (2005) **Real-time PCR for mRNA quantification. *Biotechniques* 39(1): 75-85**
- Wu L, Belasco JG** (2008) Let me count the ways: mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*. 29(1):1-7
- Yamaji R, Chatani E, Harada N, Sugimoto K, Inui H, Nakano Y** (2005) Glayceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the extracellular space inhibits cell spreading. *Biochim Biophys Acta*. 1726(3): 261-271

- Yamaji R** et al. (2003) Hypoxia up-regulates glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase in mouse brain capillary endothelial cells: involvement of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger. *Biochim Biophys Acta*. 1593(2-3): 269-276
- Yang IV** (2006) Use of external controls in microarray experiments. *Methods Enzymol*. 411: 50-63,
- Yeom KH, Lee Y, Han J, Suh MR, Kim VN** (2006) Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing. *Nucleic Acids Res*. 34(16): 4622-9
- Zampieri M** et al. (2010) Validation of suitable internal control genes for expression studies in aging. *Mech Ageing Dev*. 131(2): 89-95
- Zakharkin SO, Kim K, Bartolucci AA, Page GP, Allison DB** (2006) Optimal allocation of replicates for measurement evaluation studies. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 4(3): 196-202
- Zhao D, Zhu BL, Ishikawa T, Li DR, Michiue T, Maeda H** (2006) Quantitative RT-PCR assays of hypoxia-inducible factor-1alpha, erythropoietin and vascular endothelial growth factor mRNA transcripts in the kidneys with regard to the cause of death in medicolegal autopsy. *Leg Med (Tokyo)*. 8(5): 258-63
- Zhao D, Zhu BL, Ishikawa T, Quan L, Li DR, Maeda H** (2006) Real-time RT-PCR quantitative assays and postmortem degradation profiles of erythropoietin, vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor 1 alpha mRNA transcripts in forensic autopsy materials. *Leg Med (Tokyo)*. 8(2): 132-6
- Zhao D** et al. (2008) Tissue-specific differences in mRNA quantification of glucose transporter 1 and vascular endothelial growth factor with special regard to death investigations of fatal injuries. *Forensic Sci Int*. 177(2-3): 176-83
- Zhao D, Ishikawa T, Quan L, Michiue T, Thu BL, Maeda H** (2009) Postmortem quantitative mRNA analyses of death investigation in forensic pathology: an overview and prospects. *Leg Med (Tokyo)*.
- Zhang Y, Wei Z, Li YY, Chen Y, Shen W, Lu C** (2009) Transcription level of messenger RNA per gene copy determined with dual-spike-in strategy. *Anal Biochem*. 394(2): 202-8
- Zheng ZJ, Croft JB, Giles WH, Mensah GA** (2001) Sudden cardiac death in the United States, 1989 to 1998. *Circulation*. 104(18): 2158-63
- Zhu BL** et al. (2008) Forensic pathological investigation of myocardial hypoxia-inducible factor-1 alpha, erythropoietin and vascular endothelial growth factor in cardiac death *Leg Med (Tokyo)*. 10(1): 11-9
- Zipes DP, Wellens HJ** (1998) Sudden cardiac death. *Circulation*. 98(21): 2334-51

**Zubakov D, Hanekamp E, Kokshoorn M, van Ijcken W, Kayser M** (2008) Stable RNA markers for identification of blood and saliva stains revealed from whole genome expression analysis of time-wise degraded samples. *Int J Legal Med.* 122(2): 135-42

**Zubakov D, Kokshoorn M, Kloosterman A, Kayser M** (2009) New markers for old stains: stable mRNA markers for blood and saliva identification from up to 16-year-old stains. *Int J Legal Med.* 123(1): 71-4

**Zubakov D, Boersma AW, Choi Y, van Kuijk PF, Wiemer EA, Kayser M** (2010) MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation. *Int J Legal Med.* 124(3): 217-26

## 9 Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Professor Dr. Stefan Pollak, der mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Doktorarbeit am Institut für Rechtsmedizin der Universität Freiburg anfertigen zu können. Neben den für den experimentellen Ablauf der Arbeit erforderlichen Mitteln gewährte er mir Kongressreisen und Seminarbesuche, die meinen Ausbildungsweg entscheidend bereichert und vorangebracht haben. Herzlichen Dank dafür.

Frau Privatdozentin Dr. Sabine Lutz-Bonengel von der Rechtsmedizin der Universität Freiburg sowie Herrn Professor Dr. Georg Krohne vom Biozentrum der Universität Würzburg danke ich vielmals für die Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit.

Ein herzlicher Dank gilt weiterhin meiner Betreuerin Frau Dr. Marielle Vennemann. Ihre beständige und außerordentlich vertrauensvolle Unterstützung und Förderung sowie ihre Forschungsfreude haben mich stets motiviert und mich entscheidend voran gebracht. Ich danke ihr außerdem vielmals für ihre beständige Diskussionsbereitschaft und die intensive Korrektur des Manuskripts.

Frau Professor Dr. Heidi Pfeiffer und Herrn Dr. Toni Fracasso sowie Herrn Dr. Benedikt Vennemann, Thomas Rost und Wolfgang Schmitt danke ich für die zuverlässige und freundliche Kooperation, die fachliche Unterstützung sowie die Hilfe bei der Gewinnung von Probenmaterial.

Weitere herzliche Danksagungen gehen an:

Timo Sänger und Samuel Niepmann für das verlässliche Bestellen und Organisieren der benötigten Reagenzien sowie für die stets geduldige Weiterhilfe und Diskussionsbereitschaft bei technischen und EDV-Problemen.

Jeannette Heizmann und Tanja Wangler für die herzliche und mitfühlende Zusammenarbeit, die vielen lustigen und schönen Momente im Labor und für die Geduld bei der immer wiederkehrenden Frage „Braucht heute jemand die Zentrifuge?“.

Joachim Weisser, Sabine Lutz-Bonengel, Ulrike Schmidt und René Pflugradt danke ich für ihre stets vorhandene Gesprächs- und Hilfsbereitschaft und ihre positive fachliche und moralische Unterstützung bei allen Höhen und Tiefen des Laboralltags.

Besonders danken möchte ich Frau PD Dr. Sabine Lutz-Bonengel und Herrn Professor Dr. Stefan Pollak für die Möglichkeit, nachträglich abschließende Experimente im Freiburger Labor durchführen zu können sowie für ihre zügige und intensive Korrektur des Manuskripts.

Den Kollegen aus der Toxikologie danke ich für die kooperative Zusammenarbeit und die Möglichkeit, verschiedene Messungen in deren Laboren durchführen zu können. Dankeschön sage ich insbesondere Annette Thierauf, Susanne Vogt, Sebastian Dresen, Jürgen Kempf und Mylene Störtzel für die fröhlichen Zusammenkünfte im Gang, beim Sessel, am Herd oder im Kastaniengarten. Das alles hat den Alltag sehr erheitert.

Meinen Freunden Anna, André, Carina, Katrin, Kathi, Miriam, René, Sandra, Sarah, Steffi und Tina danke ich dafür, dass sie immer ein offenes Ohr haben und mich in den bewegenden Momenten der Doktorarbeit aufmunternd und unterstützend begleitet haben.

Herrn Prof. Dr. Bernd Brinkmann, Herrn Dr. Carsten Hohoff sowie allen Kollegen im IFG Münster danke ich für deren Unterstützung und das mir entgegengebrachte Vertrauen. Ohne deren Entgegenkommen sowie die herzliche Aufnahme im neuen Team hätte die Arbeit nicht so schnell fertiggestellt werden können

Den größten Dank richte ich an meine Familie:

An meine Eltern und Großeltern, die mich all die Jahre finanziell unterstützt und die mich trotz der bestehenden räumlichen Entfernung stets emotional getragen und gestärkt haben. Ohne Euch wäre das alles nicht gegangen. Des Weiteren an Ute und Günter für ihre Herzlichkeit. Und schließlich an meinen Flo für die intensive Korrektur des Manuskripts, für sein Verständnis in jeder Hinsicht und dafür, dass er mich glücklich macht.

## 10 Erklärung

Erklärung gemäß § 4 Absatz 3 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg vom 15. März 1999.

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt zu haben. Die aus der Literatur entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht. Des Weiteren erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat. Zuvor habe ich keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Otterfing, im Mai 2012

.....

Antje Huth (geb. Koppelkamm)