

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

**Das Auftreten der 4977 bp Deletion der
mitochondrialen DNA in menschlichem
Herzmuskelgewebe in Abhängigkeit vom
Lebensalter und chronischer Hypoxie**

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

vorgelegt von
Hanne Karen Warnk
aus Hamburg

Lübeck 2006

- 1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr.med. Christoph Meissner**
- 2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Hendrik Bonnemeier**

Tag der mündlichen Prüfung: 20.11.2006

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 20.11.2006

Gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach
- Dekan der Medizinischen Fakultät

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG

1.1	Mitochondriale DNA und Deletionen	7
1.1.1	Mitochondrien	7
1.1.2	Das mitochondriale Genom	9
1.1.3	Theorie der freien Radikale	11
1.1.4	Die 4977 bp Deletion	13
1.2	Herzmuskelgewebe und Deletionen	14
1.3	Degenerative Erkrankungen und Deletionen	15
1.4	Nachweis und Quantifizierung der 4977 bp Deletion	16
1.5	Anwendungsgebiete der Quantifizierung	16
1.5.1	Altersabhängigkeit	16
1.5.2	Myokardiale Ischämie	17
1.6	Zielsetzung	18

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1	Untersuchungsmaterial und DNA-Gewinnung	19
2.1.1	Probenmaterial	19
2.1.2	DNA-Extraktion	20
2.1.3	Quantifizierung der DNA-Extrakte	21

2.2	Nachweis der 4977 bp Deletion mittels PCR	22
2.2.1	Primer	22
2.2.2	Amplifikation der spezifischen Fragmente mittels PCR	22
2.2.3	Auftrennung der Amplifikate mittels Elektrophorese	23
2.2.4	Nachweis mittels Silberfärbung	25
2.3	Quantifizierung der 4977 bp Deletion mit dem ABI PRISM™310 Genetic Analyzer	27
2.4	Statistische Methoden	31
3	ERGEBNISSE	
3.1	Nachweis der spezifischen mitochondrialen Fragmente	32
3.1.1	Undeletierte mtDNA	32
3.1.2	Deletierte mtDNA	32
3.2	Semiquantitative Bestimmung der 4977 bp Deletion in Skelettmuskelgewebe	33
3.3	Semiquantitative Bestimmung der mtDNA in Herzmuskelgewebe	35
3.3.1	Einteilung in Herzregionen	35
3.3.2	Hinterwand des linken Herzventrikels	36
3.3.3	Vorderwand des linken Herzventrikels	37
3.3.4	Rechter Herzventrikel	38
3.3.5	Vergleich der verschiedenen Gewebe	39
3.3.6	Einteilung in Altersklassen	39

3.4	Akkumulation der Deletion bei chronischer Hypoxie	44
4	DISKUSSION	
4.1	Quantifizierungsmethoden	45
4.2	DNA-Mutationen und der Alterungsprozess	47
4.3	mtDNA-Mutationen in Herzmuskulatur	50
4.3.1	Herzmuskelgewebe und der Alterungsprozess	50
4.3.2	mtDNA-Schäden bei myokardialer Hypoxie/Ischämie	53
4.3.3	mtDNA-Schäden bei verschiedenen Kardiomyopathien	55
4.3.4	mtDNA-Schäden bei degenerativen Erkrankungen mit kardialer Beteiligung	57
4.4	mtDNA-Mutationen und Apoptose	58
4.5	Ausblick	60
5	ZUSAMMENFASSUNG	61
6	LITERATUR	63
7	ANHANG	
7.1	Tabellen	76
7.2	Geräte	79
7.3	Chemikalien	80

7.4	Ansatz und Vorbereitung der Lösungen	82
------------	---	----

ABKÜRZUNGEN

ATP	: Adenosintriphosphat
8-OH-dG	: 8-Hydroxy-Desoxyguanosin
bp	: Basenpaare
cm	: Zentimeter
DCM	: dilatative Kardiomyopathie
del	: Deletion
dmtDNA	: deletierte mitochondriale DNA
DNA	: Desoxyribokukleinsäure
dNTP	: Didesoxynukleosid-Triphosphat
FAM	: Farbstoff-Amidit
fg	: Femtogramm
h	: Stunde
HCM:	: hypertrophische Kardiomyopathie
kb	: Kilobasen
mA	: Milliampere
µg	: Mikrogramm
µl	: Mikroliter
µm	: Mikrometer
min	: Minuten
mg	: Milligramm
ml	: Milliliter
mtDNA	: mitochondriale DNA
mW	: Milliwatt
ng	: Nanogramm
OXPHOS	: oxidative Phosphorylierung
PAG	: Polyacrylamidgel
PAGE	: Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PCR	: Polymerasekettenreaktion
pg	: Pikogramm
pmol	: Pikomol
RNA	: Ribonukleinsäure
ROS	: reactive oxygen species (= freie Radikale)
rRNA	: ribosomale RNA
sec	: Sekunden
SIDS	: Sudden Infant Death Syndrome (= plötzlicher Kindstod)
tRNA	: Transfer-RNA
U	: Unit
UV	: Ultraviolett
V	: Volt
W	: Watt
wt	: Wildtyp
wmtDNA	: Wildtyp mtDNA (= undeletierte DNA)

1 EINLEITUNG

1.1. Mitochondriale DNA und Deletionen

1.1.1 Mitochondrien

Die wichtigsten energieliefernden Prozesse aller aeroben Zellen, die nicht Photosynthese betreiben, finden in den Mitochondrien statt (Schmid, 1990). Bei der Zellatmung, bestehend aus Citratzyklus, Elektronentransportkette und oxidativer Phosphorylierung, werden die Produkte des intermediären Stoffwechsels bei Sauerstoffaufnahme zu Kohlendioxid und Wasser abgebaut. Durch die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) wird die hierbei freigesetzte Energie in energiereiche Bindungen (Adenosintriphosphat, ATP) überführt und so gespeichert (Leonhardt, 1990).

Mitochondrien sind ovale Zellorganellen mit einer Länge von ca. 2 μm und einem Durchmesser von etwa 0,5 μm . Sie befinden sich im Zytosol jeder eukaryontischen Zelle (Junqueira & Carneiro, 1991). Mitochondrien besitzen zwei Membransysteme: eine äußere und eine innere Membran. Die innere Membran ist durch eine Anzahl von Einstülpungen gefaltet, die als Cristae bezeichnet werden und der Oberflächenvergrößerung dienen. Somit enthält das Mitochondrium zwei Kompartimente: einen Intermembranraum zwischen der äußeren und der inneren Membran und die Matrix, die den Raum bezeichnet, der von der inneren Membran begrenzt wird (Alberts et al., 1990). Die äußere Membran ist für die meisten Ionen und kleinen Moleküle vollständig permeabel. Die innere Membran hingegen ist für beinahe alle Ionen und polaren Moleküle impermeabel, so dass spezifische Protein-Carrier Moleküle wie langkettige Fettsäuren oder ADP durch die innere Membran transportieren müssen. Die OXPHOS findet in der inneren Mitochondrienmembran statt, im Gegensatz zu den meisten Reaktionen des Citratzyklus und der Fettsäureoxidation, die in der Matrix ablaufen (Stryer, 1990).

Die Anzahl der in einer Zelle enthaltenen Mitochondrien ist abhängig vom Energieverbrauch der Zelle und vom jeweiligen Zelltyp. In einer Zellart ist die Mitochondrienzahl jedoch relativ konstant (Alberts et al., 1990). Am mitochondrienreichsten sind Herz- und Skelettmuskelzellen, Drüsenzellen und Nierenepithelien. Leukozyten und die Zellen des thymolymphatischen Systems enthalten hingegen nur wenige Mitochondrien (Schmid, 1990). Leberparenchymzellen enthalten beispielsweise zwischen 1000 und 2000 Mitochondrien, einige Eizellen über 100000, in Samenzellen finden sich hingegen nur ca. 50 Mitochondrien (Watson et al., 1992).

Mitochondrien gelten als semiautonome Zellorganellen, da sie eigene DNA besitzen und zur Proteinsynthese befähigt sind. Die Kodierung der mitochondrialen Proteine obliegt jedoch zwei unterschiedlichen Genomen: der nukleären und der mitochondrialen DNA. Die genetische Information für die mitochondrialen RNAs und für einige weitere Proteine trägt die mitochondriale DNA (Alberts et al., 1990; Müller-Höcker, 1990; Rödel, 1994).

Die meisten der mitochondrialen Proteine werden von der DNA der Zellkerns kodiert und anschließend aus dem Cytosol in das Mitochondrium transportiert. Ohne diese Proteine wäre das Mitochondrium weder lebens- noch replikationsfähig.

Nach Replikation der mtDNA vermehren sich die Mitochondrien durch Zweiteilung über eine Art Septenbildung (Alberts et al., 1990). Die Teilung erfolgt zwar unabhängig vom Zellzyklus, jedoch verdoppelt sich die Anzahl der Mitochondrien pro Zellzyklus in etwa (Robin & Wong, 1988). Die Verteilung erfolgt gleichmäßig auf Mutter- und Tochterzellen.

Auch in postmitotischen Geweben, also solchen, welche nicht mehr der Zellteilung unterliegen, findet noch eine Replikation der mtDNA statt (Cortopassi & Wang, 1995).

1.1.2 Das mitochondriale Genom

Die humane mitochondriale DNA ist doppelsträngig, zirkulär und in der mitochondrialen Matrix lokalisiert. Pro Mitochondrium finden sich zwei bis zehn DNA-Moleküle, so daß in einer Zelle durchschnittlich 1000 bis 10000 Kopien der mtDNA vorliegen (Müller-Höcker, 1994). Die mitochondriale DNA wird fast ausschließlich maternal vererbt (Gyllensten et al., 1991, Filosto et al., 2003; Taylor et al., 2003), also von der Mutter sowohl auf die weiblichen als auch die männlichen Nachkommen übertragen.

Die mtDNA ist, im Gegensatz zur Kern-DNA, nicht mit Histonen komplexiert und somit auch nicht in Nucleosomen organisiert (Alberts et al., 1990). Sie besteht aus 16569 Basenpaaren, deren Sequenz erstmals komplett 1981 von Anderson und Mitarbeitern entschlüsselt wurde (Anderson et al., 1981).

Die mtDNA wird aus zwei komplementären Strängen, dem H(heavy)- und dem L(light)-Strang gebildet, welche beide einen eigenen, separaten Replikationsursprung besitzen. Den überwiegenden Teil der Gene transkribiert der H-Strang, nur die Gene für einige tRNAs und ein Protein werden vom L-Strang transkribiert (Alberts et al., 1990). Die native mtDNA liegt in einer Überstruktur (Supercoil) vor, offene Ringe (Open Circles) entstehen durch mindestens einen Bruch in einem der beiden DNA-Stränge (Kadenbach & Müller-Höcker, 1990).

Die auf der mtDNA liegenden Sequenzen kodieren für 13 Proteine, die alle Bestandteil der Atmungskette sind, außerdem für zwei rRNAs und 22 tRNAs (Anderson et al., 1981). Das mitochondriale Genom enthält bis auf die D-Loop-Region keine Introns oder andere nicht-kodierende Nukleotide, es ist somit in seinem Informationsgehalt sehr kompakt.

Die ca. 1200 bp lange D-Loop-Sequenz (von displacement = Verschiebung) markiert den Startbereich für den Beginn der Replikation des H-Strangs und die Promoterregionen für die Transkription beider Stränge. Außerdem kommt dieser Region eine regulatorische Bedeutung von Transkription und Translation zu (Clayton, 1991). Die D-Loop-Region kann in über 150 verschiedenen Sequenzpolymorphismen vorliegen (Lutz et al., 1998).

Der genetische Code der mtDNA weicht in vier der 64 Codons vom universellen genetischen Code ab: AGA und AGG stellen in der mtDNA Stopcodons dar, wohingegen sie im Zellkern für Arginin codieren. UGA codiert im Mitochondrium für Tryptophan – im nukleären Genom ist es ein Stopcodon, AUA codiert im mitochondrialen Genom für Methionin, im Kern hingegen für Isoleucin. Der genetische Code der mtDNA variiert außerdem leicht zwischen verschiedenen Organismen (Singer & Berg, 1992). Im Gegensatz zum Cytosol, in dem 31 tRNAs vorkommen, besitzen Mitochondrien nur 22 tRNAs (Alberts et al., 1990).

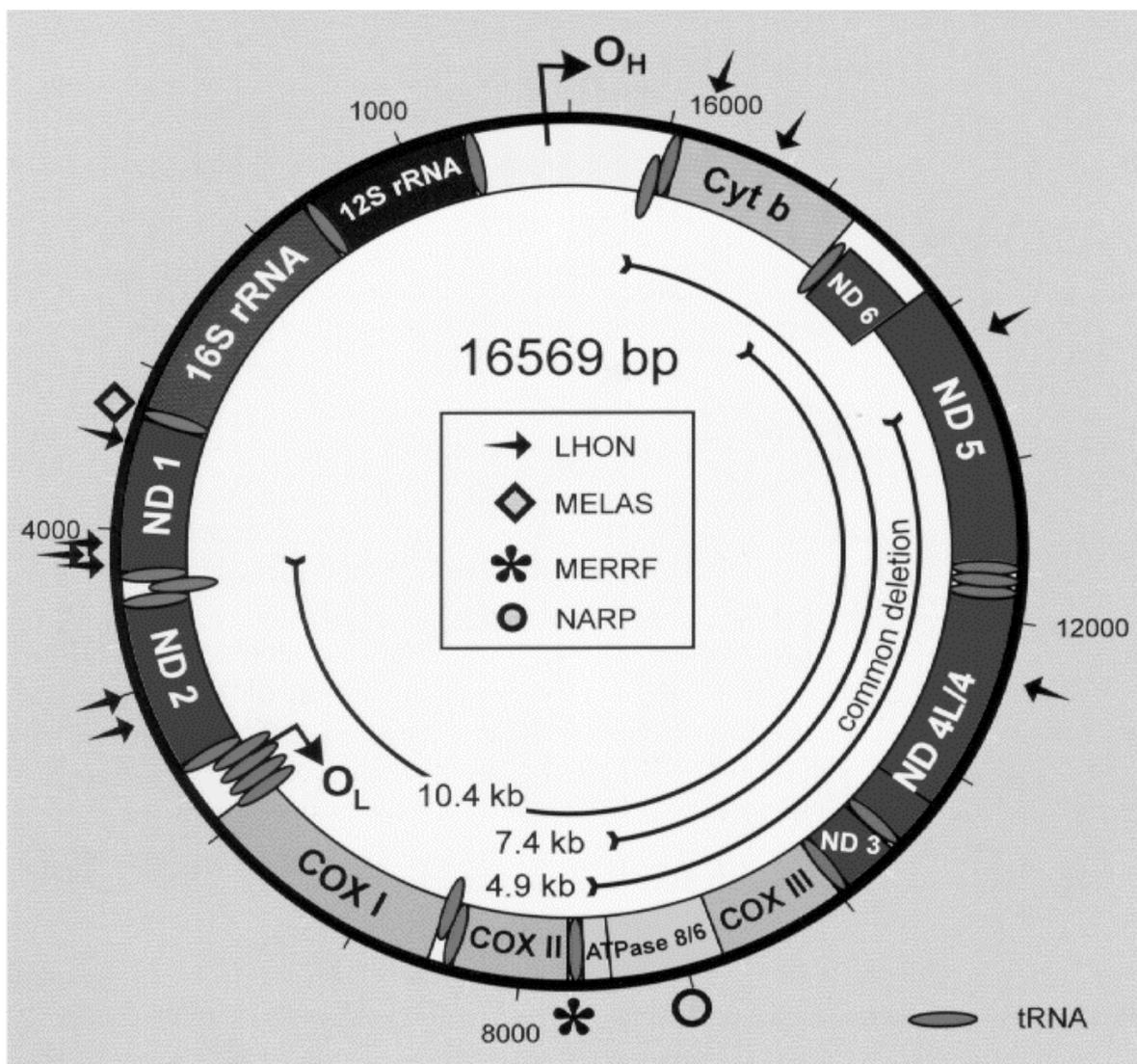


Abb. 1: Das humane mitochondriale Genom. Schematische Darstellung. Gezeigt ist die von Anderson et al (1981) entschlüsselte Karte der mtDNA mit den Ansatzstellen (Ori H und Ori L) für den L- und H-Strang. Es ist der Bereich dargestellt, welcher von der 4977 bp Deletion betroffen ist, und weitere langstreckige Deletionen und Punktmutationen, die zu bestimmten Erkrankungen führen (Reichmann et al., 1996)

1.1.3 Theorie der freien Radikale

90% des vom Körper aufgenommenen Sauerstoffs wird in den Mitochondrien schrittweise in der Atmungskette zu H_2O reduziert. Während dieses Prozesses werden pro Sauerstoffmolekül vier Elektronen zugefügt und die entstehende Energie in Form von ATP gespeichert (Richter, 1995). Bei dieser Reaktion entstehen aus 1-2% des Sauerstoffs die natürlichen Zwischenprodukte Superoxid(O_2^-)- und Hydroxyl(OH^-)-Ionen (Papa, 1996; Yakes & van Houten, 1997). Solche Ionen sind aufgrund ihrer ungepaarten Elektronen hochreaktiv und werden als freie Radikale (reactive oxygen species, ROS) bezeichnet (Luft, 1994). Wenn diese freien Radikale in sehr hohem Maße produziert oder nicht ausreichend durch Antioxidantien neutralisiert werden, können sie in der Zelle Schäden an Membranlipiden, Proteinen, DNA und anderen Makromolekülen verursachen (Luft, 1994; Richter, 1995; Papa, 1996; Yakes & van Houten, 1997).

Durch verschiedene körpereigene Systeme und einige Substanzen kann die normale Synthese von ROS durch die OXPHOS noch verstärkt werden. Zum Beispiel führt die Zerstörung von Zellen während chronischer Infektionen oder verschiedene Schutzmechanismen gegen toxische Substanzen zu einer gesteigerten ROS-Synthese (Ames et al., 1993).

Auch der Abbau von Fettsäuren und anderer Verbindungen in den Peroxisomen (Kasai et al., 1989) sowie Hypoxie- und Reperfusionprozesse (Richter, 1995) können die Bildung von freien Radikalen verstärken.

Zusätzlich zu diesen endogenen Prozesse führen auch einige exogene Noxen, wie z.B. Peroxide und Stickoxide sowie UV-Strahlung, zu einer vermehrten Produktion von ROS in den Mitochondrien (Ames et al., 1990; Gold et al., 1992; Harman, 1992; Fahn et al., 1996; Birch-Machin et al., 1998; Lee et al., 1999).

Durch die räumliche Nähe der mtDNA zu den Enzymen der Atmungskette ist das mitochondriale Genom in besonders hohem Maße den freien Radikalen ausgesetzt. Ausserdem fehlen schützende Histone und effiziente Reparaturmechanismen (Ozawa, 1994).

Die ROS können die mtDNA sowohl an dem Zuckerphosphatgerüst als auch an einzelnen Basen schädigen (Halliwell & Aruoma, 1991). Mutationen treten in der mtDNA ungefähr 10 bis 12mal häufiger auf als in der DNA des Zellkerns und führen aufgrund des Fehlens von Introns immer zu einem veränderten Genprodukt (Linnane et al, 1989; Sugiyama et al., 1991; Miquel, 1992).

Die Schädigung der mtDNA durch freie Radikale kann sich auf verschiedene Weise manifestieren: als Punktmutation (Münscher et al., 1993; Seibel et al., 1995, Nakagawa et al., 1995), Deletion (Hayakawa et al., 1992) oder anderen Rearrangements, wie Duplikationen (Richter, 1995). Somit sind freie Radikale als potentielle intrazelluläre Mutagene anzusehen (Subba Rao & Loeb, 1992). Allerdings weisen Mitochondrien bestimmte Schutzmechanismen gegen den Angriff von freien Radikalen auf, z.B. in Form von Enzymen wie Glutathionperoxidase und Superoxiddismutase. Aber auch Vitamin C und E, Glutathion und Ubichinol-10 dienen der Neutralisation von ROS (Luft, 1994; Richter, 1995). Trotz dieser Antioxidantien sind Schädigungen des mitochondrialen Genoms durch ROS nachweisbar (Richter 1995; Yakes & Van Houten, 1997): Das häufigste dieser oxidativ geschädigten Basen der mtDNA ist das 8-Hydroxy-Desoxyguanosin (8-OH-dG), welches die oxidativ veränderte Form des in intakter DNA vorliegenden Desoxyguanosin ist (Richter, 1988; Ames et al., 1993).

In den von oxidativer Schädigung betroffenen Zellen liegt immer eine Mischung aus geschädigter und intakter mtDNA vor, da nie alle mitochondrialen Genome betroffen sind. Dieser Zustand wird als Heteroplasmie bezeichnet (Gadaleta, 1995; Sobreira et al, 1996).

Rearrangements der mtDNA wie Duplikationen, Punktmutationen und Deletionen können durch die Bildung von 8-OH-dG entstehen. Durch dieses oxidative Basenaddukt können während der Replikation und Transkription Fehlpaarungen mit Adenin entstehen (Kuchino et al., 1987; Shibutani et al., 1991). Außerdem kommt es durch 8-OH-dG zu strukturellen Alterationen der mtDNA, welche eine Trennung der Stränge verursachen können. Die dabei entstehenden Einzelstrangregionen begünstigen während der Replikation das Auftreten von Deletionen (Johns et al., 1989; Mita et al., 1990; Ozawa 1995a; Cahill et al., 1997).

Gehen durch oxidative Schädigung große Fragmente der mtDNA verloren, kommt es zu einem Translationsdefekt und es entstehen defekte Atmungskettenenzyme. Durch die Beeinträchtigung der OXPHOS entstehen vermehrt ROS, welche wiederum zur Schädigung der mtDNA führen. So schließt sich ein *circulus vitiosus* (Papa, 1996). Mit ansteigendem Gehalt an mutierter mtDNA sinkt die mitochondriale Energieproduktion unter einen Schwellenwert, der für eine ungestörte Funktion der Zellen und Gewebe erforderlich ist und es kommt zu klinischen Manifestationen (Li, 1995).

1.1.4 Die 4977 bp Deletion der mtDNA

Oxidativer Stress in Form von ROS kann zu verschiedenen Mutationen der mtDNA, insbesondere zur Entstehung von spezifischen Deletionen führen. Der genaue Mechanismus der Entstehung von Deletionen ist bisher noch nicht geklärt, es ist lediglich bekannt, dass viele der Deletionen von kurzen sequenzgleichen Abfolgen (*direct repeats*) flankiert sind. Diese *direct repeats* weisen in der Regel eine Länge von 12-16 bp auf und sind spezifisch für bestimmte Deletionen. Nach der durch oxidative Schädigung auftretenden Einzelstrangbildung lagern sich die getrennten Stränge vorzugsweise im Bereich der *direct repeats* wieder aneinander. Hierbei entsteht eine Schlaufe, die leicht herausbrechen kann (Ozawa, 1995b; Hou & Wei, 1996).

Es sind über 120 verschiedene Deletionen bekannt, von denen die 4977 bp Deletion am häufigsten vorkommt. Aus diesem Grunde wird letztere auch als „*common deletion*“ bezeichnet (Simonetti et al., 1992; Lee et al., 1994; Wallace, 1995). In vielen verschiedenen Geweben kann die 4977 bp Deletion nachgewiesen werden, sowohl in Biopsiematerial lebender Personen (Simonetti et al., 1992) als auch in postmortal entnommenen Proben (Cortopassi & Arnheim, 1990; Meißner et al., 1997).

Als Angriffspunkt für die Entstehung dieser Deletion dienen wahrscheinlich zwei 13 bp lange *direct repeats*, welche den Bereich der 4977 bp Deletion flankieren. Diese Regionen bezeichnet man auch als „*hot spots*“, sie liegen im Bereich der

bp-Positionen 8470-8482 und 13447-13459 der mtDNA (Mita et al., 1990; Hou & Wei, 1998).

Nachgewiesen werden konnte die 4977 bp Deletion im Probenmaterial gesunder Probanden bisher im Skelettmuskel (Hsieh et al., 1990), Gehirn (Cortopassi & Arnheim, 1990), in Haarfollikeln (Kao et al., 1997), in der Lunge (Fahn et al., 1996; Lee et al., 1999), in der Haut (Yang et al., 1994; Birch-Machin, 1998; Liu et al., 1998a; Lu et al., 1999), im Knochen (Papiha et al., 1998), in Spermien (Kao et al., 1995; Kao et al., 1998), in Ovarien (Kitagawa et al., 1993) in der Plazenta (Kurauchi et al., 1995) und in Photorezeptorzellen der Retina (Barron et al., 2001). Auch konnte die 4977 bp Deletion inzwischen in Blut und einzelnen Blutzellen nachgewiesen werden (Gattermann et al., 1995; von Wurmb et al., 1998, Meißner et al., 2000; Mohamed et al., 2004).

1.2 Herzmuskelgewebe und Deletionen

In Herzmuskelzellen machen Mitochondrien 20-40% des zellulären Volumens aus, da das Herzmuskelgewebe aufgrund seiner ständigen Aktivität in Form des Herzschlages einen besonders hohen Energiebedarf hat (Marin-Garcia et al., 2000). Die OXPHOS stellt die hierfür notwendigen Energieträger bereit. Es entstehen in Folge aber auch größere Mengen freier Radikale, welche die Zelle und die mtDNA schädigen können.

Einige der Deletionen mitochondrialer DNA finden sich bei Patienten mit mitochondrialer Kardiomyopathie und bei gesunden älteren Probanden, die an einer gefäßunabhängigen kardialen Dysfunktion (Presbykardie) leiden. Hieraus leitet sich die Vorstellung ab, dass es mit zunehmendem Alter zum unvermeidlichen mitochondrialen Herzmuskelschaden kommt. Werden dieselben Veränderungen bereits in jugendlichem Alter im Myokard nachweisbar, könnte dies einem beschleunigten Alterungsprozess des Myokards entsprechen. Dieser kann durch zahlreiche endogene (genetische Faktoren, Autoimmunprozesse) oder

exogene Noxen wie Virusinfekte, Toxine, Medikamente oder Sauerstoffradikale ausgelöst und unterhalten werden (Ozawa, 1994).

1.3 Degenerative Erkrankungen und Deletionen

Bei den Erkrankungen, welche mit Mutationen des mitochondrialen Genoms einhergehen, stehen Kardiomyopathien, Myopathien, Enzephalomyopathien, Endokrinopathien und Hepatonephropathien im Vordergrund. Zahlreiche Studien zeigten eine Assoziation von bestimmten mitochondrialen Mutationen mit dem Auftreten von degenerativen Myo- und Enzephalomyopathien (Wallace, 1992; Moraes et al., 1995; Suomalainen, 1997; Schon et al., 1997).

Als Ursache für diese Gewebespezifität kann die Tatsache angesehen werden, dass die genannten Organe in hohem Maße von der Energiegewinnung mittels OXPHOS abhängig und somit in ihrer Funktion bei Schädigung der mtDNA beeinträchtigt sind.

An klinischen Krankheitsbildern, bei denen die 4977 bp Deletion bei über 50% der mtDNA-Genome nachweisbar ist, sind das Kearns-Sayre-Syndrom (Poulton et al., 1991; Fischel-Ghodsian et al., 1992; Kim & Chi, 1997; Fromenty, 1997), die chronisch progressive externe Ophthalmoplegie (Bohlega et al., 1996) und das *Pearson`s marrow / pancreas syndrome* (Smith et al., 1995) bekannt. Viele andere Myopathien sind mit Punktmutationen des mitochondrialen Genoms assoziiert, wie beispielsweise Leber`s hereditary optic neuroretinopathy (LHON), mitochondrial encephalomyopathy, lactat acidosis, stroke like episodes (MELAS), und myoclonic epilepsy with ragged red fibres (MERRF) (Wallace, 1992; Suomalainen, 1997).

Auch bei der Pathogenese verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen scheinen mitochondriale Deletionen eine Rolle zu spielen: Bei der amyotrophen Lateralsklerose (ALS) (Rosen et al., 1993), der Chorea Huntington (Browne et al., 1997), dem Morbus Alzheimer (Parker et al., 1990) und bei Morbus Parkinson (Ozawa et al., 1990a) konnte eine erhöhte Deletionsrate sowie eine Abnahme der Enzymaktivität der OXPHOS nachgewiesen werden.

Bei einigen anderen Erkrankungen konnte ebenfalls eine Assoziation mit Schädigungen der mtDNA gezeigt werden, hierzu gehören z.B der Diabetes mellitus (Ballinger et al., 1992), Polymyalgia rheumatica (Reynier et al., 1993), Multiple Sklerose (Kalman et al., 1996), Arteriosklerose (Bankson et al., 1993) und die Leberzirrhose (Yamamoto et al., 1992).

Auch wird von vielen Autoren ein Zusammenhang von mitochondrialen Mutationen und der Entstehung bestimmter Tumorerkrankungen postuliert (Richter, 1998; Toyokuni et al., 1995; Bianchi et al., 1995; Ozawa 1995b).

1.4 Nachweis und Quantifizierung der 4977 bp Deletion

Bevor die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) als spezifische Nachweismethode für geringe DNA-Mengen zum Einsatz kam, konnte die 4977 bp Deletion nur mit Hilfe des Southern-Blots detektiert und quantifiziert werden (McShane et al., 1991). Hierfür sind allerdings größere Mengen deletierter DNA erforderlich, so dass diese Methoden für den Deletionsnachweis bei gesunden Probanden zu wenig sensitiv ist (Zhang et al., 1996). Der Nachweis der deletierten mtDNA mittels PCR ist empfindlicher, außerdem schneller und spezifischer für einzelne Deletionen anzuwenden (Zhang et al., 1992). Es sind verschiedene Methoden entwickelt worden, mit Hilfe derer der Anteil der 4977 bp Deletion an der mtDNA relativ genau bestimmt werden kann (Hamblet & Castora, 1995).

1.5. Anwendungsgebiete der Quantifizierung

1.5.1 Altersabhängigkeit

Mit steigendem Lebensalter nimmt auch der Anteil der von der 4977 bp Deletion betroffenen mtDNA an der gesamten mtDNA zu (Cortopassi & Arnheim, 1990; Lee

et al., 1994). Jedoch zeigt diese Altersabhängigkeit der Deletion eine erheblich unterschiedliche Ausprägung zwischen verschiedenen Geweben.

In postmitotischen Geweben, wie Skelett- und Herzmuskel oder Hirngewebe ist der Anteil der Deletion besonders hoch (Cortopassi & Arnheim, 1990; Zhang et al., 1992). Hingegen finden sich in mitotisch aktiven Geweben wie Leber oder Hoden nur vergleichsweise geringe Mengen der 4977 bp Deletion (Yen et al., 1991; Simonetti et al., 1992; Lee et al., 1994). Bei Feten und gesunden Neugeborenen ist die Deletion nicht nachzuweisen (Cortopassi & Arnheim, 1990; Yen et al., 1991; Zhang et al., 1992), ab dem Alter von 20 Jahren wird sie detektierbar (Zhang et al., 1992; Hsieh et al., 1994) und nimmt danach mit steigendem Lebensalter kontinuierlich zu. Bei über 70-jährigen werden die höchsten Werte gemessen (Lee et al., 1994; Melov et al., 1995; Liu et al., 1998b).

Umgekehrt zur 4977 bp Deletion verhält sich die Aktivität der Atmungskettenenzyme, welche mit dem Alter abnimmt (Trounce et al., 1989; Hsieh et al., 1994; Cortopassi & Wang, 1995; Kopsidas et al., 1998). Ebenso kommt es zu einer Aktivitätsabnahme der Enzyme, welche eine Neutralisation von freien Radikalen bewirken (Wei et al., 1998c; Lu et al., 1999).

1.5.2 Myokardiale Ischämie

Myokardiale Ischämie bezeichnet einen Zustand, der durch einen aufgehobenen Blutfluss in den Koronargefäßen verursacht wird und zur einer Verminderung der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung führt.

In der Herzmuskulatur können wiederholte Episoden koronarer Ischämien zu hypoxischen Schäden und damit zu einer Akkumulation von deletierter mtDNA führen (Fouret et al., 1994). Dazu passend wird in ischämisch geschädigter Herzmuskulatur auch eine Abnahme der OXPHOS beobachtet (Corral-Debrinski et al., 1991)

1.6 Zielsetzung

In dieser Arbeit soll das Auftreten der 4977 bp Deletion der mtDNA in Herzmuskelgewebe untersucht werden. Es soll überprüft werden, ob sich in postmortal entnommenem Herzmuskelgewebe akut verstorbenen herzgesunder Personen eine Korrelation der Deletionsmenge mit dem Lebensalter findet.

Auch sollen physiologische Normwerte für den Anteil der 4977bp Deletion am mitochondrialen Genom in verschiedenen Altersklassen erstellt werden.

Ferner soll untersucht werden, ob die Menge an deletierter mtDNA innerhalb der verschiedenen Herzregionen Unterschiede aufweist und wie sich der Deletionsanteil im Vergleich zum Auftreten der Deletion im Skelettmuskel verhält.

Eine Assoziation des Auftretens der 4977 bp Deletion mit einer hypoxischen Myokardschädigung soll beispielhaft an 10 Fällen untersucht werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Untersuchungsmaterial und DNA-Gewinnung

2.1.1 Probenmaterial

Von Obduktionen der Jahre 1998, 1999 und 2000 wurden jeweils ca. 200 mg Herzmuskelgewebe, frei von sichtbarem Fett- oder Bindegewebe, bei 50 Individuen aus drei verschiedenen Regionen des Herzens entnommen.

Abschnitt a: Hinterwand des linken Ventrikels

Abschnitt b: Vorderwand des linken Ventrikels

Abschnitt c: Rechter Ventrikel

Zusätzlich wurden ca. 200 mg Skelettmuskelgewebe (M. iliopsoas) entnommen.

Der Tod trat bei den ausgewählten Fällen akut oder perakut ein und es lag kein pathologischer Herzbefund vor. Auch fanden sich bei den ausgewählten Personen keine Anzeichen für das Vorliegen einer mitochondrialen Erkrankung.

Die Menge der 4977 bp Deletion bei Auftreten von Hypoxie/Ischämie wurde exemplarisch an Herzmuskelgewebe von 11 Individuen untersucht. Hierbei handelte es sich ausschließlich um Fälle, bei denen im Sektionsprotokoll die Diagnose „hochgradige Koronaratherosklerose“ gestellt wurde.

Das untersuchte Gewebe stammte hierbei aus der Vorderwand des linken Ventrikels. Dieser wird bei den meisten Individuen durch den Ramus interventrikularis anterior der A. coronaria sinistra versorgt, dieses Gefäß ist in der Regel am stärksten von atherosklerotischen Veränderungen betroffen.

Ferner wurde bei 11 altersgleichen herzgesunden Kontrollpersonen aus der gleichen Region Myokardgewebe entnommen.

Die Liegezeit betrug vor Probenentnahme maximal 48 Stunden; Leichen mit bereits eingetretener Fäulnis wurden nicht berücksichtigt.

Sämtliche Proben wurden direkt nach der Entnahme bei – 70 °C tiefgefroren und anschliessend bis zur Verarbeitung bei –20 °C gelagert.

Die 50 Proben werden nach dem Lebensalter in neun Gruppen eingeteilt:

- Gruppe 1: 0-9 Jahre**
- Gruppe 2: 10-19 Jahre**
- Gruppe 3: 20-29 Jahre**
- Gruppe 4: 30-39 Jahre**
- Gruppe 5: 40-49 Jahre**
- Gruppe 6: 50-59 Jahre**
- Gruppe 7: 60-69 Jahre**
- Gruppe 8: 70-79 Jahre**
- Gruppe 9: 80-102 Jahre**

2.1.2 DNA-Extraktion

Die Extraktion der DNA wurde bei allen Proben mit dem Extraktionskit Super Quick Gene 1 (IMMUCOR, Roedermark) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierzu wurden je 200 mg Gewebe zerkleinert und nach Zugabe von 1,5 ml WBC-Puffer (Leukozytenlyspuffer) 30 s geschüttelt und noch 20µl 1 M Dithiotreitol (DTT) hinzugefügt.

Es folgte eine zweistündige Inkubation im Wasserbad bei 55°C. Im Anschluss wurden 200µl 10%iges SDS und 0,5 ml Protein präzipitierendes Reagenz (PpR) beigegeben und 30 s kräftig durchmischt. Danach folgte eine erneute einstündige Inkubation im Wasserbad (s.o.). Nach Zentrifugieren (5300 upm, 20°C, 20 min.) wurde der klare, DNA-haltige Überstand in ein neues Röhrchen überführt. Es wurden 2 Volumenanteile (ca. 5 ml) absoluter Ethanol hinzugefügt, nach vorsichtigem Schwenken wurde ein fädiges DNA-Präzipitat sichtbar. Dieses wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt, der Überstand wurde ebenfalls auf Eppendorf-Gefäße verteilt und erneut zentrifugiert (13000 upm, 4°C, 5 min.). Der Überstand wurde verworfen, die Gefäße mit jeweils 1 ml 70%igem Ethanol aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Der ethanolhaltige Überstand wurde wiederum verworfen und

die DNA-haltigen Pellets für 20 min. bei 40°C getrocknet. Schließlich wurden die Pellets in 1 ml 1xTE-Puffer resuspendiert und die Proben bei 4°C gelagert.

2.1.3 Quantifizierung der DNA-Extrakte

Die extrahierte DNA wurde zunächst photometrisch quantifiziert. Die photometrische Messung gibt Auskunft über die DNA-Konzentration und den Reinheitsgrad der Proben; Verunreinigungen durch Proteine oder Lösungsmittel können erkannt werden. Es wurde ein Spektralphotometer mit einer Deuteriumlampe eingesetzt, die Nachweisgrenze liegt etwa bei 10 µg / ml (Dr. Lange, Bremen).

Bis zur Quantifizierung mit dem Slotblot wurden die Proben bei 4°C im Kühlschrank gelagert, danach wurden sie bis zum Einsatz in der PCR bei -20°C eingefroren.

Eine präzisere Quantifizierung der extrahierten DNA wurde mit dem humanspezifischen Slotblot durchgeführt. Diese Methode beruht auf der Immobilisierung der denaturierten DNA auf einer positiv geladenen Nylonmembran (Roche, Mannheim). Hierfür wurde der Bio-Dot-SF Microfiltration Apparatus (Bio-Rad, München) verwendet. Anschließend wurde mit einer markierten humanspezifischen Sonde (D17Z1; GIBCO BRL, Gaithersburg, MA, USA) nach Angaben des Herstellers eine Hybridisierung durchgeführt. Die Sonde ist komplementär zu einer Sequenz auf Chromosom 17 und mit alkalischer Phosphatase markiert. Mit einem Chemilumineszenzfarbstoff (LumiPhos Plus) wurde die Sonde auf der Membran detektiert, und durch Schwärzung (Bande) eines Röntgenfilms sichtbar gemacht.

Zusätzlich zu den zu quantifizierenden Proben wurde eine Standardverdünnungsreihe mit definierten DNA-Konzentrationen (K562 DNA 0,2 ng bis 40 ng) auf die Membran aufgetragen. Durch Vergleich der Intensität der Schwärzung von Proben und Standards kann eine Quantifizierung der Proben durchgeführt werden.

Die Nachweisgrenze der Slot-Blot-Messung liegt bei 200 pg DNA.

2.2 Nachweis der 4977 bp Deletion mittels PCR

2.2.1 Primer

Der Nachweis der intakten oder deletierten mtDNA erfolgte mittels PCR nach einem modifizierten Protokoll nach Lee et al (1994). Mit dem Primerpaar Mit1F/Mit2R wird ein 113 bp großes spezifisches Fragment der undeletierten mtDNA amplifiziert. Die Primer haben eine Länge von 18 bzw. 23 bp (Tabelle 1).

Das Primerpaar Alt1F / Alt2R flankiert den Bereich, in dem die 4977 bp Deletion auftritt. Liegt keine Deletion vor, befindet sich zwischen den beiden Alt-Primern ein Abschnitt mit einer Länge von mehr als 5 kbp. Unter den eingesetzten Bedingungen kann ein Fragment dieser Größe aufgrund unzureichender Extensionszeit nicht amplifiziert werden. Ist die in der PCR eingesetzte mtDNA von der 4977 bp Deletion betroffen, fehlt dieser gesamte Abschnitt und es kann ein deletionsspezifisches Fragment von 123 bp Länge amplifiziert werden. Die deletionsspezifischen Primer haben eine Länge von 26 bzw. 24 bp.

Alle Primer wurden von der Firma MWG Biotech synthetisiert und mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) gereinigt.

Die lyophilisierten Primer wurden in 1x TE-Puffer gelöst, so dass eine Endkonzentration von 100 µM erreicht wurde. Die Primer wurden als Primer-Mix in Aliquots von je 20 µl in Eppendorfgefäßen bei -20°C gelagert. Durch das Aliquotieren sollte sichergestellt werden, dass die Primer nicht durch häufiges Auftauen und Einfrieren degradieren. Außerdem bietet das Aliquotieren Schutz vor Kontamination, weshalb auch andere in der PCR eingesetzte Reagenzien aliquotiert wurden (dNTP's, TMAC, DMSO, aqua bidest.)

2.2.2 Amplifikation der spezifischen Fragmente mittels PCR

Für die PCR wurde ein Mastermix angesetzt, welcher alle nötigen Reagenzien bis auf die Template-DNA enthält. Diese Methode minimiert das

Kontaminationsrisiko, erleichtert das Pipettieren und erhöht die Konstanz der Ergebnisse innerhalb einer Versuchsreihe.

Zur Amplifikation der mtDNA wurde Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe) eingesetzt.

Der PCR-Ansatz für eine Probe ist dem Anhang zu entnehmen.

Es wurden 10 µl der DNA-Lösung (1ng/µl) in die Reaktionsgefäße (0,2 ml; PE Biosystems, Weiterstadt) vorgelegt, dann 15 µl des Mastermixes hinzugefügt, so dass ein Endvolumen von 25 µl pro Probe in die PCR eingesetzt wurde.

Zusätzlich zu den DNA-Proben wurden bei jedem Lauf eine positive und eine negative Kontrollprobe mitgeführt. Als Positivkontrolle diente eine Skelettmuskel-DNA-Probe einer alten Person, welche das nachzuweisende Fragment sicher enthält. Als Negativkontrolle wurde steriles aqua dest. eingesetzt.

Zur Durchführung der PCR wurden der 2400 und der 9600 GeneAmp PCR System Thermocycler (PE Biosystems, Weiterstadt) verwendet.

2.2.3 Auftrennung der Amplifikate mittels Elektrophorese

Die in der PCR generierten Amplifikate wurden mit einer Gelelektrophorese dargestellt. Unter Elektrophorese versteht man eine Methode, die sich die Eigenschaft geladener Teilchen in einem elektrischen Feld zu wandern, zu Nutze macht. Bei Nukleinsäuren entstehen diese Ladungen durch das Vorhandensein ionisierbarer Gruppen.

In dieser Arbeit wurde mit Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) gearbeitet, da Polyacrylamidgele besonders zur Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten, geeignet sind, welche kleiner als 500 bp sind.

Bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wird Acrylamid verwendet, das in wässriger Lösung und in Gegenwart von freien Radikalen zu langen Ketten polymerisiert.

Die Porengröße der Gelmatrix kann den aufzutrennenden Fragmenten entsprechend sehr genau eingestellt werden, und wird durch die Konzentration der

einzelnen Komponenten (totale Monomerkonzentration % T und Crosslinkerkonzentration % C) festgelegt.

Es wurden Gele mit einem Format von 24 cm x 12 cm und einer Dicke von 0,4 mm mit einer Konzentration von 7,5 % Acrylamid / 2,5 % Bisacrylamid und 60 mM Formiat eingesetzt. Zudem wurden pro Gelansatz 80 µl Bromphenolblau zugegeben, wodurch die Lauffront besser erkennbar wurde.

Die Gellösung wurde zwischen 2 Glasplatten gegossen, eine Gelbondfolie diente als Trägermaterial („Flaptechnik“, Haas et al, 1994). Zwei Lagen Dymoband definierten die Dicke des Gels und dienten als Randbegrenzung. Das Gel polymerisierte 30 min lang aus, danach war es sofort einsetzbar.

Das Gel wurde mit der Gelbondfolie nach unten mit etwas aqua bidest auf die Keramikplatte der Elektrophoresekammer aufgebracht. Ein 1 cm breiter und 20 cm langer Blottingpad-Streifen diente als Anode, ein 3%iger Agarosegelstreifen mit den gleichen Abmessungen als Kathode. Anschließend wurden die Probenapplikationsstücke (application pieces, PHARMACIA, Erlangen) unterhalb der Kathode auf das Gel aufgelegt. Je 8 µl des Amplifikats und 5 µl der Leiter (pUC19) wurden auf die Applikationsstücke pipettiert, anschließend wurden die Elektroden auf die Streifen gelegt und die Elektrophorese gestartet.

Die Elektrophorese lief mit 1000 Volt, 50 mA und 25 Watt bei einer Temperatur von 15 °C für ca. 60 min.

2.2.4 Nachweis mittels Silberfärbung

Die elektrophoretisch aufgetrennten Amplifikate wurden mit einer modifizierten Silberfärbung nach Bassam et al. (1991) und Sanguinetti et al. (1994) detektiert.

Nach Ende der Laufzeit wurde das Gel der Elektrophoresekammer entnommen und 7 min in 1%-iger Salpetersäure geschwenkt. Nachdem sich die Lauflinie gelb verfärbt hatte, wurde kurz mit aqua bidest gewaschen und anschließend die Färbung mit 0,2%-iger Silbernitratlösung durchgeführt.

Nach 20 min wurde die Silberlösung abgegossen und das Gel ca. 3 min in aqua bidest geschwenkt, um überschüssiges Silber abzuwaschen. Dann wurden die Banden mit Dinatriumcarbonatlösung (0.28M Na₂CO₃,) sichtbar gemacht. Wenn alle Banden und die Leitern gut zu erkennen waren, wurde erneut mit aqua bidest gespült und anschließend 5 min in 10%-iger Essigsäure fixiert.

Nach der Fixierung wurde die Essigsäure verworfen, anschließend wurde das Gel für 10 min in aqua bidest gewaschen. Das Gel wurde über Nacht in 15%-igem Glycerol geschwenkt und danach mehrere Stunden getrocknet. Nach Abkleben mit einer Fotokopierfolie eignete es sich zur beliebig langen Aufbewahrung (Abb.10).

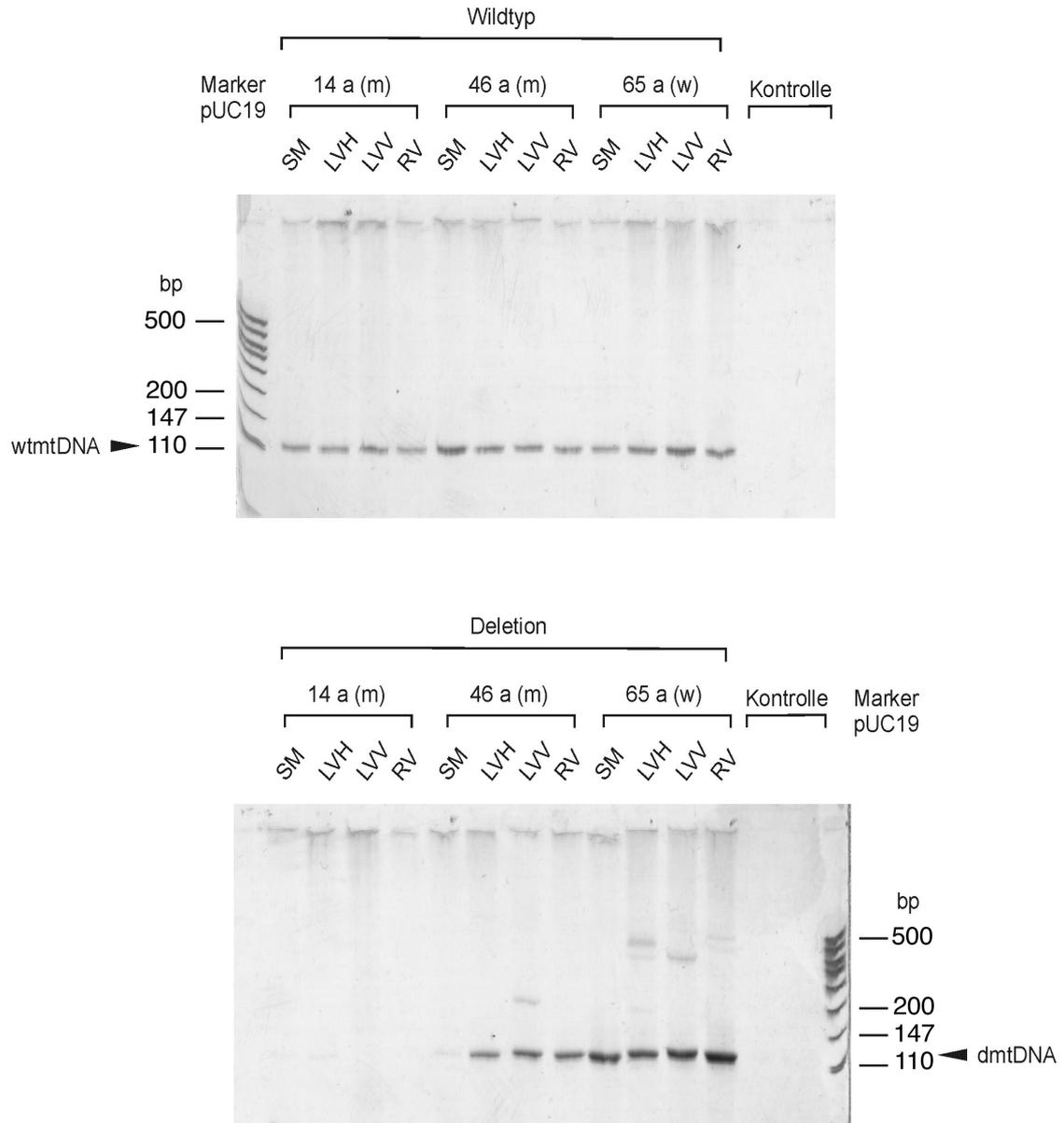


Abbildung 2: Dargestellt sind die Polyacrylamidgele nach Elektrophorese und Silberfärbung für die wildtyp- und deletionsspezifischen Amplifikate aus den verschiedenen Geweben für drei verschiedene Individuen von 14, 46 und 65 Jahren sowie Negativkontrolle und die Leiter pUC19. SM = Skelettmuskel, LVH = linker Ventrikel Hinterwand, LVV = linker Ventrikel Vorderwand, RV = rechter Ventrikel.

2.3 Quantifizierung der 4977 bp Deletion mit dem ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer

Theoretisch verdoppelt sich bei jedem Zyklus der PCR die Ausgangsmenge der Amplifikate. Dieser exponentielle Anstieg erlaubt semiquantitative Messungen.

In der Praxis ist diese optimale Vermehrung allerdings nicht zu erreichen. Statt dessen wird bei quantitativen Messungen von einer bestimmten Amplifikationseffizienz ausgegangen, deren Wert sich aus der Größe des Amplikons ergibt und um so höher ist, je kleiner das zu amplifizierende Fragment ist.

Die Sensitivität der Quantifizierung der PCR-Produkte kann durch den Einsatz eines computergesteuerten Analysegerätes im Vergleich zur früher eingesetzten kinetischen PCR erheblich gesteigert werden. In dieser Arbeit wurde der ABI PRISM™310 Genetic Analyzer verwendet. ABI Prism™ Systeme sind mikroprozessorgesteuerte Elektrophorese- und Fluoreszenzdetektionssysteme, welche aus Hardware (Computer für die Datenaufnahmen und Systemsteuerung) und Software (Datenanalyse) bestehen.

Es werden fluoreszenzmarkierte Primer verwendet, wobei im Gerät dann eine kapillarelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate stattfindet. Diese werden von einem Laserstrahl abgetastet und die relative Fluoreszenzstärke vom angeschlossenen Rechner als Flächenintegral unter einer Kurve dargestellt. Um eine absolute Quantifizierung zu erreichen, ist das Mitführen interner Standards mit bekanntem DNA-Gehalt erforderlich. Zur Bestimmung des deletierten Anteils an der gesamten mtDNA kann die Wildtyp-mtDNA bei gleichzeitiger Amplifikation unter identischen Bedingungen als Amplifikationskontrolle angesehen werden.

Die Elektrophorese erfolgt im ABI Prism™310-System in Kapillaren von 50 µm Durchmesser, welche vor jedem Lauf mit einem Trenn-Polymer gefüllt werden. Die Detektion erfolgt mit einem 10 mW Argonlaser, dessen Emissionswellenlänge zwischen 488 nm und 514,5 nm liegt. Der Laserstrahl ist auf ein Glasfenster der Kapillare gerichtet.

Unter denaturierenden Bedingungen werden die markierten DNA-Fragmente in der Kapillare der Größe nach aufgetrennt. Erscheint das markierte Fragment in dem Bereich, auf welchen der Laserstrahl gerichtet ist, wird es zur Aussendung von Fluoreszenzstrahlung angeregt. Diese trifft auf eine Fokussierlinse, anschließend wird das Licht prismatisch aufgespalten und die Daten von einer CCD-Kamera (Charge-Coupled-Device) aufgenommen. Die Daten werden dann zu einem Apple Power-Macintosh Computer weitergeleitet, wo sie von der GeneScan-Software analysiert und ausgewertet werden können (Mertes, 1997). Die Menge und die Größe der gemessenen Fragmente werden graphisch als Elektropherogramme dargestellt. Zur genauen Quantifizierung ermittelt der Rechner das Flächenintegral unter der Kurve.

Damit ein DNA-Fragment mit dem ABI Prism™310-System erfaßt werden kann, muss ein in der PCR verwendeter Primer mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markiert werden. Die Forward-Primer für das wildtyp- und das deletionsspezifische Fragment wurden von der Firma Applied Biosystems mit dem Farbstoff-Amidit (FAM) am 5' - Ende markiert. Die chromophore Struktur der [F]-Amidite 6-FAM besteht aus 6-Carboxyfluoreszein. Der Farbstoff ist gegenüber den Bedingungen, welche im Laufe einer PCR auftreten, stabil, so dass nach der Amplifikation die Zielsequenzen an den 5' -Enden einen Fluoreszenzfarbstoff tragen (Applied Biosystems, Handbuch 1997).

Pro Probe wurden für die Messung 13,8 µl Formamid und 0,2 µl Größenstandardlösung (GeneScan ROX 350; PE BIOSYSTEMS, Weiterstadt) benötigt, welche als Mastermix für die gesamte Probenzahl hergestellt wurden. Die Standardlösung enthält neun verschiedene Größenstandards von 50 bp bis 500 bp Größe zur Fragmentgrößenbestimmung. Es wurden je 14 µl des Mastermix in 0,5 ml Genetic Analyzer Sample Tubes (PE BIOSYSTEMS, Weiterstadt) vorgelegt und je 1 µl des deletionsspezifischen- und des wildtypspezifischen Amplifikates hinzupipettiert. Die Röhrchen wurden mit Gummisepta verschlossen und die DNA durch Erhitzen für drei Minuten auf 94°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben auf 4°C abgekühlt.

Die so vorbereiteten Proben wurden in den ABI PRISM™ Genetic Analyzer (PE BIOSYSTEMS, Weiterstadt) eingesetzt und das Gerät den Herstellerangaben entsprechend kalibriert. Dann wurde mit dem Meßvorgang begonnen, die Messung einer einzelnen Probe dauert in etwa 25 min. Pro Messvorgang können maximal 48 Proben analysiert werden.

Zur Quantifizierung der 4977 bp Deletion wurde mittels der GeneScan Analysis Software 2.0 des ABI PRISM™ Genetic Analyzers das Flächenintegral unter den Kurven für die fragmentspezifischen Peaks für Wildtyp und Deletion computergestützt errechnet. Nach Messung der PCR-Produkte im ABI PRISM™ Genetic Analyzer wurde der Quotient aus den Integralen für die wildtyp- und deletionspezifischen Fragmente ermittelt.

Der errechnete Zahlenwert muss mit einem Korrekturfaktor multipliziert werden, welcher sich aus der Länge der Fragmente, der Amplifikationseffizienz und der Anzahl der durchlaufenen PCR-Zyklen ergibt (Abb. 11).

Die Amplifikationseffizienz wurde in Vorversuchen anhand einer kinetischen PCR ermittelt, sie lag bei 20 unabhängigen Messungen bei ca. 1,96.

Demnach kann der Anteil der 4977 bp Deletion mit der folgenden Formel berechnet werden (Mohamed et al., 2004):

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

f(dmtDNA): *Frequenz der 4977 bp Deletion*

A_{dmt}: *Flächenintegral der Kurve des deletionsspezifischen Peaks*

A_{mt}: *Flächenintegral der Kurve des wildtypspezifischen Peaks*

CD_{dmt}: *Anzahl der PCR-Zyklen zur Detektion des spezifischen Fragmentes der 4977 bp Deletion*

CD_{mt}: *Anzahl der PCR-Zyklen zur Detektion des spezifischen Fragmentes der intakten mtDNA*

.

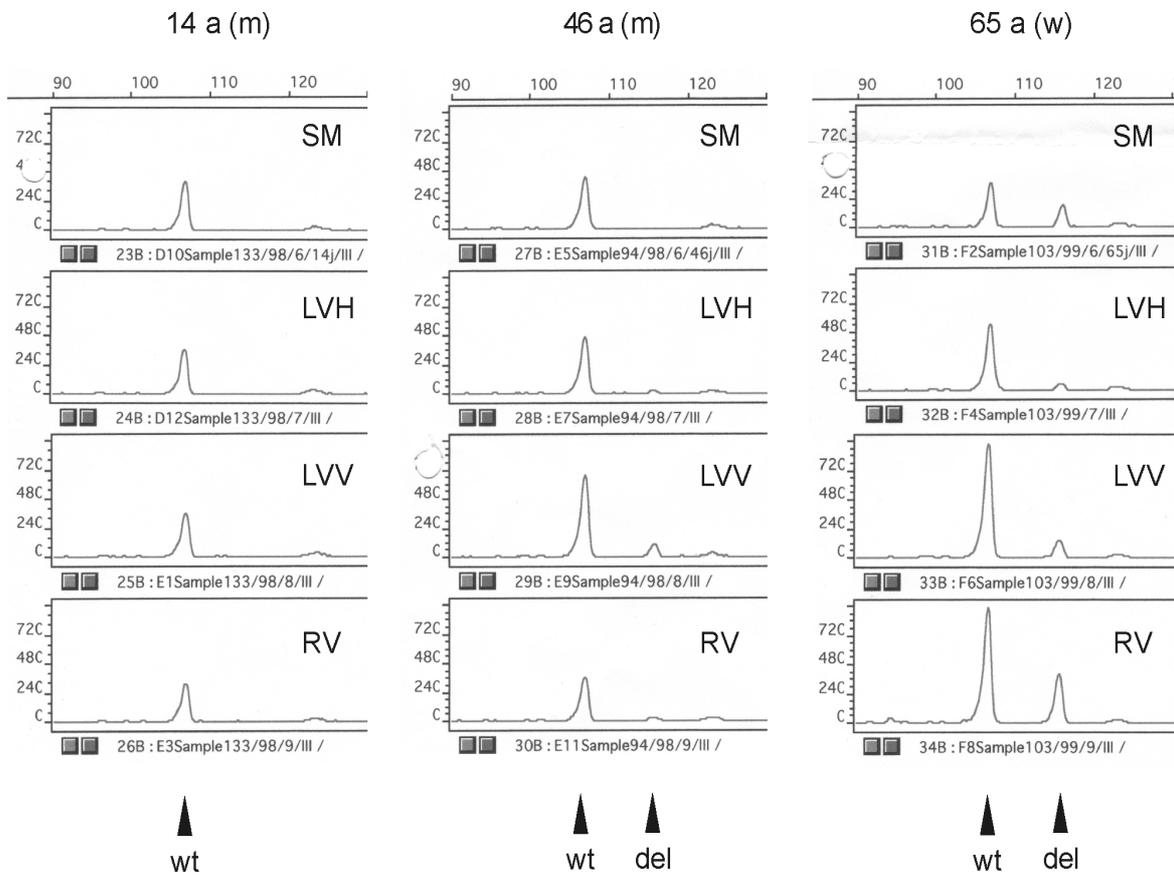


Abbildung 3: Dargestellt sind die Elektropherogramme nach kapillarelektrophoretischer Auftrennung im ABI PRISM Genetic Analyzer für die wildtyp- und deletionsspezifischen Amplifikate aus den verschiedenen Geweben bei drei verschiedene Individuen von 14, 46 und 65 Jahren. SM = Skelettmuskel, LVH = linker Ventrikel Hinterwand, LVV = linker Ventrikel Vorderwand, RV = rechter Ventrikel, wt = Elektropherogramm des wildtypspezifischen Fragments, del = Elektropherogramm des deletionsspezifischen Fragments.

2.4 Statistische Methoden

Für die mit Hilfe des ABI PRISM™ Genetic Analyzers quantifizierte 4977 bp Deletion der mtDNA wurde eine statistische Auswertung durchgeführt.

Graphisch aufgetragen wurde der prozentuale Anteil der 4977 bp Deletion gegenüber dem Lebensalter der Personen mit der jeweiligen Regressionsgeraden. Es wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman-Rho entsprechend der folgenden Formel berechnet:

$$r_{SP} = \frac{\sum_i (rg(x_i) - \bar{rg}_x)(rg(y_i) - \bar{rg}_y)}{\sqrt{\sum_i (rg(x_i) - \bar{rg}_x)^2} \sqrt{\sum_i (rg(y_i) - \bar{rg}_y)^2}}$$

Ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ wurde das Ergebnis als signifikant gewertet.

Bei der Einteilung in Altersklassen wurde für jede Altersgruppe und jeden Gewebeabschnitt der Mittelwert für den prozentualen Anteil der 4799 bp Deletion bestimmt und der jeweilige Standardfehler des Mittelwertes (SEM) errechnet. Die Darstellung hier erfolgt als Balkendiagramm.

Für alle statistischen Auswertungen wurde das Statistikprogramm PRISM 4.0 (GraphPad Software) verwendet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Nachweis der spezifischen mitochondrialen Fragmente

3.1.1 Das 113bp- Fragment der undeletierten mtDNA

Es wurde von 50 Personen unterschiedlichen Alters die Gesamt-DNA aus 200 mg Skelettmuskelgebe (M. Iliopsoas) und 200 mg Herzmuskelgewebe aus drei verschiedenen Herzregionen, der linken Ventrikelhinterwand, der linken Ventrikelvorderwand und des rechten Ventrikels, extrahiert, quantifiziert und zur Amplifikation der mitochondrialen Fragmente in die PCR eingesetzt.

Bevor die DNA-Amplifikate mit dem ABI PRISM™ Genetic Analyzer quantifiziert wurden, wurde jede Probe auf das Vorliegen von intakter mtDNA hin untersucht. Zu diesem Zweck wurde das 113 bp grosse Fragment nachgewiesen, welches für die intakte mtDNA spezifisch ist. 10 ng Template-DNA wurde in die PCR eingesetzt, in 17 Zyklen amplifiziert und anschliessend nach Elektrophorese auf einem Polyacrylamidgel mittels Silberfärbung sichtbar gemacht.

In beinahe allen Proben konnte unter diesen Bedingungen das 113 bp grosse Fragment nachgewiesen werden. Proben, bei denen sich komplette Ausfälle, sehr schwache Banden oder Schmier in der Silberfärbung durch Degradierung zeigten, wurden nicht für eine spätere Quantifizierung verwendet.

3.1.2 Das 123bp-Fragment der deletierten mtDNA

In einem zweiten PCR-Ansatz wurde die Probe ausserdem auf das Vorliegen des 123 bp großen deletionsspezifischen Fragmentes untersucht. Hierfür wurden

ebenfalls 10 ng Matrizen-DNA eingesetzt, diese jedoch in 28 - 32 Zyklen amplifiziert.

Es zeigte sich, daß die 4977 bp Deletion mit den Primern Alt1F/Alt2R in Skelett- sowie Herzmuskelgewebe bereits ab einem Lebensalter von vier Monaten nachweisbar war. Die Bandenstärke des deletionspezifischen Fragmentes nahm mit steigendem Lebensalter der Individuen deutlich zu (s. Abb.10).

3.2 Semiquantitative Bestimmung der 4977 bp Deletion in Skelettmuskelgewebe

Bei positivem Nachweis des 113 bp-Fragmentes der intakten mtDNA in der Polyacrylamidgelelektrophorese mit Silberfärbung wurde eine Quantifizierung der 4977 bp Deletion mit dem ABI PRISM™ Genetic Analyzer durchgeführt.

Die Quantifizierung der 4977 bp Deletion im Skelettmuskelgewebe diente zum einen der Gewährleistung der Validität der Ergebnisse, da in zahlreichen Arbeiten bereits eine Zunahme der 4977 bp Deletion mit steigendem Lebensalter beschrieben worden ist. Zum anderen kann die Menge der 4977 bp Deletion in Skelettmuskulatur als Referenzwert betrachtet werden, mit dem man die Deletionsmenge in Herzmuskelgewebe vergleichen kann.

Das spezifische Fragment der intakten mtDNA sowie das deletionspezifische Fragment der 50 Skelettmuskelproben wurden während der gleichen PCR, jedoch in verschiedenen Reaktionsansätzen amplifiziert. Für die Amplifikation des wildtypspezifischen Fragments wurde der Primer Mit1F fluoreszenzmarkiert und mit dem unmarkierten Primer Mit2R kombiniert. Das deletionspezifische Fragment wurde mit dem fluoreszenzmarkierten Primer Alt1F und dem unmarkierten Primer Alt2R amplifiziert.

Es wurden jeweils 10 ng Matrizen-DNA eingesetzt. Die Proben zum Nachweis der intakten mtDNA wurden nach 17 Zyklen, jene zum Deletionsnachweis nach 28-32 Zyklen entnommen. Hierdurch sollte erreicht werden, daß in etwa vergleichbare

Mengen Amplifikat gewonnen werden, die während der gleichen Messung vom Laserstrahl des ABI PRISM™ Genetic Analyzers quantifiziert werden können.

Es konnte in einem Vorversuch mittels einer TaqMan-Real-Time-PCR ermittelt werden, daß sich die Amplifikation des 113 bp-Fragmentes nach 17 Zyklen und jene des 123 bp-Fragmentes nach 30 Zyklen in der Mitte der exponentiellen Amplifikationsphase befindet. Es wurde ausgeschlossen, dass sich die Amplifikation zu diesem Zeitpunkt bereits in der Plateauphase befindet, da dies eine Quantifizierung unmöglich machen würde.

Es wurden von jeder Probe drei PCR-Ansätze mit den gleichen Reagenzien und der gleichen Menge an Matrizen-DNA hergestellt. Die Proben wurden anschließend in drei Durchgängen im ABI PRISM™310 Genetic Analyzer quantifiziert. Die Mengen an wildtyp- bzw. deletionsspezifischem Fragment wurden mittels Messung der Fluoreszenzstärke im ABI PRISM™ Genetic Analyzer bestimmt. Dort wurden die Amplifikate kapillarelektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe der Gene Scan™ Software der quantitative Anteil beider Fragmente bestimmt. Der prozentuale Anteil der 4977 bp Deletion in der mtDNA der einzelnen Proben wurde ermittelt, in dem das Flächenintegral unter der Kurve des Elektropherogrammes für die intakte mtDNA als interner Standard gewertet wurde. Zu diesem wurde die Fläche unter der Kurve des Elektropherogrammes für die deletierte mtDNA ins Verhältnis gesetzt. Aus den drei Messungen wurde anschließend der Mittelwert des prozentualen Anteils errechnet und in einem Diagramm gegenüber dem Lebensalter abgebildet.

Die 4977 bp Deletion war in Skelettmuskulatur in 32 von 48 Proben nachweisbar und ist bereits ab dem 4. Lebensmonat detektierbar. Es zeigte sich bei einem nichtparametrischen Korrelationskoeffizienten von 0,7406 ($p < 0,01$) ein sehr signifikanter Anstieg der Deletionsmenge mit Zunahme des Lebensalters. Der Mittelwert des prozentualen Anteils lag im Skelettmuskel für alle 50 Proben bei 0,013%. Der höchste Wert von 0,14% fand sich bei einem 102 Jahre alten Individuum.

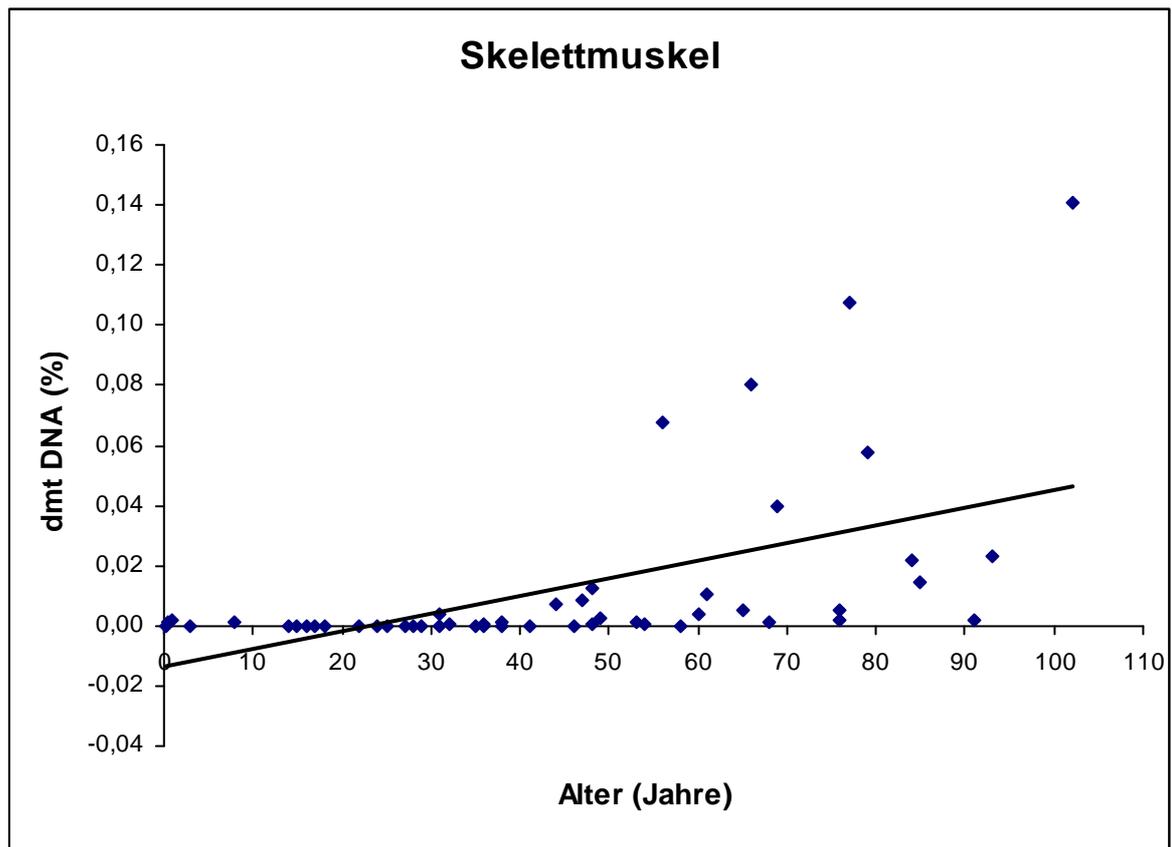


Abb. 4: Zunahme des Anteils der 4977 bp Deletion an der gesamten mtDNA in Skelettmuskelproben in Abhängigkeit vom Lebensalter. Mit der Gesamt-DNA von 50 Skelettmuskelproben wurden in einer PCR das wildtyp- sowie das deletionsspezifische Fragment bestimmt. Anschließend wurden die Fragmente im ABI PRISM™ Genetic Analyzer quantifiziert und darauf basierend der prozentuale Anteil der dmtDNA berechnet. Aufgetragen gegenüber dem Lebensalter ist jeweils der Mittelwert aus drei PCR-Bestimmungen nach Quantifizierung mittels ABI Prism™ Genetic Analyzer mit Regressionsgerade.

3.3 Semiquantitative Bestimmung der 4977 bp Deletion in Herzmuskelgewebe

Vor Quantifizierung der Fragmente wurden die Proben auf das Vorliegen von undeletierter mtDNA untersucht, da diese bei den späteren Messungen als interner Standard fungierte (s.o.). Anschließend wurden die Proben mit den fluoreszenzmarkierten Primern Mit1f/Mit2R und Alt1f/Alt2R amplifiziert, die Menge der wildtyp- und deletionsspezifischen Fragmente im ABI PRISM 310 Genetic Analyzer quantifiziert und der prozentuale Anteil der 4977 bp Deletion an der Gesamt-mt DNA mit der oben beschriebenen Formel berechnet.

3.3.2 Hinterwand des linken Herzventrikels (Abschnitt a)

Die 4977 bp Deletion konnte in 33 von 50 Proben nachgewiesen werden. Der höchste Anteil fand sich mit 0,0929% bei einem 38-jährigen Individuum. Bei 17 Personen war die 4977 bp Deletion nicht nachzuweisen, von denen 14 jünger als 30 Jahre waren. Es fand sich ein tendenzieller Anstieg des prozentualen Anteils der dmtDNA mit zunehmendem Lebensalter, der nichtparametrische Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho liegt bei 0,7469 ($p < 0,01$).

Der Mittelwert des prozentualen Anteils der dmtDNA war hier mit 0,005% deutlich geringer als im Skelettmuskelgewebe.

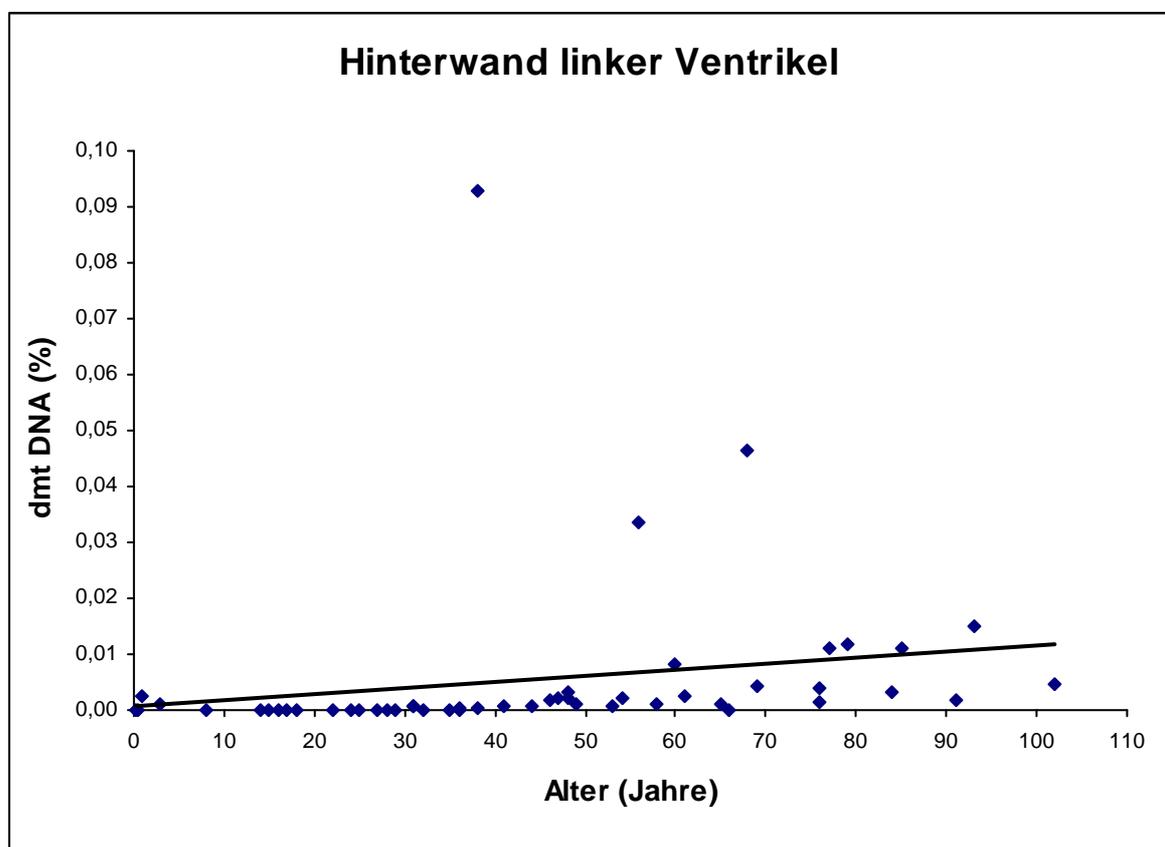


Abb. 5: Akkumulation der 4977 bp Deletion in Abhängigkeit vom Lebensalter in Gewebe aus der Hinterwand des linken Ventrikels. Aufgetragen gegenüber dem Lebensalter in Jahren ist jeweils der prozentuale Anteil der dmt DNA als Mittelwert aus drei PCR-Bestimmungen nach Quantifizierung mittels ABI PRISM™ Genetic Analyzer mit Regressionsgerade

3.3.3 Vorderwand des linken Herzventrikels (Abschnitt b)

In Gewebe, welches aus der Vorderwand des linken Herzventrikels stammte, konnte bei 34 Individuen ein Vorliegen der 4977 bp Deletion der mtDNA nachgewiesen werden. Der höchste Anteil fand sich mit 0,028% bei einer 85jährigen Person. Bei 16 Personen fehlte die 4977 bp Deletion, von diesen Individuen waren 14 jünger als 30 Jahre. Der Mittelwert des prozentualen Anteils liegt bei 0,0045%. Der nichtparametrische Korrelationskoeffizient liegt bei 0,8400 ($p < 0,01$).

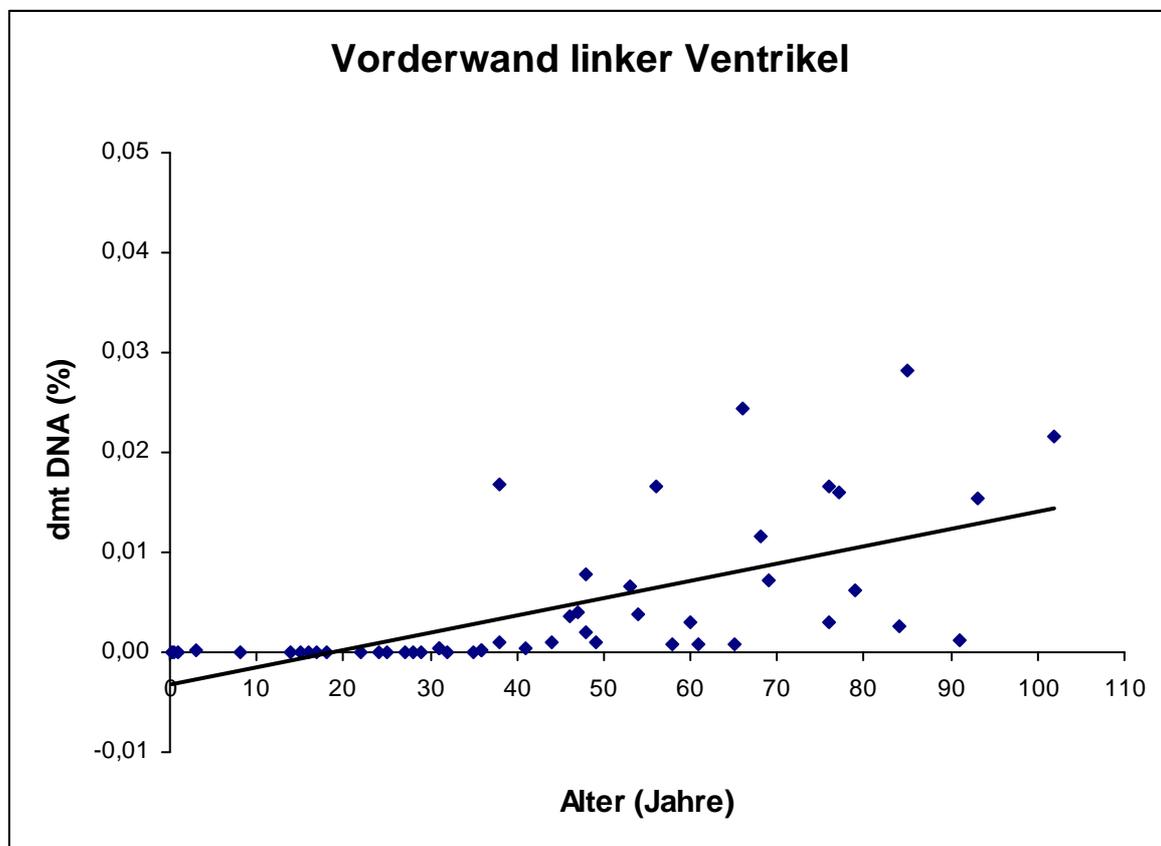


Abb. 6: Akkumulation der 4977 bp Deletion in Abhängigkeit vom Lebensalter in Gewebe aus der Vorderwand des linken Ventrikels. Aufgetragen gegenüber dem Lebensalter in Jahren ist jeweils der prozentuale Anteil der dmtDNA als Mittelwert aus drei PCR-Bestimmungen nach Quantifizierung mittels ABI PRISM™ Genetic Analyzer mit Regressionsgerade.

3.3.4 Rechter Herzventrikel (Abschnitt c)

Bei 37 von 50 Individuen konnte in Gewebe des rechten Herzventrikels die 4977 bp Deletion nachgewiesen werden. Der höchste Anteil fand sich mit 0,17% bei einem achtjährigen Kind, dieser Wert muss als Ausreisser betrachtet werden.

Die 4977 bp Deletion fehlt bei 13 Personen, hiervon waren 12 jünger als 30 Jahre. Der Mittelwert für den prozentualen Anteil liegt im rechten Ventrikel bei 0,012%

Der nichtparametrische Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho liegt unter Berücksichtigung des Ausreisserwertes bei 0,6300, ohne diesen Wert bei 0,7100 ($p < 0,01$).

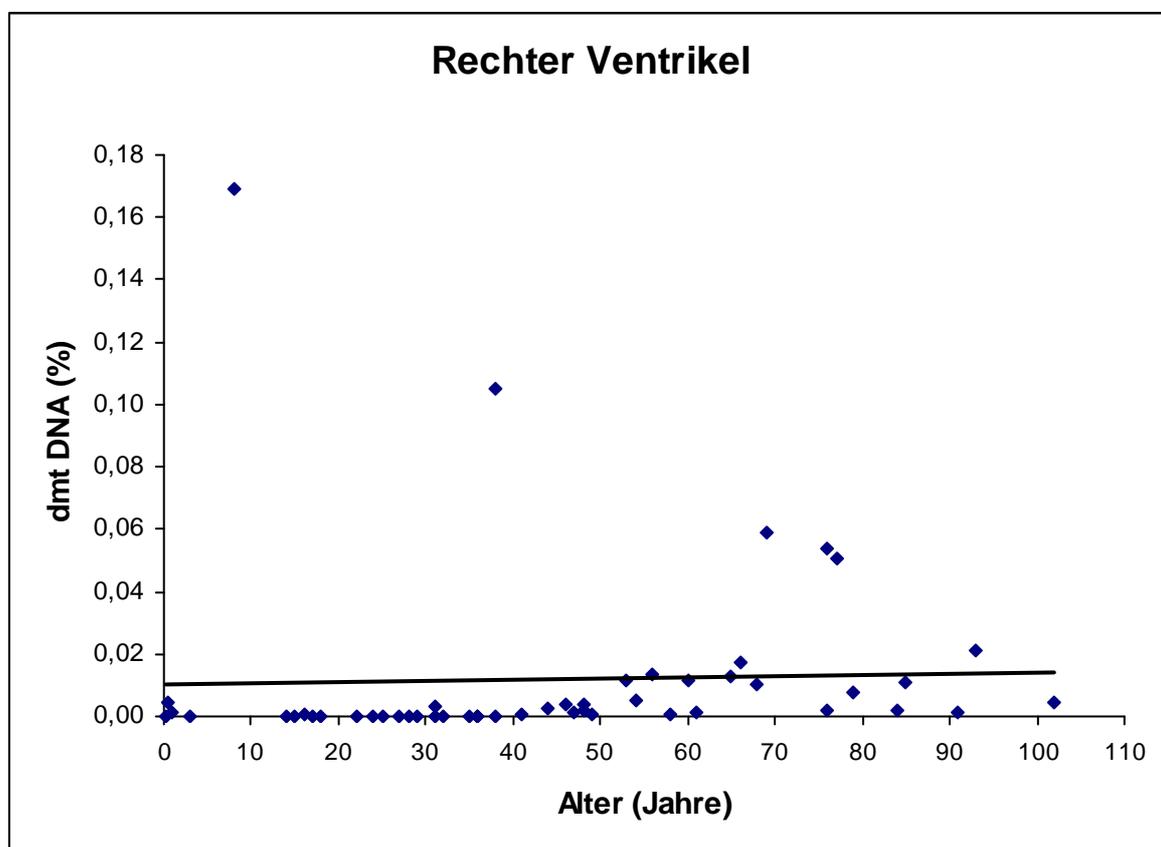


Abb. 7: Akkumulation der 4977 bp Deletion in Abhängigkeit vom Lebensalter in Gewebe aus dem rechten Herzventrikel. Halblogarithmische Darstellung. Aufgetragen gegenüber dem Lebensalter in Jahren (a) ist jeweils der prozentuale Anteil der dmtDNA als Mittelwert aus drei PCR-Bestimmungen nach Quantifizierung mittels ABI PRISM™ Genetic Analyzer mit Regressionsgerade.

3.3.5 Vergleich der verschiedenen Gewebe

Insgesamt liegt der prozentuale Anteil der 4977 bp Deletion an der Gesamt-mtDNA im Skelettmuskelgewebe mit durchschnittlich 0,013% am höchsten. Gewebe aus dem rechten Herzen weist mit 0,012% nur einen geringfügig niedrigeren Anteil auf. Im linken Herzen finden sich mit 0,0045 % in der Vorderwand und 0,005% in der Hinterwand deutlich geringere Mengen an deletierter mtDNA. Die Altersabhängigkeit ist mit einem nichtparametrischen Korrelationskoeffizienten nach Spearman-Rho von 0,8400 in der Vorderwand des linken Ventrikels am stärksten ausgeprägt, das Gewebe des rechten Ventrikels weist die geringste Altersabhängigkeit auf.

3.3.6 Einteilung in Altersklassen

Die 50 Individuen wurden, wie beschrieben, in neun Altersklassen zusammengefasst. Mittels der in drei PCR-Amplifikationen und nachfolgender Quantifizierung im ABI PRISM™ Genetic Analyzer bestimmten Werte für den Anteil der 4977 bp Deletion wurde für jede Altersgruppe und jeden Gewebeabschnitt ein Mittelwert für den Anteil der 4977 bp Deletion an der gesamten mtDNA bestimmt und als Balkendiagramm mit Standardfehler dargestellt. Hier zeigte sich die bestehende Altersabhängigkeit noch deutlicher.

Es zeigte sich deutlich, dass die Altersabhängigkeit in Skelettmuskelgewebe stark ausgeprägt war. Im Herzmuskelgewebe zeigte das Gewebe aus dem linken Herzventrikel die stärkste Altersabhängigkeit.

Abbildung 8: Zunahme der Häufigkeit der 4977 bp deletierten mtDNA aus Skelettmuskulatur in Abhängigkeit vom Lebensalter. Schematische Darstellung im Balkendiagramm. Mit der Gesamt-DNA von 50 Personen unterschiedlichen Alters wurden drei PCR-Amplifikationen mit fluoreszenzmarkierten Primern mit anschließender Quantifizierung im ABI PRISM™ Genetic Analyzer durchgeführt. Anhand der Differenz aus der Fluoreszenzstärke des wildtypspezifischen- und deletionspezifischen Fragments wurde der relative Anteil der 4977bp deletierten mtDNA an der gesamt mtDNA errechnet. Dargestellt ist der Mittelwert der Häufigkeit der deletierten mtDNA in den verschiedenen Altersgruppen mit Standardfehler (SEM).

Abb. 9 Zunahme der Menge der 4977 bp deletierten mtDNA aus Gewebe der Hinterwand des linken Herzventrikels in Abhängigkeit vom Lebensalter nach Einteilung in Altersklassen. Schematische Darstellung. Balkendiagramm. Mit der Gesamt-mtDNA von 50 Personen unterschiedlichen Alters wurden drei PCR-Amplifikationen mit fluoreszenzmarkierten Primern mit anschließender Quantifizierung im ABI PRISM™ Genetic Analyzer durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert des Anteils der deletierten mtDNA an der gesamten mtDNA in den verschiedenen Altersgruppen mit Standardfehler (SEM).

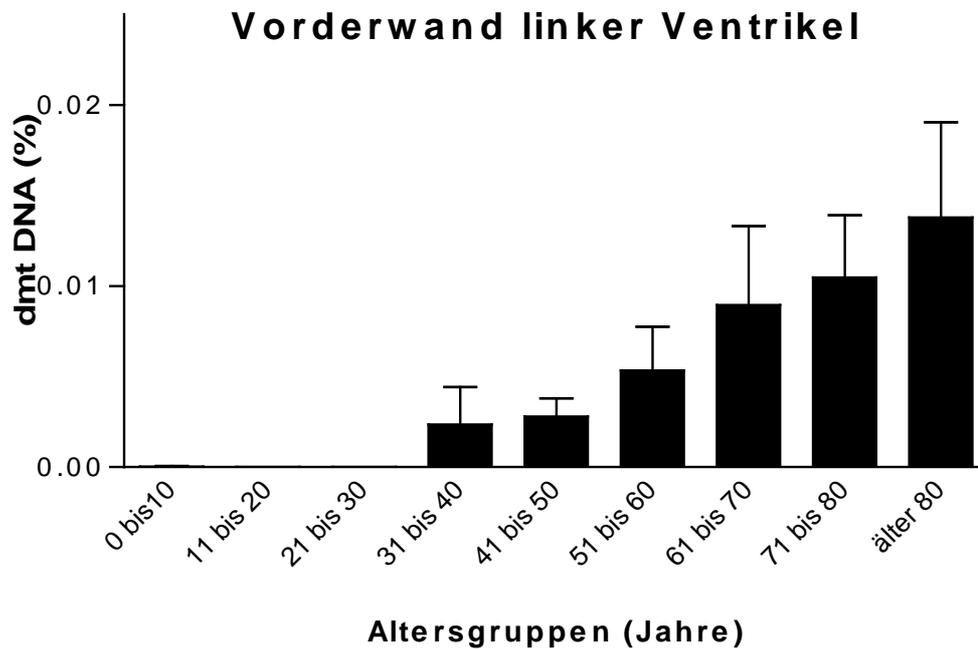


Abb. 10 Zunahme der Menge der 4977 bp deletierten mtDNA aus Gewebe der Vorderwand des linken Herzventrikels in Abhängigkeit vom Lebensalter nach Einteilung in Altersklassen. Schematische Darstellung. Balkendiagramm. Mit der Gesamt-mtDNA von 50 Personen unterschiedlichen Alters wurden drei PCR-Amplifikationen mit fluoreszenzmarkierten Primern mit anschließender Quantifizierung im ABI PRISM™ Genetic Analyzer durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert des Anteils der deletierten mtDNA an der gesamten mtDNA in den verschiedenen Altersgruppen mit Standardfehler (SEM).

Rechter Ventrikel

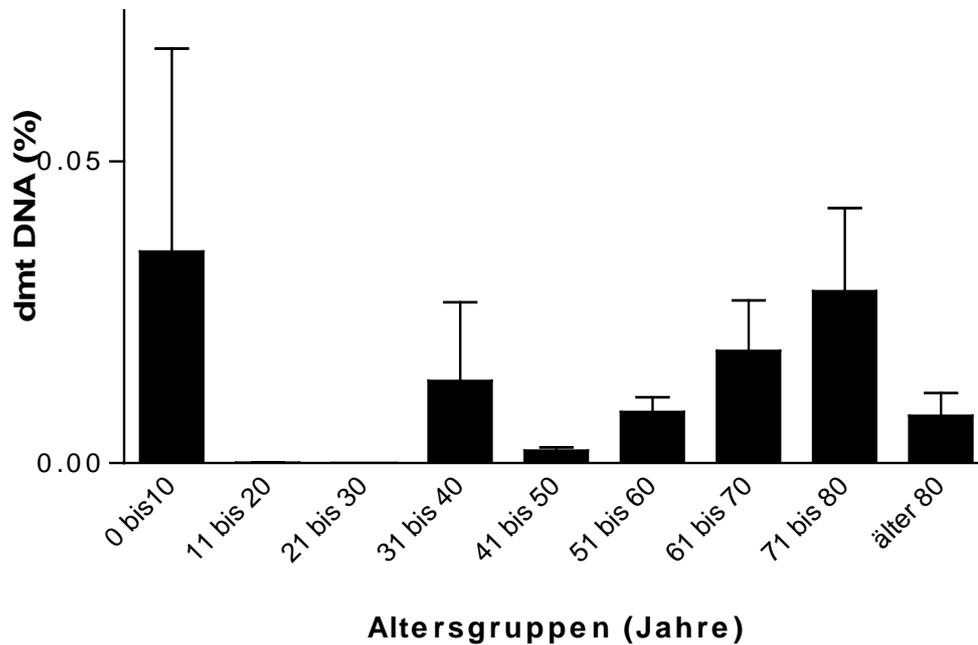


Abb.11 Zunahme der Menge der 4977 bp deletierten mtDNA aus Gewebe des rechten Herzventrikels in Abhängigkeit vom Lebensalter nach Einteilung in Altersklassen. Schematische Darstellung. Balkendiagramm. Mit der Gesamt-mtDNA von 50 Personen unterschiedlichen Alters wurden drei PCR-Amplifikationen mit fluoreszenzmarkierten Primern mit anschließender Quantifizierung im ABI PRISM™ Genetic Analyzer durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert des Anteils der deletierten mtDNA an der gesamten mtDNA in den verschiedenen Altersgruppen mit Standardfehler (SEM).

3.4 Akkumulation der Deletion bei chronischer Hypoxie

Der Anteil der 4977 bp Deletion wurde bei 11 Individuen im Herzmuskelgewebe der Vorderwand des linken Ventrikels bestimmt, welche laut Sektionsprotokoll unter einer hochgradigen Koronaratherosklerose litten. Diese Werte wurden jeweils mit altersgleichen, herzgesunden Kontrollen verglichen.

Hierbei zeigte sich bei zehn der elf untersuchten Fälle ein erhöhter Anteil der 4977 bp Deletion gegenüber der Kontrollgruppe auf bis maximal das zwölffache. Der Mittelwert des prozentualen Anteils der deletierten mtDNA an der Gesamt-mtDNA lag bei den koronaratherosklerotisch veränderten Myokardgewebeproben bei 0,02%, bei den gesunden Kontrollen bei 0,0065%. Bei den Daten ist hohe statistische Signifikanz gegeben ($p = 0,002$).

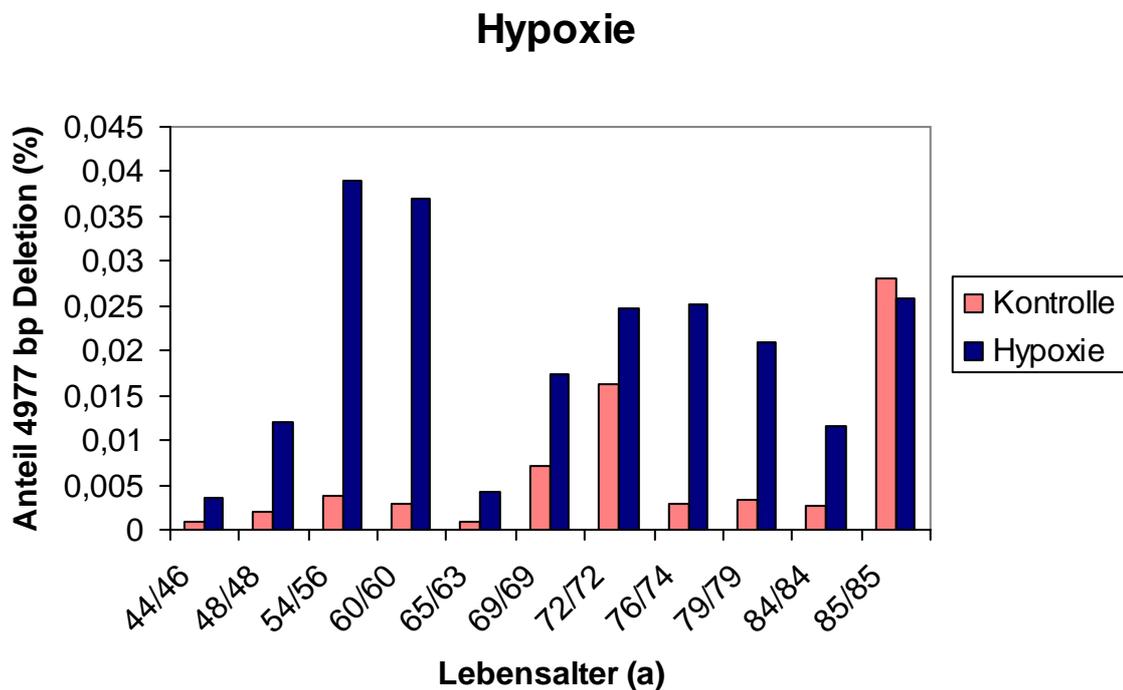


Abbildung 12: Die Akkumulation der 4977 bp Deletion bei Auftreten von chronischer Hypoxie ist beispielhaft dargestellt anhand von 11 Individuen, welcher unter Koronaratherosklerose litten. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der 4977 bp Deletion in Gewebe aus der linken Ventrikelvorderwand. Als Kontrollgruppe dienten etwa altersgleiche, herzgesunde Individuen.

4 DISKUSSION

4.1 Quantifizierungsmethoden der 4977 bp Deletion

Um eine Aussage zum Auftreten der 4977 bp Deletion machen zu können, ist zunächst eine Detektion der wildtyp- und deletionspezifischen Fragmente erforderlich.

Am einfachsten ist eine densitometrische Auswertung der sich auf ethidiumbromidhaltigen Agarose- oder Polyacrylamidgelen anfärbbaren Fragmentbanden. Jedoch nimmt die Intensität der Signale ab einer bestimmten Konzentration nicht mehr linear entsprechend der Amplifikatmenge zu, so dass eine genaue quantitative Auswertung nicht mehr gewährleistet ist (Sundfors & Collan, 1996). Von vielen Arbeitsgruppen wurde eine serielle Verdünnung zur Quantifizierung angewendet (Corral-Debrinski et al., 1991; Cortopassi et al., 1992; Hsieh et al., 1994; Lee et al., 1994; Ballinger et al., 1996; Kao et al., 1997). Hier ist jedoch der Arbeitsaufwand beträchtlich und es kommt häufig zu einem Ausfall eines Signals innerhalb einer Verdünnungsserie.

In einer kinetischen PCR, in der die Differenz der Zyklenzahlen ermittelt wird, welche zur erstmaligen Detektion des Wildtyp- und des Deletionsfragmentes benötigt werden, kann unter Kenntnis der Amplifikationseffizienz der Anteil der deletierten mtDNA bestimmt werden. Der Arbeitsaufwand ist jedoch wesentlich höher als bei der Quantifizierung dem Genetic Analyzer, auch ist die Methode weniger sensitiv (Meißner et al., 1999).

Eine simultane Amplifikation eines Fragmentes und die Detektion dessen Zunahme ist mittels einer TaqMan Real-time PCR möglich. Hierbei hybridisieren fluorogene Sonden zwischen zwei Primern mit der DNA-Matrize. Ein Oligonukleotid bildet die Sonde, welches an seinem 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff (Fluoreszein-Derivat) markiert ist. Das 3'-Ende hingegen trägt ein Rhodamin-Derivat, den sogenannten Quencher-Farbstoff, welcher mit einem Phosphat blockiert ist. Bei einer spezifischen Wellenlänge von 488 nm wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs durch einen Fluoreszenz-Energietransfer unterdrückt, welcher durch die räumliche Nähe zum Quencher entsteht. In der PCR findet nun sowohl eine Hybridisierung der Sonde als auch der

Primer mit der Matrizen-DNA statt, die Primer-Extension findet mit Hilfe der Taq-DNA-Polymerase statt. Diese trifft nun auf die markierte Sonde und beginnt sie zu verdauen. Hierdurch wird die räumliche Nähe zwischen den beiden Farbstoffen aufgehoben und die Hemmung durch den Quencher Farbstoff fällt weg. Die Emission des Reporter-Farbstoffes kann nun direkt über eine entsprechende Software gemessen werden. Mit jedem PCR-Zyklus nimmt entsprechend der Akkumulation des PCR-Produktes die Reporter-Fluoreszenz zu, somit kann die Mengenzunahme des PCR-Produktes in jedem Zyklus exakt detektiert werden.

Mittels einer lasergestützten Quantifizierung in einem automatischen Sequenziergerät nach PCR-Amplifikation der spezifischen Fragmente mit fluoreszenzmarkierten Primern kann die 4977 bp Deletion hochsensitiv und mit relativ geringem Arbeitsaufwand nachgewiesen werden. Es lassen sich unter Einsatz des Primerpaares Alt1F/Alt2R sehr geringe Amplifikatmengen nachweisen, die 4977 bp Deletion ist in Geweben aus dem rechten Herzventrikel bereits bei einem 6 Monate alten Säugling zu detektieren.

Bei gleichzeitiger Singleplex-Amplifikation des Wildtyp- und des Deletionsfragments aus einer gleichen Ausgangsmenge DNA in einem PCR-Lauf, aber in zwei Reaktionsansätzen, konnte der Deletionsanteil durch den Quotienten des deletionsspezifischen und des wildtypspezifischen Peaks als relativer Anteil der gesamten mtDNA berechnet werden. Die Voraussetzung hierfür war, dass die Amplifikation der Fragmente die Plateauphase noch nicht erreicht hatte. Dieses wurde durch eine verschiedenen Anzahl von PCR-Zyklen für Wildtyp und Deletion gewährleistet: Die Ansätze zur Wildtyp-Amplifikation wurden bereits nach 17 Zyklen entnommen, jene zur Deletions-Amplifikation durchlaufen insgesamt 28 - 32 Zyklen. Anhand der bekannten Amplifikationseffizienz von 1,9 und der festgelegten Zyklendifferenz konnte anschließend ein prozentualer Anteil der 4977 bp Deletion an der gesamten mtDNA ermittelt werden.

Um eine möglichst genaue Aussage über die Altersabhängigkeit oder den Einfluss anderer Variablen auf das Auftreten der 4977 bp Deletion treffen zu können, wurde ein möglichst großer Probenumfang gewählt und der Mittelwert aus drei Messungen gebildet.

4.2 DNA-Mutationen und der Alterungsprozeß

Das Altern ist sicherlich ein multifaktorieller Prozess und es existieren verschiedene Theorien über die biologische Grundlage des Alterungsprozesses. Grob können diese in zwei Klassen eingeteilt werden, von denen eine das Altern als einen festgelegten Prozess beschreibt, bei dem programmierte Veränderungen der Genexpression zu einer Verminderung der Lebensfähigkeit führen. Die andere Klasse beinhaltet die Zufallstheorien, welche zur Grundlage haben, dass zufällige Schäden an Makromolekülen zum Altern führen (Morley, 1995). Zu den Zufallstheorien zählt auch die somatische Mutationstheorie (Szilard, 1959; Orgel, 1973; Morley, 1982).

1956 entwickelte Harman die Theorie der freien Radikale (Harman, 1956; Harman 1992), welche bis heute von allen Alterungstheorien die bekannteste ist. Demnach verursachen freie Radikale oxidative Schäden an verschiedenen Biomolekülen, welche im Laufe des Lebens akkumulieren. Das Mitochondrium ist der wichtigste Ursprungs- und Angriffsort der freien Radikale und reaktiven Sauerstoffverbindungen (Nohl & Hegner, 1978; Chance et al., 1979). Hier kommt es vorzugsweise zu einer Schädigung der mtDNA im Sinne von Deletionen als auch von Punktmutationen, welche mit zunehmendem Lebensalter in verschiedenen Geweben akkumulieren (Cortopassi & Arnheim, 1990; Linnane et al., 1990; Hattori et al., 1991, Arnheim & Cortopassi, 1992; Münscher et al., 1993b; Zhang et al., 1993).

Viele Beobachtungen deuten darauf hin, dass zwischen der Menge an reaktiven Sauerstoffverbindungen und dem Fortschreiten des Alterungsprozesses ein Zusammenhang besteht. Etwa haben Tierarten mit einer hohen Stoffwechselrate und damit einer hohen Produktion an freien Radikalen, wie z.B. Mäuse, eine wesentlich kürzere Lebensspanne als Arten mit niedriger Stoffwechselrate, wie etwa Schildkröten oder Elefanten (Osiewacz, 1995). Auch haben Arten mit erhöhten Spiegeln an antioxidativen Enzymen eine höhere Lebenserwartung als Arten, bei denen niedrige Enzymspiegel gemessen werden (Osiewacz, 1995; Orr & Sohal, 1994).

Mit dem Alter akkumulierende, spezifische Deletionen sind von vielen Autoren nachgewiesen worden. Hierzu zählt insbesondere die 4977 bp Deletion (Arnheim

& Cortopassi, 1992; Lezza et al., 1994; Kadenbach et al., 1995; Ozawa, 1995a; Ozawa, 1995b; Kovalenko et al., 1997; Liu et al., 1998b; Zhang et al., 1998).

Bei gesunden Personen wird das Auftreten der 4977 bp Deletion als spontane somatische Mutation angesehen. Die Deletion akkumuliert mit steigendem Lebensalter und kann meistens bei 20- bis 30-jährigen nachgewiesen werden, das Verhältnis von deletierter mtDNA zu intakter mtDNA nimmt zu (Kadenbach et al., 1995; Ozawa, 1995a; Ozawa 1995b; Wei, 1998a).

Die Tatsache, dass in dieser Arbeit die 4977 bp Deletion bereits bei gesunden Personen unter 20 Jahren nachgewiesen werden konnte, steht im Gegensatz zu den meisten bisher veröffentlichten Ergebnissen (Cortopassi & Arnheim, 1990; Yen et al., 1991; Hsieh et al., 1994; Zhang et al., 1996). In dieser Arbeit konnten durch Einsatz hochsensitiver Primerpaare und der lasergestützten Quantifizierung im automatischen Sequenziergerät bereits sehr geringe Mengen der 4977 bp Deletion nachgewiesen werden, so dass die Nachweisgrenze folglich bis in das Kindesalter vorrückt.

Ob bei mitochondrialen Punktmutationen ebenfalls eine Altersabhängigkeit besteht, ist bisher nicht restlos geklärt: Einige Autoren beschreiben eine Zunahme mit steigendem Lebensalter zumindest für bestimmte Punktmutationen (Liu et al., 1998b; Wei et al., 1998b; Wei et al., 1998c; Zhang et al., 1998), während Palotti et al. (1996) eine Altersabhängigkeit nicht nachweisen konnten. Neuere Beobachtungen weisen im Rahmen einer Einzelzellanalyse auf eine Akkumulation von klonal expandierten Punktmutationen der mtDNA mit zunehmenden Lebensalter in Mundschleimhautepithelien und Herzmuskelzellen hin (Nekhaeva et al., 2002).

Da Mutationen der mtDNA mit steigendem Lebensalter zunehmen, stellt sich die Frage, ob diese strukturellen Veränderungen funktionelle Folgen haben. Verschiedene Untersuchungen beschreiben einen Zusammenhang zwischen der Akkumulation mitochondrialer Deletionen und einem zunehmenden bioenergetischen Defizit mit steigendem Lebensalter. Zum Beispiel besteht ein Zusammenhang zwischen der Deletionsmenge der mtDNA und der Aktivität der Cytochrom-C-Oxidase (Kovalenko et al., 1997; Kopsidas et al., 1998). Auch wird ein Aktivitätsrückgang der Atmungskettenkomplexe I, II und IV mit steigender Menge an dmtDNA beschrieben (Lezza et al., 1994).

Nach Lu et al. (1999) nehmen der Anteil der 4977 bp Deletion, die Menge an 8-OH-dG und die Menge an Maleindialdehyd - ein Fettstoffwechselprodukt - mit steigendem Lebensalter zu, während die Menge der Schutzenzyme Cu- und Zn-Superoxiddismutase, Katalase und Glutathionperoxidase sinkt. Diese und ähnliche Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass bei einer starken Akkumulation von Deletionen wichtige Gene bzw. deren Produkte ausfallen, welche für die Aufrechterhaltung der Mitochondrienfunktion essentiell sind. Infolgedessen kommt es schließlich zur Zerstörung der Mitochondrienstruktur und -funktion und zu einer Entkopplung der Atmungskette (Yen et al., 1989; Trounce et al., 1989; Cooper et al., 1992; Hsieh et al., 1994; Lee et al., 1998a; Porteous et al., 1998; Wei, 1998a).

Der Anteil der 4977 bp Deletion überschreitet verschiedenen Studien zufolge auch bei über 80jährigen, gesunden Personen einen Wert von 0,2% der mtDNA nicht (Simonetti et al., 1992; Lezza et al., 1994). Dies bestätigte sich in den Ergebnissen dieser Arbeit, hier fand sich der höchste Wert von 0,14% in Skelettmuskelgewebe eines 102 Jahre alten Individuums. Dieser niedrige Wert wirft die Frage auf, ob daraus überhaupt klinische Konsequenzen im Sinne der beschriebenen Altersveränderungen entstehen können. In Versuchen, bei denen Mitochondrien in Zellen ohne mtDNA transferiert worden sind, konnte festgestellt werden, dass erst Anteile von mehr als 60% schadhafter mtDNA zu klinischen Manifestationen führen (Hayashi et al., 1991). Eine andere Arbeitsgruppe konnte durch transgene Mausmodelle feststellen, daß eine Reduktion der mtDNA um 37% zu einer Abnahme der Komplex I-Aktivität um etwa 40% in Herzmuskulatur führte (Larsson et al., 1998).

Jedoch existieren neben der 4977 bp Deletion noch multiple andere Deletionen sowie Punktmutationen, deren Summe letztendlich zu den genannten Veränderungen führt (Arnheim & Cortopassi, 1992). Die Häufigkeit des Auftretens der 4977 bp Deletion korreliert nicht mit dem Auftreten multipler Deletionen, so dass vermutlich kein einheitlicher Mechanismus zum Auftreten von Deletionen führt (Zhang et al., 1999).

So bleibt die Frage, ob Deletionen der mtDNA während des Alterungsprozesses zwar auftreten, ihn aber möglicherweise nicht verursachen, weiterhin kontrovers.

4.3 mtDNA-Mutationen in Herzmuskulatur

4.3.1 Herzmuskelgewebe und der Alterungsprozess

Mit zunehmendem Alter ist der Herzmuskel insbesondere von Zellverlust und -vergrößerung sowie einer Veränderung der metabolischen ionischen und elektrischen Aktivität der Myocyten betroffen (Olivetti et al., 1991; Lakatta, 1993). Mit Ansteigen der ROS-Produktion nehmen die antioxidativen Schutzmechanismen ab, es entsteht ein Ungleichgewicht, welches wiederum zur Bildung von Lipidhydroperoxiden, mitochondrialen Strukturveränderungen und oxidativ veränderten Proteinen führt (Papa, 1996; Rosenfeldt et al., 1999). Das Myokard des älteren Menschen hat ferner eine geringere Kapazität, sich von Ischämie und Reperfusionstress zu erholen (Pepe, 2000).

Aufgrund seiner ständigen Aktivität hat das Herz einen besonders hohen Energiebedarf, welcher durch die oxidative Phosphorylierung gedeckt werden muss. Aus diesem Grund enthalten Herzmuskelzellen besonders viele Mitochondrien und damit große Mengen an mtDNA (Shoffner und Wallace, 1995). Jedoch folgt aus dieser hohen Aktivität der OXPHOS auch eine verstärkte Bildung von freien Radikalen (Ozawa et al., 1991).

Deletionen der mtDNA können aufgrund des hohen Energiebedarfes in Herzmuskelgewebe und der Tatsache, dass Herzmuskelzellen keine Synzythien bilden, schlechter als in anderen Geweben toleriert werden (Fromenty et al., 1996).

Die Tatsache, dass eine Störung der Mitochondrienfunktion durch Mutation der mtDNA zur Dysfunktion des Myokards führen kann (Marin-Garcia et al., 1996; Ozawa, 1994), wurde bereits anhand einiger seltener Fälle maternal vererbter Kardiomyopathien (Suomalainen et al., 1992; Zeviani et al., 1991) und der kardialen Beteiligung bei einigen mitochondrialen Erkrankungen (Anan et al., 1995) dokumentiert. Auch wurde gezeigt, daß erniedrigte zelluläre ATP-Spiegel, welche durch eine mitochondriale Dysfunktion entstehen können, zu einer Erniedrigung der Membrandepolarisationsschwelle führen (James et al., 1999)

und damit potentiell die Erregungsbildung und -leitung des Myokards beeinflussen können.

Eine altersabhängige Akkumulation von Deletionen der mtDNA über einen bestimmten Schwellenwert könnte zur Entstehung des sogenannten „Altersherzens“ (Presbykardie, d.h. Verschlechterung der Herzfunktion im höheren Lebensalter) beitragen.

In der Regel ist die 4977 bp Deletion in Herzmuskelgewebe etwa ab dem 30. bis 40. Lebensjahr detektierbar und kann bei alten Personen je nach Autor zwischen 0,007% und 10% erreichen (Hattori et al., 1991; Corral-Debrinski et al., 1991; Sugiyama et al., 1991; Hayakawa et al., 1992; Zhang et al., 1992; Corral-Debrinski et al., 1992; Wei, 1992; Arnheim und Cortopassi, 1992; Marin-Garcia et al., 1996; Kim et al., 2000). Im Normalfall ist die Deletion vor dem 12. Lebensjahr nicht nachzuweisen, jedoch gelang in Einzelfällen eine Detektion der 4977 bp Deletion bereits bei Säuglingen (Remes et al., 1994; Marin-Garcia et al., 1996). Auch in dieser Arbeit konnte die 4977 bp Deletion in Gewebe aus dem rechten Herzventrikel bereits bei einem 6 Monate alten Säugling nachgewiesen werden.

Eine Rarität stellt die Beobachtung dar, dass die Menge der deletierten DNA nach dem 80. Lebensjahr abnehmen soll (Hattori et al., 1991), auch die Ergebnisse dieser Arbeit widersprechen dieser Aussage.

Hinsichtlich der Frequenz des Auftretens und der Altersabhängigkeit der „common deletion“ weist das Herzmuskelgewebe regionale Unterschiede auf:

Sowohl die 4977 bp Deletion als auch die 7483 bp Deletion finden sich vermehrt im Ventrikelgewebe eines Herzens, wohingegen in den Vorhöfen der Deletionsanteil geringer ist. Dies legt die Vermutung nahe, dass der Grad der hämodynamischen Belastung Einfluß auf die Entstehung von mtDNA-Mutationen nimmt. Ein Unterschied in der Häufigkeit zwischen rechtem und linkem Ventrikel besteht jedoch nicht (Kim et al., 2000).

In dieser Arbeit findet sich der höchste Mittelwert des prozentualen Deletionsanteils in Gewebe, welches aus dem rechten Ventrikel stammt. Der Anteil der Deletion in linksventrikulärem Gewebe liegt bei weniger als der Hälfte.

Die Tatsache, daß sich im rechten Ventrikel trotz geringerer hämodynamischer Belastung höhere Deletionsmengen als im linksventrikulären Gewebe finden, könnte in der Tatsache begründet sein, dass hier aufgrund des geringeren Wanddurchmessers in jedem Fall transmurale Proben entnommen wurden, wohingegen das linksventrikuläre Gewebe eventuell nur einzelne Wandschichten repräsentiert. Somit ist bei den rechtsventrikulären Proben immer Gewebe aus dem subendokardialen Gebiet der „letzten Wiese“, welches besonders hypoxiegefährdet ist, enthalten.

Die große Streuung der Werte im rechten Ventrikel erklärt sich möglicherweise durch die Beobachtung, dass in Proben aus benachbarten Abschnitten des rechten Vorhofs die Häufigkeit der 4977 bp Deletion innerhalb desselben Individuums teilweise bis um das 100-fache variiert, während die Häufigkeit bei gleichen Abschnitten einer anderen Person nur um das 1,4-fache voneinander abweicht (Zhang et al., 1999).

Eine Altersabhängigkeit besteht nur in Ventrikelgewebe, jedoch nicht in Gewebe, welches aus den Vorhöfen stammt (Kim et al., 2000). In dieser Arbeit wies das Gewebe aus dem rechten Ventrikel die geringste Altersabhängigkeit auf, Vorhofgewebe wurde nicht untersucht. Jedoch zeigte sich die am stärksten signifikante Altersabhängigkeit in Gewebe, welches aus der Vorderwand des linken Ventrikels stammte.

Andere Autoren haben zwei weitere Deletionen, die 7483 bp und die 10422 bp Deletion, in Herzmuskelgewebe nachgewiesen, die ebenso wie die 4977 bp Deletion eine altersabhängige Zunahme zeigten (Corral-Debrinski, 1992; Ozawa, 1994).

Die 7438 bp Deletion wurde zuerst in Herzmuskelgewebe von Patienten mit Kardiomyopathien nachgewiesen, weshalb man zunächst eine Spezifität für Herzmuskelgewebe annahm, dies hat sich nach weiteren Untersuchungen jedoch nicht bestätigt (Ozawa et al., 1990; Hattori et al., 1991; Sugiyama et al., 1991; Zhang et al., 1992; Baumer et al., 1994).

Eine Einzelzell-Long-PCR mit Amplifikation des gesamten mitochondrialen Genoms einzelner Kardiomyozyten verschiedener Personen zeigte, dass eine einzelne Zelle jeweils nur eine einzige spezifische Deletion aufweist, was auf eine Akkumulation durch klonale Expansion einer einzelnen Mutation hinweist (Khrapko et al., 1999). Eine andere Arbeitsgruppe hingegen machte in Skelettmuskelgewebe die Beobachtung, dass multiple Deletionen nebeneinander in der selben Zelle existieren (Kopsidas et al., 1998).

4.3.2 mtDNA-Mutationen bei myokardialer Hypoxie/Ischämie

Die Hauptursache für kardiale Ischämien ist die Koronararterienstenose aufgrund von Atherosklerose. Die hieraus resultierenden ischämischen Episoden mit anschließender Reperfusion führen zur Erzeugung von freien Radikalen, wodurch wiederum die Mitochondrien, die mtDNA und die gesamte Zelle geschädigt werden, und es schließlich zu generalisierten Gewebeschäden und Nekrosen (McCord, 1988) sowie zur Apoptoseinduktion (Tanaka et al., 1994; Kacimi et al., 1997) kommt. Auch scheinen die unter Ischämie vermehrt aus den Mitochondrien freigesetzten ROS als *second messenger* in dem Signalweg zu fungieren, der bei Abfall des Sauerstoffpartialdrucks zur Herabsetzung der kontraktilen Funktion der Kardiomyozyten führt (Duranteau et al., 1998). Somit sind die Mitochondrien in die Vorgänge, welche nach Ischämie und Reperfusion schließlich zu Zellschädigung und -tod führen können, eng involviert und bilden einen potentiellen Ansatzpunkt zur Etablierung protektiver Interventionsmöglichkeiten (Suleiman et al., 2001).

Hinsichtlich der mitochondrialen Funktion kann die Ausbildung eines ischämischen Zellschaden in drei Phasen eingeteilt werden: In der ersten, welche dem Einsetzen der Ischämie folgt, werden die Mitochondrien von ATP-synthetisierenden zu ATP-verbrauchenden Zellorganellen. Die zweite Phase ist gekennzeichnet durch strukturelle und funktionelle Alterationen der Mitochondrien, welche infolge einer prolongierten Ischämie auftreten. In der dritten Phase findet

eine Reperfusion statt, hier ist die Mitochondrienfunktion essentiell für die Regenerationsfähigkeit der Zelle (Di Lisa et al., 1998).

In ischämisch geschädigten Myokardgewebe fanden sich ebenfalls die drei bekannten mitochondrialen Deletionen (4977 bp Deletion, 7436 bp Deletion, 10.422 bp Deletion) (Corral-Debrinski et al., 1992).

Der Anteil der 4977 bp Deletion lag mit bis zu maximal 0,85% 7 bis 2200 mal höher als in Herzmuskelgewebe, welches von Personen einer gesunden Kontrollgruppe stammt, parallel kommt es zu einer kompensatorisch um das 3,5-fache verstärkten Induktion von nukleärer OXPHOS-Gen mRNA. Im linken Ventrikel, der mit der Versorgung des Körperkreislaufs den größten Teil der Herzarbeit verrichtet und daher einen höheren Energiebedarf hat, finden sich in hypoxisch geschädigten linken Ventrikeln eine 27-fach höhere Deletionsmenge als im linken Vorhof und eine 50-fach höhere Deletionsmenge als im rechten Ventrikel. Hierbei verursacht insbesondere die chronische Ischämie Schäden der mtDNA, ein akuter Myokardinfarkt oder einer Koronarthrombose führen eher nicht zu einer Zunahme der 4977 bp Deletion (Corral-Debrinski et al., 1991; Corral-Debrinski et al., 1992). Dies deckt sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit, wo sich in koronaratherosklerotisch veränderten Herzen eine signifikante Akkumulation der 4977 bp Deletion fand. Allerdings konnte hier nur eine Steigerung auf maximal den zwölffachen Wert der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Der prozentuale Anteil der deletierten mtDNA in hypoxisch geschädigtem Myokard lag hierbei im Mittel bei 0,02%, bei den gesunden Kontrollen bei 0,0065%.

Der Herzinfarkt ist durch den Verlust kontraktile Muskelfasern gekennzeichnet. Die führt zu einer funktionellen Mehrbeanspruchung des nicht vom Infarktgeschehen betroffenen Myokards und infolgedessen zu reaktiven strukturellen und funktionellen Veränderungen wie Hyperplasie und Polyploidisierung (Adler et al., 1998).

Es wurde zudem eine verstärkte Synthese von ROS mit nachfolgender mtDNA-Schädigung und mitochondrialer Dysfunktion im Sinne einer erhöhten Lipidperoxidation in den Mitochondrien, eine verminderte mtDNA Kopienzahl, eine Abnahme der Anzahl der mtRNA-Transkripte und eine reduzierte Aktivität der Atmungskettenenzyme mit konsekutiv verminderter oxidativer Phosphorylierung

beobachtet. Dies läßt vermuten, daß Schäden der mtDNA eine wichtige Rolle bei der Ausbildung eines myokardialen Remodelings und schließlich der Entstehung des progredienten Herzversagens spielen (Ide et al., 2001).

Klinisch manifestiert sich progredientes Herzversagen aufgrund einer ischämischen Schädigung vor allem in Form einer geringeren Belastbarkeit und gesteigerten muskulären Ermüdbarkeit. Es konnte anhand eines Rattenmodells gezeigt werden, daß es bei progredientem Herzversagen auch in der Skelettmuskulatur zu einer mitochondrialen Dysfunktion mit Störung der OXPHOS kommt, was eine Beteiligung bestimmter Stoffwechselwege an der Entstehung der Myopathie nahelegt (De Sousa et al., 2000).

4.3.3 mtDNA-Mutationen bei verschiedenen Kardiomyopathien

Der Begriff „mitochondriale Kardiomyopathie“ kann nach Marin-Garcia (2000) für hypertrophische (HCM) oder dilatative (DCM) Kardiomyopathien verwendet werden, bei denen sowohl Defekte der mtDNA als auch der mitochondrialen Bioenergetik vorliegen.

Es finden sich bei den mitochondrialen Kardiomyopathien zumeist Punktmutationen an Stellen der mitochondrialen tRNA-Gene oder strukturellen Gene, die für die Untereinheiten der Atmungskette kodieren (Ozawa, 1994). Etwa 20 verschiedene spezifische Punktmutationen sind heute bekannt, welche sich phänotypisch als DCM oder HCM manifestieren können (Marin-Garcia, 2000).

Ebenso kann es bei einer Depletion der mitochondrialen DNA phänotypisch zur Ausbildung einer Kardiomyopathie kommen (Moraes et al., 1991; Tritschler et al., 1992). Sowohl bei der hypertrophischen als auch bei der dilatativen Form der Kardiomyopathie konnte das Vorliegen von mtDNA-Depletionen nachgewiesen werden (Marin-Garcia et al., 1997; Marin-Garcia et al., 2001).

Zudem können in Herzmuskelgewebe von Kardiomyopathiepatienten spezifische mtDNA-Deletionen von Größen zwischen 3,3 und 12,6 kb sowohl bei hypertrophischer und dilatativer, als auch bei ischämischer Kardiomyopathie

nachgewiesen werden (Ozawa et al., 2000; Remes et al., 1994; Hattori et al., 1991; Li et al., 1995; Ruppert und Maisch, 2000). In Gewebe von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie, welches aus dem linken Ventrikel stammte, wurden bei einer Amplifikation des gesamten mitochondrialen Genoms 14 verschiedene Deletionen nachgewiesen, während sich in Gewebe aus dem rechten Ventrikel nur 6 unterschiedliche Deletionen fanden (Li et al., 1995).

Kim et al. (2000) fanden bei Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz aufgrund idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie erhöhte Deletionsmengen, wohingegen andere Autoren (Remes et al., 1994; Marin-Garcia et al., 1996a; Marin-Garcia et al., 1996b) keine Unterschiede hinsichtlich der Deletionsmenge zwischen kardiomyopathisch veränderten Herzen, welche allerdings noch nicht terminal herzinsuffizient waren, und einer gesunden Kontrollgruppe feststellen konnten. Es lässt sich somit annehmen, dass die Entstehung von mtDNA-Mutationen von der Schwere und der Pathogenese einer Herzerkrankung abhängt.

In verschiedenen Studien wurden Anteile von 0,01% bis zu 9% deletierter mtDNA in Herzmuskelgewebe von Kardiomyopathiepatienten gefunden (Remes et al., 1994; Marin-Garcia et al., 1996a,b; Kim et al., 2000; Ruppert und Maisch, 2000). Der Anteil der 7438 bp Deletion zeigte sich bei Kardiomyopathiepatienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe um bis zu 50-fach erhöht (Bobba et al., 1995; Marin-Garcia et al., 1996).

Die 4977 bp Deletion und die 7438 bp Deletion wurden bei Kardiomyopathiepatienten bereits im jüngeren Lebensalter (unter 18 Jahre), und somit früher als bei gesunden Personen, gefunden (Marin-Garcia, 1996; Ruppert und Maisch, 2000). Es kann angenommen werden, dass diese im Verhältnis zur Gesamt-mtDNA geringen Deletionsmengen weniger zur Verschlechterung der bereits vorbestehenden myokardialen Dysfunktion beitragen, als dass die mtDNA-Mutationen durch die verstärkte Belastung eines insuffizienten Herzens entstehen und somit nur ein Begleitphänomen darstellen (Kim et al., 2000).

Im Rahmen einer hypertrophischen oder einer dilatativen Kardiomyopathie kommt es zu einer Verminderung der mitochondrialen Proteinbiosynthese und einer Aktivitätsabnahme der Atmungskettenenzyme (Buchwald et al., 1990; Tanaka et

al., 1990; Zeviani et al., 1991; Taniike et al., 1992; Silvestri et al., 1994; Rustin et al., 1994; Marin-Garcia et al., 1995; Saantorelli et al., 1995; Casali et al., 1995; Zeviani et al., 1995; Arbustini et al., 1998; Quigley et al., 2000; Marin-Garcia et al., 2001). Es lassen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Art, Häufigkeit oder Schwere der Schädigung der betroffenen Atmungskettenenzyme zwischen den beiden Unterformen hypertrophische (HCM) oder dilatative (DCM) Kardiomyopathie finden (Marin-Garcia, 2000).

Die Enzymaktivitätsminderungen lassen sich bei Neugeborenen, welche an Kardiomyopathie leiden, ebenfalls in Skelettmuskelgewebe nachweisen (Marin-Garcia, 1999). Es gab jedoch auch einzelne Patienten mit schweren Atmungskettenenzymdefekten, bei welchen sich keine Deletionen der mtDNA nachweisen ließen (Marin-Garcia et al., 1999).

Die Relevanz der Schutzfunktion antioxidativer Systeme bei der Entstehung einer Kardiomyopathie konnte anhand eines Knockout-Mausmodells belegt werden: Mäuse, denen das Enzym MnSOD (Mangan-Superoxiddismutase) fehlt, entwickeln nach Gabe von Adriamycin eine dilatative Kardiomyopathie, wohingegen transgene Mäuse, welche durch eine Überexpression von MnSOD gekennzeichnet sind, nicht an einer Kardiomyopathie erkranken (Li et al, 1995; Yen et al., 1999).

4.3.4 mtDNA-Mutationen bei degenerativen Erkrankungen mit kardialer Beteiligung

Hauptsächlich sind drei klinische Entitäten mit mtDNA Deletionen und Duplikationen (dup-mtDNA) assoziiert: Das Kearns-Sayre-Syndrom (KSS), das Pearson-Syndrom mit angeborener Pankreas- und Leberinsuffizienz und Panzytopenie und die sporadische progressive externe Ophthalmoplegie (PEO) mit *ragged-red fibers* (RRF).

Von diesen Erkrankungen steht eine kardiale Manifestation besonders beim KSS im Vordergrund, welches durch Manifestation vor dem 20. Lebensjahr, PEO,

Retinopathia pigmentosa, kardiale Erregungsleitungsstörungen, zerebelläre Symptome sowie erhöhte Proteinkonzentrationen im Liquor gekennzeichnet ist. Es finden sich bei KSS-Syndrom-Patienten in über 80% der Fälle Erregungsleitungsstörungen wie AV-Block, inkompletter oder kompletter Schenkelblock, welche regelmäßig die Todesursache dieser Patienten darstellen. Verglichen mit der Häufigkeit der Erregungsleitungsstörungen ist das Auftreten von Kardiomyopathien bei KSS-Patienten eher selten (Hirano et al., 1996), kann aber fatal sein (Huber et al., 1986). Als Erklärung für die hohe Vulnerabilität des Erregungsleitungssystems fanden sich bei Untersuchung von Gewebeproben aus Sinus- und AV-Knoten und His-Bündel eines KSS-Patienten höhere Anteile deletierter mt-DNA als im kontraktiven Myokard (Müller-Höcker, 1998).

Bei Patienten mit Kearns-Sayre-Syndrom wurde neben der 4977 bp Deletion in Herzmuskelgewebe zudem die korrespondierende Duplikation der mtDNA (dup-mtDNA) in einem Anteil von bis zu 91% gefunden, in anderen Gewebearten identischer Patienten war der Anteil der dup-tmDNA mit 0 bis 39% wesentlich geringer (Fromenty et al. 1997). Auch findet sich in der mtDNA von Patienten mit KSS eine weitere spezifische Deletion, welche 7704 bp umfasst (Vazquez-Acevedo et al., 2002).

4.4 mtDNA-Mutationen und Apoptose

Als Apoptose bezeichnet man den sogenannten „programmierten Zelltod“. Im Unterschied zur Nekrose wird der Zelluntergang hierbei nicht durch äußere Schädigungen verursacht.

Apoptosen treten z.B. bei der Zellmauserung, bei der Organgestaltung in der Embryonalentwicklung oder der Anpassung an veränderte hormonelle Steuerungen ein. Der Zelltod durch Apoptose betrifft häufig nur einzelne Zellen inmitten einer sonst unberührten Zellpopulation. Die Zelle wird dabei kondensiert, die Zellmembranen und die Zellorganellen bleiben zunächst intakt. Die Chromatinsubstanz legt sich der Kernmembran innen an, schließlich zerfällt der Kern in große Granula. Entzündliche Veränderungen fehlen gänzlich, die

beschriebenen Vorgänge spielen sich innerhalb von Minuten bis Stunden ab (Leonhardt, 1990).

Mutationen und insbesondere Deletionen der mitochondrialen DNA scheinen im Zusammenhang mit der Apoptoseregulation eine Schlüsselrolle zu spielen:

Yoneda et al. zeigten anhand von Fibroblastenkulturen, welche ein normales mitochondriales Genom besitzen, dass die Exposition der Kultur gegenüber 95% Sauerstoff nach vier Tagen bei 84% der Zellen zum apoptotischen Zelltod mit Nachweis multipler mitochondrialer Deletionen führten, wohingegen eine Fibroblastenlinie ohne mtDNA sich als resistent gegen oxidativen Stress erwies (Yoneda et al., 1995).

Im Rahmen der Induktion oder Verhinderung von apoptotischen Vorgängen spielen proapoptische Proteine wie Caspasen, Bax (ein Mitglied der Bcl-Familie) und Cytochrom c, sowie antiapoptische Proteine wie Bcl-2, Akt und IAP (inhibitory apoptotic proteins) eine wichtige Rolle. Die Apoptose kann verhindert werden durch Caspase-Inhibitoren und Überexpression von Bcl-2. Auch erhöhter oxidativer Stress kann zur Apoptoseinduktion führen, wobei Antioxidantien wiederum zu einer Inhibition dieses Vorgangs beitragen können (Kumar et al., 2002).

Das mitochondriale Atmungskettenenzym Cytochrom c spielt bei der mitochondrialen Apoptoseinduktion eine wichtige Rolle: Kommt es zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, wird Cytochrom c in das Zytoplasma freigesetzt und leitet dort das Eintreten der Apoptose ein. Ein Verlust des mitochondrialen Membranpotentials kann wiederum etwa durch das Auftreten von mtDNA-Deletionen verursacht werden, welche ihrerseits durch oxidative Schäden entstehen. Diese Mechanismen scheinen etwa beim M. Parkinson pathogenetisch bedeutsam zu sein, hier führt das Auftreten multipler Deletionen der mtDNA zur Apoptoseinduktion und somit zum Untergang nigrostriatarer Zellen. (Ozawa et al., 1997).

Auch bei der dilatativen Kardiomyopathie ist pathogenetisch eine Beteiligung von Mutationen der mtDNA, welche zur Apoptoseinduktion führen, nachgewiesen worden (Zhang et al., 2003).

4.5 Ausblick

Mit zunehmendem Verständnis für die molekularen und pathophysiologischen Mechanismen, welche im Rahmen einer hypoxischen Myokardschädigung oder einer Kardiomyopathie schließlich zur Herzinsuffizienz und -versagen führen, bessern sich auch die Aussichten auf verbesserte diagnostische Methoden als auch auf effizientere therapeutische Möglichkeiten.

Die Kenntnis der spezifischen mitochondrialen Enzymdefekte bei der Kardiomyopathie könnte eine medikamentöse Therapie mit Stoffen wie Coenzymen und Vitaminen, insbesondere Vitamin C und K, Thiamin, Riboflavin, ermöglichen. Diese könnten als Elektronendonatoren, -akzeptoren und -transporter fungieren, den Enzymblock zumindest teilweise kompensierend umgehen und die ATP-Synthese steigern (Melov et al., 1999). Ein therapeutischer Nutzen wurde bei Kardiomyopathiepatienten bereits für die Gabe von Coenzym Q₁₀ nachgewiesen (Langsjuen, 1985; Shoffner, 1994).

Ein weiterer Therapieansatz könnte in der Gentherapie zu sehen sein. Für einen effektiven Nutzen muss jedoch die Entwicklung einer Methode zum mtDNA-Ersatz in menschlichen Zellen abgewartet werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde die Frequenz der 4977 bp Deletion der humanen mitochondrialen DNA in Skelett- und Herzmuskelgewebe untersucht.

Von besonderem Interesse ist das Auftreten der 4977 bp Deletion in verschiedenen Regionen des menschlichen Herzmuskels, die Akkumulation der Deletion mit steigendem Lebensalter und bei Auftreten chronischer Hypoxie.

Es wurden von 50 Individuen unterschiedlichen Lebensalters, welche akut verstarben und laut Sektionsprotokoll herzgesund waren, die mitochondriale DNA aus verschiedenen Herzregionen sowie aus dem M. iliopsoas isoliert. Ferner wurde von 11 Leichen, welchen laut Sektionsprotokoll die Diagnose „hochgradige Koronaratherosklerose“ zugeordnet wurde und 11 altersähnlichen, herzgesunden Kontrollpersonen, die mtDNA aus Gewebe der linken Ventrikelvorderwand isoliert. Mittels PCR wurde anschliessend jeweils ein wildtyp- und ein deletionspezifisches Fragment amplifiziert.

Eine Quantifizierung erfolgt nach Verwendung unterschiedlicher fluoreszenzmarkierter Primer computergestützt im ABI PRISM™ Genetic Analyzer, einem automatischen Sequenziergerät.

Bei der Auswertung wurde jeweils ein prozentualer Anteil der 4977 bp Deletion an der gesamten mtDNA, repräsentiert durch die Menge des Wildtyp-Fragmentes, berechnet.

Es bestätigte sich die bereits bekannte Altersabhängigkeit der 4977 bp Deletion in Skelettmuskelgewebe, der Anteil der 4977 bp Deletion lag hier im Mittel bei 0,013%.

In Herzmuskelgewebe zeigte sich mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,8400 die stärkste Altersabhängigkeit im Bereich der Vorderwand des linken Ventrikels. Der rechte Ventrikel wies die geringste Altersabhängigkeit auf, der Korrelationskoeffizient lag hier nur bei 0,6300.

Der Anteil der 4977 bp Deletion war im rechten Ventrikel am höchsten, er lag hier bei 0,012%. Im Vergleich dazu lag der Anteil der Deletion in der linken Ventrikelvorder- bzw. Hinterwand bei weniger als der Hälfte (0,0045% bzw. 0,005%).

Die Ursache für dieses Ergebnis kann in der Tatsache begründet sein, dass die Gewebeproben aus dem rechten Ventrikel aufgrund der geringeren Wandstärke in jedem Fall Anteile aus dem subendokardialen Gebiet der „letzten Wiese“ beinhalten, welches besonders vulnerabel für hypoxische Ereignisse ist.

Bei den 11 koronaratherosklerotisch erkrankten Individuen zeigte sich eine Akkumulation der 4977 bp Deletion auf bis das Zwölfwache der jeweils herzgesunden Kontrollperson. Lediglich in einem Fall lag der Anteil der Deletion bei der gesunden Kontrollperson höher. Insgesamt lag der Mittelwert des prozentualen Anteils der Deletion bei den hypoxisch geschädigten Personen mit ca. 0,02% in etwa dreimal höher als bei den altersgleichen Kontrollen. Bei den Ergebnissen ist deutliche statistische Signifikanz gegeben ($p = 0,002$).

Diese Arbeit bestätigt exemplarisch am Beispiel der 4977 bp „common deletion“, dass eine Schädigung der mitochondrialen DNA sowohl in Skelett- als auch in Herzmuskelgewebe mit zunehmendem Lebensalter nachweisbar ist. Hieraus resultiert wiederum eine verminderte Synthese von Atmungskettenenzymen und eine Anstieg der freien Radikalen, so dass sich der „*circulus vitiosus*“ hinsichtlich einer Gewebsschädigung schließt.

Ferner liegt die Vermutung nahe, dass eine Schädigung der mtDNA durch chronische Hypoxie induziert wird. Inwieweit die Schädigung des mitochondrialen Genoms bei der Entstehung einer ischämisch bedingten Herzinsuffizienz zur Pathogenese beiträgt, bleibt zu klären.

6 LITERATUR

Adler CP, Herget GW, Neuburger M: Regeneration des Herzmuskels nach Myokardinfarkt. *Versicherungsmedizin* 50 :2, 55-58 (1998)

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD: *Molekularbiologie der Zelle*. 2.Aufl., 287-311, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (1990)

Ames BN: Endogenous DNA damage is related to cancer and aging. *Mutat Res* 214, 41-46 (1989)

Anan R, Nakagawa M, Miyata M, Higuchi I, Nakao S, Suehara M, Osame M, Tanaka H: Cardiac involvement in mitochondrial diseases: a study of 17 patients with documented mitochondrial DNA defects. *Circulation* 91, 955-961 (1995)

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R, Young IG: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290, 457-465 (1981)

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

Barron MJ, Johnson MA, Andrews RM, Clarke MP, Griffiths PG, Bristow E, He LP, Durham S, Turnbull DM: Mitochondrial abnormalities in ageing macular photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 (12) 3016-22 (2001)

Birch-Machin MA, Tindall M, Turner R, Haldane F, Rees JL: Mitochondrial DNA deletions in human skin reflect photo- rather than chronologic aging. *J Invest Dermatol* 110, 149-152 (1998)

Bobba A, Giannattasio S, Pucci A, Lippolis R, Camaschella C, Marra E: Characterization of mitochondrial DNA in primary cardiomyopathies. *Clinica Chimica Acta* 243, 181-189 (1995)

Brown MW, George M, Wilson AC: Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 1967-1971 (1979)

Cahill A, Wang X, Hoek JB: Increased oxidative damage to mitochondrial DNA following chronic ethanol consumption. *Biochem Biophys Res Commun* 235:2, 286-290 (1997)

Chance B, Sies H, Boveris A: Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59, 527-605 (1979)

Clayton DA: Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. *Annu Rev Cell Biol* 7, 453-478 (1991)

Corral-Debrinski M, Stepien G, Shoffner JM, Lott MT, Kanter K, Wallace DC: Hypoxemia is associated with mitochondrial DNA damage and gene induction. *JAMA* 266, 1812-1816 (1991)

Cortopassi GA, Arnheim N: Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans. *Nucleic Acids Res* 18, 6927-6934 (1990)

Cortopassi GA, Shibata D, Soong NW, Arnheim N: A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 7370-7374 (1992)

De Sousa E, Veksler V, Bigard X, Mateo P, Ventura-Clapier R: Heart failure affects mitochondrial but not myofibrillar intrinsic properties of skeletal muscle. *Circulation* 102, 1847-1853 (2000)

Duranteau J, Chandel NS, Kulisz A, Shao Z, Schumacker PT: Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 273 :19, 11619-11624 (1998)

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

Fahn HJ, Wang LS, Hsieh RH, Chang SC, Kao SH, Huang MH, Wie YH: Age-related 4977bp deletion in human lung mitochondrial DNA. *Am J Respir Crit Care Med* 154, 1141-1145 (1996)

Fromenty B, Carozzo R, Shanske S, Schon EA: High Proportions of mtDNA Duplications in Patients with Kearns-Sayre-Syndrome occur in the Heart. *Am J Med Genet* 71, 443-452 (1997)

Gadaleta MN: Aging and mitochondrial genome. *Aging (Milano)* 7, 469 (1995)

Gold LS, Slone TH, Stern BR, Manley NB, Ames BN: Rodent carcinogens: setting priorities. *Science* 258, 261-265 (1992)

Gyllensten U, Wharton D, Josefsson A, Wilson AC: Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature* 352, 255-257 (1991)

Halliwell B, Aruoma OI: DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett* 281, 9-19 (1991)

Hamblet NS, Castora FJ: Mitochondrial DNA deletion analysis: a comparison of PCR quantitative methods. *Biochem Biophys Res Commun* 207, 839-847 (1995)

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

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

Hattori K, Tanaka M, Sugiyama S, Obayashi T, Ito T, Satake T, Hanaki Y, Asai J, Nagano M, Ozawa T: Age-dependent increase in deleted mitochondrial DNA in the human heart:: possible contributory factor to presbycardia. *Am Heart J* 121, 1735-1742 (1991)

Hayakawa M, Hattori K, Sugiyama S, Ozawa T: Age-associated oxygen damage and mutation in mitochondrial DNA in human hearts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189: 979-985 (1992)

Hayashi JI, Ohta S, Kikuchi A, Takemitsu M, Goto YI, Nonaka I: Introduction of disease-related mitochondrial DNA results in mitochondrial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 10614-10618 (1991)

Hirano M, DiMauro S, Clinical features of mitochondrial myopathies and encephalomyopathies. *Handbook of Muscle Disease*. Edited by Lane RJM. New York. Marcel Dekker Inc. USA; 479-504 (1996)

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

Hubner G, Gokel JM, Pongratz D, et al.: Fatal mitochondrial cardiomyopathy in Kearns-Sayre-Syndrome. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 408, 611-621 (1986)

Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S, Kang D, Suematsu N, Nakamura K, Utsumi H, Hamasaki N, Takeshita A: Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circ Res* 88, 529-535 (2001).

James AM, Sheard PW, Wei YH, Murphy MP: Decreased ATP synthesis is phenotypically expressed during increased energy demand in fibroblasts containing mitochondrial tRNA mutations. *Eur J Biochem* 259, 462-469 (1999)

Johns DR, Rutledge SL, Stine OC, Hurko O: Directly repeated sequences associated with pathogenic mitochondrial DNA deletions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8059-8062 (1989)

Kacimi R, Long CS, Karliner JS: Chronic hypoxia modulates the interleukin-1 β stimulated inducible nitric oxide synthase pathway in cardiac myocytes. Circulation 96, 1937-1943 (1997)

Kadenbach B, Müller-Höcker J: Mutations of mitochondrial DNA and human death. Naturwissenschaften 77, 221-225 (1990)

Kadenbach B, Münscher C, Frank V, Müller-Höcker J, Napiwotzki J: Human ageing is associated with stochastic somatic mutations of mitochondrial DNA. Mutat Res 338, 161-172 (1995)

Kasai H, Okada Y, Nishimura S, Rao MS, Reddy JK: Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in liver DNA of rats following long-term exposure to a peroxisome proliferator. Cancer Res 49, 2603-2605 (1989)

Khrapko K, Bodyak N, Thilly WG, van Orsouw NJ, Zhang X, Coller HA, Perls TT, Upton M, Vijg J, Wei JY: Cell-by-cell scanning of whole mitochondrial genomes in aged human heart reveals a significant fraction of myocytes with clonally expanded deletions. Nucleic Acids Res 27:11 2434-2441 (1999)

Kopsidas G, Kovalenko SA, Kelso JM, Linnane AW: An age-associated correlation between cellular bioenergy decline and mtDNA rearrangements in human skeletal muscle. Mutat Res 421, 27-36 (1998)

Kuchino Y, Mori F, Kasai H, Inoue H, Iwai S, Miura K, Ohtsuka E, Nishimura S: Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and the adjacent residues. Nature 327:6117, 77-79 (1987)

Langsjuen P, Vadhanavikit S, Folkers K: Response of patients in classes III and IV of cardiomyopathy to therapy in a blind and crossover trial with coenzyme Q10. PNAS 82,4240-4244 (1985)

Larsson NG, Wang J, Wilhelmsson H, Oldfors A, Rustin P, Lewandoski M, Barsh GS, Clayton DA: Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance an embryogenesis in mice. Nat Genet 18, 231-236 (1998)

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

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

Leonhardt H: Histologie, Zytologie und Mikronatomie des Menschen. 8. Überarbeitete Aufl., 45-47, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1990)

Li, YY, Hengstenberg C, Maisch B: Whole mitochondrial genome amplification reveals basal level multiple deletions in mtDNA of patients with dilated cardiomyopathy. Biochem Biophys Res Commun 210 No.1, 211-218 (1995)

Li H, Wang J, Wilhelmsson H, Hansson A, Thoren P, Duffy J, Rustin P, Larsson NG: Genetic modification of survival in tissue-specific knockout mice with mitochondrial cardiomyopathy. PNAS 97, 3467-3472 (2000)

Linnane AW, Marzuki S, Ozawa T, Tanaka M Mitochondrial DNA mutations as a contributor to ageing and degenerative diseases, The Lancet 25:642-645 (1989)

Linnane AW, Baumer A, Maxwell RJ, Preston H, Zhang CF, Marzuki S: Mitochondrial gene mutation: the ageing process and degenerative diseases. *Biochem Int* 22, 1067-1076 (1990)

Luft R: The development of mitochondrial medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8731-8738 (1994)

Lutz S, Weisser HJ, Heizmann J, Pollak S: Location and frequency of polymorphic positions in the mtDNA control region of individuals from Germany. *Int J Legal Med* 111, 67-77 (1998)

Marin-Garcia J, Goldenthal MJ, Ananthakrishnan R, Pierpont ME, Fricker FJ, Lipshultz SE, Perez-Atayde A: Mitochondrial function in children with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Inher Metab Dis* 19, 306-314 (1996)

Marin-Garcia J, Goldenthal MJ, Ananthakrishnan R, Pierpont ME, Fricker FJ, Lipshultz SE, Perez-Atayde A: Specific mitochondrial DNA deletions in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Cardiovas Res* 31, 306-313 (1996)

Marin-Garcia J, Ananthakrishnan R, Goldenthal MJ, Filiano JJ, Perez-Atayde A: Mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of children with cardiomyopathy. *Pediatrics*, 103 :2, 456-459 (1999)

Marin-Garcia J, Ananthakrishnan R, Goldenthal MJ, Pierpont ME: Biochemical and molecular basis for mitochondrial cardiomyopathy in neonates and children. *J Inher Metab Dis* 23, 625-633 (2000)

McCord JM: Free radicals and myocardial ischemia: overview and outlook, *Free Radicals Biol. Med.* 4, 9-14 (1988)

McShane MA, Hammans SR, Sweeny M, Holt IJ, Beattie TJ, Brett EM, Harding AE: Pearson syndrome and mitochondrial encephalomyopathy in a patient with a deletion of mtDNA. *Am J Hum Genet* 48, 39-42 (1991)

Meissner C, Mohamed SA, Klueter H, Hamann K, von Wurmb N, Oehmichen M: Quantification of mitochondrial DNA in human blood cells using an automated detection system. *Forensic Sci Int* 122 (2-3) 197-199 (2000)

Miquel J: An integrated theory of ageing as the result of mitochondrial-DNA mutation in differentiated cell, *Arch. Gerontol. Geriatr.* 12: 99-117 (1991)

Mita S, Rizzuto R, Moraes CT, Shanske S, Arnaudo E, Fabrizi GM, Koga Y, DiMAuro S, Schon EA: Recombination via direct repeats is a major cause of large scale deletions of human mitochondrial DNA. *Nucl. Acids Res.* 18: 561-56 (1990)

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

Morley AA: Is ageing the result of dominant or co-dominant mutations? *J Theor Biol* 98, 469-474 (1982)

Morley AA: The somatic mutation theory of ageing. *Mutat Res* 338 19-23 (1995)

Müller-Höcker J: Molekularpathologie mitochondrialer Funktionsstörungen. *Verh Dtsch Ges Pathol* 78, 48-93 (1994)

Müller-Höcker J, Jacob U, Seibel P: The common 4977 base pair deletion of mitochondrial DNA preferentially accumulates in the cardiac conduction system of patients with Kearns-Sayre syndrome. *Mod Pathol* 11, 295-301 (1998)

Münscher C, Rieger T, Müller-Höcker J, Kadenbach B: The point mutation of mtDNA characteristic for MERRF disease is found also in healthy people of different ages, *FEBS* 317:27-30 (1993)

Nakagawa Y, Ikegami H, Yamato E, Takekawa K, Fujisawa T, Hamada Y, Ueda H, Uchigata Y, Miki T, Kumahara Y:

A new mitochondrial DNA mutation associated with non-insulin-dependent diabetes mellitus, *Biochem Biophys Res Commun* 209: 664-668 (1995)

Nekhaeva E, Bodyak NB, Kravtsov Y, McGrath SB, van Oersouw NJ, Pluzhnikov A, Wei JY, Khrapko K: Clonally expanded mtDNA point mutations are abundant in individual cells of human tissues. *PNAS* 99: 5521-5526 (2002)

Nohl H, Hegner D: Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo? *Eur J Biochem* 82, 863-867 (1978)

Orgel LE: Ageing of clones of mammalian cells. *Nature* 243, 441-445 (1973)

Osiewacz HD: Molekulare Mechanismen biologischen Alterns. *Biologie unserer Zeit* 6, 336-344 (1995)

Ozawa T, Tanaka M, Sugiyama S, Hattori K, Ito T, Ohno K, Takahashi A, Sato W, Takada G, Mayumi B, Yamamoto K, Adachi K, Koga Y, Toshima H: Multiple mitochondrial DNA deletions exist in cardiomyocytes of patients with hypertrophic or dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 170, 830-836 (1990)

Ozawa T: Mitochondrial Cardiomyopathy. *Herz* 19, 105-118 (1994)

Ozawa T: Mitochondrial DNA mutations associated with ageing and degenerative diseases. *Exp Gerontol* 30, 269-290 (1995a)

Ozawa T: Mechanism of somatic mitochondrial DNA mutations associated with age and degenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 1271, 177-189 (1995b)

Ozawa T, Hayakawa M, Katsumata K, Yoneda M, Ikebe S, Mizuno Y: Fragile mitochondrial DNA: The missing link in the apoptotic neuronal cell death in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 235, 158-161 (1997)

Papa S: Mitochondrial oxidative phosphorylation changes in the life span. Molecular aspects and physiopathological implications. *Biochim Biophys Acta* 1276, 87-105 (1996)

Pepe S: Mitochondrial function in ischemia and reperfusion of the ageing heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 27, 745-750 (2000)

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

Reichmann H, Janetzky B, Seibel P: Das mitochondriale Genom- die kleine Schwester des nukleären Genoms. *Sandorama* 3, 13-18 (1996)

Remes AM, Hassinen IE, Ikaheimo M, Herva R, Hirvonen J, Peuhkurinen KJ.: Mitochondrial DNA deletions in dilated cardiomyopathy: a clinical study employing endomyocardial sampling. *J Am Coll Cardiol* 23: 935-942 (1996)

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

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

Rödel G: Mutationen des mitochondrialen Genoms. *Pathologie* 15, 315-320 (1994)

Ruppert V, Maisch B: Mitochondrial DNA deletions in cardiomyopathies. *Herz* 25 :3, 161-167 (2000)

Schmid F: Mitochondrien. *Biologische Medizin* 3, 144-151 (1990)

Seibel P, Tarpe J, Villani G, Klopstock T, Papa S, Reichmann H

Transfection of mitochondria: strategy towards a gene therapy of mitochondrial DNA diseases, *Nucl. Acids Res.* 23, 10-17 (1995)

Shibutani S, Takeshita M, Grollman AP: Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature* 349:6308, 431-434 (1991)

Shoffner JM, Wallace DC: Oxidative phosphorylation diseases and mitochondrial DNA mutations: diagnosis and treatment. *Annu Rev Nutr* 14, 535-568 (1994)

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

Sobreira C, Davidson M, King MK, Miranda AF: Dehydrorhodamine 123 identifies impaired mitochondrial respiratory chain function in cultured cells harboring mitochondrial DNA mutations. *J Histochem Cytochem* 44, 571-579 (1996)

Subba-Rao K; Loeb, LA

DNA damage and repair in brain: relationship to ageing, *Mut. Res.* 275: 317-329 (1992)

Sugiyama S; Hattori K; Hayakawa M; Ozawa T

Quantitative analysis of age-associated accumulation of mitochondrial DNA with deletion in human hearts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180:894-899 (1991)

Suleiman MS, Halestrap AP, Griffiths EJ: Mitochondria: a target for myocardial protection. *Pharmacology & Therapeutics* 89, 29-36 (2001)

Suomalainen A, Paetau A, Leinonen H, Majander A, Peltonen L, Somer H: Inherited idiopathic dilated cardiomyopathy with multiple deletions of mitochondrial DNA. *Lancet* 340, 1319-1320

Szilard L: On the nature of aging process. Proc Natl Acad Sci U S A 45, 35-45 (1959)

Tanaka M, Ito H, Adachi S, Akimoto H, Nishikawa T, Kasajima T, Marumo F, Hiroe M: Hypoxia induces apoptosis with enhanced expression of FAS antigen mRNA in cultured neonatal rat cardiomyocytes. Circ Res 75, 426-433 (1994)

Taylor RW, McDonnell MT, Blakely EL, Chinnery PF, Taylor GA, Howell N, Zeviani M, Briem E, Turnbull DM: Genotypes from patients indicates no paternal mitochondrial DNA contribution. Ann Neurol 54, 521-524 (2003)

Toyokuni S, Okamoto K, Yodoi J Hiai H: Persistent oxidative stress in cancer. FEBS Lett 358, 1-3-(1995)

Trounce I, Byrne E, Marzuki S: Decline in skeletal muscle mitochondrial respiratory chain function: Possible factor in ageing. Lancet, 637-639 (1989)

Vazquez-Acevedo M, Vazquez-Memje ME, Mutchinick OM, Morales JJ, Garcia-Ramos G, Gonzalez-Halphen D: A case of Kearns-Sayre syndrome with the 4977-bp common deletion associated with a novel 7704-bp deletion. Neurol Sci 23, 247-50 (2002)

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

Watson JD, Gilman M, Witkowsik J, Zoller, M: Rekombinierte DNA. 2.Aufl., 420-421, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (1992)

Wei YH: Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging. Proc Soc Exp Biol Med 217, 53-63 (1998a)

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

Yen TC, Su JH, King KL, Wei YH: Ageing-associated 5 kb deletion in human liver mitochondrial DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 178, 124-131 (1991)

Yen H, Oberley TD, Gairola G, Szweda LI, St.Clair DK: Manganese superoxid dismutase protects mitochondrial complex I against Adriamycin-induced cardiomyopathy in transgenic mice. *Arch Biochem Biophys* 362, 59-66 (1999)

Yoneda M, Katsumata K, Hayakawa M, Tanaka M, Ozawa T: Oxygen stress induces apoptotic cell death associated with fragmentation of mitochondrial genome. *Biochem Biophys Res Commun* 209, 723-729 (1995)

Zeviani M, Gellera C, Antozzi C, Rimoldi M, Morandi L, Villani F, Tiranti V, DiDonato S: Maternally inherited myopathy and cardiomyopathy: association with mutation in mitochondrial DNA tRNA^{Leu} (UUR). *Lancet* 338, 143-147 (1991)

Zhang C, Linnane AW, Nagley P: Occurrence of a particular base substitution (3243 A to G) in mitochondrial DNA of tissues of ageing humans. *Biochem Biophys Res Commun* 195, 1104-1110 (1993)

Zhang C, Peters LE, Linnane AW, Nagley P: Comparison of different quantitative PCR procedures in the analysis of the 4977bp deletion in human mitochondrial DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 223, 450-455 (1996)

Zhang C, Lee A, Liu VWS, Pepe S, Rosenfeldt F, Nagley P: Mitochondrial DNA deletions in human cardiac tissue show a gross mosaic distribution. *Biochem Biophys Res Commun* 223, 450-455 (1999)

7 ANHANG

7.1 Tabellen

Tabelle 1: Verwendete Primer

Primer	bp-Folge (5'...3')	Label
Mit 1F	CCC-TTC-GCT-GAC-GCC-ATA	5-FAM
Mit 2R	AGT-AGA-AGA-GCG-ATG-GTG-AGA-GC	-
Alt 1F	CAC-CAT-AAT-TAC-CCC-CAT-ACT-CCT-TA	5-FAM
Alt 2R	GAG-GAA-AGG-TAT-TCC-TGC-TAA-TGC	-

Tabelle 2: Ansatz für die PCR mit fluoreszenzmarkierten Primern und Taq-Polymerase

Volumen 25 µl	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration im PCR-Ansatz
2,5 µl	10 x PCR-Puffer	[1x]
0,75 µl	MgCl ₂ , 50 mM	[1,5 mM]
2,0 µl	dNTP-Mix, je 10 mM	[je 200 µM]
2,0 µl	Primer-Mix, je 10 µM	[je 400 nM]
0,2 µl	Platinum-Taq-Polymerase, 5 U/µl	[1 U]
0,5 µl	DMSO, 100%	[2%]
0,5 µl	TMAC, 500 mM	[10 mM]
10 µl	DNA-Lösung, 1 ng / µl	[10 ng]
6,55 µl	aqua bidest	-

Tabelle 3: Temperaturprofil für die Amplifikation der mitochondrialen Fragmente bei Verwendung der Taq-Polymerase

Art	Temperatur	Dauer
1. Denaturierungsschritt	94°C	10 min
Denaturierung	94°C	30 sec
Annealing	61°C	30 sec
Extension	72°C	50 sec
Zyklenzahl Wildtyp	17	
Zyklenzahl Deletion	28-32	
Endextension	72°C	30 min

Tabelle 4: Ansatz für ein PAG zur elektrophoretischen Auftrennung der Amplifikate

Volumen 22 ml	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration im PAG
5,7 ml Acrylamid-Fertiglösung	38,66 % Acrylamid 1,33 % Bisacrylamid	8% T / 3,5% C
5 ml aqua bidest	-	-
11 ml Tris-Formiat	120 mM	60 mM
220 µl APS	10 %	0,1 %
22 µl TEMED	100 %	0,1 %
80 µl BPB	-	-

Tabelle 5: Sektionsfälle, denen die verwendeten Gewebeproben entnommen wurden mit Angabe des Alters, Geschlechts und der Todesursache.

Lfd. Proben-Nr.	Alter (Jahre)	Geschlecht (m/w)	Todesursache	Lfd. Proben-Nr.	Alter (Jahre)	Geschlecht (m/w)	Todesursache
1	0,25	m	SIDS	26	44,00	w	unbekannt
2	0,50	m	SIDS	27	46,00	m	unbekannt
3	1,17	w	Ersticken	28	47,00	m	Intoxikation
4	3,00	w	Aspiration	29	48,00	m	Ertrinken
5	8,00	m	unbekannt	30	48,00	m	unbekannt
6	14,00	m	Intoxikation	31	49,00	m	Verbluten
7	15,00	m	unbekannt	32	53,00	w	Intoxikation
8	16,00	m	Verbluten	33	54,00	m	Ersticken
9	17,00	m	Verbluten	34	56,00	m	Ertrinken
10	18,00	m	Polytrauma	35	58,00	m	unbekannt
11	22,00	m	Schock	36	60,00	w	sept. Schock
12	24,00	m	unbekannt	37	61,00	m	Pneumonie
13	25,00	w	unbekannt	38	65,00	w	Ertrinken
14	27,00	m	Intoxikation	39	66,00	m	unbekannt
15	28,00	m	Schock	40	68,00	m	Intoxikation
16	29,00	w	Aspiration	41	69,00	m	Verbluten
17	31,00	w	Intoxikation	42	76,00	m	Luftembolie
18	31,00	m	Polytrauma	43	76,00	m	Pneumonie
19	32,00	m	unbekannt	44	77,00	m	unbekannt
20	35,00	w	Verbluten	45	79,00	w	unbekannt
21	36,00	m	Intoxikation	46	84,00	w	Ertrinken
22	36,00	w	unbekannt	47	85,00	m	Embolie
23	38,00	w	Verbrennung	48	91,00	w	Verbluten
24	38,00	w	Meningitis	49	93,00	m	Intoxikation
25	41,00	m	Ersticken	50	102,00	w	Verbrennung

7.2 Geräte

Zur Durchführung der Experimente werden folgende Geräte und Materialien benötigt:

Detektion (Slotblot):

- Hybriboat; INVITROGEN
- Membran, Biotodyne A Nylonmembran; PALL
- Röntgenfilme, Ortho G 100; Kodak
- Röntgenkassette; DU PONT
- Schüttler; GEBHARD
- Slotblot; INVITROGEN
- Wasserbad; MEMMERT und KOTTERMANN

DNA-Extraktion:

- Vortex, REAX 2000; HEIDOLPH
- Waage, Vibra CG; SHINKO DENTI
- Zentrifuge, Biofuge 17RS; HERAEUS SEPATECH

Elektrophorese und Detektion:

- Blotting Pads: Blot Materials 20 x 25 cm; INVITROGEN
- horizontale Elektrophoresekammer, Biorad Biophoresis TM; BIORAD
- IEF-Sampl APPL PIECE; PHARMACIA
- Kühlgerät, UKW 320; HAAKE
- Spannungsgerät, Power PAC 3000; BIORAD
- Whatmanpapier: Chromatographiepapier, 46 x 57 cm; WHATMAN

Gelherstellung (PAG):

- GelBond-PAG Trägerfolie, 124 x 258 mm, BIOZYM
- Glasplatten, 14 x 26 x 0,4 cm; INVITROGEN

photometrische DNA-Messung:

- Photometer; LANGE

PCR:

- Geneamp PCR System 2400; PERKIN ELMER
- Geneamp PCR System 9600; PERKIN ELMER
- MicroAmp Deckel und Reaktionsgefäße; PERKIN ELMER
- MicroAmp Halterahmen 2400 und 9600; PERKIN ELMER
- Micro Amp Tray, Retainer, 2400 und 9600; PERKIN ELMER

Sequenzierung und Quantifizierung:

- ABI PRISM™310 Genetic Analyzer, inklusive Zubehör, PERKIN ELMER
- Genetic Analyzer Sample Tubes; PERKIN ELMER

7.3 Chemikalien:

- Aces 2.0 Human DNA Quantitation System; INVITROGEN
- Acrylamid / Bisacrylamid-Fretiglösung; ROTH
- Ameisensäure (Formic Acid, 90%); BAKER
- Ammoniumpersulfat (APS); SIGMA
- Aqua ad injectabilita; KABI PHARMACIA
- Blockierungsreagenz; BOEHRINGER MANNHEIM
- Borsäure p.A.; SIGMA
- Bromphenolblau; MERCK
- Dinatriumhydrogencarbonat; MERCK
- Dimethylsulfoxid (DMSO); JANSSEN
- DNA-Extraktionskit: Super Quick Gene; IMMUCOR
- DNA-Typing Grade K562 DNA; INVITROGEN
- Dithiothreitol (DTT); SIGMA
- Ethylendiaminotetraacetat (EDTA); MERCK
- Essigsäure 100% p.A.; MERCK
- Ethanol 96% p.A.; MERCK
- Fixierer; HYPAM
- Formaldehyd 37%; MERCK
- Formamid; INVITROGEN
- GeneAmp dNTP's; PERKIN ELMER

- GeneScan-350 ROX Size Standard, PERKIN ELMER
- Glyzerol; MERCK
- IDNA-Agarose; BIOZYM
- Isopropanol; FLUKA
- Leiter: pUC19 DNA / *Msp I* (*HpaII*) Marker; MBI FERMENTAS
- Lumi-Phos Plus; INVITROGEN
- Natriumacetat, p.A.; MERCK
- Natriumcarbonat; MERCK
- Natriumchlorid, p.A.;MERCK
- Natriumdodecylsulfat (SDS) ; SIGMA
- Natriumhydrogenpphosphat; MERCK
- Natriumhydroxid, p.A.; MERCK
- Magnesiumchlorid, INVITROGEN
- PCR-Puffer 10x; INVITROGEN
- Platinum Taq DNA Polymerase; INVITROGEN
- Röntogen Rapid Entwickler; TETENAL
- Salpetersäure, 65%; MERCK
- Salzsäure, 37%, p.A. MERCK
- Sodiumdodecylsulfat (SDS); FLUKA
- Silbernitrat, p.A.; MERCK
- Sucrose; SIGMA
- Tetramethylethylendiamin (TEMED); BIORAD
- Tetramethylammoniumchlorid (TMAC); SIGMA
- Trinatriumcitratdihydrat; MERCK
- Trizma Base; SIGMA
- Xylencyanol; SERVA

7.4 Ansatz und Vorbereitung der Lösungen

Agaroseplugs:

IDNA-Agarose 3% in 200 ml Elektrodenpuffer aufkochen, in Gelwanne füllen, 1 h auspolymerisieren lassen und in 1 cm breite und 24 cm lange Streifen schneiden. In Elektrodenpuffer bei 8°C aufbewahren

AP:

10 % (v/v) in bidest, bei 20°C aufbewahren, aufgetaut und bei 4°C gelagert etwa eine Woche haltbar

Bromphenolblau (BPB) für Agaroseplugs und PAG: 0,5 % (w/v)

Denaturierungslösung für Slotblot:

0,5 M NaCl, 0,5 M NaOH, sterilfiltrieren, autoklavieren

EDTA: 0,5 M, pH 8,5

Elektrodenpuffer für PAG:

0,5 M Tris base, 0,28 M Borsäure, bei 50°C unter Rühren lösen, 50 µl Bromphenolblau (0,5%-ig) zugeben

Essigsäure: 10 % (v/v)

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

Formamidpuffer:

10 mM NaOH; 95 % Formamid, 0,0005 % BPB, 0,0005 % Xylencyanol

Glyzerol: 5 % (v/v)

Ladepuffer für PAG: 40 % Sucrose, 0,1 % Xylencyanol, 0,1 % Bromphenolblau (w/v) n 200mM Tris, 100 mM Natriumacetat und 1 mM EDTA, nicht autoklavieren

Leiter:

1:40 mit 1 x TE-Puffer verdünnen, bei 4°C lagern

Natriumacetat: 3M

Na₂CO₃:

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

Na₂HPO₄: 0,5 M

Prähybridisierungslösung: 44,5 ml Na₂PO₄ (0,5 M) + 5 ml Blockierungsreagenz

Salpetersäure: 1 % (v/v)

SSC (20x): 3 M NaCl, 0,3 M Na₃citrat

TE-Puffer (Tris-EDTA): 10 mM Tris, 0,2 mM EDTA, pH 7,5

Tris-Formiat für PAG: 0,5 M Trisbase, 0,12 M Ameisensäure

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

Waschpuffer:

500 µl SDS (10%) + 500 µl Na₂HPO₄ + 49 ml steriles aqua bidest

Sofern nicht anders angegeben, werden alle Pufferlösungen mit aqua bidest angesetzt, sterilfiltriert und autoklaviert.

