

**Quantitative Analyse  
von  
Mutationen der mitochondrialen DNA  
und deren  
Auftreten beim Altern**

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. Nat.)

dem  
Fachbereich Chemie  
der Philipps- Universität Marburg  
vorgelegt von

Annette Reith, geb. Nuhn  
aus Bad Hersfeld

Marburg/Lahn 1999

Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen  
am: 12.10.1999

Erstgutachter: Prof. Dr. B. Kadenbach

Zweitgutachter: Prof. Dr. W. Buckel

Tag der mündlichen Prüfung am: 26.10.1999

Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 1996 bis Oktober 1999 im Arbeitskreis von Prof. Dr. B.Kadenbach im Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg angefertigt.

*Kinder sind ein großes Glück im Leben ...  
Alles Grobe und Gefühllose  
verschwindet beim Anblick  
eines solchen Blümeleins.*

*Alexander Iwanowitsch Herzen*

*Für Theresa*

<b>1</b>	<b><i>Einleitung</i></b>	<b>1</b>
1.1	<b>Mitochondriale DNA des Menschen</b>	<b>2</b>
1.2	<b>Die Wirkung der reaktiven Sauerstoff-Spezies auf die Mitochondrien</b>	<b>5</b>
1.3	<b>Mutationen der mitochondrialen DNA</b>	<b>6</b>
1.3.1	Veränderungen der mitochondrialen DNA beim Altern	7
1.3.2	Mitochondriale Myopathien	11
1.3.2.1	Kearns-Sayre-Syndrom (KSS) und Chronic progressive external ophthalmoplegia (CPEO)	12
1.3.2.2	Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke like episodes (MELAS)	13
1.3.2.3	Myoclonic epilepsy with ragged red fibres (MERRF)	15
1.4	<b>Einfluß der Alterung auf die Atmungskettenenzyme</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b><i>Zielsetzung</i></b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b><i>Material</i></b>	<b>19</b>
3.1	<b>Enzyme, Kits und Reagenzien</b>	<b>19</b>
3.2	<b>Enzyme</b>	<b>19</b>
3.2.1	Enzyme	19
3.2.2	Restriktionsenzyme	19
3.2.3	Kits	20
3.2.4	Radioaktive Nukleotide	20
3.3	<b>Chemikalien für die Gelelektrophorese</b>	<b>20</b>
3.4	<b>Reagenzien für Nährmedien</b>	<b>20</b>
3.5	<b>Antibiotika</b>	<b>21</b>
3.6	<b>Bakterienstämme</b>	<b>21</b>
3.7	<b>Plasmide</b>	<b>21</b>
3.8	<b>Reagenzien</b>	<b>21</b>
3.9	<b>DNA-Längenmarker</b>	<b>22</b>
3.10	<b>Puffer und Stammlösungen für PCR</b>	<b>23</b>
3.11	<b>Lösungen für Gele</b>	<b>23</b>
3.12	<b>Sonstige Puffer und Lösungen</b>	<b>24</b>
3.13	<b>Medien</b>	<b>26</b>
3.14	<b>Verbrauchsmaterialien und Geräte</b>	<b>27</b>
3.15	<b>Gewebeproben</b>	<b>28</b>

3.15.1	Biopsieproben	28
3.15.2	Autopsieproben	30
<b>3.16</b>	<b>Oligonukleotide für die PCR</b>	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>Methoden</b>	<b>32</b>
<b>4.1</b>	<b>Sicherheitsbestimmungen</b>	<b>32</b>
<b>4.2</b>	<b>Isolierung und Aufreinigung von DNA</b>	<b>32</b>
4.2.1	Isolierung von mitochondrialer DNA aus Geweben nach Wallace	32
4.2.2	Präparation von Plasmid-DNA	33
4.2.2.1	Präparation von Plasmid-DNA mit dem Qiagen Plasmid DNA Extraktions Kit	33
4.2.2.2	Präparation von Plasmid-DNA mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit	34
4.2.2.3	Präparation von Plasmid-DNA mit der TENS Plasmid Minipräparation	34
4.2.3	Präparation von PCR-amplifizierter DNA	35
4.2.3.1	Präparation von PCR-amplifizierter DNA aus der PCR-Lösung	35
4.2.3.2	Präparation von PCR-amplifizierter DNA aus Agarosegelen mit dem „NUCLEOTRAP extraction kit“	35
4.2.3.3	Präparation von PCR-amplifizierter DNA durch Anreicherung und Reinigung mit Microcon-100	36
<b>4.3</b>	<b>Fällung von DNA</b>	<b>36</b>
4.3.1	Natriumacetat / Ethanolfällung	36
4.3.2	Ammoniumacetat / Isopropanolfällung	37
<b>4.4</b>	<b>Extraktionen</b>	<b>37</b>
4.4.1	Phenolextraktion	37
4.4.2	Chloroformextraktion	37
<b>4.5</b>	<b>Quantitierung von DNA und Oligonukleotiden</b>	<b>38</b>
4.5.1	Photometrische Quantitierung von DNA	38
4.5.2	Photometrische Quantitierung der Oligonukleotide	38
<b>4.6</b>	<b>Auftrennung der DNA durch Agarosegelelektrophorese</b>	<b>39</b>
4.6.1	Agarosegelelektrophorese	39
4.6.2	Auftragspuffer	40
4.6.2.1	Bromkresolgrün-Auftragspuffer	40
4.6.3	Anfärben der Agarosegele	40
4.6.3.1	Ethidiumbromid-Färbung	40
4.6.3.2	SYBR Green I-Färbung	40
4.6.4	Neuartige Quantifizierungsmethode	41
4.6.4.1	Ansatz der PCR-Lösungen und Ablauf der PCR	41
4.6.4.2	Agarosegelelektrophorese der Quantifizierung	42
4.6.4.3	Auswertung des Gels mit dem Programm NIH Image	43
4.6.4.4	Graphische Auswertung der Daten	44

4.6.4.5	Effizienzbestimmung der PCR	45
4.6.4.6	Quantifizierung der mtDNA in Patientenproben	48
<b>4.7</b>	<b>Polymerase Chain Reaction</b>	<b>50</b>
4.7.1	Enzymatische Amplifizierung von dsDNA	50
4.7.2	Standard-PCR	52
4.7.3	PCR-Methoden zur Analyse von Punktmutationen	52
4.7.3.1	Allelspezifische PCR	52
<b>4.8</b>	<b>Behandlung enzymatisch amplifizierter dsDNA mit Restriktionsendonukleasen</b>	<b>53</b>
<b>4.9</b>	<b>Klonierung</b>	<b>54</b>
4.9.1	Vektoren und Bakterienstämme	54
4.9.1.1	Plasmidkarte von pBluescript <sup>®</sup> II SK(+/-)	54
4.9.1.2	Plasmidkarte von pCR <sup>®</sup> II-TOPO	55
4.9.2	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	55
4.9.2.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> RbCl-Zellen	56
4.9.3	Klonierung eines PCR-Fragmentes in pBluescript <sup>®</sup> II SK(+/-)	56
4.9.3.1	Dephosphorylierung des Vektors pBluescript <sup>®</sup> II SK(+/-)	56
4.9.3.2	Phosphorylierung eines PCR-Fragmentes mit T4 Polynukleotid Kinase	57
4.9.3.3	Auffüllen von DNA-Enden mit DNA-Polymerase, Klenow Fragment	57
4.9.3.4	Ligasereaktion	58
4.9.3.5	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i> -Zellen	58
4.9.4	Klonierung eines PCR-Fragmentes mit dem TOPO TA Cloning Kit Dual Promotor	59
4.9.4.1	Polyadenylierung eines PCR-Fragmentes	59
4.9.4.2	Klonierung und Transformation mit dem TOPO TA Cloning Kit Dual Promotor	59
<b>4.10</b>	<b>Mutagenese</b>	<b>60</b>
4.10.1	Site directed mutagenesis	60
4.10.2	Mutagenese PCR	61
<b>4.11</b>	<b>DNA-Sequenzierung</b>	<b>61</b>
4.11.1	DNA-Sequenzierung nach der Didesoxymethode nach Sanger	61
4.11.2	DNA-Sequenzierung mit einem DNA-Sequenzer	62
4.11.3	Polyacrylamidelektrophorese zur DNA-Sequenzierung nach Sanger	62
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>64</b>
<b>5.1</b>	<b>Herstellung von Plasmiden mit punktmutierten Inserts</b>	<b>64</b>
5.1.1	Amplifikation und Klonierung eines mit Vent (exo-)-Polymerase amplifizierten PCR-Fragmentes aus humaner mtDNA	64
5.1.1.1	Sequenzierung des Plasmides pBluescript (SK+/-) mit einem Vent (exo-) Polymerase amplifizierten 946 bp-Insert	67

5.1.2	Amplifikation und Klonierung eines mit Taq/Pwo Polymerase amplifizierten PCR-Fragmentes aus humaner mtDNA	67
5.1.3	Mutagenese des Plasmides mit Hilfe der PCR und Identifikation des Produktes	68
5.1.4	Klonierung eines PCR-Fragmentes mit dem pCR II TOPO Cloning <sup>®</sup> Kit Dual Promotor	69
5.1.4.1	Sequenzierung des Plasmides pCR II TOPO mit einem Vent (exo-) Polymerase amplifizierten 669 bp-Insert	71
<b>5.2</b>	<b>Probleme bei der Quantitierung von deletierter mtDNA mit der Methode nach Becker et al. (1996)</b>	<b>72</b>
5.2.1	Einfluß der Reinheit der DNA auf die Amplifikationseffizienz	72
5.2.2	Effizienzverringerng der PCR-Amplifikation des Plasmides pCII durch Patienten-DNA	74
<b>5.3</b>	<b>Modifikation der Quantitierung durch kinetische PCR von mutierter mtDNA</b>	<b>76</b>
<b>5.4</b>	<b>Vergleich der Ergebnisse unterschiedlicher PCR-Quantitierungen</b>	<b>79</b>
<b>5.5</b>	<b>Quantitierung der <i>common deletion</i> in mitochondrialer DNA aus Skelettmuskel von 87 Probanden</b>	<b>81</b>
5.5.1	Quantitierung der <i>common deletion</i> mit der kombinierten Methode	82
5.5.2	Quantitierung der <i>common deletion</i> mit der modifizierten Zyklentitrationmethode	83
<b>5.6</b>	<b>Verteilung der <i>common deletion</i> in humanem Skelettmuskel eines Probanden</b>	<b>85</b>
<b>5.7</b>	<b>Quantitierung von Punktmutationen der mitochondrialen DNA in 87 Probanden</b>	<b>88</b>
5.7.1	Temperaturabhängigkeit der allelspezifischen Primer	88
5.7.1.1	Temperaturkurve für die MELAS-Mutation an nt3243 (A → G)	89
5.7.1.2	Temperaturkurve für die MELAS-Mutation an nt3271 (T → C)	92
5.7.1.3	Temperaturkurve für die MELAS-Mutation an nt3291 (T → C)	94
5.7.1.4	Temperaturkurve für die MERRF-Mutation an nt8344 (A → G)	95
5.7.2	Quantitierung der Punktmutation Melas 3243 (A → G)	97
5.7.3	Quantitierung der Punktmutation Melas 3271 (T → C)	99
5.7.4	Quantitierung der Punktmutation Melas 3291 (T → C)	100
5.7.5	Quantitierung der Punktmutation MERRF 8344 (A → G)	102
<b>5.8</b>	<b>Patienten mit mehreren Mutationen</b>	<b>104</b>
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>108</b>
<b>6.1</b>	<b>Erzeugung von Plasmiden mit punktmutierten Inserts</b>	<b>108</b>
<b>6.2</b>	<b>Quantitierungsprobleme bei der kombinierten Methode aus seriellen Verdünnung und kinetischen PCR</b>	<b>109</b>
<b>6.3</b>	<b>Entwicklung einer modifizierten kinetischen PCR-Methode</b>	<b>111</b>
<b>6.4</b>	<b>Quantitierungsunterschiede am Beispiel einiger Probanden</b>	<b>113</b>
<b>6.5</b>	<b>Quantitierung von Probanden-DNA</b>	<b>114</b>

6.5.1	Quantitierung der <i>common deletion</i> bei 87 Probanden	114
6.5.2	Statistische Untersuchung zur Verteilung der <i>common deletion</i> im Skelettmuskel	115
6.5.3	Quantitierung von verschiedenen Punktmutationen bei 87 Probanden	116
<b>6.6</b>	<b>Vorkommen der Mutationen</b>	<b>118</b>
<b>7</b>	<b><i>Zusammenfassung</i></b>	<b>120</b>
<b>8</b>	<b><i>Literatur</i></b>	<b>122</b>
<b>9</b>	<b><i>Publikationsliste</i></b>	<b>140</b>
<b>10</b>	<b><i>Abkürzungen</i></b>	<b>142</b>
<b>11</b>	<b><i>Anhang</i></b>	<b>144</b>
<b>11.1</b>	<b>Humane Gewebeproben</b>	<b>144</b>
11.1.1	Biopsieproben	144
11.1.2	Autopsieproben	146
<b>11.2</b>	<b>Plasmidkarte des Plasmides pCII</b>	<b>147</b>
<b>11.3</b>	<b>Sequenzanalyse</b>	<b>148</b>
<b>12</b>	<b><i>Danksagung</i></b>	<b>152</b>

# 1 Einleitung

Das Altern ist verbunden mit einer progressiven Abnahme von Muskelmasse und Muskelleistung (Davies et al., 1986; Evans, 1995; Hurley, 1995). Der Verlust der Masse wurde im Skelettmuskel, Gehirn und anderen Geweben gefunden, insbesondere in solchen, die einen hohen Bedarf an oxidativer Phosphorylierung haben. Dieses Phänomen stimmt mit der Abnahme von Mitochondrien in diesen Geweben überein (Fries, 1980; Wallace, 1992; Shigenaga et al., 1994). Der altersbedingte Verfall ist charakterisiert durch die Abnahme von mitochondrialem Inhalt, oxidativer Kapazität, Enzymaktivität und der Zunahme von Mutationen der mitochondrialen DNA (Syrový und Gutmann, 1977; Poggi et al., 1987; Melov et al., 1995). Die steigende Zahl von atemungsdefekten Zellen (Fasern) wurden in Herz, Skelettmuskel und in einzelnen extraokularen Muskeln histochemisch nachgewiesen (Müller-Höcker, 1989, 1990; Müller-Höcker et al., 1992).

Mehr als 80 % der zellulären Energie wird durch oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien gewonnen, eine Korrelation zwischen der Alterung und mitochondrialen Funktionen ist naheliegend und wurde für die Atmungskettenaktivität gezeigt (Trounce et al., 1989, Boffoli et al., 1994). In fetalem Gewebe ist die anaerobe Glykolyse die Hauptquelle für zelluläres ATP, während die oxidative Phosphorylierung nur einen kleinen Teil zur Energieproduktion beiträgt (Burch et al., 1963; Hommes, 1975). Bei der Geburt tritt ein Anstieg der Atmungskettenfunktionen auf, welche in jungen und erwachsenen Säugetieren ihr Maximum erreicht (Pollak, 1975). Morphologische (Müller-Höcker, 1989, 1992) und biochemische Beobachtungen (Cardellach et al., 1989; Yen et al., 1989; Cooper et al., 1992; Boffoli et al., 1996) deuten auf eine fortschreitende Abnahme des mitochondrialen Atmungssystems in menschlichem Gewebe während des Alterns hin.

Alterung wurde lange als progressive Akkumulation von verschiedenen Veränderungen im Gewebe definiert, welche sowohl verbunden mit oder gar verantwortlich für die Anfälligkeit der Menschen für Krankheit und dem endgültigen Tod sind, die das fortschreitende Altern begleiten (Kadenbach und Müller-Höcker, 1990; Harman, 1991).

## 1.1 Mitochondriale DNA des Menschen

In menschlichen Zellen kommen bis zu hundert Mitochondrien vor, die bis zu tausend Kopien der mtDNA enthalten (Wallace, 1994). Das Mitochondrium besitzt ein eigenes Genom. Die mitochondriale DNA ist ein ringförmig geschlossenes, doppelsträngiges, superhelikales DNA-Molekül von 16569 bp Länge.

Sie kodiert 13 Strukturgene der Atmungskette, 22 Transfer-RNAs sowie eine kleine (12 S) und eine große (16 S) ribosomale RNA. Im Gegensatz zur genomischen DNA besteht das mitochondriale Genom fast nur aus kodierenden Sequenzen, es gibt keine Introns. In einigen Fällen überlappen sich die Enden des einen mit dem Anfang des anderen Gens auf den antiparallelen Strängen. Die typischen Stoppsignale am Ende des proteinkodierenden Bereichs fehlen, dafür sind die Strukturgene aber von zwei Bereichen, die für tRNAs kodieren, eingegrenzt. Beide Stränge der mtDNA unterliegen der Transkription. Der „Heavy“ und der „Light Strand“ besitzen jeweils einen Replikationsursprung und einen Promoter.

Auffällig ist, daß die Mitochondrien nicht den „universellen“ genetischen DNA-Code benutzen, sondern einen eigenen Code besitzen. Sie verwenden nur 22 verschiedene tRNAs, dagegen sind im Cytosol 61 vorhanden. Diese tRNAs lesen zum Teil vier verschiedene Codons. AGA und AGG, die normalerweise für Arginin kodieren, stehen in der mtDNA für Stopcodons. Auch kodiert AUA nicht für Methionin, sondern für Isoleucin und UGA ist kein Stopcodon, sondern steht für Tryptophan. Der nach der Crick'schen Wobbelregel berechnete Minimalwert von 32 tRNAs wird also in den Mitochondrien noch unterschritten (Grivell, 1983).

Ein weiterer Unterschied zur genomischen DNA liegt darin, daß die mitochondriale DNA maternal und nicht autosomal vererbt wird.

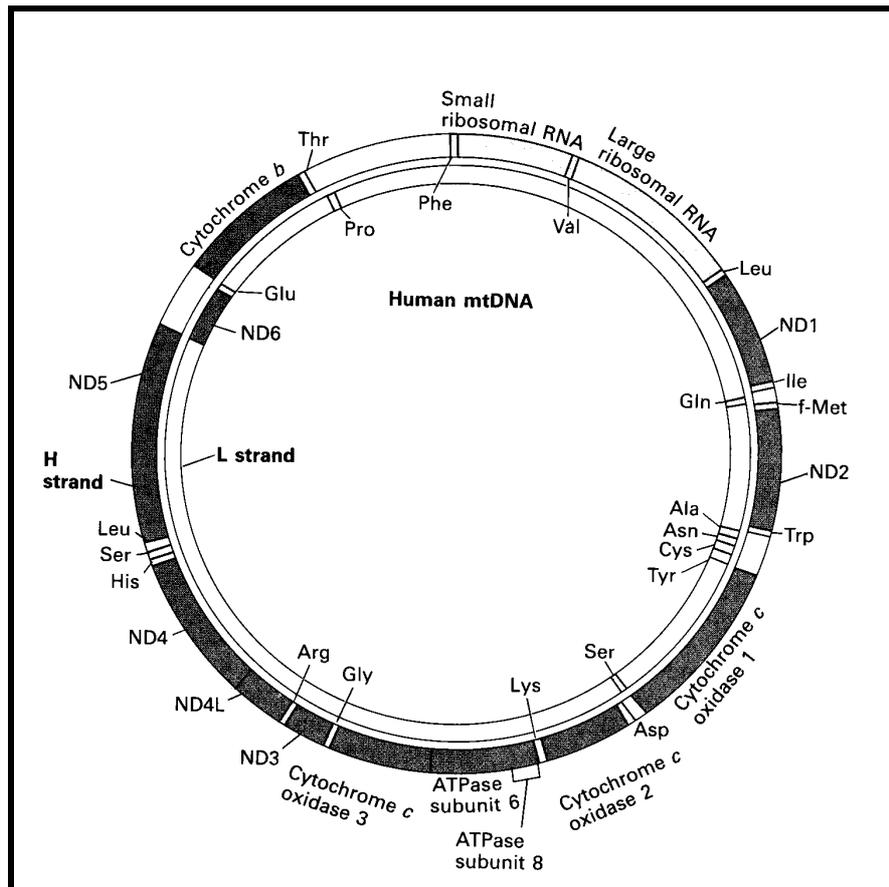


Fig. 1: Genkarte der menschlichen mitochondrialen DNA. Der äußere Strang wird als „Heavy-Strand“ (H-Strang), der innere als „Light-Strand“ (L-Strang) bezeichnet. Auf dem Genom befinden sich neben den Strukturgenen von den Untereinheiten der Atmungskettenenzymen, die Gene von 2 rRNAs und 22 tRNAs. ND1 bis ND6 kodieren für die Untereinheiten des Komplexes I der Atmungskette, die Gene Cytochrom c Oxidase I (COX I) bis Cytochrom c Oxidase III (COX III) kodieren für Komplex IV. Cytochrom b kodiert für das Cytochrom b des Komplexes III und ATPase 6/8 für Untereinheiten des F<sub>0</sub>-Bereiches der ATP-Synthase. OH und OL sind die Replikationsursprünge des H- bzw. des L-Stranges. PH und PL sind die Promoter für die jeweiligen Stränge.

Die folgende Tabelle lokalisiert die in Figur 1 dargestellten Gene der mitochondrialen DNA.

	Kodierender Strang	Position (Nukleotidpaar)
D-loop	H	16104 – 499
O <sub>H</sub> Replikationsursprung des H-Stranges	H	1 - 191
P <sub>L</sub> TranskriptionsPromoter des L-Stranges	L	404 - 424
P <sub>H</sub> TranskriptionsPromoter des H-Stranges	H	531 - 568
tRNA-Phe	H	577 - 647
12S -rRNA	H	648 - 1601
tRNA-Val	H	1602-1670
16S-rRNA	H	1671 - 3229
tRNA-Leu(UAA)	H	3230 - 3304
mRNA ND 1	H	3305 - 4262
tRNA-Ile	H	4263 - 4331
tRNA-Gln	L	4332 - 4400
tRNA-Met	H	4402 - 4469
mRNA ND 2	H	4470 - 5511
tRNA-Trp	H	5512 - 5579
tRNA-Ala	L	5580 - 5655
tRNA-Asn	L	5657 - 5729
O <sub>L</sub> Replikationsursprung des L-Stranges	L	5741 - 5752
tRNA-Cys	L	5761 - 5826
tRNA-Tyr	L	5826 - 5891
mRNA COX I	H	5901 - 7517
tRNA-Ser	L	7445 - 7516
tRNA-Asp	H	7518 - 7585
mRNA COX II	L	7586 - 8294
tRNA-Lys	L	8295 - 8364
mRNA ATP - Synthase 8	H	8365 - 8569
mRNA ATP - Synthase 6	H	8527 - 9206
mRNA COX III	H	9207 - 9990
tRNA-Gly	H	9991 - 10058
mRNA ND 3	H	10059 - 10404
tRNA-Arg	H	10405 - 10469
mRNA ND 4L	H	10470 - 10763
mRNA ND 4	H	10760 - 12137
tRNA-His	H	12138 - 12206
tRNA-Ser	H	12207 - 12265
tRNA-Leu(UAG)	H	12266 - 12336
mRNA ND 5	H	12337 - 14148
mRNA ND 6	L	14152 - 14673
tRNA-Glu	L	14674 - 14742
mRNA Cytochrom b	H	14747 - 15887
tRNA-Thr	H	15888 - 15953
tRNA-Pro	L	15955 - 16023

Tabelle 1: Lokalisierung der Gene auf der menschlichen mitochondrialen DNA in Figur 1.

## 1.2 Die Wirkung der reaktiven Sauerstoff-Spezies auf die Mitochondrien

Reaktive Sauerstoff-Spezies (reactive oxygen species (ROS)) werden aus zellulären Quellen wie Neutrophilen und Makrophagen als Bestandteile eines Verteidigungssystems (Janssen et al., 1993) und als Nebenprodukte der oxidativen Phosphorylierung in Mitochondrien, wo Sauerstoff zu Wasser reduziert wird, hergestellt (Chance et al., 1979; Breen and Murphy, 1995). Zusätzliche ROS werden durch nichtenzymatische Produktion von Hydroxylradikalen während der Exposition von Ionisierungsstrahlung erzeugt (Teoule et al., 1977; Clark et al., 1987). In Gegenwart von verschiedenen Medikamenten und Toxinen (z.B. Elektronentransportinhibitoren und Entkopplern, verschiedenen Quinonoidverbindungen) kann die mitochondriale Erzeugung von ROS verschieden ansteigen (Boveris du Chance, 1973; Boveris et al., 1976).

Das Superoxid-Anion-Radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ) scheint das erste Produkt der Sauerstoffreduktion zu sein, das unter physiologischen wie auch pathologischen Bedingungen erzeugt wird (Chance et al., 1979). Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und Hydroxylradikale ( $OH^{\cdot}$ ) werden durch weitere Reaktionen des Superoxid-Anions ( $O_2^{\cdot-}$ ) erzeugt (Davies et al., 1983; Davies und Doroshov, 1986).

Unterschiedliche Studien haben die DNA-Beschädigung, ausgelöst durch ROS, wie Einzelstrang- und Doppelstrang-Brüche und Basen-Beschädigungen, untersucht (Demple und Harrison, 1994; Friedberg et al., 1995). Einige Untersuchungen demonstrieren deutlich die Empfindlichkeit mitochondrialer Proteine, Lipide und von DNA gegenüber oxidativem Streß (Naraayashi et al., 1982; Davies et al., 1983; Ruach et al., 1983; Klimek et al., 1983; Marcillat et al., 1989). Vieles deutet darauf hin, daß oxidative Beschädigungen den Hauptgrund für die Begrenzung des mitochondrialen Umsatzes darstellen. Wie bei Zhang et al. (1990) beschrieben, ist die Stärke der oxidativen Zerstörung abhängig von der Art der Sauerstoff-Spezies, wobei Hydroxyl-Radikale die am meisten schädigende Änderung der mitochondrialen Funktion verursachen. Ebenfalls wurde gezeigt, daß ein Mangel an Antioxidantien in der Nahrung die Lebensspanne von Schweinen verkürzt (de Gritz und Rahko, 1995). Bekannt ist ebenfalls, daß Bestandteile der Elektronentransportkette und der ATPase durch ROS beschädigt werden (Zhang et al., 1990).

Verglichen mit nuklearer DNA weist mitochondriale DNA einen erhöhten Level von 8-oxoguanin auf (Richter et al., 1988), aber beide Genome akkumulieren Basenzerstörungen mit steigendem Alter (Shigenaga et al., 1994). Durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verursachte mtDNA-Beschädigungen treten zügiger und umfangreicher auf als die der nuklearen DNA. Bei einer Exposition mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> von mehr als 60 min konnte keine DNA-Reparatur in Mitochondrien beobachtet werden, während Beschädigungen der Kern-DNA vollständig beseitigt wurden. MtDNA-Reparaturen wurden nur bei Aussetzungen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> von weniger als 15 min beobachtet (Yakes und Van Houten, 1997).

### 1.3 Mutationen der mitochondrialen DNA

Vor mehr als vier Jahrzehnten schlug Harmann (1956), die sogenannte „Theorie der freien Radikale des Alterns“ vor. In diesem Konzept, wurde der Grund für das Altern in der Schädigung der Mitochondrien durch in den vorwiegend in der Atmungskette gebildeten ROS (reactive oxygen species) gesehen. Weiterhin schlug er vor, daß mitochondriale DNA ein mögliches Ziel für den Angriff freier Radikale im Alterungsprozess darstellen kann (Harmann, 1972). Tatsächlich ist die Mutationsrate 10 bis 20 mal höher bei humaner mtDNA als bei der Kern-DNA (Merriwether et al., 1991; Wallace, 1992b). Mögliche Gründe dafür könnten sein:

1. Die mtDNA befindet sich an der Matrixoberfläche der inneren Mitochondrienmembran, wo ROS in der Atmungskette gebildet werden (Boveris et al., 1972; Nohl et al., 1978; Fleming et al., 1982). Aufgrund dieser Tatsache entstehen mehr mtDNA-Mutationen als in Kern-DNA (Richter et al., 1988).
2. Mitochondrien haben ein weniger effizientes DNA-Reparatursystem als der Kern. Im Gegensatz zu früheren Annahmen (Clayton et al., 1974; Fukunaga und Yielding, 1979; Clayton, 1982) bestätigen einige Untersuchungen die Existenz von DNA-Reparatursystemen auch in Säugetier-Mitochondrien (Domina und Mosbaugh, 1985; Tomkinson et al., 1988, 1990; Pettepher et al., 1991), aber dieses Reparatursystem ist weniger effizient als das des Kerns (Yakes und Houten, 1997).
3. Im Kontrast zum Kern gibt es in den Mitochondrien für die DNA keine Schutzproteine wie Histone (Richter, 1992).

4. Es gibt einige Hinweise zur höheren Fehlerrate der mtDNA-Polymerase (Kunkel und Loeb, 1981; Pinz et al., 1995), währenddessen Williams et al. (1993) eine kleinere Fehlerrate für dieses Enzym beschreibt.
5. In der mtDNA liegt ein ungewöhnlich hoher Anteil von direkten Wiederholungen (*direct repeats*) vor (siehe Tabelle 4 in Schon et al., 1989), welche spontane Deletionen der mtDNA durch rekombinante Ereignisse unterstützen (Schon et al., 1989; Shoffner et al., 1989; Johns et al., 1989).
6. Der einzelsträngige D-loop-Replikations-Mechanismus der mtDNA könnte die intermediäre Bildung einer Kleeblattstruktur an den tRNA-Genen unterstützen, was zu einer Erhöhung der Fehlerrate der DNA-Polymerase- $\gamma$  an *hot spots* führen könnte. Dies wiederum führt zu Punktmutationen der tRNA-Gene (Lauber et al., 1991).
7. Die mtDNA unterliegt einem kontinuierlichen Umsatz sowohl in mitotischen als auch in postmitotischen Zellen (Menzies und Gold, 1971) und dies erhöht die Möglichkeit der Mutation (Richter et al., 1988; Wallace et al., 1995). Die auf diesem Wege mutierten mtDNA-Moleküle, maternal vererbt oder durch ein mutagenes Ereignis produziert in somatischen Zellen, können in postmitotischem Gewebe altersbezogen akkumulieren. Jedoch sammelt sich in jeder Zelle nur eine Deletion oder Punktmutation an (Müller-Höcker et al., 1993)

Die Folge von Mutationen der mtDNA sind komplex und haben starke Effekte auf den Energiestoffwechsel der betroffenen Zellen und Gewebe. Schädliche Neuarrangements oder Punktmutationen in Strukturgenen beeinträchtigen den betroffenen Enzymkomplex, während die in tRNA-Genen die Translation aller 13 mitochondrial codierten Proteine beeinträchtigen, da jede mitochondriale tRNA essentiell erscheint.

### 1.3.1 Veränderungen der mitochondrialen DNA beim Altern

Die These, daß ein großer Teil der Alterserscheinungen auf Mutationen der mtDNA zurückzuführen sind (Linane et al., 1989; Kadenbach und Müller-Höcker, 1990), führte in den letzten Jahren zu einer steigenden Anzahl von Arbeiten, die sich damit befaßten, daß mtDNA-Mutationen mit der menschlichen Alterung und mitochondrialen Erkrankungen verbunden sind (Wallace 1992b; Wei, 1992). Es gibt zwei verschiedene Manifestationen der mtDNA-Mutationen. Beim ersten Typ handelt es sich um alle Arten von Deletionen, Duplikationen

und Insertionen, die zu einer Veränderung der Länge des Genoms führen. Punktmutationen einzelner Basenpaare der mtDNA gehören jedoch zum zweiten Typ.

Mehr als ein Dutzend mtDNA-Deletionen wurden bereits in den verschiedenen Geweben von älteren Menschen identifiziert. Die meisten von ihnen wurden nur in einem besonderen Gewebe nachgewiesen, andere hingegen wurden in mehr als einer Gewebeart gefunden (Holt et al., 1988; Wei, 1992). Die am stärksten befallenen Gewebe, sowohl bei mitochondrialen Erkrankungen wie auch beim Alterungsprozeß, sind das Gehirn, das Herz und der Skelettmuskel, also Gewebearten mit hohem Energiebedarf (Wallace, 1992; Schon et al., 1994). Bei mitochondrialen Erkrankungen liegt der Schwellenwert bei 70-90% deletierter mtDNA, bevor klinische Symptome sichtbar werden.

Die bestuntersuchte mtDNA-Deletion ist die sogenannte *common deletion*, eine 4977 bp  $\Delta$ -mtDNA-Spezies, welche oft in Fällen von sporadischer Deletion auftritt (Schon et al., 1989). Diese Deletion wurde als molekulare Ursache für Krankheiten wie Kearns-Sayre-Syndrom oder oculare Myopathien identifiziert (Moraes et al., 1989; Nelson et al., 1989; Müller-Höcker et al., 1992).

Eine weitere Deletion ist die 7.4 kb-Deletion der mtDNA, auch große Deletion genannt. In diesem Fall ist die Region zwischen den Nukleotiden 8637-16084 deletiert. Diese mtDNA-Neuanordnung findet man bei der *chronic progressive external ophthalmoplegia* (CPEO), jedoch weniger als die *common deletion*. In beiden Fällen, *common deletion* und 7.4 kb-Deletion, werden die deletierten Regionen von Bereichen mit *direct repeats* flankiert.

Der Anteil der deletierten mtDNA ist im Falle von Alterung deutlich geringer als bei mitochondrialen Erkrankungen, beide Deletionen konnten aber auch hierbei nachgewiesen werden. Die Menge der deletierten mtDNA akkumuliert mit steigendem Alter und hängt stark vom untersuchten Gewebe ab (Liu et al., 1998; Zhang et al., 1998).

Der beste Weg, Informationen über das Ansteigen von Deletionen während des Alterns zu erhalten, wäre es, Proben eines Patienten im Laufe seines Lebens zu analysieren, da so der exakte Verlauf des Alterns gezeigt würde. Eine andere Möglichkeit stellen statistisch Analysen von Proben verschiedener Probanden unterschiedlichen Alters dar. Das Problem dieser Untersuchung ist es, ausreichend Proben desselben Gewebetyps, besonders jüngerer Probanden, zu erhalten. In der Regel handelt es sich um Autopsieproben, wobei der Tod meistens durch das hohe Alter oder bei jüngeren Probanden durch Krankheit verursacht wurde. Eine weitere Methode, um Informationen zu erhalten, stellt die Möglichkeit, kurzlebige Säugetiere zu untersuchen, dar. Es konnte gezeigt werden, daß die Mutationsrate

bei Mäusen wesentlich höher als bei Menschen ist, was mit der größeren Lebenserwartung von Menschen zu erklären ist (Wang et al., 1997).

Um den altersabhängigen Anstieg der deletierten mtDNA nachzuweisen, wurde meistens die PCR-Technik verwendet (Corral-Debrinski et al., 1992; Cortopassi et al., 1992; Simonetti et al., 1992; Wallace et al., 1992). Es ist schwierig, Ergebnisse verschiedener Gruppen miteinander zu vergleichen, da Änderungen von einzelnen Parametern der PCR, wie die Polymerase, Oligonukleotide, Zyklenzahl, Elongationszeit, Annealingtemperatur, Bestimmungsmethode der Menge des PCR-Produktes, Ionenstärke und die untersuchten Gewebe, die Ergebnisse stark beeinflussen können. Dies erklärt auch die Abweichungen der durchschnittlichen Deletionsmenge der *common deletion* bei Geweben von älteren Menschen. Garcia et al. (1996) gab die Menge an *common deletion* mit 0.005% bei älteren Menschen an, wohingegen Ozawa (1995) einen Anstieg auf 7% und Wallace et al. (1995) bis zu 10% bestimmten.

Müller-Höcker et al. (1993) konnten zeigen, daß eine Zelle jeweils nur eine Deletion oder Punktmutation aufweist, aber zwei verschiedene Zellen desselben Gewebes unterschiedliche Mutationen haben können. Es kann angenommen werden, daß die Ansammlung bestimmter Deletionen und Punktmutationen in einer Zelle (Faser) zu einem Abfall der mitochondrialen Funktion führen.

Diese altersabhängige Anhäufung von mtDNA-Mutationen wurde aber nicht nur für Neuarrangements der DNA gefunden, sondern auch für spezielle Punktmutationen, die bekannt sind als Grund für mitochondriale Myopathien, wie MERRF, MELAS oder CIPO (Münscher et al. 1993, Kadenbach et al., 1995). In beiden Fällen, Neuarrangements der mtDNA und Punktmutationen, kann die Veränderung beim normalen Alterungsprozeß mit etwa 40 Jahren nachgewiesen werden.

Mittels der PCR kann die Menge der mutierten mtDNA in einer Probe lediglich durchschnittlich bestimmt werden, weil es bei dieser Methode nicht möglich ist, Informationen über einzelne Zellen zu erhalten. Müller-Höcker et al. (1996) berichtete vom altersabhängigen Anstieg von Zellen mit defekter mitochondrialer Funktion bei Stammzellen, dies bestätigte die Ergebnisse, welche durch quantitative PCR erhalten wurden. Durch immunhistochemische Bestimmung konnte gezeigt werden, daß Defekte von Komplex III oder Komplex IV der Atmungskette einzeln oder kombiniert auftreten.

Im Gegensatz zu mitochondrialen Erkrankungen, existieren bei Proben von gealterten Individuen verschiedene mtDNA-Mutationen im selben Gewebe (Zhang et al., 1992; Münscher et al., 1993). Dies wurde durch Melov et al. (1997), der an postmitotischem

Gewebe von Mäusen eine altersabhängige Akkumulation von einem heterogenen Aufgebot von mtDNA-Neuanordnungen fand, bestätigt.

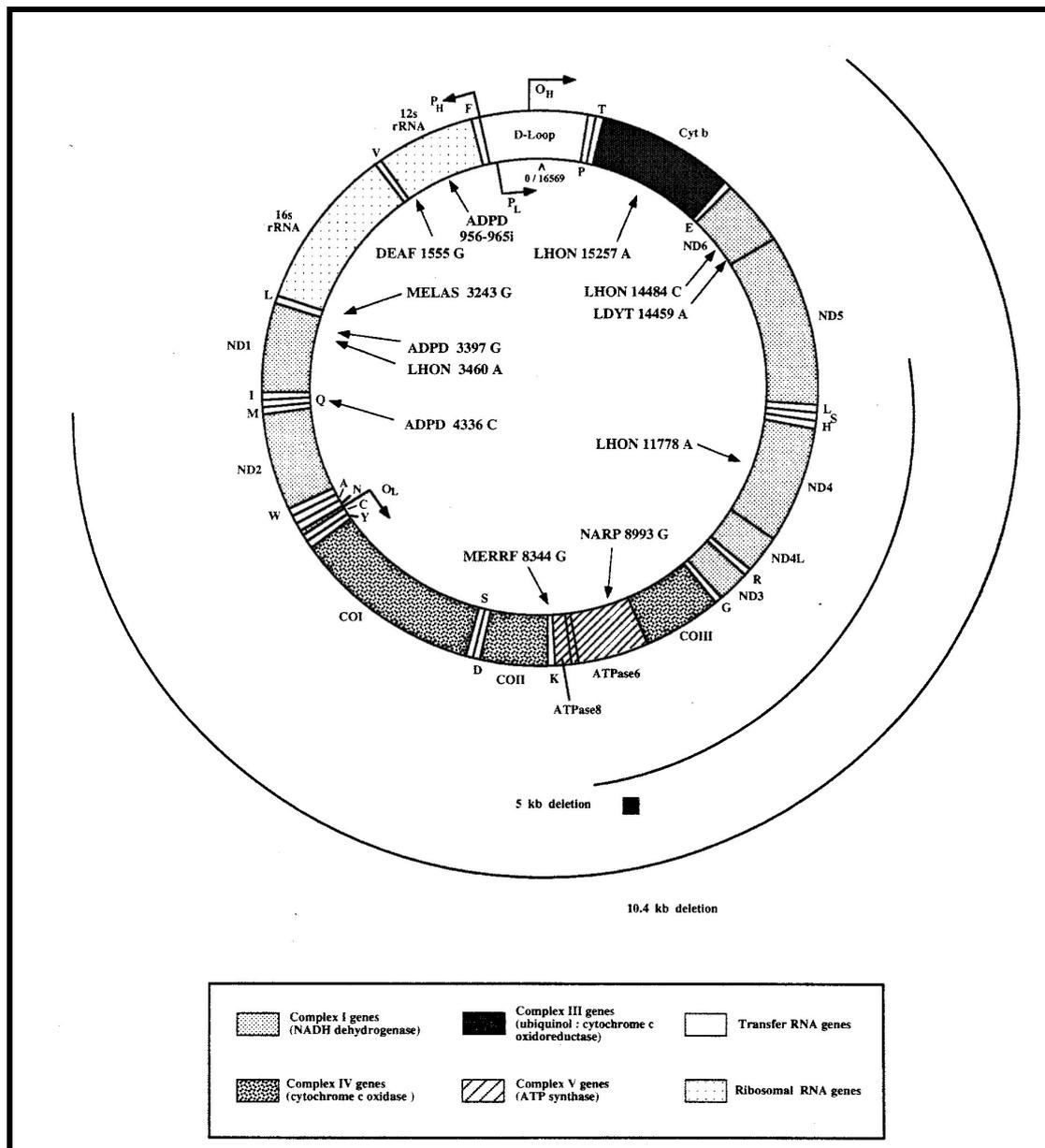


Fig. 2: Die humane mtDNA Karte zeigt die Lokalisierung der Gene und die geläufigsten Krankheitsmutationen. Die Gene sind in Fig. 1 und Tabelle 1 beschrieben. Die Position der Punktmutationen, die Krankheiten verursachen, sind durch vier oder fünf Buchstaben der klinischen Bezeichnung, die Nukleotidposition der Mutation und der mutierten Base, erkennbar. Die Lage von zwei Deletionsmutationen sind durch die äußeren Kreise angedeutet. Die Deletions-Mutation für Diabetes mellitus und Taubheit ist die 10.4 kb Deletion verantwortlich. Es handelt sich um dieselbe Bruchstelle wie die der 6.1 kb Insertion (Wallace et al., 1995).

Diese Tatsachen können auf zwei verschiedene Arten diskutiert werden. Die erste Möglichkeit ist die, daß die Beschädigung der DNA die Bildung von ROS unterstützt und somit weitere Beschädigungen hervorruft (Yakes und Van Houten, 1997). Dieser Weg würde aber mehrere Mutationen in einer Zelle zulassen. Die zweite Sichtweise ist, daß beschädigte Mitochondrien weniger intakte Enzyme produzieren und dadurch weniger ROS (de Grey, 1997). Diese Mitochondrien erleiden seltener einen lysosomalen Abbau, weil sie der freien Radikal-Zerstörung langsamer ausgesetzt sind. Wenn nun eine Mutation in einem Mitochondrium einer nichtteilungsfähigen Zelle auftaucht, wird das Mitochondrium schnell diese Zellen bevölkern und hierbei die Atmungsaktivität der Zelle zerstören.

### 1.3.2 Mitochondriale Myopathien

Bei den mitochondrialen Myopathien stehen Anomalien der Mitochondrien im Vordergrund, die zu Stoffwechselerkrankungen führen. Es kann zu einer Vermehrung der Mitochondrien oder Anhäufungen unter der Zellmembran kommen. Morphologische Veränderungen zeigen sich durch histochemische Untersuchungen als *ragged red fibres* (RRF). Diese bestehen vornehmlich aus der subsarkolemmalen Akkumulation von abnormen Mitochondrien.

Mutationen und Deletionen der mtDNA führen zu Erkrankungen des Energiestoffwechsels (ATP-Synthese), da die mtDNA 13 Untereinheiten von Enzymkomplexen der oxidativen Phosphorylierung kodiert. Der Anteil der mutierten bzw. deletierten DNA muß jedoch einen gewissen Schwellenwert überschreiten. Zu den häufigsten mitochondrialen Myopathien gehören das Kearns-Sayre-Syndrom, das MERRF-Syndrom (Myoclonic epilepsy with ragged red fibres) und das MELAS-Syndrom (Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke like episodes) (Di Mauro et al., 1985). Die klinischen Symptome lassen sich auf die verminderte Versorgung der Zelle mit ATP zurückführen und werden wie folgt beschrieben:

- Muskelschwäche
- Lactatacidose
- verminderter Wuchs
- Herzrhythmusstörungen
- Hemiparese (Lähmung einer Körperhälfte)
- Retinis Pigmentosa (Pigmentierung der Netzhaut)

- Ophthalmoplegie (Lähmung des Augenmuskels)
- akute oder subakute Blindheit
- epileptische Anfälle
- Demenz

Bei Patienten mit mitochondrialen Myopathien liegen Wildtyp- und mutierte DNA nebeneinander vor (Heteroplasmie). Der Schwellenwert, bei dem ein Krankheitsbild auftritt, ist meist höher als 80% (Schon et al., 1992).

### **1.3.2.1 Kearns-Sayre-Syndrom (KSS) und Chronic progressive external ophthalmoplegia (CPEO)**

Patienten, die an CPEO erkrankt sind, leiden an einer Lähmung der Augenmuskulatur (Ophthalmoplegie) und an anderen Symptomen unterschiedlicher Ausprägung. Hinzu kommen *ragged red fibres* und eine Erhöhung des Lactat- bzw. Pyruvat-Blutspiegels. Die Erkrankung ist progressiv und tritt vorwiegend im Erwachsenenalter auf.

Das Kearns-Sayre-Syndrom stellt sich als klinische Variante der CPEO dar. Die klinischen Symptome sind Ophthalmoplegie, Reizleitungsstörungen des Herzens und der Retinis Pigmentosa. Die Krankheit ist ebenfalls progressiv, tritt aber schon vor dem 20. Lebensjahr auf.

Die molekularbiologische Heterogenität dieser Syndrome ist charakteristisch. Verschieden lange Deletionen der mtDNA treten auf. Die von Lestienne und Ponsot (1988) beschriebene 5 kb Deletion konnte im Muskel eines KSS-Patienten, nicht aber in den Lymphocyten und Fibroblasten nachgewiesen werden. Bei 78% der KSS-Patienten und 56% der CPEO-Patienten konnten verschiedene Deletionen festgestellt werden (Moraes et al., 1989). Moraes et al. fanden die sogenannte *common deletion* bei 11 von 123 Patienten.

Deletionen sind oft durch *direct repeat*-Sequenzen von 13-18 bp flankiert (John et al., 1989). Die häufigste Deletion ist die *common deletion*, die von einem 13 bp *direct repeat* flankiert wird. Sie ist lokalisiert zwischen den Nukleotiden 8468 und 13446.

### **1.3.2.2 Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke like episodes (MELAS)**

Für das MELAS-Syndrom sind Durchblutungsstörungen (können zu Hirninfarkten führen), migräneartige Kopfschmerzen, Erbrechen, Lactatacidose oder cortikale Blindheit charakteristisch (Pavlakakis et al., 1984 und Montagna et al., 1988). Die Krankheit beginnt in den meisten Fällen zwischen dem 5. und 15. Lebensjahr. Eine Punktmutation am Nukleotid nt3243 von A nach G wird in 80% der Fälle gefunden. Bei Patienten mit oder ohne dieser Mutation war jedoch keine klinische Unterscheidung möglich (Goto et al., 1992). Die Mutation liegt in der tRNA-Leu(UUR) (Goto et al., 1990). Weitere vier Mutationen liegen ebenfalls im Bereich dieser tRNA. Sie befinden sich an den Positionen nt3251 (A nach G, Sweeny et al., 1993), nt3252 (A nach G, Morton et al., 1993), nt3271 (T nach C, Goto et al., 1991) und nt3291 (T nach C, Goto et al., 1994). Eine sechste Mutation an nt5601 liegt im Bereich der tRNA-Ala (G nach A, Tanaka et al., 1991).

Derzeit sind elf Punktmutationen in dem mt-tRNA-Leu(UUR)-Gen bekannt, wovon zehn mit mitochondrialen Erkrankungen verbunden sind. Das Gen der tRNA-Leu(UUR) beinhaltet nicht nur die größte Anzahl von vermutlich krankheitsauslösenden Mutationen, sondern auch ungefähr genauso viele Mutationen wie die übrigen 21 tRNA-Gene zusammen.

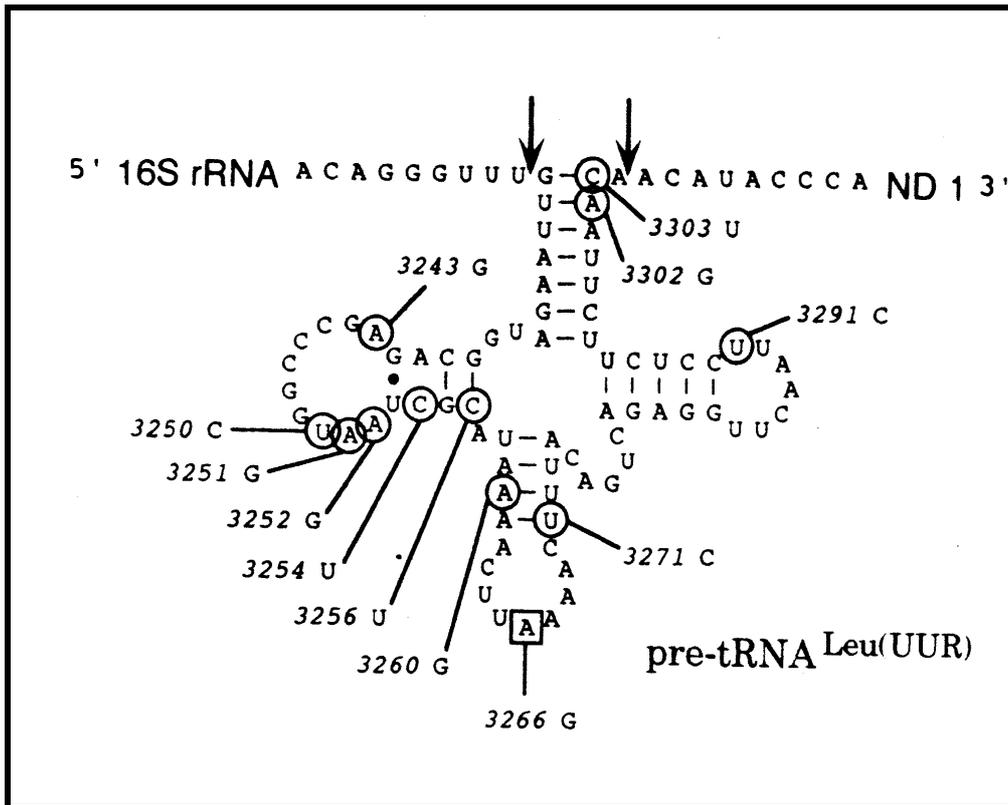


Fig 3: Schematische Darstellung des Vorläufers der mitochondrialen tRNA-Leu(UUR). Die Sequenz der mt tRNA-Leu(UUR) ist eingebettet zwischen die 16S rRNA und die NADH Dehydrogenase Untereinheit 1 mRNA (ND 1) in das Primärtranskript. Die elf Transitionen in den Kreisen sind durch ihre Nukleotidposition auf dem mitochondrialen Genom gekennzeichnet. Die A nach G Transition im Anticodon ist eine künstliche Mutation, die zur Kontrolle bei den Untersuchungen von Rossmanith und Karwan (1998) eingefügt wurde.

Die folgende Tabelle zeigt die Punktmutationen der mtDNA im tRNA-Leu(UUR).

Nukleotid Position	Mutation	Krankheit	Referenz
3243	A to G	MELAS / PEO Diabetes	Goto et al., 1990 van den Ouweland et al,1992
3250	T to C	Myopathie	Goto et al., 1992
3251	A to G	MELAS	Sweeney et al., 1993
3252	A to G	MELAS	Morten et al., 1993
3254	C to T	Natürl. Polymorphismus	Ozawa et al., 1991
3256	C to T	Multisystem / PEO	Moraes et al., 1993a
3260	A to G	Cardiomyopathie	Zeviani et al., 1991
3266	A to G	Kontrolle	Rossmannith und Karwan (1998)
3271	T to C	MELAS	Goto et al., 1991

3291	T to C	MELAS	Goto et al., 1994
3302	A to G	Myopathie	Bindoff et al., 1993
3303	C to G	Cardiomyopathie	Silvestri et al., 1993

Tabelle 2: Punktmutationen des mitochondrialen *tRNA-Leu(UUR)*-Gens. PEO: progressive external ophthalmoplegia,

Die MELAS-Mutationen an nt3243, nt3251, nt3252, nt3271 und nt3291 haben unterschiedliche Einflüsse auf die Struktur der mitochondrialen *tRNA-Leu(UUR)*. Die häufigste Mutation, die am Nukleotid 3243, verursacht in der *tRNA* den Verlust einer, für die tertiäre Struktur wesentliche Wasserstoffbrücke zwischen A14 und U8.

Die Transition am nt3251 wie auch die an nt3291 haben keinen bemerkenswerten Einfluß auf die Struktur oder die Prozessierung der pre-*tRNA-Leu(UUR)*. Im Fall der Punktmutation an nt3252 sind die Auswirkungen auf die Struktur dagegen wichtiger, da A21 an einer Interaktion mit A14 und U8 beteiligt ist. Die tertiäre Struktur wird durch den Verlust dieser Interaktion merklich negativ beeinflusst. Durch den Einbau eines weiteren AC *mismatch* im Anticodon-Stamm, durch den Basenaustausch an nt3271, wird dieser in seiner Stabilität geschwächt (Rossmannith und Karwan, 1998).

### 1.3.2.3 Myoclonic epilepsy with ragged red fibres (MERRF)

Bei dieser Krankheit werden familiäre Anhäufung und maternale Vererbung sowie Enzymdefekte der Atmungskette beobachtet (Pollok et al., 1986). Sie ist eine Stoffwechselerkrankung des Zentralen Nervensystems und der Skelettmuskulatur (Wallace et al., 1988). Als Symptome treten myoclonische Epilepsie, Gedächtnisstörungen, Hyperventilation, leichte Kardiomyopathie sowie der Verlust der Hörfähigkeit auf. Dabei kommt es zum Auftreten anomaler Mitochondrienanhäufungen, den *ragged red fibres*, die segmental in den Skelettmuskeln in Erscheinung tritt (Matsuoka et al., 1991).

Als Krankheitsursache wurde eine Mutation des Nukleotides nt8344 von A nach G diagnostiziert (Shoffner et al., 1990). In etwa 80% aller bekannten Fälle trat diese Mutation auf (Shoffner und Wallace, 1992). Da die Mutation in Heteroplasmie mit dem Wildtyp vorliegt, reichen 15% der Wildtyp mtDNA, um die COX-Aktivität auf einem normalen Niveau zu halten.

Eine weitere Mutation an nt8356 mit einer C nach G Transition wurde von Silvestri et al. (1992) gefunden. Beide Mutationen befinden sich im tRNA-Lys-Gen, wobei die Mutation nt8344 im T-Psi-C-Loop und die Mutation an nt8356 im anschließenden T-Psi-C-Stamm liegen.

## 1.4 Einfluß der Alterung auf die Atmungskettenenzyme

Die Mitochondrien erzeugen in der Atmungskette Sauerstoffradikale. An isolierten Mitochondrien wurde gefunden, daß annähernd 2% des gesamten verbrauchten Sauerstoffs nicht zu Wasser, sondern zu aktivierten Sauerstoff-Spezies umgewandelt wird (Chance et al., 1979). Obwohl mitochondriales Superoxid und Wasserstoffperoxid durch effiziente Radikalabfangsysteme, wie die Superoxid-Dismutase, Katalase und Gluthation-Reduktase umgesetzt werden, ist die oxidative Beschädigung der Mitochondrien nicht unwesentlich (Richter, 1992). Die Zunahme von ROS beim Altern und ihre Bildung durch die Mitochondrien läßt vermuten, daß die mitochondrialen Enzyme ein Ziel für ROS darstellen. Ebenso führen die zunehmenden Veränderungen der mitochondrialen DNA zu einer Abnahme der Synthese der mitochondrial codierten Enzyme oder zur Synthese von abnormalen Proteinen, was zu einer Schwächung der Enzymaktivität führt.

In vitro Experimente an Mitochondrien unterschiedlicher Tiergewebe zeigten, daß eine verminderte Proteinsynthese mit der Alterung auftaucht (Marcus et al., 1982; Bailey und Webster, 1984). Studien aus anderen Laboratorien unterstützten die Ergebnisse durch das Veranschaulichen einer altersabhängigen Abnahme der Aktivität der mitochondrialen Atmungsketten-Enzyme (Yen et al., 1989; Byrne et al., 1991; Cooper et al., 1992; Boffoli et al., 1994; Hsieh et al., 1994) und der  $F_0F_1$ ATP Synthase (Guerrieri et al., 1992, 1993). Die Abnahme der Atmungskettenaktivität impliziert die Abnahme der Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV). Dies konnte jedoch nicht für die Ubiquinon-Cytochrom-c-Oxidoreduktase (Komplex III) nachgewiesen werden (Boffoli et al., 1994). Weiterhin konnte keine signifikante Veränderung von Häm  $a_3$  und Cyt c beim Altern festgestellt werden. Diese Beobachtung zeigt, daß die Veränderungen der Atmungskettenaktivität hauptsächlich von der fortschreitenden Abnahme des Umsatzes der Atmungsenzyme, besonders der Cytochrom-c-Oxidase, abhängt. Die gegensätzlichen Ergebnisse der Experimente von Lefai et al. (1997) ergaben eine Abnahme der Enzymaktivität in Korrelation zur Abnahme der Enzymmenge in

der Entwicklung vom Kind zum jungen Erwachsenen. Dies ist offenbar nicht der Reduktion der intramuskulären Mitochondrienpopulation zu verdanken, da die Mitochondrienmenge pro Gramm des Muskels konstant bleibt (Lefai et al., 1995).

Yamada et al. (1995) bestätigten die Verwicklung von freien Radikalen in die altersbezogene Verminderung der mitochondrialen Funktion. Sie legten dar, daß die Behandlung mit Deoxorubicin, einem Radikal erzeugenden Medikament, die mitochondriale Funktion in Zwerchfell und im Herzen von Ratten beeinflußt. Zusätzlich fanden sie einen Rückgang der Cytochrom-c-Oxidase Aktivität in den Mitochondrien des Zwerchfells und des Herzen von unbehandelten Ratten.

Bei in vivo Experimenten an intakten Rattenleber-Zellen demonstrierten Sastre et al. (1996) eine altersgebundene Abnahme des mitochondrialen Membran-Potentials. Für die mitochondriale Membranmasse und die Mitochondriengröße wurden keine Altersabhängigkeit gefunden. Sastre et al. (1996) fanden ebenfalls einen Anstieg der Peroxidproduktion bei Mitochondrien und eine starke Zunahme des intrazellulären Peroxid-Pegels mit zunehmendem Alter.

## 2 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die mtDNA von 87 gesunden gealterten Patienten auf mehrere Punktmutationen (MELAS 3243, 3271, 3291 und MERRF 8344) und eine Deletion (4977 bp Deletion, *common deletion*) untersucht werden.

Die Quantitierung der Wildtyp-mtDNA und der mutierten mtDNA sollte mit der von Andreas Becker während seiner Dissertation entwickelten und von mir in meiner Diplomarbeit standardisierten kombinierten Methode der seriellen Verdünnungs- und kinetischen PCR durchgeführt werden. Hierzu sollten Plasmide hergestellt werden, welche die zu bestimmenden Mutationen tragen. Dies war notwendig, da diese Plasmide zur Bestimmung der PCR-Effizienz herangezogen werden sollten.

Auffallende Unterschiede in den detektierten Mengen der deletierten mtDNA bei unterschiedlichen Methoden der Quantitierung sollten dargestellt werden. Ein möglicher Fehler bei der Quantitierung sollte ermittelt und behoben werden. Hierzu sollten Versuche mit Stör-DNA durchgeführt werden, um deren Einfluß zu klären.

Die Methode der Quantitierung nach Becker et al. (1996) sollte modifiziert werden, um die Ergebnisse der Quantitierung der *common deletion* mit der ursprünglichen und der modifizierten Methode zu vergleichen. Die Punktmutationen sollten ebenfalls mit der modifizierten Methode quantitiert werden. Sowohl die *common deletion* als auch die Punktmutationen sollten auf ihre Altersabhängigkeit überprüft werden.

Statistische Untersuchungen der Verteilung der *common deletion* in sehr kleinen Fragmenten des Gewebes der Skelettmuskulatur eines Patienten sollten durchgeführt werden und Aufschluß über die starken Differenzen der publizierten Prozentgehalte der  $\Delta$ mtDNA/mtDNA geben.

Es sollten nicht nur Bestimmungen der Menge der mutierten mtDNA durchgeführt werden, sondern auch die Häufigkeit einer Mutation bzw. die Anzahl der Mutationen pro Patient und deren Altersabhängigkeit sichtbar gemacht werden.

## 3 Material

### 3.1 Enzyme, Kits und Reagenzien

Die bei der praktischen Durchführung verwendeten Reagenzien sind nachfolgend mit der jeweiligen Bezugsfirma aufgeführt. Alle verwendeten Chemikalien sind vom Reinheitsgrad p.a. (pro analysi) oder speziell für molekularbiologische Zwecke gereinigt.

### 3.2 Enzyme

#### 3.2.1 Enzyme

Vent-Polymerase (exo-)	New England Biolabs, Schwalbach
Proteinase K	Boehringer, Mannheim
Rnase A	Serva, Heidelberg

#### 3.2.2 Restriktionsenzyme

EcoR I	USB, Braunschweig
Hind III	Boehringer, Mannheim
Pvu II	USB, Braunschweig
Nae I	USB, Braunschweig
Apa I	USB, Braunschweig
Sma I	USB, Braunschweig
EcoR V	USB, Braunschweig

### 3.2.3 Kits

Qiagen Plasmid Midi Präparation	Qiagen GmbH, Hilden
Qiagen Plasmid Mini Präparation	Qiagen GmbH, Hilden
Qiaprep Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Jetsorb Gel Extraktions Kit	Genomed GmbH, Bad Oeynhausen
Nucleotrap Gel Extraction Kit	Machery-Nagel, Düren
<sup>32</sup> P Sequencing Kit	Pharmacia Biotech, Freiburg
Expand <sup>TM</sup> High Fidelity PCR System	Boehringer, Mannheim

### 3.2.4 Radioaktive Nukleotide

[ $\alpha$ - <sup>35</sup> S]-dATP	ICN, Eschwege
------------------------------------	---------------

## 3.3 Chemikalien für die Gelelektrophorese

ultrapure <sup>TM</sup> Agarose	BRL, Karlsruhe
Metaphor <sup>®</sup> -Agarose	FMC Bioproducts, Rockland, USA
Acrylamid 2X	Serva, Heidelberg
Ammoniumperoxodisulfat	Riedel de Hean, Hannover
Methacryloxypropylsilan	Sigma, Deisenhofen
Sigmacote	Sigma, Deisenhofen
TEMED	Pharmacia, Freiburg

## 3.4 Reagenzien für Nährmedien

Bacto Agar	Gibco, Karlsruhe
Bacto Trypton	Gibco, Karlsruhe
Hefe Extrakt	Gibco, Karlsruhe

### 3.5 Antibiotika

Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Kanamycin	Sigma, Deisenhofen

### 3.6 Bakterienstämme

<i>E. coli XL1 Blue</i>	Stratagene, Heidelberg
-------------------------	------------------------

### 3.7 Plasmide

pBluescript (KS -)	Boehringer, Mannheim
pCII	Dr. Eric Schon, Columbia University, New York, USA
PCRII-TOPO	Invitrogen, <a href="mailto:tech_service@invitrogen.nl">tech_service@invitrogen.nl</a>

### 3.8 Reagenzien

Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromkresolgrün	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Desoxyribonukleosidtriphosphate	Boehringer, Mannheim
Diethylether	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen

Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Gelantine	Serva, Heidelberg
$\beta$ -D-(+)-Glucose	Serva, Heidelberg
Glycerin	Merck, Darmstadt
HEPES	Serva, Heidelberg
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Manganchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat (steril)	New England Biolabs, Schwalbach
Mineralöl	Sigma, Deisenhofen
MOPS	Sigma, Deisenhofen
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Paraffin	Fluka, Neu-Ulm
Phenol (eq. in TE)	Roth, Karlsruhe
Rubidiumchlorid	USB, Braunschweig
SYBR Green I	FMC Bioproducts, Rockland, USA Biozym, Hess. Oldendorf
Tris-Puffersalz	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol FF	Serva, Heidelberg

### 3.9 DNA-Längenmarker

DNA-Mass-Ladder	Gibco, Karlsruhe
GenSura Super-Ladder MID1 500 bp-Ladder	Roth, Karlsruhe
$\lambda$ -Hind III	

### 3.10 Puffer und Stammlösungen für PCR

#### dNTP-Lösung (10x)

2,0 mM	dATP
2,0 mM	dCTP
2,0 mM	dGTP
2,0 mM	dTTP

#### Vent-Puffer (10x)

100 mM	KCl
200 mM	Tris-HCl (pH 8,8)
100 mM	Ammoniumsulfat
0,1 %	Triton-X-100

#### MgSO<sub>4</sub>-Puffer (steril)

100 mM	MgSO <sub>4</sub>
--------	-------------------

### 3.11 Lösungen für Gele

#### 6 x Auftragspuffer

0,1 mg	Bromkresolgrün
400 µL	Glycerin (steril)

auf einen Milliliter mit bidest. Wasser auffüllen

#### Ethidiumbromid-Stammlösung

10 mg	Ethidiumbromid
-------	----------------

in 1 mL ethanolischer Lösung

#### SYBR Green I

10 µL	10000x SYBR Green I-Puffer
-------	----------------------------

in 100 mL Agarosegelansatz

## 10 x TBE-Puffer

890 mM	Tris-HCl
890 mM	Borsäure
20 mM	EDTA

### 3.12 Sonstige Puffer und Lösungen

Sofern nicht anders angegeben, wurden die entsprechenden Lösungen auf einen Liter aufgefüllt.

## Homogenisierungspuffer I

25	mM	EDTA
5	mM	KCl
0.137	mM	NaCl
0.9	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *12H <sub>2</sub> O
55	mM	β-D-(+)-Glucose
20	mM	HEPES
		pH=7.1

auf 50 mL auffüllen, steril filtrieren, bei -20°C lagern

## Homogenisierungspuffer II

1	%	SDS
10	mM	EDTA
10	mM	HEPES
		pH=7.4

auf 50 mL auffüllen, steril filtrieren, bei -20°C lagern

## PCR-TE

10	mM	EDTA
200	mM	Tris-HCl
		pH = 8,0

## 1 M Tris-HCl

12,11 g/ 100 mL

pH = 7,5/8,0

## 0,5 M EDTA (pH = 8,0)

186,1 g EDTA

pH = 8,0 mit NaOH einstellen

## 10/1 TE

10 mM Tris-HCl (pH = 7,5 oder 8,0)

1 mM EDTA (pH = 8,0)

pH = 7,5 oder pH = 8,0

## 3 M Natriumacetat

408 g Natriumacetat (Trihydrat)

pH = 5,2 mit Eisessig einstellen

## TENS

10 mM Tris

1 mM EDTA

0,1 M NaOH

0,5 % SDS (w/v)

## TFB 1-Puffer

(sterilfiltriert)

100 mM Rubidiumchlorid

50 mM Manganchlorid

30 mM Kaliumacetat

10 mM Calciumchlorid

15 % Glycerin (v/v)

pH 5,8

## TFB 2-Puffer

(autoklaviert)

10 mM	MOPS
10 mM	Rubidiumchlorid
75 mM	Calciumchlorid
15 %	Glycerin
	pH 8.0

## Kanamycin

25.0 mg/mL	Kanamycin
------------	-----------

## Ampicillin

5.0 mg/mL	Ampicillin
-----------	------------

## 4x Entwickler für Röntgenfilme

4.0 g/L	Metol
52.0 g/L	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O frei)
12.0 g/L	Hydrochinon
104.0 g/L	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O frei)
4.0 g/L	KBr

## Fixierer für Röntgenfilme

200.0 g/L	Natriumthiosulfat
20.0 g/L	Kaliummetabisulfit

### 3.13 Medien

## 2x YT-Medium

16.0 g	Bacto Trypton
10.0 g	Hefe Extrakt
5.0 g	NaCl
	pro Liter

## LB-Medium

10.0 g	Bacto Trypton
5.0 g	Hefe Extrakt
10.0 g	NaCl
	pro Liter, für Agarplatten 15 g/L Agar zugeben

### 3.14 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Laborautoklav Sanoklav	Wolf, Geislingen
Vortex-Mixer	Bender & Hobein AG, Zürich
Cups	Eppendorf, Hamburg
	Perkin Elmer, Überlingen
	Biozym, Hessisch Oldendorf
DNA Thermal Cycler	Perkin Elmer, Überlingen
Elektrophoreseapparatur	Institutswerkstatt
Heraeus-Christ-Zentrifuge	Heraeus-Christ, Osterode
Tischzentrifuge	Hettich, Tuttlingen
Hochspannungstransformator	Biotec-Fisher, Reiskirchen
Verstellbare Pipetten	Abimed, Düsseldorf
	Eppendorf, Hamburg
	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Schüttelinkubator Certomat	Braun, Melsungen
Zweistrahlphotometer Uvikon 810	Kontron, Offenbach
Sterilfiltrationsfilter	Schleicher & Schüll, Dassel
Speed vac Concentrator	Bachhofer, Reutlingen
Transilluminator Ru-Ve 42 (366 nm)	Vetter, Wiesloch
Transilluminator Vilbert (302 nm)	Bachhofer, Reutlingen
Macintosh Performa 400	Macintosh, USA
frame grabber (Scion LG3-01)	Labortechnik Froebel, Wasserburg
VarioCam (CCD-video camera)	Labortechnik Froebel, Wasserburg
Cybertech CS1	Cybertech, Berlin

### 3.15 Gewebeproben

#### 3.15.1 Biopsieproben

Proben von Prof. Dr. Hans-Dieter Mennel, Neuropathologisches Institut der Universität Marburg. Es handelt sich um Skelettmuskelbiopsien.

Probenname	Geburtsdatum	Geschlecht	Alter zur Zeit der Entnahme in Jahren
88.02	29.06.61	m	27
88.04	14.05.35	w	53
88.05	12.06.56	w	32
88.06	22.07.29	w	59
88.11	07.04.88	w	0
88.12	16.08.43	m	45
88.13	13.04.21	w	67
88.14	13.01.39	m	49
89.01	09.02.33	w	56
89.07	03.11.58	m	31
89.08	09.10.26	m	63
89.09	16.12.45	w	44
90.01	14.08.46	w	44
90.02	21.02.30	w	60
90.03	25.01.62	m	28
90.04	20.02.39	w	51
90.05	02.11.57	m	33
90.08	02.11.15	w	75
90.09	21.07.64	m	26
90.10	24.06.66	m	24
90.11	12.07.30	w	60
90.12	24.01.49	w	41
90.13	25.09.90	w	0
90.14	17.09.62	w	28
91.02	07.12.15	m	76
91.03	30.05.61	w	30
91.04	24.05.44	m	47
91.06	21.06.23	m	68
91.07	03.04.75	w	16
91.08	16.10.32	w	59
91.09	27.01.35	w	56
91.10	14.04.40	w	51
91.11	24.10.48	w	43
91.13	04.01.43	m	48
92.01	11.01.61	w	31
92.03	18.02.21	m	71
92.04	14.05.39	m	53
92.05	01.01.69	m	23
92.06	02.05.32	w	60
92.08	22.02.38	m	54
92.09	07.12.30	m	62

93.02	18.08.66	w	27
93.03	25.06.21	w	72
93.04	05.05.34	w	59
93.05	17.12.50	w	43
93.06	24.08.28	w	65
93.07	30.08.60	m	33
93.09	16.01.60	m	33
93.10	05.12.58	w	35
93.11	10.06.44	m	49
93.12	08.05.23	m	70
93.14	23.09.39	m	54
93.15	30.10.33	w	60
93.16	23.10.71	w	22
93.17	10.09.39	m	54
93.18	23.04.55	w	38
93.19	05.10.72	m	21
93.20	07.07.25	w	68
93.23	03.09.30	m	63
93.24	02.08.53	w	40
93.25	25.06.46	m	47
93.26	04.02.65	w	28
93.27	16.05.16	m	77
93.28	24.08.38	m	55
93.29	21.07.25	m	68
93.30	02.02.42	m	51
93.32	22.10.63	w	30
93.33	19.03.52	m	41
93.34	15.09.41	m	52
94.01	19.03.59	m	35
94.02	09.06.60	w	34
94.03	19.05.62	m	32
94.04	12.02.14	m	80
94.05	01.09.51	m	43
94.06	26.03.40	m	54
94.07	03.12.36	m	58
94.08	17.02.31	m	63
94.09	11.10.39	m	55
94.10	03.03.45	m	49
94.11	30.10.13	w	81
94.13	02.09.27	m	67
94.14	30.11.46	m	48
94.15	14.10.77	w	17
94.16	09.10.31	w	63
94.18	04.07.44	m	50
94.19	12.04.30	w	64
94.20	24.06.75	m	19
94.31	12.07.67	m	27
94.35	21.10.49	w	45
94.38	08.06.25	m	69
94.45	17.10.26	w	68
94.46	24.02.61	m	33

Tabelle 3: Skelettmuskelbiopsien, Probenname, Geburtsdatum, Geschlecht und Alter zur Zeit der Entnahme

Von den vorliegenden Biopsien ist der Zeitraum zwischen ihrer Entnahme und Einfrieren nicht bekannt, so daß eventuell die mtDNA einiger der vorliegenden Proben schon abgedaut sein könnte.

### 3.15.2 Autopsieproben

Bei den Autopsieproben handelt es sich ebenfalls um Skelettmuskulatur.

Probenname	Geburtsdatum	Geschlecht	Alter zur Zeit der Entnahme
91.N	1919	m	72
91.O	1939	m	52
92.F	1905	w	87
92.H	1907	w	85
92.I	1958	w	34
92.K	1935	m	57
93.L	1921	w	72
93.M	1948	m	45
93.P	1931	w	62
93.Q	1914	m	79
93.RA	1955	m	38
93.C	1953	w	40
94.RB	1952		42
94.RC	1920	m	74
94.RD	1937		57

Sektion <12h	Sektion <24h	Sektion <48h	Sektion >48h
--------------	--------------	--------------	--------------

*Tabelle 4: Autopsieproben der Skelettmuskulatur, Probenname, Geburtsdatum, Geschlecht (falls bekannt), Alter zur Zeit der Entnahme und Verweildauer bis zur Sektion.*

Die Biopsie- und die Autopsieproben wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Die Autopsieproben wurden zudem luftdicht verschlossen und bis zur Bearbeitung (DNA-Isolierung) nicht aufgetaut.

### 3.16 Oligonukleotide für die PCR

Kurz-bezeichnung	Primer		5'end	3'end	Bp	T <sub>H</sub>	pm/μl	Sequenz	Restr.Site
B2	1574-E-16S	>	2772	2789	18	54	196.1	CACAGGTCCTAAACTACC	—
L9	ND1-for 2	>	3006	3024	19	64	421.0	TCCCGATGGTGCAGCCGCT	—
P1	3216-Mu-for-L	>	3215	3253	39	74	100.0	CAAGAACAGGGTTTGTTAAGATGGCAg ggcccGGTAATC	Apa I
P2	3225-Mu-for-K	>	3226	3243	18	51	100.0	GTTTGTTAAGATGGCAGG	—
O9	3234-rev	<	3234	3214	21	60	200.8	TTAACAAACCCTGTTCTTGGG	—
O10	3235-Mu-for	>	3235	3255	21	70	2233	GATGGCAgggcccGGTAATCG	Apa I
Q7	3244-Mu-for-L	>	3244	3281	38	70	100.0	GCCCGTAATCGCATAAAACTTAAAC CTTACAGTCAG	—
Q8	3256-Mu-for-K	>	3256	3271	16	40	100.0	CATAAAACTTAAACC	—
Q10	3263-Mu-for-L	>	3263	3298	36	67	100.0	CTTAAACTTTACAGTCAGAGGTTCAA TCCCTCTC	—
R1	3275-Mu-for-K	>	3275	3291	17	51	100.0	CAGTCAGAGGTTCAATC	—
P5	3714-rev	<	3714	3698	17	58	100.0	TACTGCTCGCAGTGCGC	—
B6	16S-rev	<	3717	3701	17	56	303.0	GGCTACTGCTCGCAGTG	Hind III
P4	3884-rev	<	3884	3867	18	56	100.0	GTCTCTGCTAGTGTGGAG	—
O8	8260-for	>	8260	8280	21	68	2943.0	TACCCTATAGCACCCCTCTA	—
P6	8327-Mu-for-K	>	8327	8344	18	45	100.0	AGTTAAAGATTAAGAGAG	—
P7	8324-Mu-for-L	>	8325	8354	30	63	100.0	TAAGTTAAAGATTAAGAGAGCCAACA CCTC	—
Q1	8669-rev	<	8669	8651	18	52	100.0	CATTGTTGGGTGGTGATT	—
N6	8869-rev	<	8869	8855	15	46	932.6	TAATCACTGTGCCCG	—
O2	13647-rev	<	13647	13631	17	54	779.7	GAAGCGAGGTTGACCTG	—
Q2	16106-rev	<	16106	16089	18	47	100.0	CAGTAATGTACGAAATAC	—

Tabelle 5: Beschreibung der verwendeten Primer. Die in der Spalte T<sub>H</sub> angegebene Temperatur gibt die theoretisch berechnete Hybridisierungstemperatur für den Primer an, nach der Formel  $T_H = (2AT + 4GC)$ . In der Spalte „Sequenz“ kleingeschriebene Nukleotide stehen für eine vorhandene Restriktionsschnittstelle. Die dazugehörige Restriktionsendonuklease steht in der Spalte „Restr. Site“. Unterstrichene Nukleotide entsprechen nicht der Wildtyp-DNA der Mitochondrien des Menschen.

Die während dieser Doktorarbeit neu synthetisierten Primer wurden mit dem Programm PrimerDesign V.1.10 (Jörg Napiwotzki und Andreas Becker) entworfen.

## **4 Methoden**

### **4.1 Sicherheitsbestimmungen**

Die Sicherheitsbestimmungen für die durchgeführten Experimente umfassen die in den Paragraphen 6-27 und 37 vorgesehenen Maßnahmen der Unfallverhütungsvorschrift „Medizinische Laboratoriumsarbeiten“ (VGB 114).

Autopsieproben und Biopsieproben wurde als potentiell infektiös angesehen und dementsprechend behandelt.

Arbeiten mit gesundheitsgefährdenden und mutagenen Substanzen (insbesondere Phenol, Chloroform, SYBR Green I und Ethidiumbromid) wurden unter dem Abzug durchgeführt. Abfälle dieser Chemikalien wurden getrennt gesammelt und entsorgt. Grundsätzlich wurden bei allen Arbeiten Einweghandschuhe getragen.

### **4.2 Isolierung und Aufreinigung von DNA**

#### **4.2.1 Isolierung von mitochondrialer DNA aus Geweben nach Wallace**

Die Autopsie- und Biopsieproben wurden nach der Mini-Präparationsmethode von Wallace (Wallace et al., 1988) aufgearbeitet.

Zunächst wurden die in flüssigem Stickstoff gefrorenen Proben im Achatmörser pulverisiert. Die Menge von etwa 10 - 30 mg dieses Pulvers wurde in einem Eppendorf-Cup mit 300 µL Homogenisierungspuffer I versetzt und mit einem Teflonstempel homogenisiert. Anschließend wurden der Suspension 300 µL Homogenisierungspuffer II hinzugegeben, gevortext und 20 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Um auf eine Endkonzentration von 1 M NaCl zu gelangen, wurden 190 µL 4 M NaCl-Lösung zugegeben. Die Suspension wurde nun für 30 min im Eisbad inkubiert. Nach 5-minütigem Zentrifugieren (Hettich Mikroliter 15000 U/min) wurde das Pellet verworfen und der Überstand weiterverarbeitet. Um die Proteine zu entfernen, wurde mit 15 µL 25%-iger SDS-Lösung (Endkonzentration 0.5%)

sowie 7.7  $\mu\text{L}$  einer 1%-igen Proteinase K-Lösung (Endkonzentration 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) versetzt und die Lösung über Nacht bei 55°C inkubiert. Eventuell vorhandene Gewebereste wurden danach nochmals abzentrifugiert. Die klare Lösung wurde zweimal mit 1 mL Phenol emulgiert und jeweils 15 min zentrifugiert. Das Phenol wurde vorsichtig entfernt. Um restliches Phenol abzutrennen, wurde mit 1 mL Chloroform extrahiert. Zur Ausfällung der DNA wurde der wässrige Überstand mit einer Ethanol-fällung (4.3.1.) aufgearbeitet. Die bei Raumtemperatur vakuumgetrocknete DNA wurde mit 50  $\mu\text{L}$  PCR-TE-Puffer aufgenommen und bei -20°C gelagert.

## **4.2.2 Präparation von Plasmid-DNA**

### **4.2.2.1 Präparation von Plasmid-DNA mit dem Qiagen Plasmid DNA Extraktions Kit**

2 mL einer 3 mL Übernacht-Bakterienkultur wurden 5 min bei 4000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge bei 4°C abzentrifugiert. Das hierbei gewonnene Bakterienpellet wurde mit 300  $\mu\text{L}$  Puffer P1 suspendiert. Nach Zugabe von 300  $\mu\text{L}$  Puffer P2 und vorsichtigem Mischen wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das hierbei entstandene klare Zellysate wurde mit 300  $\mu\text{L}$  Puffer P3 versetzt, sofort vorsichtig gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Die ausgefallene hochmolekulare DNA und die Proteine wurden in 30-minütiger Zentrifugation bei 12000 rpm und 4°C abgetrennt. Der Überstand wird auf eine mit 1 mL QBT equilibrierten Qiagen tip20-Säule gegeben. Die Säule wurde danach dreimal mit 1 mL QC-Puffer gewaschen und die Plasmid-DNA mit 0.8 mL Puffer QF in ein Eppendorf-Cup eluiert. Die Plasmid-DNA wurde nun mittels Isopropanolfällung (4.3.2.) präzipitiert und gereinigt. Die unter Wasserstrahlvakuum getrocknete DNA wurde in 50  $\mu\text{L}$  PCR-TE-Puffer aufgenommen.

Für größere Mengen Plasmid wurde die Midi-Präparation über Qiagen tip100-Säulen durchgeführt. Eine 200 mL Übernacht-Bakterienkultur wurde abzentrifugiert, das Pellet in 4 mL P1-Puffer suspendiert, mit 4 mL P2-Puffer lysiert und die hochmolekulare DNA sowie die Proteine mit 4 mL P3-Puffer ausgefällt. Die Equilibrierung der Säule erfolgte mit 5 mL QBT-Puffer. Nach dem Auftragen des Überstandes wurde dreimal mit 5 mL QC-Puffer gewaschen und anschließend die DNA mit 5 mL QF-Puffer eluiert. Auch hierbei wurde die

Isopropanolfällung verwendet, um die DNA auszufällen und aufzureinigen. Die bei RT vakuumgetrocknete DNA wurde in 100 µL PCR-TE-Puffer aufgenommen.

#### **4.2.2.2 Präparation von Plasmid-DNA mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit**

2 mL einer 3 mL Übernacht-Bakterienkultur wurden 5 min bei 4000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge bei 4°C abzentrifugiert. Das hierbei gewonnene Bakterienpellet wurde mit 250 µL Puffer P1 suspendiert und in ein Microfugen Gefäß überführt. Nach Zugabe von 250 µL Puffer P2 und vorsichtigem Mischen wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um lokale Präzipitation zu vermeiden, wurde sofort nach der Zugabe von 350 µL Puffer N3 vorsichtig gemischt. Die Lösung wurde bei diesem Schritt trüb. Bei der anschließenden Zentrifugation wurde die Qiaprep spin Säule auf ein 2 mL Auffanggefäß gegeben und 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und erneut für 30-60 s zentrifugiert, um weiteren Überstand zu entfernen. Die Säule wurde zum Waschen mit 0.5 mL Puffer PB beladen und 30-60 s zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde wiederholt. 0.75 mL Puffer PE wurden ebenfalls zum Waschen der Säule aufgetragen und 60 s abzentrifugiert. Die Zentrifugate wurden verworfen. Um sicher zu gehen, daß kein Waschpuffer verblieben war, wurde abschließend 1 min zentrifugiert. Zur DNA-Elution wurde die Säule auf ein frisches Cup überführt und mit 50 µL Puffer EB beladen, 1 min stehen gelassen und dann für 1 min zentrifugiert. Im Zentrifugat befand sich die DNA.

#### **4.2.2.3 Präparation von Plasmid-DNA mit der TENS Plasmid Minipräparation**

1.5 mL einer Übernacht-Bakterienkultur wurden bei 12000 rpm in einer Mikroliterzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde weitgehend entfernt, so daß 50-100 µL weiterhin verblieben. Die Zellen wurden in diesem Medium resuspendiert. Zur Zell-Lyse wurden 300 µL TENS-Lösung hinzugegeben und für 2-5 Sekunden gevortext bis die Suspension hochviskos wurde. Die Fällung der Proteine wurde dann mit 150 µL einer 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5.2) vorgenommen und das Gemisch erneut 2-5 Sekunden gevortext. Die Suspension wurde bei 12000 rpm für 2 min abzentrifugiert, der Überstand in ein frisches Eppendorf-Cup überführt und mit 900 µL -20°C kaltem absolutem Ethanol versetzt. Nachdem

die Lösung gut gemischt wurde, zentrifugierte man 15 min. Der Überstand wurde abdekantiert und mit 50  $\mu$ L 70%-igem Ethanol gewaschen. Nachdem das Pellet bei RT vakuumgetrocknet wurde, nahm man es in 20  $\mu$ L PCR-TE-Puffer auf. Für den anschließenden RNase-Verdau wurden 1  $\mu$ L einer 1 mg/mL RNase A-Lösung hinzugegeben und 30 min bei 37°C inkubiert.

### **4.2.3 Präparation von PCR-amplifizierter DNA**

#### **4.2.3.1 Präparation von PCR-amplifizierter DNA aus der PCR-Lösung**

Die PCR-Lösung wurde, falls mit Öl überschichtet war, mit Chloroform gereinigt und in ein neues Cup überführt. Es wurde 1 mL vom Puffer QBT hinzugegeben und auf eine ebenfalls mit QBT equilibrierten Qiagen tip5-Säule aufgetragen. Danach wurde dreimal mit 1 mL QC-Puffer gewaschen. Die DNA wurde mit 0.8 mL QF-Puffer eluiert und durch Ethanol-fällung präzipitiert. Die vakuumgetrocknete DNA wurde in 25  $\mu$ L PCR-TE-Puffer aufgenommen.

#### **4.2.3.2 Präparation von PCR-amplifizierter DNA aus Agarosegelen mit dem „NUCLEOTRAP extraction kit“**

Das gesuchte DNA-Fragment wurde unter UV-Licht (302 nm) möglichst schnell aus dem Agarosegel ausgeschnitten, um ein *crosslinking* zu vermeiden. Das ausgeschnittene Gelstück wurde in Eppendorf-Cups in maximal 300 mg-Mengen verteilt. Pro 100 mg Gel wurden 300  $\mu$ L NT1-Puffer hinzugefügt. Dieses Gemisch ließ man 10 min bei 50°C inkubieren, wobei alle 3 min gevortext wurde. Danach wurde 30 s zentrifugiert (10000 rpm) und der Überstand verworfen. Um das Pellet zu waschen, wurde nun mit 500  $\mu$ L NT2-Puffer emulgiert, gemischt und dann zentrifugiert (> 1000 rpm, 30 s). Der Überstand wurde verworfen und der Waschschrift wiederholt. Im zweiten Waschschrift wurde das Pellet ebenfalls zweimal mit 500  $\mu$ L NT3-Puffer versetzt, gemischt und zentrifugiert (>10000 rpm, 30 s) und der Überstand entfernt.

Danach wurde das gewaschene Pellet nochmals abzentrifugiert und 10 min unter Vakuum (kein Speed Vac) getrocknet und in 40  $\mu$ L PCR-TE-Puffer oder bidest. Wasser aufgenommen. Es wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, wobei die Probe alle 2-3 min vorsichtig gemischt wurde. Danach wurde zentrifugiert ( $>10000$  rpm, 30 s). Im Überstand befand sich die isolierte DNA.

#### **4.2.3.3 Präparation von PCR-amplifizierter DNA durch Anreicherung und Reinigung mit Microcon-100**

Der Microcon-Behälter wurde auf ein dazugehöriges Cup gesetzt und mit maximal 0.5 mL der aufzubereitenden Lösung versetzt. Danach wurde 15 min bei 300 rpm mit der Tischzentrifuge zentrifugiert. Die DNA wurde dabei im Microcon-Behälter aufgefangen und die abzentrifugierte Lösung verworfen. Das Microcon wurde umgekehrt auf ein neues Cup gesetzt und 1 min bei 300 rpm zentrifugiert. Die DNA wurde mit 10  $\mu$ L bidest. Wasser oder TE-Puffer von dem Microcon während des Zentrifugierens (1 min bei 300 rpm) gespült.

### **4.3 Fällung von DNA**

#### **4.3.1 Natriumacetat / Ethanol fällung**

Um DNA aus einer Lösung zu fällen, wurde zu dieser Lösung 1/8 Volumen 3 M Natriumacetatlösung (pH = 5,2) und 2 Volumen absolutem Ethanol gegeben. Die Fällung erfolgte innerhalb von zwei Stunden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  (Trockeneis) oder über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Durch eine 15- minütige Zentrifugation in einer Tischzentrifuge ließ sich die DNA als Pellet isolieren. Der ethanolische Überstand wurde verworfen und das Pellet ein- bis zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach 5-minütiger Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet am Wasserstrahlpumpenvakuum getrocknet. Die DNA konnte im gewünschten Puffer oder in bidest. Wasser aufgenommen werden.

### **4.3.2 Ammoniumacetat / Isopropanolfällung**

Die Verwendung von Isopropanol anstelle von Ethanol führte zu einer Fällung in einem geringeren Gesamtvolumen. Dazu wurde der DNA-Lösung  $\frac{1}{2}$  Volumen Isopropanol und  $\frac{1}{10}$  Volumen Ammoniumacetatlösung zugegeben und die DNA durch 30 minütige Inkubation bei Raumtemperatur gefällt. Zentrifugation und Waschen entsprach der Ethanol-fällung.

## **4.4 Extraktionen**

### **4.4.1 Phenolextraktion**

Die DNA-Lösung wurde mit dem gleichem Volumen TE-Puffer equilibriertem Phenol (pH=5.0) versetzt und in einer Tischzentrifuge zur Phasentrennung zentrifugiert (15000 rpm, 15 min, Raumtemperatur). Die wäßrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und konnte weiterverarbeitet werden.

### **4.4.2 Chloroformextraktion**

Die DNA-Lösung wurde mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (25:1) versetzt, gevortext und in einer Tischzentrifuge zur Phasentrennung zentrifugiert (15000 rpm, 5 min, Raumtemperatur). Die wäßrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und die organische Phase mit dem gleichen Volumen TE 10/1 (pH 7,2) reextrahiert. Die beiden wäßrigen Phasen wurden vereinigt.

## 4.5 Quantitierung von DNA und Oligonukleotiden

### 4.5.1 Photometrische Quantitierung von DNA

Die photometrische Quantitierung von dsDNA und ssDNA erfolgte durch Extinktionsmessungen bei 320 nm, 300 nm, 280 nm und 260 nm gegen das Medium, in dem die DNA gelöst vorlag. Zur Bestimmung einer Basisgeraden wurden die gemessenen Extinktionswerte (E) von 320 nm und 300 nm benutzt. Aufgrund dieser Geraden ließen sich neue, korrigierte Basiswerte für 280 nm und 260 nm,  $E_{280\text{korr}}$  und  $E_{260\text{korr}}$  bestimmen. Die Menge an gewonnener DNA sowie deren Reinheit ergibt sich dabei aus folgenden Formeln:

$$M = E_{260\text{korr}} \times 50 \times V$$

$$R = (E_{260\text{korr}} / E_{280\text{korr}})$$

M : Menge an DNA in  $\mu\text{g}$

V : Verdünnungsfaktor der Meßlösung

R : Reinheit der DNA

Eine Extinktion von 1 bei  $\lambda = 260$  nm entspricht einer Doppelstrang-DNA-Konzentration von 50  $\mu\text{g/mL}$ . Bei ssDNA entspricht eine Extinktion von 1 einer Konzentration von 33  $\mu\text{g/mL}$ . Der bestimmte Reinheitsquotient liegt für reine DNA-Lösungen über einem Wert von 1.8.

### 4.5.2 Photometrische Quantitierung der Oligonukleotide

Lyophilisierte Oligonukleotide wurden in 500  $\mu\text{L}$  bidestilliertem Wasser aufgenommen. 5  $\mu\text{L}$  dieser Lösung wurden mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt und im Zweistrahlphotometer bei den Wellenlängen 320 nm, 300 nm, 280 nm und 260 nm vermessen. Die Berechnung der Konzentration war im wesentlichen identisch mit der photometrischen Quantitierung von DNA-Lösungen. Lediglich entsprach hier eine Extinktion von 1 bei  $\lambda = 260$  nm einer Oligonukleotidkonzentration von 33  $\mu\text{g/mL}$ :

$$C = E_{260\text{kor}} \times 33 \times V$$

C : Konzentration [ $\mu\text{g/mL}$ ]

V : Verdünnungsfaktor

## 4.6 Auftrennung der DNA durch Agarosegelelektrophorese

### 4.6.1 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophoresen wurden in Apparaturen mit Gelvolumen von 60 bis 200 mL durchgeführt. Abhängig von der Größe, der zu trennenden DNA-Fragmente, wurden 0.8 - 2%ige Agarosegele angefertigt, größtenteils jedoch 1%ige Gele. Die benötigte Menge Agarose wurde abgewogen und in 1 x TBE-Puffer (für Agarosegele) für etwa 1.5 min in einem Mikrowellenherd (700 Watt) erhitzt. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 45°C wurde der jeweilige Nukleinsäure-Farbstoff zugefügt, kurz geschüttelt und die Lösung in das Gelbett der Elektrophoreseapparatur gegossen. Ein die Geltaschen formender Kamm wurde eingesetzt und das Gel zum Aushärten 10 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Nachdem das Agarosegel ausgehärtet, die Pufferkammern mit 1xTBE-Puffer (für Agarosegele) gefüllt und der Kamm entnommen waren, wurden die DNA-Lösungen mit 1/5 Volumen eines 6 x Auftragspuffers versetzt und in die Auftragsaschen des Gels pipettiert. Die Gesamtauftragsmenge betrug zwischen 5 und 12  $\mu\text{L}$ .

Die Elektrophorese der DNA wurde mit einer Spannung von 160 Volt durchgeführt, um die Diffusion kleinerer DNA-Fragmente möglichst gering zu halten. Nach etwa 20 min war die Elektrophorese beendet und das Agarosegel konnte direkt auf einem UV-Schirm betrachtet werden ( $\lambda = 302 \text{ nm}$ ). Als Längenmarker für DNA-Fragmente bis 2000 Basenpaare wurden 2  $\mu\text{L}$  DNA-Mass-Ladder auf das Agarosegel aufgetragen.

## **4.6.2 Auftragspuffer**

### **4.6.2.1 Bromkresolgrün-Auftragspuffer**

Dieser Auftragspuffer enthält nur eine geringe Konzentration des Farbstoffs Bromkresolgrün. Es tritt ein Leuchten unter der UV-Lampe auf. Die Laufhöhe liegt etwa in der eines 100-150-Basenpaar-Fragmentes, so daß er bei einer Quantitierung der PCR-amplifizierten Fragmente von 400-550 Basenpaaren nicht störend wirkt. Die Glycerinkonzentration wurde sehr hoch (40%) gewählt, um eine Diffusion der DNA aus den Geltaschen zu verhindern.

## **4.6.3 Anfärben der Agarosegele**

### **4.6.3.1 Ethidiumbromid-Färbung**

Qualitative Agarosegele wurden mit Ethidiumbromid angefärbt. Hierzu wurden 5 µL Ethidiumbromid (10 mg/mL) pro 100 mL Gelansatz hinzugefügt und das Gel wie oben beschrieben gegossen.

### **4.6.3.2 SYBR Green I-Färbung**

Die quantitativen Gele wurden mit dem Nukleinsäure-Farbstoff SYBR Green I angefärbt. Es wurden 10 µL SYBR Green I pro 100 µL Gelansatz verwendet. Dieser Farbstoff hat für die Quantitierungs-Methode einige Vorteile. Der Farbstoff ist etwa 20-25 mal sensitiver als das gebräuchliche Ethidiumbromid, so daß schon geringe Mengen (etwa 0.2 ng) von DNA nachweisbar sind. Zusätzlich weist er keine Hintergrundfluoreszenz auf.

#### 4.6.4 Neuartige Quantifizierungsmethode

Diese neue nichtradioaktive Methode beruht auf einer Verbindung aus seriellen Verdünnungen und Zyklentitrationsen. Mit zwei Primern werden spezifische Amplifikationen der mtDNA erhalten, deren Menge in einem Agarosegel mit Hilfe eines neuen Fluoreszenzfarbstoffes „SYBR Green I“ bestimmt wurde. Der Nukleinsäurefarbstoff SYBR Green I erlaubt es, amplifizierte Banden schon im exponentiellen Bereich der PCR zu bestimmen, da seine Sensitivität etwa 20-25 mal höher als die von Ethidiumbromid ist. Nach der Aufnahme der Agarosegele mit einer Videokamera werden die Bandenintensitäten mit Hilfe des Programms NIH Image berechnet und mit einer graphischen Methode ausgewertet.

##### 4.6.4.1 Ansatz der PCR-Lösungen und Ablauf der PCR

Zur PCR-Kalibrierung wurden 18 PCR-Reaktionsgefäße, für die Patientenquantifizierung jeweils 3 Cups pro Patient benötigt. Das bedeutet, daß bei 48 Stellplätzen in dem Perkin Elmer TC1-Cycler bei jeder PCR 10 Patienten-DNAs bestimmt werden konnten. Da die PCR-Lösungen der Kalibrierung und der Patientenquantifizierung die gleiche Zusammensetzung hatten und nur die zugegebene DNA variiert wurde, wurde zunächst ein Gesamtansatz für alle Reaktionsgefäße pipettiert (H<sub>2</sub>O, dNTPs, Ventpuffer, Primer forward, Primer reverse, MgSO<sub>4</sub>-Lösung und Vent-(exo-)-Polymerase). Die PCR-Kalibrierung bestand aus 6x3 PCR-Cups. Es wurden für sechs unterschiedliche Konzentrationen (z.B. 100 ng Gesamt-DNA/100 µL PCR-Lösung, 30 ng Gesamt-DNA/100 µL PCR-Lösung, 10 ng Gesamt-DNA/100 µL PCR-Lösung usw.) jeweils drei Gefäße vorbereitet. Die Verdünnungen unterhalb von 100 ng Gesamt-DNA/µL sollten immer neu angesetzt werden, weil die Menge des zu amplifizierenden Fragmentes bei älteren Lösungen der höheren Verdünnungen stark vermindert ist. Um den Pipettierfehler bei der DNA-Zugabe zu minimieren, wurde für diese drei PCR-Lösungen ebenfalls ein größerer Ansatz aliquotiert. Es wurde ein vierfaches Aliquot eines Einzelansatzes mit der entsprechenden Menge an DNA versetzt. Die Vorgehensweise war bei den Patienten-Proben dieselbe. Nachdem die Vierfachansätze auf die PCR-Reaktionsgefäße verteilt worden waren, wurde die Lösung mit 35 µL geschmolzenem Paraffin überschichtet. Um sicher zu gehen, daß die DNA vollständig denaturiert war, wurde

ein *hot start* von 4 min durchgeführt. Die PCR wurde dem folgenden Temperaturprofil unterzogen:

T <sub>Denaturierung</sub>	=	94°C	60 s
T <sub>Annealing</sub>	=	57°C	45 s
T <sub>Elongation</sub>	=	72°C	45 s
≤35 Zyklen			

Die PCR-Cups wurden im Sinne einer Zyklentitration entnommen. Die Entnahme erfolgte immer bei einer Temperatur von 74°C vor der Denaturierung des nächsten Zyklus. Die Proben wurde sofort auf Eis gestellt.

#### 4.6.4.2 Agarosegelelektrophorese der Quantitierung

Da SYBR Green I leichter zerfällt als Ethidiumbromid, empfiehlt es sich, den Farbstoff in 50 µL-Aliquots aufzuteilen, ihn nicht länger als nötig bei Raumtemperatur zu belassen und nicht dem Licht auszusetzen. Das 1%ige Agarosegel wurde bei einer Temperatur von 45-50°C mit SYBR Green I versetzt und danach sofort in die Agarosegelapparatur gegossen. Nach dem Erstarren des Geles wurde es mit TBE-Puffer überschichtet und der Kamm entfernt. Die Auftragsmenge des Mengenstandards richtete sich nach der geforderten DNA-Menge. Von den Lösungen der PCR-Kalibrierung und der Patienten-DNA-Proben wurden immer 10 µL aufgetragen. Das Volumen des Auftragspuffers wurde auf 3 µL festgelegt. Eine Spannung von 160 V wurde angelegt. Die Migrationsweite des Farbstoffes betrug 3 cm.

#### 4.6.4.3 Auswertung des Gels mit dem Programm NIH Image

Die Erfassung des Geles mit der Videokamera wurde im Programm NIH Image dargestellt. Die Funktion *start capturing* ermöglicht die Aufnahme eines Standbildes, welches von der Kamera festgehalten wurde. Um einen Intensitätsverlust der fluoreszierenden DNA-Banden zu vermeiden, wurde die optimale Position und maximale Größe des gewünschten Gelausschnittes bei geöffneter *black box* (Kammer für die Videokamera) und nicht eingeschaltetem UV-Schirm bestimmt. Danach wurde der UV-Transilluminator angestellt und die *black box* sofort verschlossen. Die Zeitspanne zwischen UV-Beleuchtung und Abspeicherung des Gelbildes mußte sehr klein sein, da der Fluoreszenzfarbstoff sehr schnell ausbleicht.

Die Belichtungszeit und die Anzahl der Graustufen wurden an der Kamera eingestellt. Das Bedienungselement befindet sich außerhalb der *black box*. Die Kamera „VarioCam“ besitzt eine breite Dynamik und eine ausgezeichnete Auflösung. Die breite Dynamik ermöglicht eine proportionale Umwandlung der Intensität in entsprechende Grauwerte über einen weiten Bereich an DNA-Mengen, ohne daß die Bestimmung durch die Eigenschaften der Kamera verfälscht wird. Außerdem zerlegt sie die aufgezeichneten Bilder in sehr viele Einzelpunkte (Pixel), d.h. sie hat eine hohe Auflösung.

Die Auswertung des Bildes erfolgt mit einem Macintosh Performa 400 Computer und dem public domain „NIH Image Programm“ (geschrieben von Wayne Rasband, U.S. National Institutes of Health) und dem Makro „Gel\_Plotting\_Andreas.txt“ (geschrieben von Andreas Becker). NIH Image ermöglicht die Aufnahme der Gelbilder in verschiedenen *look up tables*. Die Fehlfarbandarstellung *16 color ramp* erleichtert es, eine Überbelichtung des Bildes zu vermeiden, eine optimale Belichtungszeit und Graustufeneinstellung zu finden. Überbelichtete Stellen werden weiß dargestellt und können nicht zur Quantifizierung verwendet werden. Der Wert der Graustufeneinstellung der Kamera (*gain*) wurde sehr klein gewählt (0-6), da dies die breiteste Dynamik bedeutet. Die Belichtungszeiten variierten zwischen 8 und 128 (ohne Einheitenangabe). Das optimal belichtete Gelbild wurde gespeichert. Mit der Markierungsfunktion des Programmes NIH Image wurde die erste sichtbare Bande markiert. Der Markierungsbereich darf nicht zu klein sein, damit später eine Hintergrundsubtraktion möglich ist. Die Funktion *mark first lane* (Nummernblock: 1) vollzog die Markierung und öffnete ein neues Fenster der auszuwertenden Gelreihe. Mit der Pfeiltaste wurde die Markierung auf die nächste Bande gezogen und dort mit der Funktion *mark second lane* (Nummernblock: 2) festgelegt. Alle weiteren Banden dieser Reihe wurden wie die zweite

Bande markiert. Als dies abgeschlossen war, wurde mit Hilfe der Funktion *measure* (Nummernblock: 3) die Darstellung der Bildpunkte<sup>2</sup> x Grauwerte als zweidimensionaler Plot initiiert. An dieser Stelle mußten Basislinien mit dem Werkzeug *line* hinzugefügt werden, um den Hintergrund zu subtrahieren. Der so eingegrenzte Bereich unter der Kurve wurde mit dem NIH Image-Zauberstab-Werkzeug (*wand-tool*) bestimmt. Der folgende Befehl *show results* (Apfel-Taste 2) zeigte die Daten der Berechnung des Zauberstabes als Tabelle. Diese Meßwerte wurden gespeichert und weiter mit einem Mathematikprogramm für PCs ausgewertet.

#### 4.6.4.4 Graphische Auswertung der Daten

Als Mengenstandard zur Eichung des zu messenden PCR-Produktes wurde zum einen pBluescript(SK-) verwendet. Eine 200 mL-Übernacht-Bakterienkultur wurde mit der Qiagen Midi-Präparation aufgereinigt. Das Plasmid wurde einem Verdau mit Pvu II bei 37°C unterzogen (Inaktivierung 65°C, 15 min), wobei man zwei Fragmente erhielt (2515 bp und 445 bp). Das 445 bp-Fragment wurde nun durch Gelelektrophorese vom Größeren getrennt, aus dem Gel herausgeschnitten und mit der Jetsorb Gel Extraktions-Methode isoliert.

Ein anderer Mengenstandard wurde mittels PCR amplifiziert. Die Primer für *common deletion* und das Plasmid pCII bildeten die Grundlage hierfür. Die Aufreinigung des entstandenen PCR-Produktes der Länge 410 bp erfolgte durch Verwenden von Microcon-100.

Als Stammlösung für die PCR-Produktbestimmung wurden Verdünnungen von 50 ng/µL, 5 ng/µL und 0.5 ng/µL hergestellt. Da das PCR-amplifizierte Patienten-DNA-Fragment bei einer Auftragung von 10 µL der PCR-Lösung 100 ng oder weniger beträgt, wurden 150 ng, 50 ng, 35 ng, 15 ng, 5 ng, 3.5 ng und 1.5 ng Plasmid auf dem Gel aufgetragen, um so eine gute Bestimmbarkeit zu erzielen.

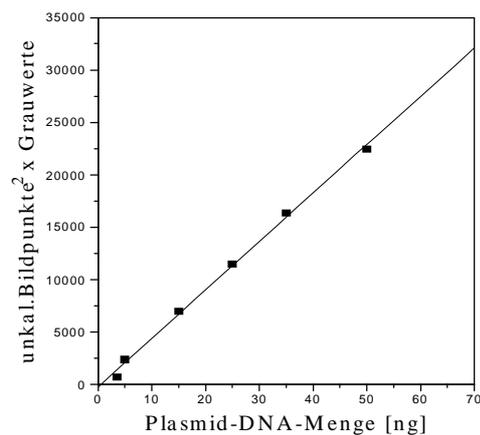


Fig. 4.: Auftragung der eingesetzten Menge an Plasmid-Fragment (3.5 ng, 5.0 ng, 15 ng, 25 ng, 35 ng, 50 ng) gegen die durch NIH Image ermittelten Werte der unkalibrierten (Bildpunkte<sup>2</sup> x Grauwerte) Ausgleichsgerade mit der Funktion  $y = A + Bx$ . (Annette Reith, Diplomarbeit)

Mit Hilfe der Ausgleichsgeraden können beliebige Fluoreszenzintensitäten (unkal. (Bildpunkte<sup>2</sup> x Grauwerte)) eines PCR-amplifizierten Patienten-DNA-Fragmentes einer bestimmten DNA-Menge zugeordnet werden.

#### 4.6.4.5 Effizienzbestimmung der PCR

Bei der Effizienzbestimmung der PCR wird ein Proband mit etwa 100% Wildtyp-mtDNA bzw. mutierter oder deletierter mtDNA benötigt. Dies ist im Falle des Wildtyps möglich, jedoch bei den beiden anderen Fällen muß auf Plasmid-DNA zurückgegriffen werden, da keine Patienten-DNA mit großer Menge von *common deletion* oder einer Punktmutation vorliegt. Das Plasmid pCII enthält Bereiche der humanen mtDNA, die vor und hinter der *common deletion* (deletierter Bereich 8468-13446) liegen.

Die Effizienzbestimmung der PCR der Wildtyp-mtDNA wurde mit dem Patienten 93.Q durchgeführt. Zunächst wurde eine Verdünnungsreihe der photometrisch quantitierten DNA angelegt (100 ng/μL, 30 ng/μL, 10 ng/μL, 3 ng/μL, 1 ng/μL, 0.3 ng/μL).

An dieser Stelle wurde als Vorversuch die Verdünnung 10 ng/μL verwendet, um die Amplifikation der DNA bei einer Zyklentitration, startend im Zyklus 10, bis in die

Plateauphase der PCR zu verfolgen. Dies war notwendig, um zu erfahren, in welchen Zyklen die Kalibrierungsproben bei einer Quantitierung entnommen werden sollten.

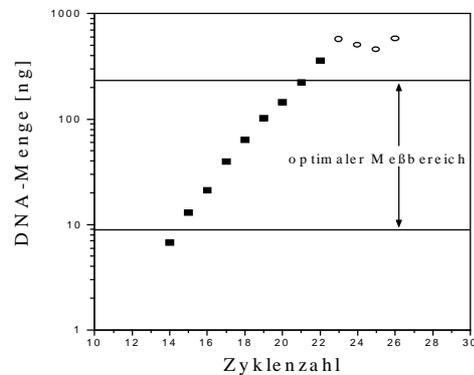


Fig. 5: Auftragung der Zykluszahl gegen die Menge des amplifizierten Fragmentes in 100  $\mu\text{L}$  Lösung. DNA des Patienten 93.Q (87 Jahre). Zyklentitration des Ansatzes 10 ng Patienten-DNA/100  $\mu\text{L}$  PCR-Ansatz. PCR-Ansatz und Temperaturprofil wie unter Kapitel 4.6.4.1 beschrieben. ■ exponentieller Bereich, ○ Plateauphase der PCR (Annette Reith, Diplomarbeit).

Anhand dieser Grafik kann man erkennen, daß für die Verdünnung 10 ng/ $\mu\text{L}$  die Zyklen 15-21 im exponentiellen Bereich liegen. Ein zu hoher Zyklus würde in der Plateauphase der PCR und dem Sättigungsbereich der Kamera liegen, was zu starken Schwankungen in der amplifizierten Menge bzw. ihrer Auswertung führt. Ist jedoch der Zyklus zu niedrig gewählt, trifft man auf die Grenzen der minimalen Auswertbarkeit. Die Banden werden hierbei nicht mehr ausreichend angefärbt, so daß sie sich nicht mehr deutlich vom Hintergrund abheben. Sie sind nicht mehr auswertbar. Aus diesem Grund werden nur die Zyklen 16-18 zur Effizienzbestimmung verwendet.

Mit folgender mathematischer Gleichung kann man den Zyklusabstand ( $\Delta n$ ) berechnen, der bei unterschiedlicher Verdünnung die gleiche Menge amplifizierter DNA liefert.

$$\Delta n = \log(\text{Verdünnung}) / \log(\text{Effizienz})$$

$$\Delta n = \text{Zyklusabstand}$$

Es wurden jeweils drei PCR-Reaktionsgefäße für jede Verdünnung vorbereitet, die im Abstand von zwei Zyklen (Zyklusabstand: 1.Cup 100 ng/100  $\mu\text{L}$  zu 1. Cup 30 ng/100  $\mu\text{L}$  beträgt zwei Zyklen) entnommen wurden.

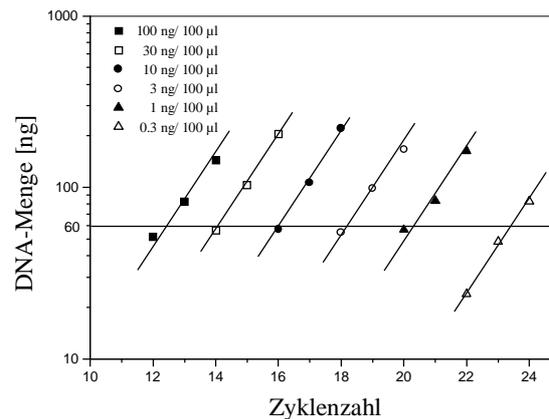


Fig. 6: Auftragung der Zyklenzahl gegen die Menge des amplifizierten Fragmentes (Isolinien-Plot). DNA des Patienten 93.Q (87 Jahre). PCR-Ansatz und Temperaturprofil wie unter Kapitel 4.6.4.1 beschrieben. Isolinie bei 60 ng. Graphisch ermittelte Zyklenzahlen: 100 ng/100 µL = 12.2; 30 ng/100 µL = 14.1; 10 ng/100 µL = 16.1; 3 ng/100 µL = 18.1; 1 ng/100 µL = 20.2; 0.3 ng/100 µL = 23.2; (Annette Reith, Diplomarbeit)

Bei der Auftragung dieser Zyklentitration (Isolinien-Plot) ist der Abstand der einzelnen kleinen parallelen Ausgleichsgeraden jeder Verdünnung untereinander gleich groß. Bei einer bestimmten Grammenge (hier 60 ng), die von jeder PCR-Titration erreicht wurde, wurde eine zur x-Achse parallele Gerade durch die Linienschar gezogen. Diese Linie wird als ISOLINIE bezeichnet. Mit der Isolinie wird eine rechnerische Zyklenzahl bestimmt, bei der eine definierte DNA-Menge von jeder Zyklentitration einer Verdünnung amplifiziert wurde.

Die theoretischen Zyklenzahlen, bei denen z.B. 60 ng PCR-Produkt amplifiziert wurde (Schnittpunkte der Isolinie mit den kleinen Geraden verschiedener Titrationen (Fig.6)), werden in Abhängigkeit zur eingesetzten Menge an totaler DNA/100 µL PCR-Ansatz aufgetragen. Diese Plotmethode wird in der Dissertation von Andreas Becker genauer beschrieben. Das so entstehende Diagramm („Effizienzdiagramm“) gibt Auskunft über verschiedene Faktoren. Man erhält

a) einen Schnittpunkt der Ausgleichsgeraden mit der x-Achse, welcher die Menge GesamtdNA angibt, in der die Menge der Isolinie (hier 60 ng) an PCR-Fragment enthalten ist.

$$\% \text{ mtDNA} = \text{Isolinie} \times \text{Faktor} \times 100 / \text{EduktDNA}$$

$$\text{Faktor} = \text{mtDNA-Länge} / \text{Fragmentlänge}$$

$$\text{EduktDNA} = \text{Edukt2 [ng]} / 100 [\mu\text{L}]$$

Edukt2 = x-Wert des Schnittpunktes der Ausgleichsgeraden mit der x-Achse

Isolinie = Schnittpunkt der Isolinie mit der y-Achse des Isolinien-Plots / 100  $\mu$ L

b) Zum anderen errechnet sich aus dem Steigungskoeffizienten der Geraden die Effizienz der PCR. Unter Effizienz versteht man die prozentuale Amplifikationsrate pro Zyklus im linearen Anstiegsbereich der PCR. Der Steigungskoeffizient ist definiert als  $R = (1 + \text{Effizienz}/100)$ .

$$\text{Steigung} = 10^{((\log \text{ Edukt2} - \log \text{ Edukt1}) / (\text{Zyklus1} - \text{Zyklus2}))}$$

Edukt1 = x-Wert des Schnittpunktes mit der y-Achse

Edukt2 = x-Wert des Schnittpunktes mit der x-Achse

Zyklus1 = y-Wert des Schnittpunktes mit der y-Achse

Zyklus2 = y-Wert des Schnittpunktes mit der x-Achse

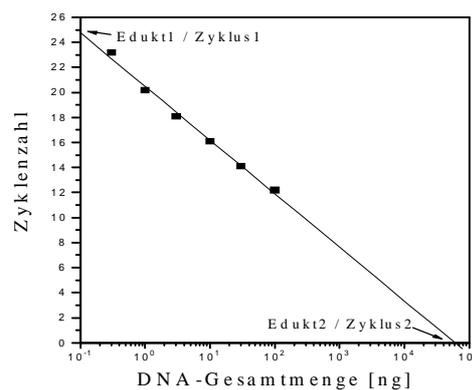


Fig. 7 : Auftragung der aus der Isolinie ermittelten Zykluszahlen der Fig. 6 gegen die DNA-Gesamtmenge. „Effizienzdiagramm“ (Annette Reith, Diplomarbeit).

Durch Einsetzen in die Gleichungen 2 und 3 erhält man für das obige Beispiel ein Verhältnis der mtDNA zu Gesamt-DNA von 3.3 %. Der Steigungskoeffizient beträgt 1.71, was eine Effizienz der PCR von 71 % bedeutet.

#### 4.6.4.6 Quantifizierung der mtDNA in Patientenproben

Für jeden Patienten ist es notwendig, mindestens einen bestimmten PCR-Zyklus, besser aber mehrere Zyklen zu bestimmen, da die Ergebnisse so genauer werden. Die DNA-Menge

100 ng/100  $\mu$ L ist für die Patientenquantifizierung am besten geeignet, da sie einen großen auswertbaren exponentiellen Bereich vorweisen kann (Andreas Becker, Dissertation). Für Wildtyp-Quantifizierungen wurden die Zyklen 15 bis 17 verwendet, da sich diese Zyklen in Vorversuchen als geeignet für die meisten Patienten erwiesen. Bei Quantifizierungen der *common deletion* der mtDNA wurden zunächst qualitative PCR-Bestimmungen mit 32 Zyklen vorgenommen. Die jeweilige Anzahl von Zyklen war von der Menge der deletierten mtDNA der Patienten abhängig, die ebenfalls in Vorversuchen ermittelt wurde.

Die unkalibrierten (Bildpunkte<sup>2</sup> x Grauwerte) (aus NIH Image) der amplifizierten PatientendNA wurden in derselben Weise Mengen zugewiesen, wie unter 5.2.3. beschrieben.

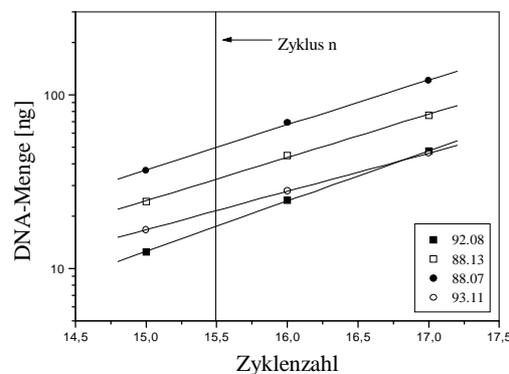


Fig. 8: Auftragung der Zyklenzahl gegen die Menge des amplifizierten Fragmentes. DNA der Patienten 92.08, 88.13, 88.07, 93.11. PCR-Ansatz und Temperaturprofil wie unter Kapitel 4.6.4.1 beschrieben. Ein Beispiel für die Auftragung der gemessenen Menge an Patienten-DNA (Annette Reith, Diplomarbeit).

Aus der vertikalen Linie bei Zyklus 15.5 und den zur x-Achse parallelen Geraden wird die Menge des amplifizierten Fragmentes im Zyklus 15.5 bestimmt. Die Lage der vertikalen Linie ist von den entnommenen PCR-Zyklen abhängig.

Die hypothetischen Ausgangsmengen des Fragmentes werden mit Hilfe der Gleichung für natürliches Wachstum berechnet.

$$E_0 = P_n / (1+R)^n$$

$E_0$  = Edukt im Zyklus 0

$P_n$  = Produktmenge im Zyklus n

$1+R$  = Steigungskoeffizient

n = Zyklus

Abschließend wird mit dem Umrechnungsfaktor (mtDNA-Länge/Fragmentlänge) auf die Gesamtmenge der mtDNA umgerechnet.

## 4.7 Polymerase Chain Reaction

### 4.7.1 Enzymatische Amplifizierung von dsDNA

Das Standardprotokoll einer PCR geht von einem Gesamtvolumen von 100  $\mu\text{L}$  aus. Die so hergestellte Reaktionslösung wurde in einem DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer) bei den gewünschten Reaktionsparametern (in einem zyklischen Programm) inkubiert.

Die Hybridisierungstemperatur  $T_H$  richtete sich nach der niedrigsten theoretischen Hybridisierungstemperatur beider Primer. Die theoretischen Hybridisierungstemperaturen der Oligonukleotide lassen sich nach verschiedenen Gleichungen berechnen.

$$T_M = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$$

$$T_M = \text{Schmelztemperatur}$$

Diese Formel ist die allgemein gebräuchliche, sie wurde jedoch für eine 1 M Salzkonzentration berechnet und ist nur als erste Annäherung zu betrachten.

Für Oligonukleotide mit einer Länge von mehr als 20 Nukleotiden ist diese Gleichung zu ungenau. Für solche Nukleotide ist es besser, die folgende Gleichung zu benutzen:

$$T_o = 22 + 1.46 (l_n)$$

$$T_o = \text{optimierte Annealingtemperatur}$$

$$l_n = \text{effektive Länge des Primers} = 2 \times (G + C) + A + T$$

Diese Formel stimmt am Besten für Primer mit einer Länge von 20-35 Nukleotiden überein.

Für alle diese Gleichungen ist zu beachten, daß sie nur zu einer ersten Näherung der optimalen Annealingtemperatur führen. Diese kann in einem Bereich von etwa 10°C um diesen berechneten Wert schwanken.

Bei allen durchgeführten Reaktionen wurde die Vent(exo-)- Polymerase (New England Biolabs) aus einem *E. coli* Stamm, der das Vent-Polymerase-Gen aus *Thermococcus litoralis* trägt, verwendet. Sie besitzt ein Aktivitätsmaximum im Bereich von 72°C-80°C. Die Hitzebeständigkeit der Vent-Polymerase ist sehr hoch, so mißt man nach 5 h bei 95°C bei der Vent-Polymerase noch eine Aktivität von 60%, während der entsprechende Wert bei der häufig verwendeten Taq-Polymerase zu diesem Zeitpunkt bereits auf unter 20% gesunken ist. Die enzymatische Amplifizierung von dsDNA erfolgte in einem Reaktionsgemisch folgender Zusammensetzung:

Reaktionsmischung:

70 µL bidest H<sub>2</sub>O  
10 µL 10xPCR-Puffer  
10 µL dNTP (2 nmol / µL)  
3 µL Primer A (10 pmol / µL)  
3 µL Primer B (10 pmol / µL)  
2 µL MgSO<sub>4</sub> (100 nmol / µL)  
1 µL DNA-Lösung (1 - 100 ng / Ansatz)  
1 µL Polymerase (1 U / µL)

Reaktionsbedingungen:

T<sub>Denaturierung</sub> = 94°C 60 s  
T<sub>Annealing</sub> = T<sub>H Primer A oder B</sub> 60 s  
T<sub>Elongation</sub> = 72°C 60 s  
35 Zyklen

Bei Serienansätzen wurde der Reaktionsansatz auf 25 µL reduziert, was aber zu keinerlei Beeinträchtigungen geführt hat. Die PCR-Ansätze wurden mit 35 µL geschmolzenem Paraffin überschichtet.

## 4.7.2 Standard-PCR

Die Standard-PCR ist die meist angewendete PCR. Ein Effekt der PCR-Reaktion ist, daß kleinere Fragmente stärker amplifiziert werden als größere. Im Falle der *common deletion* macht man sich dies zunutze, indem der deletierte Bereich der DNA in großer Ausbeute erhalten wird, während sich mit denselben Primern das Wildtypfragment nur sehr schlecht bzw. nicht amplifizieren läßt. Die Reaktion kann in ihrer Spezifität jedoch beeinflusst werden, wenn man die Elongationszeit verändert. Kurze Elongationszeiten führen zur Erhöhung der Ausbeute an kleinen Fragmenten, lange Elongationszeiten zu längeren Fragmenten.

## 4.7.3 PCR-Methoden zur Analyse von Punktmutationen

### 4.7.3.1 Allelspezifische PCR

Im Fall der „allelspezifischen PCR“ verwendet man einen Primer der bis auf das 3'-Ende zur Wildtyp-DNA komplementär ist. Das Nukleotid des 3'-Endes entspricht dem mutierten Nukleotid der mtDNA. Bei geeigneten Reaktionsparametern wird ausschließlich die mutierte DNA amplifiziert. Wichtig hierbei ist die korrekt gewählte Annealingtemperatur der Primer. Wie Rieger (Rieger et al., 1993) zeigte, führt eine zu niedrige Annealingtemperatur zu Amplifikationen sowohl bei Wildtyp-DNA als auch bei mutierter DNA. Dagegen verhindert eine zu hohe Annealingtemperatur jede Amplifikation. Die allelspezifische PCR unterliegt folgendem Temperaturprofil:

$T_{\text{hot start}}$	=	94°C	4 min
1 Zyklus			
touch down-PCR:			
$T_{\text{Denaturierung}}$	=	94°C	60 s
$T_{\text{Annealing}}$	=	$T_H + 5^\circ\text{C}$	60 s
$T_{\text{Elongation}}$	=	72°C	60 s
1 Zyklus			

$T_{\text{Denaturierung}}$	=	94°C	60 s
$T_{\text{Annealing}}$	=	$T_H+3^\circ\text{C}$	60 s
$T_{\text{Elongation}}$	=	72°C	60 s
1 Zyklus			
$T_{\text{Denaturierung}}$	=	94°C	60 s
$T_{\text{Annealing}}$	=	$T_H+1^\circ\text{C}$	60 s
$T_{\text{Elongation}}$	=	72°C	60 s
1 Zyklus			
$T_{\text{Denaturierung}}$	=	94°C	60 s
$T_{\text{Annealing}}$	=	$T_H$	60 s
$T_{\text{Elongation}}$	=	72°C	60 s
$\leq 30$ Zyklen			

#### 4.8 Behandlung enzymatisch amplifizierter dsDNA mit Restriktionsendonukleasen

Um Punktmutationen in DNA-Proben qualitativ und quantitativ nachzuweisen wurden, die in vitro synthetisierten DNA-Fragmente mit einer entsprechenden Restriktionsendonuklease behandelt. Das Protokoll dieser Restriktionsanalyse hatte folgende Struktur.

Reaktionsmischung:

- 15  $\mu\text{L}$  bidest.  $\text{H}_2\text{O}$
- 2  $\mu\text{L}$  DNA-Lösung
- 2  $\mu\text{L}$  10xRestriktionspuffer
- 1  $\mu\text{L}$  Restriktionsendonuklease

Reaktionsbedingungen:

- T: abhängig von dem verwendeten Enzym
- Inkubationszeit: 2 - 10 h

Nach Ablauf der Reaktion wurde die geschnittene DNA auf einem Agarosegel überprüft.

## 4.9 Klonierung

### 4.9.1 Vektoren und Bakterienstämme

Als Vektoren wurden pBluescript<sup>®</sup> II SK(-) und pCR<sup>®</sup>II-TOPO (Invitrogen) verwendet. Als Bakterienstamm für diese Vektoren wurde XL1 Blue ausgewählt.

#### 4.9.1.1 Plasmidkarte von pBluescript<sup>®</sup> II SK(+/-)

Das Plasmid pBluescript<sup>®</sup> II SK(+/-) muß zur Klonierung linearisiert und dephosphoryliert werden.

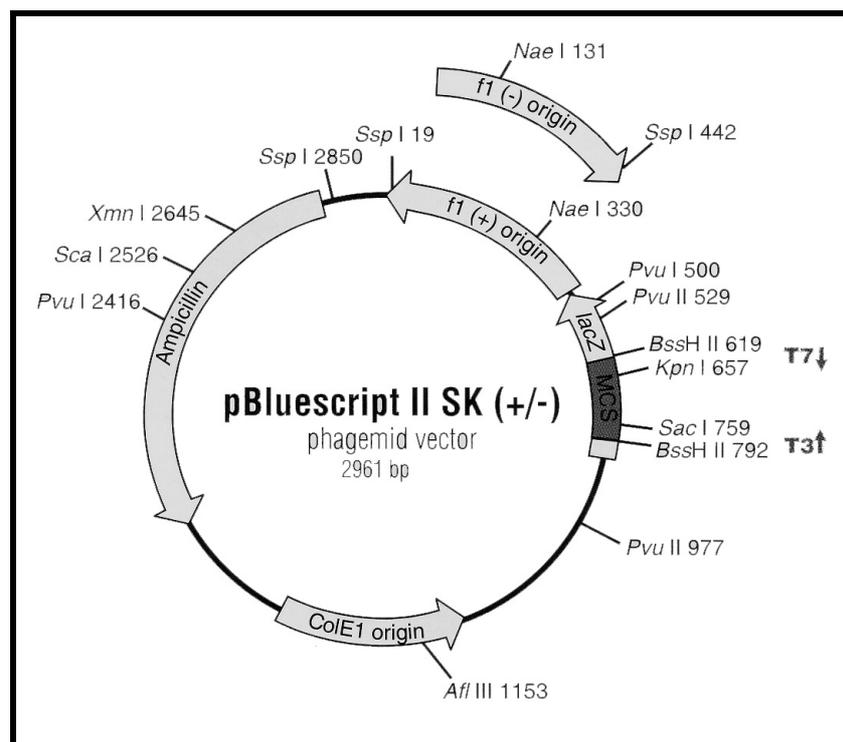


Fig. 9: Karte des Vektors pBluescript<sup>®</sup> II SK(+/-)

### 4.9.1.2 Plasmidkarte von pCR<sup>®</sup>II-TOPO

Der Vektor pCR<sup>®</sup>II-TOPO liegt schon linearisiert und aufgereinigt im Klonierungskit vor und mußte daher nicht weiter vorbereitet werden.

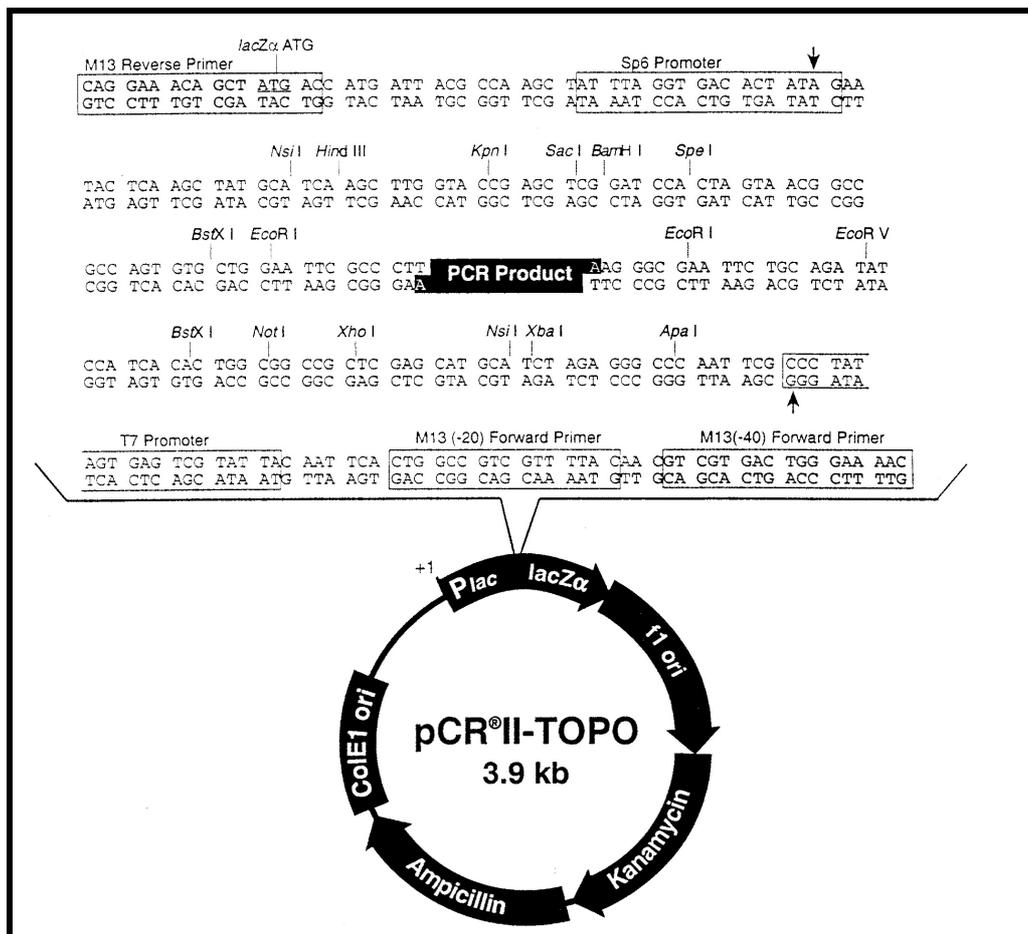


Fig. 10: Karte des pCR<sup>®</sup>II-TOPO-Vektors und Sequenz rund um den Klonierungsbereich.

## 4.9.2 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Kompetente Bakterienzellen herzustellen bedeutet, die Zellen müssen die Fähigkeit erwerben, Fremd-DNA effizient aufzunehmen. Die Plasmamembran der Zellen wird durch die Behandlung mit bestimmten hochkonzentrierten Salzlösungen unter bestimmten Bedingungen für die DNA-Aufnahme durchlässig. Bei den Salzlösungen handelt es sich um CaCl<sub>2</sub> bzw.

RbCl. Die mit RbCl erhaltenen Zellen haben gegenüber den CaCl<sub>2</sub>-kompetenten Zellen den Vorteil, daß sie in kürzerer Zeit hergestellt und dann bei -80°C gelagert werden können. Außerdem weisen diese meist eine bessere Kompetenz auf.

#### 4.9.2.1 Herstellung kompetenter *E. coli* RbCl-Zellen

200 mL 2xYT-Medium wurden mit einer *E. coli*-Übernachtskultur im Verhältnis 1:100 angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.5 wachsen gelassen. Die Kultur wurde in vier sterile 50 mL Falcon-Röhrchen überführt und bei 4000 rpm (Kühlzentrifuge) und 4°C 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und die Zellen ebenso vorsichtig mit 4°C kaltem RbCl-haltigem TFB 1-Puffer resuspendiert (30 mL TFB 1/ 100 mL Kultur) und 90 min auf Eis inkubiert. Danach wurde bei 4000 rpm und 4°C 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen vorsichtig in eiskaltem TFB 2-Puffer resuspendiert (4 mL / 100 mL Kultur). Die Zellen wurden nun in 300 µL Aliquots aufgeteilt, einige Minuten in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und dann bis zur Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

#### 4.9.3 Klonierung eines PCR-Fragmentes in pBluescript<sup>®</sup> II SK(+/-)

##### 4.9.3.1 Dephosphorylierung des Vektors pBluescript<sup>®</sup> II SK(+/-)

Der Vektor pBluescript(SK+/-) wurde durch einen Restriktionsverdau mit Eco RV (Schnittstelle in der *multiple cloning site*, MCS) linearisiert und mit der Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion aufgereinigt. Das nach der anschließenden Ethanol-fällung entstandene Pellet wurde wie unter Kapitel 4.2.1. beschrieben behandelt und in 50 µL TE-Puffer aufgenommen. Um die Religation des Vektors bei der Klonierung zu reduzieren, wurde die durch den Restriktionsverdau geschnittenen Enden dephosphoryliert. Der gereinigte Verdau wurde mit alkalischer Phosphatase (SAP) 2 h bei 37°C inkubiert und danach erneut mit SAP versetzt (1h, 37°C). Die Dephosphorylierung wurde durch Denaturieren des Enzyms bei 65°C und 15 min terminiert.

### 4.9.3.2 Phosphorylierung eines PCR-Fragmentes mit T4 Polynukleotid Kinase

Da bei der enzymatischen Amplifizierung von DNA-Fragmenten keine phosphorylierten Primer verwendet wurden, mußten die Fragmente nach der PCR phosphoryliert werden, bevor sie zur Klonierung eingesetzt werden konnten. Das erhaltene DNA-Fragment wurde mittels Gelextraktion (4.2.3.2) aufgereinigt. Die Reaktion kann mit maximal 50 pmol DNA durchgeführt werden.

Reaktionsansatz:	x	µL	DNA-Lösung
	2.0	µL	10-fach Polynukleotid Kinase Puffer
	1.3	µL	10 mM ATP
	3.0	µL	Enzym (1:10 verdünnt)
	ad 20	µL	H <sub>2</sub> O
Reaktionsbedingungen:			1 h, 37°C
Abbruch:			5 min, 65°C

### 4.9.3.3 Auffüllen von DNA-Enden mit DNA-Polymerase, Klenow Fragment

Bei der Klonierung eines mit Restriktionsendonukleasen behandelten Inserts in einen Vektor mit glatten Enden (*blunt end*) müssen die überstehenden 5'-Enden (*sticky ends*) mit Nucleotiden aufgefüllt werden. Dies gilt ebenfalls für bestimmte Polymerasen für die PCR, bei denen ebenfalls überhängende DNA-Enden entstehen.

Reaktionsansatz:	10	µL	DNA-Lösung
	2.0	µL	10-fach Klenow Puffer
	3.0	µL	H <sub>2</sub> O
	1.0	µL	20 mM dNTP-Lösung
	1.0	µL	Klenow Enzym
Reaktionsbedingungen:			1 min, Raumtemperatur
Abbruch:			10 min, 75°C

Das Enzym mußte vor der Ligation nicht entfernt werden

#### 4.9.3.4 Ligasereaktion

Um ein Insert in ein linearisierten und dephosphorylierten Vektor zu klonieren, wurde folgende Reaktion durchgeführt.

Reaktionsansatz:	1.0	µL	Vektor-DNA
	2.0	µL	DNA-Lösung
	1.0	µL	10 fach Ligase Puffer
	1.0	µL	T4 Ligase (1 U)
	1.0	µL	50% PEG
	4.0	µL	H <sub>2</sub> O
Reaktionsbedingungen:	4 h, Raumtemperatur		

Das Verhältnis zwischen Vektor und DNA-Fragment sollte 1:2 sein. Der Ansatz gilt sowohl für *blunt end* wie auch für *sticky end* Ligationen.

#### 4.9.3.5 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*-Zellen

Während einer Transformation werden Plasmide in *E. coli*-Zellen übertragen. Man bezeichnet Plasmide auch als Autosomen, da sie sich in einer geeigneten Wirtszelle autonom replizieren können.

Die zu den kompetenten Bakterienzellen gegebene DNA wird bei der Transformation zunächst als Doppelstrang an die Zellmembran gebunden. Die membrangebundenen Nukleasen bauen einen der Stränge ab. Während eines Hitzeschocks wird der verbleibende Einzelstrang von der Zelle aufgenommen.

100 µL RbCl-kompetente *E. coli*-Zellen (XL1Blue) wurden mit 6 µL Plasmid-Lösung versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Während des nun folgenden zweiminütigen Hitzeschocks bei 42°C im Thermoblock, fand die DNA-Aufnahme statt. Danach wurden die Zellen mit 500 µL LB-Medium versetzt und bei 37°C für 30 min inkubiert. Die Zellen wurden auf LB-Agarplatten, die Ampicillin und Kanamycin enthielten, ausplattiert. Es wuchsen nur die Zellen, welche die entsprechenden Resistenzen der Plasmid-DNA trugen, über Nacht zu Einzelkolonien heran.

Hiernach wurden 2 mL Übernachtskulturen von einzelnen Klonen angeimpft. 500 µL jeder Kultur wurden mit 500 µL sterilem Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert. Der Rest wurde mittels TENS-Plasmidpräparation aufgearbeitet und durch einen Restriktionsverdau analysiert.

#### **4.9.4 Klonierung eines PCR-Fragmentes mit dem TOPO TA Cloning Kit Dual Promotor**

##### **4.9.4.1 Polyadenylierung eines PCR-Fragmentes**

Zur Klonierung des Inserts in den pCR-TOPO Vektor mußte das DNA-Fragment polyadenyliert werden.

Reaktionsansatz:	2.0	µL	10-fach Taq Puffer
	4.0	µL	1 mM dATP
	1.0	µL	Taq Polymerase [1U/µL]
	3.0	µL	DNA-Lösung
	10.0	µL	H <sub>2</sub> O

##### **4.9.4.2 Klonierung und Transformation mit dem TOPO TA Cloning Kit Dual Promotor**

Es wurden 2 µL des durch Gelextraktion aufgereinigten PCR-Produktes mit 2 µL sterilem Wasser und 1 µL pCR-TOPO Vektor versetzt. Die Lösung wurde vorsichtig gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde sorgfältig zentrifugiert und auf Eis gestellt.

Zu den kompetenten Zellen gab man 2 µL einer 0.5 M β-Mercaptoethanol-Lösung und rührte vorsichtig mit der Pipettenspitze. Hierzu gab man 2 µL der Klonierungslösung und mischte behutsam und inkubierte auf Eis für 30 min. Der Hitzeschock der Zellen fand bei 42°C für 30 s statt. Die Cups wurden sofort für den Zeitraum von 2 min auf Eis gestellt. Nachdem

250  $\mu\text{L}$  des SOC-Mediums addiert wurden, wurde das Cup für 30 min horizontal sanft geschüttelt und danach auf Eis gestellt. Die Proben wurden in Mengen von 10-50  $\mu\text{L}$  auf die Selektions Platten gegeben. Diese wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

## 4.10 Mutagenese

### 4.10.1 Site directed mutagenesis

Zunächst wurde ein DNA-Fragment mit der PCR-Technik amplifiziert, welches der Sequenz des Wildtyps der humanen mtDNA entspricht. Um die Fehlerrate auf ein Minimum zu beschränken wurde Taq/Pwo Polymerase verwendet.

Reaktionsansatz:	1.0	$\mu\text{L}$	DNA-Lösung (10 ng/ $\mu\text{L}$ )
	5.0	$\mu\text{L}$	10-fach Puffer
	5.0	$\mu\text{L}$	20 m dNTP-Lösung
	1.5	$\mu\text{L}$	Primer 1 (10 pmol/ $\mu\text{L}$ )
	1.5	$\mu\text{L}$	Primer 2 (10 pmol/ $\mu\text{L}$ )
	0.5	$\mu\text{L}$	Taq/Pwo Polymerase
	35.5	$\mu\text{L}$	H <sub>2</sub> O ad 50 $\mu\text{L}$

Die Klonierung wurde wie unter Kapitel 4.9.3 beschrieben in pBluescript SK(+/-) vorgenommen. Das so entstandene Plasmid mit Wildtyp-Insert wurde nun der Mutagenese unterzogen. Die Primer wurden so gewählt, daß die beiden Primer auf den unterschiedlichen Strängen direkt aneinander angrenzen, jedoch in verschiedene Richtungen zeigen. Der eine Primer trägt die einzusetzende Mutation in der Nähe des 5'-Endes. Die anschließende PCR wurde mit Elongationszeiten von 3 bis 8 Minuten ausgeführt. Das entstandene Produkt war linear und wurde religiert.

## 4.10.2 Mutagenese PCR

Zur Einführung einer Mutation in ein PCR-Amplifikat wurde ein Primer verwendet, der zwischen 30 und 40 Basenpaaren lang war. Die Mutation befand sich etwa 20 bis 30 Basenpaare vom 5'-Ende des Primers entfernt. Der zweite Primer war nicht mutiert und hatte eine Länge von maximal 20 bp. Die enzymatische Amplifikation wurde mit einer Annealingtemperatur von 52°C durchgeführt. Die verwendete Vent exo(-)-Polymerase arbeitet mit einer sehr geringen Fehlerrate. Der Primer für die, nach der Klonierung vorgesehene allelspezifische PCR, war in der Sequenz des mutierten Primers enthalten, so daß diese Sequenz später fehlerfrei war. Die Sequenz des Fragmentes mußte lediglich im Bereich des reversen Primers korrekt sein.

## 4.11 DNA-Sequenzierung

### 4.11.1 DNA-Sequenzierung nach der Didesoxymethode nach Sanger

Die Sequenzierung der Klone erfolgte unter Verwendung des <sup>32</sup>P-Sequenzierung<sup>TM</sup> Kits von Pharmacia.

- |                            |   |
|----------------------------|---|
| 1. Denaturierung der dsDNA | 40 µL TENS präparierte Plasmid-DNA                |
|                            | 10 µL 2 N NaOH                                    |
|                            | 20 min, 37°C                                      |
| 2. Fällung der ssDNA       | 15 µL 3 M Na-Acetat                               |
|                            | 35 µL H <sub>2</sub> O                            |
|                            | 300 µL 100% Ethanol                               |
|                            | 20 min, -80°C                                     |
|                            | 20 min, 15000 rpm, 4°C                            |
| 3. Primer <i>Annealing</i> | 2 µL <i>Annealing</i> -Puffer                     |
|                            | 2 µL Primer (5 pmol/µL)                           |
|                            | auf 50°C erwärmen und in 30 min auf 30°C abkühlen |
|                            | 20 min, Raumtemperatur                            |
| 4. Sequenzierung           | 4 Cups mit je 2.5 µL „N“-Mix short                |

- pro Reaktion 0.5  $\mu\text{L}$  Polymerase und 2  $\mu\text{L}$   
Verdünnungspuffer
5. *Labelling*-Reaktion      3  $\mu\text{L}$  *Labelling*-Mix zur DNA-Lsg. Zugeben  
0.7-1.0  $\mu\text{L}$  [ $\alpha$ - $^{35}\text{S}$ ]-dATP  
2  $\mu\text{L}$  verdünnte Polymerase  
mischen, 5 min Raumtemperatur
6. Terminationsreaktion      je 4.5  $\mu\text{L}$  *Labelling*-Ansatz zu ‚N‘-Mix zugeben  
5 min, 37°C  
5  $\mu\text{L}$  Stop-Lösung zugeben
- Unmittelbar vor dem Auftrag auf ein Sequenzgel wurden die Proben für 5 min bei 94°C denaturiert.

#### 4.11.2 DNA-Sequenzierung mit einem DNA-Sequenzer

Die mit dem Quiaprep spin Miniprep Kit aufgereinigten Plasmide wurden von der Firma Top Lab sequenziert.

#### 4.11.3 Polyacrylamidelektrophorese zur DNA-Sequenzierung nach Sanger

Das 6%ige Polyacrylamid-Harnstoffgel mit einer Dicke von 0.5 mm diente zur Auftrennung der ssDNA-Fragmente. Die Glasplatten wurden mit Ethanol gereinigt. Die kleinere der beiden Platten wurde mit einer Mischung aus 10 mL Ethanol, 30  $\mu\text{L}$  Bindesilan und 30  $\mu\text{L}$  Eisessig behandelt, die größere mit 2-3 mL Sigmacote. Als Spacer zwischen den Platten diente 3M Whatman-Papier. Die beiden Platten wurden mit Metallklammern fixiert. Die Polyacrylamidlösung wurde mit TEMED und 10% APS versetzt und gegossen. Die Probenkämme wurden mit der glatten Seite nach unten eingesetzt und bis zum vollständigen Abschluß der Polymerisation des Geles (1 h) so belassen. Zur Elektrophorese wurde das Gel in die Apparatur eingespannt und die Kammern mit TBE-Puffer gefüllt. Nach dem Entfernen der Kämme wurden Blasen und Harnstoff an der Geloberfläche mit Puffer weggespült. Der folgende Vorlauf bei 1.2 kV von 1 h diente der Erwärmung des Gels. Erneut wurde die

Oberfläche mit Puffer gespült und die Kämme mit den Zähnen nach unten 1 mm tief in das Gel eingesetzt. In die gebildeten Taschen des Gels wurden nun 1.2-2.5  $\mu\text{L}$  der denaturierten Sequenzierlösungen aufgetragen. Die Migration der Fragmente erfolgte bei 1.5 kV innerhalb von 2-6 Stunden. Nach beendeter Elektrophorese wurde das Gel aus der Apparatur genommen und die Glasplatten vorsichtig getrennt. Um den Harnstoff zu entfernen und die Banden zu fixieren wurde mit einer Mischung aus 10% Methanol und 10% Eisessig 30 min lang unter Schwenken gewaschen. Das Gel wurde vorsichtig unter fließendem Wasser ab gespült. Die Glasplatte und das Gel wurden bei 100°C 1 h getrocknet. Die Autoradiographie fand durch Auflegen eines Röntgenfilms auf das Gel statt. Die Exposition dauerte 12 bis 36 Stunden.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Herstellung von Plasmiden mit punktmutierten Inserts

Die Methode der Quantifizierung (Becker et al., 1996) von Deletionen oder Punktmutationen mitochondrialer DNA setzt voraus, daß eine Kontrollprobe vorhanden ist, deren Gehalt an deletierter oder mutierter mtDNA mindestens 60% der gesamten mtDNA beträgt. Aus diesem Grund wurde schon während meiner Diplomarbeit das Plasmid pCII mit einem Insert, bestehend aus den flankierenden Regionen der *common deletion*, zur Quantifizierung verwendet. Zur Bestimmung von verschiedenen Punktmutationen mittels dieser Technik sollten Plasmide mit den entsprechenden Mutationen hergestellt werden.

#### 5.1.1 Amplifikation und Klonierung eines mit Vent (exo-) Polymerase amplifizierten PCR-Fragmentes aus humaner mtDNA

Als Grundlage für die Plasmide mit einem punktmutierten Insert wurde ein DNA-Fragment mit Hilfe der PCR amplifiziert. Die Primer wurden so gewählt, daß die gewünschte Region der humanen mtDNA die später zu mutierenden Basen einschloß. Die folgende Tabelle beinhaltet die zu mutierenden Basen in diesem mtDNA-Bereich:

Nukleotidposition der Mutation	Basenaustausch
3243	A→G
3271	T→C
3291	T→C

Tabelle 6: Nukleotidpositionen und Transitionen der Mutationen

Das amplifizierte Fragment umfaßte die Sequenz der mtDNA der Nukleotide 2772 bis 3717 (946 bp). Als Templat-DNA-Lösung wurde 100 ng/µL totale DNA aus Placenta eingesetzt, als Polymerase diente die Vent (exo-) Polymerase. Zur Amplifikation des DNA-Fragmentes

wurde eine PCR mit einem *hot start* von 4 min bei 94°C durchgeführt. Dem *hot start* folgten 35 Zyklen mit einer Denaturierungsphase von 1 min bei 94°C, eine Annealingphase von 1 min bei 57°C und eine Elongation von 4 min bei 72°C. Abschließend wurde ein Zyklus mit einer Elongationzeit von 20 min durchgeführt, um die vollständige Auffüllung an den Enden des Fragmentes sicher zu stellen.

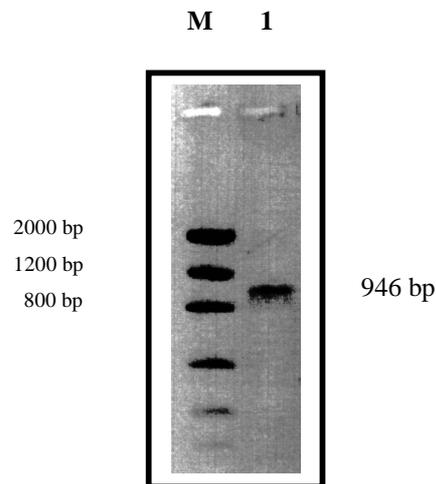


Fig. 11: Ergebnis der PCR zur Amplifikation des PCR-Fragmentes von der Länge 946 bp (nt 2772-3717). PCR-Ansatz: Standard-Ansatz unter Kapitel 4.7.1; DNA-Lösung: Placenta-DNA 100 ng/μL; PCR-Profil: (94°C 4 min) 1 Zyklus, (94°C 1 min, 57°C 1 min, 72°C 4 min) 35 Zyklen; (72°C 20 min) 1 Zyklus. Die DNA wurde mit einem 1%igen Agarosegel mit Ethidiumbromid (5 μL/100 ml) aufgetrennt. Spur M: 2 μL DNA-Mass-Ladder; Spur 1: 2 μL des PCR-Ansatzes der Amplifikation des 946 bp Fragmentes der mtDNA.

Figur 11 zeigt das PCR-Fragment der Länge 946 bp. Nach der Phosphorylierung des über Gelextraktion aufgereinigten Fragmentes wurde dieses mit glatten Enden (*blunt end*) in die *multiple cloning site* des mit Eco RV linearisierten Vektors pBluescript (SK+/-) kloniert und in *E. coli* XL1 Blue transformiert. Positive Klone wurden durch blau/weiß *Screenen* selektiert und nach Isolation der Plasmid-DNA mit einem Restriktionsverdau mit Pvu II charakterisiert. Der Restriktionsverdau wurde in Figur 12 gezeigt. Das 3908 bp Plasmid wurde durch den Verdau in ein 2513 bp und ein 1395 bp großes Teilstück fragmentiert.

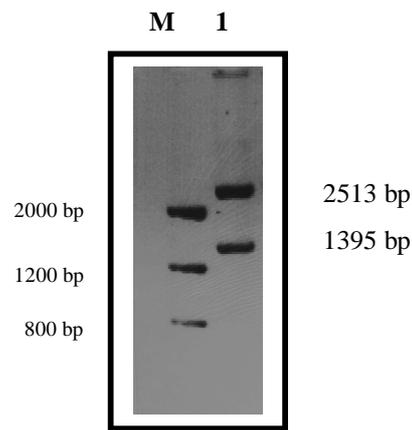


Fig. 12: Ergebnis des Restriktionsverdaus des Plasmides pBluescript (SK-) mit 946 bp Insert mit Pvu II. Die DNA wurde mit einem 1%igen Agarosegel mit Ethidiumbromid (5  $\mu$ L/100 ml) aufgetrennt. Spur M: 2  $\mu$ L DNA-Mass-Ladder; Spur 1: 15  $\mu$ L des Restriktionsverdaus.

Da bei *blunt end* Klonierungen die Orientierung des Inserts beliebig ist, wurde zur genauen Charakterisierung das 1395 bp Restriktionsfragment aus dem Gel herausgeschnitten und mit Hilfe der Nucleotrap Gelextraktion aufgereinigt. Ein weiterer Restriktionsverdau mit Eco RV erbrachte für Klone mit richtig orientierten Inserts zwei Fragmente mit den Längen 800 und 595 Basenpaaren. Bei falscher Orientierung ergab das Restriktionsmuster zwei Fragmente der Längen 723 und 672 Basenpaare.

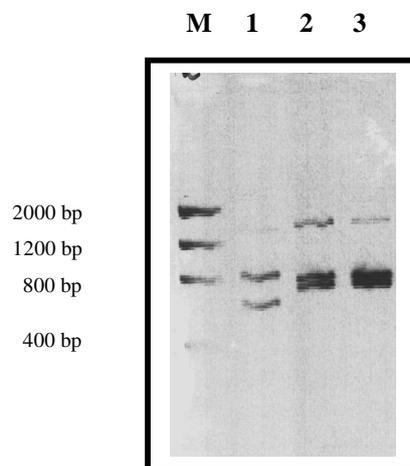


Fig. 13 : Ergebnis des Restriktionsverdaus des aufgereinigten 1395 bp Fragmentes aus Fig. 12. Die DNA wurde mit einem 1%igen Agarosegel mit Ethidiumbromid (5  $\mu$ L/100 ml) aufgetrennt. Spur M: 2  $\mu$ L DNA-Mass-Ladder; Spur 1-3: 15  $\mu$ L der Restriktionsverdaue von verschiedenen Klonen. Spur 1 zeigt Fragmente der Längen 800 bp und 595 bp. Spur 2 und 3 zeigt Fragmente der Längen 723 bp und 672 bp.

Wie das Gelbild von Figur 13 aufweist, war nur das Insert des Klons, dessen Restriktionsverdau auf Spur 1 aufgetragen wurde, richtig orientiert. Die in der Spur 2 und 3 aufgetragenen Proben waren nur unvollständig verdaut.

### **5.1.1.1 Sequenzierung des Plasmides pBluescript (SK+/-) mit einem Vent (exo-) Polymerase amplifizierten 946 bp-Insert**

Die Sequenzierung des Plasmides erfolgte nach der Didesoxymethode nach Sanger. Die Auswertung der Autoradiographie erbrachte, daß etwa jede 40. Base mutiert war. Die Fehlerrate der Vent (exo-) Polymerase war zur optimalen Amplifikation des DNA-Fragmentes zu hoch. Auf die Darstellung der Sequenz wurde deshalb verzichtet.

### **5.1.2 Amplifikation und Klonierung eines mit Taq/Pwo Polymerase amplifizierten PCR-Fragmentes aus humaner mtDNA**

Um eine fehlerfreie Sequenz des PCR-Amplifikates zu erhalten, wurde die PCR mit Taq/Pwo Polymerase durchgeführt. Dieses Polymerasegemisch besitzt Exonukleaseaktivität und korrigiert somit fehlerhaft eingebaute Basen. Als Primer wurden die unter Kapitel 5.1.1 erwähnten verwendet. Die PCR wurde mit einem *hot start* 4 min bei 94°C gestartet. Zur Erzeugung des Produktes wurden 30 Zyklen mit einer Denaturierung von 1 min bei 94°C, einer Annealingphase von 1 min bei 57 °C und einer Elongation von 5 min bei 72°C absolviert. Der Ablauf der Klonierung erfolgte wie unter Kapitel 5.1.1 beschrieben und erbrachte die gleichen Ergebnisse.

Die Sequenzierung nach Sanger ergab eine fehlerfreie Sequenz des klonierten Fragmentes.

### 5.1.3 Mutagenese des Plasmides mit Hilfe der PCR und Identifikation des Produktes

Das bislang mutationsfreie Plasmid mit dem 946 bp-Insert wurde nun einer Mutagenese mittels PCR unterzogen, um die gewünschte Mutation einführen zu können. Als erste Mutation wurde der Basenaustausch an nt3243 A→G angestrebt. Es wurde das gesamte zirkuläre Plasmid mit 2 Primern linear amplifiziert. Um ein PCR-Produkt der relativ großen Länge 3907 bp zu erzeugen, wurde das Expand<sup>TM</sup> High Fidelity PCR System gewählt. Die Primer für die PCR wurden so gewählt, daß aneinandergrenzende Nukleotide auf den entgegengesetzten Strängen der DNA als 5'-Ende der Primer vorlagen. Einer der Primer (3235-Mu-for (O10)) trug das zu mutierende Nukleotid in der Nähe des 5'-Endes, der andere Primer (3234-rev (O9)) war unmutiert. Der Ansatz der PCR-Lösung entsprach dem Standardansatz. Die Amplifikation wurde mit einem *hot start* begonnen, um eine vollständige Denaturierung der Plasmid-DNA zu erreichen. Das Produkt der PCR ist in Figur 14 dargestellt.

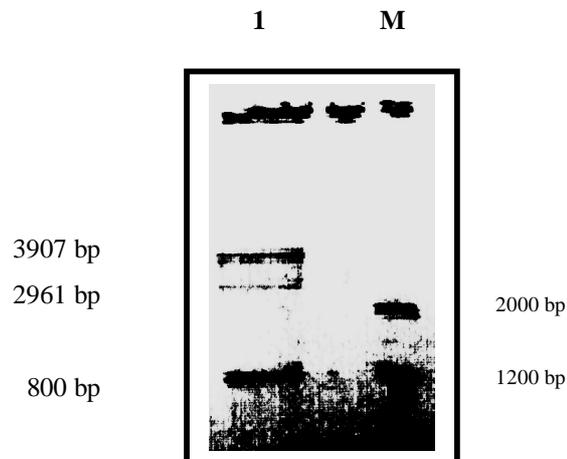


Fig. 14: Auftragung des Produktes der Mutagenese-PCR. PCR-Ansatz: Standard-Ansatz unter Kapitel 4.7.1; DNA-Lösung: pBluescript (SK+/-) mit 946 bp-Insert 100 ng/μL; PCR-Profil: (94°C 4 min) 1 Zyklus, (94°C 1 min, 45°C 45 s, 68°C 4 min 50 s) 10 Zyklen; (94°C 1 min, 52°C 45 s, 68°C 4 min 50 s) 25 Zyklen. Die DNA wurde mit einem 1%igen Agarosegel mit Ethidiumbromid (5 μL/100 ml) aufgetrennt. Spur M: 2 μL DNA-Mass-Ladder; Spur 1: 30 μL PCR-Fragmentes. Spur 1 zeigt Fragmente der Längen 3907 bp, 2961 bp und etwa 800 bp.

Das PCR-Produkt wurde über Gelextraktion aufgereinigt. Die Mutterstränge des Plasmides weisen Methylierungen auf, das PCR-Produkt hingegen ist nicht methyliert. Um nun bei der Klonierung nicht religierte Mutterstränge zu kultivieren, werden diese durch einen Verdau mit

einem methylgruppen-spezifischen Restriktionsenzym (Dpn I) geschnitten. Hiernach wurde erneut eine Gelextraktion vollzogen, um das Produkt zu reinigen. Durch das Einfügen der Mutation war eine zusätzliche Apa I Schnittstelle im Insert entstanden, so daß an dieser Stelle ein Kontrollverdau mit Apa I durchgeführt wurde. Das Ergebnis des Verdau ist in Figur 15 dargestellt. Das erwartete Restriktionsfragment war 504 bp lang.

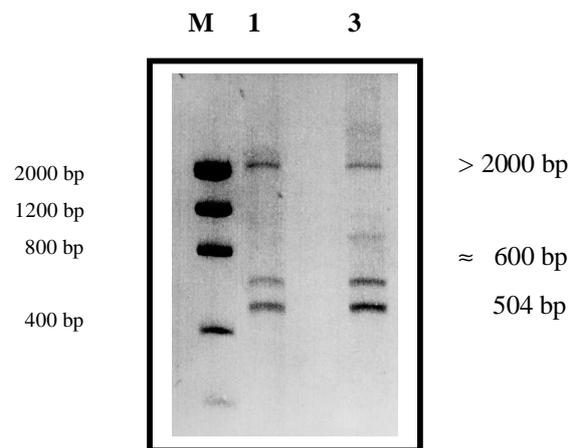


Fig. 15: Auftragung des Kontrollverdau mit Apa I des aufgereinigten und mit Dpn I verdauten Produktes der Mutagenese-PCR. Die DNA wurde mit einem 1%igen Agarosegel mit Ethidiumbromid (5  $\mu$ L/100 ml) aufgetrennt. Spur M: 2  $\mu$ L DNA-Mass-Ladder; Spuren 1 und 3: 15  $\mu$ L des Apa I-Verdau des PCR-amplifizierten Plasmides. Spuren 1 und 3 zeigen Fragmente der Längen >2000 bp,  $\approx$  600 bp und 504 bp.

Die Transformation des PCR amplifizierten und religierten Plasmides in E. coli XL1 Blue war erfolgreich und wurde anschließend sequenziert. Die Sequenzierung nach der Didesoxymethode nach Sanger war auch nach mehreren Versuchen schlecht lesbar und konnte nicht ausgewertet werden. Möglicherweise war das Gelsystem nicht optimiert und brachte deshalb nur eine sehr schlechte Auflösung der Sequenzbanden.

#### 5.1.4 Klonierung eines PCR-Fragmentes mit dem pCR II TOPO Cloning<sup>®</sup> Kit Dual Promotor

Eine erfolgversprechendere Variante wurde mit dem Klonierungskit pCR II TOPO Cloning<sup>®</sup> Kit Dual Promotor vollzogen. Zunächst wurde ein DNA-Fragment der Länge 669 bp mit den Primern P1 (3215-Mu-for-L) und P4 (3884-rev), Placenta-DNA und der Vent (exo-) Polymerase mit Hilfe der PCR hergestellt. Der Primer P1 enthält das mutierte Nukleotid an

der Position 3243. Die PCR wurde mit einem *hot start* begonnen und für weitere 30 Zyklen bei 94°C 1 min denaturiert, das Annealing wurde bei 57°C 45 s durchgeführt und die Elongationsphase bei 72°C 1 min. Das PCR-Fragment wurde über Gelextraktion aufgereinigt und anschließend adenyliert, da das Insert in einen T-Vektor mit überstehenden Enden (*sticky ends*) kloniert wurde. Hiernach wurde das Fragment erneut mit Hilfe der Gelextraktion aufgereinigt und in den Vektor kloniert. Das Plasmid wurde in *E. coli* XL1 Blue transformiert und kultiviert. Die Zellen wurden mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit aufgearbeitet und die Plasmid-DNA isoliert.

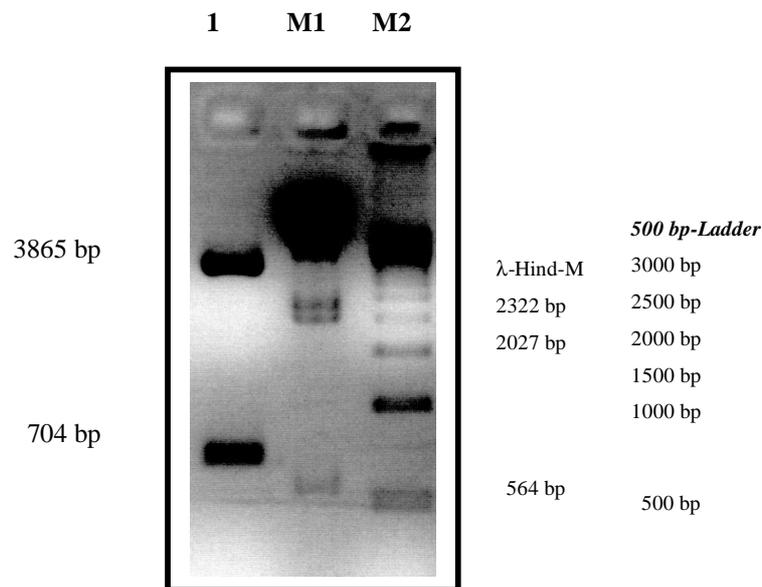


Fig. 16: Kontrollverdau des Plasmides pCR II-Topo mit dem 669 bp Insert mit *Apa I*. Die DNA wurde mit einem 2%igen Agarosegel mit Ethidiumbromid (5  $\mu$ L/100 ml) aufgetrennt. Spur M1: 5  $\mu$ L  $\lambda$ -Hind III-Marker; Spur M2: 1  $\mu$ L 500 bp -Ladder ; Spur 1: 20  $\mu$ L *Apa I* Verdau des Plasmides. Spur 1 zeigt zwei Fragmente, 3865 bp und 704 bp.

Der anschließende Kontrollverdau mit *Apa I* ergab das erforderliche Restriktionsmuster von 3865 bp und 704 bp, welcher in Figur 16 dargestellt wurde.

### 5.1.4.1 Sequenzierung des Plasmides pCR II TOPO mit einem Vent (exo-) Polymerase amplifizierten 669 bp-Insert

Das Plasmid wurde aufgrund des positiven Restriktionsverdaus von der Firma Top Lab sequenziert. Aus der graphischen Abbildung der Sequenz (siehe Anhang) wurde diese abgelesen und mit der Sequenz der humanen mtDNA verglichen. Figur 17 zeigt die erhaltene Sequenz. Mutationen, die aufgrund eines fehlerhaften Einbaus durch die Vent (exo-) Polymerase entstanden sind, wurden klein und kursiv dargestellt. Die eingeführte Mutation an dem Nukleotid 3243 (A→G) der mtDNA wurde fett markiert und unterstrichen. Die Mutation am Nukleotid 3271(T→C) wurde gleichermaßen gekennzeichnet, obwohl sie eine zufällige Mutation des Inserts darstellt.

3216	CAAGA	ACAGGGTTTG	TTAAGATGGC	<b><u>AGG</u>GCCCGGT</b>	AATCGCATAA
	AACTTAAAAC	<u>CTT</u> ACAGTCA	GAGGTTCAAT	TCCTCTTCTT	AACAACATAC
	CCATGGCCAA	CCTCCTACTC	CTCATTGTAC	CCATTCTAAT	CGCAATGGCA
	TTCCTAATGC	TTACCGAACG	AAAAATTCTA	GGCTATATAC	AACTACGCAA
	AGGCCCCAAC	GT <del>i</del> GTAGGCC	CCTACGGGCT	ACTACAACCC	TTC <del>i</del> CTGACG
	CCATAAAACT	CTTCACCAAA	GAGCCCCTAA	AACCCGCCAC	ATCTACCATC
	ACCCTCTACA	TCACCGCCCC	GACCTTAGCT	CTCACCATCG	CTCTTCTACT
	ATGAACCCCC	CTCCCCATAC	CCAACCCCCT	GGTCA <del>i</del> CCTC	AACCTAGGCC
	TCCTATTTAT	TCTAGCCACC	TCTAGCCTAG	CCGTTTACTC	AATCCTCTGA
	TCAGGGTGAG	CATCAA <del>A</del> CTC	AAACTACGCC	CTGATCGGC <del>a</del>	CACTGCGAGC
	AGTAGCCCAA	ACAATCTCAT	ATGAAGTCAC	CCTAG-CATC	ATTCTACTAT
	CAACATTACT	AATAAGTGGC	TCCTTTAACC	TCTCCACCCT	TATCACAACA
	CAAGAACACC	TCTGATTACT	CCTGCCATCA	TGACCCTTGG	CCATAATATG
	ATTTATCTCC	ACACTAGCAG	AGAC		
				3884	

Fig. 17: Sequenz des mutierten 669 bp-Inserts.

Die mutierte Base am Nukleotid 3271 war zufällig eine T→C-Transition und stimmte mit einer der zu untersuchenden Punktmutationen überein, so daß dieses Plasmid zwei Mutationen gleichzeitig trug. Insgesamt befanden sich im Insert aufgrund der verwendeten

Vent (exo-) Polymerase vier Mutationen, die in kursiven Kleinbuchstaben, und eine Basendeletion, die durch einen Strich gekennzeichnet wurden. Die Fehlerrate war gering und lag bei fünf Fehlern in 669 Basen in einem akzeptablen Bereich. Die fehlerhafte Sequenz an den fälschlicherweise mutierten Basen, stellte für die spätere Verwendung als Vergleichs-DNA bei der Quantitierung kein Problem dar, weil die Sequenz im Annealingbereich für die Quantitierungsprimer korrekt war.

## **5.2 Probleme bei der Quantitierung von deletierter mtDNA mit der Methode nach Becker et al. (1996)**

Quantitierungen von deletierter mtDNA wurden mit vielfältigen PCR-Methoden, wie der seriellen Verdünnungs-PCR, der kinetischen PCR, einer Mischung aus beiden Methoden (Coral-Debrinski et al., 1991; Ozawa et al., 1990; Becker et al., 1996) und unter Verwendung eines internen Standards (Simonetti et al., 1992) ausgeführt. Bei den meisten Methoden wird die Menge an Wildtyp und deletierter mtDNA durch eine graphisch bestimmte Effizienz auf Zyklus null extrapoliert und der Prozentgehalt der  $\Delta$ mtDNA berechnet. Es treten hierbei große Unterschiede im Prozentgehalt der deletierten mtDNA auf. Die Ergebnisse meiner Diplomarbeit ergaben Unterschiede von einer Zehnerpotenz bei denselben Patienten mit derselben Methodik. Die größte Abweichung wurde von Sandra Leist (Diplomarbeit, 1997) bestimmt, es ergaben sich Verschiebungen der Daten von drei Zehnerpotenzen.

### **5.2.1 Einfluß der Reinheit der DNA auf die Amplifikationseffizienz**

Um die Differenzen von einer Zehnerpotenz zu erklären, wurden Zyklentitrationen des Plasmides pCII, eines Kearns-Sayre-Syndrom (KSS)-Patienten und eines Patienten 93.Q mit wenig *common deletion* mtDNA durchgeführt. Die Standard-PCR-Lösung wurde mit 10 ng/ $\mu$ L Plasmid-DNA oder 100 ng/ $\mu$ L Patienten-DNA angesetzt. Die PCR des Plasmides pCII und des KSS-Patienten wurde mit den Primern (8260-for und 13647-rev) für die *common deletion*-Amplifikation angesetzt, die PCR-Lösung des Patienten 93.Q hingegen mit den Primern (8260-for und 8669-rev) für die Wildtyp-Amplifikation.

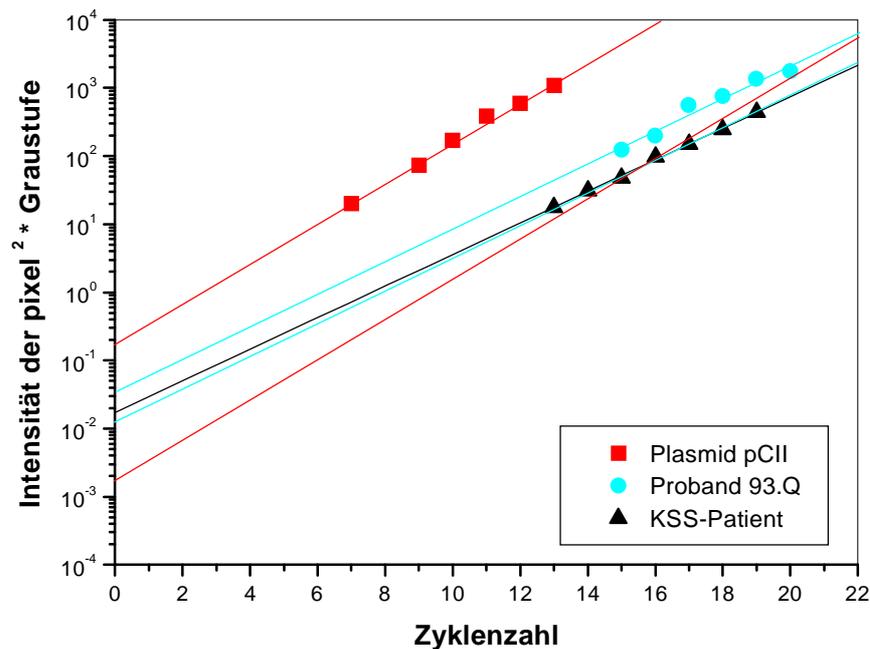


Fig. 18: Titration von unterschiedlichen DNA Proben. PCR-Ansatz: Standard-Ansatz unter Kapitel 4.7.1; DNA-Lösung: pCII 10 ng/μL, 93.Q 100 ng/μL, KSS 100 ng/μL; Primer: pCII und KSS wurden mit 8260-for und 13647-rev und 93.Q mit 8260-for und 8669-rev angesetzt; PCR-Profil: (94°C 4 min) 1 Zyklus, (94°C 45 s, 57°C 45 s, 72°C 1 min) ≤30 Zyklen. Halblogarithmische Auftragung der Intensität (pixel<sup>2</sup> \* Graustufen) des amplifizierten PCR-Fragmentes gegen die Zyklenzahl. Die Plasmid-DNA pCII (Gesamt-DNA 10 ng/100μL PCR-Lösung) Amplifikation wurde durch rote Quadrate und deren Effizienz durch die rote Linie dargestellt. Für den Probanden 93.Q (Gesamt-DNA 100 ng/100μL) mit einer niedrigen Menge an common deletion mtDNA wurde eine Wildtyp-Amplifikation mit den cyanfarbigen Kreisen gezeigt. Die dazugehörige Effizienz wurde mit der cyanfarbigen Linie beschrieben. Eine Zyklentitration eines Kearns-Sayre-Syndrom (KSS) Patienten (Gesamt-DNA 100 ng/100 μL) mit 83.6 % deletierter mtDNA wurde mit den schwarzen Dreiecken dargestellt. Die Effizienz dieses Patienten wird repräsentiert durch die schwarze Linie.

Der Einfluß der Probenreinheit von verschiedenen DNA-Proben wird in Fig. 18 gezeigt. Die Zyklentitrationen der drei DNA-Proben ergab unterschiedliche Steigungen ihrer Ausgleichsgeraden. Der KSS-Patient wurde mit schwarzen Dreiecken dargestellt und die dazugehörige Ausgleichsgerade mit einer schwarzen Linie. Die Amplifikationseffizienz des Patienten 93.Q für den Wildtyp wurde repräsentiert durch die cyanfarbigen Kreise und die gleichfarbige Ausgleichsgerade. Eine Parallelverschiebung der cyanfarbigen Ausgleichsgeraden auf die Punkte des Patienten KSS zeigte, daß die Effizienzen der beiden Patienten annähernd gleich waren und somit zu etwa den gleichen Ergebnissen führten. Die Parallelverschiebung der Ausgleichsgeraden des Plasmides (rote Linie) hingegen erbrachte, daß das Plasmid im Vergleich zu den Patienten eine wesentlich höhere

Amplifikationseffizienz hatte und bei einer Extrapolation zu geringeren Mengen von deletierter mtDNA führte. Der Größenunterschied lag bei einer Zehnerpotenz.

Die Plasmid-DNA pCII führte zu einer höheren Amplifikationseffizienz der DNA, weil weniger störende Bestandteile, wie fragmentierte DNA, Salze oder Proteinrückstände, die enzymatische Amplifikation störten. Die bei der Methode von Becker et al. (1996) zugrundeliegende Vergleichs-DNA zur Effizienzbestimmung für *common deletion* hatte bei den zu bestimmenden Patientenproben einen 10 fach geringeren Prozentgehalt der deletierten mtDNA zum Ergebnis.

### **5.2.2 Effizienzverringering der PCR-Amplifikation des Plasmides pCII durch Patienten-DNA**

Die hohe Amplifikationseffizienz bei der PCR mit dem Plasmid pCII war auf die hohe Reinheit der Plasmid-DNA zurückzuführen. Bei der Methode nach Becker et al. (1996) war der Einsatz des reinen Plasmides ungeeignet. Die mögliche Absenkung der Amplifikationseffizienz sollte durch die Verwendung von Patienten-DNA als Stör-DNA geklärt werden.

Der Einfluß von Stör-DNA auf die Amplifikationseffizienz des Plasmides mit Hilfe von Patienten-DNA wurde überprüft, indem verschiedene Mischungen des Plasmides pCII mit dem Patienten 93.L einer Zyklentitrations-PCR unterzogen wurden. Die PCR-Lösung wurde nach dem Standard-Ansatz zubereitet. Als Primer wurden die *common deletion*-Primer (8260-for und 13647-rev) verwendet. Die DNA-Lösungen wurden in unterschiedlichen Verdünnungen angesetzt. Von einer 10 ng/µL Plasmid-Lösung und einer 100 ng/µL Patient 93.L-Lösung wurden Mischungen von 100/0, 90/10, 80/20, 70/30, 60/40 angesetzt. Das PCR-Temperaturprofil entsprach dem von Kapitel 5.2.1.

Die Mischung 60/40 ergab kein auswertbares Ergebnis und wurde deshalb in der Auftragung vernachlässigt.

Die Auftragung der Menge der PCR-Fragmente (Fig. 19) ergab für das reine Plasmid die größte Steigung der Ausgleichsgeraden (schwarze Quadrate und schwarze Linie) mit einer Effizienz von 2.0735. Die Verdünnung 90/10 (rote Kreise und rote Linie) zeigte die nächstgrößte Effizienz von 1.9506, die Verdünnung 80/20 (blaue Diamanten und blaue Linie) ergab eine Amplifikationseffizienz von 1.8388 und die Auftragung der Mischung 70/30

(grüne Dreiecke und grüne Linie) eine von 1.8182. Der Wert für das reine Plasmid überschritt die Rate von maximal 2.0. Dieser Fehler kann auf einen Pipettierfehler zurückzuführen sein. Der negative Einfluß der Stör-DNA auf die Amplifikationseffizienz wurde deutlich sichtbar.

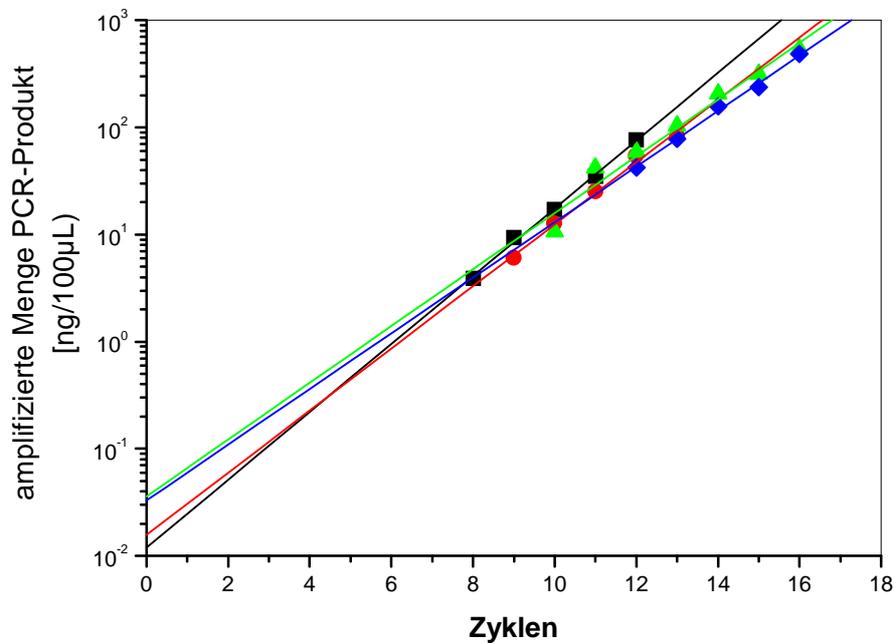


Fig. 19: Zyklentitration unterschiedlicher Verdünnungen des Plasmides pCII. PCR-Ansatz: Standard-Ansatz unter Kapitel 4.7.1; DNA-Lösung: pCII 10 ng/µL und 93.L 100 ng/µL DNA-Mischungen pCII/93.L: 100/0, 90/10, 80/20, 70/30, 60/40; Primer: 8260-for und 13647-rev; PCR-Profil: (94°C 4 min) 1 Zyklus, (94°C 45 s, 57°C 45 s, 72°C 1 min) ≤30 Zyklen. Halblogarithmische Auftragung der amplifizierten Menge des PCR-Produktes gegen die Zyklenzahl.

Quadrate und schwarze Linie: Gesamt-DNA pCII/Gesamt-DNA Proband 93.L: 100/0

Kreise und rote Linie: Gesamt-DNA pCII/Gesamt-DNA Proband 93.L: 90/10

Diamanten und blaue Linie: Gesamt-DNA pCII/Gesamt-DNA Proband 93.L: 80/20

Dreiecke und grüne Linie: Gesamt-DNA pCII/Gesamt-DNA Proband 93.L: 70/30

Die Effizienz der PCR der Mischung 70/30 entsprach der von isolierter Patienten-DNA (Ø 1.8). Um mit der neuen Quantifizierungsmethode die Menge an mutierter mtDNA bestimmen zu können, ist die Verdünnung des Plasmides 70/30 zur Effizienzbestimmung unbedingt notwendig.

### **5.3 Modifikation der Quantitierung durch kinetische PCR von mutierter mtDNA**

Zum Vergleich der Ergebnisse der neuen Methode (serielle Verdünnungs- und kinetische PCR) mit denen einer rein kinetischen PCR, wurde letztere modifiziert. Normalerweise verwendet man sowohl zur Bestimmung des Wildtyps wie auch zur Bestimmung der zu untersuchenden Mutation jeweils 100 ng Gesamt-DNA/100  $\mu$ L PCR-Ansatz. Dies führt aber bei der Wildtyp-Bestimmung zu einem sehr niedrigen Zyklbereich des linearen Amplifikationsbereiches der PCR. Die Amplifikationseffizienz ist in diesem Bereich (Zyklus 10-15) sehr hoch. Die lineare Amplifikation für die mutierte mtDNA kann jedoch erst im Bereich 20 bis 30 Zyklen sichtbar gemacht werden. Die Aktivität der Polymerase ist hier schon herabgesetzt, die Amplifikationseffizienz somit wesentlich geringer als bei der Wildtyp-Bestimmung. Um diesen Fehler zu minimieren, wurde die Wildtyp-Amplifikation nur mit 10 ng/100  $\mu$ L durchgeführt, so daß der auswertbare lineare Bereich der PCR im Bereich 15 bis 22 Zyklen liegt.

Die PCR wurde mit dem Standardansatz angesetzt und mit den obengenannten Konzentrationen der DNA-Lösungen versetzt. Die Primer und das Temperaturprofil entsprachen dem von Kapitel 5.2.1.

Die Proben für die Wildtyp-Bestimmung und die der Bestimmung der mutierten mtDNA wurden parallel amplifiziert. Jede der sechs Reaktionen für den Wildtyp und mutierte mtDNA wurden auf dasselbe Agarosegel pipettiert. Die folgende Figur 20 stellt ein Gelbeispiel dar.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

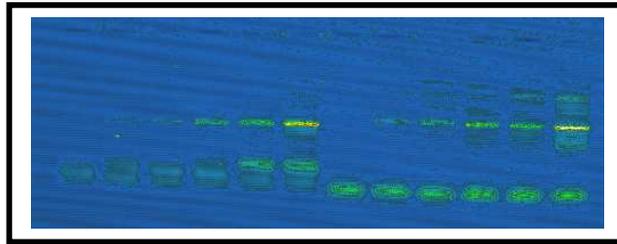


Fig. 20: Quantitatives 1% iges Agarosegel mit SYBR-Green I (10 $\mu$ L/100mL). Auftragung der PCR-Amplifikate eines Patienten (13.88). PCR-Ansatz: Standard-Ansatz unter Kapitel 4.7.1; DNA-Lösung: 13.88 10 ng/ $\mu$ L und 13.88 100 ng/ $\mu$ L; Primer: 8260-for und 8669-rev zur Wildtyp-Bestimmung; 3226-for und 3714-rev zur Mutationsbestimmung; PCR-Profil: (94°C 4 min) 1 Zyklus, (94°C 45 s, 57°C 45 s, 72°C 1 min)  $\leq$ 30 Zyklen; Spur 1-6: Zyklentitration der Wildtypbestimmung der Zyklen 13, 15, 16, 17, 19 und 21; Spur 7-12: Zyklentitration der Melas 3243-Mutationsbestimmung der Zyklen 22, 24, 26, 27, 28, und 30.

Die Auswertung der Gele erfolgte mit der Auswertetechnik (Kapitel 4.6.4.3) der Methode nach Becker et al. (1996). Die folgende Figur 21 zeigt ein Beispiel der graphischen Auswertung eines Quantifizierungsgels.

Die in Figur 21 A dargestellte Graphik zeigt die Zyklentitration der Wildtyp-Bestimmung von zwei Patienten (Patient 8.89 und Patient 1.90) bei den Zyklen 16, 18, 20, 22 und 24. Die geschlossenen Symbole demonstrieren den linearen Amplifikationsbereich der PCR, während die offenen Symbole den Sättigungsbereich der PCR darstellen. Durch die geschlossenen Symbole des jeweiligen Patienten wurden Ausgleichsgeraden gelegt, um von den auswertbaren Punkten einen Mittelwert zu erhalten. Dies war notwendig, da Pipettierfehler einen großen Einfluß haben können. Etwa in der Mitte der Linie, zwischen den äußersten Punkten der Geraden, wurde der Wert für die  $\text{pixel}^2 \cdot \text{Graustufen}$  und der dazugehörige Zyklenwert abgelesen. In die Auftragung wurde eine gestrichelte Linie bei Zyklus 19 gezogen, weil an dieser Stelle mit Hilfe des mathematischen Auswertungsprogrammes „origin 5.0“ der Abszissen-Wert abgelesen wurde. In Figur 21 B wurde, analog zu Figur 21 A, die Bestimmung des PCR-Fragmentes der *common deletion* vollzogen. Die Zyklentitration wurde bei den Zyklen 20, 22, 24, 26, 28 und 30 vorgenommen. Wie im optischen Vergleich von A und B ersichtlich wurde, war der auswertungsrelevante Bereich bei Auftragung B geringer als der von Auftragung A.

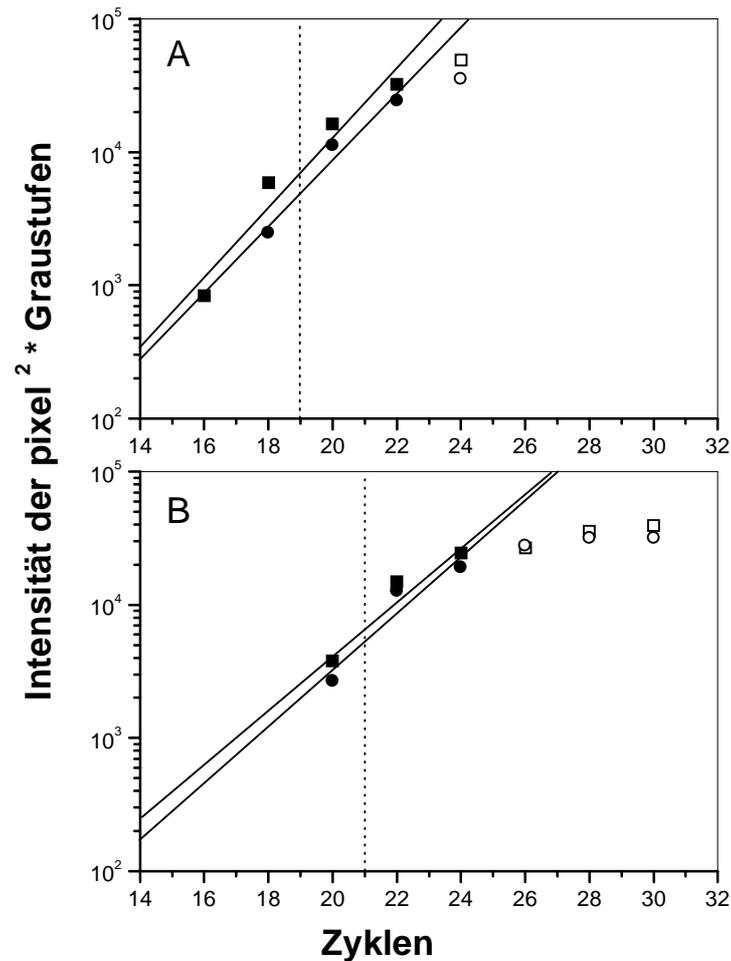


Fig. 21: Zyklentitration von Patienten-DNA. PCR-Ansatz: Standard-Ansatz unter Kapitel 4.7.1; DNA-Lösung: 8.89 und 1.90 10 ng/μL und 8.89 und 1.90 100 ng/μL; Primer: 8260-for und 8669-rev zur Wildtyp-Bestimmung; 8260-for und 13647-rev zur Deletionsbestimmung; PCR-Profil: (94°C 4 min) 1 Zyklus, (94°C 45 s, 57°C 45 s, 72°C 1 min) ≤30 Zyklen; Halblogarithmische Auftragung der pixel<sup>2</sup> \* Graustufen des PCR-Produktes gegen die Zyklenzahl.

■ Patient 8.89 linearer PCR Bereich; □ Patient 8.89 Sättigungsbereich der PCR

● Patient 1.90 linearer PCR Bereich; ○ Patient 1.90 Sättigungsbereich der PCR

Figur A entspricht der Auftragung des Wildtyps, Figur B der Auftragung der common deletion.

Die gestrichelte Linie wurde im Zyklus 21 eingelegt und die y-Daten ebenfalls abgelesen. Die Extrapolation auf den Zyklus null erfolgte mathematisch mit einem Steigungskoeffizienten von 1.8 (Durchschnittswert aller Steigungskoeffizienten der PCRs von Patienten-DNA-Quantierungen) und mit der Gleichung für natürliches Wachstum:

$$E_0 = P_n / (1+R)^n$$

$E_0$  = Edukt im Zyklus 0

$P_n$  = Produktmenge im Zyklus n

$1+R$  = Steigungskoeffizient

n = Zyklus

Abschließend wird mit dem Umrechnungsfaktor (mtDNA-Länge/Fragmentlänge) auf die  $\text{pixel}^2$  \* Graustufen umgerechnet. Der Prozentgehalt der mutierten mtDNA wurde mit diesen beiden Werten berechnet.

## 5.4 Vergleich der Ergebnisse unterschiedlicher PCR-Quantifizierungen

Die Quantifizierungsmethode von Becker et al. (1996) wurde in meiner Diplomarbeit erstmals im Reihenansatz überprüft und standardisiert. Die Ergebnisse waren nicht eindeutig und wurden nochmals in der Diplomarbeit von Sandra Leist überprüft. Auffällig dabei war, daß die Tendenz der Ergebnisse ähnlich war, die Größenordnungen der Prozentgehalte aber stark differierten. Die Unterschiede entstanden durch die Verwendung von unterschiedlicher Vergleichs-DNA. Dieser Einfluß wurde für das Plasmid pCII ermittelt und im Kapitel 5.2.1 dargestellt.

In Figur 22 wurde der Einfluß der Methoden und DNA-Sorten auf die Prozentgehalte deutlich gemacht. Mit der modifizierten Methode (5.3) wurden die Prozentgehalte der  $\Delta\text{mtDNA}/\text{mtDNA}$  in Bild A erhalten. Es handelte sich um Werte zwischen 0.48 bis 3.92 %  $\Delta\text{mtDNA}/\text{mtDNA}$ . Mit der Methode nach Becker et al. (1996) wurden in den Bildern B, C und D die größten Abweichungen im Prozentgehalt erzielt. Bei der Verwendung von zwei Patienten, 93.Q als Wildtyp-Vergleich und einem KSS-Patienten als *common deletion*-Vergleich, wurde die gleiche Größenordnung des prozentualen Anteils der deletierten mtDNA erhalten wie mit der neuen modifizierten Methode. Die Resultate lagen zwischen 1.0 und 5.4% an *common deletion* mtDNA. Der zur Extrapolation notwendige Steigungskoeffizient war bei Bild B ähnlich dem generell zugrunde gelegten von Kapitel 1.8 aus Bild A. Durch die Anwendung eines Patienten (93.Q) als Wildtyp-Vergleich und dem Plasmid pCII als *common deletion*-Vergleich, verschob sich der Prozentgehalt auf ein Zehntel der Ergebnisse aus Bild A und B ( $0.37 \cdot 10^{-1}$ - $4.0 \cdot 10^{-1}\%$ ). Die zu hohe Reinheit des Plasmides führte zu einer erhöhten Effizienz der Vergleichs-DNA, die wiederum bei der mathematischen Extrapolation niedrigere prozentuale Anteile der deletierten mtDNA/mtdna zur Folge hatten.

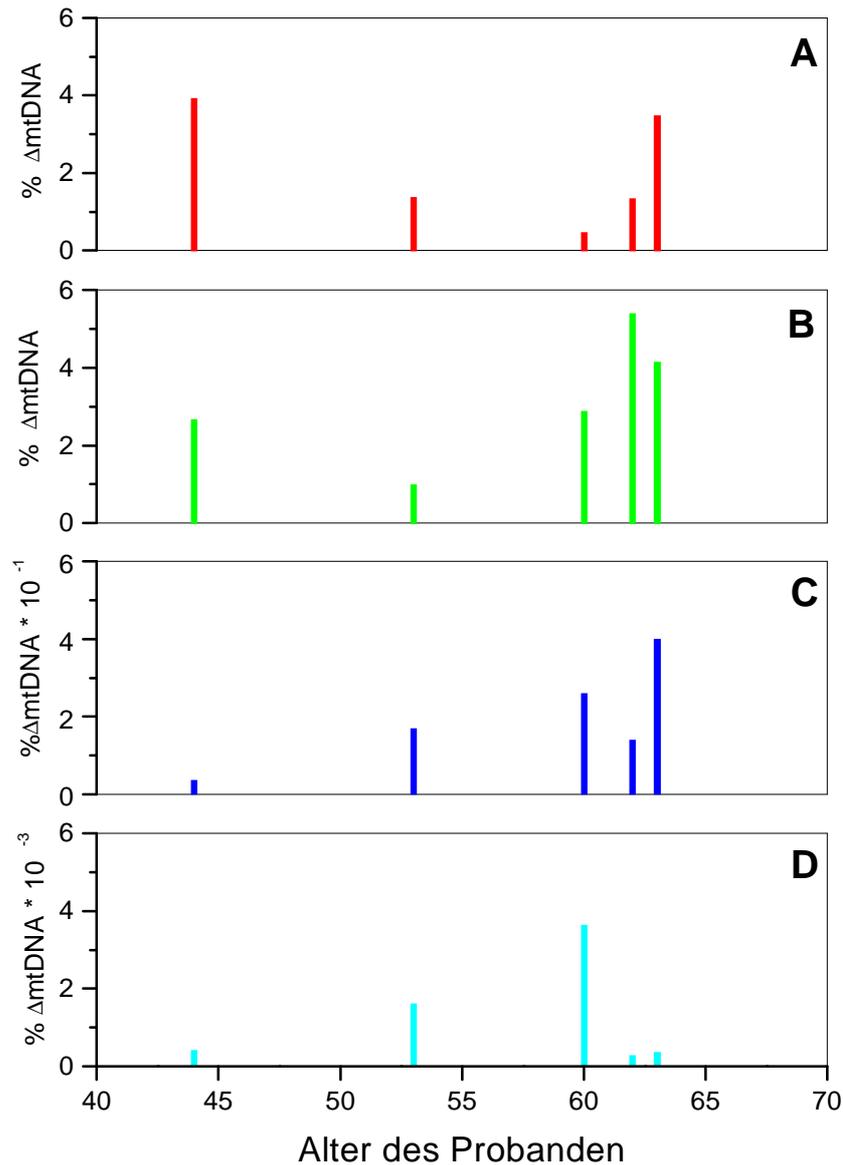


Fig. 22: Auftragung der Prozentgehalte der deletierten mtDNA an der mtDNA gegen das Alter der Probanden von fünf Probanden. Bilder **A**, **B**, **C**, **D** zeigen die Probanden 1.90 (44 Jahre), 4.92 (53 Jahre), 6.92 (60 Jahre), 9.92 (62 Jahre), 8.89 (63 Jahre). Bild **A** : Prozentgehalte der  $\Delta$ mtDNA/mtDNA mit der Methode nach 5.3 bestimmt; Bild **B** : Prozentgehalte der  $\Delta$ mtDNA/mtDNA mit der Methode nach Becker et al. (1996) mit einem Patienten (93.Q) als Wildtyp-Vergleich und einem KSS-Patienten als common deletion-Vergleich. Bild **C** : Prozentgehalte der  $\Delta$ mtDNA/mtDNA mit der Methode nach Becker et al. (1996) mit einem Patienten (93.Q) als Wildtyp-Vergleich und dem Plasmid pCII als common deletion-Vergleich. Bild **D** : Prozentgehalte der  $\Delta$ mtDNA/mtDNA mit der Methode nach Becker et al. (1996) mit Placenta-DNA als Wildtyp-Vergleich und dem Plasmid pCII als common deletion-Vergleich ( Daten des Bildes D sind aus der Diplomarbeit von Sandra Leist, (FB Chemie)entnommen).

Das mit Abstand auffälligste Ergebnis wurde durch Sandra Leist während der Diplomarbeit gefunden. Die Abweichung betrug drei Zehnerpotenzen ( $0.3 \cdot 10^{-3}$ - $3.64 \cdot 10^{-3}\%$ ) im Vergleich zu den Daten aus Bild A und B. Während in den Auftragsungen A, B und C tendenziell eine

vergleichbare Balkenhöhe erkennbar ist, differieren die Werte in Abbildung D stark. Zum einen ist dies auf die Verwendung des Plasmides pCII als Vergleichs-DNA für die *common deletion*-Quantitierung zurückzuführen, zum anderen ist der Einfluß der Placenta-DNA als Vergleichs-DNA für den Wildtyp offensichtlich noch stärker. Die Placenta-DNA wurde vermutlich bei der Isolation sehr stark fragmentiert und führte so zu Steigungskoeffizienten von 2.0 bis zu 2.3.

Diese Werte sind unreal, da bei einem PCR-Zyklus die DNA maximal verdoppelt werden kann. Bei der Berechnung der Wildtyp-Menge der mtDNA ergaben sich kleinere Mengen als tatsächlich vorhanden. Diese wiederum wurden mit den zu kleinen Mengen  $\Delta$ mtDNA rechnerisch verarbeitet und führten zu den ungewöhnlich kleinen Prozentgehalten.

Das Resultat des Vergleichs der unterschiedlichen PCR-Quantifizierungen war, daß die Methode nach Becker et al. (1996) annähernd die gleichen Ergebnisse erbrachte wie die modifizierte kinetische PCR-Methode, wenn als Vergleichs-DNA mtDNA von Patienten verwendet wurde. Die Verwendung der Vergleichs-DNA war bei der modifizierten kinetischen PCR-Methode nicht nötig. Aus diesem Grund wurden die weiteren Quantifizierungen mit der in Kapitel 5.3 beschriebenen Methodik durchgeführt.

## **5.5 Quantifizierung der *common deletion* in mitochondrialer DNA aus Skelettmuskel von 87 Probanden**

Eine Quantifizierung der *common deletion*-mtDNA wurde für 87 Probanden sowohl mit der kombinierten Methode aus serieller Verdünnungs- und Zyklentitrations-PCR (Kapitel 4.6.4.1) als auch mit der modifizierten Zyklentitrationsmethodik (5.3) durchgeführt.

### 5.5.1 Quantitierung der *common deletion* mit der kombinierten Methode

Die Quantitierungen der *common deletion* nach Becker et al. (1996) wurde bereits an den 87 Probanden während meiner Diplomarbeit vollzogen. Ihre Auswertung wurde jedoch, aufgrund der damals unerklärbar niedrigen Prozentgehalte der deletierten mtDNA, auf einen späteren Zeitpunkt verschoben. Nach der Erklärung des Einflusses der Reinheit der DNA auf die Amplifikationseffizienz (Kapitel 5.2.1), wurden die vorliegenden Daten aus der Quantitierung nach der kombinierten Methode ausgewertet. Für die Quantitierung mit der kombinierten Methode wurde als Wildtypvergleich die DNA des Patienten 93.Q verwendet. Der PCR-Ansatz entsprach dem Standardansatz, als Primer dienten die Primer O8 (8260-for) und N6 (8869-rev) für die Wildtypamplifikation und die Primer O8 und O2 (13647-rev) für die Amplifikation der *common deletion*-mtDNA. Das Temperaturprofil der PCR entsprach dem von Kapitel 5.2.1.

In Figur 23 wurde der Prozentgehalt der deletierten mtDNA/mtDNA gegen das Alter der Probanden aufgetragen. Im großen Bild wurden die Werte der einzelnen Patienten sichtbar gemacht. Der mit einem roten Kreis dargestellte 22-jährige Proband hat einen auffällig hohen Prozentgehalt an deletierter mtDNA. Es war zu vermuten, daß es sich bei diesem Probanden tatsächlich um einen Erkrankten handelte. Aus diesem Grund wurde er bei der Erstellung der Kurve für das exponentielle Wachstum nicht miteinbezogen, da nur gesunde gealterte Menschen in die altersstatistische Auswertung miteinbezogen werden sollten. Dennoch wurde im Balkendiagramm der Figur 23 dieser Patient bei der Berechnung des durchschnittlichen Prozentgehaltes für die Altersstufen 0-20 Jahre, 20-30 Jahre, 30-40 Jahre, 40-50 Jahre, 50-60 Jahre, 60-70 Jahre und 70-90 Jahre berücksichtigt. Der Prozentgehalt des 22-jährigen Probanden von 0.17% im vorliegenden Quantitierungsbeispiel ist zwar in Anbetracht des jungen Alters des Probanden sehr hoch, jedoch noch weit entfernt von einem extrem auffälligen Prozentgehalt (> 10%). Die lineare Ausgleichsgerade des Balkendiagramms zeigt deutlich, daß auch hierbei die altersabhängige Zunahme der *common deletion* unverändert bleibt. Die Ergebnisse waren aufgrund der Verwendung des Plasmides pCII als Vergleichs-DNA in diesem Fall sehr gering und lagen zwischen 0.0001 bis 1.86 %  $\Delta$ mtDNA/mtDNA.

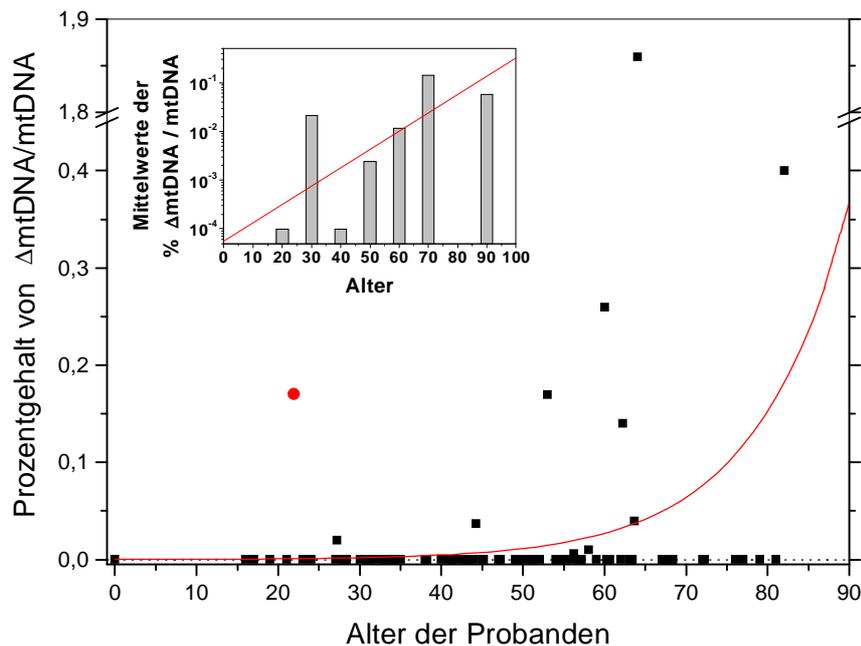


Fig. 23: Auftragung des Prozentgehaltes der deletierten mtDNA/mtDNA gegen das Alter der Probanden. PCR-Ansatz: Standard-Ansatz unter Kapitel 4.7.1 und dem Prinzip von Kapitel 4.6.4.1; Primer: 8260-for und 8869-rev zur Wildtyp-Bestimmung; 8260-for und 13647-rev zur Deletionsbestimmung; PCR-Profil: (94°C 4 min) 1 Zyklus, (94°C 45 s, 57°C 45 s, 72°C 1 min)  $\leq 30$  Zyklen; Großes Bild: Auftragung der einzelnen Ergebnisse der Patienten; ● Patient wurde nicht zur Berechnung des exponentiellen Wachstums miteinbezogen; Kleines Bild: Balkendiagramm des Durchschnittsprozentsgehaltes für 0-20 Jahre, 20-30 Jahre, 30-40 Jahre, 40-50 Jahre, 50-60 Jahre, 60-70 Jahre, 70-90 Jahre; Bestimmung des prozentualen Anteils der  $\Delta$ mtDNA/mtDNA mit der Methode nach Becker et al. (1996), dem Patienten 93.Q als Wildtypvergleichspatient und dem Plasmid pCII als common deletion-Vergleich.

### 5.5.2 Quantitierung der *common deletion* mit der modifizierten Zyklentitrationsmethode

Für die Quantitierung mit der modifizierten Zyklentitrationsmethode wurden die Proben für die Wildtypbestimmung und die der *common deletion* parallel bearbeitet. Der PCR-Ansatz entsprach dem Standardansatz, als Primer dienten die Primer O8 (8260-for) und Q1 (8869-rev) für die Wildtypamplifikation und die Primer O8 und O2 für die Amplifikation der *common deletion*-mtDNA. Das Temperaturprofil der PCR entsprach dem von Kapitel 5.2.1. Für die

Wildtypbestimmung wurden die Zyklen 13, 15, 16, 17, 19 und 21 und für die *common deletion*-Bestimmung die Zyklen 22, 24, 26, 27, 28 und 30 ausgewählt.

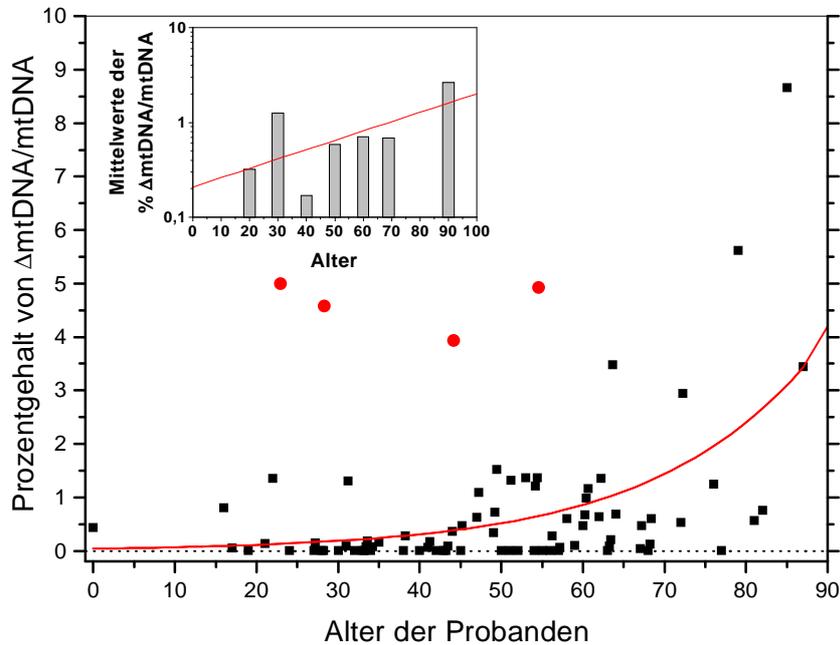


Fig. 24: Auftragung des Prozentgehaltes der deletierten mtDNA/mtDNA gegen das Alter der Probanden. PCR-Ansatz: Standard-Ansatz unter Kapitel 4.7.1; Edukt-DNA-Menge wie unter Kapitel 5.3 angegeben; Primer: 8260-for und 8669-rev zur Wildtyp-Bestimmung; 8260-for und 13647-rev zur Deletionsbestimmung; PCR-Profil: (94°C 4 min) 1 Zyklus, (94°C 45 s, 57°C 45 s, 72°C 1 min)  $\leq 30$  Zyklen; Großes Bild: Auftragung der einzelnen Ergebnisse der Patienten; ● Patient wurde nicht zur Berechnung des exponentiellen Wachstums miteinbezogen; Kleines Bild: Balkendiagramm des Durchschnittsprozentgehaltes für 0-20 Jahre, 20-30 Jahre, 30-40 Jahre, 40-50 Jahre, 50-60 Jahre, 60-70 Jahre, 70-90 Jahre; Bestimmung des prozentualen Anteils der  $\Delta$ mtDNA/mtDNA mit der modifizierten Zyklentitrationsmethode (5.3).

Um eine altersbezogene Abhängigkeit der *common deletion* auch für diese Methode der Quantifizierung zu ermitteln, wurde der prozentuale Anteil der deletierten mtDNA/mtDNA gegen das Alter der Probanden aufgetragen (Fig. 24). Die mit roten Kreisen dargestellten Patienten zeigten trotz des niedrigen Alters eine erhöhte Rate der *common deletion*, was zu dem Schluß führte, daß diese Patienten möglicherweise nicht gesund waren und somit nicht zur Berechnung herangezogen wurden. Der exponentielle Anstieg im Verlauf des Alterns ist deutlich aus der Kurve ersichtlich. In der kleinen Darstellung des Balkendiagramms wurden die mit dem roten Kreis markierten Patienten zur Berechnung des durchschnittlichen Prozentgehaltes der deletierten mtDNA mit erfaßt. Die lineare Regression zeigt weiterhin einen altersbezogenen Anstieg der *common deletion* mtDNA/mtDNA für die Altersgruppen 0-

---

20 Jahre, 20-30 Jahre, 30-40 Jahre, 40-50 Jahre, 50-60 Jahre, 60-70 Jahre und 70-90 Jahre. Die Werte lagen zwischen 0.005 bis 8.7 %. Diese Daten korrelieren mit den meisten veröffentlichten Daten und stimmen auch mit der Größenordnung der entsprechenden Messungen der Vergleichstudie aus Kapitel 5.4 überein.

## **5.6 Verteilung der *common deletion* in humanem Skelettmuskel eines Probanden**

Das Auftreten von mutierter mtDNA im Gewebe ist stochastisch und auf einzelnen Zellen oder Fasern begrenzt, wie durch in situ Hybridisierung (Müller-Höcker et al., 1993) gezeigt wurde. Die Wahrscheinlichkeit vollkommen unterschiedliche Prozentgehalte an deletierter mtDNA im selben Gewebestück zu erhalten, sollte daher um so höher sein, je kleiner die Teilstücke sind, die zur Isolierung von DNA verwendet wurden. Hierzu wurde ein etwa 5g großes Stück der Oberschenkelmuskulatur eines 55-jährigen Probanden, welcher an einem Herzinfarkt verstarb, in Gewebefragmente von 14-54 mg zerlegt. Die Teilstücke wurden quer zur Faser geschnitten und die mtDNA nach der Methode von Wallace et al. (1988) extrahiert. Die Stücke waren besonders klein. Für die normalerweise durchgeführten DNA-Isolationen der 87 Probanden wurden etwa 200 mg-Teile verwendet.

Probennummer	Einwaage [g]	Reinheitsgrad	DNA- Konzentration [µg/mL]	Isolierte DNA- Menge pro Gewebe [ng/mg]
1	0.0233	1.95	828.30	710.99
2	0.0258	1.96	1071.77	830.83
3	0.0546	1.98	1676.68	614.17
4	0.0272	1.98	2885.25	2121.51
5	0.0222	1.97	872.23	785.79
6	0.0138	1.99	489.45	709.35
7	0.0225	1.94	665.15	591.24
8	0.0167	1.93	675.19	808.61
9	0.0253	2.00	1007.77	796.66
10	0.0365	2.01	1120.72	614.09
11	0.0342	2.03	1324.03	774.29
12	0.0241	2.11	697.78	579.07
13	0.0236	2.11	747.98	633.88
14	0.0267	2.04	863.44	646.77
15	0.0150	2.12	517.06	689.41
16	0.0234	2.02	2996.94	2561.49
17	0.0230	1.99	977.65	850.13
18	0.0268	2.03	642.56	479.52
19	0.0235	1.92	1799.67	1531.63

*Tabelle 7: Probennummer, Einwaage, Reinheitsquotient und photometrisch ermittelte DNA-Gesamtmenge der nach der Methode von Wallace isolierten DNA von Teilstücken eines Skelettmuskelstückes eines 55-jährigen Probanden.*

Die nachfolgende PCR wurde nach dem Standardansatz zubereitet. Als Primer dienten die Primer O8 und Q1 für die Wildtypamplifikation und die Primer O8 und O2 für die Amplifikation der *common deletion*-mtDNA. Das Temperaturprofil der PCR entsprach dem von Kapitel 5.2.1. Zur Bestimmung wurde die Methode der modifizierten Zyklentitration angewendet. Für die Wildtypbestimmung wurden die Zyklen 13, 15, 16, 17, 19 und 21 und für die *common deletion*-Bestimmung die Zyklen 22, 24, 26, 27, 28 und 30 ausgewählt.

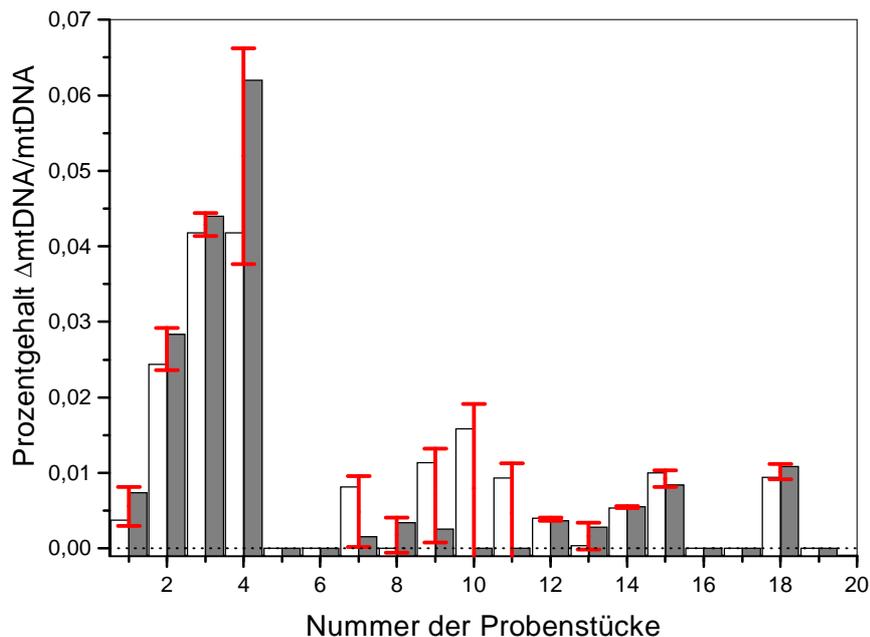


Fig. 25: Statistische Verteilung der *common deletion* der mtDNA in Teilen eines menschlichen Muskels. PCR-Ansatz: Standard-Ansatz unter Kapitel 4.7.1 DNA-Mengen wie unter Kapitel 5.3; Primer: 8260-for und 8869-rev zur Wildtyp-Bestimmung; 8260-for und 13647-rev zur Deletionsbestimmung; PCR-Profil: (94°C 4 min) 1 Zyklus, (94°C 45 s, 57°C 45 s, 72°C 1 min)  $\leq 30$  Zyklen; Weißer Balken: 1. Messung; Grauer Balken: 2. Messung; Rote Strichbalken: Standardabweichung vom Mittelwert.

Die statistische Verteilung der *common deletion* der mtDNA im humanen Skelettmuskel wurde durch die Auftragung des Prozentgehaltes der  $\Delta$ mtDNA/mtDNA gegen die Nummer der Probenstücke dargestellt (Figur 25). Die Probenanalyse wurde jeweils zweimal parallel durchgeführt. Die Auswertung der Daten ergab für die Probenstücke 5, 6, 16, 17 und 19 bei beiden Messungen ein zu kleines und nicht auswertbares Ergebnis. Bei den Probenstücken 8, 10, 11 und 13 war jeweils nur eine Messung nicht detektierbar. Die Prozentgehalte der deletierten mtDNA an mitochondrialer DNA bei der Messungen lagen zwischen 0.0001 und 0.062 %. Da es sich bei dem Patienten um keinen Myopathiepatienten, sondern um ein normal gealtertes Individuum handelte, war der deletierte Anteil der mitochondrialen DNA sehr

gering. Dennoch konnte eine sehr variable Verteilung in den einzelnen Teilstücken festgestellt werden. Anhand dieser Ergebnisse kann die hohe Varianz der durch verschiedene Arbeitsgruppen publizierten Prozentgehalte der *common deletion* ebenfalls erklärt werden.

## **5.7 Quantitierung von Punktmutationen der mitochondrialen DNA in 87 Probanden**

Die Punktmutationen der mitochondrialen DNA werden im Bezug auf ihren altersbezogenen Anstieg des Prozentgehaltes verschieden diskutiert. Münscher et al. (1993) fanden heraus, daß spezielle Punktmutationen, die als molekulare Ursache für mitochondriale Myopathien bekannt sind, wie MERRF, MELAS oder CIPO, altersabhängig akkumulieren. Dahingegen stellte Palotti et al. (1996) diese Altersabhängigkeit in Frage. Da Münscher et al. (1993) nur wenige Proben menschlichen Skelettmuskels vorlagen, wurde für 87 Probanden mit Hilfe der modifizierten Zyklentitrationmethode und der sensiblen Auswertemethode nach Becker et al. (1996), eine statistische Ermittlung einer altersabhängigen Zunahme der Punktmutationen der mtDNA untersucht.

### **5.7.1 Temperaturabhängigkeit der allelspezifischen Primer**

Punktmutationen lassen sich nicht auf die gleiche Weise quantifizieren wie die *common deletion*. Die dazu notwendige allelspezifische PCR verwendet mutierte Primer, deren spezifisches Annealing an die mutierte mtDNA von dem unspezifischen Annealing an die Wildtyp-mtDNA mit Hilfe von Temperaturerhöhungen der Annealingtemperatur und durch Veränderungen der Magnesium-Ionen-Konzentration ermittelt werden muß.

Als Negativkontrolle diente Placenta-mtDNA. Zur Positivkontrolle wurde für jede Punktmutation ein PCR-Fragment amplifiziert, welches die Mutation trug.

### 5.7.1.1 Temperaturkurve für die MELAS-Mutation an nt3243 (A → G)

Zunächst wurde ein Positivkontrollfragment mit Hilfe der PCR hergestellt. Die PCR wurde nach dem Standardansatz angesetzt. Die hierfür verwendeten Primer wurden sehr lang ausgewählt, um eine später folgende *nested PCR* zu ermöglichen. Als Primer diente der 39 bp lange Primer P1 (3216-Mu-for-L), welcher das 29. Nukleotid mutiert hatte, und der Primer P4 (3884-rev). Als mtDNA wurde mutationsfreie Placenta-DNA verwendet.

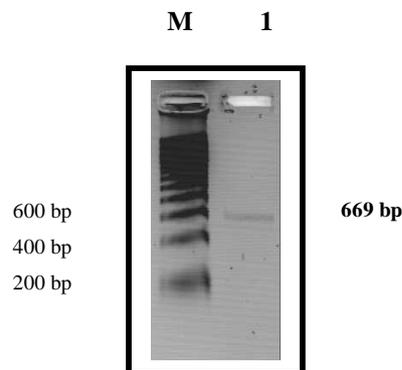


Fig. 26: Ergebnis der PCR zur Amplifikation des PCR-Fragmentes von der Länge 669 bp (nt 3216-3884). PCR-Ansatz: Standard-Ansatz unter Kapitel 4.7.1; Primer: 3216-for und 3884-rev;

PCR-Profil: hot start: 94°C 4 min 1 Zyklus  
 touch down: 94°C 45 sec, 64°C 45 sec, 72°C 1 min 1 Zyklus  
 94°C 45 sec, 62°C 45 sec, 72°C 1 min 1 Zyklus  
 94°C 45 sec, 60°C 45 sec, 72°C 1 min 1 Zyklus  
 PCR: 94°C 45 sec, 59°C 45 sec, 72°C 1 min 27 Zyklen;

Die DNA wurde mit einem 1%igen Agarosegel mit Ethidiumbromid (5 µL/100 mL) aufgetrennt. Spur M: 2 µL DNA-Mass-Ladder; Spur 1: 1 µL des PCR-Ansatzes der Amplifikation des 669 bp Fragmentes der mtDNA.

Figur 26 zeigt das PCR-Amplifikat der Positivkontrolle mit 669 bp Länge.

Für die einzelnen Proben mit Placenta-DNA (Negativkontrolle) und die Positivkontrolle (669 bp) wurde jeweils ein Gesamtansatz mit den Primern für die MELAS 3243 Mutation (P2 (3226-Mu-for-K) und P5 (3714-rev)) zubereitet.

35.0 $\mu\text{L}$	$\text{H}_2\text{O}$
5.0 $\mu\text{L}$	dNTP (2 nmol/ $\mu\text{L}$ )
5.0 $\mu\text{L}$	10 * Vent Polymerase Puffer
1.5 $\mu\text{L}$	Primer P2 (10 pmol/ $\mu\text{L}$ )
1.5 $\mu\text{L}$	Primer P5 (10 pmol/ $\mu\text{L}$ )
0.5 $\mu\text{L}$	DNA-Lösung (100 ng/ $\mu\text{L}$ )
0.5 $\mu\text{L}$	Vent (exo-) Polymerase (1U/ $\mu\text{L}$ )
x $\mu\text{L}$	$\text{MgSO}_4$ (100 nmol/ $\mu\text{L}$ )

Alle Proben wurden mit 35  $\mu\text{L}$  heißem Paraffin überschichtet und bei  $-20^\circ\text{C}$  tiefgefroren.

Um nun die optimale  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration und die Annealingtemperatur zu bestimmen, wurde die folgende Tabelle erstellt.

MgSO <sub>4</sub> -Lsg. $\mu\text{L}/50 \mu\text{l PCR}$	Annealingtemperatur (x) für die Negativkontrollen-Amplifikation						Annealingtemperatur (x) für die Positivkontrollen-Amplifikation					
	0.15	60	62	64	66	68	70	60	62	64	66	68
0.20	60	62	64	66	68	70	60	62	64	66	68	70
0.25	60	62	64	66	68	70	60	62	64	66	68	70
0.30	60	62	64	66	68	70	60	62	64	66	68	70
0.40	60	62	64	66	68	70	60	62	64	66	68	70
0.50	60	62	64	66	68	70	60	62	64	66	68	70

Tabelle 8: Tabelle zur Ermittlung der optimalen  $\text{MgSO}_4$ -Menge und der Annealingtemperatur.

Die Proben, die bei derselben Annealingtemperatur bearbeitet werden sollten, wurden gleichzeitig aufgetaut und einer PCR mit *hot start*, *touch down* und normalem *cycling* unterzogen.

PCR-Temperaturprofil:

<i>hot start</i> :	94°C 4 min	1 Zyklus
<i>touch down</i> :	94°C 45 sec, (x+5)°C 45 sec, 72°C 1 min	1 Zyklus
	94°C 45 sec, (x+3)°C 45 sec, 72°C 1 min	1 Zyklus
	94°C 45 sec, (x+1)°C 45 sec, 72°C 1 min	1 Zyklus
<i>cycling</i> :	94°C 45 sec, x°C 45 sec, 72°C 1 min	27 Zyklen

Bei dem Volumen 0.25  $\mu\text{L}$   $\text{MgSO}_4$ -Lösung/50  $\mu\text{L}$  PCR-Ansatz ergab sich die beste Spezifität der Primer.

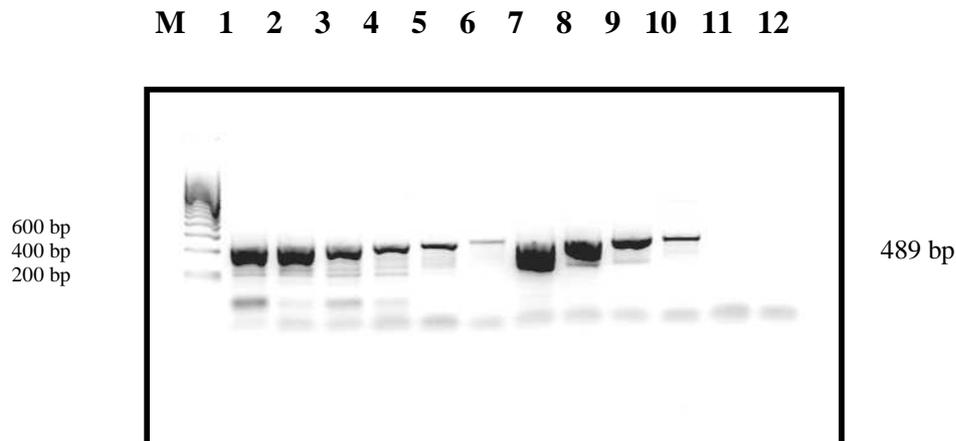


Fig. 27: Ergebnis der PCR zur temperaturabhängigen Amplifikation der Positivkontrolle des PCR-Fragmentes von der Länge 489 bp (nt 3226-3714). PCR-Ansatz: Standard-Ansatz unter Kapitel 4.7.1 mit 0.25  $\mu\text{L}$   $\text{MgSO}_4$ /50  $\mu\text{L}$  PCR-Lösung; Primer: 3226-for und 3714-rev; DNA-Menge: Positivkontrolle 100 ng/ $\mu\text{L}$ , Negativkontrolle (Placenta-DNA) 100 ng/ $\mu\text{L}$ ; PCR-Profil wie unter 5.7.11 mit  $x=66^\circ\text{C}$

Die DNA wurde mit einem 1% igen Agarosegel mit SYBR Green I aufgetrennt. Spur M: 2  $\mu\text{L}$  DNA-Mass-Ladder; Spur 1-6: 10  $\mu\text{L}$  des PCR-Ansatzes der Amplifikation des 489 bp Fragmentes der Positivkontrolle der Temperaturen  $60^\circ\text{C}$ ,  $62^\circ\text{C}$ ,  $64^\circ\text{C}$ ,  $66^\circ\text{C}$ ,  $68^\circ\text{C}$  und  $70^\circ\text{C}$ ; Spur 7-12: 10  $\mu\text{L}$  des PCR-Ansatzes der Amplifikation des 489 bp Fragmentes der Negativkontrolle der Temperaturen  $60^\circ\text{C}$ ,  $62^\circ\text{C}$ ,  $64^\circ\text{C}$ ,  $66^\circ\text{C}$ ,  $68^\circ\text{C}$  und  $70^\circ\text{C}$ .

Das Gelbild der Figur 27 zeigt die temperaturabhängige Amplifikation des 489 bp-Fragmentes der Positivkontrolle und der Negativkontrolle mit den Primern P2 und P5. Das Gelbild wurde optisch ausgewertet und in einem Diagramm dargestellt.

Der Kurvenverlauf in Figur 28 der sigmoidalen Kurven der Amplifikationsabnahme mit steigender Annealingtemperatur zeigte für die Negativkontrolle bei  $66^\circ\text{C}$  keine Amplifikation, so daß ab dieser Annealingtemperatur von einer guten Stringenz der Primer ausgegangen wurde. Die folgenden quantitativen Bestimmungen der mutierten mtDNA wurden bei einer Annealingtemperatur von  $67^\circ\text{C}$  durchgeführt.

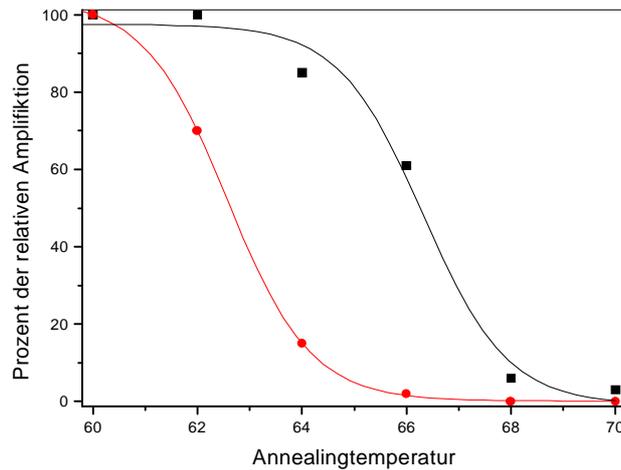


Fig. 28: Auftragung der Prozentanteile der relativen Amplifikation gegen die Annealingtemperatur für die Punktmutation MELAS 3243. ■ Positivkontrolle; ● Negativkontrolle.

### 5.7.1.2 Temperaturkurve für die MELAS-Mutation an nt3271 (T → C)

Für die Punktmutation MELAS 3271 wurde ebenfalls ein Positivkontrollfragment mit Hilfe der PCR hergestellt. Die PCR wurde nach dem Standardansatz angesetzt. Als Primer diente der 38 bp lange Primer Q7 (3244-Mu-for-L), welcher das 28. Nukleotid mutiert hatte, und der Primer P4 (3884-rev). Als mtDNA wurde mutationsfreie Placenta-DNA verwendet.

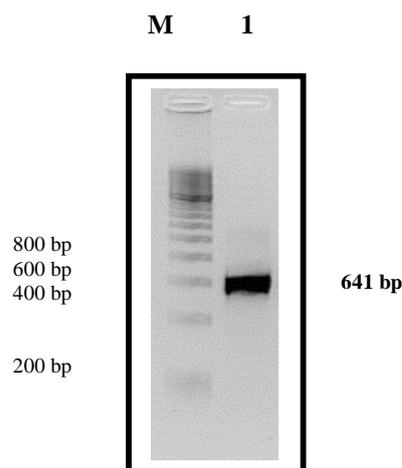


Fig. 29: Ergebnis der PCR zur Amplifikation der Positivkontrolle des PCR-Fragmentes von der Länge 641 bp (nt 3244-3884). PCR-Ansatz: Standard-Ansatz unter Kapitel 4.7.1; Primer: 3244-for und 3884-rev; PCR-Profil hot start: 94°C 4 min 1 Zyklus, PCR: 94°C 45 sec, 55°C 45 sec, 72°C 1 min 27 Zyklen

Die DNA wurde mit einem 1%igen Agarosegel mit SYBR Green I aufgetrennt. Spur M: 2 µL DNA-Mass-Ladder; Spur 1: 10 µL des PCR-Ansatzes der Amplifikation des 641 bp Positivkontrollfragmentes der mtDNA.

Figur 29 zeigt das PCR-Amplifikat der Positivkontrolle mit 641 bp Länge.

Für die einzelnen Proben mit Placenta-DNA (Negativkontrolle) und die Positivkontrolle (641 bp) wurde jeweils ein Gesamtansatz mit den Primern für die MELAS 3271 Mutation (Q8 (3256-Mu-for-K) und P5) zubereitet. Der Ansatz erfolgt wie unter Kapitel 5.7.1.1.

Alle Proben wurden mit 35  $\mu\text{L}$  heißem Paraffin überschichtet und bei  $-20^\circ\text{C}$  tiefgefroren.

MgSO <sub>4</sub> -Lsg. $\mu\text{L}/50 \mu\text{l PCR}$	Annealingtemperatur (x) für die Negativkontrollen-Amplifikation						Annealingtemperatur (x) für die Positivkontrollen-Amplifikation					
	60	62	64	66	68	70	60	62	64	66	68	70
0.15	60	62	64	66	68	70	60	62	64	66	68	70
0.3	60	62	64	66	68	70	60	62	64	66	68	70
0.5	60	62	64	66	68	70	60	62	64	66	68	70
0.8	60	62	64	66	68	70	60	62	64	66	68	70
1.0	60	62	64	66	68	70	60	62	64	66	68	70
1.25	60	62	64	66	68	70	60	62	64	66	68	70

Tabelle 9: Tabelle zur Ermittlung der optimalen MgSO<sub>4</sub>-Menge und der Annealingtemperatur.

Bei dem Volumen 0.15  $\mu\text{L}$  MgSO<sub>4</sub>-Lösung/50  $\mu\text{L}$  PCR-Ansatz ergab sich die beste Spezifität der Primer. Die Auswertung des Gelbildes (nicht gezeigt) ergab die folgende graphische Auftragung der relativen Amplifikation der Primer.

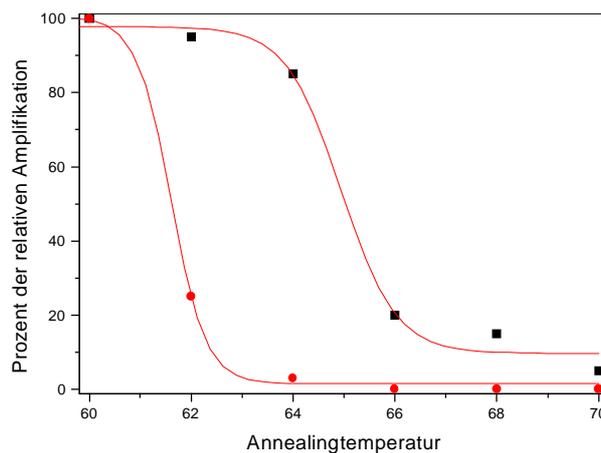


Fig. 30: Auftragung der Prozentanteile der relativen Amplifikation gegen die Annealingtemperatur für die Punktmutation MELAS 3271. ■ Positivkontrolle; ● Negativkontrolle.

Die in Figur 30 dargestellte sigmoidale Kurve der Positivkontrolle führte erst bei einer Annealingtemperatur von 70°C zu fast keiner Amplifikation. Die Negativkontrolle annealte schon bei 64°C nicht mehr ausreichend, so daß ab dieser Annealingtemperatur von einer guten Stringenz der PCR ausgegangen werden kann. Die folgenden quantitativen Bestimmungen der mutierten mtDNA wurden bei einer Annealingtemperatur von 67°C durchgeführt.

### 5.7.1.3 Temperaturkurve für die MELAS-Mutation an nt3291 (T → C)

Das Verfahren zur Ermittlung der optimalen MgSO<sub>4</sub>-Konzentration und der optimalen Annealingtemperatur verlief analog zu der für die Mutation an nt3271 (5.7.1.2). Für die Punktmutation MELAS 3291 wurde ebenfalls ein Positivkontrollfragment mit Hilfe der PCR hergestellt. Die PCR wurde nach dem Standardansatz angesetzt. Als Primer diente der 36 bp lange Primer Q10 (3263-Mu-for-L), welcher das 29. Nukleotid mutiert hatte, und der Primer P4 (3884-rev). Als mtDNA wurde mutationsfreie Placenta-DNA verwendet. Die PCR wurde nach demselben Temperaturprofil wie unter Kapitel 5.7.1.2 vollzogen.

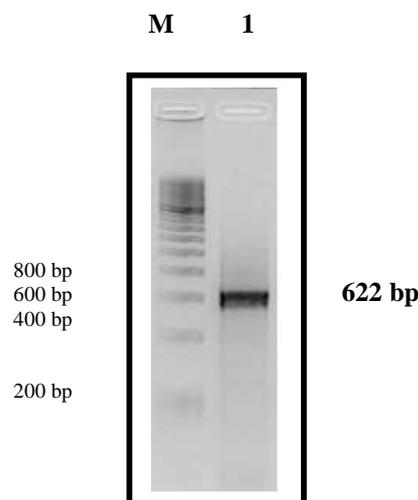


Fig. 31: Ergebnis der PCR zur Amplifikation der Positivkontrolle des PCR-Fragmentes von der Länge 622 bp (nt 3263-3884). PCR-Ansatz: Standard-Ansatz unter Kapitel 4.7.1; Primer: 3263-for und 3884-rev; PCR-Profil hot start: 94°C 4 min 1 Zyklus, PCR: 94°C 45 sec, 55°C 45 sec, 72°C 1 min 27 Zyklen;

Die DNA wurde mit einem 1%igen Agarosegel mit SYBR Green I aufgetrennt; Spur M: 2 µL DNA-Mass-Ladder; Spur 1: 10 µL des PCR-Ansatzes der Amplifikation des 622 bp Positivkontrollfragmentes der mtDNA.

Figur 31 zeigt das PCR-Amplifikat der Positivkontrolle mit 622 bp Länge.

Für die einzelnen Proben mit Placenta-DNA (Negativkontrolle) und die Positivkontrolle (622 bp) wurde jeweils ein Gesamtansatz mit den Primern für die MELAS 3291 Mutation (R1 (3275-Mu-for-K) und P5) zubereitet. Der Ansatz und die weitere Verarbeitung erfolgte wie unter Kapitel 5.7.1.2.

Bei dem Volumen 0.15  $\mu\text{L}$   $\text{MgSO}_4$ -Lösung/50  $\mu\text{L}$  PCR-Ansatz ergab sich die beste Spezifität der Primer. Die Auswertung des Gelbildes (nicht gezeigt) ergab die folgende graphische Auftragung der relativen Amplifikation der Primer.

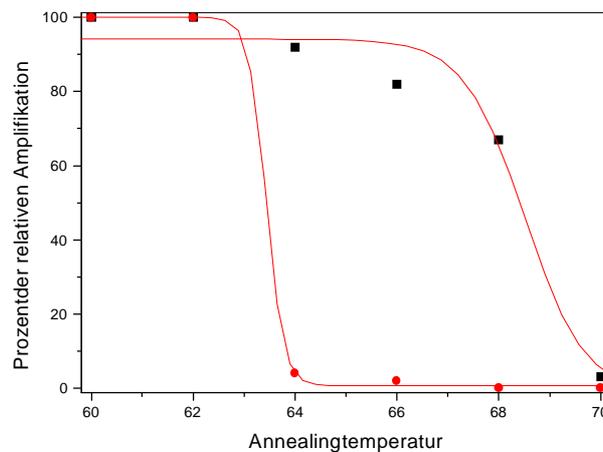


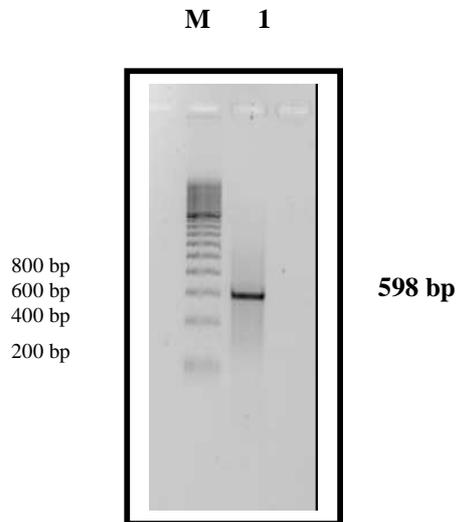
Fig. 32: Auftragung der Prozentanteile der relativen Amplifikation gegen die Annealingtemperatur für die Punktmutation MELAS 3291. ■ Positivkontrolle; ● Negativkontrolle.

Die Positivkontrolle zeigt bis zu einer Annealingtemperatur von 69°C eine Amplifikation (Fig. 32). Die Negativkontrolle ergab schon bei 64°C keine Amplifikation, so daß ab dieser Annealingtemperatur von einem stringenten Annealingverhalten der Primer ausgegangen wurde. Die folgenden quantitativen Bestimmungen der mutierten mtDNA wurden bei einer Annealingtemperatur von 67°C durchgeführt.

#### 5.7.1.4 Temperaturkurve für die MERRF-Mutation an nt8344 (A → G)

Die Ermittlung der optimalen  $\text{MgSO}_4$ -Konzentration und der optimalen Annealingtemperatur verlief für die Punktmutation MERRF 8344 analog zu den vorangegangenen. Es wurde ebenfalls ein Positivkontrollfragment mit Hilfe der PCR hergestellt. Die PCR wurde nach dem Standardansatz angesetzt. Als Primer diente der 30 bp lange Primer P7 (8325-Mu-for-L),

welcher das 26. Nukleotid mutiert hatte, und der Primer N8 (8921-rev). Als mtDNA wurde mutationsfreie Placenta-DNA verwendet. Die PCR wurde nach demselben Temperaturprofil wie unter Kapitel 5.7.1.2 vollzogen.



*Fig. 33: Ergebnis der PCR zur Amplifikation der Positivkontrolle des PCR-Fragmentes von der Länge 598 bp (nt 8324-8921). PCR-Ansatz: Standard-Ansatz unter Kapitel 4.7.1; Primer: 8324-for und 8921-rev; PCR-Profil hot start:94°C 4 min 1 Zyklus, PCR:94°C 45 sec, 55°C 45 sec, 72°C 1 min 27 Zyklen;*

*Die DNA wurde mit einem 1%igen Agarosegel mit Ethidiumbromid (5 µL/100 ml) aufgetrennt. Spur M: 2 µL DNA-Mass-Ladder; Spur 1: 10 µL des PCR-Ansatzes der Amplifikation des 598 bp Positivkontrollfragmentes der mtDNA.*

Figur 33 zeigt das PCR-Amplifikat der Positivkontrolle mit 598 bp Länge.

Für die einzelnen Proben mit Placenta-DNA (Negativkontrolle) und die Positivkontrolle (598 bp) wurde jeweils ein Gesamtansatz mit den Primern für die MERRF 8344 Mutation (P6 (8327-Mu-for-K) und N6) zubereitet. Der Ansatz und die weitere Verarbeitung erfolgte wie unter Kapitel 5.7.1.2.

Bei dem Volumen 2.5 µL MgSO<sub>4</sub>-Lösung/50 µL PCR-Ansatz ergab sich für das Annealing der Primer die höchste Spezifität. Die Auswertung des Gelbildes (nicht gezeigt) ergab die folgende graphische Auftragung des temperaturabhängigen Annealings der Primer.

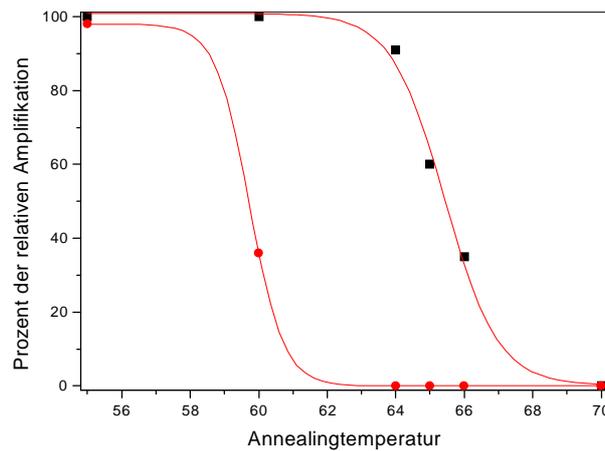


Fig. 34: Auftragung der Prozentanteile der relativen Amplifikation gegen die Annealingtemperatur für die Punktmutation MERRF 8344. ■ Positivkontrolle; ● Negativkontrolle.

Die Positivkontrolle zeigt bis zu einer Annealingtemperatur von 68°C eine Amplifikation (Fig. 34). Die Negativkontrolle ergab schon bei 62°C keine Amplifikation mehr. Als optimale Annealingtemperatur wurden 64°C ausgewählt.

### 5.7.2 Quantitierung der Punktmutation Melas 3243 (A → G)

Die Punktmutation MELAS 3243 ist die bekannteste und häufigste MELAS Mutation. Die Untersuchungen mit Hilfe der PCR-Technik wurden mit der Methode unter Kapitel 5.3 vollzogen. Für die allelspezifische PCR wurde eine bestmögliche Annealingtemperatur von 67°C, wie im Kapitel 5.7.1.1 beschrieben, ermittelt.

Die Primer für die Wildtyp-Bestimmung waren O8 und Q1, die für die Bestimmung der Punktmutation MELAS 3243 waren P2 und P5. Der PCR-Ansatz entsprach dem Standardansatz und enthielt für die Wildtyp-Determination 10 ng Gesamt-DNA/100 µL PCR-Lösung und für die Mutations-Diagnose jeweils 100 ng Gesamt-DNA/100 µL PCR-Lösung. Alle Proben wurden mit 35 µL heißen Wachs überschichtet.

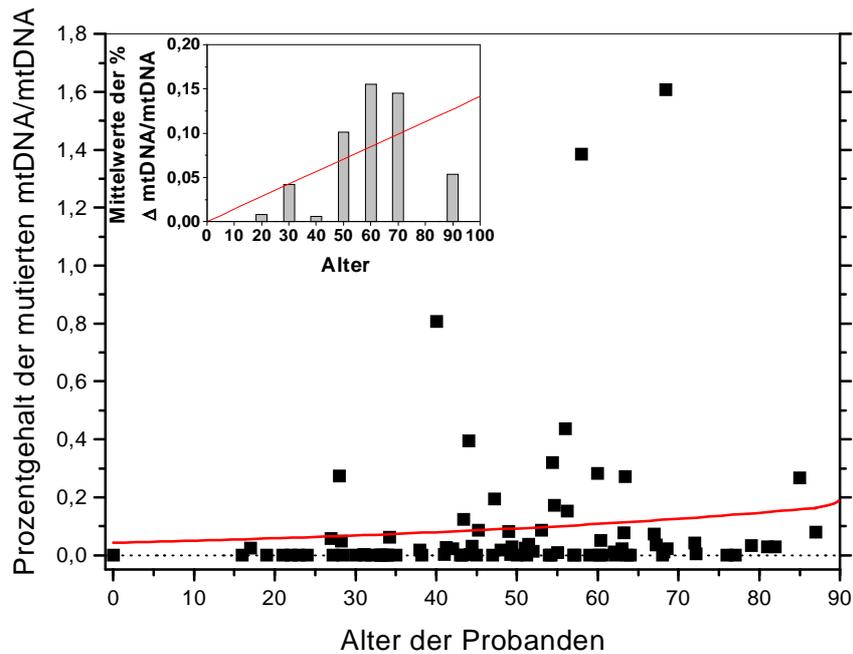


Fig. 35: Auftragung des Prozentgehaltes der mutierten (MELAS 3243) mtDNA/mtDNA gegen das Alter der Probanden. PCR-Ansatz: Standard-Ansatz unter Kapitel 4.7.1; Primer: Wildtyp-Bestimmung 8260-for und 8669-rev, Mutationsbestimmung 3226-for und 3714-rev; DNA-Mengen wie unter 5.3 angegeben; PCR-Profil wie unter Kapitel 5.7.1.1 mit  $x = 67^{\circ}\text{C}$ ;

Großes Bild: Auftragung der einzelnen Ergebnisse der Patienten; Kleines Bild: Balkendiagramm des Durchschnittsprozentgehaltes für 0-20 Jahre, 20-30 Jahre, 30-40 Jahre, 40-50 Jahre, 50-60 Jahre, 60-70 Jahre und 70-90 Jahre; Bestimmung des prozentualen Anteils der mutierten (MELAS 3243) mtDNA/mtDNA mit der modifizierten Zyklen titrationmethode (5.3).

Die Prozentgehalte der in Figur 35 dargestellten Probanden lagen zwischen 0.0001 bis 1.61 % mutierter mtDNA/mtDNA. Die Auftragungen der einzelnen Prozentgehalte zeigten mit der Kurve für exponentielles Wachstum einen altersbedingten Anstieg der MELAS 3243 Mutation. Um diese Abhängigkeit deutlicher darzustellen, wurden im kleinen Balkendiagramm der Mittelwert der Prozentgehalte der Altersgruppierungen für 0-20 Jahre, 20-30 Jahre, 30-40 Jahre, 40-50 Jahre, 50-60 Jahre, 60-70 Jahre und 70-90 Jahre beschrieben. Die lineare Ausgleichsgerade zeigt eine deutliche Steigung. Bei den Berechnungen der Kurve und der Ausgleichsgeraden wurden auch die beiden auffälligen Patienten 26.93 (28 Jahre) und 24.93 (40 Jahre) berücksichtigt. Sie wiesen beide eine zu hohe Menge mutierter mtDNA für ihr geringes Alter auf, dennoch konnte bei den sehr niedrigen Mengen (<1%) nicht von einer Erkrankung oder dem Beginn einer Erkrankung ausgegangen werden.

### 5.7.3 Quantitierung der Punktmutation Melas 3271 (T → C)

Eine weitere Mutation aus der Reihe der MELAS Mutationen ist die an Nukleotid 3271. Sie tritt seltener bei Krankheiten in Erscheinung als die an Nukleotid 3243. Die Bestimmung wurde mit Hilfe der PCR-Technik und der Methode unter Kapitel 5.3 vollzogen. Die allelespezifische PCR wurde bei der optimalsten Annealingtemperatur von 67°C, wie im Kapitel 5.7.1.1 beschrieben, durchgeführt. Die Primer für die Wildtyp-Bestimmung waren O8 und Q1, die für die Bestimmung der Punktmutation MELAS 3271 waren Q8 und P5. Drei Primer wurden von der Untersuchung der Mutation 3243 beibehalten, lediglich der allelspezifische Primer wurde der Mutation angepaßt. Die Verwendung der drei unveränderten Primer minimierte den Einfluß des unterschiedlich guten Annealingverhaltens von Primern und somit Varianzen in den Amplifikationseffizienzn. Der PCR-Ansatz entsprach dem Standardansatz und enthielt für die Wildtyp-Determination 10 ng Gesamt-DNA/100 µL PCR-Lösung und für die Mutations-Bestimmung jeweils 100 ng Gesamt-DNA/100 µL PCR-Lösung. Das Temperaturprofil der PCR war dasselbe wie in Kapitel 5.7.2. Für die Probanden lagen die Prozentgehalte der MELAS 3271 Mutation von mutierter mtDNA/mtDNA zwischen 0.0001 und 0.36%. Die Kurve für exponentielles Wachstum zeigt einen altersbezogenen Anstieg der MELAS 3271 Mutation. Da die Kurve nur sehr schwach anstieg, wurde der Mittelwert der Prozentgehalte der Altersgruppierungen für 0-20 Jahre, 20-30 Jahre, 30-40 Jahre, 40-50 Jahre, 50-60 Jahre, 60-70 Jahre und 70-90 Jahre im kleinen Balkendiagramm beschrieben. Die lineare Ausgleichsgerade zeigt eine deutliche Steigung. Bei den Berechnungen der Kurve und der Ausgleichsgeraden wurde auch der auffällige Patient 7.91 (16 Jahre) einbezogen. Obwohl dieser für sein Alter eine auffällig Menge mutierter mtDNA aufwies, konnte trotzdem nicht von einer Erkrankung ausgegangen werden, da der Wert nur bei 0.1 % lag.

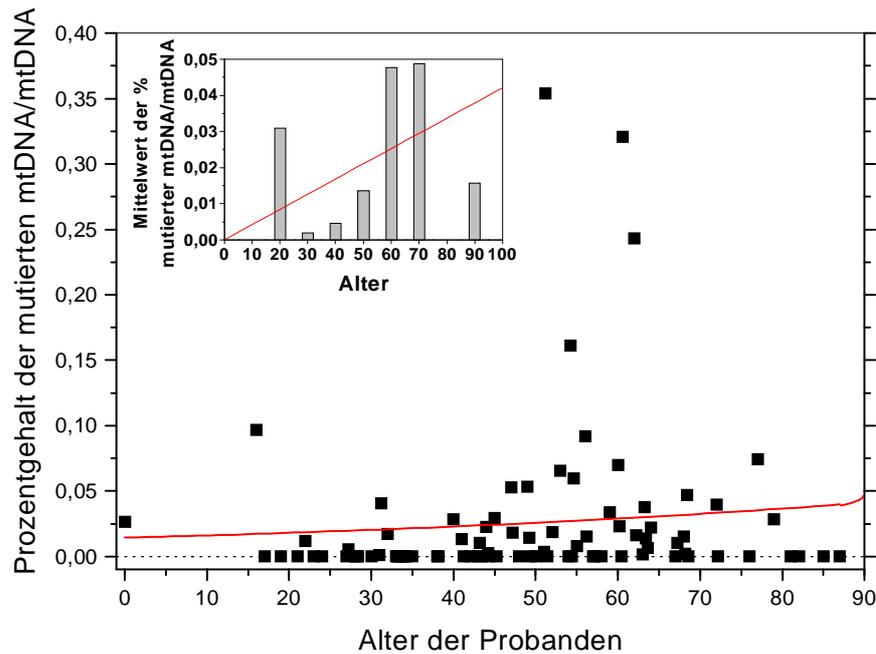


Fig. 36: Auftragung des Prozentgehaltes der mutierten (MELAS 3271) mtDNA/mtDNA gegen das Alter der Probanden. PCR-Ansatz: Standard-Ansatz unter Kapitel 4.7.1; Primer: Wildtyp-Bestimmung 8260-for und 8669-rev, Mutationsbestimmung 3256-for und 3714-rev; DNA-Mengen wie unter 5.3 angegeben; PCR-Profil wie unter Kapitel 5.7.1.1 mit  $x = 67^{\circ}\text{C}$ ;

Großes Bild: Auftragung der einzelnen Ergebnisse der Patienten; Kleines Bild: Balkendiagramm des Durchschnittsprozentgehaltes für 0-20 Jahre, 20-30 Jahre, 30-40 Jahre, 40-50 Jahre, 50-60 Jahre, 60-70 Jahre und 70-90 Jahre; Bestimmung des prozentualen Anteils der mutierten (MELAS 3271) mtDNA/mtDNA mit der modifizierten Zyklentitrationsmethode (5.3).

#### 5.7.4 Quantifizierung der Punktmutation Melas 3291 (T $\rightarrow$ C)

Die MELAS Mutationen an Nukleotid 3291 ist, genau wie die beiden vorangegangenen Punktmutationen, eine Mutation der tRNA-Leu<sup>(UR)</sup>. Sie ist weniger bekannt als die an Nukleotid 3243 und die an 3271, und tritt weniger häufig im Zusammenhang mit dem Krankheitsbild der MELAS-Erkrankung in Erscheinung. Die Bestimmung wurde mit Hilfe der PCR-Technik und der modifizierten Methode unter Kapitel 5.3 vollzogen. Die allelespezifische PCR wurde bei der optimalsten Annealingtemperatur von  $67^{\circ}\text{C}$ , wie im Kapitel 5.7.1.1 beschrieben, durchgeführt. Die Primer für die Wildtyp-Bestimmung waren O8 und Q1, die für die Bestimmung der Punktmutation MELAS 3291 waren R1 und P5. Auch bei dieser Bestimmung wurde nur der allelespezifische Primer ausgewechselt, um die

Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Bestimmungen für die einzelnen Mutationen zu erhalten. Der PCR-Ansatz entsprach dem Standardansatz und enthielt für die Wildtyp-Determination 10 ng Gesamt-DNA/100  $\mu$ L PCR-Lösung und für die Mutations-Bestimmung jeweils 100 ng Gesamt-DNA/100  $\mu$ L PCR-Lösung. Das Temperaturprofil der PCR war dasselbe wie in Kapitel 5.7.2.

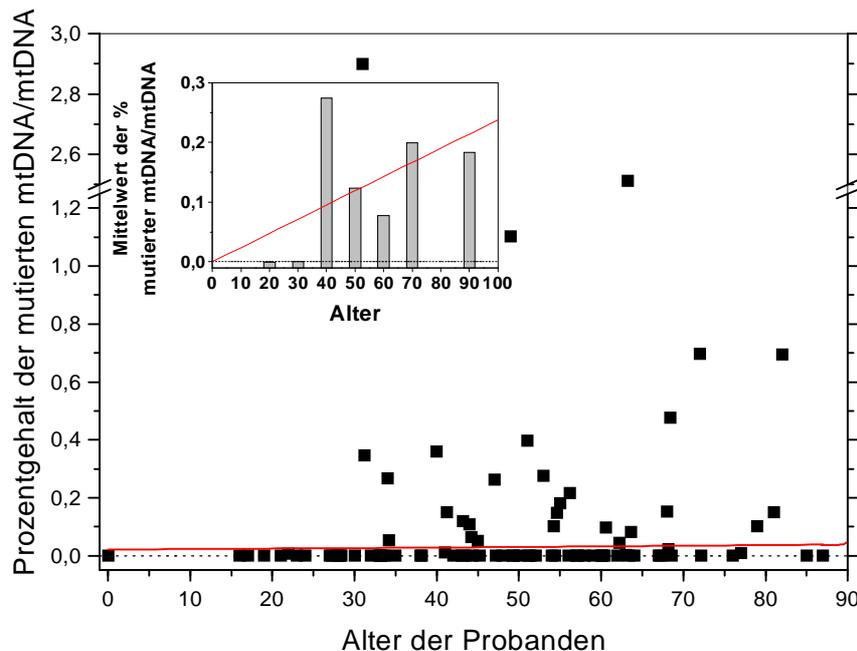


Fig. 37: Auftragung des Prozentgehaltes der mutierten (MELAS 3291) mtDNA/mtDNA gegen das Alter der Probanden. PCR-Ansatz: Standard-Ansatz unter Kapitel 4.7.1; Primer: Wildtyp-Bestimmung 8260-for und 8669-rev, Mutationsbestimmung 3275-for und 3714-rev; DNA-Mengen wie unter 5.3 angegeben; PCR-Profil wie unter Kapitel 5.7.1.1 mit  $x = 67^{\circ}\text{C}$ ;

Großes Bild: Auftragung der einzelnen Ergebnisse der Patienten; Kleines Bild: Balkendiagramm des Durchschnittsprozentgehaltes für 0-20 Jahre, 20-30 Jahre, 30-40 Jahre, 40-50 Jahre, 50-60 Jahre, 60-70 Jahre und 70-90 Jahre; Bestimmung des prozentualen Anteils der mutierten (MELAS 3291) mtDNA/mtDNA mit der modifizierten Zyklentitrationmethode (5.3).

Die Auftragung der Figur 37 ist ein nicht eindeutiges Beispiel für die altersabhängige Zunahme der Punktmutation MELAS 3291. Die mathematische Auswertung der Daten in bezug auf exponentielles Wachstum ergaben keinen eindeutigen Kurvenverlauf. Die Prozentgehalte der Probanden waren im Altersbereich zwischen 30 und 55 Jahren erhöht und diese erhöhten Werte waren häufiger als bei den anderen Mutationen der MELAS-Reihe. Das Balkendiagramm der durchschnittlichen Prozentgehalte der Altersgruppierungen für 0-20

Jahre, 20-30 Jahre, 30-40 Jahre, 40-50 Jahre, 50-60 Jahre, 60-70 Jahre und 70-90 Jahre erbrachte eine lineare Ausgleichsgerade mit deutlicher Steigung. Bei den Berechnungen der Kurve und der Ausgleichsgeraden wurde auch der auffällige Patient 7.89 (31 Jahre) einbezogen. Außergewöhnlich bei dieser Bestimmung war auch die Höhe der einzelnen Prozentgehalte die zwischen 0.0001 und 2.9 % lagen, dies war für die selten auftretende Mutation bemerkenswert hoch. Obwohl die Daten nicht unmißverständlich waren, konnte ein geringer altersbezogener Anstieg der Mutation erkannt werden.

### **5.7.5 Quantitierung der Punktmutation MERRF 8344 (A → G)**

Die MERRF 8344 Mutation ist ebenfalls eine Mutation in einem tRNA-Gen (tRNA-Lys). Die altersabhängige Zunahme dieser Punktmutation wurde von Christoph Münscher in seiner Dissertation an wenigen Patienten untersucht und bestätigt. Die Aussage über eine statistische Altersverteilung war sehr vage und sollte durch die Überprüfung an 84 Probanden verifiziert werden.

Die Bestimmung wurde mit Hilfe der PCR-Technik und der Methode unter Kapitel 5.3 vollzogen. Die allelespezifische PCR wurde bei der Annealingtemperatur von 64°C, wie im Kapitel 5.7.1.1 beschrieben, durchgeführt. Die Primer für die Wildtyp-Bestimmung waren O8 und Q1, die für die Bestimmung der Punktmutation MERRF 8344 waren N6 und P6. Der PCR-Ansatz entsprach dem Standardansatz und enthielt für die Wildtyp-Determination 10 ng Gesamt-DNA/100 µL PCR-Lösung und für die Mutations-Bestimmung jeweils 100 ng Gesamt-DNA/100 µL PCR-Lösung. Das Temperaturprofil der PCR war dasselbe wie in Kapitel 5.7.2.

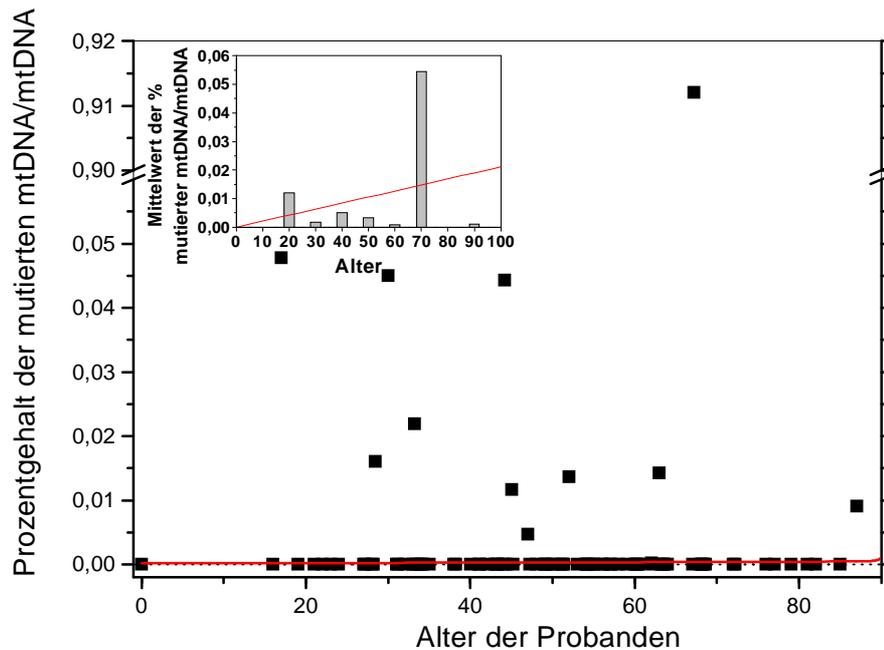


Fig. 38: Auftragung des Prozentgehaltes der mutierten (MERRF 8344) mtDNA/mtDNA gegen das Alter der Probanden. PCR-Ansatz: Standard-Ansatz unter Kapitel 4.7.1; Primer: Wildtyp-Bestimmung 8260-for und 8669-rev, Mutationsbestimmung 8327-for und 8869-rev; DNA-Mengen wie unter 5.3 angegeben; PCR-Profil wie unter Kapitel 5.7.1.1 mit  $x = 67^{\circ}\text{C}$ ;

Großes Bild: Auftragung der einzelnen Ergebnisse der Patienten; Kleines Bild: Balkendiagramm des Durchschnittsprozentgehaltes für 0-20 Jahre, 20-30 Jahre, 30-40 Jahre, 40-50 Jahre, 50-60 Jahre, 60-70 Jahre und 70-90 Jahre; Bestimmung des prozentualen Anteils der mutierten (MERRF 8344) mtDNA/mtDNA mit der modifizierten Zyklentitrationsmethode (5.3).

In der Auftragung von Figur 38 zeigten die Einzelergebnisse der Prozentgehalte der mutierten mtDNA/mtDNA eine Streuung von 0,0001 bis 0,92%. Auffallend hierbei waren einige Patienten mit erhöhten Prozentwerten im jungen Alter. Die Patienten 15,94 (17 Jahre), 3,91 (30 Jahre) und 1,90 (44 Jahre) hoben sich durch ihren Wert von den anderen Daten ab. Dennoch waren die Prozentgehalte der MERRF 8344 Mutation bei diesen Probanden nicht herausragend, so daß von normal gealterten Individuen ausgegangen wurde. Die Berechnung des exponentiellen Wachstums ergab nur einen schwach ansteigenden Kurvenverlauf. Auch hier wurde zur Verdeutlichung der altersabhängigen Zunahme der Prozentgehalte der Mutation ein Balkendiagramm angefertigt. Das Balkendiagramm der durchschnittlichen Prozentgehalte der Altersgruppierungen für 0-20 Jahre, 20-30 Jahre, 30-40 Jahre, 40-50 Jahre, 50-60 Jahre, 60-70 Jahre und 70-90 Jahre erbrachte eine lineare Ausgleichsgerade mit einer Steigung. Die Mutation MERRF 8344 weist eine sehr geringe altersabhängige Akkumulation auf.

## 5.8 Patienten mit mehreren Mutationen

Die Hypothese des Alterns sagt aus, daß nicht nur eine Mutation im Gewebe auftritt, sondern mehrere Veränderungen der mtDNA vorliegen können. Deren Summe ist vermutlich verantwortlich für den Alterungsprozeß. Einige der Probanden fielen durch mehrere Mutationen auf.

Patient	Alter	Prozentgehalt der <i>common deletion</i>	Prozentgehalt der <b>MELAS 3243</b>	Prozentgehalt der <b>MELAS 3271</b>	Prozentgehalt der <b>MELAS 3291</b>	Prozentgehalt der <b>MERRF 8344</b>
13.90	0	0,43314	< 0,0001	0,02657	< 0,0001	< 0,0001
7.91	16	0,80128	< 0,0001	0,09696	< 0,0001	< 0,0001
15.94	17	0,05233	0,0255	< 0,0001	< 0,0001	0,0478
20.94	19	< 0,005	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
19.93	21	0,13416	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
16.93	22	1,35424	< 0,0001	0,01188	0,0068	< 0,0001
5.92	23	4,98154	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
10.90	24	< 0,005	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
31.94	27	< 0,005	0,05681	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
2.88	27	0,14684	< 0,0001	< 0,00573	< 0,0001	< 0,0001
26.93	28	< 0,005	0,27379	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
14.90	28	< 0,005	0,04977	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
3.90	28	4,57251	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,01611
3.91	30	< 0,005	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,04506
7.89	31	0,08632	0,0021	0,003	2,89957	< 0,0001
1.92	31	1,3034	< 0,0001	0,04065	0,34748	< 0,0001
5.88	32	< 0,005	< 0,0001	0,01709	< 0,0001	< 0,0001
7.93	33	< 0,005	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
46.94	33	< 0,005	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,02192
9.93	33	0,08227	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
5.90	33	0,18891	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
92.I	34	< 0,005	< 0,0001	< 0,0001	0,26716	< 0,0001
2.94	34	0,0831	0,06163	< 0,0001	0,05216	< 0,0001
10.93	35	0,1628	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
93.RA	38	< 0,005	0,01699	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
18.93	38	0,27597	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
24.93	40	< 0,005	0,80624	0,02851	0,35911	< 0,0001
12.90	41	0,07125	0,002	0,01335	0,01025	< 0,0001
33.93	41	0,17466	0,02679	< 0,0001	0,14924	< 0,0001
94.RB	42	< 0,005	0,02175	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
5.93	43	< 0,005	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
11.91	43	< 0,005	< 0,0001	0,01033	0,11949	< 0,0001
5.94	43	0,0894	0,12295	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
9.89	44	0,36246	0,39531	0,02282	0,10856	< 0,0001
1.90	44	3,92302	0,00193	0,00275	0,06365	0,04434
33.93	44	< 0,005	0,03195	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
93.M	45	< 0,005	< 0,0001	0,0292	0,05185	0,0117
35.94	45	0,47013	0,08523	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
4.91	47	0,62792	< 0,0001	0,05272	0,26319	0,00477
25.93	47	1,09675	0,19383	0,01842	< 0,0001	< 0,0001
14.94	48	< 0,005	0,01825	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
10.94	49	0,34521	0,08151	0,05342	1,10268	< 0,0001
14.88	49	0,71716	0,00335	0,0143	< 0,0001	< 0,0001

11.93	49	1,51838	0,02957	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
18.94	50	< 0,005	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
30.93	51	< 0,005	0,02522	0,00367	0,39787	< 0,0001
10.91	51	1,32289	< 0,0001	0,35399	< 0,0001	< 0,0001
4.90	51	< 0,005	0,03763	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
91.O	52	< 0,005	0,01328	0,01887	< 0,0001	0,01367
4.92	53	1,37076	0,08706	0,06546	0,27616	< 0,0001
6.94	54	< 0,005	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
14.93	54	1,21685	< 0,0001	0,16115	0,10147	< 0,0001
17.93	54	1,37251	0,31967	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
8.92	54	4,91455	0,17275	0,05949	0,14789	< 0,0001
9.94	55	< 0,005	0,00961	0,00798	0,18127	< 0,0001
9.91	56	< 0,005	0,43605	0,09168	< 0,0001	< 0,0001
1.89	56	0,28559	0,15312	0,01504	0,21598	< 0,0001
92.K	57	< 0,005	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
94.RD	57	0,06158	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
7.94	58	0,60253	1,38409	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
8.91	59	0,10188	< 0,0001	0,03374	< 0,0001	< 0,0001
6.92	60	0,47646	0,28295	0,06973	< 0,0001	< 0,0001
2.90	60	0,67238	< 0,0001	0,02321	< 0,0001	< 0,0001
15.93	60	0,99107	0,05139	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
11.90	60	1,16041	< 0,0001	0,32067	0,09648	< 0,0001
93.P	62	0,63415	0,01167	0,24296	< 0,0001	3,05883E-4
9.92	62	1,35134	< 0,0001	0,01623	0,04533	< 0,0001
8.94	63	< 0,005	0,02288	0,00142	0,0029	0,01431
16.94	63	0,0844	0,07759	0,03789	2,51148	< 0,0001
23.93	63	0,20637	0,27163	0,01389	< 0,0001	< 0,0001
8.89	63	3,47694	7,81612E-4	0,00656	0,08208	< 0,0001
19.94	64	0,69242	< 0,0001	0,02209	< 0,0001	< 0,0001
13.94	67	0,04732	0,07345	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
13.88	67	0,47469	0,03485	0,01049	< 0,0001	0,91207
6.91	68	< 0,005	< 0,0001	0,01526	0,15258	< 0,0001
29.93	68	0,12314	0,01196	0,00223	0,02139	< 0,0001
20.93	68	0,60628	1,60866	0,04719	0,47566	< 0,0001
45.94	68	< 0,005	0,02176	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
93.L	72	0,52686	0,04254	0,03947	0,69605	< 0,0001
91.N	72	2,94024	0,00377	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
2.91	76	1,24373	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
27.93	77	< 0,005	< 0,0001	0,07425	0,00951	< 0,0001
93.Q	79	5,61895	0,03409	0,02837	0,10236	< 0,0001
11.94	81	0,56349	0,0294	< 0,0001	0,15106	< 0,0001
4.94	82	0,75315	0,02924	< 0,0001	0,6955	< 0,0001
92.H	85	8,66782	0,26806	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
92.F	87	3,44143	0,07981	< 0,0001	< 0,0001	0,00908

Tabelle 10: Tabelle der Prozentgehalte der Probanden. ■ Proband mit fünf Mutationen; ■ Proband mit vier Mutationen; □ Proband mit drei und weniger Mutationen;

Die Tabelle zeigt die Prozentgehalte der mutierten mtDNA/mtDNA für die fünf ermittelten Mutationen sowie das Alter und die Kennzeichnung des Patienten. Die Spalte des Prozentwertes der *common deletion* enthält als Auswertungsminimum 0.005%. Die übrigen Mutationen zeigten eine geringere Detektionsgrenze von 0.0001%.

Beim Patient 1.90 konnten alle fünf Mutationen nachgewiesen werden, die hellgrau gekennzeichneten Probanden hatten vier der fünf determinierten Mutationen. Die übrigen weiß dargestellten Patienten zeigten drei oder weniger Mutationen. Auffällig bei der Verteilung der Patienten mit vier und fünf Mutationen war, daß diese erst ab dem Alter von 40 Jahren auftraten. Dieses Alter kann als Schwellenalter betrachtet werden, da die meisten Probanden erst ab diesem Alter mehrere Mutationen aufwiesen. Ebenso stieg die Zahl der Probanden mit erhöhten Prozentgehalten der Mutationen mit zunehmendem Alter auch an.

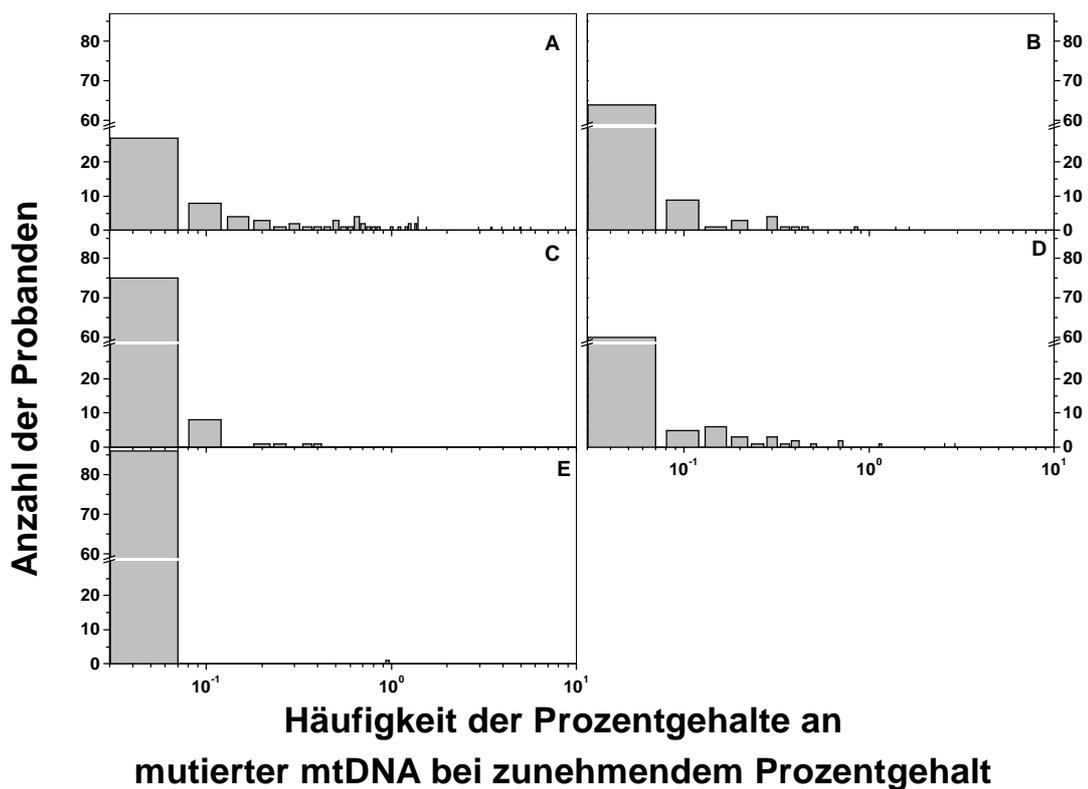


Fig. 39: Halblogarithmische Auftragung der Anzahl der Probanden mit einem bestimmten Prozentbereich an mutierter mtDNA gegen die Prozentgehalte der mutierten mtDNA/mtDNA. Häufigkeit der Prozentgehalte an mutierter mtDNA bei zunehmendem Prozentgehalt von 0.0001% bis Maximalwert der jeweiligen Mutation in 0.05%-Schritten. Bild A: Auftragung für die Mutation common deletion; Bild B: Auftragung für die Mutation MELAS 3243; Bild C: Auftragung für die Mutation MELAS 3271; Bild D: Auftragung für die Mutation MELAS 3291; Bild E: Auftragung für die Mutation MERRF 8344;

Die Figur 39 zeigt in den Einzelbildern für jede Mutation die Häufigkeit der Patienten von 0.0001% bis zum Maximalwert der jeweiligen Mutation in 0.05%-Schritten. Bild A zeigt diese Verteilung für die *common deletion* mtDNA. Die Häufigkeit der Mutation nimmt zwar mit steigendem Prozentgehalt ab, ist aber zwischen dem Minimalwert und 10% durchgängig vorhanden. Die *common deletion* ist eine häufige Mutation bei gesunden gealterten

Probanden. In Abbildung B wurde die MELAS 3243 Mutation dargestellt. Die Verteilung hierbei war so, daß mehr Patienten mit niedrigen Prozentwerten vorlagen, die Häufigkeiten jedoch bis zum Maximalwert (1.61% mutierte mtDNA/mtDNA) gut gestreut vorlagen. Dies galt ebenfalls für die MELAS 3291 Mutation (Bild D; Maximalwert 2.90% mutierte mtDNA/mtDNA). Die Bilder C und E der Figur 39 zeigen die Auftragungen der MELAS 3271 und der MERRF 8344 Mutation. Diese Mutationen haben sehr niedrige Prozentwerte für die mutierte mtDNA/mtDNA ergeben. Wobei die MELAS 3271 Mutation häufig detektierbar war, jedoch in geringem Maße und die MERRF 8344 Mutation nur sehr selten ermittelt wurde.

## 6 Diskussion

### 6.1 Erzeugung von Plasmiden mit punktmutierten Inserts

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Methode von Becker et al. (1996) zur Quantifizierung von DNA auch auf Punktmutationen angewendet werden. Die während meiner Diplomarbeit standardisierte Methode eignet sich hervorragend den prozentualen Anteil von mutierter mtDNA in Patientenproben im Reihenansatz zu quantifizieren. Hierbei ist es allerdings notwendig, eine Vergleichs-DNA mit einem hohen Prozentanteil (>60%) der zu ermittelnden Mutation zu haben. Diese Vergleichs-DNA wird zur Bestimmung der PCR-Effizienz verwendet. Für die Quantifizierung des Wildtyps der mtDNA sind die vorliegenden Probanden geeignet, da keiner an einer mitochondrialen Myopathie erkrankt ist und somit alle über mindestens 80% Wildtyp-mtDNA verfügen. Dennoch empfiehlt es sich auch hier, ein Plasmid mit einem Wildtyp-mtDNA-Insert zu verwenden, da die Plasmid-DNA jederzeit neu kultiviert und isoliert werden kann. Ebenfalls ist die Qualität der Plasmid-DNA immer gleichbleibend gut. Ein größeres Problem stellen die Punktmutationen und die *common deletion* dar. Das vorliegende Plasmid pCII trägt ein Insert mit den Bereichen der humanen mtDNA, welche die *common deletion* flankieren. Um nun auch die Punktmutationen detektieren zu können, war es notwendig, Plasmide mit den entsprechenden mutierten Inserts herzustellen. Zunächst wurde ein 946bp-Fragment der mitochondrialen DNA mit Hilfe der PCR amplifiziert. Dieses DNA-Amplifikat wurde in den Vektor pBluescript (SK-) kloniert und sequenziert. Die Sequenzanalyse ergab aufgrund der verwendeten Vent (exo-)-Polymerase und der niedrigen Annealingtemperatur, daß etwa jede 40. Base mutiert war. Diese Fehlerrate war zu hoch und sollte aus diesem Grund verbessert werden, indem eine Polymerase mit Exonukleaseaktivität verwendet wurde. Die Sequenzierung des Klons ergab für das Wildtyp-Insert eine fehlerfreie Sequenz. Die Erzeugung des mutierten Plasmides mit der Punktmutation MELAS 3243 (A → G) wurde zunächst mit Hilfe der mutagenesen PCR versucht. Das mutierte PCR-Amplifikat sowie das retransformierte Plasmid wiesen deutlich bei den Restriktionsverdauen zur Mutationsidentifikation eine Mutation auf. Die Gele der folgenden Sequenzierungen waren jedoch sehr schlecht lesbar und führten zu keinem positiven Ergebnis. Möglicherweise ist dies auf die gleichzeitige Umstellung des Gelsystems und des Sequenzierungskits zurückzuführen.

Eine andere Art der Mutagenese führte zu besseren Ergebnissen. Das PCR-Amplifikat wurde mit einem bereits mutierten Primer hergestellt, so daß das Fragment nur noch in den Vektor pCR II TOPO kloniert werden mußte. Dazu wurde das Klonierungssystem pCR II TOPO Cloning<sup>®</sup> Kit Dual Promotor verwendet. Die anschließende Sequenzierung erbrachte, trotz der verwendeten Vent (exo-)-Polymerase ein befriedigendes Ergebnis. Die Fehlerrate war minimal und die nicht beabsichtigten Mutationen lagen außerhalb der Primerannealingregionen der quantitativen allelspezifischen PCR. Eine zufällige Mutation des Inserts entspricht der Mutation MELAS 3271 (T → C), so daß dieses Plasmid zur Quantifizierung der Mutation MELAS 3243 und MELAS 3271 dienen könnte.

## **6.2 Quantifizierungsprobleme bei der kombinierten Methode aus seriellen Verdünnung und kinetischen PCR**

Die Methode von Becker et al. (1996) bietet wesentliche Vorteile zu den übrigen praktizierten Methoden wie die serielle Verdünnungs-PCR (Corall-Debrinski et al., 1991) oder die kinetische PCR (PCR-Zyklentitration), die sowohl mit Radioaktivität (Ozawa et al., 1990; Sugiyama et al., 1991; Hayakawa et al., 1992; Seibel et al., 1991) als auch mit Ethidiumbromid als Fluoreszenzfarbstoff durchgeführt wurde (Münscher, Dissertation). Die Verwendung von Radioaktivität ist zum einen teuer und zum anderen gesundheitlich bedenklich. Ethidiumbromid hat auswertungstechnische Nachteile durch die starke Hintergrundfluoreszenz bei der Transillumination. Zur Effizienzbestimmung sind 15 Proben (fünf Verdünnungen mit jeweils drei aufeinanderfolgenden Zyklen der PCR-Zyklentitration) notwendig. Zur quantitativen Bestimmung der Patientenproben genügen in der Regel drei Zyklen einer Zyklentitration, so daß bei jeder PCR mit dem Perkin Elmer TC1 Thermocycler 11 Patientenproben analysiert werden können. Die Bestimmung der Wildtyp-mtDNA und der mutierten mtDNA erfolgt unabhängig voneinander. Dieser Umstand erfordert die Bestimmung der tatsächlichen DNA-Menge, so daß nicht nur relative Prozentgehalte, sondern auch tatsächliche Prozentanteile berechnet werden können. Diese unabhängige Detektion birgt allerdings auch den Fehler der unterschiedlichen Amplifikationsraten, verursacht durch Gerätevarianzen und der Auftragung auf verschiedenen Agarosegelen. Der größte Vorteil der Methode ist aber die Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green I, der im Gegensatz zu Ethidiumbromid bei der Transillumination keinerlei Hintergrundleuchten hervorruft. Seine

hohe Sensitivität (etwa 20 mal höher als Ethidiumbromid) ermöglicht eine Determination von geringsten Mengen von DNA.

Beim Vergleich der quantitativen Bestimmung der *common deletion* von einigen ausgesuchten Patienten traten jedoch große Unterschiede im Prozentgehalt der deletierten mtDNA auf. Die Suche nach der Ursache der Ergebnisschwankungen bei gleicher Methode führte zu den verwendeten DNA-Lösungen. Zur Überprüfung dieses Einflusses der DNA wurde eine Zyklentitrations-PCR für das Plasmid pCII, für einen Patienten mit KSS und für einen gesunden gealterten Probanden durchgeführt. Die Auftragung der Bandenintensität gegen die Zyklenzahl in Figur 18 erbrachte für das Plasmid pCII die steilste Ausgleichsgerade, und somit die größte Amplifikationsrate. Der KSS-Patient und der Proband zeigten annähernd die gleiche Effizienz, die deutlich niedriger war als bei dem Plasmid. Bei der Parallelverschiebung der Ausgleichsgeraden wird deutlich, daß bei der Zugrundelegung der zu hohen Effizienz des Plasmides die Menge an Patienten- bzw. Probanden-DNA falsch extrapoliert wird und somit zu niedrigeren Prozentgehalten führt. Wie im Diagramm (Figur 18) ersichtlich ist, ergeben sich aus dieser Verschiebung Differenzen von einer Zehnerpotenz kleiner als mit dem realen Steigungskoeffizienten. Die Verwendung von reiner Plasmid-DNA (pCII) als Vergleichs-DNA zur Effizienzbestimmung ist daher ungeeignet. Die Plasmid-DNA erbrachte Amplifikationsraten von 100% (Steigungskoeffizient 2.0). Die Ermittlung eines Durchschnitts der Steigungskoeffizienten sämtlicher von mir ausgeführter PCR Reaktionen mit Patienten-DNA ergaben einen Koeffizienten von 1.8.

Untersuchungen mit Mischungen aus Plasmid-DNA (10 ng/μL) und Patienten-DNA (100 ng/μL) lieferten die erwarteten Effizienzverringerungen. Der Einfluß der Stör-DNA war groß und zeigte bei der Mischung 70/30 eine Verringerung auf einen Steigungskoeffizienten von 1.81. Dieser Wert entspricht ungefähr dem Mittelwert aller PCR-Reaktionen. Für ein Plasmid mit Wildtyp-Insert und allen Inserts mit Punktmutationen müßte diese Bestimmung ebenfalls durchgeführt werden. Da es sich hierbei aber um ein recht aufwendiges Verfahren handelt, wurde von dieser Problemlösung Abstand genommen und die Methode nach Becker et al. (1996) zu einer kinetischen PCR modifiziert.

### 6.3 Entwicklung einer modifizierten kinetischen PCR-Methode

Bei der üblicherweise verwendeten kinetischen PCR (Ozawa et al., 1990) wird eine Zyklentitration mit einer Patienten-DNA von 100 ng Gesamt-DNA durchgeführt. Dies gilt sowohl für die Wildtyp-Bestimmung wie auch für die der *common deletion*. Die Zyklentitration der Wildtyp-Bestimmung wird im Zyklbereich von 10 bis 15 Zyklen vollzogen. In diesem ersten Drittel der Gesamtzyklenzahl ist die Aktivität der Polymerase noch annähernd unvermindert. Die Amplifikationsrate der PCR-Produkte ist fast 2.0. Die Amplifikation der *common deletion* mtDNA-Fragmente bei gesunden Probanden führt jedoch erst bei einer höheren Zyklenzahl zu detektierbaren Produkten. Als optimal erwies sich der Zyklbereich bei 20 bis 30 Zyklen. Die verminderte Aktivität der Polymerase führt bei den hohen Zyklen zu einer niedrigeren Effizienz. Der Vergleich der Wildtyp-Bestimmung mit einer Einsatzmenge von 100 ng Gesamt-DNA und der *common deletion*-Determinations ebenfalls mit 100 ng Gesamt-DNA hat bei der Extrapolation den Effekt, daß die Bestimmung der Deletion relativ zum Wildtyp zu erhöhten Ergebnissen führt.

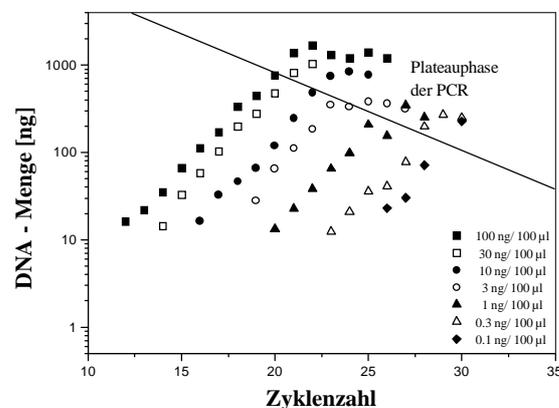


Fig. 40: Auftragung der Zyklenzahl gegen die Menge des amplifizierten Fragmentes für die Wildtypamplifikation des Patienten 93.Q. DNA des Patienten 93.Q (87 Jahre, Wildtyp-Amplifikation nach dem Standardprotokoll mit den Primern 8865-For/9361-Rev. Temperaturprofil: 94°C 4 min, 1 Zyklus; 94°C 1 min, 57°C 45 s, 72°C 45 s, ≤ 32 Zyklen. (Diplomarbeit, Annette Reith).

In der Figur 40 (Graphik entnommen aus meiner Diplomarbeit) ist die Menge des amplifizierten Fragmentes der Wildtypamplifikation einer seriellen Verdünnungsreihe zu erkennen. Um die beiden verschiedenen Amplifikationen des Wildtyps und der Deletion zyklusbezogen einander anzugleichen, hätte sowohl eine Erhöhung der Gesamt-DNA-Menge

bei der Deletionsbestimmung herangezogen werden können, als auch eine Erniedrigung der Gesamt-DNA-Menge bei der Bestimmung der *common deletion*. Die Erhöhung der eingesetzten DNA-Menge ist nicht vorteilhaft, da sich eine zu hohe Edukt-DNA-Menge hemmend auf die Amplifikationsrate auswirkt. Aus diesem Grund wurde die Einsatz-Menge der DNA zur Wildtyp-Ermittlung reduziert. Die Verdünnung 10 ng Gesamt-DNA wurde deshalb ausgewählt, obwohl die auswertbaren Zyklentitrationsen der beiden Determinationen nicht vollständig übereinstimmten, weil eine weitere Verdünnung (1 ng) einen zu kleinen detektierbaren linearen Anstiegsbereich der PCR gehabt hätte. Die absinkende Plateauphase der PCR führt bei hohen Verdünnungen zu sehr geringen linearen logarithmischen Anstiegsphasen, was vermutlich auf die sinkende Aktivität der Polymerase zurückzuführen ist. Für die DNA-Lösung mit 10 ng Gesamt-DNA ergibt sich ein optimaler auswertbarer Zyklbereich der PCR bei 15 bis 22 Zyklen. Die Steigungskoeffizienten der *common deletion* mtDNA-Bestimmung und der Bestimmung der Menge des Wildtyps sind so annähernd gleich und werden daher mit 1.8 festgelegt. Die für jeden Probanden ausgeführten 6 Zyklentitrationsen der beiden Bestimmungen werden in derselben Reihe eines Agarosegels aufgetragen und die Intensitätswerte in Abhängigkeit zum Zyklus aufgetragen. Anhand der Graphik kann erkannt werden, ob die detektierten Punkte im Anstiegsbereich der PCR oder der Sättigungsphase zu lokalisieren sind. Durch die Punkte des linearen Anstiegs wird eine Ausgleichsgerade gelegt. Etwa in der Mitte des linearen Anstiegs wird ein Abszissen-Wert abhängig vom Zyklus auf der Ausgleichsgeraden abgelesen. Die Ausgleichsgerade ermöglicht eine Korrektur von Pipettierfehlern oder Fehlern bei der Auswertung mit Hilfe von NIH-Image und ist deshalb sehr vorteilhaft. Die eigentliche Extrapolation erfolgt mit dem Steigungskoeffizienten von 1.8 und dem bestimmten Punktepaar rein mathematisch mit der Gleichung für natürliches Wachstum. Diese modifizierte kinetische PCR Methode ist keine reine kinetische PCR, sondern auch eine serielle Verdünnungs-PCR. Die Vorteile der Auswertung der Methode nach Becker et al. (1996) können weiterhin genutzt werden und führen allein hierdurch schon zu genaueren Ergebnissen (Dissertation, Andreas Becker; Diplomarbeit, Annette Reith). Die erhaltenen Daten bei der modifizierten Methode sind reine Intensitätswerte, die durch mathematische Korrektur (Länge der PCR-Fragmente im Verhältnis zur Gesamtlänge der mtDNA) zueinander ins Verhältnis gesetzt werden, so daß lediglich relative Werte berechnet werden. Die Möglichkeit, tatsächliche Mengen an Wildtyp-mtDNA und *common deletion* mtDNA zu bestimmen, ist durch die Verwendung eines Mengenstandards ebenfalls gegeben. Die neue Methode ist allerdings zum Reihenansatz von vielen Patientenproben weniger gut als die kombinierte Methode geeignet, da in jeder PCR-

Reihe maximal vier Patienten quantitiert werden können. Dennoch ist sie den herkömmlichen radioaktiven Methoden aufgrund ihres günstigen Preises und der geringen Gefahr in jedem Fall vorzuziehen. Die unkomplizierte Handhabung des Probenansatzes und der Zyklentitration ist wesentlich zeitsparender als der Ansatz bei der Methode von Becker et al. (1996).

## 6.4 Quantitierungsunterschiede am Beispiel einiger Probanden

Um den Einfluß des Reinheitsgrades der verwendeten DNA deutlich zu machen, wurden die Ergebnisse verschiedener Quantifizierungen der *common deletion* in Figur 22 aufgetragen. Anhand der fünf Probanden wurde anschaulich, daß in drei von vier Fällen (Bild A,B,C) die Tendenz der Quantifizierung für die Probanden ähnlich blieb. In einem Fall dagegen wichen die tendenziellen Werte vollkommen von den übrigen ab (Bild D). Die verwendete DNA hat insbesondere bei der Methode von Andreas Becker einen großen Einfluß auf die Prozentgehalte der deletierten mtDNA. Die Vergleichs-DNA zur Effizienzbestimmung muß den annähernd gleichen Steigungskoeffizienten aufzeigen, wie die zu detektierende mtDNA der Probanden. Im Bild B der Figur 32 wurde eine Quantifizierung mit dieser Grundlage durchgeführt. Erst durch das Verwenden des Plasmides pCII, wie in Bild C ersichtlich, schlich sich ein Fehler von einer Zehnerpotenz gegenüber Bild B ein. Die hohe Effizienz der Plasmid-DNA führt aber bei der Extrapolation zu viel zu niedrigen Werten der mutierten mtDNA-Menge, so daß im Verhältnis zu der Wildtyp-mtDNA ein zu kleiner Prozentgehalt bestimmt wird. Würde zur Wildtyp-Bestimmung ebenfalls ein Plasmid verwendet, so wäre der Fehler zwar in den Absolutwerten noch vorhanden, müßte bei den Prozentwerten jedoch mathematisch aufgehoben sein.

Ein fast unerklärbares Phänomen trat in Bild D auf. In der Diplomarbeit von Sandra Leist sollte als Vergleichs-DNA des Wildtyps isolierte mtDNA aus Placenta (Isolation nach Peter Seibel, Dissertation) verwendet werden. Dadurch ergaben sich Prozentgehalte, die drei Zehnerpotenzen niedriger waren, als die in Bild B ermittelten. Die Effizienzdiagramme der Wildtypbestimmung von Sandra Leist ergaben Steigungskoeffizienten der Placenta-mtDNA bis zu 2.3. Da bei der PCR maximal die vorliegende DNA verdoppelt werden kann, sind die Werte unrealistisch. Eine Erklärung dafür könnte die Fragmentierung der mtDNA bei der Isolation aus dem mitochondrienarmen Gewebe der Placenta sein, die durch die Scherkräfte

beim Isolieren und Reinigen auftreten. Die photometrisch bestimmte mtDNA-Menge war dadurch größer, als die tatsächliche. Die höheren Verdünnungen der Vergleichs-DNA ergaben bei der Zyklentitration keine auswertbaren Meßpunkte aufgrund der absinkenden Plateauphase. Die aus der Zyklentitration der seriellen Verdünnung erhaltenen Daten, wurden zur Effizienzermittlung verwendet. Es konnte durch die kleine Anzahl von Meßpunkten nur eine ungenaue Bestimmung der Effizienz durch das Effizienzdiagramm vollzogen werden. Vermutlich wurden durch diese Aneinanderreihung von negativen Einflüssen die Prozentgehalte falsch berechnet.

Um diesen Einflüssen der Reinheit der DNA aus dem Wege zu gehen, wurde die neue modifizierte Methode (Kapitel 5.3) entwickelt. Der Steigungskoeffizient der PCR wurde dabei vernachlässigt und als durchschnittlich 1.8 angenommen. Die Proben wurden im direkten Vergleich der deletierten mtDNA und der Wildtyp-mtDNA quantitiert. Die Ergebnisse der fünf Probanden in Bild A lagen, vergleichbar wie die des Bildes B, zwischen 0.5 und 4.0%  $\Delta$ mtDNA/mtDNA.

## 6.5 Quantitierung von Probanden-DNA

### 6.5.1 Quantitierung der *common deletion* bei 87 Probanden

Im Gegensatz zu Patienten mit mitochondrialen Myopathien tritt die *common deletion* beim Altern des Menschen nur in geringen Prozentgehalten auf (Kadenbach et al., 1995). Die Bestimmung der Prozentgehalte der *common deletion* bei 87 Probanden wurde zum einen mit der kombinierten Methode nach Becker et al. (1996) zum anderen mit der modifizierten Methode (Kapitel 5.3) durchgeführt. Der hierbei erwartete Unterschied von einer Zehnerpotenz wurde bei den detektierbaren Proben ebenfalls beobachtet. Lezza et al. (1994) beobachteten eine exponentielle Zunahme der 5 kb mtDNA-Deletion in humanem Skelettmuskel im Alter von 40 bis 80 Jahren mit einer großen individuellen Schwankung der Prozentgehalte. Diese Schwankung wurde ebenfalls bei beiden Methoden gefunden. Die *common deletion*, unabhängig von ihrer Determinationsweise, zeigt eindeutig eine altersbezogene Akkumulation. In Figur 23 wurde in der Einzelauftragung ein Patient nicht mit in die Berechnung des exponentiellen Wachstums miteinbezogen. Der 22-jährige Proband ist

möglicherweise im Anfangsstadium einer Erkrankung oder auch nur fehlerhaft bestimmt worden. Um dem Vorwurf der Selektierung von optimalen Werten entgegenzuwirken, wurde der lineare Ausgleich der Durchschnittswerte für die festgelegten Altersgruppen mit der Gesamtzahl der Probanden ausgeführt. Die Altersabhängigkeit bleibt unbeeinflusst. Die Auftragung nach der modifizierten Zyklentitrations-Methode zeigte eine erheblich größere Streuung der Prozentgehalte und eine höhere Anzahl detektierbarer Proben (Figur 24). Bei der neuen Methode war die Häufigkeit der Probanden mit detektierbaren Werten in niedrigeren Jahren schon sehr hoch. Auch hier wurden Einzeldaten von Patienten nicht zur Berechnung des exponentiellen Wachstums mit einbezogen. Die Gründe dafür waren dieselben wie auch im vorangegangenen Fall. Wie auch bei der kombinierten Methode hatten die Patienten mit auffallend hohen Prozentgehalten keinen wesentlichen Einfluß auf die Verminderung des altersbezogenen Anstiegs der *common deletion*. Wie aus der Verteilung der Werte entnommen werden kann, stellt die neuere modifizierte Methode möglicherweise eine genauere Auswertungsart der mutierten mtDNA dar.

### **6.5.2 Statistische Untersuchung zur Verteilung der *common deletion* im Skelettmuskel**

Im Gegensatz zu der Ansicht, daß multiple Mutationen der mtDNA in ein und derselben Zelle während der Alterung auftreten (Papa, 1996; Ozawa, 1995; Shoffner und Wallace, 1995), steht die Aussage, daß atmungsdefekte Zellen hauptsächlich von einzelnen Mutationen (oder Neuarrangements) der mtDNA herrühren. Die folgende Verbreitung der Mitochondrien mit mutierter mtDNA kommt durch die verzögerte Phagozytose und Degradation durch Lysosomen zustande (de Grey, 1997, 1998). Das Auftreten von nur einer Art mutierter mtDNA in einzelnen Zellen oder Fasern wurde von Müller-Höcker et al. (1993) durch in situ Hybridisierung gezeigt. Die statistische Verteilung der *common deletion* in humanem Skelettmuskel eines 55-jährigen gesunden Probanden wurde in Figur 25 gezeigt. In dieser Untersuchung wurde der Skelettmuskel in Teilstücke von 20-50 mg geteilt und der Prozentgehalt der *common deletion* in jedem Stück mit der modifizierten kinetischen PCR-Methode (5.3) determiniert. Die Figur zeigt anschaulich die großen Unterschiede von 0.0001 bis 0.062% der Deletion in Teilen dieser Gewebeprobe. Die statistische Verteilung der *common deletion* stimmt mit dem statistischen Auftreten von Cytochrom c Oxidase-defekten

Muskelfasern in gealterten Skelettmuskeln, histochemisch nachgewiesen durch Müller-Höcker (1990), überein. Ebenso kann durch diese Verteilung erklärt werden, daß verschiedene Arbeitsgruppen eine hohe Varianz der Prozentgehalte nachgewiesen haben. Chen et al. (1995) und Marin-Garcia et al. (1996) fanden eine Menge von 0.005% der  $\Delta$ mtDNA in der mtDNA, während Ozawa (1995) und Wallace et al. (1995) bis zu 7% bzw. 10% ermittelten.

### 6.5.3 Quantitierung von verschiedenen Punktmutationen bei 87 Probanden

Die altersabhängige Zunahme der *common deletion* ist, wie auch die anderer Deletionen (Melov et al., 1995), bekannt und allseits anerkannt. Dagegen wird die Akkumulation von Punktmutationen im Alter kontrovers diskutiert. Eine einzelne Punktmutation, an der Nukleotidposition 3243 wird von verschiedenen Laboratorien mit unterschiedlichem Verhalten beschrieben. Im Skelettmuskel und anderen Geweben wurde sie altersabhängig gefunden (Münscher et al., 1993; Zhang et al., 1993; Kadenbach et al., 1995; Liu et al., 1997). Im Gegensatz dazu wurde von Palotti et al. (1996) das sporadische Auftreten der Mutation im Skelettmuskel ohne Altersabhängigkeit entdeckt. Um diesen Streitpunkt für diese und einige andere Punktmutationen zu klären, wurden die Punktmutationen MELAS 3243, 3271, 3291 und MERRF 8344 mit Hilfe der allelspezifischen quantitativen kinetischen PCR und der Auswertetechnik nach Becker et al. (1996) untersucht. Die allelspezifische PCR wird dann verwendet, wenn DNA-Moleküle mit Punktmutationen vor dem Hintergrund von einer erheblichen Anzahl normaler Moleküle detektiert werden sollen. Zunächst wurden die optimalen Annealingtemperaturen für die allelspezifischen Primer ermittelt. Die folgenden Quantifizierungen mit der modifizierten kinetischen PCR-Methode (5.3) wurden mit den jeweiligen optimalen Annealingtemperaturen und der entsprechenden *touch down* PCR durchgeführt. Für die Punktmutation MELAS 3243, die wie die anderen Punktmutationen auch eine Mutation in einem tRNA-Gen ist, konnte eine eindeutige altersbezogene Zunahme der Mutation bestimmt werden. Da die Auftragung in Figur 35 bereits im Alter von 25 Jahren einige Probanden mit detektierbaren Ergebnissen zeigt und die Anzahl der Probanden mit auswertbaren Ergebnissen weiterhin ansteigt, ist die Altersabhängigkeit schon optisch erkennbar. Leider sind in der Altersgruppe 70 bis 90 Jahre nur wenige DNA-Proben vorhanden, so daß die altersgebundene Verteilung hier gestört wird. Dessen ungeachtet bleibt

die Akkumulation der Punktmutation erhalten. Die Prozentgehalte bewegten sich zwischen 0.0001 und 1.61%.

Eine weitere Punktmutation der MELAS-Reihe ist die T→C Transition am Nukleotid 3271. Sie tritt nur bei 7 bis 15% der MELAS-Patienten auf (Tarnopolsky et al., 1998) und ist weniger bekannt als die zuvor beschriebene MELAS-Mutation. Die Prozentgehalte der mutierten mtDNA stiegen bereits vor dem zwanzigsten Lebensjahr für einen Probanden an und erreichten ihr Maximum zwischen 50 und 65 Jahren. Wie auch bei der Mutation an nt3243 gab es wenige höhere Einzelprozentgehalte in der Altersgruppe über 70 Jahre. Der Maximalwert der detektierten Prozentanteile mutierter mtDNA an mtDNA betrug 0.36%. Gleichermäßen zeigt diese MELAS-Mutation einen altersabhängigen Anstieg.

Die dritte Mutation der MELAS-Erkrankung ist die an nt3291. Es handelt sich um eine T→C Transition. Sie tritt seltener auf als die bekannte MELAS 3243-Mutation. Auffällig bei dieser Quantifizierung waren die hohen Prozentanteile der Mutation von bis zu 2.9% bei einigen Probanden. Dies steht im Gegensatz zu dem seltenen Auftreten der MELAS 3291-Mutation im Zusammenhang mit der Erkrankung. Die Verteilung von höheren Prozentgehalten der mutierten mtDNA beginnt im Alter von 30 Jahren und bleibt bis zum Maximalalter ziemlich unbeeinflusst. Trotzdem ist eine sehr schwache altersabhängige Akkumulation erkennbar.

Die letzte bestimmte Mutation ist die MERRF 8344 Mutation (A→G). Sie wurde durch Münscher et al. (1993) mit der Methode der PCR/RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) mit *mispairing* Primern an Augenmuskeln durchgeführt. Hierbei wird der *mispairing* Primer durch sehr niedrige Annealingtemperaturen bewußt bei der Wildtyp- und mutierten mtDNA in die Amplifikate eingeführt und bildet dort bei vorliegender Mutation eine Schnittstelle. Der anschließende vollständige Restriktionsverdau kann zur quantitativen Erfassung der Mutationsmenge dienen. Diese Methode wird in der Regel nur bei sehr großen Mengen mutierter DNA angewendet, da sich die Restriktionsfragmente der PCR-Amplifikate bei sehr kleinen Mengen nur schwer quantifizieren lassen. Münscher fand im Augenmuskel von 11 von 14 gesunden gealterten Menschen die Mutation an nt8344 bis zu einem Prozentgehalt von maximal 2.4%.

Bei der in dieser Arbeit durchgeführten Quantifizierung an der Skelettmuskulatur von 87 Probanden, wurde ein Maximalwert von 0.92% gefunden und nur wenige Patienten zeigten überhaupt ein detektierbares Amplifikat. Die Streuung der Daten beginnt schon im Alter unter 20 Jahren und steigt etwas im Alter an. Die Altersabhängigkeit der Zunahme der Mutation ist schwach vorhanden und könnte durch einige wenige ältere Probanden mit nicht detektierbaren Amplifikaten vollständig aufgehoben werden.

Die altersabhängige Akkumulation der MELAS 3243 Mutation wurde in Autopsieproben von 18 normal gealterten Probanden im Skelettmuskel nachgewiesen (Zhang et al., 1998). Dagegen ergaben Untersuchungen derselben Arbeitsgruppe an Hautproben von 44 chinesischen Probanden ohne mitochondriale Erkrankung im Alter zwischen 19 und 87 Jahren keine altersbezogene Vermehrung der Mutation (Liu et al., 1998). Palotti et al. (1996) haben in einer Studie mit 13 normalen Individuen im Alter von 1 bis 70 Jahren keine Zunahme der Mutation mit dem Alter feststellen können. Die Gesamtzahl der Proben ist allerdings auch viel zu gering und läßt bei der individuellen Schwankung jede Möglichkeit offen. Dennoch wurden bei Palotti et al. (1996) höhere Werte für die Punktmutation MELAS 3243 als für die Punktmutation an nt8991 im ATPase 6 Gen gefunden. Nicht nur die höheren Prozentgehalte, sondern auch die hohe Anzahl verschiedener pathogener Mutationen im tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>-Gen (Morales et al., 1993; Bindoff et al., 1993) läßt vermuten, daß es sich bei diesem Gen um ein *hotspot* für Mutationen handelt.

Der Unterschied zwischen der Quantifizierung der MERRF 8344-Mutation von Christoph Münscher und der Quantifizierung in dieser Arbeit, könnte zum einen auf die unterschiedlichen Determinations-Methoden, aber auch auf das verschiedenen Gewebe zurückzuführen sein. Das Gewebe des Augenmuskels ist, aufgrund des hohen Energiebedarfs, möglicherweise besonders anfällig für Mutationen.

## 6.6 Vorkommen der Mutationen

Auffallend in Tabelle 9 war, daß die Patienten mit mehr als drei der fünf determinierten Mutationen erst ab dem Alter von 40 Jahren auftreten. Das Alter wird auch bei Zhang et al. (1998) als Schwellenalter für das Auftreten verschiedener Mutationen gesehen. Die Anzahl der Patienten mit vielen Mutationen steigt mit zunehmendem Alter rapide an. Dies korreliert mit der Hypothese, daß das Altern auf die Summe von verschiedenen Veränderungen der mtDNA in kleineren Mengen zurückzuführen ist.

Die *common deletion* ist eine sehr häufige Mutation und konnte bei den vorliegenden Probanden zu 66% nachgewiesen werden. Die MELAS 3243-Mutation hatte ein Vorkommen oberhalb der Auswertegrenze von 57%, die MELAS 3271-Mutation eines von 49%, die MELAS 3291-Mutation kommt zu 38% vor und das geringste Vorkommen verzeichnet die MERRF 8344-Mutation mit 13%. Die Deletion der 4977 bp scheint offenbar ein vielfach

aufretender Fehler der Replikation der mtDNA zu sein, da die fehlerhafte Ablesung durch die flankierenden *direct repeat* Sequenzen begünstigt wird. Die drei angegebenen MELAS-Mutationen treten, wie auch bei der Erkrankung, während des Alterungsprozesses im publizierten Bekanntheitsgrad auf. Die Mutation mit dem geringsten Vorkommen war die MERRF-Mutation.

## 7 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden, an einer großen Zahl von gesunden Probanden unterschiedlichen Alters, Untersuchungen der mitochondrialen DNA (mtDNA) auf eine Deletion und vier Punktmutationen durchgeführt.

Um die Quantitierung mit der nichtradioaktiven seriellen Verdünnungs- und kinetischen PCR-Methode ausführen zu können, war die Herstellung von Plasmiden mit mutierten Inserts als Vergleichs-DNA zur Effizienzbestimmung nötig.

Das mutierte PCR-Fragment mit der MELAS 3243-Punktmutation mit Hilfe der PCR und einem mutierten Primer hergestellt und dann in den Vektor als Insert kloniert.

Die Plasmid-DNA des Plasmides pCII (Insert mit den flankierenden Regionen der *common deletion* der humanen mtDNA) verursachte bei der Quantitierung der Deletion eine Verringerung der Prozentgehalte um eine Zehnerpotenz als bei der Quantitierung mit Probanden-Vergleichs-DNA. Der Vergleich der Effizienzen von Probanden-DNA und Plasmid-DNA führte zu dem Ergebnis der falschen Extrapolationen der PCR-Amplifikate und somit zu den zu kleinen Prozentanteilen der *common deletion*. In Versuchen mit Stör-DNA (Probanden-Gesamt-DNA) wurde das optimale Verhältnis der hochreinen Plasmid-DNA zu Stör-DNA ermittelt, um die Effizienz der PCR der Vergleichs-DNA der des zu quantifizierenden Probanden, anzugleichen.

Eine neue Art der PCR-Quantifizierung, wurde durch Modifikation der kinetischen PCR unter Anwendung der Auswertetechnik der Methode von Andreas Becker erreicht. Die neue Methode beruht auf der Verwendung von zwei verschiedenen Verdünnungen der Probanden-DNA. Die Wildtyp-Bestimmung wurde mit einer Verdünnung von 10 ng Gesamt-DNA/100 µL PCR-Lösung und die Deletions-Bestimmung mit 100 ng Gesamt-DNA/100 µL PCR-Lösung nach dem Prinzip der Zyklentitration ausgeführt. Die Finesse hierbei war, daß die Zyklentitration mit detektierbaren PCR-Fragmenten annähernd im gleichen Zyklbereich lagen.

Mit dieser neuen Methode wurden zunächst alle 87 Patienten-DNA-Proben auf die *common deletion* untersucht und mit den Ergebnissen der Quantifizierung nach der kombinierten Methode nach Becker et al. (1996) verglichen.

Statistische Untersuchungen mit der neuen Methode am Skelettmuskel eines 55-jährigen Probanden ergaben, daß die *common deletion* bei sehr kleinen Schnitten (20-50 mg) desselben Gewebestücks große Unterschiede im Prozentgehalt zeigten. Die Verteilung der betroffenen

Zellen in einem Gewebe war, wie durch in situ Hybridisierung von Müller-Höcker et al. (1993) gezeigt, nicht homogen.

Vier Punktmutationen, drei der mitochondrialen Myopathie MELAS (an nt3243, nt3271, nt3291) und eine der Erkrankung MERRF (an nt8344), wurden quantitiert und auf ihre altersabhängige Akkumulation untersucht. Für sämtliche Veränderungen, die in dieser Arbeit untersucht wurden, Punktmutationen sowie die Deletion, konnte eine altersabhängige Zunahme des Prozentgehaltes der mutierten mtDNA dokumentiert werden. Dies legt den Schluß nahe, daß das Altern durch eine Akkumulation verschiedener Mutationen in der mtDNA mit verursacht wird.

## 8 Literatur

Bailey, P.J. and Webster, G.C. (1984),

Lowered rates of protein synthesis by mitochondria isolated from organisms of increasing age,

*Mech. Ageing Dev.* **24**, 233 - 241.

Bindoff, L.A., Howell, N., Poulton, J., McCollough, D.A., Morten, K.J., Lightowlers, R.N., Turnbull, D.M. and Weber, K. (1993).

*J. Biol. Chem.* **268**, 19559-19564.

Boffoli, D., Scacco, S.C., Vergari, R., Solarino, G., Santarocce, G. and Papa, S. (1994),

Decline with age of the respiratory chain activity in human skeletal muscle,

*Biochim. Biophys. Acta* **1226**, 73 - 82.

Boffoli, D., Scacco, S.C., Vergari, R., Persio, M.T., Solarino, G., Laforgia, R. and Papa, S. (1996),

Ageing is associated in females with a decline in the content and activity of the b-c<sub>1</sub> complex in skeletal muscle mitochondria,

*Biochim. Biophys. Acta* **1315**, 66 - 72.

Boveris, A., Oshino, N. and Chance, B. (1972),

The cellular production of hydrogen peroxide,

*Biochem. J.* **128**, 617 - 630.

Boveris, A. and Chance, B. (1973),

The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen,

*Biochem. J.* **34**, 707 - 716.

Boveris, A., Cadenas, E. and Stoppani, A.O.M. (1976),

Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide,

*Biochem. J.* **156**, 435 - 444.

Breen, A.P. and Murphy, J.A. (1995),  
Reactions of oxyl radicals with DNA,  
*Free Radical Biol. Med.* **18**, 1033 - 1077.

Burch, H.B., Lowry, O.H., Kuhlman, A.M., Skerjance, J., Diamant, E.J., Lowry, S.R. and von  
Dippe, P. (1963),  
Changes in patterns of enzymes of carbohydrate metabolism in the developing rat liver,  
*J. Biol. Chem.* **238**, 2267 - 2273.

Byrne, E., Dennett, X. and Trounce, I. (1991),  
Oxidation energy failure in post - mitotic cells: a major factor in senescence,  
*Rev. Neurol.* **147**, 532 - 535.

Cardellach, F., Galofre, J., Cusso, R. and Urbano - Marquez, A. (1989),  
Decline in skeletal muscle mitochondrial respiration chain function with ageing,  
*Lancet* **I**, 44 - 45.

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

Chen, X., Prosser, R., Simonetti, S., et al. (1995)  
Rearranged mitochondrial genomes are present in human oocytes.  
*Am. J. Hum. Genet.*, **57**, 239-247.

Clark, J.M., Pattabiraman, N., Jarvis, W. and Beardsley, G.P. (1987),  
Modeling and molecular mechanical studies of the *cis*-thymine glycol radiation damage lesion  
in DNA,  
*Biochemistry* **26**, 5404 - 5409.

Clayton, D.A., Doda, J.N. and Friedberg, E.C. (1974),  
The absence of a pyrimidine dimer repair mechanism in mammalian mitochondria,  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 2777 - 2781.

---

Clayton, D.A. (1982),

Replication of mitochondrial DNA,

*Cell* **28**, 693 - 705.

Cooper, J.M., Mann, V.M. and Schapira, A.V.H. (1992),

Analyses of mitochondrial respiratory chain function and mitochondrial DNA deletion in human skeletal muscle: Effect of ageing,

*J. Neurol. Sci.* **113**, 91 - 98.

Corral-Debrinski, M., Stepien, G., Shoffner, J.M., Kanter, K. and Wallace, D.C. (1991)

*J. Am. Med. Assoc.* **266**, 1812-1816

Corral - Debrinski, M., Horton, T., Lott., M.T., Shoffner, J.N., Beal, M.F. and Wallace, D.C. (1992),

Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age,

*Nat. Genet.* **2**, 324 - 329.

Cortopassi, G.A., Shibata, D., Soong, N.-W. and Arnheim, N. (1992),

A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues,

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 7370 - 7374.

Davies, C.T., Thomas, D.O. and White, M. J. (1986),

Mechanical properties of young and elderly human muscle,

*Acta Med. Scand. Suppl.* **711**, 219 - 226.

Davies, K.J., Doroshov, J.H. and Hochstein, P. (1983),

Mitochondrial NADH dehydrogenase - catalysed oxygen radical production by adriamycin and the relative inactivity of 5-iminodaunorubicin,

*FEBS lett.* **153**, 227 - 230.

- Davies, K.J. and Doroshov, J.H. (1986),  
Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. I. Anthracycline radical formation  
by NADH dehydrogenase.  
*J. Biol. Chem.* **261**, 3060 - 3067.
- De Grey, A.D. (1997),  
A proposed refinement of the mitochondrial free radical theory of aging,  
*Bioessays* **19**, 161 - 166.
- De Gritz, B.G. and Rahko, T. (1995), Diet - induced residual formation in pigs, *Gerontology*  
**41 Suppl 2**, 305 - 317.
- Demple, B. and Harrison, L. (1994),  
Repair of oxidative damage to DNA: Enzymology and biology,  
*Annu. Rev. Biochem.* **63**, 915 - 948.
- Domena, J.D. and Mosbaugh, D.W. (1985),  
Purification of nuclear and mitochondrial uracil-DNA glycosylase from rat liver;  
identification of two distinct subcellular forms,  
*Biochemistry* **24**, 7320 - 7328.
- Evans, W.J. (1995),  
What is sarcopenia?,  
*J. Gerontol.* **50**, 5 - 8.
- Fleming, J.E., Miquel, J, Cottrell, S. F., Yengoyan, L.S. and Economos, A.C. (1982),  
Is cell aging caused by respiration - dependent injury to the mitochondrial genome?,  
*Gerontology* **28**, 44 - 53.
- Fridovich, I. (1978),  
The biology of oxygen radicals,  
*Science* **201**, 875 - 880.

- Friedberg, E.C., Walker, G.C. and Siede, W. (1995),  
*DNA Repair and Mutagenesis* (Am. Soc. Microbiol., Washington, DC).
- Fries, J.F. (1980),  
Aging, natural death, and the compression of morbidity,  
*N. Engl. J. Med.* **303**, 130 - 135.
- Fukanaga, M. and Yielding, K.L. (1979),  
Fate during cell growth of yeast mitochondrial and nuclear DNA after photolytic attachment  
of the monozide analog of ethidium,  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **90**, 582 - 586.  
*Nature (London)* **348**, 651-653.
- Goto, Y., Nonaka, I. and Horai, S. (1990).  
A mutation in the tRNA-Leu(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of  
mitochondrial encephalomyopathies.  
*Nature (London)* **348**, 651-653.
- Goto, Y., Nonaka, I. and Horai, S. (1991).  
A new mutation associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and  
stroke - like episodic (MELAS).  
*Biochim, Biophys. Acta* **1097**, 238-240.
- Goto, Y., Horai, S., Matsuoka, T., Koga, Y., Nihei, K., Kobayashi, M, und Nonaka, I. (1992).  
Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS):  
a correlative study of the clinical features and mitochondrial DNA mutation.  
*Neurology* , Vol. **42**, 545-550.
- Goto, Y., Tojo, M., Tohyama, J., Horai, S. and Nonaka, I. (1992).  
A novel point mutation in the mitochondrial tRNA-Leu(UUR) gene in a family with  
mitochondrial myopathy.  
*Ann. Neurol.* **31**,672-675.

Goto, Y., Tsugano, K., Tanake, Y., Nonaka, I. and Horai, S. (1994).

A new point mutation at nucleotide pair 3291 of the mitochondrial tRNA-Leu(UUR) gene in a patient with mitochondrial myopathy, encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like symptoms (MELAS).

*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202:3**, 1624-1630.

Guerrieri, F., Capozza, G., Kalous, M., Zanotti, F., Drahota, Z. and Papa, S. (1992),  
*Arch. Gerontol. Geriatr.* **14**, 299 - 308.

Guerrieri, F., Capozza, G., Fratello, A., Zanotti, F. and Papa, S. (1993),  
Functional and molecular changes in F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP - synthase of cardiac muscle during aging,  
*Cardioscience* **4**, 93 - 98.

Harman, D. (1956),

Ageing: Theory based on free radical and radiation chemistry,  
*J. Gerontol.* **11**, 298 - 300.

Harman, D. (1972),

The biological clock: the mitochondria?,  
*J. Am. Geriatr. Soc.* **20**, 145 - 147.

Harman, D. (1991),

The aging process: major risk factor for disease and death,  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 5360 - 5363.

Hayakawa, M., Hattori, K., Sugiama, S. and Ozawa, T. (1992)

*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189**, 979-985

Holt, I.J., Harding, A.E. and Morgan - Hughes, J.A. (1988),

Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies,  
*Nature* **331**, 717 - 719.

Hommes, F.A. (1975) in Normal and pathological development of energy metabolism,  
Academic Press, London, 1 - 9.

- Hsieh, R.H., Hou, J.H. and Wei, Y.H. (1994),  
Age - dependent respiratory function decline and DNA deletions in human muscle mitochondria,  
*Biochem. Mol. Biol. Int.* **32**, 1009 - 1022.
- Hurley, B.F. (1995),  
Age, gender, and muscular strength,  
*J. Gerontol.* **50**, 41 - 44.
- Janssen, Y.M., Van Houten, B., Borm, P.J. and Mossman, B.T. (1993),  
Cell and tissue responses to oxidative damage,  
*Lab. Invest.* **69**, 261 - 274.
- Johns, D.R., Rutledge, S.L., Stine, O.C and Hurko, O. (1989),  
Directly repeated sequences associated with pathogenic mitochondrial DNA deletions,  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 8059 - 8062.
- Kadenbach, B. und Müller-Höcker, J.. (1990).  
Mutations of mitochondrial DNA and human death,  
*Naturwissenschaften* , **77**, 221-225
- Kadenbach, B., Münscher, C., Frank, V., Müller-Höcker, J. and Napiwotzki, J. (1995),  
Human aging is associated with stochastic somatic mutations of mitochondrial DNA,  
*Mutat. Res.* **338**, 161 - 172.
- Klimek, J., Schaap, A.P. and Kimura, T. (1983),  
The relationship between NADPH - dependent lipid peroxidation and degradation of cytochrome P-450 in adrenal cortex mitochondria,  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **110**, 559 - 566.
- Kunkel, T.A. and Loeb, L.A. (1981),  
Fidelity of mammalian DNA polymerases,  
*Science* **213**, 765 - 768.

- Lauber, J., Marsac, C. Kadenbach, B. and Seibel, P. (1991),  
Mutations in mitochondrial tRNA genes: a frequent cause of neuromuscular disease,  
*Nucl. Acids Res.* **19**, 1393 - 1397.
- Lefai, E., Terrier - Cayre, A., Vincent, A., Boespflug - Tanguay, O., Tanguay, A. and Alziari, S. (1995),  
*Biochim. Biophys. Acta* **1228**, 43 - 50.
- Lefai, E., Vincent, A., Boespflug - Tanguay, O., Tanguay, A. and Alziari, S. (1997),  
Quantitative decrease of human cytochrome c oxidase during development. Evidence for post - transcriptional regulation,  
*Biochim. Biophys. Acta* **1318**, 191 - 201.
- Linnane, A.W., Marzuki, S., Ozawa, T. , und Tanaka, M. (1989).  
Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases.  
*Lancet* , Vol. **1**, Seite: 642-645
- Liu, V.W.S., Zhang, C., Linnane, A.W., Nagley, P. (1997)  
Quantitative allele-specific PCR: demonstration of age-associated accumulation in human tissues of the A→G mutation at nucleotide 3243 in mitochondrial DNA.  
*Hum. Mutat.*, **9**, 265-271.
- Liu, V.W.S., Zhang, C., Pang, C.Y., Lee, H.C., Lu, C.Y., Wei, Y.H. and Nagley, P. (1998)  
Independent occurrence of somatic mutations in mitochondrial DNA of human skin from subjects of various ages.  
*Hum. Mutat.*, **11**, 191-196.
- Marcillat, O., Zhang, Y. and Davies, K.J.A. (1989),  
Oxidative and non - oxidative mechanisms in the inactivation of cardiac mitochondrial electron transport chain components by doxorubicin,  
*Biochem. J.* **259**, 181 - 189.

Marin-Garcia, J., Goldenthal, M.J., Ananthakrishnan, R., Pierpont, M.E.M., Fricker, F.J., Lipshultz, S.E., Perez-Atayde, A. (1996),  
Specific mitochondrial DNA deletions in idiopathic dilated cardiomyopathy,  
*Cardio. Res.* **31**, 306 - 313.

Marcus, D.L., Ibrahim, N.G. and Freedman, M.L. (1982),  
Age - related decline in the biosynthesis of mitochondrial inner membrane proteins,  
*Exp. Gerontol.* **17**, 333 - 341.

Melov, S., Shoffner, J.M. Kaufman, A. and Wallace, D.C. (1995),  
Marked increase in the number and variety of mitochondrial DNA rearrangements in aging  
human skeletal muscle,  
*Nucleic Acids Res.* **23**, 4122 - 4126.

Melov, S., Hinerfeld, D., Esposito, L. and Wallace, D.C. (1997),  
Multi-organ characterization of mitochondrial genomic rearrangements in ad libitum and  
caloric restricted mice show striking somatic mitochondrial DNA rearrangements with age,  
*Nucl. Acids Res.* **25**, 974 - 982.

Menzies, R.A. and Gold, P.H. (1971),  
The turnover of mitochondria in a variety of tissues of young adult and aged rats,  
*J. Biol. Chem.* **246**, 2425 - 2429.

Merriwether, D.A., Clark, A.G., Bellinger, S.W., Scheer, T.G., Soodyall, H., Jenkins, T.,  
Sherey, S.T. and Wallace, D.C. (1991),  
The structure of human mitochondrial DNA variation,  
*J. Mol. Evol.* **33**, 543 - 555.

Moraes, C.T., DiMauro, S. and Zeviani, M. (1989),  
Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre  
syndrome,  
*New Engl. J. Med.* **320**, 1293 - 1299.

Moraes, C.T., Ciacci, F., Bunilla, E., Jansen, C., Hirano, M., Rao, N., Lovelace, R.E., Rowland, L.P., Schon, E.A. and Imauro, S. (1993)

Two novel pathogenic mitochondrial DNA mutations affecting organelle number and protein synthesis. Is the tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> gene an etiologic hot spot ?

*J. Clin. Invest.* **92**, 2906-2915.

Morten, K.J., Cooper, J.M., Brown, G.K., Lake, B.D., Pike, D. and Poulton, J. (1993)

A new point mutation associated with mitochondrial encephalomyopathy.

*Hum. Mol. Genet.*, **2**, 2081-2087.

Müller - Höcker, J. (1989),

Cytochrome c oxidase deficient cardiomyocytes in the human heart. An age - related phenomenon,

*Am. J. Pathol.* **134**, 1167 - 1171.

Müller - Höcker, J. (1990),

Cytochrome c oxidase deficient fibres in the limb muscle and diaphragm of man without muscular disease: An age related alteration,

*J. Neurol. Sci.* **100**, 14 - 21.

Müller - Höcker (1992),

Mitochondria and ageing,

*Brain Pathol.* **2**, 149 - 158.

Müller - Höcker, J., Schneiderbanger, K., Stefani, F.H. and Kadenbach, B. (1992),

Progressive loss of cytochrome c oxidase in the human extraocular muscles in ageing a cytochemical - immunohistochemical study,

*Mutat. Res.* **275**, 115 - 124.

Müller - Höcker, J., Seibel, P., Schneiderbanger, K., Zietz, C., Obermaier-Kusser, B., Gerbitz, K.-D. and Kadenbach, B. (1992b),

In situ hybridization of mitochondrial DNA in the heart of a patient with Kearns-Sayre Syndrome and dilatative cardiomyopathy,

*Hum. Pathol.* **23**, 1431 - 1437.

- Müller - Höcker, J., Aust, D., Napiwotzki, J., Münscher, C., Link, T.A., Seibel, P., Schneeweiss, S.G. and Kadenbach, B. (1996),  
Defects of the respiratory chain in oxyphil and chief cells of the normal parathyroid and in hyperfunction,  
*Hum. Pathol.* **27**, 532 - 541.
- Munim, A., Asayama, K., Dobashi, K., Suzuki, K., Kawaoi, A. and Kato, K. (1992),  
Immunohistochemical localization of superoxide dismutases in fetal and neonatal rat tissues,  
*J. Histochem. Cytochem.* **40**, 1705 - 1713.
- Münscher, C., Müller - Höcker, J. and Kadenbach, B. (1993),  
Human aging is associated with various point mutations in tRNA genes of mitochondrial DNA.  
*Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **374**, 1099 - 1104.
- Narabayashi, H., Takeshige, K. and Minakami, S. (1982),  
Alteration of inner - membrane components and damage to electron - transfer activities of bovine heart submitochondrial particles induced by NADPH - dependent lipid peroxidation,  
*Biochem. J.* **202**, 97 - 105.
- Nelson, I., Degoul, F., Obermaier-Kusser, B., Romero, N., Borrone, C., Marsac, C, Vayssiere, J.-L., Gerbitz, K.-D., Fardeau, M., Ponsot, G. and Lestienne, P. (1989),  
Mapping of heteroplasmic mitochondrial deletions in Kearns-Sayre syndrome,  
*Nucl. Acids Res.* **17**, 8117 - 8124.
- Nohl, H., Breuninger, V. and Hegner, D. (1978),  
Influence of mitochondrial radical formation on energy - linked respiration,  
*Eur. J. Biochem.* **90**, 385 - 390.
- Ozawa, T., Tanaka, M., Ikebe, S., Ohno, K., Kondo, T., and Mizuno, Y., (1990)  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **172**, 483-489

Ozawa, T., Tanaka, M., Sugiyama, S., Ino, H., Ohno, K., Hattori, K., Ohbayashi, T., Ito, T., Deguchi, H., Kawamura, K., Nakane, Y. and Hashiba, K. (1991).

Patients with idiopathic cardiomyopathy belong to the same mitochondrial DNA gene family of Parkinson's disease and mitochondrial encephalomyopathy.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **177**, 518-525.

Ozawa, T. (1995) in *Biochemistry of Cell Membranes* (Papa, S. and Tager, J.M., eds), 339 - 361, Birkhäuser, Basel.

Ozawa, T. (1995)

Mechanisms of somatic mitochondrial DNA mutations associated with age and diseases.

*Biochim. Biophys. Acta*, **1271**, 177-189

Pallotti, F., Chen, X., Bonilla, E., Schon, E.A. (1996)

Evidence that specific mtDNA point mutations may not accumulate in skeletal muscle during normal human aging

*Am. J. Hum. Genet.*, **59**, 591-602.

Papa, S. (1996)

Mitochondria oxidative phosphorylation changes in the life span. Molecular aspects and physiological implications.

*Biochim. Biophys. Acta*, **1276**, 87-105

Pettepher, C.C., Ledoux, S.P., Bohr, V.A: and Wilson, G.L. (1991),

Repair of alkali - labile sites within the mitochondrial DNA of RINr 38 cells after exposure to the nitrosourea streptozotocin,

*J. Biol. Chem.* **266**, 3113 - 3117.

Pinz, K.G., Shibutani, S. and Bogenhagen, D.F. (1995),

Action of mitochondrial DNA polymerase  $\gamma$  at sites of base loss or oxidative damage,

*J. Biol. Chem.* **279**, 9202 - 9206.

- Poggi, P., Marchetti, C. and Scelsi, R. (1987),  
Automatic morphometric analysis of skeletal muscle fibers in the aging man,  
*Anat. Rec.* **217**, 30 - 34.
- Pollak, J.K. (1975),  
The maturation of the inner membrane of foetal rat liver mitochondria,  
*Biochem. J.* **150**, 477 - 488.
- Richter, C., Park, J.-W. and Ames, B.N. (1988),  
Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive,  
*Proc. Natl Acad. Sci. USA* **85**, 6465 - 6467.
- Richter, C. (1992),  
Reactive oxygen and DNA damage in mitochondria,  
*Mutat. Res.* **275**, 249 - 255.
- Rossmannith, W., Karwan, R.M. (1998),  
Impairment of tRNA processing by point mutations in mitochondrial tRNA-Leu(UUR)  
associated with mitochondrial diseases,  
*FEBS Letters* **433**, 269-274
- Rouach, H., Clement, M., Orfanelli, M.T., Janvier, B., Nordmann, J. and Nordmann, R.  
(1983),  
Hepatic lipid peroxidation and mitochondrial susceptibility to peroxidative attacks during  
ethanol inhalation and withdrawal,  
*Biochim. Biophys. Acta* **753**, 439 - 444.
- Sastre, J., Federico, V.P., Pla, R., Pellin, A., Juan, G., O'Connor, J.E., Estrela, J.M., Miquel,  
J. and Vina, J. (1996),  
Aging of the liver: Age - associated mitochondrial damage in intact hepatocytes,  
*Hepatology* **24**, 1199 - 1205.

Schon, E.A., Rizzuto, R., Moreas, C.T., Nakase, H., Zeviani, M. and DiMauro, S. (1989),  
A direct repeat is a hotspot for large - scale deletion of human mitochondrial DNA,  
*Science* **244**, 346 - 349.

Schon, E.A., Hirano, M. and DiMauro, S. (1994),  
Mitochondrial encephalomyopathies: clinical and molecular analysis,  
*J. Bioenerg. Biomembr.*, **26**, 291 - 299.

Seibel P., Mell, O., Hannemann, A., Müller-Höcker, J. and Kadenbach, B. (1991)  
A method for quantitative analysis of deleted mitochondrial DNA by PCR in small tissue  
samples.  
*Meth. Mol. Cell. Biol.*, **2**, 147-153.

Shigenaga, M.K., Hagen, T.M. and Ames, B.N. (1994),  
Oxidative damage and mitochondrial decay in aging,  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10771 - 10778.

Shoffner, J.M., Lott, M.T., Voljavec, A.S., Soueidan, S.A., Costigan, D.A. and Wallace, D.C.  
(1989),  
Spontaneous Kearns - Sayre / chronic external ophthalmoplegia plus syndrome associated with  
a mitochondrial DNA deletion: a slip replication model and metabolic therapy,  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 7952 - 7956.

Shoffner, J.M. and Wallace, D.C. (1995)  
Oxidative phosphorylation diseases.  
In Scicer, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (eds) *The metabolic and molecular bases  
of inherited disease*, 7<sup>th</sup> ed. New York, McGraw-Hill, pp 1535-1610.

Silvestri, G., Santorelli, F.M., Shanske, S., Witley, C.B., Schemmenti, L.A., Smith, S.A. and  
DiMauro, S. (1993)  
A new mtDNA mutation in the tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> gene associated with maternally inherited  
cardiomyopathy.  
*Hum. Mutat.* **3**, 37-43.

- Simonetti, S., Chen, X., DiMauro, S. and Schon, E.A. (1992),  
Accumulation of deletions in human mitochondrial DNA during normal aging: analysis by  
quantitative PCR,  
*Biochim. Biophys. Acta* **1180**, 113 - 122.
- Sugiama, S., Hattori, K., Hayakawa, M. and Ozawa, T. (1991)  
*Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **180**, 894-899.
- Sweeney, M.G., Bunday, S., Brockington, M., Paulton, J.R., Weiner, J.B. and Harding, A.E.  
(1993)  
Mitochondrial myopathy associated with sudden death in young adults and a novel mutation  
in the mtDNA lucine transfer RNA<sup>(UUR)</sup> gene.  
*Q.J.Med.*, **86**, 709-713.
- Syrový, I. and Gutmann, E. (1977),  
Changes in speed of concentration and ATPase activity in striated muscle during old age,  
*Exp. Gerontol.* **12**, 31 - 35.
- Tarnopolsky, M.A., Maguire, J., Myint, T., Applegarth, D. and Robinson, B.H. (1998)  
Clinical, physiological and histological features in a kindred with the T3271C MELAS  
mutation  
*Muscle & Nerve*, **21(1)**, 25-33.
- Teoule, R., Bert, C. and Bonicel, A. (1977),  
Thymine fragment damage retained in the DNA polynucleotide chain after gamma irradiation  
in aerated solutions. II.,  
*Radiat. Res.* **72**, 190 - 200.
- Tomkinson, A.E., Bonk, R.T. and Linn, S. (1988),  
Mitochondrial endonuclease activities specific for apurinic / apyrimidinic sites in DNA from  
mouse cells,  
*J. Biol. Chem.* **263**, 12532 - 12537.

- Tomkinson, A.E., Bonk, R.T., Kim, J., Bartfeld and Linn, S. (1990),  
Mammalian mitochondrial endonuclease activities specific for ultraviolet - irradiated DNA,  
*Nucl. Acids Res.* **18**, 929 - 935.
- Trounce, I., Byrne, E. and Marzuki, S. (1989),  
Decline in skeletal muscle mitochondrial respiratory chain function: possible factor in ageing,  
*Lancet* **I**, 637 - 639.
- van den Ouweland, J.M., Lemkes, H.H.P., Ruitenbeek, W., Sandkjuji, L.A., de Vijlder, M.F.,  
Struyvenberg, P.A., van de Kamp, J.J.P. and Maassen, J.A. (1992)  
Mutation and mitochondrial tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> gene in a large pedigree with maternally  
transmitted type II diabetes mellitus and deafness.  
*Nature Genet.* **1**, 368-371.
- Wallace, D.C. (1992),  
Diseases of the mitochondrial DNA,  
*Annu. Rev. Biochem.* **61**, 1175 - 1212.
- Wallace, D.C. (1992b),  
Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases?,  
*Science* **256**, 628 - 632.
- Wallace, D.C. Shoffner, J.M., Trounce, I., Brown, M.D., Ballinger, S.W., Corral - Debrinski,  
M., Horton, T., Jun. A.S. and Lott, M.T. (1995),  
Mitochondrial DNA mutations in human degenerative diseases and aging,  
*Biochim. Biophys. Acta* **1271**, 141 - 151.
- Wang, E., Wong, A. and Cortopassi, G. (1997),  
The rate of mitochondrial mutagenesis is faster in mice than in humans.
- Wei, Y.H. (1992),  
Mitochondrial DNA alterations as ageing-associated molecular events.  
*Mutat. Res.* **275**, 145 - 155.

Williams, A.J., Wernette, C.M. and Kaguni, L.S. (1993),  
Processivity of mitochondrial DNA polymerase from  
*Drosophila* embryos, *J. Biol. Chem.* **268**, 24855 - 24862.

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

Yamada, K., Sugiyama, S., Kosaka, K., Hayakawa, M. and Ozawa, T. (1995),  
Early appearance of age - associated deterioration in mitochondrial function of diaphragm and  
heart in rats treated with doxorubicin,  
*Exp. Gerontol.* **30**, 581 - 593.

Yen, T.-C., Chen, Y.-S., King, K.-L., Yeh, S.-H. and Wei, Y.-H. (1989),  
Liver mitochondrial respiratory functions decline with age.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **165**, 994 - 1003.

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

Zhang, Y., Marcillat, O., Giulivi, C., Ernster, L. and Davies, K.J. (1990),  
The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase,  
*J. Biol. Chem.* **265**, 16330 - 16336.

Zhang, C., Baumer, A. and Maxwell, R.J (1992)  
Multiple mitochondrial DNA deletions in an elderly human individual,  
*FEBS Lett.* **297**, 34 - 38.

Zhang, C., Linnane, A.W., Nagley, P. (1993)

Occurrence of a particular base substitution (3243 A to G) in mitochondrial DNA of tissues of ageing humans.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **195**, 1104-1110.

Zhang, C., Liu, V.W.S., Addressi, C.L., Sheffield, D.A., Linnane, A.W. and Nagley, P. (1998)

Differential Occurrence of mutations in mitochondrial DNA of human skeletal muscle during aging

*Hum. Mutat.*, **11**, 360-371.

## 9 Publikationsliste

Becker, A., Reith, A., Napiwotzki, J., Kadenbach, B.

A quantitative method of determining initial amounts of DNA by polymerase chain reaction cycle titration using digital imaging and a novel DNA stain

*Anal. Biochem.* 1996; **237**(2); 204-207

Kim, S.H., Chi, J.G., Reith, A., Kadenbach, B.

Quantitative analysis of mitochondrial DNA deletion in paraffin embedded muscle tissues from patients with KSS and CPEO

*Biochim. Biophys. Acta* 1997; **1360**(3); 193-195

Müller-Höcker, J., Aust, D., Rohrbach, H., Napiwotzki, J., Reith, A., Link, T.A., Seibel, P., Holz, D., Kadenbach, B.

Defects of respiratory chain in normal human liver and in cirrhosis during aging

*Hepatology* 1997; **26**(3); 709-719

Gadaleta, M.N., Kadenbach, B., Lezza, A.M.S., Reith, A., Catatore, P., Boffoli, D., Papa, S., (1998)

Age linked changes in the genotype and phenotype of mitochondria

Frontiers of Cellular Bioenergetics : Molecular Biology, Biochemistry and Physiopathology (S. Papa, F. Guerrieri, J.M. Tager, eds.)

*Plenum Publishing Corporation,*

Napiwotzki, J., Reith, A., Becker, A., Leist, S., Kadenbach, B.

Quantitative analysis of mutations of mitochondrial DNA during human aging

In „Understanding the Process of Aging“ (L. Packer and E. Cadenas, eds.)  
1999(Jan); **13**; 251-264

Kadenbach, B., Bender, E., Reith, A., Becker, A., Lee, I., Arnold, S., Hammerschmidt, S., Hüttemann, M.

Possible influence of metabolic activity on aging  
submitted

Reith, A., Kadenbach B.

Problems in quantitation of mitochondrial DNA  
*in preperation*

## 10 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Ac.	Acetat
ATP	Adenosintriphosphat
ADP	Adenosindiphosphat
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
COX	Cytochrom c Oxidase
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
E	Extinktion
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EK	Epithelkörperchen
FADH <sub>2</sub>	Flavinadenindinucleotid
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure)
Lsg	Lösung
h	Stunde
M	molar
min	Minute
MOPS	(3-[N-Morpholino]-propan-sulfonsäure
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid
nm	Nanometer
nt	Nukleotid(e)
p.a.	pro analysi
PCR	Polymerase Chain Reaction
PS-PCR	Punktmutationsspezifische PCR
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoff-Spezies (reactive oxygen species)
rpm	Umdrehungen pro Minute

RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Standard Saline Citrat
SsDNA	einzelsträngige DNA
U	Einheit der Enzymaktivität (Unit)
UV	Ultraviolettes Licht
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
V	Volt

## 11 Anhang

### 11.1 Humane Gewebeproben

#### 11.1.1 Biopsieproben

Probenname	Reinheits- quotient $E_{260\text{korr}}/E_{280\text{korr}}$	DNA-Gesamt- menge [ $\mu\text{g/ml}$ ]
88.02	2.02	166
88.05	2.09	426
88.06	1.64	154
88.12	2.08	102
88.13	2.11	1299
88.14	2.11	899
89.01	2.7	197
89.07	2.3	515
89.08	2.3	622
89.09	2.38	370
90.01	2.26	597
90.02	2.6	256
90.03	2.94	139
90.05	2.24	824
90.08	1.76	18
90.10	2.03	151
90.11	1.96	138
90.12	2.12	288
90.13	1.86	602
90.14	2.11	771
91.02	2.18	1046
91.03	2.21	152
91.04	2.2	445
91.06	1.97	111
91.07	2.16	773
91.08	2.20	127

91.09	2.20	640
91.10	2.10	560
91.11	2.20	319
92.01	2.20	314
92.04	2.10	681
92.05	2.07	122
92.06	2.39	399
92.08	2.35	381
92.09	2.07	305
93.05	1.94	130
93.07	1.81	162
93.09	2.15	165
93.10	2.11	313
93.11	2.38	504
93.12	2.10	125
93.14	2.17	318
93.15	2.16	546
93.16	2.16	317
93.17	2.20	748
93.18	2.11	615
93.19	2.19	274
93.20	2.22	148
93.23	2.21	250
93.24	2.02	225
93.25	2.13	155
93.26	2.16	211
93.27	2.03	647
93.28	2.10	176
93.29	2.10	457
93.30	2.11	348
93.33	2.16	443
93.34	2.20	221.4
94.02	2.23	874
94.04	2.39	228
94.05	2.21	702
94.06	2.10	462
94.07	2.04	335
94.08	2.55	97
94.09	2.29	171

94.10	2.10	210
94.11	2.03	200
94.13	2.22	573
94.14	2.40	287
94.15	2.32	117
94.16	2.01	238
94.18	2.31	121
94.19	2.27	107
94.20	2.21	620
94.31	2.04	336
94.35	1.92	100
94.45	2.08	724
94.46	2.25	115

*Tabelle 11: Probenname, Reinheitsquotient und photometrisch ermittelte DNA-Gesamtmenge der nach der Methode von Wallace isolierten DNA aus Biopsieproben.*

### 11.1.2 Autopsieproben

Probenname	Reinheits- quotient $E_{260\text{korr}}/E_{280\text{korr}}$	DNA-Gesamtmenge [ $\mu\text{g/ml}$ ]
91.N	1.99	1496
91.O	2.10	447
92.F	2.10	629
92.H	2.10	597
92.I	2.10	616
92.K	2.15	539
93.L	2.20	189
93.M	2.15	688
93.P	2.02	1178
93.Q	2.07	2388
93.RA	2.10	301
94.RB	2.07	364
94.RD	2.06	199

Tabelle 12: Probenname, Reinheitsquotient und photometrisch ermittelte DNA-Gesamtmenge der nach der Methode von Wallace isolierten DNA aus Autopsieproben.

## 11.2 Plasmidkarte des Plasmides pCII

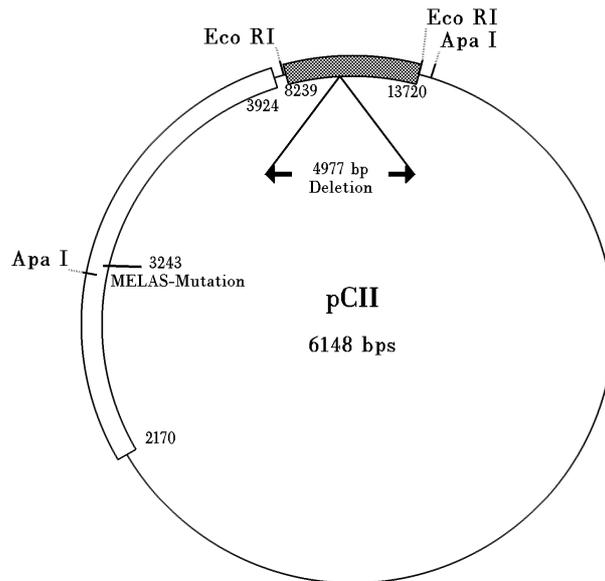


Fig. 41: Plasmidkarte des Plasmides pCII. Die Resistenzgene für Ampicillin und Kanamycin konnten nicht eingezeichnet werden, da deren Positionen im Plasmid anhand der Literatur nicht festzustellen waren.

## 12 Danksagung

Herrn Prof. Dr. B. Kadenbach danke ich für die interessante Themenstellung, seine Diskussionsbereitschaft und für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hans-Dieter Mennel für die Bereitstellung der Muskelbiopsien und Herrn Dr. Andreas Becker für die Bereitstellung der Autopsieproben.

Bei Dr. Andreas Becker und Dr. Jörg Napiwotzki bedanke ich mich für die freundliche Bereitstellung ihres Programmes „primerdesign“.

Bei Jörg Napiwotzki bedanke ich mich für die Durchsicht meines Manuskriptes.

Elisabeth Bender und Sandra Leist danke ich für das gute Klima und die vielen erfreulichen Gespräche im Labor. Den anderen Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich für die stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Ein besonderer Dank gilt Frau Miriam Findt, die durch ihre Hilfsbereitschaft und technische Assistenz meine Arbeit unterstützte und privat stets eine gute Freundin war.

Meinen Eltern danke ich für ihre liebevolle und finanzielle Unterstützung während meines Studiums.

Ich bedanke mich bei meinem Ehegatten Oliver für seine moralische Unterstützung in schwierigen Zeiten.

Bei meiner Tochter Theresa bedanke ich mich für ihr Verständnis, ihre unerschütterliche Liebe und Geduld sowie ihre Ausdauer beim Spitzenstecken.