

Aus dem Zentrum für Humangenetik
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. K.-H. Grzeschik

**Entwicklung einer Methode zur nicht-
radioaktiven DNA-Quantifizierung mittels PCR und
deren mathematische Behandlung durch eine
neue Plot-Auswertung am Beispiel der
mitochondrialen DNA**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
gesamten Medizin dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-
Universität Marburg

vorgelegt von
Andreas Becker
aus Saarbrücken
Marburg 1999

Angenommen vom Fachbereich Medizin der
Philipps-Universität Marburg am: 2.12.99

Gedruckt mit Genehmigung der Fachbereichs:

Dekan: Prof. Dr. Kern

Referent: Prof. Dr. Koch

Korreferent: PD. Dr.Scheuermann

Präambel

Die vorliegende Arbeit wurde von Dezember 1992 bis Juni 1996 unter Leitung von Herrn Prof. Dr. B. Kadenbach, Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg, und unter Betreuung von Frau Prof. Dr. M. Koch, Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg, angefertigt.

Für Rita, Simone und Alessandra

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	ÜBERSICHT	1
1.2	MOLEKULARBIOLOGIE DES MITOCHONDRIUMS	1
1.2.1	Die Atmungskette und die oxidative Phosphorylierung	2
1.2.2	Das mitochondriale Genom	3
1.2.3	Vererbung, Segregation und Schwellenwert	4
1.2.4	Replikation und Transkription der mitochondrialen DNA	5
1.3	MITOCHONDRIALE ENZEPHALOMYOPATHIEN	6
1.3.1	Kearns-Sayre-Syndrom und Ophthalmoplegia plus (syn.: KSS, CPEO)	8
1.3.2	Mitochondrial Myopathy, Encephalopathy, Lactat Acidosis and Stroke-Like Episodes (MELAS-Syndrom)	11
1.3.3	Myoclonus Epilepsy associated with Ragged Red Fibers (MERRF-Syndrom)	13
1.3.4	Veränderungen des Mitochondriums und der mitochondrialen DNA während des Alterns	13
1.4	QUANTITATIVE PCR:	18
1.4.1	Grundlagen	18
1.4.2	Aufbau der PCR-Quantifizierung	19
1.4.3	PCR-Methoden zur Quantifizierung	21
1.4.4	Die Messwertbestimmung von PCR-Produkten (Quantifizierung)	24
2	ZIELSETZUNG	26
3	MATERIAL	27
3.1	ENZYME	27
3.2	RESTRIKTIONSENZYME	27
3.3	KITS	27
3.4	MEMBRANEN UND SPEZIELLE PAPIERE	27
3.5	DNA-LÄNGENMARKER	28
3.6	VEKTOREN UND BAKTERIENSTÄMME	28
3.7	REAGENZIEN ZUM ANSETZEN VON LÖSUNGEN	28
3.8	DNA-PRÄPARATIONSPUFFER	29
3.9	PCR-PUFFER UND -STAMMLÖSUNGEN	30
3.10	RESTRIKTIONSPUFFER	30
3.11	GELE, AUFTRAGSPUFFER UND FÄRBEREAGENZIEN	31
3.12	OLIGONUKLEOTIDE FÜR DIE PCR	32
3.13	NÄHRMEDIEN UND KLONIERUNGSREAGENZIEN	32

3.14	SOUTHERN BLOT UND HYBRIDISIERUNG	33
3.15	VERBRAUCHSMATERIALIEN UND GERÄTE	34
4	METHODEN	35
4.1	ISOLIERUNG UND AUFREINIGUNG VON DNA	35
4.1.1	Isolierung von mtDNA aus Geweben nach Wallace.....	35
4.1.2	Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli mit dem Qiagen Plasmid Mini Kit.....	36
4.1.3	Präparation von PCR-Produkten aus PCR-Ansätzen mit dem QIAquick-spin PCR Purification Kit	36
4.1.4	Präparation von PCR-Produkten aus Agarosegelen mit der Jetsorb-Methode	37
4.1.5	Aufreinigung und Fällung von DNA aus Lösungen.....	37
4.2	AUFTRENNUNG DER DNA DURCH AGAROSEGELELEKTROPHORESE	38
4.3	POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR).....	38
4.3.1	Amplifikation durch PCR.....	39
4.3.2	Primer-Shift-PCR.....	39
4.3.3	Allelspezifische PCR oder Punktmutationsspezifische PCR (PSPCR)	40
4.4	MODIFIZIERUNG DER DNA DURCH ENZYME.....	40
4.4.1	Restriktionsendonukleasespaltung.....	40
4.5	KLONIERUNG.....	41
4.5.1	Verwendete Vektoren und Bakterien-Stämme.....	41
4.5.2	Anlegen der Bakterienkulturen.....	41
4.5.3	Herstellung von transformationskompetenten E. coli Zellen mit der Calciumchlorid-Methode	42
4.5.4	Transformation von E. coli mit pBluescript	42
4.5.5	Herstellen der LB-Selektiv-Agarplatten mit Ampicillin, IPGT und X-Gal zur Blau- Weiß-Selektion.....	42
4.6	SOUTHERN BLOT.....	43
4.6.1	Markierung und Hybridisierung der DNA mit dem ECL-Kit.....	43
4.7	QUANTIFIZIERUNG VON DNA IN 1D-GELEN DURCH DAS PROGRAMM NIH IMAGE MIT DEN GEL PLOTTING MACROS.....	44
5	ERGEBNISSE	47
5.1	VIDEOKAMERA.....	47
5.1.1	Dynamik.....	48
5.1.2	Linearität	50
5.1.3	Aufnahmetechnik der Gele mit einer CCD-Kamera	51
5.1.4	UV-Farbfilter.....	56
5.2	QUANTIFIZIERUNG MIT NIH IMAGE	56
5.2.1	Hintergrund-Substraktion.....	57
5.2.2	OD versus Transmission.....	57

5.2.3	Programmierfehler in den verwendeten Makros von NIH Image	62
5.3	GEL, ANFÄRBUNG UND MARKER	65
5.3.1	Der neue Farbstoff SYBR Green I	65
5.3.2	Auftragsmenge der DNA und des Farbstoffes	67
5.3.3	Gelsysteme	67
5.3.4	Auftragsmarker	68
5.3.5	Nachweisgrenze von DNA durch Anfärbung mit Ethidiumbromid und SYBR Green I	70
5.3.6	Hintergrund konzentrierter Gelbanden	73
5.3.7	Gel und Markerbanden	73
5.3.8	Genauigkeit der Messung	74
5.3.9	Vergleich von DNA mass ladder und pBluescript-Vektor als DNA-Standard	75
5.3.10	Praktisches Vorgehen	77
5.4	STANDARDISIERUNG DER PCR	78
5.4.1	Primer	79
5.4.2	DNA-Quantitierung von Biopsiematerial	80
5.4.3	Fragmentlänge	81
5.4.4	Grenzen der einzusetzenden Menge an Vent Polymerase	82
5.4.5	Gesamtmenge an eingesetzter DNA	84
5.4.6	Annealingtemperatur	85
5.5	QUALITATIVE UND QUANTITATIVE AUSWERTUNG VON PROBANDEN-DNA	87
5.5.1	Quantitative Auswertung durch kinetische PCR	87
5.5.2	Überprüfung der kinetischen PCR durch Southern Blot	88
5.5.3	Eine neue Plotmethode und eine semiquantitative Abschätzung von DNA-Mengen	91
5.5.4	Quantitierung durch die neue Plotmethode	93
5.5.5	Wiederholte Quantitierungen zur Bestimmung der Genauigkeit und Richtigkeit der neuen Plotmethode	98
5.5.6	Typische Fehlerquellen bei falsch abgeschätzter Zyklenzahl	100
5.6	MATHEMATISCHER HINTERGRUND DER METHODE	102
5.6.1	Allgemeine mathematische Betrachtungen zur quantitativen PCR	102
5.6.2	Algebraische Herleitung der neuen Plotmethode	107
6	DISKUSSION	110
6.1	QUANTIFIZIERUNG VON PCR-PRODUKTEN DURCH FÄRBUNG MIT DEM FLUORESCENZFARBSTOFF SYBR GREEN I UND DEM PROGRAMM NIH IMAGE	110
6.2	QUANTITIERUNG VON DNA DURCH EINEN NEUE PLOTMETHODE	120
6.2.1	Der mathematische Hintergrund der neuen Plotmethode	122
6.3	PERSPEKTIVEN DER NEUEN PLOTMETHODE	125
6.3.1	Neue Möglichkeiten der Quantitierung durch die neue Plotmethode	126
6.3.2	Allgemeine kinetische Beschreibung der PCR durch die neue Plotmethode	127

7 ZUSAMMENFASSUNG	129
8 LITERATURVERZEICHNIS	130
9 ANHANG	149
9.1 BEGRIFFSBESTIMMUNGEN.....	149
9.2 GLOSSAR WICHTIGER BEGRIFFE.....	149
9.3 ABKÜRZUNGEN.....	150
<i>9.3.1 Nukleotide</i>	<i>152</i>
9.4 <i>SOURCE CODE</i> DER VERÄNDERTEN <i>GEL PLOTTING MACROS</i>	152
9.5 VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER	157
9.6 DANKSAGUNGEN	158

1 Einleitung

1.1 Übersicht

In den letzten Jahren stieg das durchschnittliche Lebensalter der Bevölkerung in den Industrieländern stark an. In den medizinischen Fächern wurde der Begriff der Gerontologie eingeführt, ein Fach das in der Klinik einen immer breiteren Raum gewinnt. Auch das wissenschaftliche Interesse an dem Phänomen des Alterns hat sich verstärkt. In fast allen biomedizinischen Gebieten wird daran geforscht und es wurden bereits interessante Ansätze, um das Phänomen des Alterns zu erklären, aufgestellt. Einzelne Theorien zu favorisieren wäre unangebracht, angesichts der Komplexität des Themas. Ein Ansatzpunkt der Altersforschung sind Veränderungen des mitochondrialen Genoms, dem Ort der Energiegewinnung in der Zelle.

Mit der Entwicklung der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden ganz neue Erkenntnisse auf dem jungen Gebiet der Molekularbiologie ermöglicht. Die prinzipiell überraschend einfache Methode ermöglicht heutzutage viele Untersuchungen, die vor Jahren nicht denkbar gewesen wären. In der Literatur findet sich eine fast inflationäre Zuwachsrate an neuen PCR-Methoden. Das einfache Prinzip wird in verschiedensten Weisen abgewandelt und bietet eine Vielzahl von neuen Möglichkeiten. Hier steckt jedoch auch das Problem, kleine Änderungen in der Methode führen zu erheblichen Änderungen im Resultat. Dies ist ein systemimmanentes Problem der PCR. Auch dies ist Thema der vorliegenden Dissertation.

1.2 Molekularbiologie des Mitochondriums

Die hochdifferenzierten Zellen des menschlichen Körpers enthalten verschiedene Zellorganellen, die sich hinsichtlich ihrer Morphologie und Funktion deutlich unterscheiden. Die Zellorganellen stellen morphologisch unterschiedliche Kompartimente dar, die spezifische Zellfunktionen und Stoffwechselwege beinhalten. Die in ihnen enthaltenen Enzyme werden fast ausschließlich von nukleärer DNA

kodiert. Die einzige Ausnahme dazu stellt das Mitochondrium dar. Es besitzt eine eigenständige DNA, welche einige Untereinheiten von Mitochondrienenzymen kodiert. Das Mitochondrium ist eine ovale, seltener kugelige Zellorganelle mit einem Durchmesser von etwa 0,5 - 1 μm und einer Länge von 5 - 10 μm . Form und Größe sowie die Anzahl der Mitochondrien pro Zelle ist stark gewebespezifisch und abhängig von der Funktion der Zelle. Zu den Hauptaufgaben des Mitochondriums zählt die Energiegewinnung durch Oxidation, wobei zugleich Vorstufen für die Biosynthese von z.B. Phospholipiden, Aminosäuren und Porphyrinen anfallen. Die freiwerdende Energie wird vor allem zur Bildung von Adenosintriphosphat (ATP) verwendet und der gesamten Zelle zur Weiterverwertung zur Verfügung gestellt. Die Anzahl von Mitochondrien ist in Zellen mit hohem Energiebedarf wesentlich höher als in anderen Zellen. Sowohl Muskel- als auch Leberzellen enthalten die höchste Anzahl von Mitochondrien pro Zelle.

Zu den spezifischen Stoffwechselwegen der Mitochondrien zählen unter anderem die β -Oxidation der Fettsäuren, der Citrat-Zyklus und die oxidative Phosphorylierung.

Elektronenmikroskopisch betrachtet, sieht man, daß das Mitochondrium aus einer Doppelmembran besteht. Die innere Mitochondrienmembran weist viele kammähnliche (Cristae) bzw. röhrenförmige (Tubuli) Einfaltungen auf. Eine besondere Rolle spielt der Intermembranraum zwischen Innen- und Außenmembran des Mitochondriums. Er stellt ein eigenes Kompartiment dar, welches mit den intercrystalen bzw. intertubulären Räumen kommuniziert. Das innere Matrixkompartiment enthält den Citrat-Zyklus, die Enzyme der β -Oxidation und Teile des Harnstoff-Zyklus. Die Mitochondrien eigene DNA (mtDNA) befindet sich ebenfalls in der Matrix.

1.2.1 Die Atmungskette und die oxidative Phosphorylierung

Durch den Citrat-Zyklus werden Abbauprodukte von Zuckern, Aminosäuren und Fetten zu CO_2 und Redox-Äquivalenten abgebaut, die auf NADH und FADH_2 übertragen werden. Die Redox-Äquivalente enthalten jeweils ein Elektronenpaar mit hohem Redox-Potential, das zur Gewinnung von ATP auf molekularen Sauerstoff übertragen wird. Dieser metabolische Pfad wird oxidative Phosphorylierung genannt. In der inneren Mitochondrienmembran befinden sich fünf Enzymkomplexe, welche die oxidative Phosphorylierung durchführen:

- Komplex 1: NADH-Dehydrogenase
- Komplex 2: Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase
- Komplex 3: Ubichinon-Cytochrom c-Oxidoreduktase
- Komplex 4: Cytochrom c Oxidase
- Komplex 5: ATP-Synthase

Die Atmungskettenkomplexe I, III und IV bauen einen Protonengradienten über der Innenmembran auf, der im Komplex V die Phosphorylierung von ADP zu ATP vorantreibt.

1.2.2 Das mitochondriale Genom

Das Mitochondrium ist neben dem Nukleus die einzige Zellorganelle, welche DNA enthält. Es besitzt eine 16.569 Basenpaare (bp) lange DNA. Dieses Mitochondrien-Genom ist ein ringförmig geschlossenes, doppelsträngiges und superhelikales DNA-Molekül. Zur DNA-Replikation und zur Protein-Biosynthese besitzt das Mitochondrium eine Reihe eigener RNAs und Enzyme.

Die Mitochondrien-DNA (mtDNA) besitzt weitere interessante Merkmale, welche sie deutlich von der nukleären DNA (nDNA) unterscheidet:

1. mtDNA zeigt keine nachweisbare Methylierung.
2. Fast das gesamte mitochondriale Genom besteht aus kodierenden Sequenzen.
3. Die beiden DNA-Stränge unterscheiden sich deutlich aufgrund ihres unterschiedlichen Purin- bzw. Pyrimidin-Gehaltes in der molekularen Dichte. Sie lassen sich durch Dichtezentrifugation in einen H-Strang (*heavy*) und einen L-Strang (*light*) trennen.
4. Beide Stränge enthalten Sequenzen für die von ihnen kodierten Proteine und tRNAs. Es gibt keinen *antisense*-Strang im strengen Sinne.
5. Als weiterer Unterschied zu den Aminosäure-Codons des Nukleus, der (fast) universell ist, gibt es noch Unterschiede in der Kodierung einiger Aminosäuren.
6. In einigen Fällen, z. B. für die tRNA Leucin und die tRNA Glycin überlappen sich die Enden des einen mit dem Anfang des nächsten Gens. Die individuellen Stop-Signale für die Translation fehlen in diesen Bereichen oft, sie entstehen erst sekundär durch eine Polyadenylierung der mRNAs bzw.

durch die üblichen 3'-Enden CCA bei den tRNAs. Die mRNA-Abschnitte werden von tRNA-Abschnitten unterbrochen. Man vermutet, daß spezifische Ribonukleasen, die möglicherweise der RNase T von *E. coli* ähneln, diese gefalteten Abschnitte der tRNAs erkennen und schneiden können. Hierdurch entstehen sowohl die tRNAs als auch die rRNAs bzw. mRNAs. Manche Transkripte werden offensichtlich innerhalb der ersten zweihundert Nukleotide gespalten. Diese können wahrscheinlich als Primer für die DNA-Replikation dienen. Ein Spleißen ist nicht erforderlich, es gibt keine Introns innerhalb der Sequenzen.

7. Es gibt nur 22 tRNAs im Mitochondrium.
8. Die mtDNA ist nicht mit Histonen verbunden.

Anderson et al. sequenzierten 1981 das gesamte mitochondriale Genom des Menschen. Alle Angaben über Mutation und Nukleotide in dieser Arbeit beziehen sich auf die von Anderson et al. veröffentlichte Sequenz.

Das mitochondriale Genom kodiert nur für 13 Proteine, die ausnahmslos Untereinheiten der an der oxidativen Phosphorylierung beteiligten Enzymkomplexe darstellen (7 Untereinheiten (UE) von Komplex I, 1 UE von Komplex III, 3 UE von Komplex IV und 2 UE von Komplex V, die alle Protonenpumpen darstellen). Kein Atmungskettenenzym wird rein mitochondrial kodiert. Eine Kontrolle der mitochondrialen Gene auf nukleärer Ebene ist daher zu vermuten.

1.2.3 Vererbung, Segregation und Schwellenwert

Auch im Vererbungsmodus unterscheidet sich das mitochondriale Genom deutlich von dem nukleären. Das mitochondriale Genom wird praktisch nur maternal vererbt und besitzt im Gegensatz zum nukleären Genom keine Allele im engeren Sinne. In den mehreren tausend Mitochondrien pro Zelle befinden sich im Durchschnitt fünf mtDNA-Kopien pro Mitochondrium. Während der Befruchtung werden nur maternale Mitochondrien aus der Eizelle, jedoch keine paternalen aus den Spermien, weitergegeben (maternalen Vererbungsmodus). Ihre Verteilung innerhalb der Zelle selbst ist zufällig. Bei der weiteren Zellteilung werden diese DNA-Moleküle wiederum zufällig auf die Gewebe verteilt. In der Eizelle vorhandene Mutationen können in diesem Fall in unterschiedlicher Anzahl auf die sich entwickelnden Gewebe übertragen

werden. Diese zufällige Gewebsverteilung nennt man Segregation. Man kennt diesen Vorgang in geringerem Ausmaß auch bei der Mendel'schen Genetik. Die maternale Vererbung stellt jedoch einen charakteristischen Pathomechanismus der mitochondrialen Genetik dar. Verschiedene Gewebe können von der gleichen Mutation verschieden betroffen sein.

Innerhalb der Zelle findet vorwiegend postmitotisch eine Verschiebung der Mitochondrien-DNA durch Teilung und Abbau der Mitochondrien statt. Auch hier gibt es interessante Phänomene, z. B. dass der Anteil an pathogenetisch bedeutsamen Mutationen sich im Laufe des Lebens vermehren kann. Der Vorgang der Vermehrung an mutierter DNA findet sich bei den mitochondrialen Myopathien *Pearson's marrow pancreas syndrome* und dem Kearns-Sayre-Syndrom (s. u.).

Da pro Mitochondrium ca. 5 mtDNA-Kopien existieren, lassen sich viele Stoffwechselforgänge noch aufrechterhalten, solange nicht alle mtDNA-Kopien durch eine Mutation geschädigt sind. Erst oberhalb eines Schwellenwertes treten die genetischen Mutationen durch biochemische und morphologische Veränderungen auch phänotypisch in Erscheinung. Der Schwellenwert ist für verschiedene Mutationen unterschiedlich hoch, liegt aber im Allgemeinen (bis auf Ausnahmen) zwischen 70% und 95% mutierter mtDNA pro Gesamt-mtDNA.

1.2.4 Replikation und Transkription der mitochondrialen DNA

Fast die gesamte mitochondriale DNA stellt bis auf eine kurze Basensequenz, den sog. *displacement loop* (D-Loop), Protein-kodierende DNA dar. Im sog. *displacement loop* finden sich die Promotoren für die Transkription und Replikation des H-Stranges. Die Replikation beginnt am *origin of replication* des H-Stranges (O_H), bis die DNA-Synthese den *origin of replication* des L-Stranges (O_L) erreicht. Von hier aus findet in umgekehrter Richtung die Replikation des L-Stranges statt, während die Replikation des H-Stranges gleichzeitig in der begonnenen Richtung weitergeht. Die Stränge werden asynchron und bidirektional repliziert.

Im Mitochondrium gibt es einen eigenständigen Transkriptionsfaktor (mtTF1) und ein spezielles Ribonucleoprotein, die RNase mrp (*mitochondriales RNA Processing*) als Kofaktor beim RNA-Priming.

Zur Transkription gibt es für beide Stränge unterschiedliche Promotoren die vermutlich beide über den mitochondrialen Transkriptionsfaktor (mtTF1) gesteuert werden (Fisher und Clayton, 1988).

Am Anfang des H-Stranges befinden sich die zwei Gene für die rRNAs. Nach den Genen für die rRNAs findet man eine typische Sequenz für eine sogenannte ρ -unabhängige Termination (Dubin et al., 1983). Ein aktiver Terminationsfaktor ist bekannt (Hess et al., 1991). Dieser Mechanismus scheint sicherzustellen, daß rRNAs in einem höheren Überschuß vorhanden sind. Pathologisch scheint dieser Mechanismus auch eine Rolle bei der Entstehung des MERRF-Syndrom zu haben (siehe Kapitel 1.3.3).

Das weitere *processing* und *splicing* der RNA-Transkripte wird durch die Enzyme RNase mrp und RNase P-ähnlichen Proteinen durchgeführt (Chang und Clayton, 1985, 1987; Chang et al., 1985; Doersen et al., 1985).

1.3 Mitochondriale Enzephalomyopathien

Leitsymptom der meisten Myopathien ist die isolierte Muskelschwäche. Auch bei den mitochondrialen Enzephalomyopathien (syn.: Mitochondriopathien, mitochondriale Myopathien) steht Muskelschwäche als Leitsymptom im Mittelpunkt. Hinzu kommen jedoch eine Vielzahl unspezifischer sowohl als auch mitochondrienspezifischer Symptome. Besonders betroffen ist neben den Muskeln vor allem das Nervensystem. Charakteristischerweise findet man zusätzlich oft Kardiomyopathien, kardiale Überleitungsstörungen und eine Retinitis pigmentosa als Symptome.

Laborchemisch wegweisend für die Verdachtsdiagnose einer mitochondrialen Myopathie sind eine Erhöhung von Laktat und Pyruvat im venösen Blut in Ruhe. Diese kann noch beträchtlich bei körperlicher Belastung gesteigert werden.

Histopathologischerseits findet man häufig schon lichtmikroskopisch Veränderungen in den Muskelbiopsien als sogenannte *ragged red fibers* (RRF) in der Gomori-Trichrom-Färbung. Das elektronenmikroskopische Korrelat dieser RRFs sind subsarkolemmale Akkumulationen von abnormen Mitochondrien, sowie mitochondriale Aggregate mit parakristallinen Einschlüssen (s. Abbildung 1).

Mitochondriale Enzephalomyopathien sind Multisystemerkrankungen, die nur ihre Hauptsymptome im ZNS und im Skelettmuskel aufweisen. In den letzten Jahren hat sich das Verständnis für die Pathogenese der mitochondrialen Enzephalomyopathien grundlegend vertieft. Besonders das mitochondriale Genom ist in den Mittelpunkt des

Interesses gerückt. Hier wurden vielfältige Mutationen und Deletionen gefunden, welche heute im direkten Zusammenhang mit den Krankheiten gesehen werden.

Die Klassifizierung der mitochondrialen Enzephalomyopathien erweist sich als außerordentlich schwierig. Ein klassisches Konzept wurde von Morgan-Hughes, 1986, vorgestellt. Er unterteilte die mitochondrialen Enzephalomyopathien in drei Gruppen, wobei er das Leitsymptom und damit verbunden das Hauptausprägungsorgan als Kriterium für die Einteilung verwendet. Durch das vertiefte Verständnis der mitochondrialen Enzephalomyopathien erwies sich diese Klassifikation als Grundgerüst. Heute findet man jedoch ein Symptom aufgrund von Veränderungen des mitochondrialen Genoms, so daß im moderneren Schrifttum eine Klassifikation nach der Art der Mutation anstrebt wird.

Ein weiteres Klassifikationsmodell wurde von DiMauro, 1994, vorgestellt. Er grenzt drei eigenständige Krankheitsbilder voneinander ab:

- Kearns-Sayre-Syndrom
- MERRF-Syndrom (*myoclonus epilepsy with ragged red fibers*)
- MELAS-Syndrom (*mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes*).

Die klinischen Befunde sind in Tabelle 1 dargestellt.

Symptome	KSS	MERRF	MELAS
Opthalmoplegia	+	-	-
Herzblock	+	-	-
Retinadegeneration	+	-	-
Myoklonien	-	+	-
Ataxie	+/-	+	-
Muskelschwäche	+/-	+	+
Zentrale Anfälle	-	+	+
Episodisches Erbrechen	-	-	+
Kortikale Blindheit	-	-	+
Hemiparesen	-	-	+
Andere neurologische Ausfälle	+/-	+/-	+/-

Hyperlaktatämie	+	+	+
<i>ragged red fibers</i>	+	+	+

Tabelle 1: Einteilung der häufigsten mitochondrialen Myopathien nach DiMauro et al. (1984). Die diagnostisch richtungsweisenden Symptome der häufigsten mitochondrialen Myopathien sind hervorgehoben.

1.3.1 Kearns-Sayre-Syndrom und Ophthalmoplegia plus (syn.: KSS, CPEO)

Leitsymptom dieser chronisch progredienten externen Ophthalmoplegia (CPEO, syn. Ophthalmoplegia plus) sind Störungen der Augenmobilität und Ptosis, mit variabler Ausprägung anderer muskulärer Symptome. Praktisch immer findet man lichtmikroskopisch *ragged red fibers* in der Gomori-Trichrom-Färbung und eine pathologische Erhöhung des Laktat- bzw. Pyruvat-Blutspiegels.

Das Kearns-Sayre-Syndrom (KSS) stellt eine klinische Variante der CPEO dar. Bis heute ist nicht ganz eindeutig klar, ob es sich um verschiedene Entitäten handelt (s. u.). Leitsymptome des KSS sind:

- Chronisch externe progressive Ophthalmoplegia
- Retinadegeneration (Retinitis pigmentosa)
- Reizleitungsstörungen des Herzens.

Das häufigste Erstsymptom des KSS, die Ptosis, beginnt meist zwischen dem 10. und 20. Lebensjahr. Die Serum-CK (ein wichtiger Hinweis auf Myopathien im Allgemeinen) ist meist nur bis maximal 600 U/l erhöht. Im Fahrrad-Ergometer-Test findet man praktisch immer erhöhte Laktat-Werte. Die Muskelbiopsien zeigen lichtmikroskopisch regelmäßig *ragged red fibers* und bei 10 - 50% der Fasern ist eine gesteigerte Reaktion der Succinat-Dehydrogenase zu finden. In der Cytochrom c Oxidase-Reaktion findet man häufig fokale disseminierte Ausfälle positiver Muskelfasern. Normale Aktivitäten der Atmungskettenenzyme schließen jedoch die Diagnose einer CPEO oder eines KSS nicht aus (Jerusalem, 1991).

Das seltene KSS wurde erstmals von Kearns und Sayre, 1958, von Kearns alleine, 1965, sowie von Shy et al., 1967, beschrieben. In der Literatur wurde immer wieder von mehreren Autoren auf die große Schwierigkeit der Klassifikation der Befunde von externer Ophthalmoplegia plus hingewiesen. Dennoch wies Fine, 1978, darauf hin, daß die Krankheiten nach einem maternalen Modus vererbt werden. Neuere

Untersuchungen zeigten jedoch meist, daß die common deletion bei KSS sporadisch ohne maternale Vererbung, also erst postnatal, auftritt (Larson, 1992). 1991 wies Bertorini-Freddari et al. sogenannte *ragged red fibers* mit der Gomori-Trichrom-Färbung nach. Aus diesen Befunden verdichtete sich schnell der Verdacht, daß es sich um eine Mitochondriopathie handelt. 1988 konnten Lestienne und Ponsot eine 5 kb-Deletion in der mitochondrialen DNA eines KSS-Patienten in einer Muskelbiopsie nachweisen. Moraes et al., 1989, fanden mitochondriale Deletionen in 98% der KSS-Patienten und 56% CPEO-Patienten. Moraes et al., 1989, fanden im Muskel von 32 Patienten aus einer Gruppe von 123 Patienten mit dem Leitsymptom der CPEO verschiedenartige Deletionen die von 1,2 bis 7,6 kb reichten. 11 dieser Patienten wiesen jedoch eine identische 4,9 kb-Deletion auf. Diese Deletion wurde wegen ihres häufigeren Vorkommens als *common deletion* bezeichnet. Die Menge an deletierter DNA beträgt bei den symptomatischen Patienten meist zwischen 45 - 75% (Zeviani et al., 1988). Molekularbiologische Untersuchungen von Johns et al., 1989, zeigten daß die *common deletion* von einer 13 - 18 Basenpaar langen *direct repeated sequence* flankiert waren. Die *common deletion*-DNA enthielt von diesem *direct repeat* nur noch ein 11 bp langes Bruchstück. Der Verdacht liegt nahe, daß es sich um ein Rekombinationsprodukt handelt.

Poulton, 1991, berichtete von einer Familie mit KSS und zwei asymptomatischen Verwandten, die dieselbe mtDNA-Deletion hatten. Damit wurde zum ersten Mal eine Deletion der mtDNA in der Keimbahn beschrieben. Auch hier zeigte sich der Gehalt an mutierter mtDNA als entscheidender Parameter im Sinne der Theorie des notwendigen Schwellenwerts an mutierter mtDNA, welcher über asymptotische Deletionsträger oder Erkrankte sowie Manifestationsalter entscheidet. Die Menge und das Verteilungsmuster der mtDNA-Mutation scheint somit der entscheidende Faktor der qualitativen und quantitativen Symptomausprägung zu sein (Nonaka., 1992; Tsuyama et al., 1993).

Bei zwei verschiedenen Krankheitsbildern, die die *common deletion* als gemeinsamen genetischen Erkrankungsfaktor haben, das KSS und das *Pearson's marrow pancreas syndrome* (eine weitere, seltene mitochondriale Myopathie), fanden sich völlig verschiedene Verteilungsvarianten der mtDNA-Mutation. Man vermutete, daß verschiedene Gewebeverteilungen der mtDNA-Mutation zu diesen unterschiedlichen Ausprägungen der klinischen Merkmale führte (Fischel-Ghodsian et al., 1992; Sciacco et al., 1994).

McShane et al., 1991, beschrieben Patienten mit Symptomen des *Pearson's marrow pancreas syndrome* deren Krankheit später in ein KSS überging. Sie fanden hier auch

die *common deletion* der mtDNA. Bemerkenswerterweise scheint dieselbe mtDNA-Deletion verschiedene Krankheiten auszulösen. Hier steht die Genetik der mtDNA auch im Widerspruch zur Mendel'schen Genetik:

Eine Mutation bzw. Deletion der mtDNA führt zu verschiedenen Krankheitsbildern. Eine Krankheit wird durch verschiedene Mutationen und Deletionen der mtDNA ausgelöst.

Verschiedene Anteile an mutierter bzw. deletierter DNA und deren durch Segregation entstandenes Verteilungsmuster in verschiedenen Organen sowie deren zeitlichen Veränderungen entscheiden über den Zeitpunkt der Entstehung der Krankheit und ihrer Ausprägung. In der Komplexität wird die Schwierigkeit der Klassifikation aber auch gleichzeitig die Faszination, die von der mitochondrialen Genetik ausgeht, klar.

Eine besondere Bedeutung in der Mitochondriengenetik kommt den *direct repeats* zu. Sie haben sich als *hot spots* für lange Deletionen der humanen mtDNA (hmtDNA) herauskristallisiert. Deletionen sparen praktisch immer die ribosomalen rRNA-Gene und die Regionen des O_H bzw. O_L aus (Clayton, 1984, Chang und Clayton, 1985).

Poulton et al., 1995, zeigten zum erstenmal den genetischen Unterschied zwischen CPEO und KSS. 10 von 10 Patienten mit KSS hatten Duplikationen von deletierter mtDNA. Dagegen wiesen 8 von 8 Patienten mit CPEO einfache Deletionen ohne Duplikationsmuster der mtDNA auf. Die Duplikationsmuster zeigten im Allgemeinen ein *rearrangement* von Wildtyp und deletierter mtDNA auf und scheinen sich klinisch charakteristischerweise als frühzeitiger Beginn der Erkrankung zu manifestieren. Somit wäre es möglich, daß es sich bei der CPEO und dem KSS um verschiedene, da genetisch unterscheidbare, Entitäten handelt.

Shoubridge et al., 1997, wies auf die eindeutig unterschiedliche Verteilung von mutierter DNA bei KSS-Patienten im Muskel hin. Weitergehende Untersuchungen zeigten, daß sich die mutierte mtDNA praktisch nicht in den Satellitenzellen, welche die teilungsfähigen und damit zur Regeneration befähigten Reservezellen des Muskels sind, befand. Eine wiederholte Muskelbiopsie bei einem KSS-Patienten mit nachgewiesener Mutation der mtDNA zeigte Regenerationsfasern bei der erneuten Biopsie. Diese Fasern waren eindeutig homoplasmatisch für Wildtyp mtDNA während die nicht-regenerierenden Fasern, die den Hauptanteil an Gesamtfasern darstellen, fast durchgehend mutierte mtDNA enthielten.

1.3.2 *Mitochondrial Myopathy, Encephalopathy, Lactat Acidosis and Stroke-Like Episodes (MELAS-Syndrom)*

Klinische Leitsymptome des MELAS-Syndroms sind myopathische Zeichen und transiente zerebrale Symptome, wie episodisches Kopfweg, intermittierende Migräne, Grand mal-Anfälle und Hemiparesen, welche sich als Schlaganfallsähnliche Episoden darstellen. Laborchemisch fällt bezeichnenderweise eine Laktatazidose als Zeichen der gestörten Mitochondrienfunktion auf (Pavlakis et al., 1984 und Montagna et al., 1988). Computertomographisch findet man alle Anzeichen eines Schlaganfalls sowie charakteristischerweise Verkalkungen der Basalganglien. Klassischer Krankheitsbeginn ist das 5. bis 15. Lebensjahr. Lichtmikroskopisch findet man kennzeichnende *ragged red fibers* in der Muskelbiopsie. Subsarkolemmale pleomorphe Mitochondrien finden sich häufig im elektronenmikroskopischen Untersuchungsgut.

Molekularbiologische Untersuchungen von Goto et al., 1992, zeigten eine Punktmutation in der tRNA-Leucin an der Position 3243 von A nach G. Diese Punktmutation konnte er in 80% der untersuchten Fälle nachweisen. Klinisch und pathologisch bestand jedoch keine Korrelation von Erkrankten mit dieser Punktmutation allein. Später stellten sich auch andere Punktmutationen wie z. B. am nt 3251 (Sweeny et al., 1993), nt 3252 (Morten et al., 1993), nt 3271 (Goto et al. 1991) und nt 3291 (Goto et al. 1994) nt 5601 (Tanaka et al., 1991) und nt 11084 (Lertrit et al., 1992) als genetische Ursache für das MELAS-Syndrom heraus.

Dennoch wurden auch weitere Krankheiten gefunden bei denen charakteristischerweise die nt 3243 Mutation der tRNA-Leucin^{UUA} auftrat. Von Manouvrier et al., 1995, wird eine Mutation am nt 3243 von A nach G bei einer maternal vererbten Form des Diabetes mellitus kombiniert mit sensorischer Taubheit, hypertrophe Kardiomyopathie und Nierenversagen beschrieben. Diese Symptomenkomplexe wies er in 35 Patienten über 4 Generationen nach. Die Klinik zeigte eine große Variabilität im Bezug auf die verschiedenen Generationen. Odawara et al., 1995, fand die 3243-Mutation in 3 von 300 Patienten mit einem nicht insulinpflichtigen Diabetes mellitus bzw. pathologischen Glukosetoleranztest. Nicht dagegen fand er diese Mutation in der 115 Nichtdiabetiker und 94 insulinpflichtige Diabetiker großen Kontrollgruppe. Hier scheinen Segregations- und Verteilungsphänomene eine Rolle in der Ausprägung der klinischen Symptomatik zu spielen.

In einer Studie von Matthews et al., 1995, zeigte sich eine große Variabilität von mutierter mtDNA in Fibroblasten. Dennoch erschien die mutierte DNA im Bezug auf den Mittelwert rein zufällig verteilt. Es gab keine lokalen Foci. Auch im Bezug auf die Verteilung über 15 Generationen von Fibroblastenkulturen zeigte sich keine Veränderungen der intrazellulären Heteroplasmie der MELAS 3243 Mutation. Von Damian et al., wurde 1996 ein weibliches Kind mit VACTERL (Assoziation von *Vertebral, Anal, Cardiovascular, Tracheo-Esophagial, Renal and Limb Defects*) beschrieben, welches im Alter von 1 Jahr aufgrund von einem Nierenversagen starb. Die molekularbiologischen Untersuchungen zeigten 100% nt 3243 mutierte mtDNA in der multizystischen und 32% mutierter mtDNA in dem normalen Anteilen des Nierengewebes. Weitere dysplastische Syndrome wurden von Feigenbaum et al., 1996, für diese Mutation beschrieben. Es gibt somit gewisse Hinweise auf durch mtDNA-Mutationen hervorgerufene Dysplasien bzw. Dymorphien während der Embryogenese. Unklar ist die Entstehung dieser „sehr frühen“ Mutationen in Bezug auf das Altersphänomen. Während die nt 3243-Mutation nicht beim jungen Menschen gefunden wird, gibt es diese Mutation dennoch in der Embryogenese, ein interessantes und neues Phänomen.

Velho et al. schlugen 1996 vor, den Defekt in der Glukoseregulierung der Insulinsekretion als erste Anzeichen der Mutation anzunehmen.

Die nt 3443 Mutation befindet sich auf der Sequenz der tRNA-Leucin^{UUA}. Auf der mtDNA, welche den Bereich dieser tRNA kodiert, befinden sich weitere Mutationen von pathologischer Bedeutung. So wurden für die adulte mitochondriale Myopathie (nt 3260: Zeviani et al., 1991), eine weitere mitochondriale Myopathie (nt 3250: Goto et al., 1992, und nt 3251: Sweeney et al., 1993), die progressive Enzephalopathie (nt 3271, Einzelnukleotid-Deletion: Goto et al., 1991) und eine weitere mitochondriale Myopathie (nt 3302: Shoffner et al., 1993 und Bindoff et al., 1991) Mutationen in der in der tRNA-Leucin^{UUA} gefunden.

Die tRNA ist eindeutig ein *hot spot* für mtDNA-Mutation. Zur Erklärung der Pathogenese der vielfältigen Erkrankungen der tRNA-Leucin-Mutation und insbesondere des MELAS werden vor allem zwei Möglichkeiten diskutiert:

1. Die tRNA-Leucin ist physiologisch durch die MELAS-Mutation 3243 nicht voll funktionsfähig (Lauber et al., 1991).
2. Alternativ dazu gibt es auch die Möglichkeit, daß der Terminationsfaktor durch die veränderte Sequenz schwächer oder stärker bindet und damit im Falle einer stärkeren Bindung eine komplette Termination nach den rRNAs bewirkt. Eine Schwächung der Bindung würde darauf hinauslaufen, daß die

Möglichkeit zur Regulierung der rRNA-Synthese relativ zu der von mRNA nicht mehr gewährleistet ist. Auch dies wäre als Pathomechanismus denkbar. Experimentelle Konzepte dazu existieren (Christianson und Clayton, 1986, 1988; Kruse et al. 1989; King und Attardi, 1989).

1.3.3 Myoclonus Epilepsy associated with Ragged Red Fibers (MERRF-Syndrom)

Klinische Leitsymptome des MERRF-Syndroms sind neben der myopathischen Muskelschwäche vor allem zentral nervöse Beschwerden wie myoklonische Epilepsie, Ataxie und Spastizität sowie gelegentlich der sensorische Verlust des Gehörs (Rosing et al., 1985). Neuroradiologisch auffällig sind Verkalkungen der Basalganglien (Ellison, 1998). Die Krankheit beginnt meist in der Kindheit bzw. frühen Erwachsenenalter und hat einen maternalen Vererbungsmodus. Enzymdefekte der Atmungskette wurden von Pollok et al., 1986, beschrieben. 1990 beschrieben Shoffner et al. zum ersten Mal die mitochondriale Mutation des nt 8344 von A nach G. Seibel et al. bestätigten 1990 diese Ergebnisse. Sie konnten außerdem als erste eine Beeinträchtigung der Biosynthese mitochondrialer Enzymuntereinheiten aufzeigen. Shoffner und Wallace zeigten 1992, daß diese Mutation für ca. 80 bis 90% der MERRF-Fälle charakteristisch ist. Wallace et al., 1988, sowohl Bindoff et al., 1991, fanden, daß der damals unbekannte molekularbiologische Defekt eine Translation aller mtDNA kodierten Gene verringerte. 1992 fand Sylvestri et al. zusätzlich eine Mutation bei MERRF-Fällen an der Position 8356 von C nach G, wiederum im tRNA-Leucin^{UUA} Gen.

Interessanterweise beschrieb Zeviani et al., 1993 eine klinische Mischung des MERRF- und MELAS-Syndroms. Er konnte eine Punktmutation am nt 8356 als Ursache identifizieren.

1.3.4 Veränderungen des Mitochondriums und der mitochondrialen DNA während des Alterns

Altern bedeutet einen Verlust an Organfunktionen. Es handelt sich hier um einen sehr komplexen, kumulativen pathophysiologischen Mechanismus. Die makroskopisch

erkennbare Degeneration der Neurone und Muskelzellen sind die dabei auffälligen Merkmale. Auf biochemisch-molekularbiologischer Ebene finden sich vor allem folgende Befunde (Ellison et al., 1998):

- Reduktion der RNA-Synthese
- Ineffektivität der biochemischen Proteinabbauwege und damit verbundene Akkumulation von abnormen Proteinen
- Verminderung von trophischen Faktoren, welche das Überleben von spezifischen Organsystemen ermöglichen
- Oxidativer Schaden an den mitochondrialen Enzymen und der DNA
- Unangepasste Triggerung des ubiquitären programmierten Zelltods (Apoptose)

Pathomorphologische Veränderungen von Mitochondrien während des Alterns zeigen eine hohe Divergenz. Veränderungen der Struktur betreffen vor allem Risse der Cristae-Ablagerungen der Matrix sowie parakristalline Einschlußverbindungen (Feldman et al., 1981; Frenzel et al., 1984; Cano et al., 1994; Burch et al., 1970; Coleman et al., 1988; Hansford et al., 1983).

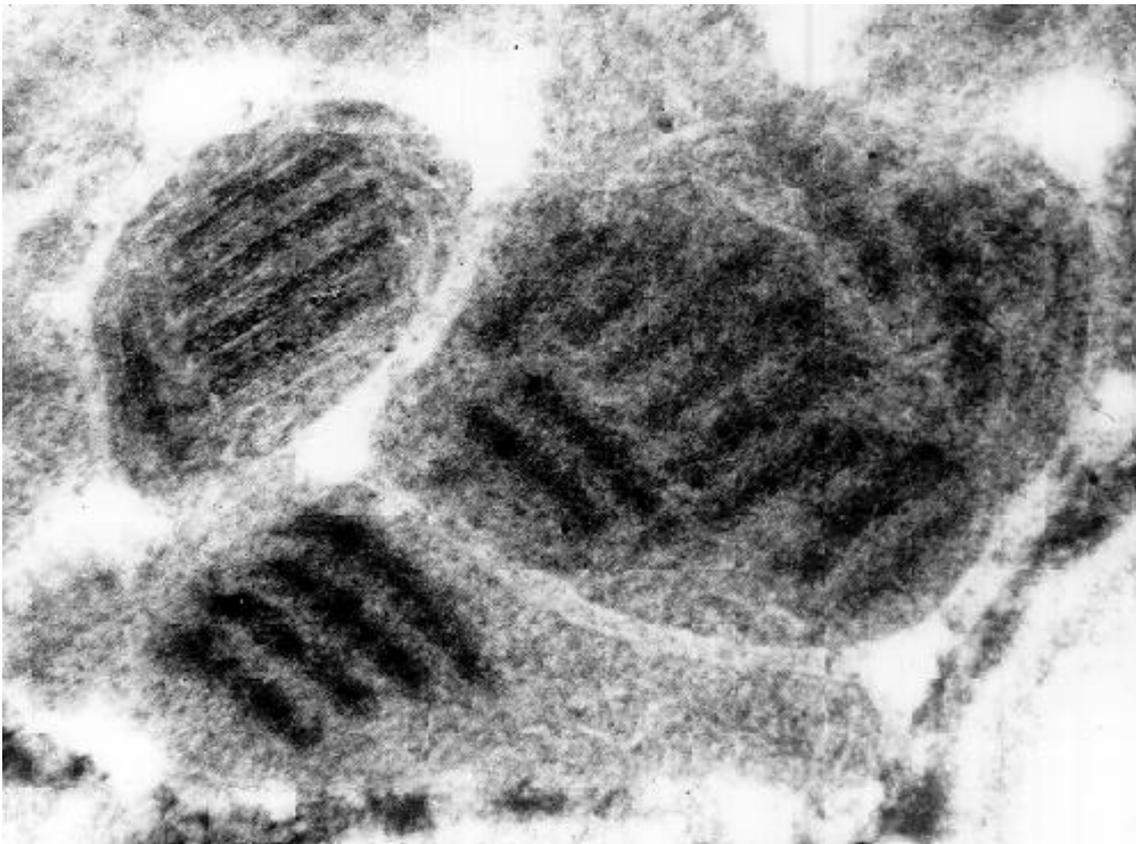


Abbildung 1: Parakristalline Einschlüsse in Mitochondrien des menschlichen Muskels (ca. 30000-fach vergrößert).

Über die Anzahl und das Volumen von Mitochondrien gibt es widersprüchliche Ergebnisse. Im menschlichen Herz bleibt das Gesamtvolumen der Mitochondrien etwa gleich, während die Anzahl der Mitochondrien steigt und gleichzeitig ihre Größe abnimmt (Frenzel, 1985). In der menschlichen Leber dagegen findet man eine Zunahme der Größe und gleichzeitig eine Abnahme der Mitochondrienzahl (Tauchi et al., 1968). Die *turnover*-Rate der Mitochondrien scheint im Verlauf des Alterns konstant zu bleiben (Menziés et al., 1971).

Als mögliche auslösende Faktoren werden zur Zeit die Zunahme von Mutationen der mtDNA (Simic, 1992; Miquel et al., 1992) und diverse andere Schädigungen durch freie Radikale des Sauerstoffs diskutiert (Harman, 1993).

Morphologische Variationen der Mitochondrien zeigen sich sowohl interindividuell als auch in ihren pathologischen Ausprägungen (Grossmann, 1990). Daneben findet man auch Veränderungen in der Zusammensetzung der gesättigten Fettsäuren und des Cholesteringehalts mitochondrialer Membranen, welche eine Verminderung der Fluidität im hohen Alter bewirken (Hansford, 1983; Nohl, 1979; Hegener, 1980).

Ausgehend von histopathologischen und elektronenmikroskopischen Befunden wurde die Hypothese abgeleitet, Alterserscheinungen auf Mutationen der mtDNA zurückzuführen (Linanne et al., 1989; Kadenbach und Müller-Höcker, 1990). Besonders von Kadenbach und Müller-Höcker wurde die Hypothese vertreten, daß postmitotische Zellen in einem erhöhten Maße Mutation und Deletionen der mtDNA akkumulieren. Diese Hypothese ermöglicht es zu verstehen, daß Kinder nicht bereits vorgealterte mtDNA erhalten. Zellen der Keimbahn wären im Gegensatz zu postmitotischen Zellen, welche die Fähigkeit der mitotischen Teilung verloren haben, nicht betroffen. 1990 wurde sowohl von Ikebe et al. sowie Cortopassi und Arnheim die ersten Beweise der Akkumulation von mutierter mtDNA im gealterten Menschen gezeigt. Es wurden geringe Mengen an *common deletion* in Muskel- und Gehirnzellen gealterter Menschen gefunden. Shima, 1975, zufolge bleibt die mtDNA-Synthese im Alterungsprozeß konstant. Auf der RNA-Ebene wurden verschiedene Resultate erzielt. Während Fernandez-Silva et al., 1991, eine Verminderung der RNA-Synthese mit konsekutiver Abnahme des *steady state levels* beim Altern fanden, konnten Barrientos et al. (1997 a und b) unveränderte *steady state levels* von mitochondrialen Transkripten, jedoch auch bei einer Minderung der RNA-Syntheserate, zeigen. *Aging* und Veränderungen der mtDNA wurden seit 1992 unabhängig von Bittles, Wallace und Harding diskutiert. Harding, 1992, fragte sich, ob Altern nicht die am weitesten verbreitete mitochondriale Erkrankung sei. Brierley et al., 1997, diskutierten, daß der Zusammenhang mit Altern und mitochondrialen Veränderungen ein subtilerer

Mechanismus als nur die einfache Verminderung der Atmungsketten sein muß. Im Mittelpunkt der Untersuchungen standen die klinisch am meisten betroffenen postmitotischen Gewebe: Muskel und Gehirn. Die auch schon vorher bekannten Deletionen, insbesondere die *common deletion* wurden im Zusammenhang mit dem Altern untersucht. Corral-Debrinski et al., 1992, fanden die *common deletion* altersabhängig besonders stark im Cortex und Putamen vermehrt, jedoch nicht im Cerebellum. Soong et al., 1992, zeigten altersabhängig große Mengen von *common deletion* im Nucleus caudatus, Putamen und in der Substantia nigra, drei Gewebe mit Dopamin-Metabolismus. Arnheim et al., 1992, fanden einen bis zu 1000fachen Anstieg der *common deletion* im Herzmuskel und Gehirn, nicht jedoch in anderen Geweben. Simonetti et al. 1992, wiesen einen bis zu 10000fachen Anstieg der *common deletion* altersabhängig nach. Insgesamt waren die Werte jedoch mit maximal 0,1% *common deletion* pro Wildtyp mtDNA sehr gering. Auch Fahn et al., 1996 konnten eine Erhöhung der *common deletion* von 0,007 auf 0,8% bei 30-respektive 80jährigen finden. Liu et al., 1998, konnten eine Akkumulation der *common deletion* sowie andere Deletionen und der nt 3243 Mutation nachweisen. Sukanuma et al., 1993, und Kitagawa et al., 1993, fanden sowohl in der menopausalen als auch in der Postmenopause einen verstärkten Anstieg der *common deletion* in Ovarien. Merrill et al., 1996, zeigten einen Zusammenhang zwischen chronischer Hypoxie und *common deletion* auf. Sie fanden einen 12 bzw. 5fachen Anstieg der *common deletion* im Putamen bzw. Frontalcortex bei Patienten mit klinisch nachgewiesener Hypoxie im Vergleich zu Alters korrelierten Patienten. Neue Untersuchungsmethoden erlaubten die Verteilungsmuster der *common deletion* in verschiedenen Geweben zu untersuchen. Kovalenko et al., 1997, zeigten mit Hilfe der indirekten *in vitro* PCR die ungleichmäßige Verteilung der *common deletion* in verschiedenen Geweben während des Alterns sowohl als auch bei den mitochondrialen Erkrankungen auf.

Andere Deletionen bzw. Duplikationen wurden auch im Zusammenhang mit dem Altern nachgewiesen. Yen et al., 1992, fanden eine 6 kb Deletion mit einem unvollständigen 8 bp repeat an den Deletionsenden. Eine Altersabhängigkeit konnte auch hier festgestellt werden. Lee et al., 1994, fanden eine 200 bp lange Tandem-Duplikation im D-Loop, die von 0,8% auf 3,1% bei 55 bis zu 71 Jahre alten Patienten anstieg. Sie konnten auch bei 90% des Patientengutes *common deletion* nachweisen. Auch in der bereits versprochenen Arbeit von Liu et al., 1998 fanden sich verschiedene Deletionen der mtDNA im Zusammenhang mit dem Altern. Wei et al., 1996, fanden neben den bereits beschriebenen Tandem-Duplikationen und der

common deletion zusätzlich in unterschiedlichen Verteilungsmuster noch ein 7,4 kb lange Deletion der mtDNA. Diese Deletion nahm auch eindeutig mit dem Altern zu.

Daneben wurden auch zahlreiche Mutationen im Zusammenhang mit dem Altern beschrieben. Im besonderem Interesse stand die Mutation nt 3243 A nach G. Ihre Zunahme konnte von Müncher et al., 1993, während des Altersprozeß beschrieben werden. Es wurde neben dem Anstieg der 3243 Mutation auch ein Anstieg der 10006 CIPO-Mutation (CIPO: chronische intestinale Pseudo-Obstruktion, eine weitere mitochondriale Myopathie) im Augenmuskel von alternden Menschen nachgewiesen. Dies führte zur Hypothese sogenannter *hot spots* für somatische postmitotische Mutationen. Zhang et al., 1993 fand semiquantitativ die Mutation 3243 in 7 von 38 Erwachsenen. In kindlichem Gewebe konnte diese Mutationen nicht nachgewiesen werden. Diese Untersuchungen konnten von Pallotti et al., 1996, nicht bestätigt werden. Währenddessen fand auch Liu et al., 1997, einen altersabhängigen Anstieg dieser Mutation mit der quantitativen allelspezifischen PCR.

Während die Rolle der Deletionen, insbesondere der *common deletion*, während des Alterungsprozesses klar auf der Hand liegt, gab es immer wieder Zweifel an der Bedeutung der Punktmutationen. Auch die relative Menge an mutierter DNA schwankt je nach Untersuchung um mindestens eine 10er Potenz. Hamblet et al., 1995, konnten in einer vergleichenden Untersuchung derselben Gehirnproben durch Quantifizierung mit der *serial dilution PCR* und der kompetitiven PCR einen Unterschied rein methodenbedingt von einer 10er Potenz aufzeigen.

Trotz der überzeugenden Untersuchungsergebnisse im Bezug auf einen relativen Anstieg der *common deletion* im Altern stellt sich jedoch die Frage der Relevanz. Während bei mitochondrialen Erkrankungen erst eine Überschreitung des Schwellenwertes, der je nach Erkrankungsart und Deletion bzw. Mutation zwischen 75 und 95% liegt, Krankheitsphänomene auftreten, wird im Zusammenhang mit dem Altern dieser Schwellenwert nicht angenommen. Kadenbach et al., 1990 und 1995, stellten deshalb die Hypothese auf, daß das Zusammenwirken verschiedener stochastisch auftretender somatischer Mutationen und Deletionen der mitochondrialen DNA nicht einzeln, jedoch im Zusammenspiel eine synergistische Schwellenwertüberschreitung darstellen.

1.4 Quantitative PCR

1.4.1 Grundlagen

Zur allgemeinen Betrachtung der quantitativen PCR (qPCR) wird in folgendem auf zwei Bereiche eingegangen, da sie innerhalb dieser Arbeit von Bedeutung sind. Erstens gibt es verschiedene Methoden die sozusagen als Einheit angewandt werden. Diese Methoden werden nur kurz als Gesamtes beschrieben. Zweitens, viel wichtiger für diese Arbeit, werden die einzelnen Schritte der Methoden beschrieben und untereinander verglichen.

Allen Methoden ist gemeinsam, daß am Anfang eine, wenn auch verschieden gestaltete PCR steht. Die PCR-Produkte werden aufgetrennt und in verschiedenen Verfahren detektiert. Als nächstes erfolgt eine Quantifizierung (mengenmäßige Beschreibung) der PCR-Produkte. Die dabei erhaltenen Werte werden durch verschiedene mathematische Auswertungsmethoden zur Analyse der untersuchten DNA herangezogen.

Die PCR hat in der Molekularbiologie einen vorher innerhalb so kurzer Zeit nie erlebten Siegeszug als Methode vollzogen. Das einfache Prinzip der PCR erlaubt eine Vervielfachung einer spezifischen Sequenz, um das bis zu millionenfache. Zwei entscheidende Parameter treffen bei dieser Methode zusammen; erstens die enorme Amplifikationsmöglichkeit, auch Sensitivität genannt, als auch die Spezifität einer relativ uniform aufgebauten chemischen Substanz wie die DNA. Sowohl für analytische als auch für präparative Aufgaben ist diese Methode geeignet. Neben diesen hervorstechenden Eigenschaften, kommen noch eine Vielzahl von Variationsmöglichkeiten hinzu. Kleine Veränderungen der vielfältigen Parameter (Polymerase, Primer, Annealingtemperatur, usw.) erzeugen neue Anwendungsmöglichkeiten, wie z. B. Mutagenese, Sequenzierung und Erzeugung von cDNA-Bibliotheken.

Eine der durch die PCR verfeinerten Methoden ist die Quantitierung geringer Mengen einer spezifischen DNA-Sequenz bei gleichzeitigem Vorliegen großer Mengen ähnlicher DNA.

Die Quantitierung ist nicht nur in der Mitochondriengenetik von Bedeutung. Klinisch große Bedeutung hat die quantitative PCR in der Mikrobiologie. Viele

Mikroorganismen lassen sich im Labor nur unter großem Aufwand züchten. Die DNA durch PCR nachzuweisen ist jedoch relativ einfach. Hier ist aber eine Ja-Nein-Antwort für den Kliniker ungenügend. Die Anzahl der vorhandenen Keime entscheidet über Krankheit oder akzidentelles Vorkommen und damit über ihre Relevanz als Krankheitsursache.

Ein weiteres wichtiges Einsatzgebiet findet sich in der RNA-Biologie. Auch hier werden nicht qualitative sondern quantitative Aussagen zur Untersuchung herangezogen.

1.4.2 Aufbau der PCR-Quantitierung

Die sogenannte kompetitive PCR wurde 1990 von Gilliland et al., sowohl als auch von Perrin et al. beschrieben. Seitdem sind weit über 500 Artikel unter dem Stichwort kompetitive PCR erschienen. Die kompetitive PCR beruht praktisch in all ihren Varianten darauf, daß in dem gleichen PCR Ansatz, in dem sich die *target-DNA* befindet, noch ein ähnliches Fragment gleichzeitig koamplifiziert wird.

Jede PCR funktioniert nach einem einfachen Drei-Schritt-Prinzip:

- In dem ersten Schritt wird die meist als doppelsträngige *target-DNA* in zwei Einzelstränge aufgetrennt. Dieser Vorgang wird bei der PCR durch Erhitzen der Reaktionslösung auf ca. 94°C ausgeführt.
- An diesen Einzelsträngen können nun die Primer binden. Dies ist ein wichtiger Schritt in Bezug auf die Sensitivität und Spezifität der PCR. Die Regulierung der Temperatur, das Design der Primer sowie die Zusammensetzung der Reaktionslösung spielen hier eine wichtige Rolle und müssen für jede PCR neu optimiert werden. Nur so kann ein regelrechtes Funktionieren der entsprechenden PCR erwartet werden.
- Eine thermostabile DNA-abhängige-DNA-Polymerase bindet an dem durch Primer und *target-DNA* gebildeten kurzen DNA-Doppelstrang und beginnt mit der unidirektionalen DNA-Synthese. Dieser Vorgang wird mehrmals durch ein Dissoziieren des Enzyms unterbrochen und wieder gestartet (Newton, C. und Graham, A., 1995, Seite 12ff). Damit ist das Ende des ersten Reaktionszyklus beschrieben.

Diese Reaktionszyklen werden mehrmals wiederholt. Bei jedem Zyklus würde, maximale Effektivität vorausgesetzt, sich die Menge der Amplifikationsfragmente verzweifachen. Mathematisch beschrieben würde die Menge der amplifizierten DNA-Fragmente exponentiell steigen. In halblogarithmischer Darstellung verläuft die exponentielle Funktion als Gerade (s. Abbildung 2). Diese Darstellungsweise ist wesentlich übersichtlicher. Die Steigung der Geraden stellt die Effizienz (bzw. deren Logarithmus) dar. Man kann hier wesentlich besser Veränderungen der Effizienz und ihre Auswirkungen erfassen. Deshalb wird diese Darstellungsmethode in dieser Arbeit meist bevorzugt.

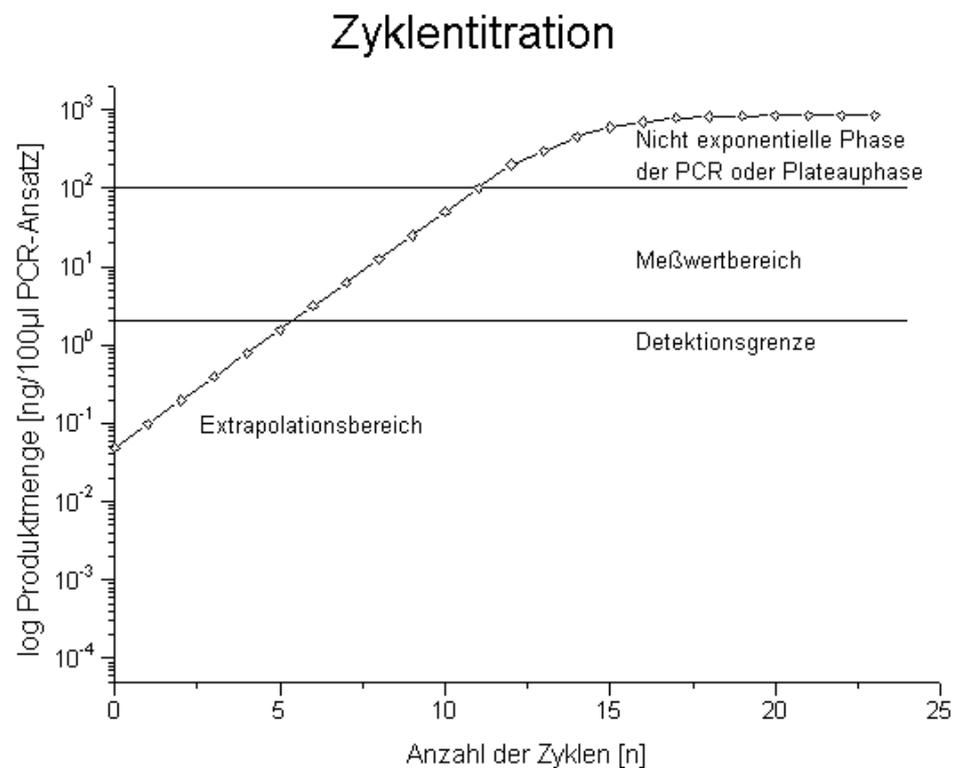


Abbildung 2: Graphische Darstellung einer idealisierten PCR. Schematische halblogarithmische Darstellung des Verlauf der Produktakkumulation einer beliebigen Menge Ausgangsfragment versus die Zyklenzahl. Eingezeichnet sind die Detektionsgrenze der DNA durch konventionelle Agarosegelelektrophorese und Färbung mit einem Fluoreszenzfarbstoff, sowie der Messwertbereich und die Plateauphase der PCR, in welcher die Reaktion nicht mehr exponentiell verläuft.

Zur Quantitierung spezifischer DNA-Sequenzen wurden verschiedene Methoden angewendet. Vom *dot blot* bis hin zum *Southern Blot* waren diese Methoden schon längere Zeit verfügbar. Mit der Einführung der PCR in die molekularbiologischen Techniken stand zum erstenmal eine dynamische Methode der Quantitierung zur

Verfügung. Aus einer sehr geringen Ausgangsmenge an *target*-DNA konnte auf quantitative Zusammenhänge geschlossen werden.

Eine quantitative PCR (qPCR) kann auf sehr verschiedenen Prinzipien beruhen. Heute haben sich mehrere Methodenzusammenstellungen etabliert. Dies ist oftmals ein Hinweis, daß man noch keine endgültige Methode gefunden hat, die erstens für verschiedenste Ansprüche durchführbar ist. Zum anderen ist die Zuverlässigkeit der PCR nicht immer gegeben. Ein kritischer Untersucher weiß, wie gut die verwendete Methode ist. Immer wieder sparen Veröffentlichungen die genaue Beschreibung ihrer verwendeten Methodik einfach aus. Oder machen zu ungenaue Angaben, daß eine weitergehende kritische Prüfung nicht durchgeführt werden kann.

Zur Einführung in die quantitative PCR erscheint es notwendig, die prinzipiellen Arbeitsschritte zu beschreiben, um neu eingeführte Veränderungen besser begreifbar zu machen.

- Am Anfang steht das Design der PCR-Methode selbst. Hier kommen verschiedenste Denkansätze in Betracht (Amplifikation).
- In einem weiteren Schritt werden die PCR-Produkte getrennt und auf verschiedene Arten messbar gemacht (Detektion).
- Die detektierbaren PCR-Produkte werden in Messwerte umgewandelt (Quantifizierung).
- Zuletzt werden die Messdaten ausgewertet und in die entsprechenden Mengen an *target*-DNA umgerechnet. Bei der Auswertung der Messdaten kommen je nach verwendeter Methode verschiedene mathematische Ansätze zur Anwendung. Dies reicht von der einfachen halblogarithmischen Auftragung bis zur Poisson-Verteilung (Quantitierung, zur Begriffsbestimmung s. a. Kapitel 9.1).

1.4.3 PCR-Methoden zur Quantitierung

1.4.3.1 Kinetische PCR

Für das Design der PCR stehen verschiedene theoretische Ansätze zur Verfügung. Die einfachste Methode ist, die PCR in mehreren Ansätzen getrennt und mit variierenden Zyklenzahlen durchzuführen, die Produkte aufzutrennen und zu

quantifizieren. Beim Plotting mehrerer Zyklen versus der Produktmenge kann man auf die Menge an *target*-DNA zurückzuschließen (s. a. Abbildung 2). Diese Methode wird auch als kinetische qPCR bezeichnet (Köhler, 1995, S.7f).

1.4.3.2 *Real time quantitative PCR*

Desweiteren kann man die PCR auch in einem Ansatz durchführen und den Einbau eines Primer durch eine gebundene Fluoreszenzsonde messen. Diese Sonde ist zusammen mit einem Quencher an einem Primerrest gebunden. Der Primer besteht aus zwei Anteilen. Der 5'-Anteil trägt den Fluoreszenzfarbstoff und den Quencher, der 3' liegenden Anteil dient zum Annealen an die *target*-DNA. Beide Anteile sind jedoch komplementär zu der entsprechenden *target*-DNA. Bei der Elongation im nächsten Zyklus bindet nun der Primer in seiner ganzen Länge an die neugebildete DNA. Der vorher am 5' Ende gefaltete Primer entfaltet sich und trennt so den vorher räumlich eng zusammenliegenden Fluoreszenzfarbstoff von dem Quencher. Erst jetzt kann Fluoreszenz nachgewiesen werden. Dies kann berührunglos und in einem Reaktionsgefäß über längere Zyklenzahlen erfolgen. Diese sehr elegante Methode wurde 1996 von Heid et al. als sogenannte *real time quantitative PCR* beschrieben und von Nazarenko, et al. 1997 modifiziert.

1.4.3.3 *Limiting dilution PCR*

Die PCR ist unter extrem optimierten Bedingungen fähig einzelne DNA-Moleküle zu einem Signal zu amplifizieren. 1992 wurde von Sykes et al. die Idee zur Quantifizierung unter dem Stichwort *limiting dilution qPCR* genutzt. Im Prinzip wird die zu quantifizierende Menge an *target*-DNA in entsprechend kleinen Schritten verdünnt und mit PCR amplifiziert. Bei einem oder auch mehr vorhandenen *target*-DNA-Molekülen wird ein PCR-Produkte erhalten. Ist die Verdünnung jedoch so stark, daß statistisch gesehen kein einziges DNA-Molekül vorhanden ist, gibt es keine PCR-Produkte mehr. Die Messergebnisse dieser Methode sind also diskrete Alles-oder-Nicht-Werte. Um diese Alles-oder-Nicht-Werte in reale Mengen umzuwandeln, verwendet man eine statistische Methode die sogenannte Poisson-Verteilung. Die Poisson-Verteilung wird bei sehr seltenen, asymmetrischen und diskreten Ereignissen angewendet (Wissenschaftliche Tabellen Geigy,.1985, S. 225).

1.4.3.4 Kompetitive PCR

Die kompetitive PCR ist eine der älteren etablierten Methoden in der Reihe der qPCRs. Einen Erstbeschreiber festzulegen ist nicht ohne weiteres möglich. Die ersten Publikationen zu diesem Thema erschienen 1989. Becker-Andre, M. et al., 1989, koamplifizierten ein um ein Basenpaar verändertes DNA-Fragment. Sie führten damit eine neue Restriktionsschnittstelle ein, welche im Wildtyp nicht vorhanden war. Damit konnten sie die entstandenen Produkte über eine Restriktionsendonukleasebehandlung eindeutig als Standard oder Wildtyp identifizieren. Kellogg et al., 1990, quantitierten HIV I-DNA durch Koamplifikation mit einer Sequenz des DQ alpha locus der HLA-Region. Für unsere Überlegungen ist es nicht von Relevanz, ob es sich um RNA oder DNA handelt, denn RNA muß praktisch immer zuerst durch reverse Transkription (RT) in DNA umgewandelt werden, um eine PCR durchzuführen.

Bei einer kompetitiven PCR gibt es zusätzlich zur *target*-DNA-Region eine zweite DNA-Sequenz (der sogenannte Standard), welche gleichzeitig in dem gleichen Reaktionsansatz amplifiziert wird. In den frühen Arbeiten über qPCR wurde oft ein endogenes *housekeeping gene* koamplifiziert. Später ging man meist zu künstlich hergestellten Fragmenten über.

Man amplifiziert eine *target*-DNA gleichzeitig mit einem Standard. Dieser Standard muß gut von den Produkten der *target*-DNA separierbar sein. Dies wird meistens durch eine identische Sequenz mit einer künstlich eingebauten Deletion oder Insertion von einigen Basenpaaren erreicht. Dann lassen sich die DNA-Fragmente z.B. über ein Gel durch Laufzeitunterschiede auftrennen. Die Menge der zugesetzten Standard-DNA kann dann so variiert werden, daß in etwa gleiche Mengen an *target*-Produkt als auch Standard-Produkt entstehen. Unter der Voraussetzung, daß beide nur geringfügig unterschiedliche Fragmente mit einer vergleichbaren Effektivität amplifiziert werden, kann man sagen, daß beide in dergleichen Menge vor der PCR vorhanden waren. Diese Aussagen müssen mit bestimmten Plotmethoden überprüft werden, damit man von einer gewissen Zuverlässigkeit dieser Methode ausgehen kann. Zu diesem Thema wurde mittlerweile eine Anzahl von theoretischen Ansätzen publiziert. (Raeymaekers, 1993; Connolly et al., 1995).

Heute ist es *common sense* bei der kompetitiven PCR, daß die Fragmente identische Primerbindungsstellen haben und artifizielle Fragmente benutzt werden.

1.4.4 Die Messwertbestimmung von PCR-Produkten (Quantifizierung)

Zur Bestimmung von Messwerten aus den PCR-Produkten gibt es verschiedene Verfahren mit unterschiedlichen Vorteilen und Problemen. Insgesamt gibt es auch im Forschungsbereich eine Tendenz zu toxikologisch unbedenklichen Verfahren, die dennoch durch gleichzeitig verbesserte Techniken immer sensitiver werden.

1.4.4.1 Radioaktivität

Eine der ersten Methoden zur Quantifizierung war die Verwendung von Radioaktivität. Am einfachsten ist die Zugabe einer geringen Menge eines radioaktiven dNTPs zur PCR. Das Nukleotid wird während der PCR in das Produkt eingebaut. Über einen Szintillationszähler kann die Radioaktivität danach gemessen werden (Seibel, et al., 1991 a). Von der Verwendung von Radioaktivität ist man heute eher abgekommen. Nicht-radioaktive Methoden sind von vergleichbarer Qualität und umgehen das umständliche *handling* sowie die Entsorgung.

1.4.4.2 Antikörper

Alard stellt 1993 eine qPCR-Methode vor, welche biotinylierte Primer verwendet. Diese werden dann über einen ELISA optisch quantifiziert. Sie konnten bis zu 16 pg eines 250 bp-Fragmentes nachweisen.

1.4.4.3 Quenching

Bei der *real time* qPCR wird durch einen Primer ein Fluoreszenzfarbstoff in das PCR-Produkt eingebaut. An seinem 5'-Ende hat der Primer einen Quencher räumlich nahe zu einem Fluoreszenzfarbstoff. Nach dem Einbau des Primer liegen die beide noch eng zusammen. Es kann noch keine Fluoreszenz nachgewiesen werden. Bei dem folgenden Zyklus wird das 5'-Ende des Primers in den neusynthetisierten Bereich mit eingeschlossen und somit entfaltet. Jetzt liegen Quencher und Fluoreszenzfarbstoff räumlich getrennt vor. Fluoreszenz ist nachweisbar.

Der große Vorteil ist das sofortige Messergebnis ohne die PCR unterbrechen zu müssen. Nachteilig erweisen sich jedoch die speziellen notwendigen Apparaturen.

1.4.4.4 Anfärbung durch Fluoreszenzfarbstoffe

Die Auftrennung verschiedener DNA-Fragment mit Hilfe eines Gels und anschließende Färbung mit einem Fluoreszenzfarbstoffs, meist Ethidiumbromid, ist heute eine molekularbiologische Standardmethode. Sie eignet sich zum Vergleichen etwa gleicher, großer Mengen an DNA. Diese Methode kann einfach zur Bestimmung bei der kompetitiven PCR eingesetzt werden (Chehadeh et al., 1995). Wegen der mangelnden Sensitivität kann sie jedoch nicht zur Bestimmung von PCR-Produkten bei der kinetischen PCR eingesetzt werden.

2 Zielsetzung

Das Ziel der Doktorarbeit stellt die Quantitierung mitochondrialer DNA und ihrer Mutation dar. Um dieses Ziel zu erreichen wird eine neue Methode entwickelt, die aufgrund neuer technischer Voraussetzungen eine nicht radioaktive Quantitierung und Auswertung von PCR Produkten erlaubt. Die technische Entwicklung dieser Methode umfaßt vielfältige Bereiche, die in dieser Arbeit behandelt werden.

Als erstes sollte ein PCR-Verfahren etabliert werden, welches zur Quantitierung geeignet ist. Der nächste Schritt bestand in der Etablierung eines Auftrennungs- und Detektionssystems mit dem neuen Farbstoff SYBR Green I, welcher die wesentlich schwerer zu handhabende radioaktive Methode ablösen soll. Die Auswertung sollte mit dem *Public domain*-Programm NIH Image erfolgen. Dieses kostenlos über das Internet vertriebene Programm leistet erstaunliches, wies jedoch bei Benutzung einen Fehler in der Makrosprache auf, welcher eliminiert wurde. Das System sollte so standardisiert werden, daß es auch durch andere Labors benutzt werden kann.

3 Material

Alle nicht gekennzeichneten Reagenzien haben einen Reinheitsgrad der *pro analysi* oder speziell für molekularbiologische Zwecke entspricht.

Alle selbsthergestellten Lösungen wurden bei 134°C, 2 bar für 20 min sterilisiert. Ausgenommen sind natürlich jede Art von Enzymen oder Substanzen biologischen Ursprung, soweit nicht anders vermerkt.

3.1 Enzyme

Proteinase K	Boehringer, Mannheim
RNase A	Boehringer, Mannheim
Vent [®] Polymerase (exo ⁻)	New England Biolabs, Schwalbach

3.2 Restriktionsenzyme

<i>Bam</i> HI	USB, Braunschweig
<i>Pvu</i> II	USB, Braunschweig

3.3 Kits

<i>Jetsorb Gel Extraction Kit</i> [®]	Genomed, Oeynhausen
<i>Qiagen PCR Purification Kit</i> [®]	Diagen, Hilden
<i>Qiagen Plasmid Mini/Midi/Maxi Kit</i> [®]	Diagen, Hilden
<i>Qiaquick-spin PCR Purification Kit</i> [®]	Diagen, Hilden
ECL [®] direct nucleic acid detection system	Amersham, Buckinghamshire, England

3.4 Membranen und spezielle Papiere

Nylon Membran	ICN, Biomedicals, Eschwege
Whatmann-Papier	ICN, Biomedicals, Eschwege

3.5 DNA-Längenmarker

λ -Phage	New England Biolabs, Schwalbach
Φ X174, <i>Hae</i> III behandelt	New England Biolabs, Schwalbach
<i>DNA mass ladder</i>	Gibco BRL, Karlsruhe

3.6 Vektoren und Bakterienstämme

pBluescript KS + [®]	Stratagene, Heidelberg
<i>E. coli</i> JM109	Stratagene, Heidelberg

3.7 Reagenzien zum Ansetzen von Lösungen

Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat	Riedel-de-Haen, Hannover
Bacto-Trypton	Difco, Detroit (USA)
Bacto-Agar	Gibco, Karlsruhe
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Bromkresylblau	Serva, Heidelberg
BSA	New England Biolabs, Schwalbach
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Diethylether	Merck, Darmstadt
EDTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Gibco, Karlsruhe
IPTG	Serva, Heidelberg
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt

Magnesiumsulfat (steril)	New England Biolabs, Schwalbach
Mineralöl	Sigma, Deisenhofen
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitratdihydrat	J.T. Baker, Deventer, Holland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat	Merck, Darmstadt
Nukleosidtriphosphate	Boehringer, Mannheim
Pepton 140	Gibco, Karlsruhe
Phenol (equilibriert mit TE)	Roth, Karlsruhe
Tris-Puffersalz	Roth, Karlsruhe
ultrapure [®] Agarose	BRL, Karlsruhe
X-Gal	Serva, Heidelberg
Xylencyanol FF	Serva, Heidelberg

3.8 DNA-Präparationspuffer

Homogenisierungspuffer I

55 mM Dextrose
25 mM EDTA
20 mM HEPES
5 mM KCl
137 mM NaCl
0,9 mM Na₂HPO₄
mit HCl auf pH 7.1 einstellen
steril filtrieren, nicht hitzesterilisieren!

Homogenisierungspuffer II

10 mM EDTA
10 mM HEPES
1% SDS (w/v)
mit NaOH auf pH 7.4 einstellen
steril filtrieren, nicht hitzesterilisieren!

Proteinase K- Stammlösung

20 mg/ml Proteinase K
Sofort bei -20°C lagern

10 xTE-Puffer

10 mM Tris
1 mM EDTA
auf pH 8,0
bei 121°C sterilisieren

3.9 PCR-Puffer und -stammlösungen**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

3.10 Restriktionspuffer**10x High-Puffer (USB)**

1 M Natriumchlorid
100 mM Magnesiumchlorid
10 mM Dithiothreitol
500 mM Tris-HCL
auf pH 7,5 einstellen

10x Medium-Puffer (USB)

500 mM Natriumchlorid
100 mM Magnesiumchlorid
10 mM Dithiothreitol
100 mM Tris-HCl
auf pH 7,5 einstellen

10x Low-Puffer (USB)

100 mM Magnesiumchlorid
10 mM Dithiothreitol
100 mM Tris-HCL
auf pH 7,5 einstellen

3.11 Gele, Auftragspuffer und Färbereagenzien**6x Auftragspuffer**

2,5 mg Bromphenolblau
2,5 mg Xylencyanol FF
300 - 600 µl Glycerin
ad 1 ml mit 10x TBE-Puffer auffüllen

6x Auftragspuffer Bromkresylblau

0,25 mg Bromkresylblau
600 µl Glycerin
ad 1 ml mit 10x TBE-Puffer auffüllen

Ethidiumbromid-Stammlösung

10 mg/ml Ethidiumbromid

10x TBE-Puffer für Agarosegele

890 mM Tris
890 mM Borsäure
20 mM EDTA
auf pH 8,0 bis 8,3 einstellen

3.12 Oligonukleotide für die PCR

Primer	5'Ende	3'Ende	bp	T _S	Sequenz	Restr.Site
ATPfor	8282	8305	24	76	CCCCTCTAGAGCCCACTGTAAAGC	---
8421for	8421	8440	20	58	CAGTATTCCTCATCACCCAA	---
8620for	8620	8657	18	56	CCCACCTCCAAATATCTC	---
8865for	8865	8882	18	56	GATTATAGGCTTTCGCTC	---
9361rev	9361	9343	19	64	AGTGTGTTGGTTAGTAGGC	---
9.6for	9618	9635	18	54	CTCGCATCAGGAGTATCA	---
COllrev	10107	10088	30	62	CCACaagctt-GTAGTAAGGCTAGGAGGGTG	<i>Hind III</i>
689 LM5	10728	10712	17	52	GGCCATATGTGTTGGAG	---
13647rev	13647	13631	17	54	GAAGCGAGGTTGACCTG	<i>Hinc II</i>
13774rev	13795	13775	21	62	TTAGGTAGAGGGGATTGTTG	---
13917rev	13917	13901	15	50	TCCGAGTATGTTGGAGA	---
282851B	15553	15569	17	50	GCCCGAATGATATTTCC	---
DLoop1	16547	16527	31	64	CCACaagcttGGAACGTGTGGGCTATTTAGG	<i>Hind III</i>

Tabelle 2: Liste der verwendeten Primer

3.13 Nährmedien und Klonierungsreagenzien

Ampicillin-Stammlösung (10 mg/ml)

10 mg/ml Ampicillin in 1 M NaOH lösen
steril filtrieren

IPTG-Stammlösung

0,1 M IPTG
steril filtrieren
bei -20°C aufbewahren

X-Gal-Stammlösung in DMF

2% X-Gal
mit DMF lösen

LB-Medium

10 g NaCl
10 g Pepton

5 g Hefeextrakt
10 ml 1 M MgSO₄
5 ml 1 M NaOH
ad 1 l mit ddH₂O auffüllen
sofort sterilisieren

LB-Agar

zu 1 l LB-Medium 12 g Agar Agar hinzufügen
sofort sterilisieren

LB Selektivagar mit Ampicillin

frisch sterilisiertes LB-Agar auf 40-50°C abkühlen lassen
mit steril filtriertem Ampicillin-Stammlösung auf 50µg/ml Ampicillin
einstellen

LB Selektivagar mit Ampicillin und X-Gal zur Blau-Weiß-Selektion

1 l frisch sterilisiertes LB-Agar auf 40-50°C abkühlen lassen
mit steril filtriertem Ampicillin-Stammlösung auf 50µg/ml Ampicillin
einstellen
2 ml 2% X-Gal-Stammlösung hinzufügen
0,4 ml 0,1 M IPTG (steril filtriert) hinzufügen

3.14 Southern Blot und Hybridisierung

Denaturierungslösung

0,5 M NaOH
1,5 M NaCl

Neutralisierungslösung

1,5 M NaCl
0,5 M Tris
1 mM EDTA
mit HCl auf pH 7.5 einstellen

20x SSC

175,32 g NaCl

88,23 g Na-Citrat x 2 H₂O

ad 1 l mit ddH₂O auffüllen

mit Zitronensäure auf pH 7.1 bis 7,2 einstellen

3.15 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Centricon [®] Microconcentrator	Amicon, Witten
Cups	Eppendorf, Hamburg
DNA Thermal Cycler	Perkin Elmer, Überlingen
Elektrophoreseapparatur	Institutswerkstatt Eppendorf, Hamburg
Frame grabber LG3-01	Scion Corporation, Frederick, USA
Hochspannungstransformator	Biotec-Fisher, Reiskirchen
Kamera <i>Cybertech CS-1</i>	Cybertech, Berlin
Kamera VarioCam	Froebel, Konstanz
Laborautoklav Sanoklav	Wolf, Geislingen
Macintosh Computer LC II	Macintosh, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Schüttelinkubator Certomat [®]	Braun, Melsungen
Speed Vac Concentrator	Bachhofer, Reutlingen
Sterilfiltrationsfilter	Schleicher & Schüll, Dassel
Tischzentrifuge	Hettich, Tuttlingen
Transilluminator Ru-Ve 42 (366 nm)	Vetter, Wiesloch
Transilluminator Vilbert (302 nm)	Bachhofer, Reutlingen
Verstellbare Pipetten	Abimed, Düsseldorf
Vortex-Mixer	Bender & Hobein AG, Zürich
Zentrifuge	Heraeus-Christ, Osterrode
Zweistrahlfotometer Uvikon 810	Kontron, Offenbach

4 Methoden

4.1 Isolierung und Aufreinigung von DNA

4.1.1 Isolierung von mtDNA aus Geweben nach Wallace

Autopsie- und Biopsie-Proben werden nach der Präparationsmethode von Wallace (1988) aufbereitet. Die in flüssigem Stickstoff gefrorenen Biopsie-Proben wurden mit einem Mörser pulverisiert. Zu ca. 10-30 mg des Pulvers wurden 300 µl Homogenisierungspuffer I hinzugegeben und in einem Eppendorf-Cup mit einem Teflonstempel gepottert. Anschließend wurden 300 µl Homogenisierungspuffer II hinzugegeben und kräftig geschüttelt. Die Suspension wurde 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 190 µl 4 M Natriumchlorid-Lösung wurde kurz geschüttelt und für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach 5-minütigem zentrifugieren wurden die Gewebstrümmer verworfen und der Überstand weiter verarbeitet. Zum Entfernen der Proteine wurden 15 µl 25%-ige SDS-Lösung (Endkonzentration 0,5%) und 7,7 µl 1%-ige Proteinase K-Lösung (Endkonzentration 100 mg/ml) hinzugegeben. Dieser Verdau wurde mindestens für 4 h bzw. über Nacht bei 55°C inkubiert. Danach noch vorhandene Gewebereste wurden erneut abzentrifugiert. Es wurde zweimal mit 1 ml Phenol emulgiert und 15 min abzentrifugiert. Der Phenolüberstand wurde verworfen. Danach wurde mit 1 ml Chloroform das noch vorhandene Phenol extrahiert. Die DNA wurde aus dem wässrigen Überstand mit einer Ethanol-Fällung aufgearbeitet und gereinigt (s. unten). Die bei Raumtemperatur getrocknete RNA wurde in 50 µl TE-Puffer resuspendiert.

4.1.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* mit dem *Qiagen Plasmid Mini Kit*

Aus 2 ml einer ÜK (Übernachtskultur) von *E. coli* im Ampicillin-LB-Medium wird durch Zentrifugation für 5 min bei 4000 rpm ein Bakterien-Pellet gewonnen. Das Bakterien-Pellet wird in 0,3 ml des Qiagen Puffers P1 vollständig resuspendiert. Nach der Zugabe von 0,3 ml Qiagen Puffers P2 wird vorsichtig umgerührt und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Auf Eis gekühlter Qiagen Puffer P3 wird hinzugesetzt, vorsichtig gemischt und auf Eis für 10 min inkubiert. Danach wird der bei 10 000 rpm (15 min) abzentrifugiert. Der Überstand wird in einer Qiagen Tip 20-Säule (äquilibriert mit 1 ml Puffer QBT) aufgetragen und ohne Druck durch die Säule fließen gelassen. Die Qiagen-Säule wird viermal mit 1 ml Qiagen Puffer QB gewaschen. Anschließend wird die DNA mit 0,8 ml Qiagen Puffer QF eluiert. Die DNA wird mit der Isopropanol-Fällung aufgereinigt. Nach der Lufttrocknung wird die DNA in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

4.1.3 Präparation von PCR-Produkten aus PCR-Ansätzen mit dem *QIAquick-spin PCR Purification Kit*

Diese Aufarbeitungsmethode dient zur Trennung von Primern, Nukleotiden und Polymerase von dsDNA oder ssDNA aus PCR-Ansätzen.

Zu dem mit Chloroform gereinigten wässrigen PCR-Ansatz werden 5 Vol. von Qiagen Puffer PB hinzugesetzt. Die Lösung wird zu einer *QIAquick-spin*-Säule hinzugegeben und 30 - 60 s in der Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Danach wird die *QIAquick spin*-Säule mit 0,25 ml Qiagen Puffer PE erneut gefüllt und 30 - 60 s zum Waschen zentrifugiert. Zur vollständigen Entfernung des Qiagen Puffer PE wird in einem neuen 1,5 ml Mikrozentrifugen-Tube für 30-60 sek zentrifugiert. Die DNA wird durch Zugabe von 50 µl TE-Puffer bei einer Zentrifugation von 30 - 60 s eluiert. Eine anschließende Fällung ist nicht mehr nötig.

4.1.4 Präparation von PCR-Produkten aus Agarosegelen mit der Jetsorb-Methode

Wie in der vorhergehenden Methode beschrieben, wird ein Gelstück ausgeschnitten. Pro 100 mg Gel werden je 10 µl der Jetsorb-Suspension und 300 µl des Jetsorb Puffers A1 hinzugegeben. Es wird bei 50°C für 50 min inkubiert und zur vollständigen Auflösung alle 3 min kurz kräftig gemischt. Die Suspension wird anschließend 1 min zentrifugiert, das Pellet wird durch dekantieren vom Überstand befreit und einmal mit 200 µl Jetsorb Puffer A1 gewaschen. Ein zweiter Waschschrift wird mit 300 µl rekonstituiertem Jetsorb Puffer A2 durchgeführt. Der Puffer wurde durch Zentrifugation (1 min, 12.000 rpm) und anschließendes Dekantieren entfernt. Dieser Schritt konnte bei Bedarf zweimal wiederholt werden. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet luftgetrocknet und anschließend in 20 µl TE-Puffer resuspendiert. Eine 30-minütige Inkubation bei 50°C führte die DNA in die wässrige Lösung über. Diese Elution der Jetsorb-Suspension konnte bei Bedarf zur Gewinnung von mehr DNA bis zu 2 mal wiederholt werden.

4.1.5 Aufreinigung und Fällung von DNA aus Lösungen

4.1.5.1 Ethanol-Fällung von DNA

Zum Fällern und Aufreinigen der DNA wird die entsprechende Lösung mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 3 Vol. absolutem Ethanol versetzt. Die Fällung erfolgt durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff oder 30 min Inkubation bei -70°C auf Trockeneis. Anschließend wird die gefällte Probe in der Zentrifuge (15.000 g, 15 min) abzentrifugiert. Der ethanolische Überstand wird verworfen, das Pellet mit 70%igem Ethanol erneut gewaschen und zentrifugiert (15.000 g, 15 min). Das Pellet wird nach Entfernen des ethanolischen Überstandes bei RT getrocknet und anschließend in einer adäquaten Menge TE-Puffer aufgenommen.

4.1.5.2 Isopropanol-Fällung

Die DNA-Lösung wird mit 0,7 Vol. Isopropanol bei RT gefällt. Es wird sofort bei 10 000 g für 30 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig dekantiert. Danach wurde mit 1 ml von kaltem 70%igem Ethanol gewaschen und erneut bei 10.000 g 15 min abzentrifugiert. Das vom Überstand befreite Pellet wurde für 5 min luftgetrocknet und in einer gewünschten Menge TE-Puffer aufgenommen. Zu langes Trocknen der DNA sollte bei den Ethanol- bzw. Isopropanol-Fällungen vermieden werden, da das Wiederauflösen der DNA in Puffer dann schwierig wird.

4.2 Auftrennung der DNA durch Agarosegelelektrophorese

Eine 1%ige (w/v) Mischung von Agarose in TBE-Puffer wird kurz aufgekocht und nach dem Abkühlen auf 40 - 50°C 1 µl Ethidiumbromid-Lösung pro 10 ml Gel hinzugefügt. Die so vorbereitete Lösung wird in die saubere Elektrophoreseapparatur gegossen und eine Taschenschablone auf die Kathodenseite eingehängt. Nach dem Erkalten des Agarosegels wird die Taschenschablone entfernt und das Gel mit TBE-Puffer überschichtet.

Die zu untersuchende DNA-Lösung wird mit einem Sechstel des 6x Auftragspuffer gemischt und vorsichtig in die dafür vorgeformten Taschen eingefüllt.

Die Elektrophorese wird unverzüglich mit einer Spannung von 60 - 100 V gestartet. Nachdem die Farbstoffe eine empirisch ermittelte Strecke auf dem Gel weitergewandert sind, ist die Elektrophorese beendet.

4.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die bei der PCR verwendeten Primer und die entsprechende Annealingtemperatur werden jeweils explizit angegeben, die sonstigen Parameter werden nur angegeben, wenn sie vom Standardprotokoll abweichen.

4.3.1 Amplifikation durch PCR

Die Reagentien werden nach folgendem Schema gemischt und in einem PCR-Zykler dem unten genannten Temperaturprotokoll unterzogen.

ddH ₂ O	70µl	
10x Vent-Puffer	10µl	
dNTP (je 2 mmol dNTPµl)	10µl	
Mg ²⁺ Lsg. (100 mmol/µl)	2µl	
Primer A (10 pmol/µl)	3µl	
Primer B (10 pmol/µl)	3µl	
Vent-Polymerase (Exo ⁻)	1µl	
DNA (100 ng/µl bei 260 nm)	1µl	
Prädenaturierung	94°C	300 s
Zyklusanzahl	1	
Denaturierung	94°C	45 s
Annealing	Variabel	45 s
Elongation	72°C	45 s
Zyklusanzahl	30	

4.3.2 Primer-Shift-PCR

Bei der Primer-Shift-PCR macht man sich den Effekt zunutze, daß kleinere PCR-Fragmente bevorzugt amplifiziert werden. Setzt man Primer ein, die eine Deletion einschließen, so wird das deletierte Fragment gegenüber dem Wildtyp verstärkt amplifiziert. Dieser Effekt wird desto stärker, je größer die Deletion ist. Die Spezifität dieser Reaktion kann auch durch die Veränderung der Elongationszeit beeinflusst werden. Kürzere Elongationszeiten führen zu einer verstärkten Amplifikation der kleineren Fragmente. Man kann bei extrem unterschiedlichen PCR-Fragmentlängen wie z. B. die *common deletion* durch Steuerung der Elongationszeit eine fast reine Ausbeute von der *common deletion* DNA erreichen.

4.3.3 Allelspezifische PCR oder Punktmutationsspezifische PCR (PSPCR)

Bei der PSPCR nutzt man die Tatsache, daß beim Primer-Design eine entscheidende Bedeutung der letzten Base am 3'-Ende des Primers zukommt. Wird die Sequenz des Primers durch die Sequenz der mutierten DNA bestimmt, so findet unter bestimmten Bedingungen fast ausschließlich eine Amplifikation der mutierten DNA statt. Wichtig für die Zuverlässigkeit der Reaktion ist eine korrekt gewählte Annealingtemperatur. Wie Rieger et al. (1991) zeigen konnten, führt eine zu niedrig gewählte Annealingtemperatur zur Amplifizierung von sowohl Wildtyp als auch mutierter DNA, eine zu hohe Annealingtemperatur verhindert jede Amplifizierung. Da das Annealing dem Massenwirkungsgesetz folgt, kann eine Zuverlässigkeit der Methode nur erreicht werden, wenn die PCR nach empirisch bestimmten Protokollen exakt durchgeführt wird. Folgende Faktoren spielen eine große Rolle bei der allelspezifischen PCR. Annealingtemperatur des Mutationsprimers:

- ◆ Stringenz des *mismatches* zwischen Punktmutation und 3'Ende des Mutationsprimers.
- ◆ Stringenz des Mismatches der benachbarten Nukleotide bzw. Einfügen weiterer Fehlpaarungen in Nachbarschaft zum 3'Ende des Primers
- ◆ dNTP Konzentration
- ◆ MgCl₂ Konzentration
- ◆ *Target*-DNA-Menge

Wichtig zur Kontrolle der Ergebnisse ist es, immer Negativ- und Positivkontrollen in demselben Reaktionsablauf mitzubestimmen. Nur so kann eine relative Sicherheit dieser, zu falsch positiven Ergebnissen neigenden Methode, erreicht werden.

4.4 Modifizierung der DNA durch Enzyme

4.4.1 Restriktionsendonukleasespaltung

Um DNA präparativ oder analytisch zu spalten, wurde folgendes Protokoll benutzt:

- ◆ 12 µl ddH₂O

- ◆ 5 µl 10x Restriktionspuffer
 - ◆ 30 µl DNA-Lösung (10-30 ng/µl)
 - ◆ 3 µl Restriktionsendonuklease (10 U/µl).
-
- | | | |
|-------------------------|------|--------|
| ◆ Reaktionsbedingungen: | 37°C | 4 h |
| ◆ Hitzeinaktivierung | 95°C | 15 min |

Der Reaktionspuffer wurde den entsprechenden Angaben der Enzym-Hersteller benutzt. Die Restriktionsendonukleasen wurden durch Einwirkung von Hitze anschließend gleich inaktiviert.

4.5 Klonierung

4.5.1 Verwendete Vektoren und Bakterien-Stämme

Als Klonierungsvektor wurde pBluescript KS+ verwendet. Ein geeigneter Bakterienstamm für diesen Vektor ist *E. coli* JM 109. In diesen *E. coli*-Bakterienstämmen vermehrt sich pBluescript Vektor-DNA mit einer hohen Replikationsrate

4.5.2 Anlegen der Bakterienkulturen

Zum Anlegen der Bakterienkultur wurden LB-Medium oder LB-Agar mit bzw. ohne Ampicillin verwendet, je nachdem ob die Bakterienstämme resistenten Vektor enthielten oder nicht. Zuerst wurde von der Stocklösung der *E. coli*-Kulturen eine Übernachtskultur angesetzt, die am nächsten Tag auf LB-Agar-Platten ausgestrichen wurde. Eine einzelne Kolonie wurde gepickt und in LB-Medium angezogen. Aus dieser Kultur konnte nun der Vektor pBluescript wie oben beschrieben isoliert werden.

4.5.3 Herstellung von transformationskompetenten *E. coli* Zellen mit der Calciumchlorid-Methode

20 ml LB-Medium wurden mit 200 µl ÜK angeimpft. Unter Schütteln wurde bei 37°C bis zum Erreichen einer OD_{578nm} 0,5 inkubiert. Die Zellsuspension wurde in ein vorgekühltes SS-34-Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min bei 8000 rpm (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellsediment in 20 ml eiskaltem 0,1 M Magnesiumchlorid resuspendiert. Erneut wurde zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen in 10 ml eiskaltem 0,1 M Calciumchlorid resuspendiert. Die Suspension wurde 30 min auf Eis inkubiert und erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder dekantiert, die Zellen in 1 ml eiskaltem 0,1 M Calciumchlorid resuspendiert und für mindestens 2 h auf Eis belassen, bevor sie zur Transformation eingesetzt wurden.

4.5.4 Transformation von *E. coli* mit pBluescript

200 µl kompetente Zellen wurden in einem 1,5 ml Eppendorf-Cup mit 50 ng Vektor-DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde 2 min in einem 42°C Wasserbad inkubiert. Es wurde 1 ml LB-Medium hinzugegeben und 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Es wurden je 5 mal 200 µl Medium auf einer LB-Selektivagarplatte ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.5.5 Herstellen der LB-Selektiv-Agarplatten mit Ampicillin, IPTG und X-Gal zur Blau-Weiß-Selektion

Steriles LB-Agar wird kurz aufgekocht und auf 40 - 50°C abgekühlt. Es wird mit steril filtrierter Ampicillin-Stammlösung auf 50 µg/ml Ampicillin eingestellt. Zu diesem Medium werden 2 ml 2% X-Gal-Stammlösung und 0,4 ml 0,1 M IPTG (steril filtriert) pro Liter Lösung hinzugefügt.

Auf diesem Agar gewachsene Klone werden nach der Blau-Weiß-Selektion ausgewählt. Durch das Ampicillin im Agar können nur Keime wachsen, die mit pBluescript transfiziert waren und das darin enthaltene Gen für Ampicillinresistenz tragen. Der *E. coli*-Stamm JM 109 ist nicht in der Lage β -Galaktosidase ohne

pBluescript zu synthetisieren. Wird nun pBluescript in die *E. coli* eingebaut, wurde die β -Galaktosidase exprimiert und X-Gal zu einem blauen Indigo-Derivat gespalten. Die selektierten Keime wurden in Ampicillin-LB-Medium angezogen und nach der weiter oben beschriebenen Plasmid-Präparation aufgearbeitet.

4.6 Southern Blot

DNA (Präparation nach Wallace) wird in unterschiedlichen Ansätzen mit *Pvu* II und *Bam* HI geschnitten. In einem 0.5%-igen Agarosegel werden 10 μ g der Verdauung zwölf Stunden lang bei 40 V elektrophoretisch aufgetrennt.

Die DNA im Agarosegel wird dreimal je 20 min mit den beschriebenen Denaturierungs- und 15 min mit der Neutralisierungslösung behandelt. Eine genau zurechtgeschnittene Nylonmembran wird mit 2*SSC-Puffer befeuchtet und blasenfrei auf das Agarosegel gelegt. Unterhalb des Gels befinden sich mehrere Lagen Whatman-Papier, die in eine Schale mit 10x SSC hineinragen. Oberhalb der Nylonmembran befinden sich in 2x SSC-getränkte Whatman-Papiere, die mit einer dicken Schicht trockenem Whatman-Papier bedeckt und mit einem Gewicht beschwert sind. Es werden nun mindestens vier Stunden bzw. über Nacht inkubiert. Der Konzentrationsgradient der SSC-Lösungen läßt die DNA in die Nylonmembran wandern. Dort wird sie von der Nylonmembran nicht-kovalent gebunden. Die Nylonmembran wird zwischen zwei trockenen Saugpapieren bei 80°C im Vakuumofen gebacken und anschließend 3 min. UV-Licht behandelt, um die DNA an der Nylonmembran zu fixieren.

4.6.1 Markierung und Hybridisierung der DNA mit dem ECL-Kit

Zur Herstellung einer spezifischen mtDNA-Sonde wird mit den Primern DLoop1 und 282851B eine PCR durchgeführt und anschließend mit dem *PCR quick spin purification kit* aufgereinigt. Um ssDNA zu erhalten, wurden 20 μ l der auf 10 μ g/ μ l eingestellten Lösung für 5 min auf 100°C erhitzt und sofort auf 0°C abgekühlt. Die ssDNA wurde mit 20 μ l des ECL-*labelling*-Reagenzes gemischt. Um die Reagenzien kovalent an die DNA zu binden, wurden 20 μ l 25% Glutaraldehyd-Lösung hinzugefügt,

geschüttelt und kurz zentrifugiert. Die Lösung wurde 10 min bei 30°C inkubiert und war danach einsatzbereit.

Die Blotmembran wurde mit der Prähybridisierungslösung für 1 h bei 42°C inkubiert. Danach wurde die vorbereitete DNA-Sonde hinzugegeben und über Nacht bei 42°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Blotmembran wurde zweimal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend zwischen Filterpapier kurz abgetrocknet. Nach einer Inkubation mit der frisch bereiteten Färbelösung (I und II im Verhältnis 1:1) für 1 min wurde die Membran in Folie gewickelt und die Reaktion durch einem exponierten Film sichtbar gemacht.

4.7 Quantifizierung von DNA in 1D-Gelen durch das Programm NIH Image mit den *gel plotting macros*

Vom National Institute of Health in Maryland (NIH; Bethesda, USA) wird über das Internet der Forschergemeinde ein kostenloses Programm zur Bildbearbeitung und -analyse zur Verfügung gestellt. Innerhalb dieses Programmes ermöglicht es eine sogenannte Makro-Schnittstelle eigene Programmteile zu integrieren. Dies geschieht in Form von Makros. Für viele Zwecke gibt es schon vorgefertigte Makros auf dem Internet-Server des NIH. Diese können auch von Nichtprogrammierern einfach angewendet werden, haben aber den Vorteil, daß sie bei Bedarf durch jedermann gelesen und verändert werden können, einfache Programmierkenntnisse vorausgesetzt. NIH Image verwendet eine Makrosprache, die der Programmiersprache Pascal sehr ähnlich ist.

NIH Image ermöglicht es mit den *gel plotting macros* eine Quantifizierung von eindimensionalen Gelaufnahmen. Nach dem Laden der Makros wird die erste Spur, welche quantifiziert werden soll, mit dem Cursor umrahmt. Dies wird als *region of interest* (ROI) bezeichnet. Danach wird im Menü der Befehl Special|Mark First Lane aufgerufen, um die erste zu vermessende Spur auf der Gelaufnahme vorzubereiten. Das Makro erzeugt daraufhin einen Bildausschnitt in einem neuen Fenster, in dem die ROI auf der linken Seite liegt (Abbildung 3) und schwarz eingerahmt ist. Danach werden weitere Spuren durch Verschieben der ROI markiert und der Makrobefehl Special|Mark Next Lane aufgerufen. Die entsprechenden ROIs werden zur Kontrolle schwarz umrahmt.

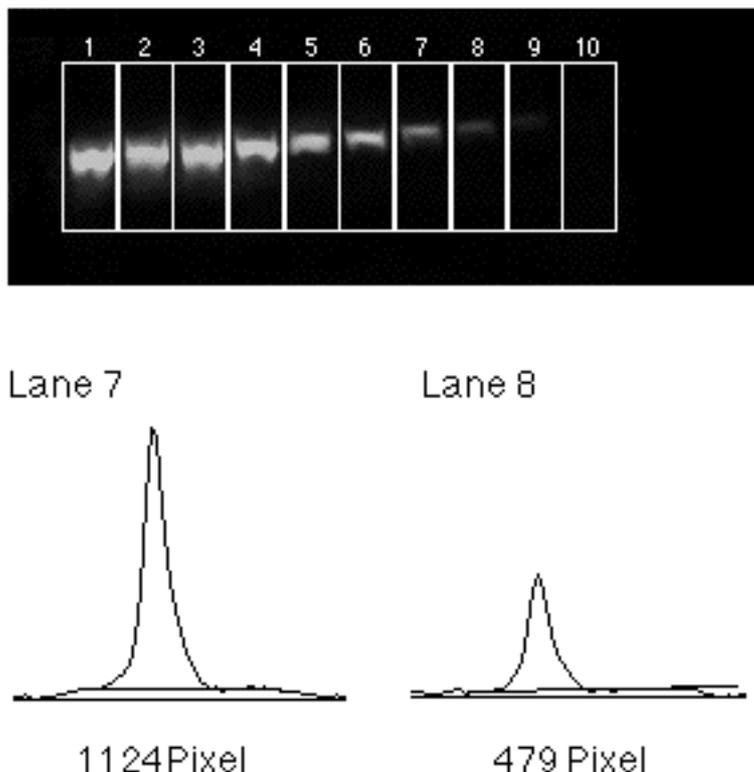


Abbildung 3: Vorgehen bei der Auswertung der Gelbanden mit einem Videokamera-Aufnahme durch NIH Image. Die einzelnen Banden wurden durch eine ROI (region of interest) markiert (obere Abbildung A) und dann die integrierte optische Densität mit den *gel plotting macros* dargestellt (untere Abbildung B). Durch eine manuell eingezogene Basislinie wurde der Hintergrund zeichnerisch eingezeichnet und mit dem sogenannten *wand tool* die Fläche innerhalb der Kurve berechnet (auch Abbildung B).

Nach dem Markieren aller Spuren (Abbildung 3 oben: A) wird der Makrobefehl *Special|Plot Lanes* aufgerufen. Das Makro öffnet ein neues Fenster und zeichnet Plots der gemittelten Leuchtstärke für jede markierte Bande untereinander ein (Abbildung 3 unten: B). Innerhalb dieses Plot-Fensters können nun individuell die jeweiligen Basislinien zur Subtraktion des Hintergrundes eingezeichnet werden; wie in Abbildung 3 schon geschehen. Danach werden die Flächen unterhalb der Kurve (*area under curve*, AUC) mit dem sogenannten *wand tool* vermessen, indem man in die Kurve mit dem *wand tool* "hineinklickt". Die Messwerte können mit dem Menübefehl *Analyse|Show Results* angezeigt werden.

Bei diesen verwendeten Makros wird aus dem Originalbild zuerst ein zweites Bild mit dem interessanten Ausschnitt kopiert. Die Bildwerte des Ausschnitts sind identisch mit

denen des Originals. In dem nächsten Schritt wird das Bild bereits aufgewertet und das Ergebnis in Form von Plots für die einzelnen markierten Spuren gezeigt. Die Plots zeigen die gemittelten Werte für die Leuchtstärke der einzelnen Banden. Sie sind somit schon aus dem Bild errechnete Werte und stellen nunmehr ein sekundäres Abbild dar.

In diesen Plots können nun die weiteren Funktionen, wie das manuelle Bestimmen des Hintergrundes durch Einzeichnen einer Basislinie und die integrierten Werte der Gesamtleuchtstärke einer einzelnen Bande durch Benutzung des *wand tool* erzeugt werden. Es handelt sich sozusagen um eine Zweischrittanalyse des Bildes, weil die Daten über einen zweiten Schritt und nicht aus den Rohdaten direkt die Messwerte ermittelt werden. Dies wird besonders betont, da später gezeigt wird, daß es einen unter bestimmten Bedingungen relevanten Fehler bei der Erzeugung des Plots gibt, der durch Änderung des *source code* eliminiert werden konnte.

5 Ergebnisse

Um eine neue Methode zur Quantifizierung zu beschreiben sind mehrere Arbeitsschritte notwendig. Die Auswertung kann nur gelingen, wenn die verschiedenen Arbeitsschritte in einer logischen Art und Weise aufeinander aufbauen. So ist es nicht möglich eine PCR-Reaktion auszuwerten, wenn man das entsprechende Computerequipment nicht funktionsfähig hat. Deshalb beginnt diese Arbeit nicht mit dem Design der PCR, sondern mit den Schritten, die notwendig sind, um eine quantitative Auswertung zu erreichen. Zuerst muß man über funktionierende Aufnahme und Auswertungstechniken verfügen. Im nächsten Schritt müssen die DNA-Fragmente so durch ein Gelsystem auftrennbar sein, daß sie mit einem funktionierenden Auswertesystem überhaupt beurteilbar sind. Das Design der PCR ist erst dann voll überprüfbar, wenn beide methodischen Schritte in die Routine übernommen werden können. Deshalb beginnt diese Arbeit mit der Etablierung eines Auswertesystems und geht erst später in den reinen molekularbiologischen Teil über. Mir erschien dies der vernünftigste Weg, wenn es auch den Leser zuerst etwas befremdet.

5.1 Videokamera

Zur Quantifizierung von PCR-Produkten werden Videoaufnahmen von Agarosegelen verwendet. Es wurden im Laufe der Zeit zwei verschiedene Systeme eingesetzt. Die Videokameras waren beide CCD-Kameras (charge couple device). CCD-Kameras haben eine hohe Sensitivität für Licht, jedoch erzeugen sie ein Rauschen in jeder Aufnahme.

Die zuerst zur Verfügung stehende Kamera war eine Cybertech CS-1. Sie wurde mit einem 9-Zoll Schwarz-Weiß-Monitor und einem ICC Computer zur Speicherung der Aufnahmen betrieben. Der Computer konnte die Aufnahmen durchnummeriert auf eine 3.5 Zoll Diskette als TIF-Dateien speichern. Die Auflösung beträgt 372 * 480 Pixel bei einer Bilddynamik von 256 Grautönen. Die Kamera komprimierte (verzerzte) automatisch die Bildhöhe um den Faktor 1,4.

Die später verfügbare Kamera war eine VarioCam, die über ein Videosignal (Rot-Kanal) über eine Scion LG 3 *frame grabber*-Karte mit einem Macintosh und einem

13 Zoll-Farbmonitor betrieben wurde. Die Auflösung war 768 x 512 Pixel bei einer Bilddynamik von 256 Grautönen. Diese Kamera verzerrte die Aufnahmen nicht.

Für Ethidiumbromid- und SYBR Green I-Färbungen standen jeweils verschieden farbige Spezialfilter für beide Kameras zur Verfügung.

5.1.1 Dynamik

Das erste Glied bei der quantitativen Auswertung von Gelaufnahmen spielt die Hardware der Videokamera. Filter, Objektiv und Kamera erzeugen ein Bild, welches die theoretischen Grenzen der Auswertung darstellen. Der richtige Filter ist von der Fluoreszenzfarbe des verwendeten Farbstoffsystems abhängig.

Korrekte Bilderzeugung setzt eine gute Kamera voraus. Eine entscheidende Größe ist die Dynamik der Kamera. Unter Dynamik versteht man den darstellbaren Bereich von Graustufen des Ausgangsmaterials bei einer Schwarz-Weiß-Aufnahme (S/W), wie hell und wie dunkel dürfen in einem Bild verschiedene Bildpunkte sein, damit sie die Kamera weder nur als weiß noch nur als Schwarz darstellt. Je weiter die darstellbaren Grauwerte auseinander liegen, desto besser sind auf einer normalen Fotografie sowohl Nuancen im Licht als auch im Schatten zu erkennen (Adams, A., 1981, S. 59 ff). Für die Quantifizierung stärker differierender Werte stellt die hohe Dynamik eine notwendige Bedingung da.

Die Steigung des linearen Anteil der von einem Schwarz-Weiß-Film dargestellten Schwärzung (bei einer Videokamera entsprechend die Helligkeit) versus den Logarithmus der Belichtung entspricht in der Photographie dem Begriff des c -Koeffizienten. Ist der lineare Bereich groß, spricht man von einer großen Dynamik.

Zum Testen der Dynamik einer Kamera kann man einen Graukeil aufnehmen. Aus Mangel an einem fotografischen Originalgraukeil wurde ein Graukeil mit Hilfe eines Druckers selbsthergestellt und digitalisiert (s. Abbildung 4). Der mittlere Keil in Abbildung 4 entspricht dem verwendeten Graukeil.

Die Kamera *Cybertech CS-1* konnte nur einen sehr geringen Bereich des Grauwertspektrums wiedergeben. Nur ein kleiner Bereich in der Mitte des Bildes zeigt Grauwerte, die wesentlich größeren äußeren Anteile zeigen nur Schwarz oder ein helles nuancen-armes Grau. Der dynamische Bereich dieser Kamera ist minimal.



Abbildung 4: Aufnahmen eines Graukeils zur Abschätzung der relativen Dynamik mit dem bloßen Auge. Der mittlere Graukeil (B) diente als Vorlage zur Aufnahme durch beide Kameras. Er stellt eine lineare Abstufung von weiß nach Schwarz dar. Er hat einen γ -Koeffizienten von 1 und eine Dynamik von 256 Graustufen. Der obere Keil (A) ist mit der VarioCam aufgenommen worden, der untere (C) mit der Cybertech CS-1.

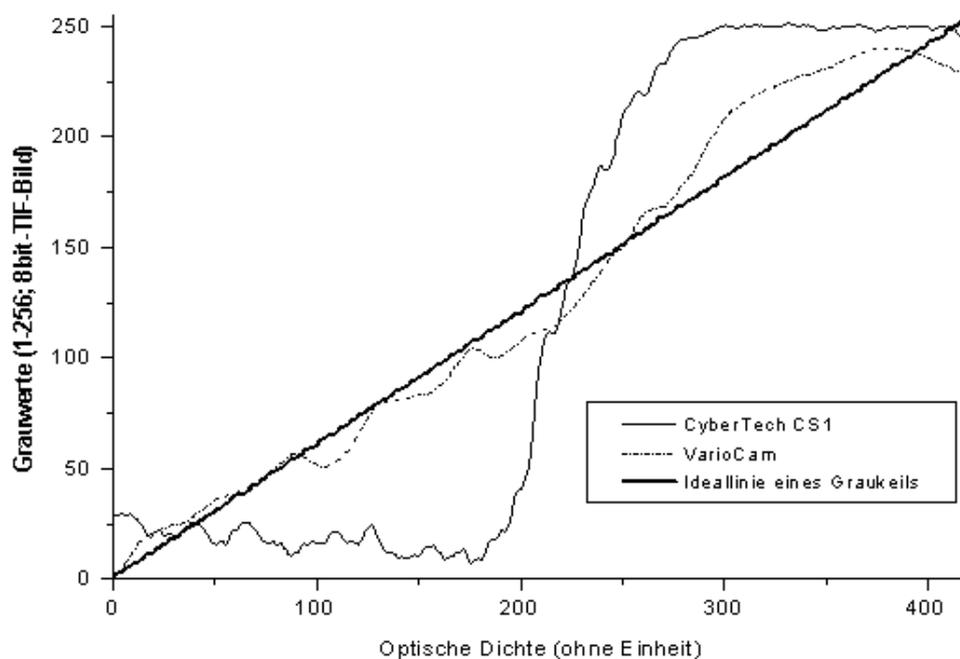


Abbildung 5: Die unterschiedlichen Aufnahmebereiche der CCD-Kameras Cybertech CS-1 (alte Kamera; durchgehende Linie) und der VarioCam (neue Kamera; gestrichelte Linie). Es wurde in beiden Fällen der gleiche Graukeil bei optimaler Belichtung und optimalem Kontrastenhancement aufgenommen. Man sieht deutlich den wesentlich größeren Aufnahmebereich (= Dynamik) der VarioCam, der parallel zur idealen Kennlinie eines Graukeils (Gerade) verläuft. Während die VarioCam eine Dynamik von 0 bis 235 Grauwerte darstellen kann, schafft es die Cybertech CS-1-Kamera nur denselben Graukeil von 195 bis 290 Grauwerten darzustellen. Das entspricht einer Dynamik der VarioCam von 235 und der Cybertech CS-1 von 95 Grauwerten.

Dagegen ergibt die digitalisierte Aufnahme mit der VarioCam eine wesentlich größere Dynamik. Fast der gesamte Bereich wird in differenzierten Graustufen dargestellt.

Neben der optischen Auswertung ist auch eine digitale Auswertung möglich. In Abbildung 5 werden die Aussagen noch einmal als Plot dargestellt. Man erkennt in dieser Abbildung die geringe Dynamik der Cybertech CS-1. Sie stellt den 256 Grauwerte umfassenden Graukeil nur mit 95 Grauwerten dar, während die VarioCam von 0 bis 235 Grauwerte darstellen kann. Die verschiedenen Aufnahmen in Abbildung 4 wurden nach der Digitalisierung optimal kontrastiert (*Kontrast-Enhancement*) und zum besseren Vergleich auf die gleiche Länge gebracht. Der dabei verwendete Algorithmus führt zu gewissen fleckigem Aussehen der Abbildung 4. Bei der Auswertung durch einen Plot führt dies zu Unregelmäßigkeiten in der Linearität, welche in Abbildung 5 deutlich werden. Diese treten in der Messung nicht auf, wie weiter unten gezeigt wird.

Beide verwendeten Kameras speichern die Bilder im TIF-Format (*tagged image format*).

Über- oder Unterbelichtungen sind auf einer S/W-Aufnahme kaum zu erkennen. Auch in der weiteren Ausarbeitung mit NIH Image lassen sich fehlerhafte Belichtungen nicht erkennen. An einem Beispiel wurde dies später in Abbildung 10 beispielhaft dargestellt. Hier sind die überbelichteten Bereiche durch die Mittelwertberechnung von NIH Image nicht direkt zu erkennen.

5.1.2 Linearität

Um eine optimale Quantifizierung von PCR-Produkten durch *image processing* erreichen zu können, muß die Kamera neben einer großen Dynamik einen relativ linearen γ -Koeffizienten aufweisen. Nur dann werden die OD's für verschiedene Vergleichsmengen an DNA über einen größeren Bereich linear gemessen. Dies erlaubt die Messung von Vergleichswerten.

In Abbildung 6 sieht man deutlich den fast über den ganzen Bereich linear verlaufenden γ -Koeffizienten bei der VarioCam. Die Cybertech CS-1-Kamera dagegen weist keinen linearen Bereich auf. Praktisch bedeutet dies, daß die Mess- und Vergleichswerte mit der Cybertech CS-1-Kamera nicht mit einer einfachen linearen Gleichung gefittet werden können, um neue Werte zu berechnen, sondern eine nicht

lineare Funktion dazu verwendet werden muß. Eine polygonale Fittingfunktion 2. Ordnung hat sich bewährt.

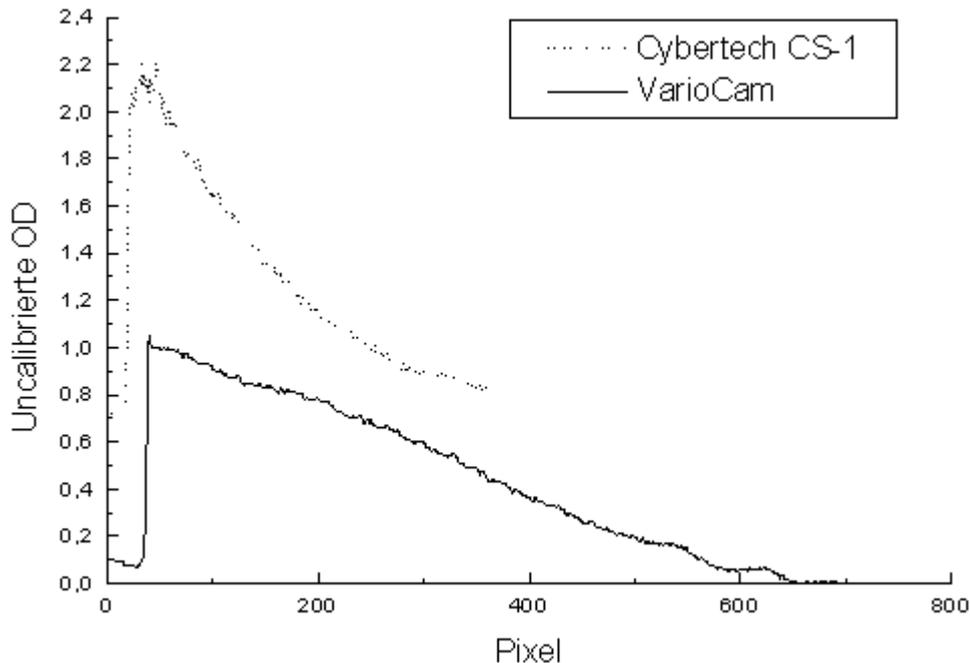


Abbildung 6: Vergleichsaufnahme mit den Kameras Cybertech CS-1 und VarioCam. Hier wurde ein Graukeil ausgemessen. Statt der OD (optical density) wurde jedoch die Transmission gegen Pixel aufgetragen. Man erkennt den relativ linear verlaufenden γ -Koeffizienten für die VarioCam. Bei der Cybertech CS-1 verläuft der γ -Koeffizient gekrümmt.

5.1.3 Aufnahmetechnik der Gele mit einer CCD-Kamera

Die richtige Belichtung der Bilder ist ein entscheidender Punkt. Aus einer mäßigen Aufnahme eines Agarosegels kann keine vernünftige Quantifizierung erfolgen. Evident, aber doch erwähnenswert erscheint, daß jede Aufnahme einen möglichst großen Ausschnitt des zu quantifizierenden Gels zeigt (s. a. Diplomarbeit von Annette Reith, 1997, Seite 62). Nur so können sogenannte Rundungsfehler beim *image processing* vermieden werden.

Eine ähnliche Rolle spielt die Belichtungszeit. Alle zu vermessenden DNA-Banden müssen optimal belichtet sein. Dies ist in Abbildung 7 und Abbildung 8 dargestellt. Bei zu großer Belichtungszeit können nicht alle Banden auf dem Agarosegel ausgewertet werden, einige Banden überbelichtet werden und damit das Verhältnis der belichteten

Werte zu den real vorhandenen Werte aufgehoben wird (nicht dargestellt, da evident). Bei Unterbelichtung (in diesem Fall 30 ms) streuen die Ergebnisse der Quantifizierung stark. Die Messung zeigt eine hohe Ungenauigkeit. Bei optimaler Belichtung (in diesem Fall 80 ms) verringert sich die Streuung sichtbar (Abbildung 8).

In der Praxis hat sich zur Optimierung der Belichtungszeiten ein sogenannter Falschfarben-*look-up table* (LUT) bewährt. Die Grauwerte der Ausgangsaufnahme werden auf dem Bildschirm durch einen sogenannten *look-up table* dargestellt (LUT). Jeder Grauwert der Aufnahme wird sozusagen in eine Falschfarbe übersetzt. Dadurch kann der Kontrast wesentlich gesteigert werden, da wir nur ca. 80 Graustufen, jedoch mehrere Millionen Farben wahrnehmen können (genauere Erklärung s. u.).

Überbelichtete Stellen auf dem *image* können damit sofort erkannt werden. Sie erscheinen bei dem verwendeten LUT „16 color ramp“ als Grautöne. Der Hintergrund stellt sich als verschiedene Blau- bzw. Grüntöne dar. Dadurch kann in kurzer Zeit eine optimal belichtete Aufnahme erzielt werden.

Bei der Cybertech CS-1-Kamera war dieses Vorgehen nicht möglich, da zur Betrachtung nur ein Schwarz-Weiß-Monitor zur Verfügung stand. Mit diesem konnte in der Praxis keine Überbelichtung erkannt werden. Hier mußten von einem Gel immer mehrere Aufnahmen mit empirisch ermittelten Aufnahmezeiten gemacht werden. Diese konnten erst nach Übertragung auf einen Computer ausgewertet werden. Da am Anfang dieser Arbeit kein Farbmonitor zur Verfügung stand, konnten die Bilder in einem Bildverarbeitungsprogramm mit einer sogenannten „Pipette“ einzeln ausgewertet werden. Dazu wurden die hellsten Stellen innerhalb des Bildes mit der „Pipette“ abgefahren und überprüft, ob einzelne Pixelwerte 255 oder 0 erreichen. Diese Bilder waren nicht zur Quantifizierung brauchbar.

Ein überbelichtetes Bild zeigt für die entsprechenden Banden zu geringe Werte an. Die Pixelkurve, die man aus einer Bande erhält, wird sozusagen abgeschnitten und die Werte, welche über diesen Punkt hinausgehen nicht mitgerechnet. Es entsteht ein systematischer Fehler, der die großen DNA-Mengen falsch quantifiziert. Leider ist diese Phänomen nicht mehr ohne weiteres sichtbar, wenn man ohne genaue Betrachtung des Ausgangsbildes die DNA-Banden mit NIH Image auswertet. Man ermittelt in dem von NIH Image verwendeten Verfahren die Durchschnittswerte über die Breite. Da die Banden an der Seite im allgemeinen durch die Gelelektrophorese nicht mehr scharf abgrenzbar sind, werden bei der Mittelwertberechnung auch diese Grauwerte mitgerechnet. Man erhält plausible Werte, die im Durchschnitt nicht auf eine Übersättigung hinweisen. Bei genauer Betrachtung mit dem Falschfarben LUT ist dies sofort sichtbar (genauere Erklärung im nächsten Kapitel).

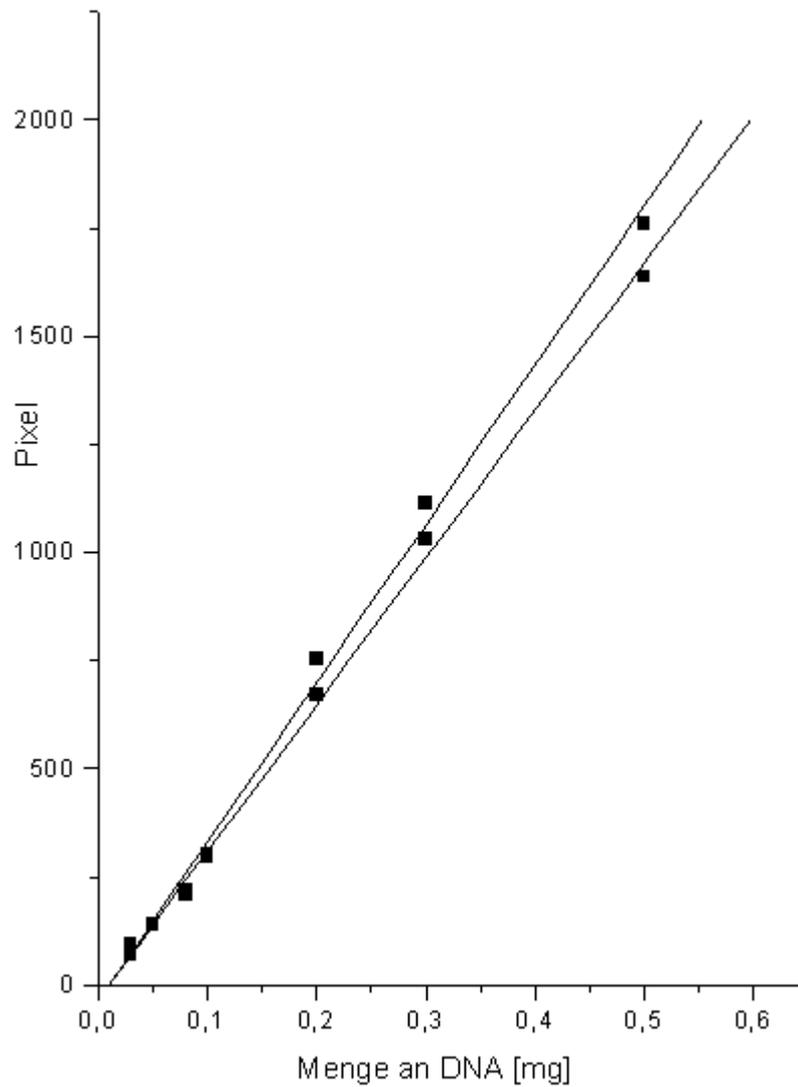


Abbildung 7: Auf einem mit SYBR Green I angefärbten Agarosegel wurden 0,03 bis 0,5 mg pBluescript-DNA (*Pvu* II behandelt, bezogen auf das 450 bp-Fragment) aufgetrennt. Das gleiche Agarosegel wurde mit verschiedenen Belichtungszeiten aufgenommen. Die verschiedenen *images* zeigen in etwa die gleichen Absolutwerte, da der Hintergrund graphisch subtrahiert wurde. Unterschiede in den Genauigkeiten werden in Abbildung 8 dargestellt.

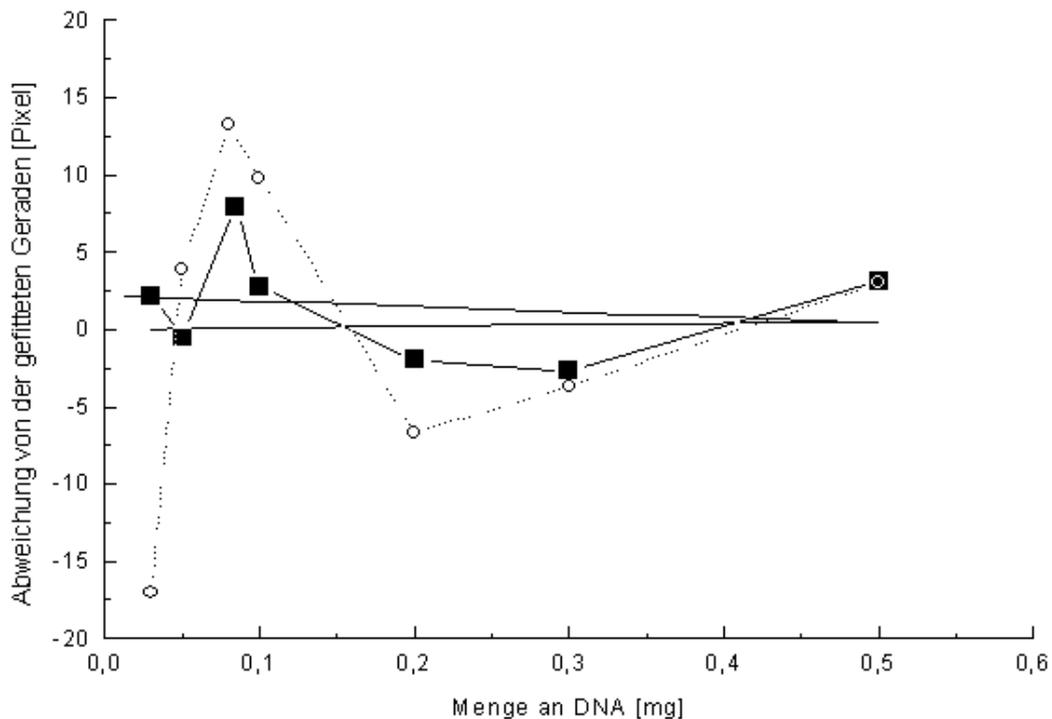


Abbildung 8: Vergleich der Genauigkeiten bei der Quantifizierung bei verschiedenen Aufnahmezeiten desselben Agarosegel mit den in Abbildung 7 gezeigten Mengen an pBluescript. Es ist die Abweichung der Werte von der gefitteten Geraden dargestellt. Die quadratischen Punkte zeigen die Werte für eine Aufnahmezeit von 80 ms, die runden Punkte eine kürzere Belichtungszeit von 30 ms. Längere Aufnahmezeiten konnten wegen der beginnenden Überbelichtung nicht ausgewertet werden. Kleinere Mengen an DNA zeigen prinzipiell eine größere Abweichung, da hier die Pipettierfehler starker ins Gewicht fallen. Insgesamt zeigen die Werte bei einer geringeren Belichtungszeit eine wesentlich größere Streuung. Optimale Belichtungszeiten sind essentiell für einen kleinen systematischen Fehler bei der Quantifizierung von DNA aus Agarosegelen.

Um die optimale Belichtung besser ermitteln zu können, gibt es bei NIH Image die Möglichkeit, die Bilder in Falschfarben darstellen zu lassen. Diese Falschfarbendarstellung verändert nicht die eigentlichen Grauwerte der TIF-Bilder, sondern dient nur zur Darstellung auf dem Bildschirm.

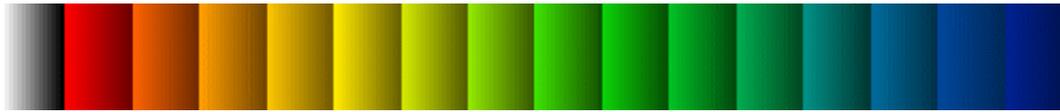


Abbildung 9: Look-up table zur Verwendung mit NIH Image (Farbdarstellung, in Schwarz-Weiß nicht adäquat darstellbar): "16 color ramps". Die Grauwerte werden auf dem Bildschirm in Form einer sogenannten *look-up table* (LUT) dargestellt. Die hier dargestellte LUT wird "16 color ramp" bezeichnet. Sie erlaubt eine optimale Belichtung einer Aufnahme. Man kann auf den ersten Blick über- und unterbelichtete Stellen in jeder Aufnahme erkennen. Eine essentielle Voraussetzung zur Quantifizierung. Unterbelichtete Stellen werden als weiß-hellgrau, überbelichtete Stellen als tief dunkelblau dargestellt. Richtig belichtete Stellen erscheinen dagegen als Farben (rot-gelb-grün-blau). Zusätzlich werden kleinste Farbnuancen durch die zusätzliche Kontrastierung der Grauwerte durch Farben sichtbar gemacht.

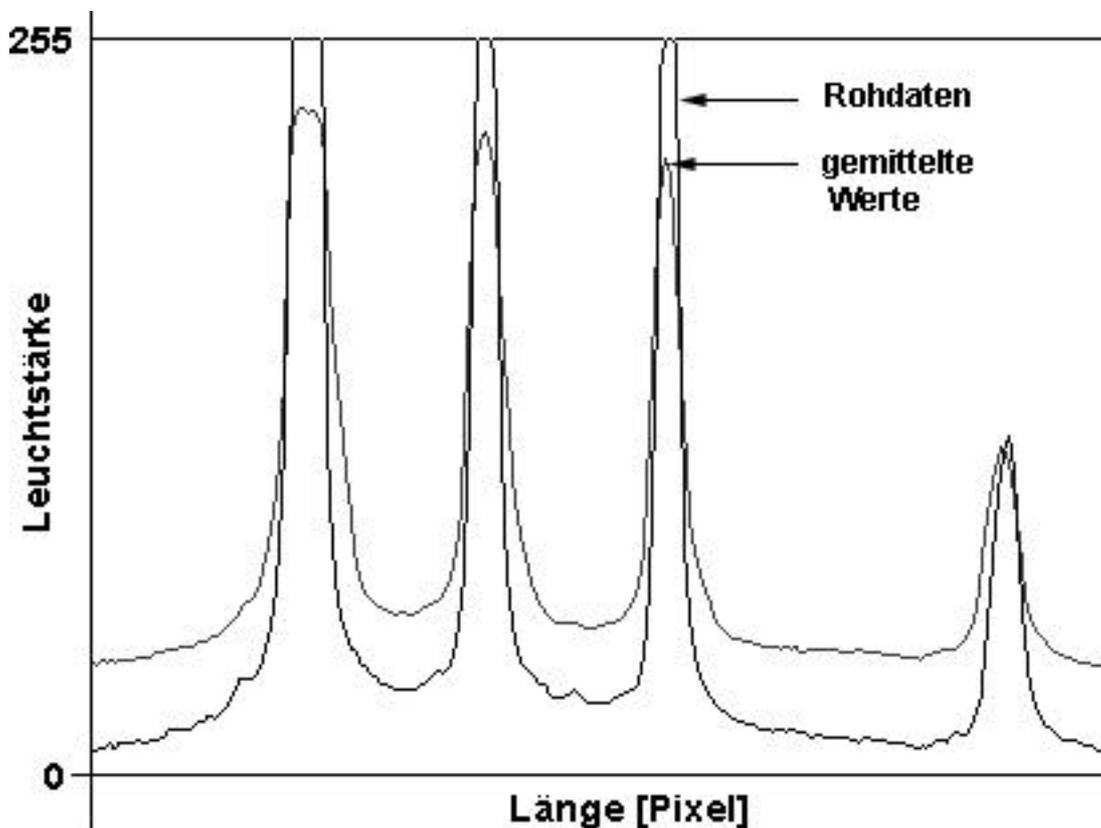


Abbildung 10: Darstellung der realen Werte eines überbelichteten Bildes versus die mit NIH Image gemittelten Werte. Die dunkle Kurve stellt die realen Werte der Aufnahme eines überbelichteten Gels dar, die graue Kurve die gemittelten Werte. Man kann die Überbelichtung in der Kurve der realen Werte sofort an den Plateaus in den oberen Bereich erkennen; bei den gemittelten Werten ist dies nicht mehr möglich. Der Falschfarben-LUT dagegen läßt die überbelichteten Stellen sofort erkennen. Richtig belichtete Helligkeitsstufen werden in beiden Abbildungsarten ohne Plateau dargestellt.

Mit Hilfe des im NIH Image-Programms benutzten LUT „16 color ramp“ kann man sehr genau Über- oder Unterbelichtung jedes Punktes innerhalb eines Bildes abschätzen. Er erlaubt weiterhin feinste Abstufungen innerhalb des Bildes durch die geschickte Farbauswahl mit maximalem Farbkontrast darzustellen. Während unser Auge nur ca. 80 Graustufen wahrnehmen kann, besteht die Möglichkeit mehrere Millionen Farben zu unterscheiden. Deshalb stellt die Umwandlung einer Grauskala in Farbe eine deutliche Verbesserung feiner Nuancen der Aufnahme für das menschliche Auge dar.

5.1.4 UV-Farbfiler

Es wurde der empfohlene UV-Filter S-7569 der Firma MoBiTec für Aufnahme von SYBR Green I-gefärbten Agarosegelen verwendet. Er hat ein Minimum der Absorption bei ca. 510 bis 520 nm. Die herkömmlichen UV-Filter für Ethidiumbromid waren nicht geeignet, da sie bei der Emissionswellenlänge von SYBR Green I (520 nm) zu stark das Licht absorbieren.

5.2 Quantifizierung mit NIH Image

NIH Image ist ein Programm, welches von *National Institute of Health* (Bethesda, Maryland, USA) zur wissenschaftlichen Bildauswertung entwickelt wurde und weltweit ohne Lizenzgebühren zur Verfügung gestellt wird (s. a. Kapitel 4.7). Das Programm kann durch eine Makroprogrammiersprache gesteuert werden. Damit werden komplexe Befehlsketten einfach durch "Knopfdruck" durchgeführt. Durch die Makroprogrammiersprache ist es sehr flexibel und kann in vielen Bereichen der Bildverarbeitung eingesetzt werden. Von der quantitativen Radiologie bis zum konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop reicht die Anwendungspalette.

Eine kurze Einführung in das Programm ist in der Methodenbeschreibung unter Kapitel 4.7 zu finden und wird deshalb nicht noch einmal beschrieben. Die folgenden Kapitel werden durch das aktive Nachvollziehen der beschriebenen Befehle innerhalb des Programms deutlicher.

5.2.1 Hintergrund-Substraktion

Alle Aufnahmen von Gelen haben neben den fluoreszierenden DNA-Banden auch einen nicht ganz schwarzen Hintergrund durch die unspezifische Fluoreszenz der verwendeten Farbstoffe (s. a. Abbildung 3 in Kapitel 4.7). Dieser Hintergrund muß optisch oder rechnerisch entfernt werden, um die DNA-Banden eines Gels auswerten zu können.

Der Hintergrund einer Aufnahme läßt sich mit NIH Image automatisch subtrahieren. Dabei wird ein sogenannter *rolling ball* mit einem vorher bestimmten Durchmesser über das Bild gefahren und aus diesen Daten der Hintergrund von den Bandenintensitäten unterschieden und gleichzeitig subtrahiert. Dieses automatisierte Verfahren hat sich in der praktischen Anwendung als sehr schwierig erwiesen. Je nach der Größe der dargestellten Einzelbanden muß der Balldurchmesser verschieden eingestellt werden. Er soll nach den Angaben von Chow, 1994, mindestens den Durchmesser der größten zu messenden Bande haben. Es ist einfacher und genauer den Hintergrund bei jeder einzelnen Bande manuell zu bestimmen. Die Verwendung der *3D rolling ball background subtraction* wurde daher nicht weiterverfolgt. Die manuelle Hintergrundbestimmung wurde in dieser Arbeit vorgezogen.

5.2.2 OD versus Transmission

Optische Dichte (OD, oder Extinktion in der Photometrie) ist die logarithmische Funktion der Transmission. Während bei der Photometrie direkt die OD bestimmt wird (z.B. bei der photometrischen Quantifizierung der DNA), ist dies bei einer CCD-Kamera oder einem Scanner nicht möglich. Alle erhaltenen Werte sind relative Aussagen, deshalb muß immer ein Standard auf der gleichen Aufnahme mitbestimmt werden, um die Absolutmengen berechnen zu können. In der Technik der Auswertung gibt es verschiedene Möglichkeiten. Das Programm NIH Image bietet eine Kalibrierungsmöglichkeit gegen einen Graukeil während der Quantifizierung an.

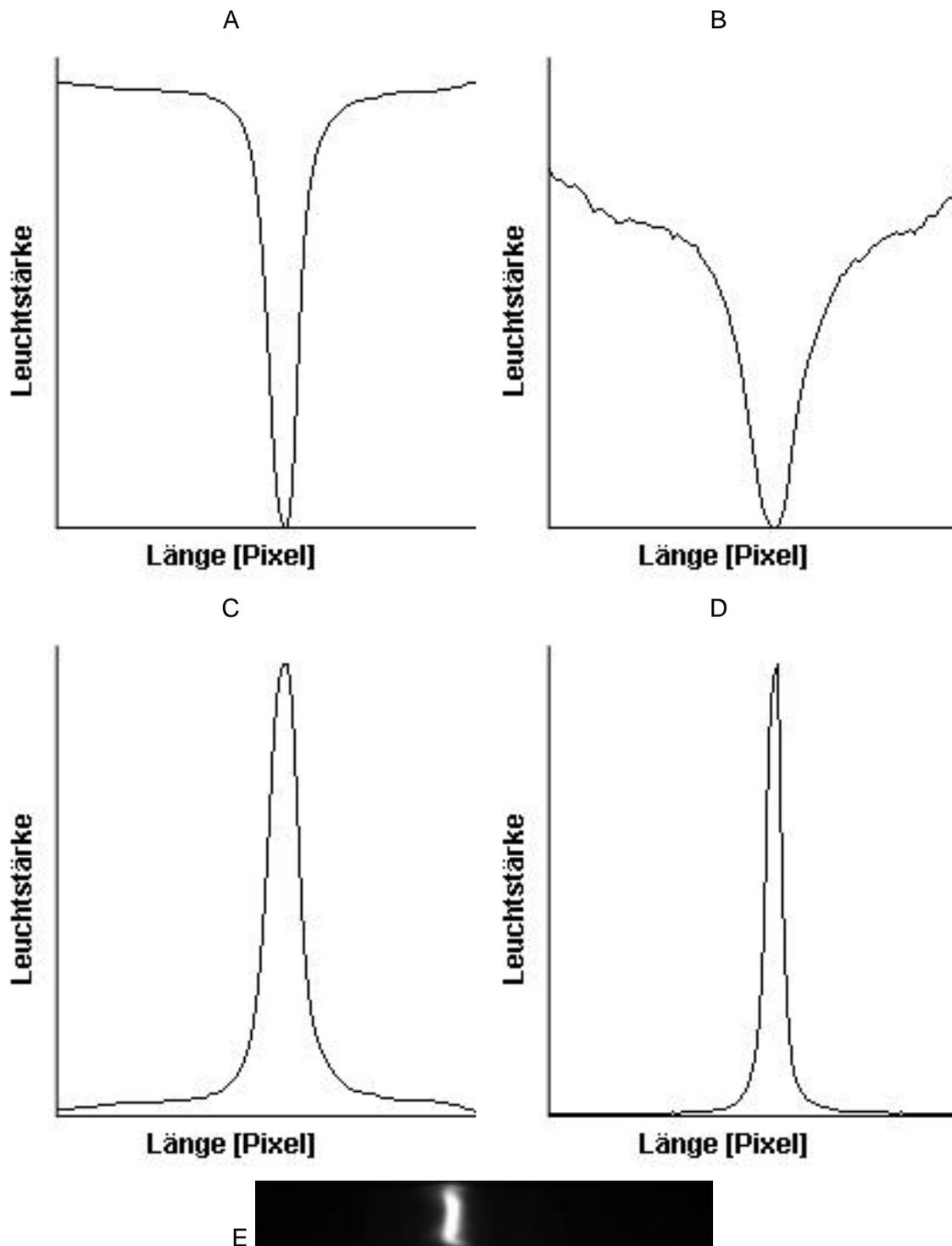


Abbildung 11: Verschiedene Methoden zur Quantifizierung einer Gelbande durch Veränderung der Kalibrierung. Eine Aufnahme eines mit 30 ng DNA-Fragmentes beladenen und mit SYBR Green I gefärbten Agarosegels wurde mit verschiedenen Einstellungen von NIH Image ausgewertet. Es wurde immer dieselbe *region of interest* (ROI) verwendet (E). A und B zeigen die Quantifizierung der hellen Gelbande auf dunklem Hintergrund. C und D wurden nach einer Invertierung der Grauwerte ausgewertet. A und C wurden als Transmission, B und D als OD berechnet. Es wurde keine Kalibrierung mit NIH Image vorgenommen.

Auf eine Kalibrierung durch NIH Image für die gesamte Aufnahme wurde entgegen den Angaben von dem NIH Image Manual (Chow, 1994) verzichtet, da der Hintergrund der Aufnahmen inhomogen ist. Die Aufnahmen zeigten geringfügig dunklere Werte (10 von 256) im Aussenbereich als in der Mitte. Dieser Fehler ist wahrscheinlich von den optischen Linsen erzeugt, da er radiär erscheint. Diese Inhomogenität würde einen systematischen, leicht zu umgehenden Fehler erzeugen. Banden in der Mitte hätten andere Werte als die gleiche DNA-Menge in einer Randzone.

Innerhalb des Programms NIH Image können verschiedene Auswertungsverfahren gewählt werden. Es kann die optische Dichte OD oder die Transmission T (hier besser Helligkeit) als Bezugspunkt gewählt werden (Analyse|Calibrate). Diese beiden Werte stehen in folgendem mathematischen Zusammenhang:

$$OD = \log(1 / T)$$

Die mit dem Programm NIH Image erhaltenen Werte sind proportional zur Transmission T (Chow, 1994). Eine 30 ng DNA-Bande wurde auf verschiedene Arten in Abbildung 11 ausgewertet. Die Abbildung 11 A und C zeigen die Auswertung der Gelbande als Transmission, die Abbildung 11 B und D zeigen dieselbe *region of interest* (ROI) als OD ausgewertet. Der Unterschied zwischen A und C, sowie B und D, ist, daß A und C von der Originalaufnahme ausgehen, während B und D von dem invertierten Bild ausgehen. Die Invertierung vertauscht die Grauwertskala. Weiß wird Schwarz und Schwarz wird Weiß dargestellt. Der einzige Unterschied zwischen den als Transmission behandelten Werten in A und C ist die spiegelsymmetrische Darstellung der Kurven. Die *area under curve* (AUC; Integral der Werte unterhalb einer Kurve) ist gleich. Bei der Darstellung als optische Dichte werden die Ausgangswerte gemäß der oben genannten Funktion umgerechnet. Bei der Darstellung in Abbildung 11 B sieht man jedoch deutlich eine Betonung des (in dieser Abbildung oben dargestellten) Hintergrundes. Bei der Quantifizierung bekommt die graphische Abgrenzung des Hintergrundes dann eine wesentlich stärkere Gewichtung. Den umgekehrten Effekt findet man in D. Hier findet man praktisch kaum Hintergrund. Er wurde einfach weggerechnet.

In Abbildung 12 wurden die verschiedenen Kalibrierungsbanden nebeneinander dargestellt. Die gleiche Aufnahme eines mit SYBR Green I gefärbten Agarosegels mit DNA-Mengen von 1 - 30 ng wurde mit einer Kalibrierung als Transmission, OD oder inverse OD durchgeführt. Auf die inverse Transmission wurde verzichtet, da es sich nur um eine Spiegelung der Transmission handelt und die gleichen Ergebnisse wie bei der Transmission erhalten werden. Die Messwerte für die Transmission sind mit

Quadraten, die der OD mit Kreisen und die der inversen OD mit Dreiecken dargestellt. Auffällig sind vor allem die negativen Werte der Fitgerade bei der Verwendung der inversen OD. Diese Kalibrierungsmethode kann kleinere DNA-Mengen (in diesem Beispiel ab ca. 5 ng) nicht mehr ausreichend darstellen. Kleine DNA-Mengen würden sogar negativ werden. Dies ist offensichtlich falsch. Die Kalibrierung der DNA-Mengen durch OD und Transmission scheinen jedoch nach Abbildung 12 möglich. Sie ergeben sinnvolle Werte in dem gesamten Messbereich. Die Werte der dieser Verfahren gehen nicht durch den Nullpunkt. Dies ist auf den sogenannten Halo-Effekt, wie in Kapitel 5.3.6 genauer beschrieben, zurückzuführen.

Die statistische Auswertung der verschiedenen Verfahren für mehrere Banden wurde in Tabelle 3 dargestellt. Der Korrelationskoeffizient R^2 als Maß für die Richtigkeit ist am besten bei der Messung als Transmission. Ebenso ist die Standardabweichung der Steigung der Fitgeraden bei der Transmission die kleinste und damit beste.

Methode	R^2	Standardabweichung der Steigung in %	Bemerkungen
Transmission	0,99	4,7	negative und positive Werte im Rahmen des Messfehlers gleich
OD	0,97	6,4	schwierige Abgrenzung der Basislinie
OD invers	0,90	13,9	negative Werte für kleine DNA-Mengen

Tabelle 3: Gegenüberstellung der Genauigkeiten der einzelnen Auswertungsmethoden bei verschiedenen Kalibrierungsarten.

Unter den gegebenen Bedingungen erscheint die Kalibrierung durch eine Messung als Transmission die beste Wahl. Sie bewirkt die kleinste Abweichung der Plotbanden von der Fitgeraden und weist zusätzlich die statistisch besten Werte gegenüber den anderen Kalibrierungsarten auf und ist hinreichend gut.

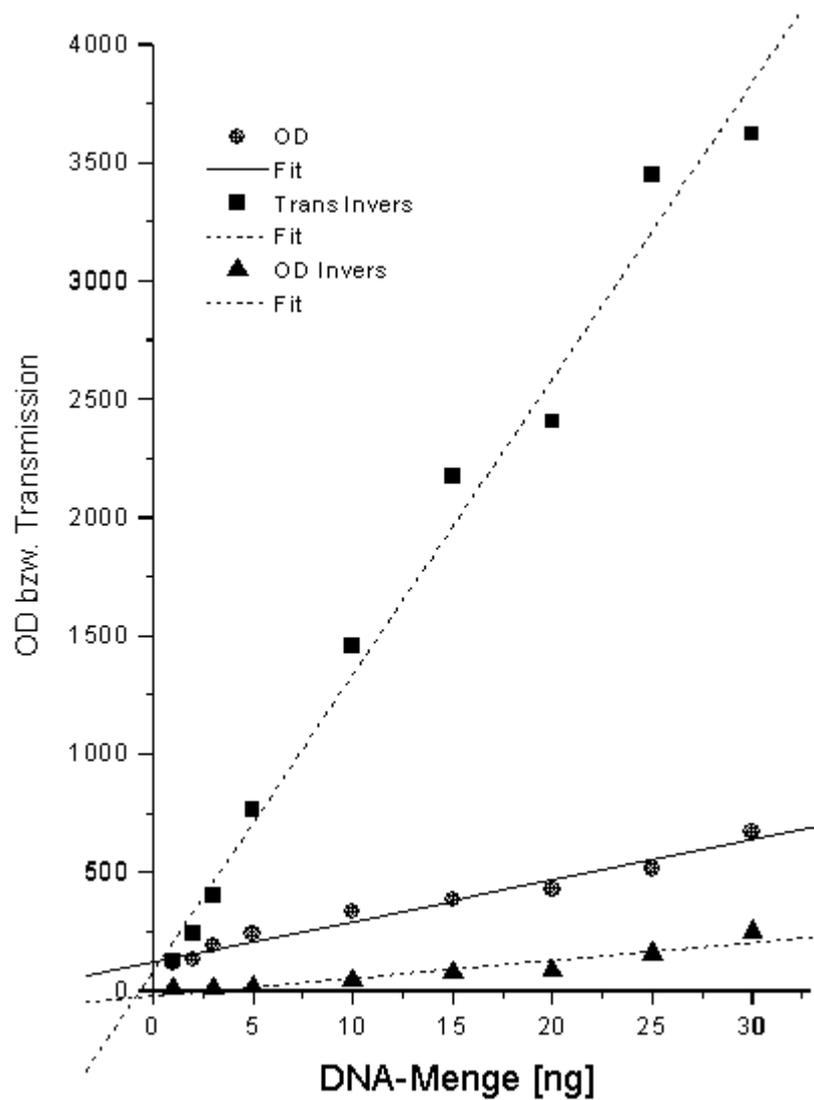


Abbildung 12: Vergleich der Pixelwerte für verschiedene Bestimmungen einer bekannten Menge an DNA mit NIH Image als OD und Transmission, entsprechend den Werten in Abbildung 11. Es wurden DNA-Mengen von 1 - 30 ng DNA pro Geltasche durch eine Elektrophorese in einem mit SYBR Green I gefärbten Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel mit NIH Image ausgewertet. Die Werte der y-Achse stellen die OD bzw. die Transmission dar und sind dimensionslos.

5.2.3 Programmierfehler in den verwendeten Makros von NIH Image

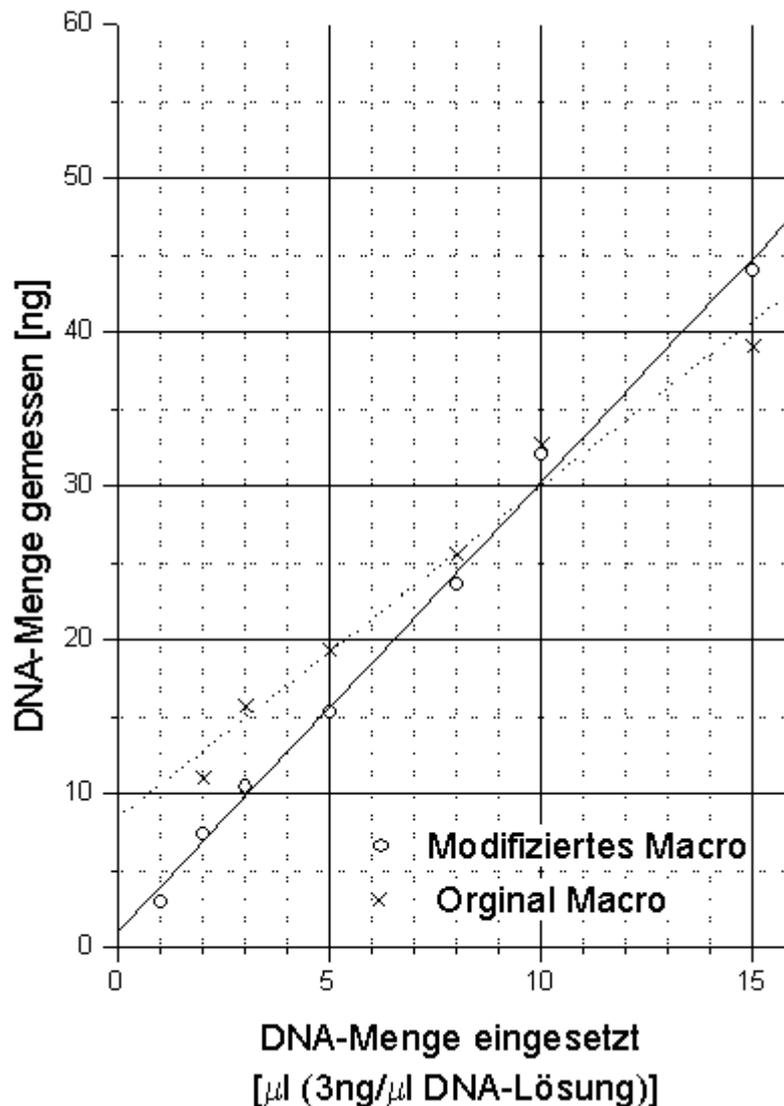


Abbildung 13: Vergleich der berechneten DNA-Menge unter Verwendung der NIH Image Makros *gel plotting macros* und den von mir modifizierten Makros. Die gleiche Aufnahme eines Agarosegels mit 1 bis 15 µl aufgereinigter PCR-Reaktionslösung (3 ng/µl DNA) wurde mit den zwei Makros ausgewertet. Das Gel wurde vorher mit SYBR Green I (1 µg/ml Agarosegel) angefärbt. Die DNA-Menge der Ordinate wurde unter Verwendung eines Faktors berechnet, der mit einer Eichkurve des pBluescript-DNA-Fragments (448 bp) bestimmt wurde.

Makros dienen als Programmiersprache innerhalb einer Computeranwendung. Mit einem Makro können neue Programmteile innerhalb eines bestehenden Programm ergänzt und die Möglichkeiten erweitert werden.

Bei der Anwendung der Auswertung mit NIH Image zeigten sich bei Wiederholungsmessungen gelegentlich verschiedene Ergebnisse, abhängig von der

Anzahl der untersuchten Banden. Bei den daraus berechneten Amplifikationsraten der PCR-Reaktionen fand sich oft eine Steigung α von mehr als 100%. Da dies der Theorie nach nicht möglich ist, mußte ein anderer Fehler schon bei der Quantifizierung der Produkte aufgetreten sein. Neben den weiter unten beschriebenen Fehlermöglichkeiten bei unsachgemäßer Anwendung fiel ein weiterer Fehler konstant auf.

Die *gel plotting macros* von NIH Image wandeln die Banden der Aufnahme in einen neuen Graphen um (s. a. Abbildung 3). Dieser Graph stellt die addierte Leuchtstärke der Banden im rechten Winkel zur betrachteten Oberfläche dar. Durch ziehen einer Linie durch den optischen Hintergrund wird die Summe der Leuchtstärke der einzelnen Banden dargestellt. Mit dem *wand tool* kann aus der Fläche unterhalb der Kurve (area under curve, AUC) die relative (und damit dimensionslose) integrierte optische Dichte gemessen werden.

Die *gel plotting macros* von NIH Image begrenzen die Größe des Fensters in welchen die Graphen dargestellt werden auf 800 Pixel Höhe. Dies bedeutet bei wenigen Graphen pro Aufnahme keine Veränderung der Leuchtstärke der Banden. Jedoch bei einer größeren Anzahl von auszuwertenden Spuren (und damit Graphen) werden die Graphen einfach komprimiert, bis sie in ein Fenster mit maximal 800 Pixel Höhe passen.

In den Auswertungen zeigte sich neben einem offensichtlich dabei entstehenden Rundungsfehler eine Unterbewertung kleiner und gleichzeitig eine Überbewertung großer Banden. Dies führte bei Kalibrierungen zu dem beschriebenen Fehler, so daß gelegentlich eine Effizienz der PCR-Reaktion über 100% und damit ein α über 2,0 gefunden wurde.

Zur Beseitigung dieses offensichtlichen Fehlers wurde der Quellcode der Makros (syn. *source code*) von mir entsprechend modifiziert. Zur genaueren Beschreibung der Modifikationen wird auf den *source code* der modifizierten Makros im Anhang verwiesen. Dort können die Veränderungen für den Geübten in der sehr stark an Pascal angelehnten Makrosprache im einzelnen nachgelesen werden. Die Makrosprache wird ausführlich in den Manuals "NIH Image" (Version 1.56) von Vivino, M. und Rusband, W., 1994, und "*Inside NIH Image*" von Vivino, M., 1994, beschrieben.

Nach den Änderungen im Makro trat der Fehler nicht mehr auf, wie in der Abbildung 13 verdeutlicht werden konnte. Zusätzlich wurde noch die Messung sehr kleiner Mengen ermöglicht, die mit dem alten Makro unter den beschriebenen Bedingungen nicht mehr möglich war (s. a. Abbildung 13).

Ebenso wurde noch ein neues Makro eingeführt, welches die Auswerteprozedur automatisiert und damit vereinfacht. Es steht jedoch nicht im Zusammenhang mit dem Fehler in den *gel plotting macros* von NIH Image, sondern dient nur zur komfortableren und schnelleren Benutzung des Programms.

Das korrigierte Makro (mit den von mir zusätzlich zur Fehlerkorrektur programmierten zusätzlichen Vereinfachungen) wird in dem *online* Tutorial "*NIH Image 1.60: Using Image for Densitometric Analysis of 1-D Gels*" von David Chow und Jai Evans unter http://scrc.dcr.nih.gov/imaging/tutorials/gel_density/table.html sowie auf der Hauptseite des SCRC *Imaging home page* des NIH, Bethesda, Maryland, offiziell unter <http://scrc.cit.nih.gov/imaging> der Öffentlichkeit zur Verfügung gestellt.

5.3 Gel, Anfärbung und Marker

5.3.1 Der neue Farbstoff SYBR Green I

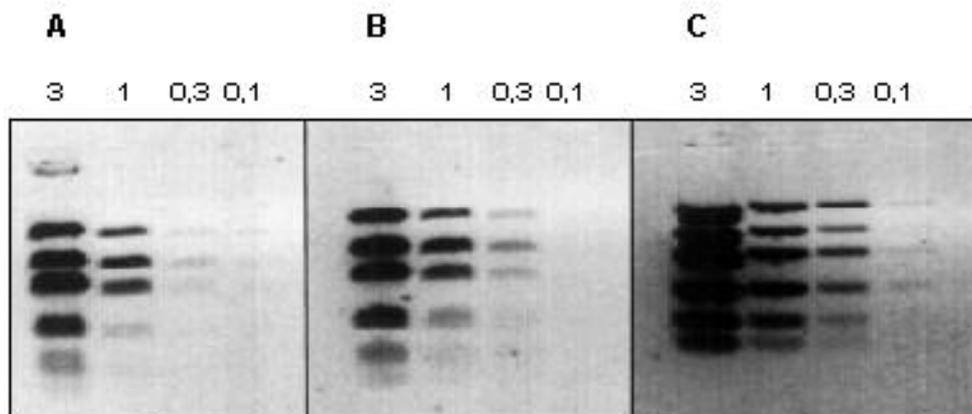


Abbildung 14: Vergleich verschiedener Färbemethoden mit SYBR Green I. Aufgetrennt wurden gleiche Mengen seriell verdünnter DNA-mass ladder (je 4, 1, 0,25 und 0,625 μ l). Abbildung A zeigt ein Agarosegel, das nach der elektrophoretischen Auftrennung mit SYBR Green I (1:10.000 verdünnten Lösung) für $\frac{1}{2}$ Stunde gefärbt und mit TBE-Puffer für 30 Minuten entfärbt wurden (sog. *poststaining*). In Abbildung B wird die DNA zuerst mit 1 : 100fach verdünnter SYBR Green I-Lösung für 5 min inkubiert und dann auf das Gel aufgetragen (sog. *prestaining*). Abbildung C zeigt eine Agarosegel in das 1 μ l SYBR Green I/1 ml Gel vor dem Gießen in das Gel integriert wurde (sog. *precasting*). Die Gele haben etwa eine Dicke von 0,7 mm.

Der Farbstoff SYBR Green I ist ein sogenannter *DNA groove binder*, sowie ein lichtempfindlicher Fluoreszenzfarbstoff, der außerdem wärme- und hydrolyseempfindlich ist. Alle Versuche wurden deshalb mit aliquotiertem, frisch angesetzten SYBR Green I im Dunkeln durchgeführt. Die Lichtexposition zur Aufnahme des Gels sollte so kurz wie möglich sein. Er ist elektrophoretisch nicht mobil. Die Fluoreszenzanregung des SYBR Green I liegt bei ca. 454 nm (Nebenmaximum) und 490 nm (Hauptmaximum). Die Fluoreszenzemission liegt bei ca. 520 nm. Von der Vertriebsfirma MoBiTec wird eine epiilluminale Beleuchtung von 254 nm optimal oder aber transilluminale von 300 nm bei geringerer Empfindlichkeit empfohlen. Eine Steigerung der hier gezeigten Sensitivität wäre vermutlich möglich,

bei Verwendung einer epiilluminativen Ausleuchtung bei 254 nm. Leider stand im Labor keine leuchtstarke UV-Quelle dieser Wellenlänge zur Verfügung.

Bei der Färbung mit SYBR Green I gibt es die Möglichkeit den Farbstoff in das Gel zu integrieren (*prestaining*), das Gel später anzufärben (*poststaining*) oder die DNA vor der Elektrophorese anzufärben und mit dem gebundenen Farbstoff aufzutrennen (*precasting*). Von der Vertriebsfirma MoBiTec wurde das *poststaining*-Verfahren empfohlen. Zur Überprüfung wurden alle drei Methoden unter vergleichbaren Bedingungen eingesetzt.

Das *prestaining* wurde mit einem Agarosegel mit 15 µl SYBR Green I-Lösung/200 ml Gel durchgeführt. Dazu wurde der Farbstoff der auf ca. 55°C abkühlten Agaroselösung zugesetzt und das Gel wie gewohnt gegossen.

Beim *precasting* wurde die DNA-Lösung mit 1:100 verdünnter SYBR Green I-Lösung vorgefärbt und dann der im Methodenteil beschriebenen Agarosegelelektrophorese unterzogen.

Das *poststaining* wurde das Agarosegel mit der bereits aufgetrennten DNA mit einer 1:10.000 verdünnten Lösung für ½ Stunde bedeckt und vorsichtig geschüttelt.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 gezeigt. Die höchste Empfindlichkeit zeigte sich bei einer Integration des Farbstoffes in das Gel. Zusätzlich konnte bei dem *precasting* manchmal ein Schmiereffekt der DNA gefunden werden (nicht gezeigt). Längere DNA-Stücke laufen dann nicht auf der für die DNA-Länge erwarteten Stelle im Agarosegel. Dieser Effekt zeigte sich jedoch nicht regelmäßig. Vermutlich war dies auf länger gelagerten SYBR Green I-Farbstoff, der schon leicht abgebaut war, zurückzuführen. Beim *poststaining* wurden längere Färbezeiten mit über 2 Stunden ausprobiert. Diese langen Zeiten führten zu deutlichen Diffusionsvorgängen der DNA und verringerten die Sensitivität erheblich (Aufnahmen hier nicht gezeigt). Beim *poststaining* wird eine geringe Anfärbung gefunden. Bei Gelen, die eine größere Dicke als die hier verwendeten von 0,7 cm haben, werden nur die äußeren Schichten gefärbt. Die innerste Schicht der Gele war fast nicht von dem Farbstoff durchdrungen.

Die Färbung wird optimal während der elektrophoretischen Trennung durchgeführt (*precasting*). Nachteil ist die unterschiedliche Kontaktmenge der DNA mit dem Farbstoff bei unterschiedlichen Lauflängen. Vorteil ist jedoch die homogene Anfärbung des Gels.

5.3.2 Auftragsmenge der DNA und des Farbstoffes

5.3.3 Gelsysteme

Es wurden durchgehend 1%ige Agarosegele verwendet. Die geringe Sensitivität der Videokamera Cybertech CS-1, welche für die meisten Untersuchungen verwendet wurde, mußte um eine höhere Sensitivität zu erreichen, kompensiert werden. In den verwendeten 70 ml Agarosegelen konnte man quantitativ nur ca. 10 µl DNA-Lösung pipettieren. Durch Verwendung von größeren Gelvolumina ließ sich die Auftragsmenge an DNA- oder PCR-Lösung erhöhen. Statt der in unseren Labor verwendeten 70 ml Agarosegele wurde Gele mit 200 ml verwendet. Damit ließ sich die DNA-Auftragsmengen von 10 µl bis auf 25 µl vergrößern. Bei der Ethidiumbromid-Färbung wurde auch der sowieso unspezifisch angefärbte Hintergrund durch das stärkere Gel noch heller. Hier zeigten sich daher keine wesentlichen Vorteile durch die Verwendung größerer Gelvolumina. Mit SYBR Green I zeigte sich jedoch durch die geringe Hintergrundfärbung eine Erhöhung der erreichten Sensitivität bis auf das 3fache, abhängig von den Rahmenbedingungen. Auf diese Art konnten kleinere DNA-Mengen quantifiziert werden.

5.3.4 Auftragsmarker

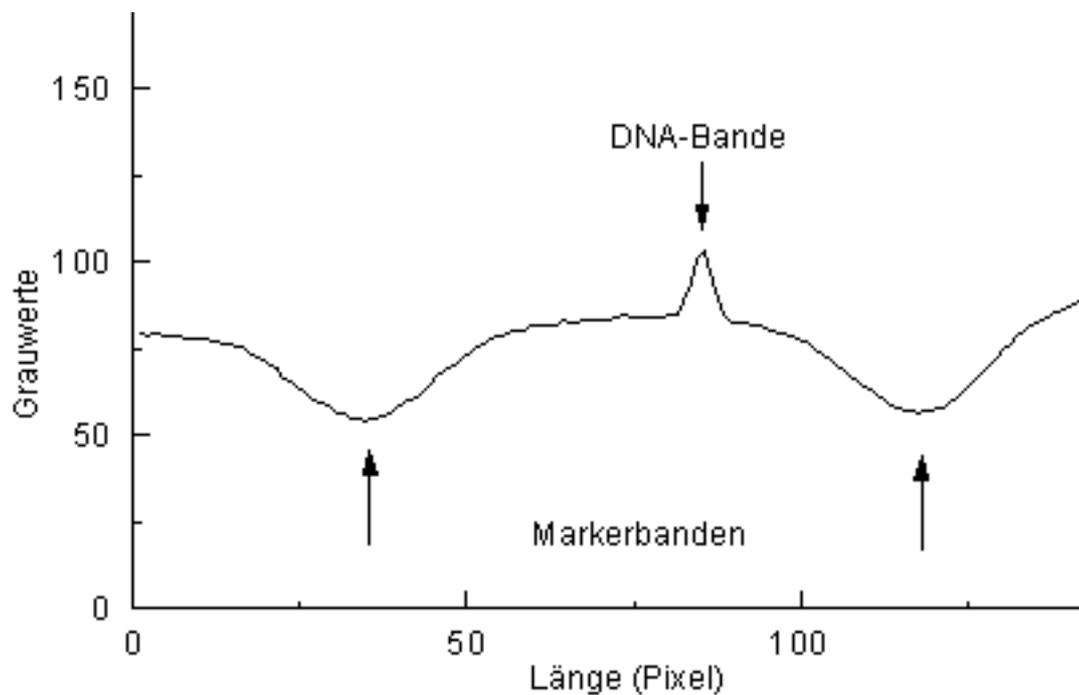


Abbildung 15: Vergleich der Grauwertintensitäten der Auftragsmarker-Bande mit der eigentlich zu bestimmenden DNA-Bande. In einem Agarosegel wurde eine elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Bande mit Ethidiumbromid angefärbt. Das Gel wurde mit der Cybertech CS-1 aufgenommen. Man erkennt bei kleinen DNA-Mengen (ca. 8 ng eines 500 bp-Fragmentes) den störenden Einfluß der Markerbanden, welche auch bei UV-Beleuchtung sichtbar sind. Dieses exemplarische Beispiel zeigt die DNA-Bande gut abgetrennt zwischen den Markerbanden. Bei größeren DNA-Mengen ist diese Abgrenzung nicht mehr möglich, da die DNA-Bande eine wesentlich breitere Basis hat. Damit läßt sich auch manuell keine klare Basislinie ziehen. Der gleiche Effekt ist bei der Färbung mit SYBR Green I zu erkennen, aber wegen dem geringeren Hintergrund nicht so ausgeprägt.

Um die DNA in die Geltaschen sicher einzufüllen, ist ein Auftragmarker notwendig. Neben dem Glycerin, welches die Dichte der aufzutragenden Lösung erhöht und damit die Übertragung der DNA in die Geltaschen sicher und quantitativ ermöglicht, ist ein Farbstoff zur Sichtbarmachung des Einpipettivorganges und zusätzlich zur Laufstreckenbestimmung, während der Elektrophorese, notwendig.

In Abbildung 15 wurde die Leuchtstärke einer Agarosegelaufnahme mit den Farbstoffen Bromphenolblau und Xylencyanol FF (beide je 2,5 mg/1 ml 6x Auftragspuffer) in dem Auftragspuffer dargestellt. Man erkennt die Verminderung der Fluoreszenz in Höhe der beiden Farbstoffe deutlich. Dies ist bei geringen DNA-Mengen, wie in dem hier gezeigten Agarosegel, nicht sehr störend. In Gelen, in

welchen die DNA-Banden in Höhe eines Farbstoffes mitwandern oder bei großen Mengen DNA, welche sich als wesentlich breitere Banden darstellen, ist eine Unterscheidung zwischen Hintergrund, DNA-Bande und Auftragsmarkerfarbstoff nicht mehr sicher durchzuführen. Um dieses Problem zu beheben wurde ein Auftragsmarker mit Bromkresolgrün hergestellt. Bromkresolgrün zeigt keine so starke Verminderung der Fluoreszenz, wie die beiden obengenannten Farbstoffe. Außerdem konnte die Konzentration auf 0,1 mg/ml Auftragpuffer (gilt für 6x Auftragpuffer) herabgesetzt werden. Dadurch wird keine Farbstoffbande gegen den Hintergrund bei der Quantifizierung mehr sichtbar.

5.3.5 Nachweisgrenze von DNA durch Anfärbung mit Ethidiumbromid und SYBR Green I

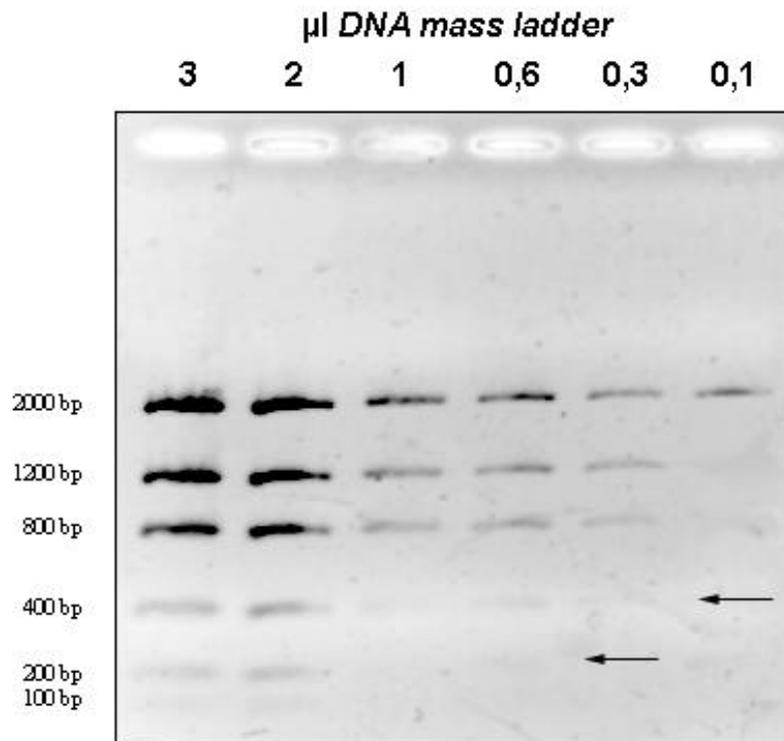


Abbildung 16: Untere Nachweisgrenze von DNA nach Anfärbung mit Ethidiumbromid.

Eine Verdünnungreihe von *DNA mass ladder* wurde auf einem Agarosegel getrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Gezeigt wird die inverse Aufnahme der Ethidiumbromid-Fluoreszenz mit der neuen Videokamera VarioCam. Die Gesamtkonzentration der *DNA mass ladder* betrug 3, 2, 1, 0,6, 0,3 und 0,1 µl pro Bande, wie in der Beschriftung gezeigt. Die DNA-Menge der einzelnen Banden ergibt sich aus der Gesamtmenge und der Fragmentlänge der entsprechenden Banden, welche alle äquimolar in der *DNA mass ladder* enthalten sind. Die schwächsten quantifizierbare Banden (Pfeile) enthalten 3 ng DNA. Wegen der Druckqualität sind sie leider nicht mehr zu sehen.

In der Abbildung 16 wird ein Agarosegel mit einer seriellen Verdünnung von *DNA mass ladder* von 3 - 0,1 µl Lösung gezeigt, welches mit Ethidiumbromid gefärbt ist. Die Sensitivität der Ethidiumbromid-Färbung beträgt ca. 3 ng. Bei der Färbung von DNA mit SYBR Green I können Werte bis zu 0,2 ng DNA noch quantifiziert werden (siehe Abbildung 17).

Zwei Vorteile der Färbung der DNA in Agarosegelen lassen sich mit SYBR Green I gegenüber Ethidiumbromid zeigen. Erstens ist die Sensitivität wesentlich höher. Zweitens ist der bei der Quantifizierung stark störende Hintergrund wesentlich geringer.

Damit ist auch das sogenannte Hintergrundrauschen wesentlich geringer. Bessere Abgrenzbarkeit der DNA-Banden vom Hintergrund in den Plots von NIH Image sind damit gegeben.

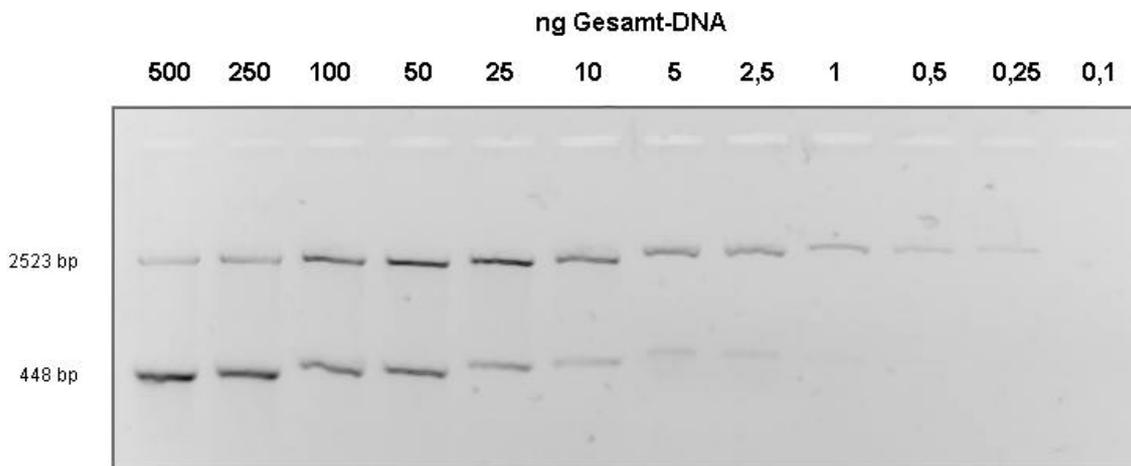


Abbildung 17: SYBR Green I gefärbtes Agarosegel mit verschiedenen DNA-Mengen zur Messung des Sättigungsbereiches des Fluoreszenzfarbstoffes. Als DNA wurde der mit *Pvu* II vorbehandelter Vektor pBluescript eingesetzt. Der Vektor wurde nach der Restriktionsendonukleasebehandlung photometrisch quantifiziert und in Mengen von 0,1 bis 500 ng Gesamtvektor-DNA (wie in der Abbildung angegeben) auf einem Agarosegel, welches SYBR Green I (10 µl/100 ml Agarosegel) enthielt. Die Aufnahme wurde mit der VarioCam gemacht. Die entsprechenden Werte können aus Abbildung 18 entnommen werden.

SYBR Green I bindet an die kleine Furche der DNA (Angaben der Vertriebsfirma MoBiTec, Göttingen). Um DNA quantitativ zu detektieren muß SYBR Green I im Überschuß vorhanden sein.

pBluescript Vektor-DNA wird mit der Restriktionsendonuklease *Pvu* II behandelt. Dabei werden 2 Fragmente mit 448 bp und 2513 bp Länge erhalten. Der behandelte Vektor wird anschließend photometrisch quantifiziert. Auf einem Agarosegel mit 10 µl SYBR Green I/100 ml Ansatz werden Mengen von 1 bis 500 ng Gesamtvektor-DNA elektrophoretisch getrennt. Von diesem Gel wird eine Aufnahme mit der VarioCam gemacht und wie beschrieben ausgewertet. Die Ergebnisse wurden in Abbildung 18 dargestellt. Man beachte, daß die eingesetzten Mengen sich auf Gesamtvektor-DNA beziehen und damit nicht identisch sind mit der DNA-Menge des 448 und 2513 bp-Fragmentes. In den Abbildungen wurde der jeweilige Bezugswert angegeben.

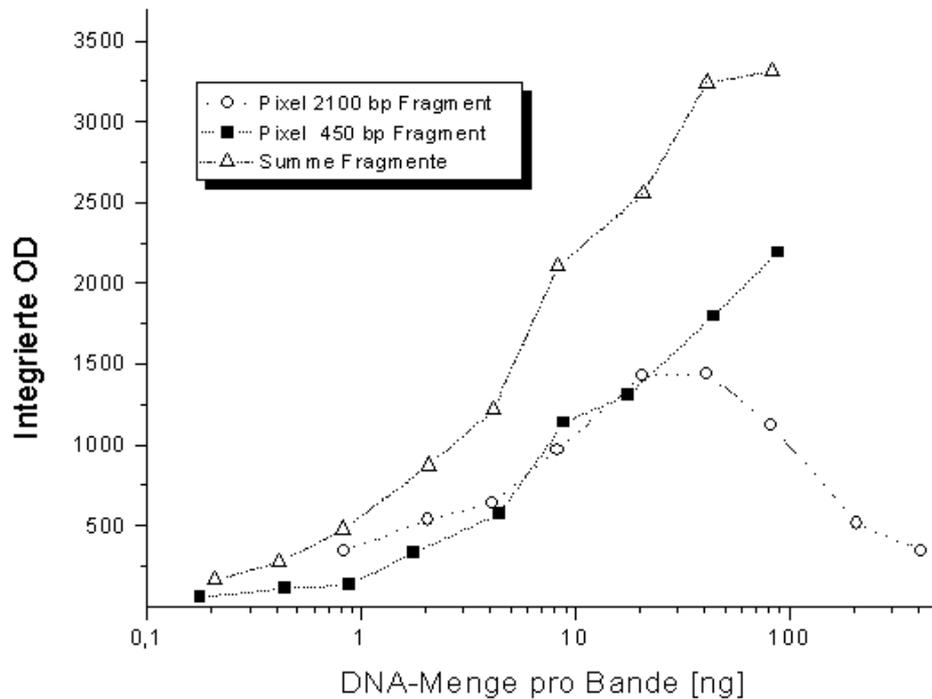


Abbildung 18: Quantifizierung von DNA-Banden des Agarosegels in Abbildung 17. Für die verschiedenen Mengen DNA wurde ein dimensionsloser Wert der integrierten OD ermittelt. Das 448 bp Fragment ist offenen Quadraten, das 2513 bp Fragment mit offenen Kreisen und die addierte Gesamtmenge innerhalb einer ausgewerteten Bande des Gels als gefüllte Kreise dargestellt.

In Abbildung 18 erkennt man, daß die kleinste noch quantifizierbare DNA-Menge unter den genannten Bedingungen bei ca. 0,2 ng pro Geltasche liegt. Ab einer Gesamtmenge von mehr als 30 ng Gesamt-DNA kann die 2513 bp-Bande nicht mehr vom eingesetzten SYBR Green I gesättigt werden. Die 448 bp-Bande ist jedoch noch bis fast 100 ng im ansteigenden Bereich.

Dies läßt sich durch das Laufverhalten der Banden erklären. Die kleinere Bande läuft in Front. Sie nimmt den Farbstoff SYBR Green I auf und wird vollständig von ihm abgesättigt. Die darauffolgende 2513 bp Bande läuft in dem bereits an SYBR Green I verminderten Gelbereich. Folglich kann sie mit dem weniger vorhandenen Farbstoff ab einer gewissen Menge nicht mehr abgesättigt werden. Die Farbtintensität wird geringer, als es der DNA-Menge entsprechen müßte. Zusätzlich ist die Wegstrecke durch das Gel und damit die Menge an SYBR Green I geringer. Dadurch wird die Sättigung mit SYBR Green I mit bereits geringeren DNA-Mengen erreicht, als dies bei der 448 bp Bande der Fall ist. Die Wegstrecke der DNA durch das Gel spielt also eine Rolle bei der Sättigung. Entscheidend für eine Quantifizierung mit einem Farbstoff, der mit in das Gelsystem integriert wurde, ist also eine empirisch ermittelte

Laufstrecke. Sie muß konstant gehalten werden, um eine Absättigung der zu messenden DNA-Mengen zu gewähren und damit vergleichbare Quantifizierungen zu erhalten. Die Laufstrecke wurde empirisch auf 7 cm für den Farbstoff Bromkresolgrün festgelegt.

Für die Anwendung ergibt sich eine Verwendung der 448 bp Vergleichs-DNA von 0,2 bis 100 ng. Dies entspricht einer Dynamik von 500. Die 2513 bp Bande kann nur sehr beschränkt unter diesen Bedingungen zur Quantifizierung eingesetzt werden. Spätere Untersuchungen zeigen eine breitere Einsatzmöglichkeit bei längeren Laufstrecken (s.u.), die zu einer besseren Absättigung mit SYBR Green I führt.

5.3.6 Hintergrund konzentrierter Gelbanden

Bei der Quantifizierung großer DNA-Mengen auf einem Gel (ab ca. 20 ng pro Spur) zeigt sich oft ein sogenannter Halo. Um die eigentliche Bande herum befindet sich ein Lichthof in der Aufnahme. Dieser entsteht, besonders bei dickeren Gelen, durch Streustrahlung der gefärbten DNA horizontal in das Gel. Dieses Phänomen zeigt sich deutlich sowohl auf der Aufnahme als auch auf dem Quantifizierungsplot.

Eine theoretische Lösung dieses Problems konnte nicht gezeigt werden. In dieser Arbeit wurde es als Artefakt gewertet und zusammen mit dem sonstigen Hintergrund geometrisch in dem Quantifizierungsplot abgetrennt.

5.3.7 Gel und Markerbanden

Damit ein größerer Messwertbereich mit der Cybertech CS-1 erhalten werden konnte, wurde die Menge an aufgetragenem PCR-Produkt variiert. Von dem zu messenden PCR-Produkt wurde 5, 10 oder 30 µl pro Spur aufgetragen. Dies wurde empirisch ermittelt. Dazu waren die üblichen 70 ml Agarosegel mit einer Grundfläche von ca. 100 cm² zu klein. Es haben sich Gel mit 200 ml für die verwendeten Gelkammer bewährt. Damit war es möglich quantitativ 30 µl PCR-Produkt in eine Spur aufzutragen.

Nach der Auswertung wurde auf die standardisierte Menge von 50 µl/PCR-Reaktion zurückgerechnet.

Die Menge an verwendetem DNA-Marker oder besser *Pvu* II behandeltem und aufgereinigtem pBluescript wurde so berechnet, daß die kleinste und größte Menge an zu messender DNA innerhalb der gemessenen Kalibrierung lag. Extrapolationen über den Kalibrierungsbereich sollten prinzipiell nicht angewendet werden. Auf *DNA mass ladder* zur Kalibrierung der Quantifizierung wurde in späteren Versuchen ganz verzichtet (s. a. Kapitel 5.3.9)

5.3.8 Genauigkeit der Messung

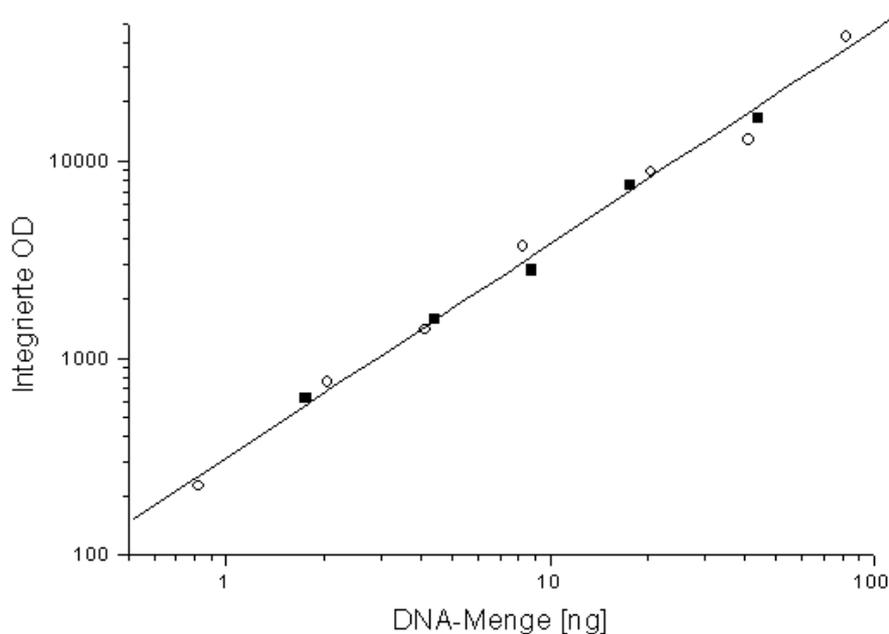


Abbildung 19: Genauigkeit der Quantifizierung verschiedener DNA-Mengen. Verschiedene Mengen pBluescript-DNA wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und mit Hilfe der bisher beschriebenen Quantifizierungsmethode (SYBR Green I-Färbung (precasting), Bromkresolgrün im Auftragspuffer, VarioCam, modifizierte Makros, OD-Kalibrierung) ausgewertet. Die runden Kreise entsprechen einem 450 bp-Fragment von pBluescript (mit *Pvu* II behandelt), die Vierecke entsprechen dem 2513 bp-Fragment von pBluescript (mit *Pvu* II behandelt).

In Abbildung 19 wurden verschiedene Mengen pBluescript-DNA (*Pvu* II behandelt und aufgereinigt) auf einem Agarosegel (15 µl SYBR Green I/60 ml Gel) aufgetrennt und mit den beschriebenen Methoden quantifiziert. Die Kreise sind die Mengen des 450 bp-Fragmentes, die Quadrate die Mengen des 2513 bp-Fragmentes aufgetragen gegen die Pixel, um den immanenten Fehler der Messung zu bestimmen. Als

Fehlergrößen fließen hier sowohl Pipettierfehler als auch die Messfehler der Quantifizierung mit NIH Image ein.

Die Genauigkeit des Messverfahrens ausgedrückt durch den Korrelationskoeffizienten ist $>0,99$, es ergibt sich eine Standardabweichung von 0,08 und eine Irrtumswahrscheinlichkeit p von <0.0001 . Diese Daten beschreiben die hohe Reproduzierbarkeit der Messungen, jedoch nicht systematische Fehler (s. a. Kapitel 9.1).

5.3.9 Vergleich von *DNA mass ladder* und pBluescript-Vektor als DNA-Standard

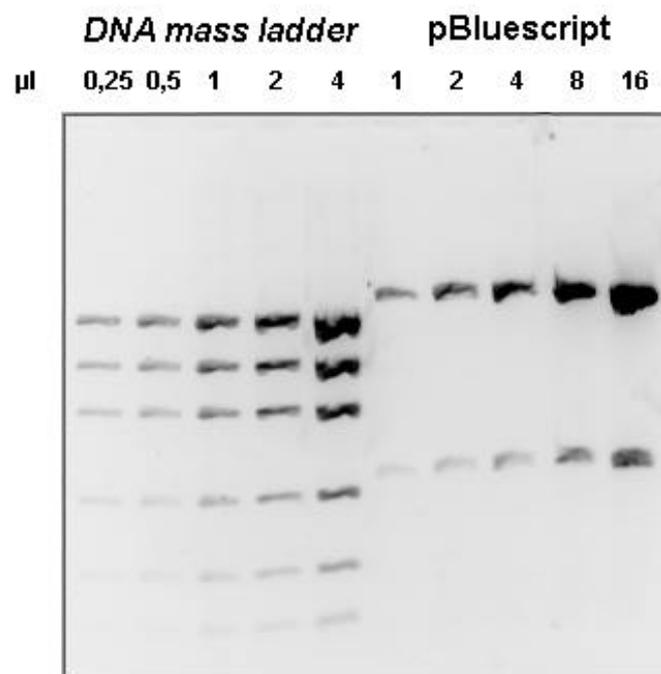


Abbildung 20: Agarosegel auf dem gleichzeitig bekannte Mengen *DNA mass ladder* und *pBluescript-DNA* aufgetragen wurden. Die Mengen in µl ausgedrückt sind aus der Abbildung ersichtlich, die Konzentration des pBluescript ist 5 ng/µl. Die *DNA mass ladder* wurde als Kalibrierung zum Quantifizieren der bekannten DNA-Mengen pBluescript verwendet. Die Auswertung ist in Abbildung 21 dargestellt.

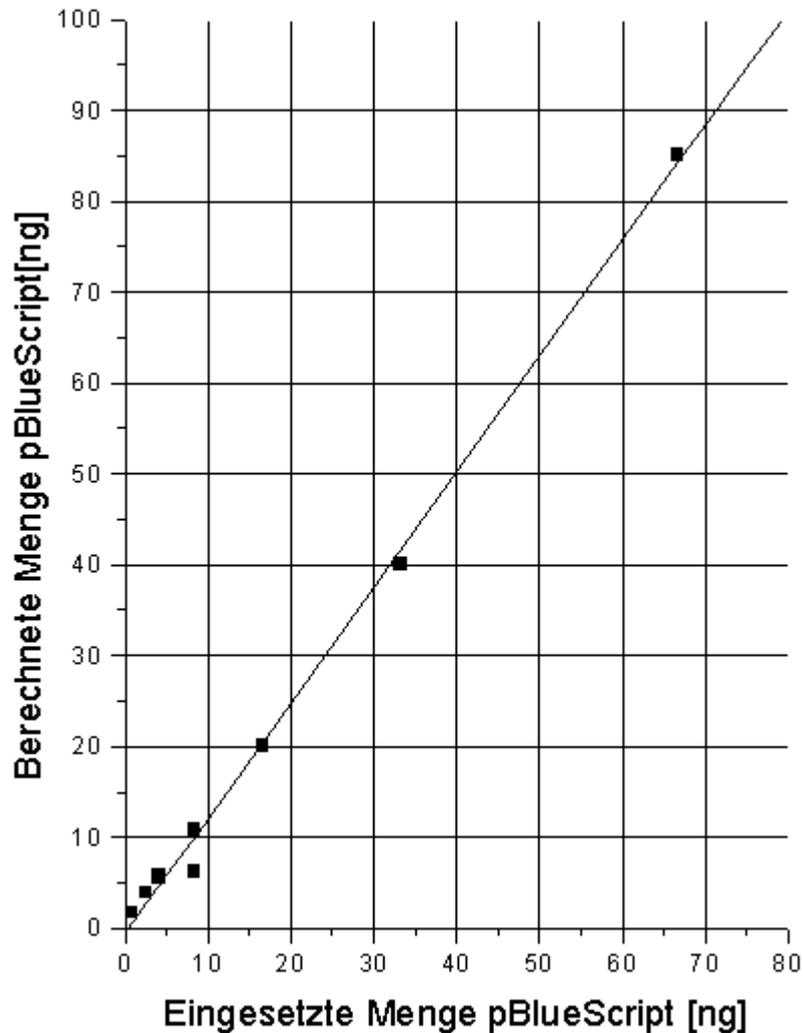


Abbildung 21: Gleichzeitige Messung von *Pvu* II behandelten pBluescript mit *DNA mass ladder* als Kalibrierung. Eine Aufnahme eines mit SYBR Green I angefärbten Agarosegels mit unterschiedlichen Mengen pBluescript und *DNA mass ladder* wurden quantifiziert. Man erkennt deutlich einen systematischen Fehler in der Steigung. Durch die Auswaschung des im Agarosegels integrierten Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green I durch die in Front laufenden DNA-Banden wurden die folgenden Banden der *DNA mass ladder* nicht mehr quantitativ angefärbt. Es entsteht ein systematischer Fehler.

Es wurden bei Verwendung von *DNA mass ladder* (ein käuflicher DNA-Marker mit DNA-Fragmentlängen von 2000, 1200, 800, 400, 200 und 100 bp) als Kalibrierungsstandard für die Quantifizierung Effektivitäten einiger PCRs von mehr als 100% gefunden. Dies ist nicht mit der Theorie der PCR vereinbar. Ein Fehler in der Kalibrierung mit *DNA mass ladder* zeigte sich im folgenden.

In einem Versuch wurde *DNA mass ladder* als Standard zur Quantifizierung von bekannten Mengen von pBluescript (*Pvu* II behandelt und aufgereinigt) verwendet.

Die Ergebnisse der Quantifizierung werden in Abbildung 21 gezeigt. Es wurden Mengen von 1 bis 16 μl pBluescript (5 ng/ μl) aufgetragen. Anschließend wurde mit den beschriebenen Methoden quantifiziert.

Man würde eine Richtigkeit (nicht Genauigkeit, s. a. Kapitel 9.1) der Fitgeraden von 1 erwarten; 1 μg sollte schließlich auch 1 μg ergeben. Jedoch zeigte sich bei Verwendung der *DNA mass ladder* eine starke Verzerrung der Steigung. Statt der erwarteten Steigung von 1 wurde eine Steigung von etwa 0,8 erhalten.

Die längeren DNA-Banden der *DNA mass ladder* werden mit dem SYBR Green I-Farbstoff nicht mehr abgesättigt, wie in Kapitel 5.3.1 bereits ausführlich beschrieben. Daraus ergibt sich ein entscheidender Fehler in der Richtigkeit der Messung, es handelt sich um einen systematischen Fehler (s. a. Kapitel 9.1). Auf die Verwendung von *DNA mass ladder* wird daher verzichtet und nur noch *Pvu* II behandelte pBluescript-Vektor zur Kalibrierung bei der Quantifizierung verwendet.

5.3.10 Praktisches Vorgehen

Aus den vorgestellten Daten ergeben sich Besonderheiten für die Quantifizierung mit der Cybertech CS-1-Kamera. Da die Dynamik der Kamera nur sehr gering ist, muß man sich einer modifizierten Handlungsweise bedienen.

Zur Erhöhung der Sensitivität werden bis zu 30 μl PCR-Ansatz in einer Geltasche aufgetragen. Dies ist technisch nicht mit den Standardgelen möglich. Deshalb werden die mit 70 ml Agarosegel-Ansatz hergestellten Gele durch 200 ml Gelen ersetzt. Auf diese Art kann man pro Geltasche bis zu 30 μl PCR-Ansatz auftragen und so die Sensitivität stark erhöhen. Da SYBR Green I kaum Hintergrund zeigt, kann die Sensitivität um mehr als den Faktor 3 erhöht werden und ermöglicht so eine Quantifizierung auch noch geringerer Mengen an DNA.

Desweiteren ist die Dynamik so schwach, daß praktisch keine unterschiedlichen Intensitäten (sprich DNA-Mengen), die sich um mehr als den Faktor 10 unterscheiden, aufgenommen und ausgewertet werden können. Für eine PCR mit einer angenommenen Effektivität von etwa 2 pro Zyklus entspricht dies ungefähr 3 Zyklen ($2^3 = 8$). Nach jedem 3.Zyklus wurde die Menge an aufgetragener DNA vermindert. Für die ersten zu quantifizierenden PCR-Ansätze wurden je 30 μl PCR-Ansatz verwendet, dann je 10 μl und schließlich bei höheren Zyklenzahlen mit entsprechend höherer DNA-Menge pro PCR-Ansatz nur 3 μl . Durch die unterschiedlichen

Pipettiermengen wurde natürlich ein statistischer Fehler in Form einer Ungenauigkeit in Kauf genommen. Diese Prozedur beruhte auf empirischen Erfahrungen und mußte somit immer wieder neu ausgelotet werden. Dies führte dazu, daß man, um vernünftig auswertbare Gele zu erhalten, alle zu einem Versuch aufgenommen Gele oft mehrere Male wiederholen mußte.

Ein offensichtlich großer Aufwand, welcher mit der neueren Kamera VarioCam nicht mehr notwendig ist. Da ein Teil dieser Arbeit auf diesen Ergebnisse beruht, wird dieses Verfahren dargestellt. Deutliche Verbesserungen kann die VarioCam bieten und deshalb wird das wesentlich einfachere Vorgehen mit der VarioCam empfohlen.

Als Kalibrierungsstandard wurde *Pvu* II behandelte und anschließend aufgereinigte pBluescript-DNA benutzt. Dazu wurde pBluescript-Vektor in kompetente *E. coli* Zellen transfiziert, wie in dem Methodenteil beschrieben. Die Zellen wurden in einer Übernachtskultur angezogen und am folgenden Tag auf einer Petrischale mit LB Selektiv-Agarplatten angezüchtet. Aus den weißen Kolonien wurden einzelne Keime in 100 ml LB-Medium übertragen und in einer Übernachtskultur hochgezüchtet. Die pBluescript-DNA wurde mit dem *Qiagen Plasmid Midi Kit* aus den Bakterien isoliert und in einer entsprechenden Menge ddH₂O aufgenommen. In einer anschließenden Behandlung mit dem Restriktionsenzym *Pvu* II in Puffer bei 37°C für 4 Stunden wurde der Vektor linearisiert und in zwei Fragmente gespalten. Dabei entstand ein 450 bp und ein 2513 bp Fragment. Das Restriktionsenzym wurde für 5 min bei 95°C hitzeinaktiviert. Die Fragmente wurden anschließend mit dem *Qiagen preparation kit* aufgereinigt und photometrisch quantifiziert.

5.4 Standardisierung der PCR

Auch bei der PCR mußten zuerst einige Optimierungen vorgenommen werden, bevor man anfangen konnte zu quantifizieren.

5.4.1 Primer

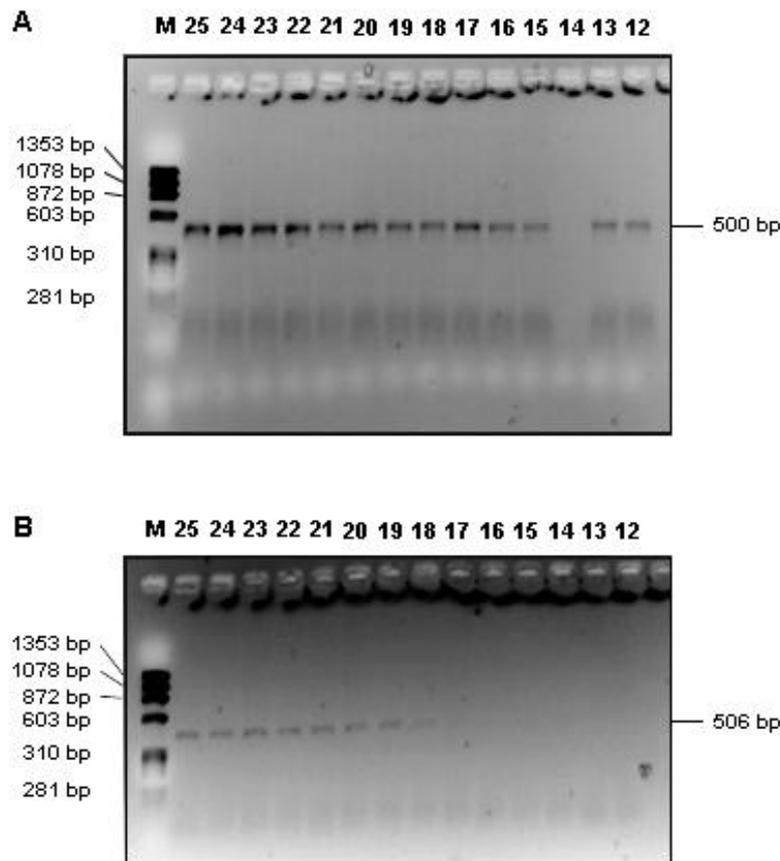


Abbildung 22: Probleme bei der zyklenabhängigen Amplifikation mit bestimmten Primern. 100 ng DNA eines KSS-Patienten pro 100 μ l PCR-Ansatz wurden mit der im Methodenteil beschriebenen PCR (100 μ l) mit den Primern 9.6for und Collrev für Wildtyp-DNA (Abbildung A, 500 bp-Fragment) sowie ATPfor und 13774rev für *common deletion* (Abbildung B, 506 bp-Fragment) bei einer Annealingtemperatur von 60°C für 12 - 25 Zyklen amplifiziert. Als DNA-Längenmarker wurde Φ X174 (*Hae* III behandelt) eingesetzt. Mit den verwendeten Primern konnte keine Zyklusabhängigkeit der PCR-Produkte gefunden werden.

Ein sensibler Punkt bei jeder PCR sind immer die Primer. Auch bei der Quantifizierung zeigte sich die Primerauswahl als entscheidend. In Abbildung 22 werden zwei solcher Fallstricke aufgezeigt. 100 ng DNA eines KSS-Patienten pro 100 μ l PCR-Ansatz wurden mit der im Methodenteil beschriebenen PCR (100 μ l) mit den Primern 9.6for und Collrev für Wildtyp-DNA (Abbildung 22 A, 500 bp-Fragment) sowie ATPfor und 13774rev für *common deletion* (Abbildung 22 B, 506 bp-Fragment) für 12 - 25 Zyklen bei einer Annealingtemperatur von 60°C amplifiziert. Bei der Amplifikation mit dem Wildtyp-Primerpaar zeigt sich keine Zyklusabhängigkeit. Zufällige Ereignisse beim Primerannealing oder andere Faktoren scheinen bei der Amplifikation zu

Unregelmäßigkeiten des PCR-Produkts zu führen. Auch mit anderen Primerpaaren konnten vergleichbare Effekte gezeigt werden.

Im Falle des *common deletion* Primerpaar zeigte sich ein frühzeitiges Erreichen der Plateauphase nach nur wenigen Zyklen der exponentiellen Amplifikation. Der Grund für diese Effekte könnte eine frühe Inhibition der Amplifikation durch Annealen der nicht optimalen Primer mit Folgeprodukten sein.

Auf die Verwendung dieser Primer wurde verzichtet. Neue Primer wurden mit Hilfe des CGC-Programmpaketes im DKFZ, Heidelberg, bestimmt und für die folgenden Arbeiten eingesetzt.

5.4.2 DNA-Quantitierung von Biopsiematerial

Bei der Amplifikation von Templatmengen mit nur 0,1 und 0,01 µg Gesamt-DNA in einer PCR mit den Primern 9.6for und 689LM5 bei einer Annealingtemperatur von 50°C nach den Standardbedingungen zeigte sich bei 23, 26 und 29 Zyklen (Abbildung 23, Spur 1-3) und bei 26, 29 und 32 Zyklen (Abbildung 23, Spur 4-6) eine Amplifikation von DNA-Leiter. Es dürfte sich dabei nicht etwa um das für apoptotische Zellen charakteristische *DNA laddering* handeln, sondern eher um Effekte die durch die Bildung von Primer-Dimern bzw. Primer-Oligomere handeln. Dieses Verhalten trat nicht konstant auf, zeigte sich jedoch gelegentlich bei diesen. Diese Primer waren deshalb auch nicht für die Quantitierung von DNA geeignet. Fraglich ist auch, ob die sehr geringen Mengen an Gesamt-DNA in der Amplifikationslösung diese DNA-Leiterbildung bedingen. Da die DNA-Proben aus Autopsiematerial stammen, ist eine starke Fragmentierung der DNA wahrscheinlich, welche die Bildung dieser Fragmente hervorruft.

Für quantitative Amplifikationen wurden nur noch die Primerpaare 8865for und 9361rev für die Wildtyp-mtDNA-Bestimmung und 8421for und 13917rev für die *common deletion*-Bestimmung angewendet. Sie zeigten keine der oben beschriebenen Effekte.

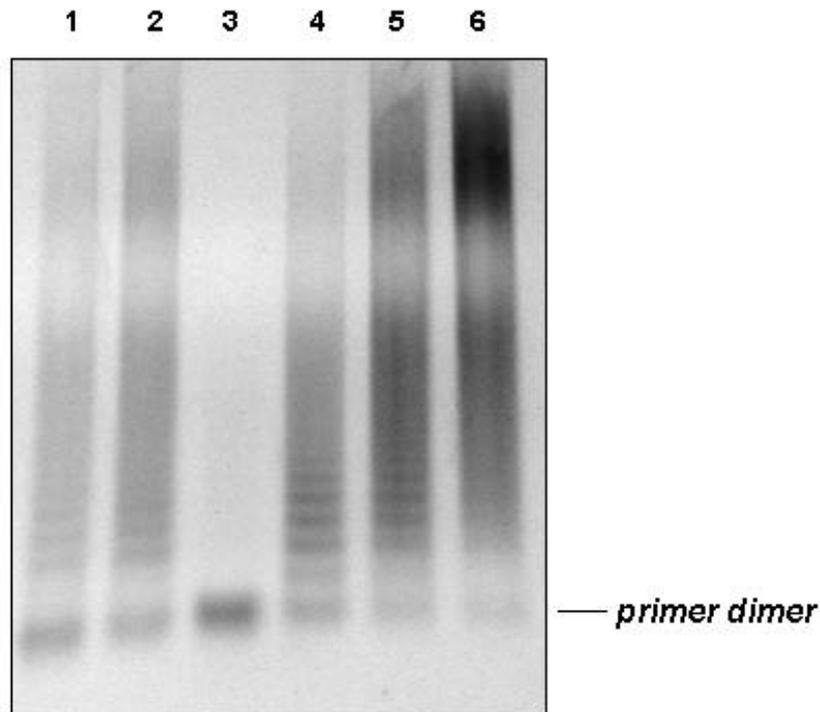


Abbildung 23: Bildung von einer DNA-Leiter bei der Amplifikationen geringer Templatmengen bei der PCR. Bei der Amplifikation von Templatmengen mit 0,1 und 0,01 μ g Gesamt-DNA in einer PCR mit den Primern 9.6for und 689LM5 (1111 bp) bei einer Annealingtemperatur von 50°C zeigte sich bei 23, 26 und 29 Zyklen (Spur 1-3, 0,1 ng Gesamt-DNA) und bei 26, 29 und 32 Zyklen (Spur 4-6, 0,01 ng Gesamt-DNA) eine DNA-Leiter.

5.4.3 Fragmentlänge

Die Fragmentlänge der durch PCR amplifizierten PCR-Produkte sollte unter idealen Bedingungen keine Rolle bei der Quantitierung spielen. Nimmt man jedoch die Fragmentierung der Templat-DNA durch Abbauvorgänge bei den autoptischen Proben mit in die Überlegungen auf, so ist es sehr wahrscheinlich, daß kleine PCR-Fragmente auf eine scheinbar höhere Menge an Ausgangs-DNA hinweisen. DNA-Fragmente können immer dann als Matrizen der PCR dienen und ein Amplifikationsprodukt bilden, wenn beide Primer an sie binden können. Sind die DNA-Matrizen kürzer als das zu amplifizierende Fragment, kann maximal ein Primer binden und eine Amplifikation eines Einzelstrangs initiieren. Es kommt in diesem Fall nicht zu einer PCR-Amplifikation, da der in den nächsten Schritten benötigte reverse Primer

nicht an dieses kurze DNA-Fragment binden kann. Es werden geringe Mengen ssDNA amplifiziert. Eine exponentielle Vermehrung der DNA kann nicht stattfinden.

Dementsprechend würde bei der Quantifizierung auch eine höhere Menge an Ausgangs-DNA gefunden werden, wenn man die Amplifikationen mit Primern durchführt, die zu kleineren Fragmenten führt.

Da jedoch kleinere DNA-Fragmente durch einen interkalierenden Farbstoff, wie Ethidiumbromid, oder durch einen Farbstoff der in der kleinen Furche der DNA bindet, wie SYBR Green I, entsprechend der Länge der amplifizierten DNA erst in einem späteren Zyklus genügend angefärbt werden, um sie nachweisen zu können, sollten die PCR-Fragmente auch wiederum nicht zu kurz sein.

In dieser Arbeit werden aus den genannten Gründen eine Fragmentlänge von ca. 500 bp verwendet.

Es muß noch einmal darauf hingewiesen werden, das dieses Problem unabhängig von der verwendeten Methode zur Quantifizierung besteht; es ist nur abhängig von der Degradierung der Templat-DNA. Bei Autopsien ist dieses Problem praktisch immer vorhanden.

5.4.4 Grenzen der einzusetzenden Menge an Vent Polymerase

Um die Kosten für eine größere Menge an PCR-Reaktionen gering zu halten wurde versucht die Menge an eingesetzter Vent-Polymerase zu verringern. Dazu wurde bei verschiedenen Mengen an Template-DNA die verwendete Menge an Vent Polymerase um die Hälfte reduziert. Dazu wurde eine PCR für 40 Zyklen mit den Primer 9.6for und Collrev nach Standardbedingungen bei einer Temperatur von 55°C Annealingtemperatur durchgeführt. Als Templatemengen wurden 10 ng, 1 ng und 0,1 ng Gesamt-DNA mit 2 U Vent Polymerase/100 µl PCR-Ansatz und 1 U Vent Polymerase/100 µl PCR-Ansatz eingesetzt. Die Aufnahme des mit Ethidiumbromid angefärbten Agarosegel nach elektrophoretischer Trennung zeigt Abbildung 24. Man erkennt deutlich die wesentlich geringe Amplifikation durch die auf 1 U/100 µl PCR-Reaktion verringerte Menge an Vent Polymerase (Spur 4 bis 6) gegenüber 2 U/100 µl PCR-Reaktion (Spur 1 bis 3). In Spur 4 bis 6 zeigen sich sogenannte Primer-Dimer, als Hinweis auf eine, wenn auch nur geringe Amplifikation, der Produkte beim Unterschreiten der kritischen Grenze an Polymerase.

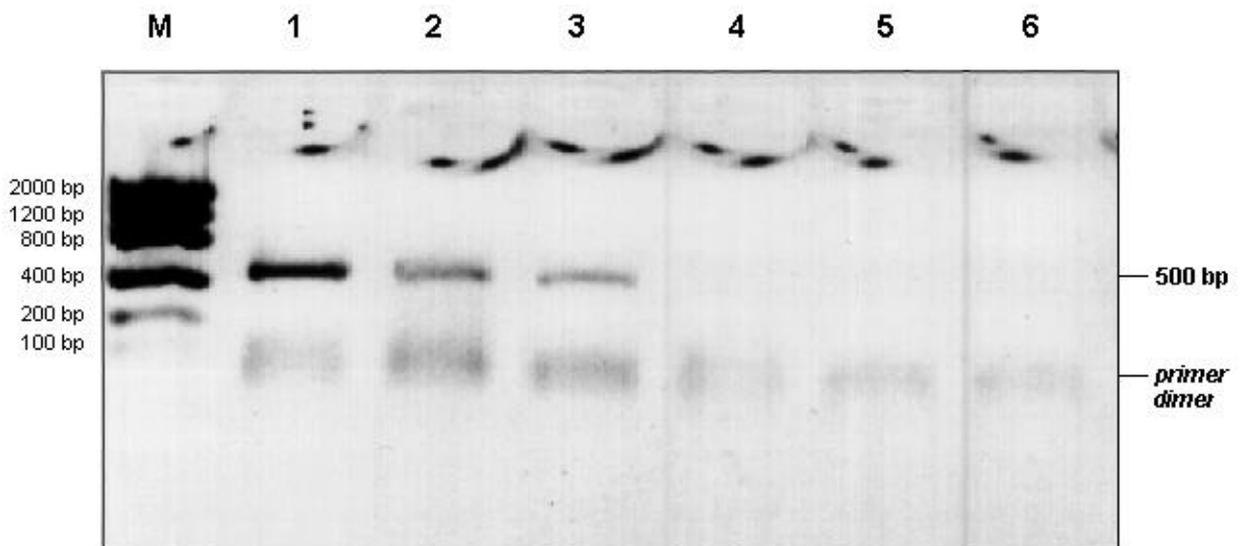


Abbildung 24: Bestimmung der einzusetzenden Vent Polymerase zur quantitativen PCR.

Das mit Ethidiumbromid angefärbte Agarosegel zeigt PCR-Produkte nach 40 Zyklen mit den Primern 9.6for und Collrev (500 bp). In Spur 1 bis 3 wurden je 2 U Vent Polymerase pro 100 μ l PCR-Reaktion, in Spur 4 bis 6 je 1 U Vent Polymerase pro 100 μ l PCR-Reaktion eingesetzt. In Spur 1 und 4 wurden 10 ng, in Spur 2 und 5 je 1 ng und Spur 3 und 6 je 0,1 ng Gesamt-DNA-Templat eingesetzt.

2 U/100 μ l PCR-Reaktion haben sich als die geringste verwendbare Menge unter den hier verwendeten Bedingungen erwiesen. Wahrscheinlich spielt die Fragmentierung der DNA durch Abbauvorgänge bei den autoptisch gewonnenen DNA-Fragmenten eine Rolle. Hier könnte es zu kompetitiven Reaktionen mit den PCR-Produkten kommen.

5.4.5 Gesamtmenge an eingesetzter DNA

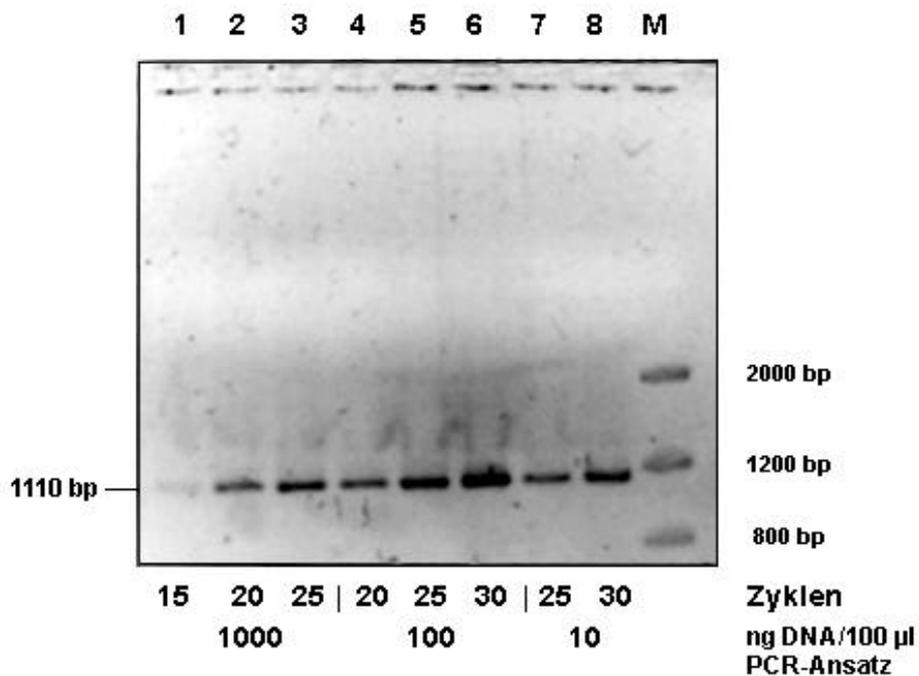


Abbildung 25: PCR mit variierenden Templat-Mengen von Gesamt-DNA. Mit Ethidiumbromid angefärbtes Agarosegel von PCR-Produkten mit variierenden Zyklenzahlen und eingesetzten Templat-Mengen. Spur 1 bis 3 zeigt die Produkte einer PCR mit einer Templat-Menge von 1000 ng Gesamt-DNA nach 15, 20 und 25 Zyklen. Spur 4 bis 6 zeigt die Produkte einer PCR mit einer Templat-Menge von 100 ng Gesamt-DNA nach 20, 25 und 30 Zyklen. Spur 7 und 8 zeigt die Produkte einer PCR mit einer Templat-Menge von 10 ng Gesamt-DNA nach 25 und 30 Zyklen.

Für die Quantifizierungen sehr kleiner DNA-Mengen wäre es ein erheblicher Gewinn, wenn man die eingesetzte Gesamt-DNA-Menge einfach erhöhen könnte. Dann wären auf einfache Art und Weise ein Schritt in Richtung kleinerer Mengen nachweisbarer DNA getan.

In einer PCR wurde die Templat-Menge an DNA um das 10-fache des allgemein üblichen erhöht. Es wurden 8 Ansätze mit je 1000 ng, 100 ng und 10 ng Templat-Menge Gesamt-DNA in einer PCR für 15 bis 30 Zyklen amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarosegel getrennt und mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Abbildung 25 zeigt ein Bild des Agarosegels. Man erkennt beim Vergleichen von Spur 5 und 6 (100 ng: 25 und 30 Zyklen) mit Spur 7 und 8 (10 ng: 25 und 30 Zyklen) eine Verminderung der PCR-Produkte. Dies entspricht unseren Erwartungen. Kleinere Mengen Templat-DNA erzeugt geringere Produktmengen nach den gleichen Zyklenzahlen. Vergleicht man jedoch Spur 2 und 3 (1000 ng: 20 und 25 Zyklen) mit

Spur 4 und 5 (100 ng: 20 und 25 Zyklen) so erkennt man deutlich eine geringere Produktmenge trotz mehr eingesetzter Templat-DNA.

Überraschenderweise zeigte aber eine Erhöhung der DNA-Menge auf die 10-fache der für die PCR empfohlenen Templat-Menge auf 1000 ng Gesamt-DNA nicht eine Erhöhung der PCR-Produkte bei vergleichbaren Zyklenzahlen.

Es ist jedoch unbedingt zu bemerken, daß die in der gesamten Arbeit verwendete DNA von Autopsieproben stammt, die sich mindestens 12 h (meist sogar wesentlich länger) vor dem Einfrieren bei Körpertemperatur befanden. Ein teilweiser Abbau und damit eine zunehmende Fragmentierung der DNA ist dabei zu erwarten. Diese fragmentierte mtDNA muß um die Reagenzien während der PCR konkurrieren. Eine Verminderung der Effizienz ab einer bestimmten Menge ist bei dieser DNA zu erwarten. Ähnliche Überlegungen stellte Morrison und Gannon, 1994, über die Plateauphase an. Auch in der Plateauphase muß es zu kompetitiven Reaktionen von Substrat mit neu amplifizierter DNA geben, da, wie die Autoren darlegen, in der Plateauphase die Reagenzien nur zur einem Bruchteil aufgebraucht sind.

Wie sich die Reaktion bei Biopsiematerial oder künstlich hergestellter DNA verhält, ist damit nicht eindeutig geklärt. Allerdings sollte dieses Ergebnis als ein Hinweis auf Probleme diesbezüglich ernst genommen werden.

5.4.6 Annealingtemperatur

Die Annealingtemperatur spielt bei der PCR neben den Primern immer eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Produkten. Ob sie auch einen großen Einfluß auf die Effektivität hat war bisher nicht detailliert beschrieben worden. Fraglich ist auch, ob die Temperatur eingesetzt werden kann, um die PCR zu optimieren. Eine geringere Effektivität erweitert eventuell den Messwertbereich bei der PCR, eine erhöhte Effektivität führt eventuell zu einem größeren exponentiellen Bereich, da die Polymerase weniger hitzeinaktiviert wird.

Deshalb wurden gleiche PCR-Ansätze unterschiedlichen Annealingtemperaturen unterworfen. 100 µg Patienten-DNA/100 µl PCR-Ansatz wurde mit den Primern 8865for und 9361rev unter Standardbedingungen für 10 - 25 Zyklen amplifiziert (497 bp-Fragmentlänge). Die Annealingtemperatur betrug in einer Gruppe 54°C und in der anderen Gruppe 57°C. Die Ergebnisse sind in Abbildung 26 dargestellt. Man erkennt eine leicht geringere Effektivität (Steigung) der PCR bei der

Annealingtemperatur von 57°C. Die höhere Annealingtemperatur führt zu einer Erhöhung der Annealingstringenz gegenüber der niedrigeren Temperatur von 54°C. Die Anzahl der messbaren Zyklen verändert sich praktisch jedoch nicht. Man kann keinen Vorteil für die Amplifikation und Quantifizierung bei einer höheren oder niedrigeren Annealingtemperatur (innerhalb eines vernünftigen Bereich) finden. Ganz allgemein kann man sagen, daß die Erhöhung der Stringenz mit einer Erniedrigung der Amplifikationsrate verknüpft ist. Da die höhere Temperatur die stringentere ist, wird sie zu zuverlässigeren Ergebnissen führen und wurde deshalb weiterverwendet.

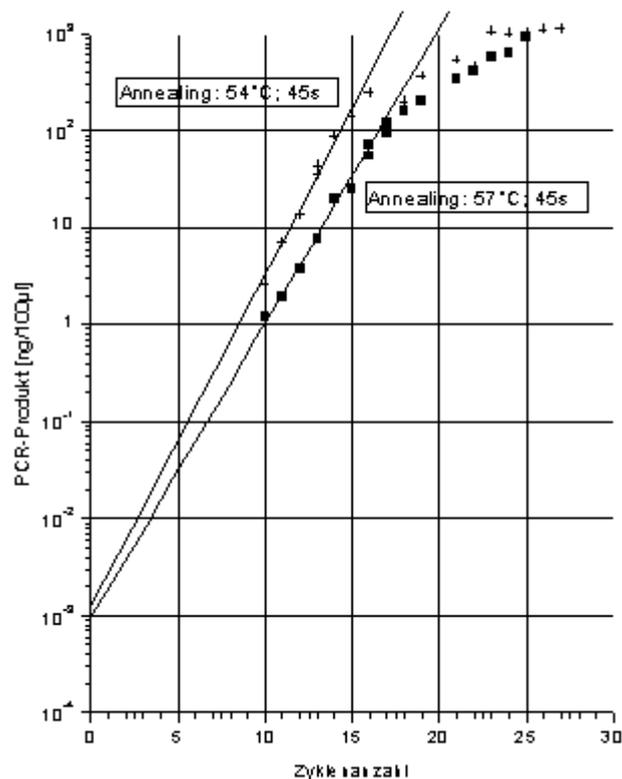


Abbildung 26: Variation der Menge an Amplifikationsprodukten bei unterschiedlichen Annealingtemperaturen. Die PCR wurde mit 100µg Patienten-DNA /100µl PCR-Ansatz unter Standardbedingungen mit den Primern 8865for und 9361rev durchgeführt (497 bp-Fragmentlänge). Die Annealingtemperatur betrug 54°C (Kreuze) und 57°C (Quadrate). Es wird die Menge an PCR-Produkten nach 10 - 25 Zyklen gezeigt.

5.5 Qualitative und quantitative Auswertung von Probanden-DNA

Damit sind die theoretischen und praktischen Voraussetzungen zur Quantifizierung gegeben.

5.5.1 Quantitative Auswertung durch kinetische PCR

Die bisher vorgestellten Methoden sollen nun zur Quantifizierung der mtDNA eines Patienten mit bekannter *common deletion* eingesetzt werden. Das Ergebnis wird anschließend mit Hilfe eines *Southern Blots* der gleichen DNA überprüft.

Für die Wildtyp-Quantifizierung wird eine PCR mit 100 ng DNA/100 µl PCR-Ansatz mit den Primern 8865for und 9361rev (497 bp-Fragmentlänge) bei einer Annealingtemperatur von 52°C für 17 bis 24 Zyklen durchgeführt. Zur Quantifizierung der *common deletion* wird nach dem gleichen Verfahren mit den Primern 8421for und 13917rev (520 bp-Fragmentlänge) für 16 bis 28 Zyklen amplifiziert. Die PCR-Produkte werden wie beschrieben aufgetrennt und quantifiziert. Danach werden die PCR-Produktmengen gegen die Zyklen aufgetragen. Das Ergebnis ist in Abbildung 27 dargestellt.

Nach Auswertung der Messung findet man 0,20 ng Wildtyp-DNA und 0,25 ng *common deletion*-DNA pro 100 µl PCR-Ansatz. Da 100 µl PCR-Ansatz 100 ng Gesamt-DNA enthalten, kann man sagen, daß 0,2% (w/w) Wildtyp und 0,22% (w/w) *common deletion* im Verhältnis zur Gesamt-DNA vorliegen. Die Menge an mtDNA beträgt somit 0,43% (w/w) von der Gesamt-DNA. Der Anteil von *common deletion*-DNA zur mtDNA ist 53% (w/w), in molarer Angabe 61%. Man beachte, daß es sich einmal um Gewichtsprozent, beim letzteren jedoch um molares Verhältnis handelt. Da Wildtyp und *common deletion* ein unterschiedliches Molekulargewicht haben, ist dies immer bei der Umrechnung mit einzubeziehen.

Die Effizienzen dieser PCRs betragen 1,56 für Wildtyp und 1,60 für *common deletion*.

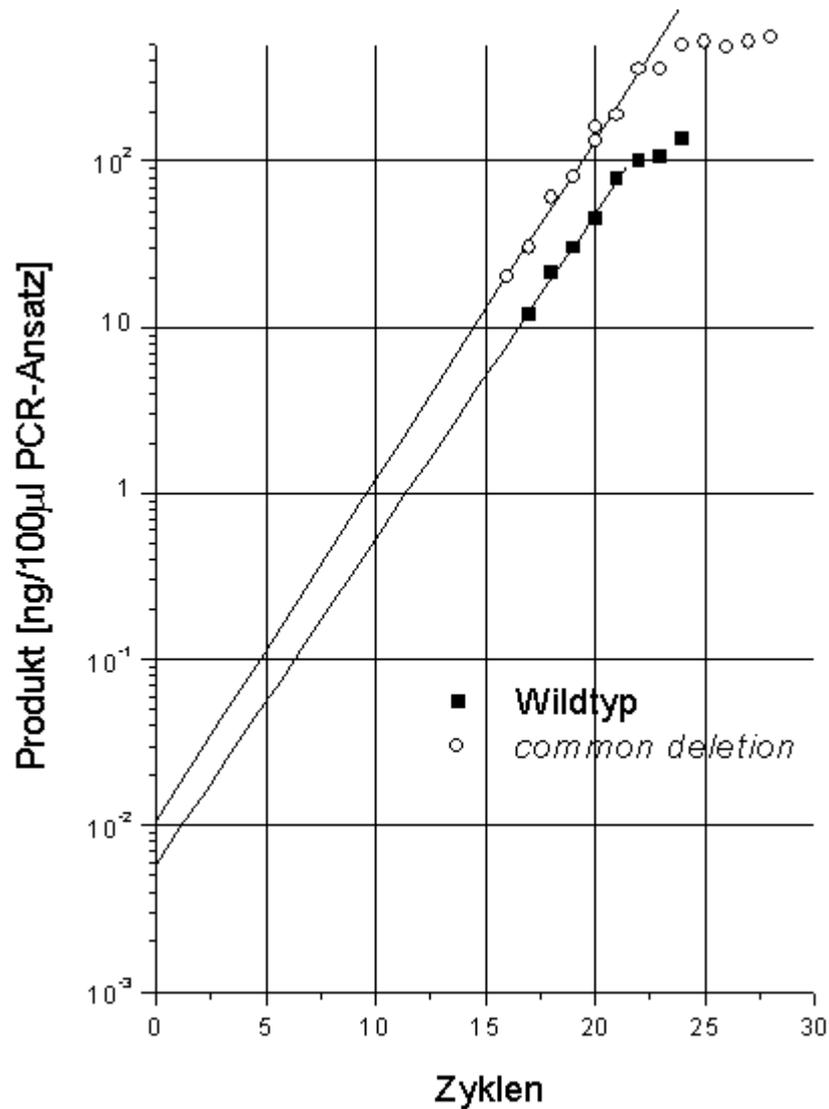


Abbildung 27: Aufgetragen sind die DNA-Produktmengen verschiedener PCRs gegen die Zyklenzahl. Die PCR für den Wildtyp wird mit den Primer 8865for und 9361rev (497 bp-Fragmentlänge), für die *common deletion* mit den Primer 8421for und 13917rev (520 bp-Fragmentlänge) bei einer Annealingtemperatur von 52°C durchgeführt. Alle PCRs wurden mit 100 ngGesamt-DNA/100 µl PCR-Ansatz durchgeführt. Die Zyklenzahl wurde entsprechend der Beschriftung des Plots variiert. Von dem exponentiellen Anteil der Werte wurde eine Gerade bis zur y-Achse gezogen.

5.5.2 Überprüfung der kinetischen PCR durch Southern Blot

Für eine Patienten-DNA mit bekannter *common deletion* wurde eine Quantifizierung parallel mit der neuen Methode und einem *Southern Blot* durchgeführt.

Zur Vorbereitung des *Southern Blots* wurde die Gesamt-DNA mit dem Restriktionsenzym *Bam* HI behandelt und auf einem 0,5% Agarosegel über Nacht bei 40 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA in dem Gel wurde für den *Southern Blot* auf eine Nylonmembran übertragen und mit dem ECL-Kit behandelt (Kapitel 4.6 und 4.6.1). Danach wurde Photopapier aufgelegt bis die Fluoreszenz sichtbar wurde. Der entsprechende Blot ist in Abbildung 28 gezeigt. Von diesem Blot wurde eine Durchlichtaufnahme gemacht und mit der beschriebenen Methode quantitativ ausgewertet. Die Auswertung der integrierten optischen Densität der *Southern Blot*-Aufnahme ist in Abbildung 29 zu sehen. Leider überlappen sich die Fragmente in dem *Southern Blot*. Dies zeigt sich in der Auswertung in Abbildung 29 dadurch, daß sich diese Fragmente nicht deutlich von einander abgrenzen. Bei der Quantifizierung dieser Aufnahme wurde ein Verhältnis von 0,80:1 von Wildtyp zu *common deletion* gefunden. Dies entspricht einem Anteil von 56% (w/w) *common deletion* an der Gesamt-mtDNA, molar ausgedrückt 64%.

Die durch den *Southern Blot* gewonnenen Verhältniswerte stimmen mit dem durch kinetische PCR berechneten Gehalt von 53% (w/w) und 61% (molar) an *common deletion* pro Gesamt-mtDNA überein. Der *Southern Blot* bestätigt damit die Ergebnisse der kinetischen PCR mit hinreichender Genauigkeit.

Die Qualität des *Southern Blots* ist leider nicht sehr hoch, es stand allerdings nicht genügend DNA eines Patienten mit *common deletion* zur Verfügung, um einen weiteren *Southern Blot* durchzuführen. Eine schärfere Trennung der Banden wäre notwendig gewesen, um eine genauere Quantifizierung durch den *Southern Blot* durchzuführen. Daten über die quantitative Färbung mit dem ECL-Kit sind mir nicht bekannt. Ob es eine Übersättigung der Reaktion mit dem ECL-Kit gibt, ist mir auch nicht bekannt. Dies würde zu einer Überzeichnung der schwachen Banden zu Ungunsten der stärkeren führen.

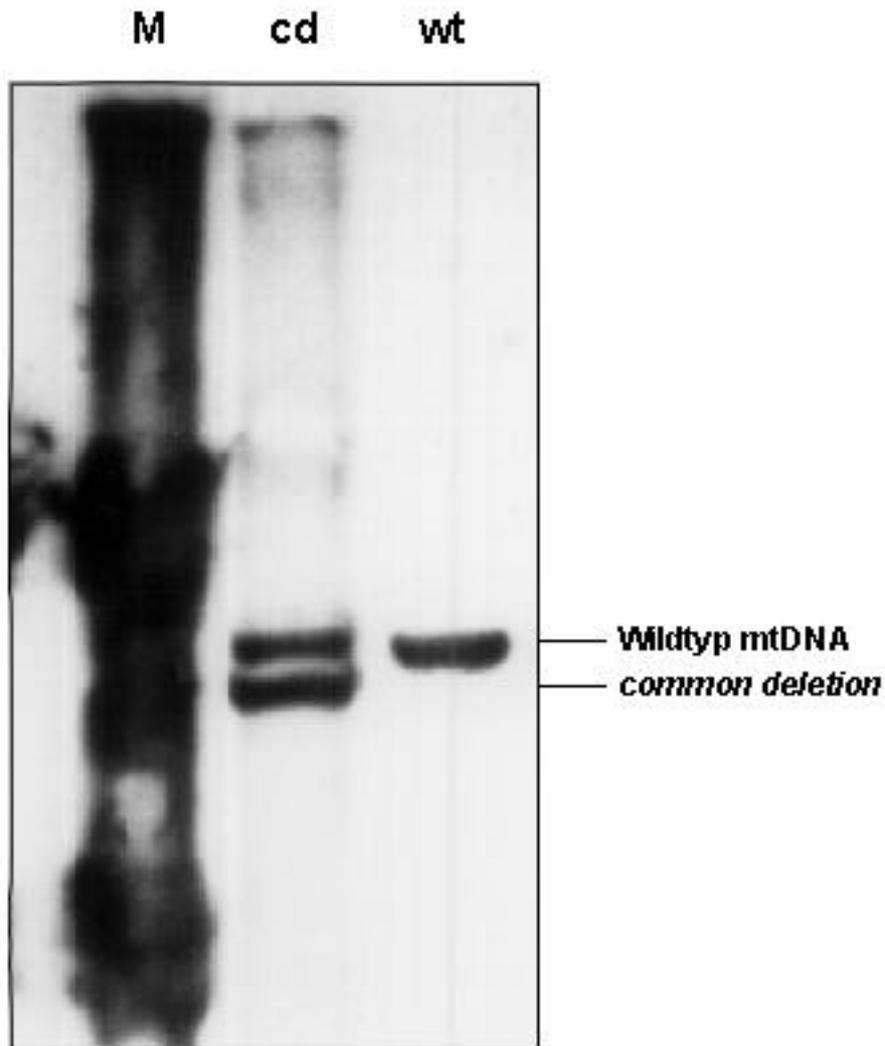


Abbildung 28: Southern Blot der DNA eines Patienten mit bekannter *common deletion* zur Überprüfung der PCR-Quantifizierung. Die Gesamt-DNA aus Muskelbiopsien eines Patienten mit bekannter *common deletion* (cd) und einer Kontrollperson (wt) wurde elektrophoretisch getrennt und auf eine Membran übertragen. Die DNA wurde mit einer mtDNA-Sonde, die mit dem ECL-Kit wie im Text beschrieben markiert war, annealt. Die DNA-Sonde wurde mit einem Lumineszenzfarbstoff auf einem Film sichtbar gemacht. Die mit M beschriftete Bande zeigt den im ECL-Kit vorhandenen Längenmarker.

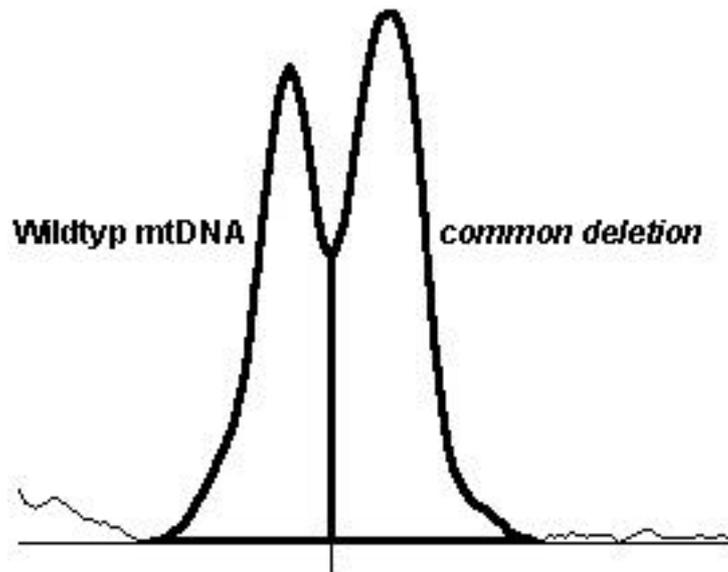


Abbildung 29: Auswertung des in Abbildung 28 dargestellten *Southern Blots*. Man erkennt, daß die dargestellten Banden sich überlappen. Durch eine Trennlinie im Tal zwischen den Peaks wurden die beiden Fragmente quantifiziert.

5.5.3 Eine neue Plotmethode und eine semiquantitative Abschätzung von DNA-Mengen

Zum Anfang dieser Arbeit stand kein Computerprogramm zur Quantifizierung der PCR-Produkte zur Verfügung. Um nun aber doch Aussagen halbquantitativer Art machen zu können, mußte man Abschätzen bei welchen Zyklenzahlen bei gegebener Menge die ersten sichtbaren Banden vorhanden waren. Bei einer Reihenuntersuchung wurde nun die Menge an zu quantifizierender DNA gegen den Zyklus aufgetragen, bei welchem die DNA zum erstenmal sichtbar war (Abbildung 30). Dabei stellten sich zwei überraschende Dinge dar. Zum ersten scheint man eine einfache gerade Linie zum Fitting durch die optisch halbquantitativ bestimmten Werte in der halblogarithmischen Darstellung legen zu können. Zum zweiten schneidet diese Linie die lineare Ausgangsmengen-Achse wenn der Zyklus gleich null ist.

Diese im ersten Moment nicht sofort interessant erscheinenden Fakten haben aber eine wichtige Bedeutung. Intuitiv kann man sagen, daß der Schnittpunkt durch die DNA-Mengen-Achse bei der Zyklenzahl Null eine quantitative Aussage über die Menge an gesuchter DNA zu Anfang der PCR (= Zyklus 0) macht. Zweitens kann man intuitiv vermuten, daß die gerade Linie, die sich aus dem Fitting der Messpunkte

ergibt, einen Rückschluß auf die relativ konstante Effektivität der PCR (innerhalb gewisser Grenzen) zuläßt.

Diese zwei Thesen und ihre Bedeutung werden später ausführlich mathematisch behandelt.

Eine Quantitierung durch eine Verdünnungsreihe der Ausgangslösung mit Auftrag gegen die Zyklenzahl in einem Plot, ist durch diese neue Methode möglich geworden. Das Plotten einer Verdünnungsreihe gegen die Zyklenzahl entspricht jedoch nicht der *serial dilution PCR*, die in der Einleitung beschrieben wurde. Nur um Mißverständnisse zur neuen Plotmethode auszuschließen, sei noch einmal erwähnt, daß dieses Verfahren nicht mit der *serial dilution PCR* (syn. *limiting dilution PCR*) identisch oder auch nur ähnlich ist, bis auf die Tatsache, daß in beiden Methoden DNA-Verdünnungen eingesetzt werden. Bei der *limiting dilution PCR* wird die DNA wesentlich stärker verdünnt (bis keine Amplifikationsprodukte mehr entstehen können!) und die Auswertung erfolgt in Form von diskreten Ja-Nein-Ereignissen über die Poisson-Verteilung, (s. a. Kapitel 1.4.3.3). Hier jedoch werden kontinuierliche Messwerte zur Bestimmung der Ausgangsmenge eingesetzt.

In Abbildung 30 kann man folgende halbquantitative Aussagen machen: Ohne eine PCR (entspricht dem Zyklus Null) könnte man das amplifizierte Fragment nach der elektrophoretischen Trennung in einem Agarosegel sehen. Zu diesem Zeitpunkt müßte man die dem Schnittpunkt entsprechende Menge Gesamt-DNA einsetzen, um dieses Fragment theoretisch sehen zu können.

Das die einfache Erkennung einer DNA-Bande nur sehr ungenaue Aussagen zur Quantitierung ermöglicht ist offensichtlich. Es soll auch nur die Entstehung der Idee zu der neuen Plot-Art aufgezeigt werden, nicht eine semiquantitative Aussage gemacht werden.

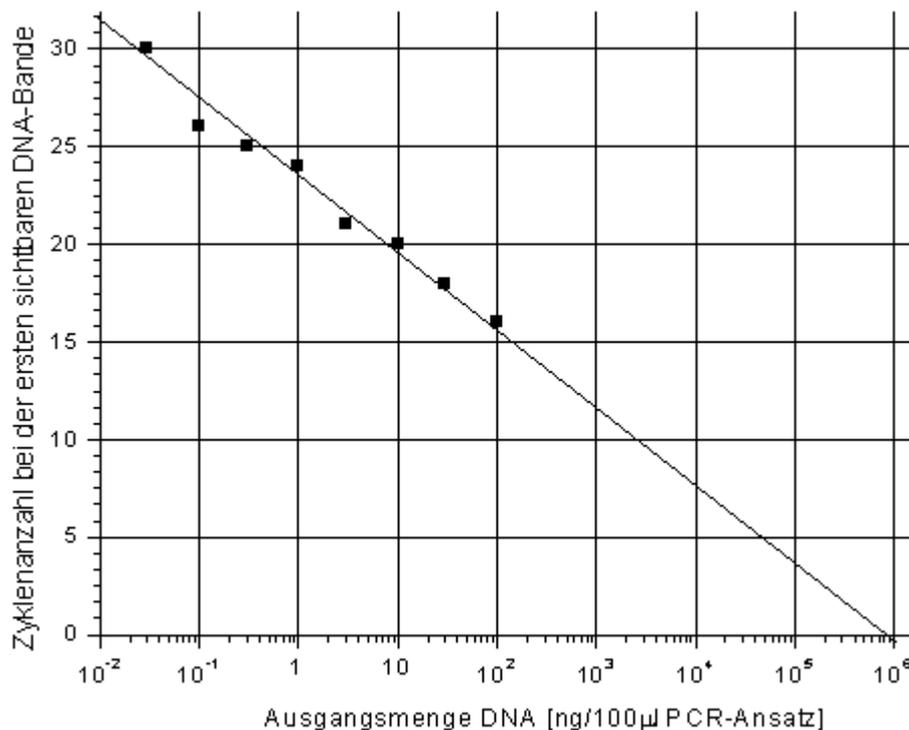


Abbildung 30: Neue Plotmethode zur halbquantitativen Bestimmung der Ausgangsmenge Gesamt-DNA in welcher ein durch PCR amplifiziertes Fragment theoretisch zu sehen ist. Es wurde eine PCR mit den Primern 8865for und 9361rev (497 bp-Fragment) für verschiedene Zyklen mit einer seriell verdünnten DNA-Ausgangsmenge (100 ng - 0,01 ng/100 µl PCR-Ansatz) ausgeführt. Aufgetragen ist die Ausgangsmenge an Templat-Gesamt-DNA gegen die Anzahl der Zyklen, bei der ein PCR amplifiziertes Fragment nach elektrophoretischer Auftrennung in einem mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel erstmalig zu sehen ist.

5.5.4 Quantitierung durch die neue Plotmethode

Zur Quantitierung von Wildtyp mtDNA wurde eine Verdünnungsreihe der Gesamt-DNA angelegt.

Will man 3 Messpunkte zur möglichst genauen Kalibrierung einer Ausgleichsgeraden festlegen, wählt man die äußeren Punkte so, daß sie den gewünschten Messbereich vollständig einschließen. Den dritten Punkt legt man genau in die Mitte der äußeren Punkte. Bei einer linearen Funktion nimmt man arithmetische Mittel

$\bar{x} = \frac{\sum x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$ zwischen den äußeren Werten. Da man es sich aber bei der PCR

um eine exponentielle Funktion handelt, mathematisch gesehen analog zu Wachstumsprozessen, muß man entsprechend das geometrische Mittel $g = \sqrt[n]{x_1 * x_2 * \dots * x_n}$ zur Bestimmung des mittleren Messwertes einsetzen. Konkret auf eine Quantifizierung angewendet, bedeutet dies, daß man nicht eine Verdünnungsreihe von 1/5, 5/10 usw. anlegt, sondern eine exponentielle Verdünnungsreihe in Zehnerpotenzen mit Zwischenschritten von 1/3, 16/10 usw. Dieser Zwischenschritt ergibt sich aus dem geometrischen Mittel von $g = \sqrt[3]{10} = 3,16$ für eine Zehnerpotenz, die in zwei gleiche Teile auf einer exponentiellen Skala geteilt wird. Die Verdünnungsreihe wurde also von 100 ng Gesamt-DNA/100 µl PCR-Lösung ausgehend, jeweils um ungefähr den Faktor 3,16 verdünnt. Um keine gebrochenen Zahlen zu verwenden, wurde eine Verdünnungsreihe von 100, 30, 10, 3, 1, ... ng Gesamt-DNA/100 µl PCR-Ansatz erstellt.

Mit dieser Verdünnungsreihe wurden jeweils mehrere PCR-Ansätze hergestellt und für, wie in Abbildung 31 dargestellt, 15 bis 31 Zyklen, abhängig von dem Ausgangsgehalt an DNA, durch PCR mit den Primern 8865for und 9361rev (497 bp-Fragment) bei einer Annealingtemperatur von 57°C amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe eines mit SYBR Green I gefärbten Gels aufgetrennt und durch Vergleich mit einem Kalibrierungsstandard, wie bereits beschrieben, quantifiziert. Die Messwerte werden gegen die entsprechende Zyklenzahl in Abbildung 31 in Form eines halblogarithmischen Plots dargestellt. Im exponentiellen Bereich der jeweiligen Messwerte kann nun durch eine Linie gefittet werden. Wie bereits bekannt, stellt die Steigung dieser Geraden die Effizienz der PCR, die Schnittpunkte durch die y-Achse bei dem Zyklus Null die Ausgangsmengen an amplifizierten DNA-Fragment-Templat dar.

In einem zweiten Plot soll nun die Ausgangsmenge an Gesamt-DNA gegen die notwendigen Zyklenzahlen, die notwendig sind, um eine bestimmte (jedoch *fast* willkürlich festgelegte) Menge an PCR-Produkt zu erzeugen, dargestellt werden. Diese wird durch Ziehen einer Linie parallel zur x-Achse bei einer willkürlich festgelegten Menge an PCR-Produkt und Ablesen der Zyklenzahlen durchgeführt. In unserem Fall ist dies 40 ng/100 µl PCR-Ansatz. Die Linie sollte sich innerhalb der Linienschar befinden, um Fehler zu minimieren. Danach kann die Menge an Ausgangs-Gesamt-DNA gegen die theoretisch notwendigen Zyklenzahlen zur Erreichung der festgelegten PCR-Fragmente in einem Plot aufgetragen werden (Abbildung 32). Der Ausdruck theoretische Zyklenzahl wird deshalb betont, da es in der praktischen Anwendung keine gebrochenen, sondern nur diskrete ganzzahlige

Zyklenzahlen geben kann, jedoch in der Behandlung der Messwerte gebrochen rationale Zahlen auftreten.

Nun kann aus dem Plot in Abbildung 32 sowohl die Effizienz der PCR als auch die Menge an Templat-DNA ermittelt werden. Die relative Menge an mtDNA, ausgedrückt in Prozent, kann durch die Formel

$$\%mtDNA = \frac{40ng / 100ml * 16569bp \text{ (Gesamtlänge der mtDNA)}}{x - \text{AchsenSchnittpunkt}[ng / 100ml] * 497bp \text{ (Länge des PCR - Fragmentes)}}$$

berechnet werden. Die Herleitung dieser Formel wird näher im Kapitel 5.6 beschrieben.

Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse der beiden Methoden in Bezug auf die PCR-Parameter Effizienz und mtDNA-Templat.

Zur Vereinfachung bezeichne ich im folgenden diese neue Plotmethode der PCR als ausgangsmengenabhängigen PCR-Plot, im Gegensatz zur vorher benutzten kinetischen oder zyklenabhängigen PCR-Plot.

Es sei noch unbedingt darauf hingewiesen, daß die DNA-Verdünnungsreihe immer frisch angesetzt werden muß. Bei Versuchen, eine eingefrorene DNA-Verdünnungsreihe zu verwenden, kam es regelmäßig bei den stark verdünnten Konzentrationen zu einem Ausbleiben der PCR-Produkte. Auch die Aufbewahrung der eingefrorenen verdünnten DNA in TE-Puffer führte zu diesem Ergebnis. Deshalb muß die DNA immer frisch verdünnt werden.

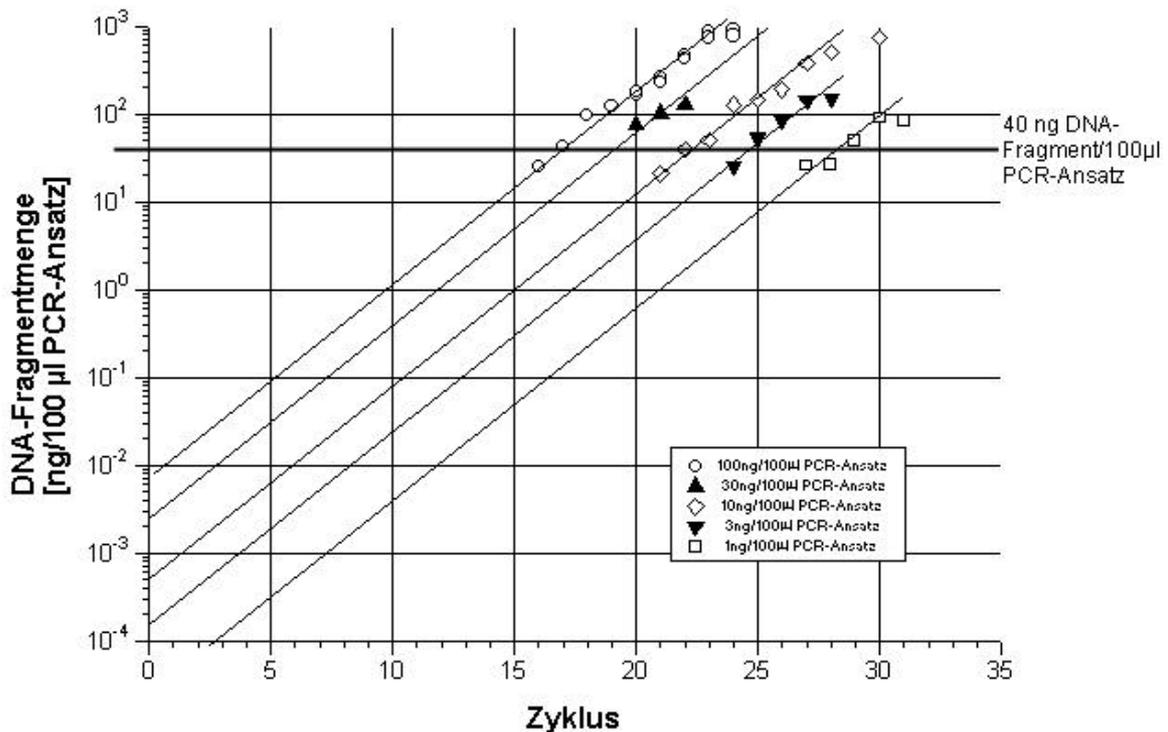


Abbildung 31: Halblogarithmischer Plot einer Verdünnungsreihe eines durch PCR amplifizierten DNA-Fragmentes in Abhängigkeit von der verwendeten Zyklenzahl und die entsprechenden Fit-Geraden (kinetischer oder zyklensabhängiger PCR-Plot). Es werden die quantifizierten Werte für 100 ng (offene Kreise), 30 ng (nach oben gerichtete Dreiecke), 10 ng (offene Rauten), 3 ng (nach unten gerichtete Dreiecke) und 1 ng (offene Quadrate) Gesamt-DNA-Templat pro 100 µl PCR-Ansatz dargestellt. Zur Erstellung des Plots in Abbildung 32 wurde eine Linie bei 40 ng PCR-Amplifikat/100 µl PCR-Ansatzlösung eingezeichnet. Für die gezeigten DNA-Templat-Mengen wurde der jeweilige Zyklus bestimmt, in welchem die amplifizierte DNA 40 ng/100 µl erreicht.

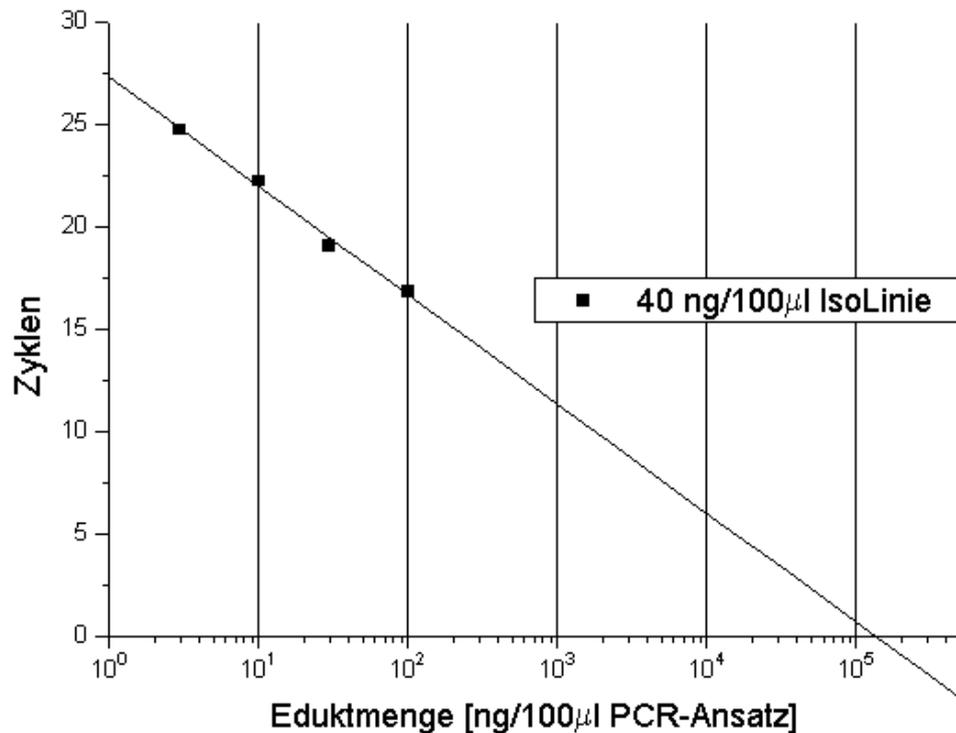


Abbildung 32: Halblogarithmischer Plot der Eduktmenge Gesamt-DNA gegen die Zyklenzahl bei welcher 40 ng PCR-Produkt/100 ml PCR-Ansatz amplifiziert wurde (ausgangsmengenabhängiger PCR-Plot). Die Steigung der Geraden entspricht der Effektivität der PCR, der Schnittpunkt durch die x-Achse gibt die Gesamtmenge von Templat-DNA an, welche bei null Zyklen (sprich ohne PCR) 40 ng/100 µl des zu amplifizierenden Fragmentes enthält.

	Effizienz der PCR	Ausgangsmenge Templat-Fragment [ng/100µl Gesamt-DNA]	mtDNA-Templat [%/Gesamt-DNA]
Zyklenabhängiger PCR-Plot	1,61	2×10^{-2}	0,78
Ausgangsmengenabhängiger PCR-Plot	1,56	—	0,66

Tabelle 4: Gegenüberstellung der PCR-Parameter Effizienz und mtDNA-Templat bei dem zyklenabhängigen (Abbildung 31) und dem neuen ausgangsmengenabhängigen PCR-Plot (Abbildung 32).

5.5.5 Wiederholte Quantifizierungen zur Bestimmung der Genauigkeit und Richtigkeit der neuen Plotmethode

Zur Messung der Genauigkeit und Richtigkeit der neuen Methode wurden vier voneinander unabhängige PCR-Reaktionen mit einer photometrisch quantitierten Menge eines künstlich hergestellten Vektors durchgeführt. Der Vektor pCII wurde freundlicherweise von Eric Schon zur Verfügung gestellt. Er enthält ein Fragment, das die *common deletion* einschließt. Mehrere unabhängige PCRs wurden von diesem Fragment mit den Primern 8620for und 13647rev bei einer Annealingtemperatur von 57°C, wie vorher beschrieben, durchgeführt und ausgewertet. Die Ergebnisse der Einzeluntersuchungen sind in Tabelle 5 dargestellt.

PCR-Ansatz	Prozentgehalt an Templat-DNA	Effizienz der Reaktion
I	106,86	1,7149
II	119,21	1,7852
III	60,78	1,9124
IV	78,74	1,7914

Tabelle 5: Bestimmung der Genauigkeit und Richtigkeit der neuen Plotmethode durch voneinander unabhängige PCR-Ansätze. Es werden die ermittelten Ergebnisse für 4 PCR-Reaktionen gezeigt und im Text statistisch aufgearbeitet. Als Templat-DNA wurde der Vektor pCII, der die Sequenz der *common deletion* enthielt, verwendet. Der Vektor wurde photometrisch quantitiert, der Prozentgehalt an Templat-DNA bezieht sich auf die photometrisch bestimmte Menge an Vektor. Die Effizienz der einzelnen Reaktionen wird in der 3. Spalte gegenübergestellt.

Die Richtigkeit der Methode, berechnet mit dem Mittelwert dieser Werte, beträgt 91,4%. Die Standardabweichung des Mittelwertes, als Maß für die Genauigkeit, beträgt 23,0%. Das Konfidenzintervall für den Mittelwert beträgt bei dieser geringen statistischen Auswertung 11,5%. Das heißt, daß der wahre Mittelwert mit einer Wahrscheinlichkeit von 68% in einem Konfidenzintervall von 91,4% ± 11,5% liegt. Das entspricht den gegebenen Verhältnissen.

Die Effizienzwerte schwanken bei den unabhängigen amplifizierten PCR-Ansätzen erheblich. Dennoch hat dies offensichtlich nur einen geringen Einfluß auf die Richtigkeit und Genauigkeit der Methode. Von Annette Reith wurde in ihrer Diplomarbeit gezeigt, daß die Werte für parallel durchgeführte PCR-Reaktionen in

einem sehr viel geringerem Maße schwanken (Annette Reith, Diplomarbeit, 1996, Seite 61). Diese Unterschiede lassen sich erstens als Pipettierfehler und zweitens als Unterschiede in dem jeweils verwendeten Zyklenprotokoll interpretieren. Scheinbar verlaufen zeitlich unterschiedliche PCR-Reaktionen mit einer unterschiedlichen Effizienz, während gleichzeitig durchgeführte PCRs eine gleichförmigere Effizienz aufweisen.

5.5.6 Typische Fehlerquellen bei falsch abgeschätzter Zyklenzahl

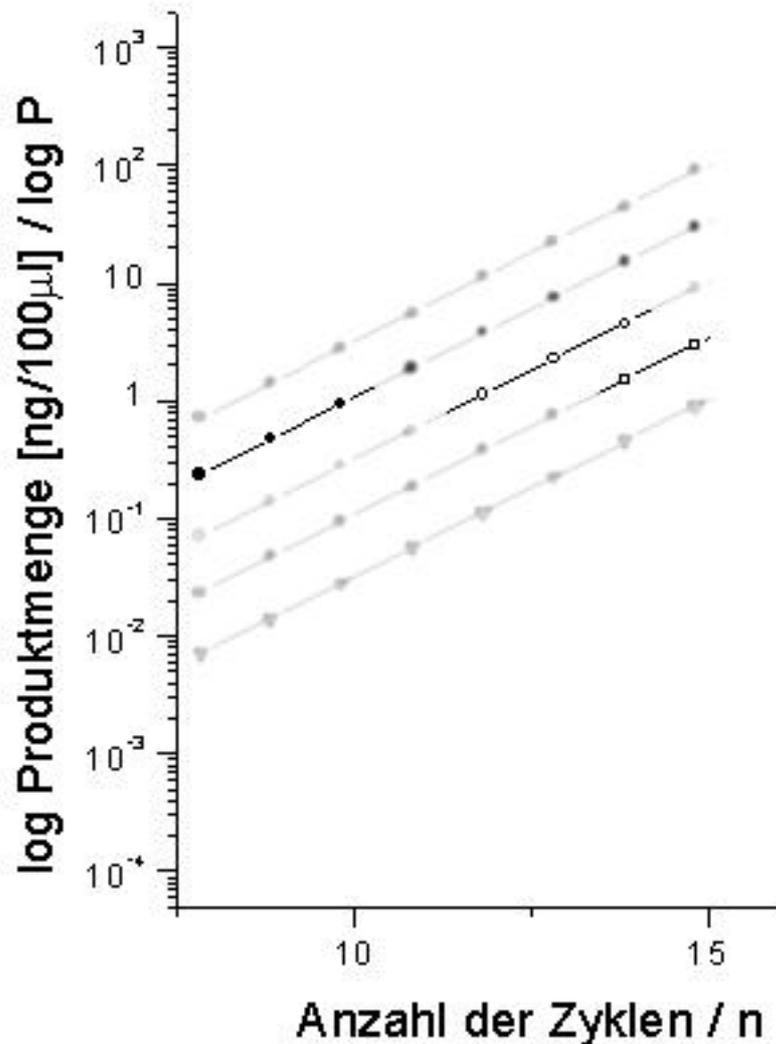


Abbildung 33: Idealisierte Darstellung der Zyklenzahl gegen die gebildete Produktmenge einer PCR. Die Messwerte (dunkle und scharf dargestellte Punkte) kommen nicht auf einer Isolinie der Produktmenge zu liegen. Die Zyklendifferenzen sind zu groß gewählt, daß eine Linie gleicher Produktmengen gebildet werden kann.

Bei der Anwendung der neuen Methode zur DNA-Quantitierung kam es gelegentlich vor, daß Zwischenergebnisse bei dem Plot Zyklen versus Produktmenge gewonnen wurden, die sich nicht auswerten lassen (siehe Abbildung 33 und Abbildung 34), da keine Isolinie eingezeichnet werden konnte. Die unterschiedlichen Zyklenzahlen sind in diesen Fällen relativ zur Verdünnungsreihe ungünstig gewählt. Einmal wurde der Zyklenunterschied, nach welchem die nächste Produktmenge bestimmt wurde, zu gering gewählt (Abbildung 34), ein anderes mal war der Zyklenabstand zu groß

(Abbildung 33). Dies führte zu den fliehenden und komprimierten Zyklenzahlen, die in den entsprechenden Abbildungen zu sehen sind.

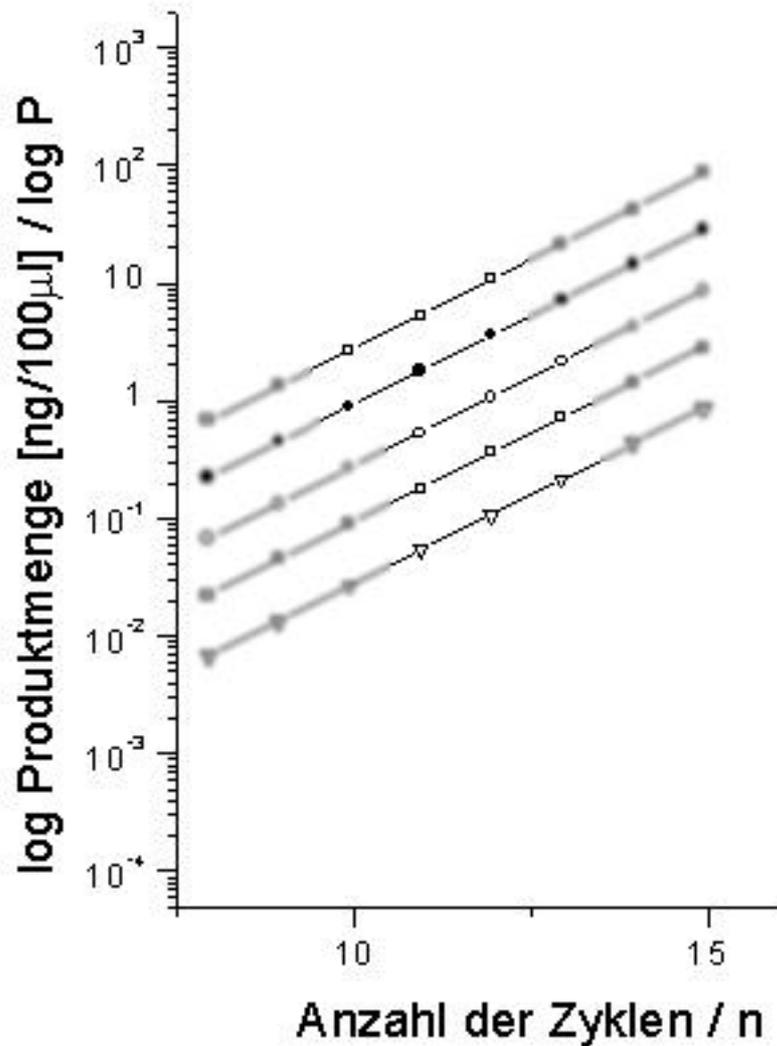


Abbildung 34: Idealisierte Darstellung der Zyklenzahl gegen die gebildete Produktmenge einer PCR. Die Messwerte (dunkle und scharf dargestellte Punkte) kommen nicht auf einer Isolinie der Produktmenge zu liegen. Die Zyklendifferenzen sind zu groß gewählt, daß eine Linie gleicher Produktmenge gebildet werden kann.

5.6 Mathematischer Hintergrund der Methode

5.6.1 Allgemeine mathematische Betrachtungen zur quantitativen PCR

Die geometrische Darstellung der Messwerte (Plot) statt der arithmetischen Berechnung einer qPCR wird gewöhnlich zur Auswertung herangezogen. Wie bei vielen Plots hat sich die rein geometrische Auswertung als einfacher und übersichtlicher erwiesen. Zum vertieften theoretischen Verständnis einer Plotmethode ist jedoch eine algebraische Behandlung der geometrisch durchaus plausiblen Vorgänge notwendig.

Die Grundgleichung zur mathematischen Beschreibung der quantitativen PCR lautet:

$$P_n = P_0 * a^n$$

Mit Worten ausgedrückt: Die Ausgangsmenge an *target*-DNA (oder Eduktmenge) P_0 wird bei einer Effizienz von a nach n Zyklen zu der PCR-Produktmenge P_n amplifiziert. Die bekannten Messwerte sind P_n und n , gesucht bzw. unbekannt sind die Werte P_0 und a . Es handelt es sich um eine Gleichung mit 2 Unbekannten. Daher sind zur Berechnung mindestens zwei Messwerte notwendig. In der Praxis sind jedoch aus statistischen Gründen immer wesentlich mehr Messwerte zwingend notwendig. Die übliche Auswertung durch eine Plot findet durch folgende Umrechnung statt:

$$P_n = P_0 * a^n$$

$\log P_n = \log P_0 + n * \log a$, oder als lineare allgemeine Geradengleichung:

$$y = a + bx$$

Diese Formel transformiert die Grundgleichung der qPCR in die allgemeine Geradengleichung und ermöglicht die graphische Darstellung und Auswertung.

Zur Errechnung von P_0 und a brauchen wir folgende Gleichungen:

$$P_n = P_0 * a^n$$

$$P_0 = \frac{P_n}{a^n}$$

$$P_n = P_0 * a^n$$

$$a^n = \frac{P_n}{P_0}$$

$$a = \sqrt[n]{\frac{P_n}{P_0}}$$

Wollen wir P_0 aus 2 Messwerten für n und P_n berechnen so erhalten wir durch Gleichsetzung von a :

$$a = \sqrt[n]{\frac{P_n}{P_0}} = \sqrt[n']{\frac{P'_{n'}}{P_0}}$$

$$\frac{\log P_n - \log P_0}{n} = \frac{\log P'_{n'} - \log P_0}{n'}$$

$$\frac{\log P_n}{n} - \frac{\log P_0}{n} = \frac{\log P'_{n'}}{n'} - \frac{\log P_0}{n'} \quad [*nn']$$

$$n' \log P_n - n' \log P_0 = n \log P'_{n'} - n \log P_0$$

$$n \log P_0 - n' \log P_0 = n \log P'_{n'} - n' \log P_n$$

$$\log P_0 (n - n') = n \log P'_{n'} - n' \log P_n$$

$$\log P_0 = \frac{n \log P'_{n'} - n' \log P_n}{(n - n')} \quad [\text{Potenzieren der Gleichung}]$$

$$P_0 = \sqrt[n-n']{\frac{P'_{n'}{}^n}{P_n{}^{n'}}}$$

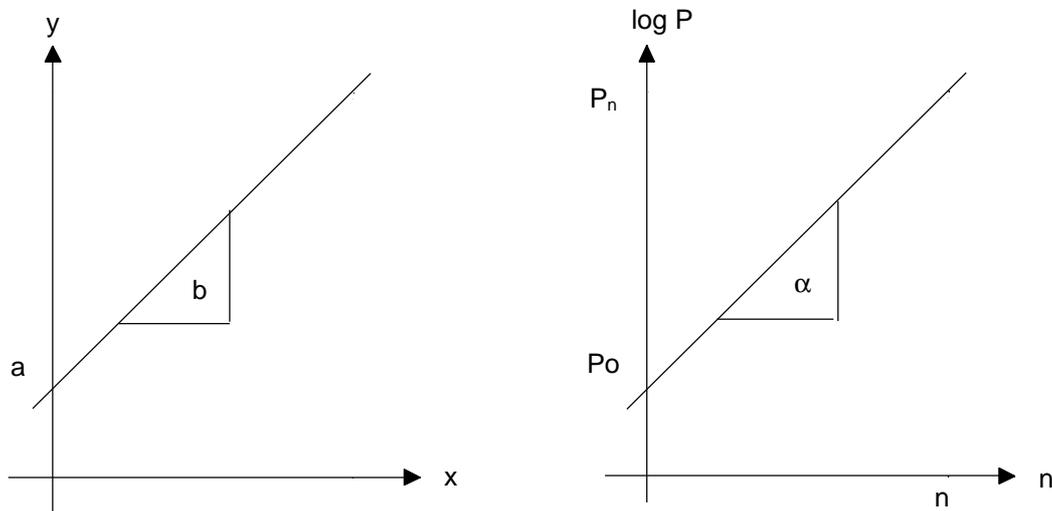


Abbildung 35: Gegenüberstellung der einfachen, allgemeinen Geradengleichung $y = a + bx$ und der halblogarithmischen Darstellungsweise der Formel $\log P_n = \log P_0 + n \log a$ zur geometrischen Lösung der qPCR.

Damit kann die Gleichung in einer linearen Plotmethode graphisch dargestellt werden und ist geometrisch lösbar. Eine allgemeinere Behandlung der Formel bietet eine flexiblere Auswertung. Deshalb wurde der folgende Weg beschritten.

Für bekannte Produktmengen P_n und $P'_{n'}$ bei bekannten Anzahl von PCR-Zyklen n und n' kann sowohl die Effizienz der PCR a als auch die Menge des Ausgangsproduktes P_0 bei beliebiger Ausgangsverdünnung f wie folgt direkt errechnet werden.

Zuerst die Berechnung von a :

$$\begin{array}{ll}
 P_n = P_0 \cdot a^n & P_n^{\hat{A}} = P_0 \cdot f \cdot a^{n^{\hat{A}}} \\
 \log P_n = \log P_0 + n \log a & \log P_n^{\hat{A}} = \log P_0 + \log f + n^{\hat{A}} \log a \\
 \log P_0 = \log P_n - n \log a & \log P_0 = \log P_n^{\hat{A}} - \log f - n^{\hat{A}} \log a
 \end{array}$$

Beide Gleichungen sind nach $\log P_0$ aufgelöst und können jetzt gleichgesetzt werden.

$$\begin{aligned}
 \log P_n - n \log a &= \log P_n^{\hat{A}} - \log f - n^{\hat{A}} \log a \\
 n^{\hat{A}} \log a - n \log a &= \log P_n^{\hat{A}} - \log P_n - \log f \\
 \log a (n^{\hat{A}} - n) &= \log P_n^{\hat{A}} - \log P_n - \log f \\
 \log a &= \frac{\log P_n^{\hat{A}} - \log P_n - \log f}{(n^{\hat{A}} - n)} \quad [\text{Potenzieren, um die Logarithmen zu entfernen}] \\
 a &= \sqrt[n^{\hat{A}}]{f \cdot \frac{P_n^{\hat{A}}}{P_n}} \quad [\text{für } P_n = P_n^{\hat{A}} \text{ gilt:}] \\
 a &= \sqrt[n^{\hat{A}}]{f}
 \end{aligned}$$

Die Berechnung für P_0 lautet davon abweichend:

$$\begin{array}{ll}
 P_n = P_0 \cdot a^n & P_n^{\hat{A}} = P_0 \cdot f \cdot a^{n^{\hat{A}}} \\
 \log P_n = \log P_0 + n \log a & \log P_n^{\hat{A}} = \log P_0 + \log f + n^{\hat{A}} \log a \\
 n \log a = \log P_n - \log P_0 & n^{\hat{A}} \log a = \log P_n^{\hat{A}} - \log P_0 - \log f \\
 \log a = \frac{\log P_n - \log P_0}{n} & \log a = \frac{\log P_n^{\hat{A}} - \log P_0 - \log f}{n^{\hat{A}}}
 \end{array}$$

Beide Gleichungen sind jetzt nach $\log a$ aufgelöst und können durch das Gleichsetzungsverfahren gelöst werden.

$$\begin{aligned}
 \frac{\log P_n - \log P_0}{n} &= \frac{\log P_n^{\hat{A}} - \log P_0 - \log f}{n^{\hat{A}}} \\
 n^{\hat{A}} \log P_n - n^{\hat{A}} \log P_0 &= n \log P_n^{\hat{A}} - n \log P_0 - n \log f \\
 n \log P_0 - n^{\hat{A}} \log P_0 &= n \log P_n^{\hat{A}} - n^{\hat{A}} \log P_n - n \log f \\
 \log P_0 (n - n^{\hat{A}}) &= n \log P_n^{\hat{A}} - n^{\hat{A}} \log P_n - n \log f \\
 \log P_0 &= \frac{n \log P_n^{\hat{A}} - n^{\hat{A}} \log P_n - n \log f}{(n - n^{\hat{A}})} \\
 \log P_0 &= \frac{n \log P_n^{\hat{A}} - n \log f - n^{\hat{A}} \log P_n}{(n - n^{\hat{A}})} \\
 \log P_0 &= \frac{n(\log P_n^{\hat{A}} - \log f) - n^{\hat{A}} \log P_n}{(n - n^{\hat{A}})} \quad [\text{Potenzieren der Gleichung}] \\
 P_0 &= \sqrt[n - n^{\hat{A}}]{\frac{\left(\frac{P_n^{\hat{A}}}{f}\right)^n}{P_n^{n^{\hat{A}}}}} \quad [\text{oder in anderer Schreibweise:}] \\
 P_0 &= \sqrt[n - n^{\hat{A}}]{P_n^{\hat{A}} \cdot f^{-n} \cdot P_n^{-n^{\hat{A}}}}
 \end{aligned}$$

Damit steht eine Gleichung zur direkten Berechnung zur Verfügung. Jedoch ist sie nicht sehr tauglich in der Praxis, da sie beim Rechnen gleichzeitig sehr große und sehr kleine Zahlen erzeugt. Dies führt auf Taschenrechnern und auch bei nicht korrekter Variablenbenutzung auf einem PC zu nicht unbedeutenden Rundungsfehlern.

Prinzipiell ist damit aber der mathematische Beweis erbracht, daß eine bei verschiedenen Ausgangskonzentrationen durchgeführte PCR mit 2 Messpunkten einen unmittelbaren Rückschluß sowohl auf die Effizienz als auch auf die unverdünnte Ausgangsmenge erlaubt.

Betrachten wir jedoch noch 2 wichtige Sonderfälle. Die Zyklen-abhängige PCR benutzt keine unterschiedlich verdünnten Ausgangskonzentrationen. Auch hier gilt wieder die allgemeine Gleichung. Mathematisch gesehen ist hier $f=1$. Damit vereinfacht sich die allgemeine Formel der qPCR wie folgt:

$$P_0 = \sqrt[n-n']{P_n^{\hat{A}} \cdot f^{-n} \cdot P_n^{-n' \hat{A}}}$$

$$P_0 = \sqrt[n-n']{P_n^{\hat{A}} \cdot P_n^{-n' \hat{A}}}$$

$$P_0 = \sqrt[n-n']{\left(\frac{P_n^{\hat{A}}}{f}\right)^n \cdot P_n^{n' \hat{A}}}$$

$$P_0 = \sqrt[n-n']{\frac{P_n^{\hat{A}}}{P_n^{n' \hat{A}}}}$$

Die Allgemeingültigkeit dieser Formel ist somit gegeben.

Wie aus den Formel ersichtlich ist, kann man auch (abweichend von der von mir beschriebenen Methode) mit nur zwei Werten P_n und P_n' aus zwei unterschiedlichen Verdünnungen mit zwei vorgegebenen Zyklenzahlen n und n' bei entsprechend statistisch notwendiger Wiederholung der Wertbestimmung sowohl die Effizienz als auch die Ausgangsmenge P_0 berechnen. Das Konzept der qPCR durch Variation der eingesetzten Ausgangsmenge läßt sich vielfach verändern und stellt eine sehr variable Methode dar.

Ein anderer Sonderfall der allgemeinen Gleichung der PCR ist auch von entscheidender Bedeutung. Betrachten wir nicht weiter den Radikanden, sondern den Wurzelexponenten. Man kann den Wurzelexponenten vereinfacht als Dn für den Fall setzen, für den gilt: $Dn=n-n'$. Setzen wir nun $n=n'$ so wird $Dn=0$. Dies führt zu der Formel:

$$P_0 = \sqrt[0]{P_n^{\hat{A}} \cdot f^{-n} \cdot P_n^{-n' \hat{A}}}$$

Die 0-te Wurzel aus einem Radikanden ist jedoch nicht definiert. Die Gleichung ist für diesen Grenzwert nicht lösbar. Mit anderen Worten ist bei noch so exakter Bestimmung zweier Produktwerte bei gleicher Zyklenanzahl *nie* eine Bestimmung der

Ausgangskonzentration möglich. Dies ist bei der graphischen Betrachtung dieser Aussage evident. Neben dieser evidenten und wenig aufregenden Bedeutung ergibt sich aber noch etwas Entscheidendes. Sieht man nämlich $\Delta n=0$ als Grenzwert verschiedener Werte an, kann man den Umkehrschluß ziehen, daß ein großes Δn eine bessere, sprich statistisch genauere, Bestimmung der Ausgangskonzentrationen erlaubt. Auf die in dieser Arbeit vorgestellte Methoden übertragen heißt dies, daß eine Spreizung der Messwerte auf der n -Achse eine Verbesserung der Genauigkeit der Messung bewirkt. Da eine Vergrößerung der Spreizung mit der üblichen Zyklentitration qPCR begrenzt ist durch die Sensitivität der DNA-Detektion als untere und durch die Plateauphase der PCR selbst als obere Beschränkung sind hier enge Grenzen in der Präzision der Methode gesetzt. Dies wird bei der qPCR mit verdünnten Werten umgangen. Hier ist eine Spreizung der Messwerte auf der n -Skala nicht durch die Plateauphase der PCR gegeben. Bei höherer Verdünnung f der Eduktmenge P_0 wird die Plateauphase wesentlich später (sprich $\Delta(n - n') < \Delta(n - n'')$) erreicht.

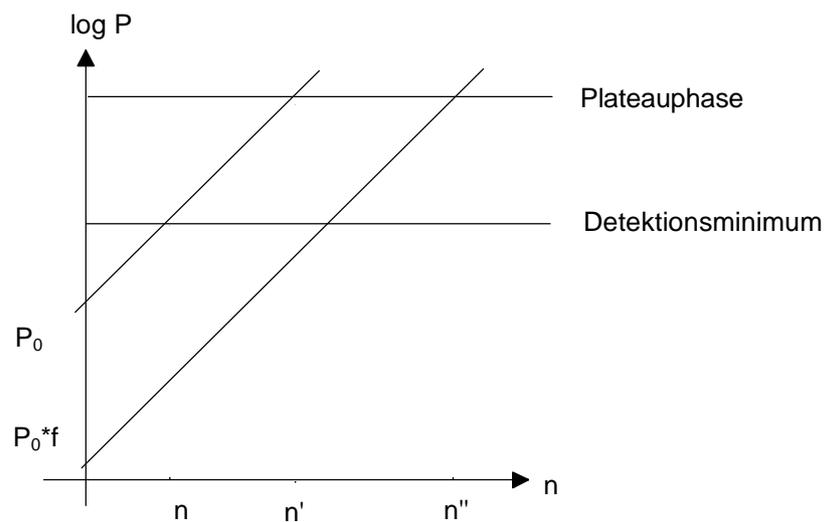


Abbildung 36: Darstellung der Auswirkung der Verdünnung f der Ausgangslösung P_0 auf die Spreizung der Differenz der Zyklenzahl $D(n - n') < D(n - n'')$.

5.6.2 Algebraische Herleitung der neuen Plotmethode

Der traditionelle Plot der qPCR muß durch mathematische Umwandlung in die Beschreibung des neuen Plots umgewandelt werden. Dazu noch einmal die graphische Gegenüberstellung der zwei Plots:

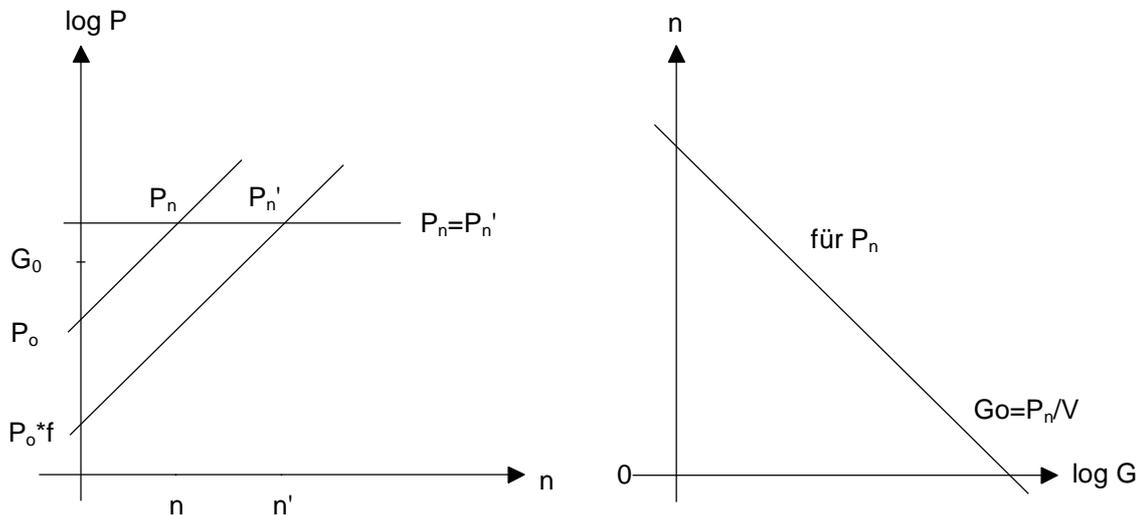


Abbildung 37: Gegenüberstellung der verschiedenen Plotmethoden. Links der traditionelle Plot, welcher die verschiedenen Produktwerte auf der logarithmischen Skala $[\log P]$ gegen die Zyklanzahl $[n]$ darstellt. Die neue Plotmethode stellt die Zyklanzahl $[n]$ gegen die Gesamt-DNA auf der logarithmischen Skala $[\log G]$ dar. Der Schnittpunkt G_0 bedeutet die Menge an Gesamt-DNA, in die Produktmenge P_n ohne PCR (sprich Zyklus $n=0$) vorhanden wäre. Damit kann man auf die relative Menge an Ausgangs-DNA P_0 zurückrechnen.

Wie aber stehen die zwei Plotmethoden algebraisch im Zusammenhang? Dazu beginnen wir erst die allgemeine Gleichung der qPCR nach n aufzulösen:

$$\begin{aligned}
 P_n &= P_0 \cdot a^n \\
 \log P_n &= \log P_0 + n \log a \\
 n \log a &= \log P_n - \log P_0 \\
 n &= \frac{\log P_n - \log P_0}{\log a}
 \end{aligned}$$

Von der gesamten eingesetzten DNA ist jedoch nur ein kleiner Teil *target*-DNA. Das Verhältnis V an der *target*-DNA P_0 an der Gesamt-DNA G_0 wird durch folgende Gleichung ausgedrückt:

$$G_0 = P_0 * V$$

$$P_0 = \frac{G_0}{V}$$

Diese Gleichung wird nun eingesetzt:

$$n = \frac{\log P_n - \log P_0}{\log a}$$

$$n = \frac{\log P_n - \log\left(\frac{G_0}{V}\right)}{\log a}$$

$$n = \frac{\log P_n - \log G_0 + \log V}{\log a}$$

$$n = \frac{\log P_n + \log V}{\log a} - \frac{\log G_0}{\log a}$$

$$n = \frac{\log P_n + \log V}{\log a} - \frac{1}{\log a} * \log G_0$$

Dies entspricht nun dem Standard der linearen Gleichung

$$y = a + bx$$

und kann graphisch dargestellt werden:

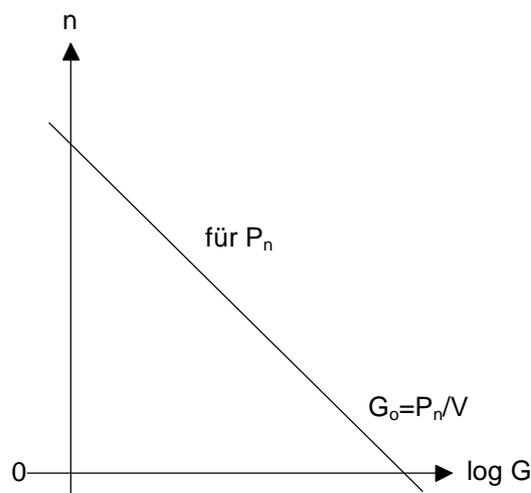


Abbildung 38: Geometrische Lösung der vorgestellten Plotmethode und ihre algebraische Herleitung.

Zugegebenermaßen ist dieser Zusammenhang aufgrund der komplexen Gleichung nicht offensichtlich, zudem die Gleichung in Form eines halblogarithmischen Plots dargestellt wurde.

Betrachtet man jedoch den Sonderfall $n=0$ stellt sich die Gleichung sofort übersichtlicher dar:

$$n = \frac{\log P_n - \log G_0}{\log a} - \frac{\log V}{\log a}$$
$$0 = \frac{\log P_n - \log G_0}{\log a} - \frac{\log V}{\log a}$$
$$\frac{\log V}{\log a} = \frac{\log P_n - \log G_0}{\log a} \quad [* \log a]$$
$$\log V = \log P_n - \log G_0$$
$$V = \frac{P_n}{G_0}$$

V ist das Verhältnis von Gesamt-DNA G_0 und Anfangsmenge P_0 . Jetzt kann sie für eine bestimmte Isolinie P_n und dem Schnittpunkt der Gesamt-DNA G_0 mit der neuen Plotmethode dargestellt werden.

Dies ist der algebraische Beweis für die im vorangehenden Teil diskutierte und zuerst nur graphisch dargestellte Plotmethode.

6 Diskussion

Die Diskussion wird in drei Teile untergliedert. Zuerst wird auf die neue Methode zur Quantifizierung der PCR-Produkte mit SYBR Green I und die konventionelle Plotmethode der zyklenabhängigen PCR eingegangen. Im zweiten Teil wird die Auswertung der Messwerte durch die neue Plotmethode diskutiert. In einem dritten Teil werden neue Perspektiven durch die vorgestellte Methode sowohl zur Quantifizierung von DNA durch PCR als auch auf die mögliche allgemeine Bedeutung dieser Plotmethode als Beschreibung der PCR-Kinetik eingegangen.

Es werden zwei neue Methoden in dieser Arbeit vorgestellt, die beide völlig unabhängig nebeneinander angewendet werden können. Die Quantifizierung von Agarosegelen mit SYBR Green I ist auch für andere Quantifizierungen von beliebiger DNA nutzbar, sie ist nicht auf die Quantifizierung von PCR-Produkten beschränkt. Das gleiche gilt für die neue qPCR-Plotmethode. Die vorherige Messwertgewinnung kann durch jede andere Quantifizierungsmethode erreicht werden. Es kann auch mit Radioaktivität, Antigen-gelabelten Primer, farbig markierten Nukleotiden oder anderen Prinzipien der Messwertgewinnung gearbeitet werden. Beide Methoden sind also sehr vielseitig einsetzbar.

6.1 Quantifizierung von PCR-Produkten durch Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I und dem Programm NIH Image

In der vorliegenden Arbeit wird zuerst eine neue Methode zur Quantifizierung der DNA, in diesem Fall speziell der mtDNA, vorgestellt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt mit der üblichen Methode der kinetischen PCR. Aufgrund der technischen Veränderungen und neu in den Markt eingeführten Produkten wird ein neuer Farbstoff angewendet, der eine nicht-radioaktive Messwertgewinnung erlaubt. Der Vorteil ist neben dem geringeren toxikologischen Potential radioaktiver Substanzen zusätzlich eine wesentlich billigere Methode zur Quantifizierung von DNA. Die Anwendung wird hier mit mtDNA gezeigt, ist jedoch prinzipiell auf jede Art von DNA-Quantifizierung übertragbar. Die Methode soll mit üblichem Labormaterialien durchgeführt werden, um auch in anderen Laboratorien einfach durchführbar sein.

In dem folgenden Abschnitt wird die gleiche Reihenfolge der Betrachtungen, wie auch im Ergebnisteil eingehalten. Da jeder Schritt bei der Quantifizierung auf einem funktionierenden anderen Teilsystem aufbaut, wird mit der Aufnahme und Auswertung von Bildern begonnen. Nach diesen Vorarbeiten wird auf die Elektrophorese und die Anfärbung der DNA mit Fluoreszenzfarbstoffen eingegangen. Erst wenn diese Vorarbeiten eine korrekte Quantifizierung von DNA erlauben, ist es möglich die PCR zu optimieren.

Eine einzelne Quantifizierung läuft allerdings nach einer anderen Reihenfolge ab. Zuerst führt man eine entsprechend ausgearbeitete PCR durch, es folgt Auftrennung der PCR-Produkte mit Agarosegelen, die DNA-Banden werden mit dem neuen Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I angefärbt. Von diesen gefärbten Agarosegelen wurden Aufnahmen mit einer Videokamera angefertigt. Diese Aufnahmen standen dann zur Auswertung mit einem *image processing*-Programm bereit. Es wurde das *public domain*-Programm NIH Image verwendet. Die Vorteile dieses Programms werden weiter unten genauer erläutert.

Als einer der essentiellen Punkte zur Quantifizierung mit dem neuen Farbstoff SYBR Green I stellte sich eine sehr gute Videokamera heraus. Es stand am Anfang nur ein älteres Modell mit begrenzten technischen Fähigkeiten zur Verfügung. Videokameras zur Auswertung von Bildern sind nach dem physikalischen Prinzip des *charge coupled device* (CCD) aufgebaut. Ein Photon erzeugt auf einer Miniphotozelle einen elektrischen Strom, der mit Computertechnologie in ein digitales Bild umgewandelt wird. CCD-Kameras haben einige Vorteile gegenüber konventionellen Kameras. Sie liefern sofort ein Bild, welches ohne Zeitaufwand sofort digital vorliegt und damit zum *image processing* bereit steht. Außerdem haben sie eine hohe Sensitivität für Licht, die bei neueren Geräten mit dem von üblichen Filmen zu vergleichen ist. Zufällige Entladungen der Photozellen unabhängig von eintreffenden Photonen bewirken besonders bei den älteren Modellen und bei langen Belichtungszeiten (Bruchteile von Sekunden) ein Hintergrundrauschen, das ein Störsignal bei der Auswertung der Aufnahmen darstellt. Neuere Modelle, wie die wesentlich später verwendete VarioCam haben dieses Problem technisch minimiert. Dieser Umstand macht diese neue Generation von Videokameras wesentlich besser für geeignet für das *image processing*.

Die anfangs zur Verfügung stehende Videokamera Cybertech CS-1 stellte die Aufnahmen über einen 9-Zoll Schwarz-Weiß-Monitor dar. Diese Aufnahmen wurden über einen ICC-Computer auf Diskette als TIF-Files abgespeichert. Der Computer

nummerierte die Aufnahmen auf der Diskette von 1-8. Die Files mußten nachträglich mit wiedererkennbaren Namen versehen werden.

Die Videokamera hatte eine Auflösung von 372 x 480 Pixel und eine Abstufung von 265 Grautönen. Die Aufnahmen wurden jedoch nicht 1:1 übertragen, sondern in der Bildhöhe um den Faktor 1,4 komprimiert. Dies führt zu optisch scheinbar schärferen Banden, stellt aber für die quantitative Auswertung einen unkalkulierbaren Verzerrungsfaktor dar.

Dieser Monitor war aufgrund der geringen Größe und der mangelnden Möglichkeit Farbe darzustellen nur begrenzt tauglich. Eine Falschfarbendarstellung zur Erkennung der über und unterbelichteten Bezirke einer Aufnahme, wie sie sich in meinen Händen bewährt hat, konnte damit nicht erreicht werden. Statt dessen mußte man eine Anzahl von Aufnahmen mit unterschiedlichen Belichtungen durchführen, um später die geeignete, richtig belichtete Aufnahme herauszufinden.

Die neuere Videokamera VarioCam war wesentlich lichtempfindlicher und zeigte keine Verzerrung bei den Aufnahmen der Bilder. Durch ein Videosignal wurden die Daten direkt über eine *frame grabber*-Karte, in einem Macintosh LC II eingespeist. Man konnte die fertigen Aufnahmen sofort beurteilen und gegebenenfalls die Belichtung über eine Falschfarbendarstellung auf einem 13-Zoll-Monitor optimieren. Die Auflösung der Kamera betrug 768 x 512 Pixel und konnte 256 Grautöne darstellen.

Ein Vergleich der Dynamik der zwei Videokameras mit einem Graukeil zeigte deutliche Unterschiede. Die alte Cybertech CS-1 konnte nur einen sehr geringen Anteil der Grautöne darstellen, die dunklen Grautöne stellte sie als schwarz, die helleren Grautöne als weiß dar. Bei der Darstellung einer Dynamik von 256 Grautönen konnte sie gerade einmal 95 Grautöne darstellen. Die neuere VarioCam stellte dagegen 235 Grautöne dar. Dies stellt für die Quantifizierung einen entscheidenden Vorteil dar. Neben sehr hellen DNA-Banden konnte die VarioCam auch sehr schwach fluoreszierende DNA-Banden darstellen. Auf einer Aufnahme konnte ohne weiteres 1:50fach stärkere Banden gleichzeitig quantifizieren. Bei der Cybertech CS-1 dagegen waren weniger als 1:10fach unterschiedliche Bandenintensitäten, die noch auswerten lassen.

Um mit der Cybertech CS-1 Gelaufnahmen quantifizieren zu können, mußten verschiedene Volumina der PCR-Produkte auf dem Agarosegel aufgetragen werden. So wurden je nach der zu erwartenden PCR-Produktmenge 3 bis 30 µl PCR-Lösung auf das Agarosegel aufgetragen und danach eine Elektrophorese durchgeführt. Damit ist eine Quantifizierung möglich, jedoch müssen die Elektrophoresen oft wiederholt werden, wenn die abgeschätzte DNA-Banden sich nicht mehr auswerten lassen. Dies

fürte zu einem mit der neuen Kamera vermeidbaren Zeitaufwand und Verbrauch von zusätzlichen Materialien. Zum anderen gibt es durch die ständige Anpassung der Pipettierolumina zusätzliche Fehler in der Genauigkeit der Messungen. Durch die neue Videokamera VarioCam wurde das Verfahren einfacher, billiger und auch genauer.

Die alte Videokamera Cybertech CS-1 hatte zudem keine lineare Darstellung der aufgenommenen Grauwerte. Der nicht-linearen c -Koeffizient führte zu einer guten Darstellung der hellen Werte, aber zu einer "Kompression" der dunkleren Werte. Man mußte eine nicht-lineare Kalibrierungskurve zur Ermittlung der unbekannt DNA-Mengen verwenden. Durch die "Kompression" der Graustufen wurden auch die Fehlerschwankungen, besonders der kleinen Messwerte, stark vergrößert.

Auch die feinere Darstellung der Aufnahme durch die höhere Pixelzahl der VarioCam (786 x 512 statt 372 x 480 Pixel bei der Cybertech CS-1) führt zu einer Reduzierung von Rundungsfehlern bei der Auswertung und damit zu statistisch besseren Ergebnissen.

Frau Annette Reith konnte in ihrer Diplomarbeit zeigen, daß Aufnahmen der Gele in maximaler Größe erfolgen mußten, da man sonst zusätzliche Fehlerquellen auftrat. Kleiner aufgenommene Gele hatten eine größere Abweichung der Messwerte von der Fitgerade als optimale Aufnahmen desselben Agarosegels.

Einen ähnlichen Effekt hat eine nicht optimale Belichtung und Anpassung des c -Koeffizienten. Die Fehler der Messwerte wird größer, wenn eine zu kurze Belichtungszeit gewählt wird. Überbelichtungen führen dazu, daß man einige DNA-Banden nicht auswerten kann.

Überbelichtungen sind mit der Cybertech CS-1 nicht direkt zu erkennen. Deshalb mußten Aufnahmen mit verschiedenen Belichtungszeiten gemacht werden, um die richtigen Zeiten empirisch nachträglich zu ermitteln. Die konnte bei S/W-Monitoren nur durch eine sogenannte Pipette gemacht werden, mit der alle Banden einzeln abgefahren wurden und geprüft wurde, daß die Grauwerte der hellsten Banden kleiner als 255 waren. Leider war es nicht möglich während der Weiterverarbeitung der Aufnahmen mit NIH Image dies einfach festzustellen. Da NIH Image einen gemittelten Wert für jede Bande errechnet, wurden diese Peak nicht sichtbar, da jede Bande in den Randbereichen auch dunklere Werte hatte, die in die Mittelwertberechnung mit eingingen.

Eine wesentliche Erleichterung wurde durch die Verwendung eines Farbmonitors erreicht. Mit der neuen Videokamera und dem damit angeschlossenen Macintosh war eine direkte Kontrolle der Aufnahme möglich. Man kann damit die Aufnahme in

Falschfarben durch den *16 color ramp*-LUT darstellen. Über- und unterbelichtete Stellen erkennt man sofort und kann die Belichtungszeit vor der Speicherung der Aufnahme optimieren.

Auch mit dem Auswertungsprogramm NIH Image ergaben sich einige Fallstricke für die optimale Quantifizierung. In dem damals aktuellen Handbuch wurden einige falsche Anweisungen gegeben. Eine automatische Hintergrundsubtraktion führte in meinen Händen nicht zu vernünftigen Ergebnissen. In dem neuesten mir vorliegenden Manual des NIH wird diese Methode auch nicht mehr empfohlen. Der Hintergrund wird besser manuell in dem Plotfenster entfernt.

Es gibt bei dem Programm NIH Image einige Methoden die Aufnahme auszuwerten. Dabei wird einmal der Plot als die OD oder alternativ als Transmission berechnet. Diese Methoden entsprechen nicht den bekannten Begriffen aus der photometrischen Bestimmung der Lichtabsorption, sondern sind nur mathematische Behandlungsmethoden der Berechnung. Es erweist sich die Berechnung als Transmission als die Methode der Wahl, da sie die kleinsten Fehlerabweichungen der Messwerte von der Fitgerade hat und keine offensichtlich unsinnigen Negativwerte für kleine Mengen DNA zeigt.

Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte mit Makros, die innerhalb des Programms NIH Image aufgerufen werden können. Ein Makro ist ein veränderlicher und umprogrammierbarer Teil eines Gesamtprogrammes. Einige Befehlsfolgen werden darin automatisch aufgerufen. Bei der Anwendung der Makros *gel plotting macros* zeigt sich bei der Auswertung von Aufnahmen vieler Banden auf einmal immer wieder ein Fehler. Kleine Messwerte von DNA wurden gegenüber großen Messwerten zu klein berechnet. Dies fiel dadurch auf, daß plötzlich Effizienzen von den PCRs über 100% auftraten. Dies war nach der allgemein anerkannten Theorie der PCR nicht möglich. Genauer Untersuchungen und eine Überprüfung der Makros zeigten, daß es sich um einen Rundungsfehler handelte, der immer dann auftrat, wenn viele Banden gleichzeitig ausgewertet wurden. Da die *gel plotting macros* in einer Pascal ähnlichen Programmiersprache geschrieben waren ließen sie sich einfach so modifizieren, daß der Fehler nicht mehr auftrat. Diese neuen *gel plotting macros* wurden auf dem Server des NIH veröffentlicht und sind unter der im Anhang genannten *internet home page* der Öffentlichkeit zugänglich.

Zusätzlich wurden in die Makros noch einige Verbesserungen eingeführt, welche die Handhabung bei der Quantifizierung stark automatisieren.

Die Auftrennung der DNA wurde durch Gelelektrophorese von Agarosegelen durchgeführt. Die DNA wurde mit dem damals neu auf dem Markt eingeführten Farbstoff SYBR Green I durch Fluoreszenz durch UV-Beleuchtung sichtbar gemacht. Dieser Farbstoff weist eine höhere Fluoreszenz auch mit kleinen Mengen DNA auf, als der Farbstoff Ethidiumbromid. Damit können in unseren Händen auf Agarosegelen Mengen von DNA bis zu 0,2 ng DNA ausgewertet werden. Eine deutliche Verbesserung Ethidiumbromid-gefärbten Gelen gegenüber. Nicht nur die höhere Fluoreszenz des Farbstoffes trägt zur Verbesserung der Auswertung bei, sondern auch die fehlende unspezifische Hintergrundanfärbung der Gele trägt entscheidend zur Verbesserung der Ergebnisse bei.

Zur Färbung von DNA mit SYBR Green I stehen mehrere Möglichkeiten zur Auswahl. Die Färbung kann vor der Auftrennung (*prestaining*) in einem Agarosegel durch Elektrophorese, während der Elektrophorese (*precasting*) oder nachträglich (*poststaining*) geschehen. Das *prestaining* führte oft zu "Schmiereffekten" bei der Gelelektrophorese und war nur begrenzt auswertbar. Das *poststaining*-Verfahren erreichte nicht die optimale Sensitivität für kleine DNA-Mengen und zeigte bei längeren Färbezeiten eine Diffusion der DNA-Banden. Optimale Ergebnisse wurden mit dem *precasting*-Verfahren erreicht. Hierzu wurde der Farbstoff während des Gelgießens in das Gel integriert. Damit waren optimale Laufeigenschaften der DNA-Banden und eine hohe Sensitivität zu erreichen. Dieses Verfahren wurde dann konsequent angewendet.

Die Empfehlung der Vertriebsfirma MoBiTec, als Beleuchtung einen Epiilluminator statt eines Transilluminators zu verwenden, konnte von mir nicht bestätigt werden. Die epiilluminale Ausleuchtung führte immer zu einer geringeren Sensitivität. Damit ist nicht auszuschließen, daß stärkere UV-Epiilluminatoren bessere Ergebnisse bringen. Mit unseren technischen Möglichkeiten konnten wir dies jedoch nicht zeigen.

Bei der Quantifizierung großer Mengen an DNA durch diese Methode gab es jedoch noch eine zu beachtende Obergrenze. Wurden in einem Gel mehr als 100 ng DNA bei einer Farbstoffkonzentration von 10 µl SYBR Green I-Lösung/100 ml Agarosegel gemessen konnte kein linearer Zusammenhang zwischen DNA-Menge und Leuchtintensität mehr gefunden werden. Bei der gleichzeitigen Messung mehrerer DNA-Banden in einer Spur trat dieser Effekt bei den Banden längerer DNA-Fragmente schon bei wesentlich geringeren Mengen auf. Kürzere DNA-Fragmente laufen in der Front der Banden. Beim Durchlaufen des Gels sättigen sie sich mit dem Farbstoff ab und wandern zusammen mit dem gebundenen Farbstoff weiter. Dadurch wird die Konzentration des Farbstoffes in diesem Gelbereich erniedrigt. Ein nachfolgendes

längeres DNA-Fragment findet also beim Durchlaufen dieses Bereiches weniger Farbstoff vor und kann sich, falls es sich um eine große Menge DNA-Fragment handelt, nicht mehr absättigen. Die messbare Fluoreszenz dieses DNA-Fragmentes ist damit geringer als die Fluoreszenz der Banden, welche die volle Sättigung mit SYBR Green I erreicht haben. Dies führt zu Fehlmessungen, oder wenn es sich um DNA zur Kalibrierung handelt, zur Fehlkalibrierung der zu messenden DNA-Mengen. Dieser Effekt spielt deshalb eine wichtige Rolle, da zur Kalibrierung oft käuflicher DNA-Längenmarker verwendet wird. Dieser besteht immer aus vielen DNA-Fragmenten, da diese zur Längenbestimmung notwendig sind. Bei der Quantifizierung können diese DNA-Fragment-Marker praktisch nie eingesetzt werden. Sie wurden generell und besonders in den hohen DNA-Mengenbereichen zu Fehlern führen. Bei zwei Fragmenten, die gleichzeitig in einer Spur aufgetragen wurden, zeigte sich für das kleinere DNA-Fragment eine maximale Beschickungsmenge von 100 ng, für das größere Fragment eine maximale Menge von 30 ng. Dies ist sicherlich abhängig von der Fragmentgröße und vielen anderen Faktoren, deshalb sollte jeweils empirisch überprüft werden, falls man trotzdem DNA-Längenmarker verwenden will. In dem weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde ganz darauf verzichtet.

Der Hintergrund sehr konzentrierter Banden zeigte nach der elektrophoretischen Auftrennung einen Vorhof um die jeweilige Bande. Dieser Halo-Effekt kann durch die Streulicht des in das Agarosegel eingestrahlten Fluoreszenzlicht erklärt werden. Er konnte jedoch nicht beseitigt werden. Er führte bei den Kalibrierungskurven oft dazu, daß die Fitgeraden nicht durch den Nullpunkt gingen, wie das bei einer korrekten Kalibrierungskurve zu erwarten wäre.

Als störend bei der Auswertung stellt sich der zum DNA-Auftrag auf das Agarosegel verwendete Marker heraus. Der übliche Marker enthielt die Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol F, damit man die DNA-Lösung erstens besser in die Geltaschen eingefüllen kann, und zweitens daß man die Lauflänge der DNA während der Gelelektrophorese abschätzen kann. Die Farbstoffe des Markers absorbieren Licht (wahrscheinlich ist das UV-Licht der entscheidende Faktor) und führen zu dunkleren Stellen in der Aufnahme der Agarosegele. Falls der Marker in Höhe einer DNA-Bande auf dem Gel mitläuft oder sich bei breiten, stark leuchtenden Banden im Randbereich einer DNA-Bande befindet, ist es praktisch unmöglich den Hintergrund manuell von dem dunklen Bezirk des Markers abzugrenzen. Einige Gelaufnahmen waren dadurch nicht mehr auszuwerten. Dies Problem konnte durch einen Marker der ein anderes Laufverhalten hatte und weniger UV-Licht absorbierte gelöst werden. Bromkresolgrün erwies sich als geeigneter Farbstoff. Außerdem kann

durch eine niedrigere Konzentration des Farbstoffes eine Störung der Quantifizierung reduziert werden.

Unter Beachtung der bisherigen Ausführungen wurde nun die neue Möglichkeit zur Quantifizierung statistisch untersucht. Vergleichenden DNA-Messungen führten unter den gegebenen Voraussetzungen zu einem Korrelationskoeffizienten von 0,99, einer Standardabweichung von 0,08 und einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $< 0,0001$. Diese Werte zeigen die hohe Reproduzierbarkeit der quantifizierten Ergebnisse.

Die PCR ist eine sehr empfindliche Reaktion, da sie DNA-Sequenzen millionenfach amplifizieren kann. Viele Parameter der PCR werden auch heute nicht ganz verstanden, weshalb die PCR immer wieder empirisch für die jeweilige Anwendung optimiert werden muß.

Ein erster wichtiger Punkt sind die verwendeten Primer. Oft wurden die Primer einfach ohne Überprüfung durch Computerprogramme ausgewählt. Dadurch kommt es besonders bei hoch repetitiven Sequenzen, wie zum Beispiel der mtDNA, zu einem Mehrfachannealing der Primer. Auf diese Art und Weise entstehen störende DNA-Produkte und es finden Konkurrenzreaktionen statt. Dies kann die PCR-Effizienz und Ausbeute an DNA-Produkten bzw. Nebenprodukten erheblich beeinflussen. Mit einigen der zu Verfügung stehenden Primer in unserem Labor konnte keine wirkliche Zyklusabhängigkeit gefunden werden. Erst als mit Computer-getesteten Primern gearbeitet wurde, konnte man eine wirkliche Zyklusabhängigkeit feststellen. Mit Computerprogrammen konnten auch viele zusätzliche Annealingstellen der ungeeigneten Primer mit der mtDNA festgestellt werden.

Bei Amplifikationen geringer Mengen DNA über viele Zyklen, zeigten sich oftmals DNA-Fragmente in Form einer DNA-Leiter nach der Auftrennung mit Agarosegelen. Dieses Phänomen wurde nicht immer gefunden, sondern nur in einigen Einzelfällen. Diese Effekte lassen sich am ehesten durch die Bildung von Primer-Dimern bzw. -Oligomere erklären. Die Qualität der eingesetzten DNA war oft nur sehr gering. Sie stammte aus Autopsieproben, die Probengewinnung wurde nicht sofort, sondern erst nach Stunden oder oft nach Tagen durchgeführt. Man kann daher davon ausgehen, daß die DNA dadurch schon stark degradiert ist. Diese degradierten Fragmente führen wahrscheinlich direkt oder aber indirekt durch verändertes Amplifikationsverhalten der Primer zu diesen leiterartigen DNA-Fragmentlängen. Nach einem Wechsel zu den vorgeschlagenen Primern war dieses Phänomen nicht mehr beobachtet worden.

Ein prinzipielles Problem bei der Quantifizierung von DNA durch PCR stellt die Fragmentlänge der PCR-Produkte dar. Bei zunehmender Degradation der DNA aus Autopsieproben kommt es aus statistischen Gründen zu immer kleiner werdenden DNA-Fragmenten. Große Fragmente zerfallen in kleinere Fragmente. Quantifiziert man nun diese DNA-Proben mit einem Primerpaar, welches sehr große Fragmente amplifiziert, stehen nur wenige DNA-Matrizen mit der notwendigen Länge für die Amplifikation zur Verfügung. Anders ist die Situation bei der Verwendung von Primerpaaren, die zu kleineren Fragmenten führen. Hier stehen wesentlich mehr DNA-Fragmente als Matrizen für die Amplifikation zur Verfügung. Man wird bei korrekter Bestimmung der Ausgangsmenge DNA eine geringere DNA-Menge bei längeren Primerabständen finden, als bei der Quantifizierung dergleichen DNA mit Primern, die ein kleineres Fragment amplifizieren. Man sollte daher die Abstände des Primerpaares so gering wie möglich halten. Andererseits sind jedoch große Fragmente besser anzufärben mit einem Fluoreszenzfarbstoff. Alle interkalierenden oder *groove binder* Farbstoffe färben die DNA proportional zu ihrer Länge an. Folglich kann man eine wesentlich geringere Menge von längeren DNA-Fragmenten als kürzere auf einem Gel mit Farbstoffen dieser Klasse sichtbar anfärben. Das bedeutet, daß man schon bei geringeren Zyklenzahlen bei der qPCR Fragmente auf dem Gel quantifizieren kann. Hier sollten die Fragmente optimalerweise möglichst groß sein. Um einen vernünftigen Kompromiß zwischen beiden Anforderungen bei der qPCR-Auswertung mit Fluoreszenzfarbstoffen zu erreichen habe ich mich für 500 bp lange DNA-Fragmente entschieden.

Bei einer großen Menge an zu untersuchenden Autopsieproben spielen auch wirtschaftliche Überlegungen eine Rolle. Ein großer Kostenfaktor bei der PCR ist die verwendete Menge an Polymerase. Deshalb wurde die minimale Menge an Polymerase ermittelt. Die bei der PCR eingesetzten Vent Polymerase-Menge konnte gegenüber den Firmenangaben ohne weiteres halbiert werden. Bei der Verwendung eines Viertels der empfohlen Menge waren bei vergleichbaren Zyklenzahlen keine auswertbaren PCR-Produktmengen vorhanden. Es wurde also die Hälfte der empfohlenen Menge an Vent Polymerase verwendet.

Ein weiterer Vorschlag, sehr kleine Mengen DNA zu quantifizieren, war, die Menge an Template-DNA zu erhöhen. Damit ist auch die zu bestimmende mtDNA in größerer Menge in der Reaktionsmischung vorhanden. Allerdings zeigte sich, daß die Amplifikation oberhalb der üblicherweise für die PCR verwendeten Mengen von 10 - 100 ngGesamt-DNA/100 µl PCR-Lösung keine Erhöhung der PCR-Produkte bei

vergleichbaren Zyklenzahlen brachte. Es wurde sogar noch weniger PCR-Produkt amplifiziert.

Immer noch wird sowohl die Effektivität als auch die Plateauphase der PCR nur unzureichend verstanden. Mathematisch gesehen ist in der Plateauphase lediglich die ein mehr oder weniger plötzliches Absinken der Effektivität der PCR. Daher liegt der Schluß nahe, daß ähnliche Faktoren, die das Absinken der PCR-Effektivität in der Plateauphase bewirken auch in der exponentiellen Phase der PCR eine Rolle spielen. Die Bedeutung der Plateauphase wurde von Morrison und Gannon, 1994, diskutiert. Erschöpfung von den Ausgangsverbindungen oder deren Aktivitäten während der PCR konnte experimentell nicht als Grund für die Plateauphase ermittelt werden. Sicherlich spielt diese bei den hitzempfindlichen Polymerase eine Rolle, kann aber allein oder bei hitzestabileren Polymerasen, wie z. B. die von uns verwendete Vent Polymerase, nicht als wesentliche Ursache gesehen werden. Interessanter waren bei dieser Diskussion die Möglichkeiten durch Hemmung der während der PCR gebildeten Produkte. Als eine Möglichkeit kommen inhibierende Nebenprodukte in Betracht, andererseits aber auch die gebildeten PCR-Fragmente in Betracht. Das Ergebnis, daß große DNA-Mengen die Effektivität beeinflussen führt zu der Möglichkeit, daß kompetitive Interaktionen der großen Mengen an neu gebildeten DNA-Fragmente mit den Primern und der DNA-Polymerase einen erheblichen Einfluß auf die Effektivität haben können. Ein Hinweis in diese Richtung wird durch dieses Resultat gegeben, für einen Beweis mußten jedoch weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Dies war jedoch nicht das primäre Ziel der Arbeit.

Die Annealingtemperatur ist ein weiterer wichtiger Parameter in der qPCR. Durch Variation der Ausgangstemperatur könnte die Effektivität der PCR geändert werden. Bei einer höheren Temperatur würden die Primer schwächer annealen und die Effektivität würde sinken. Würde sich die Plateauphase nicht ändern hätte man einen größeren Bereich von Messwerten zur Verfügung, würde sich die Genauigkeit verbessern, da sich das Verhältnis des Messbereich zu dem Extrapolationsbereich verkleinern würde. Es werden zwei Amplifikationen gezeigt, die sich nur in einem Parameter, der Annealingtemperatur unterscheiden. Den Erwartungen entsprechend findet sich eine geringere Effektivität der PCR. Allerdings verschiebt sich auch die Plateauphase und es kann kein Vorteil der höheren Annealingtemperatur gegenüber der niedrigeren gefunden werden. Es wurde weiterhin eine Annealingtemperatur von 54°C bei einer Annealingzeit von 45 s verwendet.

Alle bisherigen Ergebnisse ermöglichen eine korrekte Quantifizierung der PCR-Produkte und damit eine einfache Quantifizierung durch die kinetische PCR.

Die neu ausgearbeitete Methodik der Quantifizierung und kinetischen PCR sollte nun an der mtDNA eines Patienten mit bekannter *common deletion* überprüft werden. Zur Kontrolle wurde ein *Southern Blot* mit dergleichen DNA-Probe durchgeführt.

Durch die kinetische PCR wurde für die Patientenprobe 0,2 ng Wildtyp-mtDNA/100 ng Gesamt-DNA und 0,22 ng *common deletion*-DNA/100 ng Gesamt-DNA ermittelt. Dies entspricht 0,2% Wildtyp-mtDNA (w/w) und 0,22% *common deletion*-DNA (w/w) an der Gesamt-DNA. Daraus ergibt sich wiederum ein Verteilung angegeben in Gewichtsprozent von 47% Wildtyp und 53% *common deletion* an der Gesamt-mtDNA. Man muß jedoch überlegen, ob die Angaben des Verhältnisses an Deletion zu Wildtyp in Gewichtsprozenten oder in molaren Prozenten erfolgt. Dies wird regelmäßig in der einschlägigen Literatur vernachlässigt. Bei dem relativ kleinen mtDNA-Molekül spielt eine Deletion von der Größe der *common deletion* eine rechnerisch bedeutende Rolle. In molaren Prozenten angegeben heißt dies, daß 61% der DNA-Moleküle mitochondrialen Ursprungs diese Deletion tragen.

Ein Vergleich mit einem *Southern Blot* dieser DNA zeigt ein vergleichbares Deletionsmuster. Der Anteil von *common deletion*-DNA zu Gesamt-mtDNA war in Gewichtsprozenten 56% und in molarer Angabe 64%. Diese Ergebnisse zeigen die nach den vorherigen Ausführungen erwartete Genauigkeit dieser neuen Methode zur Quantifizierung und der Quantitierung der mtDNA.

6.2 Quantitierung von DNA durch einen neue Plotmethode

Während der ersten Zeit stand kein Auswertungsprogramm zum *image processing* zur Verfügung. Zum Überprüfen der Ergebnisse konnten daher nur semiquantitative Methoden angewendet werden. Durch die üblichen Plotmethoden konnten daher keine Aussagen gemacht werden. Um nun aber dennoch abschätzen zu können, nach welcher Anzahl von Zyklen die ersten DNA-Banden bei der üblichen kinetischen qPCR für verschiedene Mengen Templat-DNA sichtbar waren, stellte ich auf einem Plot die eingesetzte DNA-Menge der Anzahl der Zyklen gegenüber, in welchen die erste DNA-Bande sichtbar war. Dabei stellte sich heraus, daß die Punkte durch eine Linie zu verbinden waren. Es handelte sich also um eine lineare Funktion, die zur Abschätzung der Zyklenzahlen bei verschiedenen eingesetzten Templat-DNA-Mengen zur Erzeugung einer sichtbaren (und damit auch später auswertbaren) PCR-Produktmenge notwendig war. Bei diesem Plot fiel auf, daß die Gerade die x-Achse

schneidet, wenn n auf der y -Achse null wird. Dieser Schnittpunkt muß also eine Aussage über die vorhandene DNA-Menge bei null Zyklen, das heißt eigentlich bevor man eine PCR durch führte, machen.

Nach einiger Überlegung wird klar, daß der Schnittpunkt bei dieser Plotmethode die Menge an Templat-DNA darstellt, bei welcher das PCR-Produkt, in der Ausgangs-DNA ohne eine PCR durchzuführen (!), theoretisch gerade sichtbar sein würde.

Die Steigung der Geraden in diesem Plot entspricht der negativen reziproken Effizienz der PCR. Diese Zusammenhänge werden im Kapitel 5.6.2 ausführlich erklärt. Nachdem ein Auswerteprogramm, nämlich NIH Image zur Verfügung stand, wurde diese neue Plotmethode an DNA-Proben validiert. Dazu wurde eine frische Verdünnungsreihe der Gesamt-DNA angefertigt und durch PCR amplifiziert. Die Verdünnungsreihe wurde entsprechend dem geometrischen Mittel (s. a. Kapitel 5.5.4) verdünnt. Nach Auftragung der Werte in dem üblichen kinetischen Plot konnte eine DNA-Menge von 0,78% mtDNA von der Gesamt-DNA für diese DNA-Probe ermittelt werden. Wurden diese Plot-Ergebnisse jetzt nach der neu eingeführten Potmethode berechnet, so konnte ein Anteil von 0,66% mtDNA in der Gesamt-DNA-Menge berechnet werden. Für die kinetische PCR wird eine Effizienz von 1,61 und für die neue Ausgangsmengen-abhängige PCR eine Effizienz von 1.56 erhalten. Die zwei Plotmethoden liefern also durchaus vergleichbare Ergebnisse.

Zur genaueren statistischen Beurteilung dieses Plotverfahrens wurde mit einer photometrisch bestimmten Menge eines Plasmides eine mehrfache Quantitierung ausgeführt. Diese Quantitierungen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mit jeweils neuen unabhängigen PCR-Ansätzen durchgeführt. Von den 100 ng Ausgangs-DNA können durchschnittlich 91,4% wiedergefunden werden. Trotz eines Ausreißers in der Versuchsreihe wurde noch eine Standardabweichung der Werte von 23% gefunden. Das Konfidenzintervall für eine 68%ige Richtigkeit des Versuchsergebnisses betrug 11,5%. Damit ist eine hinreichende Genauigkeit und Wiederholbarkeit der Methode gezeigt. Eine Quantitierung von dergleichen DNA aus einem gemeinsamen PCR-Ansatz zum gleichen Zeitpunkt in einen PCR-Zykler führt, wie in der Diplomarbeit von Annette Reith gezeigt wurde, zu einer geringeren statistischen Streuung der Werte.

6.2.1 Der mathematische Hintergrund der neuen Plotmethode

Bei der PCR wird in der exponentiellen Phase das Anfangstemplat mit jedem Zyklus mit einer Effizienz, die größer als 1 und kleiner als 2 ist exponentiell vermehrt. Dies entspricht einem exponentiellen Wachstumsprozeß und wird außer in der medizinischen Wissenschaft in der Ökonomie zur Beschreibung von Zinseszinsberechnungen angewendet. Die entsprechende Formel für die PCR lautet:

$$P_n = P_0 * a^n$$

Hierbei ist P_0 die Ausgangsmenge an DNA-Templat, a die Effizienz der PCR und n die Anzahl der Zyklen, welche man durchgeführt hat. Daraus ergibt sich P_n , die Produktmenge nach n Zyklen der PCR.

Will man nun diese Formel in einem Plot zeigen, so kann man dies am einfachsten durch eine halblogarithmische Darstellung erreichen. In der Sprache der Algebra kann man dies durch folgende Gleichungsumstellung erreichen:

$$P_n = P_0 * a^n$$

$\log P_n = \log P_0 + n * \log a$, oder als lineare allgemeine Geradengleichung:

$$y = a + bx$$

Die letzte Zeile der Rechnung stellt die allgemeine Geradengleichung dar. Jetzt kann der $\log P_n$ auf der logarithmischen y-Achse in Abhängigkeit von n auf der linearen x-Achse dargestellt werden (s. a. Abbildung 37).

Wird aus den Werten für $P_n = f(n)$ eine Linie gebildet, dann ist die Steigung $b = \log a$ und der Schnittpunkt durch die y-Achse $a = \log P_0$, denn im Schnittpunkt ist $n = 0$ und die Gleichung vereinfacht sich in $P_n = P_0$.

Der eigentlich interessante Wert ist nun aber P_0 . Die Formel nach P_0 aufgelöst lautet nun:

$$\log P_0 = \log P_n - n * \log a$$

Bei dieser Gleichung haben wir nun 2 Bekannte n und P_n und wir möchten 2 Unbekannte a und P_0 errechnen. Also brauchen wir mindestens 2 Paare der Bekannten, das sind unsere verschiedenen Messwerte für n und P_n . Man kann nun zwei Dinge tun, um Messwerte für die PCR zu erhalten: Erstens kann man bei zwei verschiedenen Zyklen n die dazu gehörenden P_n bestimmen, wie in der klassischen kinetischen PCR, oder aber man verdünnt das Ausgangs-Templat um den Faktor f und mißt wieder bei zwei verschiedenen Zyklen n die dazu gehörenden P_n . Auch

unter diesen Bedingungen läßt sich die Formel wie im Ergebnisteil beschrieben auflösen nach:

$$P_0 = {}^{n-n'}\sqrt{P_n^m * f^{-n} * P_n^{-n'}}$$

Man erkennt mit dieser Formel, daß über eine Verdünnung einer DNA-Templat-Ausgangslösung und Messung bei 2 verschiedenen Zyklen n immer eine Berechnung von P_0 möglich ist. Man ist nicht darauf angewiesen dieselbe Ausgangslösung zu verwenden.

Es ist selbstverständlich, daß die Bestimmung von zwei Messwerten in der Anwendung natürlich zu wenig ist, um ein statistisch zuverlässiges Ergebnis zu erhalten. Man kann dies aber durch wiederholte Messwertbestimmung kompensieren, wenn man auf diese Art eine Quantitierung durchführen möchte. Aber von der Überlegung führt diese Geradengleichung direkt zu der neuen von mir vorgeschlagenen Quantitierung. Man kann von einer Verdünnung ausgehend eine Quantitierung durchführen und auch geometrisch und algebraisch auswerten. Diese Gleichung ist die universellere Erweiterung der Ausgangsformel zur kinetischen qPCR. Sie beschreibt alle Fälle, auch für verdünnte Ausgangslösungen. Im Falle der klassischen kinetischen PCR wird in dem Term $f^{-n'}$ dadurch $f = 1$ gesetzt, da keine Verdünnung verwendet wird. Dann gilt für alle n : $1^{-n'} = 1$. Eine Multiplikation mit 1 kann weggelassen werden und die Formel entspricht:

$$P_0 = {}^{n-n'}\sqrt{P_n^m * P_n^{-n'}} \text{ oder:}$$

$$P_0 = {}^{n-n'}\sqrt{\frac{P_n^m}{P_n^{n'}}$$

Dies stellt wiederum die schon beschriebene Formel für die klassische PCR dar.

Interessant ist die Grenzwertbetrachtung, wenn bei beiden Messungen sich die Zyklen immer mehr annähern. In dem Moment wenn beide Zyklen gleich sind, wird $n = n'$ oder $\Delta(n - n') = 0$ und die Gleichung verändert sich wie folgt:

$$P_0 = {}^0\sqrt{P_n^m * f^{-n} * P_n^{-n'}}$$

Die Wurzel aus 0 ist jedoch nicht definiert. In diesem Extremfall kann keine Berechnung von P_0 durchgeführt werden. Also sind auch klein werdende $\Delta(n - n')$ mit einer immer größeren Ungenauigkeit behaftet. Daraus ergeben sich Konsequenzen bei der Messung. Ein großer Abstand $\Delta(n - n')$ bringt einen Zugewinn an Genauigkeit. Die ist auch graphisch betrachtet durchaus plausibel. Vergrößert sich nun der Abstand der Messpunkte wird das Verhältnis zwischen dem Messbereich und

dem Extrapolationsbereich immer kleiner; das bedeutet, Fehler spielen eine immer kleinere Rolle.

Bei dem klassischen kinetischen Plot ist der maximale Messbereich nach unten durch die Nachweisgrenze und nach oben durch die Plateauphase begrenzt. Anders dagegen bei der neuen Plotmethode. Hier kann der Messbereich für die Zyklen weiter nach hinten ausgedehnt werden (s. a. Abbildung 38). Nicht die Plateauphase der Templat-DNA spielt die entscheidende Rolle, sondern die Plateauphase der maximal möglichen Verdünnung. Dies führt zu einer deutlichen Erweiterung des Messbereiches, damit zu einer Verkleinerung des Verhältnisses Messwertbereich zu Extrapolationsbereich und schließlich zu einer Erhöhung der Genauigkeit des Ergebnisses.

Bei der Ableitung der Gleichung für die neue Plotmethode konnte folgende Formel gefunden werden, die in die allgemeine Geradengleichung überführt werden kann:

$$n = \frac{\log P_n + \log V}{\log a} - \frac{1}{\log a} * \log G_0$$

$$y = a + bx$$

Die Formel selbst ist jedoch nicht einfach zu Verstehen. Dennoch kann man folgendes aussagen: b stellt in der allgemeinen Geradengleichung die Steigung der Geraden dar. b entspricht dem Term $-\frac{1}{\log a}$, hat also eine negative Steigung, die dem reziproken $\log a$ entspricht. Daraus kann die Steigung berechnet werden.

Für den Fall, daß $n=0$ wird, dies entspricht den Bedingungen ohne PCR, kann folgende Gleichung abgeleitet werden:

$$V = \frac{P_n}{G_0}$$

Aus dieser Formel kann nun wieder das Verhältnis V von Gesamt-Templat-DNA G_0 zu der willkürlich eingesetzten Menge der Isolinie P_n berechnet werden. Das Ergebnis dieses Plotverfahrens ist nun primär keine absolute Größe, sondern ein Verhältnis, welches sich aus der Gesamt-Templat-DNA G_0 sekundär ergibt. Da die Gesamt-Templat-DNA G_0 aber vorher photometrisch bestimmt wurde, kann auf die Absolutmenge von P_0 zurückgeschlossen werden:

Es sei noch angemerkt, daß alle diese Gleichungen nicht berücksichtigen, daß das amplifizierte PCR-Fragment nur ein Teilstück der mtDNA darstellt. Bei allen Umrechnungen von dem PCR-Fragment zu der mtDNA (oder der *common deletion*) muß dieser Faktor natürlich immer berücksichtigt werden. Ich habe diesen Faktor nicht in die Formeln aufgenommen, da er diese nur unnötig komplizierter macht, aber

nicht das Prinzip der Gleichungen ändert. In der allgemein üblichen Praxis wird einfach am Ende der Berechnungen von dem Gewicht oder Molekulargewichtes des PCR-Fragmentes auf selbiges der mtDNA umgerechnet.

6.3 Perspektiven der neuen Plotmethode

Durch die neue Plotmethode wird gegenüber der zyklenabhängigen qPCR ein entscheidender Vorteil sichtbar. Sie bietet die Möglichkeit genauer als mit der unmodifizierten Methode zu messen.

Vergleichende Studien zwischen verschiedenen PCR-Methoden wurden bereits durchgeführt. Die meisten dieser Arbeiten beschäftigen sich mit Viren (besonders HIV und Hepatitis C) oder der mitochondrialen DNA. Hamblet und Castora, 1995, vergleichen die Ergebnisse der kinetischen PCR mit denen der *serial dilution* PCR unter Verwendung der gleichen DNA-Proben. Sie finden einen mehr als 10fachen Unterschied zwischen beiden Methoden. Zhang et al., 1996, beschreibt den Vergleich von drei PCR-Methoden und findet die beste Übereinstimmung zwischen der *serial dilution* und der kompetitiven PCR. Die kinetische PCR liefert, wie auch bei Hamblet und Castora, eine mehr als 10fach zu höheren Wert. Eine absolute Quantitierung der mtDNA führen beide Arbeitsgruppen leider nicht durch, weshalb die richtige DNA-Menge leider unbekannt ist. Dennoch ergibt die Übereinstimmung der Ergebnisse der *serial dilution*-PCR und der kompetitiven PCR in der Arbeit von Zhang et al. einen Hinweis auf deren genauere Quantitierung. Leider wurde in beiden Arbeiten nur eine relative Quantitierung vorgenommen, kein Bezug zu einer bekannten Menge an DNA. Ein Vergleich mit der von mir vorgestellten Methode steht noch aus, beide Veröffentlichungen entstanden in der Endphase meiner praktischen Laborarbeit oder erschienen erst nach Beendigung.

Ein weiteres Problem der Validierung ergibt sich aus der Verwendung von Autopsiematerial für den Vergleich dieser Methoden. Autopsiematerial hat immer das Problem, daß es eine Unzahl von degradiertes DNA gibt. Welchen Einfluß diese Degradation hat ist noch nicht geklärt, in dieser Arbeit konnten verschiedene Probleme damit aufgezeigt werden. Ohne Quantitierung einer bekannten Menge an DNA ist dieser Vergleich leider sehr relativ.

Auch die in dieser Arbeit vorgestellten Kontrollmethoden sind teils relativer und teils absoluter Art. Bei den relativen Kontrollen findet sich jedoch eine hohe Übereinstimmung mit den angewandten Kontrollen, wie z. B. der *Southern Blot* und

die kinetische PCR. Eine Methode der Überprüfung der absoluten Menge ist die qPCR von reiner mtDNA oder aber einem Plasmid. Die Quantifizierung von Plasmid-DNA hat sich auch als genau herauskristallisiert. Reine mtDNA zu quantifizieren wurde auch schon in Angriff genommen, wurde aber bisher nicht beendet.

Natürlich muß man bei all diesen Kontrollen bedenken, daß die Quantifizierung sehr kleiner Menge an *common deletion* neben einer um Zehnerpotenzen höheren Konzentration der mtDNA (mit ähnlicher Sequenz) ganz neue Problem aufwirft, die mir in meiner Arbeit verborgen bleiben.

Nicolletti et al., 1996, führten eine Quantifizierung auf dem hier vorgestellten Prinzip an der mRNA von Erythropoetin (quantitative RT-PCR) vor und kamen zu dem Ergebnis, daß eine Quantifizierung mit dieser Methode eine Alternative zur kompetitiven RT-PCR ist. Auch in ihrem Ansatz wurde gezeigt, daß sich die Effizienz in einer Verdünnungsreihe nicht verändert.

6.3.1 Neue Möglichkeiten der Quantifizierung durch die neue Plotmethode

Die neue Plotmethode erlaubt nun sehr genau den empfindlichsten Parameter einer kinetischen PCR zu erfassen, die Effektivität der PCR. Die Effektivität hat den größten Einfluß auf die Ausgangsmenge an DNA, da die Ausgangs-DNA durch eine Extrapolation der Produktmenge errechnet oder graphisch ermittelt wird. Jede Extrapolation führt zu einem deutlichen Anstieg der Fehlerwahrscheinlichkeit für das Ergebnis. Ein Fehler in der Menge der amplifizierten DNA führt (bei unveränderter Effizienz) zu einem genauso großen Fehler im Ergebnis. Das heißt der Fehler setzt sich linear fort. Anders bei der Effizienz, hier bedeutet der Fehler eine Fortpflanzung auf einer logarithmischen Skala. Ein kleiner Fehler in der Steilheit der Fitlinie (entspricht der Effizienz) führt zu einem großen Fehler im Ergebnis. Dies tritt besonders stark bei kleinen DNA-Templat-Mengen auf, da hier der Extrapolationsbereich wesentlich größer ist als der Messbereich. Da die hier vorgestellte PCR-Plotmethode nun eine sehr genaue Bestimmung der Effizienz ermöglicht, wäre es ohne weiteres machbar, mit einem Teil eines PCR-Ansatzes genau die Effizienz zu bestimmen und mit dem anderen Anteil des gleichen Ansatzes weitere Proben nur einmal oder aber auch mehrere Ansätze zu amplifizieren. Man erstellt eine Kalibrierungskurve für die Amplifikation in einem Ansatz zur genauen Bestimmung der Effizienz eben dieser PCR und legt der Berechnung der DNA-Menge

in den unbekanntenen Ansätzen diese Effizienz zugrunde. Das wäre eine zeitliche und auch ökonomische Erleichterung für eine Quantifizierung. So könnte eine starke Vereinfachung für ein groß angelegtes Screeningverfahren gegeben sein.

Zwingende Voraussetzung wäre natürlich, daß es sich bei der DNA um vergleichbare Proben handelt. Sie sollten etwa die gleiche DNA-Zusammensetzung und auch vergleichbare Menge an DNA enthalten. Ebenso zwingend ist natürlich, daß die PCR-Gefäße mit dem gleichen Ansatz der PCR-Lösung mit Ausnahme der untersuchten DNA-Lösung und die PCR zur gleichen Zeit auf demselben PCR-Zykler durchgeführt wird.

Unter diesen Voraussetzungen wäre eine Vereinfachung zu großen Screenings möglich. Dieser Ansatz wird von Annette Reith zur Zeit geprüft.

Tsai und Wiltbank, 1996, beschrieben eine vergleichbare Methode für eine Prostaglandin-Rezeptor mRNA. Statt mehrere PCR-Ansätze der gleichen DNA durchzuführen, wurde nur jeweils ein Ansatz der zu bestimmenden DNA durchgeführt und durch Vergleich mit einer qPCR-Standardkurve der Gehalt an spezifischer mRNA bestimmt.

6.3.2 Allgemeine kinetische Beschreibung der PCR durch die neue Plotmethode

Über die Quantifizierung hinaus erschließt die neue Plotmethode noch einen Ansatz die Kinetik der PCR tiefer zu verstehen. Die Möglichkeiten wurden nicht geprüft von mir, sollen aber weitergehende Möglichkeiten dieser Methode kurz streifen. Dazu folgende theoretische Überlegungen.

Inhibitoren, welche in sich dem DNA-Ansatz befinden, würden durch die Verdünnungsreihe in immer geringeren Konzentrationen vorliegen. Dadurch würden sie die Amplifikationen mit hohem Anteil stärker hemmen und bei diesen die Effizienz stärker erniedrigen. In der neuen Plotmethode würde sich daher eine nach oben gekrümmte Kurve zeigen.

Konzentrationsunabhängige Inhibitoren, z.B. die Inaktivierung der Polymerase durch die hohe Temperatur über lange Zeit, würden zu einer Verringerung der Effizienz besonders der unteren Templat-Konzentrationen führen und damit eine nach unten gekrümmte Kurve bilden.

Inhibitoren, die sich erst während der PCR bilden, würden zu einer Parallelverschiebung der Kurve führen, aber zu keiner Krümmung, da sie sich immer erst ab

einer bestimmten Menge an PCR-Produkten bilden würden und damit für alle Konzentrationen erst vor der Plateauphase in entsprechenden Mengen gebildet werden.

Dies sind einige der theoretische Überlegungen, die aber natürlich erst experimentell überprüft werden müssten.

7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden zwei neue Methoden der quantitativen PCR vorgestellt.

Zuerst wird eine nicht-radioaktive Methode beschrieben, welche die Quantifizierung von PCR-Produkten durch einen neu eingeführten Fluoreszenzfarbstoff erlaubt und damit die Möglichkeit eröffnet, nicht-radioaktive PCR-Quantifizierungen durchzuführen. Es wurde eine Methodik der Auswertung von mit SYBR Green I-gefärbten PCR-Produkten durch elektrophoretische Trennung auf Agarosegelen und die anschließende Auswertung mit dem Programm NIH Image gezeigt. Diese Quantifizierung wurde durch Bestimmung einer bekannten DNA auf Richtigkeit überprüft.

Im weiteren Teil wird eine Plotmethode vorgestellt, welche die Auswertung von PCR-Ergebnissen auf eine neue Art ermöglicht. Die neue Quantifizierungsmethode wurde erfolgreich durch einen *Southern Blot* auf ihre Richtigkeit und durch wiederholte Quantifizierungen auf ihre Reproduzierbarkeit geprüft.

Diese neue Plotmethode wurde in dieser Arbeit auch algebraisch hergeleitet und damit mathematisch bewiesen.

Perspektivisch bleibt zu untersuchen, ob sich diese Plotmethode auch zum vereinfachten quantitativen Screening einer großen Anzahl von Patienten-DNA auf Deletionen und Mutationen bewährt. Eine weitere Einsatzmöglichkeit könnte die Bestimmung von inhibitorischen Effekten auf die PCR sein.

8 Literaturverzeichnis

Adams, A. (1981):

"Das Zonensystem" in *Das Negativ*, Christian Verlag, München, Seite 59-108

Alard, P., Lantz, O., Sebagh, M., Calvo, C.F., Weill, D., Chavanel, G., Senik, A. und Charpentier, B. (1993):

"A versatile ELISA-PCR assay for mRNA quantitation from a few cells."

Biotechniques, **Vol.:** 15, Seite 730-7

Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J.H., Staden, R. und Young, I.G. (1981):

"Sequence and organization of the human mitochondrial genome"

Nature, **Vol.:** 290, Seite 457-465

Arnheim, N. (1992):

"Polymerase chain reaction strategy"

Annu. Rev. Biochem., **Vol.:** 61, Seite 131-56

Arnheim, N. und Cortopassi, G. (1992):

"Deleterious mitochondrial DNA mutations accumulate in aging human tissues."

Mutat. Res., **Vol.:** 275, Seite 157-67

Barrientos, A., Casademont, J., Cardellach, F., Ardite, E., Estivill, X., Urbano-Marquez, A., Fernandez-Checa, J.C. und Nunes, V. (1997 a):

"Qualitative and quantitative changes in skeletal muscle mtDNA and expression of mitochondrial-encoded genes in the human aging process."

Biochem. Mol. Med., **Vol.:** 62, Seite 165-71

Barrientos, A., Casademont, J., Cardellach, F., Estivill, X., Urbano-Marquez, A., und Nunes, V. (1997 b):

"Reduced steady-state levels of mitochondrial RNA and increased mitochondrial DNA amount in human brain with aging."

Brain. Res. Mol. Brain. Res., **Vol.:** 52, Seite 284-9

Becker-Andre M. und Hahlbrock K (1989):

"Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATTY)."

Nucleic Acids Res, **Vol.: 17**, Seite 9437-46

Bertoni-Freddari, C., Famoretti, C., Casoli, T., Pieroni, M., Meier-Ruge, W. und Ulrich, J. (1991):

"Neurobiology of the aging brain: Morphological alterations of biosynaptic regions."

Arch. Gerontol. Geriatr., **Vol.: 12**, Seite 253-259

Bindoff.LA, Desnuelle.C, Birch-Machin.MA, Pellissier.JF, Serratrice.G, Dravet.C, Bureau.M, Howell.N und Turnbull.DM (1991):

"Multiple defects of the mitochondrial respiratory chain in a mitochondrial encephalopathy (MERRF): a clinical, biochemical and molecular study."

J. Neurol. Sci., **Vol.: 102**, Seite 17-24

Bittles, A.H. (1992):

"Evidence for and against the causal involvement of mitochondrial DNA mutation in mammalian ageing"

Mutat. Res., **Vol.: 275**, Seite 217-225

Brierly, E.J., Johnson, M.A., Bowman, A., Ford, G.A., Subhan, F., Reed, J.W., James, O.F. und Turnbull, DM (1997):

"Mitochondrial function in muscle from elderly athletes [published erratum appears in *Ann Neurol* 1997 May;41(5):698] "

Ann. Neurol., **Vol.: 41**, Seite 114-6

Burch, G.E., Sohal, R. und Fairbanks, L.D. (1970):

"Ultrastructural changes in drosophila heart with age."

Arch. Pathol., **Vol.: 89**, Seite 128-136

Cano, J., Hervas, J.P. und Machado, A. (1994):

"Ultrastructural studies in maturing and senescent muscle cells."

Cardiology and Ageing, Platt D., Seite Stuttgart

Chang, D.D., Hauswirth, W.W. und Clayton, D.A. (1985):

"Replication priming and transition initiate from precisely the same site in mouse mitochondrial DNA"

EMBO J., **Vol.: 4**, Seite 1559-67

Chang, D.D. und Clayton, D.A. (1985):

"Priming of human mitochondrial DNA replication occurs at the light-strand promotor"
Proc. Nat. Acad. Sci., **Vol.: 85**, Seite 351-55

Chang, D.D. und Clayton, D.A. (1987):

"A novel endoribonuclease cleaves at a priming site of mouse mitochondrial DNA replication."
EMBO J., **Vol.: 6**, Seite 409-17

Chehadeh, H.E., Zerlauth, G. und Mannhalter, JW (1995):

"Video image analysis of quantitative competitive PCR products: comparison of different evaluation methods."
Biotechniques, **Vol.: 18**, Seite 26

Chen, J.D. und Denton, M.J. (1991):

"X-chromosomal gene in Leber hereditary optic neuroretinopathy"
Am. J. Hum. Genet., **Vol.: 48**, Seite 692-693. (Letter)

Chow, D. (1994):

in *NIH Image 1.54 - Using Image for Densitometric Analysis of 1-D Gels*, NIH,
Bethesda, Maryland, USA

Christianson, T.W. und Clayton, D.A. (1986):

"In vitro transcription of human mitochondrial DNA: accurate termination requires a region of DNA sequence that can function bidirectly"
Proc. Nat. Acad. Sci., **Vol.: 83**, Seite 6277-81

Christianson, T.W. und Clayton, D.A. (1988):

"A tridecamer DNA sequence supports human mitochondrial RNA 3' formation in vitro"
Mol. Cell Biol., **Vol.: 8**, Seite 4502-9

Ciba-Geigy (1985):

in Ciba-Geigy AG: *Wissenschaftliche Tabellen Geigy - Teilband Statistik*, Basel

Clayton, D.A. (1982):

"Replication of animal mitochondrial DNA"
Cell, **Vol.: 28**, Seite 693-705

Clayton, D.A. (1984):

"Transcription of the mammalian mitochondrial genom."
Rev. Biochem., **Vol.: 53**, Seite 573-94

Clayton, D.A. (1991):

"Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA"
Annu. Rev. Cell Biol., **Vol.:** 7, Seite 453-78

Cockerell, G.L., Lairmore, M.D., B., Rovnak, J., Hartley, T.M. und Miyoshi, I. (1990):

"Persistent infection of rabbits with HTLV-I: patterns of anti-viral antibody reactivity and detection of virus by gene amplification."
Int. J. Cancer., **Vol.:** 45, Seite 127-30

Coleman, R., Weiss, A., Finkelbrand, S. und Silbermann, M. (1988):

"Age and exercise-related changes in myocardial mitochondria in mice."
Acta Histochem., **Vol.:** 83, Seite 81-90

Connolly, A.R., Cleland, L.G. und Kirkham, BW (1995):

"Mathematical considerations of competitive polymerase chain reaction."
J. Immunol. Methods., **Vol.:** 187, Seite 201-11

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

"Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age."
Nat. Genet., **Vol.:** 2, Seite 324-9

Corral-Debrinski, M., Shoffner, J.M., Lott, M.T. und Wallace, D.C. (1992):

"Association of mitochondrial DNA damage with aging and coronary atherosclerotic heart disease."
Mutat. Res., **Vol.:** 275, Seite 169-80

Cortopassi, G.A. und Arnheim, N. (1990):

"Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans."
Nucl. Acids Res., **Vol.:** 18, Seite 6927-6933

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

"A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues."
Proc. Natl. Acad. Sci.USA., **Vol.:** 89, Seite 7370-4

Damian, M.S., Seibel, P., Schachenmayr, W., Reichmann, H. und Dorndorf, W. (1996):

"VACTERL with the mitochondrial np 3243 point mutation."
Am. J. Med. Genet., **Vol.:** 62, Seite 398-403

DiMauro, S. (1994):

"Methabolic myopathies" in *Handbook of Neurology*, Seite 212

- Doerson, C.J., Guerrier-Takada, C., Altman, S. und Attardi, G. (1985):
"Characterisation of an RNase P activity from HeLa cell mitochondria: comparison with the cytosol RNase P activity"
J. Mol. Biol., **Vol.:** 260, Seite 5942-49
- Dubin, D.T., Montoya, J., Timko, K.D. und Attardi, G. (1982):
"Sequence analysis and precise mapping of the 3' ends of HeLa cell mitochondrial ribosomal RNA's"
J. Mol. Biol., **Vol.:** 157, Seite 1-19
- Ehrlich, N. (1994):
PCR technique
- Ellison, D. und Lowe J (1998):
Neuropathology
- Feigenbaum, A., Chitayat, D., Robinson, B., MacGregor, D., Myint, T., Arbus, G. und Nowaczyk, M.J.M. (1996):
"The expanding clinical phenotype of the tRNA-leu(UUR) A-to-G mutation at np 3243 of mitochondrial DNA: diabetic embryopathy associated with mitochondrial cytopathy."
Am. J. Med. Genet., Seite 404-409
- Fahn, H.J., Wang, L.S., Hsieh, R.H., Chang, S.C., Kao, S.H., Huang, M.H. und Wei, YH (1996):
"Age-related 4,977 bp deletion in human lung mitochondrial DNA."
Am. J. Respir. Crit. Care Med., **Vol.:** 154
- Feldman, M.L. und Navaratman, V. (1981):
"Ultrastructural changes in atrial myocardium of the ageing rat."
J. Anat., **Vol.:** 133, Seite 7-17
- Fernandez-Silva, P., Petruzella, V., Fracasso, F., Gadaleta, M.N. und Cantatore, P. (1991):
"Reduced synthesis of mtRNA in isolated mitochondria of senescent rat brain."
Biochem. Biophys. Res. Commun., **Vol.:** 176, Seite 645-653
- Fine, P.E.M. (1978):
"Mitochondrial inheritance and disease."
Lancet, Seite 659-662
- Fischel-Ghodsian, N., Bohlman, M.C., Prezant, T.R., Graham, J.M., Jr., Cederbaum, S.D. und Edwards, M.J. (1992):
"Deletion in blood mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome"
Pediat. Res., **Vol.:** 31, Seite 557-560.

Fisher, R.P. und Clayton, D.A. (1988):

"Purification and characterisation of human mitochondrial transcription factor 1"

Mol. Cell Biol., **Vol.: 8**, Seite 3496-509

Frenzel, H. (1985):

"Das Herz im Alter. Licht und elektronenmikroskopische Befunde."

Z. Kardiol., **Vol.: 74**, Seite Suppl. 7, 17-25

Frenzel, H. und Feimann, J. (1984):

"Age dependent structural changes in the myocardium of rats. A quantitative light- and electron microscopic study on the right and the left chamber wall."

Mech. Ageing Develop., **Vol.: 27**, Seite 24-41

Gerbitz, K.-D., Paprotta, A., Jaksch, M., Zierz, S. und Drechsel, J. (1993):

"Diabetes melitus is one of the heterogenous phenotypic features of a mitochondrial DNA point mutation within the tRNA^{Leu}(UUR) gene"

FEBS Lett., **Vol.: 321**, Seite 194-196

Gilliland, G., Perrin, S., Blanchard, K. und Bunn, H.F. (1990):

"Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction."

Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **Vol.: 87**, Seite 2725-9

Goto, Y., Nonaka, I. und Horai, S. (1991):

"A new mtDNA mutation associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS)"

Biochim. Biophys. Acta, **Vol.: 1097**, Seite 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**, Seite 545-550

Goto, Y., Tojo, M., Tohyama, J., Horai, S. und Nonaka, I. (1992):

"A novel point mutation in the mitochondrial tRNA^(Leu)(UUR) gene in a family with mitochondrial myopathy."

Ann. Neurol., **Vol.: 31**, Seite 672-5

Goto Y., Tsugane K., Tanabe Y., Nonaka I und Horai S (1994):

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

Biochem. Biophys. Res. Commun., **Vol.: 202**, Seite 1624-30

Grossmann, L.I. (1990):

"Mitochondrial DNA in sickness and health."

Am. J. Hum. Genet., **Vol.: 46**, Seite 415-417

Hamblet, N.S. und Castora, F.J. (1995):

"Mitochondrial DNA deletion analysis: a comparison of PCR quantitative methods."

Biochem. Biophys. Res. Commun., **Vol.: 207**, Seite 839-47

Hansford, R.G. (1983):

"Bioenergetics in aging."

Biochim. Biophys. ACTA, **Vol.: 726**, Seite 41-80

Harding, A.E. (1992):

"Growing old: the most common mitochondrial disease of all?"

Nature Genet., **Vol.: 2**, Seite 251-252

Harmann, D. (1993):

"Free radical involment in aging."

Drugs Aging, Seite 60-80

Hegner, D. (1980):

"Age-dependence of molecular and functional changes in biological membran properties."

Mech. Ageing Dev., **Vol.: 14**, Seite 101-118

Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. und Williams, PM (1996):

"Real time quantitative PCR."

Genome Res., **Vol.: 6**, Seite 986-94

Hess, J.F., Parisi, M.A., Bennet, J.L. und Clayton, D.A. (1991):

"Impairment of mitochondrial transcription termination by a point mutation associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies"

Nature, **Vol.: 351**, Seite 236-39

Ikebe, S.-I., Tanaka, M., Ohno, K., Sato, W., Hattori, K., Kondo, T., Mizuno, Y. und Ozawa, T. (1990):

"Increase of deleted mitochondrial DNA in the striatum in Parkinson's disease and senescence."

Biochem. Biophys. Res. Comm., **Vol.:** 170, Seite 1044-1048

Jerusalem, F. und Zierz, S. (1991):

in *Muskelerkrankungen*, Georg Thieme Verlag, New York

Johns, D.R., Rutledge, S.L., Stine, O.C. und Hurko, O. (1989):

"Directly repeated sequences associated with pathogenic mitochondrial DNA deletions"

Proc. Nat. Acad. Sci., **Vol.:** 86, Seite 8059-8062

Kadenbach, B. und Müller-Höcker, J. (1990):

"Mutations of mitochondrial DNA and human death."

Naturwissenschaften, **Vol.:** 77, Seite 221-225

Kadenbach, B., Münscher, C., Frank, V., Müller-Höcker, J. und Napiwotzki, J. (1995):

"Human aging is associated with stochastic somatic mutations of mitochondrial DNA."

Mutat. Res., **Vol.:** 338

Kearns, T.P. und Sayre, G.P. (1958):

"Retinitis pigmentosa, external ophthalmoplegia, and complete heart block: unusual syndrome with histologic study in one of two cases"

Arch. Ophthal., **Vol.:** 60, Seite 280-289

Kearns, T.P. (1965):

"External ophthalmoplegia, pigmentary degeneration of the retina, and cardiomyopathy: a newly recognized syndrome"

Trans. Ophthal. Soc. U.K., **Vol.:** 63, Seite 559-625

Kellogg, D.E., Sninsky, J.J. und Kowk, S. (1990):

"Quantitation of HIV-1 proviral DNA relative to cellular DNA by the polymerase chain reaction."

Anal. Biochem., **Vol.:** 189, Seite 202-8

King, M. und Attardi, G. (1989):

"Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation"

Science, **Vol.:** 246, Seite 500-503

- Kitagawa, T., Suganuma, N., Nawa, A., Kikkawa, F., Tanaka, M., Ozawa, T. und Tomoda, Y. (1993):
"Rapid accumulation of deleted mitochondrial deoxyribonucleic acid in postmenopausal ovaries."
Biol. Reprod., **Vol.:** 49, Seite 730-6
- Köhler, T., Lassner, D., Rost, A., Thamm, B., Pustowitz, B. und Remke H. (1995):
in *Quantitation of mRNA by Polymerase Chain Reaction - Nonradioactive PCR Methods*, Springer Lab Manual
- Kovalenko, S.A., Harms, P.J., Tanaka, M., Baumer, A., Kelso, J., Ozawa, T. und Linnane, AW (1997):
"Method for in situ investigation of mitochondrial DNA deletions."
Hum. Mutat., **Vol.:** 10, Seite 489-495
- Kruse, B., Narasimhan, N. und Attardi, G. (1989):
"Termination of transcription in human mitochondria: identification and purification of a DNA binding protein factor that promotes termination."
Cell, **Vol.:** 58, Seite 391-397
- Larrick, J.W. (1997):
The PCR Technique: Quantitative PCR, BioTechniques Books; Eaton Publishing
- Larsson, N.-G., Holme, E., Kristiansson, B., Oldfors, A. und Tulinius, M. (1990):
"Progressive increase of the mutated mitochondrial DNA fraction in Kearns-Sayre syndrome"
Pediat. Res., **Vol.:** 28, Seite 131-136
- Lauber, J., Marsac, C., Kadenbach, B. und Seibel, P. (1991):
"Mutations in mitochondrial tRNA genes: a frequent cause of neuromuscular diseases."
Nucleic Acids Res., **Vol.:** 19, Seite 1393-7
- Larsson N G , Eiken H G , Boman H , Holme E , Oldfors A und Tulinius M H (1992):
"Lack of transmission of deleted mtDNA from a woman with Kearns-Sayre syndrome to her child."
Am. J. Hum. Genet., **Vol.:** 50, Seite 360-3
- Lee, H.C., Pang, C.Y., Hsu, H.S. und Wei, Y.H. (1994):
"Ageing-associated tandem duplications in the D-loop of mitochondrial DNA of human muscle."
FEBS-Lett., **Vol.:** 354, Seite 79-83

Lee, H.C., Pang, C.Y., Hsu, H.S. und Wei, Y.H. (1994):

"Differential accumulations of 4,977 bp deletion in mitochondrial DNA of various tissues in human ageing."

Biochim. Biophys. Acta., **Vol.:** 1226, Seite 37-43

Lertrit, P., Noer, A.S., Jean-Francois, M.J.B., Kapsa, R., Dennett, X., Thyagarajan, D., Lethlean, K., Byrne, E. und Marzuki, S. (1992):

"A new disease-related mutation for mitochondrial encephalopathy lactic acidosis and strokelike episodes (MELAS) syndrome affects the ND4 subunit of the respiratory complex I"

Am. J. Hum. Genet., **Vol.:** 51, Seite 457-468

Lestienne, P. und Ponsot, G. (1988):

"Kearns-Sayre syndrome with muscle mitochondrial DNA deletion"

Lancet, **Vol.:** 1, Seite 885 (Letter)

Leveille, A.S. und Newell, F.W. (1980):

"Autosomal dominant Kearns-Sayre syndrome"

Ophthalmology, **Vol.:** 87, Seite 99-108

Lezza A.M., Boffoli D., Scacco S., Cantatore P. und Gadaleta, M.N. (1994):

"Correlation between mitochondrial DNA 4977-bp deletion and respiratory chain enzyme activities in aging human skeletal muscles."

Biochem. Biophys. Res. Commun., **Vol.:** 205, Seite 772- 9

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., Zhang, C., Linnane, A.W. und 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. 1997; 9(3): 265-71

Liu, V.W., Zhang, C., Pang, C.Y., Lee, H.C., Lu, C.Y., Wei, Y.H. und Nagley, P. (1998):

"Independent occurrence of somatic mutations in mitochondrial DNA of human skin from subjects of various ages."

Hum. Mutat. 1998; 11(3): 191-6

Liu, V.W., Zhang, C. und Nagley, P. (1998):

"Mutations in mitochondrial DNA accumulate differentially in three different human tissues during ageing."

Nucleic. Acids Res., **Vol.:** 26, Seite 1268-75

Manouvrier, S., Rotig, A., Hannebique, G., Gheerbrandt, J., D., Royer, Legrain, G., Munnich, A., Parent, M., Grunfeld, J., P., Largilliere, C., Lombes, A. und Bonnefont, J., P. (1995):

"Point mutation of the mitochondrial tRNA(Leu) gene (A 3243 G) in maternally inherited hypertrophic cardiomyopathy, diabetes mellitus, renal failure, and sensorineural deafness."

J. Med. Genet., **Vol.:** 32, Seite 654-656

Mathews, C.E., McGraw, R.A. und Berdanier, CD (1995):

"A point mutation in the mitochondrial DNA of diabetes-prone BHE/cdb rats."

FASEB-J., **Vol.:** 9, Seite 1638-42

Matthews, P.M., Brown, R.M., Morten, K., Marchington, D., Poulton, J. und Brown, G. (1995):

"Intracellular heteroplasmy for disease-associated point mutations in mtDNA: implications for disease expression and evidence for mitotic segregation of heteroplasmic units of mtDNA."

Hum. Genet., **Vol.:** 96, Seite 261-268

Matthews, P.M., Brown, R.M., Morten, K., Marchington, D., Poulton, J. und Brown, G. (1995):

"Intracellular heteroplasmy for disease-associated point mutations in mtDNA: implications for disease expression and evidence for mitotic segregation of heteroplasmic units of mtDNA."

Hum. Genet., Seite 261-268

McKusick, V.A. (1994):

in *Mendelian Inheritance in Man. Catalogs of Human Genes and Genetic Disorders*, Johns Hopkins University Press, Baltimore

McShane, M.A., Hammans, S.R., Sweeney, M., Holt, I.J., Beattie, T.J., Brett, E.M. und Harding, A.E. (1991):

"Pearson syndrome and mitochondrial encephalomyopathy in a patient with a deletion of mtDNA"

Am. J. Hum. Genet., **Vol.:** 48, Seite 39-42

Menzies, R.A. und Gold, P.H. (1971):

"The turnover of mitochondria in a variety of tissues of young adult and aged rats."

J.Biol.Chem., **Vol.:** 246, Seite 2425-2429

Merril, C.R., Zullo, S., Ghanbari, H., Herman, M.M., Kleinman, J.E., Bigelow, L.B., Bartko, J.J. und Sabourin, D.J. (1996):

"Possible relationship between conditions associated with chronic hypoxia and brain mitochondrial DNA deletions."

Arch. Biochem. Biophys., **Vol.: 326**, Seite 172-7

Miquel, J. (1998):

"An update on the oxygen stress-mitochondrial mutation theory of aging: genetic and evolutionary implications."

Exp. Gerontol., **Vol.: 33**

Montagna, P., Gallassi, R., Medori, R., Govoni, E., Zeviani, M., Di Mauro, S., Lugaresi, E. und Andermann, F. (1988):

"MELAS syndrome: characteristic migrainous and epileptic features and maternal transmission"

Neurology, **Vol.: 38**, Seite 751-754

Moraes, C.T., DiMauro, S., Zeviani, M., Lombes, A., Shanske, S., Miranda, A.F., Nakase, H., Bonilla, E., Werneck, L.C., Servidei, S., Nonaka, I., Koga, Y., Spiro, A.J., Brownell, A.K.W., Schmidt, B., Schotland, D.L., Zupanc, M., DeVivo, D.C., Schon, E.A. und Rowland, L.P. (1989):

"Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome"

New Eng. J. Med., **Vol.: 320**, Seite 1293-1299

Morghen-Hughes, J.A. (1986):

"The mitochondrial myopathies" in Engel E.A., Banker, B.Q. und McGraw-Hill (Editors)
Myology, New York, Seite 1709-1743

Morrison, C. und Gannon, C. (1994):

"The impact of the PCR plateau phase on quantitative PCR"

Biochimica et Biophysica Acta, **Vol.: 1219**, Seite 493-498

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

"A new point mutation associated with mitochondrial encephalomyopathy."

Hum. Mol. Genet., **Vol.: 2**, Seite 2081-7

Münscher, C., Müller-Höcker, J. und Kadenbach, B. (1993):

"Human aging is associated with various point mutations in tRNA genes of mitochondrial DNA."

Biol. Chem. Hoppe-Seyler., **Vol.: 374**, Seite 1099-104

Münscher, C., Rieger, T., Müller-Höcker, J. und Kadenbach, B. (1993):

"The point mutation of mitochondrial DNA characteristic for MERRF disease is found also in healthy people of different ages."

FEBS-Lett., **Vol.:** 317, Seite 27-30

Nazarenko, I.A., Bhatnagar, S.K. und Hohman, RJ (1997):

"A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer."

Nucleic. Acids Res., **Vol.:** 25, Seite 2516-21

Newton, C.R. und Graham, A. (1995):

in Graham, J.M. und Billington, D. (Editor): *PCR - Introduction to BioTechniques*

Nicoletti, A. und Sassy, Prigent, C. (1996):

"An alternative quantitative polymerase chain reaction method."

Anal. Biochem., **Vol.:** 236, Seite 229-41

Nohl, H. (1979):

"Influence of age on thermotropic kinetics of enzymes involved in mitochondrial energy metabolism."

Z. Gerontol., **Vol.:** 12, Seite 9-18

Nonaka, I (1992):

"Mitochondrial diseases."

Curr. Opin. Neurol. Neurosurg., **Vol.:** 5, Seite 622-32

Odawara, M., Sasaki, K. und Yamashita, K. (1995):

"Prevalence and clinical characterization of Japanese diabetes mellitus with an A-to-G mutation at nucleotide 3243 of the mitochondrial tRNA-leu(UUR) gene."

J. Clin. Endocr. Metab., **Vol.:** 80, Seite 1290-1294

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

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

Am. J. Hum. Genet., **Vol.:** 59, Seite 591-602

Pavlakis, S.G., Phillips, P.C., DiMauro, S., De Vivo, D.C. und Rowland, L.P. (1984):

"Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: a distinctive clinical syndrome"

Ann. Neurol., **Vol.:** 16, Seite 481-488

- Pearson, H.A., Lobel, J.S., Kocoshis, S.A., Naiman, J.L., Windmiller, J., Lammi, A.T., Hoffman, R. und Marsh, J.C. (1979):
"A new syndrome of refractory sideroblastic anemia with vacuolization of marrow precursors and exocrine pancreatic dysfunction"
J. Pediat., **Vol.:** 95, Seite 976-984
- Perrin, S. und Gilliland, G. (1990):
"Site-specific mutagenesis using asymmetric polymerase chain reaction and a single mutant primer."
Nucleic. Acids Res., **Vol.:** 18, Seite 7433-8
- Pollock, M.A., Cumberbatch, M., Bennett, M.J., Gray, R.G.F., Brand, M., Hyland, K., Congdon, P.J., Pitts-Tucker, T. und Gray, S. (1986):
"Pyruvate carboxylase deficiency in twins"
J. Inherit. Metab. Dis., **Vol.:** 9, Seite 29-30
- Poulton, J., Sewry, C., Potter, C.G., Bougeron, T., Chretien, D., Wijburg, F.A., Morten, K.J. und Brown, G. (1995):
"Variation in mitochondrial DNA levels in muscle from normal controls. Is depletion of mtDNA in patients with mitochondrial myopathy a distinct clinical syndrome."
J. Inherit. Metab. Dis. 1995; 18(1): 4-20
- Poulton, J., Deadman, M.E., Ramacharan, S. und Gardiner, R.M. (1991):
"Germ-line deletions of mtDNA in mitochondrial myopathy"
Am. J. Hum. Genet., **Vol.:** 48, Seite 649-653
- Raeymaekers L. (1993):
"Quantitative PCR: theoretical considerations with practical implications."
Anal. Biochem., **Vol.:** 214, Seite 582-5
- Rosing, H.S., Hopkins, L C., Wallace, D.C., Epstein, C.M. und Weidenheim, K. (1985):
"Maternally inherited mitochondrial myopathy and myoclonic epilepsy"
Ann. Neurol., **Vol.:** 17, Seite 228-237
- Rychlik W., Spencer W.J. und Rhoads R.E (1990):
"Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro [published erratum appears in *Nucleic Acids Res* 1991 Feb 11;19(3):698]"
Nucleic. Acids Res., **Vol.:** 18, Seite 6409-12

- Sciacco. M., Bonilla. E., Schon. E.A., DiMauro. S. und Moraes. C.T. (1994):
"Distribution of wild-type and common deletion forms of mtDNA in normal and respiration-deficient muscle fibers from patients with mitochondrial myopathy [published erratum appears in Hum Mol Genet 1994 Apr;3(4):687]"
Hum. Mol. Genet., **Vol.: 3**, Seite 13-9
- Scion Corporation (1997):
in *Scion Image for Windows*, Frederick, Maryland, [<http://www.scioncorp.com>]
- Seibel, P., Degoul, F., Bonne, G., Romero, N., Francois, D., Paturneau-Jouas, M., Ziegler, F., Eymard, B., Fardeau, M., Marsac, C. und et.al. (1991 a):
"Genetic biochemical and pathophysiological characterization of a familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF)."
J. Neurol. Sci., **Vol.: 105**, Seite 217-24
- Seibel, P., Mell, O., Hannemann, A., Müller-Höcker, J. und Kadenbach, B. (1991 b):
"A method for quantitative analysis of deleted mitochondrial DNA by PCR in small tissue samples"
Methods in Molecular and Cellular Biology, **Vol.: 2**, Seite 147-153
- Shima, A. (1975):
"Effect of age in radiosensitivity of nuclear an mitochondrial DNA synthesis in the mouse liver."
Exper. Gerontol., **Vol.: 10**, Seite 171- 180
- Shoffner, J.M., Lott, M.T., Lezza, A.M.S., Seibel, P., Ballinger, S.W. und Wallace, D.C. (1990):
"Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA-lys mutation"
Cell, **Vol.: 61**, Seite 931-937
- Shoffner, J.M. und Wallace, D.C. (1992):
"Mitochondrial genetics: principles and practice"
Am. J. Hum. Genet., **Vol.: 51**, Seite 1179-1186 (Editorial)
- Shoffner, J.M., Krawiecki, N., Cabell, M.F., Torroni, A. und Wallace, D.C. (1993):
"A novel tRNA^{Leu}(UUR) mutation in childhood mitochondrial myopathy."
Am. J. Hum. Genet., **Vol.: 53 (Suppl)**
- Shoubridge, E.A., Johns, T. und Karpati, G. (1997):
"Complete restoration of a wild-type mtDNA genotype in regenerating muscle fibres in a patient with a tRNA point mutation and mitochondrial encephalomyopathy"
Hum. Molec. Genet., **Vol.: 6**, Seite 2239-2242

- Shy, G.M., Silberberg, D.H., Appel, S.H., Mishkin, M.M. und Godfrey, E.H. (1967):
"A generalized disorder of nervous system, skeletal muscle and heart resembling Refsum's disease and Hurler's syndrome. I. Clinical, pathologic and biochemical characteristics"
Am. J. Med., **Vol.:** 42, Seite 163-168
- Silvestri, G., Moraes, C.T., Shanske, S., Oh., S.J. und DiMauro, S. (1992):
"A new mtDNA mutation in the tRNA(Lys) gene associated with myoclonic epilepsy and ragged-red fibers (MERRF)."
Am. J. Hum. Genet., **Vol.:** 51, Seite 1213-7
- Simic, M.G. (1992):
"The rate of DNA damage and aging." in Emerit, I. und Change, B. (Editor)*Free radicals and aging*, Birkhäuser, Seite 20-30
- Simonetti, S., Chen, X., DiMauro, S. und Schon, E.A. (1992):
"Accumulation of deletions in human mitochondrial DNA during normal aging: analysis by quantitative PCR."
Biochim. Biophys. Acta., **Vol.:** 1180, Seite 113-22
- Soong, N.W., Hinton, D.R., Cortopassi, G. und Arnheim, N. (1992):
"Mosaicism for a specific somatic mitochondrial DNA mutation in adult human brain."
Nat. Genet., **Vol.:** 2, Seite 318-23
- Stolovitzky, G. und Cecchi, G. (1996):
"Efficiency of DNA replication in the polymerase chain reaction."
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **Vol.:** 93, Seite 12947-52
- Suganuma, N., Kitagawa, T., Nawa, A. und Tomoda, Y. (1993):
"Human ovarian aging and mitochondrial DNA deletion."
Horm. Res., **Vol.:** 39 (Suppl 1), Seite 16-21
- Sweeney, M.G., Bunday, S., Brockington, M., Poulton, K.R., Winer, J.B. und Harding, A.E. (1993):
"Mitochondrial myopathy associated with sudden death in young adults and a novel mutation in the mitochondrial DNA leucine transfer RNA(UUR) gene"
Quart. J. Med., **Vol.:** 86, Seite 709-713
- Sykes, P.J., Neoh, S.H., Brisco, M.J., Hughes, E., Condon, J. und Morley, A.A. (1992):
"Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution."
Biotechniques, **Vol.:** 13, Seite 444-9

- Tanaka. M., Ino. H., Ohno. K., Ohbayashi. T., Ikebe. S., Sano. T., Ichiki. T., Kobayashi. M., Wada. Y. und Ozawa. T (1991):
"Mitochondrial DNA mutations in mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS)."
Biochem. Biophys. Res. Commun., **Vol.: 174**, Seite 861-8
- Tauchi, H. und Sato, T. (1968):
"Age change in size and number of mitochondria of hepatic human cells."
J. Geront., **Vol.: 23**, Seite 454-461
- Tsai, S.J. und Wiltbank, M.C. (1996):
"Quantification of mRNA using competitive RT-PCR with standard-curve methodology."
Biotechniques, **Vol.: 21**, Seite 862-6
- Tsuyama Y., Adachi Usami E. und Takeda N. (1993):
"A case of Kearns-Shy syndrome with later onset."
Ophthalmologica, **Vol.: 206**, Seite 149-51
- Velho, G., Byrne, M.M., Clement, K., Sturis, J., Pueyo, M.E., Blanche, H., Vionnet, N., Fiet, J., Passa, P., Robert, J., J., Polonsky, K.S. und Froguel, P. (1996):
"Clinical phenotypes, insulin secretion, and insulin sensitivity in kindreds with maternally inherited diabetes and deafness due to mitochondrial tRNA Leu(UUR) gene mutation."
Diabetes, **Vol.: 45**, Seite 478-487
- Verma, A., Moraes, C.T., Shebert, R.T. und Bradley, WG (1996):
"A MERRF/PEO overlap syndrome associated with the mitochondrial DNA 3243 mutation."
Neurology, **Vol.: 46**, Seite 1334-6
- Vivino, M. (1994):
Image Engineering, NIH, Bethesda, Maryland, USA
- Vivino, M. (1994):
Inside NIH Image, NIH, Bethesda, Maryland, USA
- Vivino, M. und Rusband, W. (1994):
NIH Image (Version 1.56), NIH, Bethesda, Maryland, USA

- Wallace, D.C., Zheng, X., Lott, M.T., Shoffner, J.M., Hodge, J.A., Kelley, R. I., Epstein, C.M. und Hopkins, L.C. (1988):
"Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF): genetic, pathophysiological, and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease."
Cell, Seite 601-610
- Wallace, D.C. (1992):
"Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases?"
Science, **Vol.:** 256, Seite 628-632
- Wallace, D.C. (1994):
"Mitochondrial DNA mutations in diseases of energy metabolism."
J. Bioenerg. Biomembr., **Vol.:** 26, Seite 241-50
- Wei, Y.H., Pang, C.Y., You, B.J. und Lee, HC (1996):
"Tandem duplications and large-scale deletions of mitochondrial DNA are early molecular events of human aging process."
Ann. N.Y. Acad. Sci., **Vol.:** 786, Seite 82-101
- Wiesner R.J., Ruegg J.C. und Morano I (1992):
"Counting target molecules by exponential polymerase chain reaction: copy number of mitochondrial DNA in rat tissues."
Biochem. Biophys. Res. Commun., **Vol.:** 183, Seite 553-9
- Wiesner R.J. (1992):
"Direct quantification of picomolar concentrations of mRNAs by mathematical analysis of a reverse transcription/exponential polymerase chain reaction assay."
Nucleic. Acids Res., **Vol.:** 20, Seite 5863-4
- Wiesner R.J., Beinbrech B. und Ruegg J.C. (1993):
"Quantitative PCR [letter]"
Nature, **Vol.:** 366, Seite 416
- Yang B., Yolken R. und Viscidi R. (1993):
"Quantitative polymerase chain reaction by monitoring enzymatic activity of DNA polymerase."
Anal. Biochem., **Vol.:** 208, Seite 110-6
- Yen, T.C., Pang, C.Y., Hsieh, R.H., Su., C.H., King, K.L. und Wei, Y.H. (1992):
"Age-dependent 6 kb deletion in human liver mitochondrial DNA."
Biochem. Int., **Vol.:** 26, Seite 457-68

Yen, T.C., Su., J.H., King, K.L. und Wei, Y.H. (1991):

"Ageing-associated 5 kb deletion in human liver mitochondrial DNA."
Biochem. Biophys. Res. Commun., **Vol.: 178**, Seite 124-131

Zeviani, M., Moraes, C.T., DiMauro, S., Nakase, H., Bonilla, E., Schon, E.A. und Rowland, L.P. (1988):

"Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome"
Neurology, **Vol.: 38**, Seite 1339-1346

Zeviani, M., Gellera, C., Antonozzi, C., Rimoldi, M., Morandi, L., Villnai, F., Tiranti, V. und DiDonato, S. (1991):

"Maternally inherited myopathy and cardiopathy: association with mutation in mitochondrial DNA tRNA^{Leu}(UUR)."
Lancet, **Vol.: 338**, Seite 143-147

Zeviani, M., Muntoni, F., Savarese, N., Serra, G., Tiranti, V., Carrara, F., Mariotti, C. und DiDonato, S. (1993):

"A MERRF/MELAS overlap syndrome associated with a new point mutation in the mitochondrial DNA tRNA(Lys) gene [published erratum appears in *Eur J Hum Genet* 1993;1(2):124]"
Eur. J. Hum. Genet., **Vol.: 1**, Seite 80-7

Zhang, C., Baumer, A., Maxwell, R.J., Linnane, A.W. und Nagley, P. (1992):

"Multiple mitochondrial DNA deletions in an elderly human individual."
FEBS Lett., **Vol.: 297**, Seite 34-38

Zhang, C., Linnane, A.W. und 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., **Vol.: 195**, Seite 1104-10

Zhang, C., Peters, L.E., Linnane, A.W. und Nagley, P. (1996):

"Comparison of different quantitative PCR procedures in the analysis of the 4977-bp deletion in human mitochondrial DNA."
Biochem. Biophys. Res. Commun., **Vol.: 223**, Seite 450-5

9 Anhang

9.1 Begriffsbestimmungen

In der vorliegenden Arbeit werden die Begriffe Quantitierung und Quantifizierung in spezifischer Weise angewendet und sind nicht austauschbar.

Quantifizierung ist die Beschreibung einer Menge mit Zahlen oder Größen, also die Bestimmung eines realen Messwertes.

Quantitierung ist die Berechnung einer Größe oder genauer Menge an DNA durch mathematische Auswertung von Messwerten.

Die Begriffe **Effizienz** und **Effektivität** werden synonym verwendet.

Richtigkeit wird durch das Fehlen systematischer Fehler erreicht. Sie kann weder mit statistischen Methoden erfaßt noch korrigiert werden. Dies trifft zum Beispiel bei falscher Handhabung, Verwendung falscher Messmethoden oder falscher Kalibrierung der Messinstrumente zu.

Im Gegensatz dazu entsteht die **Genauigkeit**, welche durch zufällige (Mess-)Fehler entsteht. Sie kann statistisch beschrieben und eventuell auch korrigiert werden. Sie entsteht z. B. durch Pipettierfehler, Schwankungen in der Zusammensetzung von Lösungen und Inhomogenitäten des Untersuchungsgut. Durch mehr Messpunkte oder Vielfachbestimmung kann die Genauigkeit erhöht werden.

9.2 Glossar wichtiger Begriffe

<i>area under curve</i>	Integrierter Wert der Fläche unter einer Kurve bis zu der vorgegebenen Basislinie, die nicht immer mit der Nulllinie identisch sein muß.
Grauwert/Farbwert	Bei dem verwendeten TIF-Format Werte eines Pixels zwischen 0 und 255. Dies entspricht 8 bit ($2^8 = 256$).
Leuchtstärke	Helligkeits- bzw. Farbwert seines Pixels; syn. zu Grauwert bei S/W Bildern.
<i>Look-up table</i>	Daten zur Darstellung der Pixelwerte eines Images. Je ein Pixelwert wird einer Farbe (oder einem Grauwert) zugeordnet. Dadurch können

	Falschfarbenbilder aus S/W Bildern dargestellt werden. Dient zur verbesserten Wahrnehmung oder zur Kalibrierung eines Images.
Makro	Innerhalb eines Programms ausführbare Befehle zur Automatisierung einer oft gebrauchten Befehlskette. Bei NIH Image wird eine Pascal-ähnliche Programmiersprache verwendet.
Pascal	Programmiersprache
Pixel	Ein Bildelement, das den kleinsten Baustein für die Zusammensetzung eines Bildes darstellt. Ein Pixel kann bei dem verwendeten 8-bit TIF-Format Werte zwischen 0 (Weiß) und 255 (Schwarz) annehmen.
TIFF oder TIF	Abkürzung für <i>tagged image file (format)</i> . Darstellung eines Images durch einzelne Pixel, welche verschiedene Farbwerte annehmen können.

9.3 Abkürzungen

Å	Angström (10^{-10} m)
Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	<i>area under curve</i> (s. o.)
bidest.	bidestilliert
BIMM	Benigne Infantile Mitochondriale Myopathie
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CCD	<i>charge-coupled device</i> (bei den meisten Videokameras verwendetes Prinzip zur optischen Digitalisierung)
cDNA	komplementäre DNA
CIPO	<i>chronical intestinal pseudoobstruction</i>
CK	Creatinkinase
COX	Cytochrom c Oxidase
CPEO	Chronisch progressive externe Ophthalmoplegia
CSB	<i>conserved sequence block</i>
D	Dalton
ddH ₂ O	bidestilliertes, steriles Wasser
D-loop	<i>displacement loop</i>
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Extinktion
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEG	Elektoenzephalogramm

FAD	Flavin-adenin-dinukleotid
FIMM	Fatale Infantile Mitochondriale Myopathie
h	Stunde
HE	Hämtoxylin-Eosin
HSP	Transkriptionspromotor des H-Stranges (<i>heavy stand promotor</i>)
H-strand	schwerer DNA-Strang der mtDNA
KSS	Kearns-Sayre-Syndrom
LHON	Leber's <i>heretery optical neuropathy</i>
Lsg.	Lösung
LSP	Transkriptionspromotor des L-Stranges (<i>light stand promotor</i>)
L-strand	leichter DNA-Strang der mtDNA
LUT	<i>look-up table</i>
MAO	Monoaminoxidase
MELAS	<i>Mitochondrial myopathy, Encephalopathy, Lactatacidosis and stroke-like episodes</i>
MERRF	<i>Myocloni, Encephalopathy and ragged red fibers</i>
min.	Minute
mRNA	Messenger-RNA
MRT	Massenspektroskopie
mtDNA	mitochondriale DNA
mTF 1	mitochondrialer Transkriptionsfaktor 1
NADH	Nicotinsäureamid-adenin-dinukleotid
NARP	Neuropathie, Ataxie, Retinitis Pigmentosa
NC	Nitrozellulose
nm	Nanometer
np	Nukleotidpaar
nt	Nukleotid(e)
OD	Optische Dichte (<i>syn. optical density</i>)
O _H	Replikationsursprung (<i>Origin</i>) des H-Stranges
O _L	Replikationsursprung (<i>Origin</i>) des L-Stranges
p.a.	pro Analyse
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
p _H	Transkriptionspromotor des H-Stranges
P _L	Transkriptionspromotor des L-Stranges
PSPCR	Punktmutationsspezifische PCR
qPCR	Quantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase mrp	RNase für mitochondriales RNA processing
RNase	Ribonuklease
ROI	<i>region of interest</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RRF	<i>Ragged Red Fibers</i>
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde

S/W	Schwarz-Weiß
SDS	Natriumdodecylsulfat
s.	Sekunde
ssDNA	einzelsträngige DNA
syn.	synonym, gleichbedeutend
TAS	<i>Termination Associated Sequences</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TIFF oder TIF	Abk. für <i>tagged image file (format)</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Unit, Einheit der Enzymaktivität
ÜK	Übernachtkultur
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt

9.3.1 Nukleotide

A	Abk. für Adenin
C	Abk. für Cytosin
G	Abk. für Guanin
T	Abk. für Thymin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	äquivalente Mischung der Desoxynukleotide dATP, dCTP, dGTP und dTTP
dTTP	Desoxythymidintriphosphat

9.4 Source code der veränderten gel plotting macros

Diese Makros sind auch beim NIH unter folgender URL zu finden:

ftp://codon.nih.gov/pub/NIH_Image/user-macros/gel_plotting_andreas.txt

```
{Gel_Plotting_Macros_Andreas
This macro was modified by Andreas Becker in may 1995.
If you have questions or suggestions email to
becker@ps1515.chemie.uni-marburg.de

var {Global variables}

RoiLeft,RoiTop,RoiWidth,RoiHeight:real;
GelPid,MarkedPid,TempPid,PlotsPid,nLanes,count,ppv:real;
SaveRoiLeft,SaveRoiTop,hOffset,vOffset:real;
MinY,MaxY,xscale,yscale:real;
VerticalLanes,Uncalibrated:boolean;
GelTitel, TempTitel, Plotstitle:string;
GelPid,MarkedPid,PlotsPid,nLanes:integer
count,ppv:real;
```

```

OldRoiLeft,OldRoiTop,OldRoiWidth,OldRoiHeight:integer
Autoexec:boolean

procedure MarkLane;

var
  left,top,width,height:real;
  GelNotCalibrated:boolean;
  min,max:real;

begin
  GetRoi(left,top,width,height);
  if width=0 then begin
    PutMessage('Please outline the next lane. ');
    exit;
  end;
  if (VerticalLanes and (left=RoiLeft))
    or (not VerticalLanes and (top=RoiTop)) then begin
    PutMessage('This lane has already been marked. ');
    exit;
  end;
  nLanes:=nLanes+1;
  ChoosePic(GelPid);
  if VerticalLanes then begin
    MakeRoi(left+hOffset,RoiTop+vOffset,RoiWidth,RoiHeight);
    RoiLeft:=left;
    rUser1[nLanes]:=left;
  end else begin
    MakeRoi(RoiLeft+hOffset,top+vOffset,RoiWidth,RoiHeight);
    RoiTop:=top;
    rUser1[nLanes]:=top;
  end;
  GetPlotData(count,ppv,min,max);
  if min<MinY then MinY:=min;
  if max>MaxY then MaxY:=max;
  SelectPic(MarkedPid);
  if VerticalLanes
    then MakeRoi(left,RoiTop,RoiWidth,RoiHeight)
    else MakeRoi(RoiLeft,top,RoiWidth,RoiHeight);
  DrawBoundary;
  SetFontSize(9);
  if VerticalLanes then begin
    SetText('Centered, No Background');
    MoveTo(RoiLeft+RoiWidth/2,RoiTop-6);
  end else begin
    SetText('Right Justified, No Background');
    MoveTo(RoiLeft-2,RoiTop+RoiHeight/2);
  end;
  Write(nLanes:1);
  RestoreRoi;
  SelectPic(MarkedPid);
end;

procedure FirstLane;
var
  GelWidth,GelHeight,left,width:real;
  margin,leftm,rightm,topm,bottomm:real;
begin
  RequiresVersion(1.54);
  if WindowTitle='Temp' then begin
    PutMessage('To restart, select the first lane in the gel. ');
    exit;
  end;
  GetRoi(RoiLeft,RoiTop,RoiWidth,RoiHeight);
  if autoexec=false then begin
    OldRoiLeft:=RoiLeft;
    OldRoiTop:=RoiTop;
    OldRoiWidth:=RoiWidth;
    OldRoiHeight:=RoiHeight;
  end;
  if RoiWidth=0 then begin
    PutMessage('The Setup macro expects the Gel to be displayed and the first lane outlined. ');
    exit;
  end;

```

```

VerticalLanes:=RoiHeight>RoiWidth;
Uncalibrated:=not Calibrated;
GelPid:=PidNumber;
SetForegroundColor(255);
SetBackgroundColor(0);
MinY:=999999;
MaxY:=-999999;
nLanes:=0;
margin:=20;
GetPicSize(GelWidth,GelHeight);
leftm:=RoiLeft;
if leftm>margin then leftm:=margin;
rightm:=GelWidth-(RoiWidth+RoiLeft);
if rightm>margin then rightm:=margin;
bottomm:=GelHeight-(RoiHeight+RoiTop);
if bottomm>margin then bottomm:=margin;
topm:=RoiTop;
if topm>margin then topm:=margin;
if VerticalLanes
then MakeRoi(RoiLeft-leftm,RoiTop-topm,
             GelWidth-RoiLeft+leftm,RoiHeight+topm+bottomm)
else MakeRoi(RoiLeft-leftm,RoiTop-topm,
             RoiWidth+leftm+rightm,GelHeight-RoiTop+topm);
ChoosePic(GelPid);
TempTitel:=WindowTitle;
Duplicate('Temp ',TempTitel);
TempPid:=PidNumber;
SetText('centered Justified');
SetFontSize(8);
MoveTo(5,5);
write(TempTitel);
MarkedPid:=PidNumber;
SaveRoiLeft:=RoiLeft;
SaveRoiTop:=RoiTop;
hOffset:=RoiLeft-leftm;
vOffset:=RoiTop-topm;
RoiLeft:=leftm;
RoiTop:=topm;
SelectPic(GelPid);
KillRoi;
SelectPic(MarkedPid);
MakeRoi(RoiLeft,RoiTop,RoiWidth,RoiHeight);
if VerticalLanes
then RoiLeft:=-1
else RoiTop:=-1;
SetPlotScale(0,0);
MarkLane;
end;

procedure NextLane;

var
  left,top,width,height:integer;
  GelNotCalibrated:boolean;
  min,max:real;

begin
  if nLanes=0 then begin
    PutMessage('Please use the "Mark First Lane" macro first. ');
    Exit;
  end;
  MarkLane;
end;

procedure PlotLanes;

var
  left,top,width,height:real;
  GelNotCalibrated:boolean;
  i,LaneLength:integer;
  xmin,xmax,ymin,ymax,min,max:real;
  NeededSize:integer;
  PlotTop,PlotBottom,PlotWidth,PlotHeight:integer;
  hMargin,vMargin,SavePlotTop,PlotWindowSize:integer;

```

```

PlotWinHeight,PlotWinWidth:integer;
begin
  if nLanes=0 then begin
    PutMessage('Please use the Setup and Mark macros first.');
```

Exit;

end;

if VerticalLanes

then LaneLength:=RoiHeight

else LaneLength:=RoiWidth;

PlotWidth:=LaneLength;

if PlotWidth<500 then PlotWidth:=500;

if PlotWidth>(2*LaneLength) then PlotWidth:=2*LaneLength;

PlotHeight:=PlotWidth/2;

if PlotHeight<200 then PlotHeight:=200;

if PlotHeight>400 then PlotHeight:=400;

hMargin:=5;

vMargin:=25;

PlotWinHeight:=nLanes*PlotHeight+2*vMargin;

PlotWinWidth:=PlotWidth+2*hMargin;

PlotWindowSize:=PlotWinWidth*PlotWinHeight;

if PlotWindowSize>UndoBufferSize then begin

NeededSize:=(PlotWindowSize+0.05*PlotWindowSize) div 1024;

PutMessage('Use Preferences(Options Menu) to increase the Undo buffer size to at least ',NeededSize:1,'K.');

KillRoi;

exit;

end;

SetForegroundColor(255);

SetBackgroundColor(0);

SetNewSize(PlotWinWidth,PlotWinHeight);

ChoosePic(GelPid);

GelTitel:=WindowTitle;

MakeNewWindow('Plots ',Geltitel);

PlotsPid:=PidNumber;

SetText('centered Justified');

SetFontSize(9);

MoveTo(PlotWinWidth/2,vmargin-20);

ChoosePic(GelPid);

GelTitel:=WindowTitle;

ChoosePic(Plotspid);

write(GelTitel);

if UnCalibrated then begin

 SetText('centered Justified');

 SetFontSize(9);

 MoveTo(PlotWinWidth/2,vmargin-10);

 Write(' Uncalibr.');

 end else begin

 SetText('centered Justified');

 SetFontSize(9);

 MoveTo(PlotWinWidth/2,vmargin-10);

 Write(' Uncalibr. OD');

end;

xmin:=0;

xmax:=count-1;

ymin:=MinY;

ymax:=MaxY;

xscale:=PlotWidth/(xmax-xmin);

yscale:=PlotHeight/(ymax-ymin);

PlotTop:=vMargin;

SavePlotTop:=PlotTop;

RoiLeft:=SaveRoiLeft;

RoiTop:=SaveRoiTop;

SetLineWidth(1);

for i:=1 to nLanes do begin

PlotBottom:=PlotTop+(ymax-ymin)*yscale;

ChoosePic(GelPid);

 if VerticalLanes

 then MakeRoi(rUser1[i]+hOffset,RoiTop,RoiWidth,RoiHeight)

 else MakeRoi(RoiLeft,rUser1[i]+vOffset,RoiWidth,RoiHeight);

GetPlotData(count,ppv,min,max);

SelectPic(PlotsPid);

MoveTo(hMargin,PlotBottom);

LineTo(PlotWinWidth-hMargin,PlotBottom);

MoveTo(hMargin,PlotBottom-(PlotData[0]-ymin)*yscale);

 for i:=1 to count-1 do

```

        LineTo(hMargin+i*xscale,PlotBottom-(PlotData[i]-ymin)*yscale);
        PlotTop:=PlotTop+PlotHeight;
    end;
nLanes:=0;
ResetCounter;
SetOptions('Area');
WandAutoMeasure(true);
AdjustAreas(true);
LabelParticles(true);
IncludeInteriorHoles(true);
SetFontSize(9);
SetText('Centered');
    if Uncalibrated
    then SetScale(0,'pixels')
    else SetScale(sqrt(xscale*yscale/ppv),'unit');
end;

Macro 'Mark First Lane [F1]'

begin
    Autoexec:=false;
    FirstLane;
end;

Macro 'Mark Next Lane [F2]'

begin
    NextLane;
end;

Macro 'Plot Lanes [F3]'

begin
    PlotLanes;
end;

Macro 'Autoexecute [F4]'

var
    left,top,width,height:real;
    LaneNumbers,Lane,LaneWidth,:real;
    myleft,mytop:real;

begin
    GetRoi(left,top,width,height);
    OldRoiLeft:=Left;
    OldRoiTop:=Top;
    OldRoiWidth:=width;
    OldRoiHeight:=height;
    Autoexec:=true;
    LaneNumbers:=GetNumber('How many lanes are marked',12);
    LaneWidth:=((Width/LaneNumbers));
    for Lane:=1 to LaneNumbers do begin
        if Lane=1 then begin
            MakeRoi(left+(LaneWidth*(Lane-1)),top,LaneWidth,height);
            FirstLane;
            myleft:=RoiLeft;
            mytop:=RoiTop;
        end else begin
            MakeRoi(myleft+(LaneWidth*(Lane-1)),mytop,LaneWidth,height);
            NextLane;
        end;
    end;
    end;
    PlotLanes;
    SelectPic(GelPid);
    MakeRoi (OldRoiLeft,OldRoiTop,OldRoiWidth,OldRoiHeight);
    ChoosePic(PlotsPid)
end;

```

9.5 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren in Mainz:

Baumann, Fischer, Huppmann, Loidl, Müller, Romer, Thews, Vollrath

Meine akademischen Lehrer waren in Marburg:

Arnold, Baum, Blankenburg, Eschenbach, Ganz, Gotzen, Gressner, Grzeschik, Griss, Habermehl, Happle, Hartmann, Huffmann, Kadenbach, Klenk, Koch, Legrum, Lennartz, Löffler, Löw, Müller, Netter, Oepen, Pohlen, Prinz, Riedmiller, Schulz, Thomas, Westphal, Zelder

Meine akademischen Lehrer waren in London:

Blau, Frackowiak, Marsden, Mathias, Quinn, Ron, Schapira, Trimble, Wood

Meine akademischen Lehrer waren in Giessen:

Damian, Kuchelmeister, Schachenmayr

9.6 Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Kadenbach möchte ich für die Themenstellung und die Betreuung dieser Arbeit herzlich danken.

Bei Frau Prof. Dr. Koch möchte ich mich für die Betreuung und Übernahme des Gutachtens bedanken.

Meinem damaligen Arbeitskreises möchte ich für die Unterstützung und das gute Arbeitsklima danken. Besonders erwähnen möchte ich dabei Frau Annette Reith, Frau Sandra Leist und Herrn Dr. Jörg Napiwotzki, die meine Arbeit geduldig auch in schweren Zeiten unterstützt haben. Herrn Dr. Jörg Napiwotzki möchte ich außerdem noch für die Durchsicht des Manuskriptes danken.

Herrn PD Dr. Maxwell Damian möchte ich für die Durchsicht des genetisch-medizinischen Teils des Manuskriptes und seine fachliche Unterstützung danken.

Meiner Familie möchte ich für die Unterstützung in jeder Hinsicht danken, besonders möchte ich noch meine Lebenspartnerin Alessandra Dolfetti wegen ihrer Geduld und Unterstützung erwähnen.