

**Einflussfaktoren auf den Isolationserfolg
von Mitochondrien
und
Analyse von einzelnen mitochondrialen
Partikeln**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

René Pflugradt

aus

Goch

Bonn (24.11.2010)

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. K. Olek
2. Gutachter: Prof. Dr. V. Knoop
Tag der Promotion: 22.11.2010
Erscheinungsjahr: 2010

2. 2. 5. 5. Herstellung von 1:1-Mischungen (murin/porcin) gefärbter Mitochondriensuspensionen	32
2. 2. 6. Mikroskopische Verfahren	33
2. 2. 6. 1. Hellfeldmikroskopie.....	33
2. 2. 6. 2. Fluoreszenzmikroskopie	33
2. 2. 6. 3. Konfokale Mikroskopie	33
2. 2. 6. 4. Elektronenmikroskopie (EM).....	34
2. 2. 7. Separationsmethoden.....	34
2. 2. 7. 1. Durchflusszytometrie	35
2. 2. 7. 1. 1. Vergleich verschiedener mitochondrialer Farbstoffe.....	35
2. 2. 7. 1. 2. Vergleich verschiedener Separationsmethoden	36
2. 2. 7. 1. 2. a. Suche nach den richtigen Einstellungen	36
2. 2. 7. 1. 2. b. Optimierte Einstellungen.....	37
2. 2. 7. 1. 3. Sonstige Versuche	38
2. 2. 7. 1. 3. a. Ablage von Lymphozyten	38
2. 2. 7. 1. 3. b. Ablage von Mitochondrien aus humanen Lymphozyten	38
2. 2. 7. 2. Laser-Mikrodissektion.....	39
2. 2. 7. 2. 1. Vergleich verschiedener Separationsmethoden	39
2. 2. 7. 2. 1.a. Suche nach den richtigen Einstellungen	39
2. 2. 7. 2. 1.b. Optimierte Einstellungen.....	39
2. 2. 7. 3. Optische Pinzette.....	40
2. 2. 7. 3. 1. Vergleich verschiedener Separationsmethoden	40
2. 2. 7. 3. 1. a. Suche und Optimierung der Einstellungen.....	40
2. 2. 8. PCR-basierte Methoden	41
2. 2. 8. 1. Verwendete Oligonukleotide	42
2. 2. 8. 2. Verwendete Thermocyclerprogramme.....	43
2. 2. 8. 3. humane mtDNA: PCR-Systeme	43
2. 2. 8. 3. a. L29/H381	44
2. 2. 8. 3. b. L162/H381.....	45
2. 2. 8. 4. humane nDNA: PCR-Systeme	45
2. 2. 8. 5. Agarosegelelektrophorese.....	46
2. 2. 8. 6. PCR Aufreinigungen	46
2. 2. 8. 7. mtDNA Sequenzierung	46
2. 2. 8. 7. 1. Mini-Sequenzierung	47
2. 2. 8. 8. Sequenzierungsaufreinigungen	47
2. 2. 8. 9. Automatische Sequenzierung und Fragmentanalysen.....	47
2. 2. 8. 10. DNA-Alinierung und Auswertung.....	47
2. 2. 8. 11. Sequenzanalyse.....	48
2. 2. 8. 11. a. Interspezies-Sequenzanalyse	48
2. 2. 8. 11. b. Intraspezies-Sequenzanalyse.....	49
2. 2. 8. 12. Realzeit Quantifizierung (qPCR)	49
2. 2. 9. Photo- und spektrometrische Messungen	50
2. 2. 9. 1. Photometrie	50
2. 2. 9. 2. Massenspektrometrie.....	50
2. 2. 10. Sonstige Versuche	51
2. 2. 10. 1. DNase Behandlung.....	51
3. Ergebnisse	52
3. 1. Isolation von Lymphozyten.....	52
3. 2. Mitochondrienisolationen	52
3. 2. 1. Verschiedene Ausgangsmaterialien	53
3. 2. 2. Medien zur Resuspension von Mitochondrien	54
3. 2. 3. Kontrollen zur Bestimmung der Reinheit der Mitochondriensuspensionen.....	56
3. 3. Mitochondrienfärbungen.....	58

3. 4. Vergleich verschiedener Separationsmethoden.....	61
3. 4. 1. FCM: Suche nach den richtigen Einstellungen	61
3. 4. 2. LCM: Suche nach den richtigen Einstellungen	62
3. 4. 3. OT: Suche nach den richtigen Einstellungen	63
3. 4. 4. Sequenz- und qPCR Analyse einzelner mitochondrialer Partikel	64
3. 5. Vergleich von Lymphozyten und Mitochondrien.....	68
3. 6. Methoden zur Analyse von Mitochondrien.....	69
3. 6. 1. Humane mtDNA: PCR-basierte Methoden.....	69
3. 6. 2. Sequenzanalyse – Allgemeines.....	72
3. 6. 3. qPCR – Allgemeines und Kontrollen	73
4. Diskussion	76
4. 1. Isolation von Lymphozyten	76
4. 2. Mitochondrienisolationen	76
4. 2. 1. Verschiedene Ausgangsmaterialien	78
4. 2. 2. Medien zur Resuspension von Mitochondrien	80
4. 2. 3. Reinheit der Mitochondrienisolate.....	81
4. 3. Mitochondrienfärbungen.....	83
4. 4. Vergleich verschiedener Separationsmethoden.....	86
4. 4. 1. FCM: Suche nach den richtigen Einstellungen	86
4. 4. 2. LCM: Suche nach den richtigen Einstellungen	87
4. 4. 3. OT: Suche nach den richtigen Einstellungen	88
4. 4. 4. Sequenz- und qPCR Analyse einzelner Mitochondrien	88
4. 5. Vergleich von Lymphozyten und Mitochondrien.....	92
4. 6. Methoden zur Analyse von Mitochondrien.....	93
4. 6. 1. humane mtDNA: PCR-basierte Methoden.....	93
4. 6. 2. Sequenzanalyse – Allgemeines und Kontrollen	95
4. 6. 3. qPCR – Allgemeines und Kontrollen	96
5. Zusammenfassung:.....	97
6. Danksagungen	98
7. Literatur.....	99
8. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen:	109

I Verzeichnis verwendeter Abkürzungen

Kürzel	Bedeutung
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
Brsq.	Breisgau
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
C _T	Cycle treshold
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid (Blaue Fluoreszenz)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxycytosintriphosphat
ddGTP	Didesoxyguanosintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukeosidtriphosphat
ddTTP	Didesoxythymidintriphosphat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCM	Durchflusszytometrie
FITC	Fluorescein-isothiocyanat (Grüne Fluoreszenz)
FSC	Forward-Scatter
g	Gramm, Erdbeschleunigung
HPLC	high performance liquid chromatography
i.d.	in der
inkl.	inklusive
JC-1	5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanin Jodid
kb	Kilobasen
LCM	Laser-Mikrodissektion

LCN	low copy number
LPC	Laser pressure catapulting
LV	low volume
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mtDNA	mitochondriale DNA
MTG	Mitotracker Green Fm
MTR	Mitotracker Red 580
NAO	Nonyl-Acridin-Orange
nDNA	nukleäre DNA
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
np	Nukleotidposition
OT	Optische Pinzetten
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin (Gelb-rote Fluoreszenz)
p9	Pikogramm
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
qPCR	realtime quantitative PCR
R1-R3	Sortierregionen 1-3
rfu	Relative Fluoreszenzintensität
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rotations per minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
s	Sekunde; siehe
s. o.	siehe oben
SSC	Side-Scatter
TBE	Tris, Borsäure, EDTA-Puffer
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Unit
V	Volt

vgl.	vergleiche
z. B.	Zum Beispiel

Tabelle 1: Liste aller verwendeten Abkürzungen

1. Einleitung

1. 1. Herkunft und Funktion von Mitochondrien

Nach der heute gängigen Endosymbiontentheorie stammen Mitochondrien ursprünglich von „frei“ lebenden Proteobakterien, welche durch Endozytose von prä-eukaryotischen Zellen aufgenommen wurden. Durch gegenseitigen Nutzen hat sich eine immer enger werdende intrazelluläre Symbiose eingestellt, wodurch die Mitochondrien heute fester Bestandteil der eukaryotischen Zelle sind. Eine gute Zusammenfassung findet sich bei Martin et al. (2001).

Die Mitochondrien sind Träger der Enzyme der Atmungskette und erzeugen im Zuge der oxidativen Phosphorylierung den Großteil der zellulären Energie in Form von ATP. Zusätzlich haben sie weitere wichtige biologische Funktionen und sind am Intermediärmetabolismus, an der Calciumvermittlung und der Apoptose beteiligt (Chan 2006a).

1. 2. mtDNA

Im Zuge der Co-Evolution von Mitochondrien und ihren Wirtszellen hat ein Transfer zwischen den Genomen des Mitochondriums und des Zellkerns stattgefunden. Ein beträchtlicher Teil der Gene des Mitochondriums wurde ausgelagert und in die nukleäre DNA (nDNA) integriert (z. B. Timmis et al. 2004). Nichtsdestotrotz haben die Mitochondrien bis heute ein autonomes, sich selbst replizierendes Genom behalten:

Eine zirkuläre DNA, die bei den Mammalia ca. 16 kb groß ist. Neben verschiedenen Genen der Atmungskette, werden auf ihr r- und tRNA-Gene kodiert, wie z. B. die 12s rRNA (s. Abb. 1).

Die mtDNA ist in Nukleoiden organisiert, durch die sie an die innere Membran gebunden ist (Wang und Bogenhagen 2006). Die Nukleoide sind dabei intra-organelle Organisationsformen von Protein-DNA Komplexen (z. B. Garrido et al. 2003). Man geht davon aus, dass 2–10 mtDNA Genome Bestandteil eines Nukleoids sind (Iborra et al. 2004, Legros et al. 2004).

Mit der Energieproduktion einhergehend kommt es zur vermehrten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies. Unter anderem ist dadurch die Mutationsrate der mtDNA im Vergleich zur nDNA erhöht (z. B. Wei et al. 2009). In der Kontrollregion, die den Replikationsursprung des schweren Stranges enthält, kommen drei nicht kodierende, hypervariable Regionen vor. In diesen Bereichen können Mutationen besonders stark akkumulieren, da diese keinem Selektionsdruck ausgesetzt sind. Diese Tatsache sorgt in diesen Bereichen, sowohl zwischen verschiedenen Arten als auch innerhalb einer Art, für eine hohe Varianz der Basenzusammensetzung. Insbesondere die Unterschiede zwischen verschiedenen nicht

mütterlich verwandten Individuen und Ethnien machen diesen Bereich für die forensische Genetik interessant.

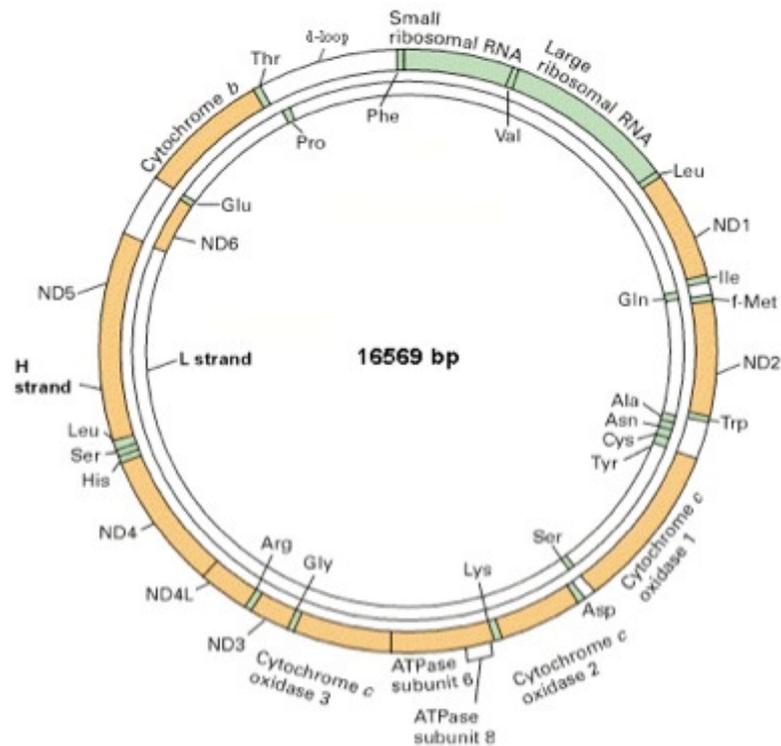


Abbildung 1: Das humane mitochondriale Genom. In Grün sind Gene dargestellt, die für funktionelle RNAs kodieren.

1. 3. Nutzen der mtDNA für die forensische Genetik und biologische Forschung

Das wichtigste Aufgabengebiet der forensischen Genetik ist die Untersuchung von biologischen Spuren und deren Zuordnung zu Personen. Eine gängige und hoch aussagekräftige Methode ist dabei die STR- (Short Tandem Repeat) Analyse. STRs sind variable, nicht codierende DNA-Bereiche, die sich auf der nDNA befinden. Da biologische Spuren aber oft nur wenig nDNA enthalten, ist die Analyse von mtDNA auf Grund einer höheren Kopienanzahl pro Zelle (mtDNA) vielversprechender (Budowle et al. 2003). Während man in jeder diploiden Zelle nur zwei nDNA Kopien vorfindet, sind demgegenüber hundert bis tausende mtDNA Kopien vorhanden (Robin und Wong 1988). Die mtDNA Analyse ist aus diesem Grund auch in der Erforschung von DNA mit langer Lagerungszeit ein wertvolles Werkzeug (Ho und Gilbert 2010).

Bei den meisten Mammalia, so auch beim Menschen, wird die mtDNA rein maternal vererbt, so dass eine Mischung mit paternaler mtDNA, beispielsweise in Form einer Rekombination, nicht

stattfindet (z. B. Pakendorf und Stoneking 2005). Die mtDNA ändert sich folglich über Generationen hinweg nur auf Basis der Mutationsrate und eignet sich daher entlang der maternalen Linie besonders für Abstammungs-begutachtungen von unvollständigen Generationen und historischen Personen (z. B. Coble et al. 2009). Auch aus evolutionsbiologischer Sicht ist die mtDNA interessant, da ihre Analyse direkte Rückschlüsse auf den maternalen Ursprung phylogenetischer Ereignisse zulassen kann (z. B. Janssen et al. 2002). Bedingt durch die maternale Vererbung ist die mtDNA dagegen ungeeignet für Vaterschaftsanalysen und die Differenzierung von maternal verwandten Personen.

1. 4. Heteroplasmie

Früher ging man davon aus, dass normalerweise alle mtDNA Moleküle innerhalb eines Individuums gleich sind, also eine Homoplasmie vorliegt (Monnat und Reay 1986). Auf Grund der hohen Anzahl von mtDNA Molekülen, der hohen Mutationsrate der mtDNA (vgl. Pakendorf und Stoneking 2005) und weniger ausgeprägter Reparatur-systeme (Bogenhagen 1999) ist jedoch anzunehmen, dass es zeitlebens zu einer Anhäufung von Mutationen in der mtDNA kommt. Ist mehr als ein mtDNA-Haplotyp in einem Organismus vorhanden, spricht man von Heteroplasmie. Heteroplasmie kann von einer mütterlichen Generation auf die nächste vererbt werden. Dabei kann das Ausmaß der Heteroplasmie zwischen den Generationen enorm variieren (z. B. Sekiguchi et al. 2003). Deshalb geht man davon aus, dass nur wenige Mitochondrien am Aufbau der Mitochondrienpopulation der nächsten Generation beteiligt sind. Diese Theorie wird als mitochondrialer Flaschenhalseffekt bezeichnet. Sie wurde erstmals von Ashley et al. (1989) postuliert, um den schnellen Wechsel von Heteroplasmieverhältnissen zwischen maternal verwandten Generationen bei Kühen zu erklären. Sowohl das genaue Stadium (z. B. Poulton und Marchington 2002) als auch die Größe des Flaschenhalses (z. B. Lutz-Bonengel et al. 2008a) sind unklar und Gegenstand der aktuellen Forschung.

Obwohl bei den meisten Taxa ein maternaler Mechanismus der mtDNA-Vererbung vorherrscht, hat man in den letzten Jahren mehrere Spezies gefunden, bei denen eine biparentale Vererbung stattfindet (z. B. Weihe et al. 2009, Jannotti-Passos et al. 2001). Zudem kann es auch bei der maternalen Vererbung zu einem sogenannten „paternal leakage“ kommen (z. B. Kvist et al. 2003). Dabei gelangt paternale mtDNA auf bisher nicht abschließend geklärte Weise in die nächste Generation. White et al. (2008) bietet dazu eine aktuelle Zusammenfassung. Sowohl eine biparentale Vererbung als auch ein „paternal leakage“ führen zu einer heteroplasmatischen Mitochondrienpopulation der Zygote.

Es gibt zwei Arten von Heteroplasmie – die Sequenz- und die Längenheteroplasmie (Bendall und Sykes 1995, Bendall et al. 1996, Marchington et al. 1997). Bei der Sequenzheteroplasmie unterscheidet sich die Basenzusammensetzung an einer bestimmten Position, wodurch bei einer Direktsequenzierung eine Überlagerung der Basen an der entsprechenden Stelle zu erkennen ist. Bei einer Längenheteroplasmie tritt in einem Haplotyp eine Deletion oder Insertion (InDel) auf. Bei einer Sequenzierung kommt es dadurch ab der InDel-Position zu Überlagerungen der nachfolgenden Peaks.

Der Grad an Heteroplasmie kann zwischen verschiedenen Geweben eines Individuums stark variieren (Sekiguchi et al. 2003). Bislang geht man davon aus, dass eine zufällige Segregation von Mitochondrien bei der Zellteilung für dieses Phänomen verantwortlich ist. Im Zuge von Heteroplasmieforschung konnte gezeigt werden, dass der Begriff der Heteroplasmie nicht nur auf ganze Organismen oder Gewebe anzuwenden ist, sondern dass auch einzelne Zellen in einem heteroplasmatischen Zustand vorliegen können (Lutz-Bonengel et al. 2008b).

Trotz der erzielten Fortschritte bestehen immer noch viele offene Fragen und Unklarheiten in Bezug auf Entstehung, Verteilung und Häufigkeit von Heteroplasmie in einem Organismus.

1. 5. Definition von einzelnen Mitochondrien

Ein „einzelnes Mitochondrium“ ist schwer zu definieren, da die Mitochondrien innerhalb der Zelle nicht als diskrete Organellen fungieren. Sie sind über das Zytoskelett verbunden und verhalten sich als Netzwerk, das durch Zusammenlagerungs- und Teilungsprozesse reguliert wird (z. B. Hayashi et al. 1994, Bereiter-Hahn et al. 2008, Chan 2006b, Chen und Chan 2009, Kuznetsov et al. 2009, Meeusen und Nunnari 2005). Je nach Status der Zelle können die Mitochondrien lange tubuläre Strukturen ausbilden oder als fragmentierte, globuläre Gebilde erscheinen.

Wegen dieser Problematik ist es zudem schwer, die Anzahl von mtDNA Kopien innerhalb von Mitochondrien zu bestimmen. Häufig wird deshalb die Anzahl von Kopien pro μm Mitochondrium berechnet (z. B. Iborra et al. 2004).

In dieser Arbeit wird der Begriff des „einzelnen Mitochondriums“ für diskrete, sphärische mitochondriale Strukturen verwendet, die in Folge der angewendeten Isolationstechnik entstehen. Mit „einzelnen mitochondrialen Partikeln“ sind „einzelne Mitochondrien“ gemeint, die nach der Isolation mit unterschiedlichen Methoden separiert (s. 1. 11.) und abgelegt wurden.

Bei einem Versuch, die Anzahl von mtDNA-Kopien innerhalb einzelner mitochondrialer Partikel zu bestimmen, konnten Cavelier et al. (2000) und Navratil et al. (2007) zwischen 0-22 mtDNA Moleküle pro Partikel identifizieren.

1. 6. Warum einzelne Mitochondrien analysieren?

Die Erforschung der Heteroplasmie ist für die forensische Genetik von besonderer Bedeutung. Erst durch ein umfassendes Verständnis dieses Phänomens kann die statistische Aussagekraft von mtDNA-Analysen abgeschätzt werden. Da einzelne mitochondriale Partikel mehrere mtDNA Genome beinhalten können und somit Heteroplasmien möglich sind (s. 1. 4.), ist die Erforschung der mtDNA auf Niveau des einzelnen Mitochondriums die nächste Hürde, die genommen werden muss.

Die Möglichkeit zur Analyse von einzelnen Mitochondrien ist nicht nur aus forensischer Sicht interessant. Viele Krankheiten lassen sich auf Mutationen der mtDNA zurückführen, wobei diese innerhalb von Individuen in heteroplasmatischer Form vorliegen. Die Anzahl der mutierten mtDNA Genome kann im Laufe des Lebens zunehmen. Ist eine kritische Menge überschritten, tritt das Krankheitsbild in Erscheinung (Sproule und Kaufmann 2008). Da die mtDNA hauptsächlich Gene der Atmungskette beinhaltet, verwundert es nicht, dass pathogene Mutationen der mtDNA überwiegend mit Nerven- und Muskelerkrankungen assoziiert sind (Chan 2006a). Da Minorkomponenten bei einer Direktsequenzierung erst erkannt werden, wenn sie 10–20% der gesamten Templatmenge ausmachen (Lynch et al. 2001), bleiben pathogene mtDNA Mutationen oft für lange Zeit unentdeckt. Wenn man im Durchschnitt von ca. fünf mtDNA Kopien pro Mitochondrium ausgeht (Sato und Kuroiwa 1991), wobei der Begriff eines einzelnen Mitochondriums umstritten ist (s. 1. 5.), kann durch die mtDNA Analyse von einzelnen Mitochondrien bereits ein einzelnes „pathogenes Genom“ erkannt werden. Die Analyse von einzelnen Mitochondrien kann dementsprechend die Früherkennung von verschiedenen Krankheiten erheblich beschleunigen. Weiter könnte eine statistische Mutationsanalyse einzelner Mitochondrien helfen, die für die Phylogenetik wichtige Mutationsrate genauer zu bestimmen. Dadurch wäre es möglich, evolutionsbiologische Vorgänge exakter zu datieren.

1. 7. Schwierigkeiten bei der Analyse von einzelnen Mitochondrien

Eine große Herausforderung bei der mtDNA-Analyse von einzelnen Mitochondrien liegt in der Separierung und Ablage einzelner Mitochondrien. Um die Heteroplasmieforschung effektiv

und sinnvoll auf Ebene von einzelnen Mitochondrien betreiben zu können, muss sichergestellt sein, dass wirklich nur ein Mitochondrium abgelegt wird. Kontaminationen, entweder durch freie, extramitochondriale mtDNA oder durch eine Co-Ablage mehrerer Mitochondrien, müssen dabei verhindert werden.

Es stehen mehrere potenzielle Techniken für die Separation von Mitochondrien zur Auswahl (s. 1.11.).

1. 8. Bisherige Analysen von mtDNA aus (Einzel)-Mitochondrien

Kuroiwa et al. (1996) versuchten erstmals mtDNA aus einzelnen Mitochondrien zu amplifizieren. Zuvor wurden diese durch eine Kombination aus LCM (*Laser Capture Microdissection*: Laser-Mikrodissektion) und OT (*Optical Tweezers*: Optische Pinzetten) separiert. Dabei gelang es, Amplikons aus kleinen Gruppen von Mitochondrien zu erzeugen.

Cavellier et al. (2000) separierten Mitochondrien mittels FCM (*Flow Cytometry*: Durchflusszytometrie). Dabei fanden sie 25% heteroplasmatische Partikel, die mit Hilfe einer Hybridisierungsmethode analysiert wurden. In einer weiteren Studie zeigten Deckmann et al. (2008) das Vorhandensein von Heteroplasmie in einzelnen mitochondrialen Partikeln. Hierbei wurden die Mitochondrien durch eine OT aus einzelnen Zellen separiert. Der analytische Beweis, dass tatsächlich einzelne Mitochondrien kontaminationsfrei analysiert wurden, steht bislang jedoch noch aus.

1. 9. Isolation von Mitochondrien

Der Begriff der Mitochondrienisolation wird in dieser Arbeit für die präparative Freisetzung der Mitochondrien aus den Zellen und die anschließende Abtrennung dieser Organellen von anderen Zellkompartimenten verwendet. Bei der Isolation können Mitochondrien je nach osmotischem Druck des Isolationsmediums morphologische Veränderungen erfahren. Bei der Verwendung von 0,25M Sucrose im Isolations- oder Resuspensionsmedium entstehen Mitochondrien mit sphärischer, fragmentierter Gestalt (Muscatello et al. 1972). Es ist davon auszugehen, dass isolierte Mitochondrien also nicht dem Gesamtnetzwerk in lebenden Zellen entsprechen.

Dennoch hat die Isolation der Mitochondrien dahingehend Vorteile, dass durch die selektive Präparation der Mitochondrien mögliche Kontaminanten, wie etwa Zellen oder nDNA weitgehend ausgeschlossen werden.

Bei den meisten Techniken zur Mitochondrienisolation werden die Zellen mechanisch mit Hilfe verschiedener Methoden aufgebrochen. Ein weiterer Schritt ist dann eine differentielle Zentrifugation (Schneider 1948). Die differentielle Zentrifugation nutzt dabei das unterschiedliche Sedimentationsverhalten von Zellorganellen bei unterschiedlichen Zentrifugalkräften aus, um diese voneinander zu trennen. Um die Mitochondrienfraktion weiter aufzureinigen, werden häufig Ultrazentrifugationen in verschiedenen Dichtegradienten durchgeführt (z. B. Martinez et al. 1997).

Mittlerweile gibt es zahlreiche kommerziell erwerbliche Kits zur Isolation von Mitochondrien.

1. 10. Mitochondrienfärbungen

Auf Grund der geringen Größe von Mitochondrien (0,5–5µm Durchmesser, Whittaker und Danks 1978) können diese bei vielen Methoden in ihrem nativen Zustand optisch nicht detektiert werden und sind der Analyse erst zugänglich, wenn sie mit einem spezifischen Farbstoff angefärbt wurden.

Mitochondrienspezifische Farbstoffe machen sich verschiedene Eigenschaften zu Nutze, die charakteristisch für Mitochondrien sind. Da es eine große Anzahl solcher Farbstoffe gibt, werden hier nur diejenigen erwähnt, die in dieser Arbeit Anwendung finden.

10-N-nonyl-Acridin-Orange (NAO) bindet an Cardiolipine (Gallet et al. 1995). Cardiolipine sind Phospholipide, welche hauptsächlich in der inneren Membran von Mitochondrien gefunden werden (Daum 1985). NAO hat ein Absorptions-/ Emissionsmaxima bei 495/525 nm. Dieser Farbstoff wurde beispielsweise in der Durchflusszytometrie verwendet, um einzelne Mitochondrien abzulegen (Cavelier et al. 2000).

5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyaninjodid (JC-1) besitzt eine delokalisierte positive Ladung. Durch das negative Membranpotenzial aktiver Mitochondrien werden JC-1 Moleküle in den Mitochondrien akkumuliert. In wässriger Lösung tritt der Farbstoff als Monomer auf (Absorption/Emission: 490/527 nm). Bei hoher Konzentration des Farbstoffs in den Mitochondrien bildet JC-1 Aggregate. Diese Aggregate haben ein verändertes Emissionsmaximum (590 nm), wodurch gefärbte Mitochondrien rot fluoreszieren (Reers et al. 1991). Dieser Farbstoff wurde in der Durchflusszytometrie verwendet, um das Membranpotenzial von Mitochondrien zu messen (z. B. Cossarizza et al. 1993).

Zwei verschiedene Mitotracker-Farbstoffe kamen zum Einsatz: Mitotracker red 580 (581/644 nm) und Mitotracker green (490/516 nm). Mitotracker green ist ein Substrat von P-Glykoprotein (Marques-Santos et al. 2003) und färbt Proteinkomponenten, die in Mitochondrienfraktionen gefunden werden (Presley et al. 2003). Dieser Farbstoff wurde in der

Durchflusszytometrie zur Analyse von Mitochondrien verwendet (Teranishi et al. 1999, Wakabayashi et al. 2000).

Mitotracker red 580 diffundiert passiv durch die Zellmembran und akkumuliert in aktiven, vitalen Mitochondrien (Feng et al. 2005). Dieser Farbstoff wurde insbesondere für mikroskopische Analysen verwendet (z. B. Luo et al. 2009).

1. 11. Methoden zur Separation von Mitochondrien

Der Begriff der Separation beschreibt in dieser Arbeit das Abtrennen einzelner Mitochondrien aus Mitochondriensuspensionen, die im Zuge der Mitochondrienisolation erzeugt werden.

Die vorgestellten Methoden wurden mit dem Ziel verwendet, einzelne Mitochondrien separiert voneinander abzulegen. Drei verschiedene Separationsmethoden kamen zur Anwendung: Die FCM, die LCM und ein spezieller Aufbau der OT.

1. 11. 1. Durchflusszytometrie (FCM)

Bei der FCM werden die zu untersuchenden Partikel durch einen feinen Flüssigkeitsstrahl transportiert. In einer so genannten Messkammer wird dieser Strahl von einem Laser bestrahlt. Trifft der Laser auf ein Partikel, wird dessen Licht gebrochen. Die Veränderungen des Laserlichtes werden von verschiedenen Detektoren registriert. Auf diese Weise können Parameter eines Partikels festgehalten werden. Zu diesen Parametern gehören unter anderem der Forward-Scatter (FSC) und der Side-Scatter (SSC). Der FSC ist ein Maß für die Größe eines Partikels, während der SSC durch die innere Struktur eines Partikels bestimmt wird. Des Weiteren können viele Durchflusszytometer Emissionen von spezifischen Fluoreszenzsignalen messen, die durch den Laser angeregt werden. Durch die Kombination der verschiedenen Streusignale und Messung von Fluoreszenzen lassen sich verschiedene Partikel über ihre Eigenschaften differenzieren. Alle Parameter werden in sogenannten Dotplots festgehalten. Jeder Punkt (dot) spiegelt dabei die Eigenschaft eines Partikels wieder. Wir haben mit einem Durchflusszytometer gearbeitet, welches neben der Messung verschiedener Parameter und Fluoreszenzsignale in der Lage ist, einzelne Partikel getrennt voneinander zu sortieren und abzulegen. Dazu wird der Flüssigkeitsstrahl, nachdem er vom Laser abgetastet worden ist, in kleine Tröpfchen zerlegt. Der Tropfen, in dem sich ein spezielles Partikel befindet, kann durch statische Aufladung so abgelenkt werden, dass er an einer vorher definierten Stelle abgelegt wird. In dieser Arbeit wurden die Tröpfchen in PCR-Plattformen, insbesondere 96-Well-Platten, abgelegt.

Die FCM ist ein bedeutendes Werkzeug der quantitativen Analyse und Ablage von Partikeln und daher eine etablierte Methode bei vielen biologischen Anwendungen. Zusammenfassungen bieten z. B. Comas-Riu und Rius (2009) oder Czechowska et al. (2008). In der mitochondrialen Forschung kommt die FCM häufig bei der Analyse von isolierten Mitochondrien zur Anwendung. Es wurden beispielsweise Parameter wie die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (z. B. Wakabayashi 2000) oder das Membranpotenzial (z. B. Cazzalini et al. 2001) untersucht. Eine Zusammenfassung über FCM-basierende Analysen von Mitochondrien geben Medina et al. (2002) und Fuller und Arriaga (2003). Mit dem Ziel, die mtDNA-Zusammensetzung von Mitochondrien zu analysieren, wurde die FCM bereits zur Separierung von Mitochondrien eingesetzt (Cavelier et al. 2000).

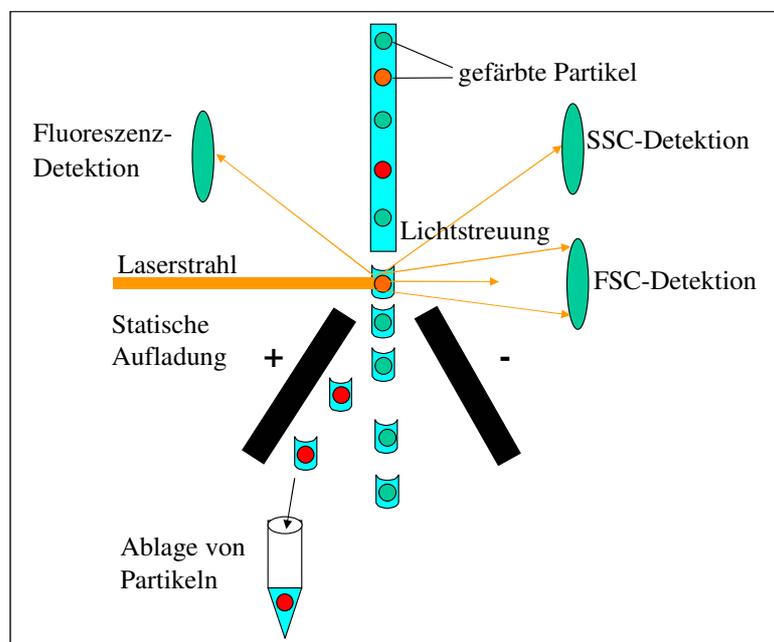


Abbildung 2: Schematische Funktionsweise der FCM

1. 11. 2. Laser-Mikrodissektion (LCM)

Die LCM wird verwendet, um spezielles Gewebe, Zellen oder andere Strukturen unter optischer Kontrolle durch einen fokussierten Laserstrahl auszuschneiden und getrennt voneinander abzulegen (Edwards 2007). In der mitochondrialen Forschung wurde die Technik bereits erfolgreich eingesetzt, um mtDNA aus Krebsgewebe (z. B. Aldridge et al. 2003) oder aus einzelnen Zellen zu analysieren (Kraytsberg et al. 2009).

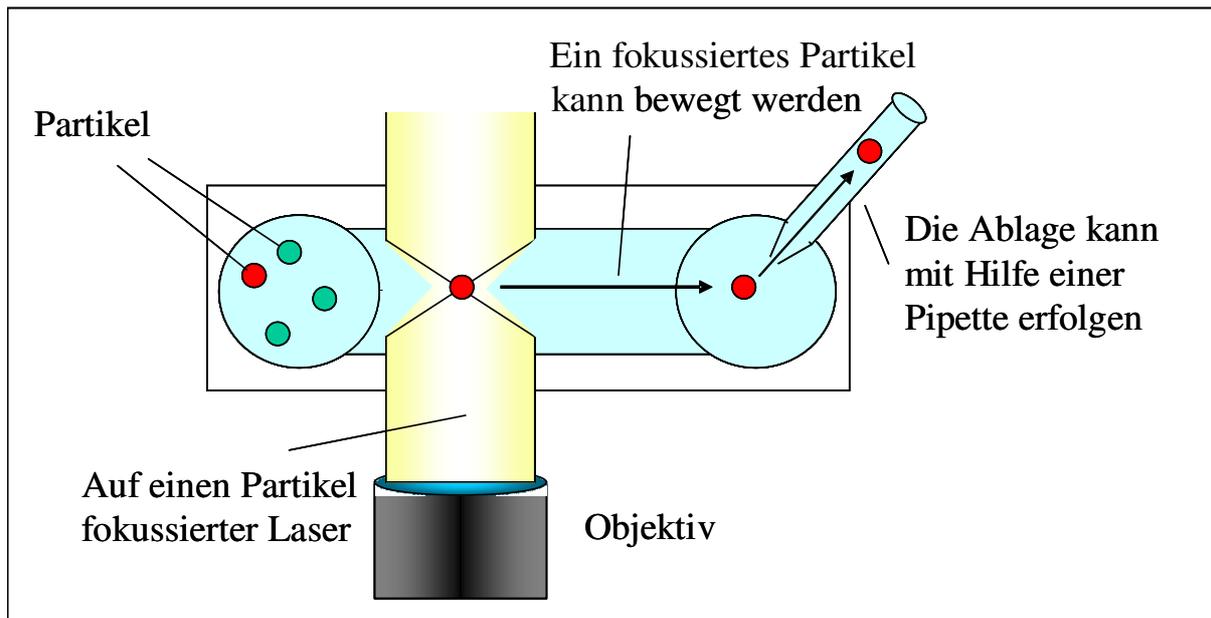


Abbildung 4: Schematische Funktionsweise der OT. Es ist ein Aufbau in Kombination mit dem 1µl-Ibi treat-slide (Ibidi, Martinsried, Deutschland) eingezeichnet.

1. 12. Methoden zur Analyse der mtDNA

Nach der Separierung von Mitochondrien soll mittels analytischer Verfahren die erfolgreiche Ablage einzelner Mitochondrien geprüft werden. Diese Verfahren sind die Sequenzanalyse und die Realtime-PCR (qPCR). Die Sequenzanalyse setzt sich aus einer PCR und einer nachfolgenden Sequenzierung zusammen.

1. 12. 1. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Das Prinzip der PCR wurde erstmals 1986 von Mullis et al. (1986) vorgestellt. Dabei kann ein Bereich der DNA durch zwei gegenläufige Oligonukleotide, unter Verwendung einer thermostabilen Polymerase, spezifisch amplifiziert werden. Diese Technik war ein Meilenstein in der biologischen Forschung. Mit ihrer Hilfe werden DNA-Fragmente so stark vermehrt, dass diese in Folgeanalysen detektiert werden können.

1. 12. 2. Low copy number (LCN)- und low volume (LV)-PCR

Wenn in eine PCR weniger als 200 pg nDNA eingesetzt werden, spricht man von *low copy number*-PCR (Caddy et al. 2009). Geht man davon aus, dass 6 pg DNA dem Gesamtgehalt einer diploiden Zelle entsprechen (Aerssens et al. 2001), kommt dies einer Kopienmenge von ca. 65 Template-DNAs gleich. Die Amplifizierung von mtDNA Fragmenten einzelner mitochondrialer Partikel muss ebenfalls als LCN-PCR definiert werden, da innerhalb dieser Partikel mit nur 0–22 mtDNA Kopien gerechnet werden muss (Cavelier et al. 2000, Navratil et al. 2007).

Um LCN-PCRs erfolgreich durchführen zu können, sind besondere Strategien zu berücksichtigen. Eine Verringerung des PCR-Volumens ist besonders vielversprechend. Dadurch kann eine Steigerung der Sensitivität und Effizienz erreicht werden (Schmidt et al. 2006, Lutz-Bonengel et al. 2007). In der Fachliteratur bedeutet LV, dass ein maximales Reaktionsvolumen von 2 μ l für den PCR-Ansatz verwendet wird (Schmidt et al. 2006, Lutz-Bonengel et al. 2007).

In dieser Arbeit wurden Reaktionsansätze von 1–5 μ l benutzt. Bei 1 μ l Reaktionen wurde ein chemisch strukturierter Chip (AmpliGrid) verwendet (s. Abb. 5), der bereits bei Schmidt et al. (2006) und Lutz-Bonengel et al. (2007) erfolgreich eingesetzt wurde.

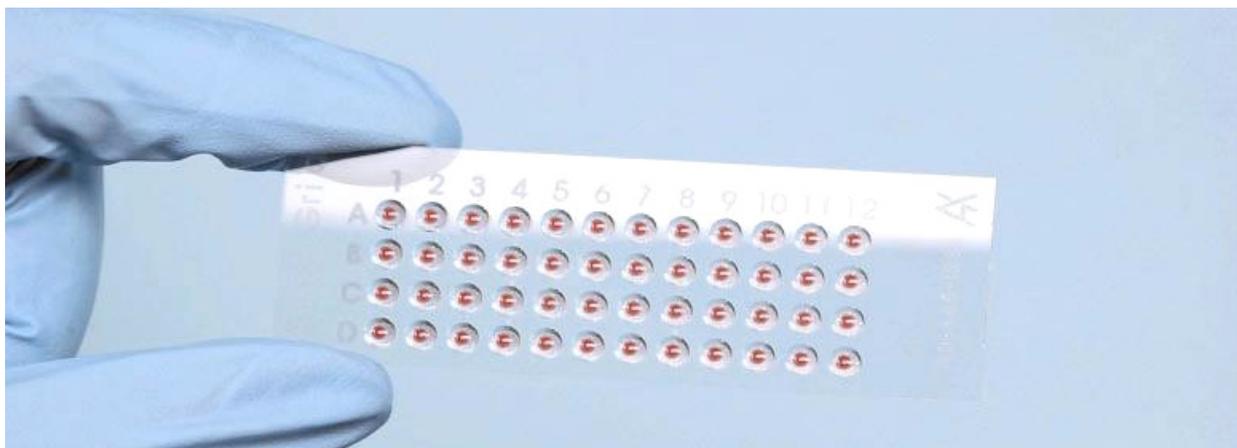


Abbildung 5: Chemisch strukturierter PCR-Chip (AmpliGrid, Brunthal, Deutschland). Der Chip bietet 48 *low volume* (LV) Reaktionsräume (anchor spots). Zur besseren Visualisierung wurde 1 μ l einer rot schimmernden Substanz in jeden Spot vorgelegt.

Der Chip beinhaltet Reaktionsräume, die durch eine hydrophobe Umrandung abgegrenzt sind. Für 5 μ l Reaktionen wurden 96-Well-Platten verwendet, die nicht speziell für *low volume* Ansätze konzipiert wurden.

1. 12. 3. Realtime-PCR (qPCR)

Mit dieser Methode kann während der PCR nachvollzogen werden, in welchem Umfang PCR-Produkte gebildet werden. Durch einen Thermocycler werden während der PCR Fluoreszenzintensitäten aufgezeichnet, die ein Maß für die momentan vorhandene DNA-Menge darstellen. Mittlerweile sind viele verschiedene Techniken dazu verfügbar. In dieser Arbeit wurde SYBR green als Fluoreszenzfarbstoff gewählt. SYBR green interkaliert in doppelsträngige DNA und beginnt dadurch ein Fluoreszenzsignal von 520 nm zu emittieren. Das Realtime-Gerät misst die Fluoreszenzintensitäten am Ende der Elongationsphase, bei der das gesamte PCR-Produkt in doppelsträngiger Form vorliegt. Am Ende einer qPCR können C_T -Werte (Cycle Threshold) berechnet werden. Diese Werte beschreiben, in welchem Zyklus sich die spezifische Fluoreszenz um ca. das Zehnfache vom Hintergrundrauschen unterscheidet und das PCR Produkt exponentiell vermehrt wird (Wong und Medrano 2005). Je höher der C_T -Wert, also je später ein Produkt exponentiell gebildet wird, desto weniger DNA ist enthalten.

1. 12. 4. Sequenzierung

Die Didesoxymethode wurde von Sanger und Coulson (1975) entwickelt. Das Prinzip beruht auf einer DNA-Polymerase katalysierten Reaktion, bei der einzelsträngige DNA mittels eines spezifischen Oligonukleotids durch den Einbau von dNTPs verlängert wird. Neben den dNTPs sind in der Reaktion anteilig auch ddNTPs enthalten. Diese Nukleotide besitzen am 3'-Ende keine Hydroxygruppe. Nach dem Einbau dieser Nukleotide kommt es zu einem Kettenabbruch, weshalb diese Methode als Kettenabbruchmethode bezeichnet wird. Durch ein mehrfaches Wiederholen der enzymatischen Reaktion kommt es statistisch gesehen dazu, dass Fragmente aller möglichen Längen entstehen. Durch die Verwendung von Fluoreszenzmarkierungen, mit denen die vier verschiedenen ddNTPS (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) spezifisch markiert sind, können bei der automatischen Sequenzierung alle Fragmente in einem Lauf detektiert und die Basenabfolge des analysierten DNA Abschnittes rekonstruiert werden.

Bei der Minisequenzierung reicht ein Oligonukleotid genau an eine zu untersuchende Position einer Sequenz heran. Als Bausteine stehen ausschließlich ddNTPS zur Verfügung, weshalb der Primer nur um eine Base verlängert werden kann. Durch spezifisch gefärbte ddNTPS kann bei der automatischen Sequenzierung die Base an der entsprechenden Position bestimmt werden.

1. 13. Fragestellung

Ziele dieser Arbeit waren:

- 1) Die Parameter der Mitochondrienpräparation zu optimieren, so dass die Mitochondrien in ausreichender Qualität für eine anschließende Separation zur Verfügung stehen. Untersuchte Einflussfaktoren waren dabei die Art des Ausgangsgewebes, die Mitochondrienisolationstechnik, verschiedene Medien zur Resuspension der Mitochondrien und die Verwendung unterschiedlicher Farbstoffe.
- 2) Eine Methode zu finden, die für die Separation und Ablage von einzelnen Mitochondrien geeignet ist.
- 3) Eine Technik zu etablieren, mit der man die erfolgreiche Ablage von einzelnen Mitochondrien nachweisen kann.
- 4) Methoden anzuwenden, die eine Analyse von humaner mtDNA auf dem Niveau einzelner Mitochondrien ermöglichen.
- 5) Kontrollen zu implementieren, um die Qualität der Ergebnisse einschätzen zu können.

2. Material und Methoden

2. 1. Materialien

2. 1. 1. Biologisches Material

Für die Mehrheit der Versuche wurden Mitochondrienisolate aus der Leber von Mäusen (*Mus musculus*) oder Schweinen (*Sus scrofa*) verwendet. Dabei wurden die Mitochondrien aus 0,06–0,5 g Lebergewebe isoliert (vgl. 2.2.2.3.a. und 2.2.2.4.). Zum Einsatz kam ausschließlich frisches Lebergewebe, das den Tieren direkt nach dem Tod entnommen wurde. Dabei wurde das Gewebe sofort in PBS oder Storage-Puffer (Qiagen) überführt und auf Eis gekühlt. Die Mäuseleber wurde von der Tierhaltung der Universität Freiburg und die Schweineleber vom Schlachthof Färber (Freiburg im Brsg.) zur Verfügung gestellt.

Für Mitochondrienisolationen aus Lymphozyten wurde frisches humanes oder murines Blut verwendet. Das humane Blut wurde von Mitarbeitern des Instituts für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Freiburg gespendet.

DNA-Isolationen wurden mit murinem Blut aus der Tierhaltung (s. o.) durchgeführt.

2. 1. 2. Chemikalien, Kits und Enzyme

Material	Hersteller	Firmensitz
AmpliTaQ Gold	Applied Biosystems	Carlsbad, CA, USA
BigDYE V1.1 Sequencing Kit	Applied Biosystems	Carlsbad, CA, USA
Blood Mini Kit	Qiagen	Hilden, Deutschland
Borsäure	J.T. Baker	Groß-Gerau, Deutschland
Bromphenol-Blau	Merck	Darmstadt, Deutschland
Chemikalien für die Elektronenmikroskopie	verschiedene	verschieden
Dye Ex 96 kit	Qiagen	Hilden, Deutschland
DyeEx 1.2	Qiagen	Hilden, Deutschland
EDTA	Serva	Heidelberg, Deutschland
Ethanol	Sigma Aldrich	St. Louis, MO, USA
Ethidiumbromid	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
ExoSAP-IT	USB	Cleveland, OH, USA
Glycerin	Sigma Aldrich	St. Louis, MO, USA

HPLC- H2O	VWR	Darmstadt, Deutschland
JC-1	Sigma Aldrich	St. Louis, MO, USA
Leucosep-Röhrchen	Greiner Bio-one	Kremsmünster, Österreich
Mitochondria-Isolation Kit for Eucaryotic Cells	Pierce	Rockford, IL, USA
MOPS	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
MS850 Mitochondria Isolation Kit for Tissue	Mitoscience	Eugene, OR, USA
MTG	Invitrogen	Carlsbad, CA, USA
MTR	Invitrogen	Carlsbad, CA, USA
NAO	Invitrogen	Carlsbad, CA, USA
PMSF	Genaxxon	Ulm Deutschland
Power SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems	Carlsbad, CA, USA
ProLong Gold	Invitrogen	Carlsbad, CA, USA
Proteaseinhibitor	Pierce	Rockford, IL, USA
Qproteome Mitochondria Isolation Kit	Qiagen	Hilden, Deutschland
SAP	Roche	Mannheim, Deutschland
SNaPshot Multiplex	Applied Biosystems	Carlsbad, CA, USA
Sucrose	Genaxxon	Ulm Deutschland
Sybr Safe DNA gel stain	Invitrogen	Carlsbad, CA, USA
Tris	Sigma Aldrich	St. Louis, MO, USA
Trypanblau	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
TURBO DNA-free	Ambion	Foster City, CA, USA
Xylenxyanol	Sigma Aldrich	St. Louis, MO, USA

Tabelle2: Liste aller verwendeten Chemikalien, Enzyme und Kits

2. 1. 3. Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
Bromphenolblau-Ladepuffer	50% Glycerin, 0,1% Bromphenolblau
Disruptionpuffer	(Qiagen) Zusammensetzung unbekannt
Isolationpuffer	(Mitoscience) Zusammensetzung unbekannt
Lysispuffer	(Qiagen) Zusammensetzung unbekannt
PBS	DPBS (Invitrogen; genaue Zusammensetzung unbekannt)

Reagenz A	(Pierce) Zusammensetzung unbekannt
Reagenz B	(Pierce) Zusammensetzung unbekannt
Reagenz C	(Pierce) Zusammensetzung unbekannt
Storage-Puffer	(Qiagen) Zusammensetzung unbekannt; Mannose enthalten
Sucrose-Puffer	0,25 M Sucrose, 1mM PMSF, 10 mM MOPS, 1 mM EDTA, pH 7,2
1xTBE	90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2mM EDTA
TE-Puffer	(Applichem, Gatersleben, Deutschland) Fertig-Lösung
Xylenxanol-Ladepuffer	30% Glycerin, 0,25% Xylenxanol

Tabelle 3: Liste aller verwendeten Puffer

2. 1. 4. Arbeitsgeräte

Gerätetyp	Typ/ Programm	Hersteller	Firmensitz
Abzug	unbekannt	Laborbau Syke	Diepholz, Deutschland
Durchflusszytometer	Mo-Flo	Dako	Glostrup, Dänemark
Heizplatte	RCT	IKA	Staufen, Deutschland
Homogenizer	Dounce- Homogenisator	Kontes	Vineland, NJ, USA
Homogenizer	T10 basic	IKA	Staufen, Deutschland
Kamera	Axiocam	Carl Zeiss	Jena, Deutschland
Mikrodissektionsgerät	Palm Microbeam	Carl Zeiss	Jena, Deutschland
Mikroskop	EM 900	Carl Zeiss	Jena, Deutschland
Mikroskop	Axiovert C40	Carl Zeiss	Jena, Deutschland
Mikroskop	Axioskop 2	Carl Zeiss	Jena, Deutschland
Optische Pinzette	verschiedene Komponenten	IMTEK	Freiburg, Deutschland
Optische Pinzette	Palm CombiSystem	Carl Zeiss	Jena, Deutschland
PCR-Bank	UVC/T-M-AR	Kisker	Steinfurt, Deutschland
PCR-Bank	unbekannt	BDK	Sonnenbühl, Deutschland

PCR-Plattform	AmpliGrid	Advalytix	Brunnthal, Deutschland
PCR-Plattform	AB-1100 (96-Well- Platte)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
pH-Meter	pH197	WTW	Weilheim, Deutschland
Pipetten	diverse	Eppendorf	Wesseling, Deutschland
Sequenzierautomat	Prism 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems	Carlsbad, CA, USA
Sequenzierautomat	3130xl Genetic Analyzer	Applied Biosystems	Carlsbad, CA, USA
Sequenzierautomat	3100-Avant Genetic Analyzer	Applied Biosystems	Carlsbad, CA, USA
Software	Sequencher	GeneCodes	Ann Arbor, MI, USA
Software	SPSS 15.0	IBM	Ehningen, Deutschland
Software	Microsoft Office	Microsoft	Redmond, WA, USA
Software	SDS Version 1.2.3	Applied Biosystems	Carlsbad, CA, USA
Software	Sequencing Analysis	Applied Biosystems	Carlsbad, CA, USA
Software	GeneMapper	Applied Biosystems	Carlsbad, CA, USA
Software	Oligoexplorer 1.2	Genelink	Hawthorne, NY, USA
Spannungsgerät	SAE 2761	Serva	Heidelberg, Deutschland
Spektrometer	Nano-Drop	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Thermocycler	PTC-200	MJ-Research	Minneapolis, MN, USA
Thermocycler	Mastercycler-Gradient	Eppendorf	Wesseling, Deutschland
Thermoinkubator	TH30	Edmund Bühler	Hechingen, Deutschland
Thermoinkubator	Thermomixer comfort	Eppendorf	Wesseling, Deutschland

Trockenschrank	unbekannt	Bruno-Kummer	Freiburg, Deutschland
UV-Kammer	unbekannt	LTF-Labortechnik	Wasserburg, Deutschland
Vortexer	unbekannt	neolab	Heidelberg, Deutschland
Vortexer	VF2	IKA	Staufen, Deutschland
Waagen	BP121S	Satorius	Göttingen, Deutschland
Zentrifuge	Z 233 MK-2	Hermle	Wehingen, Deutschland
Zentrifuge	2 K 15	Sigma Aldrich	St. Louis, MO, USA
Zentrifuge	PicoFuge	Agilent	Waldbronn, Deutschland
Zentrifuge	Heraeus Labofuge 900	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Zentrifuge	ProFuge 10K	Agilent	Waldbronn, Deutschland
Zentrifuge	Mini-Spin	Eppendorf	Wesseling, Deutschland
Zentrifuge	Optima MAX	Beckmann-Coulter	Krefeld, Deutschland

Tabelle 4: Liste aller verwendeten Arbeitsgeräte

2. 2. Methoden

2. 2. 1. Isolation von Lymphozyten

Mittels 10 ml Leucosep-Röhrchen (Greiner bio-one) wurden Lymphozyten aus humanem oder murinem Blut nach Herstellerangaben isoliert. Jeweils 6 ml Blut wurden eingesetzt. Das lymphozytenhaltige Pellet wurde schließlich in 2 ml PBS resuspendiert. In PBS resuspendierte Lymphozyten werden im Folgenden als Lymphozytensuspension bezeichnet.

2. 2. 2. Mitochondrienisolationen

Bei den Mitochondrienisolationen wurden alle Schritte bei 4 °C durchgeführt. Die verwendeten Tubes und Zentrifugen wurden ebenfalls auf 4 °C vorgekühlt.

Mit drei verschiedenen Kits wurden Mitochondrien isoliert. Im Einzelnen waren dies der MS850 Mitochondria Isolation Kit for Tissue (Mitosciences), der Mitochondria-Isolation Kit for Eucaryotic Cells (Pierce) und der Qproteome Mitochondria Isolation-Kit (Qiagen).

Mit allen drei Kits wurden Mitochondrien aus humanen Lymphozytensuspensionen isoliert und anschließend in PBS resuspendiert.

Bei der Mitochondrienisolation aus Lebergewebe wurden zwei Varianten des Qproteome Mitochondria Isolation Kits verwendet (Qiagen) (vgl. 2.2.2.3. und 2.2.2.4.).

Während Variante I im Wesentlichen auf den Angaben des Herstellers basiert, ist Variante II stärker modifiziert und beinhaltet eine Ultrazentrifugation in einem Sucrose-Dichtegradienten. Nach der Isolation wurden die Lebermitochondrien in Storage-Puffer (Qiagen) resuspendiert. In einigen Versuchen wurden alternative Puffer, wie z. B. Sucrose-Puffer (Cavelier et al. 2000) oder PBS für die Resuspension der Mitochondrien verwendet. Wenn außer dem Storage-Puffer (Qiagen) ein alternativer Puffer eingesetzt wurde, wird dies im Folgenden explizit erwähnt. In den nächsten Abschnitten werden alle angewandten Mitochondrienisolationen beschrieben.

2. 2. 2. 1. MS850 Mitochondria Isolation Kit for Tissue (Mitosciences) (Mitosciencekit)

Die hier beschriebene Methode wird in den folgenden Abschnitten als *Mitosciencekit* bezeichnet.

Es wurde das Protokoll des Herstellers verwendet. Als Ausgangsmaterial dienten 2ml einer humanen Lymphozytensuspension. In einem Dounce-Homogenisator (Kontes) wurden nach einem initialen Stoß mit dem „großen Abstandspistill“ ca. 70 Stöße mit dem „kleinen Abstandspistill“ durchgeführt. Dadurch sollten die enthaltenen Zellen aufgebrochen werden. Das mitochondrienhaltige Pellet wurde schließlich in 500µl PBS resuspendiert.

2. 2. 2. 2. Mitochondria-Isolation Kit for Eucaryotic Cells (Pierce) (Piercekit)

Es wurde die im Herstellerprotokoll angegebene reagenzienbasierte Isolationsmethode verwendet. Als Ausgangsmaterial dienten 2ml Lymphozytensuspension. Im letzten Schritt wurde das Pellet in 500µl PBS resuspendiert.

2. 2. 2. 3. Qproteome Mitochondria Isolation Kit (Qiagen) – Variante I (*Qiagenkit-Variante I*)

Mit dieser Methode wurden Mitochondrien aus murinem und porcinem Lebergewebe isoliert. Für einige Versuche wurde diese Methode ebenfalls zur Isolation von Mitochondrien aus humanen Lymphozyten verwendet.

2. 2. 2. 3. a. Qiagenkit-Variante I zur Mitochondrienisolation aus murinem und porcinem Lebergewebe

Es wurde nach dem Herstellerprotokoll für die Isolation aus Gewebe verfahren. Wenige Modifizierungen wurden vorgenommen. Im Einzelnen waren diese: 60 mg Lebergewebe wurden vor der Isolation der Mitochondrien nicht mit einer NaCl-Lösung, sondern mit Storage-Puffer gewaschen (Zentrifugation: 1 min, 2.000 g). Das Gewebe wurde mit einem Homogenizer (IKA) bei minimaler Geschwindigkeit zerkleinert (15 s). Für den Zellaufbruch wurde ein 2 ml Dounce-Homogenisator (Kontes) verwendet. Dazu wurden 5 initiale Stöße mit dem „großen Abstandspistill“ und daran anschließend 25 Stöße mit dem „kleinen Abstandspistill“ durchgeführt. Das mitochondrienhaltige Pellet aus Lebergewebe wurde schließlich in 400 µl Storage-Puffer resuspendiert. Um verschiedene Puffer vergleichen zu können, wurde anstelle von Storage-Puffer ein Sucrose-Puffer (Cavelier et al. 2000) verwendet.

2. 2. 2. 3. b. Qiagenkit-Variante I zur Mitochondrienisolation aus humanen Lymphozyten

Für die Isolation wurden 2 ml Lymphozytensuspension verwendet. Das Herstellerprotokoll für eukaryotische Zelllysate wurde mit einigen Modifikationen angewandt. Die Lymphozytensuspension wurde nicht mit einer NaCl-Lösung, sondern mit PBS gewaschen. Für den Zellaufbruch wurde ebenfalls ein Dounce-Homogenisator (Kontes) verwendet. Es wurden 5 initiale Stöße mit dem „großen Abstandspistill“ und daran anschließend 25 Stöße mit dem „kleinen Abstandspistill“ durchgeführt. Als Alternative zum Homogenisator wurde die Suspension mit einer 26G-Spritze 20–30 mal aufgezogen und eluiert. Die Mitochondrien wurden schließlich in 500 µl PBS resuspendiert. In einer Ausnahme wurden diese in 400 µl Storage-Puffer resuspendiert (vgl. 2.2.7.1.3.b.).

2. 2. 2. 4. Qproteome Mitochondria Isolation Kit (Qiagen) – Variante II (*Qiagenkit-Variante II*)

Pro Probe wurden 0,5 g Leber abgewogen und in 10 ml-Röhrchen gegeben. Das Lebergewebe wurde anschließend mindestens zweimal mit 10 ml PBS gewaschen (1 min, 2.000 g). Nachfolgend wurden 2 ml Storage-Puffer inkl. 1x Proteaseinhibitor (Qiagen) auf das

Lebergewebe gegeben und dieses mit einem Homogenizer (IKA) auf kleinster Stufe zerkleinert (15 s). Um das gesamte Material zu pelletieren, wurde das Homogenisat nun in ein 2 ml-Tube überführt und zentrifugiert (10 min, 12.000 g). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml PBS (inkl. 1x Protease-inhibitor) resuspendiert. Nach der Wiederholung dieses Schrittes wurde der Überstand erneut verworfen und das Pellet in 2 ml Lysispuffer inkl. 1x Protease-inhibitor resuspendiert. Anschließend wurde das Lebergewebe für 10 min auf einem Schüttler inkubiert und erneut zentrifugiert (10 min, 12.000 g). Der Überstand wurde ein weiteres Mal verworfen und das Pellet in 1,5 ml Disruptionpuffer (inkl. 1x Proteaseinhibitor) resuspendiert. Weiter wurde die Suspension in einen 2 ml Dounce-Homogenisator (Kontes) gegeben. Zuerst wurden fünf Stöße mit dem „großen Abstandspistill“ und anschließend 40 Stöße mit dem „kleinen Abstandspistill“ durchgeführt. Nachfolgend wurde das Lysat in ein neues 2 ml-Tube überführt und zur Sedimentation von Zellen und Debris zentrifugiert (10 min, 1.000 g). Nun wurde der Überstand in ein 2 ml-Tube überführt und das Pellet verworfen. Dieser Schritt wurde insgesamt dreimal wiederholt. Schließlich wurde die Lösung zum Pelletieren der Mitochondrien 10 min bei 6.000 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml Storage-Puffer resuspendiert und zum Waschen der Mitochondrien erneut zentrifugiert (20 min, 6.000 g). Die Mitochondrien wurden nun in 250 µl Storage-Puffer resuspendiert.

Für die Ultrazentrifugation wurde ein diskontinuierlicher Sucrosegradient erstellt (s. Abb. 6), der Phasen aus 30%, 40%, 50%, 60% und 90%iger Sucroslösung enthält. Die Sucrose wurde für jeden Gradienten in Sucrose-Puffer (s. 2.1.3.) resuspendiert. Auf den Gradienten wurden schließlich 750 µl Mitochondrienisolat gegeben, was einem Äquivalent von drei Mitochondrienisolationen (1,5 g Leber) entspricht.

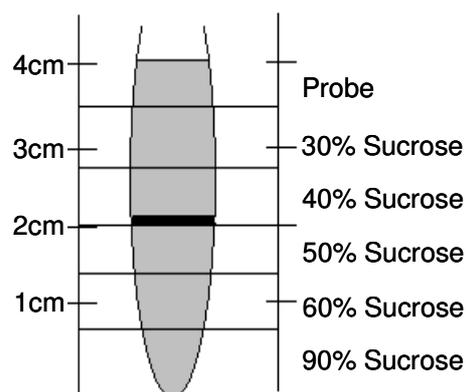


Abbildung 6: Beispiel eines Ultrazentrifugationsröhrchens mit einem diskontinuierlichen Sucrosegradienten; nach der Zentrifugation bei 84.000 g ist eine Hauptbande an der Interphase von 40 – 50% Sucrose zu erkennen.

Die Ultrazentrifugation wurde unter Verwendung eines MLS50-Rotors (Beckmann Coulter) bei 84.000 g für 2 h durchgeführt. Die Mitochondrien sammelten sich an der Interphase zwischen 40% und 50% Sucrose und wurden mit Hilfe einer Pipette abgesaugt.

2. 2. 3. DNA-Isolation

Mit dem Blood Mini Kit (Qiagen) wurde DNA aus Mäuseblut isoliert. Hierfür wurden 200 µl Blut eingesetzt. Der Kit wurde nach Herstellerangaben angewendet. Das Elutionsvolumen betrug 200 µl (H₂O).

Für DNA-Extraktionen aus Mitochondrien wurden 200 µl Mitochondriensuspension (in PBS) verwendet. Es wurde ebenfalls nach Herstellerangaben verfahren und die DNA schließlich in 50 µl H₂O eluiert.

2. 2. 4. Zellfärbungen

20 µl humane Lymphozytensuspension oder Mitochondrienisolate aus humanen Lymphozyten wurden jeweils mit 80 µl einer 0,5% Trypanblaulösung vermischt, um enthaltene Zellen anzufärben.

2. 2. 5. Mitochondrienfärbungen

Es kamen vier verschiedene mitochondrienspezifische Farbstoffe zum Einsatz (JC-1 [Sigma-Aldrich], NAO, MTR und MTG [alle Invitrogen]).

In anfänglichen Versuchen wurden Färbelösungen für NAO, MTR und MTG in PBS angesetzt. Zur schonenden Färbung von Mitochondrien wurde schließlich an Stelle von PBS Storage-Puffer (Qiagen) verwendet. Alle Schritte und Zentrifugationen wurden, wenn nicht anders beschrieben, bei 4 °C durchgeführt.

2. 2. 5. 1. JC-1-Färbung

Die JC-1-Färbung isolierter Mitochondrien wurde mit dem Isolated Mitochondria Staining Kit (Sigma-Aldrich) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dafür wurden 2 ml-Tubes verwendet, in die 1,8 ml Färbelösung zu den isolierten Mitochondrien (5–20 µg mitochondriales Protein) gegeben wurde. Die Inkubationszeit des Farbstoffes betrug 20 min bei 37 °C. Im Anschluss wurden die Mitochondrien gewaschen (10 min, 10.000 g) und in 100 µl Storage-Puffer (Qiagen) resuspendiert.

2. 2. 5. 2. NAO-Färbung

Mitochondrienisolate oder Lymphozytensuspensionen wurden mit 1 μ M NAO für 20 min bei 37 °C inkubiert. Um überschüssigen Farbstoff zu entfernen, wurde anschließend einmal mit Storage-Puffer gewaschen (10 min, 10.000 g) und das Pellet in 400 μ l Storage-Puffer (alternativ PBS) resuspendiert.

2. 2. 5. 3. MTR-Färbung

Mitochondrienisolate wurden mit 500 nM MTR-Lösung für 20 min bei 37 °C inkubiert. Überschüssiger Farbstoff wurde durch einen Waschvorgang (10 min, 10.000 g) entfernt und die Mitochondrien in 400 μ l Storage-Puffer resuspendiert.

2. 2. 5. 4. MTG- Färbung

MTG wurde hauptsächlich in einer Konzentration von 400 nM angewendet. Für wenige Versuche, bei denen dies explizit erwähnt wird, fanden andere Konzentrationen Verwendung (100–500nM). Die Mitochondrien wurden 20 min bei 37 °C im Farbstoff inkubiert (alternativ: 45 min bei 4 °C). Da MTG in wässriger Lösung nicht fluoresziert, wurde nach der Färbung kein Waschvorgang durchgeführt.

2. 2. 5. 5. Herstellung von 1:1-Mischungen (murin/porcin) gefärbter Mitochondriensuspensionen

Für die Interspezies-Sequenzanalyse (s. 2.2.8.11.a.) von separierten Mitochondrien (s. 2.2.7.) mussten 1:1-Mischungen (murin/porcin) von Mitochondriensuspensionen verwendet werden. Dafür wurden jeweils zwei Mitochondrienisolationen (*Qiagenkit-Variante I*; s. 2.2.2.3.a.) sowohl aus Schweine- als auch aus Mäuseleber durchgeführt. Nach der Isolation wurde die Größe der mitochondrienhaltigen Pellets optisch begutachtet. Nur wenn ein Pellet von der Maus und dem Schwein die gleiche Größe hatten, wurden diese weiterverwendet und mit Farbstoff inkubiert. Erst nach der Färbung wurden die Mitochondriensuspensionen zu gleichen Teilen vereinigt.

2. 2. 6. Mikroskopische Verfahren

Um einzelne Mitochondrien bestmöglich zu visualisieren, kamen verschiedene mikroskopische Techniken zum Einsatz.

Die Hellfeldmikroskopie wurde im Wesentlichen eingesetzt, um die Lyse und den erfolgreichen Aufschluss von Zellen nach der Mitochondrienisolation zu überprüfen.

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde verwendet, um die Konzentrationen der mitochondrialen Farbstoffe zu optimieren und die Inkorporation in die Mitochondrien zu kontrollieren.

Um die Qualität der Mitochondrien nach der Isolation studieren zu können, wurden auch elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt.

2. 2. 6. 1. Hellfeldmikroskopie

Lymphozyten- und Mitochondrienisolate, die mit Trypanblau (s. 2.2.4.) angefärbt wurden, sind mit verschiedenen Mikroskopen (s. 2.1.4.) und Vergrößerungen (400–1000fach) begutachtet worden.

2. 2. 6. 2. Fluoreszenzmikroskopie

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden unterschiedliche Mikroskope (s. 2.1.4.) verwendet. Verschieden gefärbte Mitochondrienisolate (vgl. 2.2.5.) wurden bei 400–1.000fachen Vergrößerungen mit Hilfe von FITC- (MTG, NAO) oder Rhodaminfiltern (JC-1, MTR) analysiert.

Kontrollen:

Um zu überprüfen, ob die puren Färbelösungen keine störenden Autofluoreszenzen aufweisen, wurden diese ohne die Zugabe von Mitochondrien mit den entsprechenden Filtersätzen mikroskopisch untersucht.

2. 2. 6. 3. Konfokale Mikroskopie

Um Aufschluss über die Beschaffenheit von Mitochondrien zu erhalten, die mit der *Qiagenkit-Variante I* (s. 2.2.2.3.a.) isoliert wurden, kam ein konfokales Mikroskop (LSM 510, Carl Zeiss) zum Einsatz. Dreidimensionale (3D) Aufnahmen einer MTG gefärbten Mitochondriensuspension wurden aufgenommen. Zuvor waren die Mitochondriensuspensionen mit ProLong Gold eingedeckt worden.

2. 2. 6. 4. Elektronenmikroskopie (EM)

Exemplarisch wurden Mitochondrienisolate aus porcinem Lebergewebe untersucht, die mit beiden Varianten des *Qiagenkits* (s. 2.2.2.3.a. und 2.2.2.4.) isoliert worden waren. Um verschiedene Resuspensionspuffer miteinander vergleichen zu können, wurden Mitochondrienisolate der Variante I in Storage- (Qiagen) oder Sucrose-Puffer (Cavelier et al. 2000) resuspendiert und analysiert.

Mitochondrienisolate aus humanen Lymphozytensuspensionen wurden entweder direkt oder nach der Ablage durch die FCM untersucht (vgl. 2.2.7.1.3.b.).

Alle Mitochondriensuspensionen wurden mit 2% Paraformaldehyd und 0,5% Glutaraldehyd fixiert. Die Vorbereitung der Proben und die eigentliche Elektronenmikroskopie wurden nach einem veröffentlichten Protokoll (Walker et al. 2002) durchgeführt. Die einzige Modifikation war eine Bleicitrat-Inkubation der Ultradünnschnitte nach Reynolds (1963), die an die Uranylacetat-Behandlung angeschlossen wurde.

2. 2. 7. Separationsmethoden

Um herauszufinden, womit einzelne Mitochondrien am besten abgelegt werden können, wurde ein Vergleich verschiedener Separationsmethoden (FCM, LCM und OT) durchgeführt. Dazu wurden einzelne mitochondriale Partikel mit allen Separationsmethoden auf 96-Well-Platten abgelegt: sowohl einzelne mitochondriale Partikel aus einer 1:1 gemischten Mitochondriensuspension (murin/porcin; s. 2.2.5.5.) als auch einzelne Partikel aus einer rein murinen Suspension.

Die aus der Mischung stammenden mitochondrialen Partikel wurden anschließend mit der Interspezies-Sequenzanalyse (s. 2.2.8.11.a.) und die aus der rein murinen Suspension mit der qPCR (s.2.2.8.12.) analysiert.

Um repräsentative Daten für die verschiedenen Separationsmethoden zu erhalten und eine statistische Auswertung zu ermöglichen, wurden mehrere Vorkehrungen getroffen: Sowohl die FCM als auch die LCM wurden an mindestens zwei unterschiedlichen Tagen vorgenommen und jede Analyse (qPCR und Sequenzanalyse) mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt. Weiter wurde beachtet, dass mindestens zwei verschiedene Mitochondrienisolate von unterschiedlichen Tieren verwendet wurden.

Da der Aufbau der OT nur selten zur Verfügung stand, konnten nicht alle dieser Vorkehrungen berücksichtigt werden. So mussten Mitochondrienisolate von denselben Tiere verwendet werden, und die Ablage von Mitochondrien für die qPCR erfolgte an nur einem Tag. Insgesamt

wurden mit der OT weniger Mitochondrien abgelegt als mit den anderen Methoden (vgl. Tabelle 7).

Um unterschiedliche Separationstechniken effektiv vergleichen zu können, ist es entscheidend, bei jeder Methode die optimalen Einstellungen zu verwenden. Daher werden für jede Technik sowohl die Suche nach den richtigen Einstellungen (s. 2.2.7.1.2.a., 2.2.7.2.1.a. und 2.2.7.3.1a.) als auch die schließlich verwendeten, optimierten Adjustierungen (s. 2.2.7.1.2.b., 2.2.7.2.1b. und 2.2.7.3.1a.) für den Vergleich der Separationsmethoden beschrieben.

Mit der FCM sollte auch geklärt werden, ob verschiedene mitochondriale Farbstoffe Auswirkungen auf die Beschaffenheit isolierter Mitochondrien haben (s. 2.2.7.1.1.).

Weiter wurden mit der FCM verschiedene Versuche an humanen und murinen Lymphozyten sowie humanen Mitochondrien durchgeführt (s. 2.2.7.1.3.).

2. 2. 7. 1. Durchflusszytometrie

Für alle Versuche wurde ein Mo-Flo Zellsortierer (Dako) verwendet.

2. 2. 7. 1. 1. Vergleich verschiedener mitochondrialer Farbstoffe

Um den Einfluss eines mitochondrialen Farbstoffs auf die Beschaffenheit der Mitochondrien zu untersuchen, wurden Mitochondriensuspensionen getrennt voneinander mit unterschiedlichen Farbstoffen inkubiert (MTR, MTG und JC-1). Aus den gefärbten Suspensionen wurden einzelne mitochondriale Partikel auf 96-Well-Platten abgelegt. Wie unter 2.2.7. beschrieben, wurden dazu 1:1-Mischungen (murin/porcin; s. 2.2.5.5.) oder rein murine Suspensionen verwendet.

Die Separation erfolgte innerhalb eines Tages mit Mitochondrienisolaten derselben Tiere. Dadurch sollte ein Einfluss des Durchflusszytometers oder der Tierspezies auf die Mitochondrienqualität ausgeschlossen werden. Jeweils eine voll beladene 96-Well-Platte wurde mit der Interspezies-Sequenzanalyse (s. 2.2.8.11.a.) und der qPCR (s. 2.2.8.12.) analysiert.

Um das Durchflusszytometer zu justieren, wurden vor der Ablage von Mitochondrien mit Kügelchen (Beads) probeweise untersucht. Diese sind mit einem grünen Fluoreszenzfarbstoff markiert und weisen eine definierte Größe (2–15 µm) auf. Erst als die 2 µm Beads deutlich erkannt werden konnten, wurden die Mitochondriensuspensionen analysiert. Einzelne mitochondriale Partikel wurden schließlich bei folgenden Einstellungen abgelegt:

Laserpower 300 mW, FSC (*forward scatter*): Verstärkung 2, SSC (*side scatter*): Verstärkung 1.

Die Sortierregionen lagen dabei in folgenden Fenstern:

R1: SSC/FSC

R2: Fluoreszenz (FITC[grün]/PE[rot])

R3: Pulsweite/ FSC

Bei MTR wurde als Triggersignal der SSC, bei MTG und JC-1 dagegen die Fluoreszenz verwendet.

Kontrollen:

Es wurde getestet, ob die eingesetzten Farbstoffe auch ohne Anwesenheit von Mitochondrien detektierbare Fluoreszenzen emittieren. Dazu wurden alle Farbstoffe ohne Zugabe von Mitochondrien bei den oben genannten Einstellungen geprüft.

2. 2. 7. 1. 2. Vergleich verschiedener Separationsmethoden

2. 2. 7. 1. 2. a. Suche nach den richtigen Einstellungen

In anfänglichen Versuchen wurden im Wesentlichen der FSC, der SSC und die Fluoreszenz (PE und FITC) als Sortierfenster verwendet. Um die Sortierregion zu finden, in der am ehesten einzelne Mitochondrien enthalten sind, wurden verschiedene Anzahlen von mitochondrialen Partikeln aus drei verschiedenen Bereichen (Abbildung 7) auf 96-Well-Platten abgelegt. Dazu wurden JC-1 gefärbte Mitochondrien aus murinem Lebergewebe verwendet. Die Partikel wurden anschließend mit der qPCR (s. 2.2.8.12.) auf ihren mtDNA-Gehalt geprüft. Es wurde nachfolgend durch optimierte Geräteeinstellungen versucht, die Region genauer aufzulösen, deren Partikel am wenigsten mtDNA enthielten (s. 3.4.1.). Dazu wurden die Stärke des Lasers variiert, einzelne Kanäle verstärkt, weitere Sortierregionen hinzugefügt oder andere mitochondriale Farbstoffe verwendet. Nach jeder Modifizierung wurden mitochondriale Partikel abgelegt und mit Hilfe der qPCR auf ihren mtDNA-Gehalt getestet.

Zusätzlich wurde geprüft, ob ein Verdünnen der Mitochondrien einen Einfluss auf die abgelegte mtDNA-Menge hat. Dazu wurden Mitochondrien aus verschiedenen verdünnten Mitochondriensuspensionen (1:1 bis 1:1000) abgelegt und ebenfalls mit der qPCR (s. 2.2.8.12.) analysiert. Die höchste Verdünnungsstufe, bei der die FCM noch praktikabel betrieben werden kann, sollte nachfolgend für den Vergleich der Separationsmethoden verwendet werden.

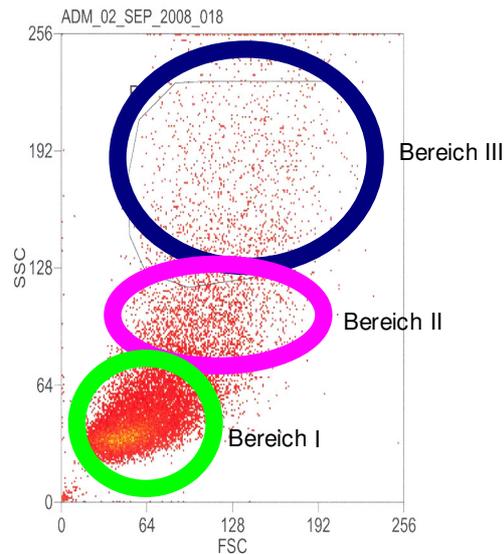


Abbildung 7: Ausschnitt eines Dotplots, der mit Hilfe der FCM generiert wurde. Es ist das SSC/FSC-Fenster wiedergegeben. Die farbigen Kreise zeigen drei verschiedene Bereiche, aus denen Mitochondrien abgelegt wurden.

2. 2. 7. 1. 2. b. Optimierte Einstellungen

Um einzelne Mitochondrien separieren und ablegen zu können, wurde das Durchflusszytometer mit MTG-gefärbten Mitochondrien beschickt, die mit der *Qiagenkit-Variante I* (s. 2.2.2.3.a.) isoliert wurden. Die Mitochondrien wurden vor der Separation im Verhältnis von 1:30 mit Storage-Puffer (Qiagen) verdünnt.

Am Durchflusszytometer wurde die logarithmische Adjustierung des FSC, des SSC und der Fluoreszenz verwendet. Weiter wurde die Laserstärke auf 200 mV eingestellt und das Fluoreszenzsignal als Auslöser (*Trigger*) verwendet. Drei Sortierregionen wurden gleichzeitig zur Ablage einzelner mitochondrialer Partikel verwendet. Die erste (R1) wurde dabei so in das SSC/FSC-Fenster gelegt, dass Partikel von $\approx 2 \mu\text{m}$ enthalten waren. Dies geschah basierend auf den zuvor untersuchten Beads (vgl. 2.2.7.1.1.), die definierte Größen hatten. Die zweite Sortierregion (R2) wurde in das PE/FITC-Fenster gelegt. Dabei wurde darauf geachtet, dass nur angefärbte Mitochondrien enthalten waren. Die dritte Region (R3) wurde in das Pulsweite/FSC-Fenster gelegt.

Kontrollen:

Als technikbasierte Negativkontrollen wurden einzelne Beads mit einem Durchmesser von ca. $15 \mu\text{m}$ auf 96-Well-Platten abgelegt. Dazu wurden die Beads zu den Mitochondriensuspensionen hinzugegeben.

Die Ablage der Beads diente zur Kontrolle, ob eine unerwünschte (Co)-Ablage von mtDNA – etwa in Form von ungebundener mtDNA – möglich ist.

2. 2. 7. 1. 3. Sonstige Versuche

2. 2. 7. 1. 3. a. Ablage von Lymphozyten

Um Vergleiche zwischen einzelnen mitochondrialen Partikeln und Zellen anzustellen und Aussagen über mögliche Zell-Kontaminationen in den Mitochondrienisolaten treffen zu können, wurden neben Mitochondrien sowohl humane als auch murine Lymphozytensuspensionen analysiert und einzelne Lymphozyten auf 96-Well-Platten abgelegt. Im Wesentlichen wurden dabei bereits publizierte Einstellungen verwendet (Lutz-Bonengel et al. 2008b).

2. 2. 7. 1. 3. b. Ablage von Mitochondrien aus humanen Lymphozyten

Um die Sensitivität humaner PCR-Systeme zu testen, wurden einzelne mitochondriale Partikel verschiedener Personen auf AmpliGrid abgelegt. Für die Ablage auf AmpliGrid wurden Mitochondrienisolate aus Lymphozyten verwendet, die in PBS resuspendiert (s. 2.2.2.3.b.) und mit 100 nM MTG (s. 2.2.5.4.) gefärbt wurden. Als Sortierregionen wurden gleichzeitig sowohl positiv gefärbte Partikel innerhalb des PE/FITC-Fensters als auch die Hauptfraktion des Pulsweite/FITC-Fensters ausgewählt. Unter anderem wurden einzelne mitochondriale Partikel für eine Minisequenzierung abgelegt. Dazu wurde eine 1:1 Mischung von Mitochondrien von zwei verschiedenen Probanden verwendet. Die beiden Probanden unterscheiden sich an der zu sequenzierenden Position (np 271) in ihrer mtDNA-Sequenz.

Auf 96-Well-Platten wurden Mitochondrien mit den optimierten Einstellungen (s. 2.2.7.1.2.b.) abgelegt. Zuvor waren diese Mitochondrien aus humanen Lymphozyten isoliert, in Storage Puffer (Qiagen) resuspendiert (s. 2.2.2.3.b.) und mit 400 nM MTG (s. 2.2.5.4.) markiert worden. Vor der Ablage wurde eine 1:1-Mischung von Mitochondrien zweier Probanden angefertigt, die unterschiedliche Sequenzpolymorphismen in der zu analysierenden Sequenz aufweisen. Die Mitochondriensuspensionen wurden zum Betreiben der FCM nicht verdünnt.

Weiter wurden humane Mitochondrien aus Lymphozyten in ein Tube sortiert, um diese anschließend elektronenmikroskopisch zu analysieren (s. 2.2.6.4.). In das Zieltube wurden 100 µl PBS vorgelegt, um den Aufprall der Mitochondrien abzufangen und so einer mechanischen Beschädigung vorzubeugen. Insgesamt wurden – dem Zählwert des Durchflusszytometers entsprechend – 706.561 mitochondriale Partikel sortiert. Für diesen Versuch wurden die Mitochondrien mit 100 nM MTG gefärbt. Als Sortierregionen dienten sowohl die Hauptfraktion des PE/FITC-Fensters als auch die des Pulsweite/FITC-Fensters.

In ein weiteres Tube wurden auf diese Weise ca. 12.000 Mitochondrien abgelegt. Hier wurde kein PBS vorgelegt. Dieser Versuch sollte klären, ob noch Überreste von nDNA in den sortierten Mitochondrien vorhanden sind (s. 2.2.8.4.).

Zusätzlich zu den beschriebenen Versuchen wurde eine Vielzahl weiterer FCM-basierter Experimente durchgeführt, z. B. die Analyse humaner Lymphozyten, muriner Thrombozyten oder die Ablage unterschiedlicher Anzahlen von Mitochondrien, die verschieden präpariert oder gefärbt wurden.

2. 2. 7. 2. Laser-Mikrodissektion

2. 2. 7. 2. 1. Vergleich verschiedener Separationsmethoden

2. 2. 7. 2. 1.a. Suche nach den richtigen Einstellungen

Zur Optimierung der Laser-Mikrodissektion wurden Mitochondrien verwendet, die mit der *Qiagenkit-Variante I* (s. 2.2.2.3.a.) isoliert und mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (MTR, MTG und JC-1) gefärbt worden waren. Die Mitochondrien wurden in verschiedenen Medien (PBS, H₂O, Storage-Puffer) und Verdünnungsstufen auf Objektträgern ausgestrichen und eingetrocknet. Diese waren dabei entweder mit PET- oder PEN-Membranen (Carl Zeiss) beschichtet oder es wurden unbeschichtete Glasobjektträger verwendet. Zur Detektion der Mitochondrien wurden verschiedene Filtersätze (FITC, DAPI, Rhodamin) am PALM Microbeam (Carl Zeiss) eingesetzt. Fluoreszenzsignale, die einer Größe von ca. 1–3 µm entsprachen, wurden anschließend entweder mit der *Autocircle*- (5µm) oder mit der LPC-Funktion ausgeschnitten. Die Partikel wurden dabei entweder auf die Reaktionsräume von AmpliGrid oder auf Capture Plates 96 (Carl Zeiss) abgelegt. Vor der eigentlichen Mikrodissektion wurde bei der Verwendung von AmpliGrid jeder Reaktionsraum mit 2 µl HPLC-H₂O beladen. Bei den Capture-Plates hingegen wurde jedes Well mit 20 µl HPLC-H₂O befüllt. Diese Maßnahme wurde durchgeführt, damit die Mitochondrien nach der Ablage im Zielort haften blieben.

2. 2. 7. 2. 1.b. Optimierte Einstellungen

Isolierte Mitochondrien (*Qiagenkit-Variante I*; s. 2.2.2.3.a.) wurden mit Mitotracker-Green angefärbt und im Verhältnis von 1:400 mit Storage-Puffer (Qiagen) verdünnt. Die mitochondrienhaltige Lösung wurde anschließend auf unbeschichtete Glasobjektträger ausgestrichen und eingetrocknet. Unter Verwendung des FITC-Filters wurden nun einzelne mitochondriale Partikel (1–3 µm Durchmesser) ausgeschnitten und in die Capture-Plates

abgelegt (vgl. 2.2.7.). Je nach Kristallisationsgrad der Salze, die beim Eintrocknen des Mediums entstehen, wurden dazu leicht modifizierte Lasereinstellungen gewählt. Im Durchschnitt wurden folgende Einstellungen verwendet:

Schneideenergie: ~75, Schneidefokus ~10, LPC-Energie: ~84, LPC-Focus: ~9.

Durch Zentrifugation (3.000 rpm, 30 s) wurden die Mitochondrien nach der Ablage auf 96-Well-Platten überführt. Die beladenen 96-Well-Platten wurden ca. 2 h bei 60 °C im Trockenschrank gelagert. Dadurch wurde überschüssiges Wasser entfernt, welches bei der Zentrifugation der Capture-Plates in die 96-Well-Platten überführt wurde.

Kontrollen:

Zur Kontrolle wurden fluoreszenzfreie Areale innerhalb der Mitochondrienausstriche ausgeschnitten und auf Capture-Plates abgelegt. Durch Zentrifugation (3000rpm, 30s) wurden diese Areale auf 96-Well-Platten überführt. Diese als technikbasierte Negativkontrollen bezeichneten Proben dienten dazu, mögliche (Co)-Ablagen von mtDNA oder Mitochondrien aufzuspüren.

2. 2. 7. 3. Optische Pinzette

2. 2. 7. 3. 1. Vergleich verschiedener Separationsmethoden

2. 2. 7. 3. 1. a. Suche und Optimierung der Einstellungen

Um einzelne Mitochondrien zu separieren und abzulegen, wurden zwei verschiedene OTs verwendet: das Palm CombiSystem (Carl Zeiss) und eine optische Pinzette bei IMTEK (Institut für Mikrosystemtechnik der Universität Freiburg). Beide Geräte verwenden einen 1064 nm Infrarotlaser. Bei IMTEK wurde das 40x C-APOCHROMAT Objektiv (Carl Zeiss) mit einer numerischen Apertur von 1,2 und bei Zeiss ein EC Plan-Neofluar 100x Öl-Immersion-Objektiv (Carl Zeiss) mit einer numerischen Apertur von 1,3 verwendet.

Als Separationsplattform kam ein Ibidi-Slide (1µ-Slide VI flat ibiTreat (Ibidi, Martinsried)) zum Einsatz. Dieser spezielle Objektträger besitzt 6x2-Aussparungen, welche durch einen kleinen Kanal miteinander verbunden sind. Je eine Aussparung wurde zuerst mit ~30 µl HPLC-H₂O befüllt, wogegen die andere über den Kanal verbundene Aussparung anschließend mit HPLC-H₂O plus ca. 1 µl einer 1:200 verdünnten Mitochondriensuspension befüllt wurde. Die verwendeten porcinen und murinen Mitochondrien wurden mit der *Qiagenkit-Variante I* isoliert (s. 2.2.2.3.a.) und mit 400 nM MTG angefärbt. Einzelne mitochondriale Partikel wurden nun mit dem Infrarotlaser in die Falle genommen (s. Abb. 8). Anschließend wurden sie durch

den Kanal von der mitochondrienhaltigen Aussparung in die nur mit HPLC-H₂O befüllte Aussparung überführt. Dabei fand die Überführung durch das manuelle oder automatische Bewegen der Objektträgerplattform statt. Die Mitochondrien wurden anschließend mit einer 20µl Pipette aus der Zielaussparung entnommen und auf 96-Well-Platten abgelegt (vgl. 2.7.2.). Dabei wurden sie mit etwa 10–20 µl Medium überführt. Bei Vorversuchen wurde anstelle von HPLC-H₂O Storage-Puffer (Qiagen) verwendet. Die beladenen Platten wurden nach der Ablage etwa 2 h bei 60 °C gelagert, damit überschüssiges Medium verdampfen konnte.

Kontrollen:

Um zu überprüfen, ob Kontaminationen wie freie mtDNA oder weitere Mitochondrien mitgeschleppt werden, wurden 96-Well-Platten mit Medium aus der Zielaussparung beladen, ohne dass Mitochondrien zuvor durch den Kanal gezogen wurden. Diese Kontrollen werden als technikbasierte Negativkontrollen bezeichnet.

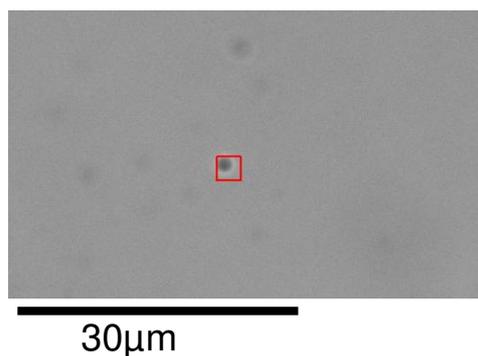


Abb. 8: Mitochondrium in der Laserfalle

2. 2. 8. PCR-basierte Methoden

In diesem Abschnitt werden alle Methoden beschrieben, denen entweder das Prinzip der PCR zu Grunde liegt oder solche, die infolge einer PCR durchgeführt werden.

2. 2. 8. 1. Verwendete Oligonukleotide

Name	PCR-System, Verwendung	Spezies	Sequenz (5'→3')
L29	L29/H381; mtDNA- Sequenzierung	<i>Homo sapiens</i>	CTCACGGGAGCTCTCCATGC
L162	L162/H381; mtDNA- Sequenzierung	<i>Homo sapiens</i>	CGCACCTACGTTCAATATTAC
L231	Mini- Sequenzierung	<i>Homo sapiens</i>	CATAATAATAACAATTGAATGTCTGCACAG CCGCTTTCCA
H381	L29/H381 L162/H381	<i>Homo sapiens</i>	GCTGGTGTTAGGGTTCTTTG
Pentaplex	Nachweis nDNA	<i>Homo sapiens</i>	10 verschiedene Primer nach Wiegand et al. (2006)
L-CytB	L-CytB/H-CytB Sequenzanalyse	diverse	CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA (Parson et al. 2000)
H-CytB	L-CytB/H-CytB Sequenzanalyse	diverse	CCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA (Parson et al. 2000)
K1	K1/K2; qPCR	<i>Mus musculus</i>	CTCTACCTCACCATCTCTTGCTAA
K2	K1/K2; qPCR	<i>Mus musculus</i>	CATTGGCTACACCTTGACCTAACG

Tabelle 5: Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind hier vermerkt. Bereits publizierte Sequenzen sind als solche markiert. Ein vorangestelltes L im Primernamen steht für *light strand* (leichter Strang), ein H für *heavy strand* (schwerer Strang). L-Primer sind identisch mit dem leichten und H-Primer mit dem schweren Strang.

2. 2. 8. 2. Verwendete Thermocyclerprogramme

Programm	Schritte
ABCDSL	95°C,10min; 94°C 30s; 56°C 20s; 72°C 40s; 32-35 Zyklen; 72°C 10 min;
CYTB 45	95°C 10min; 95°C 45s; 50°C 1min; 72°C 1min; 45 Zyklen; 72°C 10min;
D-Loop-PCR	95°C, 10min; 95°C,15s; 56°C,30s; 72°C 1,5min; 45Zyklen; 72°C, 10min
D-Loop-Seq	96°C 1min; 96°C 10s; 50°C 5s; 60°C 4min; 30 Zyklen
ExoSAP-IT	37°C 30min; 80°C 15min
MD56SL	95°C,10min; 94°C 1min; 56°C 30s; 72°C 40s; 35 Zyklen; 72°C 10 min;
Pentaplex (Wiegand et al. 2006)	95°C 11min; 94°C 30s; 61°C 1,5min; 72°C 1,5min; 9Zyklen; 90°C 30s; 60°C 1,5min; 72°C 1,5min; 19Zyklen; 68°C 30sec
qPCR	95°C 10min; 95°C 15s; 60°C 1min; 40-50 Zyklen
RP-D38	95°C 10min; 95°C 15s; 56°C 30s; 72°C 1min; 38Zyklen; 72°C 10min
SAP	37°C 1h; 75°C 15min
SLSEQ50	96°C 1min; 96°C 10s; 50°C 10s; 60°C 4min; 25Zyklen
SnapSLID	96°C 10min; 50°C 5s; 60°C 30s; 25 Zyklen

Tabelle 6: Verwendete PCR-Programme; die farbig markierten Passagen kennzeichnen Cyclerschritte, die zyklisch wiederholt werden.

2. 2. 8. 3. humane mtDNA: PCR-Systeme

Es wurden im Wesentlichen zwei PCR-Systeme angewendet, die spezifisch für humane mtDNA sind. Diese waren: L29/H381 und L162/H381.

Kontrollen:

Bei allen Amplifizierungen wurden zwei bis sechs *No-Template*-Kontrollen und mehrere Positivkontrollen (9947A) mitgeführt.

2. 2. 8. 3. a. L29/H381

Für die Amplifikation eines 352 bp Fragmentes der HVR II der humanen Kontrollregion wurden die Primer L29 und H381 (s. Tabelle 5) verwendet. Das L29/H381 System wurde für 1 µl-Ansätze auf AmpliGrid oder für 5 µl-Ansätze auf 96-Well-Platten eingesetzt.

Der 1 µl Ansatz auf AmpliGrid setzte sich wie folgt zusammen:

1x PCR-Puffer für die AmpliTaq-Gold

250 µM von jedem Nukleotid (dNTP)

0,5 µM pro Primer

0,25 U AmpliTaq-Gold DNA-Polymerase (Applied Biosystems)

Als Template dienten entweder mittels FCM abgelegte Mitochondrien, die aus Lymphozyten isoliert, in PBS resuspendiert und mit 100 nM MTG gefärbt wurden (s. 2.2.7.1.3.b.) oder 1 µl DNA (9947A) verschiedener Konzentrationen (1–500 pg). Die Template-DNA wurde auf AmpliGrid vorgelegt und vor der Zugabe des PCR-Mixes eingetrocknet. Um eine Verdunstung zu vermeiden, wurden fertige Reaktionsansätze mit 5 µl Mineralöl (Advalytix) überschichtet. Es wurde das PCR-Programm ABCDSL (s. Tabelle 6) mit 32 oder 35 Zyklen durchgeführt. Dabei kam ein Eppendorf Mastercycler mit einem für AmpliGrid geeigneten Adapter (in situ-Aufsatz) zur Anwendung.

Die PCR in 5 µl-Ansätzen auf 96-Well-Platten setzte sich wie folgt zusammen:

1x PCR-Puffer für die AmpliTaq-Gold

0,25 U AmpliTaq Gold DNA Polymerase

0,2 µM von jedem Primer

200 µM von jedem dNTP

Als Template dienten einzelne mitochondriale Partikel zweier Probanden (vgl. 2.2.7.1.3.b.), die aus humanen Lymphozyten isoliert, in Storage-Puffer (Qiagen) resuspendiert (s. 2.2.2.3.b.) und mit 400 nM MTG (s. 2.2.4.5.) angefärbt wurden. Die Platten wurden für die PCR mit einer Silikonmatte abgedeckt und das Programm D-Loop-PCR verwendet.

2. 2. 8. 3. b. L162/H381

Für die Amplifizierung eines kleineren Fragmentes der HVR II (219 bp) wurden die Primer L162 und H381 (s. Tabelle 5) eingesetzt. Die PCRs wurden dazu entweder in 1 µl Ansätzen auf AmpliGrid oder in 5 µl Ansätzen auf 96-Well-Platten durchgeführt. Der 1 µl Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

1x PCR-Puffer

250 µM pro dNTP

0,5 µM pro Primer

0,25 U AmpliTaq-Gold (Applied Biosystems)

Als Template dienten mittels FCM abgelegte Mitochondrien (vgl. 2.2.7.1.3.b.), die aus Lymphozyten isoliert, in PBS resuspendiert (s. 2.2.2.3.b.) und mit 100 nM MTG gefärbt wurden (s. 2.2.4.5.). Bei der 1 µl PCR wurde das Programm MD56SL (s. Tabelle 6) mit 35 Zyklen verwendet, wobei der Eppendorf Mastercycler mit in situ Aufsatz zum Einsatz kam.

Die 5 µl-PCR auf 96-Well-Platten setzte sich wie folgt zusammen:

1x PCR-Puffer für die AmpliTaq Gold

0,25 U AmpliTaq Gold DNA Polymerase

0,2 µM von jedem Primer

200 µM von jedem dNTP

Als Template wurden verschiedene Konzentrationen der 9947A-DNA (0,01–500pg) verwendet und vor Zugabe des PCR Mixes eingetrocknet. Der PTC200 Thermocycler (GMI) mit dem Programm RP-D38 mit 38 Zyklen wurde für die automatische Amplifizierung eingesetzt. Die Platten wurden dabei mit Silikonmatten abgedeckt.

2. 2. 8. 4. humane nDNA: PCR-Systeme

Um zu testen, ob nDNA in den Mitochondrienisolationen aus humanen Lymphozyten enthalten ist, wurden Pentaplex PCRs nach Wiegand et al. (2006) durchgeführt, und zwar in 12,5 µl Ansätzen in 0,2 ml-Tubes. In einem Ansatz waren 6,25 µl Multiplex-PCR-Kit (Qiagen) und 0,5 µl Primermix (Primer nach Wiegand et al. 2006) enthalten. 5 µl Template wurden zu jeder Reaktion dazugegeben. Als Template wurden Mitochondrien verwendet, die aus humanen Lymphozytensuspensionen isoliert und in PBS resuspendiert worden waren (*Qiagenkit-Variante I*; 2.2.2.3.b.). Eingesetzt wurden dabei sowohl unsortierte Mitochondrien als auch solche, die mit Hilfe der FCM sortiert wurden (s. 2.2.7.1.3.b.). Die DNA der Proben wurde vor der PCR extrahiert (s. 2.2.3.)

2. 2. 8. 5. Agarosegelelektrophorese

Der Erfolg jeder PCR wurde durch eine elektrophoretische Auftrennung der Amplikons überprüft. Dazu wurden 2%ige Agarosegele angefertigt, indem 0,5 g Agarose in 50 ml 1x TBE-Puffer gegeben wurden. Der Ansatz wurde so lange aufgeköcht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Nachdem die Lösung auf ca. 60 °C abgekühlt war, wurden entweder 1 µl Ethidiumbromid (Carl Roth) oder alternativ 4 µl SYBR Safe (Invitrogen) hinzugegeben. Nach gründlichem Mischen wurde die Lösung nun in eine 50 ml-Kammer gegeben, die mit einem Kamm bestückt war. Dieser definiert die einzelnen Slots. Nach Erkalten des Gels wurde der Kamm entfernt. Anschließend wurde das Gel vollständig mit 1X TBE-Puffer bedeckt.

Von 12,5 µl PCR-Ansätzen wurden jeweils 2,5 µl PCR-Produkt mit 2 µl Xylenylnol oder Bromphenol-Blau gemischt und jeweils in ein Slot eines Agarosegels aufgetragen. Bei 1–5 µl PCR-Ansätzen wurde das gesamte Produkt verwendet. Zur Ermittlung der Amplikonlänge wurden bei jedem Gel 2,5 µl einer 100 bp Leiter aufgetragen. Nun wurde eine Spannung von etwa 100 V bei einer Stromstärke von ca. 80 A für die Dauer von 25 min angelegt. Das Gel wurde schließlich in einer UV-Kammer fotografiert und auf das Vorhandensein von DNA überprüft.

2. 2. 8. 6. PCR Aufreinigungen

Alle Proben, die (mini)-sequenziert werden sollten, wurden aufgereinigt.

Pro 5 µl PCR-Produkt wurde 1 µl ExoSAP-IT (USB) pipettiert. Bei PCRs auf AmpliGrid wurde ebenfalls 1 µl ExoSAP-IT dazugegeben. Die Inkubation erfolgte in einem PTC 200 Thermocycler (GMI), Programm: ExoSAP-IT (s. Tabelle 6). Alternativ wurde 1 h bei 37 °C inkubiert.

2. 2. 8. 7. mtDNA Sequenzierung

Nach der ExoSAP-IT-Aufreinigung wurden die Sequenzierungen durchgeführt. Als Sequenzierprimer diente der *light strand* Primer eines PCR-Systems (s. Tabelle 5). Bei 5 µl PCR-Ansätzen wurden zu dem PCR-Ansatz 2 µl BigDye v1.1 Buffer, 2 µl BigDye v1.1 Mix und 0,5 µM Primer pipettiert. Anschließend kam das Thermocyclerprogramm D-Loop-Seq (s. Tabelle 6) zur Anwendung.

Für die Sequenzierung von PCRs auf AmpliGrid wurden 0,4 µl BigDye v1.1 Mix und 0,5 µM Primer in die aufgereinigten Proben pipettiert. Es wurde das Thermocyclerprogramm SLSEQ50 (s. Tabelle 6) verwendet.

2. 2. 8. 7. 1. Mini-Sequenzierung

Als Template für die Mini-Sequenzierung dienten PCR-Amplifikate von einzelnen mitochondrialen Partikeln aus humanen Lymphozyten. Die Partikel wurden dabei mit Hilfe der FCM aus einer 1:1-Mischung von Mitochondrien zweier Probanden abgelegt. Diese unterschieden sich an der mini-sequenzierten Position in ihrer Basenabfolge (vgl. 2.2.7.1.3.b.). Die zu Grunde liegenden PCR-Amplifikate wurden entweder mit dem L29/H381 oder dem L162/H381-System in 1 µl Reaktionen auf AmpliGrid erzeugt (vgl. 2.2.8.3.). Nach der Aufreinigung des Amplikons mit ExoSAP-IT (s. 2.2.8.6.) wurden 0,2 µl SNaPshot-Mix (Applied Biosystems) und 0,2 µM L231 (s. Tabelle 5) hinzupipettiert. Das Thermocyclerprogramm SnapSLID (s. Tabelle 6) wurde nun auf dem Eppendorf Mastercycler durchgeführt.

2. 2. 8. 8. Sequenzierungsaufreinigungen

Zur Aufreinigung von mtDNA-Sequenzierungsprodukten wurde entweder der DyeEx 2.0 Kit oder der DyeEx 96 Kit (beides Qiagen) verwendet. AmpliGrid-Proben wurden vor der Reinigung in 0,2 ml-Tubes überführt und auf ein Volumen von 20 µl mit H₂O aufgefüllt. Es wurde nach Angaben des Herstellers verfahren.

Zur Aufreinigung von Mini-Sequenzierungsprodukten wurde das gesamte Volumen jeder Reaktion auf AmpliGrid in ein 0,2 ml-Tube gegeben und 1 µl SAP, 1 µl SAP-Puffer (beides: Roche) sowie 6 µl HPLC-H₂O hinzugegeben. Anschließend wurde das Thermocyclerprogramm SAP (s. Tabelle 6) verwendet.

2. 2. 8. 9. Automatische Sequenzierung und Fragmentanalysen

Für die automatische Sequenzierung und für Fragmentanalysen wurde entweder ein ABI 310, ABI 3100Avant oder ein ABI 3130xl verwendet.

2. 2. 8. 10. DNA-Alinierung und Auswertung

Alle mtDNA Sequenzen wurden mit der Sequencher Software (Gene Codes) zur Referenzsequenz (Anderson et al. 1981) aliniert und ausgewertet. Alle Fragmente wurden

weiter mit Hilfe der Blast-Funktion (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) auf ihre Herkunft überprüft.

2. 2. 8. 11. Sequenzanalyse

Der Begriff der Interspezies-Sequenzanalyse wird in dieser Arbeit für eine spezielle Analyseform verwendet, bei der murine und porcine Mitochondrien gleichzeitig analysiert und differenziert werden können. Die Intraspezies-Sequenzanalyse hingegen wird für Analysen innerhalb von *Homo sapiens* verwendet. Beide Formen der Sequenzanalyse werden im Folgenden beschrieben.

2. 2. 8. 11. a. Interspezies-Sequenzanalyse

Es wurde eine 1:1-Mischung aus murinen- und porcinen Lebermitochondrien angelegt (2.2.5.5.). Aus der Mischung wurden anschließend einzelne mitochondriale Partikel mit verschiedenen Separationsmethoden in Reaktionsräume von 96-Well-Platten abgelegt. Anschließend wurde ein 357 bp großes Fragment des mitochondrialen Cytochrom b Genes amplifiziert (Parson et al. 2000). Die Reaktionen wurden in dieser Studie in 5 µl auf 96-Well-Platten durchgeführt. Es wurden jeweils 0,2 µM von jedem Primer, 200 µM dNTPs und 0,25 U AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems) eingesetzt. Das PCR-Programm Cyt b 45 (Tabelle 6) wurde auf dem PTC 200 Thermocycler angewandt. Nach der Amplifikation wurden die Produkte mit 1µl ExoSAP-IT (vgl. 2.2.8.6.) gereinigt. Anschließend wurde die Sequenzierreaktion mit dem *light strand* Primer (Tabelle 5) und dem BigDye V1.1 Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) durchgeführt (s. 2.2.8.7.). Nach einer Aufreinigung mit dem Dye Ex 96 kit oder Dye Ex 2.0 (beides: Qiagen, s. 2.2.8.8.) wurden die Proben mit dem ABI 3130xl oder dem 3100 *Avant* analysiert. Die detektierten Sequenzen wurden schließlich mit der Sequencher-Software (Gene Codes) zur Referenzsequenz (Anderson et al. 1981) aliniert und ausgewertet (2.2.8.10.). Dabei wurde geprüft, wieviele Sequenzen rein murinen oder rein porcinen Ursprungs waren und welche eine Mischung aus beiden Sequenztypen zeigten.

Auf diesen Daten basierend, wurde eine maximale Wahrscheinlichkeit (W_{max}) für die Ablage von Einzelmitochondrien berechnet:

$$W_{max} = (1 - (x / n)) * 100$$

(x) ist die Anzahl der Sequenzen, die eine Mischung von *Mus musculus* und *Sus scrofa* aufwiesen. (n) ist die Stichprobengröße.

Bei der Verwendung des Verhältnisses von Proben mit reinen Sequenzen (y) (murin oder porcin):

$$y = 1 - (x/n),$$

konnte die Anzahl von mitochondrialen Partikeln, die am wahrscheinlichsten abgelegt wurden, berechnet werden:

$$m = \log_{1/2} (y/2).$$

Diese Berechnungen gelten nur unter der Annahme, dass vereinzelte Mitochondrien analysiert werden, welche aus einer 1:1 Mischung der enthaltenden Mitochondrientypen abgelegt wurden. Sind diese Kriterien nicht erfüllt, können Abweichungen zu den berechneten Werten auftreten.

2. 2. 8. 11. b. Intraspezies-Sequenzanalyse

Die hier verwendete Intraspezies-Sequenzanalyse erfolgte ausschließlich an humanen Lymphozytenmitochondrien, die mit der *Qiagenkit-Variante I* isoliert und in Storage-Puffer (Qiagen) resuspendiert wurden (s. 2.2.2.3.b.). Mitochondrien aus einer 1:1-Mischung zweier Probanden wurden mit Hilfe der FCM abgelegt und mit dem L29/H381-PCR-System amplifiziert und sequenziert (vgl. 2.2.7.1.3.b. und 2.2.8.3.a.). Da in dem PCR-Fragment zahlreiche Sequenzunterschiede zwischen den Personen vorliegen, kann beurteilt werden, wieviele reine und/oder Mischsequenzen vorliegen. Mit dem angegebenen Modell (s. 2.2.8.11.a.) kann daher ebenfalls eine W_{max} berechnet werden.

Kontrollen:

Auf jeder Platte wurden sowohl drei murine als auch drei porcine Positivkontrollen sowie sechs *No-Template*-Kontrollen mitgeführt.

2. 2. 8. 12. Realzeit Quantifizierung (qPCR)

Die Primer K1 und K2 (s. Tabelle 5) wurden mit Hilfe des Programms Oligoexplorer 1.2 (Genelink) erstellt. Mit ihnen kann ein murines, 122 bp langes, mitochondriales Fragment des 12s rRNA-Gens amplifiziert werden. Bei einem Gesamtvolumen von 5 μ l beinhalteten die qPCR-Ansätze jeweils 2,5 μ l des Power SYBR Green Master Mix (ABI) und 0,2 μ M jeden Primers. Als Template dienten entweder murine Lymphozyten, die mit Hilfe der FCM abgelegt worden waren, oder verschieden präparierte mitochondriale Partikel. Alle Proben wurden auf 96-Well-Platten amplifiziert. 40–50 Zyklen einer Zweischritt qPCR (Annealings- und Extensionstemperatur von 60 °C, vgl. Tabelle 6) wurden durchgeführt.

Kontrollen:

Auf jeder Platte wurden Standard-Mäuse-DNAs analysiert, die jeweils in Dubletten angelegt und in folgenden Verdünnungsstufen eingesetzt wurden: 1,8 ng, 180 pg, 18 pg und 1,8 pg. Die Standard-DNAs sollten als Positiv-Kontrollen und zum Berechnen der PCR-Effizienz dienen. Zudem wurden sie als "Plate-to-Plate"-Kontrolle verwendet, um einen Vergleich zwischen Proben verschiedener Platten zu ermöglichen. Die Spezifität der Amplikons wurde durch eine angeschlossene Schmelzkurvenanalyse überprüft.

Pro Platte wurden vier *No-Template*-Kontrollen angelegt und mituntersucht.

Da in *No-Template*-Kontrollen messbare Signale mit C_T -Werten über 40 auftreten können, wurde ein C_T -Wert von 40 als maximaler Wert für ein positives Signal definiert. Erhaltene C_T -Werte wurden von dem Maximalwert 40 abgezogen und werden in dieser Arbeit als ΔC_T bezeichnet. Diese Werte wurden bei der Auswertung der qPCR-Ergebnisse miteinander verglichen. Bei Vergleichen von mitochondrialen Partikeln, die mit unterschiedlichen Farbstoffen angefärbt oder mit unterschiedlichen Separationsmethoden abgelegt worden waren, wurden Unterschiede der ΔC_T -Werte zwischen Gruppen mit dem exakten, zweiseitigen Mann-Whitney-Test (Mann und Whitney 1947, Wilcoxon 1945) mit einem Signifikanzlevel von $p < 5\%$ untersucht.

2. 2. 9. Photo- und spektrometrische Messungen

2. 2. 9. 1. Photometrie

Die DNA-Konzentration von isolierter Mäuse-DNA (s. 2.2.3.) wurde mittels des Nano-Drops (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Sie diente anschließend als Standardreihe bei der qPCR. Für die photometrische DNA-Quantifizierung wurden die vorhandenen instrumentalen Einstellungen für die Messung von DNA verwendet. Zur Eichung des Hintergrunds diente H_2O . Die Messung der DNA erfolgte in Triplikaten bei einer Wellenlänge von 260nm.

2. 2. 9. 2. Massenspektrometrie

Der Storage-Puffer (Qiagen) wurde massenspektrometrisch im toxikologischen Labor des Instituts für Rechtsmedizin am Universitätsklinikum Freiburg untersucht. Die Messung sollte Aufschluss geben, ob osmotisch wirksame Kohlenhydrate, wie etwa Sucrose, enthalten sind.

2. 2. 10. Sonstige Versuche

2. 2. 10. 1. DNase Behandlung

Eine DNase-Behandlung wurde für eine nachfolgende FCM-Analyse bei einigen Mitochondrienlösungen durchgeführt. Dadurch sollte nicht an Mitochondrien gebundene, also „freie“ DNA, entfernt werden. Der TURBO DNA-free Kit (Ambion) wurde nach Herstellerangaben verwendet. Die Inaktivierung der DNase erfolgte kurz vor der Ablage der Mitochondrien durch die FCM.

3. Ergebnisse

3. 1. Isolation von Lymphozyten

Mit Trypanblau gefärbte Lymphozytenisolate (s. 2.2.4.) wurden mittels der Hellfeldmikroskopie (s. 2.2.6.1.) untersucht. Dabei konnten neben ungefärbten Zellen zum überwiegenden Teil blau eingefärbte Lymphozyten nachgewiesen werden.

3. 2. Mitochondrienisolationen

Um herauszufinden, welche Methode am besten für die Isolation von Mitochondrien geeignet ist, kamen drei verschiedene Kits unterschiedlicher Hersteller zum Einsatz (s. 2.2.2.1., 2.2.2.2. und 2.2.2.3.b.). Die Kits wurden dazu an dem Anteil unaufgebrochener Zellen bewertet. Lymphozyten können durch Trypanblau eingefärbt und mit Hilfe der Hellfeldmikroskopie leicht auffindig gemacht werden. Aus diesem Grund wurden die Mitochondrien für die Bewertung der Kits aus Lymphozytensuspensionen isoliert (vgl. 2.2.2.), mit Trypanblau behandelt (s. 2.2.4.) und schließlich mit dem Hellfeldmikroskop (Axiovert C40, Carl Zeiss) untersucht (s. 2.2.6.1.).

Es zeigte sich, dass ausschließlich nach der Isolation mit der *Qiagenkit-Variante I* (s. 2.2.2.3.b.) keine Lymphozyten mehr beobachtet werden konnten. Bei der Verwendung der beiden anderen Kits hingegen konnten Zellen detektiert werden. Dabei waren nach der reagenzienbasierten Mitochondrienisolation des *Piercekits* (s. 2.2.2.2.) am meisten Lymphozyten erhalten. In den Isolaten des *Mitosciencekit* (s. 2.2.2.1.) konnten nur wenige Lymphozyten gefunden werden.

Auf Grund der Tatsache, dass beim Einsatz sowohl des *Pierce-* als auch des *Mitosciencekits* die Zellen nicht vollständig aufgebrochen waren, wurden die Versuche mit diesen Kits eingestellt. Es wurde im Folgenden ausschließlich der *Qiagenkit* verwendet.

Mitochondrienisolate der *Qiagenkit-Variante I* wurden zusätzlich mit verschiedenen Mikroskopen (s. 2.1.4.) sowohl hellfeld- als auch fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Dabei konnten ebenfalls keine Zellen mehr detektiert werden.

Eine elektronenmikroskopische Beurteilung (s. 2.2.6.4.) erfolgte an Mitochondrien, die mit zwei Varianten des *Qiagenkits* aus porcinem Lebergewebe isoliert und in Storage-Puffer (Qiagen) resuspendiert worden waren (vgl. 2.2.2.3.a. und 2.2.2.4.).

Die EM-Aufnahmen zeigen, dass bei beiden Varianten des *Qiagenkits* hauptsächlich Partikel mit einem Durchmesser von ca. 0,5–2,5 μm isoliert wurden. Diese waren dabei – wie für

Mitochondrien typisch – durch das Vorhandensein einer Doppelmembran gekennzeichnet (s. Abb. 9). Zu gewissen Anteilen sind kleine zirkuläre Partikel zu erkennen, die einen Durchmesser von 0,1–0,3 μm besitzen. Es treten keine Strukturen mit einem Durchmesser von $>2,5 \mu\text{m}$ auf.

Der Anteil an Partikeln mit intakter Doppelmembran lag bei Variante I in gleicher Größenordnung wie bei Variante II.

Insgesamt erzielte die Isolation mit der *Qiagenkit-Variante I* im Vergleich zu den anderen Methoden das beste Ergebnis: Alle Zellen wurden erfolgreich aufgebrochen und es wurden Mitochondrien mit intakter Doppelmembran isoliert. Des Weiteren ist die *Qiagenkit-Variante I* auf Grund der unterbleibenden Ultrazentrifugation weniger zeitaufwändig (ca. 2 h) als die *Qiagenkit-Variante II*.

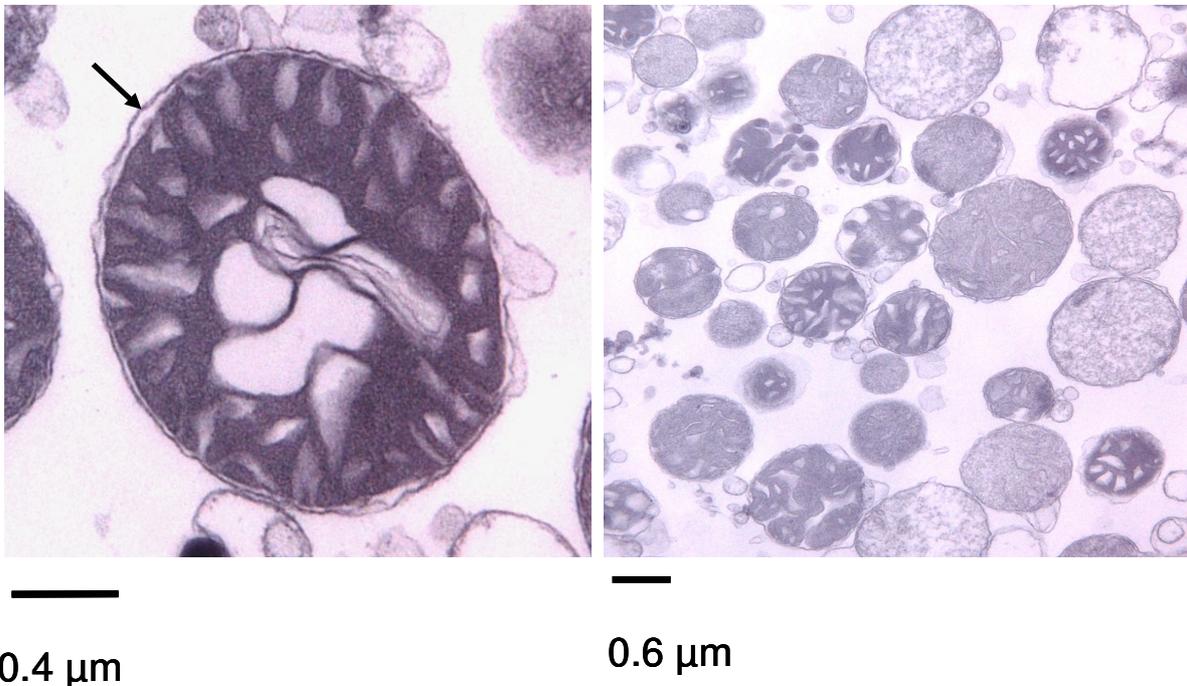


Abbildung 9: EM-Aufnahmen von porcinen Lebermitochondrien, die mit dem *Qiagenkit* isoliert wurden. Links ist ein mit Variante I isoliertes Mitochondrium zu erkennen. Der Pfeil zeigt auf die mitochondriale Außenmembran. Rechts: Übersichtsaufnahme von Mitochondrien, die mit der *Qiagenkit-Variante II* isoliert wurden.

3. 2. 1. Verschiedene Ausgangsmaterialien

Mittels EM wurden Mitochondrienisolate aus humanen Lymphozyten sowie porcinem Lebergewebe untersucht (vgl. 2.2.6.4.). Die Mitochondrien wurden dafür mit der *Qiagenkit-Variante I* (s. 2.2.2.3.) isoliert. Die Mitochondrien aus Lymphozyten wurden vor der Elektronenmikroskopie mit der FCM sortiert (vgl. 2.2.7.1.3.b.), während die Lebermitochondrien direkt nach der Isolation für die EM präpariert wurden. In einer weiteren

EM-Untersuchung wurden zusätzlich humane Lymphozytenmitochondrien beurteilt, die direkt im Anschluss an eine Isolation mit dem *Mitosciencekit* (s. 2.2.2.1.) für die EM präpariert wurden.

Es zeigte sich, dass nur in den Isolaten aus porcinem Lebergewebe intakte Mitochondrien gefunden werden konnten (Abb. 9). Bei Mitochondrienisolaten aus Lymphozyten ergab sich ein anderes Bild:

Sowohl bei den sortierten Isolaten als auch bei denen, die direkt für die EM präpariert wurden, konnten keine Mitochondrien detektiert werden. Stattdessen wurden verschiedene zellartige Strukturen unbekanntes Ursprungs beobachtet (s. Abb. 10). Möglicherweise handelt es sich um Hefepilze.

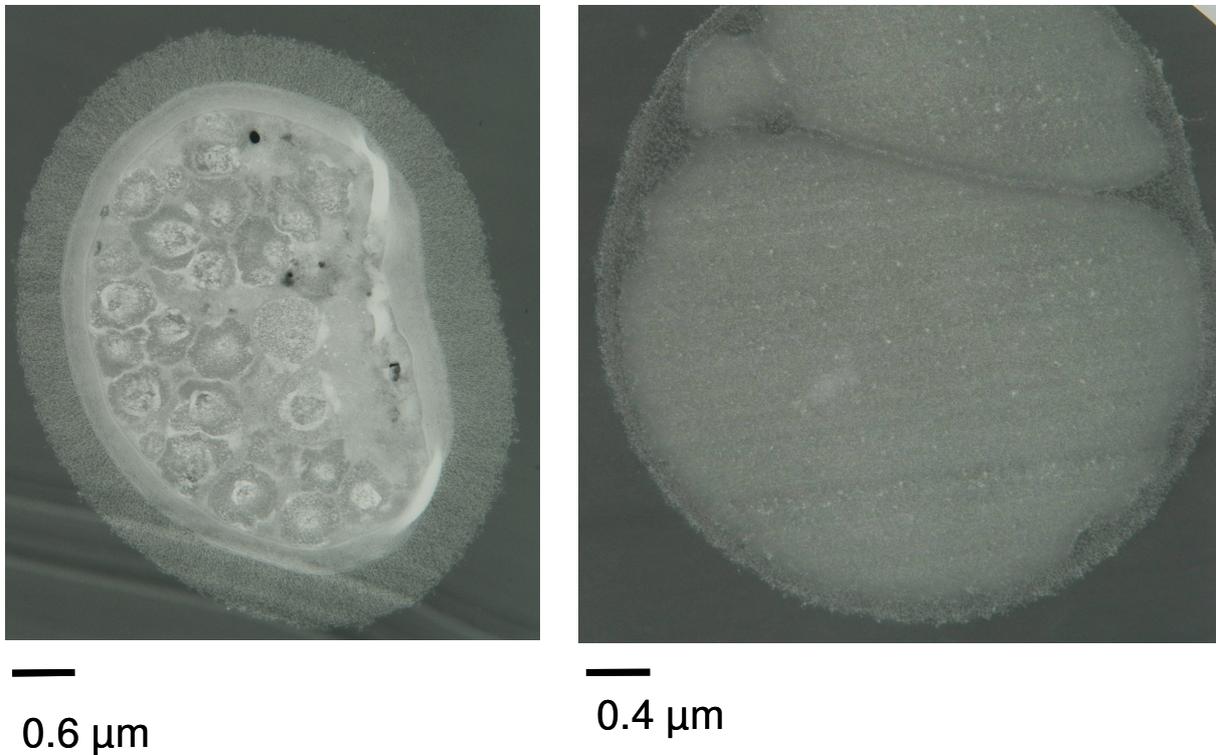


Abbildung 10: Zellartige Strukturen unbekanntes Ursprungs.

3. 2. 2. Medien zur Resuspension von Mitochondrien

Um zu testen, welchen Einfluss das Resuspensionsmedium auf die mitochondriale Morphologie hat, wurden porcine Mitochondrien mit der *Qiagenkit-Variante I* (s. 2.2.2.3.a.) isoliert und in verschiedenen Puffern resuspendiert (PBS, Sucrose- (Cavelier et al. 2000) und Storage-Puffer (Qiagen)).

Bei fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung von MTG-gefärbten Lebermitochondrien, die in Storage-Puffer oder PBS resuspendiert wurden, ergab sich folgendes Bild:

In PBS resuspendierte Mitochondrien wiesen häufig großflächige und gestreute Fluoreszenzsignale auf, die überwiegend nicht auf distinkte Partikel zurückzuführen waren. Mitochondrien in Storage- (Qiagen) oder Sucrose-Puffer (Cavelier et al. 2000) hingegen zeigten überwiegend insulare Fluoreszenzsignale, die von einzelnen Partikeln auszugehen schienen. Abb. 11 zeigt typische Fluoreszenzmuster von Mitochondrien, die in Storage-Puffer oder in PBS resuspendiert wurden.

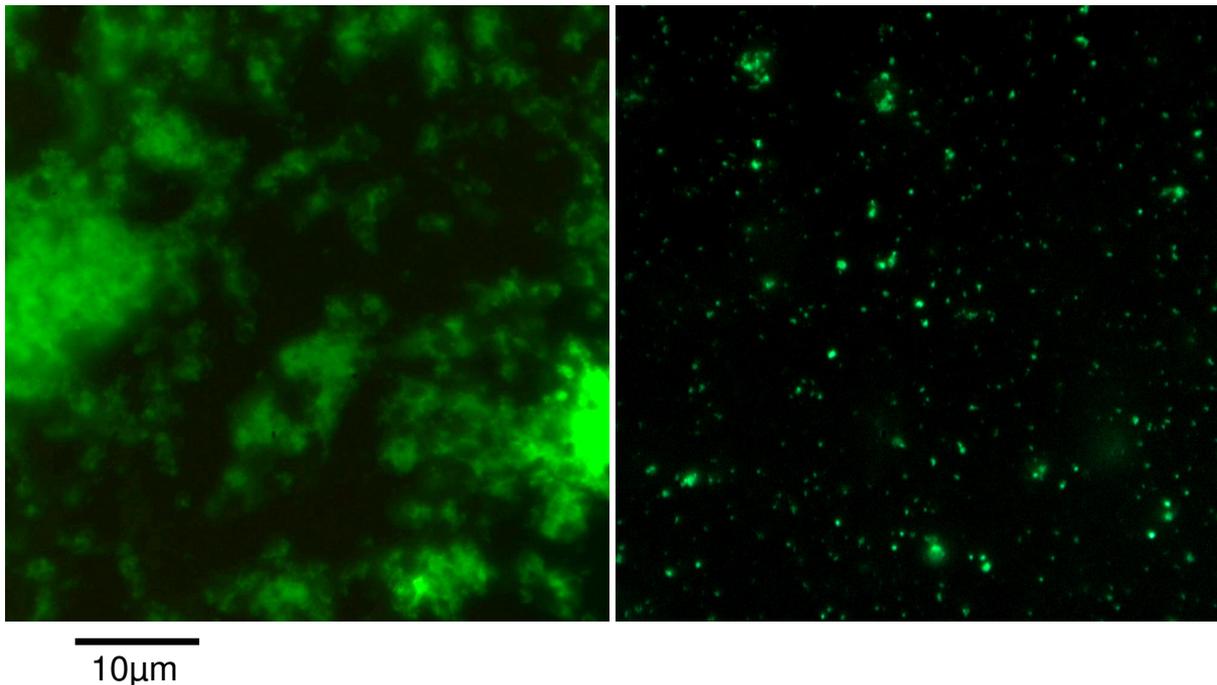


Abbildung 11: Exemplarische fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von MTG-gefärbten Mitochondrien, die in verschiedenen Puffern resuspendiert wurden (1000fache Vergrößerung). Links: Lebermitochondrien der *Qiagenkit-Variante II* in PBS; rechts: Lebermitochondrien der *Qiagenkit-Variante I* in Storage-Puffer.

EM-Untersuchungen von porcinen Mitochondrien, die in Sucrose- (Cavelier et al. 2000) oder Storage-Puffer (Qiagen) resuspendiert wurden (vgl. 2.2.6.4.), zeigten, dass der Anteil von intakten Mitochondrien in Storage-Puffer höher ist als der in Sucrose-Puffer (s. Abb. 12).

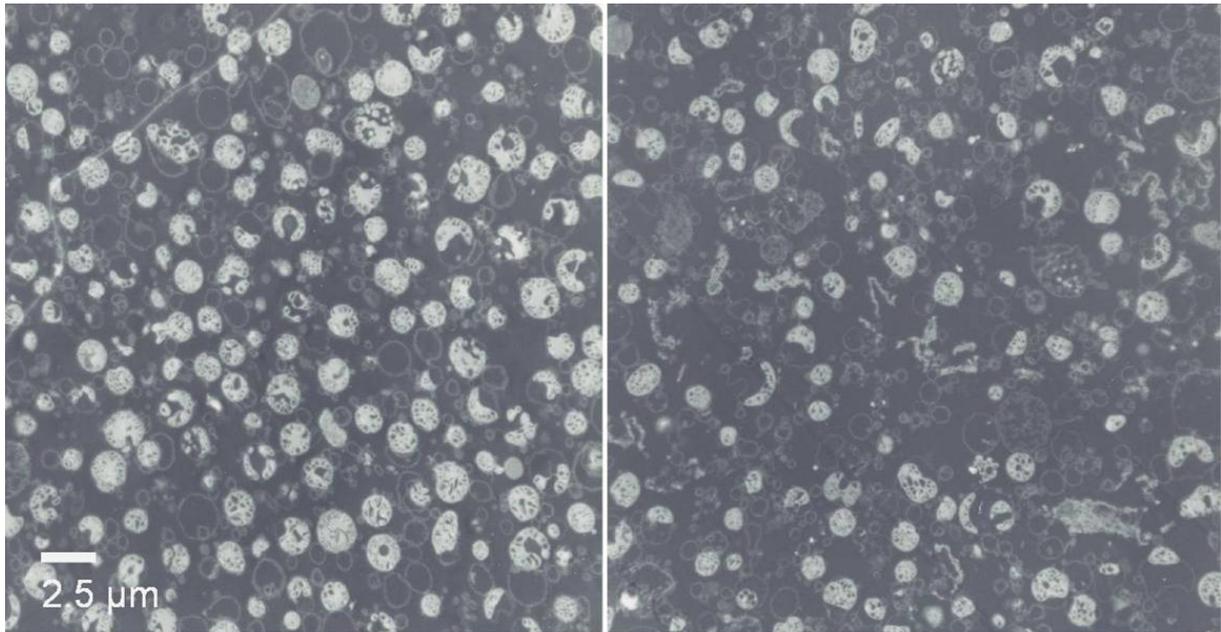


Abbildung 12: EM-Übersichtsaufnahmen von Lebermitochondrien, die in zwei verschiedenen Puffern resuspendiert wurden. Links: Storage-Puffer (Qiagen); rechts: Sucrose-Puffer (Cavelier et al. 2000)

Für einige Versuche wurden Mitochondrien in HPLC-H₂O resuspendiert. Mit Hilfe der Hellfeld- und Fluoreszenzmikroskopie konnte beobachtet werden, dass diese Mitochondrien im Vergleich zu Mitochondrien, die in Storage-Puffer (Qiagen) resuspendiert wurden, größer erschienen.

Im Gegensatz zu PBS konnten bei der Verwendung von H₂O als Resuspensionsmedium keine großflächigen Fluoreszenzsignale beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

3. 2. 3. Kontrollen zur Bestimmung der Reinheit der Mitochondriensuspensionen

Mitochondrienisolationen der *Qiagenkit-Variante I* (s. 2.2.2.3.) wurden hinsichtlich möglicher Kontaminationen, wie z. B. unaufgebrochene Zellen, extrapartikuläre mtDNA oder vorhandene nDNA mit verschiedenen Techniken untersucht.

Mittels EM (Abb. 12), aber auch mit der Hellfeld- und Fluoreszenzmikroskopie konnten keine Zellen oder Strukturen gefunden werden, die im Durchmesser >2,5 μm waren (vgl. 3.2.).

In Kongruenz dazu zeigte ein FCM-basierter Vergleich von Lymphozytensuspensionen und isolierten Mitochondrien (vgl. 2.2.7.1.3.a. und 2.2.7.1.3.b.), dass die Zellfraktion im Mitochondrienisolat nicht mehr enthalten ist (s. Abb. 13).

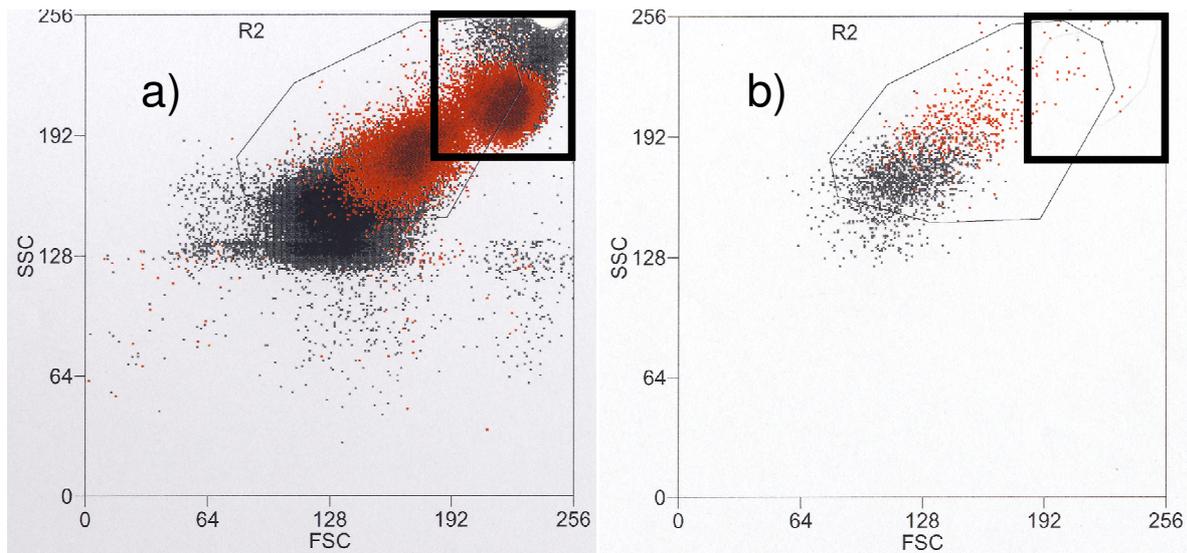


Abbildung 13: FCM-Dotplot einer Lymphozytensuspension vor und nach der Isolation der Mitochondrien mit der *Qiagenkit-Variante I*. Das Quadrat zeigt den Bereich, in dem die Lymphozyten liegen. Links: Lymphozytensuspension; rechts: Mitochondrienisolat. Man erkennt, dass nach der Isolation keine Zellen mehr vorhanden sind.

Überstände von Mitochondrienisolaten aus porcinem Lebergewebe (*Qiagenkit-Variante I*, s. 2.2.2.3.a.) wurden bis zu einem Verhältnis von 1:130.000 mit Storage-Puffer (Qiagen) verdünnt. Überstand bedeutet dabei, dass die Mitochondrien vor der Entnahme von Flüssigkeit pelletiert wurden (10 min, 10.000 g). Je 1 µl der verschiedenen Verdünnungsstufen wurde in die qPCR (2.2.8.12.) eingesetzt und analysiert.

Die ΔC_T -Werte dieser qPCR sind in einem Box- und Whisker-Plot dargestellt (s. Abb. 14). Man erkennt, dass in allen Verdünnungen – selbst bei der höchsten Stufe – mtDNA enthalten ist. Die mtDNA-Menge nimmt dabei mit jeder Verdünnungsstufe kontinuierlich ab.

Mittels der FCM wurden einzelne mitochondriale Partikel aus unterschiedlich verdünnten Suspensionen (vgl. 2.2.7.1.2.a.) abgelegt. Mit Hilfe der qPCR konnte bei den Partikeln aus verdünnten Suspensionen weniger mtDNA detektiert werden als in denen aus unverdünnten (Daten nicht gezeigt).

Eine DNase-Behandlung (s. 2.2.10.1.) der Mitochondrien vor der FCM-Ablage führte dazu, dass in den abgelegten Partikeln weniger mtDNA detektiert werden konnte als bei unbehandelten Mitochondriensuspensionen (Daten nicht gezeigt). Neben der mtDNA-Menge wurde durch die DNase-Behandlung der Isolate auch die Anzahl der Partikel herabgesetzt, die von der FCM erkannt wurden.

In humanen Mitochondrienisolaten aus Lymphozyten (*Qiagenkit-Variante I*, s. 2.2.2.3.b.) konnte nukleäre DNA mittels einer Pentaplex-PCR (Wiegand et al. 2006, s. 2.2.8.4.) auf einem

Agarosegel nachgewiesen werden. Bei der automatischen Fragmentanalyse (s. 2.2.8.9.) konnte das entsprechende DNA-Profil dabei eindeutig dem Spender zugewiesen werden (Peakhöhen >2000 rfu). Bei Mitochondrien hingegen, die mit der FCM sortiert wurden (vgl. 2.2.7.1.3.b.), konnte nach der Durchführung der Pentaplex-PCR keine nDNA detektiert werden. Mit der automatischen Fragmentanalyse (s. 2.2.8.9.) ließ sich jedoch ein Teilprofil erzeugen, dessen Peakhöhen im Schnitt aber deutlich niedriger waren als vor der Sortierung (<500 rfu).

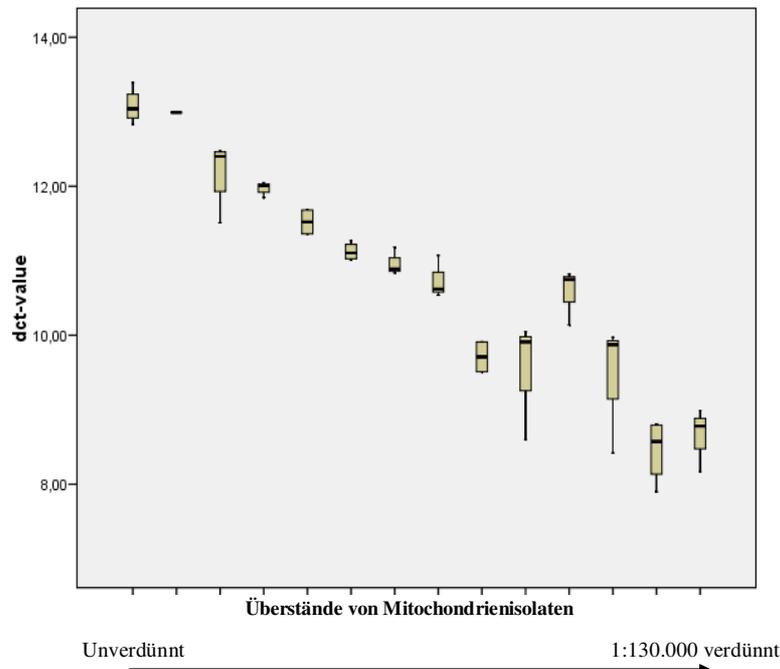


Abbildung 14: Box- und Whisker-Plot von C_T -Werten einer qPCR-Analyse. Überstände von Mitochondrienisolationen wurden dabei auf ihren relativen mtDNA-Gehalt überprüft. Selbst in den höchsten Verdünnungsstufen ist mtDNA enthalten.

3. 3. Mitochondrienfärbungen

Die erfolgreiche Inkorporation der verwendeten Farbstoffe in die Mitochondrien wurde jeweils durch den Einsatz der Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen (s. 2.2.6.2.). Dabei zeigte sich, dass bei der Färbung mit MTR und insbesondere mit JC-1 große fluoreszierende Strukturen mit einem Durchmesser von bis zu 30 μm entstehen. Bei der Färbung durch MTG wurden solche Formen nur selten beobachtet (vgl. Abb. 15). Es konnten stattdessen überwiegend insulare Strukturen mit einem Durchmesser von etwa 1–3 μm detektiert werden. Fluoreszenzaufnahmen von Mitochondrien, die mit NAO (1 μM) gefärbt wurden, enthielten ebenfalls überwiegend insulare Strukturen gleicher Größe und waren kaum von MTG-gefärbten Mitochondrien zu unterscheiden.

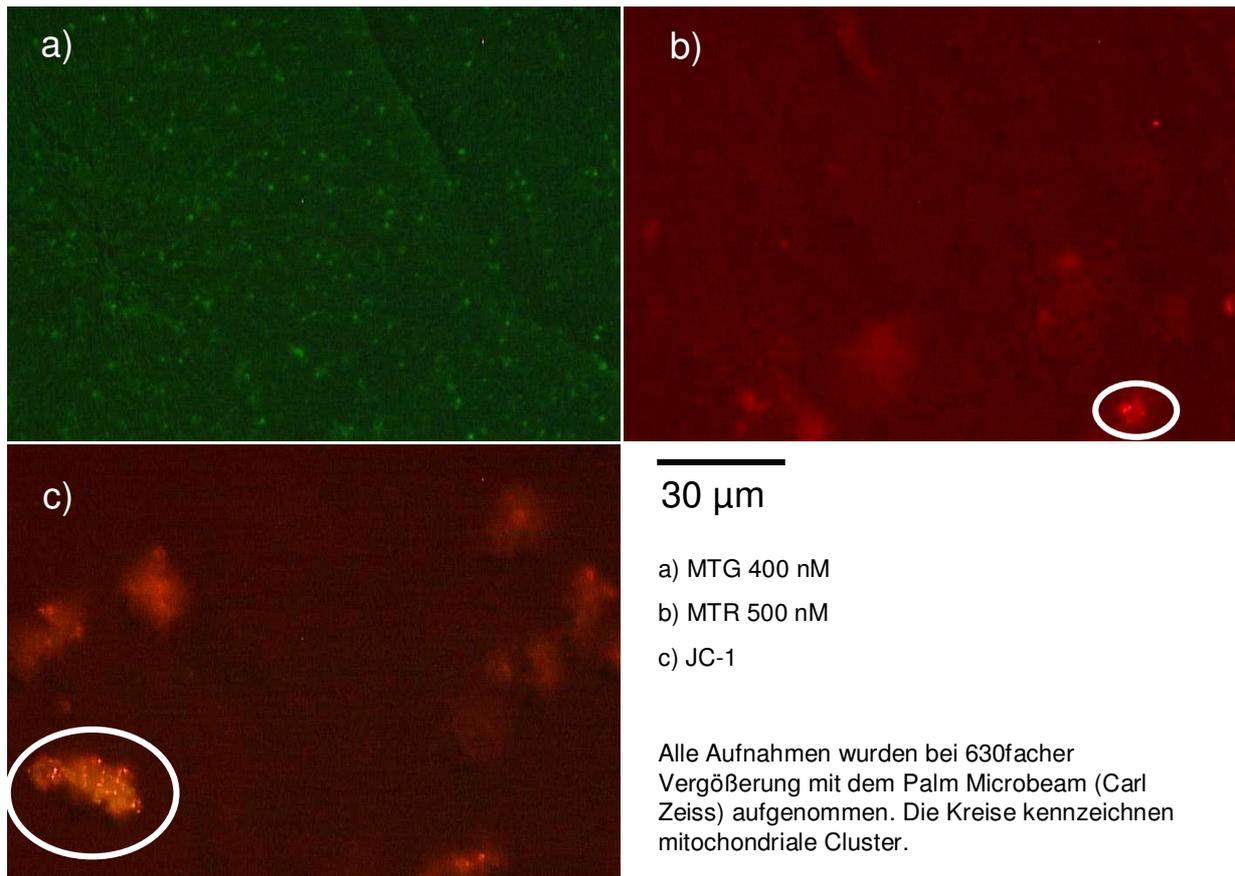


Abbildung 15: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen unterschiedlich gefärbter Mitochondrien

3D-Aufnahmen von MTG-gefärbten Mitochondrien, die mit einem konfokalen Mikroskop angefertigt wurden (s. 2.2.6.3.), zeigten ebenfalls überwiegend insulare Strukturen (s. Abb. 16).

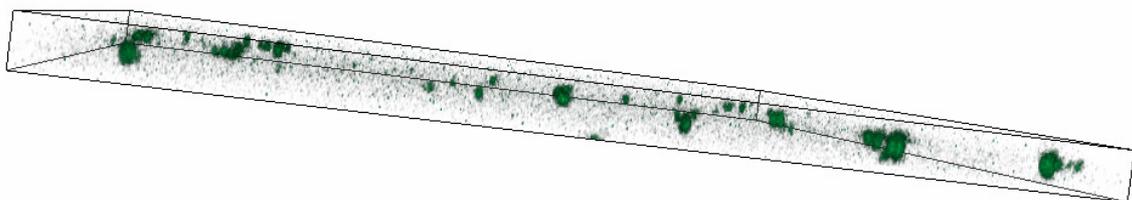


Abbildung 16: 3D-Aufnahme einer eingebetteten Mitochondriensuspension, welche mit MTG gefärbt wurde

Mit Hilfe der qPCR (s. 2.2.8.12.) konnten insgesamt 73% aller einzelnen Mitochondrien ausgewertet werden, die für den Vergleich verschiedener mitochondrialer Farbstoffe abgelegt wurden (s. 2.2.7.1.1.). Abb. 17 zeigt die ΔC_T -Werte der qPCR in einem Box- und Whisker-Plot. Es wird deutlich, dass gefolgt von JC-1 und MTR, bei MTG am wenigsten mtDNA abgelegt wurde.

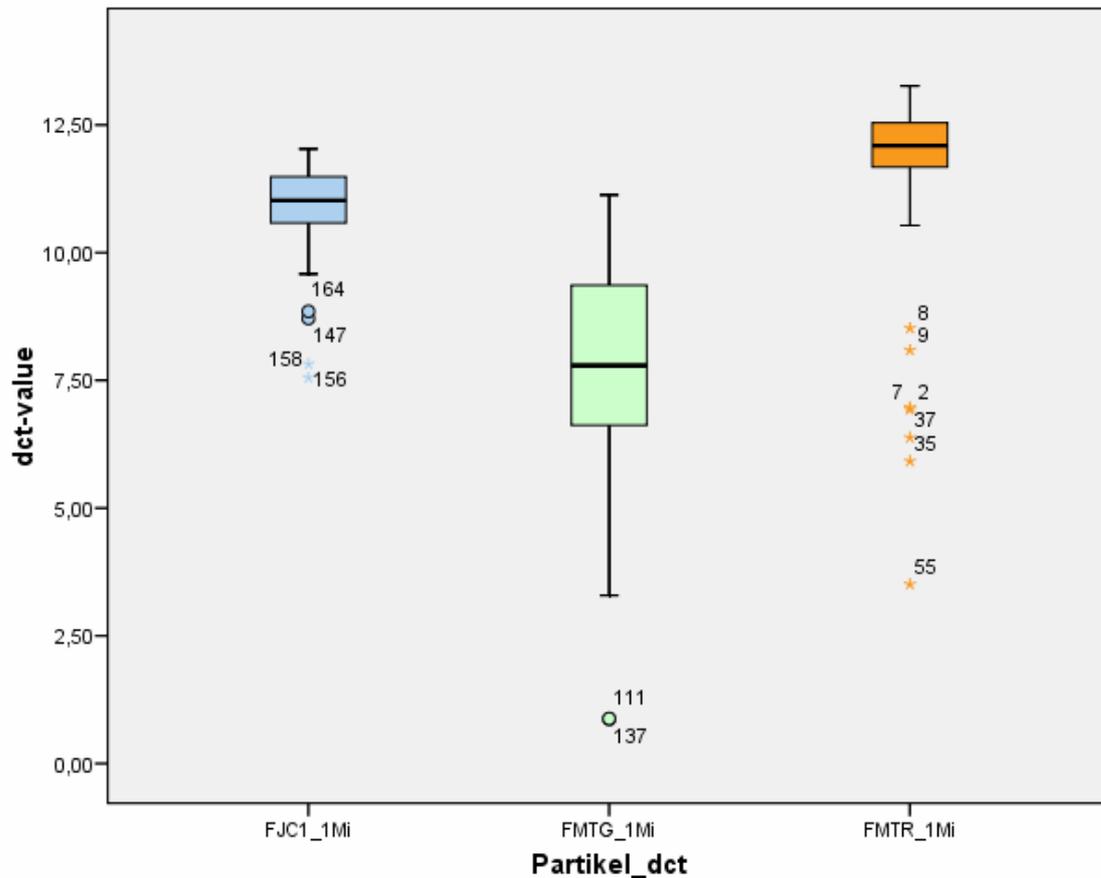


Abbildung 17: Box- und Whisker-Plot von ΔC_T -Werten, die bei einer qPCR Analyse erzeugt wurden. Es wurden jeweils einzelne mitochondriale Partikel untersucht, die mittels FCM abgelegt wurden. Links: JC-1 gefärbte Partikel; mitte: MTG; rechts: MTR gefärbte Partikel. Alle Farbstoffe unterscheiden sich signifikant voneinander ($P < 0,05$).

Durch die Interspezies-Sequenzanalyse (s. 2.2.8.11.a.) konnten ca. 80% aller Proben ausgewertet werden. Insgesamt waren dies 169 Sequenzen. Davon waren 132 reine Sequenzen, die nur murinen (51 Sequenzen) oder porcinen Ursprungs (81 Sequenzen) waren. Die restlichen Sequenzen stellten Mischungen aus beiden Spezies dar. Die geringste Wahrscheinlichkeit für die Ablage von Einzelmitochondrien (W_{max}) wurde für die Färbung mit MTG (60%) ermittelt, gefolgt von MTR (75%) und JC-1 (95%).

Kontrollen:

Zur Kontrolle, dass tatsächlich Mitochondrien für die gemessenen Fluoreszenzsignale verantwortlich sind, wurden alle Farbstoffe ohne Zugabe von Mitochondrien in Storage-Puffer (Qiagen) mittels FCM und Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Bei allen Farbstoffen konnten dabei in geringem Ausmaß messbare Fluoreszenzen detektiert werden.

Die *No-Template*-Kontrollen blieben bei der Sequenzanalyse ohne Befund. In zwei von 216 ausgewerteten Sequenzen konnte jedoch eine (Co)-Amplifikation von humaner DNA

festgestellt werden. Die qPCR-Analyse ergab bei insgesamt 12 *No-Template*-Kontrollen einmal ein positives Signal.

3. 4. Vergleich verschiedener Separationsmethoden

3. 4. 1. FCM: Suche nach den richtigen Einstellungen

Bei der qPCR-Analyse von einzelnen mitochondrialen Partikeln, die aus drei verschiedenen Bereichen (vgl. Abb. 7) abgelegt wurden (s. 2.2.7.1.2.a.), zeigte sich, dass in Bereich III tendenziell am wenigsten mtDNA enthalten ist. Im Bereich I ist weniger mtDNA enthalten als im Bereich II. Bei Verwendung der optimierten Einstellungen für die Ablage von einzelnen Mitochondrien (s. 2.2.7.1.2.b.) konnte insgesamt am wenigsten mtDNA festgestellt werden (s. Abb. 18).

Abbildung 19 zeigt die Abnahme des mtDNA Gehalts von einzelnen mittels FCM abgelegten mitochondrialen Partikeln während der Optimierungen der Einstellungen. Eine weitere Verfeinerung der unter 2.2.7.1.2.b. beschriebenen Einstellungen gelang nicht, da das Gerät die maximale Auflösungsgrenze erreicht hatte.

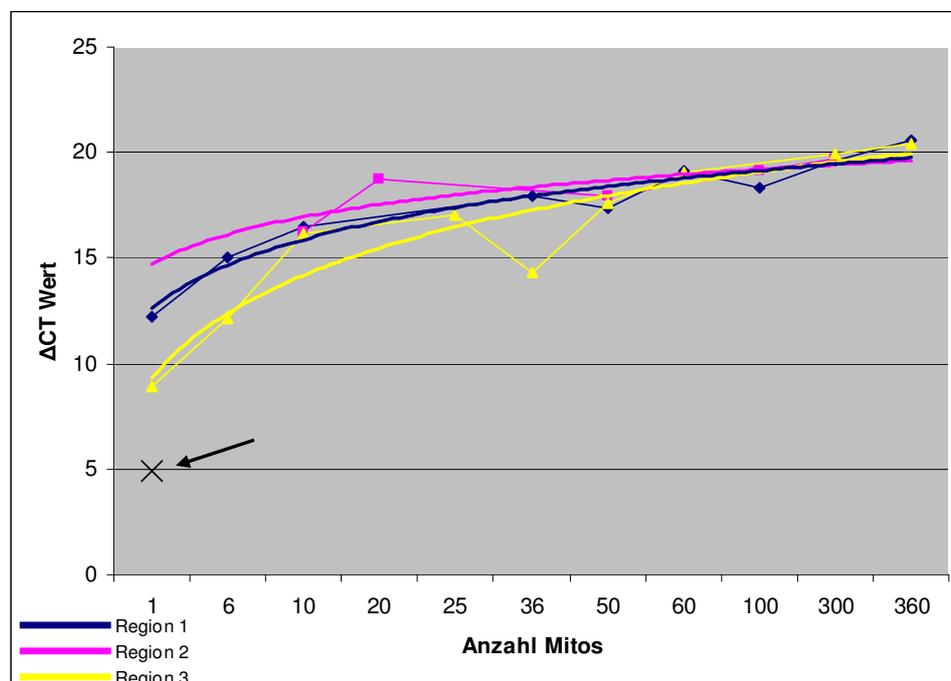


Abbildung 18: Mitochondrien, die mittels FCM abgelegt wurden: Alle Mitochondrien, die aus den Bereichen I-III abgelegt wurden (vgl. Abb. 7), wurden durch die qPCR-Analyse untersucht. Nicht vorhandene Werte wurden interpoliert. Für jeden Datensatz wurde eine exponentielle Trendlinie eingezeichnet. Der Pfeil deutet auf den Datenpunkt für einzelne Mitochondrien, wenn die optimierten Einstellungen (s. 2.2.7.1.2.b.) verwendet wurden.

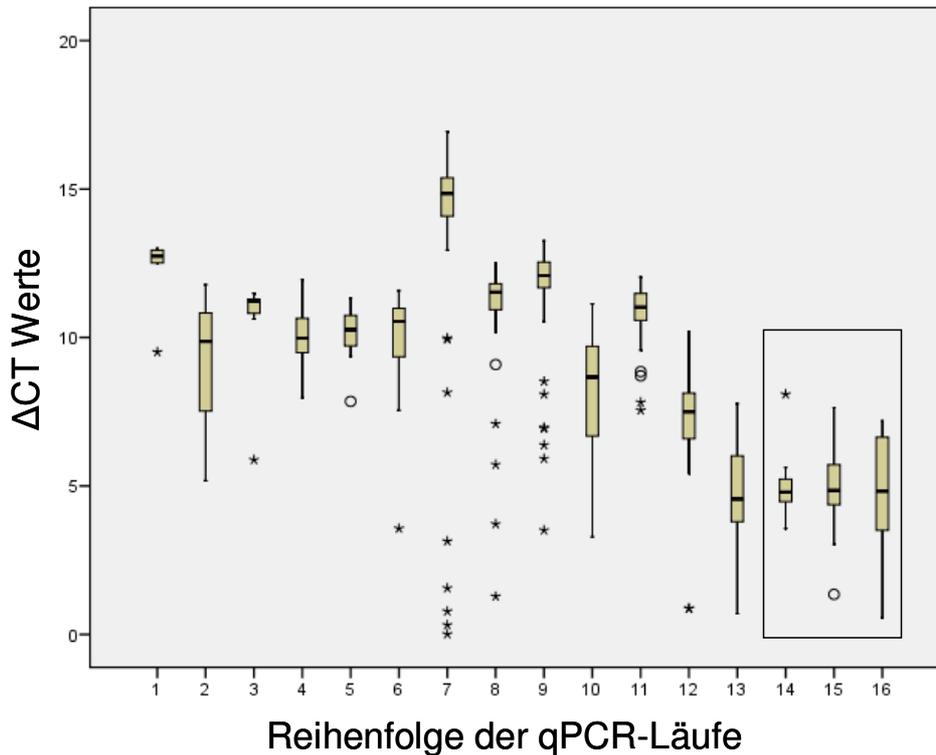


Abbildung 19: ΔC_T -Werte der qPCR: Es sind alle mittels FCM abgelegten mitochondrialen Partikel eingezeichnet, die bei verschiedenen Läufen im Zuge der Optimierung der Einstellungen separiert wurden. Die Läufe sind dabei chronologisch aufgelistet. Die letzten drei Läufe wurden für den Vergleich verschiedener Separationsmethoden verwendet.

Eine qPCR-Analyse von abgelegten mitochondrialen Partikeln aus unterschiedlich verdünnten Mitochondriensuspensionen ergab, dass die mtDNA-Menge mit wachsendem Verdünnungsgrad abnahm (Daten nicht gezeigt). Verdünnungen im Verhältnis von mehr als 1:30 konnten für die FCM nicht verwendet werden. Die dabei detektierte Anzahl von Mitochondrien reichte nicht mehr aus, um damit 96-Well-Platten zu befüllen.

Auch der Einsatz verschiedener Mitochondrienfarbstoffe hatte einen Effekt auf die gemessene mtDNA-Menge (vgl. 3.3.).

3. 4. 2. LCM: Suche nach den richtigen Einstellungen

Die am verwendeten Mikrodisektionsgerät eingebauten Filter waren nicht auf die Emissionsspektren von MTR oder JC-1 abgestimmt. Nur besonders intensive Fluoreszenzsignale, die in das Spektrum eines jeweiligen Filters hineinstrahlten, konnten damit erfasst werden. Durch einen FITC-Filter war das Gerät hingegen optimal für die Detektion von MTG ausgestattet.

Wegen der hydrophoben Oberflächenbeschaffenheit der membranbeschichteten Objektträger konnten alle verwendeten Mitochondrienmedien nur schlecht auf diesen

ausgestrichen werden. Nachteilig war auch, dass die Membranen autofluoreszierende Poren aufwiesen, die mitochondrialen Fluoreszenzsignalen ähnelten. Durch die Verwendung von Glasobjektträgern konnten diese Nachteile umgangen werden: Auf Grund der hydrophilen Oberfläche konnten die Suspensionen leicht ausgestrichen werden und zusätzlich wurden keine Autofluoreszenzen festgestellt.

Durch das Eintrocknen von Mitochondrien, die in PBS oder Storage-Puffer (Qiagen) resuspendiert wurden, kam es zur Kristallisierung von enthaltenem Salz. Bei der Verwendung von Storage-Puffer entstand dabei eine relativ gleichmäßige Salzschrift. Diese erwies sich als hilfreich für das Ausschneiden mit dem Laser. Dennoch mussten die Lasereinstellungen während des Schneidens leicht nachjustiert werden.

Bei Verdünnungsstufen von Mitochondriensuspensionen unterhalb eines Verhältnisses von 1:400 lagen die gemessenen Fluoreszenzsignale zu dicht beieinander, um einzelne Mitochondrien voneinander getrennt auszuschneiden. Bei einem Verdünnungsverhältnis von 1:400 waren die Abstände zwischen den Partikeln ausreichend groß.

Das Beladen des Ampligrids erwies sich als schwierig, da das vorgelegte Wasser (2 µl) schnell verdunstete. Der Slide musste daher oft aus der Halterung genommen werden, um H₂O nachzufüllen. Bei 96-Well-Platten war dies nicht nötig. Das vorgelegte H₂O (20 µl) konnte mehrere Stunden belassen werden, ohne komplett zu verdunsten. Trotz dieser Problematik gelang es, mitochondriale Partikel sowohl auf 96-Well-Platten als auch auf Ampligrid erfolgreich abzulegen und die enthaltene mtDNA zu sequenzieren.

Wegen der vorgestellten Ergebnisse wurden die unter 2.2.7.2.1.b. aufgeführten Einstellungen im Folgenden als optimale Adjustierung für die Ablage von einzelnen Mitochondrien verwendet.

3. 4. 3. OT: Suche nach den richtigen Einstellungen

Bei den OT wurden die Kanäle des 1 µl-bidi-Slide anfänglich nicht mit Wasser sondern mit Storage-Puffer (Qiagen) befüllt. Im Zuge einer Interspezies-Sequenzanalyse (vgl. 2.2.8.11.a.) wurde jedoch festgestellt, dass die hohe Menge an enthaltenem Storage-Puffer PCR-inhibierend wirkt (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden die Mitochondrien vor der Separation in H₂O resuspendiert (vgl. 2.2.7.3.1.a.).

3. 4. 4. Sequenz- und qPCR Analyse einzelner mitochondrialer Partikel

Mit der Interspezies-Sequenzanalyse (s. 2.2.8.11.a.) konnten die mtDNA-Sequenzen von einzelnen abgelegten mitochondrialen Partikeln bei allen verwendeten Separationsmethoden bestimmt werden (s. Tabelle 7). Die Separationsmethoden wurden dabei jeweils mit den optimierten Einstellungen angewandt (vgl. 2.2.7.1.2.b., 2.2.7.2.1.b., 2.2.7.3.1.a.).

Im Einzelnen konnten mit Hilfe der FCM 46,43%, mittels LCM 4,76% und bei Einsatz der optischen Pinzetten 36,0% aller abgelegten mitochondrialen Partikel erfolgreich analysiert werden. Die Sequenzanalyse ergab für die FCM 15 Mischsequenzen (15/117) und für die LCM eine Mischsequenz (1/16). Alle anderen Sequenzen zeigten reine Sequenzen – entweder nur muriner oder porciner Herkunft (s. Abb. 20). So konnte auch bei allen Sequenzen aus Mitochondrien, die mit den OT abgelegt wurden, keine Mischsequenz gefunden werden (0/9).

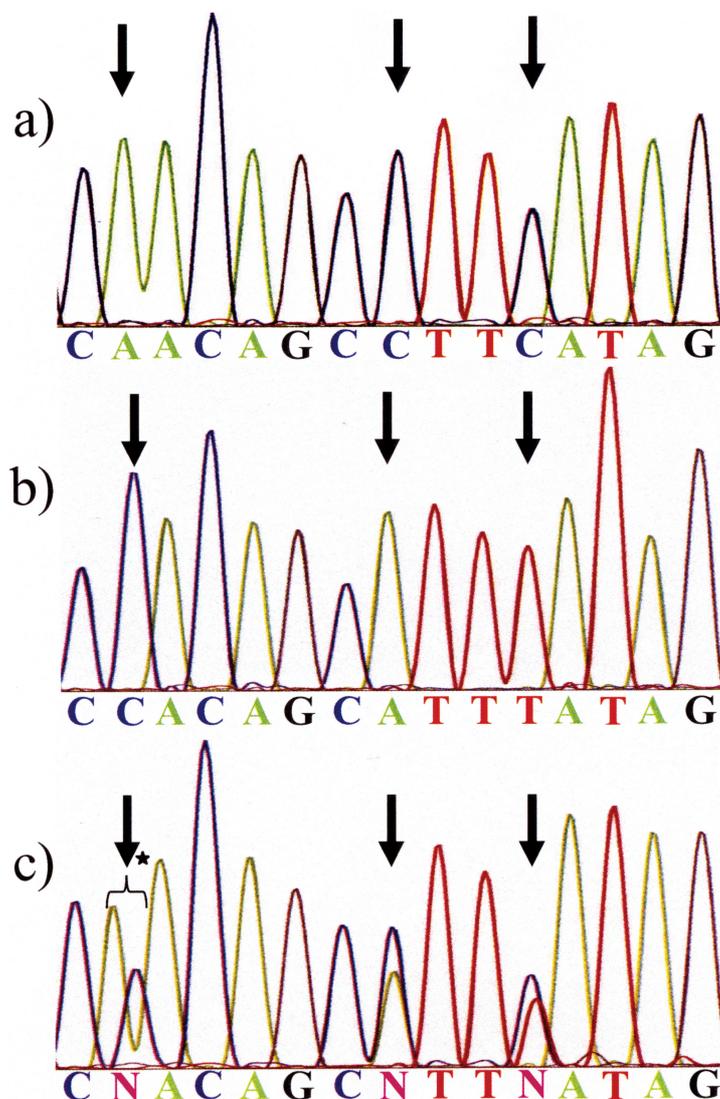


Abbildung 20: Repräsentativer Ausschnitt von Elektropherogrammen, die a) eine reine porcine, b) eine reine murine und c) eine Mischsequenz (porcin/murin) zeigen. Die Pfeile deuten auf Sequenzpolymorphismen, die spezifisch für *Mus musculus* oder *Sus scrofa* sind. Das Sternchen symbolisiert, dass es bei der Mischsequenz zu einem Basenversatz der speziesspezifischen Peaks kommen kann.

Insgesamt waren 48,41% und 51,59% aller reinen Sequenzen entweder murinen oder porcinen Ursprungs. Diese Werte spiegeln ziemlich genau die 1:1-Mischung (murin/porcin) der Mitochondriensuspensionen wider, aus denen die einzelnen Mitochondrien abgelegt wurden. Durch die erfolgreiche Erzeugung dieser 1:1-Mischung konnte eine Berechnung sowohl der W_{max} als auch der durchschnittlich abgelegten Anzahl von Mitochondrien (m) durchgeführt werden (vgl. 2.2.8.11.a.).

Die höchste Wahrscheinlichkeit für die Ablage von Einzelmitochondrien (W_{max}) wurde für die OT berechnet (100%) gefolgt von der LCM (93,75%) und FCM (87,18%) (s. Abb. 21). Dementsprechend wurden durchschnittlich folgende Anzahlen von Mitochondrien pro Well abgelegt (vgl. 2.2.8.10.):

FCM:	$m = 1,2$
LCM:	$m = 1,09$
OT:	$m = 1$

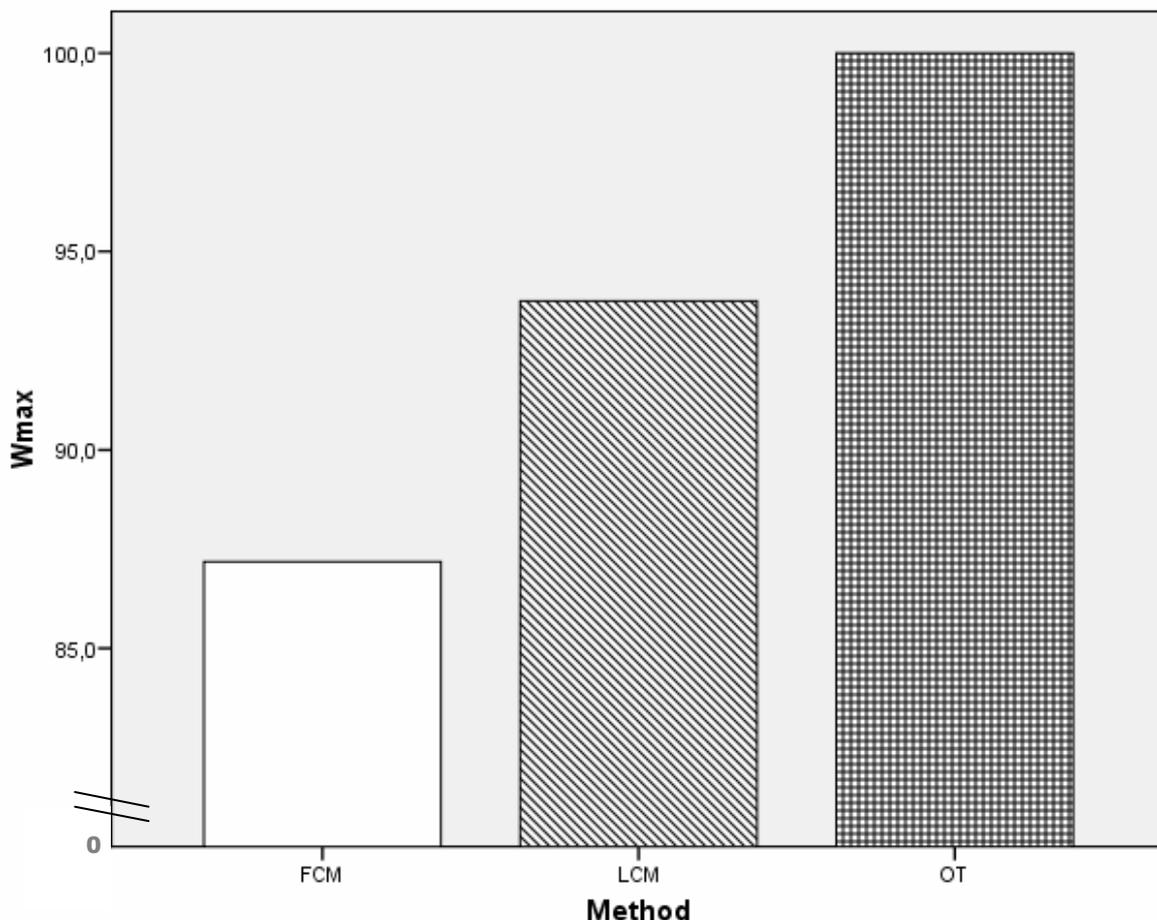


Abbildung 21: Die maximale Wahrscheinlichkeit für die Ablage von einzelnen Mitochondrien (W_{max}) ist gezeigt. FCM: Durchflusszytometrie, LCM: Laser-Mikrodissektion, OT: Optische Pinzette.

Mit Hilfe der qPCR (s. 2.2.8.12.) konnten Signale von abgelegten mitochondrialen Partikeln aller Separationsmethoden erfolgreich ausgewertet werden (s. Tabelle 7).

Der Median des ΔC_T -Wertes war:

FCM: 4,83 (in einem Bereich von 0,57 – 8,09)

LCM: 3,26 (Bereich: 1,45 – 4,93)

OT: 5,39 (Bereich: 3,49 – 7,34)

Gepoolte Ausfallraten waren:

FCM: 65,47%

LCM: 94,9%

OT: 53,85%

Die Verwendung des Mann-Whitney-U-Tests ergab, dass bei mitochondrialen Partikeln, die mit der LCM abgelegt wurden, signifikant weniger mtDNA enthalten ist als bei den anderen Methoden ($P < 0,05$) (Abb. 22). Im Gegensatz dazu konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Mitochondrien festgestellt werden, die mit der FCM oder den OT abgelegt wurden.

Separationsmethode	Analysemethode	x	y	z
FCM	Interspezies-Sequenzanalyse	3	252	117
	qPCR	3	249	56
LCM	Interspezies-Sequenzanalyse	4	336	16
	qPCR	3	252	14
OT	Interspezies-Sequenzanalyse	5	25	9
	qPCR	2	14	9

Tabelle 7: Analysierte einzelne mitochondriale Partikel für den Vergleich verschiedener Separationsmethoden. x: Anzahl verwendeter 96-Well-Platten für die Ablage von Mitochondrien; y: Anzahl bearbeiteter Proben; z: Anzahl erfolgreich analysierter Proben. FCM: Durchflusszytometrie; LCM: Laser-Mikrodissektion; OT: Optische Pinzette.

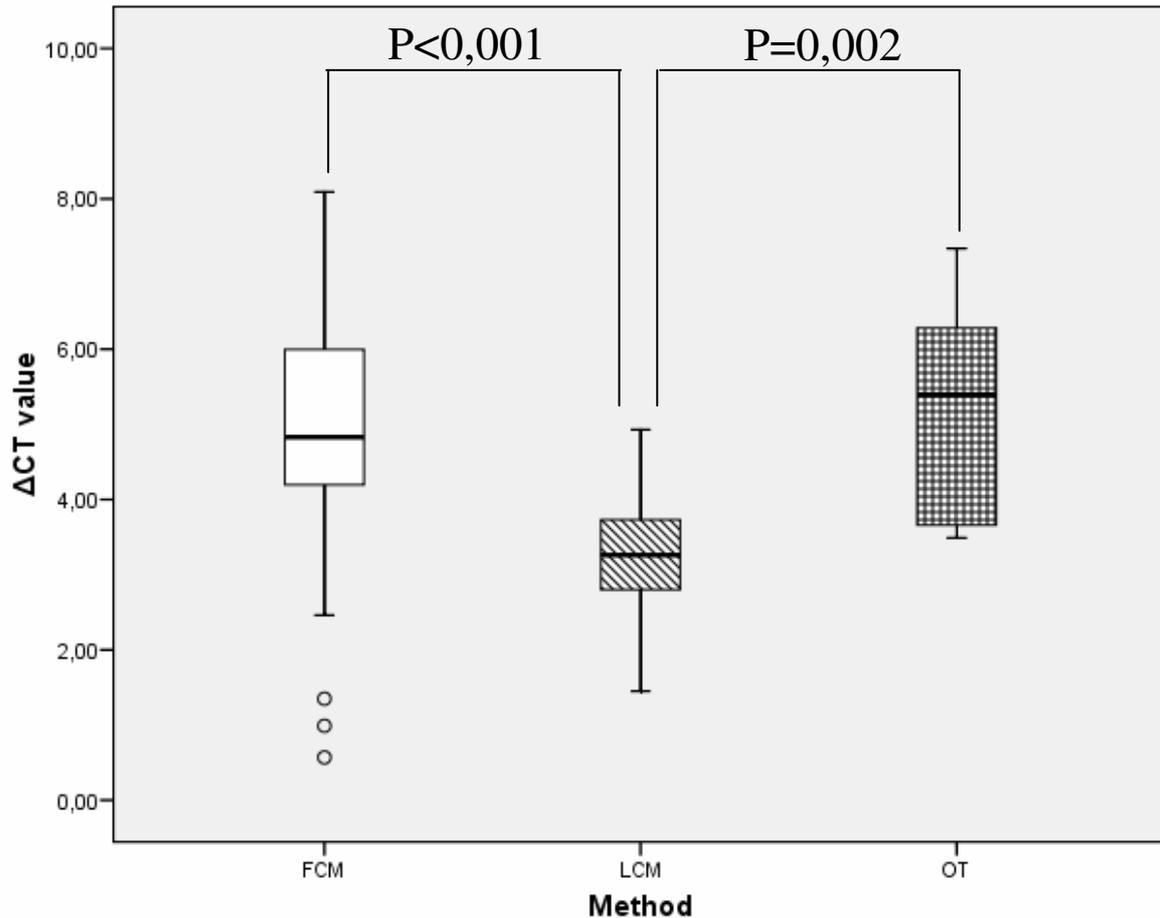


Abbildung 22: Box- und Whisker-Plot von ΔC_T Werten, die bei der qPCR-Analyse zum Vergleich verschiedener Separationsmethoden generiert wurden. Die statistische Signifikanz ist angezeigt. FCM: Durchflusszytometrie; LCM: Laser-Mikrodissektion; OT: Optische Pinzette.

Kontrollen:

Bei den technikbasierten Negativkontrollen (vgl. 2.2.7.1.2.b., 2.2.7.2.1.b. und 2.2.7.3.1.a.) konnten positive Signale sowohl mit der Sequenzanalyse als auch mit der qPCR bei allen Separationsmethoden gemessen werden:

FCM: 37,7%
 LCM: 2,38%
 OT: 1,11%.

Bei der qPCR war die Standardabweichung des C_T -Wertes der *plate-to-plate*-Kontrolle 0,37. Damit lag sie innerhalb der Standardabweichung für C_T -Werte von Mitochondrien aller analysierten Platten.

3. 5. Vergleich von Lymphozyten und Mitochondrien

Ein weiterer Ansatz zur Berechnung der Anzahl der bei der jeweiligen Separationsmethode tatsächlich abgelegten Mitochondrien, ist ein Vergleich der ΔC_T -Werte von Mitochondrien und Lymphozyten.

Im Folgenden werden exemplarisch die ΔC_T -Werte von mitochondrialen Partikeln, die mittels OT abgelegt wurden (s. Abb. 22), mit den ΔC_T -Werten von murinen Lymphozyten verglichen. Diese wurden dazu mit Hilfe der FCM abgelegt (vgl. 2.2.7.1.3.).

Für einzelne murine Lymphozyten ergab sich ein Median ΔC_T -Wert von 8,98, für einzelne murine mitochondriale Partikel von 5,39 (s. Abb. 23). Aus der Differenz der ΔC_T -Werte (3,59) ergibt sich, dass die abgelegten Mitochondrien etwa 1/12 der mtDNA-Menge von Lymphozyten enthalten (vgl. 4.6.3.). Ist die Anzahl von Mitochondrien innerhalb von Leukozyten (L_m) bekannt, kann die Anzahl abgelegter Mitochondrien berechnet werden:

$$m = L_m / 12$$

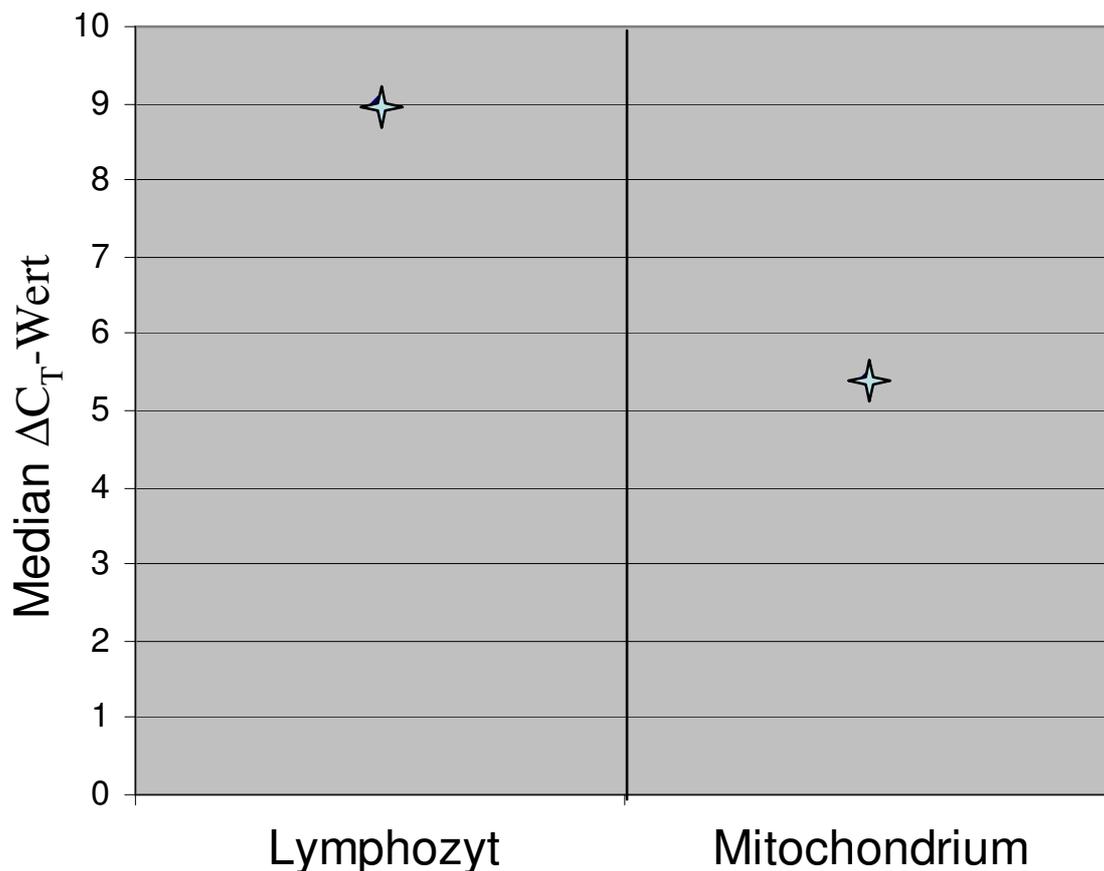


Abbildung 23: ΔC_T -Werte einer qPCR Analyse, bei der mittels FCM abgelegte einzelne Lymphozyten mit einzelnen per OT abgelegten mitochondrialen Partikeln verglichen wurden. Die Differenz der ΔC_T Werte beträgt 3,59.

3. 6. Methoden zur Analyse von Mitochondrien

3. 6. 1. Humane mtDNA: PCR-basierte Methoden

Alle mitochondrialen Partikel, die mit humanen PCR-Systemen analysiert wurden, sind aus Lymphozyten isoliert worden (vgl. 2.2.2.3.b.). Die Mitochondrien wurden anschließend in PBS resuspendiert und mit Hilfe der FCM abgelegt (2.2.7.1.3.b.).

Bei der Verwendung des L29/H381-Systems und der Durchführung von 32 PCR-Zyklen konnten auf Ampligridd in 1 µl Ansätzen Fragmente des humanen mitochondrialen D-Loop erfolgreich amplifiziert werden. Dies gelang für DNA-Konzentrationen von nur 1 pg Gesamt-DNA (Daten nicht gezeigt). Durch eine Erhöhung der Zyklenzahl auf 35 gelang es, aus einzelnen mitochondrialen Partikeln Amplifikate zu erzeugen (s. Abb. 24). Mittels Sanger-Sequenzierung konnten aus allen Amplifikaten Sequenzen erhalten werden, die eindeutig dem humanen mitochondrialen Haplotyp des jeweiligen Probanden zugeordnet werden konnten.

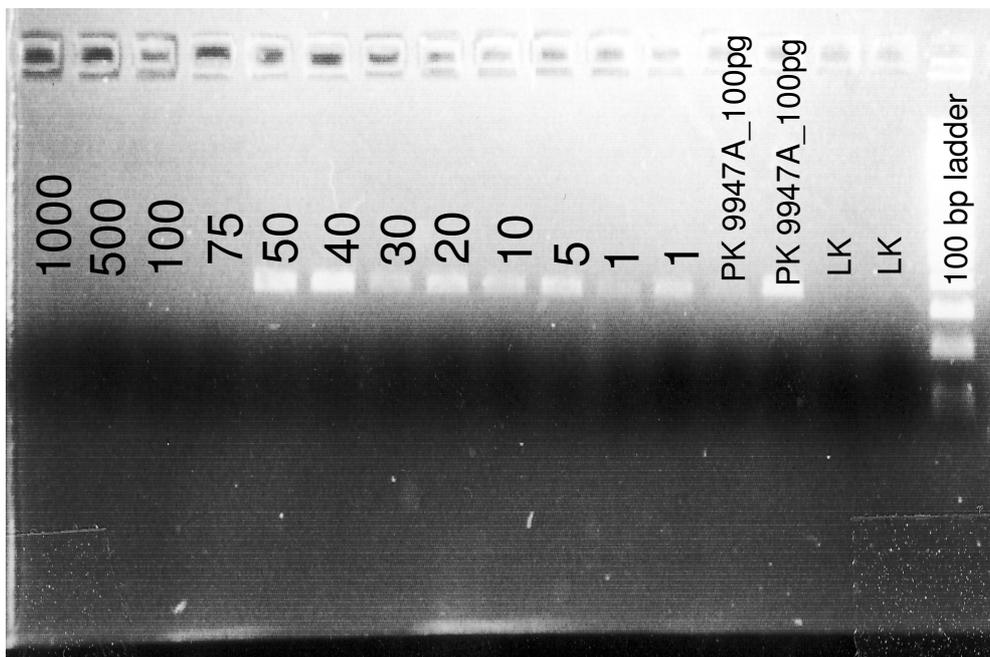


Abbildung 24: 2%iges Agarosegel. Es wurden Amplifikate aufgetragen, die aus einzelnen abgelegten Mitochondrien generiert wurden. Die Mitochondrien wurden dabei mit der Durchflusszytometrie abgelegt. Es wurden Mitochondriensuspensionen verwendet, die aus Lymphozyten abgelegt wurden. Die Zahlen von 1–1000 geben die Anzahl der abgelegten mitochondrialen Partikel an.

Das L29/H381-System wurde zusätzlich für eine Intraspezies-Sequenzanalyse verwendet (s. 2.2.8.11.b.). Für diesen Versuch wurden die Mitochondrien nach der Isolation ausnahmsweise

in Storage-Puffer (Qiagen) resuspendiert und einzelne mitochondriale Partikel mit Hilfe der FCM bei den optimierten Einstellungen (s. 2.2.7.1.2.b.) abgelegt.

Insgesamt konnten bei dieser Analyse 51 Sequenzen (51/84) erfolgreich ausgewertet werden. Zehn davon zeigten eine Mischung beider Probanden, wogegen die anderen Sequenzen nur den Haplotyp eines Probanden aufwiesen. Dabei konnten zehn Sequenzen Proband I und 31 Sequenzen Proband II zugeordnet werden. Auf der Basis dieser Daten wurde eine W_{max} von 80,39% berechnet (vgl. 2.2.8.11.a.). Demzufolge wurden durchschnittlich $m = 1,31$ Mitochondrien pro Well abgelegt.

Mit dem L162/H381-System war es möglich, humane Fragmente aus einzelnen mitochondrialen Partikeln zu amplifizieren und zu sequenzieren. Dazu wurden 35 PCR-Zyklen in 1 μ l Ansätzen auf AmpliGrid durchgeführt (Daten nicht gezeigt).

Bei einer Versuchsreihe mit einer humanen Standard-DNA (9947A) gelang es, bei 38 Zyklen Amplifikate aus 0,1 pg Gesamt-DNA zu erzeugen. Dabei wurde dieser Versuch in 5 μ l Ansätzen auf 96-Well-Platten durchgeführt. Die Proben aus dieser PCR konnten ebenfalls erfolgreich sequenziert werden. Ein exemplarischer Abschnitt einer solchen Sequenz ist in Abb. 25 gezeigt.

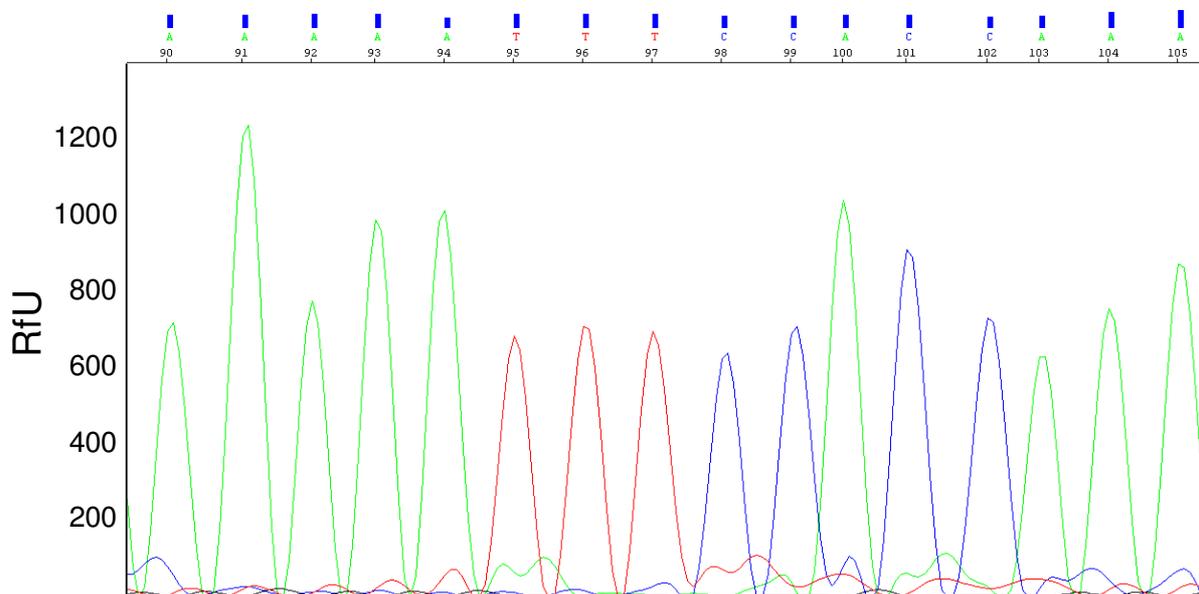


Abbildung 25: Exemplarische Rohdaten eines Sequenzabschnittes der mitochondrialen HVRII. Die Sequenz wurde aus 0,1 pg Gesamt-DNA (9947A) gewonnen.

Neben der Sanger-Sequenzierung wurden auch Minisequenzierungen (s. 2.2.8.7.1.) von einzelnen mitochondrialen Partikeln erfolgreich durchgeführt. Dabei konnten sowohl Amplifikate aus dem L29/H381- als auch aus dem L162/H381-System verwendet werden. Von einzelnen abgelegten mitochondrialen Partikeln aus einer Mitochondrienmischung (1:1) von zwei Probanden (vgl. 2.2.7.1.3.b.) konnten insgesamt sechs Elektropherogramme ausgewertet

werden. Dabei zeigten fünf davon das Profil von nur einer Person, während eines eine Mischung beider Probanden aufwies (s. Abb. 26).

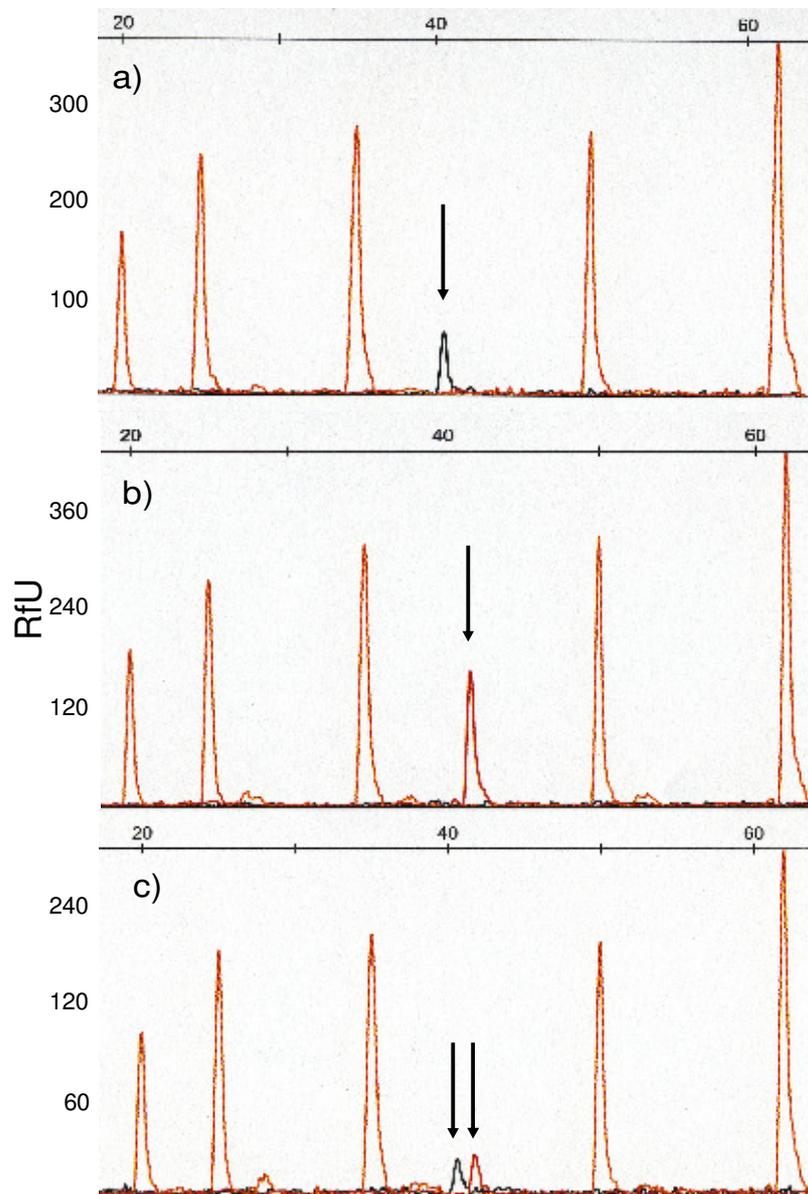


Abbildung 26: Exemplarische Fragmentelektropherogramme von Mini-Sequenzierungen. Es wurden einzelne mitochondriale Partikel aus einer 1:1-Mischung von Mitochondrien zweier Probanden abgelegt, die sich an der sequenzierten Position unterscheiden. Die Mitochondrien wurden aus Lymphozytensuspensionen gewonnen und mittels Durchflusszytometrie abgelegt. a) Profil von Proband I, b) Profil von Proband II, c) Mischprofil (Proband I und II).

Bei der PCR und (Mini-)Sequenzierung traten insbesondere bei der Verwendung von AmpliGrid (Advalytix) einige Schwierigkeiten auf. Die Reaktionen waren nicht regelmäßig reproduzierbar. Häufig fielen Amplifizierungen ohne ersichtlichen Grund aus. Gelegentlich sind die einzelnen Reaktionen innerhalb eines Slides nach dem Pipettieren ineinander gelaufen, wodurch die PCR dieser Proben fehlschlug. Hohe Template-Konzentrationen führten zu Ausfällen in den jeweiligen Proben. Es war z. B. oft nicht möglich, Amplifikate aus mehr als 75 Mitochondrien zu generieren (vgl. Abb. 24). Weiter wurde beobachtet, dass Markierungen

für die Reaktionsräume falsch gesetzt worden waren. Dadurch ergaben sich sowohl Probleme beim Pipettieren der Reaktionsansätze als auch bei der Ablage von Mitochondrien mit einer Separationsmethode.

Kontrollen:

Alle *No-Template*-Kontrollen der hier vorgestellten Versuche blieben sowohl auf einem Agarosegel (s. 2.2.8.5.) als auch bei der automatischen Sequenzierung (s. 2.2.8.9.) ohne Befund. In Vorversuchen wurden jedoch vereinzelt kontaminierte *No-Template*-Kontrollen gefunden.

3. 6. 2. Sequenzanalyse – Allgemeines

Um die beschriebenen PCRs (s. 2.2.8.11.) in ausreichender Sensitivität für die Amplifizierung von einzelnen Mitochondrien durchführen zu können, wurden anfänglich PCR-Programme mit 38 Zyklen angewendet. Bei dieser Zyklenanzahl war es nicht möglich, Sequenzen aus einzelnen mitochondrialen Partikeln zu gewinnen, die mit den OT abgelegt wurden. Erst durch eine Erhöhung der Zyklenzahl auf 45 gelang die Amplifikation.

Kontrollen:

Alle analysierten Sequenzen innerhalb der Interspezies-Sequenzanalyse wurden per Blast-Funktion auf der Seite www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi auf ihre phylogenetische Herkunft untersucht. In den meisten Fällen konnten dabei eindeutig mitochondriale Sequenzen von *Mus musculus*, *Sus scrofa* oder Mischungen beider Spezies identifiziert werden. Insgesamt wurden 53 Mischsequenzen (murin/porcin) in 311 mitochondrialen Partikeln gefunden, die im Rahmen des Vergleichs verschiedener Farbstoffe oder Separationsmethoden ausgewertet wurden.

In seltenen Fällen wurden Sequenzen humanen Ursprungs detektiert. Aus 1327 analysierten Wells war dies 23 mal (1,73%) der Fall.

Bei der Intraspezies-Sequenzanalyse konnten ausschließlich humane Sequenzen detektiert werden.

3. 6. 3. qPCR – Allgemeines und Kontrollen

Exemplarisch wurden murine Amplifikate des K1-K2-Systems sequenziert. Mit Hilfe einer phylogenetischen Suche mit der Blast-Funktion (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) konnten dabei murine mitochondriale 12s rRNA-Sequenzen bestätigt werden (s. Abb. 27).

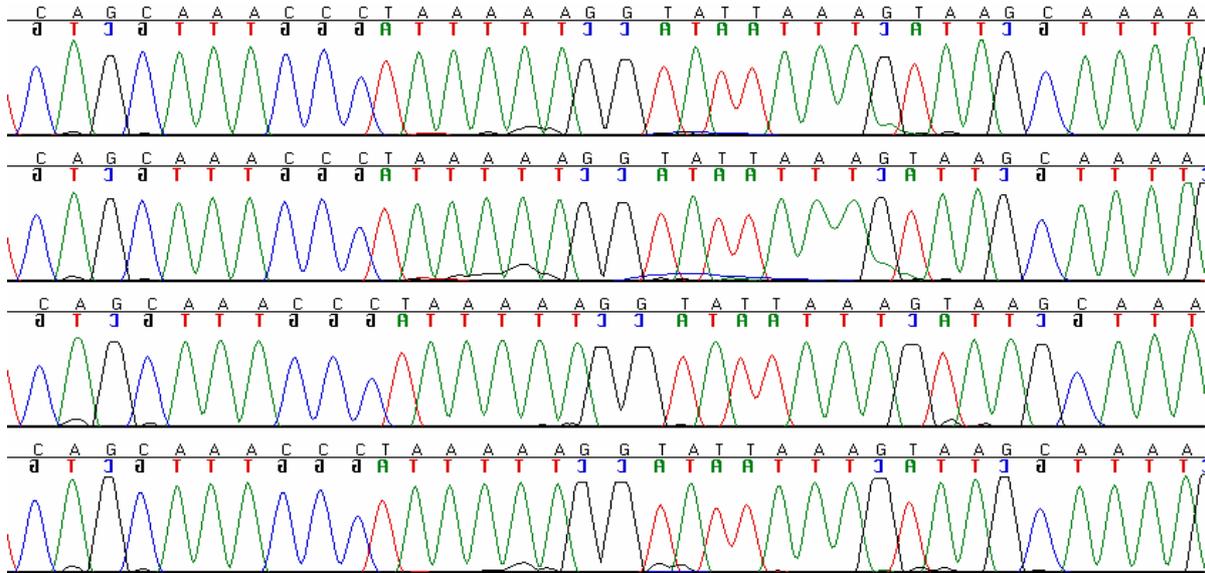


Abbildung 27: Exemplarischer Ausschnitt von murinen PCR-Amplifikaten des K1-K2 Systems. Die Elektroferogramme zeigen einen Sequenzausschnitt des murinen 12s rRNA Genes.

Kontrollen:

Es wurde isolierte Mäuse-DNA (s. 2.2.3.), deren Konzentration mittels Photometrie bestimmt wurde (s. 2.2.9.1.), als Positivkontrolle zur Erstellung einer Standardkurve, zur Berechnung der PCR-Effizienz sowie zur Kalkulation der Standardabweichung der *plate-to-plate* Kontrolle verwendet. Auf jeder analysierten 96-Well-Platte wurde dazu eine Verdünnungsreihe von 1,8 ng/μl bis 1,8 pg/μl in Dubletten angelegt und parallel zum Versuchsansatz analysiert. Alle Verdünnungsstufen der Standardreihe lieferten positive Signale. Die zugehörigen C_T -Werte wurden für die Erstellung einer Standardkurve verwendet (s. Abb.28). Mittels der Standardkurve konnte eine durchschnittliche PCR-Effizienz von 98,84% berechnet werden. Die Standardabweichung der *plate-to-plate* Kontrollen war zwischen den analysierten 96-Well-Platten einer Versuchsreihe immer kleiner als die Standardabweichung zwischen Proben innerhalb einer Platte.

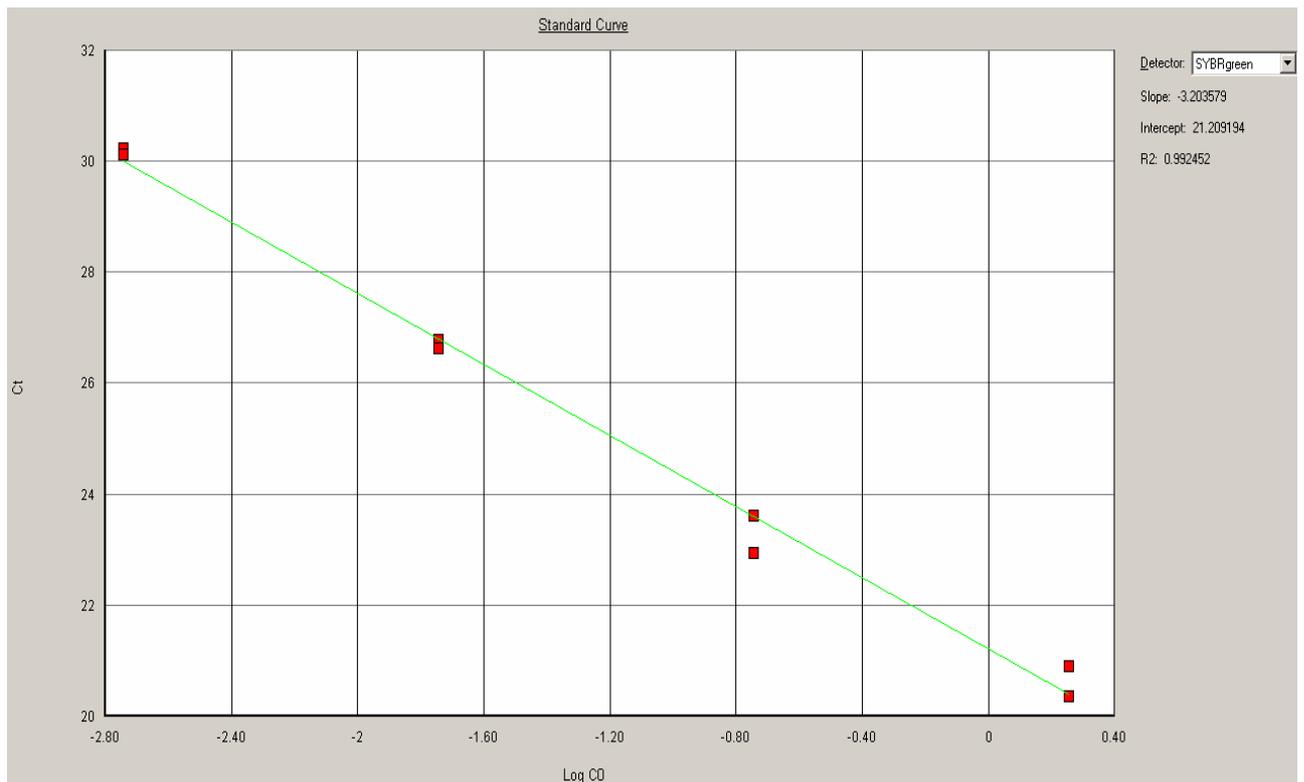


Abbildung 28: qPCR: Eine exemplarische Standardkurve von murinen DNA-Verdünnungen (1,8ng- 1,8pg) ist eingezeichnet.

Die Spezifität der qPCR wurde mit einer Schmelzkurvenanalyse untersucht. Murine Amplifikate (T_m zwischen 73,6 °C and 75 °C) zeigten ein spezifisches Produkt und konnten deutlich von humanen (T_m -Mittelwert von 78,2), porcinen (T_m -Mittelwert von 75,8) oder anderen unspezifischen Produkten unterschieden werden. Abbildung 29 zeigt eine Schmelzkurvenanalyse, in der murine und humane Produkte gebildet wurden.

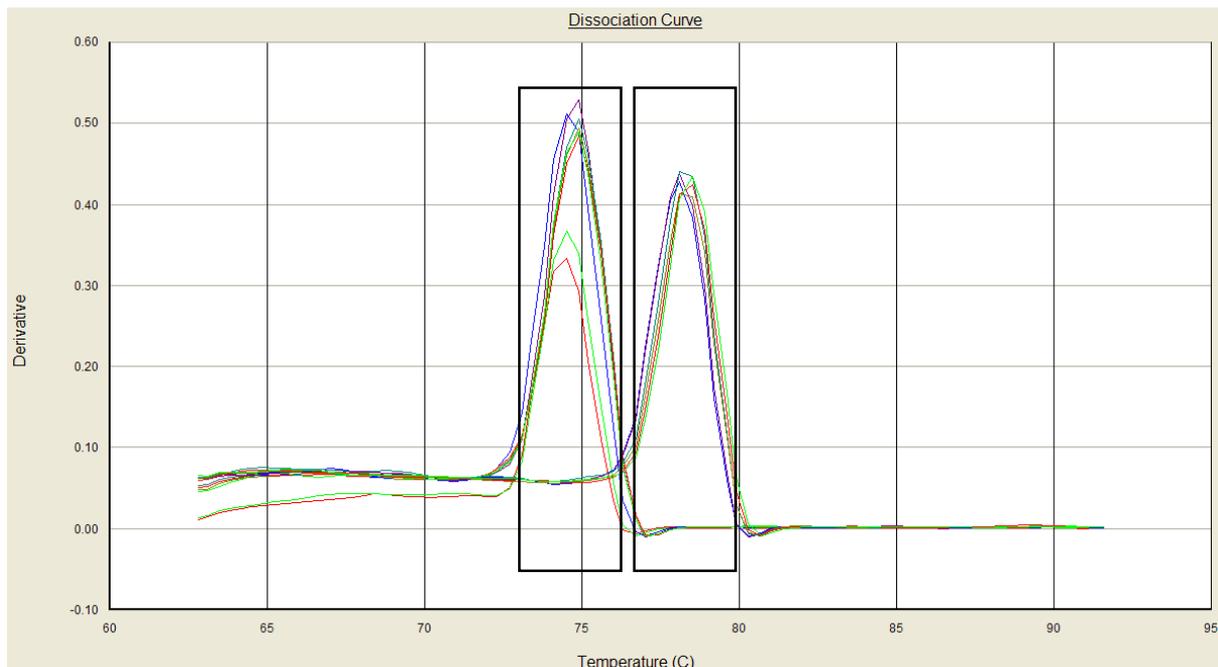


Abbildung 29: Schmelzkurvenanalyse der qPCR: Der linke Kasten zeigt spezifische murine Produkte; der rechte Kasten zeigt humane Amplifikate.

Nur spezifische Daten mit einem C_T von ≤ 40 wurden für die Analysen verwendet (vgl. 2.2.8.12.). Über alle Versuche gepoolt, konnten acht positive Signale aus 268 *No-Template*-Kontrollen detektiert werden. Drei davon hatten einen ΔC_T -Wert zwischen 0,25 und 0,48. Die anderen lagen in einem Bereich zwischen 2,36 und 6,57.

4. Diskussion

4. 1. Isolation von Lymphozyten

Der Hersteller des Isolationsverfahrens mit Leukosep gibt an, dass Lymphozyten und periphere mononukleäre Zellen von Erythrozyten und Granulozyten separiert werden können (www.ebitlog.de).

Mittels Hellfeldmikroskopie konnten in den Isolaten Lymphozyten festgestellt werden. Trypanblau wird nur von abgestorbenen Zellen aufgenommen, die ihre Membranintegrität verloren haben (z. B. Solomon et al. 2010). Da fast alle Lymphozyten blau eingefärbt waren, spricht dies dafür, dass die meisten Zellen nicht mehr vital waren. Diese Tatsache geht wahrscheinlich damit einher, dass zwischen der Blutabnahme, der Isolation und der Färbung der Zellen bis zu zwei Stunden vergingen.

4. 2. Mitochondrienisolationen

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war es, einzelne Mitochondrien getrennt voneinander zu analysieren. Daher werden bereits hohe Ansprüche an die Mitochondrienisolation gestellt:

Die Mitochondrien müssen nach der Isolation in ausreichender Qualität und Quantität sowie in einem hohen Reinheitsgrad vorliegen. Dabei sollte das Mitochondrienisolat frei sein von störenden Kontaminationen, wie ungebundener mtDNA oder nDNA, insbesondere aber von unaufgebrochenen Zellen. Sind diese nach der Mitochondrienisolation noch vorhanden, können sie in allen Folgeversuchen wie etwa der qPCR oder der Sequenzanalyse stören. Wenn bei der qPCR anstelle einzelner Mitochondrien fälschlich abgelegte Zellen analysiert werden, führt dies zwangsläufig dazu, dass der mtDNA Gehalt einzelner Mitochondrien überschätzt wird. In einem Lymphozyten sind beispielsweise etwa zwölf Mitochondrien enthalten (vgl. Tabelle 8). Der mtDNA-Gehalt von einzelnen Mitochondrien würde folglich um das Zwölfwache überschätzt. Bei der Sequenzanalyse hingegen kann die Ablage von ganzen Zellen in einer erhöhten Anzahl von reinen Sequenzen resultieren.

Um eine optimale Isolationsmethode zu finden und so einen hohen Reinheitsgrad der Mitochondrienisolate sicherzustellen, wurden drei verschiedene Kits von verschiedenen Herstellern miteinander verglichen. Die Kits wurden dabei an dem Anteil von Zellen bemessen, die während der Isolation nicht aufgebrochen wurden. Lymphozyten können nach einer Trypanblaubehandlung mit mikroskopischen Techniken leicht detektiert werden. Daher dienten Lymphozytensuspensionen als Ausgangsmaterial für den Vergleich der Isolationskits.

Nur bei der Verwendung des *Qiagenkits* (s. 2.2.2.3.) konnten keine Lymphozyten in der Mitochondrienfraktion gefunden werden. Bestandteile dieser Isolationsmethode sind sowohl ein chemischer Aufschluss – in Form eines Lyse-Puffers – als auch ein mechanischer Aufbruch der Zellen (26G Spritze oder Dounce Homogenizer).

Bei der Verwendung des *Piercekits* (s. 2.2.2.2.) konnten nach der Isolation am meisten Lymphozyten nachgewiesen werden. Bei dieser Methode wird im Wesentlichen nur mit chemikalischen Mitteln versucht, einen Zellaufbruch zu erzielen.

Nach der Isolation mit dem *Mitosciencekit* (s. 2.2.2.1.) konnten nur relativ wenige Lymphozyten detektiert werden. Bei dieser Isolationsmethode findet ein mechanisches Aufbrechen der Zellen mit einem Dounce-Homogenizer statt. Ob und inwieweit ein chemischer Zellaufschluss erfolgt, wird vom Hersteller nicht spezifiziert (www.mitosciences.com).

Der Umstand, dass sowohl mit dem *Piercekit* als auch mit *Mitosciencekit* ein unvollständiger Zellaufbruch stattfindet, scheint auf dem Verzicht eines chemischen oder mechanischen Zellaufschlusses zu beruhen. Da diese Kits jedoch nicht explizit für die Isolation der Mitochondrien aus Lymphozyten konzipiert wurden, ist es theoretisch möglich, dass zellspezifische Eigenschaften der Lymphozyten (z. B. Zellgröße etc.) den Zellaufbruch blockieren.

Auch wenn der *Qiagenkit* ebenfalls nicht speziell für die Mitochondriengewinnung aus Lymphozyten ausgewiesen ist, scheint die Kombination aus dem chemischen und dem mechanischen Zellaufschluss die beste Voraussetzung zu sein, zellfreie Mitochondrienfraktionen zu erhalten.

In dem Vergleich der Isolationskits wurde der *Qiagenkit* als die optimale Methode befunden und für alle weiteren Isolationen – auch aus Lebergewebe – eingesetzt. Die Versuche mit den anderen Kits hingegen wurden weitgehend eingestellt.

Um zu prüfen, ob die Qualität der Mitochondrien, die mit dem *Qiagenkit* isoliert werden, gesteigert werden kann, wurden zwei Varianten des *Qiagenkits* angewendet (Variante I und II). Insbesondere die in Variante II vorgesehene Ultrazentrifugation sollte dabei der Qualitätssteigerung der Mitochondrienfraktion dienen.

Durch EM-Aufnahmen konnten in den Mitochondrienisolaten aus porcinem Lebergewebe, die mit beiden Varianten des *Qiagenkits* generiert wurden, Partikel mit intakter Doppelmembran nachgewiesen werden. Innerhalb der Partikel sind Faltungen der Membran zu erkennen (Cristae), die unter anderem ein Bestandteil von Lebermitochondrien sind (z. B. Riede und Rohr 1971). Die Größe der Partikel variierte zwischen einem Durchmesser von 0,5 µm und 2,5 µm.

Diese Angaben stimmen mit der Fachliteratur weitgehend überein, die von einer Mitochondriengröße zwischen 0,5 µm und 5 µm ausgeht (Whittaker und Danks 1978). Leichte Variationen der Größe können entweder durch verschiedene Osmolaritäten der verwendeten Isolationspuffer (Muscatello et al. 1972) oder durch zellspezifische Anpassungen der Mitochondrien entstehen. Plecítá-Hlavatá et al. (2008) konnten beispielsweise zeigen, dass die mitochondriale Morphologie vom Energiestatus der Zelle beeinflusst wird. Die Größe der Mitochondrien kann zudem zwischen verschiedenen Zelltypen variieren (z. B. Plattner und Hentschel 2006).

Bei den kleinen zirkulären Strukturen mit einem Durchmesser von 0,1 – 0,3 µm handelt es sich wahrscheinlich um Mitochondrien, die bei der Präparation tangential angeschnitten wurden. Insgesamt beurteilt, scheinen alle elektronenmikroskopisch dargestellten Strukturen mitochondrialen Ursprungs zu sein.

Gemessen an dem Vorhandensein von Partikeln mit intakter Doppelmembran, scheinen beide Varianten des *Qiagenkits* in gleicher Weise geeignet zu sein, Mitochondrien zu isolieren. Sowohl die Belastung durch die hohen Zentrifugationsgeschwindigkeiten als auch die längere Dauer der Isolation können ein Grund dafür sein, dass der erwartete Qualitätsgewinn durch die Ultrazentrifugation nicht erreicht wurde.

Durch die *Qiagenkit-Variante 1* können intakte Mitochondrien – ohne zusätzlichen Zeitaufwand in Form einer Ultrazentrifugation – isoliert werden. Dabei wird ein vollständiger Zellaufbruch erreicht und dadurch die Gefahr einer zellulären Kontamination eliminiert. Die *Qiagenkit-Variante 1* scheint insgesamt beurteilt eine optimale Voraussetzung dafür zu sein, einzelne Mitochondrien zu separieren und deren DNA zu analysieren.

4. 2. 1. Verschiedene Ausgangsmaterialien

Mit der EM konnten keine Mitochondrien aus Lymphozyten nachgewiesen werden. Die EM-Aufnahmen (Abb. 10) zeigen stattdessen unbekannte zellartige Strukturen, die vereinzelt gefunden wurden. Dabei handelt es sich möglicherweise um verschiedene Bakterienspezies oder um Hefepilze, die als typische Laborkontaminationen bekannt sind. Wahrscheinlich war eine Lösung, die bei der Präparation der Mitochondrien verwendet wurde, kontaminiert.

In Mitochondrienisolaten aus Lebergewebe hingegen konnten überwiegend intakte Mitochondrien gefunden werden.

Die Tatsache, dass nur in Isolaten aus Lebergewebe Mitochondrien detektiert werden konnten, beruht wahrscheinlich darauf, dass Leberzellen deutlich mehr Mitochondrien enthalten als Lymphozyten. Bei Leberzellen sind ca. 1.000–2.000 Mitochondrien in einer Zelle vorhanden

(Alberts et al. 2002), während es bei Lymphozyten nur etwa zwölf sind (vgl. Tabelle 8). Zudem gelten Mitochondrien aus Lymphozyten als besonders klein (persönliche Mitteilung: Prof. Dr. V. Herzog, Universität Bonn). Die Lymphozytenmitochondrien wurden im Gegensatz zu den Lebermitochondrien nach der Isolation nicht in Storage-Puffer (Qiagen), sondern in PBS resuspendiert. Es ist daher möglich, dass die Mitochondrien auf Grund der Wirkung von PBS beschädigt werden und sich dadurch dem elektronenmikroskopischen Nachweis entzogen (vgl. 4.2.2.).

Ein weiterer Grund für den misslungenen Versuch, Lymphozytenmitochondrien mittels EM darzustellen, liegt darin begründet, dass diese im Gegensatz zu den Lebermitochondrien vor der EM-Präparation mit der FCM sortiert wurden (vgl. 2.2.7.1.3.b.). Durch das Sortieren nimmt die relative Konzentration der Mitochondrien pro Volumeneinheit ab:

Einerseits wurden 100 µl PBS Puffer in die Ziektubes vorgelegt, andererseits werden nicht alle in einer Suspension enthaltenden Partikel durch die FCM erkannt und sortiert.

Möglicherweise war also die Konzentration der Lymphozytenmitochondrien zu niedrig, um diese elektronenmikroskopisch nachweisen zu können.

Um zu prüfen, ob eine niedrige Konzentration der Mitochondrien für den fehlgeschlagenen Nachweis verantwortlich war, wurden zusätzlich Mitochondriensuspensionen verwendet, die direkt nach der Isolation aus Lymphozyten – ohne Sortierschritt – für die EM präpariert wurden. Die Mitochondrien wurden dafür allerdings nicht mit einer *Qiagenkit-Variante*, sondern mit dem *Mitosciencekit* (s. 2.2.2.1.) isoliert.

In den Isolaten des *Mitosciencekits* konnten ebenfalls keine Mitochondrien detektiert werden. Folglich scheint nicht ausschließlich die niedrige Konzentration der Lymphozytenmitochondrien für die fehlgeschlagene EM-Analyse verantwortlich zu sein. Vielmehr scheint es sich um eine Kombination verschiedener Faktoren zu handeln (Anzahl und Größe der Lymphozytenmitochondrien, Osmolarität des Resuspensionspuffers, Konzentration).

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass Mitochondrien unter idealen Bedingungen aus Lymphozyten isoliert und mittels EM nachgewiesen werden können.

Auf Grund der hohen Anzahl von Mitochondrien in Leberzellen und wegen des erfolgreichen elektronenmikroskopischen Nachweises wurde schließlich nur mit Lebergewebe als Ausgangsmaterial gearbeitet. Die Isolationen aus Lymphozyten wurden hingegen weitgehend eingestellt.

4. 2. 2. Medien zur Resuspension von Mitochondrien

Mitochondrien werden bei der Isolation aus ihrer natürlichen Zellumgebung entfernt. Aus diesem Grund ist es wichtig, die Mitochondrien in einem Puffer zu resuspendieren, welcher der zellulären Osmolarität entspricht. Puffer für Mitochondrien werden deshalb in der Regel mit osmotisch wirksamen Substanzen z. B. Sucrose oder anderen Kohlenhydraten vergleichbarer Größe versetzt. Um den Einfluss des Puffers auf die Integrität der Mitochondrien zu klären, wurden die Mitochondrien in PBS, Storage-Puffer (Qiagen) oder in Sucrose-Puffer (Cavelier et al. 2000) resuspendiert.

Gefärbte Mitochondrien, die in PBS resuspendiert wurden, zeigten häufig diffuse Fluoreszenzbilder (vgl. Abb. 11). Eine Erklärung hierfür ist, dass PBS keine osmotisch wirksamen Kohlenhydrate beinhaltet und es daher hypoosmotisch auf die Mitochondrien wirkt. Es ist davon auszugehen, dass die Mitochondrien durch den entstehenden osmotischen Stress morphologische Veränderungen durchmachen. Wahrscheinlich erfolgt eine Aufhebung der Membranintegrität, wodurch angefärbte mitochondriale Proteine aus den Mitochondrien entlassen werden können.

Bei der Verwendung des Storage- oder des Sucrose-Puffers wurden die beschriebenen diffusen Fluoreszenzsignale nicht beobachtet. Sowohl der Sucrose- als auch der Storage-Puffer enthalten osmotisch wirksame Kohlenhydrate, die im Falle des Storage-Puffers massenspektrometrisch nachgewiesen werden konnten (die genaue Zusammensetzung wird aus rechtlichen Gründen nicht benannt). Offenbar verhindert die Osmolarität der Puffer eine Aufhebung der Membranintegrität, so dass ein Austritt von mitochondrialen Proteinen unterbleibt.

Mitochondrien, die in Sucrose- oder in Storage-Puffer resuspendiert wurden, zeigten auf EM-Aufnahmen runde, sphärische Formen.

Solche Strukturen wurden bereits von Muscatello et al. (1972) beschrieben, die an Mitochondrienisolaten aus Ratten forschten. Die Gruppe zeigte, dass die Osmolarität des Resuspensionsmediums einen Einfluss auf die Morphologie von isolierten Mitochondrien hat. Bei einer Konzentration von 0,25 M Sucrose lagen die Mitochondrien – im Gegensatz zu den sonst üblichen tubulären Strukturen – in der auch hier aufgefundenen sphärischen Form vor. Der in dieser Studie verwendete Sucrose-Puffer enthielt ebenfalls 0,25 M Sucrose. Bemessen an der sphärischen Morphologie der Mitochondrien, die in Storage-Puffer resuspendiert wurden, scheint dieser Puffer offenbar osmotisch wirksame Kohlenhydrate in ähnlicher Konzentration zu beinhalten.

Bei EM-Untersuchungen konnten wir eine verbesserte Integrität der in Storage-Puffer (Qiagen) resuspendierten Mitochondrien im Vergleich zum Sucrose-Puffer (Cavelier et al. 2000) beobachten. Welche Pufferbestandteile dafür im einzelnen verantwortlich sind, bleibt unklar.

Auf Grund der guten Qualität der Mitochondrien, die in Storage-Puffer (Qiagen) resuspendiert werden, wurde dieser Puffer in allen Folgeversuchen als Medium verwendet.

Bei Versuchen, die mit den OT durchgeführt wurden, mussten Mitochondrien zuvor in H₂O resuspendiert werden. Dabei konnte ein Anschwellen der Mitochondrien beobachtet werden. EM-Aufnahmen, die in der Arbeit von Caplan und Greenawalt (1966) vorgestellt werden, zeigen ebenfalls in H₂O resuspendierte Mitochondrien. Es entstehen dabei so genannte „mitochondrial ghosts“. Dies sind Mitochondrien, bei denen sich die äußere Membran auf Grund eines osmotisch bedingten Wasser-Einstroms ablöst, während die innere Membran intakt bleibt. Die in H₂O befindlichen Mitochondrien zeigten in unseren Versuchen eine dauerhafte Größenzunahme. Diese scheint dadurch zu entstehen, dass die äußere Membran nach dem Ablösen an die innere gebunden bleibt und daraus eine Volumenzunahme resultiert. Obwohl H₂O so wie PBS keine osmotisch wirksamen Kohlenhydrate enthält, konnten im Gegensatz zu PBS bei der Verwendung von H₂O als Resuspensionsmedium keine großflächigen Fluoreszenzsignale beobachtet werden. Der Grund für die unterschiedlichen Fluoreszenzeigenschaften der Mitochondrien in diesen beiden Medien bleibt unklar.

4. 2. 3. Reinheit der Mitochondrienisolate

Ein hoher Reinheitsgrad der isolierten Mitochondrien ist nicht nur dahingehend wichtig, dass keine Zellen mehr enthalten sind, sondern auch, dass möglichst keine anderen Störfaktoren für die Folgeapplikationen vorhanden sind. Dazu zählen z. B. Kontaminationen, wie extramitochondriale mtDNA oder nDNA.

Dass Zellen als Kontaminationsquelle in den Mitochondrienisolaten des Qiagenkits auszuschliessen sind, konnte gezeigt werden (vgl. 3.2. und 4.2.). Ein weiterer Beweis dafür wurde durch einen FCM-basierten Vergleich von Lymphozytensuspensionen vor und nach der Isolation der Mitochondrien ersichtlich: Nach der Isolation der Mitochondrien konnte die Zellfraktion nicht mehr detektiert werden (vgl. 3.2.3.).

Eine Kontamination mit freier mtDNA kann dazu führen, dass diese bei den eingesetzten Separationsmethoden zusammen mit den Mitochondrien abgelegt wird. Folgeanalysen wie die qPCR würden dann mehr DNA detektieren, als tatsächlich in einem Mitochondrium enthalten ist. Bei der Sequenzanalyse käme es bei Verwendung von Material verschiedener mütterlicher Linien oder unterschiedlicher Spezies zu einer Überrepräsentation von Mischsequenzen.

Durch die qPCR-Analyse konnte gezeigt werden, dass in Überständen von Mitochondrienisolaten, die nach einer Pelletierung der Mitochondrien entnommen wurden, mtDNA enthalten ist. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um freigesetzte mtDNA. Diese wird möglicherweise während des mechanischen Zellaufschlusses aus den Mitochondrien entlassen. Die dort entstehenden Scherkräfte führen nicht nur zum Aufbruch der Zellen, sondern können auch die Mitochondrien beschädigen, so dass diese ihren Inhalt freisetzen. Alternativ dazu ist es vorstellbar, dass einige Mitochondrien nach der Pelletierung wieder in Lösung gehen. Es ist daher nicht auszuschließen, dass ganze Mitochondrien und nicht nur freie mtDNA mit dem Überstand abgelegt und analysiert wurden.

Bei der qPCR-Analyse von einzelnen mitochondrialen Partikeln, die mit Hilfe der FCM abgelegt wurden, zeigte sich, dass in Partikeln aus verdünnten Mitochondrienfraktionen weniger mtDNA gefunden wird als in Partikeln aus unverdünnten Isolaten. Unter der Annahme, dass bei der FCM eine Co-Ablage von ganzen Mitochondrien nicht erfolgt, spricht dieses Ergebnis für das Vorhandensein von freier mtDNA, die mit den Mitochondrien abgelegt wird. Durch das Verdünnen der Mitochondrienlösungen wird die Konzentration freier mtDNA herabgesetzt und die Wahrscheinlichkeit einer Co-Ablage offensichtlich geringer.

Mittels DNase-Behandlung von Mitochondriensuspensionen sollte freie DNA eliminiert werden. In mitochondrialen Partikeln, die mit Hilfe der FCM aus DNase-behandelten Suspensionen abgelegt wurden, konnte mittels qPCR weniger mtDNA detektiert werden als in solchen aus unbehandelten Lösungen.

Zwei mögliche Gründe kommen für diesen Befund in Betracht. Erstens: Bei unbehandelten Lösungen findet eine Co-Ablage von Mitochondrien und freier mtDNA statt. Durch die DNase-Behandlung wird eine solche Co-Ablage – durch den Abbau der freien mtDNA – verhindert. Zweitens: Bereits bei unbehandelten Lösungen werden ausschließlich Mitochondrien (ohne weitere freie mtDNA) abgelegt, und durch die DNase wird auch ein Teil der in den Mitochondrien befindlichen mtDNA abgebaut. Welche dieser Möglichkeiten tatsächlich zutrifft, bleibt unklar.

Ein weiteres Phänomen konnte durch die DNase-Behandlung von Mitochondriensuspensionen festgestellt werden. Der Anteil positiv gefärbter Mitochondrien wird in einer Lösung deutlich

vermindert. Der Grund dafür ist wahrscheinlich, dass während der Inaktivierung der DNase (vgl. 2.2.10.1.) die Mitochondrienintegrität beschädigt wird.

Insgesamt gesehen scheint das Vorgehen, die Mitochondriensuspensionen vor einer Ablage zu verdünnen, der sicherste Weg zu sein, um das Problem freier mtDNA weitgehend in den Griff zu bekommen, ohne die Integrität der Mitochondrien zu beeinträchtigen.

Eine Kontamination durch nDNA kann dazu führen, dass bei der PCR neben dem eigentlichen Target zusätzlich mitochondriale Pseudogene amplifiziert werden. Dabei handelt es sich um nichtfunktionale mtDNA Sequenzen, die in die nukleäre DNA integriert wurden (Woischnik und Moraes 2002). Eine Co-Amplifikation dieser DNA mit der eigentlichen mtDNA kann zu einer Fehlinterpretation der Ergebnisse der Folgeanalysen führen (z. B. Yao et al. 2008).

Nukleäre DNA (nDNA) konnte in geringen Mengen in Mitochondrienisolaten nachgewiesen werden. Dieser Sachverhalt stört jedoch nicht weiter, da alle Amplifikate, die mit den verwendeten Primern (s. Tabelle 5) generiert wurden, mit Hilfe einer phylogenetischen Suche (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) als mitochondriale Sequenzen bestätigt wurden. Zudem wird durch die praktizierte Verdünnung der Mitochondrien vor der Ablage neben freier mtDNA auch die Konzentration von nDNA verringert. Da durch die Separation der Mitochondrien, wie hier exemplarisch bei der FCM getestet, der Anteil von DNAs weiter reduziert werden konnte, sind Kontaminationen durch freie mtDNA und nDNA weitgehend zu vernachlässigen.

4. 3. Mitochondrienfärbungen

In allen Mitochondrienisolaten, die mit den verschiedenen mitochondrialen Farbstoffen inkubiert wurden, konnten mikroskopisch deutliche Fluoreszenzsignale festgestellt werden. Es ist daher von einer erfolgreichen Inkorporation der Farbstoffe in die Mitochondrien auszugehen.

Anhand des Durchmessers von insularen Fluoreszenzpunkten, die bei MTG-gefärbten Mitochondrien detektiert werden konnten (1–3 μm), ist davon auszugehen, dass tatsächlich einzelne Mitochondrien und nicht ganze Netzwerke von Mitochondrien gefärbt wurden, wie sie innerhalb von Zellen vorkommen (z. B. Xu et al. 2005, Frazier et al. 2006). In der Fachliteratur wird passend dazu der Durchmesser von Mitochondrien mit 0,5–5 μm angegeben (Whittaker und Danks 1978). Auch dreidimensionale Aufnahmen mittels konfokaler Mikroskopie zeigen, dass MTG-gefärbte Mitochondrien überwiegend als insulare Partikel

vorliegen. Neben den punktuellen Fluoreszenzsignalen von 1–3 µm Durchmesser kommen sowohl bei JC-1- als auch bei MTR-markierten Mitochondrien größere Strukturen mit teilweise erheblichen Durchmesser (≤ 30 µm) vor. Offenbar verklumpen die Mitochondrien durch die Behandlung mit JC-1 oder MTR miteinander und bilden Cluster. Diese Cluster werden im Folgenden als Mitochondrienaggregate bezeichnet. Bei einer Quantifizierung des mtDNA-Gehalts von Partikeln, die mit Hilfe der FCM abgelegt wurden (s. 2.2.7.1.1.), konnte gezeigt werden, dass in den JC-1- und MTR-gefärbten Mitochondrien signifikant mehr mtDNA enthalten ist als in denen, die mit MTG gefärbt wurden (Abb. 17). Dieser Sachverhalt untermauert, dass die Mitochondrien bei der Behandlung mit JC-1 oder MTR verklumpen und Aggregate bilden. Offensichtlich werden diese Aggregate abgelegt, was eine Erhöhung der mtDNA-Menge zur Folge hat.

Da bei MTG-markierten Mitochondrien eine vermehrte Aggregatbildung nicht zu beobachten war und sie den geringsten mtDNA Gehalt aufwiesen, scheint die Färbung mit MTG die beste Vorbereitung für eine anschließende Separation und Ablage einzelner Mitochondrien zu sein. Es verwundert daher zunächst, dass die Interspezies-Sequenzanalyse ein anderes Bild zeigt: MTG-gefärbte Mitochondrien wiesen die geringste maximale Wahrscheinlichkeit (60%) dafür auf, dass einzelne Mitochondrien abgelegt wurden. MTR- (75%) und JC-1-gefärbte Mitochondrien (95%) besitzen dagegen relativ hohe Wahrscheinlichkeiten für die Ablage von Einzelmitochondrien.

Dieses Ergebnis steht mit unserer Annahme nur scheinbar im Widerspruch. Die Schweine- und Mäusemitochondrien wurden getrennt voneinander gefärbt. Daraus ergibt sich, dass im Falle einer Aggregatbildung nur Mitochondrien derselben Spezies miteinander verklumpen. Bei der Ablage von Mitochondrienaggregaten durch die FCM wurden also überwiegend Mitochondrien eines Typs (*Mus musculus* oder *Sus scrofa*) abgelegt und analysiert. Der hohe Anteil der Mischsequenzen, der zu der geringen W_{max} bei MTG-gefärbten Mitochondrien führt, lässt sich daher durch eine Co-Ablage mehrerer einzelner Mitochondrien oder einer Co-Ablage von Mitochondrium und freier mtDNA begründen. Eine solche Co-Ablage kann zwar auch bei MTR-oder JC-1 gefärbten Mitochondrien auftreten, doch ist wegen der hohen Anzahl von Mitochondrien derselben Spezies innerhalb eines Aggregates wahrscheinlich, dass parallel abgelegte Minor-Komponenten in Form einzelner Mitochondrien oder freier mtDNA nicht detektiert werden können. Vergleichbare Phänome sind aus der forensischen Genetik bekannt (Lutz-Bonengel et al. 2007, Wallin et al. 1998).

Für JC-1-gefärbte Mitochondrien wurde die höchste W_{max} berechnet. Die relative mtDNA Menge, die mit Hilfe der qPCR detektiert wurde, ist aber geringer als bei MTR-gefärbten

Mitochondrien. Obwohl MTR-gefärbte Mitochondrien den höchsten durchschnittlichen mtDNA Gehalt aufwiesen, zeigt ein relativ großer Anteil derart gefärbter Partikel mtDNA-Quantitäten im Bereich von MTG-gefärbten Mitochondrien. Wahrscheinlich kommen also neben Aggregaten relativ viele Mitochondrien vor, die nicht geclustert vorliegen. Bei der Ablage von MTR-gefärbten Partikeln, die nicht aggregiert vorliegen, kann eine Co-Ablage von weiteren Mitochondrien oder freier mtDNA mittels Sequenzanalyse detektiert werden und zu einer geringeren W_{max} führen.

Wodurch die Aggregatbildung bei JC-1 und MTR begünstigt wird, ist unklar. Mitochondrien, die mit JC-1 oder MTR gefärbt werden, müssen nach der Inkubation gewaschen werden, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Verzichtete man darauf, käme es zu einer enormen Störung durch Hintergrundfluoreszenz. Beim Waschen werden die Mitochondrien durch Zentrifugation pelletiert, um den farbstoffhaltigen Überstand zu entfernen. Nach der Pelletierung werden die Mitochondrien wieder in Puffer resuspendiert. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Aggregation durch ein Verkleben der Mitochondrien bei der Zentrifugation entsteht. Bei der MTG-Färbung ist ein Waschvorgang nicht notwendig, da überschüssiger Farbstoff in wässriger Lösung nicht fluoresziert (*molecular probes handbook*, www.invitrogen.com).

Neben einer Verklumpung beim Pelletieren besteht die Möglichkeit, dass MTR- und JC-1-gefärbte Mitochondrien intakt gebliebenen zellulären mitochondrialen Netzwerken entsprechen (z. B. Bereiter-Hahn et al. 2008). Da aber die Färbemethode bei MTR oder JC-1 nicht schonender durchgeführt wird als bei MTG, und dabei sogar ein Waschvorgang mehr nötig ist, erscheint dies wenig plausibel.

Kontrollen:

In reinen Farbstofflösungen – ohne Zugabe von Mitochondrien – konnten mittels FCM und Fluoreszenzmikroskopie vereinzelt fluoreszierende Partikel detektiert werden. Bei diesen Partikeln handelt es sich wahrscheinlich um Farbstoffverbindungen, die der Farbstoff mit sich selbst oder dem Puffer eingeht. Es ist möglich, dass solche Partikel in seltenen Fällen anstelle von Mitochondrien abgelegt wurden. Bei solchen Partikeln verläuft sowohl die qPCR als auch die Sequenzanalyse erfolglos. Daraus ergibt sich eine mögliche Erklärung, warum nur 73–80% aller Proben analysiert werden konnten. Hinzu kommt, dass ein methodisch bedingter Probenausfall nicht völlig auszuschließen ist. Denn es ist nicht sicher, dass bei der FCM-basierten Separation tatsächlich alle Mitochondrien korrekt auf den 96-Well-Platten abgelegt wurden.

Insgesamt waren sehr wenige *No-Template*-Kontrollen kontaminiert, was belegt, dass die Vorkehrungen zum Schutz vor Kontaminationen ausreichend waren (Mund- und Haarschutz, Handschuhe etc.).

4. 4. Vergleich verschiedener Separationsmethoden

4. 4. 1. FCM: Suche nach den richtigen Einstellungen

Als erstes wurde versucht, auf den Dotplots jenen Bereich zu bestimmen, wo am ehesten Einzelmitochondrien zu finden sind.

Bei der qPCR Analyse von drei Bereichen aus dem SSC/FSC-Fenster (s. Abb. 7) zeigte sich, dass – gemessen am FSC – in dem Bereich, der die größten Partikel enthalten sollte (Bereich III), am wenigsten mtDNA zu finden war. Wahrscheinlich sind in dieser Region keine Mitochondrien, sondern andere Strukturen lokalisiert. Dabei könnte es sich um größere Bruchstücke von Zellmembranen oder um Farbstoffverbindungen handeln, die teilweise in Färbelösungen ohne Zugabe von Mitochondrien gefunden wurden (vgl. 4.3.). Vereinzelt könnte sich freie mtDNA an solche Partikel heften und mittels qPCR detektiert werden.

Im Bereich I ist weniger mtDNA vorhanden als im Bereich III. Daher scheinen im Bereich I am ehesten einzelne Mitochondrien vorhanden zu sein. Aus diesem Grund wurde versucht, diesen Bereich genauer aufzulösen. Dies gelang mit den unter 2.2.7.1.2.b. beschriebenen Einstellungen.

Durch die Wahl von MTG als Farbstoff konnte die gemessene mtDNA-Menge von abgelegten Partikeln weiter reduziert werden. Dies war möglich, weil dadurch die Ablage von Mitochondrienaggregaten vermieden wird (vgl. 3.3. und 4.3.).

Durch das Verdünnen der Mitochondrien vor der FCM konnte eine weitere Reduktion des mtDNA-Gehaltes erreicht werden, indem die Wahrscheinlichkeit einer Co-Ablage von mehreren Mitochondrien oder freier mtDNA verringert wird (vgl. 3.2.3. und 4.2.3.).

Durch verschiedene Modifikation am Durchflusszytometer, wie z. B. die Verstärkung von Signalen oder das Hinzuziehen weiterer Sortierregionen, konnten die Einstellungen für die Ablage von Einzelmitochondrien optimiert werden. Der Erfolg der Optimierungen spiegelt sich dabei in der Abnahme der gemessenen mtDNA im Laufe der Experimente wider (s. Abb. 19).

Mit den unter 2.2.7.1.2.b. beschriebenen Einstellungen wurde bei der Analyse von einzelnen mitochondrialen Partikeln am wenigsten mtDNA gemessen. Da das Gerät bei diesen Einstellungen an der maximalen Auflösungsgrenze arbeitet, sind innerhalb der Sortierregion neben Mitochondrien wahrscheinlich auch Partikel des fluoreszierenden

Hintergrundrauschens enthalten. Dabei kann es sich z. B. um kleine Membranbruchstücke oder Staub handeln. Für Folgeanalysen ist aus diesem Grund mit relativ hohen Ausfallraten zu rechnen gewesen.

4. 4. 2. LCM: Suche nach den richtigen Einstellungen

MTG wurde als Farbstoff für die Mikrodissektion verwendet, nicht nur weil die eingebauten Filter dafür ideal ausgelegt sind, sondern auch weil dieser Farbstoff die Bildung von Mitochondrienaggregaten verhindert (vgl. 4.3.).

Sind die Filter nicht ideal auf die Detektion eines Farbstoffes ausgelegt, so können nur solche Fluoreszenzen beobachtet werden, die in das Spektrum des verwendeten Filters überstrahlen. Eine Überstrahlung kann durch besonders intensiv gefärbte Partikel auftreten. Bei MTR und JC-1 führt dies dazu, dass gerade die stärker fluoreszierenden Mitochondrienaggregate detektiert werden, wohingegen einzelne Mitochondrien unentdeckt bleiben.

Um eine ausreichende Vereinzelung der Mitochondrien zu erreichen, mussten die Mitochondriensuspensionen auf Objektträgern ausgestrichen werden. Dabei wurden anfänglich verschiedene membranbeschichtete Objektträger (PEN und PET) verwendet.

Der Vorteil membranbeschichteter Objektträger besteht darin, dass die Membran leicht mit dem Laser geschnitten werden kann. Ein abgetrenntes Membranstück kann einfach mit der LPC- (*laser pressure catapulting*) Funktion von dem Objektträger abgelöst werden. Nachteilig war jedoch, dass die membranbeschichteten Objektträger hydrophobe Eigenschaften aufweisen, wodurch ein Ausstreichen der Mitochondriensuspensionen nicht möglich war. Die Suspensionen konnten daher nur in kleinen Tropfen auf den Membranen getrocknet werden. Innerhalb der Tropfen kommt es jedoch zu einer Überlagerung von Mitochondrien, wodurch die Wahrscheinlichkeit erhöht wird, dass beim Ausschneiden gleich mehrere Mitochondrien abgelegt werden. Das Eintrocknen ganzer Tropfen führte weiterhin dazu, dass eine Kristallisation von Salzen zu unterschiedlichen Schnittdicken führte. Die Lasereinstellungen mussten daher beim Ausschneiden der Mitochondrien immer wieder modifiziert und der Salzkruste angepasst werden. Weiter zeigten die verwendeten Membranen besonders im FITC-Kanal Autofluoreszenzen, wodurch die Gefahr besteht, dass diese mit Mitochondrien verwechselt werden.

Aus diesen Gründen wurden im Anschluss unbeschichtete Glasobjektträger verwendet. Auf ihnen war ein gleichmäßiges Ausstreichen der Suspensionen möglich. Dadurch konnte sowohl eine bessere Vereinzelung der Mitochondrien als auch eine einheitlichere Schnittdicke der Salzkruste erreicht werden. Ein Vorteil der so entstandenen Salzkruste war, dass sie für die

Mitochondrien als Trägermaterial diente, auf dem diese auf die 96-Well-Platten katapultiert werden konnten.

Bei der LCM konnten Mitochondriensuspensionen verwendet werden, die zuvor bis zu einem Verhältnis von 1:400 mit Storage-Puffer (Qiagen) verdünnt wurden. Bei dieser Verdünnungsstufe lagen die Mitochondrien innerhalb eines Ausstrichs weit genug auseinander um die Wahrscheinlichkeit einer Co-Ablage von mehreren Mitochondrien zu minimieren. Höhere Verdünnungen waren nicht praktikabel, da zu wenige Mitochondrien gefunden werden konnten, um damit 96-Well-Platten zu beladen.

4. 4. 3. OT: Suche nach den richtigen Einstellungen

Bei Verwendung der optischen Pinzette konnte Storage-Puffer (Qiagen) nicht als Medium verwendet werden, da dieser alle PCR-basierten Folgeanalysen inhibiert. Es wurde stattdessen HPLC-H₂O verwendet. Durch das Einbringen von Mitochondrien in H₂O kommt es jedoch zu einem Schwellen und wahrscheinlich zu einem Platzen der äußeren Membran. Die innere Membran scheint dabei dennoch intakt zu bleiben (vgl. 4.2.2.). Aus diesem Grund ist mit einem Verlust von mtDNA nicht zu rechnen, da die mtDNA an die innere Membran gebunden ist (Albring et al. 1977, Boesch et al. 2010, Jackson et al. 1996).

4. 4. 4. Sequenz- und qPCR Analyse einzelner Mitochondrien

Mittels der Interspezies-Sequenzanalyse (s. 2.2.8.11.a.) konnten bei allen drei Separationsmethoden insgesamt 48,41% bzw. 51,59% Sequenzen gefunden werden, die rein murinen oder rein porcinen Ursprungs waren. Dieses Verhältnis belegt, dass die Methode zur Herstellung der 1:1-Mischungen (murin/porcin) ausreichend genau war.

Das Auftreten einer reinen murinen oder porcinen Sequenz bedeutet nicht zwangsläufig, dass nur ein Mitochondrium abgelegt wurde. Zwei weitere Möglichkeiten kommen dafür in Betracht:

Erstens können ganze Mitochondriencluster, die nur aus Mitochondrien einer Spezies bestehen, abgelegt worden sein (vgl. 4.3. und 4.6.2.). Zweitens können stochastische Ereignisse während der frühen Phasen der PCR dazu führen, dass ein Sequenztyp stärker amplifiziert wird als der andere (Budowle et al. 2009).

In Bezug auf den W_{max} (100%) ergibt sich für Partikel, die mit der optischen Pinzette abgelegt wurden, jedoch ein starker Hinweis, dass tatsächlich einzelne Mitochondrien abgelegt wurden.

Bei Betrachtung der qPCR-Resultate zeigte sich, dass in den mittels LCM abgelegten Partikeln am wenigsten mtDNA enthalten ist. Da aber die W_{max} bei Verwendung der optischen Pinzette höher ist als bei der LCM, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Präparation der Suspensionen für die LCM mit einer morphologischen Veränderung der Mitochondrien einhergeht, welche einen Einfluss auf den mtDNA Gehalt hat. In besonderem Maße kommt für diese Veränderung die Eintrocknung der Ausstriche auf den Objektträgern in Betracht. Schon Liu et al. (2005) konnten zeigen, dass eine Austrocknung der Mitochondrien die Membranintegrität beeinflusst. Möglicherweise ist damit eine Freisetzung von intra-mitochondrialer DNA verbunden. Eine Freisetzung von mtDNA würde erklären, warum erstens ein sehr geringer mtDNA-Gehalt bei den jeweiligen Partikeln zu finden ist, die mit der LCM abgelegt wurden, und zweitens die errechnete W_{max} geringer ist als bei den OT-Proben. Die W_{max} wird in diesem Fall durch eine Co-Ablage von mtDNA einer Spezies mit einem Mitochondrium der anderen Spezies herabgesetzt. Wahrscheinlich ist genau dieser Mechanismus für das Auftreten von Mischsequenzen bei LCM-Proben verantwortlich. Zusätzlich kommt solcherart freigesetzte mtDNA für das Auftreten von positiven Signalen bei den technikbasierten Leerkontrollen in Frage.

Obwohl bei der qPCR kein signifikanter Unterschied im mtDNA Gehalt von LCM- und FCM-Proben gefunden wurde, konnte interessanterweise mittels der Interspezies-Sequenzanalyse für die OT eine viel höhere W_{max} berechnet werden als für die FCM. Da bei der qPCR zwei ΔC_T Werte (7,64 and 8,09) der FCM-Proben höher sind als die gesamten Werte der OT-Proben (höchster berechneter ΔC_T Wert: 7,34), scheinen folglich solche Fälle eine Ablage von zusätzlicher mtDNA zu repräsentieren.

Die restlichen ΔC_T Werte von FCM- und OT-Proben scheinen tatsächlich den mtDNA Gehalt einzelner Mitochondrien widerzuspiegeln. Die Variation der ΔC_T -Werte zeigt dabei anscheinend die Variation des mtDNA Gehaltes einzelner Mitochondrien an.

Cavelier et al. (2000) fanden heraus, dass ein mitochondriales Partikel in Fibroblasten zwischen null und elf mtDNA Moleküle beinhaltet. Diese Arbeitsgruppe detektierte weiter 25% heteroplasmatische mitochondriale Partikel nach einer FCM-basierten Separation von Mitochondrien aus einer Suspension, die zwei verschiedene mitochondriale Varianten enthielt. Es wurde jedoch nicht in Betracht gezogen, dass diese Partikel anstelle einer Heteroplasmie eine Ablage von mehreren Mitochondrien oder von zusätzlicher freigesetzter mtDNA darstellen könnten. Bei der in dieser Studie verwendeten FCM-basierten Methode konnten 12,82% Mischsequenzen detektiert werden, die wahrscheinlich in Folge einer solchen Co-Ablage entstanden sind.

Die hohen Ausfallraten der LCM sind wahrscheinlich auf die Ablagetechnik an sich zurückzuführen. Sehr kleine mitochondrienhaltige Bereiche müssen durch einen Laserschuss in Capture-Plates transferiert werden. Anschließend müssen die Mitochondrien durch einen Zentrifugationsschritt auf die eigentlichen 96-Well-Platten überführt werden. Bei all diesen Schritten können die Mitochondrien verloren gehen. Zusätzlich ist es vorstellbar, dass Mitochondrien ausgeschnitten werden, die bereits ihre mtDNA auf Grund von veränderter Membranintegrität eingebüßt haben.

In Bezug auf die Ausfallraten scheint die optische Pinzette die effizienteste Methode zu sein, gefolgt von der FCM. Die FCM arbeitet bei dem Versuch, einzelne Mitochondrien zu sortieren, an der absoluten Auflösungsgrenze (vgl. 3.4.1.). Es kann also vorkommen, dass neben Mitochondrien auch andere Partikel wie z. B. Staub separiert und abgelegt werden. In solchen Fällen bleibt eine Folgeanalyse erfolglos. Hinzu kommen systematische Fehler, z. B. dass beim Sortieren nicht alle Partikel ihr Ziel-Well oder den Boden des Wells erreichen und somit nicht erfasst werden können.

Die Durchflusszytometrie ist dennoch bei weitem die schnellste Methode, gefolgt von der LCM. Die optische Pinzette ist die zeitintensivste Methode, da der Transport der Mitochondrien durch den Kanal des 1 μ -Ibidi-Slide relativ aufwändig ist.

Der Vorteil der LCM und der OT gegenüber der FCM ist, dass der ganze Separationsprozess unter direkter optischer Kontrolle am Mikroskop verfolgt werden kann. Bei der FCM dagegen ist man darauf angewiesen, den richtigen Bereich innerhalb eines Dotplots zu wählen, ohne dass man die Partikel dabei direkt visuell beobachten kann.

Alle Puffermedien, die reich an Salzen oder Kohlenhydraten sind, können hemmend auf PCR-basierte Methoden wirken. Größere Mengen an Storage-Puffer (Qiagen) oder PBS führten in Vorversuchen beispielsweise zu einer Inhibition der jeweils verwendeten PCR (Daten nicht gezeigt). Bei der FCM und LCM kann ein beliebiger Puffer verwendet werden, da die abgelegte Menge an Puffer eine Inhibition der PCR-basierten Folgeanalysen nicht erwarten lässt (Lutz-Bonenege et al. 2008b). Bei der LCM muss der Puffer jedoch vor der Mikrodissektion eingetrocknet werden. Dies kann mit einer Beschädigung der Mitochondrien einhergehen (s. o.). Die Verwendung von H₂O als Medium bei den OT verhindert eine Inhibition der PCR und scheint keinen Einfluss auf den mtDNA-Gehalt der Mitochondrien zu haben (vgl. Abb. 22).

Durch die Kombination aus qPCR und dem Modell der maximalen Wahrscheinlichkeit für die Ablage von einzelnen Mitochondrien (W_{max}), welches der Sequenzanalyse zu Grunde liegt,

konnte ein analytischer Nachweis erbracht werden, dass insbesondere die optische Pinzette für die Ablage von Einzelmitochondrien geeignet ist.

Da die optische Pinzette zusätzlich bezüglich der Ausfallraten die effizienteste Methode ist, sollte diese immer dann eingesetzt werden, wenn sichergestellt werden soll, dass nur ein einzelnes Partikel analysiert wird. Dies ist insbesondere der Fall, wenn man die mtDNA-Zusammensetzung von einzelnen Mitochondrien analysieren will, um z. B. das Phänomen der Heteroplasmie zu erforschen.

Deckman et al. (2008) verwendeten ebenfalls eine OT-basierte Technik und konnten Heteroplasmie auf Mitochondrienebene nachweisen.

Im Gegensatz zu Deckman et al. (2008), die Mitochondrien aus bestimmten Zellen separierten, eröffnet die in dieser Studie angewandte OT-Methode die Möglichkeit, Mitochondrien aus Massenpräparationen – in Form der beschriebenen Mitochondrienisolationen – zu separieren und zu analysieren.

Wenn die Analyse von einzelnen mitochondrialen Partikeln nicht unbedingt notwendig ist, wie z. B. bei der Diagnose von mitochondrial bedingten Krankheiten, können schnelle Ablagetechniken, wie die FCM, bevorzugt verwendet werden.

Am IMTEK haben wir eine optische Pinzette in Kombination mit Quadrantendioden getestet, mit denen man kleine Veränderungen eines Lichtstrahls messen kann. Diese Technik bietet eine weitere Möglichkeit zu verifizieren, ob zu einem gegebenen Zeitpunkt tatsächlich nur ein Partikel in der Laserfalle der OT ist. Dazu ist jedoch weitere Forschungsarbeit nötig. Möglicherweise wird das Zusammenspiel von OT und Quadrantendioden die Forschung an kleinen biologischen Partikeln, wie etwa Mitochondrien, weiter vorantreiben.

Kontrollen:

Obwohl alle Analysemethoden vorsichtig, gewissenhaft und unter den üblichen Kautelen (Handschuhe, Mundschutz, Laborkittel etc.) durchgeführt wurden, traten in seltenen Fällen humane Kontaminationen (21 von 1039 Sequenzierreaktionen) auf. Die Detektion von humanen Kontaminationen ist dabei auf Grund der hohen Sensitivität der Analysemethoden nie gänzlich auszuschließen. Dieses Problem wurde bereits von Tobe und Linacre (2008) angesprochen. Trotz der Problematik von human kontaminierten Proben konnten diese von den tatsächlich positiven Signalen differenziert werden. Dies war entweder durch speziesspezifische Sequenzpolymorphismen des analysierten Cytochrom b Fragmentes möglich oder durch Schmelzkurvenanalysen, die an die qPCR-Analyse angeschlossen wurden.

Bei der qPCR konnte in einer von 60 *No-Template*-Kontrollen ein positives Signal gemessen werden, das jedoch nah an dem definierten Schwellenwert von C_T 40 lag (ΔC_T : 0,48). Der Ursprung dieses Signals ist nicht eindeutig. Anstelle von einer eigentlichen Kontamination könnte es sich dabei auch um ein unspezifisches Produkt handeln, welches sich in den frühen Phasen der qPCR zufällig gebildet haben kann (Bustin 2004, vgl. 4.6.3.).

In seltenen Fällen können solche unspezifischen Produkte fälschlicherweise als mitochondriales Signal fehlinterpretiert werden. Alle Signale von Mitochondrien-proben hatten allerdings höhere ΔC_T Werte als das vermeintlich unspezifische Produkt (Bereich: 1,45–8,09). Lediglich drei „Ausreißer“ (ΔC_T 0,57, 0,99, und 1,35) die von FCM-Proben stammen, repräsentieren möglicherweise Werte von unspezifischen Produkten (vgl. Abb. 22).

Technikbasierte Negativkontrollen der FCM zeigten in vielen Fällen (95 von 252) positive Signale. Sehr wahrscheinlich ist, dass Mitochondrien oder freigesetzte mtDNA an die abgelegten Beads binden und somit eine Co-Ablage erfolgt. Die technikbasierte Leerkontrollen der LCM und OT blieben bis auf sehr seltene Ausnahmen ergebnislos.

4. 5. Vergleich von Lymphozyten und Mitochondrien

Im Mittel geht die Fachliteratur davon aus, dass etwa zwölf Mitochondrien in einem humanen Lymphozyt enthalten sind (s. Tabelle 8).

Fachliteratur	Mitochondrien pro Lymphozyt (human)
Kirschner et al. (1972)	29
Huhn et al. (1976)	5,35
Nagy et al. (2004)	3,18
Mittelwert der Mitochondrienanzahl/ Lymphozyt i.d. Fachliteratur	12,04

Tabelle 8: Literaturangaben über die Anzahl von Mitochondrien pro Lymphozyt

Da in murinen Mitochondrien, die per OT abgelegt wurden, im Vergleich zu murinen Lymphozyten nur 1/12 der mtDNA-Menge enthalten ist, wurde nach dieser Schätzung genau ein Mitochondrium abgelegt. Da sich die Fachliteratur jedoch auf humane und nicht auf murine Lymphozyten bezieht, ist unklar, wie exakt diese Abschätzung ist. Nichtsdestotrotz gehören alle analysierten Spezies zu den Mammalia, so dass ähnliche Mitochondrienanzahlen pro Lymphozyt anzunehmen sind. Insgesamt ergibt sich durch diesen Versuch ein weiteres Indiz dafür, dass mit den OT tatsächlich einzelne Mitochondrien abgelegt werden können.

4. 6. Methoden zur Analyse von Mitochondrien

4. 6. 1. humane mtDNA: PCR-basierte Methoden

Es gelang sowohl mit dem L29/H381- als auch dem L162/H381-System, Sequenzdaten aus einzelnen mitochondrialen Partikeln zu generieren. Dabei ist zu beachten, dass die mitochondrialen Partikel dafür in den meisten Fällen aus Lymphozyten isoliert und in PBS resuspendiert wurden (s. 2.2.2.3.b.), bevor diese mittels FCM abgelegt wurden. Dieses Verfahren ist nicht ideal auf die Ablage von Einzelmitochondrien ausgerichtet, da die Mitochondrien in PBS Schaden nehmen können (s. 4.2.2.) und die FCM nur bedingt geeignet ist, einzelne Mitochondrien abzulegen (vgl. 4.4.4.). Es ist also davon auszugehen, dass mehr mtDNA als nur die eines einzelnen Mitochondriums abgelegt und analysiert wurde.

Mit dem L29/H381-System wurden bei der 45-Zyklen-PCR zusätzlich mitochondriale Partikel aus Lymphozyten analysiert, die mit den optimierten Einstellungen der FCM (s. 2.2.7.1.2.b.) abgelegt wurden. Diese Mitochondrien wurden nach der Isolation in Storage-Puffer (Qiagen) resuspendiert (s. 2.2.2.3.b.).

Eine erfolgreich durchgeführte Intraspezies-Sequenzanalyse dieser Partikel (s. 2.2.8.11.b.) zeigte, dass bei einer sehr niedrigen Ausfallrate im Schnitt nur 1,31 Mitochondrien pro Well abgelegt wurden. Es konnte bei diesem Versuch eine W_{max} von 80,39% bestimmt werden. Allerdings muss davon ausgegangen werden, dass dieser Wert nicht der tatsächlichen Wahrscheinlichkeit entspricht, einzelne Mitochondrien abzulegen. Der Grund dafür ist, dass auf dem Verhältnis von reinen Sequenzen der Probanden I und II (10/36) basierend, nicht eine 1:1- sondern eine 1:3,1-Mischung der Probanden vorlag.

Nichtsdestotrotz belegt dieser Versuch, dass das L29/H381-System sensitiv genug ist, die mtDNA einzelner Mitochondrien erfolgreich zu amplifizieren und zu sequenzieren.

Mittels einer L162/H381 PCR, bei der ein kleinerer Abschnitt als bei der L29/H381 amplifiziert wird, konnten bereits bei 38 PCR-Zyklen in 96-Well-Platten Amplifikate aus 0,1pg Gesamt-DNA erzeugt und erfolgreich sequenziert werden. Die verwendete DNA (9947A) wird aus einer humanen lymphoiden Zellkultur gewonnen. Nach Schumacher et al. (1973) befinden sich in lymphoiden Zellen ca. zehn Mitochondrien (9,3). Geht man davon aus, dass nach Cavalier et al. (2000) bzw. Navratil et al. (2007) in einem mitochondrialen Partikel null bis elf bzw. eins bis 22 mtDNA-Kopien zu finden sind, würden demzufolge in einer lymphoiden Zelle ca. 100 mtDNA-Kopien vorliegen. Da 6 pg DNA dem Gesamt-DNA Gehalt einer Zelle entsprechen

(Aerssens et al. 2001), würden demzufolge 0,1 pg Gesamt-DNA nur 1,67 mtDNA-Kopien entsprechen. Auch wenn eine solche Rechnung auf vielen Annahmen beruht, wird ersichtlich, dass wahrscheinlich auch dieses PCR-System sensitiv genug ist, um Heteroplasmieforschung auf der Ebene von einzelnen Mitochondrien betreiben zu können.

Auch die Minisequenzierung eignet sich als Methode, um einzelne Positionen auf Heteroplasmie zu untersuchen (z. B. Morley et al. 1999).

In einem hier durchgeführten Versuch konnten damit einzelne mitochondriale Partikel analysiert werden, die aus einer Mischung einer Mitochondriensuspension (1:1) von zwei Probanden abgelegt wurden. Der Minisequenzierung lagen dabei Amplifikate zu Grunde, die mit dem L29/H381- und dem L16/H381-System generiert wurden. Auch hier wurden Mitochondrien verwendet, die aus Lymphozyten isoliert, in PBS resuspendiert und mit der FCM abgelegt wurden. Es ist also davon auszugehen, dass ebenfalls mehr als nur ein Mitochondrium abgelegt wurde. Die Ergebnisse der Minisequenzierung belegen dies. Es konnten Elektropherogramme gefunden werden, die eine Mischung der probandenspezifischen Merkmale an der untersuchten Stelle aufwiesen. Dies ist nur durch die Co-Ablage und Analyse von mtDNA beider Probanden erklärbar.

Die meisten Amplifikationen von humaner DNA wurden in einer *low volume*- (LV) Reaktion auf chemisch strukturierten Objektträgern durchgeführt. Durch die Reduktion des Reaktionsvolumens kann eine Erhöhung der Sensitivität erfolgen (Schmidt et al. 2006, Lutz-Bonengel et al. 2007). Eine ausreichende Reproduzierbarkeit war auf den Objektträgern jedoch nicht gegeben, weshalb die meisten in dieser Arbeit beschriebenen PCRs auf 96-Well-Platten erfolgten. Dabei wurde mit größeren Volumina gearbeitet.

Ein 5 µl Reaktionsvolumen auf 96-Well-Platten scheint ausreichend klein zu sein, um eine Erhöhung der Sensitivität zu erzielen: Die Amplifikationen selbst von einzelnen Mitochondrien verliefen sehr effizient und waren in hohem Maße reproduzierbar.

Es konnte gezeigt werden, dass die angewandten PCR-Systeme sensitiv genug sind, um Heteroplasmieforschung an Einzelmitochondrien zu betreiben. Mit den gewonnen Erkenntnissen wird es in Zukunft mit hoher Wahrscheinlichkeit möglich sein, die Frage endgültig zu klären, inwieweit Heteroplasmie in humanen Einzelmitochondrien auftritt.

4. 6. 2. Sequenzanalyse – Allgemeines und Kontrollen

Erst mit einer erheblichen Zyklenzahl (45) konnte die mtDNA-Sequenz einzelner mitochondrialer Partikel, nach der Separation und Ablage, detektiert werden. Je mehr Zyklen benötigt werden, um ausreichend Amplifikate für Folgeanalysen zu erhalten, desto eher kommt es zu Sequenzartefakten (Park und Crowley 2010). Da jedoch die amplifizierten Fragmente viele Basenunterschiede zwischen den analysierten Spezies (*Mus musculus* und *Sus scrofa*) und den beiden Probanden beinhalteten, konnten die erhaltenen Sequenzen eindeutig zugeordnet werden.

Das Auftreten einer reinen Sequenz, die nur einem einzigen Verursacher zuzuordnen ist, bedeutet nicht, dass in diesem Fall tatsächlich nur ein Mitochondrium abgelegt wurde. Möglich ist auch, dass mehrere Mitochondrien abgelegt wurden, die von derselben Spezies oder demselben Probanden stammen. Besonders Mitochondrienaggregate, wie sie in 4.3. beschrieben wurden, können zu einer solchen Co-Ablage führen. Auch eine Co-Ablage von freigesetzter mtDNA kommt in Frage. So kann eine Mischsequenz z. B. durch die Ablage eines Mitochondriums der einen Spezies (z. B. von *Mus musculus*) mit zusätzlich freigesetzter mtDNA der anderen Spezies (z. B. *Sus scrofa*) entstehen.

Um diese Probleme zu umgehen, wurde eine maximale Wahrscheinlichkeit für die Ablage von Einzelmitochondrien (W_{max}) berechnet. Diese Berechnung basiert auf der Hypothese, dass die Ablage von Mitochondrienaggregaten die Ausnahme bleibt. Damit diese Hypothese erfüllt ist, wurde beim Vergleich der drei beschriebenen Ablagemethoden von Mitochondrien mit MTG als Farbstoff gearbeitet. Wie in 4.3. beschrieben, ist dabei der Anteil von Mitochondrienaggregaten als gering einzustufen. Weiter ist es wichtig, eine 1:1-Mischung von Spezies oder Probanden zu erzielen, da sonst der berechnete Wert von m oder der W_{max} nicht mit dem realen Wert übereinstimmt. Insbesondere für den Vergleich der Separationsmethoden wurde eine 1:1-Mischung (murin/porcin) erfolgreich erzeugt.

Kontrollen:

Vereinzelte Kontaminationen (23 aus 1327 Sequenzen) ließen sich trotz aller Präventionsmaßnahmen nicht vermeiden (vgl. 4.4.4.). Bei der Interspezies-Sequenzanalyse konnten humane Kontaminationen auf Grund von Sequenz-polymorphismen jedoch eindeutig von den zu erwartenden Sequenzen unterschieden werden.

4. 6. 3. qPCR – Allgemeines und Kontrollen

Anhand der mitgeführten Positivkontrollen konnte eine PCR-Effizienz von nahezu 100% (98,84%) berechnet werden. Das bedeutet, dass in der exponentiellen Phase der PCR bei jedem Zyklus in etwa eine Verdopplung des Produktes eintritt (Wiedemann et al. 2004). Daher können exakte Aussagen über DNA-Gehalte angestellt werden. Ist z. B. bei einer Effizienz von 100% der C_T -Wert einer Probe genau um einen Zyklus größer als derjenige der anderen Probe, so ist in der erst genannten Probe genau halb soviel DNA enthalten. Differenzen von C_T -Werten können daher verwendet werden, um relative mtDNA Mengen zwischen analysierten Proben zu berechnen.

Ein wichtiger Aspekt der hier durchgeführten qPCR ist, dass man damit zwischen murinen und humanen Templates unterscheiden konnte. Beim Arbeiten mit sensitiven Analysemethoden kommt es immer wieder zu eingeschleppten Kontaminationen. In dem forensischen Labor, in dem diese Arbeiten durchgeführt wurden, wird überwiegend mit humaner DNA gearbeitet, weshalb vor allem humane Kontaminationsquellen in Betracht kommen.

Durch die an die qPCR angeschlossene Schmelzkurvenanalyse war eine Unterscheidung von murinen Produkten und anderen Spezies möglich. Die qPCR bildet bei Anwesenheit von muriner Template-mtDNA ein spezifisches Produkt mit einer Schmelztemperatur zwischen 73,6 °C und 75 °C. Bei der Anwesenheit von porciner oder humaner mtDNA werden Produkte mit anderen Schmelztemperaturen gebildet, die sich dadurch deutlich unterscheiden ließen.

In seltenen Fällen (acht von 268, =2,99%) kam es in *No-Template*-Kontrollen zu positiven Signalen. Drei davon hatten einen ΔC_T -Wert zwischen 0,25 und 0,48. Diese liegen sehr nah an dem verwendeten C_T -Schwellenwert von 40 (s. 2.2.8.12.). Bei den anderen Signalen aus *No-Template*-Kontrollen handelt es sich hingegen mit hoher Wahrscheinlichkeit um „echte“ Kontaminationen mit muriner mtDNA. Durch das häufige Arbeiten mit murinem Gewebe, beispielsweise im Zuge der durchgeführten Isolationen, kann es trotz aller Vorsichtsmaßnahmen zu einer Verbreitung von murinen Kontaminanten innerhalb des Laborbereiches kommen.

Fast alle *No-Template*-Kontrollen zeigten Signale in einem Bereich zwischen C_T 40-50. Bei diesen Signalen könnte es sich um unspezifische Produkte handeln, die durch Primerdimere oder missgeprinte Sequenzen erzeugt werden (Bustin 2004). Wenn solche unspezifischen Produkte in den ersten Zyklen der qPCR entstehen, können sie theoretisch C_T -Werte unterhalb des Schwellenwertes annehmen.

5. Zusammenfassung:

Um einzelne Mitochondrien separieren und analysieren zu können, müssen wichtige Voraussetzungen erfüllt sein. Von besonderer Bedeutung ist, dass die Mitochondrien in ausreichend hoher Qualität und Quantität vorliegen. Daher spielt unter anderem die Technik der Mitochondrienisolation eine entscheidende Rolle. Mit der Isolation ist dabei die Freisetzung der Mitochondrien aus der Zelle und deren Abtrennung von anderen Zellkompartimenten gemeint. Drei verschiedene Isolationsmethoden wurden miteinander verglichen. Die Effektivität der Methoden wurde dabei an dem Anteil von Zellen bemessen, die während der Isolation nicht aufgebrochen wurden. Es stellte sich heraus, dass nur eine Technik (Qproteome Mitochondria Isolation Kit, Qiagen) geeignet war, einen vollständigen Zellaufschluss zu erzielen.

Da Zellen verschiedener Gewebe bezüglich der Anzahl und Größe ihrer Mitochondrien erheblich variieren können, ist nicht nur die Technik der Mitochondrienisolation sondern auch die Wahl des biologischen Ausgangsmaterials von großer Bedeutung. Durch den Einsatz von Lebergewebe konnten Mitochondrien in hoher Anzahl isoliert werden.

Neben der Verwendung eines geeigneten Ausgangsmaterials und einer optimalen Isolationsmethode entscheidet auch die chemische Zusammensetzung des Resuspensionspuffers über die Qualität der Mitochondrien. Der Einsatz von verschiedenen Puffern ergab, dass insbesondere die Osmolarität des Mediums einen Einfluss auf die mitochondriale Membranintegrität besaß.

Nach der Optimierung der Isolationsmethode und der Wahl des optimalen Resuspensionspuffers konnten Mitochondrien in ausreichender Qualität und Quantität isoliert werden. Der Erfolg der Isolation konnte dabei durch elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigt werden.

Neben den Mitochondrien waren in den Isolaten sowohl freie mtDNA als auch nDNA enthalten. Diese DNAs können bei der Analyse von Mitochondrien zu Kontaminationen führen. Das Kontaminationsrisiko konnte allerdings durch Verdünnungsmaßnahmen und den Einsatz von Separationsmethoden, insbesondere der optischen Pinzette, minimiert werden. Der Begriff der Separation beschreibt dabei das Vereinzeln der Mitochondrien.

Um die Mitochondrien mit den Separationsmethoden detektieren zu können, müssen diese mit einem Farbstoff markiert werden. Mitochondrien, die mit JC-1 oder MTR gefärbt wurden, zeigten im Gegensatz zu der Färbung mit MTG die Tendenz miteinander zu clustern und Mitochondrienaggregate zu bilden.

Mit drei verschiedenen Separationsmethoden – FCM, LCM und der OT – wurden einzelne mitochondriale Partikel abgelegt, die aus Lebergewebe von *Mus musculus* oder *Sus scrofa*

isoliert wurden. Die mtDNA dieser Partikel konnte erfolgreich mittels qPCR bestimmt und sequenziert werden. Durch Kombination der qPCR-Daten und mit Hilfe eines mathematischen Modells, das auf der Sequenzanalyse basiert, konnte erstmals der analytische Nachweis erbracht werden, dass insbesondere die optische Pinzette geeignet ist, einzelne Mitochondrien abzulegen.

Weiter werden in dieser Arbeit PCR-basierte Methoden vorgestellt, die eine ausreichende Sensitivität besitzen, um humane mtDNA aus Einzelmitochondrien analysieren zu können.

Da mit der optischen Pinzette eine geeignete Technik zur Separation von Einzelmitochondrien zur Verfügung steht und die Voraussetzungen für die Analyse humaner mtDNA gegeben sind, kann nun Heteroplasmieforschung auf der Ebene von einzelnen humanen Mitochondrien betrieben werden.

6. Danksagungen

1) Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Sabine Lutz-Bonengel, die mir während des Promotionsstudiums fachlichen Beistand leistete und mich maßgeblich beim Design der durchgeführten Studien unterstützt hat.

2) Herrn Prof. Dr. Klaus Olek und Herrn Prof. Dr. Volker Knoop danke ich für die Betreuung der Dissertation.

3) Ich danke dem Institut für Rechtsmedizin der Universität Freiburg sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die Finanzierung der Doktorandenstelle und der Verbrauchsmittel.

4) Herrn Timo Sänger danke ich für fachliche Diskussionen, die zu neuen Lösungsansätzen führten.

5) Für das Bedienen des Elektronenmikroskops und die Bereitstellung von Fluoreszenzmikroskopen danke ich Frau Carmen Kopp und Frau Karin Sutter.

6) Bei Frau Monika Stich und dem Laborteam von Carl Zeiss sowie Herrn Benjamin Landenberger vom IMTEK bedanke ich mich, dass ich mit ihren optischen Pinzetten arbeiten durfte.

7) Herrn Klaus Geiger und Frau Marie Follo danke ich für ihre Hilfe und das Bedienen des Durchflusszytometers.

8) Herrn Prof. Dr. Dieter Hauschke möchte ich für die Ratschläge bezüglich der verwendeten statistischen Methoden danken.

9) Für die Bereitstellung von Lebergewebe bedanke ich mich bei Herrn Dr. Erschig (Schlachthof Färber, Freiburg im Brsg.) und Frau Sipp (Tierhaltung, Universität Freiburg).

10) Auch möchte ich dem ganzen DNA-Laborsteam und dem ärztlichen Direktor des Institutes für Rechtsmedizin Freiburg, Herrn Prof. Dr. Stefan Pollak dafür danken, dass ich die Arbeiten zu dieser Dissertation im DNA-Labor des Institutes durchführen konnte.

11) Mein Dank gilt auch den vielen Korrekturlesern, insbesondere meiner Freundin Nicola Ludwig und meinen Eltern, Volker und Hiltrud Pflugradt.

7. Literatur

Aerssens J, Armstrong M, Gilissen R, Cohen N. (2001) The human genome: an introduction. *Oncologist*, 6:100-109.

Albring M, Griffith J, Attardi G. (1977) Association of a protein structure of probable membrane derivation with HeLa cell mitochondrial DNA near its origin of replication. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 74:1348–1352.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2002) *Molecular Biology of the Cell*. Tayler and Friends, London.

Aldridge BA, Lim SD, Baumann AK, Hosseini S, Buck W, Almekinder TL, Sun CQ, Petros JA. (2003) Automated sequencing of complete mitochondrial genomes from laser-capture microdissected samples. *Biotechniques*, 35:606-607, 609-610, 612.

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

Ashkin A. (1970) Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure. *Phys. Rev. Lett.*, 24:156-159.

Ashkin A, Dziedzic JM, Yamane T. (1987) Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. *Nature*, 330:769-771.

Ashley MV, Laipis PJ, Hauswirth WW. (1989) Rapid segregation of heteroplasmic bovine mitochondria. *Nucleic Acids Res.*, 17:7325-7331.

Bendall KE, Sykes BC. (1995) Length heteroplasmy in the first hypervariable segment of the human mtDNA control region. *Am. J. Hum. Genet.*, 57:248-256.

Bendall KE, Macaulay VA, Baker JR, Sykes BC. (1996) Heteroplasmic point mutations in the human mtDNA control region. *Am. J. Hum. Genet.*, 59:1276-1287.

Bereiter-Hahn J, Vöth M, Mai S, Jendrach M. (2008) Structural implications of mitochondrial dynamics. *Biotechnol. J.*, 3:765-780.

Boesch P, Ibrahim N, Dietrich A, Lightowlers RN. (2010) Membrane association of mitochondrial DNA facilitates base excision repair in mammalian mitochondria. *Nucleic Acids Res.*, 38:1478-1488.

Bogehagen DF. (1999) Repair of mtDNA in vertebrates. *Am. J. Hum. Genet.*, 64:1276-1281.

Budowle B, Allard MW, Wilson MR, Chakraborty R. (2003) Forensics and mitochondrial DNA: applications, debates, and foundations. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 4:119-141.

Budowle B, Eisenberg AJ, van Daal A. (2009) Validity of low copy number typing and applications to forensic science. *Croat. Med. J.*, 50:207-217.

Bustin SA. (2004) *A-Z of Quantitative PCR*. International University Line. La Jolla California.

Caddy B, Taylor DR, Lincare AM. (2009) A review of the science of low template DNA analysis. <http://www.homeoffice.gov.uk>.

Caplan AI, Greenawalt JW. (1966) Biochemical and ultrastructural properties of osmotically lysed rat-liver mitochondria. *J. Cell. Biol.*, 31:455-472.

Cavelier L, Johannisson A, Gyllensten U. (2000) Analysis of mtDNA copy number and composition of single mitochondrial particles using flow cytometry and PCR. *Exp Cell Res.*, 259:79-85.

Cazzalini O, Lazzè MC, Iamele L, Stivala LA, Bianchi L, Vaghi P, Cornaglia A, Calligaro A, Curti D, Alessandrini A, Prospero E, Vannini V. (2001) Early effects of AZT on mitochondrial functions in the absence of mitochondrial DNA depletion in rat myotubes. *Biochem. Pharmacol.*, 62:893-902.

Chan DC. (2006a) Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell*, 125:1241-1252.

Chan DC. (2006b) Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 22:79-99.

Chen H, Chan DC. (2009) Mitochondrial dynamics – fusion, fission, movement, and mitophagy – in neurodegenerative diseases. *Hum. Mol. Genet.*, 18:169-176.

Coble MD, Loreille OM, Wadhams MJ, Edson SM, Maynard K, Meyer CE, Niederstätter H, Berger C, Berger B, Falsetti AB, Gill P, Parson W, Finelli LN. (2009) Mystery solved: the identification of the two missing Romanov children using DNA analysis. *PLoS One*, 4:e4838.

Comas-Riu J, Rius N. (2009) Flow cytometry applications in the food industry. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 36:999-1011.

Cossarizza A, Baccarani-Conti M, Kalashnikova G, Franceschi C. (1993) A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 197:40-45.

Czechowska K, Johnson DR, van der Meer JR. (2008) Use of flow cytometric methods for single-cell analysis in environmental microbiology. *Curr. Opin. Microbiol.*, 11:205-212.

Daum G. (1985) Lipids of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, 822:1-42.

Deckman KH, Levin BC, Helmerson K, Kishore RB, Reiner JE. (2008) Isolation and Characterization of a Single Mitochondrion. US Patent Pending 2008/0254530.

Edwards RA. (2007) Laser capture microdissection of mammalian tissue. *J. Vis. Exp.*, 309.

Feng J, Lucchinetti E, Ahuja P, Pasch T, Perriard JC, Zaugg M. (2005) Isoflurane postconditioning prevents opening of the mitochondrial permeability transition pore through inhibition of glycogen synthase kinase 3 β . *Anesthesiology*, 103:987-995.

Frazier AE, Kiu C, Stojanovski D, Hoogenraad NJ, Ryan MT. (2006) Mitochondrial morphology and distribution in mammalian cells. *Biol. Chem.*, 387:1551-1558.

Fuller KM, Arriaga EA. (2003) Advances in the analysis of single mitochondria. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 14:35-41.

Gallet PF, Maftah A, Petit JM, Denis-Gay M, Julien R. (1995) Direct cardiolipin assay in yeast using the red fluorescence emission of 10-N-nonyl acridine orange. *Eur. J. Biochem.* 228:113-119.

Garrido N, Griparic L, Jokitalo E, Wartiovaara J, van der Blik AM, Spelbrink JN. (2003) Composition and dynamics of human mitochondrial nucleoids. *Mol. Biol. Cell*, 14:1583-1596.

Hayashi J, Takemitsu M, Goto Y, Nonaka I. (1994) Human mitochondria and mitochondrial genome function as a single dynamic cellular unit. *J. Cell Biol.*, 125:43-50.

Huhn D, Rodt H, Thiel E, Fink U, Ruppelt W. (1976) Elektronenmikroskopische und immunhistochemische Untersuchungen an menschlichen Lymphozyten. *Blut*, 32:87-102.

Ho SY, Gilbert MT. (2010) Ancient mitogenomics. *Mitochondrion*, 10:1-11.

Iborra FJ, Kimura H, Cook PR. (2004) The functional organization of mitochondrial genomes in human cells. *BMC Biol.* 2:9.

Jackson DA, Bartlett J, Cook PR. (1996) Sequences attaching loops of nuclear and mitochondrial DNA to underlying structures in human cells: the role of transcription units. *Nucleic Acids Res.* 24:1212–1219.

Jannotti-Passos LK, Souza CP, Parra JC, Simpson AJ. (2001) Biparental mitochondrial DNA inheritance in the parasitic trematode *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.*, 87:79-82.

Jansen T, Forster P, Levine MA, Oelke H, Hurles M, Renfrew C, Weber J, Olek K. (2002) Mitochondrial DNA and the origins of the domestic horse. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 99:10905-1010.

Kirschner RH, Getz GS, Evans AE. (1972) Leukocyte mitochondria: function and biogenesis. *Enzyme*, 13:56-76.

Kraytsberg Y, Bodyak N, Myerow S, Nicholas A, Ebralidze K, Khrapko K. (2009) Collection of isolated cells for studying mitochondrial DNA mutations within individual cells. *Methods Mol. Biol.*, 554:315-327.

Kuroiwa T, Ishibashi K, Takano H, Higashiyama T, Sasaki N, Nishimura Y, Matsunaga S. (1996) Optical isolation of individual mitochondria of *Physarum polycephalum* for PCR analysis. *Protoplasma*, 194:275-279.

Kuznetsov AV, Hermann M, Saks V, Hengster P, Margreiter R. (2009) The cell-type specificity of mitochondrial dynamics. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 41:1928-1939.

Kvist L, Martens J, Nazarenko AA, Orell M. (2003) Paternal leakage of mitochondrial DNA in the great tit (*Parus major*). *Mol. Biol. Evol.*, 20:243-247.

Legros F, Malka F, Frachon P, Lombès A, Rojo M. (2004) Organization and dynamics of human mitochondrial DNA. *J. Cell. Sci.*, 117:2653-2662.

Linch CA, Whiting DA, Holland MM. (2001) Human hair histogenesis for the mitochondrial DNA forensic scientist. *J. Forensic Sci.*, 46:844-853.

Liu XH, Aksan A, Menze MA, Hand SC, Toner M. (2005) Trehalose loading through the mitochondrial permeability transition pore enhances desiccation tolerance in rat liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1717:21-26.

Luo Z, Zhong L, Han X, Wang H, Zhong J, Xuan Z. (2009) Astragalus membranaceus prevents daunorubicin-induced apoptosis of cultured neonatal cardiomyocytes: role of free radical effect of Astragalus membranaceus on daunorubicin cardiotoxicity. *Phytother Res.*, 23:761-767.

Lutz-Bonengel S, Sanger T, Heinrich M, Schön U, Schmidt U. (2007) Low volume amplification and sequencing of mitochondrial DNA on a chemically structured chip. *Int. J. Legal Med.*, 121:68-73.

Lutz-Bonengel S, Schmidt U, Sanger T, Heinrich M, Schneider PM, Pollak S. (2008a) Analysis of mitochondrial length heteroplasmy in monozygous and non-monozygous siblings. *Int. J. Legal Med.*, 122:315-321.

Lutz-Bonengel S, Sanger T, Parson W, Müller H, Ellwart JW, Follo M, Bonengel B, Niederstätter H, Heinrich M, Schmidt U. (2008b) Single lymphocytes from two healthy individuals with mitochondrial point heteroplasmy are mainly homoplasmic. *Int. J. Legal Med.*, 122:189-197.

Mann H, Whitney D. (1947) On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Annals of mathematical Statistics*, 8:50-60.

Marchington DR, Hartshorne GM, Barlow D, Poulton J. (1997) Homopolymeric tract heteroplasmy in mtDNA from tissues and single oocytes: support for a genetic bottleneck. *Am. J. Hum. Genet.*, 60:408-416.

Marques-Santos LF, Oliveira JG, Maia RC, Rumjanek VM. (2003) Mitotracker green is a P-glycoprotein substrate. *Biosci. Rep.*, 23:199-212.

Martin W, Hoffmeister M, Rotte C, Henze K. (2001) An overview of endosymbiotic models for the origins of eukaryotes, their ATP-producing organelles (mitochondria and hydrogenosomes), and their heterotrophic lifestyle. *Biol. Chem.*, 382:1521-1539.

Martínez F, Kiriakidou M, Strauss JF 3rd. (1997) Structural and functional changes in mitochondria associated with trophoblast differentiation: methods to isolate enriched preparations of syncytiotrophoblast mitochondria. *Endocrinology*, 138:2172-2183.

Medina JM, López-Mediavilla C, Orfao A. (2002) Flow cytometry of isolated mitochondria during development and under some pathological conditions. *FEBS Lett.*, 510:127-132.

Meeusen SL, Nunnari J. (2005) How mitochondria fuse. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 17:389-394.

Monnat RJ Jr, Reay DT. (1986) Nucleotide sequence identity of mitochondrial DNA from different human tissues. *Gene*, 43:205-211.

Morley JM, Bark JE, Evans CE, Perry JG, Hewitt CA, Tully G. (1999) Validation of mitochondrial DNA minisequencing for forensic casework. *Int. J. Legal Med.*, 112:241-248.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant. Biol.*, 51:263-273.

Muscattello U, Guarriera-Bobyleva V, Buffa P. (1972) Configurational changes in isolated rat liver mitochondria as revealed by negative staining. I. Modifications caused by osmotic and other factors. *J. Ultrastruct. Res.*, 40:215-234.

Nagy G, Barcza M, Gonchoroff N, Phillips PE, Perl A. (2004) Nitric oxide-dependent mitochondrial biogenesis generates Ca²⁺ signaling profile of lupus T cells. *J. Immunol.*, 173:3676-3683.

Navratil M, Poe BG, Arriaga EA. (2007) Quantitation of DNA copy number in individual mitochondrial particles by capillary electrophoresis. *Anal Chem.*, 79:7691-7699.

Park JW, Crowley DE (2010) Nested PCR bias: a case study of *Pseudomonas* spp. in soil microcosms. *J. Environ. Monit.*, 12:85-988.

Pakendorf B, Stoneking M. (2005) Mitochondrial DNA and human evolution. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 6:165-183.

Parson W, Pegoraro K, Niederstätter H, Föger M, Steinlechner M. (2000) Species identification by means of the cytochrome b gene. *Int. J. Legal Med.*, 114:23-28.

Plattner H, Hentschel J. (2006) *Zellbiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, p.344.

Plecitá-Hlavatá L, Lessard M, Santorová J, Bewersdorf J, Jezek P. (2008) Mitochondrial oxidative phosphorylation and energetic status are reflected by morphology of mitochondrial network in INS-1E and HEP-G2 cells viewed by 4Pi microscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, 1777:834-846..

Poulton J, Marchington DR. (2002) Segregation of mitochondrial DNA (mtDNA) in human oocytes and in animal models of mtDNA disease: clinical implications. *Reproduction.*, 123:751-755.

Presley AD, Fuller KM, Arriaga EA. (2003) MitoTracker Green labeling of mitochondrial proteins and their subsequent analysis by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 793:141-150.

Reers M, Smith TW, Chen LB. (1991) J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry.*, 30:4480-4486.

Reynolds ES. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, 17:208-212.

Riede UN, Rohr HP. (1971) Atypic liver mitochondria as adaptive special forms? I. Ultrastructural morphologic observations. *Virchows. Arch. B. Cell Pathol.*, 8:350-356.

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

Sanger F, Coulson AR. (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.*, 94:441-448.

Satoh M, Kuroiwa T. (1991) Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell. *Exp. Cell Res.*, 196:137-140.

Schmidt U, Lutz-Bonengel S, Weisser HJ, Sanger T, Pollak S, Schön U, Zacher T, Mann W. (2006) Low-volume amplification on chemically structured chips using the PowerPlex16 DNA amplification kit. *Int. J. Legal Med.*, 120:42-48.

Schneider WC. (1948) Intracellular distribution of enzymes; the oxidation of octanoic acid by rat liver fractions. *J. Biol. Chem.*, 176:259-266.

Schumacher HR, Szekely IE, Park SA, Fisher DR. (1973) Ultrastructural studies on the acute leukemic lymphoblast. *Blut*, 27:369-406.

Sekiguchi K, Kasai K, Levin BC. (2003) Inter- and intragenerational transmission of a human mitochondrial DNA heteroplasmy among 13 maternally-related individuals and differences between and within tissues in two family members. *Mitochondrion* 2: 401-414.

Solomon M, Wofford J, Johnson C, Regan D, Creer MH. (2010) Factors influencing cord blood viability assessment before cryopreservation. *Transfusion*, 50:820-830.

Sproule DM, Kaufmann P. (2008) Mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: basic concepts, clinical phenotype, and therapeutic management of MELAS syndrome. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1142:133-158.

Teranishi M, Karbowski M, Kurono C, Nishizawa Y, Usukura J, Soji T, Wakabayashi T. (1999) Effects of coenzyme Q10 on changes in the membrane potential and rate of generation of reactive oxygen species in hydrazine- and chloramphenicol-treated rat liver mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, 366:157-167.

Timmis JN, Ayliffe MA, Huang CY, Martin W. (2004) Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nat. Rev. Genet.*, 5:123-135.

Tobe SS, Linacre AMT. (2008) A technique for the quantification of human and non-human mammalian mitochondrial DNA copy number in forensic and other mixtures. *Forensic Sci. Int. Genet.*, 2:249-256.

Wang Y, Bogenhagen DF. (2006) Human mitochondrial DNA nucleoids are linked to protein folding machinery and metabolic enzymes at the mitochondrial inner membrane. *J. Biol. Chem.*, 281:25791-25802.

Wakabayashi T, Teranishi MA, Karbowski M, Nishizawa Y, Usukura J, Kurono C, Soji T. (2000) Functional aspects of megamitochondria isolated from hydrazine- and ethanol-treated rat livers. *Pathol. Int.*, 50:20-33.

Walker UA, Bickel M, Lütke Volksbeck, SI, Ketelsen UP, Schöfer H, Setzer B, Venhoff N, Rickerts V, Staszewski S. (2002) Evidence of nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitor – associated genetic and structural defects of mitochondria in adipose tissue of HIV-infected patients. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 29:117-121.

Wallin JM, Buoncristiani MR, Lazaruk KD, Fildes N, Holt CL, Walsh PS. (1998) TWGDAM validation of the AmpFISTR blue PCR amplification kit for forensic casework analysis. *J. Forensic Sci.*, 43:854-870.

Wei YH, Wu SB, Ma YS, Lee HC. (2009) Respiratory function decline and DNA mutation in mitochondria, oxidative stress and altered gene expression during aging. *Chang Gung Med. J.*, 32:113-32.

Weihe A, Apitz J, Pohlheim F, Salinas-Hartwig A, Börner T. (2009) Biparental inheritance of plastidial and mitochondrial DNA and hybrid variegation in *Pelargonium*. *Mol. Genet. Genomics*, 282:587-593.

White DJ, Wolff JN, Pierson M, Gemmell NJ. (2008) Revealing the hidden complexities of mtDNA inheritance. *Mol. Ecol.*, 17:4925-4942.

Whittaker PA, Danks SM. (1978) *Mitochondria: structure, function, and assembly*. Longman Inc New York-Whitstable, Kent, Great Britain.

Wiedemann C, Schulz HL, Weber BHF. (2004) Quantitative Real-Time PCR – Eine Frage der Normalisierung. *Biospektrum*, 1:99-102.

Wiegand P, Klein R, Braunschweiger G, Hohoff C, Brinkmann B. (2006) Short amplicon STR multiplex for stain typing. *Int. J. Legal Med.*, 120:160-164.

Wilcoxon F. (1945) Individual Comparisons by Ranking Methods. *Biometrics Bulletin*, 1:80-83.

Woischnik M, Moraes CT. (2002) Pattern of organization of human mitochondrial pseudogenes in the nuclear genome. *Genome Res.*, 12:885-893.

Wong ML, Medrano JF. (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39:75-85.

Xu N, Thorsness MK, Thorsness PE. (2005) Mitochondrial DNA impacts the morphology of mitochondrial compartments. *Gene*, 354:37-42.

Yao YG, Kong QP, Salas A, Bandelt HJ. (2008) Pseudomitochondrial genome haunts disease studies. *J. Med. Genet.*, 45:769-772.

8. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen:

- | | |
|---------------|---|
| Abbildung 1: | Das humane mitochondriale Genom |
| Abbildung 2: | Schematische Funktionsweise der FCM |
| Abbildung 3: | Schematische Funktionsweise der LCM |
| Abbildung 4: | Schematische Funktionsweise der OT |
| Abbildung 5: | Chemisch strukturierter Chip als PCR Plattform |
| Abbildung 6: | Ultrazentrifugationstube |
| Abbildung 7: | Dotplot eines FSC/SSC-Fensters (Durchflusszytometrie) |
| Abbildung 8: | Mitochondrium in einer Laserfalle |
| Abbildung 9: | EM-Bilder von Mitochondrien, die mit dem <i>Qiagenkit</i> isoliert wurden |
| Abbildung 10: | Zellartige Strukturen unbekanntes Ursprungs |
| Abbildung 11: | Fluoreszenzmikroskopie: MTG-gefärbte Mitochondrien in verschiedenen Puffern |
| Abbildung 12: | EM-Aufnahme von Mitochondrien aus verschiedenen Resuspensionsmedien |
| Abbildung 13: | FCM-Dotplot von einer Lymphozytensuspension |
| Abbildung 14: | qPCR: Überstände von Mitochondrienisolaten |
| Abbildung 15: | Fluoreszenzmikroskopie: unterschiedlich gefärbte Mitochondrien |

Abbildung 16:	Konfokale Mikroskopie: 3D-Aufnahme von MTG gefärbten Mitochondrien
Abbildung 17:	qPCR: Box- und Whisker-Plot – unterschiedlich gefärbte Mitochondrien
Abbildung 18:	FCM-Vergleich von Sortierregionen
Abbildung 19:	qPCR – FCM: Chronologische Ablage von Mitochondrien
Abbildung 20:	Repräsentative Sequenzanalyse
Abbildung 21:	Maximale Wahrscheinlichkeit für die Ablage von Einzelmitochondrien
Abbildung 22:	qPCR: Box- und Whisker-Plot – Vergleich von Separationsmethoden
Abbildung 23:	qPCR: Vergleich Lymphozyten – Mitochondrien
Abbildung 24:	Agarosegel: Amplifikate verschiedener Anzahlen abgelegter Mitochondrien
Abbildung 25:	Sequenz aus einzelnen mitochondrialen Partikeln: Fragment der HVRII
Abbildung 26:	Elektropherogramme Minisequenzierung
Abbildung 27:	Ausschnitt einer murinen 12s rRNA Sequenz
Abbildung 28:	qPCR: Exemplarische Standardkurve
Abbildung 29:	qPCR: Schmelzkurven-Analyse
Tabelle 1:	Liste aller verwendeten Abkürzungen
Tabelle 2:	Liste aller verwendeten Chemikalien, Kits und Enzyme
Tabelle 3:	Liste aller verwendeten Puffer und Lösungen
Tabelle 4:	Liste aller verwendeten Arbeitsgeräte
Tabelle 5:	Verwendete Oligonukleotide
Tabelle 6:	Verwendete Thermocyclerprogramme
Tabelle 7:	Analysierte Proben: Vergleich von Separationsmethoden
Tabelle 8:	Literaturangaben: Anzahl von Mitochondrien pro Lymphozyt

