

Aus dem

Zentrum für Kardiologie der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität
Mainz

Direktmessung mitochondrialer DNA im Plasma mittels qPCR unter dem Einfluss
körperlicher Belastung

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin oder Zahnmedizin oder der physiologischen Wissenschaften
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Tim Könnel
aus Rodalben

Mainz, 2020

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 08. Dezember 2020

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	9
2. Ziel der Dissertationsschrift	10
3. Wissenschaftlicher Hintergrund	
3.1. Herkunft zellfreier zirkulierender DNA	11
3.2. Zellfreie zirkulierende nukleäre DNA und deren Bedeutung	11
3.3. Zellfreie zirkulierende mitochondriale DNA und deren Bedeutung	13
3.4. Mitochondriale DNA und Thrombozyten	15
3.5. Messmethoden und -ergebnisse zellfreier zirkulierender DNA	16
3.6. Zellfreie zirkulierende DNA und andere Marker für Organbelastung	18
4. Methodik	
4.1. Herstellung von Standardlösungen mitochondrialer DNA	20
4.2. Standard-Labormethoden	22
4.2.1. Ethanol-Präzipitation	22
4.2.2. Gelelektrophorese	22
4.2.3. Aufreinigung von DNA aus einer Gelelektrophorese	23
4.2.4. Messung der Konzentration am NanoDrop 3300	23
4.2.5. Ansetzen von Standardreihen zur Bestimmung des LOQ	24
4.3. Etablierung einer qPCR zur Messung zellfreier mitochondrialer DNA im Plasma	25
4.3.1. Vergleich von Tego- und HiFi-Puffer	25
4.3.2. Vergleich von Phusion- und VELOCITY-Polymerase	25
4.3.3. Bestimmung der optimalen MgCl ₂ -Konzentration	26
4.3.4. Testen kürzerer Annealing-Zeiten	27
4.3.5. Variation der Primer-Konzentration	27
4.3.6. Festlegen des neuen Pipettierschemas	28
4.3.7. Bestimmung des Limit of Quantification (LOQ) der Methode	28
4.3.8. Protokoll der qPCR für die Messung freier mitochondrialer DNA im Plasma	29
4.4. qPCR zur Amplifikation von L1PA2 im Plasma	30
4.5. Primer	31

4.6. Untersuchung des Einflusses der Plasmaverarbeitung auf gemessene Konzentration zellfreier DNA	31
4.6.1. Messung zellfreier DNA bei verschiedenen Zentrifugations- Geschwindigkeiten	31
4.6.2. Messung zellfreier DNA bei verschiedenen Pipettierhöhen	32
4.6.3. Messung des Einflusses der Anzahl der Einfrier- und Auftauvorgänge	33
4.6.4. Messung des Einflusses verschiedener Verdünnungsverhältnisse	33
4.6.5. Untersuchung verschiedener Zentrifugationsgeschwindigkeiten und Konzentrationen mitochondrialer DNA in resuspendierten Pellets	33
4.7. Messung mitochondrialer DNA anhand eines Belastungstests	35
4.8. Verarbeitung der Proben	35
4.9. Analyse der gewonnenen Proben in der Laboratoriumsmedizin	35
4.10. Umgang mit Fehlmessungen	36
4.11. Verwendete Geräte, Chemikalien, Kits, Medien, Verbrauchsmaterialien und Software	36
5. Ergebnisse	
5.1. LOQ der qPCR für mtDNA	41
5.2. Bestimmung der optimalen MgCl ₂ -Konzentration	43
5.3. Einfluss der mehrfachen Messung einer Verdünnung	44
5.4. Abhängigkeit der mtDNA-Konzentration von Einfrieren und Verdünnungsverhältnissen	46
5.5. Bestimmung der möglichen Zentrifugationsgeschwindigkeiten zur Verarbeitung von Proben	48
5.6. Zentrifugationsgeschwindigkeit bei L1PA2-Messungen	50
5.7. Auswertung des abschließenden Belastungsversuchs	52
5.7.1. Korrelationen der DNA-Konzentrationen im Gesamtversuch	52
5.7.2. Thrombozyten und Konzentration mitochondrialer DNA	55
5.7.3. Andere korpuskuläre Blutbestandteile und Konzentration mitochondrialer DNA	57
5.7.4. DNA-Konzentrationen in einzelnen Versuchsreihen	60
5.7.4.1. Pipettierhöhe und DNA-Konzentrationen	60
5.7.4.2. Einfluss der Pipettierhöhe auf korpuskuläre Blutbestandteile	64
5.7.4.3. Pipettierhöhe und Abnahmezeitpunkt	66

5.7.4.4. Pelletversuch und DNA-Konzentrationen	68
6. Diskussion	
6.1. qPCR zur Bestimmung der Konzentration mitochondrialer DNA	74
6.2. Einfluss der Probenverarbeitung auf die Messergebnisse mitochondrialer und zellfreier nukleärer DNA	75
6.3. Unterschiede von mitochondrialer und nukleärer DNA anhand des Pelletversuchs	78
6.4. Mitochondriale DNA in Interaktion mit Thrombozyten	79
6.5. Bedeutung der verschiedenen Fragmentlängen zellfreier nukleärer DNA und Schlussfolgerungen für die mitochondriale DNA	81
6.6. Mitochondriale DNA als Belastungsmarker	82
6.7. Mitochondriale DNA als Parameter in anderen Settings	83
7. Zusammenfassung	
8. Anhang	

Abkürzungsverzeichnis

cf-n-DNA	zellfreie nukleäre DNA
mt-DNA	mitochondriale DNA
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
LOQ	Limit of Quantification
DNA	Desoxyribonukleinsäure
NET	neutrophile extrazelluläre Traps
et al.	„et altera“ (und andere)
VO ₂ max	maximal aufgenommenes Sauerstoffvolumen
TLR9	Toll-like-Rezeptor 9
min	Minute
s	Sekunde
mL	Milliliter
L	Liter
bp	Basenpaare
g	Gramm
x g	Erdbeschleunigung $g=9,81 \text{ m/s}^2$
°C	Grad Celsius
H ₂ O	Wasser
V	Volt
Eppi	Eppendorf-Gefäß
Cq	Cycle of Quantification
DNase	Desoxyribonuclease
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mmol	Millimol
mM	millimolar
O ₂	Sauerstoff
prä	vor Belastungsbeginn
post	nach Ende der Belastung
RNA	Ribonucleinsäure
HiFi	High-Fidelity
dNTP	Desoxynucleotid-Triphosphat

μL	Mikroliter
p	Signifikanzniveau
%	Prozent
cm	Zentimeter
mm	Millimeter
PV	Pelletversuch
H	Pipettierhöhe
R	Korrelationskoeffizient
f(x)	Funktion von x
ln	natürlicher Logarithmus
Abb	Abbildung
Labormedizin	Institut für Laboratoriumsmedizin der Universitätsmedizin Mainz
ng	Nanogramm

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1a+b	Pipettierhöhen und Zentrifugationsprotokoll des Pelletierungsversuchs
Abb. 2	C _q -Werte der LOQ-Messung
Abb. 3	Mittelwerte und Standardabweichung der LOQ-Messung
Abb. 4	C _q -Werte in Abhängigkeit der Kopienzahl mitochondrialer DNA
Abb. 5	Berechnung der realen Kopienzahl anhand gemessener C _q -Werte
Abb. 6	MgCl ₂ -Test
Abb. 7	Mehrfache Messung einer Verdünnung 1
Abb. 8	Mehrfache Messung einer Verdünnung 2
Abb. 9	Einfrierversuch
Abb. 10	Verdünnungs-Versuch
Abb. 11a+b	Zentrifugationsgeschwindigkeit mtDNA und Aufreinigung
Abb. 12	Einflussfaktoren der Zentrifugation auf die mtDNA-Konzentration
Abb. 13a+b	Zentrifugationsgeschwindigkeit nukleäre DNA
Abb. 14	Korrelation zwischen mtDNA und cf-nDNA
Abb. 15	Zusammenhang zwischen mtDNA und 90bp-Fragment
Abb. 16	Zusammenhang zwischen mtDNA und 222bp-Fragment
Abb. 17	Zusammenhang zwischen 90 bp- und 222 bp-Fragment
Abb. 18a+b	Abhängigkeit von Thrombokrit und Thrombozytenzahl von der mtDNA
Abb. 19a+b	Abhängigkeit der Anzahl großer Thrombozyten und der Thrombozytenverteilungsbreite von der mtDNA
Abb. 20	Abhängigkeit der Leukozytenzahl von der mtDNA
Abb. 21	Abhängigkeit der Erythrozytenzahl von der mtDNA
Abb. 22	Unterschiede zwischen den einzelnen Pipettierhöhen bei mtDNA
Abb. 23	Boxplot Pipettierhöhe und mtDNA
Abb. 24	Unterschiede zwischen den einzelnen Pipettierhöhen bei cf-nDNA
Abb. 25a+b	Boxplot Pipettierhöhe und cf-nDNA
Abb. 26	Unterschiede zwischen den einzelnen Pipettierhöhen bei korpuskulären Blutbestandteilen
Abb. 27a+b	cf-nDNA und Pipettierhöhe bei verschiedenen Abnahmezeitpunkten
Abb. 28a+b	Kreuztabelle und Boxplot mtDNA bei verschiedenen Abnahmezeitpunkten
Abb. 29	Pelletversuch und mtDNA
Abb. 30a+b	Pelletversuch und cf-nDNA
Abb. 31	Korrelation von langem und kurzem Fragment im Pelletversuch

1. Einleitung

Sportliche Belastung und Krankheitszustände resultieren im Körper teilweise in sehr ähnlichen Prozessen, wenn man Stoffwechsel und Zellschäden betrachtet. Dies hat dazu geführt, dass sich die molekularbiologische Forschung in den letzten Jahren verstärkt auch der Etablierung neuer Marker zugewandt hat, die sowohl in der Sport- als auch in der Intensivmedizin wie in onkologischen Gebieten eine breite Anwendung fanden. Hierzu zählt unter anderem die frei-zirkulierende DNA.

Während für die zellfreie nukleäre DNA mittlerweile eine etablierte Direktmessung aus Blutplasma vorliegt (Breitbach et al., 2014) und deren Anwendung auch für viele klinische Thematiken wie beispielsweise dem Tumormonitoring (Ehlert et al., 2018) gezeigt werden konnte, so ist über andere DNA-Entitäten weitaus weniger bekannt. Einige Arbeitsgruppen konnten jedoch bereits Messungen mit isolierter mitochondrialer DNA durchführen, die Resultate in Anwendungsgebieten mit klinischer Relevanz aufwiesen. Eine Direktmessung mitochondrialer DNA aus Plasma wurde bisher von Miriam Albus (2018) angestrebt, wobei bei Betrachtung der Messergebnisse sichtbar wurde, dass eine weitere Optimierung der Direktmessung auf dieser Grundlage nötig wäre, da hier keine reproduzierbaren Absolutwerte erzielt werden konnten. Bezüglich des Verhaltens mitochondrialer DNA unter körperlicher Belastung lagen zum jetzigen Zeitpunkt teilweise widersprüchliche Ergebnisse vor, die einer genauen Betrachtung hinsichtlich Methodik und Probenverarbeitung bedurften.

Somit ergaben sich für die vorliegende Arbeit vier Hauptfragestellungen:

1. Wie kann man mitochondriale DNA im Plasma valide und reproduzierbar direkt detektieren und quantifizieren?
2. Was ist bei der Probenverarbeitung und -lagerung zu beachten, um vergleichbare Ergebnisse zu liefern?
3. Wie verhält sich mitochondriale DNA unter körperlicher Belastung?
4. Welche anderen klinischen Parameter weisen eine Assoziation zu Konzentrationsänderungen mitochondrialer DNA auf und könnten damit eine sinnvolle Aussage über Krankheitsverläufe liefern?

2. Ziel der Dissertationsschrift

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer verbesserten Direktmessung mittels qPCR zur Detektion der Konzentration zellfreier zirkulierender mitochondrialer DNA im Plasma. Besonderer Wert sollte hierbei auf die richtige Aufarbeitung von Plasmaproben, sowie die Einflussfaktoren dieser auf gemessene Konzentrationen der mitochondrialen DNA gelegt werden. Weiterhin soll die Kinetik zellfreier mitochondrialer DNA exemplarisch anhand eines Belastungstests untersucht und mit etablierten Methoden zur Bestimmung zellfreier nukleärer DNA gemessen werden.

3. Wissenschaftlicher Hintergrund

3.1. Herkunft zellfreier zirkulierender DNA

DNA findet sich ubiquitär im menschlichen Körper. In den Zellen liegt diese in zwei Kompartimenten vor: im Zellkern befindet sich die nukleäre (nDNA) und in den Mitochondrien die mitochondriale (mtDNA) DNA. Die Mitochondrien, von denen lange Zeit angenommen wurde, dass sie nur maternal weitervererbt werden (Shiyu Luo et al., 2018), konnten evolutionsbiologisch in der Endosymbiontentheorie als ehemals eigenständige Lebensformen identifiziert werden, die in ihrer Entwicklung mit Körperzellen verschmolzen und in Interaktion mit diesen traten (Sagan 1967, Nass 1969). Dies erklärt, warum ebenfalls DNA-Fragmente mit mitochondrialen Mustern und Proteine sowie Enzyme, die deren Verarbeitung dienen, im Zellkern anzutreffen sind.

Die Herkunft zellfreier zirkulierender DNA (cfDNA) ist nicht endgültig geklärt und somit Gegenstand aktueller Forschung. Es wird eine Assoziation mit dem Zelltod, in Form von Apoptose und Nekrose, vermutet (Atamaniuk et al., 2004, 2008). Breitbach et al. (2012) erklärten allerdings, dass dies als alleinige Erklärung für deren Entstehung nicht hinreichend ist, da auch eine aktive Freisetzung aus der Zelle in Betracht gezogen werden muss. Eine mögliche Theorie wird hier in Bezug auf neutrophile extrazelluläre Traps (NETs) beschrieben (Fuchs et al. 2007). Diese besondere Form der DNA-Fragmente ist mit Histonen sowie antibakteriell wirkenden Proteinen gekoppelt. Hier konnte sowohl bei Zelluntergang wie auch bei Entzündungsgeschehen eine Freisetzung, die von reaktiven Sauerstoffspezies abhängig war, identifiziert werden. Somit wird eine aktive Freisetzung durch immunkompetente Zellen vermutet.

Generell kann frei zirkulierende DNA in mitochondriale und nukleäre DNA unterschieden werden (Budnik, Kloth et al. 2013), wobei bei der mitochondrialen DNA in zellfreie und zellgebundene Formen unterschieden werden muss.

3.2. Zellfreie zirkulierende nukleäre DNA und deren Bedeutung

Die erste Beschreibung der zellfreien zirkulierenden DNA geht auf das Jahr 1948 zurück (Mandel und Metais, 1948). Hierbei können niedrige Konzentrationen dieser DNA auch bei gesunden Individuen nachgewiesen werden. Erhöhte Werte der

zellfreien zirkulierenden nukleären DNA (cf-nDNA) haben als Forschungsgegenstand der letzten Jahre zunehmend an praktischer Bedeutung gewonnen. Hierbei können zwei Haupteinsatzgebiete unterschieden werden: klinisch dienen sie als Parameter für den Verlauf akuter und chronischer Erkrankungen, in der Sportmedizin zeigen sich belastungsabhängige Verläufe.

Klinisch konnte mittlerweile eine sehr gute Korrelation der cf-nDNA-Werte mit vielen verschiedenen Krankheitsbildern nachgewiesen werden. Diagnostisch und prognostisch zeigte sich ein Zusammenhang zu Autoimmunerkrankungen (Swarup et al. 2007); vor allem der systemische Lupus erythematodes, eine Kollagenose, war schon früh als mit erhöhten cf-nDNA-Werten assoziierte Erkrankung erkannt worden (Tan et al. 1966, Tug et al. 2014). Bei Tumorerkrankungen bestand zwar keine Korrelation von cf-nDNA-Konzentrationen und Tumorage sowie Tumorgroße, allerdings zeigten metastasierte Tumoren weitaus höhere Konzentrationen von cf-nDNA (Ehlert, Tug et al. 2017). Somit stellen hohe cf-nDNA-Level ein schlechtes prognostisches Zeichen dar (Leon et al. 1977). Neuere Untersuchungen zeigen auch die Möglichkeit der prädiktiven Anwendung von cf-nDNA in Bezug auf Therapieansprechen und Entwicklung des Tumors (Heitzer et al. 2015). Eine breit angelegte Studie zu Patienten mit Sepsis zeigte erhöhte cf-nDNA-Werte sowohl bei septischen Patienten im Vergleich zu solchen, die keine Sepsis entwickelten, wie auch bei Patienten, die auf Intensivstation behandelt wurden im Vergleich zu solchen, die sich auf einer Normalstation befanden. Ebenso waren erhöhte Level bei septischen Patienten zu finden, die im Krankheitsverlauf verstarben, gegenüber jenen, die sich von der Krankheit erholten. Dadurch kommt cf-nDNA als unabhängiger Marker für die Mortalität bei septischen Krankheitsverläufen in Betracht (Rhodes et al. 2006) und könnte zukünftig in der standardisierten Diagnostik eine größere Rolle spielen. Eine weitere Untersuchung von cf-nDNA-Werten erfolgte durch Lo et al. (2000) an Patienten nach nicht näher bezeichnetem Trauma. Hierbei fand sich ein Zusammenhang zwischen cf-nDNA-Erhöhungen und gesteigerter Mortalität auf Intensivstationen. Des Weiteren liegen auch Untersuchungen für Patienten mit Schlaganfällen (Rainer et al. 2003) und Herzinfarkten vor (Chang et al. 2003).

Sportmedizinisch erfolgten erste Studien zur cf-nDNA-Kinetik durch Atamaniuk et al. (2004 und 2008). Untersucht wurden hier die Anstiege nach einer Belastung durch Halbmarathon- beziehungsweise Ultramarathon-Läufe. Belastungsabhängig konnte ein starker Anstieg der cf-nDNA-Level gezeigt werden, der später auch in vielen

weiteren Studien zu finden war. So unter anderem bei verschiedenen Laufband-Belastungen (Beiter et al. 2010), intensiv durchgeführtem Widerstandstraining (Fatouros et al. 2006, Atamaniuk et al. 2010) sowie Stufenbelastungen auf einem Laufband (Breitbach et al. 2014). Unterschiede in der Kinetik der cf-nDNA-Anstiege zeigten sich hierbei als relativ gering ausgeprägt, während die Absolutwerte erheblich differierten. Im Vergleich der verschiedenen Studien ist von einem schnellen Anstieg auszugehen, der wenige Minuten nach Ende der Belastung sein Maximum erreicht und nach 30 Minuten wieder auf sein Ausgangsniveau zurückkehrt (Breitbach et al. 2014). Einzig Atamaniuk et al. (2004) konnten bei den Ultramarathon-Läufen verlängerte Anstiege bis über sechs Stunden nach Belastung nachweisen, die erst nach 24 Stunden wieder die Ausgangswerte erreicht hatten. Damit ist eine Korrelation zwischen der Intensität der vorangegangenen Belastungen und der Dauer der cf-nDNA-Erhöhung zu vermuten (Fatouros et al. 2010).

3.3. Zellfreie zirkulierende mitochondriale DNA und deren Bedeutung

Während im Bezug auf die klinische Relevanz von zellfreier zirkulierender mitochondrialer DNA (cf-mtDNA) schon einige Studien existieren, ist deren Bedeutung aus belastungsphysiologischer Sicht, anders als die der cf-nDNA, bisher nur wenig erforscht.

Das mitochondriale Genom besteht aus 16569 bp (Anderson, Bankier et al. 1981) und liegt sowohl in Assoziation zu Proteinen (Garrido, Griparic et al. 2003) als auch der inneren mitochondrialen Membran (Nicholls and Minczuk 2014) vor. Bogenhagen konnte 2012 zeigen, dass zwischen 500 und 12900 Kopien des mitochondrialen Genoms pro Zelle vorliegen. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass hiervon ein Großteil für Proteine der Atmungskette kodiert (Anderson, Bankier et al. 1981).

Cf-mtDNA konnte als wichtiger Aktivator der unspezifischen Immunantwort über verschiedene zelluläre Signalwege identifiziert werden. Hierzu zählen unter anderem TLR9 (maßgeblich für die Bindung viraler und bakterieller Antigene unter anderem auf dendritischen Zellen), NLRP3 (Verstärkung einer Immunantwort bei Bindung extrazellulärer Harnsäure) und STING (Aktivierung des Interferon Signalwegs bei Infektion mit intrazellulären Erregern) (Chunju Fang et al. 2016). Diese fungieren neben der Bekämpfung bakterieller und viraler Erreger auch als Mediatoren der Autoregulation entzündlicher Prozesse infolge von Zelluntergang und innerer Beanspruchung durch äußere Einflussfaktoren dienen. Die Aktivierung dieser

Signalwege wird durch die Ausschüttung von pathogen- und zellschaden-assoziierten molekularen Mustern (PAMPs und DAMPs) aus den Mitochondrien erklärt, die durch erhöhten Kalziumfluss und Phosphorylierung von MAP-Kinasen zu Migration und Degranulation der neutrophilen Granulozyten führen (Zhang et al. 2010). Des Weiteren zeigte sich mtDNA als Stimulus für die Bildung der bereits bei der cf-nDNA beschriebenen NETs (McIlroy et al. 2014; Itagaki et al. 2015). Itagaki et al. konnten auch zeigen, dass diese Bildung lediglich von TLR9, nicht aber wie zuvor vermutet von der Aktivität der NADPH-Oxidase, abhängig war.

Krankheitsbezogen wurden bereits verschiedene Pathologien untersucht. So konnte im Tierexperiment eine wesentliche Relevanz für die Überwachung der Taucherkrankheit erkannt werden (Vallee et al. 2013). In symptomatischen Individuen zeigte sich hierbei eine wesentlich höhere Konzentration von cf-mtDNA als in asymptomatischen Tieren. Weiterhin konnten zu diesem Thema auch klinische Studien durchgeführt werden. Eine Untersuchung an Traumapatienten zeigte signifikante Anstiege in cf-mtDNA-Konzentrationen und eine positive Korrelation mit der Schwere der Verletzungen (Lam et al. 2003). Zudem konnte zuletzt erst nachgewiesen werden, dass mtDNA und cf-nDNA zu einer gesteigerten Gerinnung durch Thrombinaktivierung führten (Bhagirath et al., 2015). Eine weitere Studie kam außerdem zu dem Ergebnis, dass die cf-mtDNA-Level bei jüngeren Probanden höher lagen als bei Älteren (Itagaki et al. 2015). Dies ist zum Einen durch niedrigere Konzentrationen an TLR9 in älteren Patienten oder zum Anderen durch bei diesen Probanden erhöhte Enzymaktivität von Neutrophiler Elastase und Myeloperoxidase (die dem cf-mtDNA-Abbau dienen) zu erklären. Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen traumainduziertem Multiorganversagen und Superinfektion bei älteren Patienten mit erhöhter NET-Bildung liegen ebenfalls vor. Zudem korrelierte die gemessene Konzentration mit der späteren Letalität der Patienten (Itagaki et al. 2015). Bei Krebspatienten konnte zum Teil ein Absinken der cf-mtDNA-Werte gemessen werden (Kohler et al. 2009), das durch eine Aktivierung von DNase I bei diesen Patienten erklärbar wäre. DNase I dient unter anderem dem Abbau dieser kleinen DNA-Fragmente und wird sowohl bei Erkrankungen als auch bei Belastung aktiviert. Somit könnte bei geringen Anstiegen der Abbau durch dieses Enzym überwiegen und so die Konzentration unter physiologische Werte senken (Shockett et al. 2015). Zum anderen konnten auch in verschiedenen Studien Anstiege der cf-mtDNA bei Tumorerkrankungen gezeigt werden (Hou, Chen et al. 2013). Der genaue Pathomechanismus bleibt hier also Gegenstand wissenschaftlicher Forschung.

Erhöhte Werte zeigten sich weiterhin bei Autoimmunerkrankungen wie der Granulomatose mit Polyangiitis (Surmiak et al. 2015) sowie bei gesteigerter Gerinnung. Weitere Untersuchungen zur Beeinflussung der Gerinnung wiesen nach, dass Thrombozyten nach ihrer Aktivierung ganze Mitochondrien freisetzen (Boudreau et al. 2014). Ebenso präsentierte sich die cf-mtDNA als Akutmarker beim Herzinfarkt, die sehr schnelle Anstiege zeigte, die noch vor gängigen Laborparametern wie Troponin I erfolgten (Wang, Xie et al. 2015).

Trainingsdiagnostisch ist die Messung der cf-mtDNA weitaus weniger etabliert. Während Beiter et al. (2010) eine Korrelation der cf-nDNA-Anstiege mit einer Laufband-Belastung belegen konnten, korrelierten die Werte der cf-mtDNA in gleicher Studie nicht. Es war kein signifikanter Anstieg zu erkennen. Eine weitere Untersuchung (Shockett et al. 2015) ergab sogar eine entgegengesetzte Kinetik. In einem Laufband-Versuch über 90 Minuten bei 60% VO₂max sank die cf-mtDNA-Konzentration zu den Zeitpunkten 54 und 90 Minuten. Mögliche Erklärungsansätze bilden hier ebenfalls die Aktivierung der DNase I oder die vermehrte Aufnahme von cf-mtDNA in Muskelfasern oder Endothelzellen durch vermehrte Bindung neutrophiler Granulozyten über TLR9 (Shockett et al. 2015). Hummel et al. (2018) wiesen bei einer Laufbandbelastung mit 15%-iger Steigungsrate sowohl Anstiege von cf-nDNA als auch von cf-mtDNA nach, die durch psychische Belastung in gleicher Weise reproduzierbar waren.

3.4. Mitochondriale DNA und Thrombozyten

Thrombozyten sind entscheidende Mediatoren der Hämostase, die keine Zellkerne, jedoch Mitochondrien besitzen und diese bei ihrer Abschnürung aus Megakaryozyten erhalten (Richardson et al., 2005). Eine besondere Bedeutung für die Messung mitochondrialer DNA scheint ihre Interaktion mit Thrombozyten zu haben. Früh zeigten Clejan et al. (1977), dass Thrombozyten cf-DNA nach Inkubation auf ihrer Oberfläche binden konnten. Auch für einzelsträngige DNA konnte dieses Verhalten nur wenig später nachgewiesen werden (Dorsch et al., 1981). Ein weiterer Zusammenhang konnte zwischen der Konzentration mitochondrialer DNA und den Thrombozytenkonzentrationen in transfundierten Patienten nachgewiesen werden (Doescher, Peterskofen et al. 2014). Bei der richtigen Bestimmung dieser Werte scheint allerdings auch die Zentrifugation der Blutproben eine entscheidende Rolle zu spielen. So führt schnellere Zentrifugation zu stärkerer Aktivierung von

Thrombozyten (Plebani, Lackner et al. 2016) und somit zu stärkerer Freisetzung ganzer Mitochondrien (Boudreau et al. 2014), wohingegen bei höheren Geschwindigkeiten auch mehr Thrombozyten aus dem Plasma eliminiert werden konnten (Plebani, Lackner et al. 2016). Zu beachten ist hierbei, dass die vollständige Entfernung von Thrombozyten nur durch zweimalige Zentrifugation gelang. Söderström et al. (2016) zeigten zudem, dass eine deutlich geringere P-Selektin-Expression auf Thrombozyten durch Zentrifugationsgeschwindigkeiten von 150-200xg für 10 Minuten erzielt werden konnte, während auch hier nur eine vollständige Elimination der Thrombozyten bei zweifacher Zentrifugation gelang. Es konnte jedoch auch nachgewiesen werden, dass eine zweifache Zentrifugation zu einer Erhöhung der Thrombozyten-Aktivierung führte (Seidel et al. 2019).

Neuere Untersuchungen zeigten, dass sich die Konzentration der mtDNA mit dem Vorliegen der Anzahl an Thrombozyten erhöhte, jeweils um den Faktor 1,07 je 1000 Thrombozyten (Hurtado-Roca et al. 2016), wohingegen sie sich umgekehrt proportional zur Zahl an Leukozyten verhielt.

3.5. Messmethoden und -ergebnisse zellfreier zirkulierender DNA

Für die Messung von cf-nDNA existieren bereits viele gut validierte Methoden. Eine davon ist die in den Versuchen dieser Arbeit verwendete Quantifizierung mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) für Fragmente einer Länge von 90 und 222 Basenpaaren (bp), die im entsprechenden Methodik-Teil näher beschreiben wird (Breitbach et al. 2014). Dieses Verfahren, das eine Direktmessung der cf-nDNA im Plasma vorsieht, zeigte geringere Verluste an DNA mit 2,79-fach höheren Werten als nach vorheriger Aufreinigung mittels DNA-Extraktion und Präzipitation mit Phenol-Chloroform-Isoamyl. Die höchsten cf-nDNA-Werte wurden bei Halbmarathon-Läufen gemessen (Atamaniuk et al. 2008). Weitaus interessanter sind die Verläufe und Anstiege im Verhältnis zu den Ausgangswerten der cf-nDNA. Verschiedene Studien (u.a. Fatouros et al. 2006 und Breitbach et al. 2010) zeigten unabhängig voneinander einen belastungsabhängigen Anstieg ab etwa 70% VO₂ max an (Beiter et al. 2010), der zum Belastungsende sein Maximum erreichte und 30 Minuten nach Belastung wieder zu seinem Ausgangswert zurückkehrte. In allen Studien außer bei den Ultramarathons (Atamaniuk et al. 2004) erreichten die Konzentrationen nach zwei Stunden wieder ihren Ausgangswert. Im Vergleich zwischen der Messung in venösem und kapillärem Plasma (entnommen an der Fingerbeere der Probanden)

konnten 9,8-fach höhere Werte für die venösen Proben bestimmt werden, die sich allerdings in ihrer Kinetik nur unwesentlich unterschieden (Breitbach et al. 2014).

Für die Messung der cf-mtDNA liegen bereits verschiedene Methoden vor. So ist eine qPCR nach Isolation und Aufreinigung der DNA etabliert (Beiter, Fragasso et al. 2011). Weitere Methoden sind der Southern Blot (Southern, 1975; Shmookler Reis and Goldstein 1983), die Sequenzierung (Zhang, Nakahira et al. 2016) und die digital droplet PCR (Memon, Zoller et al. 2017).

Eine Direktmessung von cf-mtDNA im Plasma bedarf noch der verbesserten Etablierung. Erstmals wurde eine solche Messung in der Dissertationsschrift von Miriam Albus (2018) beschrieben. Grundlegende Überlegungen bilden die Betrachtung der Fragmentlängen mitochondrialer DNA, deren Metabolisierung und Abbau sowie mit dieser Art der DNA assoziierte Einflussfaktoren.

Der Vorteil einer Direktmessung besteht sowohl in der fehlenden Beeinflussung durch die Reagenzien bei einer Aufreinigung (Huggett, Novak et al. 2008) als auch der Vermeidung des Verlusts von DNA-Fragmenten durch diese (Fleischhacker, Schmidt et al. 2011). Einen besonderen Fallstrick bildet hierbei vor allem die Unterscheidung der gemessenen DNA-Fragmente bei verschiedenen Zentrifugationsgeschwindigkeiten. Bei Zentrifugationsgeschwindigkeiten von 10.000xg konnte tatsächlich nur zellungebunde cf-mtDNA gemessen werden (Alam, Kanki et al. 2003), was darauf schließen lässt, dass der präanalytischen Verarbeitung der Proben entscheidende Bedeutung zukommt (Helmig, Frühbeis et al. 2015)

Zhang et al. (2016) wiesen nach, dass der Großteil der Fragmente von cf-mtDNA eine Länge von 30 bis 60 bp aufweist, mit einem Maximum bei 42 bp. So lagen Fragmente mit einer Länge von weniger als 100 bp 11,5-fach häufiger vor als solche mit einer Länge von mehr als 100 bp. Dies übt einen entscheidenden Einfluss auf die Menge der durch qPCR amplifizierbaren DNA und folglich auch auf die Messgenauigkeit der Methode aus.

Ebenso ist zu berücksichtigen, dass cf-mtDNA deutlich empfindlicher für Degeneration ist als cf-nDNA, da sie nicht an Histone gebunden vorliegt (Zhang et al. 2016). Histone verbessern die Stabilität von DNA-Fragmenten wobei sie diese auch gleichzeitig vor chemischer Modifikation in Form von Methylierung, Phosphorylierung und weiterer Veränderungen schützen. Dies dient als mögliche Erklärung für die im Mittel geringeren Fragmentlängen von cf-mtDNA gegenüber cf-nDNA, deren mittlere Fragmentlänge durchschnittlich bei 167 bp liegt, da sie nicht an Histone gebunden in den Mitochondrien vorliegt (Lo et al. 2010). Auffällig ist, dass sich cf-mtDNA-

Fragmente nicht einheitlich betrachten lassen, da sie sich sowohl zwischen Patienten als auch nach ihren Ursprungszellen unterscheiden, dies wird als Heteroplasmie bezeichnet (u.a. Wallace et al. 2013).

Einen weiteren starken Einfluss auf die Messergebnisse bei der Betrachtung mitochondrialer DNA hat die Verarbeitung der Proben vor der Messung. Während in früheren Studien eine zweimalige Zentrifugation mit anschließender Filtration empfohlen wurde (Chiu et al. 2003), konnten Helmig et al. (2015) unlängst zeigen, dass cf-mtDNA über verschiedene Bindungsmechanismen mit Mikrovesikeln vergesellschaftet ist. Dies kann bei Zentrifugation mit zu hohen Gravitationskräften dazu führen, dass die cf-mtDNA aus dem Plasma eliminiert werden kann. Andererseits sedimentieren Mitochondrien erst bei hohen Zentrifugationsgeschwindigkeiten im Bereich von 16000xg, sodass bei zu geringer Geschwindigkeit sowohl cf-mtDNA als auch die DNA aus frei zirkulierenden Mitochondrien analysiert würde, die etwa 10-100 fach höher liegt als die cf-mtDNA (Helmig et al. 2015). Stawski et al. (2017) konnten erstmals nachweisen, dass es zu einem signifikanten Anstieg von cf-mtDNA durch sportliche Betätigung kam (bei Zentrifugation mit 16000xg), indem Probanden drei Laufband-Tests bei 70% VO₂ max bis zur Erschöpfung durchführten, während die Ausgangskonzentrationen im Verlauf der Tests absanken. Dies deutet darauf hin, dass durch regelmäßiges Training cf-mtDNA-Level dauerhaft gesenkt werden könnten (Shockett et al. 2015, Stawski et al. 2017) und dadurch eine Gesundheitsverbesserung aufgrund geringerer entzündlicher Aktivierung möglich wäre. Bei Schwimmern konnte ein Zusammenhang zwischen Trainingszustand und Menge mitochondrialer DNA gezeigt werden, wobei Trainierte signifikant höhere Werte aufwiesen als Untrainierte (Baykara, Sahin et al. 2016).

Der Einfluss anderer Faktoren auf cfDNA verbleibt nicht eindeutig geklärt. Neben vielen verschiedenen Enzymen, die DNA abbauen und modifizieren können, ist auch der Abbau durch Leber und Niere noch unklar (Saukkonen et al. 2008). Dies ist ein noch nicht abschätzbarer Einflussfaktor auf Kinetik und Ausgangskonzentration von cfDNA, dem bei multimorbiden Patienten steigende Bedeutung zukommen könnte.

3.6. Zellfreie zirkulierende DNA und andere Marker für Organbelastung

In verschiedenen Untersuchungen zeigte sich ein ähnlicher beziehungsweise überlegener Verlauf zwischen cfDNA und anderen etablierten Belastungsmarkern. Im

Vergleich zur Kreatinkinase erwies sich die Kinetik der cf-nDNA als deutlich schneller (Breitbach et al. 2012), sodass mit einer effizienteren Zeiteingrenzung von Ereignissen zu rechnen ist. Ebenso war ein nahezu paralleler Verlauf zwischen cf-nDNA und High-Mobility-Group-Protein B1 (HMGB1) nachweisbar (Beiter et al. 2010). HMGB1 wird beim Zelltod aus nekrotischen Zellen freigesetzt und dient im Körper als Alarmsignal für von außen einwirkende Noxen. Fatouros et al. (2006) untersuchten zusätzlich die Korrelation zwischen cf-nDNA und Stoffen die routinemäßig im Blutbild bestimmt werden können, hier zeigte sich jedoch kein direkter Zusammenhang zwischen cf-nDNA und CK, CRP oder Harnsäure. Auch gegenüber Laktat, das vorwiegend in der Sportmedizin zur Leistungsdiagnostik gemessen wird, aber auch im Blutbild als Indikator für den Ablauf anaeroben Stoffwechsels dient, zeigte cf-nDNA eine schnelle Kinetik (Breitbach et al. 2012).

Mit der folgenden Versuchsreihe sollte nun herausgefunden werden, wie sich die mtDNA unter Belastung bei korrekter Probenverarbeitung tatsächlich verhält und wie laborchemische Größen und korpuskuläre Blutbestandteile in Bezug zu dieser stehen.

4. Methodik

4.1. Herstellung von Standardlösungen mitochondrialer DNA

Die Herstellung der Standardlösung mitochondrialer DNA erfolgte in zwei verschiedenen Ansätzen.

Ansatz 1 bildete der Bakterien-Stock „mt Standard 1“, der mtDNA aus E. coli-Bakterien enthält. Hieraus wurde mit einer 100 μ l- Pipettenspitze der Firma Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen eine geringe Menge Bakterien von der Oberfläche des Stocks abgekratzt und die Pipettenspitze anschließend in ein 15 ml Falcon Tube von Greiner Bio-One Frickenhausen abgeworfen. Unter Zugabe von 6 ml LB-Medium (zusammengesetzt aus 5 g Trypton, 2,5 g Hefeextrakt und 2,5 g Natriumchlorid aufgelöst in 500 ml destilliertem Wasser) und 6 μ l Ampicillin, um die Vermehrung anderer durch Verunreinigungen eingebrachter Bakterien zu verhindern, wurde der Ansatz bei 37°C im Brutschrank „New Brunswick Galaxy 170 R“ (Eppendorf AG Hamburg) über 16 Stunden bebrütet. Es wurden zwei Ansätze erstellt, von denen einer bei 4°C im Kühlschrank zur möglichen Weiterverarbeitung aufbewahrt wurde.

Anschließend erfolgte die Generierung von 50 μ l Probe mittels QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen GmbH, Hilden, das der Extraktion des Plasmids aus den Bakterien dient. Die Anwendung des Kits erfolgte nach Herstellerprotokoll.

Die gewonnene Probe wurde dann einem Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym EcoR1 HF von New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main, unterzogen, um die eigentliche Sequenz mitochondrialer DNA aus dem Plasmid der Bakterienkultur E.coli DH10B herauszuschneiden. Hierzu bindet das Restriktionsenzym an die entsprechende DNA-Sequenz die kloniert werden soll und schneidet diese aus dem gesamten Strang heraus. EcoR1 bindet hierbei spezifisch an DNA aus E.coli-Bakterien. Der Ansatz von 60 μ l bestand aus:

49 μ l Probe aus dem QIAprep Spin Miniprep Kit

6 μ l CutSmart Puffer (6x), New England Biolabs GmbH

1 μ l Eco-R1 HF

4 μ l H₂O

Dieser wurde einer Inkubation von 45 min bei 37°C im Mini Incubator (Labnet International, Inc, Edison, NJ, USA) unterzogen. Direkt danach erfolgte die Inaktivierung des Restriktionsenzym für 20 min bei 65°C.

Ansatz 2 war ein bereits bestehender Plasmid-Standard von Herrn Dr. Tobias Ehlert, der in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit HiFi PCR-Puffer und VELOCITY DNA Polymerase der Firma Boline GmbH, Luckenwalde, amplifiziert wurde. Der Gesamtansatz von 50,5 µl bestand aus:

HiFi-Puffer (10x)	12	µl	Velocity Polymerase (2 U/µL)	1	µl
MgCl ₂ (25mM)	0,25	µl	Primer (3,5mM)	4	µl
dNTPs (10mM)	1,2	µl	Template	3	µl
H ₂ O	28,6	µl			

Nach 30-sekündigem initial Heating bei 98°C wurde dieser über 40 Zyklen amplifiziert, wobei die Denaturierung über 15 s bei 98°C, das Annealing über 40 s bei 63°C und die Elongation über 10 s bei 72°C erfolgte. Zudem wurde eine Schmelzkurve mit einem Inkrement von 0,5°C erstellt, bei der über Temperaturanstieg eine Aussage über die Spezifität der qPCR erfolgen kann. Fragmente weisen eine spezifische Schmelztemperatur auf, im Wesentlichen abhängig von ihrer Länge. Liegt in der Schmelzkurvenanalyse ein mehrgipfelter Verlauf vor, so spricht dies für die Entstehung von Nebenprodukten wie beispielsweise Primer-Dimeren.

Bei beiden Ansätzen erfolgte eine Ethanol-Präzipitation nach Protokoll (siehe Standard-Labormethoden) und eine Gelelektrophorese (siehe Standard-Labormethoden) in einem 1,8% Agarose-Gel mit einer 100 Basenpaar DNA-Leiter (Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe) als Referenz für 60 min bei 80 V. Im Anschluss erfolgte die Analyse des Gels mittels Gel Doc XR+ (siehe Standardlabormethoden) und die Aufreinigung mit dem Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden) nach Herstellerangaben.

Die letztendliche Bestimmung der Standardkonzentration erfolgte durch Messung der Probe am NanoDrop 3300 (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) und die Berechnung der Kopienzahl mit dem ThermoFisher Copy Number Calculator (<http://www.thermoscientificbio.com/webtools/copynumber/>, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA; siehe Standard-Labormethoden).

4.2. Standard-Labormethoden

Folgende Methoden fanden in der Etablierung der qPCR für mitochondriale DNA ihre Anwendung und wurden in der immer gleichen Weise durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der Methoden zu gewährleisten.

4.2.1. Ethanol-Präzipitation

Die Ethanol-Präzipitation erfolgte nach folgendem Schema. Hierzu werden der zu präzipitierenden Probe das 0,1-fache Volumen 3-molarer Natriumacetat-Lösung mit pH 5,2 und die 2,5-fache Menge 100%-igen Ethanols (Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe) zugesetzt. Die Lösung wird dann für wahlweise eine Stunde bei -80°C in Trockeneis oder über Nacht bei -20°C gelagert, um die DNA aus der Probe zu präzipitieren. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation der Probe bei 4°C über 30 min und 16.000xg, um die Phasen voneinander zu trennen. Nach der Entfernung des Überstands werden 500 µl 70%-iger Ethanol-Lösung hinzugefügt und eine weitere Zentrifugation bei 4°C und 16.000xg für 2 min durchgeführt. Dieser Schritt wird dann noch einmal wiederholt. Nach der Entfernung des überschüssigen Ethanols kann die DNA bei Raumtemperatur getrocknet werden, dies dauert etwa 5-10 Minuten. Die DNA wird anschließend in 50 µl TE-Puffer der Firma Life Technologies GmbH, Darmstadt, resuspendiert und zur besseren Lösung für 30 min bei 37°C und 200 rpm im Schüttler bewegt.

4.2.2. Gelelektrophorese

Die Durchführung der Gelelektrophoresen erfolgte in einer horizontalen Kammer der Firma Bio-Rad, München. Hierzu wurde Agarose (Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe) in Lösungen von 0,8 - 2% in TAE-Puffer (Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe) eingebracht und nach Erhitzung mit dem Interkalanz Ethidiumbromid (Konzentration nach Herstellerangabe von Carl Roth GmbH + Co.KG) versetzt. Anschließendes Gießen in die Kammer erbrachte ein Gel mit festgelegter Breite und Dicke, welches anschließend mit TBE-Puffer benetzt werden musste. Unter Spannungen von 80 V und Zeitdauern von 30-90 min je nach Dichte des Gels erfolgte die Auftrennung der Probe. Ladepuffer war dabei 10%-iges Bromphenol Blau DNA Loading Dye (New England Biolabs, Frankfurt/Main), als Referenz für die

Fragmentlängen dienten die DNA Leitern „100 bp“ und „pUC19“ der Firma Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe.

4.2.3. Aufreinigung von DNA aus einer Gelelektrophorese

Zur Auswertung der Gelelektrophorese wurde die Software des Gel Doc XR+ (Bio-Rad, München) verwendet. Nach Abgleich der Fragmentlängen mit der aufgetragenen DNA-Leiter konnte die entsprechende Bande unter möglichst kurzer Durchleuchtung mit UV-Licht (dient der Vermeidung von Strangbrüchen) detektiert und mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten. Die im Gel gewonnene Bande konnte anschließend in ein 2 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf AG, Hamburg) überführt und danach mit dem Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden) nach Herstellerangaben weiterverarbeitet werden. Hieraus ergeben sich 50 μ l Probe, deren Konzentration bestimmt werden kann, um einen Standard bekannter Konzentration zur Verfügung stehen zu haben.

4.2.4. Messung der Konzentration am NanoDrop 3300

Der NanoDrop 3300 (PEQLAB Biotechnologies, Erlangen) ist ein Fluorospektrometer, das heißt es wird ein interkalierender Farbstoff (hier PicoGreen der Firma Thermo Fisher) benötigt, um ein Signal zu messen. Vor der Benutzung wurde das Gerät mit Ethanol und Aqua dest. auf einem fusselfreien Tuch (Kimberly-Clark GmbH, Koblenz) gereinigt, um mögliche Verunreinigungen mit DNA zu entfernen, und die PicoGreen-Stocklösung hergestellt (2 μ l PicoGreen + 398 μ l TE-Puffer). Als Verhältnis zwischen PicoGreen-Lösung und zu messender Probe ist 1:1 vorgesehen, zur Verifizierung ist zusätzlich die 5-fache Messung jeder Probe (2 μ l) erforderlich, das heißt es werden 10 μ l Messlösung benötigt (5 μ l Probe + 5 μ l PicoGreen-Lösung). Nach Herstellung der Messlösung wurde die gevortexed (Vortex-Genie 2, Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe) und für genau 4 min unter Lichtabschluss inkubiert. Vor der Messung der Proben erfolgte eine „blank“-Messung mit dem TE-Puffer, um dessen Einfluss aus den Endkonzentrationen herauszurechnen. Die anschließende 5-fache nacheinander erfolgende Messung der Probe (um einen reliablen Mittelwert zu erzeugen) musste in möglichst kurzen Abständen durchgeführt werden, um mögliche Veränderungen durch längere Inkubationszeiten zu vermeiden. Als Dilutionsfaktor wurde in der Software 2,0

gewählt. Die Berechnung der Mittelwerte der 5 Messungen und damit die Bestimmung der Konzentration der Probe erfolgte nach Exportieren der Werte in Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Aus den bestimmten Konzentrationen konnte dann die vorliegende Kopienzahl der mitochondrialen DNA mit dem ThermoFisher Copy Number Calculator (<http://www.thermoscientificbio.com/webtools/copynumber/>, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) berechnet werden. Dieser legt die Länge des verwendeten Fragments, das mittlere Gewicht der in der DNA enthaltenen Basen sowie die auf dem NanoDrop 3300 gemessene Konzentration zu Grunde.

4.2.5. Ansetzen von Standardreihen zur Bestimmung des LOQ

Alle Standardreihen zur Bestimmung des LOQ (Limit of quantification) wurden nach dem selben Verdünnungsschema erzeugt. Das LOQ beschreibt die kleinste gegebene Kopienzahl, die mit dem etablierten Verfahren noch sicher quantifiziert werden kann. Hierzu wurde über eine Standardreihe diejenige Anzahl von DNA-Kopien ermittelt, bei der die Standardabweichung noch gering genug war, um von der gemessenen Konzentration noch auf die korrekte Kopienzahl zurückzuschließen. Das heißt man nimmt einen Standard, bei dem man die DNA-Kopienzahl genau kennt und misst die DNA-Konzentration mittels qPCR. Anschließend rechnet man anhand der Masse des Fragments auf die DNA-Kopienzahl zurück und vergleicht diese mit der anfänglich eingesetzten Zahl. Liegt diese innerhalb der Standardabweichung, so wird der Wert als quantifizierbar angenommen.

Zunächst wurde die am NanoDrop 3300 gemessene DNA Konzentration mit dem ThermoFisher Copy Number Calculator in die Kopienzahl des untersuchten DNA-Fragments umgerechnet. Ausgehend von dieser Kopienzahl erfolgte eine Verdünnung auf 10^9 Kopien/ μl H₂O, die dann im Verhältnis von 20 μl Template und 180 μl H₂O in vier Schritten von 10^8 auf 10^5 Kopien verdünnt wurde. Um die Kopienzahlen für die eigentliche LOQ-Reihe zu erhalten, wurden 5,12 μl der 10^5 Kopienzahl-Probe mit 44,9 μl H₂O versetzt, was 10240 Kopien/ μl ergab. Davon ausgehend konnte dann die Reihe im Verhältnis 1:1 von 25 μl Template und 25 μl H₂O verdünnt werden, sodass sich die folgenden Kopienzahlen ergaben:

10240, 5120, 2560, 1280, 640, 320, 160, 80, 40, 20 / μl H₂O

Die Standardreihe wurde anschließend eingefroren und bei -20°C gelagert.

4.3. Etablierung einer qPCR zur Messung zellfreier mitochondrialer DNA im Plasma

Mit den aus der Bakterienkultur gewonnenen Standardproben sollte eine qPCR zur Direktmessung zellfreier mitochondrialer DNA im Plasma etabliert und durch eine LOQ-Reihe die kleinste noch sicher quantifizierbare DNA-Konzentration ermittelt werden. Zur Ermittlung der optimalen Konzentrationen an Reagenzien wurden verschiedene qPCR-Durchläufe ausgeführt, die im Folgenden näher beschrieben werden. Als Referenzwerte für die anfänglich verwandten Konzentrationen dienten die bereits durchgeführten Versuche von Miriam Albus (2018).

4.3.1. Vergleich von Tego- und HiFi-Puffer

Zum Vergleich der beiden PCR-Puffer Tego und HiFi (Bioline GmbH, Luckenwalde) wurden jeweils 10 Proben gemessen. Zum Einen eine Verdünnungsreihe mit festen Konzentrationen zellfreier mitochondrialer DNA von 10^6 - 10^2 DNA-Kopien/ μ L in 1:10-Verdünnungsschritten, die jeweils im Verhältnis 2:5 mit Plasma verdünnt wurde (1,65 μ l Template + 0,55 μ l Plasma), zum Anderen 5 Kontrollproben: Positivkontrolle Daniel pre/post, Probe 10^4 ohne Plasma und als Negativkontrollen H_2O und bei 100.000 x g zentrifugiertes humanes Plasma. Zum Ansetzen der beiden MasterMixe wurde folgendes Pipettierschema verwandt:

HiFi-/Tego-Puffer (2x)	360 μ l	FITC (0,1x)	6,25 μ l
MgCl ₂ (25mM)	12,5 μ l	H ₂ O	79,8 μ l
dNTPs (10mM)	36 μ l	Phusion Polymerase (5U/ μ L)	12,5 μ l
SYBR Green (10x)	8,75 μ l		

Davon wurden jeweils 144,1 μ l verwendet und mit 30,8 μ l Primern vermischt.

4.3.2. Vergleich von Phusion- und VELOCITY-Polymerase

Unter Verwendung des HiFi-Puffers wurden die qPCR-Ergebnisse zwischen Phusion- (New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main) und VELOCITY-Polymerase (Bioline GmbH, Luckenwalde) bei niedrigen Konzentrationen mitochondrialer DNA verglichen. Es erfolgte die Messung von vier Verdünnungen der Konzentrationen 10^5

- 10² (1:10-Schritte) aus einem neuen Ansatz von Bakterien und einer bei 100.000xg zentrifugierten humanen Plasma-Probe als Negativkontrolle. Hierbei galt das selbe Pipettierschema wie in, wobei jeweils 72 µl Mastermix und 15,4 µl Primer verwendet wurden.

4.3.3. Bestimmung der optimalen MgCl₂-Konzentration

MgCl₂ (Qiagen GmbH, Hilden) kann die Amplifikation niedriger DNA-Konzentrationen beeinflussen und ist bereits in den verwendeten Puffern enthalten. Während im bereits bekannten Ansatz 0,5 mM MgCl₂ zusätzlich zur im Puffer enthaltenen MgCl₂-Konzentration eingesetzt wurde, sollte die Effizienz der Amplifikation durch Variation dieser Konzentration überprüft werden. Dazu musste ein MasterMix ohne MgCl₂ und H₂O (das als Ausgleichsgröße für gleichbleibende Volumina eingesetzt wird) hergestellt werden:

HiFi (5x)	73,4 µl	FITC (0,1x)	3,19 µl
dNTPs (10mM)	7,65 µl	VELOCITY Polymerase (2U/µL)	6,38 µl
SYBR Green (10x)	4,46 µl		

Dieser wurde mit 28,56 µl PrimerMix versetzt und zur Messung dreier Proben niedriger Konzentration (10³, 10² und humanem Plasma als Negativkontrolle) zu jeweils 20,9 µl in vier Reaktionsgefäße (Eppendorf AG, Hamburg) aufgeteilt. Zusätzlich wurde ein Reaktionsgefäß mit 34,9 µl befüllt, da bei einer Konzentration von 0,5 mM MgCl₂ zusätzlich eine Wasser- und eine Mausplasma-Probe als Negativkontrollen gemessen werden sollten.

Entsprechend der gewünschten Endkonzentration an MgCl₂ wurden folgende Volumina hinzugefügt:

Konz. MgCl ₂ (mM)	MgCl ₂ (µl)	H ₂ O (µl)
0	0	24,5
0,25	0,5	23,9
0,5	1,7	39
0,75	1,6	22,9

Konz. MgCl ₂ (mM)	MgCl ₂ (μl)	H ₂ O (μl)
1	2,1	22,4

Die Proben der Konzentrationen 10³ und 10² wurden wiederum 2:5 mit 100.000xg-zentrifugiertem und 1:10 verdünnten Plasma versetzt.

4.3.4. Testen kürzerer Annealing-Zeiten

In allen von 4.1. bis 4.3.3. beschriebenen Versuchen wurde eine Annealing-Dauer für die Primer von 40 Sekunden gewählt, wie es im bereits vorhandenen Protokoll vorgesehen war. Aufgrund großer Ungenauigkeit bei den PCR-Ergebnissen wurde diese auf 10 Sekunden verkürzt, um die Produktion unspezifischer Nebenprodukte zu verringern. Es wurden die Konzentrationen 10⁶ und 10³ jeweils mit und ohne humanem Plasma versetzt gemessen und zusätzlich Daniel pre/post (ein als Standard verwendetes Blutplasma aus vorausgegangenen L1PA2-Messungen, das bei einer Laufband-Belastung gewonnen wurde) als Positivkontrolle, sowie H₂O und humanes Plasma als Negativkontrolle.

4.3.5. Variation der Primer-Konzentration

Im vorhandenen Protokoll zeigte sich bei der Betrachtung der Schmelzkurven während der qPCR die starke Bildung von Nebenprodukten, die auf Primer-Dimere zurückzuführen waren. Diese konnten als zweiter Peak bei schon niedrigeren Temperaturen in der Schmelzkurve dargestellt werden. Zur Ermittlung der bestmöglichen Primer-Konzentration, bei der sowohl ein effizientes Annealing, als auch eine möglichst geringe Dimer-Bildung anzutreffen waren, wurden die gleichen Proben bei zwei unterschiedlichen Primer-Konzentrationen (0,125 μM und 0,175 μM) gemessen. Als Referenz dienten die Proben der Konzentrationen 10⁶ - 10² (1:10-Schritte) sowie eine Negativkontrolle (H₂O) mit und ohne humanem Plasma. Zur Herstellung des MasterMixes wurden jeweils verwendet:

HiFi (5x)	51,8 μl	FITC (0,1x)	2,3 μl
dNTPs (10mM)	5,4 μl	H ₂ O	109,8 μl
SYBR Green (10x)	3,2 μl	VELOCITY Polymerase (2U/μL)	4,5 μl

Für die gewünschten Konzentrationen wurden 169,6 μl dieses MasterMixes mit 8,2 μl (0,125 μM) und 9,8 μl (0,175 μM) Primern gemischt.

4.3.6. Festlegen des neuen Pipettierschemas

Unter Einbeziehen, der in 4.4.4. und 4.4.5. bestimmten Veränderungen wurde das neue Pipettierschema für die Erstellung der LOQ-Reihe wie folgt festgelegt. Alle Werte gelten für die Messung einer Probe:

Reagenz	Volumen (μl) / Triplet
HiFi Puffer (5x)	4,32
MgCl ₂ (50mM)	0
dNTPs (10mM)	0,45
SYBR Green (10x)	0,263
FITC (0,1 μM)	0,188
H ₂ O	9,275
VELOCITY Polymerase	0,375
Total	14,87

4.3.7. Bestimmung des Limit of Quantification (LOQ) der Methode

Zur Bestimmung des LOQ wurde aus den generierten Standards eine LOQ-Reihe verdünnt (siehe Standard-Labormethoden). Zur Validierung der Methode war das Pipettieren jeder Verdünnungsstufe im Heptett-Ansatz notwendig. Somit ergaben sich andere Volumina an Reagenzien für die Messung einer Probe, während die Konzentrationen im Mastermix gleich blieben:

Reagenz	Volumen (μl) / Heptett
HiFi Puffer (5x)	10,08
MgCl ₂ (50 mM)	0
dNTPs (10 mM)	1,05

Reagenz	Volumen (μl) / Heptett
SYBR Green (10x)	0,613
H ₂ O	0,438
VELOCITY Polymerase	18,842
Total	31,897

Vom generierten MasterMix waren jeweils 26,6 μl Heptett zu verwenden, die mit 1,42 μl PrimerMix versetzt wurden. Hiervon wurden 30,8 μl Primer-MasterMix in ein neues Reagiergefäß pipettiert und mit 7,7 μl Template gemischt. So ergaben sich 38,5 μl je Probe von denen 7x5 μl für die Quantifizierung verwendet wurden.

Bei jeder PCR wurden vier Positivkontrollen (Daniel pre/post, Matthias pre/post) sowie zwei Negativkontrollen im Triplettansatz (siehe Pipettierschema) mitbestimmt (H₂O und humanes Plasma).

Zur Bestimmung einer geeigneten LOQ-Reihe waren insgesamt 5 qPCR-Durchläufe notwendig.

4.3.8. Protokoll der qPCR für die Messung freier mitochondrialer DNA im Plasma

Die qPCR wurde auf dem Bio-Rad CFX384 Touch Real-Time Detection System durchgeführt und mit der Software Bio-Rad CFX-Manager, 3.1 (Bio-Rad GmbH, München) ausgewertet. Nach einer 30-sekündigen Aktivierung bei 98°C erfolgten 35 Zyklen mit folgendem Protokoll:

Denaturierung	10 s	94°C
Annealing	10 s	63°C
Elongation	10 s	77°C

Die Analyse der Schmelzkurve erfolgte für jeweils 10 s im Bereich zwischen 70 und 95°C mit einem Inkrement von 0,5°C.

4.4. qPCR zur Amplifikation von L1PA2 im Plasma

Die qPCR zur Messung des L1PA2-Fragments wurde vollständig von Frau Dr. Sarah Breitbach etabliert übernommen (Breitbach et al., 2014). Die Methode dient der Messung zweier Fragmente von 90 und 222 bp Länge im L1PA2-Retrotransposon. Dieses kommt repetitiv im Genom des Menschen vor und ist somit geeignet, sowohl die Größenverteilung der einzelnen cf-nDNA-Fragmente, als auch den Prozess der Freisetzung der cf-nDNA zu untersuchen. Das 222 bp lange Fragment liegt insgesamt in 3134-facher Ausführung im menschlichen Genom vor, sodass schon bei geringsten Mengen an cf-nDNA eine Amplifikation des gewünschten Fragments sichergestellt werden kann.

Der Ansatz der Proben erfolgt jeweils in Tripletts, sodass sich folgende Mengen an zu pipettierenden Reagenzien je Probe ergaben:

Reagenz	Volumen / Probe (μ l)
TEGO-Puffer (2x)	7,5
MgCl ₂ (25 mM)	0,3
Velocity Polymerase (2 U/ μ l)	0,3
SYBR Green (10x)	0,21
FITC (1 μ M)	0,015
H ₂ O	3,39

Hierzu sind 1,2 μ l des entsprechenden Primers, sowie 2,2 μ l der zu messenden Probe hinzuzufügen. Dies ergibt ein Gesamtvolumen von 16,5 μ l, von dem jeweils 5 μ l pro Well auf der PCR-Platte verwendet wurden. Jede Probe bestand aus im Verhältnis von 1:10 verdünntem Plasma, sodass zuvor jeweils 3 μ l des gewonnen Plasmas mit 27 μ l H₂O versetzt werden mussten. Der Durchlauf der qPCR wurde auf dem Bio-Rad CFX384 Touch Real-Time Detection System der Firma Bio-Rad GmbH, München ausgeführt und mit der dazugehörigen Software (Bio-Rad CFX-Manager, 3.1) ausgewertet.

Nach einer Aktivierung für zwei Minuten bei 98°C waren 35 Zyklen zu durchlaufen.

Der Ablauf eines Zyklus bestand aus:

Denaturierung	10 s	94°C
Annealing	40 s	64°C
Elongation	10 s	75°C

Für die Schmelzkurvenanalyse wurde ein Bereich zwischen 70 und 95°C untersucht, wobei das Intervall der Messung 10 s betrug und der Temperaturanstieg bei 0,5°C je Intervall lag.

4.5. Primer

Die verwendeten Primer zur Amplifikation des mitochondrialen Genlokus wurden von Beiter, Fragasso et al. (2011) übernommen (forward Primer: 5' CTA TCC GCC ATC CCAR ACA TTG 3'; reverse Primer: 5' ATC GTG TGA GGG TGG GAC TG 3'). Zur Amplifikation diente ein 85 Basenpaar großer Genlokus im mitochondrialen Genom (Mt:15195-15279; Sequenz: CTA TCC GCC ATC CCA TAC ATT GGG ACA GAC CTA GTT CAA TGA ATC TGA GGA GGC TAC TCA GTA GAC AGT CCC ACC CTC ACA CGAT).

4.6. Untersuchung des Einflusses der Plasmaverarbeitung auf gemessene Konzentrationen zellfreier DNA

Im Folgenden sollen Untersuchungen der Einflussfaktoren auf die Höhe gemessener Konzentrationen von cf-DNA bei der Verarbeitung gewonnener Plasmaproben beschrieben werden. Hierfür wurde der Einfluss verschiedener Zentrifugationsgeschwindigkeiten ebenso untersucht wie die Abnahmhöhe des Plasmaüberstands über korpuskulären Blutbestandteilen. Des Weiteren wurde die Anzahl an Einfrier- und Auftauvorgängen und das Mengenverhältnis bei der Herstellung messbarer 1:10-Verdünnungen betrachtet.

4.6.1. Messung zellfreier DNA bei verschiedenen Zentrifugationsgeschwindigkeiten

Zur Messung des Einflusses der verschiedenen Zentrifugationsgeschwindigkeiten wurden einem Probanden 2x7,5 mL EDTA-Vollblut entnommen. Diese wurden

gleichmäßig auf 7x 2-mL-Eppis verteilt und bei unterschiedlichen Geschwindigkeiten (300g, 1600g, 2500g) für 2, 5 oder 10 min zentrifugiert. Die Zentrifugation bei 2500g erfolgte nur über 15 min. Anschließend wurde der Plasmaüberstand bis etwa 0,5 cm oberhalb der korpuskulären Blutbestandteile abgenommen und abermals unterteilt. Während eine Hälfte sofort bei -20°C eingefroren wurde, wurde die Andere bei selber Geschwindigkeit nochmals zentrifugiert und anschließend der Plasmaüberstand über den pelletierten Bestandteilen abgenommen und eingefroren.

4.6.2. Messung zellfreier DNA bei verschiedenen Pipettierhöhen

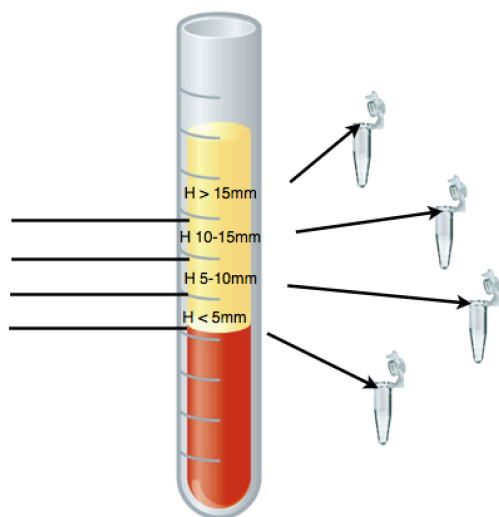


Abb. 1a Pipettierhöhe

Die Abbildung zeigt, wie man aus der zentrifugierten Blutprobe die verschiedenen Pipettierhöhen abnimmt. Nach Markierung der Nulllinie direkt oberhalb der korpuskulären Blutbestandteile markiert man mit einem Lineal in 5mm-Abständen die entsprechenden Höhen und überführt sie mit einer Pipette in die entsprechenden Eppendorf-Gefäße

Zur Messung der verschiedenen Pipettierhöhen wurden einem Probanden 2x7,5 mL EDTA-Vollblut entnommen. Das Blut wurde vollständig in ein 15 mL Falcon der Firma Greiner Bio-One, Frickenhausen GmbH überführt und anschließend für 5 min bei 1600g zentrifugiert. Zur genauen Bestimmung der gewünschten Höhen wurde anschließend ein Klebestreifen seitlich an das Falcon aufgebracht, auf dem immer im Abstand von 5mm Markierungen gesetzt wurden. Die Nulllinie wurde auf Höhe der Grenze zwischen Plasma und korpuskulären Blutbestandteilen gesetzt. Anschließend erfolgte von oben nach unten die Abnahme der 4 Phasen >15mm (H>15), 10-15mm (H10-15), 5-10mm (H5-10) und <5mm (H<5) über den korpuskulären Blutbestandteilen. Hierbei ist vor allem die Einhaltung der Reihenfolge von oben nach unten von Bedeutung, da so eine Durchmischung der verschiedenen Phasen vermieden werden kann. Nach Abnahme der Phasen wurde das Plasma unterteilt, wobei ein Teil direkt bei -20°C eingefroren und der Andere zur Messung

eines kleinen Blutbildes im Plasmaüberstand in die Laboratoriumsmedizin der Universitätsmedizin Mainz gebracht.

4.6.3. Messung des Einflusses der Anzahl der Einfrier- und Auftauvorgänge

Anhand der Proben aus 4.6.1. wurde anschließend der Einfluss mehrmaligen Auftauens und Einfrierens auf die gemessenen Konzentrationen der cf-mtDNA untersucht. Hierzu wurden die Konzentrationen bei den verschiedenen Pipettierhöhen nach ein-, drei- und zehnmalem Auftauen gemessen. Das Auftauen der Proben erfolgte hierbei unter Kühlung auf Eis bis zur Erwärmung auf Raumtemperatur.

4.6.4. Messung des Einflusses verschiedener Verdünnungsverhältnisse

Anhand der Proben aus 4.6.1. wurden verschiedene Verhältnisse bei der Herstellung der 1:10-Verdünnungen zur qPCR-Messung untersucht, um mögliche Einflüsse durch ungleichmäßige Verteilung der mtDNA in einer Plasmaprobe zu erkennen. Hierfür wurde Plasma der Volumina 2, 3, 10 und 30 mL mit den entsprechenden Mengen H₂O versetzt (18, 27, 90, 270 mL) versetzt und anschließend gleichmäßig gevortext und zentrifugiert. Somit ergaben sich groß- und kleinvolumige Ansätze gleicher Konzentrationen, die dann vergleichend gemessen werden konnten.

4.6.5. Untersuchung verschiedener Zentrifugationsgeschwindigkeiten und Konzentrationen mitochondrialer DNA in resuspendierten Pellets

Zur Identifizierung der genauen Lokalisation der mitochondrialen DNA bei verschiedenen Zentrifugationsgeschwindigkeiten wurde ein ausführlicher Versuch durchgeführt. Hierbei wurden 5 verschiedene Proben gewonnen, die im weiteren Verlauf wie folgt bezeichnet werden.

PV1: 700g zentrifugiertes Plasma

PV2: 1600g zentrifugierter Plasmaüberstand

PV3: 1600g zentrifugiertes, resuspendiertes Pellet

PV4: 20.000g zentrifugierter Plasmaüberstand

PV5: 20.000g zentrifugiertes, resuspendiertes Pellet

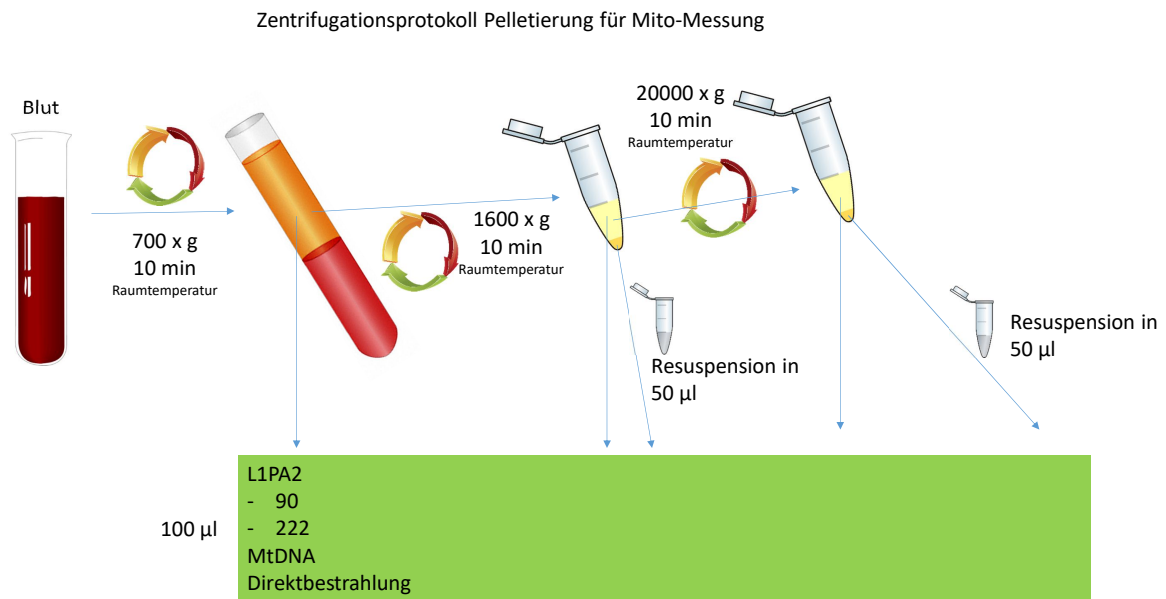


Abb. 1b Zentrifugationsprotokoll des Pelletierungsversuchs

In mehreren Zentrifugationsschritten werden die Proben PV1-PV5 aus einer abgenommenen Blutprobe generiert und anschließend der mtDNA-Messung zugeführt.

Der genaue Versuchsablauf ist in Abbildung 1 anschaulich dargestellt. Nach Abnahme von 2x7,5 mL EDTA Blut wurde dieses in ein 15 mL Falcon überführt und anschließend bei 700 x g für 10 min zentrifugiert (PV1). Nach Abnahme des Plasmaüberstands wurde dieser in drei Fraktionen (1) - (3) unterteilt. Ein Teil wurde sofort bei -20°C eingefroren (1), ein Teil zur Analyse in die Laboratoriumsmedizin der Universitätsmedizin Mainz gegeben (2) und der letzte Teil wurde erneut bei 1600 x g für 10 min zentrifugiert (3). Aus dem Zentrifugationsprodukt aus diesem Schritt wurde zuerst der Überstand abgenommen und in die drei vorher beschriebenen Fraktionen unterteilt (PV2). Das entstandene Pellet wurde anschließend in 50 µL H₂O resuspendiert und in die zwei Fraktionen (1) und (2) unterteilt (PV3). Fraktion (3) von PV2 wurde anschließend bei 20.000g für 10 min zentrifugiert und nach Abnahme des Überstands in die Fraktionen (1) und (2) unterteilt (PV4). Das entstandene Pellet wurde abermals in 50 µL H₂O resuspendiert und in die Fraktionen (1) und (2) unterteilt.

4.7. Messung mitochondrialer DNA anhand eines Belastungstests

Zur abschließenden Überprüfung der erzielten Ergebnisse wurde an drei Probanden ein Belastungstest in Form eines Stufentests durchgeführt.

Aufbau des Tests

Für den Test wurden Probanden im Alter von 21-28 Jahren einer Laufbandbelastung unterzogen. Zwei der Probanden waren hierbei trainierte Mittelstreckenläufer, der Dritte ein Student der Sportwissenschaften. Begonnen bei 6 km/h mit 1,5 % Steigung wurde die Geschwindigkeit alle drei Minuten um 2 km/h gesteigert bis es zur subjektiven Ausbelastung des Probanden kam. Vor, nach und 30 min nach der Belastung wurde eine venöse Blutentnahme von 3x7,5 mL EDTA Blut durchgeführt sowie 7,5 mL Serum und 2,7 mL für eine labormedizinische Analyse durch das MVZ für Labordiagnostik und Mikrobiologie Rhein-Main GmbH, Raunheim. Vor, nach und 30 min nach Belastung sowie zwischen den einzelnen Stufen des Tests wurde zudem eine Laktatabnahme am Ohrläppchen der Probanden durchgeführt.

Ein Ethikvotum lag vor.

4.8. Verarbeitung der Proben

Das gewonnene EDTA-Blut wurde in Falcons der Firma Greiner Bio-One, Frickenhausen gegeben und nach den unter 4.6.2. und 4.6.5. beschriebenen Zentrifugations- und Pipettierschemata für Pipettierhöhen- und Pellet-Versuch verarbeitet ($H < 5$ - $H > 15$ und PV1-5). Anschließend erfolgte die Messung aller Proben in 1:10 Verdünnung mit den von Breitbach et al. 2014 übernommenen Methoden zur L1PA2-Messung der kurzen und langen Fragmente zellfreier nukleärer DNA (90 und 222 bp) sowie der neu etablierten Methode zur Bestimmung zellfreier mitochondrialer DNA.

4.9. Analyse der gewonnenen Proben in der Laboratoriumsmedizin

Die gewonnenen Proben aus Test 4.7. für Pipettierhöhen- und Pelletversuch sollten alle in der Laboratoriumsmedizin der Universitätsmedizin Mainz auf die Parameter des kleinen Blutbildes hin untersucht werden. Die Messung erfolgte vollautomatisch

mit der Methode der Massenspektroskopie. Hierbei stellten sich die Proben PV3 und PV5 als nicht analysierbar heraus. Dies ist vermutlich auf den hoch konzentrierten Anteil korpuskulärer Blutbestandteile und Zelldetritus im resuspendierten Pellet zurückzuführen, der zu einer nur unzureichenden Durchmischung der Proben führte und somit kein einheitlich spektroskopisch messbares Signal detektierbar war.

4.10. Umgang mit Fehlmessungen

Angesichts der festgelegten Standardabweichung von 0,4 kam es in seltenen Fällen vor, dass eine Probe auch bei mehrfacher Messung keinen sicher zu quantifizierenden Wert in einer qPCR erbrachte. Deshalb wurde bei bestehenden Kosten für Puffer und andere Reagenzien festgelegt, dass maximal eine dreifache Messung einer Probe erfolgte und die Probe bei ausbleibenden Messerfolg als nicht-quantifizierbar in die Auswertung einging.

4.11. Verwendete Geräte, Chemikalien, Kits, Medien, Verbrauchsmaterialien und Software

Chemikalie	Hersteller/Vertrieb
Agarose	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Ampicillin	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
CutSmart Puffer (6x)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
DNA Away	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
DNA-Leiter 100bp	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
DNA-Marker pUC 19/Mspl	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
dNTPs	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Gel Loading Dye Blue (10x)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main

Chemikalie	Hersteller/Vertrieb
HiFi PCR-Puffer	Bioline GmbH, Luckenwalde
Isopropanol	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Qiagen GmbH, Hilden
Phusion Hot Start Flex DNA Polymerase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
PicoGreen	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Restriktionsenzym EcoR1 HF	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
SYBR Green I	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Tego PCR-Puffer (2x)	Bioline GmbH, Luckenwalde
VELOCITY DNA Polymerase	Bioline GmbH, Luckenwalde
Wasser (H ₂ O)	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt

Gerät	Hersteller/Vertrieb
Autoklav Systec VX 150	Systec GmbH Labor-Systemtechnik, Wetzlar
Brutschrank New Brunswick Galaxy 170 R	Eppendorf AG Hamburg
Eismaschine Scotsman Flockeneisbereiter, AF-80	MS Laborgeräte GmbH, Wiesloch
Elektrophoresekammer Sub-Cell GT Agarose Gel Electrophoresis System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Geldokumentation Gel Doc XR	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Inkubator Mini Incubator	Labnet International, Inc, Edison, NJ, USA
Kolbenhubpipette 2,5/10/100/1000 µl	Eppendorf AG Hamburg
Mini-Tischzentrifuge Sprout	G. Kisker GbR, Steinfurt
Mini-Tischzentrifuge Spectrafuge Mini Laboratory Centrifuge	Labnet International, Inc, Edison, NJ, USA

Gerät	Hersteller/Vertrieb
Mini-Tischzentrifuge Rotilabo-Mini-Zentrifuge	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
NanoDrop 1000	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
NanoDrop 3300	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
PCR-Arbeitsbank UV Sterilizing PCR Workstation	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Spülmaschine Miele Reinigungs- und Desinfektionsautomat, G 7883	Miele & Cie. KG, Friedberg
Thermocycler CFX384 Touch Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Vortexer RS-VA 10	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Vortexer Vortex Mixer Labnet	Labnet International, Inc, Edison, NJ, USA
Vortexer Vortex-Genie 2	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Waage Kern EMB 220-1	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Zentrifuge Hettich Universal 320 R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
Zentrifuge Centrifuge 5424R, Rotoren FA-45-6-30, A-4-81, A-2-DWP	Eppendorf AG Hamburg
Zentrifuge Centrifuge 5810R, Rotor FA-45-24-11	Eppendorf AG Hamburg

Kit	Hersteller
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden

Medium/Puffer	Hersteller
LB-Medium (lysogeny broth)	5 g Trypton, 2,5 g Hefeextrakt, 2,5 g Natriumchlorid, ad. 500 ml Aqua dest
TE-Puffer	Ambion, Life Technologies GmbH, Darmstadt
TAE-Puffer	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Blutlanzetten	Pro Medico Plan GmbH, Mainz
Butterfly Safety-Multifly-Set (Nadel: 0,8 x 19 mm)	Sarstadt AG & Co., Nümbrecht
Desinfektionsspray Kodan Tinktur	Pro Medico Plan GmbH, Mainz
Dispenser-Spitzen Combitips Advanced	VWR International GmbH, Darmstadt
Falcon Tubes 15/50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Filterspitzen 10,100,1000 μ l	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Glasware (Flaschen, Messbecher)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Kimtech Science precision wipes Reinigungstücher	Kimberly-Clark GmbH, Koblenz
Klebeetiketten	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Klebefolie für qPCR-Platten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Low retention Spitzen 10,100,1000 μ l	Axon Labortechnik GmbH, Kaiserslautern
S-Monovette 7,5/2,7 ml EDTA K3	Sarstadt AG & Co., Nümbrecht
Mundschutz	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Nitril-Einmalhandschuhe	Axon Labortechnik GmbH, Kaiserslautern
Pipettenspitzen 10,100,1000 μ l	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Plastikware (Messbecher, Messzylinder)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
qPCR-Platten, weiß (96/384-Well)	Axon Labortechnik GmbH, Kaiserslautern
Reaktionsgefäße 0,2/0,5/1,5/2 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Tupfer Pur-Zellin	Pro Medico Plan GmbH, Mainz

Software	Hersteller/Anbieter
Bio-Rad CFX Manager 3.0	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
DNA Copy Number Calculator	
Microsoft Office 2007, 2010	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
NanoDrop 1000 3.8.1	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
NanoDrop 3300 2.8.0	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ , National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA
Quantity One 1-D Analysis Software 4.6.9	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
SPSS Statistics 22 + 23	IBM Deutschland GmbH, Ehningen

5. Ergebnisse

5.1. LOQ der qPCR für mtDNA

Wie in 4.3.7. beschrieben, erfolgte die mehrfache Messung einer LOQ-Reihe mit Velocity Polymerase und HiFi-Puffer. In der Auswertung entsprach der Anstieg um einen Cq-Punkt der Halbierung der DNA-Konzentration. So musste in der LOQ-Reihe jeder Verdünnungsschritt einen Anstieg um einen Cq-Punkt bedingen.

Die Messung der LOQ-Reihe ergab in den Heptetts folgende Cq-Werte:

100000	10240	5120	2560	1280	640	320	160	80	40	20
18,12	21,48	22,44	22,87	24,38	25,15	26,65	27,27	28,81	29,65	30,12
18,07	21,44	22,20	23,22	24,28	24,93	26,21	27,50	28,24	28,96	30,04
17,96	21,40	22,23	23,34	24,47	25,46	26,64	27,83	28,26	28,80	30,09
18,40	21,22	22,50	23,36	24,52	25,21	26,52	27,42	28,25	28,93	30,08
18,26	21,36	22,67	23,20	24,71	25,09	26,83	27,54	28,62	29,05	29,77
18,24	21,13	22,36	23,10	24,60	25,17	26,64	27,58	28,45	28,87	30,25
17,96	21,24	22,88	22,91	24,59	25,27	26,08	27,43	28,34	29,22	31,09

Abb. 2 Cq-Werte der LOQ-Messung

Entsprechend der jeweils rechnerisch durch Verdünnung erzielten Kopienzahl in der ersten Zeile wurde in Zeile 2-8 für jede Probe des Heptetts ein Cq-Wert gemessen. In rot ist ein Cq-Wert markiert, der außerhalb der Standardabweichung des Mittelwerts lag.

Hieraus ergaben sich folgende Mittelwerte für jede der Verdünnungsstufen, die jeweils mit der entsprechenden Standardabweichung in der zweiten Spalte beziffert sind:

CT mean	18,14	21,32	22,47	23,14	24,51	25,18	26,51	27,51	28,42	29,07	30,06
CT SD	0,16	0,13	0,24	0,19	0,14	0,16	0,27	0,17	0,22	0,29	0,16

Abb. 3 Mittelwerte und Standardabweichungen der LOQ-Messung

Die obere Zeile zeigt die mittleren Cq-Werte je Heptett, die untere Zeile zeigt die entsprechende Standardabweichung (welche zur Auswertung unter 0,4 liegen muss)

Festgelegt war jeweils eine maximale Standardabweichung innerhalb eines Heptetts von 0,4, wodurch bis auf die Verdünnung mit 20 Kopien alle Werte aus den Heptetts zuverlässig messbar waren. Mit den zuverlässig messbaren Werten, wurde anschließend eine graphische Darstellung erstellt und mittels Excel-Software die Berechnung einer Logarithmusfunktion für die gemessenen Cq Werte in Abhängigkeit der gemessenen mtDNA-Kopien.

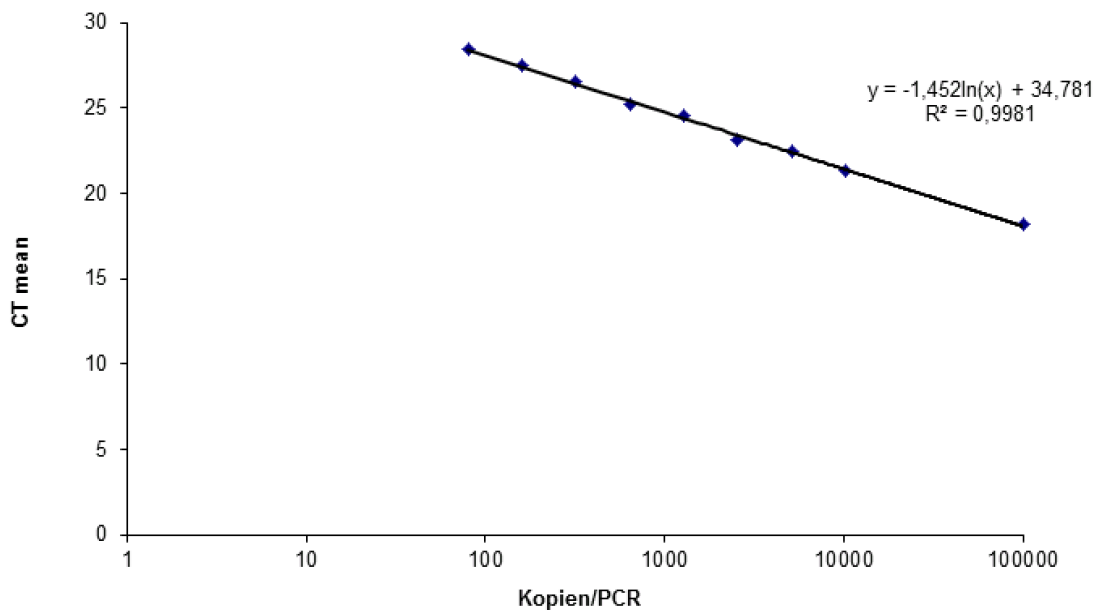


Abb.4 Cq-Werte in Abhängigkeit der Kopienzahl mitochondrialer DNA

Graphisch aufgetragen ist die Logarithmusfunktion, die die Cq-Werte der LOQ-Reihe in Abhängigkeit von der Kopienzahl an mtDNA darstellt. Es zeigt sich ein Korrelationskoeffizient von $R^2=1$

Die Funktion wurde mit $f(x) = -1,45 \ln(x) + 34,8$ angenommen und zeigte eine Korrelation von $R^2 = 1$.

Mit Hilfe der nun bekannten Funktion wurde eine Berechnung der den Cq-Werte entsprechenden Kopien durchgeführt, für die ebenfalls eine Standardabweichung von 0,4 toleriert wurde. Hieraus ergaben sich folgende kalkulierte Kopienzahlen für die gemessenen Cq-Werte:

Kopien/PCR	CT mean	calculated
100000	18,14	94635,90
10240	21,32	10590,47
5120	22,47	4815,69
2560	23,14	3026,77
1280	24,51	1182,82
640	25,18	742,70
320	26,51	297,76
160	27,51	149,54
80	28,42	79,67
40	29,07	51,12
20	30,06	25,86

Abb. 5 Berechnung der realen Kopienzahl anhand gemessener Cq-Werte

In der 1. Spalte finden sich die angestrebten Kopienzahlen, in der 2. Spalte die entsprechend gemessenen Cq-Werte und in der 3. Spalte die daraus errechneten Konzentrationen mit der Logarithmusfunktion. Rot markiert sind alle Kopienzahlen mit zu hoher Standardabweichung.

Die Abbildung 5 zeigt, dass sich für alle Kopienanzahlen > 80 Kopien/PCR eine nicht signifikante Abweichung der Messung von den eingesetzten Kopienzahlen ergab. Die Messung konnte also bis zu dieser Kopienzahl als zuverlässig angenommen werden. Hieraus ergab sich also ein Limit of Quantification von 80 Kopien/PCR, was einem Cq-Wert von 28,42 entsprach. Folglich sind alle Werte, die oberhalb dieses Wertes

liegen nicht zuverlässig messbar und müssen für die statistische Auswertung außer Acht gelassen werden.

5.2. Bestimmung der optimalen MgCl₂-Konzentration

Zur Verbesserung der Effizienz der qPCR sollte eine Anpassung der MgCl₂-Konzentration erfolgen. Im Protokoll von Miriam Albus war zuvor eine MgCl₂-Konzentration von 0,5 mmol/L im Mastermix-Ansatz vorgesehen. Die Testung erfolgte mit niedrigen Konzentrationen, um bessere Ergebnisse für die Erstellung der LOQ-Reihe zu generieren. Eingesetzt wurden Konzentrationen von 10³ und 10² Kopien sowie bei 100.000xg zentrifugiertes humanes Plasma als Negativkontrolle. Die höchsten Konzentrationen nach 35 Zyklen PCR-Amplifikation konnten gemessen werden, wenn kein MgCl₂ zugegeben wurde. Zudem zeigte sich ein Abfall der Konzentrationen mit steigender Konzentration von MgCl₂. Infolgedessen wurde die PCR anschließend ohne die Zugabe von MgCl₂ weiter fortgeführt.

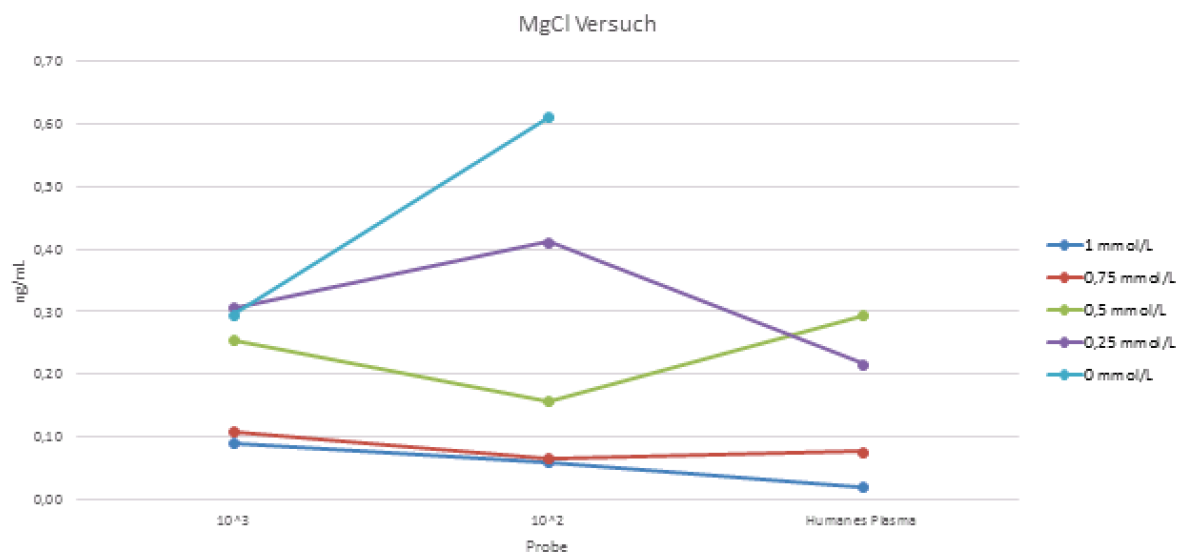


Abb. 6 MgCl₂-Test

Gezeigt ist die gemessene mtDNA-Konzentration dreier Verdünnungsstufen bei verschiedenen Konzentrationen an MgCl₂. Die höchsten Effizienzen werden in den Proben ohne Zusatz von MgCl₂ gemessen. Mit steigender MgCl₂-Konzentration sinken auch die gemessenen DNA-Konzentrationen ab.

5.3. Einfluss der mehrfachen Messung einer Verdünnung

In dieser Versuchsreihe wurde untersucht, welchen Einfluss die mehrfache Messung einer bereits erstellten Verdünnung im Vergleich zur Erstellung einer neuen Verdünnung aus einem Plasma-Stock hat. Es war also fraglich, ob es zu einer zusätzlichen Denaturierung von DNA-Fragmenten durch mehrfaches Einfrieren und Auftauen kommt und dadurch im Verlauf sinkende DNA-Konzentrationen gemessen würden.

Abbildung 7 zeigt exemplarisch den Unterschied zwischen beiden Vorgehensweisen. Hierbei benennt die Beschriftung „Versuch“ das Erstellen einer neuen Verdünnung aus vorhandenem Plasmastock, das heißt „1. Versuch“ bedeutet erste Verdünnung und „Messung“ steht jeweils für die durchgeführten qPCRs mit der selben Verdünnung, die jeweils dazwischen eingefroren und wieder aufgetaut wurde. „1. Versuch, 1. Messung“ beschreibt also eine Probe, die direkt nach ihrer Verdünnung gemessen wurde, wohingegen „1. Versuch, 2. Messung“ eine Probe beschreibt, die verdünnt, gemessen, anschließend eingefroren und wieder gemessen wurde.

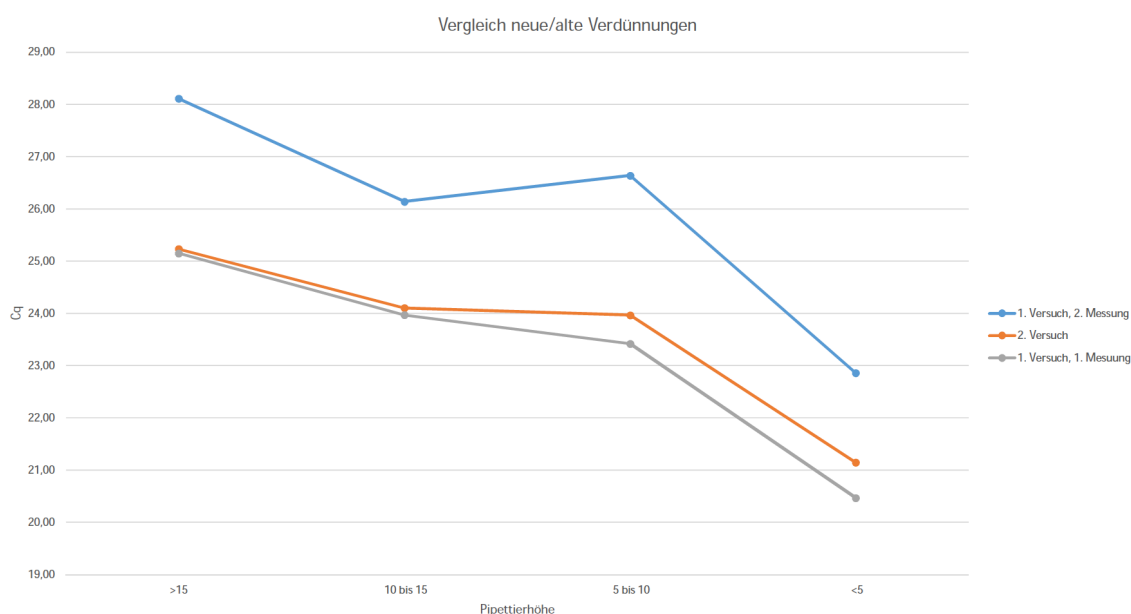


Abb. 7 Mehrfache Messung einer Verdünnung 1

Die Abbildung zeigt die gemessenen Cq-Werte in Abhängigkeit von der Pipettierhöhe für die mehrfache Messung von Verdünnungen. Es zeigt sich, dass die gemessenen Cq-Werte bei mehrfacher Messung um etwa 3 höher liegen als bei der ersten Messung.

Es zeigte sich, dass zwischen der Generierung neuer Verdünnungen aus einem vorhandenen Plasmastock keine nennenswerten Unterschiede in den gemessenen

Cq-Werten für die Verdünnungen bestehen, während die Cq-Werte für direkt gemessene Proben und danach eingefrorenen und wieder gemessenen Proben sich beträchtlich unterschieden. Es zeigte sich eine Erhöhung der Cq-Werte um etwa 3, dies entspricht einer Verringerung der gemessenen mtDNA-Konzentration um den Faktor 8.

Zur Verifizierung dieser Feststellung wurde anschließend in einem weiteren Versuch eine erneute Messung durchgeführt und in Abbildung 8 dargestellt. „1. Versuch“ beschreibt dabei die 3. Messung der 1. Verdünnung, „2. Versuch“ die 2. Messung der 2. Verdünnung und „3. Versuch“ eine erste Messung einer neu erstellten Verdünnung.

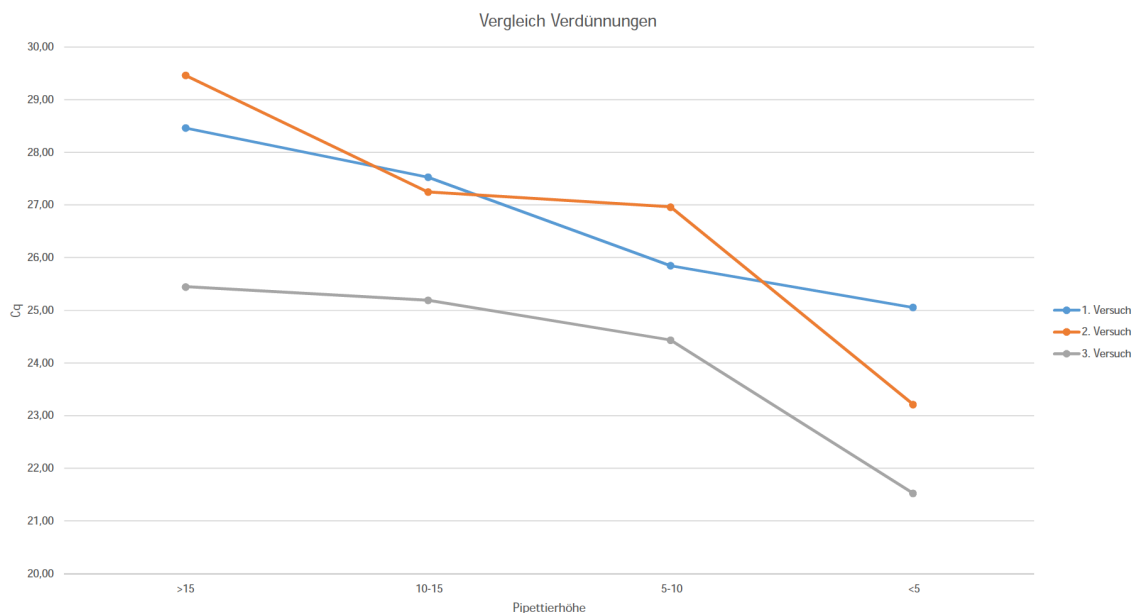


Abb. 8 Mehrfache Messung einer Verdünnung 2

Es ist wie in Abb.7 die Cq-Konzentration in Abhängigkeit der Pipettierhöhe dargestellt. Es ist zu sehen, dass sich die Cq-Werte bei abermaliger Messung auf einem Niveau stabilisieren, dass sich etwa 3 Einheiten über dem Ausgangswert befindet.

Es ist zu sehen, dass die Verschiebung um 3 Cq-Punkte auch für die 2. Verdünnung genauso reproduzierbar war, wie für die 1. Verdünnung. Die erneute Messung der 1. Verdünnung ergab dann wieder konstante Werte auf dem höheren Cq-Niveau. Die 3. Verdünnung befand sich wie zu erwarten auf dem Ausgangsniveau der ersten beiden Verdünnungen.

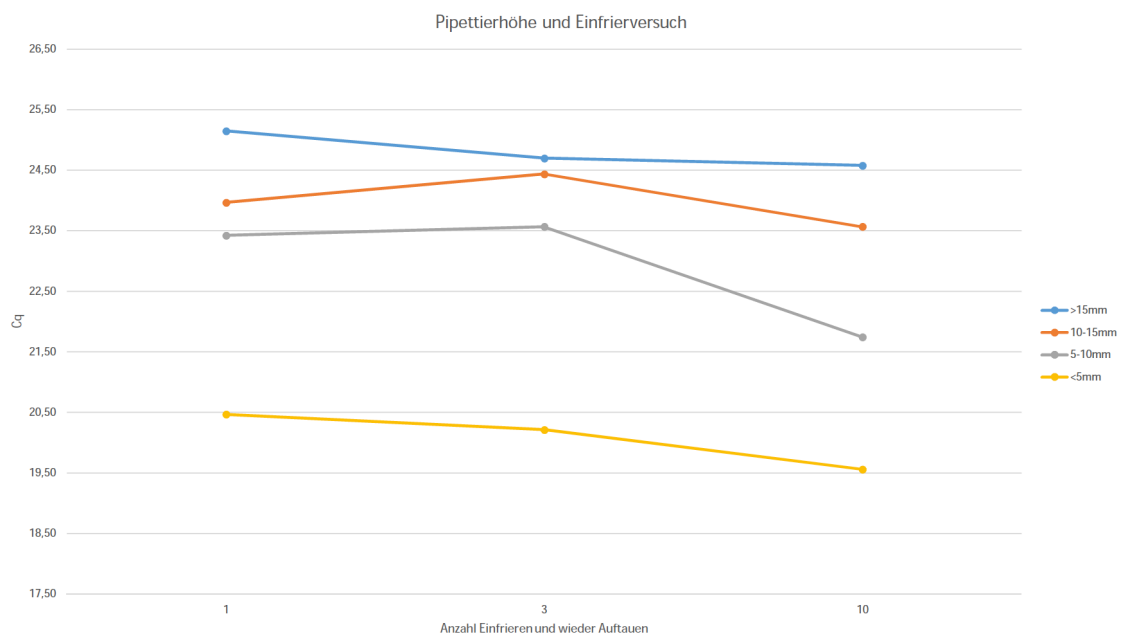
Folglich lässt sich für die korrekte Messung von Verdünnungen, die auch bei mehrfacher Messung der selben Probe konstante Werte erzeugen festhalten, dass ein Einfrieren und Auftauen vor der Messung essentiell für die Bestimmung der

mtDNA-Konzentrationen ist. Direktes Messen von Proben nach ihrer Verdünnung sollte vermieden werden, da sonst für mögliche Nachmessungen keine vergleichbaren Werte mehr berechnet werden können.

5.4. Abhängigkeit der mtDNA-Konzentration von Einfrieren und Verdünnungsverhältnissen

Einen weiteren zu untersuchenden Einflussfaktor stellte der Vorgang des Einfrierens und Auftauens dar. Hierzu wurde das Plasma in die oben beschriebenen Höhenfraktionen aufgeteilt und dann mehrere Male eingefroren und wieder aufgetaut.

Abb. 9 Einfrierversuch



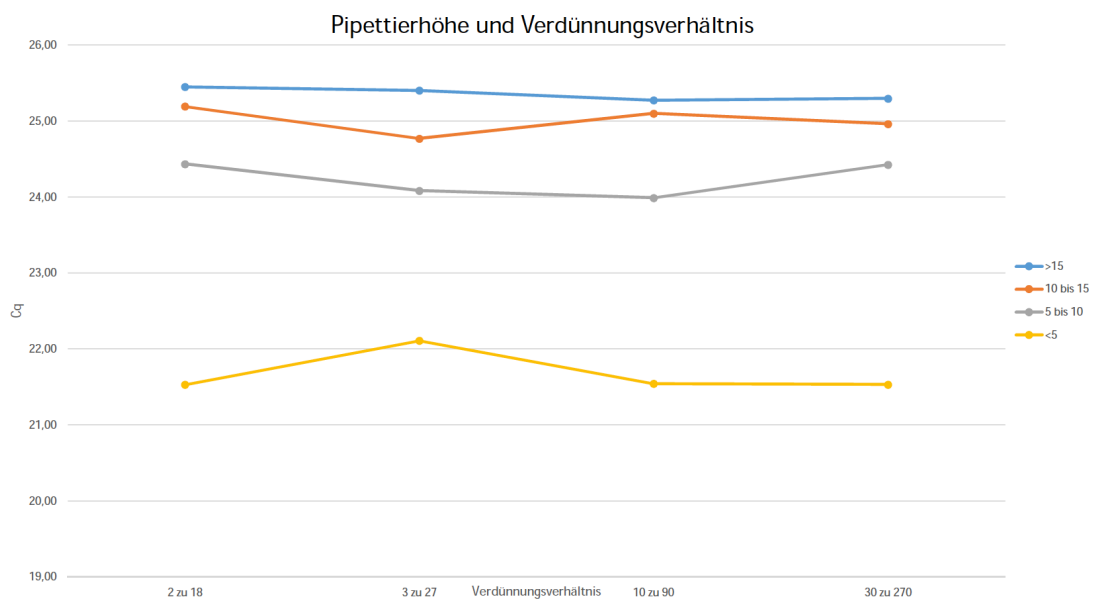
Gemessen wurden die Cq-Werte in Abhängigkeit von der Anzahl an Einfrier- und Auftauvorgängen zuvor gewonnener und verarbeiteter Proben. Es zeigt sich keine nennenswerte Veränderung der Cq-Werte bei allen Pipettierhöhen auch bei häufigerem Auftauen und Einfrieren.

Es zeigte sich dabei kein richtungsweisender Zusammenhang zwischen mehrfachem Einfrieren und Auftauen von Proben und der gemessenen mtDNA-Konzentration. Schwankungen bewegten sich im Bereich eines Cq-Wert-Punktes und konnten nicht in allen Fraktionen gleichermaßen nachgewiesen werden. Es kann somit angenommen werden, dass bereits verdünnte Proben auch bei mehrfacher Messung mit Zwischenlagerung bei -20°C verlässlich die selben Werte erzeugen und somit

eine Validität der gemessenen Werte vorliegt. Dies gilt allerdings nur, wenn bereits einmal eingefroren und wieder aufgetaut wurde (siehe 5.3.)

Zum Ausschluss von Problemen bei der Herstellung der in der qPCR eingesetzten Verdünnungen wurde aus der immer selben Phase einer zuvor gewonnenen Gesamt-Plasmaprobe eine Verdünnung in verschiedenen Volumen-Verhältnissen hergestellt. Die Gesamtvolumina lagen hierbei zwischen 20 und 300 μL verdünnter Probe (also von 2:18 μL bis 30:270 μL). Es konnte auch in diesem Versuch kein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Gesamtvolumen der Probe und der gemessenen Konzentration an mtDNA gezeigt werden. Somit wurde für folgende Versuche angenommen, dass bei gleicher Verarbeitung des zu Beginn generierten Plasmas Verdünnungseffekte oder Sedimentation in gleichen Schichten einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Messung der qPCR haben.

Abb. 10 Verdünnungs-Versuch



Dargestellt sind die Cq-Werte bei verschiedenen Verdünnungsverhältnissen (in μL). Es ist zu erkennen, dass bei allen Pipettierhöhen keine Unterschiede der Cq-Werte aufgrund von Verdünnungsverhältnissen erzielt werden.

5.5. Bestimmung der möglichen Zentrifugationsgeschwindigkeiten zur Verarbeitung von Proben

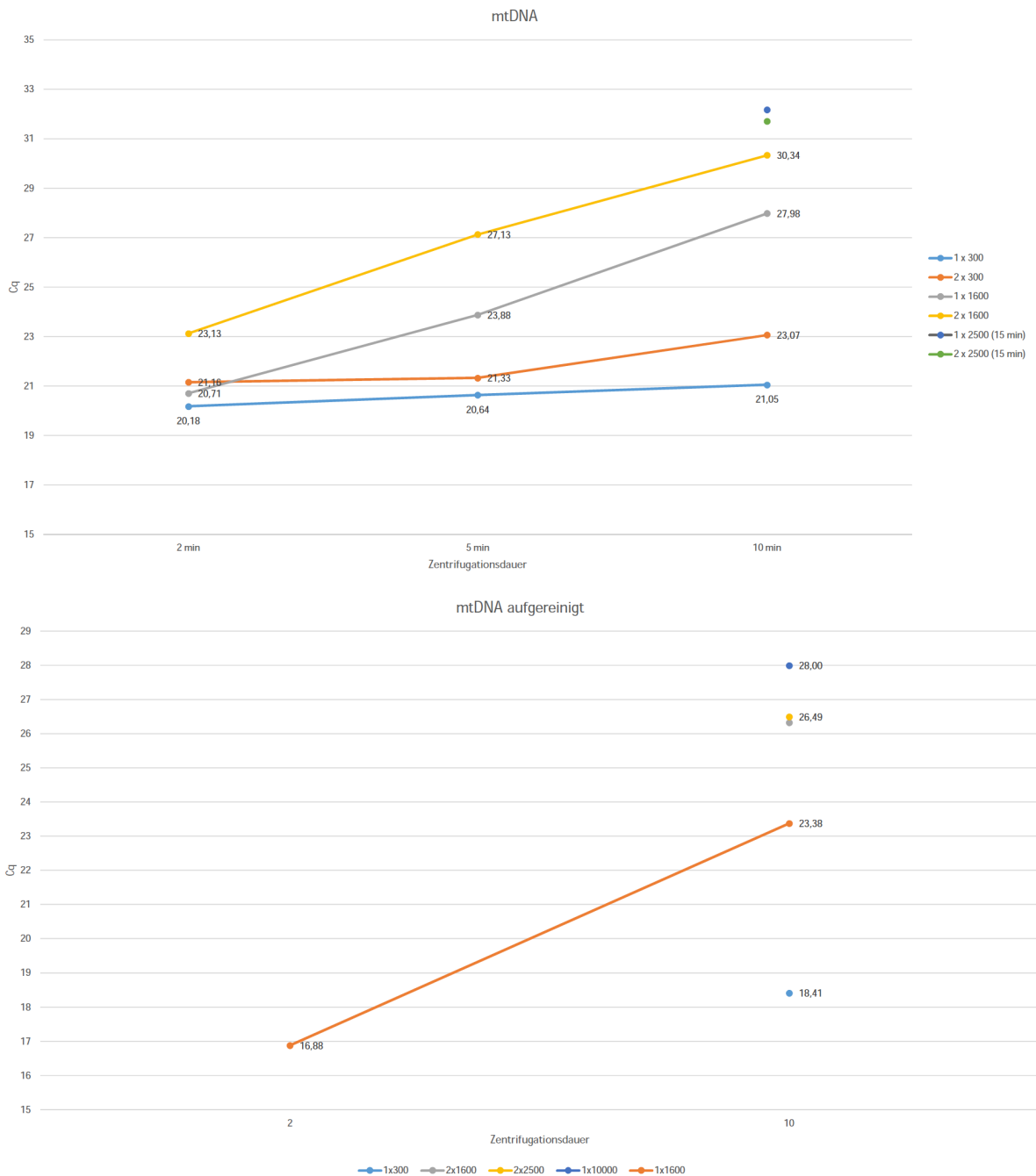


Abb. 11a+b Zentrifugationsgeschwindigkeit mtDNA

Gemessen sind die Cq-Werte in Abhängigkeit von Zentrifugationsgeschwindigkeit, Anzahl der Zentrifugation und angelegten g-Kräften. Es ist ein Anstieg der Cq-Werte bei häufigerer, schnellerer und länger dauernder Zentrifugation zu erkennen. Ebenso erfolgte eine Aufreinigung der mtDNA, um nachzuweisen, dass die mtDNA nicht an korpuskuläre Blutbestandteile gebunden vorliegt, also cf-mtDNA gemessen wurde.

Zur Bestimmung der optimalen Zentrifugationsgeschwindigkeit zur Erzeugung eines Plasmaüberstands vor Messung der Proben wurde eine Versuchsreihe mit unterschiedlichen Zentrifugationskräften g , -Häufigkeiten und Zeitdauern durchgeführt. Hierbei konnte zum Einen gezeigt werden, dass mit ansteigender Zentrifugationsdauer die Konzentrationen mitochondrialer DNA absank (Cq-Wert-Anstieg). Des Weiteren bewirkte mehrfache Zentrifugation bei gleicher Geschwindigkeit und Dauer ebenfalls ein Absinken der gemessenen DNA-Konzentrationen. Längere Zentrifugationsdauer bewirkte ebenfalls ein Absinken der gemessenen Konzentrationen bei gleichbleibender Beschleunigung. Es kann also zusammengefasst werden, dass die Konzentrationen gemessener mtDNA umgekehrt proportional zur Zentrifugationsdauer, Zentrifugationsgeschwindigkeit und zur Anzahl der Zentrifugationsschritte ist. Es ergab sich für die Zusammenfassung dieser drei Faktoren eine Korrelation von $R^2=0,885$ im Pearson-Test.

Unter Berücksichtigung der vorliegenden LOQ-Wertes wurde für die nachfolgenden Messungen eine Standardzentrifugation von $1 \times 1600g$ über 5 min festgelegt, die für die gemessene Blutprobe einen Cq-Wert von 23,88 ergab. Ausschlaggebend hierfür war, dass dieser Wert weder zu nah an den am niedrigsten sicher messbaren Konzentrationen, noch zu nah an den Höchsten sicher zu messenden Konzentrationen lag und man sich somit versprechen konnte, dass auch bei größeren Konzentrationsunterschieden die vorliegenden Werte noch zu quantifizieren waren.

Weiterhin wurde eine Aufreinigung der mtDNA durchgeführt, um zu zeigen, dass tatsächlich cf-mtDNA gemessen wurde und nicht solche mtDNA, die an andere Blutbestandteile (wie zum Beispiel des Thrombozyten) gebunden im Plasma vorliegt. Für alle Zentrifugationsgeschwindigkeiten konnte gezeigt werden, dass die Werte, bei denen die mtDNA-Konzentration innerhalb des LOQ lag, auch die aufgereinigte mtDNA Werte ergab die sich im Bereich des LOQ befanden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Methode auch wirklich cf-mtDNA misst und nicht nur gebundene mtDNA.

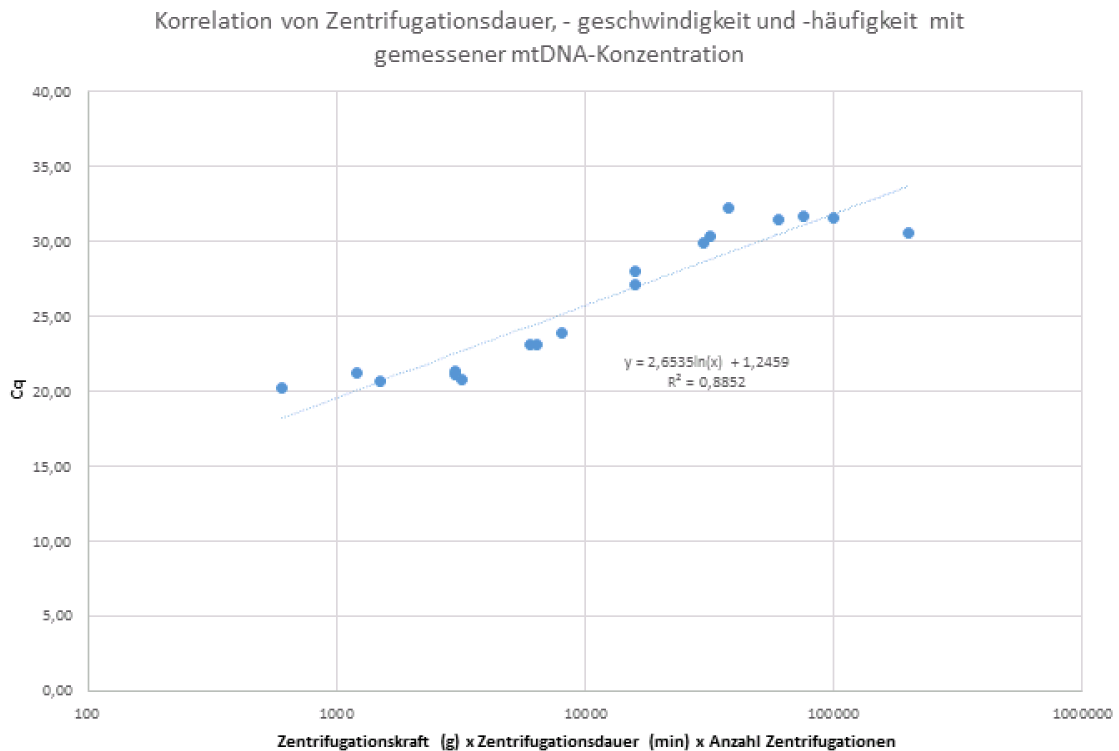


Abb. 12 Einflussfaktoren der Zentrifugation auf die mtDNA-Konzentration

Aufgetragen sind die Cq-Werte in Abhängigkeit des Produkts aus Zentrifugationskraft g, Zentrifugationsdauer und Anzahl der Zentrifugationen. Es ist eine starke Korrelation zwischen den Cq-Werten und diesem Produkt zu sehen.

5.6. Zentrifugationsgeschwindigkeit bei L1PA2-Messungen

Im Anschluss an die Versuche wurde der selbe Versuch auch für die Bestimmung der beiden Fragmente (90 und 222bp) der L1PA2-Messungen durchgeführt.

Es ist zu sehen, dass sich die gemessenen Cq-Werte in einem deutlich geringeren Maße als bei der mitochondrialen DNA unterscheiden, wobei zu erkennen ist, dass niedrigere Zentrifugationsgeschwindigkeiten zwar tendenziell eine höhere DNA-Konzentration bedingen, diese Abweichung aber für die Zentrifugationen bei 300g und 1600g nur im Bereich eines Cq-Werts lagen, während eine mehrfache Zentrifugation keinen eindeutigen Einfluss ausübte. Eine deutliche Verringerung der DNA-Konzentration um etwa den Faktor 2 zeigte sich lediglich bei Zentrifugationskräften ab 3000g, wobei diese sich auch nicht wesentlich von den Werten bei Zentrifugationen bei 10000g unterschieden. Auch die Zeitdauer der Zentrifugation hatte keinen richtungsweisenden Einfluss auf die Cq-Werte, wobei die Tendenz zu erkennen war, dass eine 10-minütige Zentrifugation eine leichte Erhöhung der DNA-Konzentrationen bewirkte.

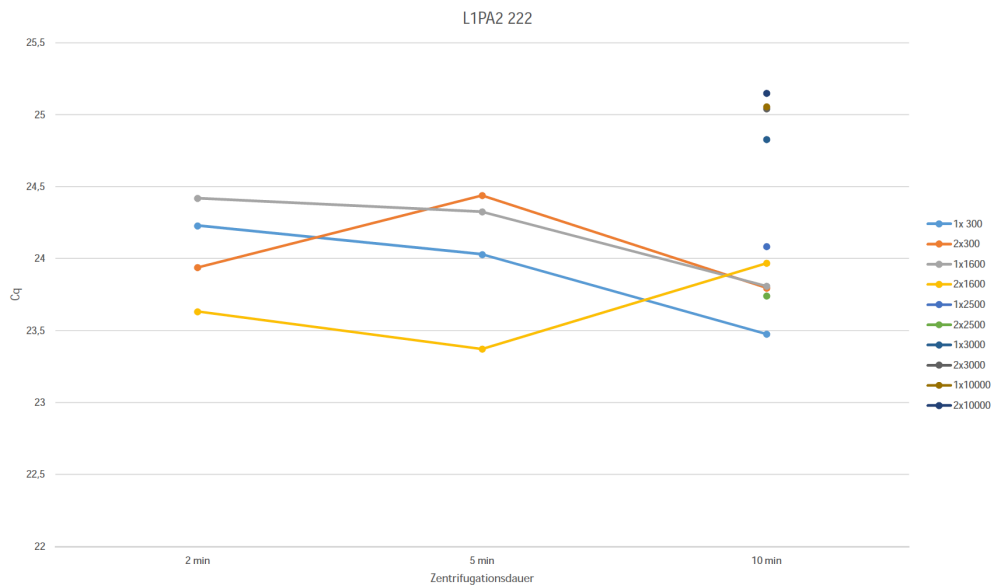
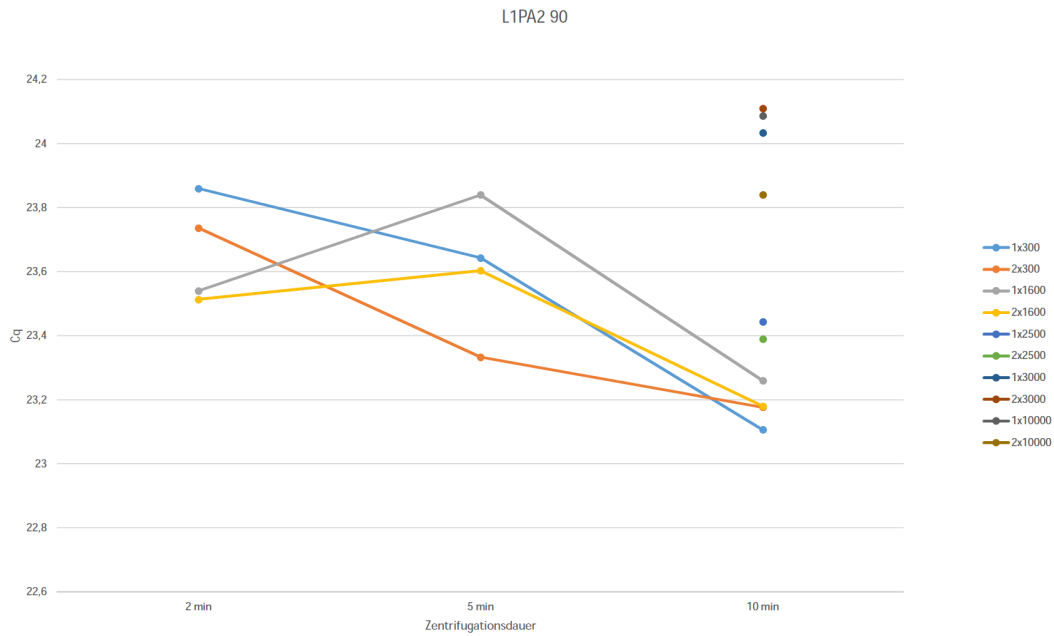


Abb. 13a+b Zentrifugationsgeschwindigkeit nukleäre DNA

Die Abbildungen zeigen die Cq-Werte der beiden L1PA2-Fragmente in Abhängigkeit von Zentrifugationsdauer, -geschwindigkeit und -anzahl. Der Einfluss stellt sich als deutlich geringer als bei der mtDNA dar und liegt lediglich im Bereich von zwei Cq-Punkten zwischen allen Versuchen.

Es kann festgehalten werden, dass der Einfluss höherer Zentrifugationskräfte vor allem ein Phänomen der Bestimmung mitochondrialer DNA darstellt, während sie für die Bestimmung nukleärer DNA durch die L1PA2-Methode eher vernachlässigt werden kann. Dennoch erscheint es sinnvoll, die Messung nur nach Zentrifugation mit einem bestimmten Schema durchzuführen, um auch geringgradigere Einflussfaktoren auszuschließen. Die Zentrifugation aller in der Folge gemessenen

Proben wurde demnach mit dem selben Schema durchgeführt, wie es auch bei mitochondrialer DNA zur Anwendung kam (1600xg für 5 min).

5.7. Auswertung des abschließenden Belastungsversuchs

5.7.1. Korrelationen der DNA-Konzentrationen im Gesamtversuch

		Korrelationen		
		logMtDNA	logL1PA2_90bp	logL1PA2_222bp
logMtDNA	Korrelation nach Pearson	1	,575**	,652**
	Signifikanz (2-seitig)		,000	,000
	N	79	72	70
logL1PA2_90bp	Korrelation nach Pearson	,575**	1	,934**
	Signifikanz (2-seitig)	,000		,000
	N	72	74	66
logL1PA2_222bp	Korrelation nach Pearson	,652**	,934**	1
	Signifikanz (2-seitig)	,000	,000	
	N	70	66	72

** . Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

Abb. 14 Korrelationen zwischen mtDNA und cf-nDNA

Gezeigt sind die Korrelationen zwischen mtDNA und den beiden cf-nDNA-Fragmenten, vor allem zeigt sich ein starker Zusammenhang zwischen kurzen und langem Fragment

Die Auswertung der Korrelationen erfolgte mit allen Proben, die nach maximal dreifacher Messung keine signifikant erhöhten Standardabweichungen ($>0,400$) in der qPCR aufwiesen. Die Anzahl ausgewerteter Proben ist hierbei mit N bezeichnet und bewegte sich zwischen 66 und 79 von 81 gemessenen Proben. Sowohl die Korrelation zwischen den logarithmierten Werten für die Konzentrationen mitochondrialer DNA, wie auch der Konzentrationen für die beiden Fragmente aus der L1PA2-Messung ergab signifikante Korrelationen in allen Tests. Somit kann von einem Zusammenhang zwischen den Konzentrationen der verschiedenen DNA-Konzentrationen ausgegangen werden. Die stärkste Korrelation konnte zwischen dem 90 bp-Fragment und dem 222 bp-Fragment der L1PA2-Messung nachgewiesen werden. Dies ist durch die gemeinsame Lage der beiden Fragmente im Genom zu erklären, da das 90 bp-Fragment einen Teil des 222 bp-Fragmentes darstellt. Somit sollte für jedes gemessene 222 bp-Fragment auch ein entsprechend kürzeres 90 bp-Fragment nachweisbar sein.

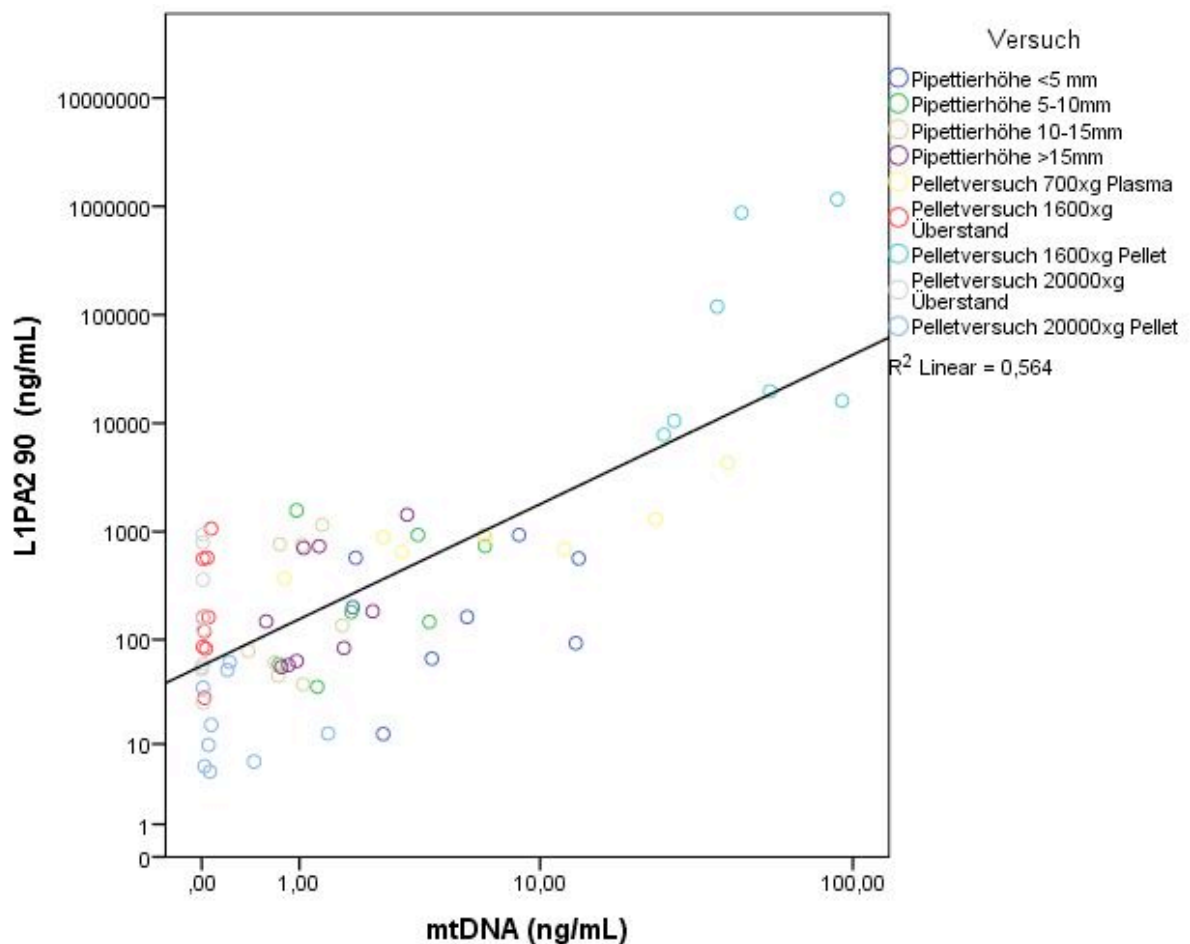


Abb. 15 Zusammenhang zwischen mtDNA und 90bp-Fragment

Abhängigkeit der Konzentration nukleärer DNA von der mitochondrialen DNA über die gesamte Versuchsreihe, es zeigt sich eine mäßige Korrelation von $R^2=0,564$

Abbildung 15 zeigt den Zusammenhang der Konzentrationen mitochondrialer DNA und des 90 bp-Fragmentes der L1PA2-Messung auf einer logarithmierten Skala. Hierbei fällt auf, dass die Korrelation der Werte vor allem bei niedrigen Konzentrationen mitochondrialer DNA zur cf-nDNA deutlich geringer ist als bei hohen Konzentrationen. Bei ähnlichen Werten dieser Konzentrationen variiert die gemessene cf-nDNA-Konzentration um annähernd vier Zehnerpotenzen, während sie sich bei höheren Konzentrationen um maximal zwei Zehnerpotenzen unterscheidet. Gleiches zeigte sich für die Korrelation zwischen mitochondrialer DNA-Konzentration und dem 222 bp-Fragment der L1PA2-Messung, wie es in Abbildung 16 dargestellt ist. Erkennbar ist auch hier die große Streuung der Werte bei niedrigen Konzentrationen. Vergleicht man dies mit den Korrelationen der beiden L1PA2-Fragmente untereinander (Abb. 31), so ist zu sehen, dass die Variation der Werte in dieser Messung zum Einen deutlich geringer und zum Anderen über den

gesamten Bereich der möglichen Werte konstanter ist. Durch die hohe Korrelation zwischen dem 90 bp- und dem 222 bp-Fragment kann postuliert werden, dass nur ein geringer Bias durch die Messung von Nebenprodukten oder Fragmenten mit ähnlicher Basensequenz vorliegt, beziehungsweise, dass beide Fragmente in diesen fehlgemessenen Produkten vorliegen müssten. Für die Messung der mitochondrialen DNA bleibt dieser Bias zu überprüfen.

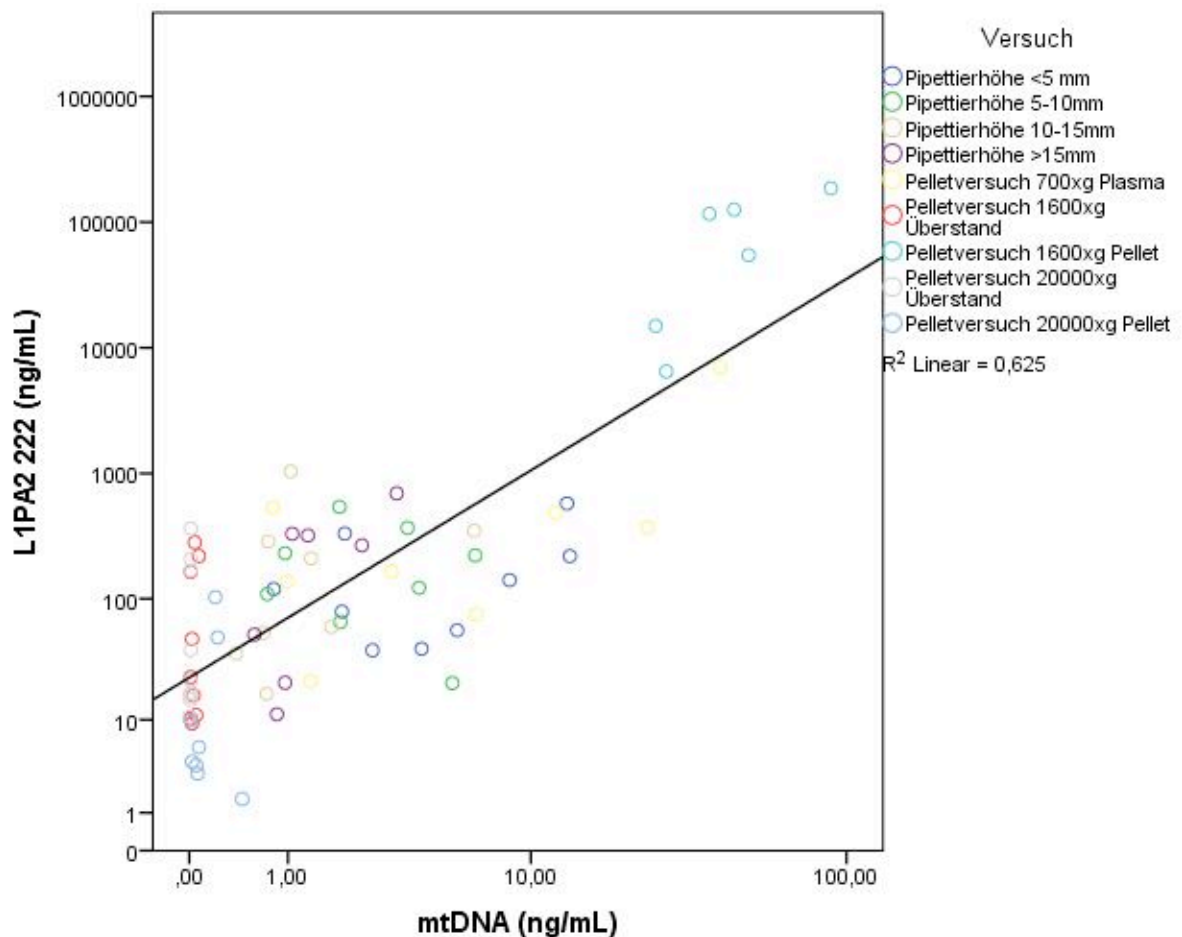


Abb. 16 Zusammenhang zwischen mtDNA und 222bp-Fragment

Abhängigkeit der Konzentration nukleärer DNA von der mitochondrialen DNA über die gesamte Versuchsreihe, es zeigt sich eine mäßige Korrelation von $R^2=0,625$

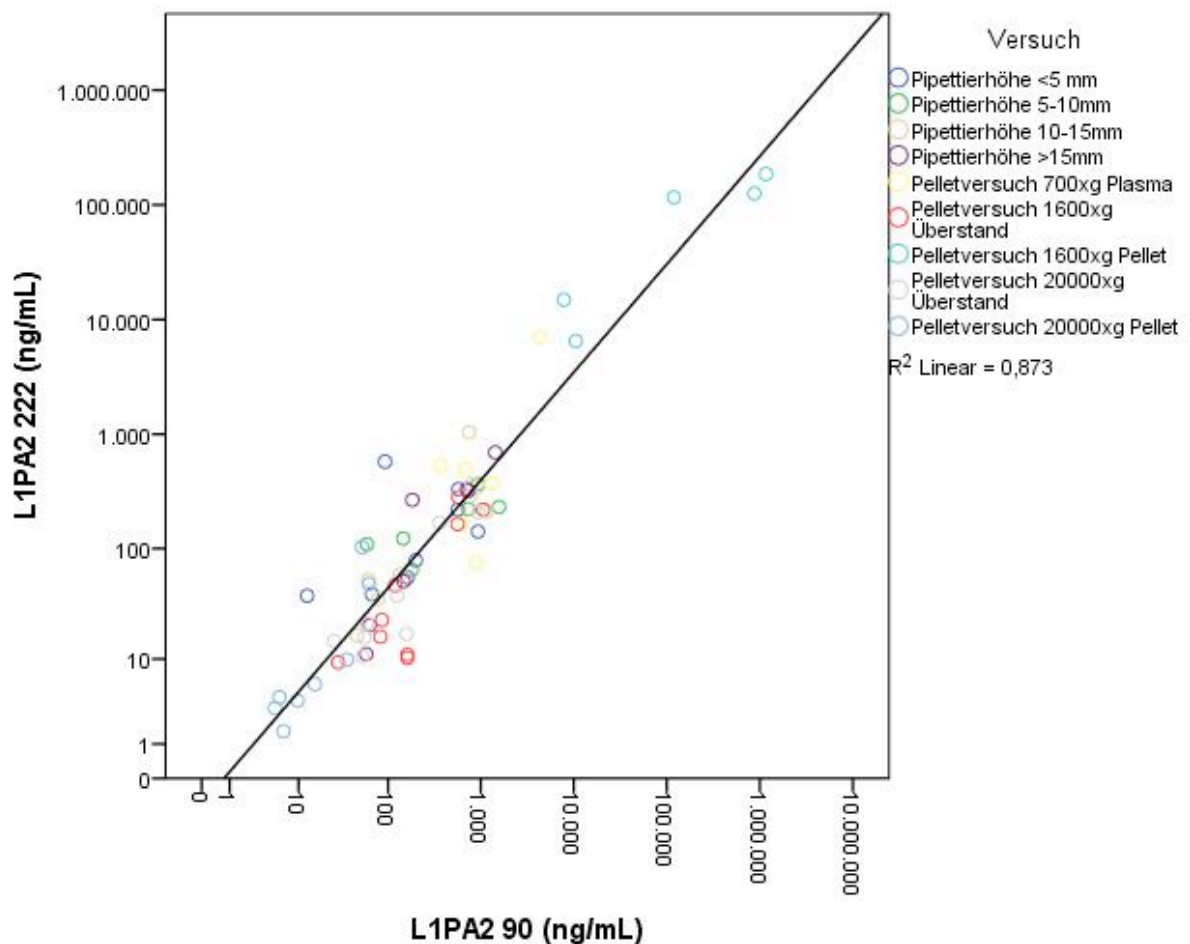


Abb. 17 Zusammenhang zwischen 90 bp- und 222 bp-Fragment

Die Abbildung zeigt die Abhängigkeit der beiden cf-nDNA-Fragmente voneinander über den Gesamtversuch, es zeigt sich eine hohe Korrelation von $R^2=0,873$ mit gleichmäßiger Verteilung über den gesamten Bereich der gemessenen Werte

5.7.2. Thrombozyten und Konzentration mitochondrialer DNA

Es erfolgte eine Korrelation der verschiedenen Thrombozyten-Parameter (Thrombozytenkonzentration und prozentualer Anteil der Thrombozyten am Gesamtblutvolumen, dem Thrombokrit) mit der Konzentration der mitochondrialen DNA im gewonnenen Plasma. Untersucht wurde hierbei der Einfluss der Thrombozytenkonzentration (abgebildet durch Thrombozyten/ μ L und den Thrombokrit) sowie der Thrombozytengröße (abgebildet durch die Thrombozyten-Verteilungsbreite, die die Unterschiede in der Thrombozytengröße darstellt und die Anzahl der Thrombozyten oberhalb des durch die Laboratoriumsmedizin festgelegten Normbereichs, große Thrombozyten).

Es zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der Konzentration an mtDNA und der Thrombozytenkonzentration, wobei diese für die alleinige Konzentration der Thrombozyten (in $10^3/\mu\text{L}$) leicht höher ausfiel, als für den Thrombokrit, der den prozentualen Anteil der Thrombozyten am Volumen der Probe widerspiegelt. Somit ist zu erkennen, dass auch der Einfluss anderer Zellen und Volumenbestandteile im Plasma bei der Beeinflussung der mitochondrialen DNA Rechnung getragen werden muss. Werte, die auf dem Signifikanzniveau von $p=0,05$ nicht dieser Korrelation entsprachen, zeigten sich ausschließlich bei hohen Thrombozytenkonzentrationen, wie sie im Pipettierversuch bei niedrigen Höhen gemessen wurden. Hier bleiben also Sedimentationseffekte und Ungenauigkeiten im Ablauf der Probengewinnung zu diskutieren. Auffällig ist hierbei auch, dass die mtDNA-Konzentration im Verhältnis zur Thrombozytenkonzentration bei diesen abweichenden Werte stets zu niedrig gemessen wurde. Das heißt die Korrelation aus mtDNA und Thrombozytenparametern überschritt ausschließlich das obere Signifikanzniveau.

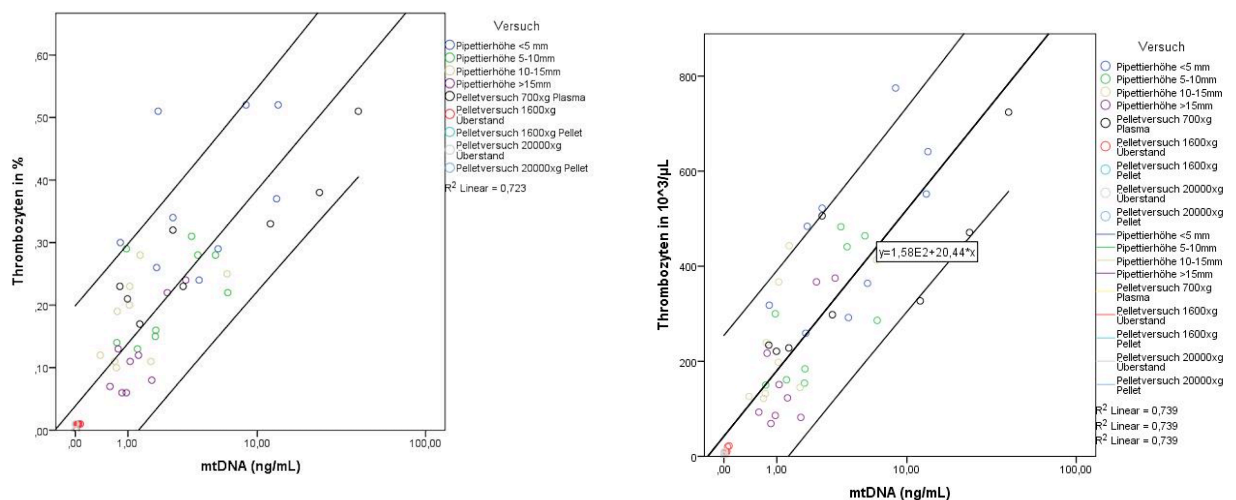


Abb. 18 a+b Abhängigkeit von Thrombokrit und Thrombozytenzahl von der mtDNA

Gezeigt sind Thrombokrit und Thrombozytenzahl in Abhängigkeit der mitochondrialen DNA, für beide Größen ist ein signifikanter Zusammenhang mit hoher Korrelation nachzuweisen, wobei beim Thrombokrit einige Werte außerhalb der festgelegten Standardabweichung lagen. Für Pelletversuch PV3 und PV5 war keine Auswertung möglich

In Bezug auf die Größe der Thrombozyten zeigte sich weder eine Korrelation mit der mtDNA bei der Thrombozytenverteilungsbreite in % noch für die Anzahl der Thrombozyten über der Normgröße. Bei der Auswertung dieser Werte ist jedoch zu beachten, dass in jeder der Proben nur kleine Mengen bis 11×10^3 Große Thrombozyten/ μL vorlagen, während sie in einem Teil der Proben gar nicht vorkamen. Somit ist hier aufgrund der Genauigkeit der Messmethode zur

Bestimmung der Konzentration an Großen Thrombozyten sicherlich nur eine geringe Aussagekraft zu erwarten, denn die Anzahl der Großen Thrombozyten wurde stets nur in ganzen Zahlen ($0-11 \times 10^3/\mu\text{L}$) angegeben. Deshalb erhielt die Skala gerade einmal 12 Werte mit ordinaler Einteilung und es konnte kein stetiger Verlauf der Messwerte angegeben werden. Ebenso verhielt sich die Korrelation bei der Bestimmung der Thrombozytenverteilungsbreite. Hier zeigte sich eine breite Streuung der Werte (zwischen 25 und 70%) bei niedrigen Konzentrationen an mtDNA, wie sie in den Überständen des Pelletversuchs auftraten, während sie sich bei höheren Konzentrationen an mtDNA im größten Teil konstant zwischen 30 und 45% bewegten. Allein eine Probe aus der Pipettierhöhe 5-10mm zeigte eine deutlich höhere Verteilungsbreite von 62%.

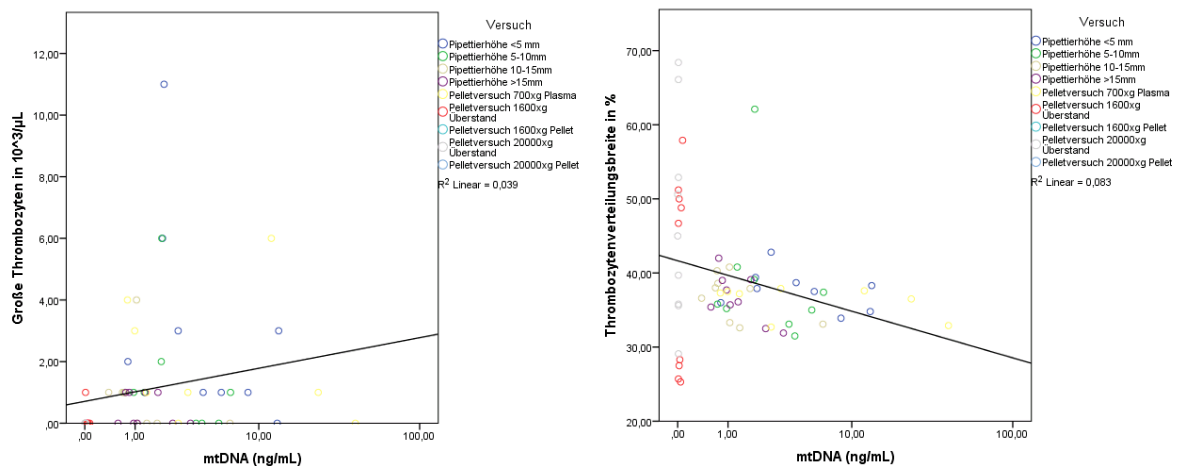


Abb. 19a+b Korrelation der Anzahl großer Thrombozyten und der Thrombozytenverteilungsbreite von der mtDNA

Die Abbildung zeigt die Anzahl großer Thrombozyten und der Thrombozytenverteilungsbreite von der mtDNA. Für beide Parameter sind keine Korrelationen erkennbar, sodass man davon ausgehen kann, dass weder Größe noch Größenunterschied einen Einfluss auf die gemessenen mtDNA-Konzentrationen ausüben

5.7.3. Andere korpuskuläre Blutbestandteile und Konzentration mitochondrialer DNA

In den Plasmaproben wurden durch die Laboratoriumsmedizin der Universitätsmedizin Mainz weiterhin die Konzentration von Erythrozyten und Leukozyten als andere korpuskuläre Blutbestandteile bestimmt. Beide Zelltypen zeigten zwar auf dem Signifikanzniveau von $p=0,05$ signifikante Korrelationen mit der

Konzentration an mtDNA, allerdings wies die graphische Darstellung der Werte, dass hier eine dezidierte Betrachtung von Nöten ist.

So ergab sich für die Zusammenfassung aller Werte lediglich eine Korrelation $R^2=0,431$, wobei aber auffällt, dass die gemessenen Konzentrationen aus dem Pelletversuch deutlich bessere Zusammenhänge zeigen, als dies bei der Pipettierhöhe der Fall ist. Zudem war eine Bestimmung der Leukozytenkonzentrationen im resuspendierten Pellet aufgrund apparativer Probleme der Laboratoriumsmedizin nicht mehr möglich, sodass hier keine Aussage über das Verhalten der Leukozyten getroffen werden kann.

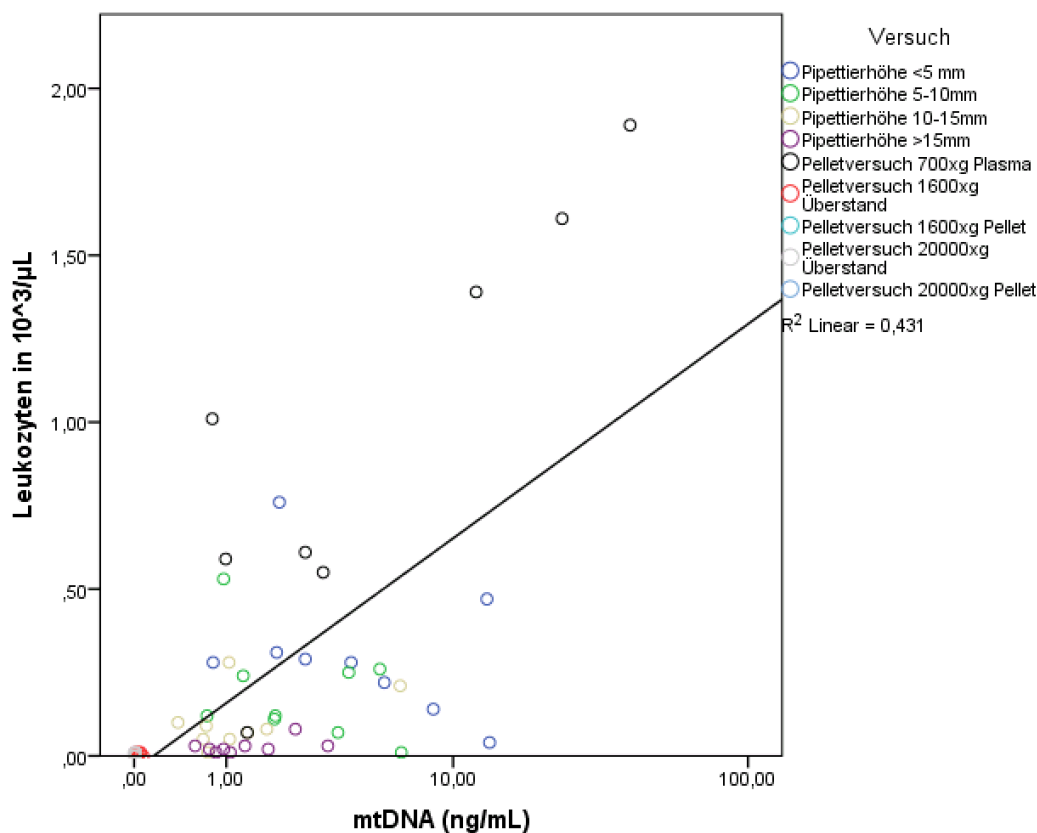


Abb. 20 Abhängigkeit der Leukozytenzahl von der mtDNA

Gezeigt ist die Leukozytenzahl/ μL in Abhängigkeit von der gemessenen mtDNA-Konzentration. Es zeigte sich statistisch zwar ein signifikanter Zusammenhang, jedoch nur eine mäßige Korrelation, es ist somit von einem geringen Einfluss der Leukozytenzahl auf die mtDNA-Konzentration auszugehen.

Ein ähnliches Bild bot die Korrelation mit der Konzentration der mtDNA mit den Erythrozyten. Auch hier war eine Messung in den beiden Pellets nicht möglich, sodass keine Aussage über das Verhalten der Erythrozyten getroffen werden kann. Diese sind jedoch nach der Zentrifugation bei 700g teilweise, nach 1600g zum größten Teil im Pellet zu erwarten. Zudem lagen in den gesamten Proben nur extrem

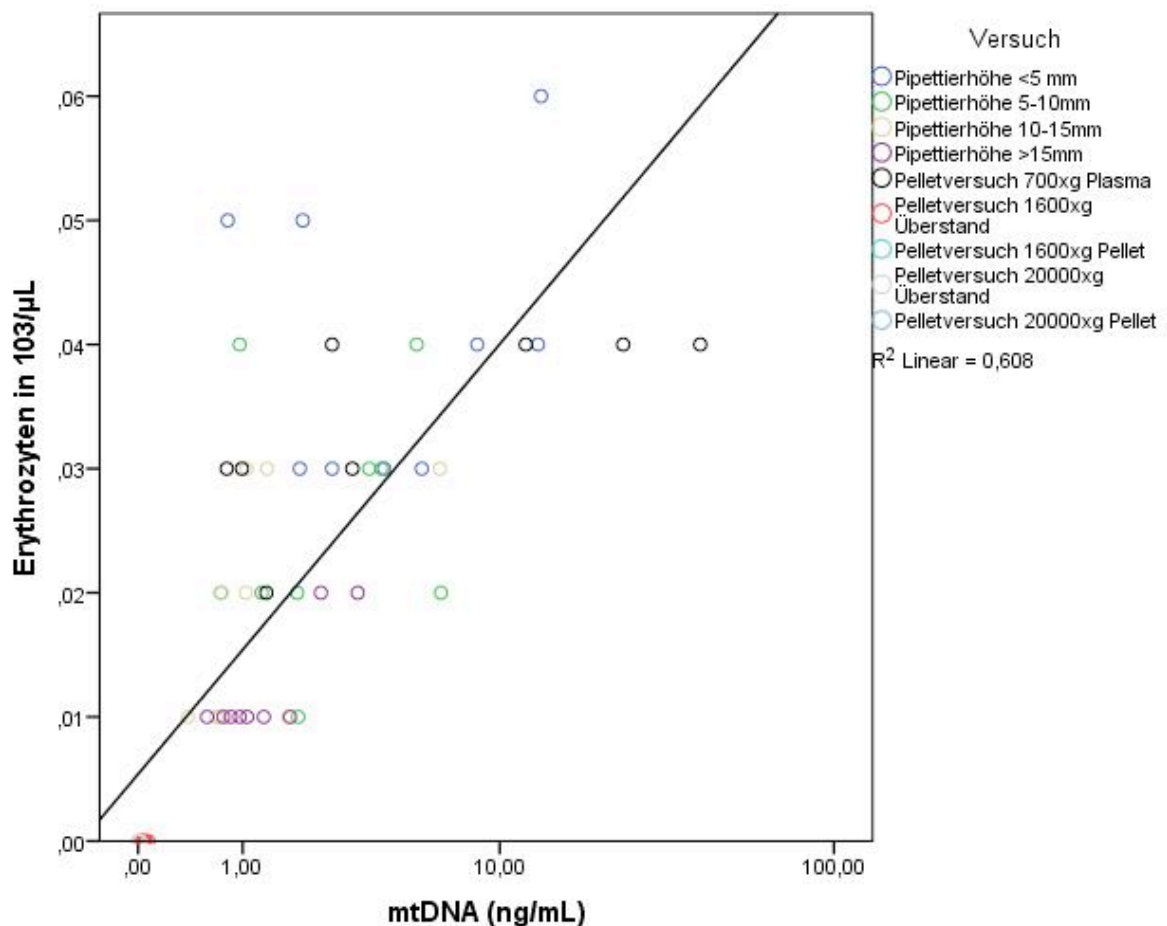


Abb. 21 Abhängigkeit der Erythrozytenzahl von der mtDNA

Aufgetragen ist die Erythrozytenzahl in Abhängigkeit von der mtDNA-Konzentration. Es ist ein stärkerer Zusammenhang als mit der Leukozytenzahl nachweisbar, allerdings ist die geringe Erythrozytenzahl und die fehlende Genauigkeit der Messung ohne Nachkommastellen zu beachten, die die Auswertung beeinträchtigt.

niedrige Mengen an Erythrozyten vor, die sich an der unteren Nachweisgrenze der Geräte der Laboratoriumsmedizin befanden ($0,01 \times 10^3 / \mu\text{L}$). Hierdurch traten zum Einen häufig gleiche Werte an Erythrozytenkonzentrationen auf, zum Anderen verhindert die Rundung auf zwei Nachkommastellen eine detailliertere Darstellung der Verläufe der Konzentrationen in den einzelnen Versuchen. Weiterhin fällt auf, dass zwar in der Gesamtkorrelation ein $R^2=0,608$ erzielt werden kann, in gleichen Versuchen allerdings häufig ähnliche Erythrozytenkonzentrationen auftraten, auch unabhängig von der gemessenen mtDNA-Konzentration (z.B. Pipettierhöhe > 15mm).

5.7.4. DNA-Konzentrationen in einzelnen Versuchsreihen

5.7.4.1. Pipettierhöhe und DNA-Konzentrationen

In diesem Versuch wurden die mitochondriale und die zellfreie nukleäre DNA bei verschiedenen Höhen im Plasmaüberstand nach 5-minütiger Zentrifugation bei 1600xg bestimmt, um den Einfluss von Sedimentation (unter anderem auch durch zelluläre Einflussfaktoren) auf die beiden DNA-Formen zu überprüfen. Für die mitochondriale DNA konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen Pipettierhöhe und DNA-Konzentration nachgewiesen werden.

Abhängige Variable: logMtDNA

Bonferroni

(I)Versuch	(J)Versuch	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Sig.	95%-Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
Pipettierhöhe <5 mm	Pipettierhöhe 5-10mm	,2494	,16043	,780	-,2018	,7006
	Pipettierhöhe 10-15mm	,5651*	,16043	,008	,1139	1,0163
	Pipettierhöhe >15mm	,5131*	,16043	,019	,0619	,9643
Pipettierhöhe 5-10mm	Pipettierhöhe <5 mm	-,2494	,16043	,780	-,7006	,2018
	Pipettierhöhe 10-15mm	,3157	,16043	,347	-,1354	,7669
	Pipettierhöhe >15mm	,2637	,16043	,660	-,1875	,7149
Pipettierhöhe 10-15mm	Pipettierhöhe <5 mm	-,5651*	,16043	,008	-1,0163	-,1139
	Pipettierhöhe 5-10mm	-,3157	,16043	,347	-,7669	,1354
	Pipettierhöhe >15mm	-,0521	,16043	1,000	-,5033	,3991
Pipettierhöhe >15mm	Pipettierhöhe <5 mm	-,5131*	,16043	,019	-,9643	-,0619
	Pipettierhöhe 5-10mm	-,2637	,16043	,660	-,7149	,1875
	Pipettierhöhe 10-15mm	,0521	,16043	1,000	-,3991	,5033

Abb. 22 Unterschiede zwischen den einzelnen Pipettierhöhen bei mtDNA

In der Kreuztabelle sind die Signifikanzen zwischen den einzelnen Pipettierhöhen gezeigt, auffällig ist, dass sich die untere Phase signifikant von den beiden oberen Phasen unterscheidet.

Während sich in der Phase von 5-10mm kein signifikanter Unterschied zu den anderen Phasen zeigte, konnten zwischen der unteren Phase (<5mm) und den beiden oberen Phasen (10-15 und >15mm) ein signifikanter Unterschied in der Konzentration an mtDNA nachgewiesen werden. Je enger über den korpuskulären Blutbestandteilen pipettiert wurde, desto höher lagen die gemessenen DNA-Konzentrationen. Zu erkennen ist ebenfalls, dass sich zwar die Mittelwerte der einzelnen Gruppen deutlich unterscheiden, die Konfidenzintervalle sich allerdings in allen Fällen überschneiden. Des Weiteren liegt kein Unterschied zwischen den beiden oberen Phasen vor, sodass davon ausgegangen werden kann, dass bei einer Pipettierhöhe >10mm über dem Plasmaüberstand bei der mitochondrialen DNA

konstante Werte gemessen werden können und dies somit als Standardvorgehen gewählt werden sollte. Ebenso fand sich in der höchsten Phase trotz des größten pipettierten Volumens (von etwa 2 mL im Vergleich zu etwa 500-700 μ L in den unteren Phasen) die geringste Streuung der mtDNA-Konzentrationen.

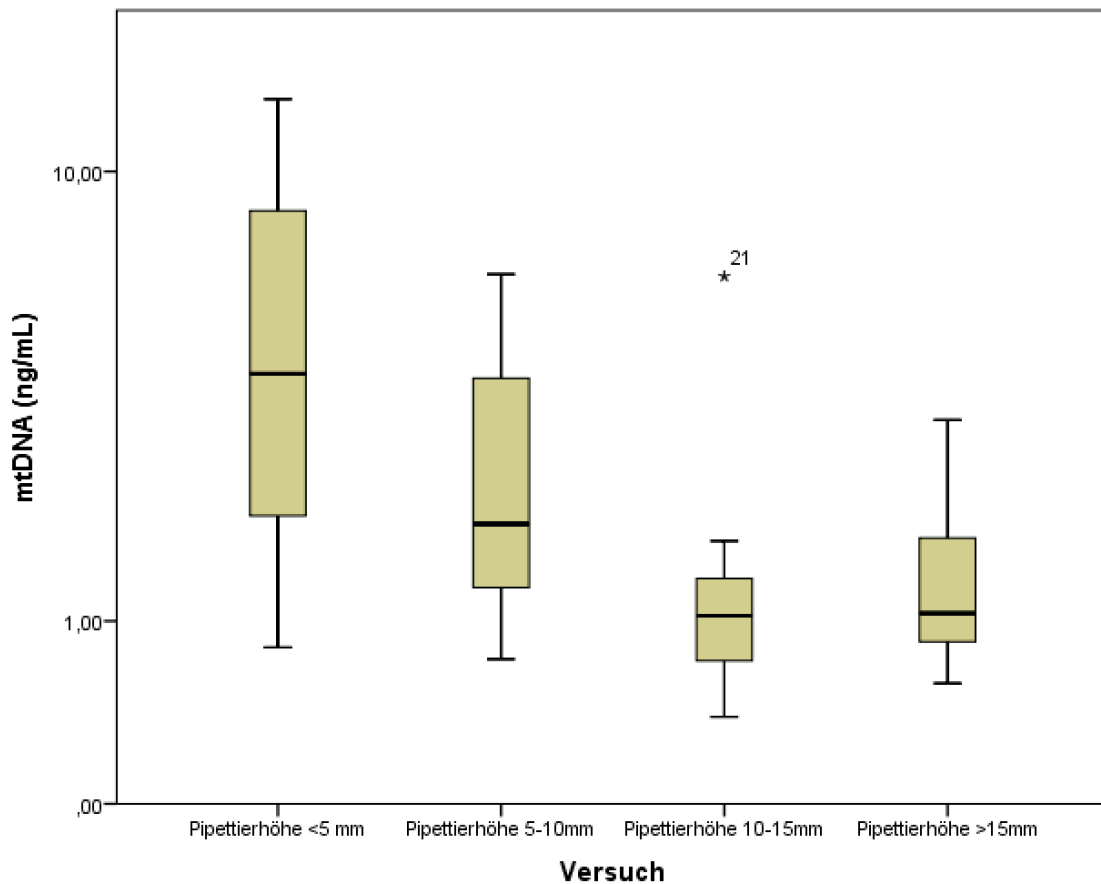


Abb. 23 Boxplot Pipettierhöhe und mtDNA

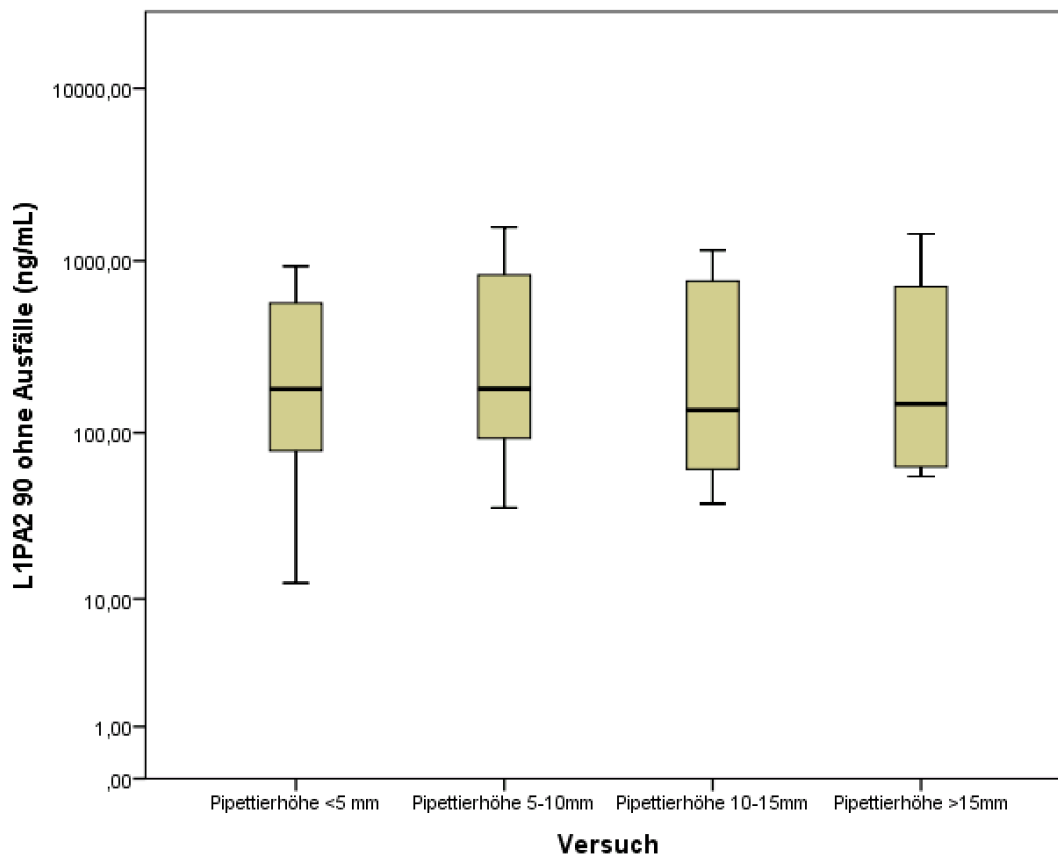
Der Boxplot stellt die Ergebnisse aus der Kreuztabelle anschaulich dar. Je niedriger die Pipettierhöhe über den korpuskulären Blutbestandteilen, desto höher lag die gemessene mtDNA-Konzentration. Ab einer Pipettierhöhe von 10mm unterscheidet sich die mtDNA-Konzentration nicht mehr signifikant.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit den gemessenen Konzentrationen an cf-nDNA, so fällt auf, dass dort die die Abhängigkeit von der Pipettierhöhe nicht vorliegt ist. Für alle Pipettierhöhen zeigte sich im Bezug auf die anderen Höhen eine Signifikanz von 1,000, was bedeutet, dass sich die Gruppen untereinander nicht unterschieden, unabhängig davon, ob das 90 oder das 222bp-lange Fragment gemessen wurde.

logL1PA2_90bp	Pipettierhöhe <5 mm	Pipettierhöhe 5-10mm	-,16206	,31014	1,000	-1,0403	,7161
		Pipettierhöhe 10-15mm	-,08078	,29119	1,000	-,9053	,7437
		Pipettierhöhe >15mm	-,04582	,29119	1,000	-,8703	,7787
	Pipettierhöhe 5-10mm	Pipettierhöhe <5 mm	,16206	,31014	1,000	-,7161	1,0403
		Pipettierhöhe 10-15mm	,08128	,30200	1,000	-,7738	,9364
		Pipettierhöhe >15mm	,11624	,30200	1,000	-,7389	,9714
	Pipettierhöhe 10-15mm	Pipettierhöhe <5 mm	,08078	,29119	1,000	-,7437	,9053
		Pipettierhöhe 5-10mm	-,08128	,30200	1,000	-,9364	,7738
		Pipettierhöhe >15mm	,03496	,28249	1,000	-,7649	,8349
	Pipettierhöhe >15mm	Pipettierhöhe <5 mm	,04582	,29119	1,000	-,7787	,8703
		Pipettierhöhe 5-10mm	-,11624	,30200	1,000	-,9714	,7389
		Pipettierhöhe 10-15mm	-,03496	,28249	1,000	-,8349	,7649
logL1PA2_222bp	Pipettierhöhe <5 mm	Pipettierhöhe 5-10mm	-,08315	,26257	1,000	-,8286	,6623
		Pipettierhöhe 10-15mm	-,00228	,26257	1,000	-,7477	,7431
		Pipettierhöhe >15mm	,02201	,27232	1,000	-,7511	,7951
	Pipettierhöhe 5-10mm	Pipettierhöhe <5 mm	,08315	,26257	1,000	-,6623	,8286
		Pipettierhöhe 10-15mm	,08087	,27018	1,000	-,6862	,8479
		Pipettierhöhe >15mm	,10516	,27967	1,000	-,6888	,8991
	Pipettierhöhe 10-15mm	Pipettierhöhe <5 mm	,00228	,26257	1,000	-,7431	,7477
		Pipettierhöhe 5-10mm	-,08087	,27018	1,000	-,8479	,6862
		Pipettierhöhe >15mm	,02429	,27967	1,000	-,7697	,8182
	Pipettierhöhe >15mm	Pipettierhöhe <5 mm	-,02201	,27232	1,000	-,7951	,7511
		Pipettierhöhe 5-10mm	-,10516	,27967	1,000	-,8991	,6888
		Pipettierhöhe 10-15mm	-,02429	,27967	1,000	-,8182	,7697

Abb. 24 Unterschiede zwischen den einzelnen Pipettierhöhen bei cf-nDNA

Die Kreuztabelle zeigt analog zu Abb. 22 die Konzentrationsunterschiede zwischen den einzelnen Pipettierhöhen für nukleäre DNA. Es kann kein Unterschied zwischen den einzelnen Pipettierhöhen nachgewiesen werden.



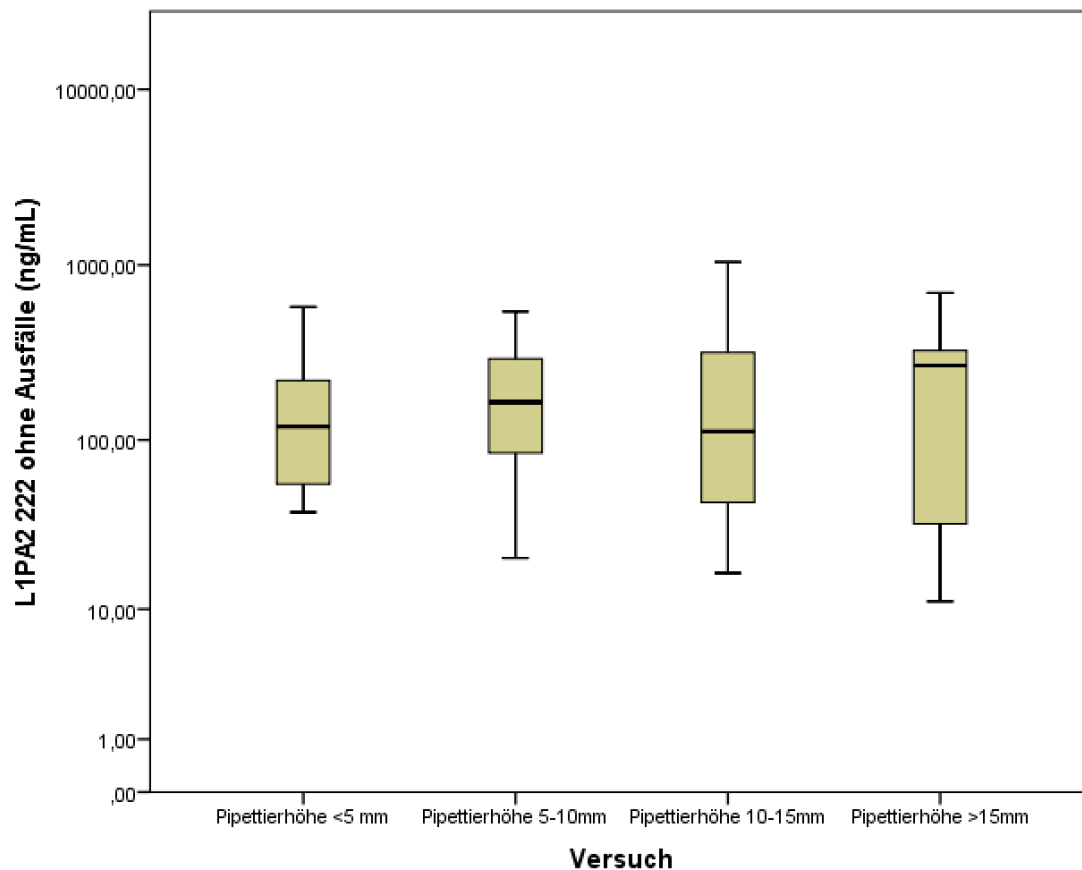


Abb. 25 a+b Boxplot Pipettierhöhe und cf-nDNA

Die Boxplots zeigen anschaulich die Ergebnisse der Kreuztabelle (Abb. 24). Sowohl für das 90 bp- als auch für das 222 bp-Fragment sind keine Unterschiede zwischen den Phasen erkennbar.

Es ist damit davon auszugehen, dass es bei der Messung der nukleären DNA mit der L1PA2-Methode unwesentlich ist, aus welcher Höhe das Plasma für die Messung gewonnen wird. Folglich ist darauf zu schließen, dass die mtDNA anders als die nukleäre DNA bei oder nach der Zentrifugation in Interaktion mit anderen Plasmabestandteilen tritt und diese somit als wichtiger Einflussfaktor bei der Bestimmung korrekter mtDNA-Konzentrationen bedacht werden müssen.

5.7.4.2. Einfluss der Pipettierhöhe auf korpuskuläre Blutbestandteile

Abhängige Variable	(I) Versuch	(J) Versuch	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler r	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
						Untergrenze	Obergrenze
Thrombozyten in %	Pipettierhöhe <5 mm	Pipettierhöhe 5-10mm	,15444 [†]	,03930	,003	,0439	,2650
		Pipettierhöhe 10-15mm	,19556 [†]	,03930	,000	,0850	,3061
		Pipettierhöhe >15mm	,25111 [†]	,03930	,000	,1406	,3616
	Pipettierhöhe 5-10mm	Pipettierhöhe <5 mm	-,15444 [†]	,03930	,003	-,2650	-,0439
		Pipettierhöhe 10-15mm	,04111	,03930	1,000	-,0694	,1516
		Pipettierhöhe >15mm	,09667	,03930	,117	-,0139	,2072
	Pipettierhöhe 10-15mm	Pipettierhöhe <5 mm	-,19556 [†]	,03930	,000	-,3061	-,0850
		Pipettierhöhe 5-10mm	-,04111	,03930	1,000	-,1516	,0694
		Pipettierhöhe >15mm	,05556	,03930	1,000	-,0550	,1661
	Pipettierhöhe >15mm	Pipettierhöhe <5 mm	-,25111 [†]	,03930	,000	-,3616	-,1406
		Pipettierhöhe 5-10mm	-,09667	,03930	,117	-,2072	,0139
		Pipettierhöhe 10-15mm	-,05556	,03930	1,000	-,1661	,0550
Thrombozyten in 10 ³ /μL	Pipettierhöhe <5 mm	Pipettierhöhe 5-10mm	176,00000	67,27669	,081	-13,2052	365,2052
		Pipettierhöhe 10-15mm	224,66667 [†]	67,27669	,013	35,4615	413,8718
		Pipettierhöhe >15mm	293,77778 [†]	67,27669	,001	104,5726	482,9829
	Pipettierhöhe 5-10mm	Pipettierhöhe <5 mm	-176,00000	67,27669	,081	-365,2052	13,2052
		Pipettierhöhe 10-15mm	48,66667	67,27669	1,000	-140,5385	237,8718
		Pipettierhöhe >15mm	117,77778	67,27669	,538	-71,4274	306,9829
	Pipettierhöhe 10-15mm	Pipettierhöhe <5 mm	-224,66667 [†]	67,27669	,013	-413,8718	-35,4615
		Pipettierhöhe 5-10mm	-48,66667	67,27669	1,000	-237,8718	140,5385
		Pipettierhöhe >15mm	69,11111	67,27669	1,000	-120,0940	258,3163
	Pipettierhöhe >15mm	Pipettierhöhe <5 mm	-293,77778 [†]	67,27669	,001	-482,9829	-104,5726
		Pipettierhöhe 5-10mm	-117,77778	67,27669	,538	-306,9829	71,4274
		Pipettierhöhe 10-15mm	-69,11111	67,27669	1,000	-258,3163	120,0940
Leukozyten in 10 ³ /μL	Pipettierhöhe <5 mm	Pipettierhöhe 5-10mm	,12000	,06413	,423	-,0603	,3003
		Pipettierhöhe 10-15mm	,20556 [†]	,06413	,018	,0252	,3859
		Pipettierhöhe >15mm	,28222 [†]	,06413	,001	,1019	,4626
	Pipettierhöhe 5-10mm	Pipettierhöhe <5 mm	-,12000	,06413	,423	-,3003	,0603
		Pipettierhöhe 10-15mm	,08556	,06413	1,000	-,0948	,2659
		Pipettierhöhe >15mm	,16222	,06413	,099	-,0181	,3426
	Pipettierhöhe 10-15mm	Pipettierhöhe <5 mm	-,20556 [†]	,06413	,018	-,3859	-,0252
		Pipettierhöhe 5-10mm	-,08556	,06413	1,000	-,2659	,0948
		Pipettierhöhe >15mm	,07667	,06413	1,000	-,1037	,2570
	Pipettierhöhe >15mm	Pipettierhöhe <5 mm	-,28222 [†]	,06413	,001	-,4626	-,1019
		Pipettierhöhe 5-10mm	-,16222	,06413	,099	-,3426	,0181
		Pipettierhöhe 10-15mm	-,07667	,06413	1,000	-,2570	,1037
Erythrozyten in 10 ³ /μL	Pipettierhöhe <5 mm	Pipettierhöhe 5-10mm	,01444 [†]	,00430	,012	,0023	,0265
		Pipettierhöhe 10-15mm	,02111 [†]	,00430	,000	,0090	,0332
		Pipettierhöhe >15mm	,02778 [†]	,00430	,000	,0157	,0399
	Pipettierhöhe 5-10mm	Pipettierhöhe <5 mm	-,01444 [†]	,00430	,012	-,0265	-,0023
		Pipettierhöhe 10-15mm	,00667	,00430	,787	-,0054	,0188
		Pipettierhöhe >15mm	,01333 [†]	,00430	,024	,0012	,0254
	Pipettierhöhe 10-15mm	Pipettierhöhe <5 mm	-,02111 [†]	,00430	,000	-,0332	-,0090
		Pipettierhöhe 5-10mm	-,00667	,00430	,787	-,0188	,0054
		Pipettierhöhe >15mm	,00667	,00430	,787	-,0054	,0188
	Pipettierhöhe >15mm	Pipettierhöhe <5 mm	-,02778 [†]	,00430	,000	-,0399	-,0157
		Pipettierhöhe 5-10mm	-,01333 [†]	,00430	,024	-,0254	-,0012
		Pipettierhöhe 10-15mm	-,00667	,00430	,787	-,0188	,0054

Abb. 26 Unterschiede zwischen den einzelnen Pipettierhöhen bei korpuskulären Blutbestandteilen

Die Kreuztabelle zeigt Signifikanzen zwischen den einzelnen Pipettierhöhen bei Thrombokrit, Thrombozytenzahl, Leukozytenzahl und Erythrozytenzahl. Zu erkennen ist, dass alle korpuskulären Blutbestandteile einen mehr oder weniger großen Gradienten zwischen den einzelnen Phasen aufbauen, der bei den Thrombozyten am stärksten ausgeprägt ist.

In diesem Versuch wurde die Anzahl der drei häufigsten Zelltypen (Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten) im Plasma nach Zentrifugation über 5 min bei 1600g mit der jeweiligen Pipettierhöhe korreliert.

Thrombozyten

Zunächst ist zu erkennen, dass ein wesentlicher Unterschied darin besteht, ob man die reine Anzahl der Thrombozyten in einem festen Volumen oder den prozentualen Anteil am Gesamtvolumen der Probe (Thrombokrit) betrachtet. Im Sinne des Thrombokrits lies sich ein Unterschied nur dahingehend belegen, dass sich in der tiefsten Phase (<5 mm) deutlich höhere Thrombozytenanteile fanden, als in den anderen Phasen, während sich bei der Thrombozytenanzahl kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden unteren Phasen erkennen ließ. Es ist also davon auszugehen, dass die Thrombozyten bei der Zentrifugation mit den angegebenen Geschwindigkeiten nicht vollständig aus dem Plasma entfernt werden können und folglich danach entsprechend ihrer Masse im Plasma sedimentieren.

Leukozyten

Die Unterschiede in den Konzentrationen der Leukozyten verhielten sich ähnlich denen der Thrombozytenanzahl. Zwischen den beiden unteren Phasen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, wobei die untere Phase allerdings signifikant höhere Leukozytenzahlen aufwies, als es die beiden oberen taten. Zu beachten ist hierbei jedoch zum Einen die relativ geringe Aussagekraft aufgrund der niedrigen Leukozytenzahlen (ein Großteil wird also bereits durch die Zentrifugation aus dem Plasma entfernt) und zum Anderen eine Problematik in der Detektion von Leukozyten. Mit konventionellen Messmethoden (Spektrometrie) ist es nur unzureichend möglich, zwischen korpuskulär intakten Leukozyten und sogenannten „Ghost cells“, zerstörten Zellresten ohne Kern, zu unterscheiden. Somit bleibt also zu überprüfen, ob tatsächlich alle als Leukozyten gemessenen Plasmabestandteile auch eben diese sind oder ob es sich eher um bereits aufgebrauchte Bestandteile handelt, die wegen ihrer geringeren Masse nicht der herkömmlichen Auftrennung durch Zentrifugation zugänglich waren.

Erythrozyten

Die niedrigsten Zahlen von Zellbestandteilen wurden bei den Erythrozyten gemessen. Dies ist damit zu erklären, dass diese von den drei Zellreihen die höchste Masse aufweisen. Eine definitive Aussage ist dadurch, dass sich die Werte nur im Bereich von $1-12 \times 10^3$ Zellen bewegen, sicherlich nicht zu treffen. Dennoch ist augenscheinlich, dass sich auch hier Unterschiede zwischen den Phasen erkennen ließen. Während sich die beiden oberen Phasen auch diesmal nicht voneinander

unterscheiden, konnten in den beiden unteren Phasen auch in diesem Versuch höhere Zahlen an Erythrozyten aufgefunden werden. Auffällig ist, dass sich die untere Phase sogar signifikant von allen anderen Phasen unterschied. Bei Betrachtung eines Falcons nach Zentrifugation kann festgestellt werden, dass häufig noch einige rote Schlieren in der unteren Phase verbleiben und sich auch am Rand der Falcons Ablagerungen von korpuskulären Blutbestandteilen finden. Am stärksten ausgeprägt war dies bei Zentrifugation mit niedrigen Kräften. Diese sind in Zusammenschau der Ergebnisse am ehesten als eine Mischung der verschiedenen Blutzellen zu werten, wobei scheinbar ein prozentualer Überschuss an Erythrozyten besteht.

Als Schlussfolgerung aus den Versuchen zur Auftrennung der korpuskulären Blutbestandteile kann analog zur Messung der mitochondrialen DNA festgehalten werden, dass man nur verlässliche und konstante Werte erreicht, wenn man das Plasma mehr als einen Zentimeter über dem zentrifugierten Pellet im Überstand entnimmt.

5.7.4.3. Pipettierhöhe und Abnahmezeitpunkt

Im Rahmen des durchgeführten Belastungstests wurde venöses Blut zu drei verschiedenen Zeitpunkten abgenommen: vor der Belastung (prä), direkt nach der Belastung (post) und 30 min nach der Belastung (+30). Aus vorausgegangenen Versuchen von Atamaniuk et al. (2008), Beiter et al. (2010) und Breitbach et al. (2014) ist bekannt, dass sich die cf-nDNA belastungsabhängig verhält, indem sie direkt nach Belastung einen Anstieg verzeichnet und dann innerhalb von 30-120 min nach der Belastung in Richtung des Ausgangsniveaus zurückkehrt. Ein solches Verhalten ist für die mitochondriale DNA bisher nicht beschrieben.

Sowohl für das lange, als auch für das kurze Fragment der cf-nDNA konnte das vorbeschriebene Verhalten reproduziert werden. Es zeigte sich ein deutlicher Anstieg nach der Belastung gegenüber dem zuvor gewonnenen Plasma, nach 30 min kehrte die DNA-Konzentration nahezu auf ihr Ausgangsniveau zurück. Es konnten allerdings auch kleine Unterschiede zwischen dem langen und dem kurzen Fragment der cf-nDNA festgestellt werden. Während sich beim kurzen Fragment alle Zeitpunkte signifikant voneinander unterschieden (das heißt Vorbelastung als niedrigster, Nachbelastung als höchster Wert und +30 min dazwischen), konnte dies

beim langen Fragment nicht gleichermaßen beobachtet werden. Hier unterschieden sich der prä- und der +30-Wert nicht voneinander. Abbildung 27 zeigt den Zusammenhang der DNA-Konzentration in Abhängigkeit des Abnahmezeitpunkts und der Pipettierhöhe für die cf-nDNA-Fragmente.

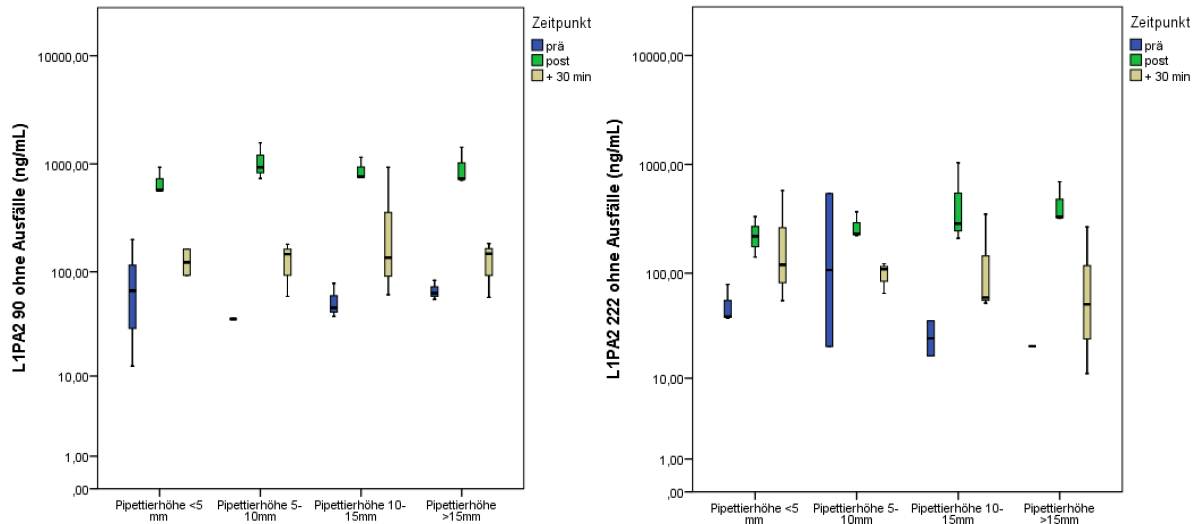


Abb. 27 a+b cf-nDNA und Pipettierhöhe bei verschiedenen Abnahmezeitpunkten

Die Boxplots zeigen die Abhängigkeit der cf-nDNA von Pipettierhöhe und Abnahmezeitpunkt. Es ist ein Anstieg von prä zu post und ein konsekutives Absinken beim +30min-Wert für alle Pipettierhöhen erkennbar. Dies bestätigt die Ergebnisse von Breitbach et al.

Bei der mitochondrialen DNA zeigte sich ein anderes Bild. Hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Abnahmezeitpunkten nachgewiesen werden. Zwar ließen sich Tendenzen im Sinne einer Erhöhung der Werte nach Belastung erkennen, allerdings lagen für alle Zeitpunkte große Streubreiten der Werte im Bereich von mehr als einer Zehnerpotenz bei Absolutwerten im Bereich von 1-10 ng/mL vor. Es bleibt also an einem größeren Kollektiv zu überprüfen, ob es tatsächlich auch für die mitochondriale DNA Korrelationen zwischen Abnahmezeitpunkt und Konzentration gibt, bei drei Probanden ist hierzu keine sichere Aussage möglich. Zur Anwendung kam bei der Auswertung ein Bonferroni-Test, um falsch positive Signifikanzen bei multiplen untersuchten Proben zu vermeiden.

Abhängige Variable: logMtDNA

Bonferroni

(I)Zeitpunkt	(J)Zeitpunkt	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler r	Sig.	95%-Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
prä	post	-,1989	,16365	,698	-,6117	,2138
	+ 30 min	-,1219	,16365	1,000	-,5346	,2909
post	prä	,1989	,16365	,698	-,2138	,6117
	+ 30 min	,0771	,16365	1,000	-,3357	,4898
+ 30 min	prä	,1219	,16365	1,000	-,2909	,5346
	post	-,0771	,16365	1,000	-,4898	,3357

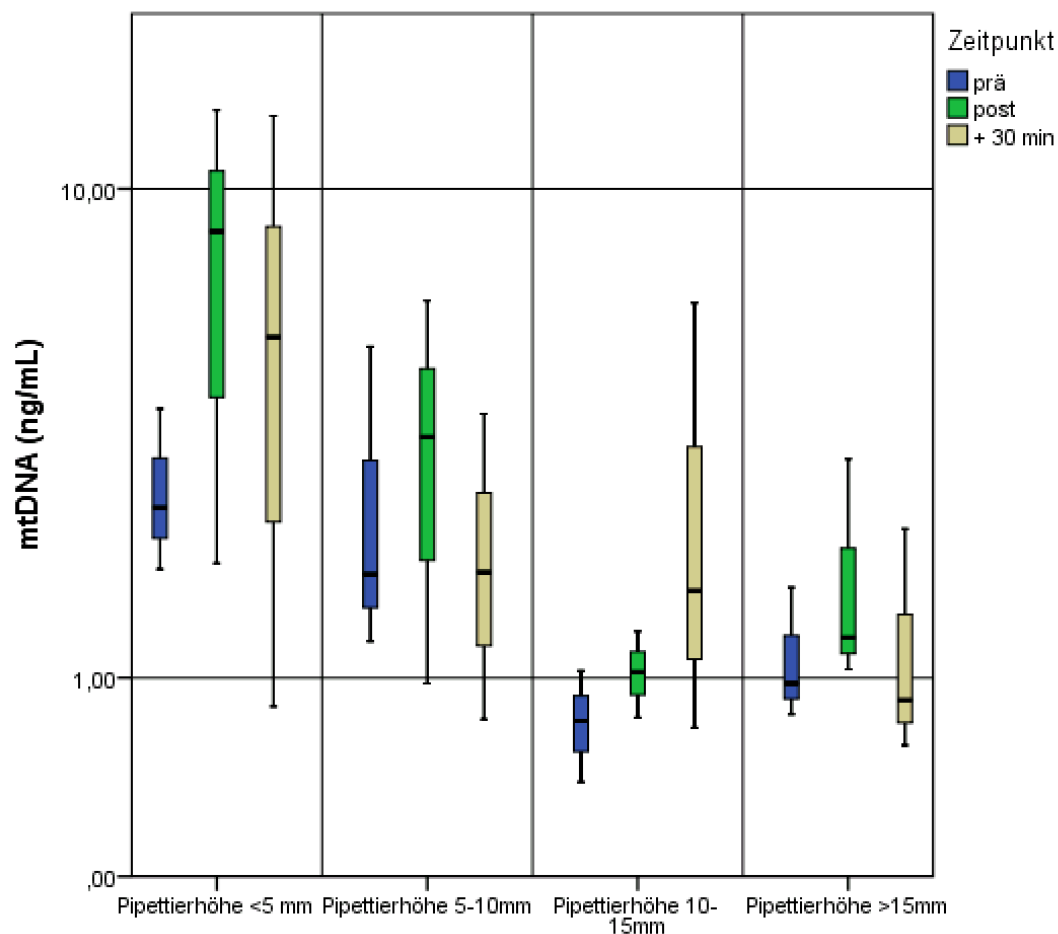


Abb. 28 a+b Kreuztabelle und Boxplot mtDNA bei verschiedenen Abnahmezeitpunkten

Kreuztabelle und Boxplot zeigen die mtDNA-Konzentration in Abhängigkeit von Pipettierhöhe und Abnahmezeitpunkt. Im Gegensatz zur cf-nDNA kann kein signifikantes Ansteigen oder Absinken im Vergleich zwischen prä, post und +30min nachgewiesen werden.

5.7.4.4. Pelletversuch und DNA-Konzentrationen

Der Ablauf des Pelletversuchs ist unter 4.7.5. beschrieben. Hiermit sollte untersucht werden, bei welchen Zentrifugationsgeschwindigkeiten die mitochondriale sowie die

nukleäre DNA aus dem Plasma entfernt wird und mit welchen Blutbestandteilen sie gegebenenfalls in Interaktion tritt. Es wurden die Proben PV1-PV5 unterschieden:

PV1: 700g Plasma

PV2: 1600g Plasmaüberstand

PV3: 1600g resuspendiertes Pellet

PV4: 20000g Plasmaüberstand

PV5: 20000g resuspendiertes Pellet

mitochondriale DNA:

Sicher detektierbare DNA-Konzentrationen konnten lediglich im 700g zentrifugierten Plasma sowie im resuspendierten Pellet nach Zentrifugation bei 1600g nachgewiesen werden.

Lediglich die beiden Plasmaüberstände unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Auffällig ist zum Einen, dass in PV1 weniger DNA vorlag als in PV3, da beide jedoch aus der selben Ausgangsprobe gewonnen wurden ist hier also entweder von einem Messfehler aufgrund niedriger Konzentrationen oder von einer ungleichmäßigen Verteilung der mitochondrialen DNA in der Ausgangsprobe auszugehen. Die gleiche Auffälligkeit konnte auch zwischen PV2 und PV5 beobachtet werden, wobei die Konzentrationsunterschiede hier im Bereich von unter einem ng/mL liegt. Dabei ist auch das Limit of quantification (LOQ) der qPCR zu beachten, die für derart niedrige Konzentrationen keine sichere Detektion der genauen Konzentrationen zulässt. Trotz der beschriebenen methodischen Schwächen lässt sich aus den Versuchen einiges über das Verhalten der mitochondrialen DNA bei Zentrifugation aussagen. So ist festzustellen, dass bei einer Zentrifugation mit 1600g über 10 min (PV2 und 3) der Großteil der mitochondrialen DNA aus dem Plasma entfernt wird und im Pellet wiederzufinden ist, während bei einer Zentrifugation von 700g über 10 min keine entscheidende Elimination der mtDNA aus dem Plasma geschieht. Weiterhin bleibt festzuhalten, dass eine Zentrifugation bei 20.000g keine erhöhte Elimination der mitochondrialen DNA aus dem Plasma bedingt. Sollte also die mitochondriale DNA zusammen mit Blutbestandteilen aus dem Plasma entfernt werden, so sind diese bei niedrigen Zentrifugationsgeschwindigkeiten noch im Plasma vorhanden, während sie bei höheren Geschwindigkeiten vollständig entfernt werden. Dies legt eher eine Assoziation zu den Thrombozyten als beispielsweise zu den Erythrozyten nahe, wobei dieser Sachverhalt in der Diskussion näher betrachtet werden soll.

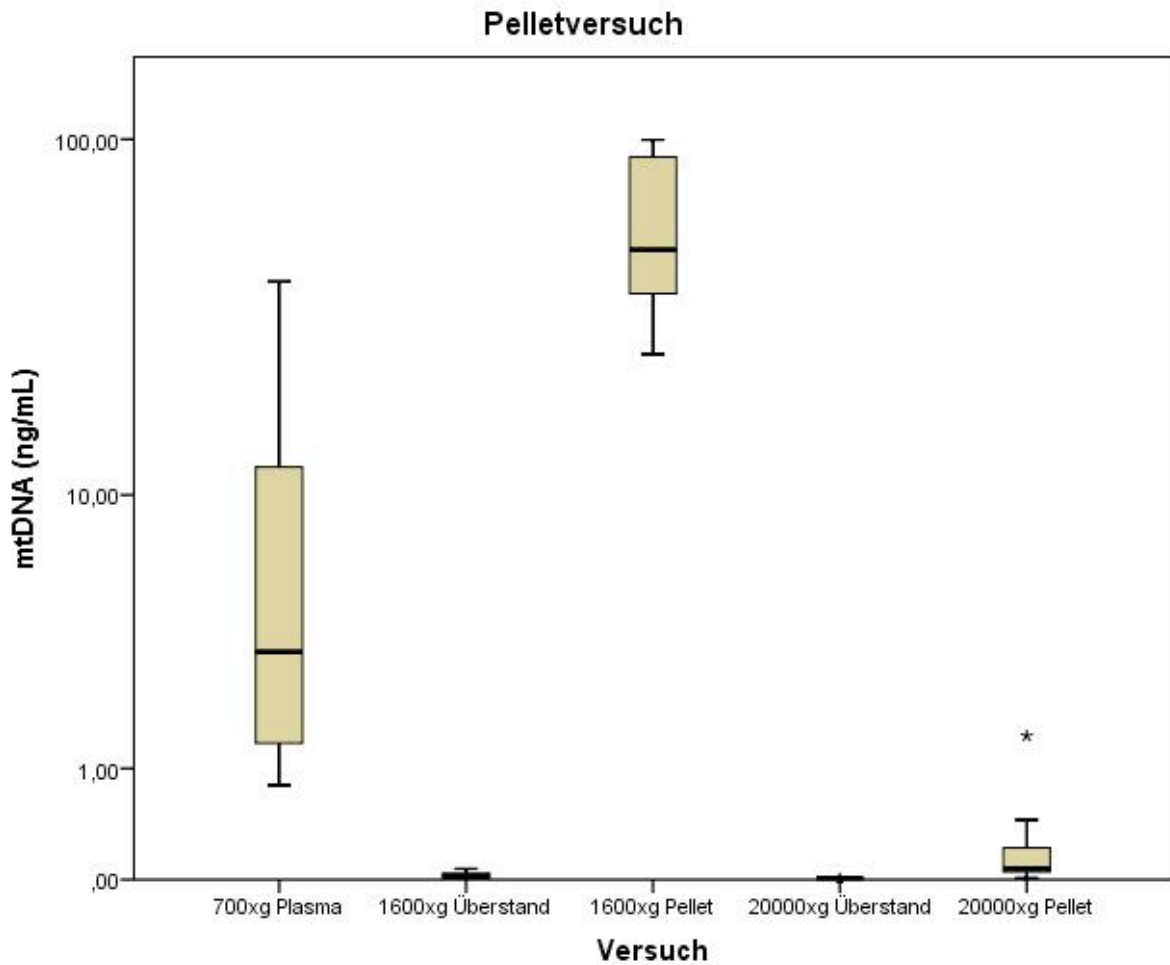


Abb.29 Pelletversuch und mtDNA

In diesem Boxplot sind die mtDNA-Konzentrationen in Abhängigkeit von den Zentrifugationen im Pelletversuch aufgetragen. Während im 700xg zentrifugierten Plasma und im 1600xg zentrifugierten Pellet hohe Konzentrationen mitochondrialer DNA gemessen werden, sind in den anderen Proben nur noch marginale Mengen an mitochondrialer DNA nachweisbar, sodass davon ausgegangen werden kann, dass mtDNA schon bei geringen g-Kräften aus dem Plasma entfernt wird.

zellfreie nukleäre DNA:

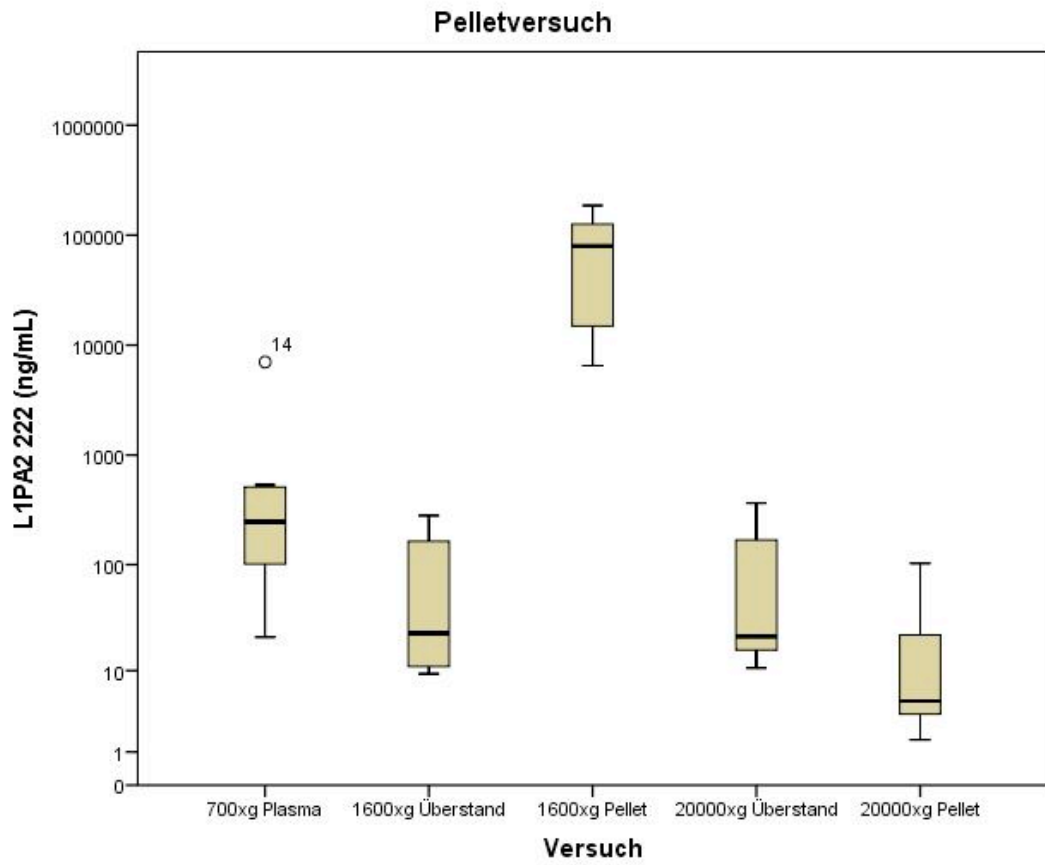
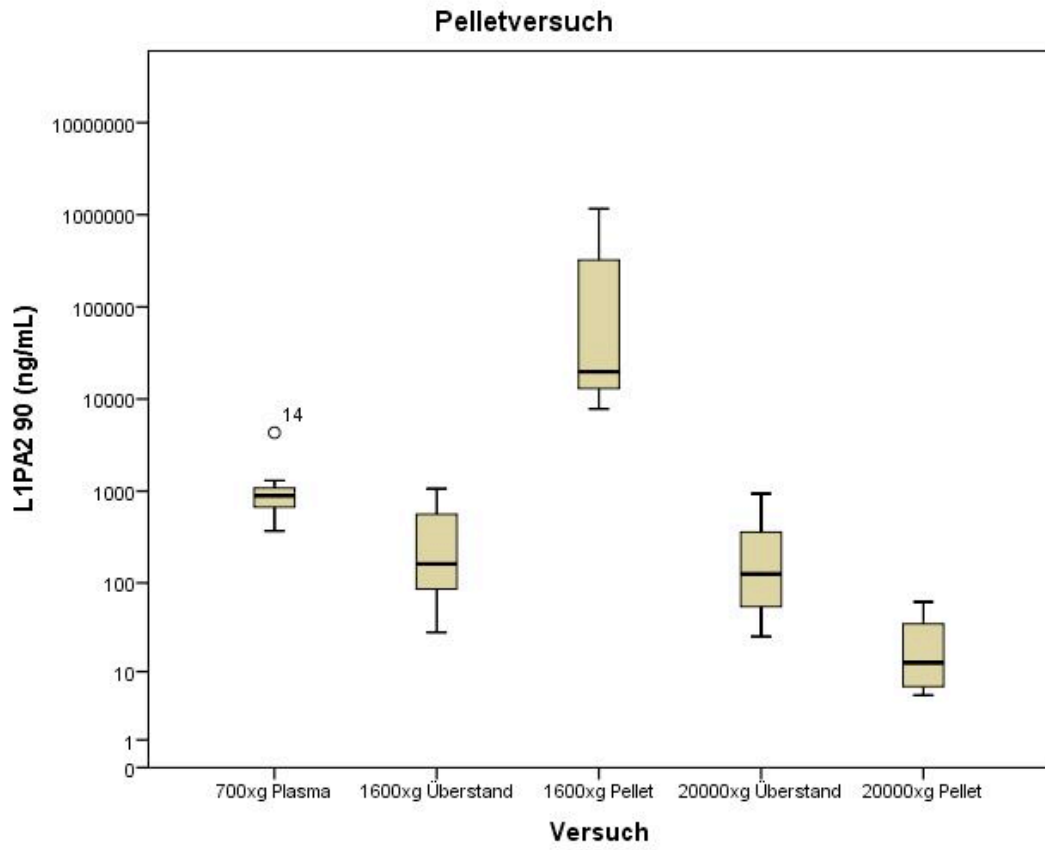
Ein anderes Verhalten zeigte im gleichen Versuch die cf-nDNA. Während die mitochondriale DNA durch Zentrifugationsgeschwindigkeiten knapp über 1000xg bereits aus dem Plasma entfernt und im Pellet wiedergefunden werden konnte, so war dies bei der zellfreien nukleären DNA nicht der Fall. Zwar zeigte sich im 700xg zentrifugierten Plasma eine höhere Konzentration als in den Plasmen, die schneller zentrifugiert wurden, allerdings lag kein nennenswerter Unterschied zwischen einer 1600xg Zentrifugation und der nachfolgenden 20000xg Zentrifugation vor. Während

im 1600xg Pellet eine große Menge an cf-nDNA gemessen werden konnte, lag im 20000xg Pellet bei beiden Fragmenten deutlich weniger DNA vor. Dies deutet darauf hin, dass eine Zentrifugation bei 1600xg zwar einen deutlichen Unterschied zu niedrigeren Geschwindigkeiten bewirkt, eine nachfolgende Hochgeschwindigkeitszentrifugation jedoch keine vorteilhaften Auswirkungen auf die Messgenauigkeit birgt. Auffällig war bei diesem Versuch abermals, dass im 1600xg zentrifugierten Pellet mehr DNA vorlag, als im 700xg Plasma, was in dieser Weise nicht möglich ist, da dieses zuerst aus der 700xg Plasmaprobe gewonnen wurde. Zur Gewinnung des 1600xg wurde der Plasmaüberstand des 700xg Plasmas zur Hälfte aufgeteilt und ein Teil mit 1600xg rezentrifugiert. Es ist somit davon auszugehen, dass auch die L1PA2-Messung bei einer höheren Zellanzahl im Pellet falsche Substrate misst oder vermehrt Zellen durch die Zentrifugation zerstört werden, deren DNA anschließend im Pellet als freie DNA nachweisbar wird.

Nichtsdestotrotz weist der durchgeführte Versuch eindrücklich die Unterschiede zwischen nukleärer und mitochondrialer DNA nach ebenso wie das richtige Vorgehen bezüglich der Verarbeitung der Plasmaproben. Während eine 10 -minütige Zentrifugation bei 1600g mit vorheriger Zentrifugation nahezu die gesamte Menge mitochondrialer DNA aus dem Plasma entfernt, ist sie bei der L1PA2-Methode sogar hilfreich, um valide Werte an DNA im Plasma zu erzeugen. Es ist also bei der mitochondrialen DNA zu erkennen, dass bei schnellerer Zentrifugation nur noch geringe mtDNA-Konzentrationen zu erkennen sind, während bei der nukleären DNA auch Plasmaproben verwendet werden können, die zuvor deutlich schneller zentrifugiert wurden (beispielsweise um Zellen oder andere relevante Plasmabestandteile zu entfernen) und trotzdem gleichbleibende Werte gemessen werden. Es sollte also generell in Betracht gezogen werden, zwei unterschiedliche Plasmaansätze aus einer Probe herzustellen, wenn man gleichzeitig die mitochondriale und die nukleäre DNA messen möchte.

Abb. 30 a+b Pelletversuch und cf-nDNA

Die Boxplots zeigen, dass bei der cf-nDNA im Gegensatz zur mtDNA auch nach Zentrifugation bei 20.000xg noch genauso viel DNA im Plasma vorliegt wie nach 1600xg-Zentrifugation. Somit ist davon auszugehen, dass die cf-nDNA auch nach Entfernung korpuskulärer Blutbestandteile durch stärkere Zentrifugation in ihrer ursprünglichen Menge im Plasma nachweisbar bleibt.



Vergleich von langem und kurzem Fragment der L1PA2-Messung

Mittels des Pelletversuchs sollte exemplarisch die Korrelation zwischen langem (222bp) und kurzem (90bp) Fragment in der L1PA2-Messung untersucht werden. Da das kurze Fragment vollständig im Bereich des Langen liegt, wird bei der Messung eines langen Fragments auch immer das kurze Fragment gemessen, da dessen Basenabfolge stets vorliegt. Kommt es jedoch zu einem Defekt des langen Fragments an einer Stelle, in der keine Basen des kurzen Fragments enthalten sind, so misst man ein kurzes Fragment ohne Detektion des langen Fragments. Daher muss die Konzentration der kurzen Fragmente immer über der der langen Fragmente liegen. Abbildung 31 stellt die gute Korrelation und das Verhältnis der beiden Fragmente dar. Es ist zu sehen, dass die gemessenen Konzentrationsverhältnisse für den gesamten Wertebereich nahe an der errechneten Ausgleichsgeraden liegen und somit ein gleichbleibendes Verhältnis für die gute Verlässlichkeit und hohe interne Konsistenz der bereits etablierten Messung spricht.

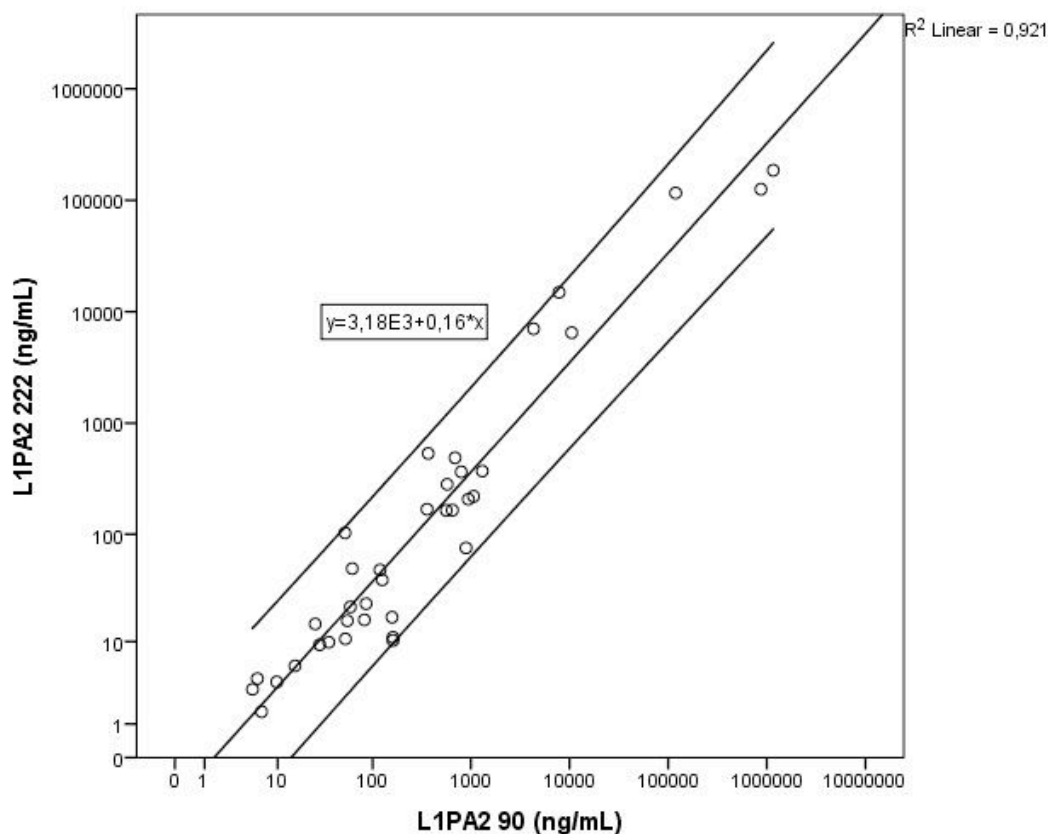


Abb. 31 Korrelation von langem und kurzem Fragment im Pelletversuch

Die Grafik zeigt die Korrelation von 90 bp- und 222 bp-Fragment im Pelletversuch. Es ist eine hohe Korrelation von $R^2=0,921$ errechnet, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die L1PA2-Messung sehr valide die Konzentration beider Fragmente darstellt ohne Nebenprodukte zu messen.

6. Diskussion

6.1. qPCR zur Bestimmung der Konzentration mitochondrialer DNA

Ziel der Etablierung der qPCR war die Direktmessung frei zirkulierender mitochondrialer DNA im Plasma.

Die Bestimmung des LOQ für die Direktmessung mitochondrialer DNA aus dem Plasma erfolgte anhand einer Verdünnungsreihe. Diese lieferte eine sichere Nachweisbarkeit der mtDNA-Konzentration bis 80 Kopien/ μ L (was einem Cq-Wert in der qPCR von 28,42 entsprach), für niedrigere Konzentrationen hingegen war die etablierte Methode nicht spezifisch genug. Dies führte in rückwirkender Betrachtung zu einigen Problemen. Während in der ähnlich ablaufenden Bestimmung der nukleären DNA selten derart niedrige Kopienzahlen gemessen wurden (vgl. Beiter et al., 2010 und Breitbach et al. 2014), waren diese bei mitochondrialer DNA deutlich frequenter vertreten. Verlässliche Aussagen sind somit nur in einem Fenster möglich, das nicht alle Werte abbildet, die unter physiologischen Bedingungen auftreten können. Um aber Plasma in den bereits etablierten Zentrifugationsgeschwindigkeiten (ggf. 16.000xg für bis zu 10 min) sicher und ohne große Ungenauigkeit messen zu können, bedarf es also einer weiteren Optimierung der präsentierten Methode im Bereich niedriger Konzentrationen. Hierbei sollte das Augenmerk auf folgende Bedingungen gelegt werden: eine Messgenauigkeit sollte optimalerweise bis zu einer Anzahl von 10 Kopien/ μ L gewährleistet sein, wenngleich einige Messwerte vor allem im Pelletversuch sogar noch darunter lagen. Auf der anderen Seite begann die Etablierung der Reihe für eine Anzahl von 100.000 Kopien/ μ L, respektive einem Cq-Wert von 18,07. Es liegt also für weitaus höhere Konzentrationen ebenfalls keine ausreichende Verlässlichkeit vor. Betrachtet man jedoch die Messung des 1600xg Pellets (PV3), so liegen hier Werte vor, die um den Faktor 10^3 höher sind. Bei schon vor der Messung erwarteten hohen Werten ist es also zu empfehlen, direkt vor der Messung der Probe eine Verdünnung vorzunehmen, um Werte zu generieren, die noch im Bereich der etablierten Werte liegen. Dies zeigt die enorme Spannweite der möglichen mtDNA-Konzentrationen und gleichzeitig das Dilemma der Etablierung einer validen Messung, die voraussetzt, dass sowohl im Bereich der Maxima, als auch im Bereich der Minima eine Verbesserung der Messgenauigkeit erzielt werden sollte. Hierzu sind verschiedene Komponenten der qPCR entsprechend ihres richtigen Einsatzes zu prüfen: Ob SYBR-Green als Färbereagenz anderen

fluoreszierenden Stoffen (u.a. SYBR-Gold) überlegen ist, sowie die Frage nach dem richtigen PCR-Protokoll. Hier hatte die Verwendung kürzerer Annealing-Zeiten zu einer deutlich verbesserten Effizienz der qPCR geführt und auch die Verlängerung um 5 Zyklen konnte die Effektivität deutlich steigern. Lediglich zu den Temperaturen der einzelnen Schritte (Denaturierung, Annealing, Elongation) wäre eine weitere Betrachtung von Nöten, um eine weitere Verbesserung der Methode zu überprüfen. Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass die etablierte Methode zur Direktmessung mitochondrialer DNA aus nicht zuvor aufgereinigtem Plasma zwar eine Verbesserung der bisher etablierten Verfahren darstellen kann, da sie einen größeren Konzentrationsbereich als die anderen abbildet, für eine wirklich valide Messung über alle unter physiologischen Bedingungen auftretenden Werte jedoch noch eine Optimierung von Nöten wäre.

6.2. Einfluss der Probenverarbeitung auf die Messergebnisse mitochondrialer und zellfreier nukleärer DNA

In Betrachtung der Ergebnisse lässt sich feststellen, dass der Probenverarbeitung zur Gewinnung einer aussagekräftigen Plasmaprobe eine entscheidende Bedeutung zukommt. Hierzu ist ein standardisiertes Vorgehen zu wählen, das die Bereiche Zentrifugation, Pipettieren und Probenlagerung beinhaltet.

Bislang wurde cf-mfDNA vor allem nach Aufreinigung gemessen (Huggett, Novak et al., 2008). Helmig et al. (2015) legten allerdings nahe, dass bei zu niedrigen Zentrifugationsgeschwindigkeiten während einer Direktmessung im Plasma auch die DNA aus frei-zirkulierenden Mitochondrien gemessen wird. Um die Messung mitochondrialer DNA, die gebunden statt frei zirkulierend im Plasma vorliegt zu vermeiden, war also eine vielseitige Betrachtung der präanalytischen Schritte nötig.

In Bezug auf die Zentrifugation konnte **in** gezeigt werden, dass durch Zentrifugation mit höheren Geschwindigkeiten über längere Zeitdauern mehr mtDNA aus den Plasmaproben eliminiert werden konnte. Gleichzeitig erhöhte sich auch die Aufreinigung im Bezug auf korpuskuläre Blutbestandteile. Während bereits bei niedrigen Geschwindigkeiten (vgl. 300xg und 700xg) größere Bestandteile wie Erythrozyten und Teile der unter Leukozyten zusammengefassten Blutbildreihen nahezu vollständig aus dem Plasmaüberstand entfernt werden konnten, gelang dies bei Thrombozyten erst vollständig ab einer Zentrifugation bei 2x2500xg für 15 min (Lackner et al., 2015). In Zusammenschau des oben beschriebenen LOQ, der

gemessenen Cq-Werte **aus** und des Verhaltens der korpuskulären Blutbestandteile ergibt sich ein gewisser Widerspruch für das Festlegen der optimalen Verarbeitung der Proben. Möchte man nur die cf-mtDNA messen, so ist eine hohe Zentrifugationsgeschwindigkeit zu wählen (Alam, Kanki et al., 2003). Letztendlich fiel die Entscheidung auf eine bessere Messbarkeit der mtDNA und es wurde eine Geschwindigkeit von 1x1600xg für 5 min bei den Etablierungsversuchen der Methode festgelegt, da sich die Cq-Werte in diesem Fall in etwa in der Mitte des messbaren Bereichs befanden. Dadurch ist allerdings eine Interaktion zwischen der mtDNA und den korpuskulären Blutbestandteilen - insbesondere den Thrombozyten - nicht ausgeschlossen. Es wäre für eine bessere Aussagekraft ohne Störfaktoren also notwendig, eine Messung der mitochondrialen DNA zu etablieren, die auch bei Zentrifugationsgeschwindigkeiten von mehr als 2x2500xg über 15 min sicher detektierbare Cq-Werte liefert. Die DNA-Aufreinigung bei der Etablierung der Zentrifugationsgeschwindigkeit legte nahe, dass auch bei derartiger Zentrifugation noch genug cf-mtDNA im Plasma vorlag, dass mit dem LOQ der Methode detektierbare Werte zu erzielen wären.

Trotz gleicher Plasmaproben lieferte die mehrfache Messung der mtDNA immer wieder stark voneinander abweichende Werte, es musste also der Verdacht gestellt werden, dass präanalytisch besondere Vorsicht bei der Erzeugung immer gleicher Proben walten musste. Insbesondere das Pipettieren des erzeugten Plasmas und die Probenlagerung vor der Messung waren hier also von Interesse.

Hinsichtlich des Pipettierens lieferte der Versuch zur Pipettierhöhe die Erkenntnis, dass sowohl die mtDNA als auch die korpuskulären Blutbestandteile (je größer, desto geringer ausgeprägt) auch nach Zentrifugation ein Konzentrationsgefälle aufbauen. Anhand der vier gebildeten Fraktionen konnte gezeigt werden, dass sich gerade in den Fraktionen dicht über dem Pellet deutlich höhere mtDNA-Konzentrationen fanden, wohingegen bei Abständen von mehr als einem Zentimeter in einem 15 mL Falcon keine wesentlichen Unterschiede mehr auftraten. Es ist also bei der Gewinnung einer aussagekräftigen Plasmaprobe sehr genau auf zwei Faktoren zu achten. Zum Einen sollte Plasma, das sich weniger als einen Zentimeter über dem Pellet befindet, nicht zur Messung herangezogen werden, um beträchtliche Konzentrationsunterschiede vorwiegend beim Pipettieren knapp über dem Pellet zu vermeiden. Dies ist bisher so bei vorangegangenen Versuchen aus anderen Arbeiten nicht beachtet worden. Zum Anderen sollte eine möglichst breite Plasmafraktion oberhalb von einem Zentimeter über dem Pellet abgenommen werden, um eine

repräsentative Schnittmenge des auch dort zwar in geringerem Ausmaß bestehenden, aber sicherlich zu betrachtenden, Konzentrationsgefälles darzustellen. Bei Betrachtung der Probenlagerung ergaben sich Hinweise auf die korrekte Verwendung einer Plasmaprobe. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Dauer der Lagerung und auch die Anzahl des Auftauens und Einfrierens keinen Einfluss auf die gemessenen Cq-Werte ausübte, sofern einmaliges Einfrieren zuvor erfolgte. Dies stellt den Vorteil dar, dass das Einfrieren keine relevante Denaturierung der mtDNA bei mehrfacher Durchführung zur Folge hat, wodurch beliebig häufig Nachmessungen erfolgen können und auch eine Vergleichbarkeit der verschiedenen Plasmaproben gewährleistet ist. Einen entscheidenden Einfluss stellte der Vorgang des Einfrierens dennoch dar, denn es erhöhte sich der Cq-Wert um etwa drei, wenn man eine Probe vor dem Messen einfror, statt sie direkt zu messen. Die Ursachen dieses Einflusses sind nicht gänzlich erklärt. Es ist allerdings davon auszugehen, dass sowohl Denaturierung der DNA beim erstmaligen Einfrieren, als auch eine Interaktion mit korpuskulären Blutbestandteilen, die durch kalte Temperaturen selbst einen Schaden erleiden, eine Rolle spielen (Galyuk et al. 2009).

Zusammenfassend kann man also festhalten, dass es nicht die optimale Zentrifugationsgeschwindigkeit für die etablierte Methode gibt, die alle denkbaren Einflussfaktoren ausschaltet. Beim Pipettieren sollte auf einen Abstand von mindestens einem Zentimeter über dem Pellet geachtet werden und eine mehrfache Messung von Proben mit simultanem Auftauen und Einfrieren ist unproblematisch, eine Probe sollte jedoch immer mindestens einmal eingefroren werden, um reproduzierbare Werte zu liefern.

Im Vergleich zur mtDNA zeigte sich die cf-nDNA deutlich weniger störanfällig bei der Herstellung einer aussagekräftigen Probe.

Betrachtet man das Vorgehen bei der Zentrifugation so war auffällig, dass bei Dauern zwischen $1 \times 300 \times g$ für 2 min und $2 \times 10.000 \times g$ für 10 min nur maximale Konzentrationsunterschiede von zwei Cq-Werten auftraten. Dies bedeutet zwar immer noch einen DNA-Konzentrationsunterschied um den Faktor 4, es zeigt jedoch, dass bei einer breiten Basis an Zentrifugationsgeschwindigkeiten noch Cq-Werte erzielt werden können, die innerhalb des LOQ der verwendeten Methode liegen. Somit fällt es deutlich leichter, andere zelluläre Einflussfaktoren, die durch höhertourige Zentrifugation vermeidbar wären, auszuschalten.

Auch bei Beurteilung der verschiedenen Pipettierhöhen zeigte sich die cf-nDNA gleichmäßig verteilt und bildete kein Konzentrationsgefälle aus. Sowohl für Plasma, das knapp über dem Pellet abgenommen wurde, als auch für solches am oberen Rand, konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Dies birgt den Vorteil in sich, dass man größere Mengen an Plasma aus einer Probe gewinnen kann, was gerade für kleine Blutvolumina von Nutzen ist, andererseits ist deutlich weniger Vorsicht bei der Wahl der Pipettierhöhe geboten, denn solange man keine Bestandteile des Pellets mit aufnimmt, liefert eine Messung valide Werte.

Auf eine Untersuchung bezüglich der Stabilität der Werte bei mehrfachem Einfrieren und Auftauen wurde verzichtet, da in Vorversuchen von Breitbach et al. Proben nach längerer Lagerung erneut gemessen wurden und auch dabei keine Konzentrationsveränderungen auftraten.

Als Fazit kann also festgehalten werden, dass eine bereits zuvor festgelegte Zentrifugation bei 1600xg für 2 oder 5 min auch für die L1PA2-Methode sicherlich sinnvoll aber weit weniger entscheidend ist, als für die mtDNA. Auch ein standardisiertes Vorgehen beim Pipettieren sollte eingehalten werden, es dient hier aber viel mehr dazu, keine Teile des Pellets aufzunehmen, als starke Konzentrationsunterschiede auszugleichen.

Es ist also möglich, Proben für die Messung von mtDNA und cf-nDNA in der grundlegend gleichen Weise zu verarbeiten, dies dient aber hauptsächlich dazu, die wesentlich empfindlicheren mtDNA-Konzentrationen auf eine valide Weise abzubilden.

6.3. Unterschiede von mitochondrialer und nukleärer DNA anhand des Pelletversuchs

Entscheidende Hinweise auf das unterschiedliche Verhalten von cf-nDNA und mtDNA lieferte der Pelletversuch. Von zentraler Bedeutung war hierbei die Frage, welchen Einfluss verschiedene Zentrifugationsgeschwindigkeiten auf die verschiedenen DNA-Formen hatten, um die Erkenntnisse aus den ersten Versuchen zu verschiedenen intensiven Zentrifugationen noch einmal zu bestätigen. Bei der Betrachtung war vor allem entscheidend, wie viel DNA sich jeweils in den Pellets und Überständen befand. Es war zu erkennen, dass sich die Überstände bei der cf-nDNA auch bei zweiter Zentrifugation mit 1.600xg oder dritter Zentrifugation mit 20.000xg

kaum veränderten. Dies lässt darauf schließen, dass eine stabile Konzentration bereits bei sehr geringen Geschwindigkeiten erzielt werden kann und dann über einen breiten Korridor an verschiedenen Geschwindigkeiten konstant bleibt. Die Bedeutung einer standardisierten Zentrifugationsgeschwindigkeit ist also hier als geringer im Vergleich zur mtDNA einzuschätzen. Viel wichtiger ist deshalb das Pipettieren ohne Teile des Pellets aufzunehmen, da darin die größte Fehlerquelle bei der Verarbeitung der Plasmaproben liegt. Bei der mtDNA zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Zentrifugationsgeschwindigkeiten, schon nach 10 min bei 1.600xg befand sich nahezu die gesamte messbare cf-mtDNA nur noch im resuspendierten Pellet und auch zwischen der 700xg-Zentrifugation und der Zentrifugation bei 1.600xg fanden sich beträchtliche Unterschiede in den gemessenen Konzentrationen. Es ist also davon auszugehen, dass für die korrekte Messung der mtDNA das saubere Pipettieren ebenso entscheidend ist wie bei der cf-nDNA, es jedoch auch eine niedrige Zentrifugationskraft erfordert, um eine reliabel messbare Konzentration zu erreichen. Die Verarbeitung der Proben kann also bei der mtDNA als deutlich entscheidender betrachtet werden.

6.4. Mitochondriale DNA in Interaktion mit Thrombozyten

Die Auswertung der Korrelationen der mtDNA mit korpuskulären Blutbestandteilen erbrachte die stärksten Zusammenhänge mit den Thrombozyten. Wie bereits in der Literaturdiskussion angeklungen, gab es vorbeschriebene Zusammenhänge zwischen den beiden Entitäten. Die Empfindlichkeit der Thrombozyten in Verbindung mit hohen Zentrifugationsgeschwindigkeiten (Plebani, Lackner et al. 2016 und Boudreau et al. 2014) stellt hierbei wahrscheinlich ein Problem für die korrekte Bestimmung der Konzentration an mtDNA dar. Die starke Korrelation legt dabei mehrere Thesen nahe:

Zunächst scheinen mtDNA und Thrombozyten entsprechend steigender Zentrifugationsgeschwindigkeit gleichzeitig aus dem Plasma entfernt zu werden. Das heißt, dass bei hohen Konzentrationen an Thrombozyten im resuspendierten Pellet auch mit einer höheren Menge an mtDNA zu rechnen ist. Jedoch ist dadurch auch naheliegend, dass Probanden mit hohen Thrombozytenzahlen auch hohe mtDNA-Konzentrationen per se aufweisen. Die Ursache hierfür ist unklar, wäre aber durch zwei Ansätze erklärbar.

Zum Einen bestünde die Möglichkeit, dass die mtDNA aus den Thrombozyten selbst stammt. Würden diese durch die Zentrifugation in ihrer Integrität gestört, so würde man höhere mtDNA-Konzentrationen messen. Es würde dann keine Messung der frei zirkulierenden mtDNA im Plasma erfolgen sondern lediglich der durch zerstörte Thrombozyten freigesetzte mtDNA aus thrombozytären Mitochondrien. Grundspiegel an mtDNA im Blut auch bei niedriger Zentrifugationsgeschwindigkeit wären dann durch mtDNA zu erklären, die bereits von abgebauten Thrombozyten freigesetzt wurde und im Blut noch nicht denaturiert ist.

Zum Anderen wäre denkbar, dass die negativ geladene mtDNA auf der Außenseite von korpuskulären Blutbestandteilen bindet, am stärksten dann auf der der Thrombozyten. So würde man sie bei noch vorhandenen Thrombozyten im Plasma dort nachweisen und bei stärkerer Zentrifugation im beschriebenen Pellet.

Dann muss weiterhin betrachtet werden, dass bei Zentrifugation mit höherer Geschwindigkeit auch mehr Thrombozyten aktiviert werden, die dadurch ihre Granula freisetzen (Seidel et al., 2019). Diese enthalten dabei auch ganze Mitochondrien. Werden diese ebenfalls zerstört, so kommt es zur Freisetzung von mtDNA. Im Sinne dieser Theorie würde man dann die frei zirkulierende mtDNA überhaupt nicht messen, sondern lediglich die DNA, die aktivierte Thrombozyten sowieso freisetzen.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Zusammenhang zwischen der mtDNA und den Thrombozyten besteht und davon ausgegangen werden muss, dass diese die Direktmessung im Plasma beeinflusst. Da die Methode der Laboratoriumsmedizin in Mainz, die die Thrombozyten spektrometrisch nachweist, keine Aussage über die Integrität der Thrombozyten treffen und somit auch keine Korrelation zwischen der Anzahl zerstörter Thrombozyten und gemessener mtDNA-Konzentration hergestellt werden konnte, steht hierfür eine weitere Untersuchung aus. Denkbar wäre hierfür die Untersuchung der Thrombozyten im Ausstrich des Plasmas oder eine spektrometrische Methode, die das Verhältnis intakter und zerstörter Thrombozyten sicherer bestimmen ließe. Weiterhin wären Versuche mit Färbemethoden sinnvoll, um das Bindeverhalten von mtDNA-Fragmenten auf der Oberfläche von Blutzellen weiter zu quantifizieren. Hier wäre es möglich mittels ELISA oder Southern Blot zuerst die mtDNA als Zielstruktur zu verwenden und anschließend selbigen Versuch auch für die Thrombozyten

durchzuführen. Eine gute Korrelation könnte dann eine Bindung der mtDNA auf den Thrombozyten nachweisen oder widerlegen.

6.5. Bedeutung der verschiedenen Fragmentlängen zellfreier nukleärer DNA und Schlussfolgerungen für die mitochondriale DNA

Die Messung der cf-nDNA erfolgte stets in zwei verschiedenen Fragmentlängen von 90 und 222 bp Länge. Dabei war das 90 bp lange Fragment ein Bestandteil des 222 bp Fragments. Dieser Fakt stellte zwei Anforderungen für die Messung dar, die beide auch nachweisbar waren: Zum Einen musste für jedes nachgewiesene 222 bp Fragment auch ein 90 bp Fragment gemessen werden, zum Anderen musste die Gesamtmenge der 90 bp Fragmente über der der 222 bp Fragmente liegen, da mögliche Bruchstellen im Bereich der DNA liegen könnten, die zwar die 222 bp Fragmente, aber nicht die 90 bp Fragmente enthielten. Durch dieses Vorgehen konnte recht sicher gezeigt werden, dass die Methode auch nur die Basenpaar-Fragmente misst, die sie auch messen sollte und kein ähnlicher Locus in einem anderen Bereich des Genoms in bedeutender Menge amplifiziert wird.

Eine solche Kontrolle liegt für die Messung der mtDNA bisher nicht vor. Das amplifizierte Fragment hat bei der aktuellen Methode eine Länge von 103 bp. Wie Zhang et al. (2016) nachwies, hat aber der Großteil der mtDNA-Bruchstücke eine Länge, die deutlich darunter liegt. Trägt man die Anzahl der DNA-Fragmente im Verhältnis zu deren Länge auf, so liegt das Maximum sogar bei nur 42 bp. Ein längeres Fragment - wie das Gemessene - erhöht also die Wahrscheinlichkeit, dass es kein entsprechendes ähnliches Fragment irgendwo im Genom (sowohl nukleär als auch mitochondrial) gibt, welches fälschlicherweise ebenfalls gemessen würde. Andererseits muss man deutlich niedrigere Konzentrationen an amplifizierter DNA in Kauf nehmen, was vor allem die Problematik verstärkt, dass ein nicht unbedeutender Teil der Konzentrationen unterhalb des LOQ lag. Ein sinnvolles Vorgehen zur Verbesserung der Methode wäre deshalb ein zweites Fragment mit einer Länge von 30-60 bp zu suchen, das innerhalb des 103 bp Fragments liegt und dieses, analog zur L1PA2-Methode, jeweils parallel zu amplifizieren. Dies würde einerseits die Sicherheit erhöhen, dass man tatsächlich nur den gewünschten Bereich der mtDNA amplifiziert, andererseits würde man aber auch höhere DNA-Konzentrationen nachweisen, sodass der LOQ-Wert nicht eine solch ausschlaggebende Bedeutung

hätte, wie er es bei der jetzigen Methode darstellt und man deutlich mehr Proben erst quantifizieren könnte.

6.6. Mitochondriale DNA als Belastungsmarker

Eine Abhängigkeit der Konzentration der cf-nDNA von körperlicher Belastung konnte wiederholt und sicher gezeigt werden. Studien wie die von Shockett et al. (2015), Stawski et al. (2017) und Hummel et al. (2018) legten eine ähnliche Bedeutung auch für die mtDNA nahe. Jedoch ist hierbei nicht bekannt, wie die Probenverarbeitung in diesen Studien genau erfolgte, lediglich war zu sehen, dass eine Zentrifugation mit 16.000xg in einem zweiten Schritt stattfand. Angesichts dessen ist es nur sinnvoll, solche Ergebnisse in die Betrachtung mit einzubeziehen, bei denen die genaue Verarbeitung der Proben hinreichend bekannt ist.

Die Ergebnisse des Belastungsversuchs lassen dabei folgenden Rückschluss zu: Während bei der L1PA2-Methode die bereits bekannten Ergebnisse reproduziert und bestätigt werden konnten, reichten die erzielten Werte bei der mtDNA nicht für eine sichere Aussage zur Verwendbarkeit als Belastungsmarker aus.

Die L1PA2-Methode zeigte eine klare Trennung der Abnahmezeitpunkte prä, post und +30 unabhängig von Zentrifugation und Pipettierhöhe. Während der Belastung stiegen die cf-nDNA-Werte an und kehrten bis 30 min nach der Abnahme nahezu auf ihr Ausgangsniveau zurück. Bei der cf-nDNA kann also davon ausgegangen werden, dass sie den Verlauf von Belastung und anschließender Erholung adäquat abbildet.

Betrachtete man die mtDNA im Versuch zur Pipettierhöhe, so ließen sich ganz ähnliche Tendenzen erkennen, wie sie bei der cf-nDNA nachgewiesen wurden. Die Werte stiegen bei Ansicht der graphischen Auftragung im Boxplot an und sanken auch bei der Erholung wieder ab, jedoch zeigte sich auch eine hohe Streubreite, sodass keine ausreichenden Signifikanzen bei zu geringer Probandenzahl (n=3) erzielt werden konnten. Ebenso war bei einer Pipettierhöhe von 5-10mm in der Erholung der gegenteilige Effekt nachzuweisen, da hier die Werte auch bis +30 min noch weiter anstiegen, statt wie bei den anderen Höhen wieder abzusinken. Auch das Absinken oder Ansteigen der mtDNA-Werte unter Belastung, wie sie in den beiden Studien beschreiben wurden (Shockett et al., 2015; Stawski et al., 2017; Hummel et al., 2018), konnte insbesondere nicht gezeigt werden. Es könnte also durchaus sein, dass sich die mtDNA ganz ähnlich wie die cf-nDNA unter Belastung

verhält, um dies nachzuweisen, wäre es allerdings nötig, die Stichprobe zu erhöhen, um zufällige Zusammenhänge sicherer auszuschließen. Auch sollte man möglicherweise zwei Kollektive bei der Untersuchung gegenüberstellen. Eines mit guter Fitness und ausgeprägter Muskulatur (aufgrund der hohen Dichte an Mitochondrien in der Muskulatur vom Typ I) und ein weniger trainiertes Kollektiv, um auch zu untersuchen, wie sich die generelle Menge an Mitochondrien auf die Werte auswirkt, auch unter der Fragestellung, ob man wirklich die freie mtDNA misst oder nur freie Mitochondrien. Auch bleibt zu untersuchen, inwiefern sich verschiedene Belastungen auf die Konzentration an mtDNA auswirken. Während sich bisherige Versuche häufig auf aerobe Belastungen bezogen, stellte die Belastung anhand des Stufentests einen Test der anaeroben Kapazität dar, sodass es möglicherweise auch hier Unterschiede im Verhalten der mtDNA gibt.

Sicher kann in jedem Fall gesagt werden, dass die mtDNA im aktuell gemessenen Setting nicht die Qualität als Belastungsmarker hat, wie es bei der cf-nDNA der Fall ist.

6.7. Mitochondriale DNA als Parameter in anderen Settings

Während sich die Bedeutung der mtDNA als Belastungsmarker in den vorliegenden Versuchen nicht hinreichend belegen ließ, so lässt sich doch feststellen, dass man sehr gute Zusammenhänge mit anderen Messgrößen, allen voran den Thrombozyten, feststellen konnte. Dadurch eröffnet sich ein breites Feld an möglichen sinnvollen Anwendungsgebieten der mtDNA.

Eine besondere Bedeutung haben Thrombozyten vor allem in der Diagnostik einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) im Rahmen von septischen Geschehen im Sinne eines daraus resultierendes Multiorganversagens genauso wie in der Diagnostik diverser hämatopoetischer Erkrankungen (Osteomyelofibrose, Leukämie, Polycythämia vera etc.). MtDNA wurde wie cf-nDNA als Trigger für eine gesteigerte Thrombinaktivierung und somit für eine verstärkte Gerinnung erkannt (Bhagirath et al., 2015), sodass hier eine Überwachung der DIC möglich wäre. Ebenso wäre eine Anwendung im Bereich der Transfusionsmedizin sinnvoll, um eine Abstoßungsreaktion bei der Übertragung von Thrombozytenkonzentraten frühzeitig zu erkennen. Es kann also festgehalten werden, dass die Bedeutung der mtDNA wohl eher im klinisch-intensivmedizinischen Setting (Itagaki et al., 2015) eine Rolle spielt als im Sportmedizinischen. Hier wäre also die Untersuchung von

Patientenkollektiven beispielsweise von internistischen oder thoraxchirurgischen Intensivstationen (Lam et al. 2003; Wang, Xie et al. 2015) sinnvoll wie auch die Messung von Proben, die im Verlaufe einer OP mit großen Volumenverlusten (thorax- oder viszeralchirurgische sowie unfallchirurgische Eingriffe) wie auch die Akut- und Langzeitobservation von Traumapatienten. In all diesen Bereichen könnte das Gerinnungsmonitoring in Kombination mit der mtDNA eine frühere Erkennung kritischer Thrombozyten-Verluste erleichtern. Allerdings ist hierzu auch eine Optimierung der labortechnischen Abläufe notwendig, um entsprechende Zeitverluste zu reduzieren.

7. Zusammenfassung

Zum jetzigen Zeitpunkt steht die wissenschaftliche Anwendung der mtDNA in verschiedenen Bereichen noch an ihrem Anfang. Zuerst war es notwendig, eine valide und fundierte Messmethode zu entwickeln, um realistische und reproduzierbare Konzentrationen zu messen. Dies sollte durch die aufgeführten Methoden der Arbeit gelungen sein. Ebenso ist es durch die etablierte qPCR erstmals möglich eine Direktmessung im Plasma ohne vorherige Isolation der mtDNA zu gewährleisten. Nichtsdestotrotz gibt es auch weiterhin Probleme durch die mögliche mannigfaltige Interaktion mit verschiedenen Messgrößen, sodass die genaue Herkunft der mtDNA, die in der qPCR gemessen wird weiterhin fraglich bleibt.

Hinsichtlich der praktischen Anwendung konnte die Bedeutung als allgemeiner Belastungsmarker, wie ihn die cf-nDNA darstellt, weder hinreichend bestätigt noch widerlegt werden. Dennoch liegt nahe, dass die mtDNA eine Qualität wie die cf-nDNA auch bei größeren Kollektiven nicht wird erreichen können. Es erscheint also deutlich sinnvoller, nach entsprechenden klinischen Anwendungen zu suchen. Hierbei erscheinen Bereiche, in denen Thrombozyten involviert sind (das heißt vor allem operative Eingriffe und Intensivmedizin), als sinnvollstes Gebiet für weitere Forschungen.

Vor allem erforderlich sind außerdem die Etablierung von Messwerten aus größeren Kollektiven. Bisher begrenzten sich die Versuche auf junge und sportliche Männer, der Einfluss körperlicher Konstitution, Krankheit, Alter und Geschlecht auf die Messwerte ist derzeit also weitgehend ungeklärt. Auch sollte eine weitere Optimierung der Messmethode mit größeren Bereichen sicher messbarer Werte angestrebt werden.

Trotz gewisser methodischer Probleme und ausbaufähiger Aussagekraft von Ergebnissen aufgrund teilweise kleiner Kollektive, sollte es sich lohnen, weiter im Bereich der frei-zirkulierenden DNA im Blut zu forschen. Genau wie bei der cf-nDNA, sollte es bei der mtDNA nur eine Frage der Zeit sein, bis breite Anwendungsgebiete gefunden werden können. Erste Ansätze soll diese Arbeit hierzu liefern.

8. Anhang

Literaturverzeichnis

ALAM, T. I., T. KANKI, T. MUTA, K. UKAJI, Y. ABE, H. NAKAYAMA, K. TAKIO, N. HAMASAKI and D. KANG 2003. Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM. *Nucleic Acids Res* 31(6): 1640-1645.

ALBUS, M. 2018. Etablierung der Messung frei zirkulierender mitochondrialer DNA mittels direkter PCR Messung aus Plasma. Dissertationsschrift 2018

ANDERSON, S., A. T. BANKIER, B. G. BARRELL, M. H. de BRUIJN, A. R. COULSON, J. DROUIN, I. C. EPERON, D. P. NIERLICH, B. A. ROE, F. SANGER, P. H. SCHREIER, A. J. SMITH, R. STADEN and I. G. YOUNG 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290(5806): 457-465

ATAMANIUK, J., VIDOTTO, C., TSCHAN, H., BACHL, N., STUHLMEIER, K. M. & MULLER, M. M. 2004. Increased concentrations of cell-free plasma DNA after exhaustive exercise. *Clinical chemistry*, 50, 1668-70

ATAMANIUK, J., STUHLMEIER, K. M., VIDOTTO, C., TSCHAN, H., DOSENBACHGLANINGER, A. & MUELLER, M. M. 2008. Effects of ultra-marathon on circulating DNA and mRNA expression of pro- and anti-apoptotic genes in mononuclear cells. *European journal of applied physiology*, 104, 711-7.

BAYKARA E., GESIERICH B., ADAM R., TULADHAR A.M., BIESBROECK J.M., KOEK H.L., ROPELE S., JOUVENT E.; CHABRIAT H., ERTL-WAGNER B., EWERS M., SCHMIDT R., DE LEEUW F.E., BIESELS G.J., DICHGANS M., DUERING M., 2016. A Novel Imaging Marker for Small Vessel Disease Based on Skeletonization of White Matter Tracts and Diffusion Histograms. *Ann Neurol*. 2016 Oct;80(4):581-92.

BHAGIRATH V.C., DWIVEDI D.J., LIAW P.C. 2015. Comparison of the Proinflammatory and Procoagulant Properties of Nuclear, Mitochondrial and Bacterial DNA. *Shock* 2015 Sep;44(3):265-71. doi: 10.1097/SHK0000000000000397

BEITER, T., FRAGASSO, A., HUDEMANN, J., NIESS, A. M. & SIMON, P. 2011. Short-term treadmill running as a model for studying cell-free DNA kinetics in vivo. *Clinical chemistry*, 57, 633-6

BEITER, T., FRAGASSO, A., HUDEMANN, J., SCHILD, M., STEINACKER, J., MOOREN, F.C. & NIESS, A. M. 2014. Neutrophils release extracellular DNA traps in response to exercise. *Journal of applied physiology*, 117, 325-33.

BREITBACH, S., STERZING, B., MAGALLANES, C., TUG, S. & SIMON, P. 2014a. Direct measurement of cell-free DNA from serially collected capillary plasma during incremental exercise. *Journal of applied physiology*, 117, 119-30

BREITBACH, S., TUG, S., HELMIG, S., ZAHN, D., KUBIAK, T., MICHAL, M., GORI, T., EHLERT, T., BEITER, T. & SIMON, P. 2014b. Direct quantification of cell-free, circulating DNA from unpurified plasma. *PloS one*, 9, e87838

BUDNIK, L. T., S. KLOTH, X. BAUR, A. M. PREISSER and H. SCHWARZENBACH 2013. Circulating mitochondrial DNA as biomarker linking environmental chemical exposure to early preclinical lesions elevation of mtDNA in human serum after exposure to carcinogenic halo-alkane-based pesticides." *PLoS One* 8(5): e64413

BOUDREAU, L. H., A. C. DUCHEZ, N. CLOUTIER, D. SOULET, N. MARTIN, J. BOLLINGER, A. PARE, M. ROUSSEAU, G. S. NAIKA, T. LEVESQUE, C. LAFLAMME, G. MARCOUX, G. LAMBEAU, R. W. FARNDAL, M. POULIOT, H. HAMZEH-COGNASSE, F. COGNASSE, O. GARRAUD, P. A. NIGROVIC, H. GUDERLEY, S. LACROIX, L. THIBAUT, J. W. SEMPLE, M. H. GELB and E. BOILARD 2014. Platelets release mitochondria serving as substrate for bactericidal group IIA-secreted phospholipase A2 to promote inflammation. *Blood* 124(14): 2173-2183.

CHANG, C. P., CHIA, R. H., WU, T. L., TSAO, K. C., SUN, C. F. & WU, J. T. 2003. Elevated cell-free serum DNA detected in patients with myocardial infarction. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 327, 95-101

CHIU, R. W., L. Y. CHAN, N. Y. LAM, N. B. TSUI, E. K. NG, T. H. RAINER and Y. M. LO 2003. Quantitative analysis of circulating mitochondrial DNA in plasma. Clin Chem 49(5): 719-726

CLEJAN L., MENAHEM H. (1977) Binding of Deoxyribonucleic Acid to the Surface of Human Platelets. 1977 S. Karger AG, Basel

Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2016. PLEBANI M., Hrsg. v. GILLERY P., GREAVES R., LACKNER K.J., LIPPI G., MELICHAR B., PAYNE D., SCHLATTMANN P.

DOESCHER A., PETERSHOFEN E.K., HERTENSTEIN B., KRAEMER D., CASPER J., SCHMIDT J.P., MÜLLER T.H., 2014. Platelet recovery and survival measured in patients bei quantitative polymerase chain reaction of mitochondrial DNA. Transfusion. 2015 Jan;55(1):55-63. doi: 10.1111/trf.12778. Epub 2014 Jul 23.

DORSCH CA. (1981) Binding of single-stranded DNA to human platelets. Thrombosis Research 1981 Oct 1-15;24(1-2):119-29.

EHLERT, T., S. TUG, A. BRAHMER, V. NEEF, F. HEID, C. WERNER, B. JANSEN-WINKELN, W. KNEIST, H. LANG, I. GOCKEL and P. SIMON 2017. Establishing PNB-qPCR for quantifying minimal ctDNA concentrations during tumour resection. Sci Rep 7(1): 8876.

FANG C., WEI X., WEI Y., 2015., Mitochondrial DNA in the regulation of innate immune responses. Protein and Cell, 2015 .10.1007/s13238-015-0222-9

FATOUROS, I. G., DESTOUNI, A., MARGONIS, K., JAMURTAS, A. Z., VRETTOU, C., KOURETAS, D., MASTORAKOS, G., MITRAKOU, A., TAXILDARIS, K., KANAVAKIS, E. & PAPASSOTIRIOU, I. 2006. Cell-free plasma DNA as a novel marker of aseptic inflammation severity related to exercise overtraining. Clinical chemistry, 52, 1820-4.

FATOUROS, I. G., JAMURTAS, A. Z., NIKOLAIDIS, M. G., DESTOUNI, A., MICHAILIDIS, Y., VRETTOU, C., DOUROUDOS, II, AVLONITI, A., CHATZINIKOLAOU, A., TAXILDARIS, K., KANAVAKIS, E., PAPASSOTIRIOU, I. & KOURETAS, D. 2010. Time of sampling is crucial for measurement of cell-free plasma DNA following acute aseptic inflammation induced by exercise. *Clinical biochemistry*, 43, 1368-70

FLEISCHHACKER, M., B. SCHMIDT, S. WEICKMANN, D. M. FERSCHING, G. S. LESZINSKI, B. SIEGELE, O. J. STOTZER, D. NAGEL and S. HOLDENRIEDER 2011. Methods for isolation of cell-free plasma DNA strongly affect DNA yield. *Clin Chim Acta* 412(23-24): 2085-2088

FUCHS T.A., ABED U., GOOSMANN C., HURWITZ R., SCHULZE I., WAHN V., WEINRAUCH Y., BRINKMANN V., ZYCHLINSKY A., 2007. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2007; 176(2): 231-41

GARRIDO, N., L. GRIPARIC, E. JOKITALO, J. WARTIOVAARA, A. M. van der BLIEK and J. N. SPELBRINK 2003. Composition and dynamics of human mitochondrial nucleoids. *Mol Biol Cell* 14(4): 1583-1596.

GALYUK E.N., WARTELL R.M., DOSIN Y.M., LANDO D.Y. 2009. DNA denaturation under freezing in alkaline medium. *J Biomol Struct Dyn.* 2009 Feb;26(4):517-23

HEITZER, E., ULZ, P. & GEIGL, J. B. 2015. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clinical chemistry*, 61, 112-23

HELMIG, S., FRUHBEIS, C., KRAMER-ALBERS, E. M., SIMON, P. & TUG, S. 2015. Release of bulk cell free DNA during physical exercise occurs independent of extracellular vesicles. *European journal of applied physiology*, 115, 2271-80

HOU, Y. L., J. J. CHEN, Y. F. WU, C. J. XUE, F. Z. LI, Q. ZHENG and H. CHEN 2013. Clinical significance of serum mitochondrial DNA in lung cancer. *Clin Biochem* 46(15): 1474-1477

HUGGETT, J. F., T. NOVAK, J. A. GARSON, C. GREEN, S. D. MORRIS-JONES, R. F. MILLER and A. ZUMLA 2008. Differential susceptibility of PCR reactions to inhibitors: an important and unrecognised phenomenon. BMC Res Notes 1: 70.

HUMMEL E.M., HESSAS E., MÜLLER S., BEITER T., FISCH M., EIBL A., WOLF OT. , GIEBEL B., PLATEN P., KUMSTA R., MOSER AD. (2018). Cell-free DNA release under psychosocial and physical stress conditions. Transl Psychiatry 8, 236 (2018) doi:10.1038/s41398-018-0264-x

HURTADO-ROCA Y., LEDESMA M., GONZALEZ-LAZARO M., MORENO-LOSHUERTOS R., FERNANDEZ-SILVA P., ENRIQUEZ JA., LACLAUSTRA M. (2016) Adjusting MtDNA Quantification in Whole Blood for Peripheral Blood Platelet and Leukocyte Counts. 2016

ITAGAKI K, KACZMAREK E, LEE YT, TANG IT, ISAL B, ADIBNIA Y, et al. 2015. Mitochondrial DNA Released by Trauma Induces Neutrophil Extracellular Traps. PLoS ONE 10(3): e0120549. doi:10.1371/journal.pone.0120549

KOHLER, C., R. RADPOUR, Z. BAREKATI, R. ASADOLLAHI, J. BITZER, E. WIGHT, N. BURKI, C. DIESCH, W. HOLZGREVE and X. Y. ZHONG 2009. Levels of plasma circulating cell free nuclear and mitochondrial DNA as potential biomarkers for breast tumors. Mol Cancer 8: 105

LAM N.Y., RAINER T.H., CHIU R.W., JOYNT G.M., LO Y.M., 2003. Plasma mitochondrial DNA concentrations after trauma. Clin Chem. 2004;50:213–216

LEON, S. A., B. SHAPIRO, D. M. SKLAROFF and M. J. YAROS 1977. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. Cancer Res 37(3): 646-65

LO, Y. M., RAINER, T. H., CHAN, L. Y., HJELM, N. M. & COCKS, R. A. 2000. Plasma DNA as a prognostic marker in trauma patients. Clinical chemistry, 46, 319-23

MANDEL, P. & METAIS, P. 1948. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. Comptes rendus des seances de la Societe de biologie et de ses filiales, 142, 241-3.

McILROY, D. J., A. G. JARNICKI, G. G. AU, N. LOTT, D. W. SMITH, P. M. HANSBRO and Z. J. BALOGH 2014. Mitochondrial DNA neutrophil extracellular traps are formed after trauma and subsequent surgery. *J Crit Care* 29(6): 1133 e1131-1135

MELCHINGER H., JAIN K., TYAGI T., HWA J. (2019) Role of Platelet Mitochondria: Life in a Nucleus-Free Zone. *Front. Cardiovasc. Med.* 6:153. doi: 10.3389/fcvm.2019.00153

MEMON, A. A., B. ZOLLER, A. HEDELIUS, X. WANG, E. STENMAN, J. SUNDQUIST and K. SUNDQUIST 2017. Quantification of mitochondrial DNA copy number in suspected cancer patients by a well optimized ddPCR method. *Biomol Detect Quantif* 13: 32-39

NASS, S. (1969). The significance of the structural and functional similarities of bacteria and mitochondria. *Int Rev Cytol* 25: 55-129

NICHOLLS, T. J. and M. MINCZUK 2014. In D-loop: 40 years of mitochondrial 7S DNA. *Exp Gerontol* 56: 175-181

RAINER, T. H., L. K. WONG, W. LAM, E. YUEN, N. Y. LAM, C. METREWELI and Y. D. LO 2003. "Prognostic use of circulating plasma nucleic acid concentrations in patients with acute stroke." *Clinical Chemistry* 49(4): 562-569

RHODES A., WORT S., THOMAS H., COLLINSON P., BENNETT E. 2006. Plasma DNA concentration as a predictor of mortality and sepsis in critically ill patients. *Critical care* 10: R 60

RICHARDSON JL., SHIVDASANI RA., BOERS C., HARTWIG JH., ITALIANO JE. (2005), Jr Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production. *Blood*. 2005;106(13):4066–4075.

SAGAN, L. (1967). On the origin of mitosing cells. *J Theor Biol* 14(3): 255-274.

SAUKKONEN, K., P. LAKKISTO, V. PETTILA, M. VARPULA, S. KARLSSON, E. RUOKONEN, K. PULKKI. Finnsepsis Study 2008. Cell-free plasma DNA as a predictor of outcome in severe sepsis and septic shock. *Clin Chem* 54(6): 1000-1007

SEIDEL S., VENDRUSCOLO C., MOREIRA J., FÜLBER J., OTTAIANO T., OLIVA M., MICHELACCI Y., BACCARIN R. (2019) Does Double Centrifugation Lead to Premature Platelet Aggregation and Decreased TGF-beta1 Concentrations in Equine Platelet-Rich Plasma? *Vet. Sci.* 2019, 6, 68; doi:10.3390/vetsci6030068

SHOCKETT, P. E., J. KHANAL, A. SITLAULA, C. OGLESBY, W. A. MEACHUM, V. D. CASTRACANE and R. R. KRAEMER 2016. Plasma cell-free mitochondrial DNA declines in response to prolonged moderate aerobic exercise. *Physiol Rep* 4(1)

SÖDERSTRÖM AC., NYBO M., NIELSEN C., VINHOLT PJ. (2016) The effect of centrifugation speed and time on pre-analytical platelet activation. *Clin Chem Lab Med.* 2016 Dec 1;54(12):1913-1920. doi: 10.1515/cclm-2016-0079.

SOUTHERN E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* 1975 Nov 5;98(3):503-17

STAWSKI, R., K. WALCZAK, P. KOSIELSKI, P. MEISSNER, T. BUDLEWSKI, G. PADULA and D. NOWAK 2017. Repeated bouts of exhaustive exercise increase circulating cell free nuclear and mitochondrial DNA without development of tolerance in healthy men. *PLoS One* 12(5):e0178216.

SURMIAK, M. P., M. HUBALEWSKA-MAZGAJ, K. WAWRZYCKA-ADAMCZYK, W. SZCZEKLIK, J. MUSIAL and M. SANAK 2015. Circulating mitochondrial DNA in serum of patients with granulomatosis with polyangiitis. *Clin Exp Immunol* 181(1): 150-155

SWARUP, V., & RAJESWARI, M. R. 2007. Circulating (cell-free) nucleic acids-a promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases. *FEBS Letters*, 581(5), 795-799

TAN, E. M., SCHUR, P. H., CARR, R. I. & KUNKEL, H. G. 1966. Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of clinical investigation*, 45, 1732-40

TUG, S., HELMIG, S., MENKE, J., ZAHN, D., KUBIAK, T., SCHWARTING, A. & SIMON, P. 2014. Correlation between cell free DNA levels and medical evaluation of disease progression in systemic lupus erythematosus patients. *Cellular immunology*, 292, 32-9.

TUG, S., HELMIG, S., DEICHMANN, E. R., SCHMEIER-JURCHOTT, A., WAGNER, E., ZIMMERMANN, T., RADSAK, M., GIACCA, M. & SIMON, P. 2015. Exercise-induced increases in cell free DNA in human plasma originate predominantly from cells of the haematopoietic lineage. *Exercise immunology review*, 21, 164-73

TUG, S., MEHDORN, M., HELMIG, S., BREITBACH, S., EHLERT, T. & SIMON, P. 2016. Exploring the Potential of cfDNA Measurements After an Exhaustive Cycle Ergometer Test as a Marker for Performance Related Parameters. *Int J Sports Physiol Perform*, 1-24

VALLEE, A., MARCQ, M., BIZIEUX, A., KOURI, C. E., LACROIX, H., BENNOUNA, J., DOUILLARD, J. Y. & DENIS, M. G. 2013. Plasma is a better source of tumor-derived circulating cell-free DNA than serum for the detection of EGFR alterations in lung tumor patients. *Lung cancer*, 82, 373-4.

WALLACE, L. K., SLATTERY, K. M., & OUTIS, A. J. 2008. The Ecological Validity and Application of the Session-RPE Method for Quantifying Training Loads in Swimming. *Journal of Strength and Conditioning Research*

WANG, L., XIE, Q., ZHANG, X., CAI, Y., TANG, L., WANG, T., HANG, J., LIU and J. GONG 2015. Plasma nuclear and mitochondrial DNA levels in acute myocardial infarction patients. *Coron Artery Dis* 26(4): 296-300.

ZHANG, Q., ITAGAKI and C. J. HAUSER 2010. Mitochondrial DNA is released by shock and activates neutrophils via p38 map kinase. *Shock* 34(1): 55-59

ZHANG, R., K. NAKAHIRA, X. GUO, A. M. CHOI and Z. GU 2016. Very Short Mitochondrial DNA Fragments and Heteroplasmy in Human Plasma. *Sci Rep* 6: 36097

Danksagung

Für die freundliche Betreuung meiner Dissertation möchte ich allen voran und danken, die mir bei Fragen und Schwierigkeiten immer mit hilfreichen und anregenden Ideen zur Seite standen.

Für die sehr gute Beaufsichtigung meiner Tätigkeit im Labor geht mein Dank an , der mit mir die einzelnen Versuchsschritte geplant und besprochen hat und mir bei der Auswertung der Ergebnisse zur Seite stand.

Weiterhin danke ich meinen Freunden aus der Laufgruppe für ihre Bereitwilligkeit an den Laufband-Tests teilzunehmen, insbesondere

Hervorzuheben ist auch die unproblematische Kooperation mit der Laboratoriumsmedizin Mainz unter der Leitung von Herrn

Zuletzt möchte ich meinen Eltern und meiner Partnerin für die Unterstützung gerade am Ende meiner Promotionszeit danken, ohne ihre Unterstützung wäre die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Lebenslauf

Tim Könnel

geboren am 10. Oktober 1994 in Rodalben



Medizinische Ausbildung und Bildung:

- 10/2013 - 12/2019 **Studium der Humanmedizin** an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
11/2019 mündliches Staatsexamen M3, Note: 1
10/2018 schriftliches Staatsexamen M2, Note: 1
09/2015 Physikumsprüfung M1, Note: 1,5
- 10/2015 - laufend **Dissertationsschrift** „Direktmessung mitochondrialer DNA im Plasma mittels qPCR - korrekte Probenverarbeitung und Durchführung eines Belastungstests“. Prof. Dr. Dr. Perikles Simon
Sportmedizin, Prävention und Rehabilitation, JGU Mainz
- 03/2013 **Abitur** am Hohenstaufen-Gymnasium Kaiserslautern, Note: 1,0

Klinische Erfahrung und berufliche Tätigkeit:

- ab 02/2020 **Assistenzarzt** an der HNO-Klinik des Klinikum der Stadt Ludwigshafen
- 07/2019 - 10/2019 **PJ Tertial Chirurgie**. Klinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie, Westpfalz-Klinikum Kaiserslautern, Prof. Dr. Dahm
- 03/2019 - 06/2019 **PJ Tertial Innere Medizin**. Klinik für Innere Medizin 1 und 2 Westpfalz-Klinikum Kaiserslautern, Prof. Dr. Held und Prof. Dr. Schumacher
- 11/2018 - 03/2019 **PJ Tertial HNO**. Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Westpfalz-Klinikum Kaiserslautern, Prof. Dr. Stasche

Famulaturen: Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Westpfalz-Klinikum Kaiserslautern
HNO Praxis Dr. Björn Göpel, Kaiserslautern
Klinik für Innere Medizin 2, Westpfalz-Klinikum Kaiserslautern
Hausärztliche BAG, Waldfishbach-Burgalben

10/2015 - 02/2016 Hilfswissenschaftler Institut für Physiologie und Pathophysiologie,
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Stipendium und Preise:

Studienstiftung des Deutschen Volkes seit 12/2013

Preis des Landes Rheinland-Pfalz für das beste Abitur

Preis der Gesellschaft Deutscher Chemiker für das beste Abitur im Fach Chemie

Preis des Deutschen Altphilologenverbandes für das beste Abitur im Fach Latein

Sprachkenntnisse:

Deutsch (Muttersprache)

Englisch (verhandlungssicher)

Großes Latinum

Außeruniversitäres Engagement und Interessen:

Langstreckenlauf beim TuS 06 Heltersberg

 Deutscher Mannschaftsmeister Berglauf 2016

 3x Rheinland-Pfalz-Meister (5000m, Crosslauf)

 7x Pfalzmeister (1500m, 5000m, 10 km Straße, Crosslauf)

Trainer der Leistungsgruppe des TuS 06 Heltersberg

klassische Klavier-Ausbildung