

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Patienten und Patientenproben

*TEL-AML1*-Spleißvarianten und MRD-Messungen wurden an RNA-Proben von Kindern, die an einer *TEL-AML1* positiven B-Vorläuferzell ALL bzw. an einem *TEL-AML1* positiven ALL-Rezidiv erkrankt waren, untersucht. Das Vorhandensein des *TEL-AML1*-Fusionstranskripts war bereits vor Beginn der Untersuchung mittels RT-PCR nachgewiesen worden.

Das Patientenmaterial kam aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie/Hämatologie der Charité, Campus Virchow Klinikum sowie aus Kliniken, die an der multizentrischen Therapieoptimierungsstudie für ALL-Rezidive im Kindesalter (ALL-REZ BFM, Berlin-Frankfurt-Münster) teilnehmen. Von allen Patienten bzw. deren Erziehungsberechtigten lag eine schriftliche Einwilligung zur Durchführung der therapiebegleitenden molekulargenetischen Untersuchungen vor.

Die untersuchten Knochenmarksproben stammen aus den Jahren 1995-2001 und waren bis zum Zeitpunkt der Untersuchung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

##### 3.1.1 *TEL-AML1*-Spleißvarianten-Untersuchung

Es wurden Knochenmarksproben von 25 Kindern untersucht, von denen acht eine ALL-Ersterkrankung und 17 ein ALL-Rezidiv hatten. Die Knochenmarksproben wurden nur verwendet, wenn sie zum Diagnosezeitpunkt der Ersterkrankung oder des Rezidivs gewonnen worden waren und sofern der Blastenanteil im Knochenmark vor Ficollisierung über 70% lag.

##### 3.1.2 MRD-Untersuchung

MRD-Untersuchungen wurden an 96 RNA-Proben von 31 Kindern, die an einem *TEL-AML1* positiven ALL-Rezidiv erkrankt waren, durchgeführt. Verwendet wurden Knochenmarkspunktate, die zum Diagnosezeitpunkt des Rezidivs gewonnen worden waren, sowie drei Wochen (vor dem zweiten Rezidivtherapie-Block F2), sechs Wochen (vor dem dritten Rezidivtherapie-Block R1) oder neun Wochen (vor dem vierten Rezidivtherapie-Block R2) nach Therapiebeginn. Es wurden nur Patienten in die Studie aufgenommen, von denen außer dem Diagnosematerial noch mindestens eine Probe vorlag, die zu einem anderen Zeitpunkt gewonnen worden war.

### 3.2 Statistische Auswertung

Die klinische Bedeutung der Translokation t(12;21) bei Rezidiven einer akuten lymphoblastischen Leukämie wurde mit SPSS (SPSS Inc., Chicago, USA), Version 10.0.7 für Windows, analysiert. Die statistischen Verfahren schließen den Mann-Whitney U-Test, Fisher's Exakt Test und Pearsons Chi Quadrat Test ein. Es wurde zweiseitig getestet. Die Beobachtungszeit wurde definiert als Zeitraum vom Tag der Rezidivdiagnose bis zum Zeitpunkt eines eventuellen Folgeereignisses (Rezidiv, Tod) oder bis zum Ende des für diese Arbeit festgelegten Untersuchungszeitraums. Der mittlere Beobachtungszeitraum betrug im Gesamtkollektiv der Patienten mit erstem Rezidiv 27 Monate. Die Analysen des Gesamtüberlebens und des ereignisfreien Überlebens (EFS) erfolgten nach der Methode von Kaplan-Meier. Die Signifikanz wurde dabei mit dem log Rank Test bestimmt.

Die Überlebenszeit wurde vom Tag der Diagnose bis zum Tag der letzten Datenerhebung bzw. des Todes errechnet. EFS wurde definiert als die Zeitspanne vom Beginn der zweiten kompletten Remission bis zum Auftreten eines Ereignisses (Rezidiv, Tod, KMT) oder bis zum Tag der letzten Datenerhebung. Wurde keine zweite komplette Remission erreicht oder starb das Kind während der Induktionstherapie wurde das EFS mit dem Wert 0 berechnet. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde auf  $\alpha=0,05$  und somit das Signifikanzniveau auf  $p<0,05$  festgelegt.

### 3.3 Materialien

#### Chemikalien

Merck KGaA, Darmstadt	Ethidiumbromid, 1% Lösung in Wasser Harnstoff
BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, ME USA	SeaKem® LE Agarose
Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden	Sephadex™ G-50 Fine DNA-Grade
Sigma, St. Louis, MO, USA	Dimethyl Sulfoxid (DMSO; 99,5%) BSA(10µg/µl)
Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe	Dithiothreitol (DTT) MgCl (50mM)
Perkin Elmer, Applied Biosystems GmbH, Weierstadt	MgCl (25mM)

Nukleinsäuren

TIB Molbiol, Berlin	Oligonukleotide (Primer) Hydrolisierungssonde	
Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe	1 Kb DNA Ladder dNTP (Deoxynukleosidtriphosphate) Mix; je 2 mM	
Roche Molecular Biochemicals, Mannheim de (50 mM)		Hexanukleoti-

Enzyme

Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe	SuperScript II RT (200U/μl) Platinum DNA Taq-Polymerase (5U/μl)	
Roche Molecular Biochemicals, Mannheim	Expand 20 kb <sup>Plus</sup> Enzymmix	

Puffer und Lösungen

Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe	First Strand Buffer (5 × konz.) Taq Puffer (10× konz.) Taq-Puffer (10× konz.) minus Mg	
Roche Molecular Biochemicals, Mannheim	5× Expand 20 kb <sup>Plus</sup> Puffer	
hergestellte Puffer	Tris-Puffer : 1 M Tris/HCl, pH 7,5 TE-Puffer, pH 8 : 10 mM Tris, 1 mM EDTA Elektrophorese-Puffer: 1x TBE; pH 8 90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA Gelladepuffer: OrangeG 20% Ficoll, 10 mM Tris 1 mg/ml OrangeG	

Seromed® Biochrom KG, Berlin

Ficoll, Dichte: 1,077 g/ml

RPMI 1640 Medium (ad: 10% FKS, 2 mM Glutamin, 20 mM Hepes, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, alle ebenfalls von Seromed® Biochrom KG, Berlin)

Fötale Bovines Serum (FBS)

Phosphate Buffered Saline (PBS) ohne Calcium und Magnesium

Kit zur RNA-Isolierung

Quiagen GmbH, Hilden

RNeasy-Kit™

Kit zur Aufreinigung der PCR-Produkte

Quiagen GmbH, Hilden

Quiaquick Gel Extraction Kit 250

Kit zur Aufreinigung der Plasmid-DNA

Quiagen GmbH, Hilden

Quiaprep Miniprep Kit

Klonierungs-Kit

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

TOPO TA Cloning® Kit pCRII

Sequenzier-Kit

Perkin Elmer, Applied Biosystems GmbH, Weierstadt

ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit

Filme

Polaroid Co., Cambridge, USA

Typ 667

### Geräte

MJ Research Inc. Watertown, MA, USA	Peltier Thermal Cyclers, PTC-200
Perkin Elmer, Applied Biosystems GmbH, Weierstadt	Gene Amp PCR System 9700
	ABI Prism 377 Sequencer
Polaroid Co, Cambridge, USA	CU-5 Nahaufnahme-Kamera
BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA	Wide Mini Sub Cell (Agarosegelelektrophoresekammer)
Roche Molecular Biochemicals, Mannheim	LightCycler

## **3.4 Molekularbiologische Arbeitstechniken**

### **3.4.1 Zelllinie**

Zur Etablierung der *long-distance* PCR und als Positivkontrolle diente RNA der Zelllinie REH, einer humanen prä-B-Zell-Leukämie, die das *TEL-AML1*-Fusionsgen exprimiert. Die Zelllinie wurde bei einer Temperatur von 37° C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% in RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 Medium mit Zusatz von 10 % FBS (Fetales Bovines Serum) kultiviert.

### **3.4.2 RNA-Isolierung**

Die mononukleären Zellen aus den Patientenproben wurden mit der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Anschließend wurde die RNA von ca.  $1 \times 10^7$  Zellen mit dem RNeasy-Kit extrahiert und entweder sofort in cDNA umgeschrieben oder bei – 80° C gelagert.

### 3.4.3 Reverse Transkription

Um zur RNA komplementäre DNA (cDNA) zu gewinnen, wird eine Reverse Transkription in folgendem Reaktionsansatz durchgeführt:

5 µl	RNA
4 µl	First Strand Buffer (5 × konz.)
5 µl	dNTP-Mix (2 mM)
2 µl	Hexanucleotide (50 mM)
1 µl	DTT (100 mM)
1 µl	SuperScript II RT
2 µl	H <sub>2</sub> O

Reaktionsbedingungen: 45 min 37°C  
5 min 94°C

### 3.4.4 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion erlaubt eine spezifische *in vitro* Vermehrung beliebiger DNA-Abschnitte durch Nachahmung der DNA-Replikation *in vivo*.

Für diese Reaktion werden die folgenden Komponenten benötigt: Einzelsträngige DNA, Primer (Oligonukleotide, die komplementär zu den Enden der DNA-Sequenz sind, die amplifiziert werden soll), Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs) und eine DNA-Polymerase.

Zunächst wird der DNA-Doppelstrang durch Erhitzen auf ca. 92-94°C in Einzelstränge zerlegt (Denaturierung). Dann kommt es bei gesenkter Temperatur zur Hybridisierung der Primer (*annealing*). Von diesen ausgehend werden nun in einem dritten Schritt komplementäre DNA-Stränge synthetisiert (Elongation). Die Verwendung von zwei unterschiedlichen Primern, die jeweils an einem der beiden komplementären DNA-Stränge binden, führt dazu, dass jeder neu synthetisierte DNA-Strang eine Bindungsstelle für den jeweils anderen Primer enthält. Auf diese Weise dient jeder neue DNA-Strang als Vorlage zur weiteren Vermehrung im nächsten Zyklus. Während 30-40facher Wiederholung dieser Reaktionsfolge kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung des DNA-

Fragments, das zwischen den Primern liegt und dessen Länge genau dem Abstand der 5'-Enden der Primer entspricht.

Die Verwendung der hitzestabilen DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus*, die während der Denaturierungsphase nicht zerstört wird, ermöglicht eine automatisierte Abfolge der drei Temperaturschritte.

#### 3.4.4.1 long-distance PCR

Als *long-distance* PCR bezeichnet man einen PCR-Ansatz, in dem besonders lange PCR Fragmente amplifiziert werden können. Dies wird durch die Verwendung von speziell optimierten Enzymmischungen möglich. Weitere wichtige Parameter sind verbesserte Pufferbedingungen, wie zum Beispiel ein höherer pH-Wert, kurze Denaturierungszeiten mit möglichst niedrigen Denaturierungstemperaturen, um DNA-Schäden zu vermeiden, längere Elongationszeiten bei niedriger Elongationstemperatur sowie ein sorgfältiges Primerdesign.

Um zu verhindern, dass das hierbei verwendete Enzymgemisch, insbesondere die 5'-Exonuclease-Aktivität der Pwo DNA Polymerase, in Abwesenheit von dNTPs zu einem Abbau der Primer und der DNA führt, werden zunächst zwei separate Reaktionsgemische auf Eis pipettiert und diese erst kurz vor dem Start im Verhältnis 1:1 zusammen gemischt.

Tabelle 2: Primersequenzen zur Amplifikation des *TEL-AML1*-Fusionsgens

<b>Primer</b>	<b>Sequenz</b>
TEL 2 <i>up</i> :	5'-CCT GAT CTC TCT CGC TGT GA-3'
TEL 16 <i>up</i> :	5'-CTG TGA GAC ATG TCT GAG ACT-3'
AML 1020 <i>down</i> :	5'-TGA TGG CTC TGT GGT AGG-3'
AML 1870 <i>down</i> :	5'-CCT CAG TAG GGC CTC CAC A-3'
AML 1880 <i>down</i> :	5'-AGGCCT GGC GCC TCA GTA G-3'
AML 1954 <i>down</i> :	5'-CCG GCG GGC TTG TCG CGA AC-3'
T2-A5 <i>down</i> :	5'-GAGTGAAGCTTTTCCGCA-3'

Tabelle 3: *long-distance* PCR - Reaktionsansatz von 30  $\mu$ l

Mastermix 1		Mastermix 2	
2 $\mu$ l	cDNA	0,3 $\mu$ l	Expand 20 kb <sup>Plus</sup> Enzymgemisch
8,4 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O	6 $\mu$ l	5 $\times$ Expand 20 kb <sup>Plus</sup> Puffer
0,6 $\mu$ l	dNTP Mix (25 mM)	0,3 $\mu$ l	DMSO
2 $\mu$ l	<i>upstream</i> Primer (10 $\mu$ M)	2,1 $\mu$ l	MgCl (25 mM)
2 $\mu$ l	<i>downstream</i> Primer (10 $\mu$ M)	6,3 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O

Tabelle 4: *long-distance* PCR – Reaktionsbedingungen

Schritt	Temperatur	Zeit
initiale Denaturierung	94°C	3 min
<b>Zyklus 1 bis 10</b>		
Annealing	64°C, -0,4°C/Zyklus	30 sec
Elongation	72°C	4 min
Denaturierung	96°C	60 sec
<b>Zyklus 11 bis 40</b>		
Annealing	60°C	30 sec
Elongation	72°C, +5s/Zyklus	4 min
Denaturierung	96°C	60 sec
<b>Abschließend</b>		
Annealing	60°C	45 sec
Elongation	72°C	15 min

### 3.4.4.2 Quantitative *real-time* PCR

Bei der *real-time* PCR wird die Vermehrung des PCR-Produktes durch Fluoreszenzmessung direkt während der Amplifikation analysiert. Der Reaktionsansatz wird hierzu in optisch klare Glaskapillaren pipettiert, die gleichzeitig als Küvette dienen. Da diese Kapillaren eine im Verhältnis zu ihrem Volumen große Oberfläche haben, ist es außerdem möglich, die Zeiten für Denaturierung, Annealing und Elongation zu verkürzen, so dass ein Zyklus weniger als eine Minute dauert. Eine Automatisierung dieser „*rapid-cycle*“-PCR mit gleichzeitiger Fluoreszenzmessung ermöglicht der LightCycler.

Zur Detektion der PCR-Amplifikation wird eine Hydrolysierungssonde eingesetzt, die aus einem doppelt fluoreszenzmarkierten Oligonukleotid besteht. Diese bindet sequenzspezifisch an das PCR-Produkt und wird in jedem Amplifikationszyklus durch die 5'-Exonuclease-Aktivität der Taq-Polymerase hydrolysiert. Bei der noch intakten Sonde wird die Fluoreszenz des Fluorochroms am 5'-Ende der Sonde (Reporter) von dem Fluorochrom am 3'-Ende (Quencher) durch Energieübertragung (*fluorescence resonance energy transfer*, FRET) unterdrückt. Die Aufhebung der räumlichen Nähe der beiden Fluorochrome aufgrund der Hydrolysierung führt dann zu einer Zunahme der Fluoreszenz des Reporters, und zwar proportional zur Menge des PCR-Produkts.

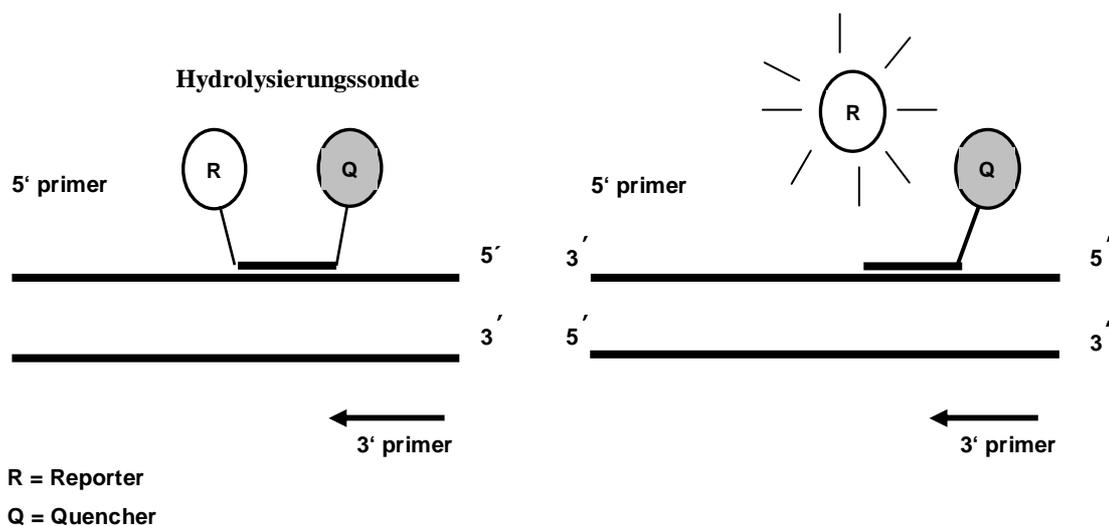


Abbildung 6: Funktionsprinzip der Hydrolysierungssonde.

Links: Die Sonde bindet sequenzspezifisch an das PCR-Produkt, die Fluoreszenz des Reporter-Fluorochroms wird durch das Quencher-Fluorochrom unterdrückt.

Rechts: Die Sonde wird durch die Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase hydrolysiert, dadurch findet keine Energieübertragung vom Reporter zum Quencher mehr statt und es kommt zur Zunahme der Fluoreszenz des Reporters.

Der LightCycler stellt die gemessene Fluoreszenz am Monitor graphisch dar und die hierbei entstehende Kurve zeigt typischerweise drei Abschnitte. In der ersten Phase ist das Hintergrundsignal des Systems noch größer als das Signal des eingesetzten Fluorochroms. Sobald dann aber genug PCR-Produkt gebildet bzw. Sonde hydrolysiert wurde, beginnt die exponentielle Phase mit rascher Zunahme der Fluoreszenz. Sie endet mit der Plateauphase, wenn die Reaktion zum Stillstand kommt.

Die initiale Kopienzahl des untersuchten Gens wird anhand einer Standardkurve berechnet. Um diese zu erstellen wird *TEL-AML1*-Plasmid-DNA über vier Stufen ( $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  Kopien/ $\mu$ l) in TE-Puffer verdünnt und quantifiziert.

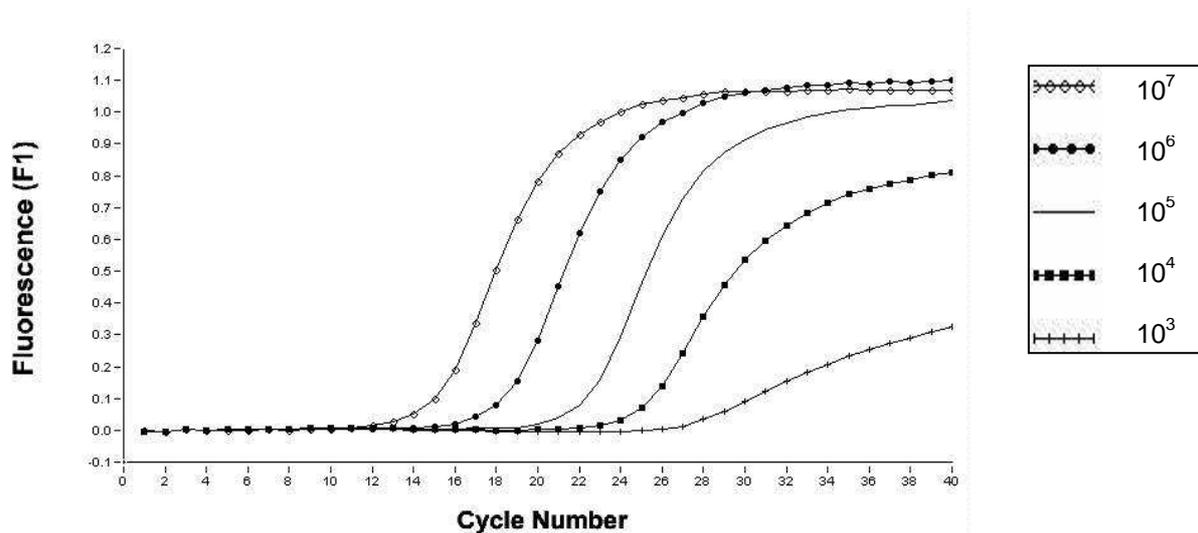


Abbildung 7: *real-time* Fluoreszenzkurven von *TEL-AML1*-Plasmid-DNA in fünf Verdünnungsstufen ( $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  Kopien/ $\mu$ l). Auf der x-Achse wird die Anzahl der PCR-Zyklen und auf der y-Achse die relative Zunahme der Fluoreszenz im Laufe der PCR dargestellt.

Abbildung 7 zeigt die *real-time* Fluoreszenzkurven der Standardverdünnungsreihe. Für die Quantifizierung wird nun von jeder Kurve der „*crossing point*“ ( $C_p$ ) bestimmt. Dieser ist definiert als die Anzahl von PCR-Zyklen, bei der die Fluoreszenz, die bei Hydrolyse der Sonde erzeugt wird, eine festgesetzte Schwelle überschreitet. Diese Schwelle sollte so gewählt werden, dass sie oberhalb der Grundlinie und im Bereich des exponentiellen Anstiegs der Kurven liegt. Der  $C_p$ -Wert ist umgekehrt proportional zur Ausgangsmenge

an DNA. Er wird gegen den Logarithmus der ursprünglichen Konzentration der Probe aufgetragen und die so entstehende Standardkurve hat die Gleichung:

$$C_p = -\left(\frac{1}{\log E}\right) \times \log T_0 + \left(\frac{\log K}{\log E}\right)$$

wobei  $T_0$  die initiale Konzentration der Probe,  $K$  die Kopienanzahl des PCR-Produkts am *crossing point* und  $E$  die Effizienz der Reaktion ist.

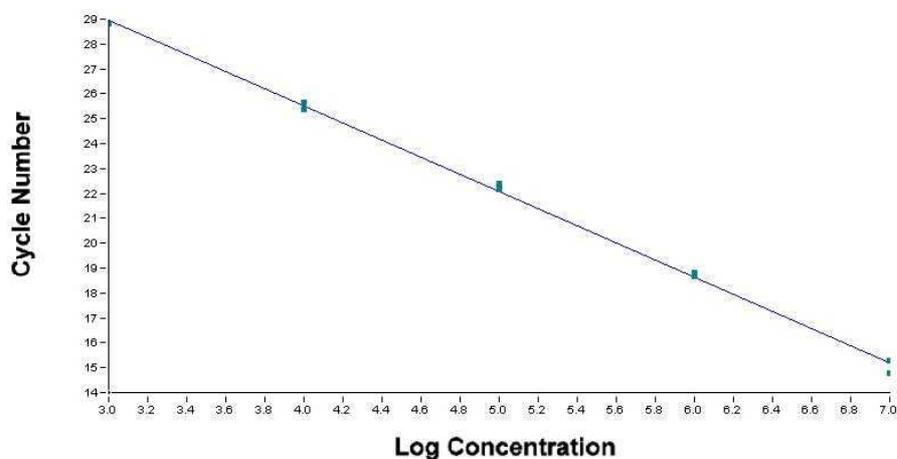


Abbildung 8: *real-time* Fluoreszenzkurven von *TEL-AML1*-Plasmid-DNA in fünf Verdünnungsstufen. Anhand der Daten aus Abbildung 3.2 (*real-time* Fluoreszenzkurven von *TEL-AML1*-Plasmid-DNA in fünf Verdünnungsstufen) berechnete Standardkurve: Auf der y-Achse wird die Anzahl der PCR-Zyklen am „*crossing-point*“ ( $C_p$ ) und auf der x-Achse der Logarithmus der ursprünglichen Konzentration der Probe dargestellt.

Da die Effizienz der Amplifikation von Lauf zu Lauf variieren kann, wird bei jedem Versuch eine Verdünnungsreihe mitgemessen. Ebenfalls mitbestimmt wird von jeder cDNA in einer parallelen PCR ein Referenzgen, nämlich *β2-Mikroglobulin*. So können die gemessenen Werte der untersuchten Gene normalisiert und ein Einfluß durch Menge und Qualität der eingesetzten cDNA weitgehend kompensiert werden. Von allen Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und daraus der Mittelwert, sowie die Standardabweichung berechnet.

Tabelle 5: Primer- und Sondensequenzen für die quantitative *real-time* PCR des *TEL-AML1*-Fusionsgens und von  $\beta 2$ -Mikroglobulin

<b>Primer</b>	<b>Sequenz</b>
TEL-C:	5' – AAG CCC ATC AAC CTC TCT CAT C – 3'
AML1-D:	5' – TGG AAG GCG GCG TGA AGC – 3'
$\beta 2$ M-up:	5'-GAG TAT GCC TGC CGT GTG-3'
$\beta 2$ M-do:	5'-AAT CCA AAT GCG GCA TCT-3'
<b>Sonden</b>	
TM-TELAM:	5'-6FAM-tctccccgcctgaagagcacgccca-(TAMRA-dT)ph
TM- $\beta 2$ M:	5'-6FAM-cctccatgatgctgcttacatgtctc-Dabcyl

6FAM: 6-[Carboxy-Fluorescein] = Reporter; TAMRA: Tetramethylrhodamin = Quencher;

Dabcyl:4-[4-Dimethylamino-phenylazo-]benzoic acid = Quencher

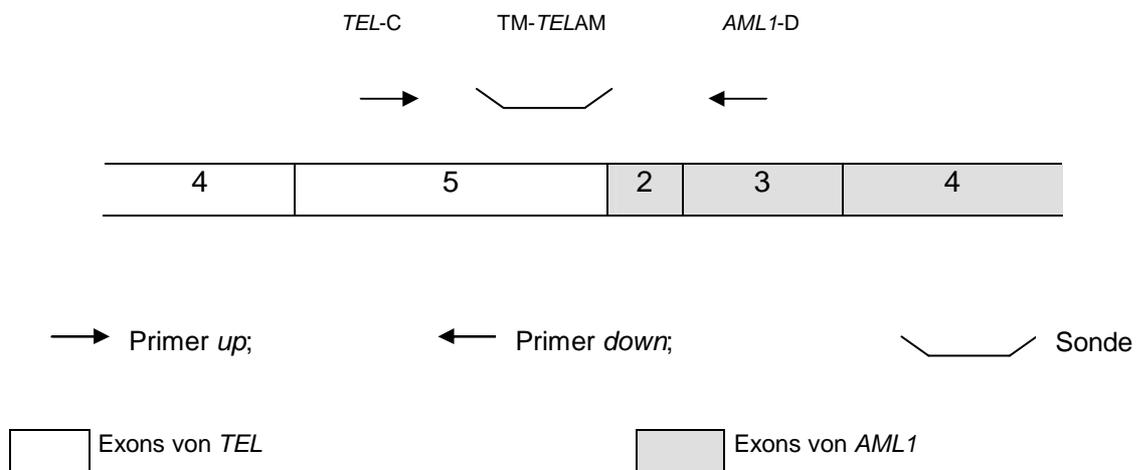


Abbildung 9: Lage der *TEL-AML1*-Primer und der Sonde für die quantitative *real-time* PCR

Die Sonden sind HPLC (*high performance liquid chromatography*)- gereinigt, die Primer durch HPLC oder Gelfiltration.

Tabelle 6: PCR-Reaktionsansatz zur quantitativen *real-time* PCR

---

3 µl	CDNA
2 µl	Taq-Puffer (10× konz.)
4µl	dNTP-Mix (2mM)
<i>TEL-AML1</i> PCR: 1,5 µl	MgCl (50 mM)
<i>β2M</i> PCR : 3 µl	
0,5 µM	Primer <i>upstream</i>
0,5 µM	Primer <i>downstream</i>
0,2 µl	Hydrolysierungssonde (10 µM)
0,3 µl	BSA(10µg/µl)
0,2 µl	Platinum DNA Taq-Polymerase (5U/µl)
ad 20 µl	H <sub>2</sub> O

Tabelle 7: PCR-Bedingungen für die quantitative *real-time* PCR

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>
initiale Denaturierung	95°C	10 sec
<b>45 Zyklen</b>		
Denaturierung	95°C	2 sec
Annealing	63°C	15 sec
Elongation	72°C	15 sec

### 3.4.5 Agarosegelelektrophorese

Die Produkte aus der *long-distance* PCR wurden mit 1/3 Volumen eines Gelladepuffers (Orange G) versetzt und in die Taschen eines 1%igen, mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegels einpipettiert. Parallel dazu wurde ein DNA-Längenstandard aufgetragen, der die Größenordnung der im Gel aufgetrennten Fragmente erlaubt. Durch Anlegen einer Spannung von 100-120 Volt über ca. 45 Minuten erfolgte eine unterschiedlich schnelle Wanderung der DNA-Moleküle durch das Gel, und zwar entsprechend ihrer Größe und ihrer Ladung. Anschließend wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und die Ergebnisse mit einer Polaroidkamera dokumentiert.

### 3.4.6 Gewinnung von *TEL-AML1*-Plasmid-DNA

### 3.4.6.1 Gewinnung der zu klonierenden DNA-Sequenz

Um für die Klonierung *TEL-AML1*-cDNA zu gewinnen, wird eine RT-PCR mit REH-mRNA und folgenden Primern durchgeführt:

TEL ext *up*: 5' – GCT GAG AGA GCT CAG GGA CC – 3'

AML 931 *down*: 5' – AAT CCA AAT CGC CGA TCT – 3'

### 3.4.6.2 Durchführung der Klonierung

Plasmide sind im Zytoplasma von Bakterien vorkommende ringförmige DNA-Moleküle, die bei der Vermehrung des Bakteriums genau wie die chromosomale DNA repliziert werden. Durch Einfügen eines bestimmten DNA-Abschnittes in das Plasmid (Insertion) und anschließendes Einbringen (Transfektion) des Plasmids in kompetente Bakterienstämme, kann die gewählte DNA-Sequenz repliziert werden.

Mit Hilfe des TOPO TA Cloning® Kits pCRII können PCR-Produkte, die mit einer Taq-Polymerase amplifiziert wurden, in das Plasmid inseriert werden. Die Taq-Polymerase hängt an das 3'-Ende eines jeden PCR-Produkts ein einzelnes Desoxyadenosin an. Der in diesem Kit verwendete Vektor hat entsprechend an seinem 3'-Ende einen Desoxythymidin-Überhang, so dass das PCR-Produkt in den offenen Vektor binden kann. Der Vektor enthält am 3'-Ende der Schnittstelle auch noch kovalent gebundene Topoisomerase. Diese Bindung kann vom 5'-Ende der Vektor-Schnittstelle angegriffen und die freiwerdende Energie zur Ligation des Vektors und des PCR-Produktes genutzt werden.

Die Bakterienkolonien werden doppelt selektioniert, je nachdem, ob sie das Plasmid aufgenommen haben und ob das Plasmid auch die zu klonierende DNA-Sequenz enthält. Um Sicherzustellen, dass sich nur diejenigen Wirtsbakterien vermehren, die das Plasmid enthalten, werden Plasmide verwendet, die dem Wirt Resistenz gegen Ampicillin und Kanamycin verleihen und die Bakterien dann in Gegenwart eines dieser Antibiotika inkubiert. Zusätzlich enthält der Vektor noch das *lacZ*-Gen, welches für die Synthese der  $\beta$ -Galaktosidase kodiert. Da die Insertionsstelle für das zu klonierende DNA-Produkt genau zwischen dem *lacZ*-Promotor und dem *lacZ*-Gen liegt, können Bakterien, die einen Vektor mit dem inserierten DNA-Abschnitt enthalten, keine  $\beta$ -Galaktosidase produzieren.  $\beta$ -Galaktosidase hydrolysiert Brom-4-Chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid (X-gal) und führt so bei Zugabe von X-gal zu einer Blaufärbung der Bakteri-

enkolonien. Kolonien, die keine  $\beta$ -Galaktosidase enthalten, bleiben weiß. Dies ermöglicht es, Bakterienkolonien mit einem leeren Vektor von solchen zu unterscheiden, deren Vektor die zu klonierende DNA-Sequenz enthält.

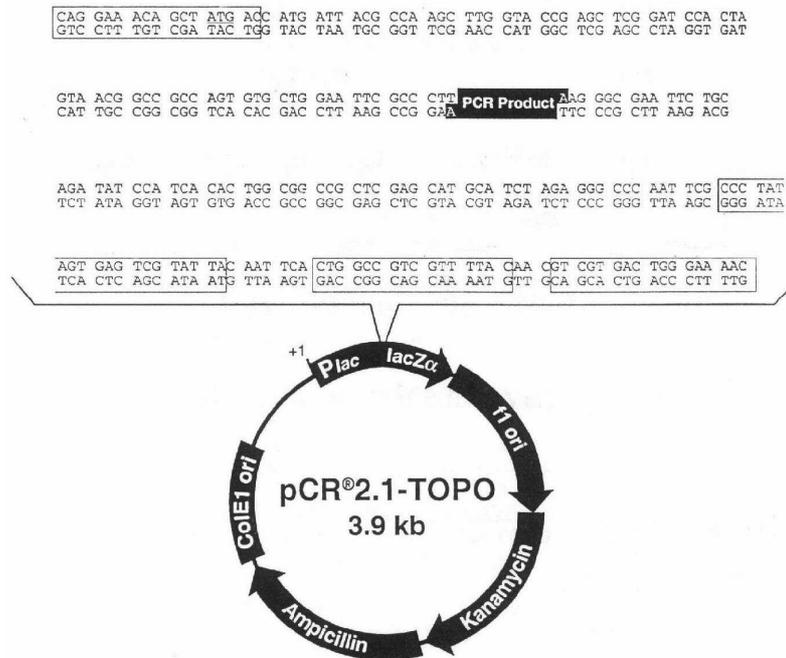


Abbildung 10: Schematische Darstellung des pCR<sup>R</sup>-Vektors mit Integrationsort für das eingefügte PCR-Produkt.<sup>52</sup>

Die Bakterienkolonien wurden über Nacht inkubiert, dann mit dem QIAGEN Miniprep Kit aufgereinigt und die gewonnene Plasmid-DNA anschließend sequenziert.

### 3.4.7 Sequenzierung

Zur Überprüfung der Primerspezifität und zur Identifizierung auf dem Agarosegel neu entdeckter Banden wurden die Produkte der *long-distance* PCR und die klonierten DNA-Sequenzen nach der Kettenabbruchmethode sequenziert.

Dazu wurden zunächst die Banden aus dem Agarosegel ausgeschnitten, mit dem Quiquick Gel Extraction Kit 250 aufgereinigt und dann in einer speziellen Sequenzier-PCR erneut amplifiziert. Das Besondere daran ist, dass außer den normalen Nukleosidtriphosphaten (dNTPs) auch Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) in kleinen Mengen hinzugefügt werden. Diesen fehlt eine Hydroxylgruppe an der 3'-Position der Desoxyribose und ihr Einbau anstelle des normalen Nukleosidtriphosphates führt zum Abbruch der Zweitstrangsynthese. Die so entstandenen Fragmente werden anschließend ihrer Größe nach in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Da die vier Didesoxynukleotidtriphosphate jeweils mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, können die Fragmente mit Hilfe eines Lasers sichtbar gemacht und so die Nukleotidsequenz abgelesen werden.

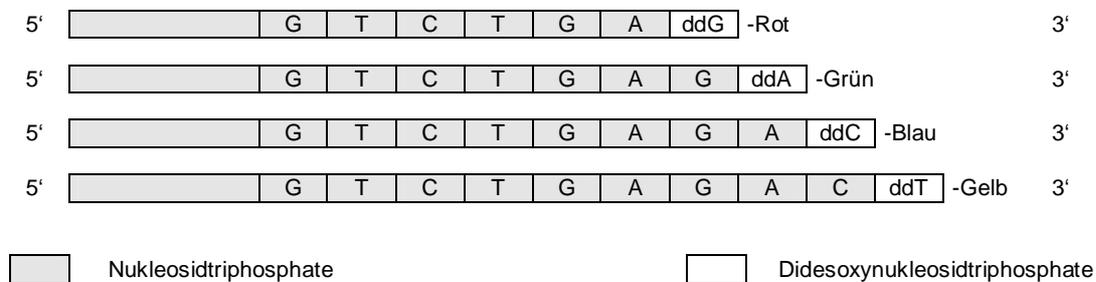


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Sequenzier-PCR

Bei Einbau eines Didesoxynukleosidtriphosphates kommt es zum Abbruch der Strangsynthese

Tabelle 8: Reaktionsansatz der Sequenzier-PCR

0,5-3 µl	cDNA (ca. 100 ng/µl)
2 µl	<i>sequencing premix</i> (ddNTPs, dNTPs, AmpliTaq DNA Polymerase, MgCl <sub>2</sub> , Tris-HCl-Puffer)
0,5 µl	Primer <i>upstream</i> oder <i>downstream</i>
ad 10 µl	H <sub>2</sub> O

Tabelle 9: Reaktionsbedingungen der Sequenzier-PCR

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>
initiale Denaturierung	96°C	1 min
<b>Zyklus 1 bis 28</b>		
Annealing	55°C	15 sec.
Elongation	60°C	4 min.
Denaturierung	96°C	30 sec.

Anschließend werden die Proben über Sephadex-Säulen aufgereinigt, um nicht eingebaute ddNTPs zu entfernen, und dann mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge lyophilisiert. So können sie entweder bei -20°C tiefgefroren oder sofort weiterverarbeitet werden. Dazu werden sie in 4 µl Ladepuffer (Formamid, EDTA, Blue Dextran) gelöst, bei 94°C für 2 min. denaturiert und bis zum Auftragen in das Gel auf Eis gestellt. Das Sequenziergel ist ein 5%iges denaturierendes Polyacrylamidgel mit Harnstoff, das nach Einbau in das Sequenziergerät (ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer) mit je 2 µl Probe pro Gelslot beladen wird.