

3. Material und Methoden

3.1. Hybridzellen

3.1.1. Somatische Zellhybride

Es wurde DNA von Zellen aus dem *Somatic Cell Hybrid Mapping Panel #1* vom HGMCR (*Human Genetic Mutant Cell Repository*) des NIGMS (*National Institute of General Medical Sciences*) verwendet. Dieses Panel besteht aus 18 somatischen Zellhybriden, die aus Zellen des Menschen und Nagetierzellen (Nr.1-17: Mensch/Maus; Nr.18: Mensch/Hamster) erzeugt wurden, wobei die ersten 15 Hybride (TAGGART et al., 1985; MOHANDAS et al., 1986) zwischen 5 und 19 Chromosomen des Menschen enthalten. Die Hybride 16, 17 und 18 sind demgegenüber monochromosomale Hybride und enthalten die Chromosomen X (Nr.16; DORMAN et al., 1978), 9 (Nr.18; WARBURTON et al., 1990) oder 16 (Nr.17; CALLEN, 1986). Die DNA-Nummern der einzelnen Zellhybride mit einer Auflistung der enthaltenen Chromosomen sind im Anhang in der Tabelle 9.1. auf der Seite 107 enthalten. Weitere Informationen sind im Internet unter der Adresse: <http://locus.umdj.edu/nigms/maps/map1.html> abrufbar. Für die chromosomale Kartierung des KPNA2-Gens wurden in einem 20 µl Reaktionsansatz 1 µl der Hybrid-DNA-Lösungen verwendet, was einer Menge von ca. 100 ng DNA pro Reaktion entspricht. Die Untersuchung erfolgte mittels PCR unter Verwendung des STS-Markers mit der Primerkombination: 1718-1738 und 1855-1834 (vgl. Tab. 3.5., S. 44) aus der untranslatierten 3'-Region der KPNA2-cDNA-Sequenz (*GenBank* Zugangsnummer: U28386). Die PCR-Produkte wurden nach Agarosegelaufreinigung mittels Ethidiumbromidfärbung detektiert.

3.1.2. Zellhybride mit chromosomalen Fragmenten

Es wurde DNA von 5 somatischen Zellhybriden verwendet, die nur die distale Region des langen Armes von Chromosom 17 enthalten. Genauere Angaben über Herkunft und enthaltene chromosomale Fragmente sind in der Tabelle 3.1. zusammengefaßt.

Tab. 3.1: Hybridzellpanel mit chromosomalen Fragmenten der Region 17q22-qter unter Angabe der genauen Bezeichnung, der enthaltenen Fragmente, der Herkunft und der Referenz

Name	UMHG-17/1	UMHG-17/2	UMHG-17/4b	UMHG-17/3	RL-III
Fragment	17q22- qter	17q22- qter	17q23.3- qter	17q24.1- qter	17q24- qter
Herkunft	University of Michigan Human Genome Center, Somatic Cell Genetics Laboratory (USA)				Freiburger Universität
Referenz	FLEJTER et al., (1993)				WAGNER et al., (1997)

3.2. Künstliche Hefechromosomen (YACs)

3.2.1. Auswahl, Herkunft und Untersuchung der Hefezellen mit YACs

Die verwendeten YACs stammen aus der *CEPH Human mega-YAC-Library* mit folgenden Eckdaten:

-Wirtsorganismus: *Saccharomyces cerevisiae* (Stamm: AB 1380)

-Vector: pYAC 4

Die benötigten Pools bzw. Klone wurden vom *Ressourcenzentrum des Deutschen Humanen Genomprojektes* am *Max Planck Institut für molekulare Genetik* und am *Deutschen Krebsforschungszentrum*, Berlin, bezogen. Die *CEPH Human mega-YAC-Library*, besteht aus 46 Hauptgruppen (*primary pools*) mit insgesamt 35712 Klonen, wobei die Hauptgruppen 1-45 je 768 Klone (8 Platten mit je 12 Spalten und 8 Reihen) repräsentieren und die Hauptgruppe 46 1056 Klone (12 Platten mit je 12 Spalten und 8 Reihen) umfaßt. Die Untersuchung der Bibliothek erfolgte in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurden die 46 Hauptgruppen untersucht. Für die positiven Hauptgruppen erfolgte im zweiten Schritt die PCR-Analyse von jeweils 29 Klongruppen (*secondary pools*) der einzelnen Platten (9 Plattengruppen mit je 96 Klonen), Reihen (8 Reihengruppen mit je 108 Klonen) und Spalten (12 Spaltengruppen mit je 72 Klonen).

Die wiederum positiven Platten-, Reihen- und Spaltengruppen ergaben die genaue Adresse der Klone, die das gesuchte DNA-Fragment enthalten. Die hierbei verwendete YAC-DNA wurde mittels Schnellpräparation unter Verwendung von Proteinase K (vgl. Kap. 3.2.3.1., S. 30) gewonnen. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte auf Agarosegelen und die Detektion unter Verwendung von Ethidiumbromid.

3.2.2. Anzuchtung der Hefezellen

Die Anzuchtung der Hefezellen erfolgte sowohl auf festen YPD-Nährböden als auch auf festen und in flüssigen SD-Medien (Tab. 3.2.). Dazu wurden die Zellen mittels Impföse auf bzw. in die Nährmedien verbracht und 36-48 Stunden bei 30 °C inkubiert. Die Inkubation der Flüssigkulturen, die ausschließlich mit einzelnen Kolonien beimpft wurden, erfolgte zusätzlich unter ständigem Schütteln bei 200 min⁻¹ im CERTOMAT von B. BRAUN .

Tab. 3.2: Zusammensetzung der Nährmedien für die Anzuchtung von Hefezellen mit künstlichen Hefechromosomen

<u>Zusammensetzung</u> (Angaben pro Liter):	<u>YPD-Medium</u> (nicht selektiv)	<u>SD-Medium</u> (Selektion auf Tryptophan und Uracil)	<u>Behandlung zur Schaffung keimfreier Bedingungen</u> (möglich+, nicht möglich-)	
			auto- klavieren	steril filtrieren
Hefeextrakt (Bacto -yeast extract)	10 g	6.7g	+	-
Pepton (Bacto -Peptone)	20 g	-	+	-
D(+)-Glucose (Sigma)	20 g	20 g	-	+
Aminosäuren(Trp-) (Bacto)	-	14 g	+	+
Adenine hemisulfate (Sigma)	-	55 mg	-	+
L-Tyrosin(+3N Na-OH) (Sigma)	-	55 mg	-	+
Ampicillin (Boehringer Mannheim)	-	25mg	-	-
Agar (feste Nährböden) (Bacto)	20 g	20 g	+	-

3.2.3. DNA-Extraktion aus Hefezellen

3.2.3.1. Schnellpräparation unter Verwendung von Proteinase K

Die Vermehrung der Hefezellen erfolgte auf festen, nichtselektiven YPD-Nährböden (Tab. 3.2., S. 29). Nach 36-48 Stunden Bebrütungsdauer bei 30 °C wurden 10-15 Kolonien pro Platte entnommen und in 500 µl Lysispuffer* gelöst. Die Zellsuspension wurde auf 95 °C erhitzt und bei dieser Temperatur für 15 Minuten inkubiert. Nach Abkühlung auf 55 °C und der Hinzugabe von 20 µl Proteinase K (Ausgangskonzentration 20 mg/ml, Boehringer Mannheim) erfolgte eine Inkubation bei 55 °C für 4 Stunden. Nach einem nochmaliges Erhitzen auf 95 °C für 5 Minuten wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Für nachfolgende Untersuchungen mittels PCR wurden 5 µl der DNA-Lösung in einem 20 µl Reaktionsansatz eingesetzt.

* Lysispuffer; pH 7.5 (steril filtrieren, Lagerung bei 4 °C)

1 % Triton (Triton X100, Sigma)

1 mM Tris (Roth -Tris Ultra Qualität)

5 mM MgCl₂ (Sigma)

320 mM Saccharose (Sucrose, Sigma)

3.2.3.2. DNA-Präparation nach Agaroseeinbettung

Nach Anzüchtung der Hefezellen auf festen, selektiven SD-Medien (Tab. 3.2., S. 29) wurde eine Kolonie in 50 ml flüssiges SD-Medium überführt und 48 Stunden bei 30 °C unter ständigem Schwenken bei 80 min⁻¹ inkubiert. Danach wurden die 50 ml Zellsuspension in ein 50 ml *Falkon*[®]-*Tube* überführt und in einer *Beckman GS-6R Zentrifuge* unter Verwendung des *GH 3.8 Rotors* für 10 Minuten bei 3000 min⁻¹ zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit dem doppelten Volumen des SEDT-Puffers*¹ resuspendiert und nach Zugabe von 0,5 mg/ml Zymolyase solange bei 37 °C inkubiert, bis sich mindestens 80 % der Hefezellen in Sphäroplasten (Hefezellen nach Auflösung der Zellwand) umgewandelt hatten. Dieser Vorgang wurde kontrolliert, indem nach 30 Minuten Inkubationsdauer im Abstand von 10 Minuten ein Tropfen Zellkultur entnommen wurde und die vom Erhalt der Zellwand abhängige Fragilität der Zellen durch Zugabe einer hypotonen Lösung (Aqua bidest.) unter dem Mikroskop beurteilt wurde. Nach ca. 50 Minuten reagierte die überwiegende Mehrzahl (>80 %) der Zellen auf die Wasserzugabe mit spontaner Zellysis (platzen).

Anschließend wurden die Sphäroplasten pelletiert (Zentrifugation in einer *Beckman GS-6R Zentrifuge* unter Verwendung des *GH 3.8 Rotors* für 10 Minuten bei 3000 min^{-1} ; Überstand verwerfen) und einmal mit 5 ml SEDT-Puffer gewaschen. Das Pellet wurde mit 2 ml SEDT-Puffer resuspendiert und die Zellkonzentration mit Hilfe eines Zellzählgerätes bestimmt. Die Suspension wurde schließlich durch Herstellung der entsprechenden Verdünnung auf eine Zellzahl von $1,2 \times 10^8$ Zellen/ml SEDT eingestellt und mit der gleichen Menge 1,2 %-iger, geschmolzener und auf $40 \text{ }^\circ\text{C}$ temperierter *SeaPlaque* Agarose vermischt. In einer auf Eis befindlichen Plastikschiablone wurden dann die Agaroseblöckchen ($5 \times 3 \times 10 \text{ mm}$) mit einer Zellendkonzentration von 6×10^7 Zellen/ml Agarose gegossen. Die Aufbewahrung der Blöckchen erfolgte in NDS-Puffer*² bei einer Temperatur von $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

*1 SEDT-Puffer (pH 7.5; Lagerung bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$)

- 1 M Sorbitol (Sigma)
- 100 mM DTT (Dithiothreitol, Sigma)
- 50 mM EDTA (Sigma)
- 10 mM Tris-puffer (Roth -Tris Ultra Qualität)

*2 NDS-Puffer (pH 9.6; Lagerung bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$)

- 0,5 M EDTA; pH 8,0 (Sigma)
- 10 mM Tris-puffer (Roth -Tris Ultra Qualität)
- 1 % N-lauroylsarcosine (Sigma)

3.3. Bakteriophagen P1-abgeleitete künstliche Chromosomen (PACs)

3.3.1. Auswahl, Herkunft und Verwendung der Bakterien mit PACs

Die verwendeten Bakterien stammen aus einer PAC-Bibliothek von *P. de Jong* und *P. Ioannou* mit folgenden Eckdaten:

- Name der Bibliothek: RPCI 1 Human PAC
- Wirtsorganismus: *E.coli* (Stamm: DH10B)
- Vector: cCYPAC-2.

Weitere Informationen sind im Internet unter der Adresse <http://bacpac.med.buffalo.edu> abrufbar. Die benötigten Pools bzw. Klone wurden vom *Ressourcenzentrum des Deutschen Humanen Genomprojektes* am *Max Planck Institut für molekulare Genetik* und am *Deutschen Krebsforschungszentrum, Berlin*, bezogen. Nähere Informationen sind im Internet unter der Adresse <http://www.rzpd.de/cgi-bin/newlib# HUMAN-PAC> erhältlich.

Für die Konstruktion eines PAC-/BAC-Contigs wurden die 39 Hauptgruppen der PAC-Bibliothek, die insgesamt 122496 Klone repräsentieren und aus jeweils 16 Zeilen, 24 Spalten und 8 Platten bestehen mit den unmittelbar an das KPNA2-Gen angrenzenden Markern mittels PCR untersucht. Zur Identifizierung der positiven PAC-Klone wurden die Klongruppen (je 40 Untergruppen mit 16 Zeilengruppen, 24 Spaltengruppen und 8 Plattengruppen) der positiven Hauptgruppen mit denselben Markern getestet. Vor der DNA-Präparation wurden die Ergebnisse mit einzelnen Kolonien, die später auch für die Mini- bzw. Maxi-Präparation verwandt wurden, verifiziert. Dazu wurde ein Teil der Kolonie mittels steriler Kanüle direkt in einen PCR-Ansatz gegeben und der Klon somit auf das Vorhandensein des verwendeten Markers untersucht. Bei positivem Ergebnis wurde diese Kolonie weiter vermehrt und die PAC-/BAC-DNA mittels Mini-Präparation für weitere PCR-Untersuchungen bzw. Maxi-Präparation für Sequenzuntersuchungen extrahiert. Die Sequenzierung der PAC-/BAC-Enden erfolgte mit Hilfe eines *ABI PRISM™ 377* Sequenzierautomaten unter Verwendung des *Big-Dye-Terminator* Sequenzier-Kits der Firma *Perkin Elmer*. Die erhaltenen Sequenzen wurden im Internet mit Hilfe des *www BLAST server* des *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mit schon bekannten Sequenzen verglichen. Bei einer Übereinstimmung zwischen den selbst detektierten Endsequenzen und Sequenzen aus dem Internet, die in der Regel von komplett sequenzierten PAC -Klonen stammten, wurden diese Klone bei der Konstruktion des Contigs mit einbezogen. Die Endsequenzen der einzelnen Klone wurden wiederum für die Konstruktion neuer STS-Marker verwendet, mit denen eine erneute Untersuchung der PAC-Bibliothek erfolgte. Die Kontrolle der Kontinuität des Contigs erfolgte durch PCR-Untersuchungen der einzelnen PAC-Klone sowohl mit den bekannten STS- bzw. Mikrosatellitenmarkern als auch mit den selbstkreierten STS-Markern der PAC-Enden.

3.3.2. Anzuchtung von Bakterien mit PACs

Die Anzuchtung der Bakterien erfolgte zunächst auf festen LB-Medien* mit einer Bebrütungsdauer von 12-16 Stunden bei 37 °C. Für weitere Vermehrungsschritte wurden 3-5 ml flüssigen LB-Mediums mit einer Kolonie beimpft und wiederum für 12-16 Stunden bei 37 °C unter ständigem Schütteln bei 200 min⁻¹ im CERTOMAT der Firma B. BRAUN inkubiert. Je nach benötigter DNA-Menge wurden anschließend 100-400 ml flüssigen LB-Mediums mit 1 ml der Vorkultur beimpft und abermals für 12-16 Stunden bei 37 °C unter ständigem Schütteln bei 200 min⁻¹ inkubiert.

* LB (Luria-Bertani)- Medium (pH 7.0; Lagerung bei 4 °C)

Zusammensetzung

absolut	pro Liter
1.0 % Tryptone	10 g Bacto -Tryptone
0.5 % Hefeextrakt	5 g Bacto -yeast extract
1.0 % NaCl	10 g NaCl (Roth)

feste Nährböden (Agarplatten; Lagerung bei 4°C)

1.5 % Agar	15 g Bacto -Agar
------------	------------------

Selektionsstoff:

25 µg/ml Kanamycin	25 mg Sigma -Kanamycin
--------------------	------------------------

Die Hinzugabe des Kanamycins erfolgte bei Agarplatten nach Abkühlung des autoklavierten Mediums auf 55 °C und bei flüssigen Kulturansätzen unmittelbar vor der Beimpfung.

3.3.3. DNA-Extraktion aus Klonen mit PACs

3.3.3.1. Mini-Präparation

Die Mini-Präparation der PAC-Klone erfolgte nach dem Protokoll des *Roswell Park Cancer Institutes* am *Human Genetics Department*, Buffalo, New York, das unter der Internet-Adresse <http://bacpac.med.buffalo.edu/pac/pacprep.htm> verfügbar ist. Es wurden 4 ml LB-Medium (+25 µg/ml Kanamycin, vgl. Kap. 3.3.2., S. 33) mit einer separaten Kolonie beimpft und 16 Stunden bei 37 °C unter ständigem Schütteln bei 200 min⁻¹ im CERTOMAT von B. BRAUN inkubiert.

Danach wurde die Zellsuspension in einer *Beckman GS-6R Zentrifuge* unter Verwendung des *GH 3.8 Rotors* für 10 Minuten bei 3000 min^{-1} zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in $300 \mu\text{l}$ Puffer-P1*¹ resuspendiert, in ein $1,5 \text{ ml}$ Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und anschließend $300 \mu\text{l}$ Puffer-P2*² hinzugegeben. Nach gründlichem Durchmischen und einer Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden $300 \mu\text{l}$ Puffer-P3*³ hinzugegeben und abermals gründlich durchmischt. Nach diesem Schritt zeigte sich ein dickes, weißes Präzipitat aus Proteinen und *E. coli* DNA. Anschließend lagerten die Proben für mindestens 5 Minuten auf Eis, bevor sich eine weitere Zentrifugation in einer *Eppendorf Tischzentrifuge 5415 C* für 10 Minuten bei 10000 min^{-1} und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ anschloß. Der Überstand wurde in ein $1,5 \text{ ml}$ Eppendorf-Reaktionsgefäß, welches $0,8 \text{ ml}$ eiskaltes Isopropanol enthielt, gegeben, die beiden Lösungen durch mehrmaliges Schwenken durchmischt und für mindestens 5 Minuten auf Eis gelagert. Schließlich wurde das Präzipitat für 20 Minuten in einer *Eppendorf Tischzentrifuge 5415 C* bei 14000 min^{-1} und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert und zum DNA-Pellet nach Verwerfen des Überstandes $500 \mu\text{l}$ 70% EtOH hinzugegeben. Das Gefäß wurde mehrmals geschwenkt und nochmals in derselben Zentrifuge für 5 Minuten bei 14000 min^{-1} und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Nach erneutem Entfernen des Überstandes und Trocknen des Pellets bei Raumtemperatur wurde die DNA in $40 \mu\text{l}$ TE-Puffer (pH 8,0) resuspendiert und die DNA-Konzentration mit Hilfe des *Lambda Bio UV/Vis Spektrometers* der Firma *Perkin Elmer* (vgl. Kap. 3.7.1., S. 38) bestimmt.

*¹ Puffer-P1 (steril filtrieren, Lagerung bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$)
15 mM Tris, pH 8 (Roth -Tris Ultra Qualität)
10 mM EDTA (Sigma)
100 $\mu\text{g/ml}$ RNase A (Qiagen)

*² Puffer-P2 (steril filtrieren, Lagerung bei Raumtemperatur)
0.2 N NaOH (Sigma)
1% SDS (Sodium Dodecyl Sulfat, Sigma)

*³ Puffer-P3 (autoklavieren, Lagerung bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$)
3 M NaOAc, pH 5.5 (Sigma)

3.3.3.2. Maxi-Präparation mittels QIAGEN Plasmid Kit

Die Maxi-Präparation der PAC-Klone wurde nach dem QIAGEN Plasmid Protokoll für *Very Low Copy* Plasmide mittels QIAGEN Plasmid Kit in leicht veränderter Form durchgeführt. Es wurden 4 ml LB-Medium (+25 µg/ml Kanamycin, Sigma) mit einer separaten Kolonie beimpft und für 16 Stunden bei 37 °C unter ständigem Schütteln bei 200 min⁻¹ unter Verwendung des CERTOMAT der Firma B. BRAUN inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde 1 ml für die Beimpfung einer 400 ml Kultur (+25 µg/ml Kanamycin, Sigma) verwandt, die wiederum für 16 Stunden bei 37 °C und unter ständigem Schütteln bei 200 min⁻¹ inkubiert wurde. Das Zellpellet, das durch Zentrifugation der 400 ml Kultur für 20 Minuten in einer *Sorvall RC-5B Zentrifuge* unter Verwendung eines *GS-3 Rotors* bei 4000 min⁻¹ entstand, wurde in 20 ml Puffer-P1 resuspendiert. Nach Hinzugabe von 20 ml Puffer-P2 und gründlichem Durchmischen wurde die Lösung für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 20 ml Puffer-P3 hinzugegeben und das Gemisch für 15 Minuten auf Eis gelagert. Es folgte eine Zentrifugation für 30 Minuten in einer *Sorvall RC-5B Zentrifuge* unter Verwendung eines *GS-3 Rotors* bei 9000 min⁻¹ und 4 °C und nach Abnahme des Überstandes wurde dieser nochmals für 15 Minuten in derselben Zentrifuge bei 9000 min⁻¹ und 4 °C zentrifugiert. Der so gewonnene Überstand wurde schließlich in ein QIAGEN-Tip, welches vorher durch Einfüllen von 10 ml QBT-Puffer, der allein durch die Schwerkraft die Säule passierte, vorbereitet wurde, gegeben. Nachdem die Säule von der Lösung passiert wurde, erfolgte ein Waschschriff mit 20 ml QC-Puffer. Anschließend wurde die DNA mit 5 ml, auf 65 °C vorgewärmtem QF-Puffer eluiert und mit Isopropanol präzipitiert. Abschließend wurde die DNA in 40 µl TE-Puffer (pH 8,0) resuspendiert und die DNA- Konzentration mit Hilfe des *Lambda Bio UV/Vis Spektrometers* der Firma *Perkin Elmer* (vgl. Kap. 3.7.1., S. 38) bestimmt. Die Zusammensetzungen und Lagerungsbedingungen der oben angeführten Puffer sind im Appendix A des *QIAGEN Plasmid Purification Handbuches* (01/97) nachzulesen.

3.4. Künstliche Bakterienchromosomen (BACs)

3.4.1. Auswahl, Herkunft und Verwendung der Bakterien mit BACs

Die verwendeten Bakterien stammen aus der CEPH (*Centre d'Études des Polymorphisms Humaines*)-BAC-Bibliothek und wurden vom *Ressourcenzentrum des Deutschen Humanen Genomprojektes* am *Max Planck Institut für molekulare Genetik* und am *Deutschen Krebsforschungszentrum*, Berlin, bezogen. Für die Konstruktion eines PAC-/BAC-Contigs wurden die 68 Hauptgruppen der BAC-Bibliothek, deren 209280 Klone wiederum in jeweils 16 Zeilen, 24 Spalten und 8 Platten gegliedert sind mit den unmittelbar an das KPNA2-Gen angrenzenden Markern mittels PCR untersucht. Die weiteren Schritte sind identisch mit den unter Kapitel 3.3.1. auf der Seite 31 beschriebenen.

3.4.2. Anzucht von Bakterien mit BACs

Die Anzucht der Bakterien erfolgte zunächst auf festen YT-Medien* (+12.5 µg/ml Chloramphenicol, Sigma) mit einer Bebrütungsdauer von 12-16 Stunden bei 37 °C. Für weitere Vermehrungsschritte wurden 4 ml flüssigen YT-Mediums (+12.5 µg/ml Chloramphenicol, Sigma) mit einer Kolonie beimpft und für 12-16 Stunden bei 37 °C unter ständigem Schütteln bei 200 min⁻¹ im CERTOMAT der Firma B. BRAUN inkubiert. Je nach benötigter DNA-Menge wurden anschließend 100-400 ml flüssigen YT-Mediums (+12.5µg/ml Chloramphenicol, Sigma) mit 1 ml der Vorkultur beimpft und abermals für 12-16 Stunden bei 37 °C unter ständigem Schütteln inkubiert.

* YT (Yeast-Tryptone)- Medium (pH 7.0; Lagerung bei 4 °C)

Zusammensetzung

absolut	pro Liter
1.6 % Tryptone	16 g Bacto -Tryptone
1.0 % Hefeextrakt	10 g Bacto -yeast extract
0.5 % NaCl	5 g NaCl (Roth)

feste Nährböden (Agarplatten; Lagerung bei 4°C)

1.2 % Agar	12 g Bacto -Agar
------------	------------------

Selektionsstoff:

12.5 µg/ml Chloramphenicol	12.5 mg Sigma - Chloramphenicol
----------------------------	---------------------------------

3.4.3. DNA-Extraktion aus Klonen mit BACs

Die DNA-Extraktion aus BAC-Klonen erfolgte mittels Maxi-Präparation nach dem QIAGEN Plasmid Protokoll für Very Low Copy Plasmide (vgl. Kap. 3.3.3.2., S. 35).

3.5. Untersuchungsmaterial

Das Tumormaterial stammte von Patienten, die in der Medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin (Robert Rössle Klinik in Berlin Buch bzw. Charité) betreut wurden. Insgesamt wurden 40 Kolon- und 30 Mammakarzinome untersucht. Für die Dickdarntumoren sind vorhandene Daten über das Erkrankungsalter, das Geschlecht der Patienten sowie über die Tumorklassifizierung, die nach den Richtlinien der *Internationalen Gesellschaft gegen Krebs* (UICC) erfolgte, und den weiteren klinischen Verlauf im Anhang in der Tabelle 9.2. zusammengefaßt. Für die Brusttumoren liegen keine weiteren Daten vor.

Die kolorektalen Karzinome wurden mit insgesamt 12 Mikrosatellitenmarkern (vgl. Tab. 3.4., S. 43) auf Heterozygotieverluste bzw. Mikrosatelliteninstabilität mit Hilfe der PCR untersucht. Die Marker D17S1792, D17S1809, D17S1813, D17S1870, D17S789 und D17S795 befinden sich auf 17q23. Die restlichen 6 Marker liegen auf unterschiedlichen Chromosomen in Regionen, in denen sich für die Tumorentstehung relevante Gene befinden bzw. die durch ein erhöhtes Auftreten von Heterozygotieverlusten bei Kolontumoren gekennzeichnet sind.

Die Mammakarzinome wurden mit 7 Mikrosatellitenmarkern aus der Region 17q22-23 untersucht. Die Detektion des Markers D17S807 erfolgte wegen fehlender Fluoreszenzmarkierung mittels Silberfärbung (vgl. Kap. 3.9.2.1.; S. 47).

Die Auftrennung und Detektion der fluoreszenzmarkierten Mikrosatellitenmarker erfolgte ausschließlich mit Hilfe des ABI (*Applied Biosystems Inc.*) 373 DNA Sequenzierautomaten und unter Verwendung der *Genescan Analysis* Software. Für die Allelotypisierung und die LOH-Untersuchungen wurde die *Genotyper* Software verwendet.

3.6. Histologische Beurteilung und Mikrodissektion

Die LOH-Untersuchungen erfolgten ausschließlich an DNA-Proben mikrodissezierter paraffineingebetteter Tumoren. Für die Mikrodissektion wurden in der Regel 5-10 (je nach Größe des Gewebeareals) ungefärbte Paraffinschnitte mit einer Schnittdicke von 5-10 μm verwendet. Die histologische Beurteilung der Schnittpräparate und die Kennzeichnung der zu mikrodissezierenden Gewebeareale wurde an je einem mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Referenzschnitt von Dr. Dr. Konrad Kölbl, Mitarbeiter des Institutes für Pathologie der Charité und Abteilung für Chirurgie und Chirurgische Onkologie der Robert-Rössle-Klinik, vorgenommen. Die Kennzeichnung des zu separierenden Tumor- und des angrenzenden Normalgewebes wurde durch ein Übereinanderlegen der Objektträger und Markierung der Areale auf den ungefärbten Schnitten übertragen. Die eigentliche Mikrodissektion erfolgte nach der Entfernung des Paraffins (vgl. Kap. 3.7.2.1., S. 40) unter Verwendung eines *CITIVAL 2*-Mikroskopes der Firma *Karl Zeiss Jena* durch Lösen des Gewebes vom Objektträger mit Hilfe einer sterilen Kanüle und unmittelbares Verbringen der Gewebestücke in 100-200 μl Lysispuffer*.

* Lysispuffer

50 mM Tris-HCL, pH 8.0 (Sigma)

1 mM EDTA, pH 8.0 (Sigma)

1 % Triton (Triton X100, Sigma)

3.7. DNA-Präparation aus Zellen vom Menschen

3.7.1. DNA-Extraktion aus Blut

10 ml EDTA-Blut und 36 ml Lysispuffer*¹ wurden in ein 50 ml *Falkon*[®]-*Tube* gegeben und 10-15 Minuten auf Eis gelagert. Danach wurde das Gemisch für 40 Minuten in einer *Beckman GS-6R Zentrifuge* unter Verwendung des *GH 3.8 Rotors* bei 4 °C und 3000 min^{-1} zentrifugiert und anschließend der Überstand vorsichtig abgegossen. Zum Pellet wurde dann 1,8 ml eiskaltes NaCl-EDTA*² hinzugegeben und so lange geschwenkt, bis sich das Pellet von dem Röhrchen löste. Das gelöste Pellet wurde in ein 15 ml *Falkon*[®]-*Tube* überführt und nach Hinzugabe von 50 μl 20 %-igem SDS und 75 μl Proteinase K (20 mg/ml), 6-16 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wurden 2 ml Phenol (Roth) hinzugegeben, mehrmals geschwenkt und für 40 Minuten in einer *Beckman GS-6R Zentrifuge* unter Verwendung des *GH 3.8 Rotors* bei 4 °C und 3000 min⁻¹ zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt, mit 2 ml Phenol/Chloroform-Isoamylalkohol (1:1) versetzt und für 10 Minuten in einer *Beckman GS-6R Zentrifuge* unter Verwendung des *GH 3.8 Rotors* bei 3000 min⁻¹ zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut in ein neues Röhrchen überführt, 2 ml Chloroform-Isoamylalkohol (24+1) hinzugegeben und für 10 Minuten in derselben Zentrifuge bei 3000 min⁻¹ zentrifugiert. Nach letztmaligem Überführen des Überstandes in ein neues Röhrchen wurde die DNA in 4,4 ml 99,8 %-igem Ethanol und 0,2 ml 3 M NaAc bei Raumtemperatur gefällt. Die gefällte DNA wurde mit einem Häkchen herausgefischt, in 70 %-igem Ethanol gewaschen und in Wasser gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch photometrische Absorbationsbestimmung bei einer Wellenlänge von 260 nm mit Hilfe des *Lambda Bio UV/Vis Spektrometers* der Firma *Perkin Elmer* und Errechnung des DNA-Gehaltes nach folgender Gleichung:

$$(\text{Optische Dichte}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnung} \times \text{DNA-Konzentration}^{*3}) : 1000 = \text{DNA-Konzentration in } \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

$$^{*3} 1 \text{ OD}_{260\text{nm}} = 50 \mu\text{g DNA /ml Lösung}$$

^{*1} Lysispuffer; pH 7.5

1 % Triton (Triton X100, Sigma)
 1 mM Tris (Roth -Tris Ultra Qualität)
 5 mM MgCl₂ (Sigma)
 320 mM Saccharose (Sucrose, Sigma)

^{*2} NaCl-EDTA

75 mM NaCl (Roth)
 24 mM EDTA (Sigma)

^{*1} und ^{*2} steril filtrieren, Lagerung bei 4 °C

3.7.2. DNA-Extraktion aus mikrodisseziertem Gewebe

3.7.2.1. Paraffineingebettetes Gewebe

Zur Entfernung des Paraffins wurden die in der Regel 5-10 µm dicken histologischen Schnitte zweimal für je 5 Minuten in separate Xylollösungen getaucht. Danach wurden die Objektträger durch das Verbringen in eine absteigende Alkoholreihe (je 2 Minuten in 99 %-ige, 85 %-ige, 70 %-ige, 55 %-ige, 30 %-ige EtOH-Lösung und abschließend in Aqua bidest.) rehydriert und nach dem Trocknen mikrodisseziert (vgl. Kap. 3.6., S. 38). Nach Hinzugabe von 10-20 µl Proteinase K (10 mg/ml, Boehringer Mannheim) wurden die Proben für 4-8 Stunden bei 55 °C inkubiert. Abschließend wurden die Proben für 15 Minuten auf 95 °C erhitzt. Von den so gewonnenen DNA-Lösungen wurden je nach DNA-Gehalt für die weiteren Untersuchungen 0,1-5 µl in einem 20 µl Reaktionsansatz verwendet.

Lösungen zum Entparaffinieren

Xylol (Roth); 99 %-ige, 85 %-ige, 70 %-ige, 55 %-ige, 30 %-ige EtOH (Roth)-Lösung;
Aqua bidest.

3.7.2.2. Frischgewebe

Von frischen, unfixierten und bei -80 °C gelagerten Tumorproben wurden ca. 10 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt. Ein mit Hämatoxylin-Eosin gefärbter Referenzschnitt wurde histologisch beurteilt (vgl. Kap. 3.6., S. 38) und diente gleichzeitig als Vorlage für die Mikrodissektion der ungefärbten Schnitte. Während der Mikrodissektion wurden die restlichen Objektträger auf Trockeneis gelagert. Die DNA-Extraktion aus den mikrodissezierten Gewebearealen wurde nach dem *Tissue Protocol*, das im Handbuch des *QIAamp Tissue Kit* (09/96) auf den Seiten 18-21 nachzulesen ist, durchgeführt. Der *QIAamp Tissue Kit* ist ein Produkt der Firma QIAGEN GmbH und besitzt die Katalog-Nummer: 29306.

3.8. Polymerasekettenreaktion (PCR)

3.8.1. Reagenzien und Bedingungen der PCR

Für die PCR kamen ausschließlich *GeneAmp Thermocycler 2400* und *9600* von *Perkin Elmer Applied Biosystems* zum Einsatz. In der Regel wurden Reaktionsansätze von 20 µl pro PCR verwendet. Eine Auflistung der verwendeten Reagenzien mit Konzentrationsangaben und Herkunft ist in der Tabelle 3.3. enthalten. Zur Berechnung der Schmelztemperatur T_m der PCR-Primer wurde folgende Gleichung verwendet: [(Anzahl von A+T) x 2 °C + (Anzahl von G+C) x 4 °C] (SUGGS et al., 1981).

Tab. 3.3: In der PCR verwendete Reagenzien mit genauer Bezeichnung, Konzentrationsangaben und Herkunft

Reagenzien	Bezeichnung	Konzentration unverdünnt	Einsatz in 20µl PCR/ Endkonzentration	Herkunft / Firma
Taq-DNA-Polymerase	InViTAQ™-DNA-Polymerase	5 Einheiten/ µl	0.08 µl = 4 Units/ PCR	InViTek GmbH, Berlin
PCR-Puffer	NH4-Reaktion Buffer	10 x	2.00 µl = 1 x	InViTek GmbH, Berlin
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Ultrapure dNTP Set	1 mM	2.00 µl = 100 µM	Pharmacia Biotech, USA
PCR-Primer	vgl. Kap. 2.9.2.	10 µM	2.00 µl = 1 µM	BioTeZ GmbH, Berlin
DNA-Matrize			50-100 ng	
Aqua bidest.			auffüllen auf 20 µl	

Die Vermehrung der entsprechenden Amplikons erfolgte nach folgendem Schema:

1. Erhitzen der Proben auf 95°C für 3 Minuten
2. 30 PCR-Zyklen mit jeweils:
 - 30 Sekunden bei 95°C
 - 30 Sekunden bei T_p (primerabhängig)
 - 30 Sekunden bei 72°C
3. Inkubation der Proben für 5 Minuten bei 72°C

Danach wurden die Proben entweder bei 4 °C gelagert (Weiterverarbeitung am selben Tag) oder bis zur Auftrennung und Detektion bei -18 °C eingefroren.

3.8.2. Verwendete Primer

3.8.2.1. Mikrosatellitenmarker

Die in der Tabelle 3.4. auf der Seite 43 enthaltenen Mikrosatellitenmarker wurden vor allem für die LOH-Untersuchungen der mikrodisezierten Tumorproben verwendet. Die Marker der chromosomalen Region 17q23 kamen darüber hinaus auch bei Untersuchungen im Rahmen der physikalischen Kartierung zum Einsatz. Die aufgeführten Mikrosatellitenmarker beinhalten ausschließlich (CA)_n-Wiederholungen und wurden von der *BioTeZ GmbH*, Berlin, hergestellt.

3.8.2.2. Primer aus dem Karyopherin Alpha 2-Gen

Die intronüberspannenden Primer aus dem KPNA2-Gen stammen aus der mRNA-Sequenz des hSRP1 α mit der *GenBank*-Zugangsnummer: U28386 und wurden von der *BioTeZ GmbH*, Berlin, hergestellt. Eine Auflistung der Primer ist in der Tabelle 3.5. auf der Seite 44 enthalten. Zur Identifizierung der Introngrößen wurden die bestimmten DNA-Abschnitte mittels o.a. Primer unter Verwendung der PCR-Technik amplifiziert und nach Agarosegelelektrophorese mittels Ethidiumbromid detektiert.

3.8.2.3. Marker aus der Region 17q23

Die Marker aus der chromosomalen Region 17q23 sind entweder im YAC-Contig WC 17.9 des *Center for Genome Research* des *Whitehead Institute for Biomedical Research* enthalten (Tab. 3.6., S. 45) oder wurden aufgrund eigener Untersuchungen aus Sequenzen der PAC- bzw. BAC-Enden kreiert (Tab. 3.7., S. 46). Die Mikrosatellitenmarker: D17S1792, D17S1809, D17S1813, D17S1870, D17S789 und D17S795, die sich ebenfalls in der Region 17q23 befinden, sind in der Tabelle 3.4. auf der Seite 43 enthalten.

Tab. 3.4: Aufstellung der verwendeten Mikrosatellitenmarker mit genauer Bezeichnung, chromosomaler Lage, Sequenz und ggf. Art der Fluoreszenzmarkierung (Fettdruck; vgl. Kap. 3.9.2.2., S. 48), sowie der in der PCR verwendeten Anlagerungstemperatur (T_p), der Größe des Amplifikates und Angaben zu Genen, die sich in unmittelbarer Nähe des jeweiligen Mikrosatellitenmarkers befinden

Name	Lage	Sequenz 5' → 3' Sinnstrang / Gegensinnstrang	T_p	Größe in bp	Gen
D1S243	1p36	TET -GGCACACACAGGCTCACAT GCCGTTTTGGTAACACCC	55°C	88- 110	MOM
D5S82	5q14-21	HEX -ATCAGAGTATCAGAATTTCT CCCAATTGTATAGATTTAGAAGTC	50°C	165- 175	APC
D8S264	8p13	HEX -TTCGGAACATCTGCGTCGTC CCAACACCTGAGTCAGCATA	63°C	129- 149	?
D15S127	15q21	TET -CCAACCACACTGGGAA AACAGTTGCCACGGT	55°C	115- 149	BLOOM
D17S789	17q23	ACTCCAAATCAAGTTTGTACTGAGA HEX -CTGCATACGAAGGGTAGGAC	62°C	154- 170	KPNA2
D17S795	17q23	TET -TTTTTCATGCGCTATCTCCAG TGAGTTGTTAGCAATACTCGTAGG	60°C	105- 121	KPNA2
D17S796	17p13.1	CAATGGAACCAAATGTGGTC 6-FAM -AGTCCGATAATGCCAGGATG	55°C	144- 176	TP53
D17S1792	17q23	GTTTTTCGGTTATTAACAACAACAA TET -CAGGTGGCTGATGGAGA	55°C	192- 196	KPNA2
D17S1809	17q23	HEX -TTGCCAAGATACAGGAATG AAGCCCACCAGGTCAT	52°C	144- 148	KPNA2
D17S1813	17q23	AGCTCCAAAGTTACATAATGC 6-FAM -AAGTGATCCATCCCCC	55°C	204- 226	KPNA2
D17S1870	17q23	TGTTGCCCTTAGATTCA 6-FAM -CGCCTGGCTAATTTTG	52°C	220- 238	KPNA2
D18S70	18q23	HEX -ACAGTAAACAACGTGGTGAG AATTCATTGCCATTCAAGG	55°C	176- 192	MADRs

Tab. 3.5: Auflistung der verwendeten Primer aus der cDNA-Sequenz des KPNA2-Gens mit Angaben zur genauen Lage (verwendete Zahlen sind identisch mit mRNA-Sequenznummerierung), der Sequenz, der in der PCR verwendeten Anlagerungstemperatur (Tp), der Größe der Amplikons und der überspannenden Introns

Lage	Sequenz 5'→3' Sinnstrang / Gegensinnstrang	Tp	Größe in bp	überspannen- des Intron
6-25 189-169	CGG TCT TTG AGC TGA GTC G GTT CTT GAA TCT GTG AAG ACG	60°C	ca.1400	1
117-137 403-384	CCC CTT TGT CTC ATA ACC ATG CCA CAT TGC TGC TAT TTA TG	58°C	ca.3400	2 und 3
249-268 403-384	GAA AGC TAA GAA GGA TGA CC CCA CAT TGC TGC TAT TTA TG	58°C	ca.3100	3
384-403 517-497	CAT AAA TAG CAG CAA TGT GG CCA AGA AGG ACA CAA ATT TCG	58°C	ca.1400	4
497-517 885-866	CGA AAT TTG TGT CCT TCT TGG CTG CTC AAC AGC ATC TAT CG	60°C	ca.1100	5 und 6
772-791 885-866	GCA GTT CCT GAT ATG TCA TC CTG CTC AAC AGC ATC TAT CG	58°C	212	6
967-986 1249-1230	ACT GAT GGT CCA AAT GAA CG CTT GCT GTA TCT GGT CCT GG	58°C	ca.600	7
1148-1167 1396-1377	TCT TTC CCA GCC TGC TCAC C TTA TGC CAC AGT GAA CAA GG	60°C	ca.500	8
1301-1323 1616-1595	ATT TTA AGA CAC AAA AGG AAG C TAC TTC TCA ATT AAG CTT AAC G	58°C	ca.1800	9
1526-1546 1741-1722	AAG AAT GTG GAG GCT TAG AC TAT GTC TCA GCT ACA TGA TC	58°C	ca.900	10
1718-1738 1855-1834	TTT AGA TCA TGT AGC TGA GAC CTG TTC AAG TAT AGT TTC AGT G	58°C	137	

Tab. 3.6: Aufstellung der verwendeten Marker aus dem YAC-Contig *WC 17.9* mit genauer Bezeichnung, Sequenz der verwendeten Primer, der in der PCR verwendeten Anlagerungstemperatur (T_p) und der Größe der Amplifikate

Name	Sequenz 5'→3' Sinnstrang / Gegensinnstrang	T_p	Größe in bp
CACNLG	GCT TCT TCC CCA GGA AGC AGG TTG TCC CTG CAA TGT TC	60°C	324
CHLC. 1E12	TCC GTC TTA CTC AGA CTG GC CAA TCA TTC ATT GCT CGA CA	58°C	144
DDX 5	CGT CTG AAG GTC ACG AGC GCC TCT GAA ACA TGG CAG G	60°C	146
D17S113	CTT GTC CCT TTA CAA TGA GG TGC GGA TCC CAA ATA CAG G	60°C	146-160
D17S807	TCC ACC TGT AGA CCT GGT AAA AGT GCT GCG TCT TAC AAC CT	62°C	114-138
D17S1552	AAA GCA GCA CCA TGG TCA AT CTG GGT GGA ATC TTG TCT TAG G	60°C	99
D17S1557	CCT CTC TTT CCT GGC CTT G TTG GAG CAA TGA AGA TGC AG	60°C	175
D17S1816	ATG GCA CCA CTG CAC TAT TCA CAG CAA GAC TCT GTC AC	56°C	134
D17S1990	AAA TGT CTG TTT TTC ATA ATT GCT C TCA AAT ATT TTT TAT TGG AAG GCC	62°C	276
D17S1977	CTC ACC AGC GAG AAC AAA CA AAG CCG TGG CCT TAA AAT TT	58°C	90
D17S2016	ATC TTA GTA CTT TTT CTG CGG CC GGG TGA AAC AGA TCA AAG CC	62°C	99
D17S2020	CAC CAA CTT CAT GAC TTC TAA AAT G TCT TGG GGA GAA GGG AAT AA	62°C	178
D17S2023	TTC AAT TCA GGT ACT TGA AAG AAG G TCT TCT GGC ACA CCT GGA G	62°C	278

Tab. 3.7: Aufstellung weiterer Marker aus der Region 17q23 mit genauer Bezeichnung, Sequenz der verwendeten Primer, der in der PCR verwendeten Anlagerungstemperatur (T_p) und der Größe der Amplifikate

Name	Sequenz 5'→3' Sinnstrang / Gegensinnstrang	T_p	Größe in bp
B09_081-N1	CTG ATT CCA GGG CTA GGA C CTC AAG CTC GCA GCT GTG C	62°C	110
B09_081-N2	CAC TAC ACT CTA GCC TGG AC GAA ATG CTT GAG ATA ACC TAC	60°C	253
B12_007-N1	ATG TGG AAT GAT TTA AGT TCC TAA ACT AGA TGG CTT CTT TGC	58°C	204
D01_188-N1	TTT GCC AAC CAT TAG ACT AG AAG GAG ATC CAG TGA GTC C	58°C	132
D01_188-N2	CCA GTG ATG TCA TCA AGT CC TTA ACA ACG CTG CCT CAT GC	60°C	103
G10_150-N1	CAA GAC TAT AGG GTG TCA GC TCT CCC ATG TAG TGT TCC AG	60°C	236
G10_150-N2	ACA ATA GAT ACT TTT CAA TAT TTG A TAC ATG TAA GGA TTA AAA CAG TC	60°C	130
H17_497-N1	TTT AAG TCT TAC CCC TGT GG TGG GAC CAT CTA TAA AGT CC	58°C	219
H17_497-N2	ATT ACA TTA GAA CCA AAG ATG G CCA ATC AAT GAA TGG TGA CC	58°C	142
J13_58-N1	TAT TCC TAG GTG CTG GAG G AGG CAA ACT TAT ACA GTT TGG	58°C	241
J13_58-N2	ACC TTA CAG TGC ATA TAT GC ATT AGT AAA TAG TAT CAG AAT CC	58°C	180
K6_452-N2	CCA TTG TTA ATG GCA ATT ACC TGC TGC CTT GAA ATT TCA GC	58°C	120
K16_028-N1	TTG CCA AGA TGG AAA GAT GC TAA TGA GTA CAC GCG TTT GC	58°C	121
K16_028-N2	TGT TAT GCT GTT TGT CGC CAT C GGA TGT GGC ATT TCA GTT GG	62°C	78
KPNA2; 3' 1835/1952	ACT GAA ACT ATA CTT GAA CAG GTT TAT TTA CAG GAT GCT GC	56°C	117
KPNA2; 5' 6-25/Exon2	CGG TCT TTG AGC TGA GTC G GTT CTT GAA TCT GTG AAG ACG	60°C	209
P3_110-N2	CTC TTT GGC TAT GAG ATG C TTG TCT GTA ATT TAT CCT GTC	56°C	237

3.9. Auftrennung und Detektion der PCR-Produkte

3.9.1. Agarosegelelektrophorese

PCR-Produkte mit einer Fragmentgröße zwischen 100 und 1000 bp wurden auf Agarosegelen mit einer Agarosekonzentration von 1,5 % in 0,5 x TBE-Puffer aufgetrennt und mit Hilfe von im Gel enthaltenen Ethidiumbromid (in 100 ml Gel 10 µl einer Lösung mit 10 mg Ethidiumbromid/ ml H₂O) und des *APPligene UV-Transilluminators* sichtbar gemacht. Für Fragmentgrößen über 1000 bp wurde die Agarosekonzentration der Gele auf 1 % herabgesetzt. Es wurden Elektrophoresekammern des Typs *Horizon™ 11-14* bzw. *20-25* (*BRL Life Technologies Inc.*) verwendet.

3.9.2. Polyakrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung von PCR-Fragmenten zwischen 70 und 500 bp mit einer notwendigen Trennschärfe von bis zu einem Basenpaar, z.B. bei nicht fluoreszenzmarkierten Mikrosatellitenmarkern, erfolgte auf nativen Polyacrylamidgelen und die Detektion mit Hilfe der Silberfärbung.

3.9.2.1. Silberfärbung

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte auf einem 6 %-igem Polyacrylamidgel*¹, an das ein elektromagnetisches Feld mit einer Leistung von 55 Watt angelegt wurde. Es wurde 0.5 %iger TT-Puffer*² verwendet und die Laufzeit betrug in der Regel 90 Minuten. Zur Färbung unter Verwendung von Silbernitrat wurde das Gel in einer großen Fotoschale für 5 Minuten in 500 ml einer Kaliumdichromatlösung*³ geschwenkt und anschließend für je 3 Minuten mit je einem Liter Aqua bidest. gewaschen. Nach der Hinzugabe von 500 ml Silbernitratlösung*⁴ wurde das Gel für 10 Minuten unter leichtem Schwenken inkubiert und danach abermals kurz mit Aqua bidest. gewaschen. Es folgte die Hinzugabe, ein kurzes Schwenken und das unmittelbare Entfernen von 100 ml Entwicklerlösung*⁵, bevor die restlichen 400 ml dieser Lösung hinzugegeben wurde. Nach ca. 5-10 Minuten bzw. als die DNA-Banden deutlich sichtbar waren, wurde die Reaktion mit einem Liter einer 3,5 %-igen Essigsäurelösung gestoppt und das Gel mit Hilfe eines Vakuumtrockners für 30 Minuten bei 80 °C getrocknet.

*¹; *²; *³; *⁴; *⁵: siehe Seite 48

* ¹ <u>Polyacrylamidgel</u> (37 x 17 x 0.04 cm)	<u>verwendete Chemikalien</u>
29,5 ml Aqua bidest.	
5,5 ml 38 %ige Acrylamidlösung mit 2 % Bisacrylamid	Rotiphorese [®] Gel 40 von ROTH [®]
1,875 ml TT-Puffer (10 fach)	
35 µl Tetramethylethylenediamine (TEMED)	TEMED p. a. von ROTH [®]
350 µl 10 %iges Ammoniumpersulfat (APS)	APS von Kodak [®]
* ² <u>10 facher TT-Puffer</u> (1 Liter)	
108 g TRIS-aminomethane	TRIS Ultra Qualität von ROTH [®]
93 g Tricine	99 %iges Tricine von SIGMA [®]
ad 1 Liter Aqua bidest.	
* ³ <u>10 fache Kaliumdichromatlösung</u> (250 ml)	
10 g Kaliumdichromat	Kaliumdichromat von ROTH [®]
2 g Salpetersäure	68 %ige Salpetersäure (SIGMA [®])
ad 250 ml Aqua bidest.	
* ⁴ 500 ml einer 0.1 %igen <u>Sibernitratlösung</u> (Rotipuran [®] 99,8 % von ROTH [®])	
* ⁵ <u>Entwicklerlösung</u> (500 ml)	
100 mg Paraformaldehyd	Paraformaldehyd von SIGMA [®]
15 g Natriumcarbonat	99 % Natriumcarbonat (ROTH [®])
ad 500 ml Aqua bidest.	

3.9.2.2. Verwendung fluoreszenzmarkierter Primer

Für die Untersuchung der Heterozygotieverluste wurden vorwiegend fluoreszenzmarkierte Primer verwendet (vgl. Tab. 3.4., S. 43). Nach der Synthese der Primer wurden an das 5'-Ende fluoreszierende Farbstoffe (HEX-gelb; FAM-blau; TET-grün) gekoppelt (*BioTeZ GmbH*), die nach Auftrennung auf einem denaturierendem Polyacrylamidgel mit Hilfe des ABI (*Applied Biosystems Inc.*) 373 DNA Sequenzierautomaten und unter Verwendung der *Genescan Analysis* und *Genotyper* Software detektiert wurden. Pro PCR-Ansatz wurde eine Endprimerkonzentration von 0,5 µM verwandt (vgl. Kap. 3.8.1., S. 41) und pro Bahn 3 µl der PCR-Mischung aufgetragen.

PCR-Mischung

- 5 µl PCR-Produkt mit HEX-markiertem Primer
- 3 µl PCR-Produkt mit FAM-markiertem Primer
- 2 µl PCR-Produkt mit TET-markiertem Primer
- 3 µl Standart-Vormischung + Formamid/Dextranblau
- ad 20 µl Aqua bidest.

3.10. DNA-Sequenzierung

3.10.1. Sequenzierung von PCR-Produkten

Die Sequenzierung von PCR-Produkten erfolgte nach dem Protokoll für *Thermo SequenaseTM dye terminator cycle sequencing pre-mix kit* von Amersham unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide mit Hilfe der ABI (*Applied Biosystems Inc.*) 373 und ABI Prism 377 DNA Sequenzierautomaten. Die Sequenzier-PCR wurde in einem *GeneAmp PCR Cycler 2400/ 9600* in 0,2 ml PCR-Gefäßen mit folgendem Ansatz und nach folgenden Bedingungen durchgeführt:

<u>PCR-Ansatz (20µl)</u>	<u>PCR-Bedingungen</u>
- 8 µl Sequenzierreagenz (fertig gemischt)	25 Zyklen mit folgenden Bedingungen:
- 11 µl DNA (0,2-2,0 µg)	- 96 °C, 30 s
- 1 µl Primer (5 pmol)	- 45 °C, 15 s
- ad 20 µl Aqua bidest.	- 60 °C, 4 min

Die Aufreinigung der Sequenzierproben erfolgte mittels Ethanol/Ammoniumacetat Präzipitation. Dazu wurden die 20 µl Proben je in ein 500 µl Reaktionsgefäß, das 7 µl einer 7,5 M Ammoniumacetat-Lösung und 68 µl 100 %-iges Ethanol (-20 °C) enthielt, gegeben, gemischt und für mindestens 20 Minuten auf Eis gelagert. Das Gemisch wurde dann für 15 Minuten bei 14000 min⁻¹ zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zum Waschen des Pellet wurden 350 µl 70 %-iges Ethanol (-20 °C) hinzugegeben, das Gefäß einige Male geschwenkt und anschließend 5 Minuten bei 14000 min⁻¹ zentrifugiert. Nach vorsichtigem Entfernen des Überstandes wurde das Pellet für 2-5 Minuten in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in 2,5 µl Auftragspuffer resuspendiert. Der Auftragspuffer bestand aus fünf Teilen Formamid und einem Teil 25 mM EDTA (pH 8.0) mit 50 mg/ml Dextranblau. Vor dem Auftrennen der Proben auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel erfolgte die Erhitzung für 2 Minuten auf 95 °C. Die Detektion erfolgte schließlich mit Hilfe des *ABI Prism 377 DNA Sequenzierautomaten* unter Verwendung der *ABI DNA Sequencing Analysis Software*.

<u>Gelzusammensetzung</u>	ABI 373 (390x200x0.4mm)	ABI 377 (390x200x0.2mm)
Rotiphorese NF-Harnstoff	30 g	18 g
Rotiphorese NF-Acrylamid/Bis	9 ml (40 %ige Lösung)	7,5 ml (30 %ige Lösung)
10xTBE-Puffer	6 ml	6 ml
Aqua bidest.	23,5 ml	23 ml
10 % Ammoniumpersulfat (APS)	180 µl	350 µl
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	24 µl	15 µl

3.10.2. Direktsequenzierung von PAC-/BAC-DNA

Sowohl die PAC-/BAC-Enden des PAC-/BAC-Contigs als auch ein Teil der Promotorregion des KPNA2-Gens wurden mit Hilfe des *ABI PrismTM Big DyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* unter Verwendung des *ABI PrismTM 377* DNA Sequenzierautomaten direkt, das heißt ohne vorgeschaltete PCR, sequenziert. Für einen 20 µl Reaktionsansatz wurden 8 µl *Terminator Ready Reaction Mix*, 1 µg PAC-DNA aus einer Maxi-Präparation (vgl. Kap. 3.3.3.2., S. 35), 6 pmol Primer und Aqua bidest. ad 20 µl verwendet. Die Reaktion wurde in einem *GeneAmp PCR Cycler 2400/ 9600* von *Perkin Elmer* mit 0,2 ml PCR-Gefäßen nach folgenden Bedingungen durchgeführt:

1. Erhitzen der Proben auf 95 °C für 5 Minuten
2. 30 Zyklen mit Erhitzung
 - für 30 Sekunden auf 95 °C
 - für 10 Sekunden auf 53 °C
 - für 4 Minuten auf 60 °C
3. Abkühlung auf 4 °C und Lagerung bei 4 °C bis zur Fällung

Die Fällung der Sequenzierproben erfolgte mittels Ethanol/Natriumacetat Präzipitation. Dazu wurden die Proben in je ein 1,5 ml Reaktionsgefäß, welches 2 µl 3 M NaOAc (pH 4,6) und 50 µl 95 % EtOH enthielt, gegeben und nach gutem Durchmischen für 10 Minuten auf Eis gelagert. Nach einer Zentrifugation in einer *Eppendorf Tischzentrifuge 5415 C* bei 14000 min⁻¹ für 30 Minuten wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet mit 250 µl 70 % EtOH gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation in einer *Eppendorf Tischzentrifuge 5415 C* bei 14000 min⁻¹ für 10 Minuten und vorsichtiger Entfernung des Überstandes wurde das Pellet in einer Vakuumzentrifuge für 2-3 Minuten getrocknet und anschließend in 2,5 µl Formamid-Auftragspuffer resuspendiert. Der Auftragspuffer besteht aus fünf Teilen Formamid und einem Teil 25 mM EDTA (pH 8.0) mit 50 mg/ml Dextranblau. Vor dem Auftrennen der Proben auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel erfolgte die Erhitzung für 2 Minuten auf 95 °C und die anschließende Lagerung auf Eis. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des *ABI Prism 377* DNA Sequenzierautomaten unter Verwendung der *ABI DNA Sequencing Analysis Software*.