

3 Material und Methoden

3.1 Bezugsquellen für die verwendeten Geräte

- Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland): Oligonucleotide Synthesizer ABI 381A, DNA-Extraktor ABI 341, Dye Dideoxy Terminator DNA Sequencer ABI 377A, GENESCAN 672 Software für die hochauflösende Analyse der PCR-Produkte, Dye Dideoxy Terminator Sequence Reaction Kit, Sequence-Software "Sequence-Navigator"
- Beckman (Berlin): Spektralphotometer Modell Du-65
- BIO-RAD Laboratories (München): Vertikalelektrophoresekammern Mini-V 8x10 vertical gel, Horizontalgelelektrophoresekammern BIO-RAD DNA Sub-Cell, Spannungsquelle Model 200
- DS BioPrint (Frankreich): Video-Photodokumentation Version 6.21 ASV1
- Edwards (Crawley, England): Gefriertrockner Modell Freeze Dryer Modulyo und "5" Two Stage
- Flow Laboratories (Milano, Italien): Sterilbank Modell Gelaire BSB6
- GFL (Burgwedel, Deutschland): Schüttler Modell 3015
- Heidelberg Unix Sequence Analysis Resource (HUSAR) Release 4.0
- Heraeus (Berlin): Minifuge GL, Biofuge 13R
- Hewlett-Packard (Ratingen): High performance liquid chromatography HP1090
- Perkin Elmer (Norwalk, CT, USA): Heizblock Thermocycler 9600
- Privileg (Berlin): Mikrowellenherd 8520
- Shandon (Astmoor, England): Zytocentrifuge Modell Zytospin-2
- Stratagene (Heidelberg): Picofuge, UV-Stratalinker 1800
- Technomara (Fernwald, Deutschland): Pipettierhilfe Modell Pipetboy

3.2 Bezugsquellen für die verwendeten Chemikalien und das Verbrauchsmaterial

- Plastikware: Falcon (Heidelberg), Nunc (Wiesbaden-Biebrich), Nalgene (New York, USA)
- Salze/Gelelektrophorese: Merck (Darmstadt), BIO-RAD (München), Boehringer-Mannheim
- Reagenzien für die Polymerase-Kettenreaktion: AmpliTaq, Buffer II, MgCl₂ und AmpliWax: Perkin Elmer (Norwalk, CT, USA)

3.3 Kontrollgewebe

Als Negativkontrollen wurden 3 Zell-Linien mit B-Zell-Immunophänotyp (Namalva, Daudi und Raji von American Type Culture Collection, Atlanta, USA), 11 Gewebeproben reaktiver Lymphknotenveränderungen, 15 B-Non-Hodgkin-Lymphome und 10 normale Blutproben untersucht. Ferner wurden 16 entzündliche Hautläsionen analysiert, davon 12 mit der Diagnose einer Psoriasis vulgaris und 4 mit einer chronischen Dermatitis.

Als Positivkontrollen wurden 8 Zell-Linien mit T-Zell-Immunophänotyp Hut 102, MOLT4, Jurkat, DHL-1, Karpas, Del, MO-T, American Type Culture Collection, (Atlanta, USA) sowie PEER von Prof.K.Bartram (Ulm) untersucht.

Ferner wurden 18 periphere T-Zell-Lymphome mit bekannten und sequenzierten TCR- γ -Umlagerungen analysiert.

3.4 Maligne Lymphome der T-Zellreihe

Es wurden insgesamt Gewebeproben von 114 Patienten mit nach der R.E.A.L.-Klassifikation⁶ subtypisierten T-Zell-Lymphome molekulargenetisch analysiert. Es wurden 9 Vorläufer-T-lymphoblastische-Lymphome/Leukämien untersucht. In die Gruppe der peripheren nodalen T-Zell-Lymphome gehören 9 angioimmunoblastische T-Zell-Lymphome, 33 großzellige anaplastische Lymphome vom T- und Null-Zelltyp-Typ sowie 16 periphere nicht weiter spezifizierte T-Zell-Lymphome.

In die Gruppe der peripheren extranodalen T-Zell-Lymphome gehören 96 Proben von 23 Patienten mit kutanen T-Zell-Lymphomen (Haut, Blut und Lymphknoten). In

Zusammenarbeit mit der Hautklinik des UKBF wurden diese bezüglich ihrer Klonalität im Vergleich zum klinischen Verlauf/Staging über einen Zeitraum von vier Jahren untersucht. Ferner wurden 13 Proben von 4 Patienten mit intestinalen T-Zell-Lymphomen und 9 Fälle von nasalen NK/T-Zell-Lymphomen analysiert. Weiterhin wurden 11 Fälle des Morbus Hodgkin mit T-Zell-Phänotyp untersucht.

3.5 Histologie und Immunhistologie

Von jedem Biopsat wurde ein Teil in flüssigem Stickstoff schockgefroren und ein Teil Formalin-fixiert und in Paraffin eingebettet. Konventionell histologische Färbungen umfassten: Hämatoxylin-Eosin (HE), Giemsa (May-Grünwald-Giemsa), Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS).

Immunhistologische Färbungen wurden teils an Paraffin-eingebettetem, teils an frischem/schockgefrorenem Material durchgeführt. Es wurden 4 µm dicke Paraffinschnitte von jeweils einem Block angefertigt und nach der APAAP-Methode gefärbt⁴⁷. Die primären Antikörper waren gegen die β -Kette des TCR (Klon β F1, T-Cell Sciences, Cambridge, MA, USA), CD3 (CD3 Dako, Glostrup, Dänemark, polyklonal), CD4 (Klon: 1F6, Novocastra, Newcastle upon Tyne, England), CD8 (C8-144, von Dr.C.Gatter, John Radcliff Hospital, Oxford, England), CD45RO (OPD4, Dako), CD30 (Ber-H2, Dako), CD103 (BerAct 8, Dako) und TdT (terminale Desoxynukleotidyltransferase, polyklonal, Dako), gerichtet.

3.6 DNA-Extraktion

3.6.1 Automatische DNA-Isolierung aus Patientenfrischmaterial

Hochmolekulare genomische DNA wurde aus Patientenfrischmaterial (Lymphknotenbiopsien, Knochenmark, Haut- und Darmbiopsien) mit Hilfe eines automatischen DNA-Extraktors (Modell 340A, Applied Biosystems, Weiterstadt) gewonnen. Dabei wurden bis zu 1 cm³ große schockgefrorene Gewebeproben unter flüssigem Stickstoff zermörsert und direkt der maschinellen DNA-Extraktion zugeführt. Das Extraktionsprogramm und die Reagentien wurden nach Angaben des Herstellers ausgewählt und durchgeführt. Das Probenvolumen betrug maximal 3 ml. Nach Abschluß des Extraktionsprogrammes wurde die DNA mit 300-1000 µl 1x TE-Puffer (pH 8,0) unter Schütteln über Nacht von den Präzipipetten abgelöst und konnte nach abschließender Quantifizierung für molekulargenetische Analysen eingesetzt werden. Für die photometrische Messung der Nukleinsäurekonzentration wurde ein Aliquot entnommen und mit H₂O im Verhältnis 1:100 verdünnt.

3.6.2 DNA-Extraktion aus in Paraffin-eingebettetem Gewebe

Mit einem Mikrotom und Einmalmessern wurde in einem Labor, in dem keine PCR-Untersuchungen durchgeführt wurden, 3-5 Schnitte pro Paraffinblock mit einer Schnittdicke von 5-7 µm gewonnen und in ein steriles 1,5 ml Schraubdeckelröhrchen überführt. Zur Vermeidung von DNA-Verschleppung war es notwendig alle Mikrotomteile, die mit dem zu untersuchenden Gewebe in Berührung gekommen sind, zunächst mit Xylol und anschließend mit Ethanol zu reinigen. Die Arbeitsschritte der Entparaffinierung der Schnittpräparate und die DNA-Extraktion wurden in einem weiteren PCR-freien Raum durchgeführt. Folgende Arbeitsschritte wurden dabei durchgeführt:

1. Entwachsen der Paraffinschnitte mit 1 ml Xylol pro Ansatz (1,5 ml Schraubdeckelröhrchen mit 3-5 Schnitten), 10 Minuten zentrifugieren bei 14000 Upm,
2. Wiederholung des Entparaffinierungsschrittes mit Xylol nachdem der Überstand vorsichtig abpipetiert wurde,

3. Weitere Entparaffinierung mit Ethanol (96 %, v/v) und anschließendem zentrifugieren,
4. Abschließende Waschung mit Ethanol (90 %, v/v),
5. Entfernung des Ethanolüberstandes, Trocknung des Pellets für 15-30 Minuten in einer Vakuumzentrifuge und anschließende Inkubation über Nacht bei 37°C mit Proteinase K (10 mg/ml Proteinase in Lysis-Buffer, Applied Biosystems),
6. Resuspension des Pellet in 100 µl PCR-Puffer,
7. Zentrifugieren des Ansatzes für 10 Minuten bei 14000 Upm,
8. DNA-Konzentrationsbestimmung des Überstandes gegen den PCR-Puffer als Lösungsmittelleerwert.

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration der Paraffin-DNA-Extrakte wurde ein Aliquot mit H₂O im Verhältnis 1:50 verdünnt (1:100 bei sehr großer DNA-Konzentration).

3.6.3 Isolierung mononukleärer Zellen (Ficoll-Gradient)

Die Isolierung von mononukleären Zellen aus heparinisiertem Vollblut erfolgte mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation. Dazu wurde zunächst das Blut mit PBS oder 0,9 %iger (w/v) NaCl-Lösung im Verhältnis 1:2 verdünnt. In ein steriles 50 ml Zentrifugenröhrchen wurden 15 ml einer auf Raumtemperatur erwärmten Ficoll-Hypaque-Trennlösung vorgelegt und vorsichtig mit dem verdünnten Blut überschichtet. Die Volumina konnten je nach Ausgangsvolumen des Blutes variiert werden. Es erfolgte nun die Trennung durch Zentrifugieren bei 1200 g für 45 Minuten bei Raumtemperatur. Die in der Interphase (weißliche Schicht) zwischen Plasma und Trennlösung angereicherten Lymphozyten (70-100 % Anreicherung) wurden mit einer Pasteur-Pipette abgehoben und zweimal mit PBS oder 0,9 %iger (w/v) NaCl-Lösung gewaschen:

1. Waschung für 10 Minuten bei 300 x g (20 °C)
2. Waschung für 10 Minuten bei 200 x g (4 °C)

Das Zellpellet konnte nun direkt zur Nukleinsäure-Isolierung eingesetzt werden oder bis dahin bei -20 °C gelagert werden.

3.7 Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wird eine 1:100 Verdünnung der jeweiligen Präparation hergestellt und gegen das gleiche Volumen der Verdünnungslösung in Quarz-Küvetten bei λ 260nm (A_{260}) gemessen. Es wird jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Die DNA-Konzentration wird photometrisch bestimmt. Bei λ 260nm entspricht ein gemessener

Absorptionswert von 1 bei 1cm Schichtdicke einer Konzentration von ungefähr (Lambert-Beer-Gesetz: $E = \epsilon \times c \times d$, wobei ϵ der molare Absorptionskoeffizient und d die Schichtdicke ist)

- a) 50 $\mu\text{g/ml}$ für Doppelstrang-DNA, und
- b) 33 $\mu\text{g/ml}$ für Einzelstrang-DNA (z.B. Primer).

3.8 Entwicklung einer PCR-Methode zum Nachweis von Umlagerungen der TCR- β -Kette

3.8.1 Kriterien für die Primerauswahl

Die Suche nach passenden Primersequenzen wurde manuell vorgenommen. Dabei wurden folgende Kriterien berücksichtigt:

1. Es wurden alle bekannten V- und J-Segmente berücksichtigt.
2. Die Primer haben eine sehr hohe Spezifität, im Falle der J-Primer haben sie sogar eine 100 %-ige Homologie zur Zielsequenz.
3. Um möglichst ähnliche optimale Reaktionsbedingungen zu erreichen, wurden vergleichbare Primerlängen (17-25 Basen) und CG-Anteile (55 +/- 10 %) kombiniert.

3.8.2 Primersynthese

Die Primer wurden initial mit einem DNA-Synthesizer (solid phase oligonucleotid synthesizer ABI 381A) hergestellt. Die Herstellung erfolgte mit den Chemikalien und den

Syntheszyklen der Firma Applied Biosystems im 0,2 μMol Maßstab. In späteren Stadien wurden die Primer kommerziell von der Firma TibMolbiol erworben.

3.8.3 Aufreinigung der Oligonukleotide mittels HPLC

Zur Durchführung einer PCR ist eine hohe Reinheit der eingesetzten Oligonukleotide notwendig, da alle kürzeren Syntheseprodukte in den Anlagerungsprozeß miteinbezogen werden können. Zur Aufreinigung von Oligonukleotiden besitzt die RP-HPLC (Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography) größte Reinheit bei geringen Verlusten.

Das Prinzip der Trennung von Oligonukleotiden mit Hilfe der RP-HPLC beruht auf der Wechselwirkung der hydrophoben DMT-Schutzgruppe am C5-Atom der Desoxyribose mit den unpolaren Alkylresten des Säulenmaterials. Diese Wechselwirkung zwischen den gebundenen Molekülen und dem Säulenmaterial wird durch den ansteigenden Gehalt eines polaren Eluenten (Acetonitril) während der Chromatographie aufgehoben. Je schwächer die Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial, d.h. je weniger hydrophob das gebundene Molekül ist, desto geringer ist die notwendige Konzentration an polarem Eluent für die Aufhebung dieser Wechselwirkung. Im Chromatogramm erscheinen deshalb die am wenigsten hydrophoben Komponenten zuerst. Der Einfluß der DMT-Schutzgruppe auf die Gesamthydrophobizität nimmt mit steigender Länge des Oligonukleotids ab.

3.8.4 Optimierung der PCR-Bedingungen

Die optimalen Reaktionsbedingungen wurden durch Austestung unterschiedlicher Magnesiumchlorid- und Primerkonzentrationen, Annealingtemperaturen, Reaktionszeiten und Zykluszahlen an Zelllinien mit bekannten TCR- β -Umlagerungen (Hut-102, MOLT4, Jurkat und DHL-1) ermittelt.

3.8.5 Kontrollexperimente

In jedem PCR-Ansatz wurde eine monoklonale Positivkontrolle (T-Zell-Linie), eine Kontrolle mit polyklonalen T-Zellen (normales Tonsillengewebe) und mindestens einer

Negativkontrolle (Wasser) untersucht.

Die Sensitivität wurde ermittelt, indem DNA der T-Zell-Linie Hut 102 und MOLT4 mit DNA von normaler menschlicher Tonsille verdünnt wurde.

Sowohl die Klonalität als auch die Amplifikatgröße wurde mittels konventioneller Polyacrylamidgelelektrophorese und zusätzlich mit der hochauflösenden GENESCAN-Technik ermittelt. Ferner wurden die Ergebnisse der GENESCAN-Technik durch die Sequenzierung klonaler PCR-Produkte bestätigt.

Der hier vorgestellte PCR-Nachweis von TCR- β -Gen-Umlagerungen wurde mit einem PCR-Nachweis für Umlagerungen des TCR- γ -Kettengens verglichen. Hierfür wurden 203 Proben von 78 Patienten mit reaktiven und malignen T-Zell-Läsionen untersucht: 96 Proben von 23 Patienten mit kutanem T-Zell-Lymphom, 12 anaplastisch großzellige T-Zell-Lymphome, 11 nicht weiter spezifizierte periphere T-Zell-Lymphome, 9 Vorläufer lymphoblastische Lymphome/Leukämien, 3 angioimmunoblastische T-Zell-Lymphome und 11 Proben von 4 Patienten mit intestinalem T-Zell-Lymphom. Als reaktive Läsionen wurden 12 Proben von Patienten mit einer Psoriasis vulgaris sowie 4 Proben von Patienten mit einer unspezifischen Dermatitis untersucht.

3.9 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Vertikale Polyacrylamidgelelektrophoresen dienen der analytischen und präparativen Auftrennung von PCR-Fragmenten. Die Elektrophoresen wurden in "Minigel"-Kammern mit einer Trennstrecke von maximal 10 cm durchgeführt. Zur Größenbestimmung der Amplifikate wurde bei jeder Polyacrylamidgelelektrophorese eine Spur (Lane) mit 1 μ g eines Größenstandards mitgeführt (1kb-Leiter, Gibco/BRL, Berlin).

Zur Beschwerung der Proben und zur Markierung der Lauffront im Gel wurden die Proben mit 0,1 Volumen Auftragspuffer versetzt. Die analytischen Elektrophoresen wurden standardmäßig bei 200 V für 45 min und die präparativen Elektrophoresen bei 100 V für 90 min unter Verwendung von TBE als Laufpuffer durchgeführt.

3.9.1 Herstellung eines Polyacrylamidgels

Zur Auftrennung von Amplifikaten wurden 6%ige Polyacrylamidgele benutzt.

10x TBE-Puffer

Tris-Base	0,9	M
Borsäure	0,9	M
Na-EDTA	0,02	M

6% Acrylamid-Gellösung

TBE (s. oben)	1	x
Acrylamid/Bis (19:1)	6	Gew. %
APS	0,001	M
TEMED	0,001	M

10x Orange G-Ladepuffer

Ficoll 400	30	% v/v
EDTA, pH 8,0	0,01	M
Orange G	0,002	% v/v
deionisiertes Formamid	ca. 70	% v/v

- Luftblasenfreies Gießen des Gels

3.9.2 Photodokumentation

Zum Zweck der Visualisierung der DNA-Fragmente unter UV-Licht (230 nm) wurden die Acrylamidgele für 2 Min. in einer 0,2%igen Ethidiumbromidlösung geschwenkt. DNA-Fragmente konnten aufgrund der Fluoreszenz des in die Nukleinsäuren interkalierten Ethidiumbromids nach elektrophoretischer Auftrennung detektiert werden. Die Gele wurden zu diesem Zweck auf einem UV-Transluminator (230 nm) durchleuchtet und zur Dokumentation photographiert (Bioprint DS, Frankreich).

3.10 Sequenzanalyse der Amplifikate

Um die Spezifität und die klonspezifischen Sequenzen zu ermitteln, wurden die klonalen PCR-Produkte von 36 T-Zell-Lymphomen und 3 T-Zell-Linien direkt sequenziert. Deutlich sichtbare DNA-Banden wurden jeweils direkt im Anschluß an die Ethidiumbromidfärbung

aus dem Polyacrylamidgel mit einem sterilen Skalpell vorsichtig herauspräpariert. Jedes einzelne Gelstück wurde in ein steriles Eppendorf-Gefäß überführt und mit 30µl destilliertem Wasser versetzt. Die Eluation erfolgte über mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur. 5-15µl des Überstandes wurden der Sequenzreaktion zugeführt.

3.10.1 Sequenzreaktion

Die aufgereinigten Amplifikate wurden mit einem modifizierten Verfahren der Didesoxynukleotid-Kettenabbruchmethode nach Sanger⁴⁸ sequenziert, bei dem dNTPs und ddNTPs im Reaktionsgemisch enthalten sind. Es wurde ein *Cycle Sequencing* durchgeführt, bei dem nur *ein* Primer eingesetzt wird, der sich an das zu sequenzierende DNA-Fragment anlagert und durch die DNA-Polymerase verlängert wird. Wenn ein ddNTP in die neusynthetisierte DNA eingebaut wird, so führt dies aufgrund der fehlenden OH-Gruppe am C3-Atom zum Kettenabbruch. Bei dem hier angewandten Sequenzierungssystem (ABI, Weiterstadt) sind die eingesetzten ddNTPs mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, wobei jeder Base ein bestimmter Farbstoff zugeordnet ist. Damit ist jedes neu synthetisierte DNA-Molekül am Kettenende mit einem Farbstoff markiert, der eine bestimmte Base repräsentiert. Durch eine anschließende Acrylamid-Gelelektrophorese werden die Sequenzprodukte der Größe nach aufgetrennt. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden durch Laserlicht angeregt, das emittierte Licht wird detektiert und daraus die Basenabfolge des Amplifikates ermittelt.

Von jedem Amplifikat werden in zwei getrennten Sequenzreaktionen Strang und Gegenstrang sequenziert (mit dem sense-Primer und dem antisense-Primer). Die beiden Sequenzen sind komplementär zueinander und enthalten die klonspezifische V-N-D-N'-J-Sequenz. Da die Fluoreszenzfarbstoffe lichtempfindlich sind, werden die Reaktionen im Halbdunkeln durchgeführt.

6,5%iges Sequenzgel:

Harnstoff	30	g
Ionen-Austauscher (AG 501-X8, Bio Rad)	1	g
Acrylamid/Bis 40 % (19:1)	9,75	ml
Aqua dest.	14	ml
Lösen bei 50 °C, Sterilfiltration (Nalgene-Filter)		
10x TBE (sterilfiltriert),	6	ml
Aqua dest.	ad 60	ml

Nach dem Hinzufügen der Polymerisations-Starter APS und TEMED wurde die Lösung kurz geschwenkt und zügig zwischen die Gelplatten gegossen. Vor dem Auftragen der Proben wurde das Sequenzgel mit einem 50-minütigen Vorlauf bei 1200 V, 30 W und 40° C vorbereitet.

Sequenzansatz:

DNA (Amplifikat)	5- 15	ng/µl
Primer (sense oder antisense)	2- 12	ng/µl (wie im PCR-Protokoll)
Premix (ABI)	1 x	

Der Premix des "Prism Ready Reaction Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit" (ABI, Weiterstadt) enthält TACS-Puffer, dNTPs, Dye Deoxy A, -C, -G, -T und AmpliTaq DNA-Polymerase.

Sequenzreaktions-Bedingungen im Thermocycler:

1. 96 °C 15 Sek. (Denaturierung)
2. 45 °C 15 Sek. (Anlagerung)
3. 60 °C 4 Min. (Kettenverlängerung)
4. → 25 mal Wiederholung der Schritte 1 bis 3

Nach der Sequenzreaktion und vor der Auftrennung im Sequenzgel wurden die nicht eingebauten fluoreszierenden ddNTPs extrahiert:

- zu jedem Sequenzansatz 80 µl Aqua dest. und 100 µl Phenol/Chloroform/H₂O (ABI, Weiterstadt) geben
- vortexen, 5 Min. mit 15000 rpm bei RT zentrifugieren (Biofuge A, Heraeus)
- Phenolphase entfernen, erneut mit Phenol/Chloroform/H₂O extrahieren
- die wässrige Phase mit 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 300 µl Ethanol abs. präzipitieren und 30 Min. bei 15000 rpm in RT zentrifugieren
- Probe mit Ethanol 70% waschen und trocknen
- das DNA-Pellet in 4 µl Formamid/EDTA (deionisiertes Formamid 80 % v/v und 50 mM EDTA, pH 8; 20 % v/v) resuspendieren
- 2 Min. bei 90 °C inkubieren, kurz zentrifugieren (Picofuge Stratagene), auf Eis stellen
- Die Auftrennung der Sequenzproben dauerte unter den gleichen Bedingungen wie der Vorlauf 4 Stunden. Zur Kontrolle der Sequenzreaktion und Gelqualität wurde stets ein Plasmid (pGEM) mitsequenziert.

3.10.2 Auswertung der Sequenzen

Die resultierenden DNA-Sequenzen wurden mit Hilfe des DNA-Analyse Programms *Sequence-Navigator* der Firma Applied Biosystems auf einem Applerechner bearbeitet. Die bereinigten Konsensussequenzen wurden mit den in einer Genbank (HUSAR, IMGT:<http://imgt.cnus.fr:8104/dnaplot>⁴⁹) gespeicherten bekannten Nukleotidsequenzen von Keimbahn-Gensegmenten der Variablen und Junktionsregionen verglichen.

3.11 Analyse von PCR-Produkten (GENESCAN-Analyse)

Die Analyse der Fluoreszenzfarbstoff-markierten PCR-Produkte erfolgte über die elektrophoretische Auftrennung und Fluoreszenzdetektion in einem automatischen DNA-Sequencer (Modell 373A) der Firma Applied Biosystems/Perkin Elmer Cooperation, Weiterstadt. Durch den Einbau eines am 5'-Ende markierten Oligonukleotidprimers während der Reamplifikation der PCR, wurden Fluoreszenzfarbstoff-markierte PCR-Produkte generiert. Zur Primermarkierung wurde im Rahmen dieser Arbeit der Farbstoff 6-FAM (6-

Carboxyfluorescein) eingesetzt. Die übrigen Parameter wurden wie bei der nicht-Fam-markierten Reamplifikation beibehalten. Um überhängende einzelne Adeninbasen, die durch den fehlerhaften Einbau am 3'-Ende entstehen (sog. "Taq-Fehler"), zu vermeiden, wurde die Extensionszeit im letzten PCR-Zyklus auf 45 Minuten verlängert.

Um die Länge der DNA-Fragmente unabhängig von der Position bzw. Variationen des Laufverhaltens von Spur zu Spur im Gel bestimmen zu können, wurde in jede einzelne Spur ein kommerziell erhältlicher interner Längenstandard mitaufgetragen, der sich farblich von den zu analysierenden Fragmenten unterscheidet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Längenstandard verwendet, der mit dem roten Farbstoff ROX (6-Carboxyrhodamin X) markiert war. Die korrekte Größenzuordnung und die Quantifizierung der Fluoreszenzsignale erfolgte über die Datenverarbeitung mit dem Computerprogramm "GENESCAN 672".

3.11.1 Vorbereitung der Gelelektrophorese

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem denaturierenden Polyacrylamidgel, dessen Zusammensetzung der Tab. 2 zu entnehmen ist. Zur Herstellung der Gellösung wurde zunächst der Harnstoff unter Erwärmung auf 50-60 °C und ständigem Rühren in den entsprechenden Volumina der Polyacrylamid-Lösung, TBE-Puffer und Wasser vollständig gelöst. Diese Lösung wurde durch einen Einmalsterilfilter (0,2 µm) filtriert und für ca. 5 Minuten entgast. Nach vorsichtiger Durchmischung dieser Lösung mit TEMED und APS wurde das Gel sofort luftblasenfrei gegossen. Da für die Detektion von Fluoreszenzsignalen spezielle Reinheitskriterien an die verwendeten Glasplatten gestellt werden müssen, wurden diese mit einem alkalischen Detergenz gründlich gereinigt, kurz mit 90 % (v/v) Isopropanol abgespült, getrocknet und anschließend möglichst staubfrei zusammengesetzt. Bei allen Arbeitsschritten wurden Einweghandschuhe getragen. Nachdem die Gellösung zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen war, wurde wahlweise ein Kamm zur Formung von 24 bzw. 36 Geltaschen eingesetzt. Der Polymerisierungsprozeß war nach 2 Stunden beendet und das Gel nach Kontrolle bzw. erneuter Säuberung der Glasplattenaußenflächen einsatzbereit.

Tab. 2: Zusammensetzung der denaturierenden Polyacrylamidgele:

	24-cm Gel
Acrylamid-Lsg. 40 % (w/v)	9 ml
Harnstoff	30g
10x TBE-Puffer	6 ml
H ₂ O	ad 60 ml
APS-Lsg., 6 % (w/v)	300 µl
TEMED	24 µl

3.11.2 Probenvorbereitung für die Elektrophorese

Abhängig von der Stärke des Amplifikates wurden die PCR-Produkte entweder unverdünnt oder mit H₂O verdünnt zu einem Gelauftragspuffer im Verhältnis 1:1 gemischt. Zu jedem Ansatz wurde 0,5 µl interner Längenstandard hinzugefügt (Rox 500). Nachdem das PCR-Produkt hinzugefügt wurde, folgte eine Denaturierung des Gemisches für 2 min bei 90° C im Wasserbad.

Gelauftragspuffer:

Formamid	5 Volumen
EDTA, 50 mM, pH 8,0	1 Volumen
Dextranblau	1 Spatelspitze

Tab. 3 Elektrophoresebedingungen bzw. Standardeinstellungen:

	24-cm Gel
Spannung	1500-1700 V
Stromstärke	30 mA const.
Leistung	30 W
Temperatur	26-28° C
PMT	630-645 V
Elektrophoresedauer	6-12 Stunden

3.11.3 Größenbestimmung von DNA-Fragmenten

Die automatische Analyse von DNA-Fragmenten erfolgte in einem denaturierenden hochauflösenden Polyacrylamidgel mit Hilfe eines internen Längenstandards. Die korrekte Größenzuordnung und die Quantifizierung der Fluoreszenzsignale erfolgte über die Datenverarbeitung mit dem Computerprogramm "GENESCAN 672". Die bekannten Fragmentlängen des Standards dienten zur Erzeugung einer Kalibrierungskurve. Mit Hilfe dieser Kurven wurde durch Extrapolation die Längen unbekannter PCR-Produkte im Bereich von 40-1000 Basen bis auf eine Base genau bestimmt. Die Genauigkeit der Längenbestimmung liegt dabei laut Herstellerangaben bei über 95 %.