



universität  
wien

# MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Optimierung von DNA-Extraktionsmethoden für  
langzeit-konservierte Gewebspräparate“

verfasst von / submitted by

Nicole Zack BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of  
Master of Science (MSc)

Wien, 2023 / Vienna 2023

Studienkennzahl lt. Studienblatt /  
degree programme code as it appears on  
the student record sheet:

A 066 862

Studienrichtung lt. Studienblatt /  
degree programme as it appears on  
the student record sheet:

Masterstudium Chemie

Betreut von / Supervisor:

Univ.-Prof. Mag. Dr. Margit Cichna-Markl



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen Personen bedanken, die mich sowohl während meiner Masterarbeit, als auch im Zuge meines gesamten Studiums unterstützt und somit dieses Etappenziel meines Lebens ermöglicht haben.

Zunächst gilt mein Dank meiner Betreuerin Univ.-Prof. Mag. Dr. Margit Cichna-Markl, die mir die Möglichkeit bot an diesem interessanten Thema zu arbeiten, welches mich von der ersten Sekunde an begeisterte. Durch ihre stetige Unterstützung war es mir eine große Freude Teil ihrer Arbeitsgruppe sein zu dürfen.

Ebenfalls möchte ich meinen Dank an Christina Wagner MSc aussprechen, welche sich die Zeit nahm, mich zu Beginn dieser Studie praktisch einzuschulen und mich dabei mit allen Tipps und Tricks versorgte, die es mir ermöglichten mich schnell in meine Laborroutine einzufinden.

Weiters möchte ich mich bei allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe für die Unterstützung zur Entwicklung meiner Masterarbeit bedanken. Durch die herzliche, familiäre und respektvolle Atmosphäre stieg die Motivation von Tag zu Tag. Vor allem möchte ich Katja Zappe MSc danken, welche mir, neben Frau Univ.-Prof. Mag. Dr. Margit Cichna-Markl, besonders im Labor mit Rat und Tat zur Seite stand.

Abschließend geht ein großes Dankeschön an meine Familie, die mich zu jeder Zeit und in jeglicher Form innerhalb sowie abseits meines gesamten Studiums unterstützte und immer für mich da ist.



## Abkürzungsverzeichnis

|                 |  |
|-----------------|--|
| °C              | Grad Celsius                                     |
| %               | Prozent  |
| A               | Adenin   |
| Abb.            | Abbildung  |
| abs.            | absolut  |
| AKH             | Allgemeines Krankenhaus                          |
| APS             | Adenosin-5'-phosphosulfat                        |
| AMP             | Adenosinmonophosphat                             |
| ATP             | Adenosintriphosphat                              |
| btn             | biotinyliert                                     |
| bp              | Basenpaare                                       |
| bzw.            | beziehungsweise                                  |
| C               | Cytosin  |
| c               | Konzentration                                    |
| CO <sub>2</sub> | Kohlendioxid                                     |
| C <sub>t</sub>  | Threshold Cycle (= Schwellenwert-Zyklus)         |
| CTAB            | Cetyltrimethylammoniumbromid                     |
| dF/dT           | 1. Ableitung der Fluoreszenz nach der Temperatur |
| DNA             | Desoxyribonukleinsäure                           |
| dNMP            | Desoxynukleosid-Monophosphat                     |
| dNTP            | Desoxynukleosid-Triphosphat                      |
| dsDNA           | doppelsträngige DNA                              |
| E               | Extinktion                                       |
| et al.          | et alii/aliae/aliam (Deutsch: und andere)        |
| EtOH            | Ethanol  |
| F1/F2/F3        | Fötus1/2/3                                       |
| FF              | Formalin-fixiert                                 |
| FFPE            | Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet            |

|                   |  |
|-------------------|--|
| fw                | Vorwärts-läufig  |
| G                 | Guanin   |
| h                 | Stunde   |
| H <sub>2</sub> O  | Wasser   |
| HCC827 Erlo       | humane Lungenkrebszelllinie, resistent gegen Erlotinib |
| HRM               | High Resolution Melting (= hochauflösendes Schmelzen)  |
| Kap.              | Kapitel  |
| kb                | Kilo Base  |
| LMW               | Low Molecular Weight                                   |
| LOD               | Nachweisgrenze   |
| m                 | Meter  |
| mg                | Milligramm   |
| MgCl <sub>2</sub> | Magnesiumchlorid                                       |
| MGMT              | O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase                  |
| min               | Minute   |
| mL                | Milliliter   |
| MM                | Mastermix  |
| mM                | Millimolar   |
| n.a.              | nicht amplifizierbar                                   |
| NaCl              | Natriumchlorid   |
| NaOH              | Natriumhydroxid  |
| nm                | Nanometer  |
| NTC               | no Template Control (= Negativkontrolle)               |
| O <sub>2</sub>    | Sauerstoff   |
| ODC               | Otozephalie-Dysgnathia Komplex                         |
| <i>OTX2</i>       | <i>Orthodenticle homeobox 2</i>                        |
| <i>PAX9</i>       | <i>Paired box 9</i>                                    |
| PBS               | Phosphat-gepufferte Salzlösung                         |
| PC                | Phenol-Chloroform                                      |

|                               |                                  |
|-------------------------------|----------------------------------|
| PCR                           | Polymerase-Kettenreaktion        |
| PP <sub>i</sub>               | Pyrophosphat                     |
| Prot.K                        | Proteinase K                     |
| <i>PRRX1</i>                  | <i>Paired related homeobox 1</i> |
| PSQ                           | Pyrosequenzierung                |
| R.DX                          | Reagenz DX                       |
| rpm                           | Umdrehungen pro Minute           |
| RT                            | Raumtemperatur                   |
| rt-PCR                        | Real-time PCR                    |
| rv                            | Rückwärts-läufig                 |
| sec                           | Sekunde                          |
| seqPrimer                     | Sequenzierprimer                 |
| <i>SHH</i>                    | <i>Sonic hedgehog</i>            |
| SNP                           | Einzel-Nukleotid-Polymorphismus  |
| SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> | Sulfat                           |
| T                             | Temperatur                       |
| T <sub>a</sub>                | Annealing-Temperatur             |
| Tab.                          | Tabelle                          |
| <i>Taq</i>                    | <i>Thermus aquaticus</i>         |
| TBE                           | TRIS-Borat-EDTA                  |
| T <sub>m</sub>                | Schmelztemperatur                |
| TRIS                          | Tris(hydroxymethyl)aminomethan   |
| V                             | Variation                        |
| W.S.                          | Working Solution                 |
| µg                            | Mikrogramm                       |
| µL                            | Mikroliter                       |
| z.B.                          | zum Beispiel                     |





# ***Inhaltsverzeichnis***

|   |    |
|---|----|
| 1. Einleitung .....   | 1  |
| 1.1. Der Narrenturm .....   | 1  |
| 1.2. Otozephalie-Dysgnathia Komplex .....                                       | 2  |
| 1.3. Fixierungsmethoden.....  | 4  |
| 1.3.1. Formalin-Fixierung .....   | 4  |
| 2. Ziele .....  | 7  |
| 3. Theorie.....   | 8  |
| 3.1. Desoxyribonukleinsäure .....   | 8  |
| 3.1.1. Struktur und Eigenschaft der DNA .....                                   | 8  |
| 3.1.2. Extraktionstechniken .....   | 9  |
| 3.1.2.1. Phenol-Chloroform Extraktion .....                                     | 10 |
| 3.1.2.2. Extraktion mit Spin Säulen .....                                       | 10 |
| 3.1.3. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung .....                            | 11 |
| 3.1.3.1. Qubit®-Fluorometer.....  | 11 |
| 3.1.3.2. NanoDrop .....   | 11 |
| 3.2. Polymerase-Kettenreaktion .....  | 12 |
| 3.2.1. Bausteine einer PCR.....   | 12 |
| 3.2.2. Prinzip der PCR .....  | 13 |
| 3.2.3. Real-time / Echtzeit - PCR .....   | 14 |
| 3.2.3.1. Quantitative Analyse .....   | 14 |
| 3.2.3.2. Qualitative Analyse .....  | 15 |
| 3.2.3.2.1. Agarose-Gelelektrophorese.....                                       | 15 |
| 3.2.3.2.2. Hochauflösende Schmelzkurvenanalyse .....                            | 15 |
| 3.2.3.2.3. Pyrosequenzierung .....  | 17 |
| 4. Experimenteller Teil .....   | 19 |
| 4.1. Gewebsmaterial .....   | 19 |
| 4.1.1. Probenahme .....   | 19 |
| 4.2. Homogenisierung der Gewebeproben .....                                     | 20 |
| 4.3. DNA-Extraktionsprotokolle .....  | 21 |
| 4.3.1. QIAamp DNA Mini Kit.....   | 22 |
| 4.3.1.1. Modifikation des QIAamp DNA Mini Kits Extraktionsprotokolls .....      | 22 |
| 4.3.2. QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.....  | 23 |
| 4.3.2.1. Modifikation des QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Extraktionsprotokolls .... | 24 |

|          |  |    |
|----------|--|----|
| 4.3.3.   | Phenol-Chloroform Extraktion .....   | 25 |
| 4.3.3.1. | Modifikation des Phenol-Chloroform Extraktionsprotokolls.....  | 26 |
| 4.3.4.   | Hot Alkali Extraktion.....   | 27 |
| 4.3.4.1. | Modifikation des Hot Alkali Extraktionsprotokolls .....  | 27 |
| 4.4.     | Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der isolierten DNA .....   | 31 |
| 4.4.1.   | Qubit® - Fluoreszenzmessung.....   | 31 |
| 4.4.2.   | NanoDrop - Messung.....  | 32 |
| 4.5.     | Durchführung und Optimierung der rt-PCR Versuche .....   | 32 |
| 4.5.1.   | Primer - Design und Optimierung.....   | 32 |
| 4.5.2.   | Untersuchung der Amplifizierbarkeit durch den Einsatz verschiedener<br>Mastermix-Ansätze .....                   | 33 |
| 4.5.3.   | Überprüfung des Einflusses von RNaseA auf die Amplifizierbarkeit der DNA-<br>Extrakte. ....                      | 35 |
| 4.5.4.   | Überprüfung auf DNA-Polymerase-hemmende Substanzen in den DNA-<br>Extrakten.....                                 | 35 |
| 4.5.5.   | Optimierung der Primer- und MgCl <sub>2</sub> - Konzentrationen zur Verbesserung der<br>PCR- Amplifikation ..... | 36 |
| 4.5.6.   | Anwendung auf die DNA von langzeit-konservierten, fetalen Gewebeproben   | 36 |
| 4.5.7.   | Auswertung der PCR-Daten.....  | 38 |
| 4.6.     | Experimente mittels Agarose-Gelelektrophorese .....  | 38 |
| 4.6.1.   | Überprüfung der Richtigkeit der erhaltenen PCR-Produkte .....  | 38 |
| 4.6.2.   | Bestimmung der Integrität von DNA-Extrakten.....   | 39 |
| 4.7.     | Pyrosequenzierung .....  | 39 |
| 4.7.1.   | PCR-Amplifikation mit biotinylierten Primern zur Vorbereitung auf die PSQ-<br>Analyse.....                       | 39 |
| 4.7.2.   | PSQ-Durchführung .....   | 40 |
| 4.7.3.   | Auswertung der PSQ-Daten.....  | 41 |
| 5.       | Ergebnisse und Diskussion .....  | 42 |
| 5.2.     | DNA-Extraktion mit dem QIAamp DNA Mini Kit.....  | 47 |
| 5.2.1.   | Konzentrations- und Reinheitsbestimmung .....  | 48 |
| 5.2.2.   | Überprüfung der Amplifizierbarkeit .....   | 49 |
| 5.3.     | DNA-Extraktion mit dem QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.....   | 52 |
| 5.3.1.   | Konzentrations- und Reinheitsbestimmung .....  | 53 |
| 5.3.2.   | Überprüfung der Amplifizierbarkeit .....   | 54 |
| 5.4.     | DNA-Extraktion mit der Phenol-Chloroform Methode .....   | 56 |
| 5.4.1.   | Konzentrations- und Reinheitsbestimmung.....   | 56 |

|                       |   |     |
|-----------------------|---|-----|
| 5.4.2.                | Überprüfung der Amplifizierbarkeit .....  | 57  |
| 5.5.                  | DNA-Extraktion mit der Hot Alkali Methode .....   | 59  |
| 5.5.1.                | Konzentrations- und Reinheitsbestimmung .....   | 60  |
| 5.5.2.                | Überprüfung der Amplifizierbarkeit .....  | 66  |
| 5.6.                  | Versuche zur Verbesserung der Amplifizierbarkeit .....  | 72  |
| 5.6.1.                | Einfluss der RNaseA auf die Amplifizierbarkeit von DNA-Extrakten .....  | 72  |
| 5.6.2.                | Einfluss der Primer- und MgCl <sub>2</sub> Konzentration auf die Amplifizierbarkeit .....                               | 73  |
| 5.6.3.                | Untersuchung der Integrität von PCR-Produkten mittels Agarose-Gelelektrophorese .....                                   | 74  |
| 5.6.4.                | Untersuchung auf Inhibition der DNA-Polymerase aufgrund störender Substanzen in den DNA-Extrakten .....                 | 76  |
| 5.7.                  | Pyrosequenzierung .....   | 77  |
| 5.7.1.                | PCR-Amplifikation mit biotinyliertem Primer zur Vorbereitung auf die PSQ-Analyse .....                                  | 77  |
| 5.7.2.                | Ergebnisse der PSQ-Analyse .....  | 81  |
| 6.                    | Schlussfolgerungen .....  | 85  |
| 7.                    | Equipment .....   | 88  |
| 7.1.                  | Chemikalien und Kits .....  | 88  |
| 7.1.1.                | Herstellung von Lösungen .....  | 89  |
| 7.2.                  | Apparaturen .....   | 90  |
| 7.3.                  | Verbrauchsmaterialien .....   | 91  |
| 7.4.                  | Software .....  | 91  |
| 8.                    | Tabellenverzeichnis .....   | 92  |
| 9.                    | Abbildungsverzeichnis .....   | 95  |
| 10.                   | Literaturverzeichnis .....  | 99  |
| Anhang .....          |   | 104 |
| A.                    | Herstellung des Mastermixes (MM) mit dem Hot Start Q5U-Polymerase MM für die PCR-Analysen samt Temperaturprogramm ..... | 104 |
| B.                    | Herstellung des Mastermixes (MM) mit dem EpiTect HRM PCR MM für die PCR-Amplifikation vor der PSQ-Analyse .....         | 105 |
| Zusammenfassung ..... |   | 106 |
| Abstract .....        |   | 107 |



# 1. Einleitung

Die Bereitstellung von langzeit-konserviertem, Formalin-fixiertem (FF) Gewebe aus pathologisch-anatomischen Sammlungen spielt bis heute eine bedeutende Rolle für die Humangenomik. [1] Die pathologische Einrichtung mit der weltweit größten Kollektion von rund 50 000 Präparaten ist der Wiener Narrenturm. Die Sammlung im Narrenturm umfasst eine Vielzahl an FF Feuchtpräparaten, welche unschätzbare Ressourcen für genomische Studien darstellen, sei es zur Genexpressionsanalyse, Mikrobiomforschung oder für Mutationsanalysen. Die Identifizierung und Validierung von Biomarkern zur Erkennung seltener Erkrankungen, wie z.B. von Otozephalie-Dysgnathia, ist ein weiteres wichtiges Forschungsgebiet, für welches sich FF Proben hervorragend eignen. [1,2,3]

Bedauerlicherweise bringt die langfristige Lagerung in wässriger Formaldehydlösung eine analytische Herausforderung zur Gewinnung intakter, genomischer Desoxyribonukleinsäure (DNA) mit sich. Aufgrund des elektrophilen Charakters des Fixatives entstehen Quervernetzungen zwischen Proteinen und der DNA, was in weiterer Folge zum Stabilitätsverlust der doppelsträngigen (ds) DNA und somit zur ihrer Denaturierung führen kann. Des Weiteren wird häufig eine Schädigung der DNA durch Fragmentierung hervorgerufen, welche vor allem aus längeren Lagerungszeiten und einem niedrigen pH-Wert des Formalins resultiert. Infolgedessen führen Polymerase-Kettenreaktions- (PCR) und Sequenzierungs-Analysen zu unzureichenden Ergebnissen aufgrund des Mangels an amplifizierbaren Templaten. [4] Bislang beschäftigten sich schon mehrere Studien mit der Lösung des Problems (siehe Kapitel (Kap.) 1.3.1).

## 1.1. Der Narrenturm

Der im Auftrag von Kaiser Josef II. (1741-1790) erbaute Narrenturm im heutigen 9. Wiener Gemeindebezirk ist ein bedeutsames Denkmal zur Geschichte der medizinischen Bildung seit dem 18. Jahrhundert. Dieses Bauwerk beinhaltet eine enorme pathologisch-anatomische Sammlung von einer Vielzahl an verschiedensten Präparaten, mitunter erkrankten Organen oder Knochenfehlstellungen. Die größte Gruppe bilden dabei Feuchtpräparate, welche in Konservierungsflüssigkeiten wie Alkohol oder Formalin aufbewahrt werden.

Das imposante kreisrunde, fünfstöckige Gebäude wurde von seiner Gründung 1784 bis 1866 als Anstalt für psychisch kranke Personen eingesetzt. Innerhalb dieses Zeitraumes entsprang die erste Idee zu einer Präparatesammlung von Josef Pasqual Ferro (1753-1809). Im Jahre 1971 begann aufgrund von Platzgründen die Übersiedelung von über 14 000 Präparaten vom damaligen pathologischen Museum in den Narrenturm, welcher bis dahin als Wohnmöglichkeit für medizinisches Pflegepersonal, Studierende und Angestellte des Allgemeinen Krankenhaus (AKH) von Wien diente. Fortan bezeichnete man dieses Gebäude als *pathologisch-anatomisches Bundesmuseum*, in welchem sich über die Jahre hinweg mehr als 50 000 Objekte ansammelten. Dazu gehören, neben medizinhistorischen Geräten und tierischen Objekten, Mazerationspräparate, Moulagen, sowie Feucht- und Trockenpräparate. Zusätzlich existiert ein ausführlicher Museumskatalog, welcher auf den damaligen pathologischen Prosektor Lorenz Biermayer (1778-1843) zurückzuführen ist. Dieser startete im Jahr 1813 mit der durchgehenden und detaillierten Protokollierung von interessanten Präparaten mit verschiedensten Krankheitsverläufen, welche bis zum heutigen Tag reichen. Die Eingliederung des Museums in das Naturhistorische Museum fand 2012 statt. Nach

ausgeführten Renovierungsarbeiten ist eine Besichtigung der weltweit größten Ausstellung pathogener Präparate gegenwärtig für alle Personen möglich. [2,5,6]

Das Anschauungsmaterial des pathologisch-anatomischen Museums ist für die medizinische Lehre von großer Bedeutung, da eine Vielfalt an dokumentierten Krankheiten heutzutage nicht mehr oder nur noch sehr selten vorkommen, wie beispielsweise die in dieser Studie untersuchten humanen Föten mit Gesichtsdysmorphien aufgrund der Otozephalie-Dysgnathia Erkrankung.

## 1.2. Otozephalie-Dysgnathia Komplex

Der Otozephalie-Dysgnathia Komplex (ODC) ist eine sehr selten vorkommende und tödliche Erkrankung des Schädels mit einer Häufigkeitsrate von 1:70 000 Schwangerschaften. Aufgrund der geringen Anzahl an rund 150 dokumentierten Fällen war es der Wissenschaft bisher nicht möglich, genaue Aussagen über den genetischen Mechanismus dieser Erkrankung zu treffen. [7,8] Lediglich der Phänotyp des ODC konnte anhand von Schädel- und Gesichtsfehlbildungen charakterisiert werden. Äußere Kennzeichen wären demnach ein sehr kleiner bzw. nicht vorhandener Unterkiefer (Agnathie), wobei sich die Ohren der Mittellinie vom Hals nähern oder völlig miteinander verschmelzen (Synotie), ein abnormal kleiner Mund (Mikrostomie), sowie eine enorm kleine Zunge (Mikroaglossie) (Abbildung (Abb.) 1). Gelegentlich wird in Publikationen ebenfalls über Anomalien des Skeletts, der Organe (Situsanomalie), Eingeweide (Viszeralanomalie) und des Gehirns (Holoprosenzephalie) berichtet. [9]



*Abbildung 1: Formalin-fixierter Fötus aus dem pathologisch-anatomischen Museum, welcher Missbildungen aufgrund des ODC aufweist.*

In einigen Studien wurden bereits bestimmte Mutationen mit dem ODC-Phänotyp assoziiert. So wurde beispielsweise im Artikel von Nanni *et al.* die Rolle des Sonic Hedgehog (SHH) Gens untersucht, welches mit der Entwicklung von Krankheiten wie Holoprosenzephalie in Verbindung gebracht wurde. [10] Diese Krankheit tritt bei 1 von 16 000 Neugeborenen auf, wobei eine fehlerhafte Entwicklung des Vorderhirns vorgefunden wird, da sich das Gehirn nicht korrekt in seine beiden Hemisphären teilt. [11] An homozygoten Mäusen mit geschädigtem SHH Gen wurde zudem ein Entwicklungsdefekt der Mittellinienstrukturen, sowie der Verlust von Gehirnzellen und Gesichtsanomalien, wie beispielsweise Zyklopie,

aufgezeigt. [10] Neben der Frühentwicklung des Vorderhirns trägt das intrazelluläre Signalprotein, dessen Gen auf Chromosom 7q36 vorkommt, ebenfalls zur Entstehung des zentralen Nervensystems bei. [12]

Beby *et al.* assoziierten bestimmte Veränderungen im Transkriptionsfaktor Orthodenticle homeobox 2 (OTX2) mit dem ODC-Phänotyp. Das in fünf Exons unterteilte Gen, wovon nur die letzten drei Exons codierend sind, ist am menschlichen Chromosom 14q22.3 lokalisiert und prägt in der Regel die normale Entwicklung von Vorderhirn und Augen bei Wirbeltieren. Eine Frameshift-Mutation geht mit schweren Augenfehlbildungen, Hirnanomalien und Hypophyseninsuffizienz einher und kann dadurch in weiterer Hinsicht mit ODC assoziiert werden. [13] Auch Chassing *et al.* berichteten über einen genetischen Zusammenhang von Otozephalie mit dem Fehlen (Anophthalmie) oder der unvollständigen Ausbildung (Mikrophthalmie) eines oder beider Augäpfel aufgrund einer ermittelten OTX2 Mutation. Zudem wurden weitere Anomalien beschrieben, welche Patienten mit mutiertem OTX2 Gen mit sich brachten, wie beispielsweise Hirnfehlbildungen, Fehlbildung der Hypophyse, Kleinwuchs und geistige Behinderung. [8]

Des Weiteren zeigen Patat *et al.* den Einfluss von OTX2 auf die Bildung von ODC mit der Identifizierung von zwei Mutationen des Gens. Außerdem fand eine Untersuchung auf Veränderungen des Paired related homobox 1 (PRRX1) Gens statt, wobei in dieser Studie keine diesbezügliche Mutation identifiziert werden konnte. Bis zum Jahr 2013 wurden nur drei Fälle dokumentiert, in welchen über die Assoziation des PRRX1 Gens mit Otozephalie berichtet wurde. [7] Bei einem dieser an ODC-erkrankten Föten wurde eine Mutation des PRRX1 Gens von Sergi und Kamnasaran entdeckt. Durch die Sequenzierung der fetalen, genomischen DNA des Patienten wurde eine heterozygote Punktmutation im zweiten von insgesamt fünf Exons des Gens, welches am menschlichen Chromosom 1q24.2 lokalisiert ist, festgestellt. [14]

Ein weiteres Gen, dessen Veränderung mit dem ODC in Zusammenhang gebracht wird, ist Paired Box 9 (PAX9), welches unter anderem zur Bildung des Mittelgesichtsknochens beiträgt und im Artikel von Sperber und Sperber erwähnt wurde. Die Mutation des auf Chromosom 14q13.3 befindlichen Gens für diesen Transkriptionsfaktor bewirkt das angeborene Fernbleiben der Zähne (Zahn-Agenesie), was sich wiederum sichtlich auf die lateralen Regionen des Nasen- und zweiten Rachenbogens auswirkt. [15]

Zur Analyse von spezifischen Mutationen oder Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) werden Gene mit Sequenziermethoden untersucht. In dieser Studie sollten verschiedene SNPs der bereits genannten, ODC assoziierten Gene SHH, OTX2 und PAX9 aus den amplifizierten DNA-Extrakten von langzeit-konservierten, fetalen Geweben mit der Pyrosequenzierung (PSQ) identifiziert werden. Die benötigten Primer zur PCR-Amplifikation wurden bereits im Vorfeld von C. Wagner designt, welche sich 2019 mit diesem Thema beschäftigte. [16]

### 1.3. Fixierungsmethoden

Die Fixierung ist eine wichtige Präparationsmethode zur Konservierung von Gewebsstrukturen hinsichtlich weiterer Untersuchungen, welche vor allem im Bereich der Histologie und Anatomie Anwendung findet. Durch unverzüglichen Einsatz des Fixierungsverfahrens an einem Organismus besteht die Möglichkeit morphologische Veränderungen, welche mit dem Zelltod einhergehen, wie z.B. Autolyse (Selbstverdau durch Enzyme), Fäulnis und Verwesung, zu verhindern, wodurch sich in weiterer Folge ein fortdauernder, lebensähnlicher Zustand erzielen lässt.

Die Stabilisierung von Organen, Gewebstücken oder ganzen Organismen kann sowohl physikalisch als auch chemisch erfolgen. Die Wahl des Konservierungsmittels ist dabei abhängig von der weiteren Verwendung des eingesetzten Objekts, sowie vom Gewebstyp selbst. Erstere Methoden umfassen beispielsweise Wärme- (Trocknen), Kälte- (Gefrieren), Dampf- und Mikrowellenbehandlungen. Häufiger zum Einsatz kommen jedoch chemische Stabilisierungsmethoden mit Fixierlösungen, wobei zunächst zwischen Perfusionsfixierung (Einbringen des Fixiermittels über Blutgefäße) und Immersionsfixierung (Eintauchen des Gewebes in die Fixierlösung) differenziert wird. Für die Immersionsfixierung existiert eine Vielzahl an Fixativen mit unterschiedlichen Eigenschaften, welche unter anderem Aldehyde (z.B. Formaldehyd, Glutaraldehyd), organische Säuren (z.B. Pikrinsäure, Essigsäure) und Alkohole (z.B. Ethanol (EtOH), Isopropanol) umfassen. In Anbetracht nachteiliger Wirkungen vieler reiner Fixiermittel wurden im Laufe des letzten Jahrhunderts verschiedenste Gemische erprobt, um Mängel eines Fixativs durch Zusatz eines anderen zu kompensieren. Ein Beispiel ist das *Fixiergemisch nach Bouin*, welches sich aus einer Kombination von Pikrinsäure (stark schrumpfende Wirkung) und Eisessig (wirkt dem Schrumpfen entgegen) zusammensetzt.

Aufgrund von giftigen Bestandteilen und/oder unpraktischem Umgang für routinemäßiges Arbeiten wurden viele Fixiermittel, welche in den letzten Jahren vermehrt Anwendung fanden, erneut durch das bis zum heutigen Tag meist verwendete Fixativ, Formalin, verdrängt. Ein weiterer Grund für den Rückgriff auf genau dieses Aldehyd ist zum einen die Vergleichbarkeit mit vergangenen Studien und zum anderen die Tatsache, dass sich die Produkte von Firmen, seien es Standards, Protokolle oder Gerätschaften, vermehrt auf FF Material ausrichten. [17]

#### 1.3.1. Formalin-Fixierung

Das für Feuchtpräparate meist genutzte Fixiermittel, welches sich ebenfalls zur Konservierung eignet, ist eine 4 - 8 % wässrige Lösung von Formaldehyd, auch bekannt als Formalin, welches 1893 von Ferdinand Bum für den Gebrauch im Bereich der Histotechnik entwickelt wurde. Die dauerhafte Konservierung geschieht dabei durch eine Veränderung von Proteinstrukturen, wobei der pH-Wert der eingesetzten Aldehyd-Lösung im physiologischen Bereich von 7,2 - 7,6 liegen sollte. Die Stabilisierung wird durch Zusatz bestimmter Puffer gewährleistet, welche sich inert gegenüber dem Fixativ verhalten. Das Mengen-Verhältnis zwischen eingelegtem Objekt und Fixiermedium sollte im optimalen Fall 1:20 entsprechen, da es zum Verbrauch von Formalin kommt. Die Aufbewahrung in dunklen Flaschen ist eine weitere Lagerbedingung, da aufgrund von Lichtreaktionen eine spontane Bildung von Ameisensäure erfolgt. [17]

Genauer betrachtet fungiert Formaldehyd, die Hauptkomponente des Formalins, als additives Fixativ, mit welchem die Gewebsfixierung über Quervernetzungsreaktionen zu Proteinen



erfolgt. Durch Wechselwirkungsreaktionen zwischen den Aminosäuren der Proteine mit Formaldehyd kommt es zur Erzeugung von Methylolgruppen bzw. Schiff'schen Basen, welche die Fähigkeit besitzen, mit anderen funktionellen Aminosäuregruppen stabile Methylenbrücken auszubilden. Obwohl der genaue Mechanismus bis heute nicht vollständig aufgeklärt werden konnte, ist man sich der Problematik der Schädigung von Nukleinsäuren in langzeit-konservierten, FF Proben bewusst. So berichten beispielsweise Do *et al.* über die teilweise Denaturierung der DNA in einzelne Bruchstücke (300 - 400 bp) aufgrund von Schwächung der Basenpaarung infolge einer Reduzierung an Wasserstoffbrücken, welche durch die Vernetzung des Formaldehyds mit den Basen-Iminogruppen einhergeht. Zudem benennen sie das Problem der ansteigenden Fragmentierung der DNA bei länger konservierten Präparaten, was eine Minderung der PCR-Amplifikation mit sich bringt, weil die Menge und Länge der zu amplifizierenden DNA-Template sinkt. [4]

Da die DNA-Extraktion aus langzeit-konserviertem Gewebe über die Jahre immer mehr an Interesse gewinnt, wie beispielsweise zur Erkennung von Mutationen im Erbgut, ist es notwendig eine Reduzierung von Sequenzartefakten zu erzielen, um dadurch eine Analyse der Nukleinsäuren zu gewährleisten. Diese Artefakte zeigen Sequenzänderungen verglichen zur DNA-Sequenz in der ursprünglichen Probe auf, wodurch diese nur schwer von echten Mutationen unterschieden werden können. Neben der Fragmentierung und Quervernetzung der DNA existieren noch viele weitere Quellen, aus welchen Sequenzartefakte hervorgehen könnten, wie z.B. durch einen „DNA-Polymerase-Fehler“. [4]

Bezüglich Quervernetzungen konnte durch Studien belegt werden, dass für Proben, welche nur kurzzeitig in Formalin gelagert wurden, eine Umkehrung der Formaldehydbindungen von den Proteinseitenketten durch die Durchführung von einfachen Waschschritten bis hin zum Auskochen möglich ist, wohingegen bei langzeit-Konservierung eine merklich höhere Hitzeeinwirkung stattfinden sollte. Einen wichtigen Ansatz dazu liefert die Arbeit von Nagai *et al.*, welche die reversible Eigenschaft der Methylenbrücken durch den Einsatz hoher Temperaturen ausnutzten, inklusive eines Waschvorgangs zu Versuchsbeginn, wodurch eine PCR-Amplifikation von intakter, genomischer DNA eines humanen Embryos mit Fragmentlängen bis zu 838 bp erreicht werden konnte. [18]

Bereits einige Jahre zuvor publizierten Shi *et al.* eine Methode zur Verbesserung der DNA-Extraktion aus FF und Paraffin-eingebetteten (FFPE) Proben durch den Einsatz einer länger andauernden Hitzebehandlung mit Temperaturen bis zu 120 °C unter alkalischen pH-Bedingungen. Dadurch konnten, neben höheren Ausbeuten der DNA, ebenfalls bessere Reinheitswerte erhalten werden. [19,20] Das sogenannte „Hot Alkali“-Protokoll fand in vielen weiteren Studien Anwendung, wie z.B. von Paireder *et al.*, welche diese Art der Hitzebehandlung vor einer Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)-Extraktion von langzeit-konservierten, FF menschlichen Gewebspräparaten durchführten. [21]

C. Wagner, deren Masterarbeit 2020 veröffentlicht wurde, befasste sich mit der Modifikation verschiedener DNA-Extraktionsprotokolle, um intakte, genomische DNA mit hoher Ausbeute und Reinheit aus langzeit-konservierten, FF Föten mit ODC-Erkrankung zu isolieren, um im Anschluss diese auf ihre PCR-Amplifizierbarkeit mit vier unterschiedlichen Primerpaaren (OTX2 1.1, OTX2 3.0, PAX9 4.0 und SHH 2.0) zu überprüfen und eine SNP-Analyse der PCR-Produkte vorzunehmen. Für Wagners Studie wurden, zusätzlich zu FF, ODC-erkrankten Föten, Föten ohne ODC als Kontrollproben herangezogen, welche in unterschiedlichen Konservierungsmitteln (EtOH, Formalin) gelagert wurden.

Im Gegensatz zu den getesteten, kommerziell erhältlichen DNA-Kits (Qiagen) und der CTAB-Extraktion, stellte sich die Phenol-Chloroform (PC)-Extraktion als geeignetste Methode zur Isolierung intakter, genomischer DNA aus FF Gewebe heraus. Dabei bestand die Probenvorbereitung aus einem Waschschrift mit einer Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS), der Homogenisation des Gewebes, der Zelllyse durch Zusatz von Proteinase K (Prot. K), dem Abbau von RNA durch Zusatz von RNaseA und einer Hitzebehandlung zur Umkehrung von Formaldehyd-Modifikationen, wobei viele Probenvorbereitungsschritte zur Verbesserung der DNA-Extraktion optimiert wurden, wie beispielsweise Lysedauer, Reaktionsvolumina oder die Matrix zur Homogenisation. Trotz erhöhter Ausbeute und verbesserter Reinheit der isolierten DNA aus Geweben von ODC-erkrankten Föten war keine PCR-Amplifikation möglich, wodurch in weiterer Folge keine Bestimmung des Genotyps stattfinden konnte. Im Gegensatz dazu konnten einige DNA-Extrakte aus FF Gewebe nicht-ODC-erkrankter Föten erfolgreich einer Amplifikation mittels PCR und einer anschließenden Pyrosequenzierung (PSQ) unterzogen werden. [16]

Diese Studie basiert auf der Vorarbeit von Christina Wagner MSc, wobei die DNA-Extraktionen aus denselben langzeit-konservierten, fetalen Gewebeproben erfolgten und für die PCR-Analysen dieselben Primersets angewendet wurden.

## **2. Ziele**

Das Ziel dieser Masterarbeit bestand darin, unterschiedliche Extraktionsmethoden zu optimieren, um aus langzeit-konservierten, Formalin-fixierten (FF), fetalen Gewebspräparaten unbeschädigte genomische DNA zu gewinnen. Durch Modifikation der Extraktionsprotokolle sollte eine höhere Ausbeute, Reinheit und Integrität der isolierten DNA erzielt werden, wodurch in weiterer Folge die Eignung der DNA-Extrakte zur Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR), sowie zur Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP)-Analyse mittels Pyrosequenzierung (PSQ) untersucht werden sollte.

Die zur Untersuchung herangezogenen Gewebeproben wurden vom pathologisch-anatomischen Museum in Wien, dem Narrenturm, bereitgestellt. Dabei handelt es sich um zwei langzeit-konservierte, FF Föten mit Gesichtsdysmorphien, aufgrund des Vorhandenseins des Otozephalie-Dysgnathia Komplexes (ODC). Als Kontrollpräparate dienten drei weitere langzeit-konservierte Föten ohne Gesichtsdysmorphien, wovon zwei in alkoholischen Lösungen (Ethanol, Isopropanol) und einer ebenfalls in Formalin aufbewahrt wurden. Die Entnahme der zu analysierenden Organe erfolgte im Jahr 2019 durch Frau Christina Wagner und Herrn Andreas Glowania, welcher zu dieser Zeit als Otorhinolaryngologe im Wiener Krankenhaus Hietzing tätig war. Für die Experimente sollten die Gewebetypen Herz, Leber, Lunge, Nabelschnur, Darm, Milz, Muskeln, sowie Groß- und Kleinhirn zur DNA-Analyse herangezogen werden, welche bis dahin bei - 20 °C gelagert wurden.

Das bereits bekannte Problem der DNA-Extraktion aus langzeit-konservierten, insbesondere FF Proben sollte durch die Änderung gewisser Parameter, wie beispielsweise Inkubationszeiten bei der Zelllyse, Erhöhung der eingesetzten Reaktionsvolumina und Gewebseinwaagen, sowie die DNA-Extraktionsmethoden, in Bezug auf Reinheit und Ausbeute der DNA gelöst bzw. verbessert werden. Für die Isolierung der DNA aus den fetalen Gewebsarten sollten vier DNA-Extraktionsverfahren geprüft werden: zwei kommerziell erhältliche Extraktionskits (Qiagen), eine Phenol-Chloroform (PC)-Extraktion und eine Hot Alkali Extraktion, wobei auf Letztere besonderes Augenmerk gelegt wurde.

Zur qualitativen Begutachtung der DNA sollte ein photometrisches Messverfahren (NanoDrop) eingesetzt werden, wohingegen die quantitative Ermittlung fluorometrisch (Qubit®-Fluorometer) erfolgen sollte. Zudem sollte die Integrität der mittels PCR zu vervielfachenden DNA durch Verwendung der Agarose-Gelelektrophorese untersucht werden. Um Herauszufinden, ob das gewünschte DNA-Templat amplifiziert wurde, sollte, zusätzlich zur Gelelektrophorese und der hochauflösenden Schmelzkurven (HRM)-Analyse, die PSQ angewandt werden.

## 3. Theorie

### 3.1. Desoxyribonukleinsäure

Das Makromolekül Desoxyribonukleinsäure, kurz DNA genannt, wird oftmals als „Molekül des Lebens“ bezeichnet, da es in allen Organismen vorzufinden und in diesem der genetische Code enthalten ist, welcher die Proteinsynthese maßgeblich prägt. Neben wichtigen Informationen, die zum Überleben und zur Entwicklung eines Individuums beitragen, existieren auch solche, welche für die Vererbung von Erkrankungen eine grundlegende Rolle spielen. Dies ist einer der Gründe, weshalb der Untersuchung dieser Nukleinsäure eine große Bedeutung zugeschrieben wird. [22]

#### 3.1.1. Struktur und Eigenschaft der DNA

Generell besteht ein DNA-Strang aus zahlreich aneinandergereihten Desoxynukleotiden, welche wiederum einen Zuckeranteil (Desoxyribose), einen Phosphatrest und einen Basenanteil (Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) oder Thymin (T)) beinhalten. Dabei werden die aus Nukleinbase und Ribose bestehenden Nukleoside, entsprechend ihrer enthaltenen Basen benannt, wodurch diese als Adenosin, Cytidin, Guanosin und Thyminidin bezeichnet werden. [22]

Die Nukleinsäuresynthese findet stetig an der freien 3'-OH-Gruppe des Zuckeranteils des zuletzt angefügten Nukleotids statt. Die zunächst ungebunden vorliegenden Desoxynukleotide existieren als energiereiche Desoxynukleosid-triphosphate (dNTP), welche sich an der freien Hydroxylgruppe des letzten Nukleotids durch Ausbildung von 3',5'-Desoxyribosephosphorsäurediester-Brücken anlagern (Abb. 2). Dabei kommt es während des Einbaus zur Dephosphorylierung, wodurch das gebildete Desoxynukleosid-monophosphat (dNMP), unter Abspaltung zweier Phosphatreste (Pyrophosphat,  $\text{PP}_i$ ), dem DNA-Strang zugeführt wird. Die Synthese verläuft dabei jedes Mal in 5' zu 3' Richtung. [23]

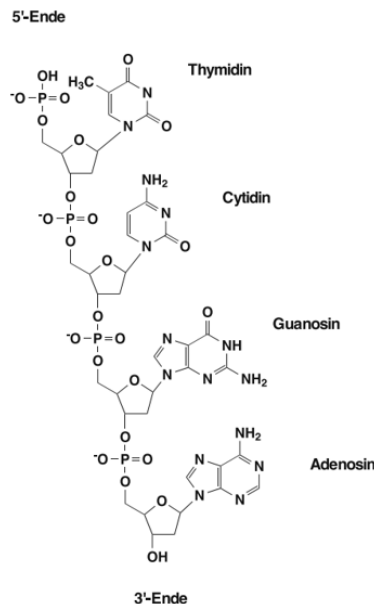


Abbildung 2: Darstellung eines DNA-Stranges mit den vier verschiedenen Nukleotiden; verändert nach [22].

Die Doppelhelix-Struktur der DNA wurde 1953 von Watson und Crick entdeckt, welche sich aus zwei antiparallelen, komplementären Polynukleotidketten zusammensetzt und die Basenabfolge des einen Stranges durch den anderen bestimmt wird. Hierbei sind ausschließlich Basenpaarungen von A mit T und C mit G möglich, zwischen denen Wasserstoffbrücken ausgebildet werden und dadurch wiederum, neben den molekularen Interaktionen zwischen den Basen (van-der-Waals-Kräfte), zur Stabilität der rechtsgewundenen Doppelhelix beitragen. Von außen betrachtet ist diese durch zwei Vertiefungen, der großen und der kleinen Furche, gekennzeichnet, welche zum einen für die Verpackung der DNA in Chromosomen und zum anderen für die Bindungen regulatorischer Proteinmoleküle eine große Bedeutung besitzen. [24,25]

Eine zentrale Eigenschaft der Nukleinsäure ist ihre Fähigkeit zur identischen Verdoppelung des Erbmateri als, welche auf ihrer komplementären Struktur beruht. Durch diesen Aspekt besteht die Möglichkeit einer vollständigen Trennung der Basenpaare durch Denaturierungsreaktionen in zwei DNA-Einzelstränge. Diese können wiederum jeweils eine neue Matrize für die Synthese neuer komplementärer Stränge ausbilden, sodass im Nachhinein zwei identische DNA-Doppelstränge entstehen. Aufgrund dessen, dass immer auf einem bereits vorhandenen Strang die Nachbildung eines entgegengesetzten Stranges erfolgt, spricht man von einer semikonservativen DNA-Replikation. [24]

Neben der genomischen DNA, welche vor allem für die quantitative Analyse von Bedeutung ist, gibt es die mitochondriale DNA. Aufgrund häufig fehlender Reparaturmechanismen und der geringen Genauigkeit der DNA-Polymerase, kommt es im mitochondrialen Genom zu deutlich höheren Mutationsraten, im Vergleich zum Genom im Zellkern. [26] Beim Menschen tritt die Mutationsrate pro Generation mit einer Häufigkeit von  $5,0 \times 10^{-8}$  pro 1000 Basenpaare (bp) auf. Basenpaarmutationen zählen dabei zu den meist auftretenden Mutationsformen, wobei ein Nukleotid durch ein anderes ersetzt wird. Zwei Vertreter dieser Art von Mutation sind die Transition (Purin- durch Purinbase oder Pyrimidin- durch Pyrimidinbase ersetzt) und die Transversion (Pyrimidin- durch Purinbase ersetzt oder umgekehrt). Durch die daraus entstehenden SNPs, welche im gesamten Genom rund 2,5 Millionen mal vorzufinden sind, können Proteinfunktionen, aufgrund der abgewandelten Sequenz innerhalb eines Gens, maßgeblich verändert werden. Zudem existiert eine Vielzahl an weiteren Mutationen, wie beispielsweise Missense-Mutationen, Radikalsubstitutionen oder Nonsense-Mutationen. Im Gegensatz zu Mutationen in den somatischen Zellen sind Mutationen, welche in den Keimbahnzellen auftreten, an die nächste Generation vererbbar. [27]

### **3.1.2. Extraktionstechniken**

Da DNA-Extrakte mit Proteinen, Nukleasen, Salzen oder anderen Störsubstanzen kontaminiert sein könnten, ist es nötig mit geeigneten Extraktionsmethoden eine Aufreinigung dieser zu erreichen. Die Anforderungen an diese Methoden sind das Erzielen von hohen DNA-Ausbeuten mit hoher Reinheit, wobei die DNA im Idealfall nicht fragmentiert vorliegen sollte. Ebenso sollte eine hohe Reproduzierbarkeit gegeben sein.

Zur Entfernung dieser unerwünschten Stoffe werden Eigenschaften der DNA ausgenutzt wie z.B. Löslichkeit, Ladung und Molekülgröße. [28]

#### **3.1.2.1. Phenol-Chloroform-Extraktion**

Dieses Standardverfahren dient vor allem zur Entfernung unerwünschter Proteine von Nukleinsäure-Lösungen und somit zur Isolierung reiner DNA. Die Aufreinigung erfolgt durch Zugabe eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches im Verhältnis 25:24:1 (v/v/v). Dabei werden die Proteine zunächst durch Phenol und Chloroform denaturiert, wodurch sie ausfallen und sich nach Zentrifugation in der Interphase wiederfinden. Der Einsatz von Isoamylalkohol verhindert währenddessen das Aufschäumen, sowie die Bildung einer intensiven Interphase. Weitere Verunreinigungen, wie beispielsweise Fette, befinden sich aufgrund ihrer guten Löslichkeit in der unteren, organischen Phase. Im Gegensatz dazu verbleiben die hydrophilen Nukleinsäuren in der oberen, wässrigen Phase, welche mittels Pipette entnommen und zur Abtrennung der Verunreinigungen in ein sauberes Gefäß transferiert werden können. Bei einem hohen Proteingehalt ist es ratsam den Reinigungsschritt zu wiederholen, indem man der wässrigen, nukleinsäurehaltigen Phase erneut das PC-Gemisch zusetzt. [29,30]

Anschließend kann, zur weiteren Aufreinigung der DNA, eine Fällung mittels Ammoniumacetat/Ethanol ( $\text{NH}_4\text{Ac}/\text{EtOH}$ )-Gemisch erfolgen, wodurch ein unlöslicher Niederschlag der Nukleinsäure entsteht. In Gegenwart von  $\text{NH}_4\text{Ac}$  ist es möglich, eine Reduktion der Copräzipitation von freien Nukleotiden zu gewährleisten. Für die Fällung geringer DNA-Mengen ist die Anwendung eines Carriers, welcher zur besseren Sichtbarkeit des Pellets verhilft, von großer Bedeutung. Hierzu sollten jedoch lediglich Substanzen verwendet werden, welche nachfolgende Versuche nicht beeinflussen, wie z.B. Glykogen oder lineares Polyacrylamid.

Mit dem darauffolgenden Waschschrift des erhaltenen DNA-Pellets mit 70 % EtOH wird die Entfernung eines Großteils der mitgefällten Salze erzielt. Zuletzt wird das Nukleinsäure-Pellet in einem kleinen Volumen eines geeigneten Lösungsmittels gelöst und bei - 20 °C aufbewahrt. [28]

#### **3.1.2.2. Extraktion mit Spin Säulen**

Für diese Isolierungsmethode kommen kleine Säulchen zum Einsatz, welche mit Silica-Gel befüllt und kommerziell erhältlich sind. Bei einem bestimmten pH-Wert und in Gegenwart einer hohen Konzentration an chaotropen Salzen werden die Nukleinsäuren an die stationäre Phase der Säule (Kieselgel) gebunden, wobei es zur Ausbildung von Salzbrücken zwischen der negativ geladenen DNA und der ebenso negativ geladenen Silica-Matrix kommt. Die Reinigung geschieht anschließend durch einen Waschschrift mit EtOH in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen, wobei unerwünschte Substanzen durch Zentrifugation verworfen werden. Zuletzt erfolgt die Elution der Nukleinsäuren durch das Zerstören der Salzbrücken-Bindungen, indem kleine Mengen eines salzarmen Puffers oder reines Wasser der Oberfläche der stationären Phase zugesetzt werden. [31]

### 3.1.3. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung

Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit von extrahierter DNA ist für weitere Untersuchungen unerlässlich. Dementsprechend gibt es eine Menge an solchen Methoden, welche für jene Fragestellungen Anwendung finden.

In dieser Masterarbeit wurde die Konzentration der gewonnenen DNA-Extrakte einerseits mit Hilfe des Qubit®-Fluorometers und andererseits mittels NanoDrop ermittelt, wobei mit Letzterem ebenfalls eine Reinheitsbestimmung der Extrakte erfolgte.

#### 3.1.3.1. Qubit®-Fluorometer

Beim Qubit®-Fluorometer handelt es sich um ein Gerät, mit dem DNA und RNA sensitiv und spezifisch quantitativ bestimmt werden können. Für die Messung der Konzentrationen werden unterschiedliche Kits eingesetzt, je nachdem welches Biomolekül detektiert werden soll. Diese Assays enthalten hochselektive Fluoreszenzfarbstoffe, welche der Probelösung zugesetzt werden und ausschließlich ein Signal erzeugen, wenn diese an die gewünschte Nukleinsäure binden. Auf diese Weise werden sowohl Kontaminanten als auch degradierte DNA/RNA nicht detektiert. Vor der Konzentrationsmessung sollte jedoch eine Behandlung der Proben mit RNase bzw. DNase stattfinden, da sonst falsche Werte ermittelt werden könnten. Im Gegensatz zum NanoDrop-Verfahren erlaubt die fluorometrische Methode die Ermittlung niedrigerer Konzentrationen aufgrund geringerer Nachweisgrenzen (LOD). So liegt beispielsweise die Bestimmungsgrenze für dsDNA zwischen 0,01 - 1000 ng/µL. [32]

#### 3.1.3.2. NanoDrop

Das NanoDrop Gerät ist ein Photometer, mit dem neben der Konzentration der Nukleinsäuren ebenfalls deren Reinheitsgrad bestimmt werden kann. Da sich das DNA-Absorptionsmaximum bei 260 nm befindet, wird bei dieser Wellenlänge die Konzentrationsmessung durchgeführt.

Mit Hilfe der nachfolgend angegebenen Formel ist es möglich, von der ermittelten Extinktion (E) auf die Konzentration (c) der nukleinsäurehaltigen Probenextrakte rückzuschließen:

$$c = E_{260} * D * F$$

|                  |                           |
|------------------|---------------------------|
| c                | Konzentration [ng/µL]     |
| E <sub>260</sub> | Extinktion bei 260 nm     |
| D                | Verdünnungsfaktor         |
| F                | Faktor für dsDNA (F = 50) |

Aufgrund des im Lambert-Beerschen Gesetz beschriebenen Zusammenhangs zwischen der Extinktion und der Konzentration besteht die Möglichkeit, bei Durchführung einer photometrischen Messung von der Extinktion auf die Konzentration zu schließen. Das 1852 formulierte Gesetz von Beer beschreibt die Beziehung zwischen der Abschwächung eines Lichtstrahls, welcher durch eine Licht-absorbierende Materie dringt, in Bezug auf eine substanzspezifische Konstante, auch molarer Extinktionskoeffizient ( $\epsilon$ ) genannt, der Konzentration der absorbierenden Substanz (c) und der Dicke der absorbierenden Schicht (b) und kann mit folgender Formel angegeben werden: [33]

|                           |               |   |
|---------------------------|---------------|---|
|                           | E             | Extinktion                                |
| $E = \varepsilon * c * b$ | $\varepsilon$ | molarer Extinktionskoeffizient [L/mol cm] |
|                           | c             | Konzentration [mol/L]                     |
|                           | b             | Schichtdicke [cm]                         |

Zur Ermittlung der DNA-Reinheit werden Extinktionen verschiedener Wellenlängen zueinander in Verhältnis gesetzt. Grundsätzlich wird dazu das Absorptionsmaximum der Proteine, welches bei 280 nm liegt ( $E_{280}$ ) und das Maximum bei 230 nm ( $E_{230}$ ) für organische Substanzen zur Überprüfung herangezogen.

Zur Gewährleistung einer ausreichend guten DNA-Reinheit sollten die Werte für das  $E_{260}/E_{280}$  Verhältnis zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Das Verhältnis  $E_{260}/E_{230}$  sollte 2,0 bis 2,2 betragen. [34]

## 3.2. Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR ist eine Methode zur in vitro-Amplifikation von sehr geringen Mengen an DNA, weshalb diese Methode eine der wichtigsten molekularbiologischen Techniken zur Untersuchung des menschlichen Genoms, sowie zur Erforschung genetisch bedingter Erkrankungen, darstellt. Entwickelt wurde dieses Verfahren im Jahre 1987 von Kary B. Mullis, welcher dafür 1993 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurde. [29,35]

### 3.2.1. Bausteine einer PCR

Zur Durchführung einer PCR werden verschiedene Komponenten benötigt, welche zur Amplifizierung einer Zielsequenz unerlässlich sind. Dazu gehören eine DNA-Polymerase, ein Primersatz (bestehend aus vorwärts-läufigem (fw)- und rückwärts-läufigem (rv)-Primer), ein Puffer mit dNTPs und Magnesiumchlorid ( $MgCl_2$ ) sowie das zu amplifizierende DNA-Templat.

Die DNA-Polymerase ist ein Enzym, welches die Verlängerung des DNA-Stranges in 5' zu 3' Synthesrichtung katalysiert, ausgehend von einem Startmolekül mit intaktem 3'-Ende, welches auch als Primer bezeichnet wird. Aufgrund von robusten und prozessiven Eigenschaften wird für die meisten Synthesen die sogenannte Taq-DNA-Polymerase eingesetzt, welche aus dem thermostabilen Bakterienstamm *Thermus aquaticus* gewonnen wird.

Der Cofaktor der Polymerase ist  $MgCl_2$ , welches einen starken Einfluss auf die Enzymaktivität hat. Für das PCR-Verfahren werden grundsätzlich Konzentrationen im Bereich von 1,0 - 2,5 mM verwendet, wobei die ideale Menge durch Optimierungsversuche (siehe Kap. 4.5.5) ermittelt wird. Der Einsatz von zu hohen Mengen an Magnesium führt in der Regel zu unspezifischen Reaktionsprodukten, während zu geringe Mengen eine Reduzierung der Ausbeute mit sich bringen. Viele kommerzielle PCR-Puffer beinhalten neben dNTPs bereits gewisse Konzentrationen an  $Mg^{2+}$  und  $Cl^-$  - Ionen, wodurch der Polymerase alle essentiellen Bestandteile für ein optimales Milieu in vitro für verschiedenste Temperaturen zur Verfügung stehen.

Primer sind Oligonukleotide, welche Längen von 18 bis 30 Basen aufweisen sollten, in Abhängigkeit von der Größe des DNA-Templats. Neben einem ausgeglichenen Basenpaarverhältnis von A/T zu G/C sollte ebenfalls auf die eingesetzte Konzentration der



Primer geachtet werden, da es sonst durch den überhöhten Einsatz zu Fehlpaarungen und damit zur Bildung unspezifischer PCR-Produkte kommen könnte, wohingegen eine zu geringe Menge zu verminderten Ausbeuten des gewünschten PCR-Produkts führt. Zur Synthese einer dsDNA aus einem DNA-Einzelstrang wird sowohl ein fw-, als auch ein rv-Primer benötigt, welche sich aufgrund ihrer komplementären Basenfolge am 3'-Ende des Einzelstranges anlagern und somit den Startpunkt der Doppelstrangsynthese bilden. Dieser Schritt, der auch Annealing genannt wird, benötigt zur korrekten Ausführung eine bestimmte Temperatur, welche in etwa 5 °C unter der berechneten Schmelztemperatur liegt, bei welcher 50 % der Oligonukleotide einen gebundenen Zustand aufweisen. [29,35]

### 3.2.2. Prinzip der PCR

Die exponentielle Vervielfachung eines DNA-Abschnitts erfolgt mit Hilfe eines Thermocyclers durch die Wiederholung von 30 bis 50 aufeinanderfolgenden Zyklen, wobei jede dieser Abfolgen drei konstante Schritte beinhaltet: Denaturierung, Annealing und Elongation. Abbildung 3 gibt einen schematischen Überblick des PCR-Verfahrens.

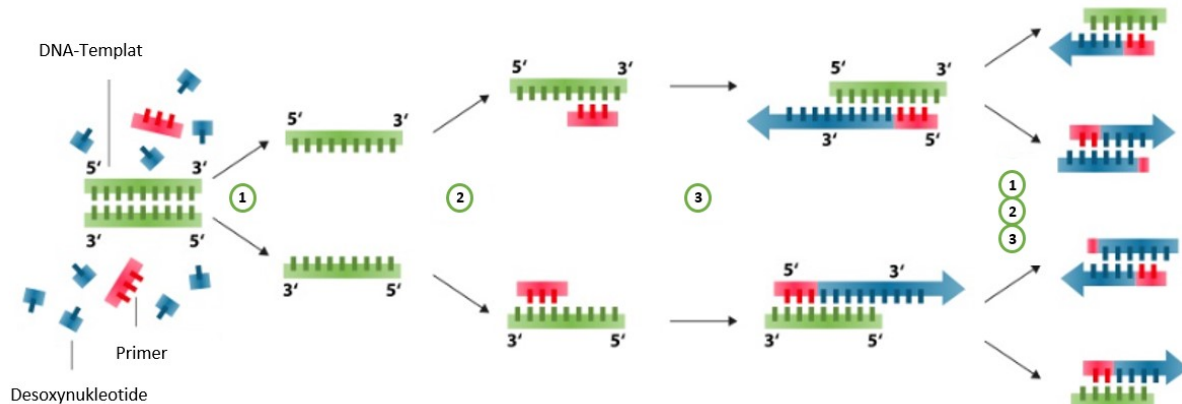


Abbildung 3: Schema des Amplifikationsprozesses mit den einzelnen Schritten: 1 - Denaturierung, 2 - Annealing und 3 - Elongation; verändert nach [36].

Zu Beginn des Zyklus wird eine Denaturierung bei Temperaturen von 90 - 95 °C für 1 - 5 min vorgenommen, wobei das dsDNA-Templat, aufgrund der sich trennenden Wasserstoffbrücken, zu zwei Einzelsträngen aufschmilzt.

Daraufhin erfolgt die spezifische Anlagerung des Primerpaares (fw, rv) an die jeweils komplementären 3'-Enden der DNA-Einzelstränge, wodurch Beginn und Ende des zu amplifizierenden Abschnitts festgelegt werden. Dieser, auch als Annealing bezeichnete Schritt, läuft bei Primer-abhängigen Temperaturen (Annealing-Temperatur,  $T_a$ ) zwischen 55 und 65 °C ab.

In der letzten Zyklusetappe, der Elongation, kommt es zur eigentlichen DNA-Synthese. Bei einer Temperatur von 72 °C erfolgt zunächst die Aktivierung der thermostabilen DNA-Polymerase, welche eine Katalyse der Synthese in 5' zu 3' Richtung bewirkt. Demnach wird, ausgehend vom 3'-Ende des Primers, ein Desoxynukleotid-Baustein nach dem anderen komplementär in die DNA-Matrize eingebaut und miteinander verbunden, wodurch sich eine zum Vorlagenstrang komplementäre DNA-Sequenz ergibt. Infolgedessen kommt es zur Bildung neuer dsDNA-Abschnitte, woraufhin ein weiterer Zyklus gestartet wird, um eine erneute Amplifikation zu ermöglichen. [29,35]

### 3.2.3. Real-time / Echtzeit - PCR

Im Zuge der Real-time (rt)-PCR besteht die Möglichkeit, die Bildung der PCR-Produkte in Echtzeit zu erfassen. Für diese Weiterentwicklung der PCR werden, neben fluoreszierenden Sonden, vermehrt fluoreszierende Farbstoffe, wie z.B. SYBR Green, eingesetzt, wobei dessen Moleküle sich innerhalb der dsDNA, genauer genommen in die kleinen Furchen des Doppelstranges, einlagern. Durch dieses Prinzip steigt das Fluoreszenzsignal proportional zur Anzahl der synthetisierten DNA-Stränge an. Ein Vorteil gegenüber Sonden ist zum einen der preisliche Faktor und zum anderen ihr universeller Einsatz für jede beliebige PCR-Reaktion. Das Problem der Anwendung von SYBR Green liegt in der geringen Spezifität des Farbstoffes, da dieser an alle dsDNA-Moleküle bindet, also ebenso an unerwünschte Primer-Dimere oder andere unerwünschte Nebenprodukte, deren Anwesenheit somit zu einer ungenauen Quantifizierung führt. [29]

Als weiteres Beispiel für fluoreszierende Farbstoffe ist EvaGreen zu nennen. Dieser stabile, umweltfreundliche PCR-Farbstoff unterscheidet sich vom bereits erwähnten SYBR Green-Farbstoff nicht nur in Bezug auf seine geringere Hintergrundfluoreszenz, sondern auch auf seine hervorragende Sättigungseigenschaft, wodurch maximale Signale bei der hochauflösenden Schmelzkurven (HRM)-Analyse erzielt werden können. [37]

#### 3.2.3.1. Quantitative Analyse

Ein bedeutender Faktor bei der Quantifizierung mittels rt-PCR ist die Kinetik der PCR-Reaktion. In der Theorie würde man von einer stetigen, exponentiellen Vermehrung des DNA-Templats ausgehen. Tatsächlich geschieht dies nur in den ersten paar Zyklen des Verfahrens, aufgrund störender Einflüsse wie beispielsweise dem Aktivitätsverlust der Polymerase durch Hitzeeinwirkung, der Hemmung der Polymerase durch die steigende Menge an  $PP_i$ , welches durch den Einbau der Desoxynukleotide freigesetzt wird oder generell dem Verbrauch von wichtigen Substanzen wie Primer oder dNTPs. Durch die Abnahme der Amplifikationseffizienz verlangsamt sich der Prozess des exponentiellen Wachstums, sodass es bei Zykluszahlen um die 40 zum Stillstand und somit zur Ausbildung eines Plateaus kommt (Abb. 4). [22]

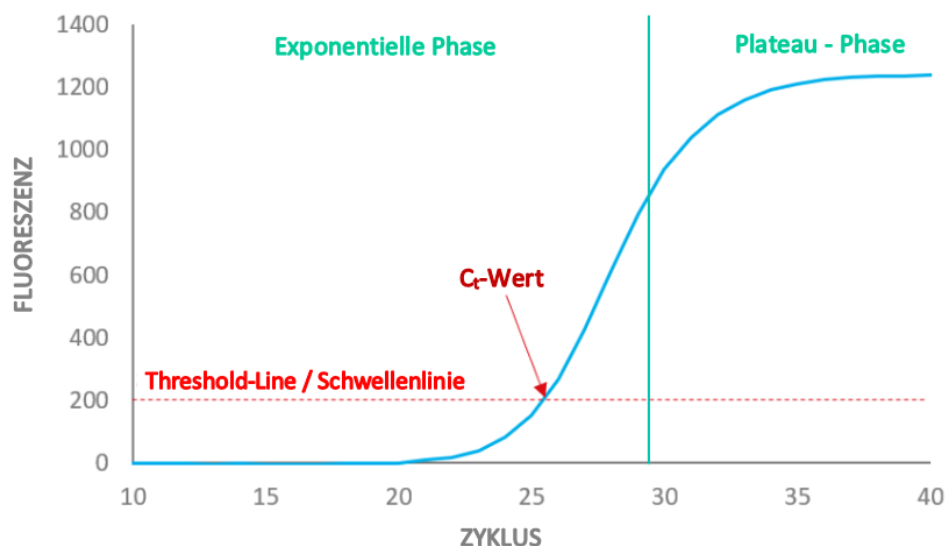


Abbildung 4: Typische Amplifikationskurve einer rt-PCR, wobei die Fluoreszenz gegen die Anzahl der Zyklen aufgetragen wurde; verändert nach [38].

Der Parameter, welcher zur Bestimmung der Menge einer Zielsequenz herangezogen wird, ist der Threshold Cycle ( $C_t$ -Wert). Dieser entspricht der Zykluszahl, bei welcher die Amplifikationskurve die Threshold-Line, auch Schwellenlinie genannt, schneidet. Demzufolge ist er ein Relativwert für die Ausgangs-Konzentration des Analyten, wobei der  $C_t$ -Wert mit abnehmender Templat-Menge ansteigt. [28,39]

### **3.2.3.2. Qualitative Analyse**

Um die Richtigkeit der Produkte, nach erfolgter Amplifikation mittels PCR, überprüfen zu können, ist es nötig weitere Analysen vorzunehmen. Hierzu bieten sich beispielsweise die Agarose-Gelelektrophorese, die HRM-Analyse, sowie die Pyrosequenzierung (PSQ) an.

#### **3.2.3.2.1. Agarose-Gelelektrophorese**

Zur Identifizierung und Auftrennung von Nukleinsäuren dient die Agarose-Gelelektrophorese. Die dafür benötigte Agarose ist ein Polysaccharid, welches aus roten Meeralgen gewonnen wird. [29]

Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes können die PCR-Produkte in Abhängigkeit von ihrer Größe bzw. Basenlänge aufgetrennt werden. Dies geschieht aufgrund des negativ geladenen Phosphatrückgrates der DNA, wodurch die Fragmente zur positiv geladenen Anode wandern. Zur definierten Migration der Moleküle wird eine gelartige Agarosematrix eingesetzt. Durch Variation der Agarose-Konzentration in der Matrix können DNA-Fragmente mit unterschiedlichen Längen von 0,1 bis 60 kb getrennt werden. Dabei ist es kürzeren DNA-Fragmenten möglich schneller durch das Gel zu wandern als längeren, wodurch Erstere tiefer in die Matrix eindringen. [29,35]

Generell ist es bei elektrophoretischen Trennmethoden zur Bestimmung der Basenpaarlänge von DNA-Fragmenten nötig einen zusätzlichen Größenstandard aufzutrennen. Dieser wird in eine separate Tasche des Gels transferiert, damit nach Beendigung der Elektrophorese die Möglichkeit besteht, die Basenlänge der aufgetrennten Fragmente einzuordnen. [29]

Um die Sichtbarkeit der erhaltenen Banden zu gewährleisten, ist es nötig die Nukleinsäuren mit fluoreszierenden Substanzen, wie z.B. mit GelRED, anzufärben. Diese werden zwischen den Basenpaarungen in die Doppelhelix interkaliert, sodass unter UV Anregung eine Betrachtung der Laufweite ermöglicht wird. [35]

#### **3.2.3.2.2. Hochauflösende Schmelzkurvenanalyse**

Eine weitere Methode, um unspezifische Produkte zu erkennen, ist die PCR-HRM. Hierbei erfolgt eine langsame Temperaturerhöhung um ungefähr 0,2 °C/sec nach Abschluss des letzten PCR-Zyklus, beginnend bei niedriger Temperatur. In Abhängigkeit von der Länge und Sequenz der DNA-Stränge findet eine Aufschmelzung der Doppelstränge bei einer gewissen Schmelztemperatur statt, wobei der interkalierende Farbstoff aus den PCR-Produkten diffundiert und dies somit zur Abnahme des Fluoreszenzsignals führt, bis die DNA lediglich als Einzelstrang vorliegt. Der Wendepunkt der dokumentierten, sigmoiden Schmelzkurve (Abb. 5), entspricht der spezifischen Schmelztemperatur ( $T_m$ ) für das jeweilige PCR-Produkt, wobei dieser das 1:1 Verhältnis von Einzelsträngen und Doppelsträngen widerspiegelt. [40]

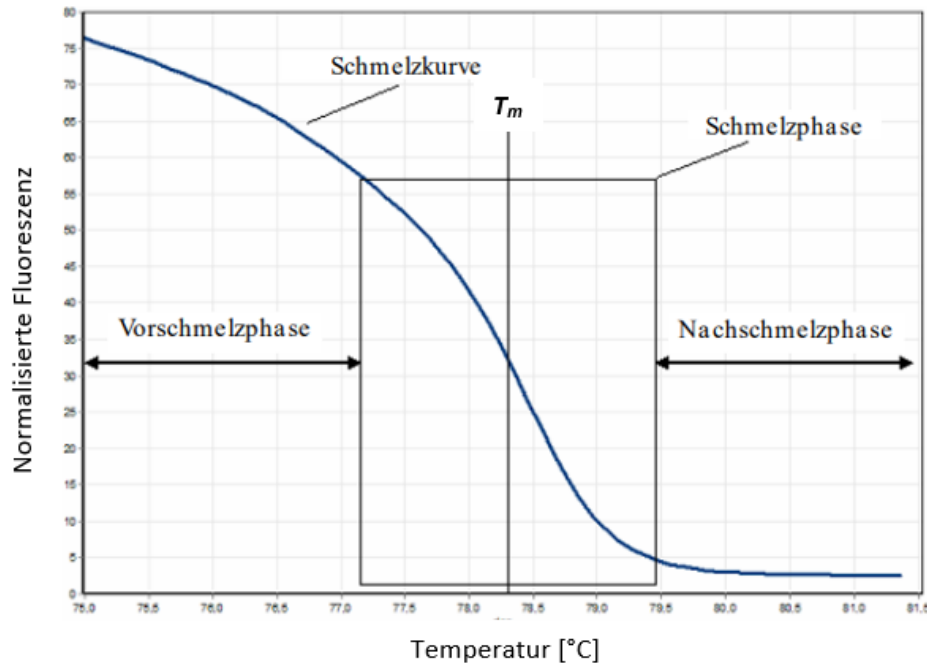


Abbildung 5: Schmelzdiagramm einer HRM-Analyse; verändert nach [41].

Wie bereits erwähnt ist die  $T_m$  stark von der Basenpaarung abhängig, sprich vom Anteil an A-T bzw. G-C - Paarungen. Dementsprechend benötigt ein DNA-Doppelstrang mit einer größeren Anzahl an G-C Basenpaaren einen höheren Energieaufwand zur Aufschmelzung, weil diese Bindungen über drei Wasserstoffbrücken verfügen, im Gegensatz zu A-T - Paarungen, welche lediglich von zwei Wasserstoffbrücken zusammengehalten werden (siehe Abb. 6). [24,40]

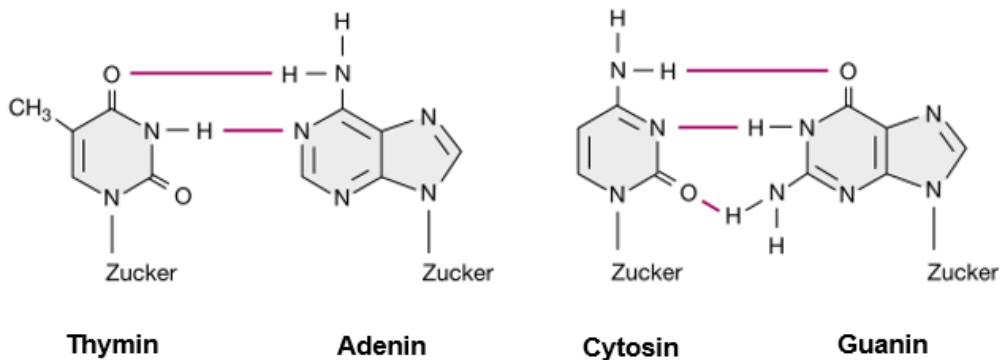


Abbildung 6: Wasserstoffbrücken der Basenpaarungen zwischen A-T und G-C; verändert nach [24].

Zur Auswertung wird häufig die negative erste Ableitung der Fluoreszenz gegen die Schmelztemperatur in °C aufgetragen. Die so veranschaulichten Peaks lassen durch die Verschiebung zu niedrigeren Temperaturen Primer-Dimere oder nicht spezifische Produkte aufzeigen, welche deutlich kürzere Kettenlängen aufweisen als die gewünschten Amplikons (Abb. 7). [40]

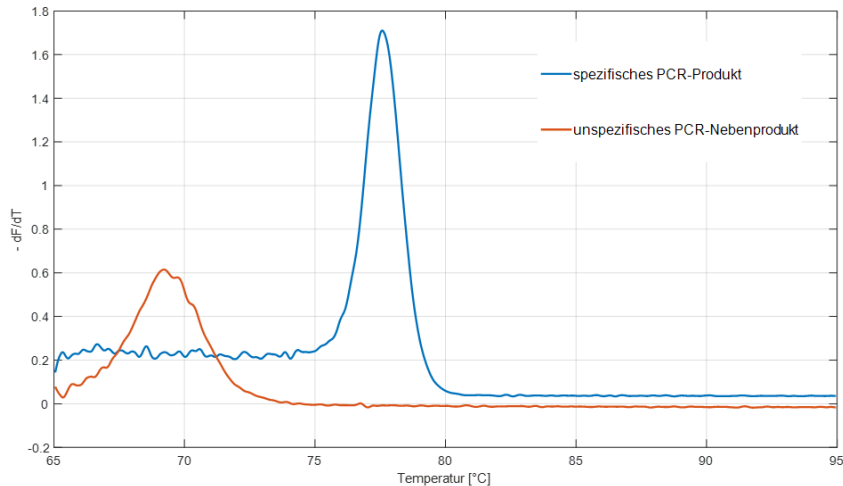


Abbildung 7: Schmelzprofil eines PCR-Produkts im Vergleich zu einem unerwünschten Nebenprodukt mit geringerer  $T_m$ .

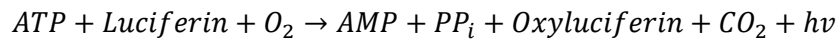
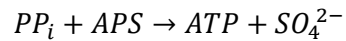
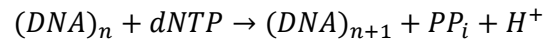
Mit Hilfe der PCR-HRM kann ebenfalls eine SNP-Genotypisierung der amplifizierten Sequenzen durchgeführt werden. In Abhängigkeit vom Schmelzpunkt der DNA ist eine Unterscheidung zwischen homozygotem Wildtyp, homozygoter- und heterozygoter Mutation möglich. [40]

### 3.2.3.2.3. Pyrosequenzierung

Die PSQ stellt eine moderne Variante der DNA-Sequenzierung dar, welche auf der wissenschaftlichen Arbeit von Ph.D. Pal Nyren im Jahr 1987 basiert und auf der Echtzeitdetektion von freigesetztem  $PP_i$  beim Einbau von Nukleotiden beruht. [42] Diese Sequenzierungstechnik ist nicht nur kostengünstiger und schneller als andere Sequenzierungsmethoden, wie z.B. die Sanger-Sequenzierung, sondern besitzt im Vergleich dazu auch eine sehr niedrige Nachweisgrenze. [42,43] Im Gegensatz zur Sanger-Methode (800 - 1000 bp) sind mit der PSQ jedoch nur kurze DNA-Fragmente, welche 100 - 250 bp umfassen, analysierbar. [43]

Zur Vorbereitung auf die eigentliche PSQ-Reaktion findet eine im Vorhinein durchgeführte PCR mit Hilfe eines biotinylierten (btn) Primers statt, wobei das 5'-Ende des Templates mit einem Biotinmolekül markiert wird. Des Weiteren erfolgt eine Fixierung des Zielstranges durch die Bindung mit Streptavidin-markierten magnetischen Kügelchen, die mit Biotin in Bindung treten. Dem durch Denaturierung entstandenen DNA-Einzelstrang wird daraufhin erneut ein Primer zugesetzt, welcher an dem 3'-Ende hybridisiert und eine Synthese des komplementären Stranges durch Einsatz einer DNA-Polymerase und einzeln-zugesetzten Nukleotiden hervorruft.

Genauer betrachtet geschieht hierbei eine enzymatische Reaktion. Nach dem erfolgreichen Einbau eines dNTPs mittels Polymerase findet die Freisetzung eines anorganischen  $PP_i$  statt, welches im nächsten Schritt, katalysiert vom Enzym ATP-Sulfurylase, mit Adenosin 5'-Phosphosulfat (APS) zu Adenosintriphosphat (ATP) reagiert. ATP findet wiederum als Cofaktor der darauffolgenden Luciferase-Reaktion Verwendung, wodurch Luciferin in Oxyluciferin umgewandelt wird und dies in einem detektierbaren Signal resultiert. Das dabei emittierte Licht ( $h\nu$ ) ist proportional zur Menge an verbrauchtem ATP. Die dazugehörigen Reaktionsformeln sind folgende: [42]



Das aufgenommene Fluoreszenzsignal wird als Pyrogramm dargestellt, womit sich entsprechend der integrierten Nukleotide die eingebaute Basensequenz bestimmen lässt (Abb. 8). [42]

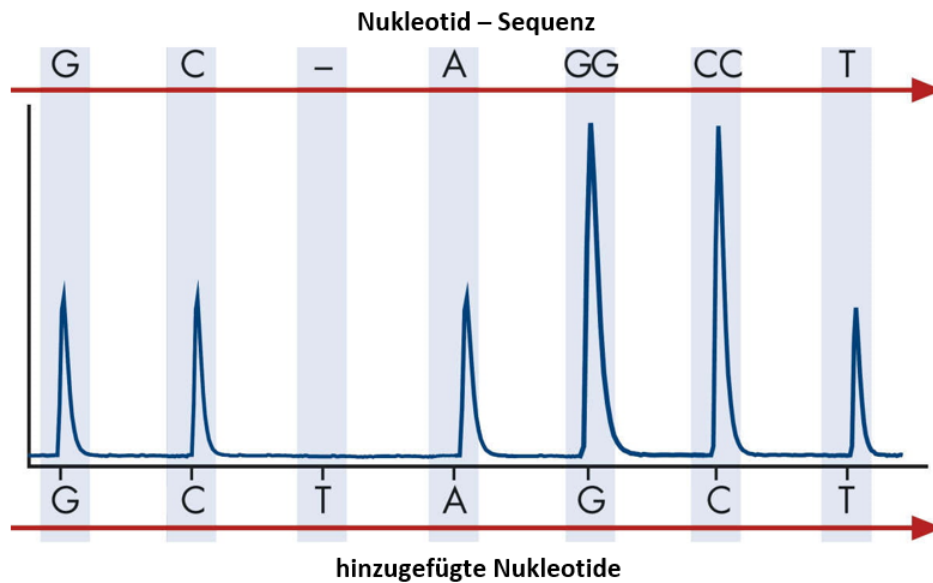


Abbildung 8: Beispielhafte Darstellung eines Pyrogramms; verändert nach [44].

Allgemein entspricht die DNA-Sequenzierung der Untersuchung der Abfolge von Nukleotiden, also den chemischen Grundbausteinen des Erbguts. Mit dieser Methode können auch Punktmutationen festgestellt werden, welche für eine Diagnose von Erbkrankheiten unerlässlich ist.

## 4. Experimenteller Teil

### 4.1. Gewebsmaterial

Die zu untersuchenden Materialien, aus welchen die DNA extrahiert wurde, waren in Isopropanol, EtOH und Formalin gelagerte, menschliche Föten, welche von Eduard Winter, dem Collections Manager des pathologisch-anatomischen Museums in Wien (Narrenturm), im Jahr 2019 dieser Studie zur Verfügung gestellt wurden. Als Kontrollproben wurden drei Föten ohne ODC herangezogen, wobei zwei davon in alkoholischen Lösungen (F1 vermutlich in Isopropanol, F2 vermutlich in EtOH) und der dritte in Formalin (F3) konserviert wurden. Zusätzlich wurden zwei FF Föten mit schweren Gesichtsanomalien (F#003, F#004) zur Untersuchung von ODC-assoziierten SNPs hinzugezogen. Bedauerlicherweise existieren aufgrund fehlender Angaben keine genaueren Kenntnisse über das Alter und die Lagerungsbedingungen der einzelnen Objekte.

Dieses Vorhaben wurde von einer Ethik-Kommission geprüft und genehmigt.

#### 4.1.1. Probenahme

Als Vergleichsgruppe dienten die alkoholisch- und Formalin-fixierten Föten ohne Gesichtsdysmorphien, welche zur Optimierung der DNA-Extraktionsmethoden herangezogen wurden. Unter sterilen Arbeitsbedingungen wurden von diesen Präparaten, von Dr. Andreas Glowania und Christina Wagner MSc, verschiedenste Gewebsarten, wie Leber, Herz, Lunge, Darm, Magen, Milz, Nabelschnur, Muskeln, Knochen, Klein- und Großhirn, entnommen (Abb. 9, Tabelle (Tab.) 1).

Die Gewebsentnahme der ODC-erkrankten Föten, welche einen deutlich größeren Korpus aufwiesen, erfolgte durch Nutzung einer minimal-invasiven 3D-basierten Technologie, wobei die Föten zunächst von Dr. Andreas Glowania und Rudolf Schmidt untersucht und im Anschluss gewisse Gewebsarten zu Analyse Zwecken herausoperiert wurden: Leber, Herz, Lunge, Darm, Magen, Milz, Nabelschnur, Muskel, Knochen, Kleinhirn und Großhirn (Abb. 9, Tab. 1). [16]



Abbildung 9: Gewebsentnahme von langzeit-konservierten Föten ohne (links) und mit Gesichtsdysmorphien (rechts).

Tabelle 1: Entnahme von verschiedenen Gewebstypen der verwendeten Föten.

| <b>Bezeichnung der Föten</b> |             | <b>F1</b>          | <b>F2</b>   | <b>F3</b>       | <b>F#003</b>    | <b>F#004</b>    |
|------------------------------|-------------|--------------------|-------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <i>Konservierungsmittel</i>  |             | <i>Isopropanol</i> | <i>EtOH</i> | <i>Formalin</i> | <i>Formalin</i> | <i>Formalin</i> |
| <b>Gewebstyp</b>             | Leber       | x                  | x           | x               | x               | x               |
|                              | Herz        | x                  | x           | x               | x               | x               |
|                              | Lunge       | x                  | x           | x               | x               | x               |
|                              | Darm        | x                  | x           | x               | x               | x               |
|                              | Magen       | x                  | x           | x               | x               | x               |
|                              | Milz        | x                  | x           | x               | x               | x               |
|                              | Nabelschnur | x                  | x           | x               | x               | x               |
|                              | Muskel      | x                  | x           | x               | x               | x               |
|                              | Knochen     | x                  | x           | x               | x               | x               |
|                              | Kleinhirn   | x                  | x           | x               | x               | -*              |
|                              | Großhirn    | x                  | x           | x               | x               | x               |

\* keine Entnahme

Grundsätzlich wurden von allen Gewebstypen jeweils ein bis zwei Gramm entnommen und in einem 15 mL Falcon-Tube bei - 20 °C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

## 4.2. Homogenisierung der Gewebeproben

Zur Optimierung des Gewebsaufschlusses erfolgte vor der Zelllyse eine Homogenisation der Gewebsmaterialien unter Einsatz des FastPrep-24 5G Tissue Homogenizers (Abb. 10).

Um Kontaminationen der Probe hinsichtlich anderer DNA-Rückstände zu vermeiden, wurden im ersten Schritt alle Arbeitsflächen des Labors gründlich mit DNA Exitus Plus™ IF gereinigt. Im DNA-Extraktionslabor wurden für die Versuchsdurchführungen 25 mg bzw. 100 mg der zu untersuchenden Probe eingewogen und mit Hilfe eines sterilen Skalpells in ungefähr 1x1x1 cm große Stücke geschnitten, um diese anschließend in ein für den Homogenisator geeignetes, stoßfestes 2 mL Röhrchen zu überführen. Diesem wurde daraufhin eine spezielle Lysematrix zugeführt, welche aus zwei ¼“ Keramikkügelchen (Matrix M, Abb. 11) bestand und aufgrund von früheren Versuchen einer Kollegin (Christina Wagner, MSc) für weitere Zwecke verwendet wurde.





Abbildung 10: FastPrep-24 5G Tissue Homogenizer

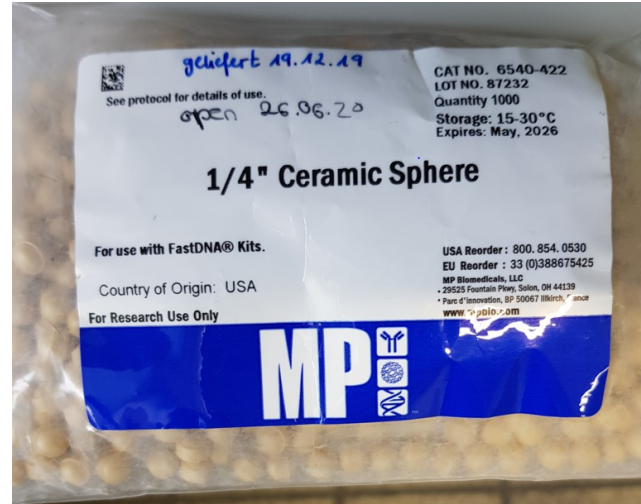


Abbildung 11: Matrix M, 1/4" Keramikkügelchen

Nach Zugabe eines Extraktionspuffers wurden die Proben, unter Einstellung verschiedener Geräteparameter des gewebserstörenden Apparates (Tab. 2) für fortlaufende Aufarbeitungsschritte zerkleinert.

Tabelle 2: Einstellungen zur Homogenisation mittels FastPrep-24 5G Tissue Homogenizer für alle Extraktionsverfahren.

| Lysematrix | Geschwindigkeit<br>[m/sec] | Adapter   | Zeit<br>[sec] | Quantity<br>[mg] | Zyklen | Pause Zeit<br>[sec] |
|------------|----------------------------|-----------|---------------|------------------|--------|---------------------|
| M          | 6,0                        | QuickPrep | 40            | 160              | 3      | 300                 |

### 4.3. DNA-Extraktionsprotokolle

Um die Isolierung der DNA aus FF Gewebe, sowohl hinsichtlich der Ausbeute als auch der Reinheit, weiter zu optimieren, wurde die Studie von Christina Wagner MSc zur praktischen Durchführung herangezogen, welche in ihrer Masterarbeit mit dem Titel „Extraction of genomic DNA from formalin-fixed and ethanol-fixed, long-term stored museal tissue with regard to SNP analysis in fetuses with Otocephaly-Dysgnathia Complex“ bereits einige Extraktionsversuche mit modifizierten Protokollen vorgenommen hatte. Aus diesem Grund wurden nicht die originalen Extraktionsverfahren der Hersteller als Vorlage verwendet, sondern die zuletzt angewendeten Versuchsmethoden von Frau Wagner, welche auf diesen basieren. [16]

#### **4.3.1. QIAamp DNA Mini Kit**

Das originale Extraktionsprotokoll des QIAamp DNA Mini Kits (Qiagen) wurde aus dem dazugehörigen Kit-Handbuch des Herstellers entnommen. Die Vorlage für nachkommende Variationen der DNA-Isolierung basiert auf [16].

Nach einer Probeneinwaage von 25 mg in ein resistentes 2 mL Gefäß wurde, dem 1x1x1 cm zerkleinerten Gewebe, 180 µL ATL Puffer zugesetzt und mit Hilfe von LyseMatrix D (1,4 mm Keramik Kügelchen) und des FastPrep-24 5G Tissue Homogenizers homogenisiert. Danach wurden 20 µL Prot. K [20 mg/mL] zugesetzt und kurz gevortext, worauf eine 18 stündige Inkubation auf einem Thermoschüttler bei Einstellungen von 56 °C und 800 rpm erfolgte. Daraufhin wurden, nach kurzem Abzentrifugieren, 4 µL einer RNaseA Lösung [100 mg/mL] hinzu pipettiert und für 15 sec gepulst-gevortext. Nach 2-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT) und erneutem kurzen Abspinnen wurde der Lösung 200 µL des AL Puffers hinzugefügt und wiederum für 15 sec gepulst-gevortext. Infolgedessen wurde eine 10-minütige Inkubation bei 70 °C durchgeführt, woraufhin eine kurze Zentrifugation und eine Zugabe von 200 µL absoluten (abs.) EtOH (96 - 100 %) stattfand, gefolgt von erneutem gepulst-vortexen für 15 sec. Anschließend wurde die Probelösung nach kurzem Abspinnen auf eine QIAamp Mini Spin Säule, welche sich in einem 2 mL Sammelbehältnis befand, transferiert und bei 8000 rpm für 1 min zentrifugiert. Im Zuge des darauffolgenden Waschschritts wurde das Filtrat verworfen und die Spin Säule in ein neues Sammelgefäß befördert, worauf 500 µL des AW1 Puffers zugegeben wurden. Nach 1-minütiger Zentrifugation bei 8000 rpm wurde das Sammel-Tube abermals getauscht, bevor 500 µL des AW2 Puffers zugefügt wurden. Diesmal wurde die Spin Säule bei einer Höchstgeschwindigkeit von 14000 rpm für 3 min zentrifugiert, wobei nach Überführung der Säule in ein neues Gefäß der Vorgang bei 14000 rpm für 1 min wiederholt wurde. Zur Rückgewinnung der an der Säule gebundenen DNA wurde die Spin Säule in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß eingeführt, wonach auf die stationäre Phase der Säule 50 µL AE Puffer pipettiert wurden. Daraufhin konnte nach 1-minütiger Inkubation bei RT die DNA durch Zentrifugation bei 8000 rpm für 1 min eluiert werden. Um sicherzustellen, dass die gesamte DNA von der Säule eluiert wurde, wurde der letzte Schritt zweimal wiederholt, wobei jedes Eluat in einem separaten 1,5 mL Eppendorf-Behältnis aufgefangen wurde. Bis zur weiteren Analyse wurde die gesammelte DNA bei - 20 °C gelagert. [16]

##### **4.3.1.1. Modifikation des QIAamp DNA Mini Kits Extraktionsprotokolls**

Um die Eignung des kommerziell erhältlichen QIAamp DNA Mini Kits auf die Extraktion von intakter DNA aus langzeit-konservierten Gewebspräparaten, hinsichtlich der DNA-Ausbeute und DNA-Reinheit zu testen, wurde das bereits im Vorfeld modifizierte Extraktionsprotokoll (Kap. 4.3.1) nochmals mit unterschiedlichen Lysepuffern und unter Verwendung von Lebergewebe eines Föten ohne ODC (F2) und beider an ODC-erkrankten Föten (F#003, F#004) durchgeführt. Die Bedingungen der verschiedenen Variationen (V1a - V2) sind in Tabelle 3 aufgelistet.

*Tabelle 3: Variation der Parameter ausgehend vom modifizierten QIAamp DNA Mini Kit Extraktionsprotokoll aus Kapitel 4.3.1. Verändert wurden dabei folgende Kenngrößen: Fötus/Gewebstyp, Art des Lysepuffers, Lysematrix, die Einstellungen bei der Zentrifugation der Spin Säule und die Inkubationszeit des Elutionspuffers (AE) vor Elution der DNA.*

| Abkürzung der Variation | Fötus/Gewebstyp            | Lysepuffer                            | Lysematrix | Zentrifugation    | Inkubationszeit AE Puffer |
|-------------------------|----------------------------|---------------------------------------|------------|-------------------|---------------------------|
| <b>V1a</b>              | F2/Leber                   | 180 µL ATL                            | Matrix M2  | 12000 rpm / 2 min | 5 min                     |
| <b>V1b</b>              | F2/Leber                   | 15 µL 20% SDS +<br>132,5 µL 2,26x TE9 | Matrix M2  | 12000 rpm / 2 min | 5 min                     |
| <b>V2</b>               | F#003/Leber<br>F#004/Leber | 180 µL ATL                            | Matrix M2  | 12000 rpm / 2 min | 5 min                     |

In den Variationen **V1a** und **V1b** wurde jeweils das Lebergewebe des EtOH-fixierten Föten F2 zur Isolierung der DNA aufgearbeitet. Hierbei lag der Unterschied in der Art des zugesetzten Lysepuffers vor der Homogenisation des Gewebes. Bei **V1a** wurde mit ATL Puffer, bei **V1b** mit einem Puffer-Gemisch aus 20 % SDS und 2,26x TE9 gearbeitet, welches in der Studie von Sambrook und Russell verwendet wurde. [45] Die Lysematrix, welche zur Homogenisation der Proben verwendet wurde, waren 2 ¼“ Keramikkügelchen (Matrix M), da sich diese am besten zur Gewebszerstörung und zur nachfolgenden Entfernung eigneten. [16] Des Weiteren mussten für alle Variationen die Zentrifugationsgeschwindigkeit und -zeit optimiert werden, da bei Einstellungen von 8000 rpm für 1 min, durch Verstopfen der Säule, keine Zentrifugation erfolgen konnte. Um eine höhere Ausbeute der DNA zu erreichen, wurde ebenfalls die Inkubationszeit des AE Puffers auf der Säule von 1 min auf 5 min optimiert.

In Variation **V2** wurde die Leber von den beiden FF Föten F#003 und F#004 untersucht. Dabei wurde der Einsatz von ATL als Lysepuffer beibehalten. Die Durchführung erfolgte sonst analog zu **V1a** und **V1b**.

#### **4.3.2. QIAamp DNA FFPE Tissue Kit**

Die DNA-Extraktionsmethode unter Verwendung des QIAamp DNA FFPE Tissue Kits (Qiagen) wurde gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Da keine Paraffin-fixierten Proben untersucht wurden, konnten die ersten paar Schritte des Protokolls übersprungen werden. Die durchgeführten Optimierungsschritte erfolgten auf Basis von [16].

Demnach wurden 25 mg Probe zunächst mittels Skalpell zerkleinert, in ein resistentes 2 mL Röhrchen transferiert und zum Waschen 80 µL einer PBS-Lösung hinzu pipettiert, bevor eine 1-minütige Zentrifugation bei 8000 rpm stattfand. Nach Verwerfen des Überstandes kam es zu einer Wiederholung des Reinigungsschrittes, wonach 2 Kügelchen Lysematrix M und 180 µL eines ATL Puffers mit 0,075 % Reagenz DX (R.DX) (v/v) zugesetzt wurden. Die anschließende Homogenisation wurde durchgeführt, um nach Entfernung der Matrix die Zelllyse durch Zugabe von 20 µL Prot. K [20 mg/mL] und gründliches Vortexen zu starten. Anschließend wurde das Gemisch auf einem Thermoschüttler für 24 h bei 56 °C und 800 rpm inkubiert, wobei alle 2 h die Probengefäße kurz gevortext und erneut abgespinn wurden. Gleich darauf wurden die Proben für 1 h bei 90 °C inkubiert, um Quervernetzungen, welche in Folge der FF auftreten, umzukehren. Nach kurzem Abspinnen wurde abgewartet, bis die

Mischung auf RT abkühlt war, um danach 2 µL RNaseA [100 mg/mL] zuzufügen und diese für 2 min bei RT zu inkubieren. Im Anschluss wurden 200 µL AL Puffer hinzu pipettiert, alles durch reichliches vortexen vermengt und kurz abgespinn. Die Probe wurde danach mit 200 µL abs. EtOH durch vortexen vermischt. Nach kurzem Abzentrifugieren der Lösung wurde diese auf eine QIAamp MinElute Säule transferiert, welche sich in einem 2 mL Sammelbehältnis befand, und bei 8000 rpm für 1 min zentrifugiert, wobei das Filtrat verworfen und die Säule in ein neues Sammelgefäß überführt wurde. Infolgedessen wurden 500 µL AW1 Puffer zugesetzt und für 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Daraufhin wurde, nach erneutem Verwerfen des Filtrats, die Säule in ein neues Behältnis transferiert und 500 µL AW2 Puffer zupipettiert. Nach 1-minütiger Zentrifugation bei 8000 rpm wurde die Säule in ein neues Sammelgefäß eingesetzt und daraufhin bei einer Höchstgeschwindigkeit von 12000 rpm für 3 min zentrifugiert. Zum Eluieren der DNA wurde die Säule in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt und darauffolgend 50 µL ATE Puffer auf die stationäre Phase der Säule aufgetragen. Zuletzt wurde, nach 1-minütiger Inkubationszeit bei RT, die DNA gewonnen, indem für 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert wurde. Um sicherzustellen, dass die gesamte DNA von der Säule eluiert wurde, wurde der letzte Schritt zweimal wiederholt, wobei jedes Eluat in einem separaten 1,5 mL Eppendorf-Behältnis aufgefangen wurde. Bis zur weiteren Analyse wurde die gesammelte DNA bei - 20 °C gelagert. [16]

#### 4.3.2.1. Modifikation des QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Extraktionsprotokolls

Um die Eignung des kommerziell erhältlichen QIAamp DNA FFPE Tissue Kits auf die Extraktion von intakter DNA aus langzeit-konservierten Gewebspräparaten, hinsichtlich der DNA-Ausbeute und DNA-Reinheit zu testen, wurde das bereits im Vorfeld modifizierte Extraktionsprotokoll (Kap. 4.3.2) nochmals mit unterschiedlichen Waschschritten, Lysepuffern, Lysezeiten, Inkubationszeiten zum RNA-Abbau und unter Verwendung von Leber- und Gehirngewebe von Föten ohne ODC (F2, F3) durchgeführt. Die Bedingungen der verschiedenen Variationen (V3 - V4b) sind in Tabelle 4 aufgelistet.

*Tabelle 4: Variation der Parameter ausgehend vom modifizierten QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Extraktionsprotokoll aus Kapitel 4.3.2. Verändert wurden dabei folgende Kenngrößen: Fötus/Gewebstyp, Waschschrift vor der Lyse, Art des Lysepuffers, Lysezeit, Inkubationszeit bei RNA-Abbau, die Einstellungen bei der Zentrifugation der Spin Säule und die Inkubationszeit des Elutionspuffers (ATE) vor Elution der DNA.*

| Abkürzung der Variation | Fötus/ Gewebstyp       | Waschschrift   | Lysepuffer                            | Lyse [h] | RNA-Abbau                        | Zentrifugation                                  | Inkubationszeit ATE Puffer |
|-------------------------|------------------------|--|---------------------------------------|----------|----------------------------------|---|----------------------------|
| V3                      | F2/Leber               | 25 °C,<br>800 rpm,<br>1 h (2x)   | 180 µL ATL /<br>0,075 %<br>R.DX (v/v) | 18       | 2 µL RNaseA,<br>2 min Inkubation | 13000 rpm,<br>1 min<br>&<br>12000 rpm,<br>2 min | 5 min                      |
| V4a                     | F2/Gehirn<br>F3/Gehirn | 25 °C,<br>800 rpm,<br>1 h (2x)   | 180 µL ATL /<br>0,05 %<br>R.DX (v/v)  | 24       | 2 µL RNaseA,<br>4 min Inkubation | 13000 rpm,<br>1 min                             | 5 min                      |
| V4b                     | F2/Gehirn<br>F3/Gehirn | 50 °C,<br>800 rpm,<br>1 h (4x) + über<br>Nacht mit PBS<br>bei 50 °C<br>inkubiert | 180 µL ATL /<br>0,05 % R.DX<br>(v/v)  | 24       | 2 µL RNaseA,<br>4 min Inkubation | 13000 rpm,<br>1 min                             | 5 min                      |

Für **V3** wurde die Leber von F2 herangezogen. Für einen besseren Arbeitsfluss wurde die Lysezeit von 24 h auf 18 h herabgesetzt. Zudem erfolgte die erste Zentrifugation mit der MinElute Säule bei 13000 rpm, da die Säule bei 8000 rpm keine Filtration zuließ. Auch bei den Waschschritten musste eine erhöhte Zentrifugation von AW1 und AW2 erfolgen (12000 rpm, 2 min), da dies mit der bereits genannten Drehzahl nicht möglich war. Des Weiteren wurde, vor Elution der DNA, die Inkubation der stationären Phase mit ATE Puffer auf 5 min erhöht, um die Ausbeute zu steigern.

Für die Variationen **V4a** und **V4b** wurde Großhirngewebe vom EtOH-fixierten Föten F2 und vom FF Föten F3 eingesetzt. Die beiden Variationen unterschieden sich im Waschschrift vor der Zellyse. Bei **V4b** wurde der Waschschrift bei 50 °C über Nacht durchgeführt. Hierzu wurde nach Zugabe von 80 µl PBS für 1 h bei 50 °C und 800 rpm am Thermoschüttler inkubiert, um anschließend den Überstand nach Zentrifugation (8000 rpm, 1 min) zu verwerfen. Nach 4-facher Wiederholung dieses Schritts wurde, nach erneuter PBS-Zugabe, über Nacht zu gegebenen Einstellungen (Tab. 4) weiter inkubiert, wobei die Gesamtdauer des Reinigungsvorgangs in etwa 21 h betrug.

Nach Beendigung des Waschvorgangs wurde, sowohl bei **V4a** und **V4b**, eine Pufferlösung von 180 µl ATL mit 0,05 % R.DX (v/v) verwendet. Die Dauer der Zellyse, nach erfolgter Homogenisation, wurde bei 24 h belassen. Eine weitere Modifizierung bestand in der Verlängerung der Dauer der Inkubation mit RNaseA auf 4 min.

Das Problem der Säulenverstopfung bei **V3** war auch bei beiden **V4**-Variationen (**V4a**, **V4b**) gegeben. Daher wurden die MinElute Säulen 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert, um den Durchfluss der Lösungsmittel zu ermöglichen. Vor der Elution der DNA wurde der ATE Puffer 5 min inkubiert.

#### 4.3.3. Phenol-Chloroform Extraktion

Das originale, für dieses Verfahren eingesetzte, Extraktionsprotokoll entstammt einer Publikation von Sambrook und Russell [45], welches von C. Wagner in folgender Weise modifiziert wurde:

25 mg Gewebeprobe wurden eingewogen, welche wiederum in 1x1x1 cm große Stücke zerteilt und in ein resistentes 2 mL Tube transferiert wurden. Um das Fixativ der Probe zu entfernen wurden 80 µL PBS zugesetzt und die Mischung für 1 h bei 25 °C und 800 rpm am Thermoschüttler belassen. Nach 1-minütiger Zentrifugation bei 8000 rpm wurde der Überstand mittels Pipette verworfen und der gesamte Waschschrift wiederholt. Danach wurde das Gewebe homogenisiert. Dazu wurde ein Gemisch aus 15 µL 20 % SDS (w/v) und 132,5 µL 2,26x TE9 Puffer der Probe hinzugefügt. Im Anschluss erfolgte die Zerkleinerung der Probe mit Hilfe des FastPrep-24 5G Tissue Homogenizers unter Verwendung der Lysematrix M. Die Einstellungen des Gerätes können der Tabelle 2 des Kapitels 4.2 entnommen werden.

Nach Beendigung dieses Vorgangs wurden die Keramikkügelchen vorsichtig entfernt, um anschließend die Zellyse durchzuführen. Dafür wurde das Gewebe mit 157,5 µL Prot. K [20 mg/mL] versetzt, gründlich gevortext und für 18 h bei 56 °C und 800 rpm inkubiert. Zur Umkehrung der Formaldehyd-Modifikationen wurde eine erneute Inkubation des Gemisches für 1 h bei 90 °C gestartet und danach auf RT abgekühlt. Der Abbau der RNA erfolgte, nach kurzem Abspinnen des Gemisches, unter Zusatz von 2 µL RNaseA [100 mg/mL]. Nach kurzem Vortexen und erneutem Abspinnen wurde des Weiteren zunächst für 2 min bei RT, danach für 10 min bei 70 °C inkubiert. Nach Abkühlung der Probe begann der DNA-Isolierungsschritt durch Zugabe von 700 µL PC (Roti®-phenol-chloroform-isoamyl alcohol;

Roth), 15 sec Vortexen und darauffolgender Zentrifugation (5 min, 14000 rpm). Danach wurde die wässrige Phase in ein 1,5 mL Tube transferiert und der gesamte Schritt, beginnend mit Zugabe von erneut 700 µL PC, wiederholt. Die daraus resultierende wässrige Phase wurde anschließend mit 750 µL einer EtOH/NH<sub>4</sub>Ac-Lösung (8:1, (v/v)) gemischt, 4x über Kopf gedreht und für 1 h bei RT inkubiert. Unter Verwendung einer Kühlzentrifuge wurde die Probe bei 4 °C und 14000 rpm für 45 min zentrifugiert und danach der Überstand vom entstandenen Pellet mittels Pipette entfernt. Zum Waschen des Rückstandes wurde dieser mit 1 mL 70 % EtOH (v/v) versetzt, erneut zentrifugiert (15 min, RT, 14000 rpm) und danach wiederum der Überstand verworfen. Bei offenen Eppendorf-Gefäßen wurden die Proben für ungefähr 20 min bei RT getrocknet, bevor die DNA in 50 µL EB Puffer durch kurzes vortexen, abspinnen und Inkubation am Thermoschüttler (RT, 800 rpm, 2 h) gelöst wurde. Die Lagerung der DNA erfolgte im Gefrierschrank bei - 20 °C. [16]

#### 4.3.3.1. Modifikation des Phenol-Chloroform Extraktionsprotokolls

Um die Anwendbarkeit der PC-Methode zur Extraktion von intakter DNA aus langzeit-konservierten Gewebspräparaten, hinsichtlich der DNA-Ausbeute und DNA-Reinheit zu untersuchen, wurde das bereits im Vorfeld modifizierte Extraktionsprotokoll (Kap. 4.3.3) nochmals mit unterschiedlichen Waschschritten, Lysezeiten und unter Verwendung von Lebergewebe der Föten ohne ODC (F1, F2, F3) durchgeführt. Die Bedingungen der verschiedenen Variationen (V5 - V7) sind in Tabelle 5 aufgelistet.

*Tabelle 5: Variation der Parameter ausgehend vom modifizierten PC-Extraktionsprotokoll aus Kapitel 4.3.3. Verändert wurden dabei folgende Kenngrößen: Fötus/Gewebstyp, Waschschrift vor der Lyse und die Lysezeit.*

| Abkürzung der Variation | Fötus/Gewebstyp                  | Waschschrift                | Lyse [h] |
|-------------------------|----------------------------------|-----------------------------|----------|
| <b>V5</b>               | F1/Leber                         | 15 min, 800 rpm, 25 °C (1x) | 20       |
| <b>V6</b>               | F1/Leber<br>F2/Leber<br>F3/Leber | 1 h, 800 rpm, 25 °C (2x)    | 18       |
| <b>V7*</b>              | F2/Leber                         | 1 h, 800 rpm, 25 °C (2x)    | 18       |

\* Wiederholung von V6 mit dem Lebergewebe des Föten F2

Für **V5** wurde das Lebergewebe des Isopropanol-fixierten Föten 1 herangezogen. Hierbei fand ein verkürzter Waschschrift vor der 20-stündigen Zellyse statt, wobei nur einmal PBS zugegeben und für 15 min (statt 1 h), inkubiert wurde.

In **V6** wurden die Lebergewebe der drei Föten ohne Gesichtsdysmorphien (F1, F2, F3) zur DNA-Isolierung herangezogen. Dabei wurde das in Kapitel 4.3.3 beschriebene Extraktionsprotokoll ohne jegliche Modifikationen ausgeführt.

**V7** wurde wie **V6** durchgeführt, allerdings wurde nur das Lebergewebe des EtOH-fixierten Föten F2 verwendet.



#### 4.3.4. Hot Alkali Extraktion

Dieses Extraktionsverfahren verlief grundsätzlich analog zum PC-Verfahren. Im Unterschied zum im Abschnitt 4.3.3 beschriebenen Protokoll wurde bei der Hot Alkali-Methode zwischen der Homogenisation und der Zellyse eine Hitzebehandlung unter alkalischen Bedingungen, nach dem Protokoll von Shi *et al.*, durchgeführt. [20] Außerdem wurde, statt des SDS/2,26x TE9 Puffer-Gemisches, eine ATL/R.DX-Pufferlösung bei der Homogenisierung verwendet.

25 mg des zu untersuchenden Gewebes wurden eingewogen und mit 80 µL PBS gereinigt, wobei ebenfalls zwei Waschvorgänge stattfanden. Zur Homogenisierung wurde, nach dem Zusatz von 2 Kügelchen Lysematrix M, 180 µL ATL Puffer versetzt mit 0,05 % R.DX dem gesäuberten Gewebe zugefügt und mit dem FastPrep-24 5G Tissue Homogenizer homogenisiert (Geräte-Einstellungen siehe Tab. 2). Nach Entfernung der Lysematrix wurde die Hitzebehandlung durchgeführt, wobei zunächst ein Gemisch von 500 µL 0,1 M Natriumhydroxid (NaOH)-Lösung mit 1 % SDS der Probe zugegeben, und diese anschließend kurz gevortext und abgespinnet wurde. Daraufhin wurde die Mischung für 20 min bei 100 °C am Thermoschüttler bzw. 120 °C im Wärme-/Trockenschrank inkubiert. Nachdem die Probe auf RT abgekühlt war, erfolgte die Zellyse durch Zugabe von 20 µL Prot. K [20 mg/mL] und Inkubation am Thermoschüttler (56 °C, 800 rpm, 18 h). Alle weiteren Schritte wurden gemäß Abschnitt 4.3.3 durchgeführt. Die gewonnene DNA wurde im Gefrierschrank bei - 20 °C gelagert.

##### 4.3.4.1. Modifikation des Hot Alkali Extraktionsprotokolls

Um die Anwendbarkeit der Hot Alkali-Methode zur Extraktion von intakter DNA aus langzeit-konservierten Gewebspräparaten, hinsichtlich der DNA-Ausbeute und DNA-Reinheit zu untersuchen, wurde das Extraktionsprotokoll (Kap. 4.3.4) mit unterschiedlichen Einwaagen des Gewebes, Waschschritten, zum Teil erhöhten Reaktionsvolumina, Hitzebehandlungen (Dauer, Temperatur, rpm), Umkehrung der Formaldehyd-Modifikationen, extra Waschschritt bei der Extraktion, DNA-Fällung unter Verwendung von allen Gewebsarten des EtOH-fixierten Föten (F2), sowie Großhirn-, Leber- und Lungengewebe des FF Föten (F3) durchgeführt. Die Bedingungen der verschiedenen Variationen (V8 - V17b) sind in Tabelle 6 aufgelistet.

*Tabelle 6: Variation der Parameter ausgehend vom Hot Alkali Protokoll aus Kapitel 4.3.4. Verändert wurden dabei folgende Kenngrößen: Fötus/Gewebstyp, Einwaage des Gewebes in mg, Waschschritt vor der Lyse, Volumina vom ATL Puffer, Prot. K und RNaseA, Hitzebehandlung bezogen auf Dauer und Temperatur mit und ohne Schütteln, Umkehrung der Formaldehyd-Modifikationen, zusätzlicher Waschschritt nach Zugabe von PC, sowie die Fällung der DNA bei unterschiedlichen Temperaturen und die Färbung der präzipitierten DNA.*

| Abkürzung der Variation | Fötus/ Gewebstyp           | Einwaage [mg] | Waschschritt                                    | Reaktions-Volumina  | Hitze-Behandlung             | Umkehrung der Formaldehyd-Modifikationen | Extra Waschschritt nach Zugabe von PC | DNA-Fällung / -Färbung |
|-------------------------|----------------------------|---------------|---|---|------------------------------|--|---------------------------------------|------------------------|
| V8                      | F2/Großhirn<br>F3/Großhirn | 25            | 80 µL PBS,<br>1 h,<br>800 rpm,<br>25 °C<br>(2x) | 180 µL ATL/0,05%<br>R.DX, 20 µL<br>Prot.K, 2 µL<br>RNaseA<br>[100mg/mL]<br>(QIAGEN) | 20 min,<br>99 °C,<br>300 rpm | 90 °C,<br>1 h                            | -                                     | 1 h bei<br>RT / k.F.*  |
| V9a                     | F2/Großhirn<br>F3/Großhirn | 25            | -   | 180 µL ATL/0,05%<br>R.DX, 20 µL<br>Prot.K, 2 µL                                     | 20 min,<br>99 °C,<br>0 rpm   | 90 °C,<br>1 h                            | -                                     | 1 h bei<br>RT / k.F.*  |

|      |  |     |  |   |                               |               |                          |                                   |
|------|--|-----|--|---|-------------------------------|---------------|--------------------------|-----------------------------------|
| V9b  |  |     |  | RNaseA<br>[100mg/mL]<br>(QIAGEN)  | 20 min,<br>120 °C,<br>0 rpm   |               |                          |                                   |
| V10a | F2/Leber   | 25  | 80 µL PBS,<br>1 h,<br>800 rpm,<br>25 °C<br>(2x)  | 180 µL ATL/0,05%<br>R.DX, 20 µL<br>Prot.K, 2 µL<br>RNaseA<br>[100mg/mL]<br>(QIAGEN) | 25 min,<br>99 °C,<br>0 rpm    | 90 °C,<br>1 h | -                        | 1 h bei<br>RT / k.F.*             |
| V10b | F3/Leber<br>F2/Lunge   |     |  |   | 25 min,<br>120 °C,<br>0 rpm   |               |                          |                                   |
| V11a | F2/Leber<br>F2/Lunge   | 25  | 80 µL PBS,<br>1 h,<br>800 rpm,<br>25 °C<br>(2x)  | 180 µL ATL/0,05%<br>R.DX, 20 µL<br>Prot.K, 2 µL<br>RNaseA<br>[100mg/mL]<br>(QIAGEN) | 20 min,<br>120 °C,<br>0 rpm   | 90 °C,<br>1 h | -                        | 1 h bei<br>RT / k.F.*             |
| V11b |  |     |  |   | 30 min,<br>120 °C,<br>0 rpm   |               |                          |                                   |
| V11c |  |     |  |   | 40 min,<br>120 °C,<br>0 rpm   |               |                          |                                   |
| V12  | F2/Milz<br>F2/Herz<br>F2/Nabelschnur<br>F2/Darm<br>F2/Muskel<br>F2/Kleinhirn | 25  | 80 µL PBS,<br>1 h,<br>800 rpm,<br>25 °C<br>(2x)  | 180 µL ATL/0,05%<br>R.DX, 20 µL<br>Prot.K, 2 µL<br>RNaseA<br>[100mg/mL]<br>(QIAGEN) | 30 min,<br>100 °C,<br>300 rpm | 90 °C,<br>1 h | -                        | 1 h bei<br>RT / k.F.*             |
| V13a | F3/Leber<br>F3/Lunge   | 100 | 160 µL PBS,<br>1 h,<br>800 rpm,<br>25 °C<br>(2x) | 180 µL ATL/0,05%<br>R.DX, 20 µL<br>Prot.K, 2 µL<br>RNaseA<br>[100mg/mL]<br>(QIAGEN) | 40 min,<br>100 °C,<br>0 rpm   | -             | 5 min,<br>RT,<br>300 rpm | 1 h bei<br>RT / k.F.*             |
| V13b |  |     |  |   | 25 min,<br>120 °C,<br>0 rpm   |               |                          |                                   |
| V14a | F3/Lunge   | 25  | 80 µL PBS,<br>1 h,<br>800 rpm,<br>25 °C<br>(2x)  | 180 µL ATL/0,05%<br>R.DX, 20 µL<br>Prot.K, 2 µL<br>RNaseA<br>[100mg/mL]<br>(QIAGEN) | 30 min,<br>100 °C,<br>0 rpm   | -             | 5 min,<br>RT,<br>300 rpm | 1 h bei<br>RT / 5 µL<br>GlycoBlue |
| V14b |  | 100 | 160 µL PBS,<br>1 h,<br>800 rpm,<br>25 °C<br>(2x) |   |                               |               |                          |                                   |
| V14c |  |     | 320 µL PBS,<br>1 h,<br>800 rpm,<br>25 °C<br>(2x) | 720 µL ATL/0,05%<br>R.DX, 80 µL<br>Prot.K, 8 µL<br>RNaseA<br>[100mg/mL]<br>(QIAGEN) |                               |               |                          |                                   |
| V15a | F3/Lunge   | 100 | 320 µL PBS,<br>1 h,<br>800 rpm,<br>25 °C<br>(2x) | 360 µL ATL/0,05%<br>R.DX, 80 µL<br>Prot.K, 8 µL<br>RNaseA                           | 30 min,<br>100 °C,<br>0 rpm   | -             | 5 min,<br>RT,<br>300 rpm | 1 h bei<br>RT / 5 µL<br>GlycoBlue |



|             |          |     |  |   |                             |   |                          |  |
|-------------|----------|-----|--|---|-----------------------------|---|--------------------------|--|
| <b>V15b</b> |          |     |  | [100mg/mL]<br>(QIAGEN)  |                             |   |                          | 1 h bei<br>-20 °C /<br>5 µL<br>GlycoBlue |
| <b>V16a</b> | F3/Leber | 100 | 160 µL PBS,<br>1 h,<br>800 rpm,<br>25 °C<br>(2x) | 180 µL ATL/0,05%<br>R.DX, 20 µL<br>Prot.K, 2 µL<br>RNaseA<br>[100mg/mL]<br>(QIAGEN)             | 30 min,<br>100 °C,<br>0 rpm | - | 5 min,<br>RT,<br>300 rpm | 1 h bei<br>-20 °C /<br>5 µL<br>GlycoBlue |
| <b>V16b</b> | F3/Lunge |     |  | 180 µL ATL/0,05%<br>R.DX, 80 µL<br>Prot.K, 8 µL<br>RNaseA<br>[100mg/mL]<br>(QIAGEN)             |                             |   |                          |  |
| <b>V17a</b> | F3/Leber | 100 | 160 µL PBS,<br>1 h,<br>800 rpm,<br>25 °C<br>(2x) | 180 µL ATL/0,05%<br>R.DX, 20 µL<br>Prot.K, 20 µL<br>RNaseA<br>[10mg/mL]<br>(Macherey-<br>NAGEL) | 30 min,<br>100 °C,<br>0 rpm | - | 5 min,<br>RT,<br>300 rpm | 1 h bei<br>-20 °C /<br>5 µL<br>GlycoBlue |
| <b>V17b</b> | F3/Lunge |     |  | 180 µL ATL/0,05%<br>R.DX, 80 µL<br>Prot.K, 20 µL<br>RNaseA<br>[10mg/mL]<br>(MachereyNAGEL)      |                             |   |                          |  |

\* keine Färbung der ausgefällten DNA mit dem GlycoBlue Farbstoff

Für **V8** der Hot Alkali Extraktion wurden jeweils 25 mg vom Großhirngewebe von F2 und F3 verwendet. Die Hitzebehandlung fand für 20 min bei 99 °C und 300 rpm am Thermoschüttler statt.

Für **V9a** und **V9b** wurden erneut die Großhirne von F2 und F3 untersucht, wobei bei diesen Variationen, aufgrund des Probenverlustes bei **V8**, der Waschschrift ausgelassen wurde. Jedes Hirngewebe wurde für 20 min einer Hitzebehandlung unterzogen, wobei diese einmal bei 99 °C am Thermoschüttler (**V9a**) und einmal bei 120 °C im Trockenschrank (**V9b**) ablief.

Die Modifizierung bei **V10a** und **V10b** belief sich zum einen darauf, dass Leber- und Lungengewebe von F2 und die Leber von F3 herangezogen wurden. Zum anderen wurde jede Gewebsart bei der Hitzebehandlung für 20 min bei 99 °C am Thermoschüttler bzw. 120 °C im Trockenschrank erwärmt.

Bei den Variationen **V11a**, **V11b** und **V11c** wurde für die DNA-Isolierung Leber und Lunge des Föten F2 verwendet, wobei die Hitzebehandlung bei 120 °C für entweder 20, 30 oder 40 min durchgeführt wurde.

**V12:** Bei dieser Variation wurde die DNA aller restlichen Gewebstypen von F2, nämlich Milz, Herz, Nabelschnur, Darm, Muskel und Kleinhirn, extrahiert. Die Einstellung des Thermoschüttlers bei der Hitzebehandlung entsprach bei allen Proben 300 rpm und 100 °C für 30 min.

Das Leber- und Lungengewebe von F3 wurde in den Variationen **V13a** und **V13b** untersucht. Dafür wurden die Einwaagen auf 100 mg erhöht, wodurch für den Waschschrift, anstatt 80 µl,

160 µL PBS verwendet wurden. Die Behandlung zur Umkehrung der Formaldehyd-Modifikationen wurde in diesem Verfahren ausgelassen, auch in allen weiteren Versuchsvariationen. Daher wurden die Proben in nachfolgenden Versuchen ausschließlich einem RNA-Verdau unterzogen.

Nachdem für jedes Gewebe eine Hitzebehandlung unter alkalischen Bedingungen bei 100 °C für 40 min bzw. bei 120 °C für 25 min stattfand, wurden die Proben auf RT abgekühlt, um daraufhin jeweils 700 µL PC hinzu zu pipettieren. Auf gründliches Durchmischen der Lösung folgte ein zusätzlich eingeführter Waschschriff, wobei die Proben für 5 min bei RT und 300 rpm am Thermoschüttler inkubiert wurden. Nach darauffolgender Zentrifugation (14000 rpm, 5 min) und Überführung der oberen/wässrigen Phase in ein neues 2 mL Tube wurde der gesamte Schriff, beginnend mit dem Zusatz von 700 µL PC, wiederholt. Der restliche Vorgang der DNA-Extraktion fand analog zum PC-Extraktionsprotokoll unter Kapitel 4.3.3. statt.

**V14a:** Nach Einwaage von 25 mg des F3-Lungengewebes, wurde der Waschschriff 2x mit je 80 µL PBS, wie in der PC-Extraktion beschrieben, durchgeführt. Danach erfolgte, analog zum Protokoll aus Kapitel 4.2, die Homogenisierung des Gewebes nach Zugabe von 180 µL des ATL/0,05 % R.DX-Puffergemisches, die Zellyse mittels 20 µL Prot. K [20 mg/mL] und der RNA-Abbau durch 2 µL RNaseA [100 mg/mL]. Zur Hitzebehandlung wurde, nach Zusatz von 500 µL 0,1 M NaOH/1% SDS, für 30 min bei 100 °C inkubiert. Danach erfolgte die DNA-Extraktion analog zu **V13a** und **V13b**, wobei zur DNA-Präzipitation zusätzlich zu 750 µL EtOH/NH<sub>4</sub>Ac (8:1, (v/v)) 15 µL des DNA-Präzipitations-Markers „GlycoBlue Coprecipitant“ [15 mg/mL] eingesetzt wurden [46], welcher zur Visualisierung des DNA-Pellets diente.

**V14b:** Bei dieser Variation wurden 100 mg Lungengewebe von F3 mit 2x 160 µL PBS gewaschen. Des Weiteren verlief diese Variation analog zu **V14a**.

**V14c:** Auch bei dieser Variation wurden 100 mg Lungengewebe von F3 verwendet, wobei beim Waschschriff das PBS-Volumen auf 2x 320 µL erhöht wurde. Ebenfalls wurde das Volumen der ATL/0,05 % R.DX-Pufferlösung auf 720 µL, der Prot. K auf 80 µL und der RNaseA auf 8 µL erhöht. Bis auf das Aufstocken der Lösungen fand die restliche Versuchsdurchführung entsprechend **V14a** statt.

Bei **V15a** und **V15b** wurde zur DNA-Isolierung Lungengewebe des Föten F3 verwendet. 100 mg des Gewebes wurden 2x mit je 320 µL PBS gereinigt. Den Proben wurden anschließend, vor der Homogenisation, 360 µL ATL/0,05 % R.DX-Puffergemisch zugeführt, wobei nach Beendigung des Zerkleinerungsprozesses 80 µL Prot. K zur Zellyse pipettiert wurden. Nach Zugabe von 8 µL RNaseA erfolgte eine 30-minütige Hitzebehandlung bei 100 °C am Thermoschüttler. Die DNA-Isolierung von **V15a** wurde analog zur Variation **V14a** durchgeführt. Für **V15b** erfolgte die DNA-Fällung bei einer Temperatur von - 20 °C [20], statt bei RT (**V15a**).

Um sich zu vergewissern, dass es bei der Erhöhung der Lösungsmittelvolumina zu keiner Beeinträchtigung der DNA-Ausbeute kam, wurden **V16a** und **V16b** folgendermaßen durchgeführt: Jeweils 100 mg Lungen- und Lebergewebe von F3 wurden eingewogen und daraufhin 2x mit je 160 µL PBS gereinigt. Bei den beiden Variationen wurden je 160 µL ATL/0,05 % R.DX-Pufferlösung zupipettiert und danach dem Homogenisierungs-Schriff unterzogen. Für **V16a** wurden zur weiteren Aufarbeitung die „normalen“ Lösungsmittelansätze eingesetzt (20 µL Prot. K, 2 µL RNaseA), bei **V16b** wurden die 4-fachen

Volumina verwendet (80 µL Prot. K, 8 µL RNaseA). Der weitere Versuchsablauf verlief analog zu **V15b**, bei welchem die DNA-Präzipitation bei - 20 °C erfolgte.

Im Prinzip verliefen **V17a** und **V17b** übereinstimmend zu den beiden **V16**-Variationen. Dafür wurden ebenfalls 100 mg Leber des FF Föten F3 verwendet und der Waschvorgang mit 2x 160 µL PBS durchgeführt. Der Unterschied zwischen den beiden **V17**-Variationen lag an dem eingesetzten Volumen von Prot. K., wobei für **V17a** ein normaler Ansatz von 20 µL und für **V17b** die 4-fache Menge (80 µL) benutzt wurde. Ausschließlich bei diesen Variationen wurden, sowohl die Prot. K [20 mg/mL], als auch die RNaseA [100 mg/mL] des Herstellers Macherey-Nagel (statt Qiagen) eingesetzt, wobei die RNaseA bereits auf 10 mg/mL voraliquotiert war. Da für die **V17**-Variationen dieselbe Menge an RNase verwendet werden sollte wie für bereits durchgeführte Variationen, wurden von der neuen RNaseA [10 mg/mL] 20 µL eingesetzt. Der weitere Extraktionsablauf verlief analog zu **V15b**.

#### **4.4. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der isolierten DNA**

Zur Quantifizierung der extrahierten, genomischen DNA wurde neben dem Qubit®-Fluorometer 3.0 (Thermo Fisher Scientific) das NanoDrop 2000c Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific) eingesetzt, wobei Letzteres ebenfalls zur Reinheitsbestimmung verwendet wurde.

Die durchgeführten Messungen verliefen nach den dazugehörigen Protokollen des Herstellers.

##### **4.4.1. Qubit® - Fluoreszenzmessung**

Die Konzentrationsbestimmung mittels Qubit®-Fluorometer erfolgte mit dem zugehörigen dsDNA HS Kit. Der erste Schritt war die Herstellung der Working Solution (W.S.). Hierfür wurde das dsDNA hoch-sensitive (HS) Farbreagenz von Qubit® mit dem im Kit ebenfalls enthaltenen dsDNA HS Puffer auf 1:200 verdünnt. Da das Endvolumen der W.S. für jedes Probenröhrchen 200 µL betragen sollte, wurde das Volumen der Lösung für die Anzahl an den zu messenden Fraktionen (y), mit zusätzlicher Addition zweier Standards (+2), berechnet. Die fertige W.S. wurde daher durch das Mischen von  $199 \times (y+2)$  µL des Qubit® dsDNA HS Puffers mit  $1 \times (y+2)$  µL des Qubit® dsDNA HS Farbreagenz hergestellt.

Zur Kalibration wurden zunächst die Standard-Lösungen wie folgt vorbereitet: In die zur Messung vorhergesehenen Eppendorf-Gefäße wurden zunächst jeweils 190 µL der W.S. vorgelegt, woraufhin je 10 µL des entsprechenden Qubit® Standards hinzu pipettiert wurde. Die Messung erfolgte nach anschließendem Vortexen für 2 sec, kurzem Abspinnen (unter Einsatz eines Schutzgefäßes) und 2-minütiger Inkubation bei RT. Nach abgeschlossener Messung des ersten Standards mit niedrigerer Konzentration wurde im Anschluss der höherkonzentrierte Standard gemessen und eine Kalibriergerade erstellt.

Für die Konzentrationsermittlung der Proben wurden zwischen 2 - 5 µL vom jeweiligen DNA-Extrakt in ein dafür vorgesehenes Analysegefäß pipettiert, um daraufhin die exakte Menge an W.S. zuzusetzen, wodurch ein Gesamtvolumen von 200 µL erreicht wurde. Analog zum Messverlauf der Standards wurden die Mischungen gevortext, abgespinn und einer Inkubation für 2 min bei RT unterzogen.

#### 4.4.2. NanoDrop - Messung

Vor der photometrischen Konzentrationsmessung musste zunächst eine Nullpunkteinstellung vorgenommen werden, wobei, nach doppelter Reinigung der Analysefläche mit Reinstwasser, 1 µL des zur Extraktion verwendeten Elutions-/Lösepuffers mittels Pipette aufgetragen wurde. Nach Messung des Blanks wurde ein Aliquot von 1 µL des zu messenden DNA-Extrakts auf den Sockel des Instruments aufgebracht, um die Extinktion bei 260 nm zu ermitteln. Durch die Anwendung der Software des NanoDrop-Gerätes bestand die Möglichkeit eine Berechnung der DNA-Konzentration durch den Einsatz folgender Formel durchzuführen:

$$c \left[ \frac{ng}{\mu l} \right] = E_{260} * D * F$$

|                  |                           |
|------------------|---------------------------|
| c                | Konzentration             |
| E <sub>260</sub> | Extinktion bei 260 nm     |
| D                | Verdünnungsfaktor         |
| F                | Faktor für dsDNA (F = 50) |

Zur Reinheitsbestimmung wurden die ebenfalls ermittelten Extinktionen bei 280 nm und 230 nm benötigt, um folgende Verhältnisse zu berechnen: [34]

- $E_{260}/E_{280} \rightarrow$  Kontamination mit Proteinen  
Werte für hohe Reinheit: 1,8 - 2,0
- $E_{260}/E_{230} \rightarrow$  Kontamination mit organischen Substanzen oder Salzen  
Werte für hohe Reinheit: 2,0 - 2,2

#### 4.5. Durchführung und Optimierung der rt-PCR Versuche

Für eine effiziente Amplifikation der extrahierten DNA wurden einige Optimierungsversuche, mit dem Ziel niedriger C<sub>t</sub>-Werte, hoher Fluoreszenzsignale und dem Ausschluss von nicht-spezifischen Produkten, inklusive Primer-Dimeren, durchgeführt.

##### 4.5.1. Primer - Design und Optimierung

Die Wahl der verwendeten Primer ergab sich aus der Suche nach Genregionen, deren Mutationen mit dem ODC assoziiert werden konnten. Hierfür boten sich die Sequenzen der Gene OTX2, PAX9 und SHH an, welche zunächst von der Datenbank National Center for Biotechnology Information heruntergeladen und anschließend in Hinblick auf relevante SNP-Bereiche untersucht wurden. Die daraus resultierenden Primerpaare wurden von C. Wagner mit Hilfe der PyroMark Assay Design Software designet, indem Änderungen in Bezug auf deren Länge und Position am DNA-Templat vorgenommen wurden. Um weitergehend die Eignung der Primer festzustellen wurden zusätzliche computergestützte Programme zur Testung gewisser Kriterien herangezogen. Dabei wurde deren Schmelzverhalten, die Wahrscheinlichkeit zur Bildung von Sekundärstrukturen oder Primer-Dimeren, sowie die Prognose des Schmelzverhaltens in Hinsicht auf die gewünschte Zielsequenz überprüft. Die designeten Primerpaare OTX2 1.1, OTX2 3.0, PAX9 4.0 und SHH 2.0 wurden von der Firma Sigma-Aldrich synthetisiert.

Vor deren Einsatz zur rt-PCR mussten alle Primersets, welche sich aus einem fw- und einem rv-Primer zusammensetzten, bezüglich ihrer T<sub>a</sub> und Primerkonzentration optimiert werden.

[16] Tabelle 7 enthält die wichtigsten Informationen zu den jeweiligen Primerpaaren, welche auch für diese Studie herangezogen wurden.

*Tabelle 7: Übersicht der eingesetzten nicht-btn Primerpaare PAX9 4.0, SHH 2.0, OTX2 1.1 und OTX2 3.0 hinsichtlich der erfassten SNPs, Accession number, Templat-Länge [bp], deren DNA-Sequenzen und  $T_a$  [°C].*

| Primerset | Benennung der Primerpaare                | Name des SNPs | Accession number | Länge des Templats [bp] | DNA-Sequenz 5' → 3'                            | $T_a$ [°C] |
|-----------|--|---------------|------------------|-------------------------|--|------------|
| 1         | PAX9 fw Primer 4.0<br>PAX9 rv Primer 4.0 | rs1219177020  | NC_000014.9      | 73                      | ATCCGACCGTGTGACATCA<br>TGTATCGCGCCAGGATCTT     | 60         |
| 2         | SHH fw Primer 2.0<br>SHH rv Primer 2.0   | rs1057523055  | NG_007504.2      | 86                      | ACATCACCACGTCTGACCG<br>GTAGTACACCCAGTCAAGC     | 60         |
| 3         | OTX2 fw Primer 1.1<br>OTX2 rv Primer 1.1 | rs786205884   | NG_008204.1      | 89                      | GAATTTTCTTTCCCTTCCAAG<br>TTTTGACCTCCATTCTGCTG  | 53         |
| 4         | OTX2 fw Primer 3.0<br>OTX2 rv Primer 3.0 | rs786205879   | NG_008204.1      | 90                      | TCAGAGAGTGGAACAAGTGGC<br>CCAGATAGACACAGGAGCACT | 62         |

#### 4.5.2. Untersuchung der Amplifizierbarkeit durch den Einsatz verschiedener Mastermix-Ansätze

Zur Ermittlung eines für die PCR-Analyse geeigneten Mastermixes (MM) wurden von einer kleinen Anzahl an Extrakten mehrere PCR-Läufe mit unterschiedlichen Bedingungen vorgenommen. Für die ersten Durchläufe wurden die DNA-Extrakte zunächst auf eine Konzentration von 5 ng/μL verdünnt und danach unverdünnt eingesetzt (Tab. 8).

*Tabelle 8: Angabe zur Herstellung der Verdünnungen eingesetzter DNA-Extrakte auf eine Konzentration von 5 ng/μL.*

| DNA-Extrakt             | c(DNA) gemäß Qubit®-Fluorometer [ng/μL] | DNA-Volumen [μL] | H <sub>2</sub> O-Zusatz [μL] | Gesamtvolumen [μL] |
|-------------------------|---|------------------|------------------------------|--------------------|
| <b>V10a</b> F2/Leber/r1 | 21,4                                    | 5,84             | 16,16                        | 25                 |
| <b>V10a</b> F2/Lunge/r2 | 16,0                                    | 7,81             | 17,19                        |                    |
| <b>V10b</b> F2/Leber/r2 | 23,9                                    | 5,23             | 19,77                        |                    |
| <b>V10a</b> F2/Lunge/r1 | 20,1                                    | 6,22             | 18,78                        |                    |

Verwendet wurden folgende Mastermixe: EpiTect HRM PCR MM (Qiagen), PyroMark PCR Kit MM (Qiagen) und Hot Start Q5U-Polymerase MM (Qiagen). Die zur Untersuchung verwendeten Primersets waren OTX2 1.1 und OTX2 3.0. In Tabelle 9 sind die experimentellen Daten angegeben.

Tabelle 9: Angaben zur Versuchsdurchführung mit der Kombination aus Primerset und Mastermix, sowie den eingesetzten Konzentrationen der DNA-Extrakte.

| Primerset    | Mastermix                   | c(DNA-Extrakt)<br>[ng/μL] |
|--------------|-----------------------------|---------------------------|
| 3 (OTX2 1.1) | EpiTect HRM PCR MM          | 5                         |
|              | PyroMark PCR Kit MM         | 5                         |
|              |                             | unverdünnt                |
|              |                             | unverdünnt                |
| 4 (OTX2 3.0) | Hot Start Q5U-Polymerase MM | unverdünnt                |
|              | EpiTect HRM PCR MM          | 5                         |

Zur Herstellung der unterschiedlichen MM wurden die Anleitungen des jeweiligen Herstellers herangezogen. Tabelle 10 zeigt beispielsweise die genauen Angaben zur Herstellung des EpiTect HRM PCR MM. Der exakte Ablauf der Fertigstellung des MM ist in Kapitel 4.5.6 beschrieben.

Tabelle 10: Setup zur Herstellung des EpiTect HRM PCR MM unter Verwendung einer Primerkonzentration von 0,6 μM.

| Reagenzien                         | c(Primer)<br>0,6 μM    |
|------------------------------------|------------------------|
|                                    | Volumina pro Well [μL] |
| Nuklease-freies H <sub>2</sub> O   | 5,6                    |
| fw Primer [10 μM]                  | 1,2                    |
| rv Primer [10 μM]                  | 1,2                    |
| 2x EpiTect HRM PCR MM              | 10,0                   |
| <b>Totales Volumen [μL]</b>        | 18                     |
| DNA-Extrakt [μL]                   | 2                      |
| <b>Gesamtvolumen per Well [μL]</b> | 20                     |

Die Durchführung aller rt-PCR Experimente erfolgte am Rotor-Gene® Q Gerät (Qiagen). Das Temperaturprogramm des Thermocyclers, welcher für die PCR-Analysen mit dem EpiTect HRM PCR MM und dem PyroMark PCR Kit MM verwendet wurde, ist in Tabelle 11 angegeben. Sowohl die Thermocycler-Einstellungen als auch das Setup zur Herstellung des Hot Start Q5U-Polymerase MM sind im Anhang A vorzufinden.

Tabelle 11: Verwendetes Temperaturprogramm für PCR-Analysen von DNA-Extrakten, welche mit dem EpiTect HRM PCR MM und dem PyroMark PCR Kit MM amplifiziert wurden.

|           | Schritt                                    | Zeit   | Temperatur [°C]  | Wiederholung |
|-----------|--|--------|------------------|--------------|
| Hold 1    | Denaturierung & Aktivierung der Polymerase | 15 min | 95               | -            |
|           | Denaturierung                              | 30 sec | 94               |              |
| Cycling 1 | Annealing                                  | 30 sec | T <sub>a</sub> * | 50 Zyklen    |
|           | Elongation                                 | 30 sec | 72               |              |
| Hold 2    | Finale Elongation                          | 10 min | 72               |              |
| Hold 3    | Denaturierung                              | 1 min  | 95               | -            |
| Hold 4    | Strangpaarung                              | 1 min  | 40               |              |
| HRM       | HRM  | -      | 65 - 95          | 0,1 °C/sec   |

\* T<sub>a</sub> des verwendeten Primers

#### 4.5.3. Überprüfung des Einflusses von RNaseA auf die Amplifizierbarkeit der DNA-Extrakte

Mit diesem Experiment sollte geprüft werden, ob die zugesetzte Menge an RNaseA die Ausbeute an DNA beeinflusst. Zur Probenvorbereitung wurden je 20 µL der Positivkontrolle HCC827 Erlo [0,1 ng/µL] in einem 1,5 mL Eppendorf-Tube vorgelegt und einer RNase-Behandlung unterzogen, wobei 2, 4, 6 oder 8 µL an RNaseA-Lösung [10 mg/mL] zugesetzt wurden. Es wurden Lösungen von zwei Herstellern (Qiagen, Macherey-Nagel) getestet. Nach erfolgter Mischung durch 15 sec vortexen wurden die Proben kurz abgespinn und zunächst für 2 min bei RT und im Anschluss für 10 min bei 70 °C inkubiert, um den Abbau der RNaseA zu gewährleisten. Danach wurde eine rt-PCR durchgeführt, wobei der MM aus dem Primerset 1 (PAX9 4.0) und Lösungen des PyroMark PCR Kits hergestellt wurde. Das Temperaturprogramm entsprach dem aus Tabelle 11, mit einer T<sub>a</sub> von 60 °C.

#### 4.5.4. Überprüfung auf DNA-Polymerase-hemmende Substanzen in den DNA-Extrakten

Um zu prüfen, ob durch die Anwesenheit von Polymerase-hemmenden Substanzen in den DNA-Extrakten die Amplifikationseffizienz beeinträchtigt wurde, wurden 2 µL des DNA-Extrakts der Positivkontrolle HCC827 Erlo [0,1 ng/µL] in ein 0,2 mL Eppendorfgefäß pipettiert. Nachdem sich die Lösung bei geöffnetem Tube nach über 2 h verflüchtigt hatte, wurden jeweils 2 µL vom zu untersuchenden DNA-Extrakt im unverdünnten Zustand zugefügt, um nach reichlicher Vermischung mittels Vortex eine rt-PCR durchzuführen. Bei dieser wurde der MM unter Einsatz von 0,6 µM SHH 2.0-Primer und Lösungen des PyroMark PCR Kits hergestellt. Die Temperatureinstellungen sind in Tabelle 11 angegeben, wobei eine T<sub>a</sub> von 60 °C zum Einsatz kam.

#### 4.5.5. Optimierung der Primer- und $MgCl_2$ - Konzentrationen zur Verbesserung der PCR-Amplifikation

Die Optimierung der rt-PCR erfolgte durch die Herstellung unterschiedlicher Mastermix-Ansätze mit dem PyroMark PCR Kit MM, in Bezug auf die Konzentrationen des Primers PAX9 4.0 und von  $MgCl_2$ . Als Positivkontrolle diente der DNA-Extrakt der Zelllinie HCC827 Erlo [0,1 ng/ $\mu$ L]. Die durchgeführten Ansätze sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Das Temperaturprogramm des PCR-Versuchs ist in Tabelle 11 vorzufinden. Dabei wurde eine  $T_a$  von 60 °C verwendet.

*Tabelle 12: Übersicht der verschiedenen Mastermix-Ansätze in Bezug auf die Primer- und  $MgCl_2$ - Konzentrationen, unter Verwendung der Positivkontrolle HCC827 Erlo.*

| Ansatz | DNA-Extrakt | c(Primer)<br>[ $\mu$ M] | c( $MgCl_2$ )<br>[mM] |
|--------|-------------|-------------------------|-----------------------|
| 1      | HCC827 Erlo | 0,6                     | 0                     |
| 2      |             | 0,6                     | 1                     |
| 3      |             | 0,6                     | 2                     |
| 4      |             | 0,8                     | 0                     |
| 5      |             | 0,8                     | 1                     |
| 6      |             | 0,8                     | 2                     |
| 7      |             | 1,0                     | 0                     |
| 8      |             | 1,0                     | 1                     |

#### 4.5.6. Anwendung auf die DNA von langzeit-konservierten, fetalen Gewebeproben

Die Vorbereitung zur PCR-Analyse geschah generell in unterschiedlichen Laboratorien. Im DNA-Labor fand die Lagerung der Proben und Reagenzien statt. Hier wurden zunächst die zu analysierenden, tiefgefrorenen DNA-Extrakte der Gewebeproben aufgetaut, kurz gevortext und abgespinnt. Danach wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung im DNA-Kühlschrank platziert. Analog dazu wurden die benötigten Primer, Mastermixe und gegebenenfalls Farbstoffe bereitgestellt, welche ebenfalls als Aliquote tiefgekühlt gelagert wurden. Die zuletzt genannten Reagenzien wurden jedoch in das DNA-freie Reinlabor überstellt, wo die weitere Aufbereitung des zur PCR-Analyse benötigten MM erfolgte.

Der MM wurde unter einer Workstation hergestellt, wodurch Kontaminationen aus der Umgebung vermieden werden konnten. Zudem wurden die Handschuhe regelmäßig getauscht, um Reagenzien und Materialien nicht zu verunreinigen. Nach gründlicher Vorreinigung der Workstation mit DNA-Exitus konnten alle Substanzen dorthin überführt werden, samt eines 72-Well-PCR-Racks, welches bis zu seiner Verwendung auf einem Gefrierbeutel gekühlt gelagert wurde. Zur Herstellung des MM wurden in einem 1,5 mL



Eppendorfgefäß der Reihe nach Nuklease-freies Wasser (H<sub>2</sub>O), der kommerzielle MM, welcher MgCl<sub>2</sub>, Nukleotide und die Polymerase enthält, und zum Schluss die auf 10 µM verdünnten Primerpaare zusammenpipettiert. Die genauen Angaben zur Herstellung des PyroMark PCR Kit MM sind in Tabelle 13 vorzufinden, wobei das Gesamtvolumen des fertigen MM pro Well 18 µL betrug.

*Tabelle 13: Setup zur Herstellung des PyroMark PCR Kit MM pro Reaktionsansatz für unterschiedliche Primerkonzentrationen (0,6 µM und 0,8 µM) mit einem Gesamtvolumen von 18 µL, wobei nachträglich eine Zugabe von 2 µL DNA-Extrakt zur PCR-Analyse erfolgte.*

| Reagenzien                         | c(Primer)<br>0,6 µM    | c(Primer)<br>0,8 µM |
|------------------------------------|------------------------|---------------------|
|                                    | Volumina pro Well [µL] |                     |
| Nuklease-freies H <sub>2</sub> O   | 2,6                    | 1,8                 |
| 10x CoralLoad                      | 2,0                    | 2,0                 |
| 20x EvaGreen                       | 1,0                    | 1,0                 |
| fw Primer [10 µM]                  | 1,2                    | 1,6                 |
| rv Primer [10 µM]                  | 1,2                    | 1,6                 |
| 2x PyroMark PCR MM                 | 10,0                   | 10,0                |
| <b>Totales Volumen [µL]</b>        | 18                     |                     |
| <i>DNA-Extrakt [µL]</i>            | 2                      |                     |
| <b>Gesamtvolumen per Well [µL]</b> | 20                     |                     |

Vor den Optimierungsversuchen (Kapitel 4.5.5) wurde mit einer Primer-Konzentration von 0,6 µM gearbeitet, und es wurde kein MgCl<sub>2</sub> zugesetzt. Später wurden, aufgrund niedrigerer C<sub>t</sub>-Werte, Primer-Konzentrationen von 0,8 µM verwendet, wobei ebenfalls kein MgCl<sub>2</sub> zugesetzt wurde.

Der fertige MM wurde anschließend in die PCR Strip Tubes, welche sich in einem PCR-Metallblock befanden, pipettiert. Der weitere Arbeitsverlauf fand in einem separaten Labor statt. Ebenso wurde hier zunächst die Workstation einer gründlichen Reinigung unterzogen, bevor die Strip Tubes und die DNA-Extrakte in die darin befindlichen Gestelle eingeordnet wurden. Für die ersten Versuche erfolgte eine Verdünnung der Extrakte auf eine Konzentration von 5 ng/µL. Angesichts der Ergebnisse wurde jedoch für weitere PCR-Läufe die unverdünnte, isolierte DNA der Extrakte herangezogen. Bis auf die Negativkontrollen (NTC's), bei denen 2 µL Nuklease-freies H<sub>2</sub>O eingesetzt wurde, wurde jedem Well mit MM je 2 µL verdünnte/unverdünnte extrahierte DNA zugesetzt, sodass ein Gesamtvolumen von 20 µL pro Well erreicht wurde.

Zur Durchführung der rt-PCR wurde das Rotor-Gene® Q Instrument (Qiagen) eingesetzt.

#### **4.5.7. Auswertung der PCR-Daten**

Die Auswertung der erhaltenen PCR-Rohdaten erfolgte mit der Rotor-Gene® Q Series Software 2.3.1. Nach Öffnen der Rohdatei bestand der erste Schritt in der Ermittlung der C<sub>t</sub>-Werte über die Amplifikationskurven der Proben. Um dies zu bewerkstelligen war es nötig die Threshold-Line so zu setzen, dass die Amplifikationskurven parallel zueinander verliefen. Infolgedessen konnte mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse die Überprüfung des gewünschten Amplikons stattfinden. Dazu wurde die Schmelztemperatur der amplifizierten Positivkontrollen mit denen der amplifizierten DNA-Extrakte der Gewebeproben verglichen.

#### **4.6. Experimente mittels Agarose-Gelelektrophorese**

Mittels Agarose-Gelelektrophorese wurde die Integrität der isolierten DNA, als auch die Richtigkeit der erhaltenen PCR-Produkte überprüft.

##### **4.6.1. Überprüfung der Richtigkeit der erhaltenen PCR-Produkte**

Im ersten Schritt erfolgte die Herstellung eines 3 % (w/v) Agarosegels, indem 3 g High Resolution Agarose in 100 mL 0,5x Tris-Borsäure-EDTA (TBE) Puffer, unter leichtem Sieden mittels Magnetrührer, gelöst wurde. Die noch warme Lösung wurde anschließend zügig in eine Gel-Gießstation transferiert, welche zuvor austariert und mit einem 1,5 mm Kamm ausgestattet wurde. Nach 30-minütigem Aushärten des Gels wurde dieses in eine Elektrophoresekammer überführt, um daraufhin die Apparatur mit 0,5x TBE Puffer bis zur maximal markierten Grenze zu befüllen. Danach wurde der Kamm vorsichtig entfernt und je 6 µL der vorbereiteten Marker und Amplikons blasenfrei in die Geltaschen pipettiert. Bezüglich des Pipettierschemas wurde immer darauf geachtet an erster und letzter Position einen Marker zu setzen, sowie bei jedem Lauf sowohl Positivkontrollen (HCC827 Erlo und C8), als auch Negativkontrollen (NTC's) mitzuführen.

Zunächst wurde der Gelladefarbstoff Roti-Load DNA-orange (6x LD orange) im Verhältnis 1:3 (v/v) mit Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O verdünnt und durch auf- und ab-pipettieren gut vermengt. Anschließend wurden mit Hilfe dieses verdünnten Farbstoffes (2x LD orange) die Amplikon-Lösungen mit einem Verdünnungsfaktor von 1:2 hergestellt, wobei das Gesamtvolumen 7 µL betrug. Als Marker diente der Low molecular weight (LMW) DNA Marker, welcher durch Zusatz von Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O und 6x LD orange fertiggestellt wurde.

Nach der Beladung des Gels in der mit 0,5x TBE Puffer befüllten Elektrophoresekammer wurde der Lauf mit einer Spannung von 80 Volt gestartet. Die Dauer der Auftrennung betrug knapp 2h.

Zur Visualisierung der Banden wurde das Gel mit dem fluoreszierenden Farbstoff GelRed behandelt. Von diesem wurden 45 µL in ein abgedunkeltes Gefäß transferiert, mit 150 mL Reinstwasser versetzt und gut gemischt. Im Anschluss wurde das Gel von der Elektrophoresekammer in 75 mL der Farbstoff-Lösung überführt und nach leichtem Schwenken in einer geschlossenen Box im Dunkeln für 30 min bei RT gelagert. Darauf erfolgte eine Entfärbung des Gels unter denselben Bedingungen in deionisiertem H<sub>2</sub>O. Zuletzt wurde die Detektion der Banden mit Hilfe eines UV Transilluminators durchgeführt und das Gel zur Dokumentation abgelichtet.

#### 4.6.2. Bestimmung der Integrität von DNA-Extrakten

Um zu überprüfen, ob ein fehlender Anstieg des Fluoreszenzsignals auf die Qualität des DNA-Extrakts zurückzuführen war, wurde von allen DNA-Extrakten, bei denen kein Fluoreszenzanstieg beobachtet wurde, eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Außerdem wurden zur Untersuchung der Integrität DNA-Extrakte herangezogen, für die zwar ein Fluoreszenzanstieg beobachtet wurde, dieser aber laut HRM-Ergebnis auf die Bildung von unspezifischen Produkten zurückzuführen war.

Dazu wurden alle DNA-Extrakte unverdünnt in einem 1 % (w/v) Agarosegel (1 g High Resolution Agarose in 100 mL 0,5x TBE Puffer) aufgetrennt. Zudem wurde, neben dem bereits verwendeten LMW DNA Marker, der 1 kb Plus DNA Marker zum Größenvergleich aufgetragen.

Der restliche Verlauf des Experiments erfolgte analog Kapitel 4.6.1.

#### 4.7. Pyrosequenzierung

Der erste Teil des Versuchsablaufs erfolgte in einem Reinlabor zur Vorbereitung und Herstellung benötigter Reagenzien, wie MM und Primer. Weitere Aufarbeitungsschritte fanden daraufhin in einem anderen Labor statt. Für die PSQ wurde das PyroMark Q24 Advanced CpG Reagents Kit (Qiagen) verwendet, wobei nach entsprechendem Protokoll des Herstellers vorgegangen wurde. [47]

##### 4.7.1. PCR-Amplifikation mit biotinylierten Primern zur Vorbereitung auf die PSQ-Analyse

Um nach erfolgter PCR-Analyse die Produkte einer PSQ unterziehen zu können, ist es notwendig die Amplifizierung mit Hilfe eines btn Primers durchzuführen. Dementsprechend wurden von allen DNA-Extrakten, welche in vorhergehenden PCR-Läufen amplifiziert werden konnten, eine weitere rt-PCR mit Hilfe eines Primersets, dessen rv-Primer btn vorlag, vorgenommen. Für die darauffolgende PSQ-Analyse wurden zu den Primersets passende Sequenzierprimer (seqPrimer) designt (Tab. 14).

*Tabelle 14: Übersicht der eingesetzten btn Primerpaare OTX2 1.1 und 3 SNPs Assay hinsichtlich der erfassten SNPs, Templat-Länge [bp], deren DNA-Sequenzen und T<sub>a</sub> [°C]. Zusätzlich sind die Sequenzen der Sequenzierprimer angegeben.*

| Primerset | Benennung der Primerpaare    | Name des SNPs | Länge des Templats [bp] | DNA-Sequenz 5' → 3'          | T <sub>a</sub> [°C] |
|-----------|------------------------------|---------------|-------------------------|------------------------------|---------------------|
| 5         | OTX2 fw Primer 1.1           | rs786205884   | 89                      | GAATTTTCTTTCCCTTCCAAG        | 53                  |
|           | OTX2 rv Primer 1.1 (btn)     |               |                         | [btn]-TTTTGACCTCCATTCTGCTG   |                     |
|           | OTX2 seqA Primer 1.1         |               |                         | CCAAGATATGGTTTA              |                     |
|           | OTX2 seqG Primer 1.1         |               |                         | CCAAGGATATGGTTTA             |                     |
| 6         | 3 SNPs Assay fw Primer       | rs527559815   | 97                      | CCGGATATGCTGGGACAGCC         | 60                  |
|           | 3 SNPs Assay rv Primer (btn) | rs547832288   |                         | [btn]-AGACACTACCAAGTCGCAAACG |                     |
|           | 3 SNPs Assay seq Primer      | rs16906252    |                         | GGATATGCTGGGACA              |                     |

Die Herstellung des MM für die PCR-Amplifikation mit Hilfe des Primersets 5 (fw und rv-[btn]) geschah unter Verwendung des PyroMark PCR Kit MM und einer Primerkonzentration von 0,8  $\mu\text{M}$ . Dabei wurden alle bisher amplifizierbaren DNA-Extrakte unverdünnt angewandt. Als Positivkontrollen wurden die DNA-Extrakte der Zelllinie HCC827 Erlo (aus Lungenkrebsgewebe) und der Probe C8 (aus kanzerogenem Brustgewebe) eingesetzt, wobei beide eine Konzentration von 0,1 ng/ $\mu\text{L}$  aufwiesen. Die Zugabe der DNA-Extrakte pro Well belief sich auf 2  $\mu\text{L}$ .

Der MM für Primerset 6 (fw und rv-[btn]) wurde mittels EpiTect HRM PCR MM fertiggestellt (Anhang B) mit einer Primerkonzentration von 0,2  $\mu\text{M}$ . Bei dieser Methode wurden alle DNA-Extrakte unverdünnt eingesetzt, das Volumen betrug 2  $\mu\text{L}$  pro Well. Im Anschluss wurde von DNA-Extrakten, die nicht zu einem Signalanstieg führten, ein Volumen von 5  $\mu\text{L}$  pro Well eingesetzt. Als Positivkontrollen dienten die DNA-Extrakte der Zelllinien HT29 EA und HCT116 ctl3 (aus kanzerogenem Dickdarmgewebe), welche Konzentrationen von 5 ng/ $\mu\text{L}$  besaßen.

#### 4.7.2. PSQ-Durchführung

Im ersten Schritt wurde der MM hergestellt. Dazu wurde zunächst eine 96-Well-Platte (iCycler IQ-plate) in vier gleich große Teile zerschnitten, wodurch sich 4x 24-Well-Platten ergaben. In jedes Well wurde der MM vorgelegt, wobei zuerst MilliQ H<sub>2</sub>O, PyroMark Bindungspuffer und, nach gründlichem Vortexen, Streptavidin Sepharose Beads zugesetzt wurden. Die Volumina der verwendeten Komponenten sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

*Tabelle 15: Volumina zur Herstellung des Mastermixes und des Primers pro Reaktionsansatz.*

|                       |   | Reaktionsvolumen [ $\mu\text{L}$ ] |                 |
|-----------------------|---|------------------------------------|-----------------|
| Mastermix             | Reagenzien  | 1-fach Ansatz                      | 1,5-fach Ansatz |
|                       | MilliQ H <sub>2</sub> O                                 | 24                                 | 36              |
|                       | Bindungspuffer  | 40                                 | 60              |
|                       | Streptavidin Sepharose HP                               | 1                                  | 1,5             |
|                       | <b>Volumen des Mastermix [<math>\mu\text{L}</math>]</b> | 65                                 | 97,5            |
|                       | btn PCR-Produkt   | 15                                 | 22,5            |
|                       | <b>Endvolumen [<math>\mu\text{L}</math>]</b>            | 80                                 | 120             |
| Sequenzier-<br>Primer | Reagenzien  | Volumen pro Well [ $\mu\text{L}$ ] |                 |
|                       | 10 $\mu\text{M}$ Primer                                 | 0,75                               |                 |
|                       | Annealing Puffer  | 19,25                              |                 |
|                       | <b>Endvolumen [<math>\mu\text{L}</math>]</b>            | 20                                 |                 |

Zur Vorbereitung des Sequenzierprimers wurde dieser nach dem Auftauen kurz gevortext und abgespinnt. Daraufhin fand eine Verdünnung eines 100  $\mu\text{M}$  Aliquots auf eine Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  statt, indem 10  $\mu\text{L}$  unverdünntem Primer 90  $\mu\text{L}$  MilliQ  $\text{H}_2\text{O}$  zugesetzt wurde. Für die Fertigstellung erfolgte der Zusatz eines Annealing-Puffers (Tab. 15), wobei die Endkonzentration des Primers 0,375  $\mu\text{M}$  betrug. Die benötigten Substrat- und Enzym-Mixe wurden vor Verwendung durch Lösen in 660  $\mu\text{L}$  MilliQ  $\text{H}_2\text{O}$  angefertigt, wobei Ersteres Luciferin und APS, Letzteres DNA-Polymerase und Luciferase enthielt.

Für die weitere Vorbereitung wurden die btn PCR-Produkte zu dem vorgelegten MM in die Wells der PCR-Platte pipettiert, woraufhin diese mit einer Folie sorgfältig verschlossen wurden, um Kontaminationen zwischen den Lösungen der einzelnen Wells zu vermeiden. Die auf der PCR-Platte befindlichen Lösungen wurden anschließend für 10 min bei 14000 rpm und RT auf einem Schüttler vermengt.

Währenddessen wurde mit der Vakuum Arbeitsstation weitergearbeitet. Dabei wurden 20  $\mu\text{L}$  des 0,375  $\mu\text{M}$  Primers je einem Well der PyroMark Q24 Platte zupipettiert. Nach beendeter Durchmischung der in den Wells befindlichen Lösungen, wurde die PCR-Platte ebenfalls an der Arbeitsstation platziert. Zuvor wurden die zugehörigen Wannen des Instruments mit speziellen Lösungen nach Anweisung des Herstellers befüllt, wie etwa 70 % EtOH, Waschpuffer, MilliQ  $\text{H}_2\text{O}$  sowie einer Denaturierungslösung. Nachdem die Funktion des Vakuums getestet wurde, konnten die danach ausgeführten Abläufe, welche der Anleitung des dazugehörigen Handbuchs zu entnehmen sind, vorgenommen werden. Im Anschluss wurde die PyroMark-Platte, welche einzelsträngige DNA-Template enthielt, für 5 min auf einen 80 °C vorgeheizten Block positioniert. Unmittelbar darauffolgend wurde die noch heiße Platte zusammen mit einer Kartusche, welche zuvor mit dem Enzym-, Substratmix sowie mit einzelnen PyroMark Q24 dNTPs befüllt wurde, im PyroMark Q24 Gerät platziert und der Lauf gestartet. Die benötigten Volumina zur Beladung der Kartusche wurden mittels zugehöriger PyroMark Q24 Advanced Software 3.0.1 berechnet, wobei die Menge der dNTPs in Abhängigkeit von der PSQ-Methode gewählt wurde.

#### **4.7.3. Auswertung der PSQ-Daten**

Mit Hilfe der PyroMark Q24 Advanced 3.0.1 Software konnten die ermittelten PSQ-Rohdaten-Files geöffnet und die Ergebnisse als Pyrogramme dargestellt werden. Das für die gesuchte Sequenz entsprechende Histogramm wurde zum Vergleich abgebildet.

Eine Übereinstimmung beider Diagramme in Bezug auf deren Basenabfolgen und Peakhöhen zeigt, dass die mittels PCR erhaltenen Produkte die zu erwartete Sequenz aufweisen. Ist dies nicht der Fall kann man von falschen Produkten ausgehen. Eine positive Deckungsgleichheit der Diagramme wird anhand eines blau gefärbten Balkens innerhalb der Auswertungssoftware angezeigt. Bei geringen Abweichungen ist eine gelbe Färbung erkennbar. Im Falle eines roten Balkens existieren große Abweichungen der Peakhöhen und/oder Basenabfolgen, wodurch das Fehlschlagen der Sequenzierung angezeigt wird.

## 5. Ergebnisse und Diskussion

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der durchgeführten Versuche präsentiert. Zunächst galt es herauszufinden, welche Primer und welcher MM zur Überprüfung der Amplifizierbarkeit der extrahierten DNA mittels PCR verwendet werden sollten.

### 5.1. Untersuchung der Amplifizierbarkeit durch den Einsatz verschiedener Mastermixe

Um Herauszufinden, welche PCR-Methode sich am besten zur Überprüfung der Amplifizierbarkeit der isolierten DNA eignet wurden verschiedene MM (Qiagen) ausgetestet: EpiTect HRM PCR MM, PyroMark PCR Kit MM und Hot Start Q5U-Polymerase MM. Für die Analysen wurden die zwei Primersets für das OTX2 Gen (Primerset 3: OTX2 1.1 und Primerset 4: OTX2 3.0) herangezogen (Kap. 4.5.1, Tab. 7).

Zum besseren Vergleich wurden für diese Versuchsserie dieselben DNA-Extrakte herangezogen. Sie wurden aus dem Leber- und Lungengewebe des EtOH-fixierten Föten F2 mit den Variationen V10a und V10b gewonnen (Kap. 4.3.4.1). Die Extrakte wurden unverdünnt eingesetzt (Kap. 5.5.1, Tab. 23). Zudem wurden von allen Extrakten Doppelbestimmungen durchgeführt, wobei die Replikate mit r1 (Replikat 1) und r2 (Replikat 2) bezeichnet wurden.

Die PCR-Analyse mittels Hot Start Q5U-Polymerase MM lieferte im Vergleich zu den anderen MM die schlechtesten Ergebnisse. Obwohl  $C_T$ -Werte ermittelt werden konnten (Tab. 16), zeigte das Schmelzdiagramm eine Vielzahl an unspezifischen Produkten (Abb. 12). Dementsprechend konnte mit dieser PCR-Methode (Primerset 3, Hot Start Q5U-Polymerase MM) weder für die DNA-Extrakte der Gewebeproben noch für die Extrakte der Positivkontrollen, eine Bildung des gewünschten Produkts beobachtet werden.

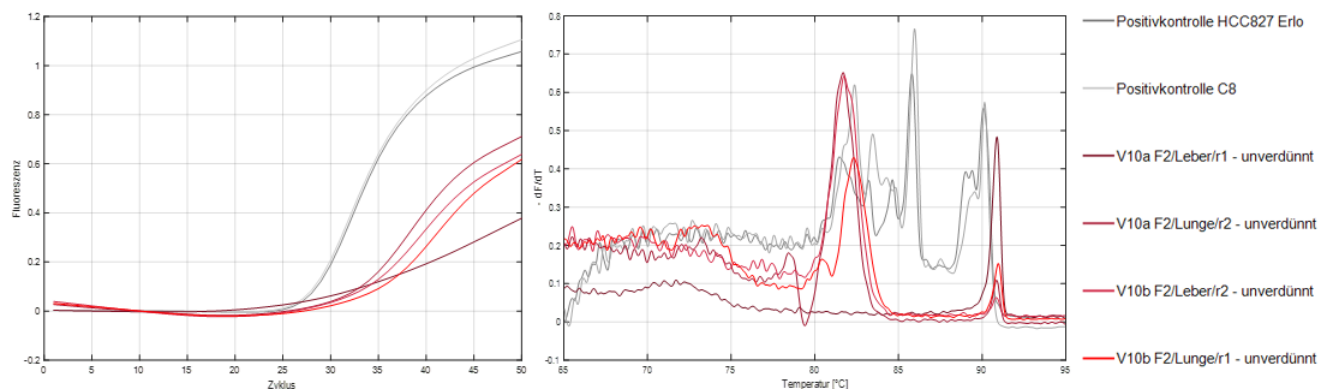


Abbildung 12: Amplifikations- (links) und Schmelzkurven (rechts) für PCR-Produkte der DNA-Extrakte aus Leber- und Lungengewebe von Fötus F2 (Extraktion: V10a und V10b). Primerset 3 (OTX2 1.1), Hot Start Q5U-Polymerase MM. Positivkontrollen: HCC827 Erlo, C8. Zwei technische Replikate pro DNA-Extrakt.

*Tabelle 16: C<sub>t</sub>-Werte, die bei Versuchen zur Auswahl einer geeigneten PCR-Methode und eines geeigneten Mastermixes (MM) erhalten wurden. Primersets: 3 und 4, Mastermixe: Hot Start Q5U-Polymerase MM, EpiTect HRM PCR MM und PyroMark PCR Kit MM. Positivkontrollen: HCC827 Erlo, C8.*

| Primer + Mastermix                               | DNA-Extrakt                  | c(DNA-Extrakt) gemäß<br>Qubit®-Fluorometer<br>[ng/uL] | C <sub>t</sub> -Wert |
|--|------------------------------|---|----------------------|
| OTX2 1.1<br>+<br>Hot Start Q5U-<br>Polymerase MM | Positivkontrolle HCC827 Erlo | 0,1   | 28,14                |
|  | Positivkontrolle C8          | 0,1   | 27,86                |
|  | <b>V10a</b> F2/Leber/r1      | unverdünnt*   | 31,60                |
|  | <b>V10a</b> F2/Lunge/r2      |   | 32,31                |
|  | <b>V10b</b> F2/Leber/r2      |   | 32,87                |
|  | <b>V10b</b> F2/Lunge/r1      |   | 34,32                |
| OTX2 1.1<br>+<br>EpiTect HRM PCR MM              | Positivkontrolle HCC827 Erlo | 0,1   | 29,12                |
|  | Positivkontrolle C8          | 0,1   | 29,40                |
|  | <b>V10a</b> F2/Leber/r1      | 5   | 34,82                |
|  | <b>V10a</b> F2/Lunge/r2      | 5   | 37,53                |
|  | <b>V10b</b> F2/Leber/r2      | 5   | 48,35                |
|  | <b>V10b</b> F2/Lunge/r1      | 5   | 38,09                |
| OTX2 3.0<br>+<br>EpiTect HRM PCR MM              | Positivkontrolle HCC827 Erlo | 0,1   | 27,29                |
|  | Positivkontrolle C8          | 0,1   | 27,77                |
|  | <b>V10a</b> F2/Leber/r1      | 5   | 37,25                |
|  | <b>V10a</b> F2/Lunge/r2      | 5   | n.a.**               |
|  | <b>V10b</b> F2/Leber/r2      | 5   | 34,49                |
|  | <b>V10b</b> F2/Lunge/r1      | 5   | 36,40                |
|  | NTC                          | -   | 31,78                |
| OTX2 1.1<br>+<br>PyroMark PCR Kit MM             | Positivkontrolle HCC827 Erlo | 0,1   | 29,87                |
|  | Positivkontrolle C8          | 0,1   | 29,76                |
|  | <b>V10a</b> F2/Leber/r1      | 5   | 42,64                |
|  | <b>V10a</b> F2/Lunge/r2      | 5   | 45,62                |
|  | <b>V10b</b> F2/Leber/r2      | 5   | 47,16                |

|                         |             |       |
|-------------------------|-------------|-------|
| <b>V10b</b> F2/Lunge/r1 | 5           | 34,61 |
| <b>V10a</b> F2/Leber/r1 |             | 34,78 |
| <b>V10a</b> F2/Lunge/r2 | unverdünnt* | 36,09 |
| <b>V10b</b> F2/Leber/r2 |             | 35,89 |
| <b>V10b</b> F2/Lunge/r1 |             | 36,81 |

\* siehe Tabelle 23

\*\* nicht amplifizierbar

In Abbildung 13 sind die erhaltenen Amplifikationskurven dargestellt. Der EpiTect HRM PCR MM führte in Verbindung mit dem OTX2 1.1 Primerpaar für die **V10a** F2/Lunge und **V10a** F2/Leber Extrakte zu einem Fluoreszenzanstieg. Im Vergleich zu den Positivkontrollen war der C<sub>T</sub>-Wert nur leicht erhöht. Im Gegensatz dazu wurde für den **V10b** F2/Leber Extrakt ein um 13,53 höherer C<sub>T</sub>-Wert erhalten. Die DNA-Konzentrationen der beiden Extrakte unterschieden sich jedoch nur geringfügig voneinander (**V10a** F2/Leber: 21,4 ng/μL, **V10b** F2/Leber: 23,9 ng/μL). Es ist daher anzunehmen, dass der höhere C<sub>T</sub>-Wert für den mit V10b erhaltenen Extrakt aus einer Fragmentierung der DNA aufgrund der stärkeren Hitzebehandlung resultierte.

In Kombination mit dem OTX2 3.0 Primerpaar führte der EpiTect HRM PCR MM zu keinen besseren Ergebnissen. Im Gegenteil, es kam hierbei nicht nur zu höheren C<sub>T</sub>-Werten, sondern auch zu einem Fluoreszenzanstieg bei der NTC. Der Anstieg war auf die Bildung von Primer-Dimeren zurückzuführen (Abb. 14). Für den **V10a** F2/Lunge Extrakt wurde kein Signalanstieg beobachtet.

Die mit dem PyroMark PCR Kit MM und dem OTX2 1.1 Primerset erhaltenen Ergebnisse waren vielversprechend. Alle DNA-Extrakte führten zu einem Fluoreszenzanstieg. Für unverdünnt eingesetzte Extrakte (> 5 ng/μL) wurden niedrigere C<sub>T</sub>-Werte erhalten als für Extrakte, die in einer Konzentration von 5 ng/μL eingesetzt wurden.



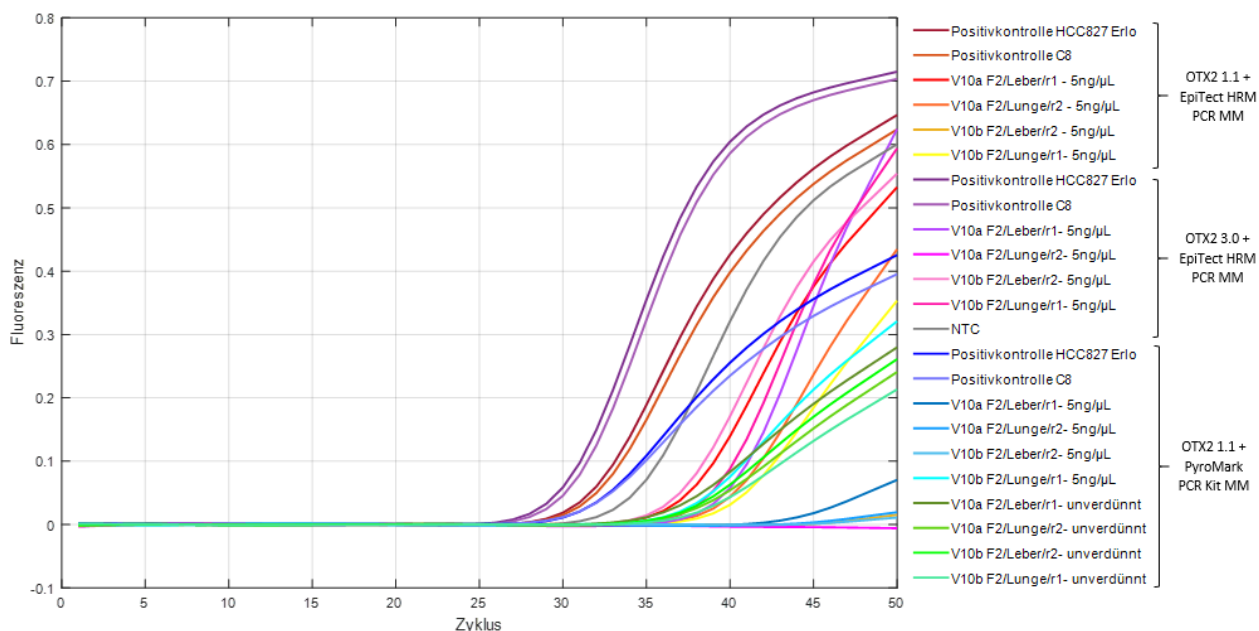


Abbildung 13: Amplifikationskurven für DNA-Extrakte aus Leber- und Lungengewebe von Fötus F2 (Extraktion: V10a und V10b) mit unterschiedlichen DNA-Konzentrationen (5 ng/µL, unverdünnt). Primerset 3 (OTX2 1.1) und 4 (OTX2 3.0), EpiTect HRM PCR MM und PyroMark PCR Kit MM. Positivkontrollen: HCC827 Erlo, C8. Zwei technische Replikate pro DNA-Extrakt.

Die erhaltenen Schmelzkurven (Abb. 14) lassen darauf schließen, dass bei Verwendung des EpiTect HRM PCR MM mit Primerset 3 (OTX2 1.1) für die DNA-Extrakte **V10b** F2/Leber und **V10b** F2/Lunge (Hitzebehandlung bei 120 °C) nicht das gewünschte Amplikon erhalten wurde, sondern lediglich unspezifische Nebenprodukte bzw. Primer-Dimere gebildet wurden. Die Schmelztemperatur des Amplikons, das für **V10a** F2/Lunge erhalten wurde, war mit 77,0 °C etwas niedriger als die Schmelztemperatur, die für die Positivkontrollen erhalten wurde ( $T_m$  = 77,6 °C), während das Peakmaximum für **V10a** F2/Leber mit dem der Positivkontrollen übereinstimmte.

Auch bei der Verwendung des EpiTect HRM PCR MM und des Primerpaares OTX2 3.0 wurden Primer-Dimere gebildet. Nur für **V10b** F2/Lunge wurde ein PCR-Produkt erhalten, welches das gleiche Schmelzverhalten zeigte wie das PCR-Produkt der Positivkontrollen ( $T_m$  = 82,0 °C). Das Maximum des erhaltenen Schmelzpeaks für **V10a** F2/Leber lag um 0,8 °C niedriger ( $T_m$  = 81,2 °C) als die für die Kontrollproben erhaltenen Schmelzpeaks. Für **V10a** F2/Lunge wurde kein Fluoreszenzanstieg beobachtet.

Mit dem OTX2 1.1 Primerpaar und dem PyroMark PCR Kit MM wurde für alle DNA-Extrakte ein Fluoreszenzanstieg verzeichnet, wobei durch den Einsatz unverdünnter Extrakte niedrigere  $C_t$ -Werte ermittelt werden konnten als für die verdünnten ( $C_t$ -Differenz: 8 - 10). PCR-Produkte von Extrakten, für die ein  $C_t$ -Wert < 37 erhalten wurde, zeigten dasselbe Schmelzverhalten wie die PCR-Produkte der Positivkontrollen ( $T_m$  = 79,7 °C).

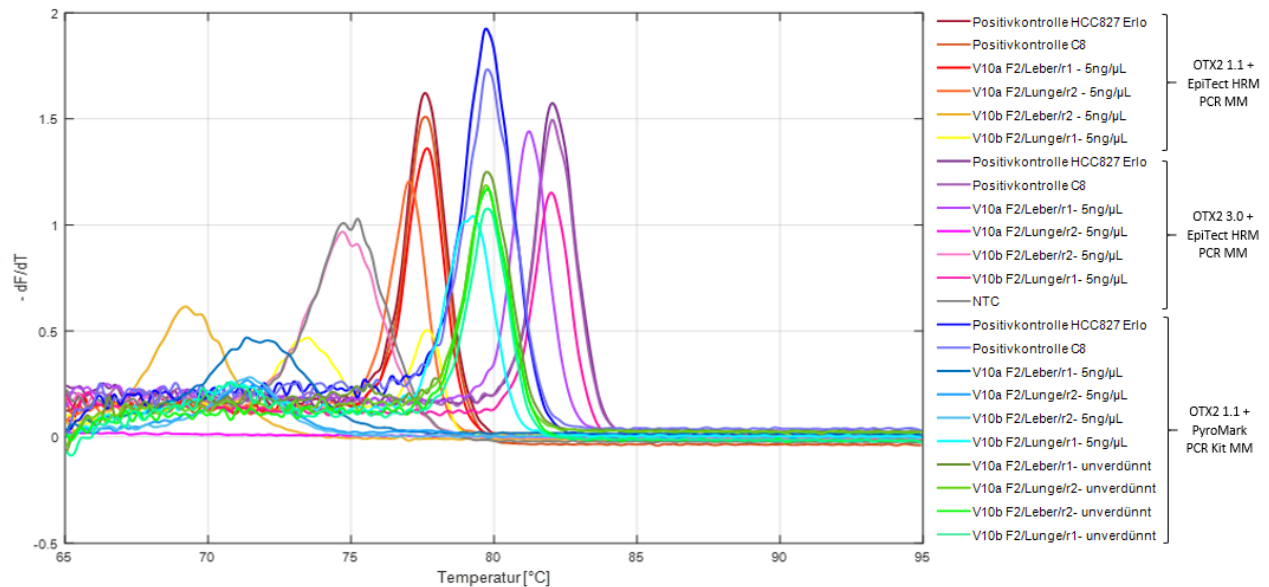


Abbildung 14: Schmelzkurven für PCR-Produkte der DNA-Extrakte aus Leber- und Lungengewebe von Fötus F2 (Extraktion: V10a und V10b) mit unterschiedlichen DNA-Konzentrationen (5 ng/µL, unverdünnt). Primerset 3 (OTX2 1.1) und 4 (OTX2 3.0), EpiTect HRM PCR MM und PyroMark PCR Kit MM. Positivkontrollen: HCC827 Erlo, C8. Zwei technische Replikate pro DNA-Extrakt.

Zur Überprüfung der Identität wurden die PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert (Abb. 15). Die Ergebnisse stimmten gut mit den Ergebnissen der HRM-Analyse überein (Abb. 14). So wurde für alle Extrakte, die zu einem Schmelzpeak führten, nur eine Bande am Gel beobachtet. Die Amplifikation von **V10b** F2/Lunge mit dem Primerpaar OTX2 1.1 und dem EpiTect PCR MM resultierte in zwei Schmelzpeaks und zwei Banden am Agarosegel. Mit allen Methoden wurde ein PCR-Produkt mit einer Länge von ca. 90 bp erhalten.

Die Banden der Amplikons, welche mit dem EpiTect HRM PCR MM erhalten wurden, zeigten nach oben hin eine Schmier, welche bei den Produkten, die mit dem PyroMark PCR Kit MM erhalten wurden, nicht zu sehen waren. Daher wurde der PyroMark PCR Kit MM als geeignet eingestuft und somit für weitere PCR-Analysen verwendet.

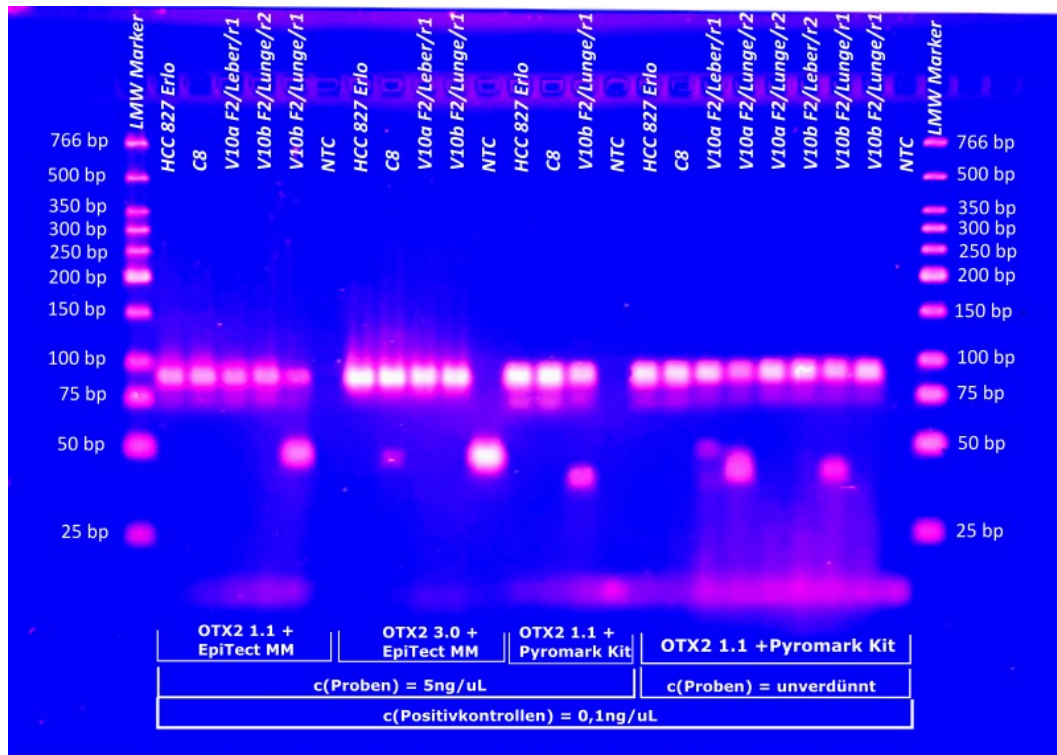


Abbildung 15: Aufnahme eines 3% (w/v) Agarosegels unter UV Licht. Aufgetragen wurden amplifizierbare DNA-Extrakte aus Leber- und Lungengewebe von Fötus F2 (Extraktion: V10a und V10b). Primerset 3 (OTX2 1.1) und 4 (OTX2 3.0), EpiTect HRM PCR MM und PyroMark PCR Kit MM. Positivkontrollen: PCR-Produkt von HCC827 Erlo und C8. Marker: LMW DNA Marker.

## 5.2. DNA-Extraktion mit dem QIAamp DNA Mini Kit

Als nächstes wurde die Eignung des QIAamp DNA Mini Kits zur Extraktion intakter, genomischer DNA aus langzeit-konservierten Föten untersucht. Für die DNA-Isolierung mit den Variationen V1a und V1b wurde das Lebergewebe des EtOH-fixierten Föten ohne ODC (F2) herangezogen und für V2 die Leber der beiden in Formalin gelagerten Föten F#003 und F#004 mit ODC-Erkrankung. Dabei wurden von allen Proben Doppelbestimmungen durchgeführt, wobei die Replikate mit *r1* (Replikat 1) und *r2* (Replikat 2) bezeichnet wurden. Zur vollständigen Elution der DNA von den Spin Säulen wurden von jeder Probe vier Eluate in separaten Gefäßen aufgefangen und einzeln weiteruntersucht. Neben dem Einsatz unterschiedlich fixierten Lebergewebes (V1a, V1b und V2) wurden zwei Lysepuffer (ATL/R.DX- und SDS/2,26x TE9 Puffer) auf ihre Eignung untersucht (V1a und V1b). Die Versuchsdurchführungen der Variationen V1a, V1b und V2 sind im experimentellen Teil der Arbeit (Kap.4.3.1, Kap. 4.3.1.1) beschrieben.

Anschließend wurde von allen Extrakten die DNA-Konzentration mit Hilfe einer fluorometrischen - und einer photometrischen Methode ermittelt, wobei mit Hilfe Letzterer ebenfalls der Reinheitsgrad bestimmt werden konnte.

Daraufhin fand eine Überprüfung der Amplifizierbarkeit der DNA-Extrakte mittels rt-PCR statt. Danach erfolgte eine weitere Untersuchung der erhaltenen PCR-Produkte mit der HRM-Analyse und der Agarose-Gelelektrophorese.

### 5.2.1. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung

Die Ausbeute an DNA, welche mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kits gewonnen wurden, fiel bereits für das EtOH-fixierte Lebergewebe des Föten F2 mit fluorometrisch ermittelten Konzentrationen im Bereich von 0,35 - 0,72 ng/μL (V1a und V1b) gering aus. Im Vergleich dazu wurden für die FF Lebergewebe der beiden Föten mit Gesichtsdysmorphien F#003 und F#004 deutlich niedrigere Ausbeuten mit dem Qubit®-Fluorometer ermittelt (V2). Mit dem NanoDrop Gerät wurden höhere Konzentrationen gemessen. Das liegt aber hauptsächlich daran, dass die photometrische Messung nicht selektiv ist und auch andere Verbindungen, welche bei einer Wellenlänge von 260 nm absorbieren, miterfasst werden.

Wie man der Tabelle 17 entnehmen kann, zeigten fast alle DNA-Extrakte, in Hinsicht auf ihre Reinheit, schlechte Resultate, da die Extinktions-Verhältnisse  $E_{260}/E_{280}$  und  $E_{260}/E_{230}$  meist sehr viel niedriger ausfielen als erhofft (1,4 - 1,7 statt 1,8 - 2,0 und 0,2 - 0,9 statt 2,0 - 2,2). Nur für **V2** F#003/Leber wurde ein guter Reinheitswert für das Extinktions-Verhältnis von  $E_{260}/E_{280}$  erhalten. Generell ließen die Ergebnisse auf Verunreinigungen der isolierten DNA schließen.

Aus dem Vergleich der Ergebnisse, die mit den Variationen V1a und V1b erhalten wurden, kann geschlossen werden, dass der Puffer, der zur Homogenisation und Zellyse verwendet wurde, keinen Einfluss auf die Konzentration und Reinheit der extrahierten DNA hatte.

Die höchsten Ausbeuten konnten im ersten Eluat ermittelt werden, weshalb nur jene Extrakte zur Amplifikation mittels rt-PCR herangezogen wurden.

Aufgrund ungenügender Reinheit und geringer DNA-Ausbeuten wurde die DNA-Extraktionsmethode basierend auf dem QIAamp DNA Mini Kit nicht weiter modifiziert.

*Tabelle 17: Ergebnisse der QIAamp DNA Mini Kit – Extraktionsmethode in Bezug auf Konzentration und Reinheit.*

| Abkürzung der Variation | Fötus/ Gewebstyp/ Replikat | DNA Eluat | Zusätzliche Informationen              | Einwaage [mg] | c(DNA) gemäß Qubit®-Fluorometer [ng/uL] | c(DNA) gemäß NanoDrop [ng/uL] | $\frac{E_{260}}{E_{280}}$ | $\frac{E_{260}}{E_{230}}$ |
|-------------------------|----------------------------|-----------|--|---------------|---|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <b>V1a</b>              | F2/Leber/r1                | 1         | Homogenisation in ATL/R.DX Puffer      | 24,9          | 0,67                                    | 79,40                         | 1,7                       | 0,3                       |
|                         | F2/Leber/r2                | 1         |  | 25,5          | 0,35                                    | 36,45                         | 1,7                       | 0,3                       |
|                         | F2/Leber/r1                | 2         |  | 24,9          | 0,64                                    | 74,00                         | 1,7                       | 0,3                       |
|                         | F2/Leber/r2                | 2         |  | 25,5          | 0,29                                    | 33,75                         | 1,7                       | 0,3                       |
|                         | F2/Leber/r1                | 3         |  | 24,9          | 0,37                                    | 47,35                         | 1,7                       | 0,4                       |
|                         | F2/Leber/r2                | 3         |  | 25,5          | 0,22                                    | 24,45                         | 1,7                       | 0,4                       |
|                         | F2/Leber/r1                | 4         |  | 24,9          | 0,27                                    | 28,70                         | 1,7                       | 0,5                       |
|                         | F2/Leber/r2                | 4         |  | 25,5          | 0,23                                    | 20,10                         | 1,7                       | 0,5                       |
| <b>V1b</b>              | F2/Leber/r1                | 1         | Homogenisation in SDS/2,26x TE9 Puffer | 25,7          | 0,35                                    | 42,75                         | 1,7                       | 0,4                       |
|                         | F2/Leber/r2                | 1         |  | 25,0          | 0,72                                    | 29,80                         | 1,7                       | 0,4                       |

|           |                |   |   |      |      |       |     |     |
|-----------|----------------|---|---|------|------|-------|-----|-----|
|           | F2/Leber/r1    | 2 |   | 25,7 | 0,26 | 30,85 | 1,7 | 0,5 |
|           | F2/Leber/r2    | 2 |   | 25,0 | 0,49 | 52,95 | 1,7 | 0,4 |
|           | F2/Leber/r1    | 3 |   | 25,7 | 0,22 | 27,30 | 1,6 | 0,6 |
|           | F2/Leber/r2    | 3 |   | 25,0 | 0,31 | 35,10 | 1,7 | 0,5 |
|           | F2/Leber/r1    | 4 |   | 25,7 | 0,13 | 9,30  | 1,7 | 0,8 |
|           | F2/Leber/r2    | 4 |   | 25,0 | 0,30 | 26,00 | 1,7 | 0,6 |
| <b>V2</b> | F#003/Leber/r1 | 1 | Homogenisation<br>in ATL/R.DX<br>Puffer | 25,0 | 0,02 | 8,35  | 2,0 | 0,2 |
|           | F#003/Leber/r2 | 1 |   | 25,3 | 0,02 | 9,45  | 2,1 | 0,2 |
|           | F#004/Leber/r1 | 1 |   | 25,4 | 0,03 | 5,00  | 1,6 | 0,2 |
|           | F#004/Leber/r2 | 1 |   | 25,5 | 0,02 | 2,30  | 1,6 | 0,3 |
|           | F#003/Leber/r1 | 2 |   | 25,0 | 0,02 | 6,15  | 1,9 | 0,2 |
|           | F#003/Leber/r2 | 2 |   | 25,3 | 0,02 | 6,65  | 1,9 | 0,2 |
|           | F#004/Leber/r1 | 2 |   | 25,4 | 0,01 | 2,50  | 1,5 | 0,4 |
|           | F#004/Leber/r2 | 2 |   | 25,5 | 0,01 | 1,50  | 1,4 | 0,9 |

### 5.2.2. Überprüfung der Amplifizierbarkeit

Trotz geringer DNA-Konzentrationen und schlechter Reinheitsgrade wurde die mit dem QIAamp DNA Mini Kit isolierte DNA einer rt-PCR (Primerset 3, PyroMark PCR Kit MM) unterzogen. Abbildung 16 zeigt die erhaltenen Amplifikationskurven, worin ein später Anstieg des Fluoreszenzsignals für **V1a** F2/Leber, im Vergleich zur DNA der Positivkontrollen HCC827 Erlo und C8, zu erkennen ist. Vermutlich ist dieses Problem auf die Fragmentierung der DNA zurückzuführen. Durch eine zu starke Fragmentierung der DNA können die Primer nicht mehr an das Templat binden, wodurch die Amplifikation der DNA ausbleibt. Die C<sub>T</sub>-Werte sind in Tabelle 18 zusammengefasst.

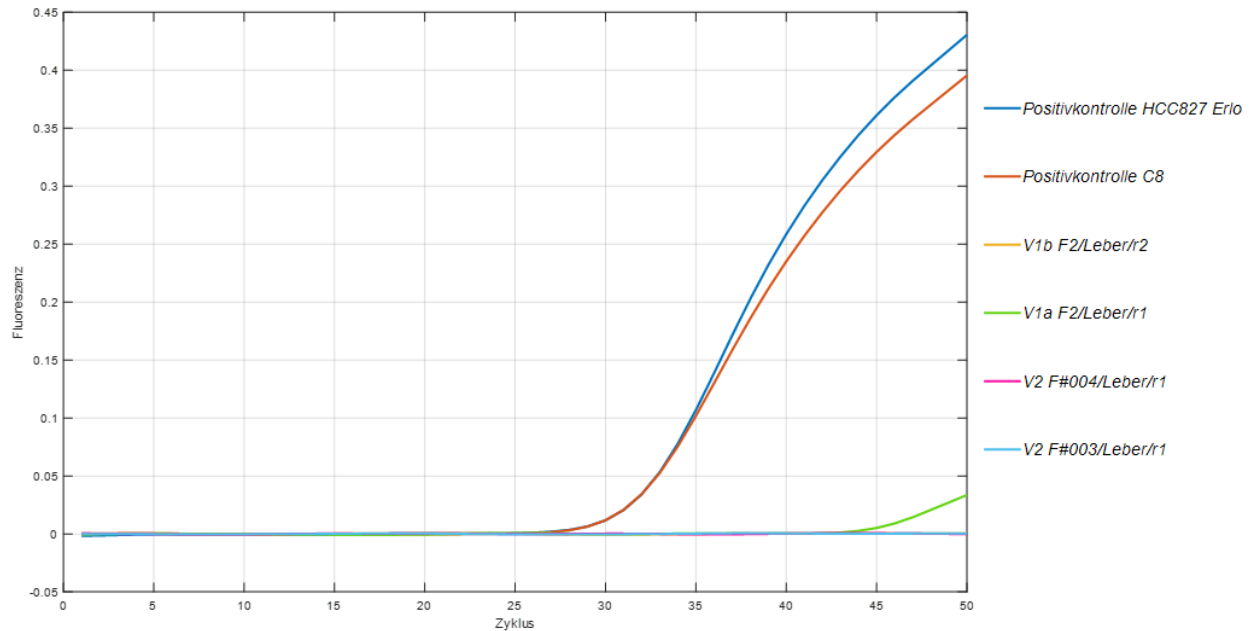


Abbildung 16: Amplifikationskurven für DNA-Extrakte aus Lebergewebe von den Föten F2 (Extraktion: V1a, V1b), F#003 (Extraktion: V2) und F#004 (Extraktion: V2). Primerset 3 (OTX2 1.1), PyroMark PCR Kit MM. Positivkontrollen: HCC827 Erlo, C8. Zwei technische Replikate pro DNA-Extrakt.

Tabelle 18: C<sub>t</sub>-Werte, die durch die Amplifizierung unterschiedlich konzentrierter, mittels QIAamp DNA Mini Kit gewonnener DNA-Extrakte erhalten wurden. Primerset: 3 (OTX2 1.1); Mastermix: PyroMark PCR Kit MM; Positivkontrollen: HCC827 Erlo, C8.

| Primer + Mastermix                   | DNA-Extrakt                  | c(DNA-Extrakt)<br>gemäß Qubit®-<br>Fluorometer<br>[ng/uL] | C <sub>t</sub> -Wert |
|--------------------------------------|------------------------------|---|----------------------|
| OTX2 1.1<br>+<br>PyroMark PCR Kit MM | Positivkontrolle HCC827 Erlo | 0,1   | 29,87                |
|                                      | Positivkontrolle C8          | 0,1   | 29,76                |
|                                      | <b>V1a</b> F2/Leber/r1       | unverdünnt*   | 46,28                |
|                                      | <b>V1b</b> F2/Leber/r2       |   | n.a.**               |
|                                      | <b>V2</b> F#003/Leber/r1     |   | n.a.**               |
|                                      | <b>V2</b> F#004/Leber/r1     |   | n.a.**               |

\* siehe Tabelle 17

\*\* nicht amplifizierbar

Abbildung 17 zeigt, dass das für **V1a** F2/Leber erhaltene PCR-Produkt ein Peakmaximum bei einer Schmelztemperatur von 80,9 °C aufwies, während das Peakmaximum für die Positivkontrollen bei einer Schmelztemperatur von 79,8 °C lag.

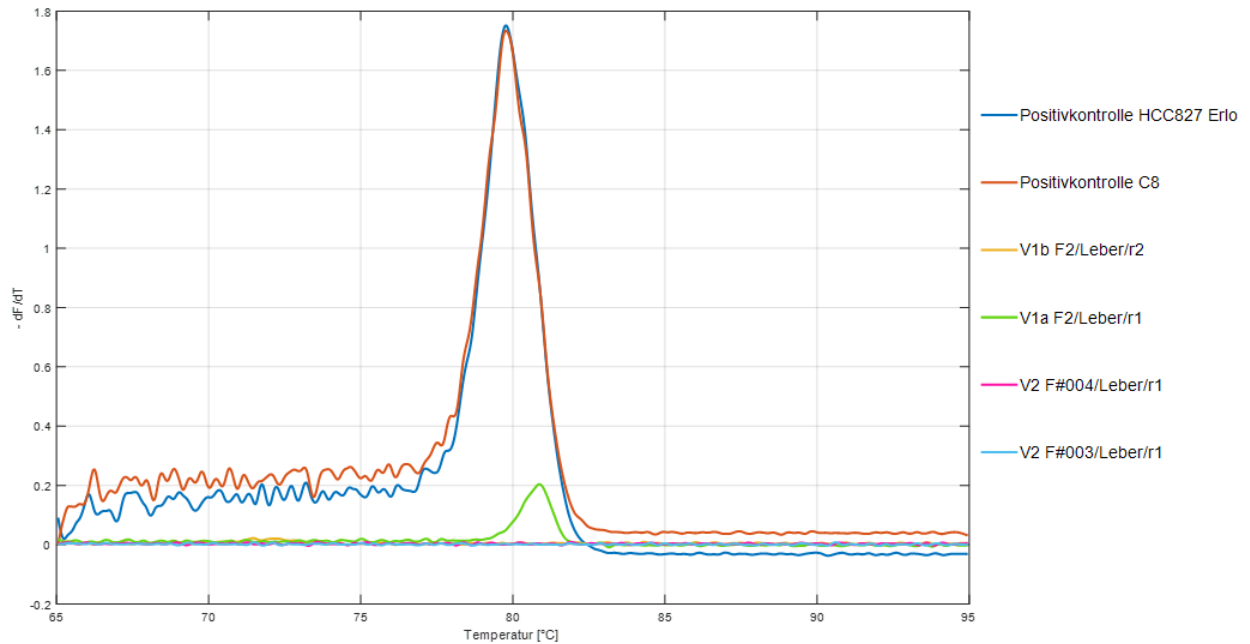


Abbildung 17: Schmelzkurven für die PCR-Produkte der DNA-Extrakte aus dem Lebergewebe von den Föten F2 (Extraktion: V1a, V1b), F#003 (Extraktion: V2) und F#004 (Extraktion: V2). Primerset 3 (OTX2 1.1), PyroMark PCR Kit MM. Positivkontrollen: HCC827 Erlo, C8. Zwei technische Replikate pro DNA-Extrakt.

Das für **V1a** F2/Leber erhaltene PCR-Produkt resultierte am Agarosegel in einer Bande, welche einer Länge von ca. 90 bp entsprach (Abb. 18, Lane: 12). Daraus konnte geschlossen werden, dass das gewünschte Produkt gebildet wurde. Aufgrund des Fehlens einer Bande der NTC konnte davon ausgegangen werden, dass sich bei diesem PCR-Lauf keine Primer-Dimere bildeten.



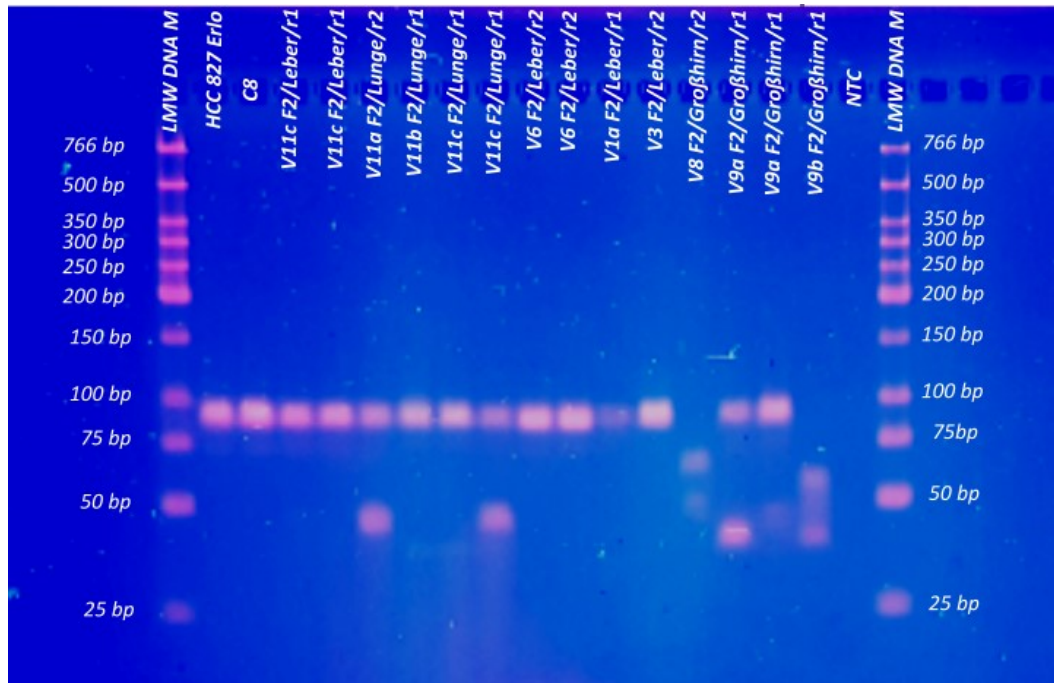


Abbildung 18: Aufnahme eines 3% (w/v) Agarosegels unter UV Licht. Aufgetragen wurden amplifizierbare DNA-Extrakte aus Leber-, Lungen- und Großhirngewebe von Fötus F2 (Extraktion: V1a, V3, V6, V8, V9a, V9b, V11a, V11b und V11c). Primerset 3 (OTX2 1.1), PyroMark PCR Kit MM. Positivkontrollen: PCR-Produkt von HCC827 Erlo und C8. Marker: LMW DNA Marker.

Unter Berücksichtigung aller Ergebnisse wurde für alle weiteren Variationen der ATL/R.DX Puffer zur Homogenisation und darauffolgender Zelllyse eingesetzt.

### 5.3. DNA-Extraktion mit dem QIAamp DNA FFPE Tissue Kit

Zur Überprüfung der Eignung des QIAamp DNA FFPE Tissue Kits zur Extraktion intakter, genomischer DNA aus langzeit-konservierten Föten wurde in der Variation V3 das Lebergewebe des EtOH-fixierten Föten ohne ODC (F2) untersucht. Für die Variationen V4a und V4b wurde das Großhirngewebe von F2 und vom FF, nicht-ODC-Föten F3 verwendet. Dabei wurden von allen Proben zwei Replikate (*r1*, *r2*) durchgeführt. Zur vollständigen Elution der DNA von den Spin Säulen wurden von jeder Probe vier Eluate in separaten Gefäßen aufgefangen und einzeln weiteruntersucht. Neben den unterschiedlich eingesetzten Gewebsarten (V3 und V4a) wurde zur Extraktionsoptimierung in V4b die Dauer des Waschschritts mit PBS verlängert. Die Versuchsdurchführungen der Variationen V3, V4a und V4b sind im experimentellen Teil der Arbeit (Kap.4.3.2, Kap. 4.3.2.1) beschrieben.

Anschließend wurden von allen Extrakten die DNA-Konzentration und Reinheit bestimmt. Daraufhin fand eine Überprüfung der Amplifizierbarkeit der DNA-Extrakte mittels rt-PCR statt. Danach erfolgte eine weitere Untersuchung der erhaltenen PCR-Produkte mit der HRM-Analyse und der Agarose-Gelelektrophorese.



### 5.3.1. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung

Mit dem QIAamp DNA FFPE Tissue Kit konnte für das EtOH-fixierte Lebergewebe (V3) bereits etwas mehr DNA, im Vergleich zum DNA Mini Kit (Tab. 17), mit Konzentrationen um die 0,97 - 1,16 ng/μL isoliert werden (Tab. 19). Die Ergebnisse der Reinheitsbestimmung mit dem NanoDrop ließen zwar auf eine geringe Verunreinigung mit Proteinen ( $E_{260}/E_{280}$ : 1,6 und 1,7), jedoch auf eine stärkere Verunreinigung mit organischen Substanzen ( $E_{260}/E_{230}$ : 0,4 und 1,5) schließen.

Trotz des identen Versuchsablaufs wurden für **V4a** F2/Großhirn viel geringere DNA-Konzentrationen erzielt als für **V3** F2/Leber. Dieses Ergebnis könnte aus den unterschiedlichen Gewebsstrukturen der beiden Organe resultieren. Während die Leber eine etwas zähere, festere Charakteristik aufwies, zeigte das Großhirn eine feuchte, weichere Konsistenz, wobei dieses durch die Zerkleinerung mittels Skalpell eine Brei-ähnliche Konsistenz annahm. Durch den Zerfall in kleinste Gewebsteilchen war die Entfernung von PBS während des Waschvorgangs nicht ohne Probenverlust möglich. Trotz des verlängerten Waschschritts in V4b konnten vergleichbare DNA-Konzentrationen zu V4a fluorometrisch ermittelt werden. Das mit dem NanoDrop ermittelte Verhältnis  $E_{260}/E_{280}$  wies auf eine geringere Anwesenheit von Proteinen hin. Eine Verbesserung der Reinheit in Bezug auf organische Substanzen oder Salze war bei V4b allerdings nicht möglich ( $E_{260}/E_{230}$ : 0,3 - 0,5). Die DNA-Ausbeute aus der Großhirnrinde des FF, nicht-ODC-Föten F3 war beträchtlich geringer, was auf die Quervernetzung der Nukleinsäuren mit Proteinen zurückzuführen ist.

Tabelle 19: Ergebnisse der QIAamp DNA FFPE Tissue Kit – Extraktionsmethode in Bezug auf Konzentration und Reinheit.

| Abkürzung der Variation | Fötus/ Gewebstyp/ Replikat | DNA Eluat | Zusätzliche Informationen            | Einwaage [mg] | c(DNA) gemäß Qubit®- Fluorometer [ng/μL] | c(DNA) gemäß NanoDrop [ng/μL] | $\frac{E_{260}}{E_{280}}$ | $\frac{E_{260}}{E_{230}}$ |
|-------------------------|----------------------------|-----------|--------------------------------------|---------------|--|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <b>V3</b>               | F2/Leber/r1                | 1         | Normaler Waschschritt (2x 1h bei RT) | 25,8          | 0,97                                     | 94,65                         | 1,7                       | 0,4                       |
|                         | F2/Leber/r2                | 1         |                                      | 25,6          | 1,16                                     | 36,60                         | 1,6                       | 1,5                       |
|                         | F2/Leber/r1                | 2         |                                      | 25,8          | 0,55                                     | 64,50                         | 1,7                       | 0,4                       |
|                         | F2/Leber/r2                | 2         |                                      | 25,6          | 0,58                                     | 59,10                         | 1,7                       | 0,4                       |
|                         | F2/Leber/r1                | 3         |                                      | 25,8          | 0,59                                     | 54,30                         | 1,7                       | 0,6                       |
|                         | F2/Leber/r2                | 3         |                                      | 25,6          | 0,57                                     | 49,10                         | 1,7                       | 0,6                       |
| <b>V4a</b>              | F2/Großhirn/r1             | 1         | Normaler Waschschritt (2x 1h bei RT) | 25,0          | 0,38                                     | 15,55                         | 1,5                       | 0,3                       |
|                         | F2/ Großhirn /r2           | 1         |                                      | 25,8          | 0,32                                     | 12,45                         | 1,6                       | 0,5                       |
|                         | F3/ Großhirn /r1           | 1         |                                      | 25,7          | 0,09                                     | 7,75                          | 1,7                       | 0,3                       |
|                         | F3/ Großhirn /r2           | 1         |                                      | 25,0          | 0,08                                     | 5,25                          | 2,1                       | 0,3                       |
| <b>V4b</b>              | F2/ Großhirn /r1           | 1         |                                      | 25,2          | 0,42                                     | 18,35                         | 1,7                       | 0,4                       |

|  |                  |   |   |      |      |       |     |     |
|--|------------------|---|---|------|------|-------|-----|-----|
|  | F2/ Großhirn /r2 | 1 | Verlängerter<br>Waschschritt<br>(4x 1 h bei 50<br>°C +<br>Inkubation<br>über Nacht) | 25,1 | 0,22 | 11,90 | 1,8 | 0,3 |
|  | F3/ Großhirn /r1 | 1 |   | 25,2 | 0,07 | 5,17  | 2,0 | 0,3 |
|  | F3/ Großhirn /r2 | 1 |   | 25,1 | 0,08 | 6,30  | 1,9 | 0,3 |

### 5.3.2. Überprüfung der Amplifizierbarkeit

Die Amplifizierbarkeit wurde mit dem Primerset 3 (OTX2 1.1) und dem PyroMark PCR Kit MM überprüft. Die in Abbildung 19 dargestellten Amplifikationskurven lassen erkennen, dass ein Anstieg des Fluoreszenzsignals lediglich für **V3** F2/Leber/r2 erzielt werden konnte. Mit einem  $C_T$ -Wert von 35,08 (Tab. 20) lag dieser deutlich näher zu den  $C_T$ -Werten der Positivkontrollen als der  $C_T$ -Wert, der für **V1a** F2/Leber erhalten wurde, was an dem Einsatz höherer DNA-Konzentrationen (Vgl. Tab. 17 und Tab. 19) liegen könnte. Die DNA-Extrakte aus dem Großhirn von F2 und F3 führten zu keinem Anstieg des Fluoreszenzsignals.

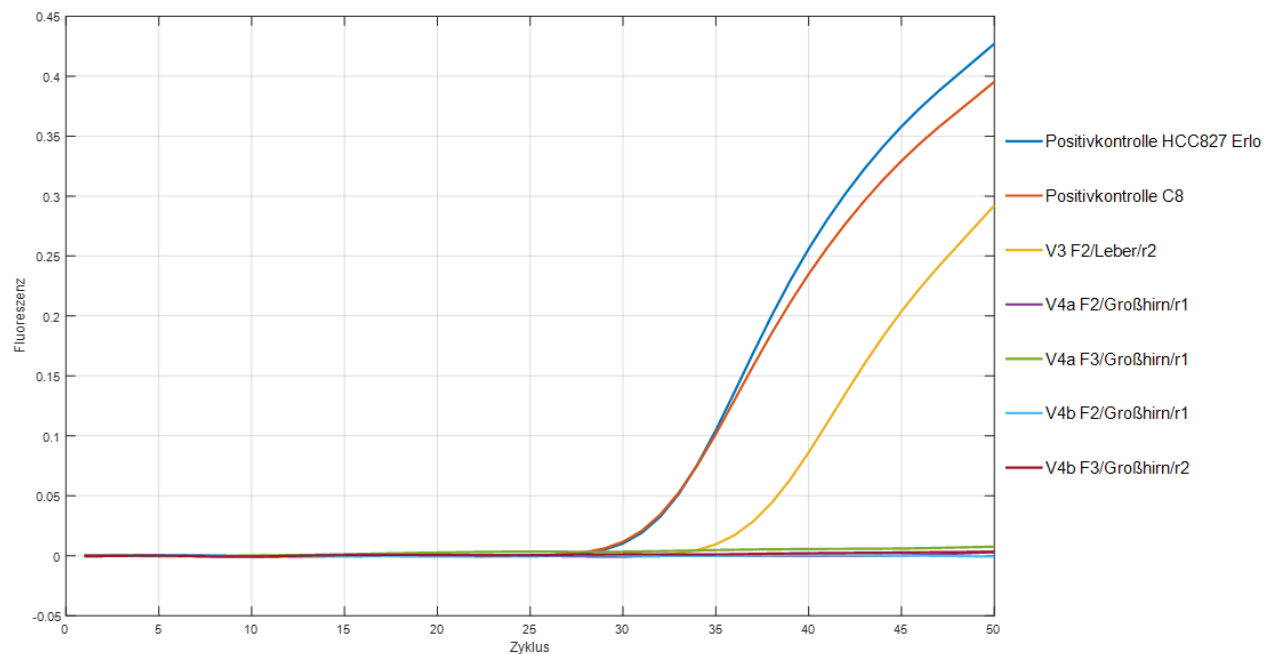


Abbildung 19: Amplifikationskurven für DNA-Extrakte aus Leber- und Großhirngewebe von den Föten F2 (Extraktion: V3, V4a und V4b) und F3 (Extraktion: V4a und V4b). Primerset 3 (OTX2 1.1), PyroMark PCR Kit MM. Positivkontrollen: HCC827 Erlo, C8. Zwei technische Replikate pro DNA-Extrakt.

Tabelle 20: C<sub>t</sub>-Werte, die durch die Amplifizierung unterschiedlich konzentrierter, mittels QIAamp DNA FFPE Tissue Kit gewonnener DNA-Extrakte erhalten wurden. Primerset: 3 (OTX2 1.1); Mastermix: PyroMark PCR Kit MM; Positivkontrollen: HCC827 Erlo, C8.

| Primer + Mastermix                   | DNA-Extrakt                  | c(DNA-Extrakt)<br>gemäß Qubit®-<br>Fluorometer<br>[ng/uL] | C <sub>t</sub> -Wert |
|--------------------------------------|------------------------------|---|----------------------|
| OTX2 1.1<br>+<br>PyroMark PCR Kit MM | Positivkontrolle HCC827 Erlo | 0,1   | 29,87                |
|                                      | Positivkontrolle C8          | 0,1   | 29,76                |
|                                      | <b>V3</b> F2/Leber/r2        |   | 35,08                |
|                                      | <b>V4a</b> F2/Großhirn/r1    |   | n.a.**               |
|                                      | <b>V4a</b> F3/Großhirn/r1    | unverdünnt*   | n.a.**               |
|                                      | <b>V4b</b> F2/Großhirn/r1    |   | n.a.**               |
|                                      | <b>V4b</b> F3/Großhirn/r2    |   | n.a.**               |

\* siehe Tabelle 19

\*\* nicht amplifizierbar

Das Schmelzdiagramm (Abb. 20) wies für **V3** F2/Leber nur einen Peak auf, woraus geschlossen werden kann, dass nur ein PCR-Produkt gebildet wurde. Allerdings war das Peakmaximum ( $T_m = 80,9 \text{ °C}$ ) bezogen auf die Positivkontrollen ( $T_m = 79,8 \text{ °C}$ ) zu höheren Temperaturen verschoben.

Ob tatsächlich die Bildung des richtigen Produkts erfolgte, wurde weiters mit der Agarose-Gelelektrophorese überprüft (Kap. 5.2.2, Abb. 18, Lane: 13). Auch hier konnte die Bande des Amplikons von **V3** F2/Leber bei Sequenzlängen von ca. 89 bp ermittelt werden, was auf das gewünschte PCR-Produkt schließen lässt.

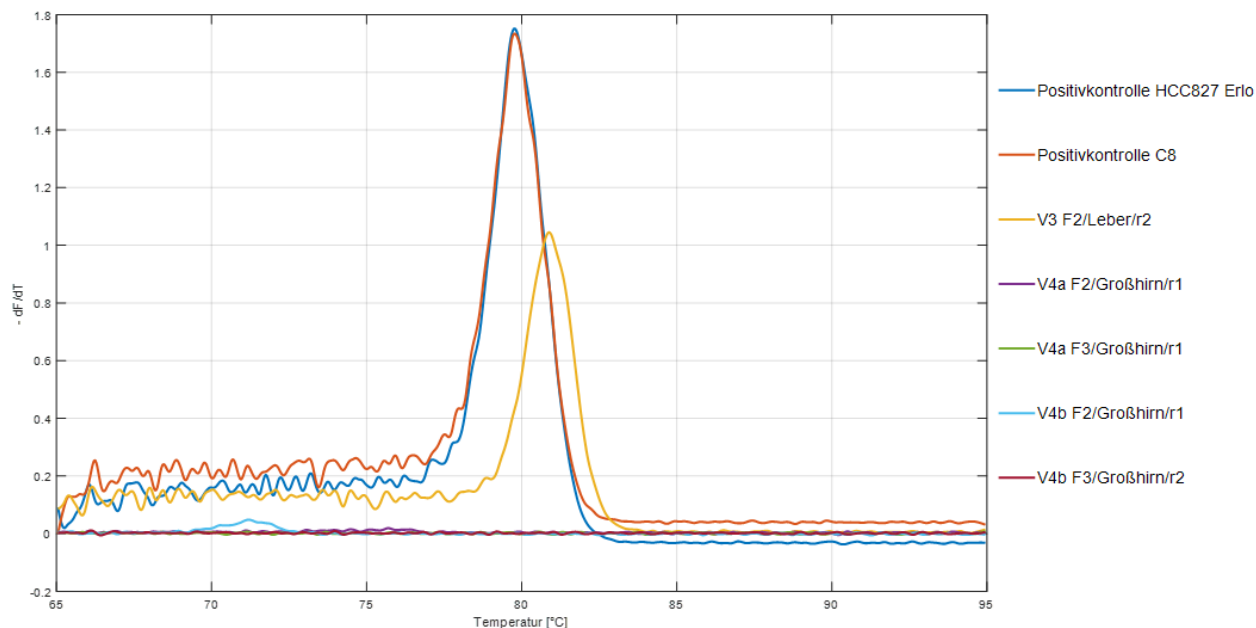


Abbildung 20: Schmelzkurven der PCR-Produkte für DNA-Extrakte aus Leber- und Großhirngewebe von den Föten F2 (Extraktion: V3, V4a und V4b) und F3 (Extraktion: V4a und V4b). Primerset 3 (OTX2 1.1), PyroMark PCR Kit MM. Positivkontrollen: HCC827 Erlö, C8. Zwei technische Replikate pro DNA-Extrakt.

Aufgrund der nur geringfügig besser erbrachten Resultate, im Vergleich zum QIAamp DNA Mini Kit, wurde die Extraktionsmethode basierend auf dem QIAamp DNA FFPE Tissue Kit in weiterer Folge nicht mehr angewandt.

#### 5.4. DNA-Extraktion mit der Phenol-Chloroform Methode

Dieser Abschnitt zeigt die Ergebnisse, die bei der Überprüfung der PC-Extraktion zur Isolierung intakter, genomischer DNA aus langzeit-konservierten Föten erhalten wurden. Zur DNA-Extraktion für V5 und V7 wurde das Lebergewebe des EtOH-fixierten Föten ohne ODC (F2) herangezogen. Für die Variation V6 wurde das Lebergewebe aller nicht-ODC-Föten F1 (isopropanol-fixiert), F2 (EtOH-fixiert) und F3 (FF) verwendet. Dabei wurden von allen Proben Doppelbestimmungen ( $r1$ ,  $r2$ ) durchgeführt. Neben dem Einsatz unterschiedlich fixierter Lebergewebe wurde der Waschschriff mit PBS in verkürzter - (V5) und in normaler Form (V6 und V7) angewandt. Bei V7 wurde lediglich der V6-Versuch mit dem Lebergewebe des Föten F2 wiederholt und nicht neu modifiziert. Die Versuchsdurchführungen der Variationen V5, V6 und V7 sind im experimentellen Teil der Arbeit (Kap.4.3.3, Kap. 4.3.3.1) beschrieben.

##### 5.4.1. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung

Mit den PC-Extraktionsvariationen V5, V6 und V7 konnte eine offensichtliche Verbesserung der DNA-Isolierung aus dem Lebergewebe aller Föten ohne ODC (F1, F2, F3) erfolgen. Vergleicht man jedoch die DNA-Ausbeuten für die einzelnen Föten, so ist festzustellen, dass aus dem EtOH-fixierten Lebergewebe (F2) bei Weitem die höchsten DNA-Mengen erzielt wurden (Tab. 21). Die fluorometrisch ermittelten DNA-Konzentrationen der isolierten DNA-Extrakte aus dem Isopropanol-fixiertem (F1) - und dem FF (F3) Gewebe unterschieden sich nur geringfügig.

Mittels NanoDrop Messung konnte eine Verbesserung der Reinheitsgrade der DNA-Extrakte bezogen auf organische Verunreinigungen ( $E_{260}/E_{230}$ ), verglichen zu den kommerziell erhältlichen Kits, beobachtet werden. Mit Ergebnissen zwischen 2,0 und 2,2 lagen die Werte von **V5** F1/Leber, **V6** F1/Leber, **V6** F3/Leber und **V7** F2/Leber im gewünschten Bereich des Extinktionsverhältnisses  $E_{260}/E_{230}$ . Nur **V6** F2/Leber lag mit 1,8 etwas darunter. In Hinsicht auf Proteinverunreinigungen ( $E_{260}/E_{280}$ ) lagen alle Extrakte mit Werten von 1,5 bis 1,7 unter dem gewünschten Bereich.

*Tabelle 21: Ergebnisse der Phenol-Chloroform – Extraktionsmethode in Bezug auf Konzentration und Reinheit.*

| Abkürzung der Variation | Fötus/ Gewebstyp/ Replikat | Zusätzliche Informationen                  | Einwaage [mg] | c(DNA) gemäß Qubit®-Fluorometer [ng/uL] | c(DNA) gemäß NanoDrop [ng/uL] | $\frac{E_{260}}{E_{280}}$ | $\frac{E_{260}}{E_{230}}$ |
|-------------------------|----------------------------|--|---------------|---|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <b>V5</b>               | F1/Leber/r1                | Verkürzter Waschschrift (1x 15 min bei RT) | 25,8          | 3,76                                    | 99,40                         | 1,5                       | 2,2                       |
|                         | F1/Leber/r2                |  | 25,4          | 5,51                                    | 151,65                        | 1,6                       | 2,2                       |
| <b>V6</b>               | F1/Leber/r1                | Normaler Waschschrift (2x 1h bei RT)       | 25,9          | 2,50                                    | 71,10                         | 1,6                       | 2,2                       |
|                         | F1/Leber/r2                |  | 25,4          | 4,50                                    | 118,30                        | 1,7                       | 1,9                       |
|                         | F2/Leber/r1                |  | 25,5          | 16,60                                   | 992,10                        | 1,7                       | 1,8                       |
|                         | F2/Leber/r2                |  | 25,0          | 21,60                                   | 1439,25                       | 1,7                       | 1,8                       |
|                         | F3/Leber/r1                |  | 25,6          | 3,33                                    | 107,45                        | 1,6                       | 1,9                       |
|                         | F3/Leber/r2                |  | 25,2          | 2,79                                    | 96,95                         | 1,6                       | 2,0                       |
| <b>V7</b>               | F2/Leber/r1                | Normaler Waschschrift (2x 1h bei RT)       | 25,1          | 21,00                                   | 1290,55                       | 1,7                       | 1,9                       |
|                         | F2/Leber/r2                |  | 25,2          | 20,20                                   | 1411,45                       | 1,7                       | 2,0                       |

#### 5.4.2. Überprüfung der Amplifizierbarkeit

Obwohl mit der PC-Extraktion zum Teil höher konzentrierte DNA-Extrakte erhalten wurden, konnte mittels rt-PCR (Primerset 3, PyroMark PCR Kit MM) ausschließlich für **V6** F2/Leber/r2 ein Fluoreszenzanstieg beobachtet werden (Abb. 21). Der ermittelte  $C_T$ -Wert (28,15) lag dabei nahe den  $C_T$ -Werten der Positivkontrollen (Tab. 22). Bei der Variation V7 handelte es sich prinzipiell um eine Wiederholung von V6. Im Unterschied zu V6 wurde aber nur das Lebergewebe von F2 untersucht. Der Grund, weshalb für **V7** F2/Leber kein Anstieg des Fluoreszenzsignals beobachtet werden konnte, könnte daran liegen, dass im V7-Extrakt vorwiegend kürzere DNA-Fragmente vorlagen als im Extrakt von V6. Die DNA-Extrakte des Lebergewebes der Föten F1 und F3 führten zu keinem Fluoreszenzanstieg.

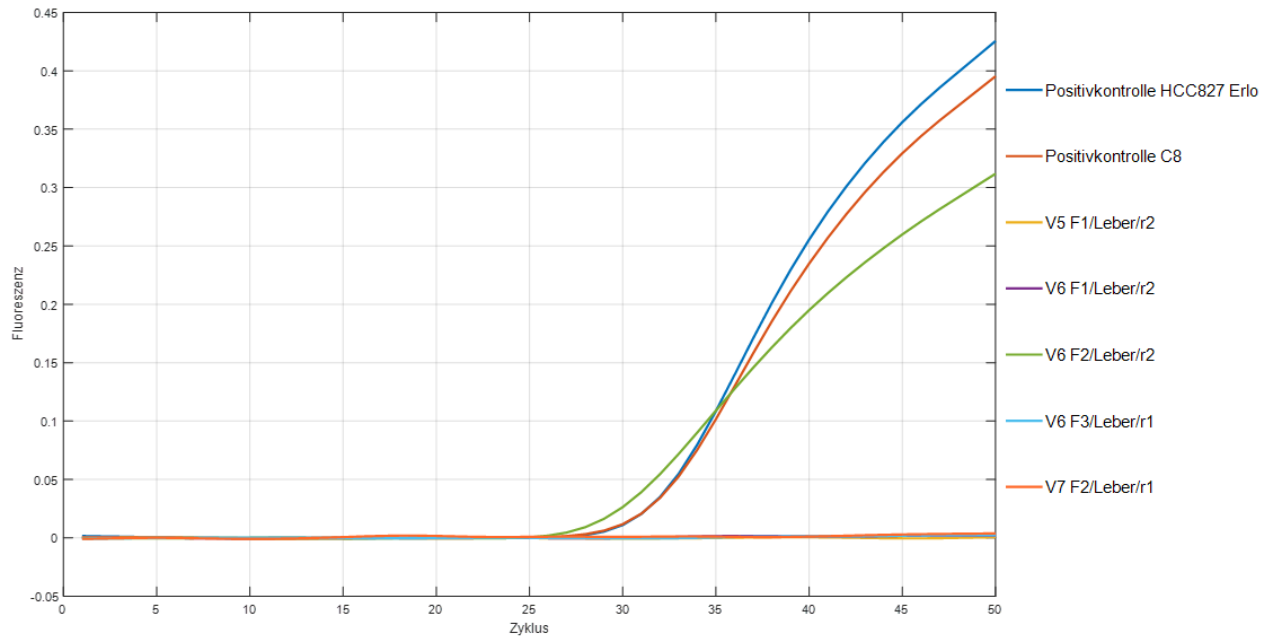


Abbildung 21: Amplifikationskurven für DNA-Extrakte aus Lebergewebe von den Föten F1 (Extraktion: V5 und V6), F2 (Extraktion: V6 und V7) und F3 (Extraktion: V6). Primerset 3 (OTX2 1.1), PyroMark PCR Kit MM. Positivkontrollen: HCC827 Erlo, C8. Zwei technische Replikate pro DNA-Extrakt.

Tabelle 22: C<sub>t</sub>-Werte, die durch die Amplifizierung unterschiedlich konzentrierter, mittels PC-Methode gewonnener DNA-Extrakte erhalten wurden. Primerset: 3 (OTX2 1.1); Mastermix: PyroMark PCR Kit MM; Positivkontrollen: HCC827 Erlo, C8.

| Primer + Mastermix                   | DNA-Extrakt                  | c(DNA-Extrakt)<br>gemäß Qubit®-<br>Fluorometer<br>[ng/μL] | C <sub>t</sub> -Wert |
|--------------------------------------|------------------------------|---|----------------------|
| OTX2 1.1<br>+<br>PyroMark PCR Kit MM | Positivkontrolle HCC827 Erlo | 0,1   | 29,87                |
|                                      | Positivkontrolle C8          | 0,1   | 29,76                |
|                                      | <b>V5</b> F1/Leber/r2        |   | n.a.**               |
|                                      | <b>V6</b> F1/ Leber/r2       |   | n.a.**               |
|                                      | <b>V6</b> F2/ Leber/r2       | unverdünnt*   | 28,15                |
|                                      | <b>V6</b> F3/ Leber/r1       |   | n.a.**               |
|                                      | <b>V7</b> F2/ Leber/r1       |   | n.a.**               |

\* siehe Tabelle 21

\*\* nicht amplifizierbar

Die Ergebnisse der HRM-Analyse (Abb. 22) und der Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 5.2.2, Abb. 18, Lanes: 10, 11) lassen darauf schließen, dass es sich bei dem für **V6** F2/Leber/r2 erhaltenen Amplikon um das gewünschte Produkt handelte.

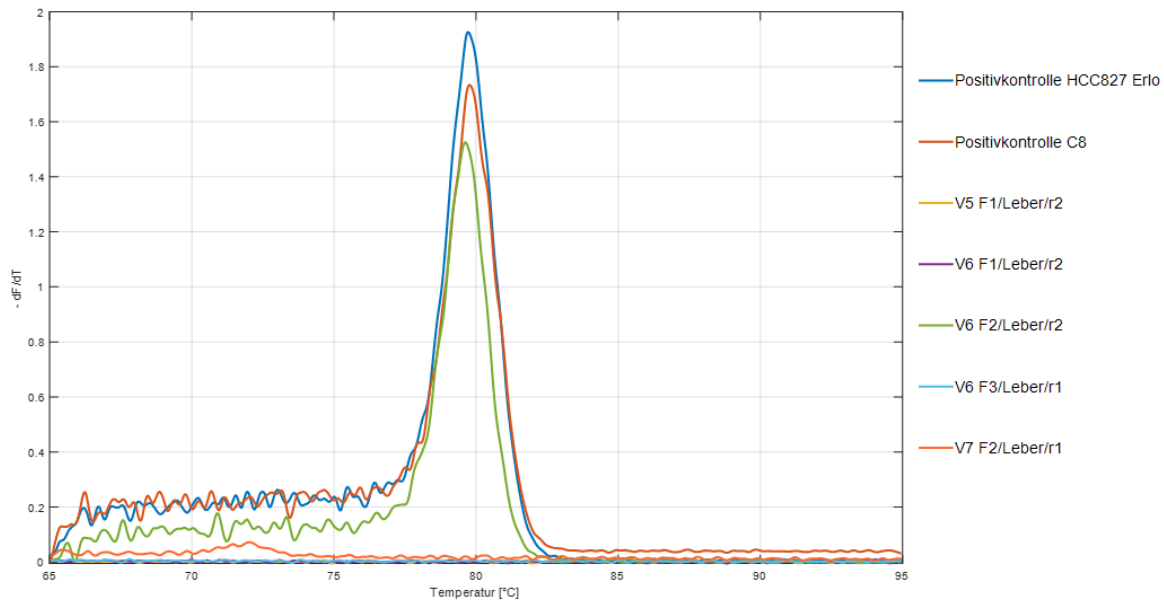


Abbildung 22: Schmelzkurven für PCR-Produkte der DNA-Extrakte aus Lebergewebe von den Föten F1 (Extraktion: V5 und V6), F2 (Extraktion: V6 und V7) und F3 (Extraktion: V6). Primerset 3 (OTX2 1.1), PyroMark PCR Kit MM. Positivkontrollen: HCC827 Erlö, C8. Zwei technische Replikate pro DNA-Extrakt.

Da eine Amplifikation der DNA-Extrakte der Lebergewebe von F1 und F3 nicht möglich war, wurde die PC-Extraktionsmethode um eine Hitzebehandlung, vor Isolierung der DNA, erweitert. Die daraus resultierende Methode, alias „Hot Alkali Extraktion“, wurde angewandt und in weiterer Folge auch modifiziert.

## 5.5. DNA-Extraktion mit der Hot Alkali Methode

Zur DNA-Extraktion für die Variationen V8, V9a und V9b wurden sowohl das Großhirngewebe des EtOH-fixierten Föten ohne ODC (F2), als auch das des FF nicht-ODC-Föten F3 herangezogen. Für V10a, V10b, V11a, V11b und V11c wurde das Leber- und Lungengewebe von F2 verwendet. In der Variation V12 kamen die restlichen Gewebsarten des F2 zum Einsatz, d.h. Milz, Herz, Nabelschnur, Darm, Muskel und Kleinhirn. Im Gegensatz zu V14a, V14b, V14c, V15a und V15b, in welchen ausschließlich das Lungengewebe von F3 herangezogen wurde, wurde bei den Variationen V13a, V13b, V16a, V16b, V17a und V17b sowohl die Lunge, als auch die Leber zur DNA-Extraktion verwendet. Dabei wurden von allen Proben Doppelbestimmungen ( $r1$ ,  $r2$ ) durchgeführt.

Neben den unterschiedlich eingesetzten Gewebsarten wurde zur Extraktionsoptimierung die alkalische Hitzebehandlung, bezüglich Inkubationszeit [min] und Temperatur [°C], modifiziert (V8 - V13b). Um höhere DNA-Konzentrationen aus FF Geweben zu isolieren, wurde die Einwaage der Gewebeproben von 25 mg auf 100 mg erhöht und die Volumina verschiedener Reagenzien (PBS, ATL Puffer, Prot. K und RNaseA) verändert (V13a - V17b). Zudem wurde, ab Variation V14a, der Farbstoff GlycoBlue (Thermo Fisher Scientific) zur besseren Visualisierung der präzipitierten DNA eingesetzt, sowie die Umgebungstemperatur während der Fällung von RT auf - 20 °C (Gefrierschrank) herabgesetzt. Bei den Variationen V17a und V17b wurden die Reagenzien Prot. K und RNaseA eines anderen Herstellers (Macherey-Nagel statt Qiagen) herangezogen. Die Versuchsdurchführungen der Variationen sind im experimentellen Teil der Arbeit (Kap.4.3.4, Kap. 4.3.4.1) beschrieben.

### 5.5.1. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung

Die Ergebnisse der Hot Alkali Extraktionsmethode sind in Tabelle 23 zu sehen. Die mittels Qubit®-Fluorometer ermittelten Konzentrationen lagen generell im Bereich von 0,03 - 23,90 ng/μL. Mit dem NanoDrop Gerät wurden Konzentrationen zwischen 1,25 ng/μL und 514,47 ng/μL ermittelt.

Aufgrund der sehr weichen Gewebscharakteristik des Großhirns (F2 und F3) wurden Probenverluste während des Waschschriffs mit PBS in Variation V8 festgestellt, was sich in den niedrigen DNA-Konzentration der Extrakte des F2 widerspiegelte. Die DNA-Konzentrationen der Großhirnextrakte von Fötus F3 lagen unter der Nachweisgrenze. Durch Eliminierung des Waschvorgangs in V9a konnten für die Extrakte aus den Gehirnen der beiden Föten etwas höhere DNA-Konzentrationen (fluorometrisch) ermittelt werden. Zudem zeigten die erhaltenen Extrakte von Variation V9a, verglichen zu denen von V8, keine schlechteren Reinheitswerte für beide Extinktionsverhältnisse, trotz des fehlenden Waschschriffs in V9a. Da für beide Replikate von V9a (Hitze: 20 min, 99 °C) und V9b (Hitze: 20 min, 120 °C) relativ unterschiedliche Konzentrationen ermittelt wurden, kann keine Aussage über den Effekt einer höher temperierten Hitzebehandlung getroffen werden. In Anbetracht dessen wurden für weitere Modifikationsversuche andere Gewebstypen herangezogen.

Verglichen mit V10a (Hitze: 25 min, 99 °C) erhaltenen DNA-Extrakten wiesen die mit V10b (Hitze: 25 min, 120 °C) gewonnenen Extrakte **V10b** F2/Leber und **V10b** F2/Lunge höhere DNA-Konzentrationen auf. Für beide Variationen (V10a und V10b) lagen die DNA-Konzentrationen der Extrakte aus der Leber des FF Fötus (F3) unter der Nachweisgrenze.

Der Einfluss der Inkubationszeit auf die DNA-Ausbeute wurde mit den Variationen V11a, V11b und V11c (F2/Leber und F2/Lunge) untersucht. Von beiden Gewebstypen wurden mit einer 20-minütigen Hitzeeinwirkung (V11a) die niedrigsten DNA-Ausbeuten erzielt. Die fluorometrisch ermittelte DNA-Konzentration für **V11c** F2/Lunge (Hitze: 40 min, 120 °C) ist mit der von **V10b** F2/Lunge (Hitze: 25 min, 120 °C) vergleichbar. Die ermittelten DNA-Konzentrationen für **V11b** F2/Leber (30 min, 120 °C) und **V11c** F2/Leber (Hitze: 40 min, 120 °C) zeigten, dass mit diesen Variationen geringere Ausbeuten erhalten wurden, verglichen zu den Extrakten von **V10b** F2/Leber (Hitze: 25 min, 120 °C). Aus diesem Grund wurde mit einer Inkubationszeit von 30 min weitergearbeitet.

Des Weiteren wurde mit den verbleibenden Gewebstypen des F2 (Milz, Herz, Darm, Nabelschnur, Muskel und Kleinhirn) eine Hot Alkali Extraktion vorgenommen (V12). Dabei wurden unterschiedliche Mengen an DNA isoliert. Für Herz- und Nabelschnur-Extrakte wurden mit dem Qubit®-Fluorometer die geringsten, nachweisbaren DNA-Konzentrationen ermittelt. Die fluorometrisch gemessenen DNA-Konzentrationen der beiden Replikate des Extrakts aus Kleinhirn lagen unterhalb der Nachweisgrenze. Auch wenn die restlichen Gewebsextrakte etwas höhere DNA-Konzentrationen zwischen 3,44 und 8,96 ng/μL (fluorometrisch) aufwiesen, konnten aus den Gewebstypen Leber und Lunge dennoch deutlich höhere DNA-Konzentrationen isoliert werden, weshalb diese Gewebsarten für nachfolgende Variationen herangezogen wurden.

DNA-Konzentrationen von Extrakten aus FF Proben, welche über der Nachweisgrenze des Qubit® lagen, wurden durch Erhöhung des Gewebseinsatzes von 25 mg auf 100 mg erzielt (V13a und V13b). Infolgedessen wurde für die weiteren Extraktionen des F3 Gewebes ebenso 100 mg Einwaage verwendet (V14 - V17). Beim Vergleich der DNA-Konzentrationen konnte



für **V13a** F3/Leber und **V13a** F3/Lunge (Hitze: 40 min, 100 °C) eine höhere DNA-Ausbeute festgestellt werden, als für **V13b** F3/Leber und **V13b** F3/Lunge (Hitze: 25 min, 120 °C).

Um einem DNA-Verlust beim Waschen des DNA-Pellets mit EtOH entgegenzuwirken, wurde für eine bessere Visualisierung der DNA der GlycoBlue Farbstoff eingesetzt. Mit dessen Hilfe konnten kleinste Pellets sichtbar gemacht werden, wodurch die DNA nicht versehentlich zusammen mit der EtOH-Lösung entnommen und verworfen wurde. Dadurch konnte beispielsweise beim Extrakt des FF Lungengewebes (F3) mit nur 25 mg Einwaage eine DNA-Konzentrationen über der Nachweisgrenze des Qubit®-Fluorometers erzielt werden (V14a). Aus diesem Grund fand der DNA-Carrier in allen weiteren Variationen Anwendung (V14a - V17b).

Durch den Vergleich der fluorometrisch ermittelten Konzentrationen der DNA-Extrakte von V14b (normale Reagenzvolumina) mit V14c (4-fach upgescalte Reagenzvolumina), wurde festgestellt, dass der Einsatz größerer Volumina zu geringeren DNA-Mengen führte. Diese Beobachtung wurde mit weiteren Variationen bestätigt. So wurden ebenfalls geringere DNA-Konzentrationen für **V15a** F3/Lunge und **V15b** F3/Lunge (4-fach upgescalte Reagenzvolumina), verglichen zu **V14b** F3/Lunge (normale Reagenzvolumina), ermittelt.

DNA-Extrakte, die mit der Variation V15b erhalten wurden, bei der die Umgebungstemperatur während der DNA-Präzipitation - 20 °C betrug, wiesen eine höhere DNA-Konzentration im Vergleich zu den Extrakten von V15a (Fällung bei RT) auf.

Aus den Ergebnissen, die mit den Variationen V16a (normale Reagenzvolumina), V16b (upgescalte Reagenzvolumina), V17a (normale Reagenzvolumina) und V17b (upgescalte Reagenzvolumina) erhalten wurden, kann geschlossen werden, dass das Upscalen der Reagenzvolumina die Ausbeute an isolierter DNA nicht verbesserte.

Zusammenfassend haben die Variationen V14 bis V17 gezeigt, dass die Erhöhung der Volumina sogar zu einer Verschlechterung der DNA-Ausbeute führte. Zudem konnten die höchsten DNA-Konzentrationen aus dem Leber- und Lungengewebe des EtOH-fixierten Föten F2 mit Konzentrationen von 8,17 - 23,9 ng/µL (fluorometrische Messung) gewonnen werden. Mit Hilfe der Variationen V14b und V17a konnten für die FF Leber- und Lungengewebe die höchsten DNA-Konzentrationen erzielt werden (4,4 - 6,84 ng/µL, fluorometrisch). Eine mögliche Ursache für den Konzentrationsunterschied zwischen den Replikaten einer Doppelbestimmung sind Unterschiede bei der Durchführung der Phasentrennung.

Beinahe alle DNA-Extrakte wiesen eine leichte Proteinverunreinigung auf ( $E_{260}/E_{280} < 1,8 - 2,0$ ). Ein Grund hierfür sind sicherlich Proteine, welche bei Abtrennung der wässrigen Phase von der Interphase mit pipettiert wurden. Das  $E_{260}/E_{230}$ -Verhältnis fiel bei vielen DNA-Extrakten mit Werten bis zu 0,4 sehr niedrig aus, wodurch eine starke Verunreinigung mit organischen Substanzen aufgezeigt wird. Lediglich die DNA-Extrakte **V12** F2/Milz, **V12** F2/Herz und **V14c** F3/Lunge zeigten für jeweils ein Replikat gute Reinheitswerte.

Tabelle 23: Ergebnisse der Hot Alkali – Extraktionsmethode in Bezug auf Konzentration und Reinheit.

| Abkürzung der Variation | Fötus/<br>Gewebstyp/<br>Replikat | Zusätzliche<br>Informationen   | Einwaage<br>[mg] | c(DNA) gemäß<br>Qubit®-<br>Fluorometer<br>[ng/uL] | c(DNA)<br>gemäß<br>NanoDrop<br>[ng/uL] | $\frac{E_{260}}{E_{280}}$ | $\frac{E_{260}}{E_{230}}$ |
|-------------------------|----------------------------------|--|------------------|---|--|---------------------------|---------------------------|
| <b>V8</b>               | F2/ Großhirn /r1                 | Normaler<br>Waschschrift,<br>normale Reagenz-<br>Volumina,<br>Hitze: 20min, 99°C     | 25,1             | < LOD*  | 5,65                                   | 1,7                       | 0,9                       |
|                         | F2/ Großhirn /r2                 |  | 25,6             | 0,28  | 13,80                                  | 1,4                       | 0,8                       |
|                         | F3/ Großhirn /r1                 |  | 25,2             | < LOD*  | 7,40                                   | 1,3                       | 1,0                       |
|                         | F3/ Großhirn /r2                 |  | 25,2             | < LOD*  | 17,20                                  | 1,3                       | 1,0                       |
| <b>V9a</b>              | F2/ Großhirn /r1                 | Kein Waschschrift,<br>normale Reagenz-<br>Volumina,<br>Hitze: 20min, 99°C            | 25,3             | 2,04  | 38,05                                  | 1,6                       | 1,4                       |
|                         | F2/ Großhirn /r2                 |  | 25,8             | 0,04  | 11,50                                  | 1,6                       | 0,8                       |
|                         | F3/ Großhirn /r1                 |  | 25,5             | 0,09  | 24,70                                  | 1,4                       | 1,1                       |
|                         | F3/ Großhirn /r2                 |  | 25,2             | 0,17  | 27,60                                  | 1,4                       | 1,2                       |
| <b>V9b</b>              | F2/ Großhirn /r1                 | Kein Waschschrift,<br>normale Reagenz-<br>Volumina,<br>Hitze: 20min,<br>120°C        | 25,3             | 1,09  | 25,75                                  | 1,6                       | 1,3                       |
|                         | F2/ Großhirn /r2                 |  | 25,7             | 0,42  | 9,83                                   | 1,7                       | 2,5                       |
|                         | F3/ Großhirn /r1                 |  | 25,2             | < LOD*  | 14,50                                  | 1,4                       | 0,9                       |
|                         | F3/ Großhirn /r2                 |  | 25,7             | < LOD*  | 12,43                                  | 1,5                       | 1,1                       |
| <b>V10a</b>             | F2/Leber/r1                      | Normaler<br>Waschschrift,<br>normale Reagenz-<br>Volumina,<br>Hitze: 25min, 99°C     | 25,4             | 21,4  | 475,80                                 | 1,6                       | 1,1                       |
|                         | F2/Leber/r2                      |  | 25,1             | 20,2  | 460,55                                 | 1,6                       | 1,0                       |
|                         | F3/Leber/r1                      |  | 25,4             | < LOD*  | 11,40                                  | 1,5                       | 1,3                       |
|                         | F3/Leber/r2                      |  | 25,6             | < LOD*  | 9,70                                   | 1,6                       | 0,8                       |
|                         | F2/Lunge/r1                      |  | 25,4             | 12,20   | 180,45                                 | 1,7                       | 1,4                       |
|                         | F2/Lunge/r2                      |  | 25,3             | 16,00   | 257,50                                 | 1,7                       | 1,4                       |
| <b>V10b</b>             | F2/Leber/r1                      | Normaler<br>Waschschrift,<br>normale Reagenz-<br>Volumina,<br>Hitze: 25min,<br>120°C | 25,9             | 23,10   | 493,75                                 | 1,6                       | 1,1                       |
|                         | F2/Leber/r2                      |  | 25,3             | 23,90   | 483,45                                 | 1,7                       | 1,2                       |
|                         | F3/Leber/r1                      |  | 25,8             | < LOD*  | 21,00                                  | 1,5                       | 0,8                       |
|                         | F3/Leber/r2                      |  | 25,9             | < LOD*  | 5,80                                   | 2,1                       | 0,6                       |
|                         | F2/Lunge/r1                      |  | 25,6             | 20,10   | 316,43                                 | 1,7                       | 1,4                       |
|                         | F2/Lunge/r2                      |  | 25,8             | 18,10   | 267,85                                 | 1,7                       | 1,4                       |
| <b>V11a</b>             | F2/Leber/r1                      | Normaler<br>Waschschrift,  | 25,6             | 12,40   | 286,15                                 | 1,6                       | 1,0                       |

|             |                   |   |       |        |        |     |      |
|-------------|-------------------|---|-------|--------|--------|-----|------|
|             | F2/Leber/r2       | normale Reagenz-Volumina,<br>Hitze:<br>20min, 120°C   | 25,5  | 13,40  | 354,13 | 1,6 | 0,9  |
|             | F2/Lunge/r1       |   | 25,7  | 11,00  | 175,15 | 1,7 | 1,2  |
|             | F2/Lunge/r2       |   | 25,7  | 12,70  | 238,35 | 1,7 | 1,3  |
| <b>V11b</b> | F2/Leber/r1       | Normaler<br>Waschschrift,<br>normale Reagenz-Volumina,<br>Hitze:<br>30min, 120°C  | 25,5  | 18,10  | 517,47 | 1,6 | 1,0  |
|             | F2/Leber/r2       |   | 25,5  | 8,17   | 238,35 | 1,6 | 0,9  |
|             | F2/Lunge/r1       |   | 25,1  | 17,60  | 361,60 | 1,7 | 1,3  |
|             | F2/Lunge/r2       |   | 25,6  | 13,60  | 233,80 | 1,7 | 1,4  |
| <b>V11c</b> | F2/Leber/r1       | Normaler<br>Waschschrift,<br>normale Reagenz-Volumina,<br>Hitze:<br>40min, 120°C  | 25,3  | 16,10  | 380,85 | 1,6 | 1,0  |
|             | F2/Leber/r2       |   | 25,6  | 14,90  | 364,57 | 1,6 | 1,0  |
|             | F2/Lunge/r1       |   | 25,5  | 21,70  | 402,00 | 1,7 | 1,4  |
|             | F2/Lunge/r2       |   | 25,4  | 19,30  | 350,35 | 1,7 | 1,3  |
| <b>V12</b>  | F2/Milz/r1        | Normaler<br>Waschschrift,<br>normale Reagenz-Volumina,<br>Hitze: 30min,<br>100°C  | 25,9  | 3,44   | 45,43  | 1,8 | 2,0  |
|             | F2/Milz/r2        |   | 25,5  | 3,54   | 50,75  | 1,7 | 1,6  |
|             | F2/Herz/r1        |   | 25,1  | 0,03   | 6,75   | 1,8 | 1,0  |
|             | F2/Herz/r2        |   | 25,2  | 0,36   | 14,85  | 1,7 | 1,1  |
|             | F2/Nabelschnur/r1 |   | 25,7  | 0,16   | 24,55  | 1,5 | 0,6  |
|             | F2/Nabelschnur/r2 |   | 25,9  | 0,26   | 29,15  | 1,5 | 0,4  |
|             | F2/Darm/r1        |   | 25,3  | 5,37   | 76,45  | 1,7 | 1,4  |
|             | F2/Darm/r2        |   | 25,6  | 8,96   | 114,30 | 1,7 | 1,4  |
|             | F2/Muskel/r1      |   | 25,1  | 4,02   | 83,30  | 1,6 | 1,0  |
|             | F2/Muskel/r2      |   | 25,0  | 4,90   | 131,50 | 1,6 | 0,9  |
|             | F2/Kleinhirn/r1   |   | 25,1  | < LOD* | 3,25   | 2,6 | 0,3  |
|             | F2/Kleinhirn/r2   |   | 25,6  | < LOD* | 1,25   | 4,6 | -1,7 |
| <b>V13a</b> | F3/Leber/r1       | 100mg Gewebe,<br>Waschschrift mit<br>160µL PBS,<br>normale Reagenz-Volumina, keine<br>Umkehrung der<br>Formaldehyd-<br>Modifikationen,<br>Hitze: 40min,<br>100°C, extra<br>Waschschrift | 100,6 | 3,04   | 89,30  | 1,5 | 1,5  |
|             | F3/Leber/r2       |   | 100,8 | 1,86   | 67,40  | 1,5 | 1,7  |
|             | F3/Lunge/r1       |   | 100,7 | 7,52   | 183,05 | 1,5 | 1,5  |
|             | F3/Lunge/r2       |   | 100,0 | 8,96   | 201,35 | 1,6 | 1,8  |

|             |             |  |       |      |        |     |     |
|-------------|-------------|--|-------|------|--------|-----|-----|
| <b>V13b</b> | F3/Leber/r1 | 100mg Gewebe, Waschschrift mit 160µL PBS, normale Reagenz-Volumina, keine Umkehrung der Formaldehyd-Modifikationen, Hitze: 25min, 120°C, extra Waschschrift  | 100,1 | 1,53 | 53,90  | 1,5 | 1,3 |
|             | F3/Leber/r2 |  | 100,6 | 0,81 | 33,30  | 1,6 | 1,8 |
|             | F3/Lunge/r1 |  | 100,5 | 2,89 | 92,65  | 1,5 | 1,4 |
|             | F3/Lunge/r2 |  | 100,0 | 3,78 | 118,75 | 1,5 | 1,3 |
| <b>V14a</b> | F3/Lunge/r1 | Normaler Waschschrift, normale Reagenz-Volumina, keine Umkehrung der Formaldehyd-Modifikationen, Hitze: 30min, 100°C, extra Waschschrift & GlycoBlue   | 25,5  | 0,04 | 29,95  | 1,7 | 0,7 |
|             | F3/Lunge/r2 |  | 25,1  | 0,05 | 32,40  | 1,7 | 0,7 |
| <b>V14b</b> | F3/Lunge/r1 | 100mg Gewebe, Waschschrift mit 160µL PBS, normale Reagenz-Volumina, keine Umkehrung der Formaldehyd-Modifikationen, Hitze: 30min, 100°C, extra Waschschrift & GlycoBlue                                      | 100,4 | 4,40 | 244,10 | 1,5 | 1,6 |
|             | F3/Lunge/r2 |  | 100,0 | 5,04 | 217,20 | 1,6 | 1,7 |
| <b>V14c</b> | F3/Lunge/r1 | 100mg Gewebe, Waschschrift mit 320µL PBS, erhöhte Reagenz-Volumina (720µL ATL, 80µL Prot.K, 8µL RNaseA), keine Umkehrung der Formaldehyd-Modifikationen, Hitze: 30min, 100°C, extra Waschschrift & GlycoBlue | 100,0 | 0,20 | 7,70   | 2,0 | 0,8 |
|             | F3/Lunge/r2 |  | 100,1 | 0,94 | 27,80  | 1,6 | 1,2 |
| <b>V15a</b> | F3/Lunge/r1 | 100mg Gewebe, Waschschrift mit 320µl PBS, erhöhte Reagenz-Volumina (360µL ATL, 80µL Prot.K, 8µL RNaseA), keine Umkehrung der Formaldehyd-Modifikationen,   | 100,7 | 0,40 | 21,00  | 1,7 | 1,0 |
|             | F3/Lunge/r2 |  | 100,1 | 1,96 | 58,50  | 1,6 | 1,1 |

|             |             |   |       |      |        |     |     |
|-------------|-------------|---|-------|------|--------|-----|-----|
|             |             | Hitze: 30min,<br>100°C,<br>extra Waschschrift<br>& GlycoBlue,<br>Fällung bei RT   |       |      |        |     |     |
| <b>V15b</b> | F3/Lunge/r1 | 100mg Gewebe,<br>Waschschrift mit<br>320µL PBS,<br>erhöhte Reagenz-<br>Volumina (360µL<br>ATL, 80µL Prot.K,<br>8µL RNaseA),<br>keine Umkehrung<br>der Formaldehyd-<br>Modifikationen,<br>Hitze: 30min,<br>100°C, extra<br>Waschschrift &<br>GlycoBlue,<br>Fällung bei -20°C | 100,5 | 0,64 | 28,25  | 1,5 | 0,8 |
|             | F3/Lunge/r2 |   | 100,6 | 3,09 | 73,05  | 1,6 | 1,3 |
| <b>V16a</b> | F3/Leber/r1 | 100mg Gewebe,<br>Waschschrift mit<br>160µL PBS,<br>normale Reagenz-<br>Volumina, keine<br>Umkehrung der<br>Formaldehyd-<br>Modifikationen,<br>Hitze: 30min,<br>100°C,<br>extra Waschschrift<br>& GlycoBlue,<br>Fällung bei -20°C  | 100,6 | 3,36 | 179,47 | 1,6 | 1,6 |
|             | F3/Leber/r2 |   | 100,9 | 2,96 | 177,45 | 1,6 | 1,6 |
|             | F3/Lunge/r1 |   | 100,0 | 5,44 | 357,65 | 1,6 | 1,9 |
|             | F3/Lunge/r2 |   | 100,8 | 3,50 | 245,75 | 1,5 | 1,6 |
| <b>V16b</b> | F3/Leber/r1 | 100mg Gewebe,<br>Waschschrift mit<br>160µL PBS,<br>erhöhte Reagenz-<br>Volumina (80µL<br>Prot.K, 8µL<br>RNaseA), keine<br>Umkehrung der<br>Formaldehyd-<br>Modifikationen,<br>Hitze: 30min,<br>100°C,<br>extra Waschschrift<br>& GlycoBlue,<br>Fällung bei -20°C            | 100,2 | 0,94 | 72,85  | 1,6 | 1,0 |
|             | F3/Leber/r2 |   | 100,3 | 1,69 | 82,05  | 1,6 | 1,2 |
|             | F3/Lunge/r1 |   | 100,0 | 2,47 | 151,40 | 1,5 | 1,2 |
|             | F3/Lunge/r2 |   | 100,1 | 2,70 | 153,70 | 1,5 | 1,3 |
| <b>V17a</b> | F3/Leber/r1 | 100mg Gewebe,<br>Waschschrift mit<br>160µL PBS,<br>normale Reagenz-<br>Volumina + andere<br>Hersteller, keine<br>Umkehrung der<br>Formaldehyd-<br>Modifikationen,   | 100,9 | 6,12 | 263,17 | 1,6 | 1,8 |
|             | F3/Leber/r2 |   | 100,4 | 4,60 | 202,85 | 1,6 | 1,7 |
|             | F3/Lunge/r1 |   | 100,7 | 5,48 | 356,40 | 1,6 | 1,7 |

|             |             |  |       |      |        |     |     |
|-------------|-------------|--|-------|------|--------|-----|-----|
|             | F3/Lunge/r2 | Hitze: 30min,<br>100°C, extra<br>Waschschritt &<br>GlycoBlue,<br>Fällung bei -20°C   | 100,2 | 6,84 | 434,85 | 1,6 | 1,9 |
| <b>V17b</b> | F3/Leber/r1 | 100mg Gewebe,<br>Waschschritt mit<br>160µL PBS, nur<br>erhöhtes Reagenz-<br>Volumen von<br>Prot.K (80µL) +<br>anderer Hersteller<br>(auch RNaseA),<br>keine Umkehrung<br>der Formaldehyd-<br>Modifikationen,<br>Hitze: 30min,<br>100°C,<br>extra Waschschritt<br>& GlycoBlue,<br>Fällung bei -20°C | 100,0 | 2,87 | 104,60 | 1,5 | 1,2 |
|             | F3/Leber/r2 |  | 100,6 | 2,63 | 100,35 | 1,6 | 1,1 |
|             | F3/Lunge/r1 |  | 100,9 | 3,68 | 185,45 | 1,5 | 1,3 |
|             | F3/Lunge/r2 |  | 100,8 | 3,70 | 160,90 | 1,5 | 1,4 |

\* LOD: Nachweisgrenze

### 5.5.2. Überprüfung der Amplifizierbarkeit

Jeder DNA-Extrakt, welcher mittels Hot Alkali Extraktion gewonnen werden konnte und eine fluorometrisch ermittelte Konzentration über der Nachweisgrenze lieferte, wurde auf Amplifizierbarkeit mittels PCR überprüft. Dazu wurde der PyroMark PCR Kit MM in Verbindung mit den Primerpaaren aus Set 1 (PAX9 4.0), 2 (SHH 2.0) und 3 (OTX2 1.1) verwendet.

Zunächst erfolgte die Amplifizierbarkeitsprüfung von verschiedenen DNA-Extrakten des Föten F2 der Variationen V8, V9a, V9b, V10a, V10b, V11a, V11b, V11c und V12. Die erhaltenen Amplifikationskurven in Abbildung 23 zeigten für die meisten DNA-Extrakte einen Fluoreszenzanstieg mit einem höheren  $C_t$ -Wert im Vergleich zu den  $C_t$ -Werten beider Positivkontrollen. Lediglich für **V12** F2/Herz und **V12** F2/Nabelschnur konnte kein Anstieg des Fluoreszenzsignals detektiert werden.

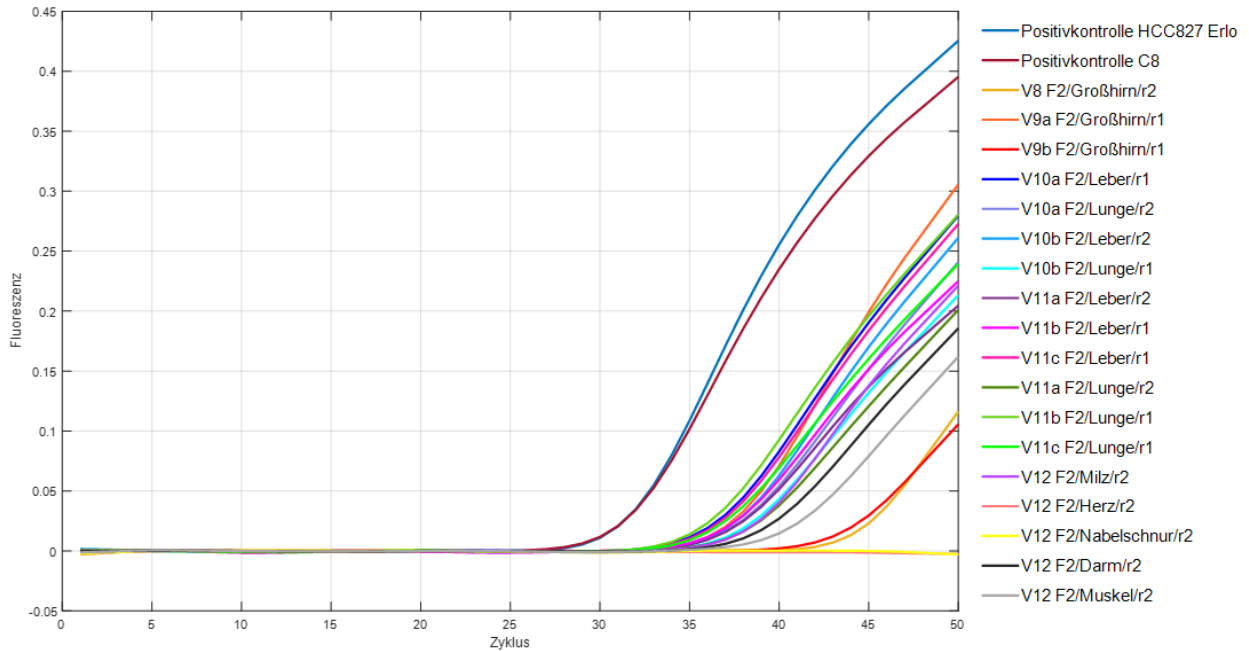


Abbildung 23: Amplifikationskurven für DNA-Extrakte aus Großhirn-, Leber-, Lungen-, Milz-, Herz-, Nabelschnur-, Darm- und Muskelgewebe von Fötus F2 (Extraktion: V8, V9a, V9b, V10a, V10b, V11a, V11b, V11c, V12). Primerset 3 (OTX2 1.1), PyroMark PCR Kit MM. Positivkontrollen: HCC827 Erlo, C8. Zwei technische Replikate pro DNA-Extrakt.

Die PCR-Produkte von **V8** F2/Großhirn, **V9a** F2/Großhirn, **V10a** F2/Leber, **V10a** F2/Lunge, **V10b** F2/Leber, **V10b** F2/Lunge, **V11a** F2/Lunge, **V11b** F2/Lunge, **V11c** F2/Leber und **V11c** F2/Lunge hatten die selbe Schmelztemperatur wie die Positivkontrollen ( $T_m = 79,8^\circ\text{C}$ , Abb. 24). Zudem wurden auch Peakmaxima beobachtet, welche zu niedrigen Temperaturen ( $T_m = 74,0 - 78,1^\circ\text{C}$ ) verschoben waren. Diese stammten von den PCR-Produkten der Extrakte **V9b** F2/Großhirn, **V12** F2/Darm, **V12** F2/Muskel und **V11a** F2/Lunge, wobei Letzteres auch einen zweiten Schmelzpeak bei korrekter Temperatur von  $79,8^\circ\text{C}$  aufwies. Die Peakmaxima der PCR-Produkte von **V11a** F2/ Leber, **V11b** F2/Leber und **V12** F2/Milz waren hingegen zu höheren Temperaturen verschoben ( $T_m = 81,6^\circ\text{C}$ ).

Zur Überprüfung der Länge der erhaltenen PCR-Produkte wurden diese auf ein 3% (w/v) Agarosegel aufgegeben. Auf dem Gel (Kap. 5.2.2, Abb. 18, Lane: 14, 16, 17) ist zu erkennen, dass von allen PCR-Produkten, die für Extrakte aus Großhirn erhalten wurden (V8, V9a und V9b), lediglich das von V9a die richtige Länge (89 bp) aufwies. Bei V8 und V9b waren nur unspezifische Produkte zwischen 40 bp und 70 bp auszumachen. Beim PCR-Produkt des Extrakts **V11a** F2/Lunge waren, wie vom Schmelzdiagramm (Abb. 24) zu erwarten, zwei Banden mit Basenlängen von 45 bp (unspezifisches Produkt) und 89 bp (gewünschtes Produkt) sichtbar (Kap. 5.2.2, Abb. 18, Lane: 6). Die Ergebnisse der beiden Methoden (Agarose-Gelelektrophorese und HRM) lassen darauf schließen, dass für **V10a** F2/Leber, **V10a** F2/Lunge, **V10b** F2/Leber, **V10b** F2/Lunge (Kap. 5.1, Abb. 15, Lanes: 19, 21, 22, 24), **V11c** F2/Leber, **V11c** F2/Lunge und **V11b** F2/Lunge (Kap. 5.2.2, Abb. 18, Lanes: 5, 7, 8) nur das richtige PCR-Produkt mit einer Länge von 89 bp gebildet wurde.

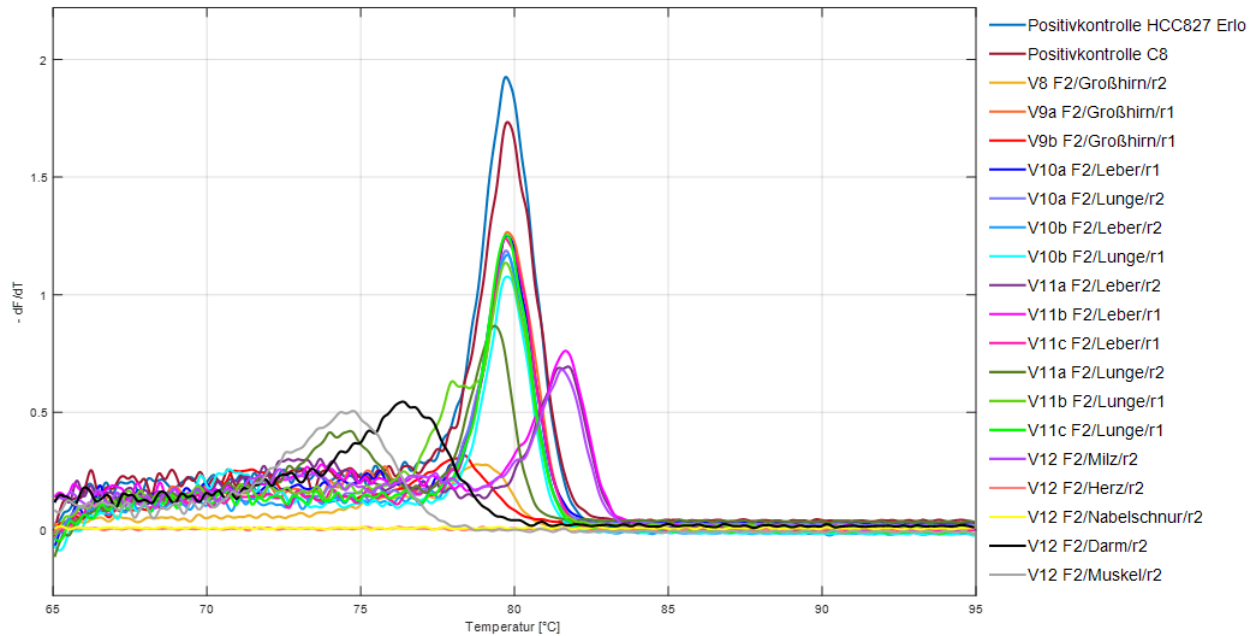


Abbildung 24: Schmelzkurven für PCR-Produkte der DNA-Extrakte aus Großhirn-, Leber-, Lungen-, Milz-, Herz-, Nabelschnur-, Darm- und Muskelgewebe von Fötus F2 (Extraktion: V8, V9a, V9b, V10a, V10b, V11a, V11b, V11c, V12). Primerset 3 (OTX2 1.1), PyroMark PCR Kit MM. Positivkontrollen: HCC827 Erlo, C8. Zwei technische Replikate pro DNA-Extrakt.

Um die Eignung verschiedener Primersets auf die extrahierten DNA-Proben auszutesten, wurden die Extrakte aller Gewebstypen von Variation V12 (Milz, Herz, Nabelschnur, Darm, Muskel) einer PCR-Analyse mit Primerset 1 (PAX9 4.0), 2 (SHH 2.0) und 3 (OTX2 1.1) unterzogen (Kap. 4.5.1, Tab. 7). Zum Vergleich der Amplifizierbarkeit sind alle erhaltenen Amplifikationskurven in Abbildung 25 dargestellt.

Mit dem Primerpaar PAX9 4.0 führten alle Extrakte (aus Milz, Herz, Nabelschnur, Darm und Muskel) zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals. Außerdem wurden mit diesem Primerset (1) die niedrigsten  $C_T$ -Werte ermittelt. Durch den Einsatz der Primerpaare SHH 2.0 und OTX2 1.1 resultierten nur die Extrakte aus Milz, Darm und Muskel in einem Signalanstieg. Bei den DNA-Extrakten aus Herz und Nabelschnur kam es nur mit dem Primerset 1 zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals.



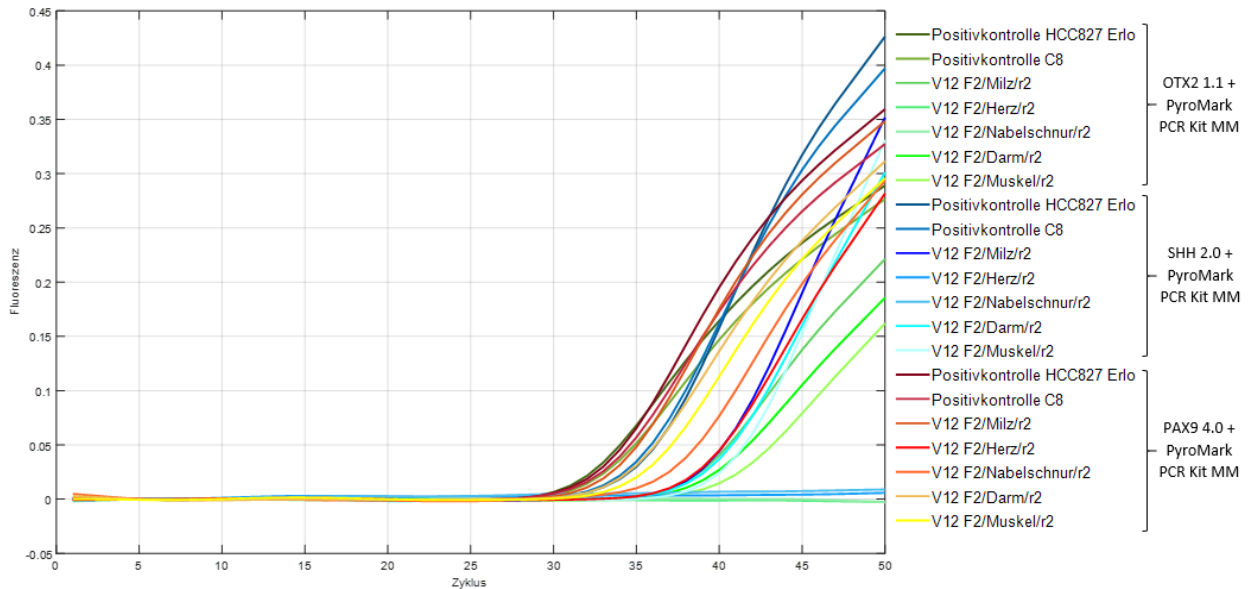


Abbildung 25: Amplifikationskurven für DNA-Extrakte aus Milz-, Herz-, Nabelschnur-, Darm- und Muskelgewebe von Fötus F2 (Extraktion: V12). Primersets: 1 (PAX9 4.0), 2 (SHH 2.0) und 3 (OTX2 1.1); PyroMark PCR Kit MM. Positivkontrollen: HCC827 Erlo, C8. Zwei technische Replikate pro DNA-Extrakt.

Mittels HRM konnten die erhaltenen PCR-Produkte weiter untersucht werden (Abb. 26). Von den mit dem Primerpaar OTX2 1.1 gebildeten Produkten wies nur **V12** F2/Milz ein identisches Schmelzverhalten, verglichen zu den Positivkontrollen ( $T_m = 81,6 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) auf. Aus den in Abbildung 26 gezeigten Schmelzkurven kann geschlossen werden, dass es sich bei den PCR-Produkten, die für Darm- und Muskelgewebe erhalten wurden, um unspezifische Produkte gehandelt hat ( $T_{m(\text{Muskel})} = 74,6 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $T_{m(\text{Darm})} = 76,4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Für **V12** F2/Herz und **V12** F2/Nabelschnur wurde kein Anstieg des Fluoreszenzsignals beobachtet. PCR-Produkte, die mit Primerpaar SHH 2.0 für Milz- und Darmgewebe erhalten wurden, zeigten geringfügig zu tieferen Temperaturen verschobene Peakmaxima ( $T_m = 90,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) im Vergleich zu den Kontrollen ( $T_m = 91,3 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Beim Amplikon des Muskelextrakts kam es zu einer stärkeren Verschiebung des Peakmaximums zu niedrigerer Temperatur von  $88,7 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Mit dem Primerset 1 (PAX9 4.0) wurde für fast alle PCR-Produkte der DNA-Extrakte (Milz, Nabelschnur, Darm, Muskel) die richtige Schmelztemperatur ermittelt. Lediglich das Amplikon von **V12** F2/Herz zeigte eine leichte Verschiebung des Peakmaximums zu niedrigeren Temperaturen ( $T_m = 87,6 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ), verglichen zu den Positivkontrollen ( $T_m = 88,4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

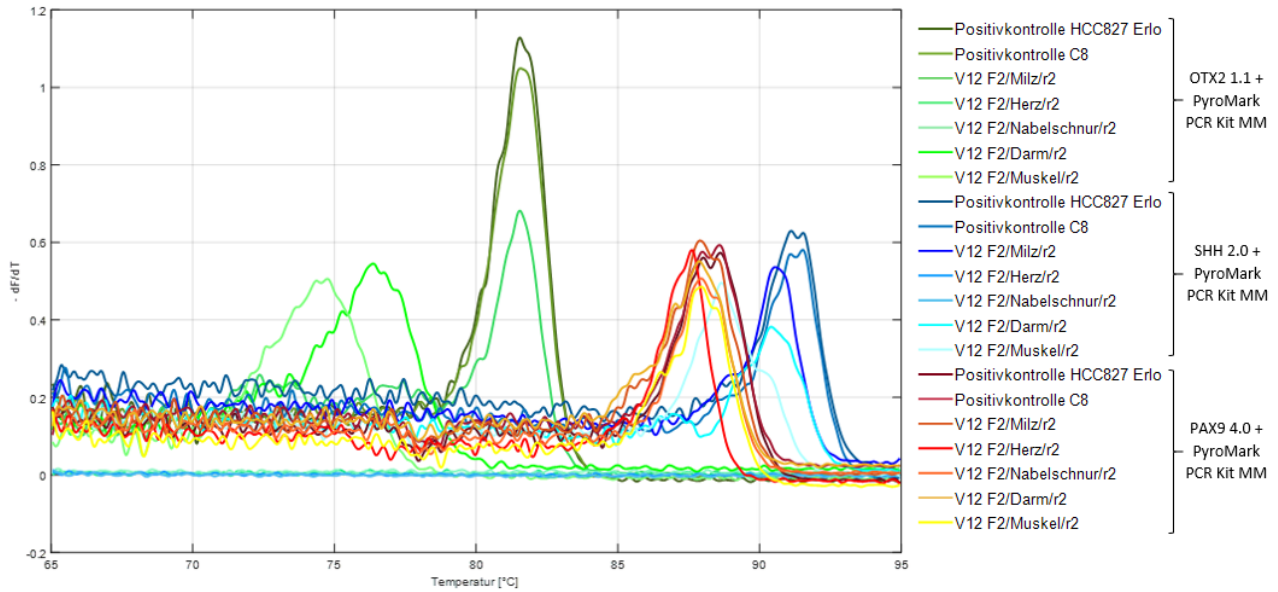


Abbildung 26: Schmelzkurven der PCR-Produkte für DNA-Extrakte aus Milz-, Herz-, Nabelschnur-, Darm- und Muskelgewebe von Fötus F2 (Extraktion: V12). Primersets: 1 (PAX9 4.0), 2 (SHH 2.0) und 3 (OTX2 1.1); PyroMark PCR Kit MM. Positivkontrollen: HCC827 Erlo, C8. Zwei technische Replikate pro DNA-Extrakt.

Auf dem Gel in Abbildung 27 wurde für PCR-Produkte, die mit dem Primerpaar OTX2 1.1 für **V12 F2 /Milz/r2** erhalten wurden, zusätzlich zu einer Bande, die dem gewünschten Produkt entsprach, eine Schliere im Bereich von 40 - 50 bp (Lanes: 4, 5) erhalten, weshalb dieses Primerpaar nicht mehr verwendet wurde. Die mit den Primerpaaren PAX9 4.0 und SHH 2.0 erhaltenen PCR-Produkte wiesen die richtige Länge auf (Lanes<sub>(SHH 2.0)</sub>: 11 - 15; Lanes<sub>(PAX9 4.0)</sub>: 19 - 28). Deshalb wurden diese Primerpaare für weitere PCR-Analysen herangezogen.

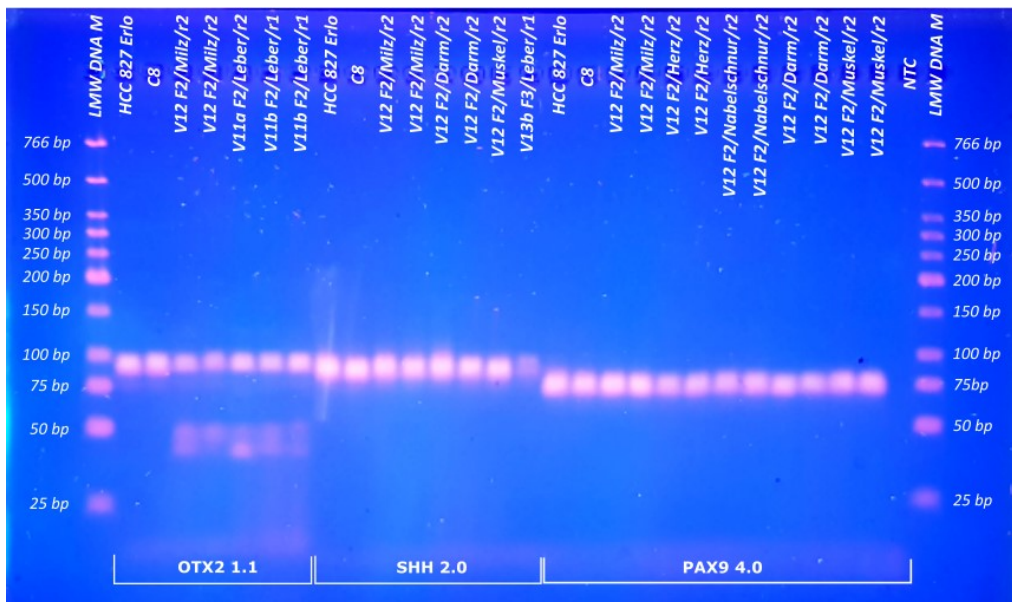


Abbildung 27: Aufnahme eines 3% (w/v) Agarosegels unter UV Licht. Aufgetragen wurden amplifizierbare DNA-Extrakte aus Leber-, Milz-, Herz-, Nabelschnur-, Darm- und Muskelgewebe von Fötus F2 (Extraktion: V11a, V11b, V12) und F3 (Extraktion: V13b). Primersets: 1 (PAX9 4.0), 2 (SHH 2.0) und 3 (OTX2 1.1), PyroMark PCR Kit MM. Positivkontrollen: PCR-Produkt von HCC827 Erlo und C8. Marker: LMW DNA Marker.

Die Ergebnisse der PCR-HRM Analyse der aus FF Gewebe isolierten DNA sind in Abbildung 28 dargestellt. Da für **V9a** F3/Großhirn, **V13a** F3/Leber, **V13a** F3/Lunge, **V13b** F3/Leber und **V13b** F2/Lunge mit dem Primerpaar OTX2 1.1 kein Fluoreszenzanstieg beobachtet wurde, wurden in den folgenden Versuchen die Primerpaare PAX9 4.0 und SHH 2.0 verwendet. Mit dem SHH 2.0 Primerpaar wurde für **V13b** F3/Leber und **V14a** F3/Lunge ein Fluoreszenzanstieg beobachtet, jedoch deutlich später als bei den Positivkontrollen. Aus der Schmelztemperatur konnte geschlossen werden, dass es sich in beiden Fällen um das richtige Produkt gehandelt hat. Das Primerpaar PAX9 4.0 führte für **V16b** F3/Leber zu einem Fluoreszenzanstieg, nicht viel später als bei den Positivkontrollen.

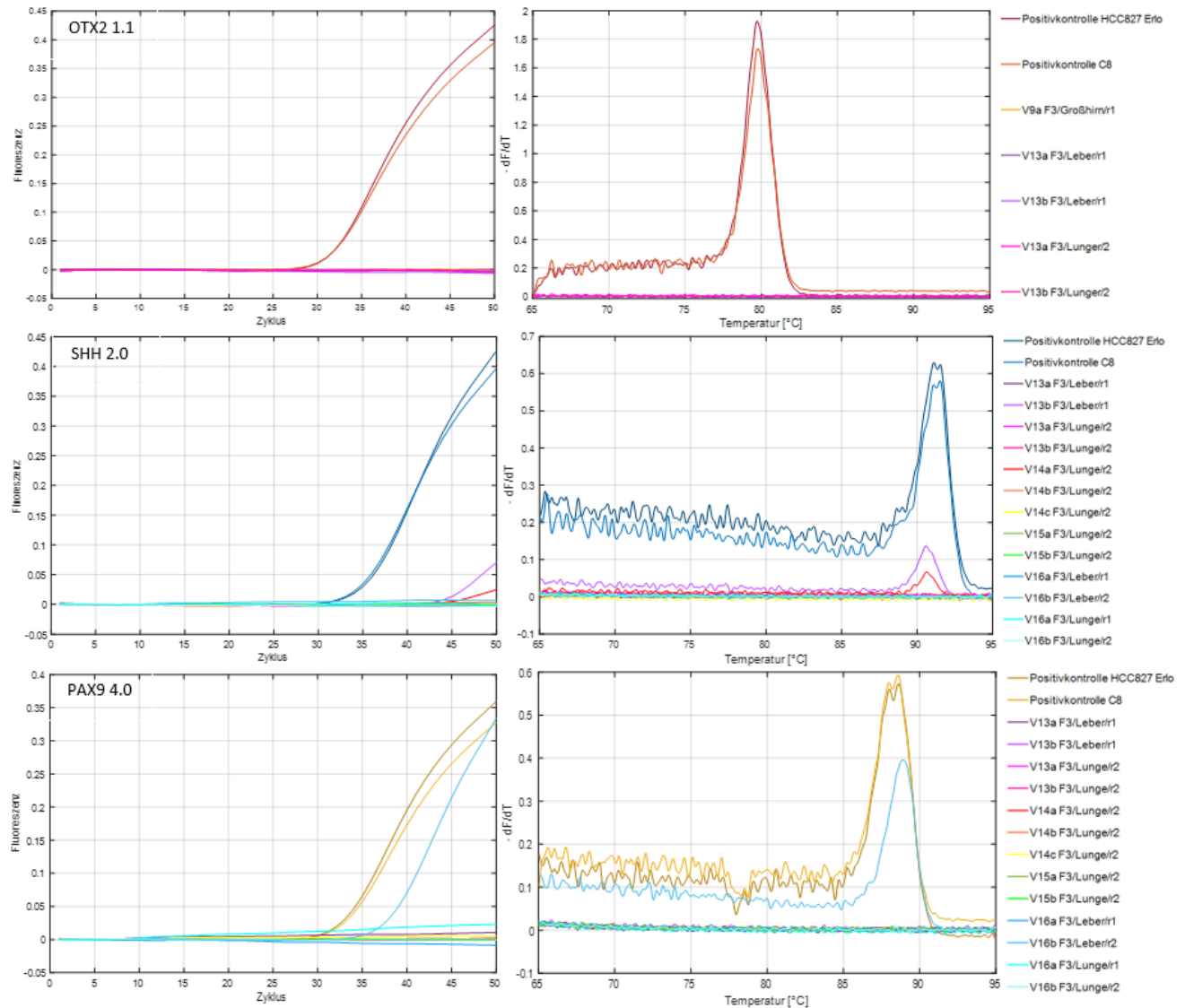


Abbildung 28: Amplifikations- (links) und Schmelzkurven (rechts) der PCR-Produkte für DNA-Extrakte aus Großhirn-, Leber-, Lungengewebe von Fötus F3 (Extraktion: V9a, V13a, V13b, V14a, V14b, V14c, V15a, V15b, V16a, V16b). Primersets: 1 (PAX9 4.0), 2 (SHH 2.0) und 3 (OTX2 1.1), PyroMark PCR Kit MM. Positivkontrollen: HCC827 Erlo, C8. Zwei technische Replikate pro DNA-Extrakt.

## 5.6. Versuche zur Verbesserung der Amplifizierbarkeit

Die schlechte Amplifizierbarkeit der DNA-Extrakte kann auf verschiedene Ursachen zurückgeführt werden. Zum einen könnte es an der Fragmentierung der DNA liegen und zum anderen an der Anwesenheit Polymerase-hemmender Substanzen. Die Qualität der angewandten PCR-Methode ist auch ein wichtiger Faktor für eine funktionierende PCR-Analyse.

Um Herauszufinden, weshalb viele DNA-Extrakte nicht amplifiziert werden konnten, wurden unterschiedliche Versuche durchgeführt. Zunächst wurde der Einfluss der Konzentration der RNaseA, der Primer und des  $MgCl_2$ -Zusatzes auf die Amplifizierbarkeit von DNA-Extrakten der Positivkontrolle HCC827 Erlo ausgetestet. Danach wurde die Integrität der isolierten DNA, die zu keinem Fluoreszenzanstieg führte, mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft und anschließend die Extrakte auf Polymerase-hemmende Substanzen untersucht.

### 5.6.1. Einfluss der RNaseA auf die Amplifizierbarkeit von DNA-Extrakten

Mit Hilfe dieses Versuches sollte der Einfluss von RNaseA auf die Amplifizierbarkeit der Positivkontrolle HCC827 Erlo getestet werden. Hierbei kamen RNase-Lösungen der Hersteller Qiagen und Macherey-Nagel zum Einsatz, welche zunächst auf eine Konzentration von 10 mg/mL verdünnt wurden. Der in Abbildung 29 dargestellte Amplifikationsplot zeigt, dass die RNaseA-Konzentration einen Einfluss auf die Amplifikation hatte. Je höher die zugesetzte Konzentration an RNaseA, desto später kam es zum Anstieg der Fluoreszenz.

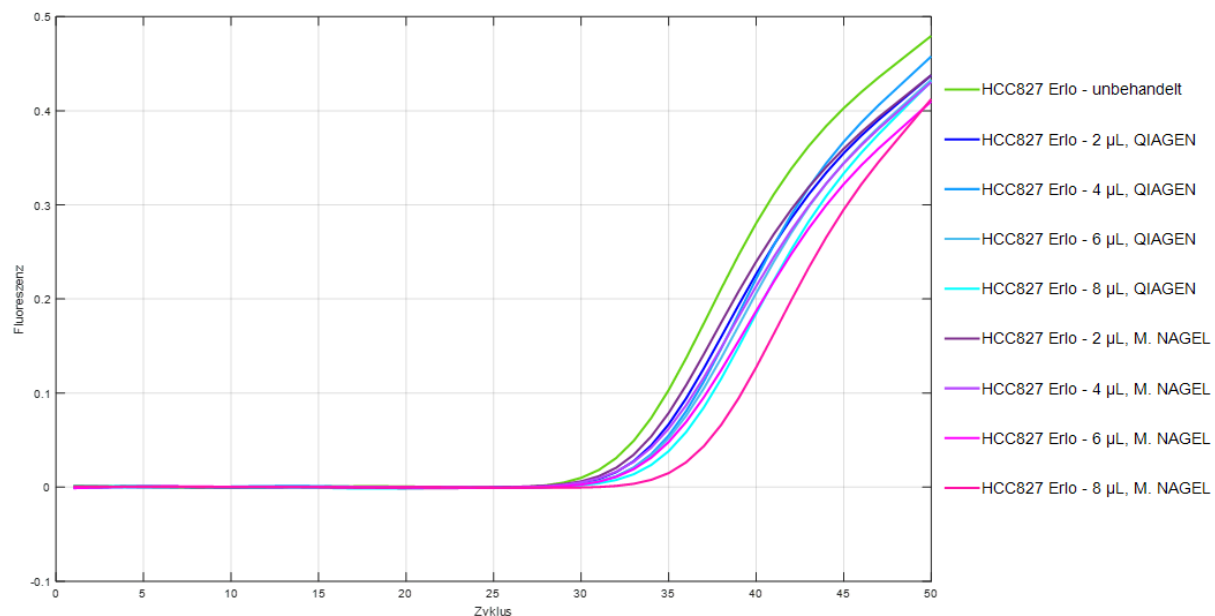


Abbildung 29: Amplifikationskurven für DNA-Extrakte der Positivkontrolle HCC827 Erlo mit Zusätzen von 0 µL, 2 µL, 4 µL, 6 µL und 8 µL RNaseA von unterschiedlichen Herstellern (Qiagen, Macherey-Nagel). Primerset 1 (PAX9 4.0), PyroMark PCR Kit MM. Zwei technische Replikate pro DNA-Extrakt.

Die in Tabelle 24 angegebenen  $C_T$ -Werte spiegeln diesen Einfluss wider. Im Unterschied dazu spielte der Hersteller des Enzyms keine Rolle.

Tabelle 24: C<sub>T</sub>-Werte, die für die amplifizierten DNA-Extrakte der Positivkontrolle HCC827 Erlo mit verschiedenen RNaseA-Konzentrationen von unterschiedlichen Herstellern (Qiagen, Macherey-Nagel) erhalten wurden. Primerset 1 (PAX9 4.0); Mastermix: PyroMark PCR Kit MM.

|            |                | RNaseA - Zusatz [µL] |       |       |       |       |
|------------|----------------|----------------------|-------|-------|-------|-------|
|            |                | 0                    | 2     | 4     | 6     | 8     |
| Hersteller | -              | 30,45                | -     | -     | -     | -     |
|            | Qiagen         | -                    | 31,68 | 32,22 | 32,22 | 32,93 |
|            | Macherey-Nagel | -                    | 31,22 | 31,60 | 32,32 | 34,80 |

Weder die Konzentration noch der Hersteller der RNaseA hatten einen Einfluss auf die Schmelztemperatur des PCR-Produkts (Abb. 30).

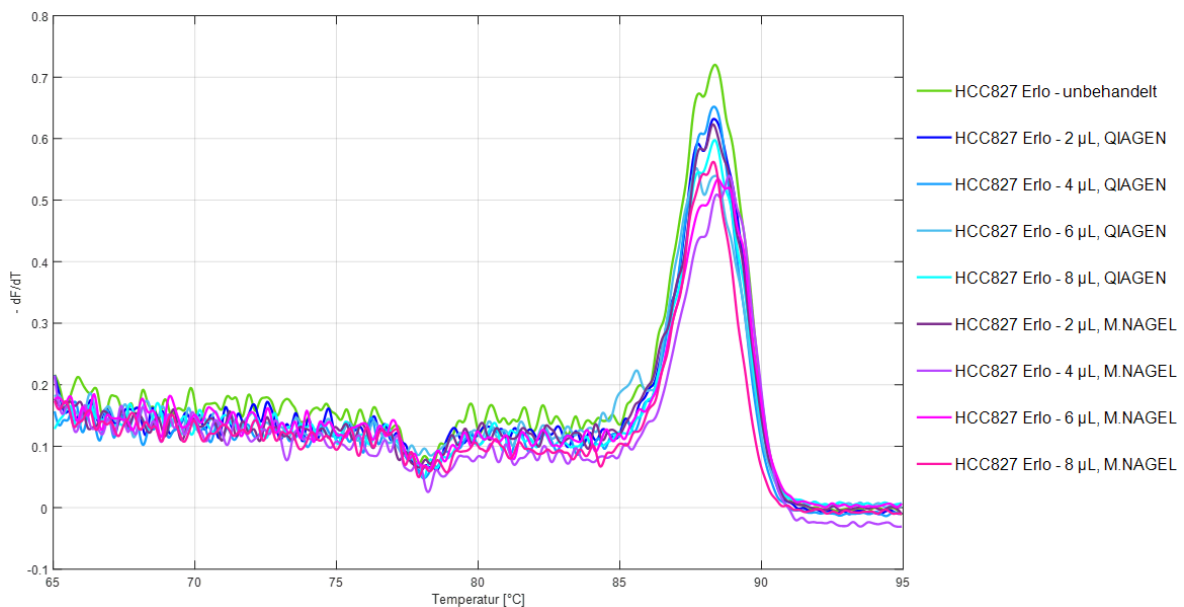


Abbildung 30: Schmelzkurven für die PCR-Produkte der DNA-Extrakte der Positivkontrolle HCC827 Erlo mit Zusätzen von 0 µL, 2 µL, 4 µL, 6 µL und 8 µL RNaseA von unterschiedlichen Herstellern (Qiagen, Macherey-Nagel). Primerset 1 (PAX9 4.0), PyroMark PCR Kit MM. Zwei technische Replikate pro DNA-Extrakt.

### 5.6.2. Einfluss der Primer- und MgCl<sub>2</sub> Konzentration auf die Amplifizierbarkeit

Als nächstes wurde geprüft, ob die Amplifizierbarkeit durch eine Erhöhung der Primerkonzentration und/oder der MgCl<sub>2</sub>-Konzentration verbessert werden konnte. Sowohl die Primerkonzentration als auch die MgCl<sub>2</sub>-Konzentration hatten nur einen geringen Einfluss (Abb. 31). Im Falle der Positivkontrolle HCC827 Erlo wurden die niedrigsten C<sub>T</sub>-Werte mit einer Primerkonzentration von 0,8 µM erzielt. Die Erhöhung der MgCl<sub>2</sub>-Konzentration führte zu einer geringen Erhöhung der C<sub>T</sub>-Werte (Tab. 25).

Infolge dieser Ergebnisse wurde für weitere PCR-Versuche die Primerkonzentration im MM von 0,6 µM auf 0,8 µM erhöht, wobei kein weiteres MgCl<sub>2</sub> zugesetzt wurde.



Tabelle 25:  $C_T$ -Werte, die für die amplifizierten DNA-Extrakte der Positivkontrolle HCC827 Erlo mit verschiedenen Primer- und  $MgCl_2$  Konzentrationen erhalten wurden. Die angegebenen  $C_T$ -Werte sind Mittelwerte, welche anhand von Doppelbestimmungen berechnet wurden. Primerset 1 (PAX9 4.0); Mastermix: PyroMark PCR Kit MM.

|                                 |   | Primerkonzentration [ $\mu M$ ] |      |      |
|---------------------------------|---|---------------------------------|------|------|
|                                 |   | 0,6                             | 0,8  | 1    |
| MgCl <sub>2</sub> - Zusatz [mM] | 0 | 30,7                            | 30,2 | 30,9 |
|                                 | 1 | 31,2                            | 31,0 | 30,7 |
|                                 | 2 | 31,4                            | 31,8 | -*   |

\* keine Durchführung der rt-PCR

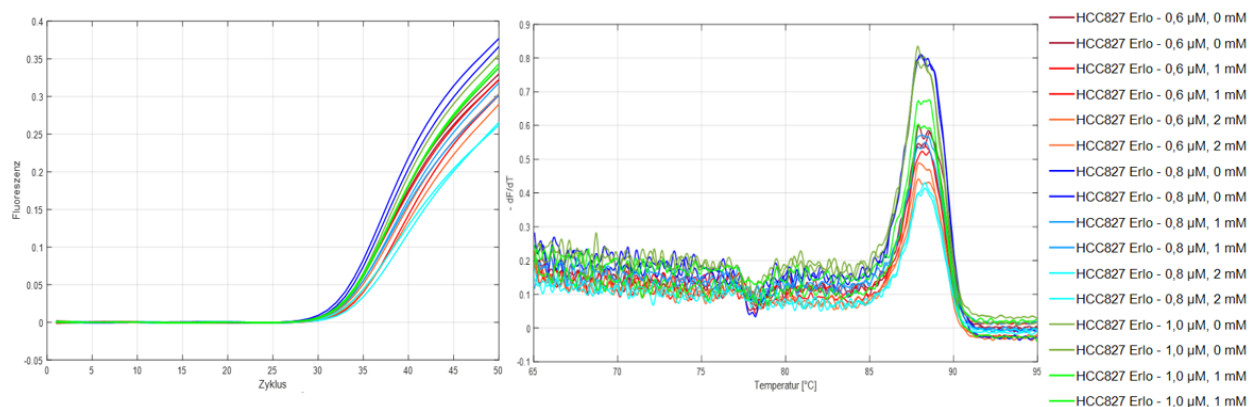


Abbildung 31: Amplifikations- (links) und Schmelzkurven (rechts) für PCR-Produkte der DNA-Extrakte der Positivkontrolle HCC827 Erlo mit Primerkonzentrationen 0,6  $\mu M$ , 0,8  $\mu M$  und 1  $\mu M$  und  $MgCl_2$ -Zusätzen von 0 mM, 1 mM und 2 mM. Primerset 1 (PAX9 4.0), PyroMark PCR Kit MM. Zwei technische Replikate pro DNA-Extrakt.

### 5.6.3. Untersuchung der Integrität von PCR-Produkten mittels Agarose-Gelelektrophorese

Um Herauszufinden, ob die fehlgeschlagene Amplifikation mancher Extrakte auf die fehlende Integrität der isolierten DNA zurückzuführen ist, wurde eine Gelelektrophorese mit einem 1% (w/v) Agarosegel durchgeführt. Dazu wurden DNA-Extrakte verschiedener Variationen herangezogen, und zwar Extrakte, die zu einer Amplifikation führten und solche, bei denen kein Anstieg der Fluoreszenz beobachtet wurde.

Das in Abbildung 32 dargestellte Gel zeigt, dass für die Extrakte **V6 F1/Leber**, **V6 F3/Leber**, **V8 F2/Großhirn**, **V12 F2/Herz**, **V12 F2/Nabelschnur**, **V13a F3/Leber** und **V13b F3/Leber** keine Banden erhalten wurden (Abb. 32, Lanes: 6, 7, 14, 15, 16, 17, 19). Aufgrund des Fluoreszenzanstieges der Extrakte **V8 F2/Großhirn**, **V12 F2/Herz**, **V12 F2/Nabelschnur** und **V13b F3/Leber** konnte die fehlende Integrität der DNA ausgeschlossen werden. Für alle Extrakte, die in der PCR zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals führten (**V6 F2/Leber**, **V9a F2/Großhirn**, **V9b F2/Großhirn**, **V10a F2/Leber**, **V10b F2/Lunge**, **V12 F2/Milz**, **V12 F2/Darm**, **V12 F2/Muskel**), konnte am Gel eine stark verschmierte Bande beobachtet werden (Lanes: 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 18).

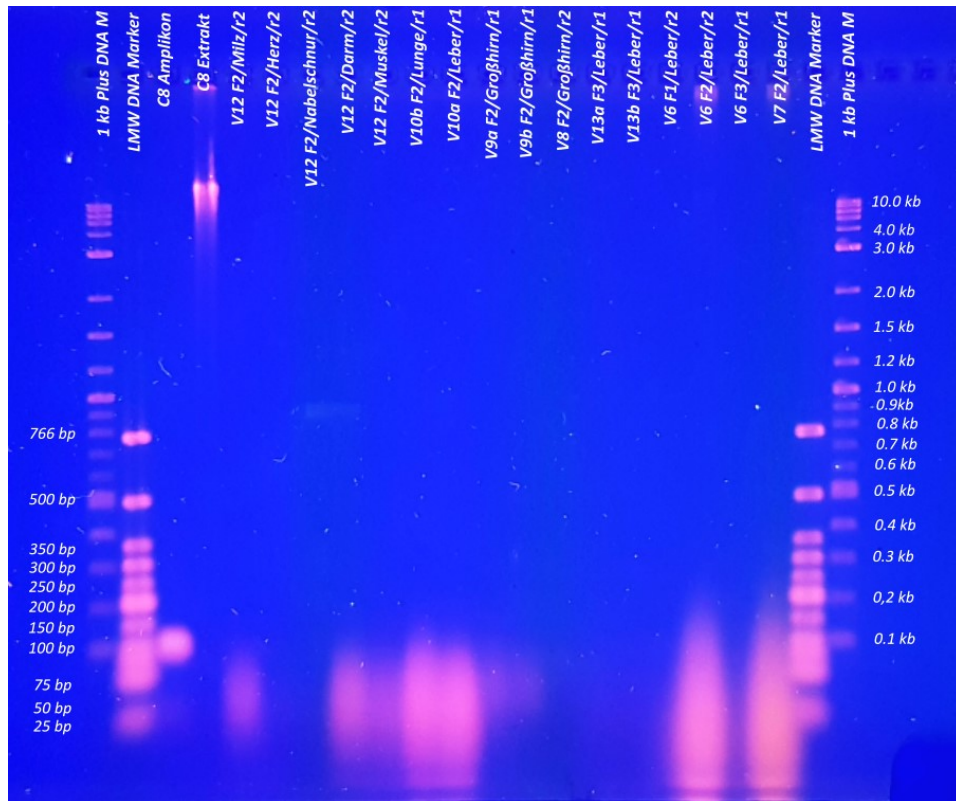


Abbildung 32: Aufnahme eines 1% (w/v) Agarosegels unter UV Licht. Aufgetragen wurden DNA-Extrakte aus Großhirn-, Leber-, Lungen-, Milz-, Darm- und Muskelgewebe von Fötus F1 (Extraktion: V6), F2 (Extraktion: V6, V7, V8, V9a, V9b, V10a, V10b, V12) und F3 (V6, V13a, V13b). Primerset Positivkontrollen: DNA-Extrakt und Amplikon von C8. Marker: LMW DNA Marker, 1kb Plus DNA Marker.

DNA-Extrakte (**V1a** F2/Leber, **V1b** F2/Leber, **V3** F2/Leber, **V4a** F2/Großhirn, **V4b** F2/Großhirn und **V13b** F3/Lunge), die bei der PCR zu keinem Anstieg des Fluoreszenzsignals führten, führten auch am Gel zu keiner Bande (Abb. 33; Lanes: 5, 6, 8, 9, 10, 20), was an der geringen DNA-Konzentration der Extrakte liegen kann (Tab. 17, 19, 23). Nur für die Extrakte **V5** F1/Leber und **V13a** F3/Lunge wurde eine leichte Bande beobachtet (Lanes: 7, 19). Starke Banden im Bereich < 100 bp waren für **V10a** F2/Lunge, **V10b** F2/Leber, **V11a** F2/Leber, **V11a** F2/Lunge, **V11b** F2/Leber, **V11b** F2/Lunge, **V11c** F2/Leber und **V11c** F2/Lunge zu erkennen (Lanes: 11 - 18) aufgrund hoher DNA-Ausbeuten (Tab. 23). Trotz der stark verschmierten Banden, welche auf eine starke Fragmentierung der DNA hinweisen, konnten von diesen Extrakten das gewünschte PCR-Produkt erhalten werden (Abb. 23, 24).

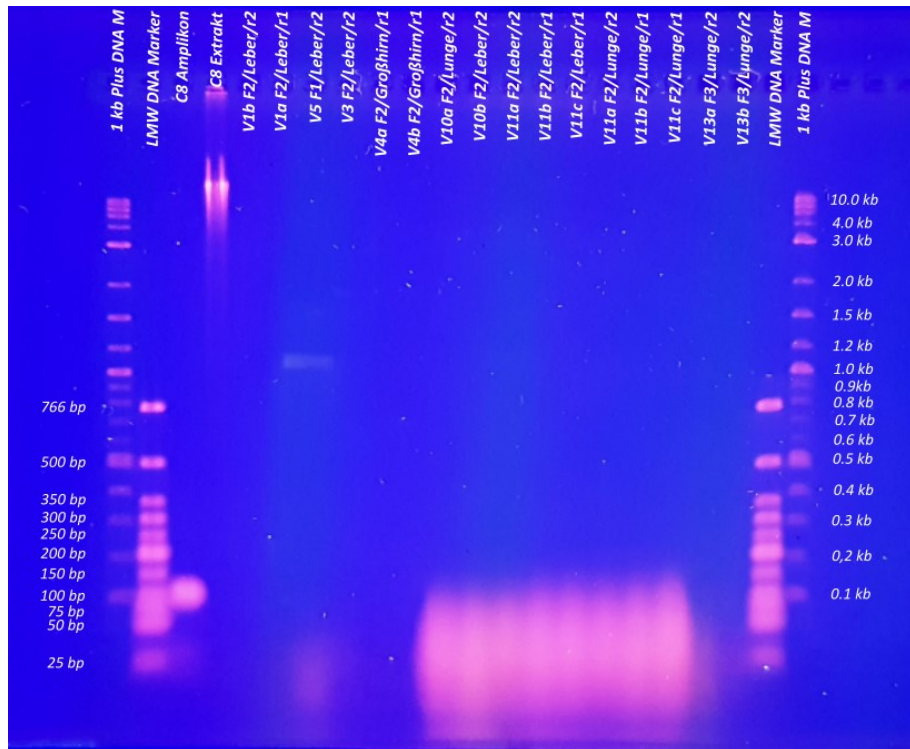


Abbildung 33: Aufnahme eines 1% (w/v) Agarosegels unter UV Licht. Aufgetragen wurden DNA-Extrakte aus Großhirn-, Leber-, Lungengewebe von Fötus F1 (Extraktion: V5), F2 (Extraktion: V1a, V1b, V3, V4a, V4b, V10a, V10b, V11a, V11b, V11c) und F3 (V13a, V13b). Positivkontrollen: DNA-Extrakt und Amplikon von C8. Marker: LMW DNA Marker, 1kb Plus DNA Marker.

#### 5.6.4. Untersuchung auf Inhibition der DNA-Polymerase aufgrund störender Substanzen in den DNA-Extrakten

Mit diesem Versuch wurden alle DNA-Extrakte, die mittels PCR zu keiner Amplifikation führten und deren DNA-Integrität nicht mittels Agarosegel aufgezeigt werden konnte, auf Polymerase-hemmende Substanzen geprüft. Dazu wurde der isolierten DNA der zu untersuchenden Extrakte der DNA-Extrakt von Positivkontrolle HCC827 Erlo zugesetzt und anschließend mittels rt-PCR (SHH 2.0, PyroMark PCR Kit MM) amplifiziert. Zur Untersuchung wurden die DNA-Extrakte aus FF Gewebe **V2** F#003/Leber, **V2** F#004/Leber, **V4a** F3/Großhirn, **V4b** F3/Großhirn, **V6** F3/Leber, **V9a** F3/Großhirn, **V13a** F3/Leber, **V13a** F3/Lunge, **V13b** F3/Leber und **V13b** F3/Lunge herangezogen, sowie die Extrakte der alkoholisch-fixierten Gewebsarten **V5** F1/Leber, **V6** F1/Leber, **V3** F2/Leber, **V6** F2/Leber und **V7** F2/Leber. Die genaue Durchführung ist in Kapitel 4.5.4 beschrieben.

Bei Betrachtung der mittels PCR erhaltenen Amplifikations- und Schmelzkurven (Abb. 34) ließ sich jedoch keine negative Auswirkung auf die Amplifizierbarkeit der im DNA-Extrakt ebenfalls befindlichen Kontrolle HCC827 Erlo nachweisen. Somit konnte die Anwesenheit auf DNA-Polymerase-hemmende Substanzen ausgeschlossen werden.



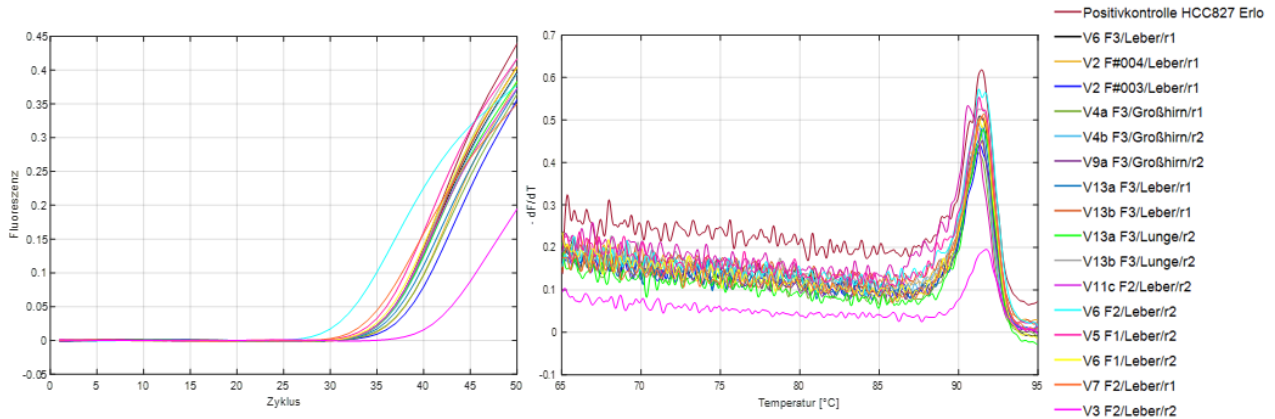


Abbildung 34: Amplifikations- (links) und Schmelzkurven (rechts) für PCR-Produkte der DNA-Extrakte der Positivkontrolle HCC827 Erlo mit Zusatz an DNA-Extrakten vom Großhirn-, Leber- und Lungengewebe der Föten F#003 (Extraktion: V2), F#004 (Extraktion: V2), F1 (Extraktion: V5, V6), F2 (Extraktion: V3, V6, V7, V11c) und F3 (Extraktion: V4a, V4b, V6, V9a, V13a, V13b). Primerset 2 (SHH 2.0), PyroMark PCR Kit MM. Positivkontrolle: HCC827 Erlo. Zwei technische Replikate pro DNA-Extrakt.

## 5.7. Pyrosequenzierung

Um die PCR-Produkte auf ODC-relevante SNPs überprüfen zu können, fand vor der PSQ-Analyse die PCR-Amplifikation mit dem btn Primer OTX2 1.1 (Primerset 5) statt.

### 5.7.1. PCR-Amplifikation mit biotinyliertem Primer zur Vorbereitung auf die PSQ-Analyse

Die Voraussetzung für eine PSQ-Analyse ist die Verwendung eines btn PCR-Produkts. Daher wurden alle DNA-Extrakte, welche mit nicht btn Primerpaaren zum gewünschten Produkt führten, einer rt-PCR unter Verwendung eines btn Primers (Primerset 5; Tab. 14) unterzogen.

Die Schmelzkurven (Abb. 35, unten) zeigen, dass wenige PCR-Produkte (**V6** F2/Leber, **V8** F2/Großhirn, **V11a** F2/Lunge und **V12** F2/Muskel) nur ein Peakmaximum bei derselben Temperatur der Positivkontrollen ( $T_m = 81,9\text{ °C}$ ) aufwiesen. Darüber hinaus besaßen die meisten Amplikons einen zusätzlichen Peak im Temperaturbereich von  $73,8\text{ °C} - 79,7\text{ °C}$ . Die Bildung von Primer-Dimeren konnte jedoch durch eine nicht amplifizierbare NTC-Probe ausgeschlossen werden. Außerdem wurde kein Fluoreszenzanstieg für die DNA-Extrakte von FF Gewebeproben (**V13b** F3/Leber, **V16b** F3/Leber, **V17a** F3/Leber, **V17a** F3/Lunge, **V17b** F3/Leber und **V17b** F3/Lunge) beobachtet. Im Gegensatz dazu gab es lediglich eine geringe Anzahl an DNA-Extrakten aus EtOH-fixiertem Gewebe (F2), welche keinen Anstieg der Fluoreszenz zeigten (**V1a** F2/Leber, **V3** F2/Leber und **V12** F2/Nabenschnur).

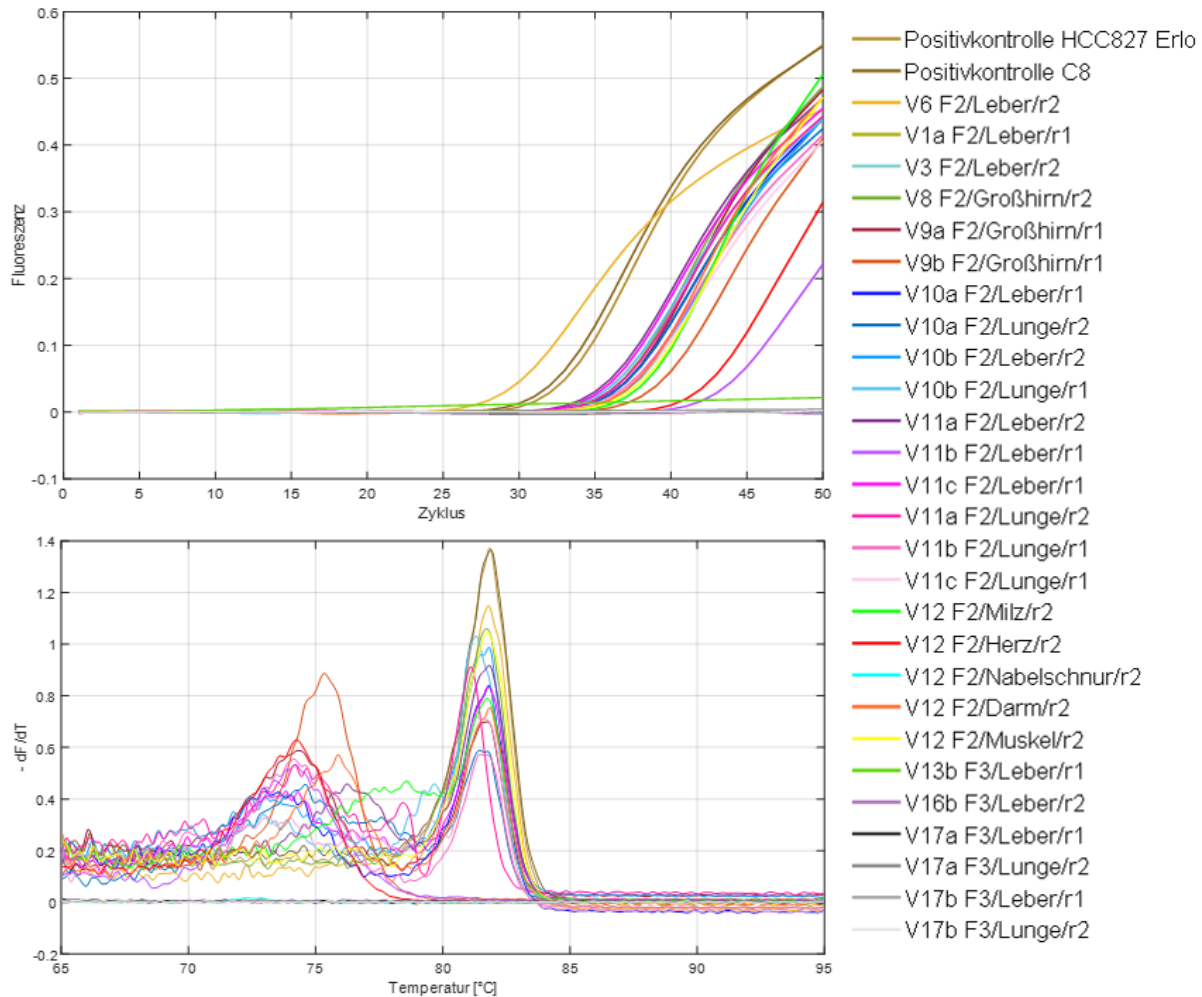


Abbildung 35: Amplifikations- (oben) und Schmelzkurven (unten) für PCR-Produkte der DNA-Extrakte vom Großhirn-, Leber- und Lungen-, Milz-, Herz-, Nabelschnur-, Darm- und Muskelgewebe der Föten F2 (Extraktion: V1a, V3, V6, V8, V9a, V9b, V10a, V10b, V11a, V11b, V11c, V12) und F3 (Extraktion: V13b, V16b, V17a, V17b). Primerset 5 (btn-OTX2 1.1), PyroMark PCR Kit MM. Positivkontrollen: HCC827 Erl, C8. Zwei technische Replikate pro DNA-Extrakt.

Zur weiteren Überprüfung wurden die PCR-Produkte auf ein Agarosegel aufgegeben. Das Gel (Abb. 36) zeigte eine gute Übereinstimmung mit dem Schmelzdiagramm (Abb. 35, unten). Neben den gewünschten PCR-Produkten mit einer Länge von 89 bp wurden auch viele Banden erhalten, die auf unspezifische PCR-Produkte hinweisen, welche eine Basenpaarlänge zwischen 40 - 70 bp aufwiesen. Infolgedessen wurde diese PCR-Methode als ungeeignet eingestuft.

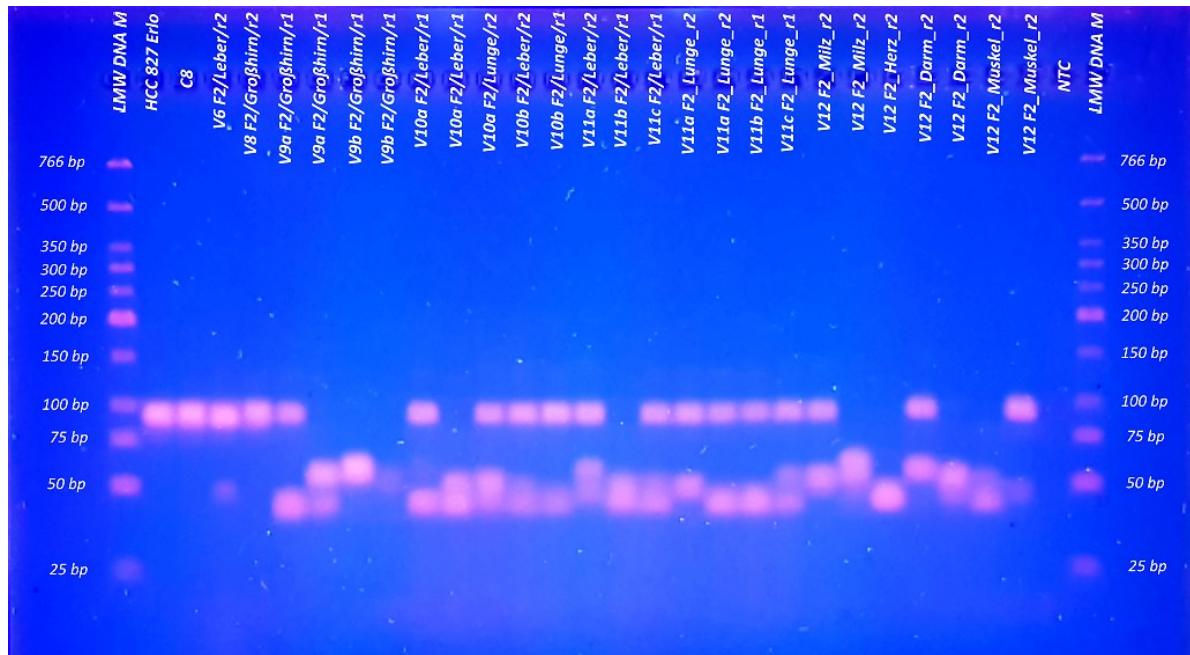


Abbildung 36: Aufnahme eines 3% (w/v) Agarosegels unter UV Licht. Aufgetragen wurden PCR-Produkte der DNA- Extrakte aus Leber-, Milz-, Herz-, Nabelschnur-, Darm- und Muskelgewebe von Fötus F2 (Extraktion: V6, V8, V9a, V9b, V10a, V10b, V11a, V11b, V11c, V12). Primerset 5 (btn-OTX2 1.1), PyroMark PCR Kit MM. Positivkontrollen: PCR- Produkt von HCC827 Erl und C8. Marker: LMW DNA Marker.

Um die Eignung der isolierten DNA zur SNP-Analyse weiter prüfen zu können, wurde aus Zeitgründen keine neue PCR-Methode entwickelt, sondern auf eine Methode zurückgegriffen, die in der Arbeitsgruppe bereits etabliert war. [48] Es handelte sich dabei aber nicht um eine Methode, um ODC assoziierte SNPs zu bestimmen, sondern drei SNPs des Gens O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT), welches bisher nicht mit ODC assoziiert wurde.

Mit der Methode für MGMT SNPs wurden alle DNA-Extrakte, die zuvor mit Primerset 5 untersucht wurden, analysiert. Zusätzlich wurden DNA-Extrakte von Gewebstypen der Föten F1, F2 und F3 auf ihre Amplifizierbarkeit getestet. Die bis dahin verwendeten Positivkontrollen (HCC827 Erl, C8) wurden für diesbezügliche Analysen gegen die DNA-Extrakte HT29 EA und HCT116 ct13 [5 ng/μL] ausgetauscht, welche von kommerziellen Dickdarmkrebszelllinien stammten.

In den Abbildungen 37 und 38 sind die erhaltenen Amplifikations- und Schmelzkurven aller DNA-Extrakte, die mit Primerset 6 analysiert wurden, dargestellt. Die erste PCR-Analyse erfolgte mit einem Zusatz von je 2 μL isolierter DNA (Abb. 37). Für all jene DNA-Extrakte, welche hierbei keinen Fluoreszenzanstieg aufwiesen, wurde selbiger PCR-Versuch mit einem erhöhten DNA-Volumen (5 μL statt 2 μL) wiederholt (Abb. 38).

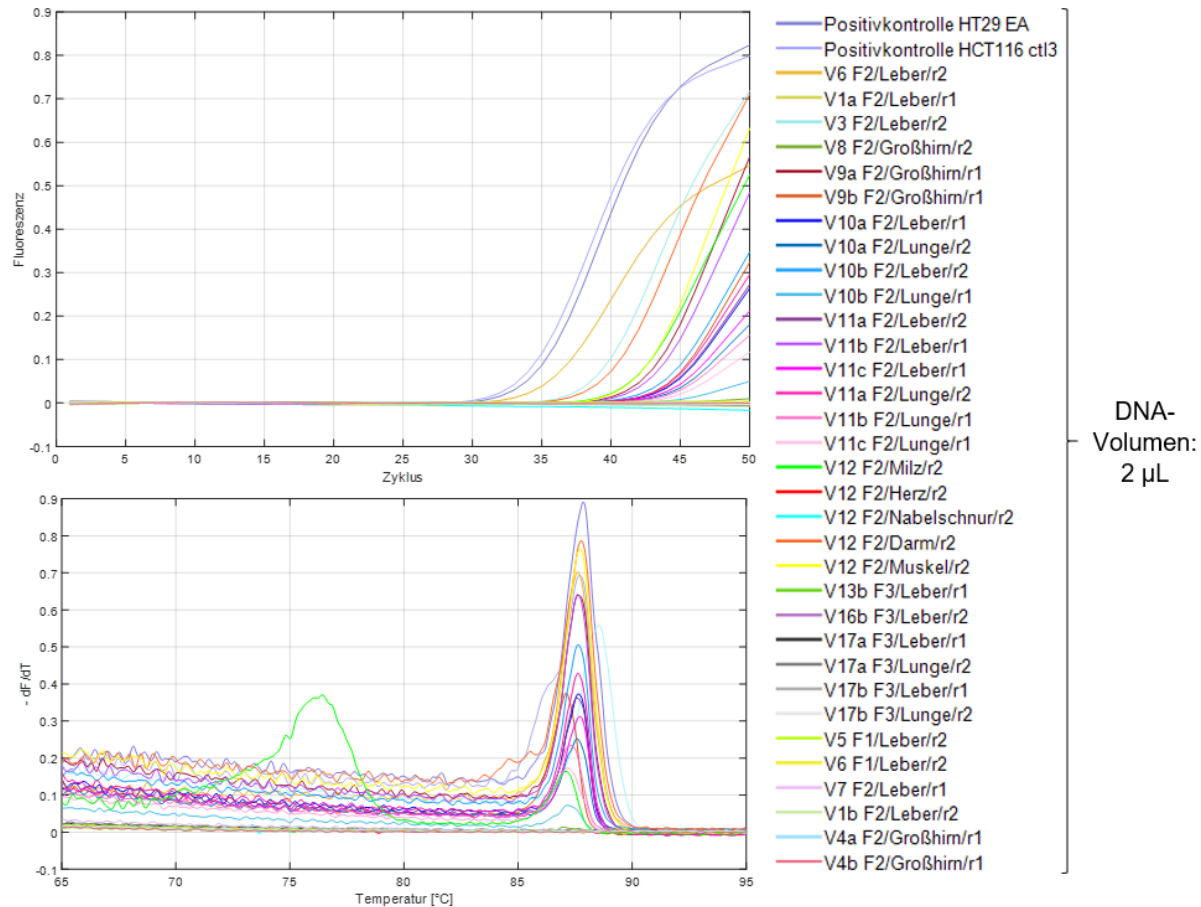


Abbildung 37: Amplifikations- (oben) und Schmelzkurven (unten) für PCR-Produkte der DNA-Extrakte vom Großhirn-, Leber- und Lungen-, Milz-, Herz-, Nabelschnur-, Darm- und Muskelgewebe der Föten F1 (Extraktion: V5, V6), F2 (Extraktion: V1a, V1b, V3, V4a, V4b, V6, V7, V8, V9a, V9b, V10a, V10b, V11a, V11b, V11c, V12) und F3 (Extraktion: V13b, V16b, V17a, V17b). Primerset 6 (3 SNPs Assay), EpiTect HRM PCR MM. Positivkontrollen: HT29 EA, HCT116 ct13. Zwei technische Replikate pro DNA-Extrakt.

Das Schmelzdiagramm zeigt, dass viele PCR-Produkte (**V6** F2/Leber, **V9a/b** F2/Großhirn, **V10a/b** F2/Leber, Lunge, **V11a/b/c** F2/Leber, Lunge und **V12** F2/Darm, Muskel) ein Peakmaximum von  $T_m = 87,8$  °C aufwiesen, wie die Positivkontrollen. Mit einer leichten Peakverschiebung zu höheren Temperaturen ( $T_m = 88,6$  °C) war dies auch für **V3** F2/Leber der Fall. Nur bei **V12** F2/Milz scheint es zur Bildung eines Nebenprodukts gekommen zu sein ( $T_m = 76,3$  °C). Es wurde jedoch bei keinem der Extrakte von F1 und F3 das richtige Produkt erhalten (Abb. 37).

Durch Erhöhung des eingesetzten DNA-Volumens auf 5 µL (Abb. 38) konnte die Amplifizierung vieler DNA-Extrakte (**V6** F1/Leber, **V8** F2/Großhirn, **V10b** F2/Lunge, **V12** F2/Milz und **V12** F2/Nabelschnur) ermöglicht werden, welche mit dem kleineren DNA-Volumen zu keinem oder zu unspezifischen Produkten führten. Außerdem führten vier DNA-Extrakte von FF Gewebe des Fötens F3 (**V6** F3/Leber, **V13a** F3/Leber, **V14a** F3/Lunge und **V16a** F3/Leber) zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals. Bedauerlicherweise war mit dieser PCR-Methode keine Amplifizierung der DNA-Extrakte **V1a** F2/Leber, **V1b** F2/Leber, **V2** F#003/Leber, **V2** F#004/Leber, **V4a** F2/Großhirn, **V4a** F3/Großhirn, **V4b** F2/Großhirn, **V4b** F3/Großhirn, **V5** F1/Leber, **V7** F2/Leber, **V12** F2/Herz, **V13a** F3/Lunge, **V13b** F3/Leber, **V13b** F3/Lunge, **V14b** F3/Lunge, **V14c** F3/Lunge, **V15a** F3/Lunge, **V15b** F3/Lunge, **V16a** F3/Lunge,

**V16b** F3/Leber, **V16b** F3/Lunge), **V17a** F3/Leber, **V17a** F3/Lunge, **V17b** F3/Leber und **V17b** F3/Lunge möglich. Die Schmelzkurven zeigen, dass alle Amplikons ein identisches oder nur leicht verschobenes Schmelzverhalten zu den Positivkontrollen ( $T_m = 87,6\text{ °C}$ ) aufweisen, mit Ausnahme des für den Extrakt **V3** F2/Leber erhaltenen Produkts ( $T_m = 89,5\text{ °C}$ ).

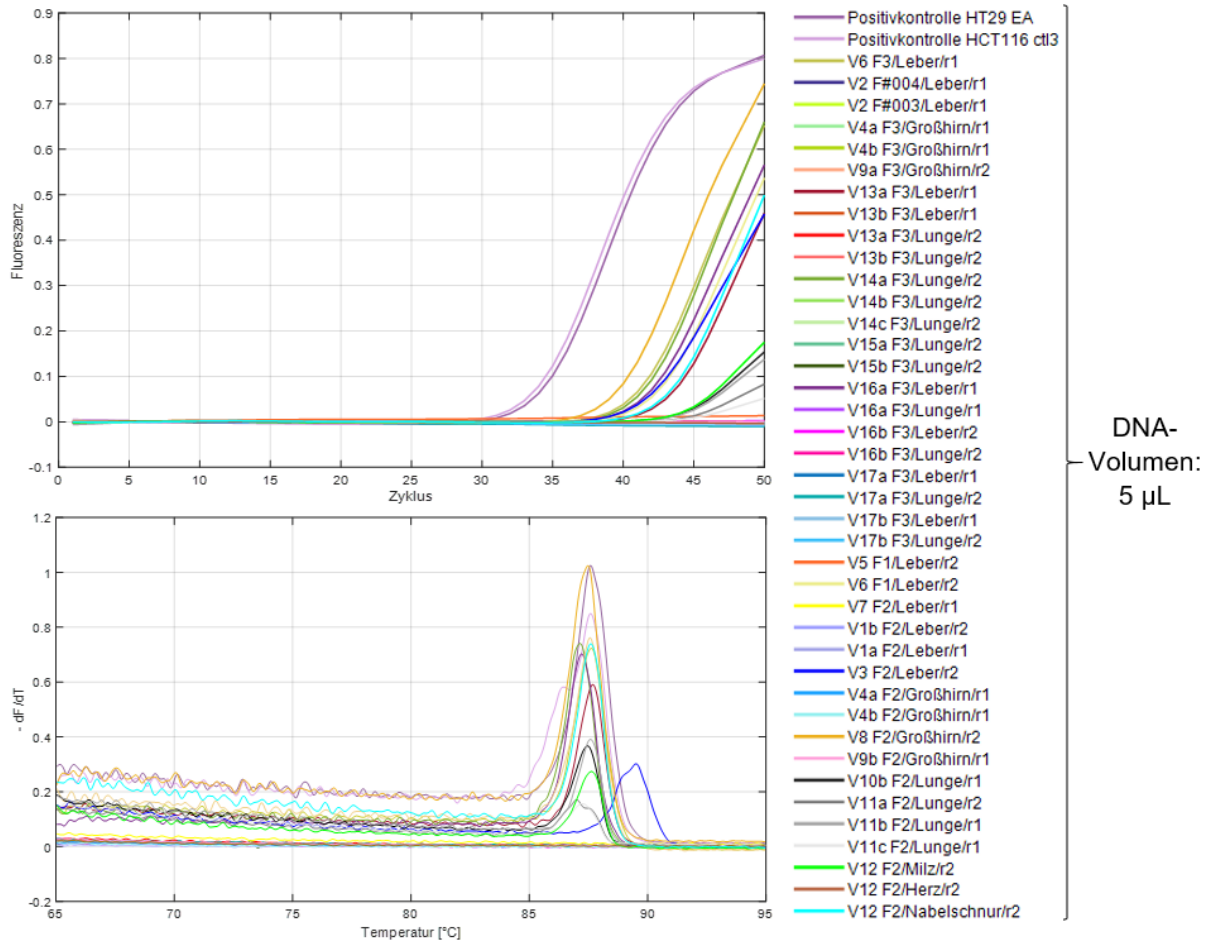


Abbildung 38: Amplifikations- (oben) und Schmelzkurven (unten) für PCR-Produkte der DNA-Extrakte vom Großhirn-, Leber- und Lungen-, Milz-, Herz-, Nabelschnurgewebe der Föten F#003 (Extraktion: V2), F#004 (Extraktion: V2), F1 (Extraktion: V5, V6), F2 (Extraktion: V1a, V1b, V3, V4a, V4b, V7, V8, V9b, V10b, V11a, V11b, V11c, V12) und F3 (Extraktion: V4a, V4b, V9a, V13a, V13b, V14a, V14b, V14c, V15a, V15b, V16a, V16b, V17a, V17b). Primerset 6 (3 SNPs Assay), EpiTect HRM PCR MM. Positivkontrollen: HT29 EA, HCT116 ct13. Zwei technische Replikate pro DNA-Extrakt.

### 5.7.2. Ergebnisse der PSQ-Analyse

Alle PCR-Produkte, die mit dem Primerpaar 6 (Tab. 14) erhalten wurden und das gleiche Schmelzverhalten aufwiesen wie die Positivkontrollen ( $T_m = 87,6\text{ °C} - 87,8\text{ °C}$ ) und einige Produkte, deren Schmelztemperatur sich nur geringfügig von den Positivkontrollen unterschied (wie z.B. **V3** F2/Leber,  $T_m = 89,5\text{ °C}$ ; Abb. 38), wurden mittels Pyrosequenzierung (PSQ) untersucht. Des Weiteren wurden PCR-Produkte einer PSQ-Analyse unterzogen, welche auf die Bildung unspezifischer Produkte hindeuteten (wie z.B. **V12** F2/Milz;  $T_m = 76,3\text{ °C}$ ; Abb. 37) aufgrund ihrer  $T_m$ - Abweichung von den Positivkontrollen.



Der Teil des Templates, welcher die drei SNPs von Interesse beinhaltet (Y) und sequenziert werden sollte, besitzt die Basenabfolge:

GCCCGCGCCCYTAGAACGCTTTGCGTCCCGACGCCCGYAGGTCCTCGCGGTGCGYAC  
CGTTTGCGACTTGGTGAGTGTCTGG

Die erhaltenen Ergebnisse wurden von der PyroMark Q24 Advanced Software 3.0.1 als Pyrogramm angezeigt. Das Pyrogramm konnte mit dem Histogramm verglichen werden. Die drei variablen Stellen (SNPs) sind jeweils grau hervorgehoben.

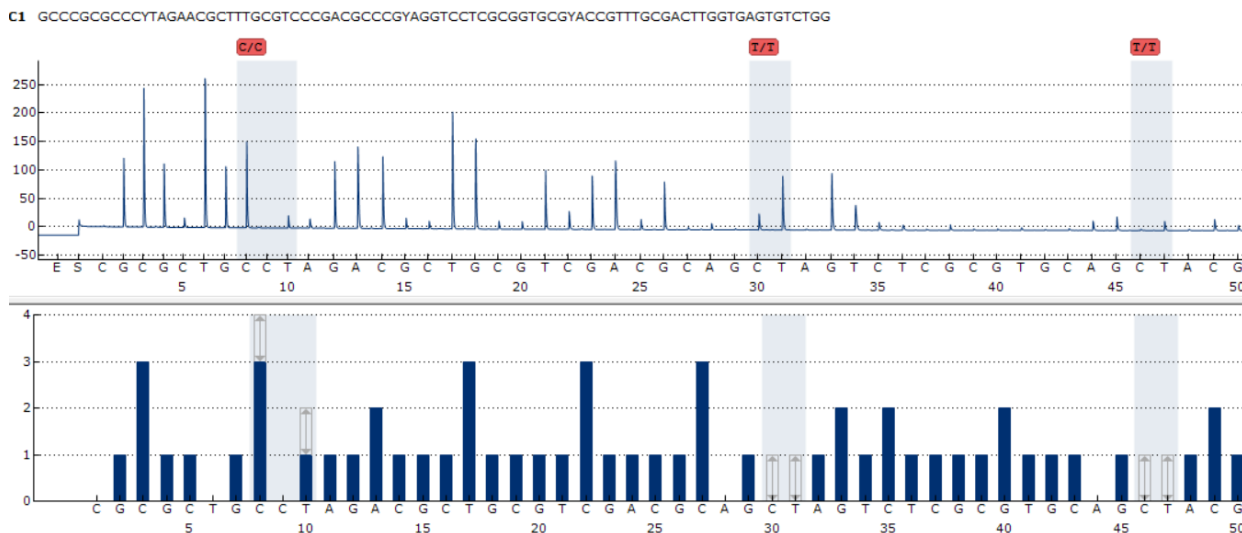


Abbildung 39: Stellvertretendes Pyrogramm eines PCR-Produkts (oben), welches in der HRM-Analyse nicht die richtige Schmelztemperatur zeigte (V12 F2/Milz mit 2  $\mu$ L DNA-Zusatz; Abb. 37).

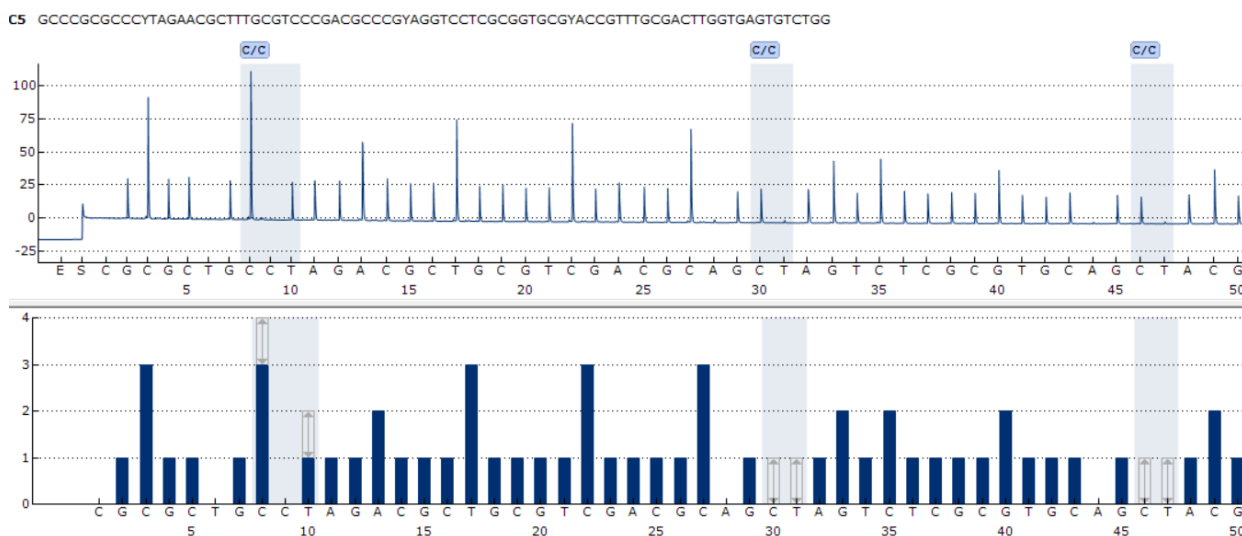


Abbildung 40: Stellvertretendes Pyrogramm eines PCR-Produkts (oben), welches in der HRM-Analyse die richtige Schmelztemperatur zeigte (V12 F2/Milz mit 5  $\mu$ L DNA-Zusatz; Abb. 38).

Von den 24 PCR-Produkten, die das gleiche Schmelzverhalten aufwiesen wie die Positivkontrollen, konnten 20 mittels PSQ sequenziert werden (Tab. 26), d.h. das Pyrogramm entsprach dem Histogramm. Die PCR-Produkte von **V9b** F2/Großhirn, **V11c** F2/Lunge, **V12** F2/Darm und **V14a** F3/Lunge lieferten Pyrogramme, die nicht mit den entsprechenden

Histogrammen übereinstimmen. Der Grund für **V14a** F3/Lunge könnte die geringe DNA-Konzentrationen ( $c < 0,1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ) sein. Da für **V9b** F2/Großhirn, **V11c** F2/Lunge und **V12** F2/Darm höhere Konzentrationen ( $c > 1,0 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ) ermittelt wurden, konnte eine diesbezügliche Begründung ausgeschlossen werden. Die HRM-Analyse zeigte für **V9b** F2/Großhirn, **V11c** F2/Lunge und **V14a** F3/Lunge PCR-Produkte, die leicht unterhalb des Schmelzbereichs der Positivkontrollen ( $T_m = 87,6 - 87,8 \text{ }^\circ\text{C}$ ) lagen (Tab. 26). Die Schmelztemperatur des PCR-Produkts von **V12** F2/Darm ist allerdings ident zu denen der Positivkontrollen. Aufgrund der nahezu gleichen Schmelztemperaturen zu den Positivkontrollen, kann eine zu starke Fragmentierung der DNA ausgeschlossen werden.

*Tabelle 26: Ergebnisse aller zur PSQ herangezogenen PCR-Produkte.*

| Abkürzung der Variation | Fötus/ Gewebstyp | DNA-Zusatz für PCR [ $\mu\text{L}$ ] | c(DNA) gemäß Qubit® - Fluorometer [ $\text{ng}/\mu\text{L}$ ] | Reinheitsmessung mittels NanoDrop: |                           | $T_m$ [ $^\circ\text{C}$ ] | Ergebnisse der PSQ    |
|-------------------------|------------------|--------------------------------------|---|------------------------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------|
|                         |                  |                                      |   | $\frac{E_{260}}{E_{280}}$          | $\frac{E_{260}}{E_{230}}$ |                            |                       |
| <b>V3</b>               | F2/Leber         | 5                                    | 1,16  | 1,6                                | 1,5                       | 89,5                       | sequenzierbar         |
|                         | F1/Leber         | 5                                    | 4,50  | 1,7                                | 1,9                       | 87,6                       | sequenzierbar         |
| <b>V6</b>               | F2/Leber         | 2                                    | 21,60   | 1,7                                | 1,8                       | 87,6                       | sequenzierbar         |
|                         | F3/Leber         | 5                                    | 3,33  | 1,6                                | 1,9                       | 87,6                       | sequenzierbar         |
| <b>V8</b>               | F2/Großhirn      | 5                                    | 0,28  | 1,4                                | 0,8                       | 87,5                       | sequenzierbar         |
| <b>V9a</b>              | F2/Großhirn      | 2                                    | 2,04  | 1,6                                | 1,4                       | 87,6                       | sequenzierbar         |
| <b>V9b</b>              | F2/Großhirn      | 2                                    | 1,09  | 1,6                                | 1,3                       | 87,1                       | nicht sequenzierbar*  |
| <b>V10a</b>             | F2/Leber         | 2                                    | 21,40   | 1,6                                | 1,1                       | 87,7                       | sequenzierbar         |
|                         | F2/Lunge         | 2                                    | 16,00   | 1,7                                | 1,4                       | 87,6                       | sequenzierbar         |
| <b>V10b</b>             | F2/Leber         | 2                                    | 23,90   | 1,7                                | 1,2                       | 87,6                       | sequenzierbar         |
|                         | F2/Lunge         | 5                                    | 20,10   | 1,7                                | 1,4                       | 87,4                       | sequenzierbar         |
| <b>V11a</b>             | F2/Leber         | 2                                    | 13,40   | 1,6                                | 0,9                       | 87,6                       | sequenzierbar         |
|                         | F2/Lunge         | 2                                    | 12,70   | 1,7                                | 1,3                       | 87,6                       | sequenzierbar         |
| <b>V11b</b>             | F2/Leber         | 2                                    | 18,10   | 1,6                                | 1,0                       | 87,6                       | sequenzierbar         |
|                         | F2/Lunge         | 5                                    | 17,60   | 1,7                                | 1,3                       | 87,6                       | sequenzierbar         |
| <b>V11c</b>             | F2/Leber         | 2                                    | 16,10   | 1,6                                | 1,0                       | 87,7                       | sequenzierbar         |
|                         | F2/Lunge         | 5                                    | 21,70   | 1,7                                | 1,4                       | 87,3                       | nicht sequenzierbar*  |
| <b>V12</b>              | F2/Milz          | 5                                    | 3,54  | 1,7                                | 1,6                       | 87,6                       | sequenzierbar         |
|                         | F2/Nabelschnur   | 5                                    | 0,26  | 1,5                                | 0,4                       | 87,6                       | sequenzierbar         |
|                         | F2/Darm          | 2                                    | 8,96  | 1,7                                | 1,4                       | 87,8                       | nicht sequenzierbar** |

|             |           |   |      |     |     |      |                       |
|-------------|-----------|---|------|-----|-----|------|-----------------------|
|             | F2/Muskel | 2 | 4,90 | 1,6 | 0,9 | 87,8 | sequenzierbar         |
| <b>V13a</b> | F3/Leber  | 5 | 3,04 | 1,5 | 1,5 | 87,7 | sequenzierbar         |
| <b>V14a</b> | F3/Lunge  | 5 | 0,05 | 1,7 | 0,7 | 87,2 | nicht sequenzierbar** |
| <b>V16a</b> | F3/Leber  | 5 | 3,36 | 1,6 | 1,6 | 87,2 | sequenzierbar         |

\* Aufgrund zu geringer Peakhöhen

\*\* Aufgrund zu großer Abweichung der Peakhöhen

Auch wenn der zur PSQ-Analyse eingesetzte Assay nicht die Analyse von ODC assoziierten SNPs ermöglicht, konnte damit doch gezeigt werden, dass in vielen Fällen die Menge, Reinheit und Integrität der isolierten DNA hoch genug waren, um ein bestimmtes Templat amplifizieren und den Genotyp mittels PSQ bestimmen zu können.



## **6. Schlussfolgerungen**

Bereits vor hunderten von Jahren bestand die Möglichkeit eine morphologische Aufrechterhaltung verschiedener Gewebstypen für eine lange Zeitspanne durch den Einsatz einer wässrigen Formaldehydlösung, auch Formalin genannt, zu gewährleisten. Aus diesem Grund stellen langzeit-konservierte Formalinpräparate unschätzbare Ressourcen zum Studium des humanen Genoms dar. Ein wesentliches Forschungsgebiet behandelt die Entwicklung von Biomarkern, mit deren Hilfe seltene Erkrankungen, wie beispielsweise der Otozephalie-Dysgnathia Komplex (ODC), frühzeitig erkannt und gegebenenfalls behandelt werden können. Die Kehrseite einer Formalin-Fixierung liegt in der Ausbildung von Quervernetzungen der DNA mit Proteinen, weshalb erschwerte Bedingungen zur DNA-Isolierung vorliegen. Zudem geht die Anwendung dieses Fixativs mit einer Schädigung der DNA einher, wie z.B. einer Fragmentierung.

Obwohl bereits in früheren Studien Methoden zur Extraktion intakter, genomischer DNA aus langzeit-konservierten, alkoholisch- und Formalin-fixierten Gewebe entwickelt wurden, bestand das Ziel dieser Masterarbeit in der Optimierung verschiedener Extraktionsprotokolle, um unbeschädigte DNA mit hoher Ausbeute und Reinheit aus unterschiedlichen Gewebstypen zu isolieren, welche für darauffolgende PCR- und SNP-Analysen mittels PSQ genutzt werden können. Zu diesem Zweck fanden zwei kommerziell erhältliche Extraktionskits mit Spin Säulen des Herstellers Qiagen (QIAamp DNA Mini Kit und QIAamp DNA FFPE Tissue Kit), eine Phenol-Chloroform (PC)-Extraktion, sowie eine Weiterentwicklung letzterer Methode, alias Hot Alkali Extraktion, auf welche besonderes Hauptaugenmerk gelegt wurde, Anwendung. Die Durchführung fand dabei unter Modifikation verschiedenster Parameter, wie z.B. Dauer des Waschschriffs oder Temperatur und Dauer der Hitzebehandlung, statt.

Mit Hilfe der organischen Extraktionsmethoden (PC und Hot Alkali) konnten sowohl höhere DNA-Konzentrationen, als auch bessere Reinheitswerte im Vergleich zu den Spin-Säulenextraktionen erzielt werden. Im Gegensatz zu den Extrakten der beiden Kits (Qiagen), konnten mit einigen Variationen der Hot Alkali-Methode gewünschte PCR-Produkte, sogar für Extrakte von Formalin-fixierten (FF) Gewebeproben, erzielt werden. Die vielversprechendsten Variationen bezüglich der Qualität und Quantität der Extrakte waren jene, welche mit einer Hitzebehandlung von 30 min bei 100 °C durchgeführt wurden, ohne die Volumina der benötigten Reagenzien (ATL Puffer, Proteinase K, RNaseA) zu erhöhen. Der Einsatz des GlycoBlue Farbstoffes zur Visualisierung der präzipitierten DNA führte zu verbesserten Ausbeuten, sowie die Durchführung der Fällung bei einer Temperatur von - 20 °C. Durch die Erhöhung der Einwaagen von 25 mg auf 100 mg konnten für die FF Gewebeproben, höhere Ausbeuten erzielt werden.

Durch die Untersuchung der verschiedenen Gewebstypen Leber, Lunge, Milz, Herz, Darm, Nabelschnur, Muskel und Kleinhirn des EtOH-fixierten Föten (F2) mit den Variationen V10a und V12 konnte festgestellt werden, dass Extrakte aus Nabelschnur, Herz und Kleinhirn die geringsten DNA-Konzentrationen < 0,5 ng/µL aufwiesen, wobei die Konzentrationen aller Kleinhirn-Extrakte unter der Nachweisgrenze des Fluorometers lagen. Die Konzentrationen der Extrakte aus Milz, Darm und Muskel lagen im Bereich von 3,44 – 8,96 ng/µL. Die höchsten DNA-Konzentrationen konnten von Extrakten aus Leber und Lunge im Bereich von 12,20 – 21,4 ng/µL ermittelt werden. Mit dem NanoDrop Gerät wurde die Reinheit der DNA-Extrakte untersucht. Dabei wurde eine leichte Proteinverunreinigung in den Extrakten aller

Gewebstypen ermittelt. Hierbei lag das  $E_{260}/E_{280}$ -Verhältnis im Bereich von 1,5 – 1,8. Das Extinktionsverhältnis  $E_{260}/E_{230}$  zeigte für Extrakte aus der Nabelschnur die stärksten organischen Verunreinigungen auf, mit Werten zwischen 0,4 und 0,6. Für Extrakte aus Leber, Lunge, Herz, Darm und Muskel wurden Reinheitswerte im Bereich von 1,0 – 1,4 ermittelt. Die besten Reinheitswerte zeigten die Milz-Extrakte, deren  $E_{260}/E_{230}$ -Verhältnis im Bereich von 1,6 – 2,0 lagen.

Zur Überprüfung der Amplifizierbarkeit der isolierten DNA wurden zuerst PCR-Methoden angewandt, die auf Abschnitte des OTX2 Gens (OTX2 1.1 und OTX 3.0), des SHH Gens (SHH 2.0) und des PAX9 Gens (PAX 4.0) abzielten, deren Mutationen mit dem ODC-Phänotypen assoziiert wurden. Zur Optimierung der Amplifizierbarkeit wurden die Primersets mit unterschiedlichen Mastermixes (EpiTect HRM PCR MM, PyroMark PCR Kit MM und Hot Start Q5U-Polymerase MM) getestet. Die Ergebnisse zeigen, dass der PyroMark PCR Kit MM in Verbindung mit den Primerpaaren SHH 2.0 und PAX9 4.0 am häufigsten zur Bildung des gewünschten PCR-Produkts führte. Die Primerpaare OTX2 1.1 und OTX2 3.0, sowie der Hot Start Q5U-Polymerase MM waren für die Amplifikation der DNA-Extrakte nicht geeignet, was sich durch eine geringe Anzahl an amplifizierbaren Extrakten und eine Vielzahl an unspezifischen Produkten widerspiegelte. Die Überprüfung auf das gewünschte Produkt fand mit der Agarose-Gelelektrophorese und der HRM-Analyse statt. Mit diesen beiden Methoden wurden die Länge und die Schmelztemperatur der PCR-Produkte untersucht. Aufgrund der niedrigen, fluorometrisch ermittelten DNA-Konzentrationen (0,016 - 0,026 ng/ $\mu$ L) für **V2 F#003/Leber** und **V2 F#004/Leber**, welche aus dem Gewebe ODC-erkrankter, FF Föten stammen, konnte mit keiner der angewandten PCR-Methoden (OTX2 1.1 mit PyroMark PCR Kit MM; OTX2 1.1 mit Hot Start Q5U-Polymerase MM; MGMT mit EpiTect HRM PCR MM) ein Anstieg des Fluoreszenzsignals erreicht werden.

Um Herauszufinden, weshalb es bei vielen DNA-Extrakten von FF Gewebeproben zu keinem Anstieg der Fluoreszenz bei der rt-PCR kam, wurden Inhibitionsversuche mittels PCR-HRM durchgeführt. Durch diese konnte die Anwesenheit Polymerase-hemmender Substanzen ausgeschlossen werden. Zudem wurde die Integrität der isolierten DNA überprüft, indem die DNA-Extrakte in ein 1 % (w/v) Agarosegel eingebracht und aufgetrennt wurden. Die starke Schmierung der Banden wies auf eine stark fragmentierte DNA hin. Trotzdem konnte von allen DNA-Extrakten, für welche eine solche Bande am Gel beobachtet wurde, das richtige PCR-Produkt erhalten werden. Das lässt darauf schließen, dass die Integrität noch ausreichend gegeben war.

Zur Verbesserung der PCR-Amplifizierbarkeit wurde ein Optimierungsversuch bezüglich der Primer- und  $MgCl_2$  Konzentrationen durchgeführt. Die niedrigsten  $C_t$ -Werte wurden dabei mit einer Primerkonzentration von 0,8  $\mu$ M ohne weiteren Magnesiumzusatz erhalten.

Zur Vorbereitung der DNA-Extrakte auf die PSQ-Analyse, zeigte sich der btn Primer OTX2 1.1 als unbrauchbar, aufgrund der Bildung vieler unspezifischer Nebenprodukte. Um dennoch die Eignung der DNA-Extrakte für die SNP-Analyse zu überprüfen, wurde eine Methode angewandt, die in der Arbeitsgruppe etabliert war und die Bestimmung von drei SNPs des O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) Gens ermöglicht. [48] Infolgedessen konnten viele DNA-Extrakte, für die PCR-Produkte erhalten wurden, die das gleiche Schmelzverhalten aufwiesen wie die Positivkontrollen, einer erfolgreichen SNP-Analyse unterzogen werden, worunter sich auch zwei PCR-Produkte aus Extrakten des Lebergewebes von F3 befanden (**V13a** F3/Leber und **V16a** F3/Leber). Die Ergebnisse der PSQ-Analyse zeigten, dass es vor allem mit Hilfe der Hot Alkali-Extraktionsmethode möglich

war DNA von langzeit-konservierten Gewebspräparaten in ausreichender Menge und Reinheit zu isolieren, um eine Untersuchung des Genotyps vornehmen zu können.

Für zukünftige Versuche sollte weiterhin die Optimierung des Hot Alkali-Protokolls mit dem Ziel höherer DNA-Ausbeuten, sowie verbesserter Reinheitswerte im Mittelpunkt stehen. Letzteres könnte eventuell durch eine gründlichere Reinigung der Gewebeproben durch die Anwendung längerer Waschschrte mit PBS ermöglicht werden.

Zur Erhöhung der Amplifizierbarkeit könnte, vor der PCR-Analyse, eine Reparatur von beschädigten DNA-Strängen, nach deren Extraktion, vorgenommen werden. Die von Bonin *et al.* entwickelte „DNA-Restaurationsbehandlung“ ist eine Polymerase-Reaktion mit darauffolgendem Denaturierungsschritt. Mit dieser Methode werden Einzelstrang-Brüche der isolierten DNA aufgefüllt, wodurch die zu amplifizierenden DNA-Fragmente von 100 bp auf ca. 300 bp verlängert werden. [49]

Das Designen neuer Primersets sollte ebenfalls in Betrachtung gezogen werden, aufgrund der ungeeigneten Amplifikation mit Primerset 5 (btn OTX2 1.1). In weiterer Folge wäre das Designen eines Primers denkbar, mit welchem ODC assoziierte Mutationen der SNPs am PRRX1 Gen untersucht werden könnten. Analysen bezüglich dieser Genregion fanden bereits unter anderem in der Publikation von Patat *et al.* und von Sergi und Kamnasaran statt. [7,14]

## **7. Equipment**

### **7.1. Chemikalien und Kits**

|  |                          |
|--|--------------------------|
| 1 kb Plus DNA Marker                       | New England BioLabs      |
| 6x Gelladepuffer, Glycerin Orange G        | Roth                     |
| Agarose High Resolution                    | Roth                     |
| Ammonium Acetat (NH <sub>4</sub> Ac)       | SIGMA-Aldrich            |
| Borsäure                                   | MERCK                    |
| DNA Exitus Plus™ IF                        | AppliChem                |
| Dulbecco's Phosphate buffered saline (PBS) | gibco                    |
| EB Puffer                                  | Qiagen                   |
| EDTA (Titriplex III)                       | MERCK                    |
| EpiTect HRM PCR Kit                        | Qiagen                   |
| Ethanol (EtOH), abs.                       | MERCK                    |
| EvaGreen Farbstoff                         | Biotium                  |
| GelRed nucleic acid stain                  | SIGMA-Aldrich            |
| GlycoBlue™ Coprecipitant [15 mg/mL]        | Thermo Fisher Scientific |
| Low MW DNA Marker                          | New England BioLabs      |
| Millipore Water                            | -                        |
| Natriumchlorid (NaCl)                      | Jena Bioscience          |
| Natriumhydroxid (NaOH)                     | MERCK                    |
| Nuklease-freies H <sub>2</sub> O           | Qiagen                   |
| Primer                                     | SIGMA-Aldrich            |
| Proteinase K [20 mg/mL]                    | Qiagen                   |
| Proteinase K [20 mg/mL]                    | Analytik Jena            |
| PyroMark PCR Kit                           | Qiagen                   |
| PyroMarkQ24 Advanced CpG Reagents Kit      | Qiagen                   |
| PyroMark wash buffer, 10x                  | Qiagen                   |
| QIAamp®DNA Mini Kit                        | Qiagen                   |
| QIAamp®DNA FFPE Tissue Kit                 | Qiagen                   |

|   |                          |
|---|--------------------------|
| Qubit® dsDNA HS Assay Kit                         | Thermo Fisher Scientific |
| Reagent DX  | Qiagen                   |
| RNaseA [100 mg/mL]                                | Qiagen                   |
| RNaseA [100 mg/mL]                                | Macherey-Nagel           |
| Roti®-phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) | Roth                     |
| Sodium-dodecyl sulfate (SDS)                      | SIGMA-Aldrich            |
| Streptavidin sepharose high performance           | GE Healthcare            |
| DNA Taq Polymerase                                | Qiagen                   |
| Tris/HCl (Trizma base)                            | SIGMA-Aldrich            |

### 7.1.1. Herstellung von Lösungen

- **20% SDS-Lösung:**  
Lösen von 2 g SDS in 10 mL Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O
- **70% EtOH-Lösung:**  
7 mL abs. EtOH mit 3 mL Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O mischen
- **EtOH/NH<sub>4</sub>Ac (8:1):**  
35 mL abs. EtOH mit 5 mL einer 7,5M NH<sub>4</sub>Ac-Lösung mischen
- **7,5 M NH<sub>4</sub>Ac:**  
Lösen von 14,45 g NH<sub>4</sub>Ac in 25 mL Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O
- **2,26x TE9-Puffer:**  
0,226 mL 1M Tris, 0,452 mL 200mM EDTA und 0,452 mL 100 mM NaCl mischen und mit Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 2 mL auffüllen (0,870 mL)
- **0,075% R.DX-Lösung:**  
2667 µL ATL Puffer mit 2 µL R.DX mischen
- **0,05% R.DX-Lösung:**  
4000 µL ATL Puffer mit 2 µL R.DX mischen
- **0,1 M NaOH:**  
Lösen von 0,4 g NaOH in 100 mL Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O
- **0,1 M NaOH / 1% SDS Lösung:**  
20 mL 0,1 M NaOH-Lösung mit 1 mL 20% SDS mischen
- **10x TBE Puffer:**  
108 g Tris mit 55 g Borsäure in 750 mL destilliertem H<sub>2</sub>O unter Rühren komplett lösen und anschließend 7,5 g EDTA hinzufügen. Infolgedessen mit destilliertem H<sub>2</sub>O bis zur 1 L Marke auffüllen und den pH-Wert ermitteln, welcher idealerweise bei 8,3 liegen sollte. Die Lagerung der fertigen Lösung erfolgt bei RT.

- **0,5x TBE Puffer:**  
50 mL des 10x TBE Puffers mit destilliertem H<sub>2</sub>O auf 1 L auffüllen.

## 7.2. Apparaturen

|   |                          |
|---|--------------------------|
| Analytische Waage TE1502S               | Sartorius                |
| Analytische Waage TE214S                | Sartorius                |
| FastPrep-24™ 5G Tissue Homogenizer      | MP Biomedicals           |
| Fluorometer Qubit® 3.0                  | Thermo Fisher Scientific |
| Magnetrührer beheizbar IKAMAG® RCT      | IKA-Labortechnik         |
| Pipetten                                | Eppendorf, BioRad        |
| PowerPac HV High-Voltage Power Supply   | BioRad                   |
| PyroMark Q24 advanced instrument        | Qiagen                   |
| PyroMark vacuum workstation             | Qiagen                   |
| Rotor-Gene® Q                           | Qiagen                   |
| Spectrophotometer NanoDrop® 2000c       | Thermo Fisher Scientific |
| Thermocycler Rotor-Gene®                | Qiagen                   |
| ThermoMixer C (24 x 1,5 mL & 24 x 2 mL) | Eppendorf                |
| Thermomixer comfort                     | Eppendorf                |
| Trocken- und Wärmeschrank ED115         | Binder                   |
| UV Transilluminator UVT-20 M            | Herolab                  |
| Vortexmixer genie 2                     | Scientific Industries    |
| Vortexmixer classical advanced          | VELP Scientifica         |
| Vortexmixer VV3                         | VWR International        |
| Zentrifuge 5424                         | Eppendorf                |
| Zentrifuge 5910 Ri                      | Eppendorf                |
| Zentrifuge Biofuge 28RS (+ Rotor #3740) | Heraeus Sepatech         |
| Zentrifuge Galaxy Mini                  | VWR International        |
| Zentrifuge miniSpin plus                | Eppendorf                |

### 7.3. Verbrauchsmaterialien

|  |                                  |
|--|----------------------------------|
| iQ 96-well PCR Platte                  | Bio-Rad Laboratories             |
| Impact resistente Tubes (2,0 mL)       | Sarstedt                         |
| Lysing Matrix ¼“ Ceramic Sphere        | MP Biomedicals                   |
| Microseal® `B` adhesive seals          | Bio-Rad Laboratories             |
| Nadelspitzen                           | B. Braun                         |
| PCR Tubes (0,2 mL; steril)             | Bio-Rad Laboratories             |
| Petrischalen (60 x 15 mm)              | Eppendorf                        |
| Pipette Filter Spitzen (BRAND®Tip-Box) | VWR International, SIGMA-Aldrich |
| PyroMark Q24 Kartusche                 | Qiagen                           |
| PyroMark Q24 24-Well Platte            | Qiagen                           |
| Qubit® Assay Tubes                     | Thermo Fisher Scientific         |
| Reaktion Tubes (0,65 mL; steril)       | VWR International                |
| Reaktion Tubes (1,5 mL; steril)        | VWR International                |
| Reaktion Tubes (2,0 mL; steril)        | Eppendorf                        |
| Reaktion Tubes (5,0 mL; steril)        | Eppendorf                        |
| Strip Tubes + Kappen (0,1 mL)          | Qiagen                           |
| Skalpell (steril)                      | B. Braun                         |
| Zentrifugentubes (15,0 mL; steril)     | Thermo Fisher Scientific         |
| Zentrifugentubes (50,0 mL; steril)     | Sarstedt, Labcon                 |

### 7.4. Software

|                                     |                          |
|-------------------------------------|--------------------------|
| MATLAB R2022b                       | MathWorks                |
| Microsoft 365 ProPlus (Excel, Word) | Microsoft                |
| NanoDrop 2000/2000c Software        | Thermo Fisher Scientific |
| PyroMark Q24 Advanced 3.0.1         | Qiagen                   |
| Rotor-Gene® Q Series Software 2.3.1 | Qiagen                   |

## 8. Tabellenverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabelle 1:</b> Entnahme von verschiedenen Gewebstypen der verwendeten Föten.....   | 20 |
| <b>Tabelle 2:</b> Einstellungen zur Homogenisation mittels FastPrep-24 5G Tissue Homogenizer für alle Extraktionsverfahren.....   | 21 |
| <b>Tabelle 3:</b> Variation der Parameter ausgehend vom modifizierten QIAamp DNA Mini Kit Extraktionsprotokoll aus Kapitel 4.3.1. Verändert wurden dabei folgende Kenngrößen: Fötus/Gewebstyp, Art des Lysepuffers, Lysematrix, die Einstellungen bei der Zentrifugation der Spin Säule und die Inkubationszeit des Elutionspuffers (AE) vor Elution der DNA. ....  | 23 |
| <b>Tabelle 4:</b> Variation der Parameter ausgehend vom modifizierten QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Extraktionsprotokoll aus Kapitel 4.3.2. Verändert wurden dabei folgende Kenngrößen: Fötus/Gewebstyp, Waschschrift vor der Lyse, Art des Lysepuffers, Lysematrix, Lysezeit, Inkubationszeit bei RNA-Abbau, die Einstellungen bei der Zentrifugation der Spin Säule und die Inkubationszeit des Elutionspuffers (ATE) vor Elution der DNA. ....  | 24 |
| <b>Tabelle 5:</b> Variation der Parameter ausgehend vom modifizierten PC-Extraktionsprotokoll aus Kapitel 4.3.3. Verändert wurden dabei folgende Kenngrößen: Fötus/Gewebstyp, Waschschrift vor der Lyse und die Lysezeit. ....  | 26 |
| <b>Tabelle 6:</b> Variation der Parameter ausgehend vom Hot Alkali Protokoll aus Kapitel 4.3.4. Verändert wurden dabei folgende Kenngrößen: Fötus/Gewebstyp, Einwaage des Gewebes in mg, Waschschrift vor der Lyse, Volumina vom ATL Puffer, Prot. K und RNaseA, Hitzebehandlung bezogen auf Dauer und Temperatur mit und ohne Schütteln, Umkehrung der Formaldehyd-Modifikationen, zusätzlicher Waschschrift nach Zugabe von PC, sowie die Fällung der DNA bei unterschiedlichen Temperaturen und die Färbung der präzipitierten DNA. .... | 27 |
| <b>Tabelle 7:</b> Übersicht der eingesetzten nicht-biotinylierten Primerpaare PAX9 4.0, SHH 2.0, OTX2 1.1 und OTX2 3.0 hinsichtlich der erfassten SNPs, <i>Accession number</i> , Templat-Länge [bp], deren DNA-Sequenzen und T <sub>a</sub> [°C]. ....   | 33 |
| <b>Tabelle 8:</b> Angabe zur Herstellung der Verdünnungen eingesetzter DNA-Extrakte auf eine Konzentration von 5 ng/µL. ....  | 33 |
| <b>Tabelle 9:</b> Angaben zur Versuchsdurchführung mit der Kombination aus Primerset und Mastermix, sowie den eingesetzten Konzentrationen der DNA-Extrakte. ....   | 34 |
| <b>Tabelle 10:</b> Setup zur Herstellung des EpiTect HRM PCR MM unter Verwendung einer Primerkonzentration von 0,6 µM. ....   | 34 |
| <b>Tabelle 11:</b> Verwendetes Temperaturprogramm für PCR-Analysen von DNA-Extrakten, welche mit dem EpiTect HRM PCR MM und dem PyroMark PCR Kit MM amplifiziert wurden. ....   | 35 |
| <b>Tabelle 12:</b> Übersicht der verschiedenen Mastermix-Ansätze in Bezug auf die Primer- und MgCl <sub>2</sub> - Konzentrationen, unter Verwendung der Positivkontrolle HCC827 Erlo. ....  | 36 |
| <b>Tabelle 13:</b> Setup zur Herstellung des PyroMark PCR Kit MM pro Reaktionsansatz für unterschiedliche Primerkonzentrationen (0,6 µM und 0,8 µM) mit einem Gesamtvolumen   |    |



|   |     |
|---|-----|
| von 18 µL, wobei nachträglich eine Zugabe von 2 µL DNA-Extrakt zur PCR-Analyse erfolgte. ....   | 37  |
| <b>Tabelle 14:</b> Übersicht der eingesetzten btm Primerpaare OTX2 1.1 und 3 SNPs Assay hinsichtlich der erfassten SNPs, Templat-Länge [bp], deren DNA-Sequenzen und T <sub>a</sub> [°C]. Zusätzlich sind die Sequenzen der Sequenzierprimer angegeben. ....  | 39  |
| <b>Tabelle 15:</b> Volumina zur Herstellung des Mastermixes und des Primers pro Reaktionsansatz. ....   | 40  |
| <b>Tabelle 16:</b> C <sub>t</sub> -Werte, die bei Versuchen zur Auswahl einer geeigneten PCR-Methode und eines geeigneten Mastermixes (MM) erhalten wurden. Primersets: 3 und 4, Mastermixe: Hot Start Q5U-Polymerase MM, EpiTect HRM PCR MM und PyroMark PCR Kit MM. Positivkontrollen: HCC827 Erlo, C8. ....  | 43  |
| <b>Tabelle 17:</b> Ergebnisse der QIAamp DNA Mini Kit – Extraktionsmethode in Bezug auf Konzentration und Reinheit. ....  | 48  |
| <b>Tabelle 18:</b> C <sub>t</sub> -Werte, die durch die Amplifizierung unterschiedlich konzentrierter, mittels QIAamp DNA Mini Kit gewonnener DNA-Extrakte erhalten wurden. Primerset: 3 (OTX2 1.1); Mastermix: PyroMark PCR Kit MM; Positivkontrollen: HCC827 Erlo, C8. ....   | 50  |
| <b>Tabelle 19:</b> Ergebnisse der QIAamp DNA FFPE Tissue Kit – Extraktionsmethode in Bezug auf Konzentration und Reinheit. ....   | 53  |
| <b>Tabelle 20:</b> C <sub>t</sub> -Werte, die durch die Amplifizierung unterschiedlich konzentrierter, mittels QIAamp DNA FFPE Tissue Kit gewonnener DNA-Extrakte erhalten wurden. Primerset: 3 (OTX2 1.1); Mastermix: PyroMark PCR Kit MM; Positivkontrollen: HCC827 Erlo, C8. ....  | 55  |
| <b>Tabelle 21:</b> Ergebnisse der Phenol-Chloroform – Extraktionsmethode in Bezug auf Konzentration und Reinheit. ....  | 57  |
| <b>Tabelle 22:</b> C <sub>t</sub> -Werte, die durch die Amplifizierung unterschiedlich konzentrierter, mittels PC-Methode gewonnener DNA-Extrakte erhalten wurden. Primerset: 3 (OTX2 1.1); Mastermix: PyroMark PCR Kit MM; Positivkontrollen: HCC827 Erlo, C8. ....  | 58  |
| <b>Tabelle 23:</b> Ergebnisse der Hot Alkali – Extraktionsmethode in Bezug auf Konzentration und Reinheit. ....   | 62  |
| <b>Tabelle 24:</b> C <sub>t</sub> -Werte, die für die amplifizierten DNA-Extrakte der Positivkontrolle HCC827 Erlo mit verschiedenen RNaseA-Konzentrationen von unterschiedlichen Herstellern (Qiagen, Macherey-Nagel) erhalten wurden. Primerset 1 (PAX9 4.0); Mastermix: PyroMark PCR Kit MM. ....  | 73  |
| <b>Tabelle 25:</b> C <sub>t</sub> -Werte, die für die amplifizierten DNA-Extrakte der Positivkontrolle HCC827 Erlo mit verschiedenen Primer- und MgCl <sub>2</sub> Konzentrationen erhalten wurden. Die angegebenen C <sub>t</sub> -Werte sind Mittelwerte, welche anhand von Doppelbestimmungen berechnet wurden. Primerset 1 (PAX9 4.0); Mastermix: PyroMark PCR Kit MM. .... | 74  |
| <b>Tabelle 26:</b> Ermittelte Resultate aller zur PSQ herangezogenen PCR-Produkte. ....   | 83  |
| <b>Tabelle 27:</b> Setup zur Herstellung des Hot Start Q5U-Polymerase MM unter Verwendung einer Primerkonzentration von 0,6 µM. ....  | 104 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tabelle 28:</b> Verwendetes Temperaturprogramm für PCR-Analysen von DNA-Extrakten, welche mit dem Hot Start Q5U-Polymerase MM amplifiziert wurden.....                   | 105 |
| <b>Tabelle 29:</b> Setup zur Herstellung des EpiTect HRM PCR MM unter Verwendung einer Primerkonzentration von 0,2 µM und zwei unterschiedliche DNA-Endkonzentrationen..... | 105 |

## 9. **Abbildungsverzeichnis**

|   |    |
|---|----|
| <b>Abbildung 1:</b> Formalin-fixierter Fötus aus dem pathologisch-anatomischen Museum, welcher Missbildungen aufgrund des ODC aufweist. ....  | 2  |
| <b>Abbildung 2:</b> Darstellung eines DNA-Stranges mit den vier verschiedenen Nukleotiden; verändert nach [22]. ....  | 8  |
| <b>Abbildung 3:</b> Schema des Amplifikationsprozesses mit den einzelnen Schritten: 1 - Denaturierung, 2 - Annealing und 3 - Elongation; verändert nach [36]. ....  | 13 |
| <b>Abbildung 4:</b> Typische Amplifikationskurve einer rt-PCR, wobei die Fluoreszenz gegen die Anzahl der Zyklen aufgetragen wurde; verändert nach [38]. ....   | 14 |
| <b>Abbildung 5:</b> Schmelzdiagramm einer HRM-Analyse; verändert nach [41]. ....  | 16 |
| <b>Abbildung 6:</b> Wasserstoffbrücken der Basenpaarungen zwischen A-T und G-C; verändert nach [24]. ....   | 16 |
| <b>Abbildung 7:</b> Schmelzprofil eines PCR-Produkts im Vergleich zu einem unerwünschten Nebenprodukt mit geringerer $T_m$ . ....   | 17 |
| <b>Abbildung 8:</b> Beispielhafte Darstellung eines Pyrogramms; verändert nach [44]. ....   | 18 |
| <b>Abbildung 9:</b> Gewebesentnahme von langzeit-konservierten Föten ohne (links) und mit Gesichtsdysmorphien (rechts). ....  | 19 |
| <b>Abbildung 10:</b> FastPrep-24 5G Tissue Homogenizer. ....  | 21 |
| <b>Abbildung 11:</b> Matrix M, ¼“ Keramikkügelchen. ....  | 21 |
| <b>Abbildung 12:</b> Amplifikations- (links) und Schmelzkurven (rechts) für PCR-Produkte der DNA-Extrakte aus Leber- und Lungengewebe von Fötus F2 (Extraktion: V10a und V10b). Primerset 3 (OTX2 1.1), Hot Start Q5U-Polymerase MM. Positivkontrollen: HCC827 Erlo, C8. Zwei technische Replikate pro DNA-Extrakt. ....  | 42 |
| <b>Abbildung 13:</b> Amplifikationskurven für DNA-Extrakte aus Leber- und Lungengewebe von Fötus F2 (Extraktion: V10a und V10b) mit unterschiedlichen DNA-Konzentrationen (5 ng/µL, unverdünnt). Primerset 3 (OTX2 1.1) und 4 (OTX2 3.0), EpiTect HRM PCR MM und PyroMark PCR Kit MM. Positivkontrollen: HCC827 Erlo, C8. Zwei technische Replikate pro DNA-Extrakt. ....           | 45 |
| <b>Abbildung 14:</b> Schmelzkurven für PCR-Produkte der DNA-Extrakte aus Leber- und Lungengewebe von Fötus F2 (Extraktion: V10a und V10b) mit unterschiedlichen DNA-Konzentrationen (5 ng/µL, unverdünnt). Primerset 3 (OTX2 1.1) und 4 (OTX2 3.0), EpiTect HRM PCR MM und PyroMark PCR Kit MM. Positivkontrollen: HCC827 Erlo, C8. Zwei technische Replikate pro DNA-Extrakt. .... | 46 |
| <b>Abbildung 15:</b> Aufnahme eines 3% (w/v) Agarosegels unter UV Licht. Aufgetragen wurden amplifizierbare DNA- Extrakte aus Leber- und Lungengewebe von Fötus F2 (Extraktion: V10a und V10b). Primerset 3 (OTX2 1.1) und 4 (OTX2 3.0), EpiTect HRM PCR MM und PyroMark PCR Kit MM. Positivkontrollen: PCR-Produkt von HCC827 Erlo und C8. Marker: LMW DNA Marker. ....            | 47 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Abbildung 16:</b> Amplifikationskurven für DNA-Extrakte aus Lebergewebe von den Föten F2 (Extraktion: V1a, V1b), F#003 (Extraktion: V2) und F#004 (Extraktion: V2). Primerset 3 (OTX2 1.1), PyroMark PCR Kit MM. Positivkontrollen: HCC827 Erlo, C8. Zwei technische Replikate pro DNA-Extrakt. ....  | 50 |
| <b>Abbildung 17:</b> Schmelzkurven für die PCR-Produkte der DNA-Extrakte aus dem Lebergewebe von den Föten F2 (Extraktion: V1a, V1b), F#003 (Extraktion: V2) und F#004 (Extraktion: V2). Primerset 3 (OTX2 1.1), PyroMark PCR Kit MM. Positivkontrollen: HCC827 Erlo, C8. Zwei technische Replikate pro DNA-Extrakt.....   | 51 |
| <b>Abbildung 18:</b> Aufnahme eines 3% (w/v) Agarosegels unter UV Licht. Aufgetragen wurden amplifizierbare DNA- Extrakte aus Leber-, Lungen- und Gehirngewebe von Fötus F2 (Extraktion: V1a, V3, V6, V8, V9a, V9b, V11a, V11b und V11c). Primerset 3 (OTX2 1.1), PyroMark PCR Kit MM. Positivkontrollen: PCR-Produkt von HCC827 Erlo und C8. Marker: LMW DNA Marker. .... | 52 |
| <b>Abbildung 19:</b> Amplifikationskurven für DNA-Extrakte aus Leber- und Gehirngewebe von den Föten F2 (Extraktion: V3, V4a und V4b) und F3 (Extraktion: V4a und V4b). Primerset 3 (OTX2 1.1), PyroMark PCR Kit MM. Positivkontrollen: HCC827 Erlo, C8. Zwei technische Replikate pro DNA-Extrakt. ....   | 54 |
| <b>Abbildung 20:</b> Schmelzkurven der PCR-Produkte für DNA-Extrakte aus Leber- und Gehirngewebe von den Föten F2 (Extraktion: V3, V4a und V4b) und F3 (Extraktion: V4a und V4b). Primerset 3 (OTX2 1.1), PyroMark PCR Kit MM. Positivkontrollen: HCC827 Erlo, C8. Zwei technische Replikate pro DNA-Extrakt.....  | 56 |
| <b>Abbildung 21:</b> Amplifikationskurven für DNA-Extrakte aus Lebergewebe von den Föten F1 (Extraktion: V5 und V6), F2 (Extraktion: V6 und V7) und F3 (Extraktion: V6). Primerset 3 (OTX2 1.1), PyroMark PCR Kit MM. Positivkontrollen: HCC827 Erlo, C8. Zwei technische Replikate pro DNA-Extrakt. ....  | 58 |
| <b>Abbildung 22:</b> Schmelzkurven für PCR-Produkte der DNA-Extrakte aus Lebergewebe von den Föten F1 (Extraktion: V5 und V6), F2 (Extraktion: V6 und V7) und F3 (Extraktion: V6). Primerset 3 (OTX2 1.1), PyroMark PCR Kit MM. Positivkontrollen: HCC827 Erlo, C8. Zwei technische Replikate pro DNA-Extrakt. ....  | 59 |
| <b>Abbildung 23:</b> Amplifikationskurven für DNA-Extrakte aus Gehirn-, Leber-, Lungen-, Milz-, Herz-, Nabelschnur-, Darm- und Muskelgewebe von Fötus F2 (Extraktion: V8, V9a, V9b, V10a, V10b, V11a, V11b, V11c, V12). Primerset 3 (OTX2 1.1), PyroMark PCR Kit MM. Positivkontrollen: HCC827 Erlo, C8. Zwei technische Replikate pro DNA-Extrakt. ....                   | 67 |
| <b>Abbildung 24:</b> Schmelzkurven für PCR-Produkte der DNA-Extrakte aus Gehirn-, Leber-, Lungen-, Milz-, Herz-, Nabelschnur-, Darm- und Muskelgewebe von Fötus F2 (Extraktion: V8, V9a, V9b, V10a, V10b, V11a, V11b, V11c, V12). Primerset 3 (OTX2 1.1), PyroMark PCR Kit MM. Positivkontrollen: HCC827 Erlo, C8. Zwei technische Replikate pro DNA-Extrakt. ....         | 68 |
| <b>Abbildung 25:</b> Amplifikationskurven für DNA-Extrakte aus Milz-, Herz-, Nabelschnur-, Darm- und Muskelgewebe von Fötus F2 (Extraktion: V12). Primersets: 1 (PAX9 4.0), 2 (SHH 2.0) und 3 (OTX2 1.1); PyroMark PCR Kit MM. Positivkontrollen: HCC827 Erlo, C8. Zwei technische Replikate pro DNA-Extrakt. ....   | 69 |

- Abbildung 26:** Schmelzkurven der PCR-Produkte für DNA-Extrakte aus Milz-, Herz-, Nabelschnur-, Darm- und Muskelgewebe von Fötus F2 (Extraktion: V12). Primersets: 1 (PAX9 4.0), 2 (SHH 2.0) und 3 (OTX2 1.1); PyroMark PCR Kit MM. Positivkontrollen: HCC827 Erlo, C8. Zwei technische Replikate pro DNA-Extrakt.....70
- Abbildung 27:** Aufnahme eines 3% (w/v) Agarosegels unter UV Licht. Aufgetragen wurden amplifizierbare DNA- Extrakte aus Leber-, Milz-, Herz-, Nabelschnur-, Darm- und Muskelgewebe von Fötus F2 (Extraktion: V11a, V11b, V12) und F3 (Extraktion: V13b). Primersets: 1 (PAX9 4.0), 2 (SHH 2.0) und 3 (OTX2 1.1), PyroMark PCR Kit MM. Positivkontrollen: PCR-Produkt von HCC827 Erlo und C8. Marker: LMW DNA Marker.....70
- Abbildung 28:** Amplifikations- (links) und Schmelzkurven (rechts) der PCR-Produkte für DNA-Extrakte aus Großhirn-, Leber-, Lungengewebe von Fötus F3 (Extraktion: V9a, V13a, V13b, V14a, V14b, V14c, V15a, V15b, V16a, V16b). Primersets: 1 (PAX9 4.0), 2 (SHH 2.0) und 3 (OTX2 1.1), PyroMark PCR Kit MM. Positivkontrollen: HCC827 Erlo, C8. Zwei technische Replikate pro DNA-Extrakt. ....71
- Abbildung 29:** Amplifikationskurven für DNA-Extrakte der Positivkontrolle HCC827 Erlo mit Zusätzen von 0 µL, 2 µL, 4 µL, 6 µL und 8 µL RNaseA von unterschiedlichen Herstellern (Qiagen, Macherey-Nagel). Primerset 1 (PAX9 4.0), PyroMark PCR Kit MM. Zwei technische Replikate pro DNA-Extrakt. ....72
- Abbildung 30:** Schmelzkurven für die PCR-Produkte der DNA-Extrakte der Positivkontrolle HCC827 Erlo mit Zusätzen von 0 µL, 2 µL, 4 µL, 6 µL und 8 µL RNaseA von unterschiedlichen Herstellern (Qiagen, Macherey-Nagel). Primerset 1 (PAX9 4.0), PyroMark PCR Kit MM. Zwei technische Replikate pro DNA-Extrakt.....73
- Abbildung 31:** Amplifikations- (links) und Schmelzkurven (rechts) für PCR-Produkte der DNA-Extrakte der Positivkontrolle HCC827 Erlo mit Primerkonzentrationen 0,6 µM, 0,8 µM und 1 µM und MgCl<sub>2</sub>-Zusätzen von 0 mM, 1 mM und 2 mM. Primerset 1 (PAX9 4.0), PyroMark PCR Kit MM. Zwei technische Replikate pro DNA-Extrakt.....74
- Abbildung 32:** Aufnahme eines 1% (w/v) Agarosegels unter UV Licht. Aufgetragen wurden DNA-Extrakte aus Großhirn-, Leber-, Lungen-, Milz-, Darm- und Muskelgewebe von Fötus F1 (Extraktion: V6), F2 (Extraktion: V6, V7, V8, V9a, V9b, V10a, V10b, V12) und F3 (V6, V13a, V13b). Primerset Positivkontrollen: DNA-Extrakt und Amplikon von C8. Marker: LMW DNA Marker, 1kb Plus DNA Marker. ....75
- Abbildung 33:** Aufnahme eines 1% (w/v) Agarosegels unter UV Licht. Aufgetragen wurden DNA-Extrakte aus Großhirn-, Leber-, Lungengewebe von Fötus F1 (Extraktion: V5), F2 (Extraktion: V1a, V1b, V3, V4a, V4b, V10a, V10b, V11a, V11b, V11c) und F3 (V13a, V13b). Positivkontrollen: DNA-Extrakt und Amplikon von C8. Marker: LMW DNA Marker, 1kb Plus DNA Marker.....76
- Abbildung 34:** Amplifikations- (links) und Schmelzkurven (rechts) für PCR-Produkte der DNA-Extrakte der Positivkontrolle HCC827 Erlo mit Zusatz an DNA-Extrakten vom Großhirn-, Leber- und Lungengewebe der Föten F#003 (Extraktion: V2), F#004 (Extraktion: V2), F1 (Extraktion: V5, V6), F2 (Extraktion: V3, V6, V7, V11c) und F3 (Extraktion: V4a, V4b, V6, V9a, V13a, V13b). Primerset 2 (SHH 2.0), PyroMark PCR Kit MM. Positivkontrolle: HCC827 Erlo. Zwei technische Replikate pro DNA-Extrakt.....77

|  |    |
|--|----|
| <b>Abbildung 35:</b> Amplifikations- (oben) und Schmelzkurven (unten) für PCR-Produkte der DNA-Extrakte vom Großhirn-, Leber- und Lungen-, Milz-, Herz-, Nabelschnur-, Darm- und Muskelgewebe der Föten F2 (Extraktion: V1a, V3, V6, V8, V9a, V9b, V10a, V10b, V11a, V11b, V11c, V12) und F3 (Extraktion: V13b, V16b, V17a, V17b). Primerset 5 (btn-OTX2 1.1), PyroMark PCR Kit MM. Positivkontrollen: HCC827 Erlo, C8. Zwei technische Replikate pro DNA-Extrakt. ....  | 78 |
| <b>Abbildung 36:</b> Aufnahme eines 3% (w/v) Agarosegels unter UV Licht. Aufgetragen wurden PCR-Produkte der DNA- Extrakte aus Leber-, Milz-, Herz-, Nabelschnur-, Darm- und Muskelgewebe von Fötus F2 (Extraktion: V6, V8, V9a, V9b, V10a, V10b, V11a, V11b, V11c, V12). Primerset 5 (btn-OTX2 1.1), PyroMark PCR Kit MM. Positivkontrollen: PCR-Produkt von HCC827 Erlo und C8. Marker: LMW DNA Marker. ....   | 79 |
| <b>Abbildung 37:</b> Amplifikations- (oben) und Schmelzkurven (unten) für PCR-Produkte der DNA-Extrakte vom Großhirn-, Leber- und Lungen-, Milz-, Herz-, Nabelschnur-, Darm- und Muskelgewebe der Föten F1 (Extraktion: V5, V6), F2 (Extraktion: V1a, V1b, V3, V4a, V4b, V6, V7, V8, V9a, V9b, V10a, V10b, V11a, V11b, V11c, V12) und F3 (Extraktion: V13b, V16b, V17a, V17b). Primerset 6 (3 SNPs Assay), EpiTect HRM PCR MM. Positivkontrollen: HT29 EA, HCT116 ctl3. Zwei technische Replikate pro DNA-Extrakt. ....  | 80 |
| <b>Abbildung 38:</b> Amplifikations- (oben) und Schmelzkurven (unten) für PCR-Produkte der DNA-Extrakte vom Großhirn-, Leber- und Lungen-, Milz-, Herz-, Nabelschnurgewebe der Föten F#003 (Extraktion: V2), F#004 (Extraktion: V2), F1 (Extraktion: V5, V6), F2 (Extraktion: V1a, V1b, V3, V4a, V4b, V7, V8, V9b, V10b, V11a, V11b, V11c, V12) und F3 (Extraktion: V4a, V4b, V9a, V13a, V13b, V14a, V14b, V14c, V15a, V15b, V16a, V16b, V17a, V17b). Primerset 6 (3 SNPs Assay), EpiTect HRM PCR MM. Positivkontrollen: HT29 EA, HCT116 ctl3. Zwei technische Replikate pro DNA-Extrakt. .... | 81 |
| <b>Abbildung 39:</b> Stellvertretendes Pyrogramm eines PCR-Produkts (oben), welches in der HRM-Analyse nicht die richtige Schmelztemperatur zeigte (V12 F2/Milz mit 2 µL DNA-Zusatz; Abb. 37).....   | 82 |
| <b>Abbildung 40:</b> Stellvertretendes Pyrogramm eines PCR-Produkts (oben), welches in der HRM-Analyse die richtige Schmelztemperatur zeigte (V12 F2/Milz mit 5 µL DNA-Zusatz; Abb. 38). ....  | 82 |

## **Literaturverzeichnis**

- [1] Flores Bueso, Y., Walker, S. P., Hogan, G., Claesson, M. J. & Tangney, M. (2020). Protoblock-A biological standard for formalin fixed samples. *Microbiome*, 8 (122), 1–14. doi.org/10.1186/s40168-020-00901-1
- [2] Patzak, B., Winter, E. & Feigl, W. (2013). Lorenz Biermayer und die Entstehung der Pathologisch-anatomischen Sammlung im Wiener Narrenturm. *Wiener Medizinische Wochenschrift* 163 (13–14), 310–315. doi.org/10.1007/s10354-013-0211-7
- [3] Gaffney, E. F., Riegman, P. H., Grizzle, W. E. & Watson, P. H. (2018). Factors that drive the increasing use of FFPE tissue in basic and translational cancer research. *Biotechnic and Histochemistry*, 93(5), 373–386. doi.org/10.1080/10520295.2018.1446101
- [4] Do, H. & Dobrovic, A. (2015). Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues: Causes and strategies for minimization. *Clinical Chemistry* 61 (1), 64–71. American Association for Clinical Chemistry. doi.org/10.1373/clinchem.2014.223040
- [5] Praschinger, A. (2010). *Der Wiener Narrenturm. psychopraxis*, 5-6, Springer Verlag, 14–17.
- [6] nhw - Naturhistorisches Museum Wien. Die pathologisch-anatomische Sammlung. www.nhm-wien.ac.at/forschung/anthropologie/pathologisch-anatomische\_sammlung\_im\_narrenturm (30.01.2023)
- [7] Patat, O., Van Ravenswaaij-Arts, C. M. A., Tantau, J., Corsten-Janssen, N., Van Tintelen, J. P., Dijkhuizen, T., Kaplan, J. & Chassaing, N. (2013). Otocephaly-dysgnathia complex: Description of four cases and confirmation of the role of OTX2. *Molecular Syndromology*, 4(6), 302–305. doi.org/10.1159/000353727
- [8] Chassaing, N., Sorrentino, S., Davis, E. E., Martin-Coignard, D., Iacovelli, A., Paznekas, W., Webb, B. D., Faye-Petersen, O., Encha-Razavi, F., Lequeux, L., Vigouroux, A., Yesilyurt, A., Boyadjiev, S. A., Kayserili, H., Loget, P., Carles, D., Sergi, C., Puvabanditsin, S., Chen, C. P. & Jabs, E. W. (2012). OTX2 mutations contribute to the otocephaly-dysgnathia complex. *Journal of Medical Genetics*, 49(6), 373–379. doi.org/10.1136/jmedgenet-2012-100892
- [9] Jones, M., Chung, J., Kimonis, V. & Gold, J. A. (2017). A novel mutation of orthodenticle homeobox 2 contributing to a case of otocephaly initially diagnosed by prenatal ultrasound in the first trimester. *Clinical Dysmorphology*, 26(2), 98–100. doi.org/10.1097/MCD.0000000000000145
- [10] Nanni, L., Ming, J. E., Bocian, M., Steinhaus, K., Bianchi, D. W., De Die-Smulders, C., Giannotti, A., Imaizumi, K., Jones, K. L., Del Campo, M., Martin, R. A., Meinecke, P., Pierpont, M. E. M., Robin, N. H., Young, I. D., Roessler, E. & Muenke, M. (1999). The mutational spectrum of the Sonic Hedgehog gene in holoprosencephaly: SHH mutations cause a significant proportion of autosomal dominant holoprosencephaly. *Human Molecular Genetics*, 8(13), 2479–2488. doi.org/10.1093/hmg/8.13.2479

- [11]** Roessler, E., Belloni, E., Gaudenz, K. et al. (1996). Mutations in the human Sonic Hedgehog gene cause holoprosencephaly. *Nature Genetics*, 14(3), 357–360. doi.org/10.1038/ng1196–357
- [12]** Dubourg, C., Bendavid, C., Pasquier, L., Henry, C., Odent, S. & David, V. (2007). Holoprosencephaly. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 2(1), 1–14. doi.org/10.1186/1750-1172-2-8
- [13]** Beby, F. & Lamonerie, T. (2013). The homeobox gene *Otx2* in development and disease. *Experimental Eye Research* 111, 9–16. doi.org/10.1016/j.exer.2013.03.007
- [14]** Sergi, C. & Kamnasaran, D. (2011). Letter to the Editor: *PRRX1* is mutated in a fetus with agnathia-otocephaly. *Clinical Genetics* 79, 293-295. doi.org/10.1111/j.1399-0004.2010.01531.x
- [15]** Sperber G.H. & Sperber S.M. (2016). The Role of Genetics in Craniofacial Biology. *Austin Dental Sciences* 1(1), 1004.
- [16]** Wagner, C. (2020). Master thesis: Extraction of genomic DNA from formalin-fixed and ethanol-fixed, long-term stored museal tissue with regard to SNP analysis in foetuses with Otocephaly-Dysgnathia Complex. University of Vienna. 29–41, 64–72.
- [17]** Lang, G. (2013). *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*, 2. Auflage, Springer-Verlag, 40–77.
- [18]** Nagai, M., Minegishi, K., Komada, M., Tsuchiya, M., Kameda, T., & Yamada, S. (2016). Extraction of DNA from human embryos after long-term preservation in formalin and Bouin's solutions. *Congenital Anomalies*, 56(3), 112–118. doi.org/10.1111/cga.12148
- [19]** Shi, S.-R., Cote, R. J., Wu, L., Liu, C., Datar, R., Shi, Y., Liu, D., Lim, H. & Taylor, C. R. (2002). DNA Extraction from Archival Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissue Sections Based on the Antigen Retrieval Principle: Heating Under the Influence of pH. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 50(8), 1005–1011. doi: 10.1177/002215540205000802
- [20]** Shi, S. R., Datar, R., Liu, C., Wu, L., Zhang, Z., Cote, R. J. & Taylor, C. R. (2004). DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: Heat-induced retrieval in alkaline solution. *Histochemistry and Cell Biology*, 122(3), 211–218. doi.org/10.1007/s00418-004-0693-x
- [21]** Paireder, S., Werner, B., Bailer, J., Werther, W., Schmid, E., Patzak, B. & Cichna-Markl, M. (2013). Comparison of protocols for DNA extraction from long-term preserved formalin fixed tissues. *Analytical Biochemistry*, 439(2), 152–160. doi.org/10.1016/j.ab.2013.04.006
- [22]** Müllhardt, C. (2013). *Der Experimentator - Molekularbiologie Genomics*, 7. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 3–5, 105. doi: 10.1007/978-3-642-34636-1



- [23] Lang, G. (2013). Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik. 2. Auflage, Springer-Verlag, 29–30. doi.org/10.1007/978-3-7091-1190-1
- [24] Graw, J. (2020). Lehrbuch: Genetik. 7. Auflage, Springer-Verlag GmbH Deutschland, 27–29, 38–41. doi.org/10.1007/978-3-662-60909-5
- [25] Gey, M.H. (2021). Lehrbuch: Instrumentelle Analytik und Bioanalytik - Biosubstanzen, Trennmethoden, Strukturanalytik, Applikationen. 4. Auflage, Springer-Verlag GmbH Deutschland, 25–28. doi.org/10.1007/978-3-662-63952-8
- [26] Amorim, A., Fernandes, T. & Taveira, N. (2019). Mitochondrial DNA in human identification: A review. PeerJ 7. doi.org/10.7717/peerj.7314
- [27] Clark, D.P. & Pazdernik, N.J. (2009). Molekulare Biotechnologie - Grundlagen und Anwendung. Spektrum-Verlag Heidelberg, 240–242. DOI 10.1007/978-3-8274-2189-0\_1
- [28] Busch, U. (2010). Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik - Grundlegende Methoden und Anwendungen. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 22–23. DOI 10.1007/978-3-642-10716-0
- [29] Jansohn, M. & Rothhämel, S. (2012). Gentechnische Methoden – Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 9–10, 68–69, 135–137, 167.
- [30] Roth. Technische Info. Phenolische DNA Aufreinigung - Hintergrund und Protokoll (nach Sambrook, J. & Russell, W. (2001). Molecular Cloning, 3. Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York. [www.carlroth.com/medias/Infobroschuere-PhenolischeAufreinigung-DE.pdf?context=bWFzdGVyfHRIY2huaWNhbERvY3VtZW50c3wzMzA4MDB8YXBwbGljYXRob24vcGRmfHRIY2huaWNhbERvY3VtZW50cy9oYzMvaGFhLzkwMzQ5NjU1MTYzMTgucGRmfGZiMzBINDViOGNkMzZhZjM1NTg0ODcwZjA5NTI5YzZjY2Q3NmFIZTcwOWNjMTJlZWFiYjU2ZDNjY2ZhNDgwYml](http://www.carlroth.com/medias/Infobroschuere-PhenolischeAufreinigung-DE.pdf?context=bWFzdGVyfHRIY2huaWNhbERvY3VtZW50c3wzMzA4MDB8YXBwbGljYXRob24vcGRmfHRIY2huaWNhbERvY3VtZW50cy9oYzMvaGFhLzkwMzQ5NjU1MTYzMTgucGRmfGZiMzBINDViOGNkMzZhZjM1NTg0ODcwZjA5NTI5YzZjY2Q3NmFIZTcwOWNjMTJlZWFiYjU2ZDNjY2ZhNDgwYml) (29.01.2023)
- [31] QIAGEN. QIAprep Spin Miniprep Columns. [www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/lab-essentials/plastics/qiaprep-spin-miniprep-columns/](http://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/lab-essentials/plastics/qiaprep-spin-miniprep-columns/) (29.09.2022)
- [32] ThermoFisher Scientific. Complete sample intelligence - NanoDrop One Spectrophotometer and Qubit 3 Fluorometer. [www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FFLSG%2Fbrochures%2Fnanodrop-spectrophotometer-qubit-fluorometer-brochure.pdf](http://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FFLSG%2Fbrochures%2Fnanodrop-spectrophotometer-qubit-fluorometer-brochure.pdf) (21.09.2022)
- [33] Botev, I. (1979). A new conception of Bouguer-Lambert-Beer's law. Fresenius' Zeitschrift Für Analytische Chemie, 297(5), 419. doi.org/10.1007/BF00480903

- [34] Matlock, B. (2015). Assessment of Nucleic Acid Purity. Technical Note 52646. Thermo Fisher Scientific. [tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf) (26.01.2023)
- [35] Müller, H.-J. & Prange, D. R. (2016). PCR-Polymerase-Kettenreaktion. 2. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2–7, 23–24. DOI 10.1007/978-3-662-48236-0
- [36] Wikimedia. Polymerase chain reaction. [commons.wikimedia.org/wiki/File:Polymerase\\_chain\\_reaction.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Polymerase_chain_reaction.svg) (14.09.2022)
- [37] Biotium. What is the difference between EvaGreen and SybrGreen? [biotium.com/faqs/what-is-the-difference-between-evagreen-and-sybr-green/](https://www.biotium.com/faqs/what-is-the-difference-between-evagreen-and-sybr-green/) (14.09.2022)
- [38] BAG DIAGNOSTICS. Real-Time PCR in der Diagnostik. [www.bag-diagnostics.com/de/technologie\\_pcr.html](https://www.bag-diagnostics.com/de/technologie_pcr.html) (15.09.2022)
- [39] Bruhn, H.D. (2008). LaborMedizin - Indikationen, Methodik und Laborwerte. Pathophysiologie und Klinik. Schattauer Verlag. 177. ISBN 978-3-7945-2550-8
- [40] Gressner, A. M. & Arndt, T. (2019). Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. 3. Auflage, Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2121. [doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4](https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4)
- [41] QIAGEN. Rotor-Gene® Q MDx User Manual (US), (2018). High Resolution Melt Analysis. Content 11-1. Qiagen GmbH Hilden. [www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=8ffc3e1a-de32-42f4-8bf6-beaf61692145&lang=en](https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=8ffc3e1a-de32-42f4-8bf6-beaf61692145&lang=en) (26.01.2023)
- [42] Harrington, C. T., Lin, E. I., Olson, M. T. & Eshleman, J. R. (2013). Fundamentals of pyrosequencing. Archives of Pathology and Laboratory Medicine 137(9), 1296–1303. [doi.org/10.5858/arpa.2012-0463-RA](https://doi.org/10.5858/arpa.2012-0463-RA)
- [43] Saeed, F. et al. (2012). Bioinformatics and Computational Biology - Lecture Notes in Bioinformatics. Multiple Sequence Alignment System for Pyrosequencing Reads. Information Technologies in Biomedicine, 362–365.
- [44] QIAGEN. Pyrosequencing Technology and Platform Overview. [www.qiagen.com/us/knowledge-and-support/knowledge-hub/technology-and-research/pyrosequencing-resource-center/pyrosequencing-technology-and-platform-overview](https://www.qiagen.com/us/knowledge-and-support/knowledge-hub/technology-and-research/pyrosequencing-resource-center/pyrosequencing-technology-and-platform-overview) (27.09.2022)
- [45] Sambrook, J. & Russell, W. (2006). Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform. Cold Spring Harbor Protocols, 4455. doi: 10.1101/pdb.prot.4455.

- [46]** Hykin, S. M., Bi, K. & McGuire, J. A. (2015). Anhang zu: Fixing formalin: A method to recover genomic-scale DNA sequence data from formalin-fixed museum specimens using high-throughput sequencing: Protocol for Experimental Extraction of hDNA from Formalin-fixed Herpetological Museum Specimens. PLOS ONE, 10(10), 1–16. doi:10.1371/journal.pone.0141579
- [47]** QIAGEN. PyroMark Q24 Advanced and PyroMark Q24 Advanced CpG Reagents Handbook, (2013). [www.qiagen.com/de-us/search/products?query=www%20qiagen%20com%20handbuch%20rotor%20gene%20Q%20MDx](http://www.qiagen.com/de-us/search/products?query=www%20qiagen%20com%20handbuch%20rotor%20gene%20Q%20MDx)
- [48]** Zappe, K., Pirker, C., Miedl, H., Schreiber, M., Heffeter, P., Pfeiler, G., Hacker, S., Haslik, W., Spiegl-Kreinecker, S. & Cichna-Markl, M. (2021). Discrimination between 34 of 36 possible combinations of three C>T SNP genotypes in the MGMT promoter by high resolution melting analysis coupled with pyrosequencing using a single primer set. International Journal of Molecular Sciences, 22(22), 1–28. doi.org/10.3390/ijms222212527
- [49]** Bonin, S., Petrera, F., Niccolini, B. & Stanta, G. (2003). PCR analysis in archival postmortem tissues. Journal of Clinical Pathology - Molecular Pathology, 56(3), 184–186. doi.org/10.1136/mp.56.3.184

## Anhang

### A. Herstellung des Mastermixes (MM) mit dem Hot Start Q5U-Polymerase MM für die PCR-Analysen samt Temperaturprogramm

Tabelle 27: Setup zur Herstellung des Hot Start Q5U-Polymerase MM unter Verwendung einer Primerkonzentration von 0,6  $\mu\text{M}$ .

| Reagenzien   | c(Primer)                           |
|--|-------------------------------------|
|  | 0,6 $\mu\text{M}$                   |
|  | Volumina pro Well [ $\mu\text{L}$ ] |
| Nuklease-freies $\text{H}_2\text{O}$                     | 10,0                                |
| 5x Q5U Reaktionspuffer                                   | 4,0                                 |
| 20x EvaGreen Farbstoff                                   | 1,0                                 |
| fw Primer [10 $\mu\text{M}$ ]                            | 1,2                                 |
| rv Primer [10 $\mu\text{M}$ ]                            | 1,2                                 |
| dNTP Mix [10nM]  | 0,4                                 |
| Q5U [2000 U/mL]  | 0,2                                 |
| <b>Totales Volumen [<math>\mu\text{L}</math>]</b>        | 18                                  |
| <i>DNA-Extrakt [<math>\mu\text{L}</math>]</i>            | 2                                   |
| <b>Gesamtvolumen per Well [<math>\mu\text{L}</math>]</b> | 20                                  |

Tabelle 28: Verwendetes Temperaturprogramm für PCR-Analysen von DNA-Extrakten, welche mit dem Hot Start Q5U-Polymerase MM amplifiziert wurden.

|                  | Schritt                                    | Zeit      | Temperatur [°C]  | Wiederholung |
|------------------|--|-----------|------------------|--------------|
| <i>Hold 1</i>    | Denaturierung & Aktivierung der Polymerase | 30 sec    | 98               | -            |
|                  | Denaturierung                              | 5-10 sec  | 98               |              |
| <i>Cycling 1</i> | Annealing                                  | 20 sec    | T <sub>a</sub> * | 50 Zyklen    |
|                  | Elongation                                 | 20-30 sec | 72               |              |
| <i>Hold 2</i>    | Finale Elongation                          | 5 min     | 72               |              |
| <i>Hold 3</i>    | Denaturierung                              | 1 min     | 95               | -            |
| <i>Hold 4</i>    | Strangpaarung                              | 1 min     | 40               |              |
| <i>HRM</i>       | HRM  | -         | 65 - 95          | 0,05 °C/sec  |

\* T<sub>a</sub> des verwendeten Primers

## B. Herstellung des Mastermixes (MM) mit dem EpiTect HRM PCR MM für die PCR-Amplifikation vor der PSQ-Analyse

Tabelle 29: Setup zur Herstellung des EpiTect HRM PCR MM unter Verwendung einer Primerkonzentration von 0,2 µM und zwei unterschiedliche DNA-Endkonzentrationen.

| Reagenzien                         | c(Primer)<br>0,2 µM    |      |
|------------------------------------|------------------------|------|
|                                    | Volumina pro Well [µL] |      |
| Nuklease-freies H <sub>2</sub> O   | 9,5                    | 6,5  |
| fw Primer [10 µM]                  | 0,5                    | 0,5  |
| rv Primer [10 µM]                  | 0,5                    | 0,5  |
| 2x EpiTect HRM PCR MM              | 12,5                   | 12,5 |
| <b>Totales Volumen [µL]</b>        | 23                     | 20   |
| <i>DNA-Extrakt [µL]</i>            | 2                      | 5    |
| <b>Gesamtvolumen per Well [µL]</b> | 25                     | 25   |

## **Zusammenfassung**

Der Otozephalie-Dysgnathia Komplex (ODC) ist eine tödliche Erkrankung humaner Föten, welche sich durch ausgeprägte Gesichtsdysmorphien auszeichnet. Da die Krankheit selten auftritt, weiß man über die genetischen Veränderungen, die ODC verursachen, noch relativ wenig.

Im Wiener Narrenturm gibt es langzeit-konservierte Feuchtpräparate von Föten mit ODC als auch Föten, die nicht an ODC erkrankt waren. Um diese für genetische Untersuchungen heranziehen zu können, ist es notwendig, DNA in ausreichender Reinheit und Quantität isolieren zu können. Es ist bekannt, dass die DNA-Isolierung, insbesondere aus langzeit-Formalin eingelagerten Proben schwierig ist, da es aufgrund von stabilen Methylenbrücken zur Quervernetzung von Proteinen und der DNA kommt.

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Optimierung der DNA-Extraktion aus langzeit-konservierten, fetalen Gewebeproben in Hinblick auf den Erhalt hoher Mengen, hoher Reinheit und hoher Ausbeuten an isolierter DNA, um nachfolgende genetische Analysen zu ermöglichen. Zur Studie wurden verschiedene Gewebstypen herangezogen, darunter Herz, Leber, Lunge, Milz, Magen, Muskeln, Nabelschnur, Großhirn und Kleinhirn. Die Konzentration und Reinheit der isolierten DNA wurde photometrisch und fluorometrisch bestimmt. Die DNA-Extrakte wurden einer Real time-PCR unterzogen. Die Identität der Amplikons wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese, hochauflösender Schmelzkurven (HRM)-Analyse und Pyrosequenzierung (PSQ) überprüft.

Die Hot Alkali Extraktion eignete sich am besten zur Isolierung intakter DNA. Dadurch konnten sowohl die DNA-Extrakte von alkoholisch-fixierten als auch von FF, fetalen Geweben ohne ODC amplifiziert und viele PCR-Produkte sequenziert werden. Dennoch war eine reproduzierbare Amplifikation vieler DNA-Extrakte nicht möglich, wodurch es weiterer Modifizierungen bedarf. Von den an ODC-erkrankten Föten war durch den Erhalt geringer DNA-Ausbeuten und/oder aufgrund fragmentierter DNA keine PCR-Amplifikation möglich.

## ***Abstract***

Otocephaly-dysgnathia complex (ODC) is a fatal disease of human fetuses characterised by marked facial dysmorphic disorders. Because the disease is rare, there is still a lack of knowledge about the genetic mutations that cause ODC.

The Fool's tower of Vienna contains long-term fixed wet preparations of fetuses with and without ODC. A prerequisite for using them for genetic studies is to isolate DNA in sufficient purity and quantity. However, it is known that DNA isolation, especially from long-term formalin stored samples, is difficult due to cross-linking of proteins and DNA caused by stable methylene bridges.

The aim was to optimize extraction of DNA from long-term preserved fetuses with regard to achieve high amounts, high purity and high yields to allow downstream genetics analyses. The study involved different tissue types: heart, liver, lung, spleen, stomach, muscles, umbilical cord, cerebrum and cerebellum. Concentration and purity of the isolated DNA was determined photometrically and fluorometrically. DNA extracts were subjected to real time PCR, the identity of the amplicons was verified by agarose gel electrophoresis, high resolution melting (HRM) and pyrosequencing (PSQ).

The hot alkali extraction was the most suitable method for isolating intact DNA. DNA extracts from both alcohol-fixed and FF fetal tissues without ODC could be successfully amplified and many PCR products could be sequenced. However, reproducible amplification of many extracts was not possible, which requires further modifications. PCR amplification of the fetuses with ODC failed due to very low DNA yields and/or due to fragmented DNA.