



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„PCR-Amplifizierbarkeit von DNA aus Formalin
fixierten Geweben“

Verfasser

Stefan Paireder

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat)

Wien, April 2010

Studienkennzahl lt.

Studienblatt: A 419

Studienrichtung lt.

Studienblatt: Diplomstudium Chemie

Betreuerin / Betreuer:

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

Danksagung

Auf diesem Weg möchte ich mich bei jenen Menschen bedanken, die an der Entstehung dieser Arbeit einen beträchtlichen Anteil haben.

Allen voran möchte ich mich bei meiner Diplomarbeitsbetreuerin, Frau Ao. Univ.-Prof. Dr. Margit Cichna-Markl für die freundliche, kompetente und intensive Betreuung bedanken. Bei Fragen und Problemen war sie mit Rat und Tat zur Stelle und hatte immer aufbauende Worte parat, wenn ich nahe daran war zu verzweifeln.

Der Direktorin des pathologisch-anatomischen Bundesmuseums Wien, Frau Dr. Beatrix Patzak, bin ich für die Bereitstellung der Museumspräparate sowie für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit zu großem Dank verpflichtet.

Für die Einführung in die „Kunst der Gewebefixierung“ und für die zur Verfügung gestellten fixierten Proben möchte ich mich bei Herrn Dr. Josef Bailer recht herzlich bedanken.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, möchte ich für den Rückhalt, der mich im Laufe meines Studiums begleitet hat, ganz besonders danken. Für die finanzielle Unterstützung, ohne die dieses Studium in dieser Form nicht möglich gewesen wäre, kann ich nicht oft genug Danke sagen.

Meinen Kolleginnen in der Arbeitsgruppe, besonders Christina und Tazeen, danke ich für das gute Arbeitsklima und die schöne Zeit, die wir zusammen im Labor verbracht haben.

Meinen Freunden Martin, Thomas, Harald, Markus und Christian, mit denen mich eine langjährige Freundschaft verbindet, möchte ich dafür danken, dass wir immer in Kontakt geblieben sind und ich dadurch stets mit Freude an meine Studienzeit zurückdenken werde.

Meinen Studienkolleginnen und Kollegen, die mich auf dem Weg durch das Studium begleitet haben, danke ich für die geselligen Stunden an und abseits der Universität. Besonders möchte ich Steffi, Christian und Connie, die mit mir viele Prüfungen überstanden und mich mit ihrem Elan immer wieder angetrieben haben, danken.

Ein besonderer Dank gebührt Melanie, die stets aufbauende Worte für mich parat hatte, und mit unbändiger Geduld meine Launen ertragen hat. Ich bin froh, dass sich unsere Wege im Labor gekreuzt haben.

Zu guter Letzt gilt mein Dank auch Herbert, dessen körperlicher Einsatz diese Arbeit erst ermöglicht hat.

Herzlichen Dank!

Wien, April 2010

Stefan Paireder

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Problemstellung.....	1
1.2	Zielsetzung und Methode.....	2
1.3	Exkurs: Das pathologisch-anatomische Bundesmuseum – Die Geschichte des Wiener Narrenturms	3
2	THEORETISCHER TEIL	6
2.1	Histotechnik	6
2.1.1	Prozesse nach dem Zelltod	6
2.1.2	Fixierung von Geweben	7
2.1.3	Fixiermittel	8
2.1.4	Formaldehyd als Fixiermittel	9
2.2	DNA – Speicher der Erbinformation.....	13
2.2.1	DNA-Struktur	13
2.3	DNA-Extraktion	16
2.4	DNA-Konzentrationsbestimmung	18
2.5	Polymerasekettenreaktion (PCR)	20
2.5.1	PCR-Ablauf.....	21
2.5.2	Kriterien für eine erfolgreiche PCR	22
2.6	REAL-TIME PCR.....	25
2.6.1	SYBR [®] Green Assay.....	27
2.6.2	TaqMan Assay	29
2.6.3	Auswertung.....	30
2.6.4	Primer- und Sondendesign	32
2.7	Forschungsstand auf dem Gebiet von Formalin fixierten Geweben.....	35

3	EXPERIMENTELLER TEIL	39
3.1	Proben	39
3.1.1	Porzine Gewebeproben	39
3.1.2	Humane Gewebeproben.....	39
3.2	Fixierung von porzinem Herzgewebe.....	40
3.2.1	Fixierung nach Kaiserling.....	40
3.2.2	Fixierung mit Neutralformol.....	41
3.2.3	Fixierung mittels der Museumsmethode	41
3.3	DNA-Extraktion	42
3.3.1	Reagenzien.....	44
3.3.2	Homogenisierung der Gewebeproben	45
3.3.3	DNA-Extraktion mittels CTAB-Methode	45
3.3.4	Abgewandelte CTAB-Methoden zur Optimierung der DNA- Extraktion	46
3.3.5	Hot Alkaliextraktion	49
3.3.6	DNA-Extraktion mit dem QIAamp® DNA Mini Kit	49
3.3.7	DNA-Extraktion mit dem QIAamp® DNA FFPE Kit.....	50
3.3.8	Vermeidung von Kontaminationen	51
3.4	Bestimmung der Konzentration und Reinheit der isolierten DNA.....	52
3.5	REAL-TIME PCR.....	52
3.5.1	Primer und Sonden	53
3.5.2	Pipettierschema	55
3.5.3	PCR-Assays	56
3.5.4	Entwicklung einer Real-Time PCR-Methode zur Amplifikation von DNA aus porzinem Gewebe.....	57
3.5.5	Entwicklung einer Real-Time PCR-Methode zur Amplifikation von DNA aus humanen Geweben	62

4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	66
4.1	DNA-Extraktion	66
4.1.1	DNA-Extraktion aus nicht fixiertem porzinem Gewebe	66
4.1.2	DNA-Extraktion aus Formalin fixiertem porzinem Gewebe	69
4.1.3	DNA-Extraktion aus nicht fixiertem humanem Gewebe	79
4.1.4	DNA-Extraktion aus fixiertem humanem Gewebe.....	82
4.2	Entwicklung einer Real-Time PCR-Methode zur Amplifikation der DNA aus Formalin fixiertem porzinem Gewebe	93
4.2.1	Primer und Sonden	93
4.2.2	Optimierung der Annealingtemperatur und der Primerkonzentration.....	94
4.2.3	Optimierung der Sondenkonzentration	96
4.2.4	Bestimmung der Effizienz	97
4.2.5	Anwendung der entwickelten Methode auf fixiertes porzines Gewebe	99
4.3	Entwicklung einer Real-Time PCR-Methode zur Amplifikation der DNA aus Formalin fixiertem humanem Gewebe	102
4.3.1	Primer und Sonden	102
4.3.2	Optimierung der Annealingtemperatur und der Primerkonzentration.....	103
4.3.3	Optimierung der Sondenkonzentration	106
4.3.4	Bestimmung der Effizienz	109
4.3.5	Anwendung der entwickelten Methoden zur Amplifikation von DNA aus fixierten Museumspräparaten	111
4.4	Schlussfolgerungen aus den erzielten Ergebnissen.....	114
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	115
6	ABSTRACT.....	117

7	ANHANG.....	119
7.1	Abkürzungen.....	119
7.2	Chemikalienliste	120
7.3	Verwendete Geräte	120
7.4	Abbildungsverzeichnis.....	121
7.5	Tabellenverzeichnis.....	123
7.6	Literaturverzeichnis.....	125
8	CURRICULUM VITAE	128

1 EINLEITUNG

1.1 Problemstellung

Mit der Entwicklung der Gewebefixierung zu Beginn des 19. Jahrhunderts wurde es möglich, ganze Organe, Körperteile, Missbildungen und krankheitsbedingte körperliche Veränderungen für die Nachwelt zu erhalten. Diese dienten in der Folge als Anschauungs- und Ausbildungsobjekte für angehende MedizinerInnen und leisteten somit eine wertvolle Hilfestellung für das Verständnis des menschlichen Körpers sowie für viele Entwicklungen im Bereich der Medizin. Dadurch entstanden ganze Sammlungen von Präparaten, die mitunter bis heute bestehen und ausgestellt sind.

Der Nutzen dieser Präparate reicht bis in die heutige Zeit. Durch die technische Weiterentwicklung in den letzten Jahrzehnten ist es heute möglich, bis zu den Bausteinen aller Organismen, den Zellen, ja sogar noch weiter bis zur DNA, dem Speicherort der Erbinformationen, vorzudringen. Geht man davon aus, dass man aus diesen Präparaten intakte DNA extrahieren kann, so eröffnen solche Sammlungen einen immens großen Pool an „alter DNA“ für zukünftige Genstudien. Daraus könnten wiederum wertvolle Erkenntnisse über Gendefekte und Erbkrankheiten gewonnen werden.

Nach dem heutigen Wissensstand führt Formaldehyd, ein häufig verwendetes Fixiermittel, zu einer Quervernetzung von Proteinen und Nukleinsäuren. Dies schützt Gewebe zwar einerseits vor Verwesung, führt aber andererseits auch zu einer beträchtlichen Schädigung der DNA. Die Frage ist nun, ob es möglich ist, dennoch intakte, mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifizierbare DNA aus fixierten Geweben zu isolieren, stellt dies doch den Ausgangspunkt jeder Genstudie dar.

In der Vergangenheit wurden bereits effektive Methoden zur Extraktion von DNA aus Formalin fixierten Geweben [Savioz, A. et al. 1997; Santos, S. et al. 2009] sowie einige PCR-Methoden für DNA aus Formalin fixierten Geweben [Dedhia, P. et al. 2007; Santos, M. C. et al. 2008] publiziert.

Was bisher jedoch noch fehlt, ist die Untersuchung von sehr alten Proben aus oben genannten Sammlungen.

Durch die Kooperation mit dem pathologisch-anatomischen Bundesmuseum Wien, auf das im Kapitel 1.3 noch näher eingegangen wird, war es im Rahmen dieser Diplomarbeit möglich, Gewebeproben aus Formalin fixierten Feuchtpräparaten zu untersuchen, die teilweise aus dem 19. Jahrhundert stammen. Damit sind diese Proben wesentlich älter als die in den bisher publizierten Forschungsarbeiten untersuchten Formalin fixierten tierischen und humanen Gewebe, die meist frisch konserviert oder maximal 50 Jahre alt waren.

1.2 Zielsetzung und Methode

Das Hauptziel der vorliegenden Diplomarbeit war es, Methoden zu entwickeln und zu optimieren, um DNA aus humanen, Formalin fixierten Museumspräparaten in ausreichender Qualität und Menge extrahieren und die Amplifizierbarkeit der extrahierten DNA mittels real-time PCR überprüfen zu können.

Zur Extraktion sollte eine in unserer Arbeitsgruppe häufig angewandte Methode, verschiedene bereits publizierte Extraktionsmethoden sowie kommerziell erhältliche DNA-Extraktionskits getestet und bei Bedarf im Hinblick auf eine höhere Ausbeute und/oder eine höhere Reinheit der DNA optimiert werden. Um die Amplifizierbarkeit der extrahierten DNA testen zu können, sollte im Rahmen der Diplomarbeit eine real-time PCR-Methode zur Bestimmung von humaner DNA entwickelt werden.

Da jedoch keine Information über die angewandten Methoden zur Konservierung der Museumspräparate verfügbar war, sollte auch DNA aus Geweben, welche unter definierten Bedingungen konserviert worden waren, extrahiert und deren Amplifizierbarkeit untersucht werden. Zu diesem Zweck sollte ein Schweineherz im Rahmen der Diplomarbeit mittels dreier Konservierungsmethoden konserviert und analysiert werden. Weiters sollten Schweineherzproben untersucht werden, die von Herrn Dr. Josef Bailer, einem Mitarbeiter der Forschungsgruppe von Univ. Prof. Erich Schmid, bereits im Jahr 2007 mit denselben drei Konservierungsmethoden konserviert worden waren. Um die Amplifizierbarkeit der aus den

konservierten Schweineherzen extrahierten DNA testen zu können, sollte eine real-time PCR-Methode zur Bestimmung von porciner DNA entwickelt und optimiert werden.

Da die in dieser Diplomarbeit verwendeten Proben dem pathologisch-anatomischen Museum entstammen und die Grundlage der vorliegenden Arbeit bilden, wird im folgenden Kapitel in einem Exkurs auf das Museum und auf die Geschichte des Narrenturms näher eingegangen.

1.3 Exkurs: Das pathologisch-anatomische Bundesmuseum – Die Geschichte des Wiener Narrenturms

Das pathologisch-anatomische Bundesmuseum in Wien ist eine der größten und ältesten pathologischen Präparatesammlungen. Auf knapp 3000 m² in 5 Stockwerken bewundern im Jahr ca. 20.000 BesucherInnen unterschiedlichste Präparate, viele davon über 200 Jahre alt. Die gesamte Sammlung umfasst in etwa 50.000 Objekte. Aufgrund der Größe der Sammlung ist so gut wie jede bekannte Konservierungsart vertreten. Den größten Anteil macht die Gruppe der Feuchtpräparate aus, gefolgt von Trockenpräparaten, Gerbungen und Plastinationen. Vom anatomischen Standpunkt betrachtet sind nicht nur ganze Organe und Körperteile vorhanden, sondern auch unterschiedlichste Krankheitsbilder, morphologische Organveränderungen sowie genetisch bedingte Missbildungen. Auch Fremdsammlungen, die überwiegend aus Krankenhauspathologien stammen und dem Museum zur Verfügung gestellt wurden, sind ausgestellt [Patzak, B. 2009].

Das Museum befindet sich heute im Wiener Narrenturm. Aufgrund der sehr bewegten Geschichte dieses Gebäudes, welches als erste Psychiatrie in Europa gilt, gibt es wohl keinen geeigneteren Standort für eine derart außergewöhnliche Sammlung. War der Narrenturm in früheren Zeiten ein Ort, an dem Menschen, die nicht der Norm entsprachen, behandelt wurden, so beherbergt er heute eine Ausstellung der etwas anderen Art. Faszination und Ekel lagen damals wie heute eng beisammen [Patzak, B. 2009].

Der Narrenturm steht im 13. Hof des Wiener Universitätscampus. Seine Erbauung geht auf die Zeit Kaiser Joseph II. zurück. Dieser wollte das damalige Sanitätswesen reformieren und plante die Errichtung des größten und modernsten Krankenhauses von Europa. Auf diese Weise entstand das Allgemeine Krankenhaus zur „Aufnahme und Heilung“ [Patzak, B. 2009].

Neben dem eigentlichen Krankenhaus ließ er aber auch ein Gebärhaus sowie eine Irrenanstalt, den Narrenturm, planen. Man kann den Narrenturm als erste errichtete Psychiatrie Europas ansehen, wenngleich sich dieses Fachgebiet erst ab Beginn des 19. Jahrhunderts entwickelte. Doch schon damals kannte man „Krankheitsbilder“ wie Schwermut, Wahnwitz und Manie, die man durch Behandlungen wie Aderlass, Schröpfung und Verabreichung von Brech- und Abführmitteln behandelte und somit für heilbar hielt. Nach der Fertigstellung 1784 wurden zunächst 109 Kranke in den Narrenturm überstellt. Schon kurze Zeit später kam es immer wieder zu Überfüllungszuständen [Patzak, B. 2009].

Die Behandlung der Patienten im Narrenturm konnte Tage bis Wochen, aber auch einige Jahre dauern. Zunächst hatten die Zimmer im Narrenturm keine Türen, sodass sich PatientInnen mit leichteren Symptomen frei im Gebäude bewegen konnten. Aggressive PatientInnen wurden hingegen in ihren Zimmern angekettet. Später wurden die Zimmer schließlich mit Türen mit Sichtfenstern ausgestattet. Als geheilt galt ein/e PatientIn dann, wenn ihr/ihm für sich und ihre/seine Umwelt keine Gefahr mehr attestiert wurde [Patzak, B. 2009].

Ab 1795 hatte der Narrenturm einen eigenen Direktor. Dieser veranlasste den Bau einer Mauer um den Narrenturm, um einerseits Schaulustige fern zu halten, andererseits Gartenanlagen für die PatientInnen errichten zu können. 1803 wurde dem Narrenturm das „Lazareth“ zugewiesen. Dieses befand sich in der heutigen Währinger Straße und diente in weiterer Folge als eine Art Quarantänestation. Einreisende mussten sich dort melden und untersuchen lassen. Ziel war es, dadurch das Ausbrechen von Seuchen zu verhindern. Noch später entstand eine 3. Abteilung, der sogenannte Dreiguldenstock. Er diente der Behandlung wohlhabender Patienten [Patzak, B. 2009].

Schließlich wurde 1817 eine weitere Außenstelle in Ybbs mit Verwalter, Wärtern und Arzt gegründet. Sie diente der Verwahrung unheilbar Kranker.

Ab 1828 gab es im Allgemeinen Krankenhaus ein eigenes Aufnahmezimmer für „Wahnsinnige“, in denen die Kranken von einem Arzt untersucht und anschließend an die entsprechende Abteilung überwiesen wurden. Ab dem Winter 1844 wurde es DoktorandInnen der Medizin ermöglicht, theoretischen und praktischen Unterricht im Narrenturm zu besuchen. 1864 wurde eine neue Psychiatrie am Brünnefeld errichtet, wodurch in weiterer Folge im Narrenturm nur mehr unheilbare und hoffnungslose Fälle aufgenommen wurden [Patzak, B. 2009].

1864 sind der Narrenturm sowie die Gebärenanstalt in den Besitz des Landes Niederösterreich übergegangen. Schließlich wurde er 1870 an den Krankenanstaltenfond verkauft. Mit dem Verkauf wurde der Betrieb des Narrenturms eingestellt und seine Aufgaben von anderen Krankenanstalten, wie jener in Gugging, übernommen. Ursprünglich sollte der Narrenturm abgerissen werden, stand dann aber lange Zeit leer und wurde 1920 nach Renovierung als Schwesternwohnheim für Krankenschwestern des Allgemeinen Krankenhauses genutzt, bis man dort während des 2. Weltkrieges Ärztedienstwohnungen installierte. Seit 1971 beherbergt der Narrenturm das pathologisch-anatomische Museum. Der zunächst zugewiesene Platz erwies sich bald als zu klein, sodass beschlossen wurde, weitere Räume dem Museum zu Verfügung zu stellen. 1993 übersiedelten schließlich die letzten Einrichtungen des Allgemeinen Krankenhauses in das neue Gebäude am Gürtel und der Narrenturm wurde dem pathologisch-anatomischen Bundesmuseum zur Miete überlassen [Patzak, B. 2009].

2 THEORETISCHER TEIL

In den folgenden Kapiteln werden die theoretischen Grundlagen zur vorliegenden Diplomarbeit erläutert. Insbesondere wird dabei auf die Prozesse nach dem Zelltod, die eine Fixierung des Gewebes erforderlich machen, sowie auf die Grundlagen der Gewebefixierung eingegangen. In weiterer Folge wird die Theorie zum Aufbau und zur Extraktion der DNA erörtert und grundsätzliche Kriterien der PCR sowie Basisvoraussetzungen für eine erfolgreiche Real-Time PCR behandelt.

2.1 Histotechnik

2.1.1 Prozesse nach dem Zelltod

Wird die Sauerstoffversorgung einer Zelle unterbrochen, setzt der Zelltod ein. Dadurch kommt es im Gewebe zu morphologischen Veränderungen, die man als Nekrose bezeichnet. Diese umfasst eine Reihe von parallel ablaufenden Prozessen:

- ❖ *Anschwellen der Zellen*
- ❖ *Denaturierung von Proteinen (Koagulation)*

Dabei wird das Zytoplasma zunächst homogen und azidophil. Nach länger andauerndem Prozess sind Zellkernveränderungen und amorphe granuläre Trümmerzonen zu beobachten.

- ❖ *Autolyse (Kolliquation)*

Unter Autolyse versteht man die Selbstverdauung der Zellen durch körpereigene Enzyme. Es handelt sich dabei hauptsächlich um hydrolytische Enzyme aus den Lysosomen, die Proteine und Kohlenhydrate spalten.

Die Autolyse ist abhängig von der Temperatur und läuft gemäß dem Temperaturoptimum der Enzyme bei 34 bis 40 °C am schnellsten ab [Bankl, H. et al. 1996]. Es ist aber auch der Enzymreichtum des Gewebes mitentscheidend. So sind enzymreiche Gewebe wie Gehirn, Leber und Nieren stärker von einer Autolyse be-

troffen als andere Gewebe. Durch Kühlung des Gewebes kann man der Autolyse kurzfristig entgegenwirken [Bankl, H. et al. 1996].

Sind an den enzymatischen Abbauvorgängen bakterielle Enzyme beteiligt, spricht man von Fäulnis. Diese Bakterien stammen aus dem Darm und kommen auf der Hautoberfläche vor. Sie bewirken einen reduktiven Abbau der Gewebe zu einfachen Abbauprodukten wie Ammoniak, Kohlen- und Schwefelwasserstoffen sowie Wasserstoff und Kohlendioxyd. Die Fäulnis ist stark von äußeren Einflüssen wie Temperatur und Feuchtigkeit abhängig. [Bankl, H. et al. 1996].

Die oxydative Zersetzung von organischen und stickstoffhaltigen Stoffen durch Bakterien bezeichnet man als Verwesung. Die Verwesung setzt im Anschluss an die Fäulnis ein und führt im Wesentlichen zu Endprodukten wie Wasser, Ammoniak, Kohlendioxyd, Nitraten und Sulfaten [Bankl, H. et al. 1996].

2.1.2 Fixierung von Geweben

Die Fixierung wird in der Histotechnik eingesetzt, um die in Kapitel 2.1.1 beschriebenen Prozesse zu stoppen bzw. auf ein Minimum zu reduzieren. Dabei kommen nicht nur verschiedene Fixierlösungen zum Einsatz, auch durch Erhitzen, Gefriertrocknen oder Einfrieren des Gewebes kann eine Stabilisierung erreicht werden. Durch die Vielzahl an unterschiedlichen Fixiermitteln und Methoden ist man in der Lage, die gewünschte Methode für den jeweiligen Zweck auszuwählen. Dadurch kann man auch mittels Fixierung spezielle Strukturen, Enzyme und Zellsubstanzen erhalten [Lang, G. 2006].

Prinzipiell unterscheidet man die Immersionsfixierung und die Perfusionsfixierung. Bei der Immersionsfixierung wird der Gewebeteil in die entsprechende Fixierlösung eingelegt, während bei der Perfusionsfixierung das Fixiermittel über das Blutgefäßsystem in das Gewebe gelangt [Lang, G. 2006].

Für eine erfolgreiche Fixierung gibt es neben dem verwendeten Fixiermittel vor allem zwei Hauptfaktoren: Temperatur und Zeit. Zwischen der Gewebeentnahme und der Fixierung sollte möglichst wenig Zeit verstreichen. Eine herabgesetzte Temperatur, wie die Lagerung im Kühlschrank, bewirkt die Verlangsamung der Autolyse und somit des Gewebeverfalls. Allerdings verläuft bei niedrigeren Tem-

peraturen auch die Fixierung langsamer. Aus diesem Grund wird die Fixierung meist bei Raumtemperatur durchgeführt [Lang, G. 2006].

Die Qualität der Fixierung ist ebenfalls von der Größe des zu fixierenden Gewebes abhängig. Fixiermittel haben unterschiedliche Eindringgeschwindigkeiten, was bei dicken Gewebestücken dazu führen kann, dass das Zentrum nicht mit dem Fixiermittel in Kontakt kommt und somit dort weiterhin Autolyse stattfindet. Bei größeren Gewebestücken muss demzufolge, abhängig von der Eindringgeschwindigkeit des Fixiermittels, die Fixierzeit verlängert werden. Allerdings darf man die Fixierzeit nicht mit dem Durchdringen des Gewebes mit Fixierlösung gleichsetzen. Formaldehyd weist beispielsweise eine hohe Eindringgeschwindigkeit auf und bindet rasch an Proteine. Quervernetzungen und somit die Fixierung des Gewebes entstehen aber erst später [Lang, G. 2006].

Ein weiterer, für die Qualität der Fixierung entscheidender Faktor ist der pH Wert. Fixierlösungen funktionieren in einem pH Bereich von 7,2 bis 7,6 (physiologischer pH Bereich) am Besten. Aus diesem Grund verwenden viele Fixiermethoden gepufferte Fixierlösungen, wobei darauf zu achten ist, dass der verwendete Puffer nicht mit dem Fixiermittel reagiert, da dies die Fixierfähigkeit wiederum behindern kann [Lang, G. 2006].

Durch die Fixierung erhält man ein Abbild der natürlichen Form des fixierten Gewebes. Auch die besten Fixiermittel verändern allerdings die natürliche Form des Gewebes zumindest geringfügig. So kann es z.B. durch osmotische Effekte zur Quellung und Schrumpfung des Gewebes kommen. Sofern man aber gleiche Gewebeteile mit gleichen Methoden fixiert, kann man davon ausgehen, dass sich zum Beispiel die Struktur der Gewebeteile bei einer Anfärbung gleich darstellt [Lang, G. 2006].

2.1.3 Fixiermittel

Die Anforderungen an ein gutes Fixiermittel sind umfangreich. So soll es:

- Eine hohe Eindringgeschwindigkeit und eine kurze Fixierdauer besitzen.
- Das Gewebe bis zu einem gewissen Grad härten.

- Die Autolyse der Zellen stoppen.
- Die räumliche Struktur des Gewebes erhalten.
- Struktur und Zellbestandteile bewahren.
- Den Nachweis von Strukturen und Zellsubstanzen ermöglichen.
- Reproduzierbare Ergebnisse erzielen.
- Für eine große Anzahl unterschiedlicher Gewebe anwendbar sein.
- Variabel bezüglich der Temperatur und der Fixierdauer sein.
- Möglichst nicht gesundheitsschädlich und problemlos zu entsorgen sein.
- Billig und einfach in der Anwendung sein.

Wie bereits im Kapitel 2.1.2 angedeutet, gibt es kein Fixiermittel, das alle diese Anforderungen vollständig erfüllt. Je nach dem gewünschten Ziel wählt man das entsprechende Fixiermittel aus, muss aber dessen mögliche Nachteile in Kauf nehmen.

Eines der am häufigsten eingesetzten Fixiermittel ist eine wässrige Formaldehydlösung. Insbesondere neutralgepufferte wässrige Formaldehydlösungen finden besonders oft eine Anwendung. [Lang, G. 2006]

2.1.4 Formaldehyd als Fixiermittel

2.1.4.1 Eigenschaften

Formaldehyd ist im Handel unter den Namen Methanal, Oxomethan, Oxymethylen und Methylenoxyd erhältlich.

Formaldehyd zählt zur Gruppe der aliphatischen Aldehyde mit einem Siedepunkt von -19,5 °C. In wasserfreiem Zustand ist es ein stechend riechendes, farbloses Gas. Die Dämpfe sind brennbar und in Verbindung mit Luft explosionsgefährlich. Formaldehyd ist bei Raumtemperatur in Wasser und Ethanol löslich, in Aceton und Diethylether sehr gut löslich. Da es bereits bei geringen Verunreinigungen zu polymerisieren beginnt, kommt es im Handel in drei Hauptformen vor:

- Formalin: 37-40%ige wässrige Lösung von Formaldehydgas mit 10-15 Gewichtsprozent Methanol zur Stabilisierung. Dies ist die höchstmögliche Konzentrierung und wird auch als 100% Formalin bezeichnet.
- Paraformaldehyd: Festes Polymer aus Formaldehyd, weißes kristallines Pulver, das beim Eindampfen von Formalinlösung entsteht.
- 1,3,5 Trioxan: Cyclisches, symmetrisches Trimer, das durch saure, katalysierte Umsetzung von Formaldehyd entsteht [Römpp online2001].

2.1.4.2 Wirkungsweise

Formaldehyd zählt zu den proteinvernetzenden Fixiermitteln. Es denaturiert die Proteine kaum und erhält zum Großteil die Sekundärstruktur, wodurch die Aktivität von Enzymen und Antigenstrukturen zum Teil erhalten bleiben [Lang, G. 2006].

Formaldehyd bindet an unterschiedliche Stellen von Proteinen, wodurch es zur Bildung von Halbacetalen mit freien Hydroxymethylgruppen kommt. Diese Gruppen sind nun in der Lage, Quervernetzungen mit anderen funktionellen Gruppen der Proteine herzustellen. Hauptsächlich sind dies Verbindungen zwischen ϵ -Amino-Gruppen von Lysin und der Aminogruppe des Proteins. Das gesamte Netz wird über Methylenbrücken, die über Schiff'sche Basen als Übergangsstadium gebildet werden, stabilisiert. Dadurch kommt es zu einer Härtung des Gewebes. Während des Fixationsprozesses wird das Fixativ verbraucht, sodass die fixierende Wirkung schwächer wird. pH-Werte über 8 sollten vermieden werden, weil im alkalischen Milieu viele funktionelle Gruppen sehr reaktionsträge sind. Formaldehyd, das an Protein gebunden ist, aber nicht weiterreagiert hat, kann durch Einlegen in Wasser entfernt werden. Dadurch wird eine extreme Härtung des Gewebes verhindert [Lang, G. 2006].

Andere Gewebebestandteile werden durch Formaldehyd ebenfalls beeinflusst. Enzyme wie Dehydrogenasen, Transferasen und Lyasen reagieren sehr empfindlich während Hydrolasen und Peroxydasen relativ stabil sind. Niedermolekulare Kohlenhydrate werden aus dem Gewebe gelöst, hochmolekulare hingegen in kleinen Mengen im Proteinnetz eingebettet. Lipide werden hingegen kaum herausgelöst [Lang, G. 2006].

Durch die Fixierung kommt es zu geringen Schrumpfungen des Gewebes. Außerdem ist eine Verfärbung von blutrot zu grau-braun und eine Änderung der Konsistenz von weich zu druckelastisch zu beobachten. [Lang, G. 2006]

2.1.4.3 Eindringgeschwindigkeit, Fixierungszeit und Konzentrationen

Die Eindringgeschwindigkeit von Formalinlösungen beträgt ungefähr 1 mm/h. Sie hängt jedoch von der Temperatur, der Konzentration und der Gewebebeschaffenheit ab. Die Fixierkraft nimmt entlang der Eindringrichtung ab, da die Formaldehydmoleküle mit dem Gewebe reagieren und dadurch verbraucht werden. Im Gegensatz zur Eindringgeschwindigkeit läuft die Vernetzungsreaktion bei Formaldehyd langsam ab. Nach etwa 24 Stunden ist eine ausreichende Vernetzung gegeben, für eine vollständige Fixierung ist jedoch eine Fixierdauer von ein bis zwei Wochen bei Raumtemperatur nötig. In vielen Fällen, z.B. wenn man Gewebeteile anfärben will, ist eine vollständige Fixierung unerwünscht, weil dabei dafür notwendige funktionelle Gruppen blockiert werden [Lang, G. 2006].

Die Formaldehydkonzentrationen der gängigen Fixiermittel belaufen sich auf 4-10%. Da die 37-40%ige Formaldehydlösung als 100% Formalin bezeichnet wird, enthält eine 10%ige Formalinlösung demzufolge ca. 4% Formaldehyd. [Lang, G. 2006]

2.1.4.4 Rezepturen für Formalin basierende Fixative

Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln angedeutet, gibt es eine Vielzahl unterschiedlichster Fixiermittel, welche es nach Zweck der Fixierung sowie Art und Zustand des zu fixierenden Gewebes auszuwählen gilt.

Die Basis aller auf Formalin basierenden Fixative ist eine 4-10%ige Formaldehydlösung.

Dies stellt gleichzeitig die einfachste Fixierlösung dar. Sie wird in der Regel aus einer 40%igen Formaldehydlösung durch Verdünnen mit Wasser im Verhältnis 1 Teil Formalin: 9 Teile Wasser hergestellt. Da diese Art der Fixierung derzeit im

pathologisch-anatomischen Museum angewendet wird, wird sie im weiteren Verlauf dieser Diplomarbeit als „Museumsmethode“ bezeichnet.

Ein Fixativ, das in der heutigen Zeit sehr oft eingesetzt wird, ist eine neutralgepufferte Formaldehydlösung, die auch als „Neutralformol“ bezeichnet wird. Dabei wird im Gegensatz zur Museumsmethode anstelle von Wasser eine Natriumphosphatpufferlösung mit einem neutralen pH Wert verwendet. Das Mengenverhältnis von Formalin zu Pufferlösung beträgt auch hier 1 zu 9. [Lang, G. 2006]

Eine der ältesten bekannten Fixierungsmethoden ist die Methode nach Kaiserling. Bei dieser Fixierung bleibt die natürliche Farbe der Präparate im Gegensatz zu anderen Methoden erhalten. Das Rezept hierfür lautet:

1000 ml H₂O_{dest}

200 ml Formalin 40%ig

30 g Kaliumacetat

15 g Kalisalpeter

[Echsel, H. und Rácek, M. 1976]

Zum Wiedererlangen der natürlichen Farbe wird das Präparat anschließend in 80%igem Alkohol eingelegt, bis die ursprüngliche Farbe wieder erreicht ist. Dann wird das Präparat in einer Aufbewahrungslösung gelagert. Diese besteht aus:

1000 ml H₂O_{dest}

200 ml Glycerin

200 g Kaliumacetat

[Echsel, H. und Rácek, M. 1976]

Je nach Rezept können der Basislösung Zusätze zugegeben werden.

Glutaraldehyd hat eine langsamere Eindringgeschwindigkeit, bewirkt aber eine feinmaschigere Vernetzung, wodurch das Gewebe stärker gehärtet wird.

Osmiumtetroxyd extrahiert Proteine und Kohlenhydrate und bewirkt eine Quervernetzung. Es wird vor allem zur Fixierung von Lipiden verwendet.

Quecksilberchlorid wird in Verbindung mit Chromsalzen eingesetzt und führt zur starken Schrumpfung des Gewebes sowie zu ausgeprägter Rindenbildung.

Chromsalze wiederum verfestigen Proteine durch eine primäre Stabilisierung, die dann durch Formaldehyd-Quervernetzung gefestigt wird. Diese stabilisierende Wirkung gilt aber nicht für Nukleinsäuren.

Alkohole und Aceton führen zu einem Wasserentzug und einer Zerstörung der Tertiärstruktur der Proteine, sie erhalten aber die Aminosäuresequenz. Zusätzlich werden Fette extrahiert.

Pikrinsäure dringt langsam ein, führt aber zu keiner Härtung des Gewebes. Allerdings erfolgt durch ihren niedrigen pH-Wert eine Hydrolyse von Nukleinsäuren.

Essigsäure führt zur Denaturierung von Nukleinsäuren, wirkt aber nicht fixierend auf Proteine. Sie führt weiters zum Anschwellen des Zytoplasmas. Darum wird es eingesetzt, um der Gewebeschrumpfung entgegenzuwirken [Lang, G. 2006].

2.2 DNA – Speicher der Erbinformation

Die Basis allen Lebens ist die in den Genen jeder lebenden Zelle gespeicherte genetische Information. Mit der Entdeckung der Desoxyribonukleinsäure (DNA) im Jahr 1940 und ihrer Strukturaufklärung 1953 durch J. Watson und F. Crick begann die Entschlüsselung des genetischen Codes. Seither konnte die moderne Genetik unzählige Bausteine zum besseren Verständnis des „Wunders Leben“ erschließen [Alberts, B. et al. 2004].

2.2.1 DNA-Struktur

Ein DNA-Molekül wird aus zwei langen Polynukleotidketten gebildet, die zusammen in einer Doppelhelixstruktur angeordnet sind. Diese Ketten bestehen wiederum aus vier unterschiedlichen Nukleotiden. Der Zusammenhalt der beiden Ketten wird durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen der Nukleotide gewährleistet. [Alberts, B. et al. 2004]

Das Grundgerüst der jeweiligen Nucleotide ist der Zucker Desoxyribose mit einer angehängten Phosphatgruppe sowie je einer der Basen Adenin (A), Cytosin (C), Thymin (T) und Guanin (G). Durch kovalente Bindung von Zucker und Phosphatgruppe sind die einzelnen Nucleotide aneinander gebunden und bilden so eine Polynucleotidkette mit einem Zuckerphosphatrückgrat. [Alberts, B. et al. 2004]

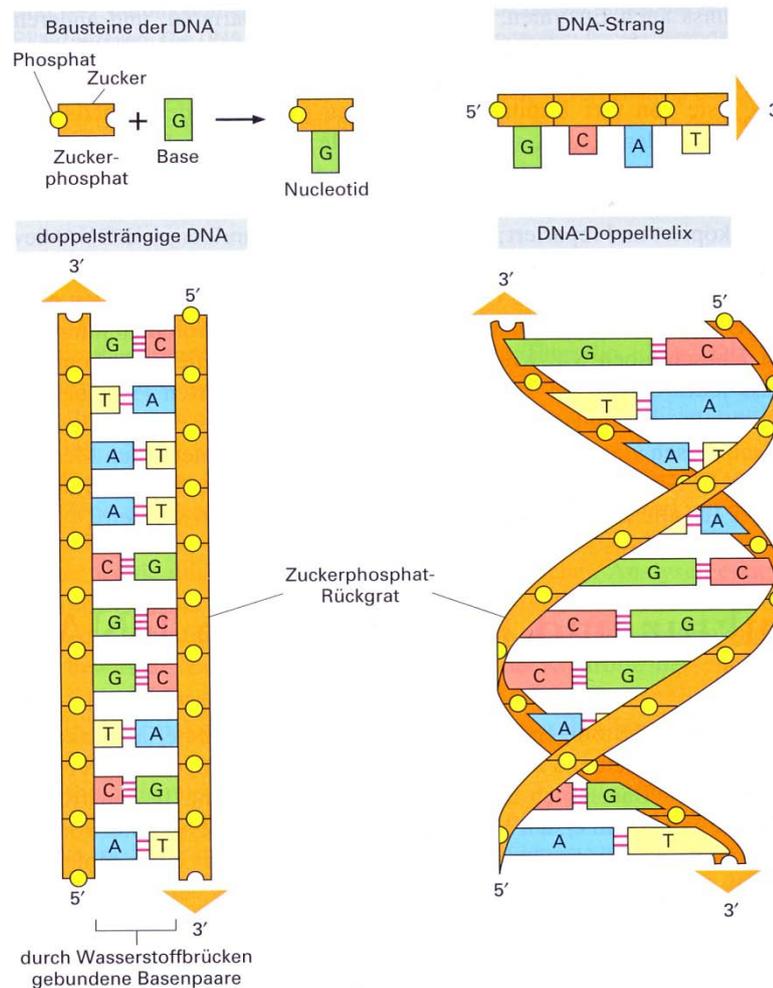


Abbildung 2-1: Aufbau der DNA [Alberts, B. et al. 2004]

Durch die Reihung der unterschiedlichen Nucleotide erhält die DNA ihre chemische Polarität. Das 5' Ende der DNA-Kette wird durch eine Phosphat-, das 3' Ende durch eine Hydroxylgruppe gebildet.

Die gebildete Doppelhelixstruktur wird durch die Eigenschaften der zwei Polynucleotidketten bestimmt. Die Phosphat-Zucker-Rückgrate liegen außen, weil die

beiden Polynukleotidketten über Wasserstoffbrückenbindungen von jeweils zwei gegenüberliegenden Basen zusammengehalten werden und diese somit innen liegen müssen. Diese Basenpaare werden immer durch eine Zwei-Ring-Base (A&G) und eine Ein-Ring-Base (T&C) gebildet. A bindet dabei immer mit T und G immer mit C, da dadurch die günstigste energetische Packung der Basenpaare innerhalb der Helix ermöglicht wird. Dadurch wird außerdem der Abstand der Rückgrate entlang der Doppelhelix konstant gehalten. [Alberts, B. et al. 2004]

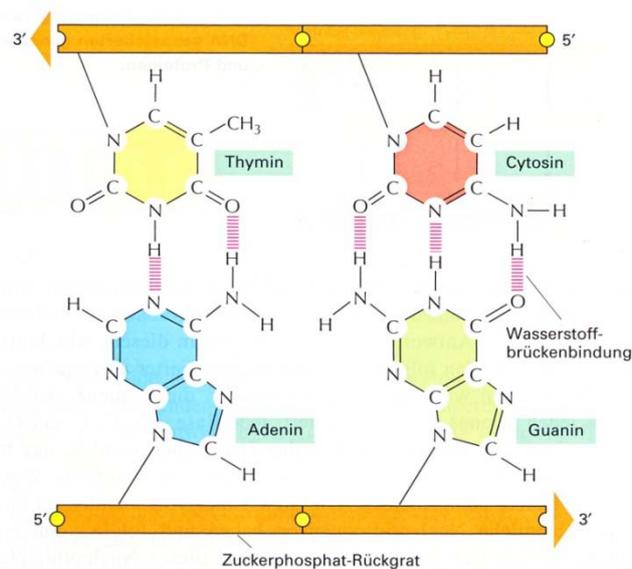


Abbildung 2-2: Wasserstoffbrückenbindungen zwischen komplementären Basenpaaren [Alberts, B. et al. 2004]

Die Doppelhelixstruktur ergibt sich aus einer zusätzlichen Erhöhung der Energieeffizienz der komplementären Basenpaarbindung. Dadurch windet sich der Doppelstrang alle zehn Basenpaare um 360° und es kommt zur Bildung von zwei Furchen. Eine weitere Konsequenz aus dieser Energieoptimierung ist, dass die beiden Helixstränge bezüglich der Polarität antiparallel laufen. So können die jeweiligen Basenpaare aneinander binden. [Alberts, B. et al. 2004]

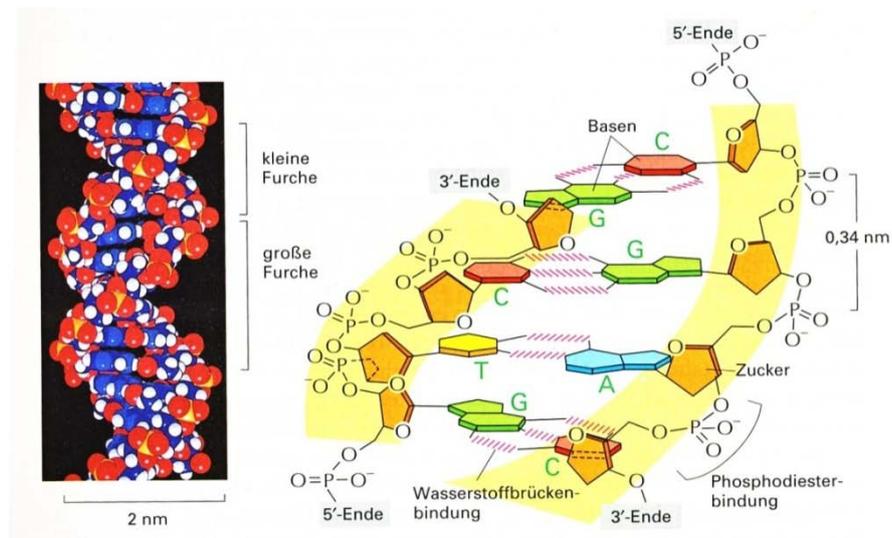


Abbildung 2-3: Helixstruktur der DNA [Alberts, B. et al. 2004]

Die komplementäre Basenbindung führt gleichzeitig dazu, dass die Sequenz eines Polynukleotidstranges die Sequenz des Komplementärstranges bestimmt. Aus beiden Einzelsträngen kann somit eine exakte Kopie des ursprünglichen Doppelstranges hergestellt werden. Dadurch kann die genetische Erbinformation, die alle Proteine eines Organismus kodiert, gespeichert, reproduziert und weitergegeben werden. [Alberts, B. et al. 2004]

2.3 DNA-Extraktion

Die Extraktion der DNA ist die Grundvoraussetzung für jede PCR-Anwendung. Aufgrund der Vielfalt und Komplexität biologischen Materials kann die erfolgreiche Extraktion eine große Herausforderung darstellen. Zudem ist das biologische Material oft nur in sehr kleinen Mengen verfügbar (wie z.B. bei Museumsproben), was eine sehr effiziente Extraktionsmethode voraussetzt, um DNA in ausreichender Menge isolieren zu können. Eine gute Extraktionsmethode zeichnet sich durch eine einfache Durchführung, eine hohe Effektivität und geringe Kosten aus [Saunders, G. C. et al. 1999].

Hauptziele jeder Extraktion sind:

- *Eine hohe DNA-Konzentration des erhaltenen Extrakts*
- *Eine hohe Reinheit der DNA*, da Kontaminationen bei späteren Anwendungen stören können
- *Die Intaktheit der extrahierten DNA*

Generell verläuft jede DNA-Extraktion nach dem folgenden Schema ab:

1. *Probenvorbereitung*

Dazu zählen alle Maßnahmen, die an der Probe durchgeführt werden, damit eine DNA-Extraktion möglich wird. So kann beispielsweise durch Abzentrifugieren von Flüssigkeit oder Homogenisierung der Probe die spätere Extraktion entscheidend beeinflusst werden.

2. *Zellverdauung*

In diesem Schritt wird die Zellmembran aufgebrochen oder abgebaut, um die DNA zugänglich zu machen. Häufig erfolgt das Aufbrechen der Zellen durch Zellverdauung mit Enzymen wie Proteinase K, es kann aber auch mechanisch, chemisch oder durch Einwirken von Hitze und Kälte erfolgen.

3. *Stabilisation der freigesetzten DNA*

Durch Einsatz von Extraktionspuffern beim Zellverdau soll die Degradation der DNA verhindert werden. Häufig werden diesen Puffersystemen Detergentien zugesetzt. Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) zählt zu den gängigen eingesetzten Detergentien. CTAB ist ein kationisches Detergens, das mit der DNA einen Komplex bildet, wodurch diese stabilisiert wird. Zusätzlich hilft CTAB bei der Auflösung der Zellmembrane.

Um die DNA vor zelleigenen Nukleasen zu schützen, wird dem Extraktionspuffer EDTA zugesetzt. EDTA komplexiert Magnesiumionen, die in freier Form als Cofaktoren der DNAsen wirken. Dadurch wird der Abbau der DNA durch die DNAsen verhindert.

4. *Isolation der DNA*

In diesem Schritt wird die DNA von der Probenmatrix und anderen Zellsubstanzen abgetrennt. Dies erfolgt häufig mit DNA-Affinitätsäulen, Anionenaustauschersäulen oder durch Extraktion mit Chloroform. Gleichzeitig erfolgt dadurch eine Aufreinigung der DNA, da störende Substanzen wie Proteine in die organische Phase wandern bzw. bei Verwendung der Säulen abgetrennt werden. Unerwünschte RNA kann durch RNase abgebaut werden, wobei dieser Schritt unmittelbar nach dem Zellverdau oder nach der Chloroformextraktion durchgeführt werden kann.

5. *Aufkonzentrierung der DNA*

Die Konzentrierung des DNA-Extraktes kann mit Hilfe von Trennsäulen oder der Präzipitation mit Alkohol und anschließender Wiederaufnahme in Wasser erfolgen. Dabei werden zusätzlich weitere störende Komponenten entfernt. [Saunders, G. C. et al. 1999]

2.4 DNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung.

Durch Vergleich mit einer Verdünnungsreihe von Standardlösungen kann mit Hilfe eines Agarosegels, Ethidiumbromid zugesetzt wurde, die Konzentration der jeweiligen DNA-Lösung durch einen Intensitätsvergleich abgeschätzt werden. Diese Methode ist jedoch sehr aufwändig und liefert sehr ungenaue Ergebnisse.

Eine einfachere, aber ebenso ungenaue Methode ist die Dot-Quantifizierung. Hierbei werden DNA-Lösungen bekannter Konzentration sowie die Testlösung mit Ethidiumbromid gemischt und Tropfen dieser Lösungen anschließend auf eine Plastikfolie auf einem UV-Transilluminator pipettiert. Die Quantifizierung erfolgt wieder durch Vergleich der Intensitäten der Fluoreszenzstrahlung [Mülhardt, C. 2006].

Des Weiteren gibt es Dipsticks und Enzym-Kits, mit deren Hilfe die Konzentration von DNA-Lösungen ermittelt werden kann. [Mülhardt, C. 2006]

Die weitaus einfachste und schnellste Bestimmung ist jedoch die Quantifizierung mit Hilfe eines Photometers. Dabei wird die Extinktion (A) der DNA-Lösung bei 260 und 280 nm gemessen. Aus dem Quotienten A_{260}/A_{280} erhält man eine Information über die Reinheit der DNA-Lösung. Nukleinsäuren weisen bei 260 nm ihr Absorptionsmaximum auf, während Verunreinigungen wie Proteine bei 280 nm am stärksten absorbieren [Mülhardt, C. 2006].

Die Konzentration der Lösung ergibt sich aus dem A_{260} -Wert mit Hilfe der Formel:

$$c \left[\frac{\mu g}{ml} \right] = A_{260} * V * F$$

C = Konzentration der Ausgangslösung

A_{260} = Extinktion bei 260 nm

V = Verdünnungsfaktor

F = Multiplikationsfaktor (für doppelsträngige DNA: 50)

[Mülhardt, C. 2006]

Das Lambert-Beersche-Gesetz beschreibt den Zusammenhang zwischen der Konzentration eines absorbierenden Analyten in flüssigem Medium und der daraus resultierenden Extinktion. Es lautet:

$$E = \varepsilon(\lambda) * c * d = \lg \frac{I_0}{I}$$

E = Extinktion

$\epsilon(\lambda)$ = molarer dekadischer Extinktionskoeffizient in $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$

d = Schichtdicke der Küvette

c = Konzentration in mol L^{-1}

I_0 = Lichtintensität vor Durchquerung der Probelösung

I = Lichtintensität nach Durchquerung der Probelösung

[Otto, M. 2000]

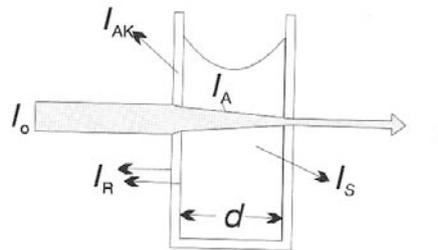


Abbildung 2-4: Lichtstrahl bei Probendurchgang im Photometer [Otto, M. 2000]

Beim Durchqueren eines monochromatischen Lichtstrahls nimmt die Intensität des Strahls durch Absorption des Analyten (I_A) ab. Weiters kommt es zur Absorption durch das Küvettenmaterial (I_{AK}) und der Probenmatrix (I_A) sowie zu Streuungs- (I_S) und Reflexionsphänomenen (I_R), wodurch die Lichtintensität ebenfalls abnimmt. Mithilfe der Durchführung einer Messung einer Blindprobe, die keinen Analyten enthält, können diese Effekte aber heraus gemittelt werden. Dadurch kann auf die Konzentration des Analyten geschlossen werden [Otto, M. 2000].

2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit der Entwicklung der Polymerasekettenreaktion 1985 durch K. Mullis, für die er 1993 den Chemie-Nobelpreis erhielt, steht heute eine Technik zur Verfügung, die es erlaubt, beliebige Abschnitte der DNA zu vervielfältigen, wenn die entsprechende Sequenz bekannt ist [Dorak, T. M. 2006].

Um ein gewünschtes DNA-Templat zu vervielfältigen, benötigt man neben dem Templat eine temperaturstabile DNA-Polymerase. Die Polymerase ist in der Lage, aus einem DNA-Einzelstrang wieder einen Doppelstrang zu generieren, so-

fern ausreichend Nucleotidbausteine (die vier unterschiedlichen Desoxyribonucleosidtriphosphate) vorhanden sind. Will man nicht den gesamten Einzelstrang sondern nur einen ausgesuchten Teilbereich amplifizieren, so benötigt man Primer. Dies sind synthetisierte Oligonucleotide, welche komplementär zu den Anfängen und Enden der ausgesuchten Templatsequenz sind, und somit Beginn und Ende des zu amplifizierenden Bereichs für die Polymerase darstellen. [Dorak, T. M. 2006]

2.5.1 PCR-Ablauf

Seit der Entwicklung der PCR wurde eine Vielzahl an unterschiedlichsten PCR-Methoden entwickelt, wobei das Grundprinzip aller Methoden gleich ist und aus drei sich wiederholenden Schritten besteht: Denaturierung, Annealing und Elongation.

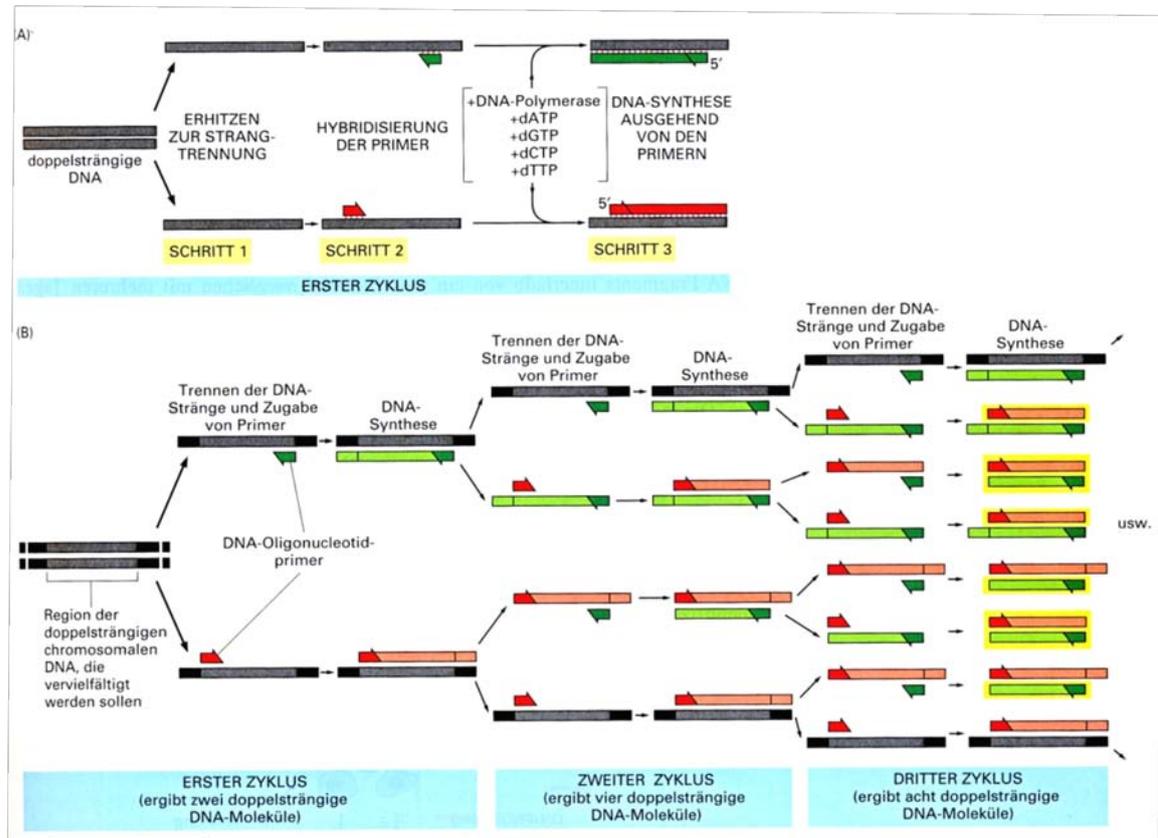


Abbildung 2-5: Schematischer Ablauf einer PCR [Alberts, B. et al. 2004]

Die Denaturierung erfolgt bei ca. 94 °C und bewirkt, dass sich der DNA-Doppelstrang in zwei Einzelstränge auftrennt.

Im anschließenden Annealingschritt wird die Temperatur auf ca. 55 °C abgesenkt. In diesem Temperaturbereich hybridisieren Oligonukleotide (sogenannte Primer), die die Zielsequenz flankieren und komplementär zum Anfang und Ende der Templateinzelstränge sind, mit den jeweiligen Einzelsträngen. Anschließend wird die Temperatur wieder erhöht, wodurch eine thermostabile DNA-Polymerase den Primer verlängert, bis wieder ein DNA-Doppelstrang vorliegt, der dem ursprünglichen Templat exakt gleicht. Pro Zyklus wird die Anzahl der vorliegenden Template theoretisch verdoppelt, sofern Primer und Nukleotidbausteine in ausreichender Konzentration vorliegen. Darin ist die enorme Empfindlichkeit der Methode begründet. In der Praxis wird aber eine tatsächliche Verdopplung der DNA-Menge pro Zyklus meistens nicht erreicht [Mülhardt, C. 2006].

Die Detektion der amplifizierten Template erfolgte ursprünglich meist mittels Gelelektrophorese und Anfärben der Gele mit Ethidiumbromid, wobei die unterschiedlich langen Amplifikate gemäß ihrer Größe aufgetrennt werden und anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. [Mülhardt, C. 2006]

2.5.2 Kriterien für eine erfolgreiche PCR

Polymerase

Die am häufigsten verwendete Polymerase ist die Taq-DNA-Polymerase. Sie wird aus einem Bakterienstamm, welcher in 70 °C heißen Wasserquellen vorkommt, isoliert und ist deshalb sehr hitzestabil. Ihr Aktivitätsmaximum liegt bei 74 °C und einem pH von über 8, wodurch sie sehr gut für PCR-Anwendungen geeignet ist. Weitere Vorteile sind, dass sie nicht nur eine 5'-3' DNA-Polymeraseaktivität aufweist, sondern auch eine 5'-3'- Exonucleaseaktivität, aber keine 3'-5'-Exonucleaseaktivität. Neben der normalen Polymeraseaktivität besitzt die Taq-Polymerase noch eine nicht templatabhängige Polymeraseaktivität, wodurch es zu einem Überhang von einer Base, meist Adenin, bei der eigentlichen Templatsequenz kommt.

Die Syntheserate liegt bei 2800 Nukleotiden pro Minute, was im Vergleich zu anderen zur Verfügung stehenden Polymerasen sehr hoch ist. Die Fehlerhäufigkeit liegt in etwa bei 10^{-5} (ungefähre Fehlerhäufigkeit pro eingebauter Base).

Auch wenn es am Markt eine Vielzahl anderer Polymerasen gibt, ist deren Marktanteil relativ gering, da sie komplizierter in der Handhabung und teurer in der Anschaffung sind und zudem geringere Syntheseraten aufweisen. Jedoch haben diese gewünschte Eigenschaften wie eine 3'-5'-Aktivität, wodurch eine Korrektur-, sowie Reverse-Transkriptaseaktivität gegeben sind. Da die Taq-Polymerase diese Eigenschaften nicht besitzt, kann sie für spezielle Anwendungen nicht eingesetzt werden.

Denaturierung

Der Denaturierungsschritt sollte so kurz wie möglich gehalten werden, da durch die hohe Temperatur alle PCR-Komponenten in Mitleidenschaft gezogen werden. So wird die Polymerase trotz ihrer Temperaturstabilität teilweise deaktiviert und Nukleotide, Primer und Template zerfallen in Bruchstücke. Dadurch sinkt die Effizienz der Methode.

Annealingtemperatur

Die Annealingtemperatur muss an die verwendeten Primer angepasst werden, um eine optimale Anlagerung der Primer zu gewährleisten. Bei einer schlecht gewählten Annealingtemperatur kann es zu einer vermehrten Dimerbildung (Primer bindet an anderes Primermolekül) kommen, sofern potentielle Sekundärstrukturen vorliegen.

Elongationszeit

Die Länge des zu amplifizierenden Templates sollte bei der Wahl der Elongationszeit berücksichtigt werden. Wird sie zu kurz gewählt, kann die Polymerase das Templat nicht vervollständigen. Ist sie zu lang, kann es zu Templaten mit zu großer Länge kommen.

Template

DNA-Template hoher Reinheit ($A_{260}/A_{280} = 1,8-2,0$) steigern die Erfolgchancen der Amplifikation. Trotzdem können durchaus auch weniger reine DNA-Template effizient amplifiziert werden. Je mehr Template für die PCR zur Verfügung stehen, umso wahrscheinlicher wird eine erfolgreiche Amplifikation. Theoretisch reicht zwar ein einzelner DNA-Doppelstrang aus, praktisch braucht man jedoch in etwa 10.000 DNA-Doppelstränge.

Primerkonzentration

Die Konzentration der Primer ist für eine erfolgreiche Amplifikation ebenfalls von Bedeutung. Obwohl die Primer bei jeder Anwendung im Überschuss vorliegen, kann durch eine zu hohe Konzentration der Primer die Amplifikation inhibiert werden. Zudem sinkt mit abnehmender Primerkonzentration die Fehlerhäufigkeit der Polymerase.

Puffersystem

Jeder PCR-Ansatz findet in einem gepufferten System statt. Unterschiedliche Polymerasen haben bestimmte pH-Optima, bei denen die Aktivität maximiert ist. Bei der Taq-Polymerase liegt dieses Optimum beispielsweise bei pH 8. Ein häufig verwendeter Puffer ist Tris-HCl. Dieses Puffersystem ist aber stark temperaturabhängig, sodass der pH-Wert bei PCR üblichen Temperaturen abnimmt und so außerhalb des Optimums der Polymerase liegt. Dies gilt es bei der Auswahl des Puffersystems zu beachten.

Salzkonzentration

Häufig verwendet man KCl in einem Konzentrationsbereich von 10 bis 50 mM. Die Optimierung der Salzkonzentration kann zu höheren Ausbeuten führen. Zu hohe Konzentrationen von KCl sowie NaCl können die Hemmung der Amplifikation bewirken.

MgCl₂ – Konzentration

Mg²⁺ spielt für die Anlagerung der Primer sowie die Auftrennung der Templat-doppelstränge eine wichtige Rolle. Dimerbildung, Fehlamplifikation, Spezifität des Produktes sowie die Aktivität der Polymerase werden ebenfalls durch die Mg²⁺ Konzentration beeinflusst.

Zusätze

Weitere Zusätze von beispielsweise DMSO, Betain oder Glycerin können helfen, die Spezifität und Amplifikationsgeschwindigkeit der gebildeten Amplikone zu erhöhen. Genaue Angaben bezüglich Zusätze gibt es allerdings nicht. Daher müssen diese von Fall zu Fall praktisch getestet werden.

[Edwards, K. et al. 2004; Mülhardt, C. 2006]

2.6 REAL-TIME PCR

Die real-time PCR ist eine der vielen Methoden, die nach der Etablierung der PCR als Analysemethode entwickelt wurden. Der große Vorteil der Methode ist, dass man sich die aufwendige Gelelektrophorese zur Detektion erspart, da der Verlauf der PCR in „Echtzeit“ während des Laufes aufgezeichnet wird. Damit gehen natürlich höhere Gerätekosten einher, da real-time PCR-Geräte gegenüber herkömmlichen Thermocyclern zusätzlich mit einer Lichtquelle und einem Detektorsystem ausgestattet sein müssen [Edwards, K. et al. 2004; Dorak, T. M. 2006]. Als detektierbares Signal wird Fluoreszenzlicht genutzt. Dazu wurde zu Beginn der Entwicklung der real-time PCR Ethidiumbromid zum PCR-Ansatz hinzugefügt. Ethidiumbromid lagert sich in den DNA-Doppelstrang ein und kann durch Anregung mit UV Licht zu Fluoreszenz angeregt werden. Diese Anwendung ist zwar relativ einfach, bringt aber den Nachteil mit sich, dass Ethidiumbromid ein sehr hohes Hintergrundrauschen verursacht. Aus diesem Grund werden heute vorwiegend andere Farbstoffe mit einem besserem Signal-Rausch Verhältnis

verwendet. Fast alle dieser verwendeten Farbstoffe nutzen FRET (fluorescence resonance energy transfer) [Mülhardt, C. 2006].

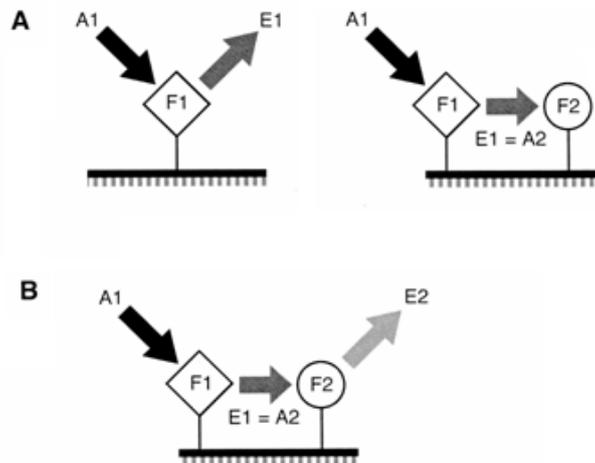


Abbildung 2-6: Funktionsprinzip des fluorescence resonance energy transfer (FRET), modifiziert nach [Mülhardt, C. 2006]

Dabei interagieren zwei Moleküle miteinander, wobei mindestens ein Molekül zur Aussendung von Fluoreszenzlicht fähig sein muss. Das Donor-Molekül – auch Reporter genannt (F1) – wird durch externes Licht (A1) in einen angeregten Zustand versetzt und sendet bei Relaxation in den Grundzustand längerwelliges Licht (E1) aus. Das Acceptor-Molekül, auch als Quencher (F2) bezeichnet, absorbiert dieses ausgesandte Licht und sorgt dafür, dass das Fluoreszenzlicht gelöscht wird. Dies ist schematisch in Abbildung 2–6 A dargestellt.

Für eine effiziente Löschung muss das Absorptionsmaximum des Acceptors nahe der Wellenlänge des ausgesandten Lichts des Donors liegen und Acceptor und Donor müssen in unmittelbarer Nähe zueinander sein [Mülhardt, C. 2006].

Es gibt jedoch noch weitere Möglichkeiten für die Anwendung von Donor-Acceptor Systemen. So kann der Acceptor anstelle von Fluoreszenzlöschung durch das vom Donor ausgesandte Licht selbst angeregt werden und in weiterer Folge Licht aussenden, das zur Detektion dient. Dazu müssen sich die Wellenlängen des Lichts von Donor und Acceptor stark genug voneinander unterscheiden. Dies ist schematisch in Abbildung 2-6 B dargestellt.

Häufig verwendete Farbstoffe sind 6-FAM (6-Carboxy-Fluorescein), welches nach der oben beschriebenen Reporter-Quencher Methode funktioniert, und SYBR[®] Green, das ähnlich wie Ethidiumbromid in freier Form zum PCR-Ansatz zugegeben wird.

Als Quencher werden häufig sogenannte Black Hole Quencher (BHQ) verwendet. [Edwards, K. et al. 2004; Dorak, T. M. 2006; Mülhardt, C. 2006]

2.6.1 SYBR[®] Green Assay

Dieser Assay zählt zu den einfachsten der Real-Time PCR-Anwendungen. SYBR[®] Green ist ein freier Farbstoff, der sich während der Amplifikation in den gebildeten DNA-Doppelstrang einlagert. Das Anregungsmaximum liegt bei 497 nm, das Emissionsmaximum bei 529 nm.

Der Vorteil dieser Methode ist, dass das Hintergrundsignal des freien Farbstoffes sehr niedrig ist. Wird der Farbstoff jedoch in den DNA-Doppelstrang eingebaut, kommt es aufgrund einer Konformationsänderung des Farbstoffmoleküls zu einem ca. 2.000 fachen Anstieg der Fluoreszenz, wodurch das Signal-Rausch Verhältnis bei diesem Assay um ein Vielfaches besser ist als beispielsweise bei Ethidiumbromid [Edwards, K. et al. 2004; Dorak, T. M. 2006].

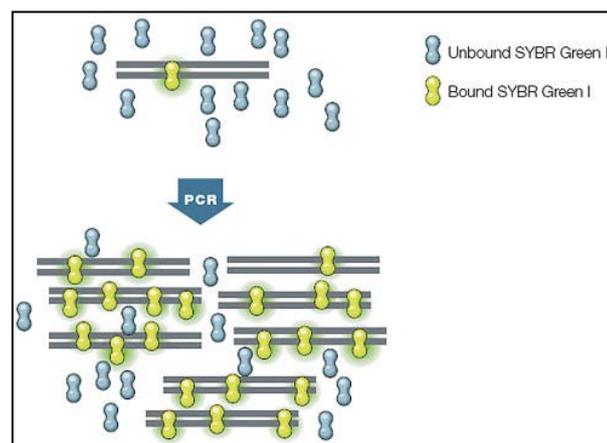


Abbildung 2-7: Funktionsprinzip von SYBR[®] Green
[Biorad-Laboratories 2006]

Außerdem benötigt man bei dieser Methode lediglich ein Primerpaar und der Farbstoff selbst ist relativ günstig. Durch diese Vorteile eignet sich die Methode außerordentlich gut zur Optimierung von Primerkonzentrationen.

Der größte Nachteil dieser Methode ist ihre geringe Spezifität. Da sich der Farbstoff in jedem gebildeten Doppelstrang einlagert, kann man Produkt, falsche Produkte und Dimere nicht direkt voneinander unterscheiden. Um zu überprüfen, ob das gewünschte Amplikon gebildet wurde, muss eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt werden. Dabei werden die gebildeten Produkte nach durchgeführtem PCR-Lauf schrittweise erhitzt. Dadurch lösen sich die gebildeten Doppelstränge wieder in Einzelstränge, SYBR[®] Green wird freigesetzt und die Fluoreszenz nimmt ab. Kurze Produkte wie Dimere schmelzen dabei bei niedrigerer Temperatur als lange Doppelstränge. Durch Abbildung der 1. Ableitung der Schmelzkurve (Fluoreszenzintensität gegen die Temperatur) können mit Hilfe der PCR-Software die jeweiligen Schmelztemperaturen der gebildeten Produkte ermittelt werden. [Edwards, K. et al. 2004; Dorak, T. M. 2006]

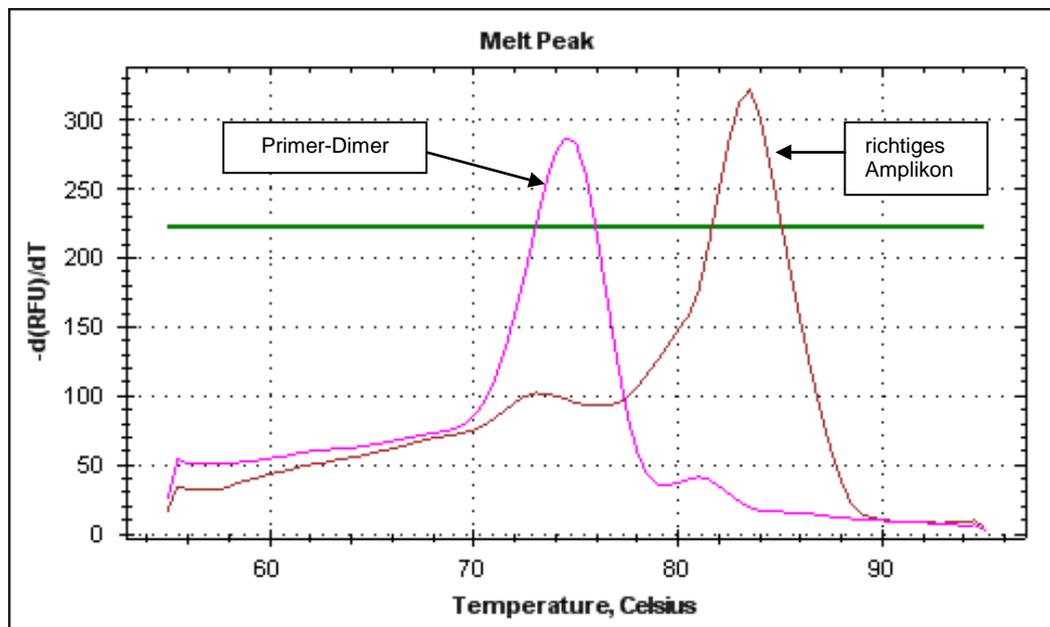


Abbildung 2-8 Schmelzpunktanalyse: Unterscheidung von Dimer und richtigem Amplikon

2.6.2 TaqMan Assay

Der TaqMan Assay ist gegenüber der SYBR[®] Green Methode spezifischer, aber auch aufwändiger und teurer. Teurer deshalb, weil zusätzlich zum Primerpaar eine zur Zielsequenz komplementäre Oligonukleotidsequenz mit Reporter und Quencher am 5' bzw. 3' Ende benötigt wird. Diese Sequenz wird allgemein als TaqMan-Sonde bezeichnet und muss an der Zielsequenz zwischen den beiden Primern binden. [Edwards, K. et al. 2004; Dorak, T. M. 2006].

An der Sonde befinden sich Reporter und Quencher in unmittelbarer Nähe, wodurch das bei der Anregung vom Reporter ausgesandte Fluoreszenzlicht effektiv gelöscht wird. Wird die Sonde durch die Polymerase in den Doppelstrang eingebaut, löst sich der Reporter, ist dadurch nicht mehr in unmittelbarer Nähe zum Quencher, und das ausgesandte Fluoreszenzlicht gelangt zur Detektoreinheit. Je öfter das Templat amplifiziert wird, umso höher ist die Intensität des Fluoreszenzlichts, wodurch die Quantifizierung des gebildeten Amplikons möglich ist [Edwards, K. et al. 2004; Dorak, T. M. 2006].

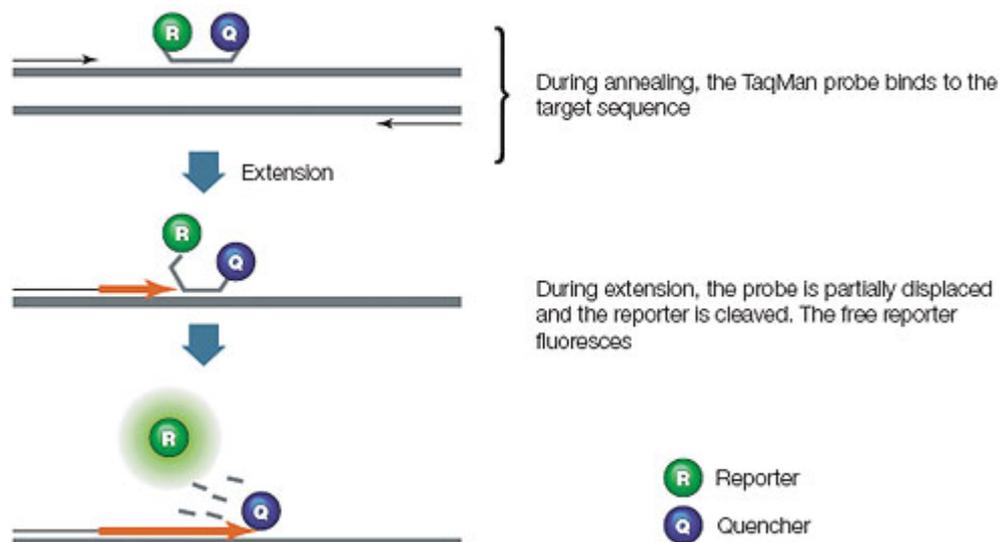


Abbildung 2-9: Funktionsprinzip einer TaqMan-Sonde [Biorad-Laboratories 2006]

Bei dieser Methode können keine Schmelzpunktanalysen durchgeführt werden. Durch sorgfältige Auswahl der Sondensequenz kann man aber eine sehr hohe Spezifität erreichen und die Bildung von falschen Produkten nahezu ausschließen. [Edwards, K. et al. 2004; Dorak, T. M. 2006]

2.6.3 Auswertung

Die Quantifizierung bei der real-time PCR erfolgt nicht über die Absolutmenge an amplifiziertem Produkt, sondern über die Kinetik der Reaktion. Zu Beginn der Reaktion kann man von einer jeweiligen Verdopplung der ursprünglich vorliegenden Templatmenge ausgehen. Dies führt zu einem exponentiellen Anstieg des Fluoreszenzsignals. Mit fortwährendem PCR-Lauf wird die Verdopplung aufgrund von Degenerationserscheinungen der Polymerase, dem Verbrauch und Zerfall der Nukleotide sowie der Anhäufung von Produkten, welche die Reaktion hemmen, nicht mehr erreicht. Daher kommt es zunächst zu einem linearen Signalanstieg und später, sobald die Reaktion zum Erliegen kommt, zu einer Plateaubildung [Edwards, K. et al. 2004; Dorak, T. M. 2006].

Die Auswertung erfolgt deshalb über den sogenannten Threshold Cycle (C_t). Der C_t -Wert gibt die Zykluszahl an, bei der sich das detektierte Fluoreszenzsignal signifikant vom Hintergrund abhebt. Je niedriger der C_t -Wert, umso besser wurde das Templat amplifiziert, sofern man gleiche Ausgangsmengen annimmt.

Der C_t -Wert wird neben der Reaktionskinetik von zwei weiteren Faktoren beeinflusst, die durch den Anwender festgelegt werden:

- ◆ *Basislinie*

Damit die unterschiedlichen PCR-Ansätze miteinander vergleichbar sind, muss eine Basislinie gesetzt werden. In der Regel verfügt jede PCR-Software über einen Algorithmus, der das Hintergrundrauschen sowie die Fluoreszenz der Reaktion der verschiedenen Wells automatisch über die ersten Zyklen am Beginn des PCR-Laufes abgleicht. Oftmals ist es aber erforderlich, die Basislinie am Ende des PCR-Laufes manuell anzupassen.

◆ *Threshold*

Dieser Schwellenwert gibt an, wann sich das Fluoreszenzsignal signifikant vom Hintergrund abhebt. Der Schwellenwert sollte innerhalb des exponentiellen Signalanstiegs liegen. Zudem ist es von großer Bedeutung, dass bei unterschiedlichen PCR-Läufen stets der gleiche Schwellenwert gesetzt wird, um einen Vergleich der Läufe zu ermöglichen.

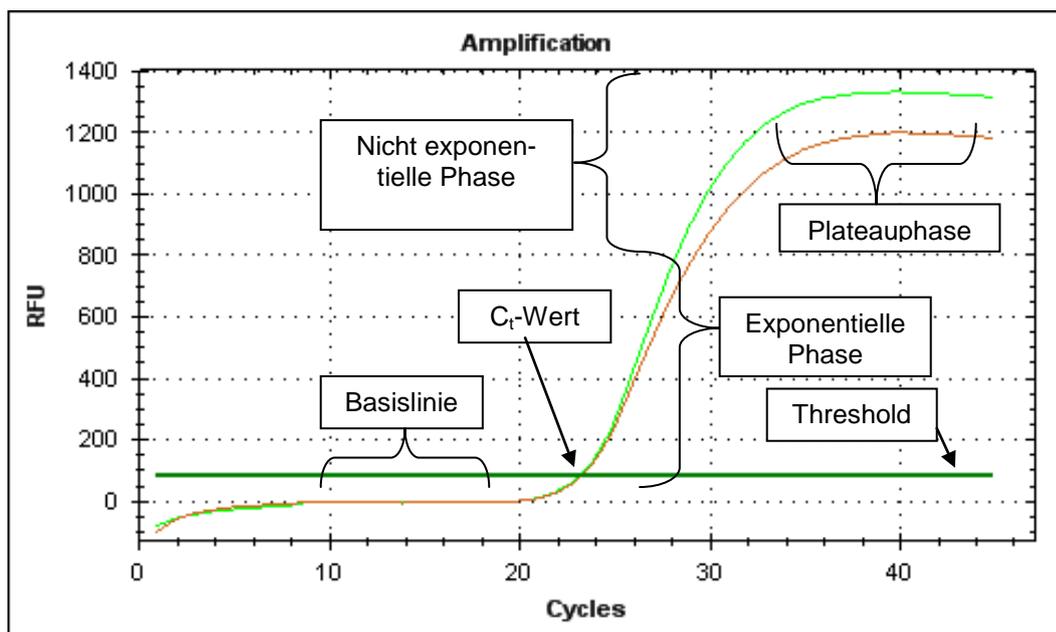


Abbildung 2-10: Parameter bei der Auswertung einer Amplifikationskurve

Um zu bestimmen, wie gut eine entwickelte PCR-Methode ist, muss deren Effizienz bestimmt werden. Eine dafür häufig angewendete Methode ist die der seriellen Verdünnung. Dabei wird eine DNA-Lösung mit bekannter Konzentration seriell um den Faktor 10 verdünnt und anschließend die C_t-Werte der jeweiligen Lösungen ermittelt. Theoretisch ergibt sich für eine Methode mit einer Effizienz von 100% bei einer Verdünnung um den Faktor 10 eine Verschiebung des C_t-Wertes von 3,3 nach hinten.

Durch Auftragen des C_t-Wertes der untersuchten Lösungen gegen den Logarithmus der jeweiligen Konzentration der DNA-Lösungen erhält man eine Standardgerade.

Mit Hilfe der Gleichung

$$\text{Effizienz [\%]} = \left(10^{\left(\frac{-1}{\text{Steigung}}\right)} - 1 \right) * 100$$

kann aus der Steigung der erhaltenen Gerade die Effizienz der Methode errechnet werden. Bei optimaler Amplifikation ist die Effizienz von 100%, was einer Verdopplung des Templates in jedem Zyklus entspricht. Für robuste, reproduzierbare Methoden sollte ein Wert zwischen 60 und 100% erreicht werden.

Die Bestimmung der Effizienz durch serielle Verdünnung zeichnet sich durch eine hohe Reproduzierbarkeit aus. Allerdings wird mit dieser Methode auch das Öfftoren eine Effizienz >100% ermittelt, was zumeist auf Verdünnungsfehler oder andere Fehler zurückzuführen ist. [Edwards, K. et al. 2004; Dorak, T. M. 2006]

2.6.4 Primer- und Sondendesign

Am Beginn jeder Entwicklung einer TaqMan Real-Time PCR-Methode steht das Design und die Auswahl von Primern und einer Sonde. Um eine robuste, reproduzierbare sowie effiziente Methode zu entwickeln, dürfen in diesem Schritt keine Fehler begangen werden, da diese nicht mehr rückgängig gemacht werden können. Obwohl es heute bereits viele Softwareprogramme gibt, die die Suche nach geeigneten Primern und Sonden immens erleichtern, bleibt es einem oft nicht erspart, diese manuell auszusuchen [Dorak, T. M. 2006].

Für das Design und die Auswahl von gut geeigneten Primern und Sonden gibt es eine Vielzahl an Faktoren, die es zu berücksichtigen gilt.

- *Primerspezifität*

In den meisten Fällen ist es erforderlich, spezifische Primer auszuwählen. Dies ist insofern schwierig, da die Anzahl an DNA-Sequenzen nahezu endlos ist und man per se nicht ausschließen kann, dass mehrere Abschnitte mit der ausge-

suchten Zielsequenz übereinstimmen. Glücklicherweise gibt es heutzutage Suchmaschinen, die es erleichtern, kreuzreaktive Sequenzen ausfindig zu machen (BLAST – Basic Local Alignment Search Tool). Dazu ist es natürlich erforderlich, dass die Sequenzen entschlüsselt und in der jeweiligen Datenbank erfasst sind. Zusätzlich sind die gängigen Softwareprogramme zur Primer- und Sondensuche mit Suchalgorithmen ausgestattet, die die Primer- und Sondensequenzen so aussuchen, dass die Wahrscheinlichkeit auf Kreuzreaktivität minimiert wird. Sucht man jedoch das Gegenteil, beispielsweise eine Sonde, die für humane und porcine DNA geeignet ist, so wird durch diese Algorithmen die Suche erschwert und man muss auf die manuelle Suche zurückgreifen.

- *Primerlänge*

Idealerweise sollten Primer etwa 16 bis 28 Nukleotide lang sein. Wird die Primersequenz zu kurz gewählt, steigt die Wahrscheinlichkeit auf Kreuzreaktivität und die Optimierung der Annealingtemperatur wird erschwert. Ist sie jedoch zu lang, können Sekundärstrukturen der Primer auftreten, Dimerbildung erfolgen und dadurch die Effizienz der Methode gesenkt werden.

- *Primer GC-Gehalt*

Der optimale GC-Gehalt von Primern liegt zwischen 35 und 65%. Zu hohe GC-Gehalte führen zu Fehlannealing, weil bereits kurze übereinstimmende Sequenzteile zu einer stabilen Bindung führen. Bei zu geringen GC-Gehalten ist die Primerbindung jedoch sehr schwach, was zu einer geringeren Effizienz führt.

- *Primerstabilität am 3' Ende*

Eine zu hohe Bindungsstabilität am 3' Ende des Primers sollte vermieden werden, da dies die Wahrscheinlichkeit auf Primerverlängerung durch die Polymerase bei nicht spezifischer Bindung erhöht.

- *Komplexität der Primersequenz*

Durch eine geringe Komplexität der Sequenz (z.B. gleiche aufeinander folgende Nukleotide oder sich wiederholende Nukleotidfolgen) steigt die Möglichkeit des Fehlannealings des Primers.

- *Schmelztemperaturen der Primer*

Die Schmelztemperatur von Forward- und Reverseprimer sollte möglichst ähnlich sein, da es ansonsten zu Problemen bei der Optimierung der Annealingtemperatur kommen kann. Zur Bestimmung der Schmelztemperatur der Primer gibt es verschiedenste mathematische Modelle, die nicht nur die Primersequenz sondern auch andere Faktoren wie Salz- und Primerkonzentration berücksichtigen. Das einfachste, aber dadurch nicht exakteste Berechnungsmodell ist die "4 + 2" Regel. Diese lautet:

$$T_m = 4 * (G + C) + 2 * (A + T)$$

und geht davon aus, dass jedes G und C Nukleotid 4 °C und jedes A und T Nukleotid 2 °C zur Schmelztemperatur beiträgt.

- *Größe des Amplikons*

Für eine effiziente Amplifikation sollte die Größe des Amplikons zwischen 100 und 250 bp liegen. Ist das Amplikon zu klein, können Primer und Sonde unter Umständen nicht richtig binden. Ist es größer, steigt die Wahrscheinlichkeit von Fehlern bei der Vervollständigung des Doppelstranges.

- *Sekundärstruktur von Primer und Templat*

Sekundärstrukturen sowohl bei Primern als auch beim Templat selbst sollten vermieden werden, da dadurch die Effizienz der Methode stark sinkt. Außerdem

kann dies speziell bei Primern zur Bildung von Primer-Dimeren führen (Forward-Forwardprimer Dimer, Forward-Reverseprimer Dimer, Reverse-Reverseprimer Dimer).

- *TaqMan Sonden Design*

Viele der Faktoren des Primerdesigns sind auch beim Design der Sonde zu berücksichtigen. Insbesondere ist beim Design einer gut funktionierenden Sonde auf folgende Punkte zu achten:

- Die Schmelztemperatur der Sonde sollte ca. 10 °C über jener der Primer liegen.
- Der GC-Gehalt sollte wie bei den Primern zwischen 35 und 65% liegen.
- Das 5' Ende der Sonde sollte nicht mit G beginnen, da dies zur Fluoreszenzlöschung führt.
- Keine Sekundärstruktur in der Sondensequenz.
- Die Sonde sollte aus einer spezifischen Region der Templatsequenz stammen, die zudem ebenfalls keine Sekundärstrukturen aufweist.
- Die Sondensequenz soll in unmittelbarer Nähe zu den Primersequenzen liegen und sich natürlich nicht mit den Primern überlappen.

[Dorak, T. M. 2006]

2.7 Forschungsstand auf dem Gebiet von Formalin fixierten Geweben

Die Extraktion von DNA aus Formalin fixierten Geweben wurde bereits in mehreren Studien untersucht, bleibt aber eine große Herausforderung, weil die Ausbeute nicht immer ausreichend ist. Vor allem Faktoren wie Inkubationsschritte vor und nach dem Zellverdau, Lysisart und -zeit, sowie der Zusatz von Detergentien können zu einer Verbesserung der Extraktionseffizienz führen.

Die folgenden Beispiele sollen einen kurzen Überblick über bereits durchgeführte Arbeiten zur Extraktion von DNA aus Formalin fixierten Geweben und ihrer Amplifizierbarkeit mittels PCR geben. Vollständigkeit ist dabei nicht angestrebt.

Gilbert et al. 2007 weisen darauf hin, dass vor allem längere Lysiszeiten zu erhöhten DNA-Ausbeuten führen [Gilbert, M. T. et al. 2007].

Shi et al. untersuchten den Einfluss des pH-Werts und einer zusätzlichen Hitzebehandlung auf das Extraktionsergebnis. Vor allem der alkalische Verdau mit 0,1 M NaOH, als Alternative zur Lyse mit Enzymen, führte zu guten Ausbeuten. Durch eine zusätzliche Zugabe von 1%igem SDS zur NaOH Lösung konnten die DNA-Ausbeuten erhöht werden [Shi, S. R. et al. 2002; Shi, S. R. et al. 2004].

Savioz et al. beschreiben eine Extraktionsmethode, um hochwertige DNA aus Formalin fixiertem und in Paraffin eingebettetem (FFPE) Gehirngewebe zu erhalten. Zudem wurden Langzeiteffekte durch die lange Lagerung in Formalin untersucht. Als Proben wurden bis zu 46 Jahre alte Gehirngewebe verwendet, die mit 15%igem Formalin fixiert worden waren. Als Kontrollproben dienten zwei frische, tiefgefrorene Gehirngewebeproben.

Die Methode setzt sich im Wesentlichen aus einer intensiven Behandlung mit Proteinase K, der Einbettung in ein Agarosegel und einem Elutionsschritt zur Gewinnung der DNA aus dem Agarosegel zusammen.

Es konnte kein signifikanter Unterschied bei der Extraktion unterschiedlich alter Proben (46 und 27 Jahre alt) festgestellt werden [Savioz, A. et al. 1997].

Dedhia et al. versuchten die Extraktion von DNA aus FFPE Geweben effizienter und einfacher zu gestalten und die Real-Time PCR für die extrahierte DNA zu optimieren. Als Proben dienten fünf 2-3 Monate alte FFPE Brustkrebsgewebe, die mit vier unterschiedlichen Extraktionsmethoden behandelt wurden. Die extrahierte DNA wurde mit Primerpaaren für Template unterschiedlicher Länge mittels SYBR[®] Green PCR untersucht und hinsichtlich, Annealingtemperatur sowie Primer- und Templatkonzentration optimiert. Die effizienteste Extraktion erfolgte bei einem Proteinase K Verdau bei 56 °C für 2 Stunden und anschließender Inkuba-

tion bei 95 °C für 10 Minuten. Mit der PCR konnten Amplifikate bis 250 bp amplifiziert werden, längere Template hingegen nicht. Als optimierte Parameter wurde eine Annealingtemperatur von 60 °C, eine Primerkonzentration von 300 nM und eine Templatkonzentration von 10 nM ermittelt [Dedhia, P. et al. 2007].

Ferrer et al. untersuchten die Konservierung von DNA bei eingefrorenen und FFPE Geweben unterschiedlichen Alters. Des Weiteren wurden diese Gewebe auf Punktmutationen sowie den Einfluss unterschiedlicher Fixierlösungen untersucht. Als Proben dienten Gehirngewebe, die unterschiedlich lange tiefgefroren bzw. mit gepuffertem 4%igem Formalin ein Monat fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet wurden. Zusätzlich wurden Proben, die mit ungepuffertem Formalin fixiert wurden und zwischen 10 und 20 Jahre alt waren, untersucht.

Die Ergebnisse zeigten im Wesentlichen eine schlechtere DNA-Ausbeute bei Formalin fixierten Geweben im Vergleich zu tiefgefrorenen Geweben, wobei dennoch in vielen Fällen ausreichend genetisches Material für Genstudien extrahiert werden konnte. In tiefgefrorenem Gewebe konnten bereits bekannte Punktmutationen identifiziert werden, nicht jedoch bei Formalin fixiertem Gewebe [Ferrer, I. et al. 2007].

Skage und Schander untersuchten die Einsatzfähigkeit von Enzymen, die in der Lage sind, DNA aus Formalin fixierten Geweben zu reparieren. Außerdem wurden daraus resultierende Verbesserungen für die Anwendung von PCR-Methoden untersucht. Als Proben wurde Formalin fixiertes Fischgewebe eingesetzt, welches unterschiedlich lange (15 bis 110 Stunden) mit 4%igem gepuffertem Formalin fixiert und anschließend in 96%igem Alkohol aufbewahrt wurde. Der Einsatz von Reparaturenzymen führte im Vergleich zu herkömmlichen Methoden zu besseren Amplifikationsfähigkeiten bei mitochondrialer DNA. Daraus kann geschlossen werden, dass durch den Einsatz solcher Reparaturenzyme die Effizienz von PCR-Anwendungen gesteigert werden kann [Skage, M. und Schander, C. 2007].

Santos, et al. entwickelten eine Methode zur Extraktion von DNA aus FFPE Gewebe von menschlichen Föten. Bei den Proben handelte es sich um Mikrotomschnitte von FFPE Gewebe, die mit Formalin und Bouinfixierlösung (besteht aus gesättigter, wässriger Pikrinsäurelösung, 100%igem Formalin und Eisessig) fixiert wurden.

Paraffin wurde mittels Ethanol und Xylol entfernt, die DNA-Extraktion wurde mit Ammoniumacetat durchgeführt.

Bei der durchgeführten PCR konnten 170 und 363 bp Template bei Formalin fixierten Geweben amplifiziert werden, nicht jedoch bei Geweben, die mit Bouinfixierlösung fixiert wurden [Santos, M. C. et al. 2008].

Santos, et al entwickelten eine Methode zur Extraktion hochwertiger DNA aus FFPE Gewebe. Die Proben bestanden aus unterschiedlichem Milchdrüsenkrebsgewebe von Katzen.

Die DNA-Extraktion erfolgte mittels eines Automatic Nucleic Acid Isolation Systems (QuickGene 800, Fujifilm Life Science). Trotz Automatisierung wurden Parameter wie Schmelzen und Entfernen von Paraffin, die Lysiszeit und Temperatur sowie die Elutionsdauer optimiert. Die wesentlichste Verbesserung bezüglich der DNA-Ausbeute brachte die Durchführung eines zusätzlichen Schrittes zur Entfernung von Paraffin [Santos, S. et al. 2009].

3 EXPERIMENTELLER TEIL

3.1 Proben

3.1.1 Porzine Gewebeproben

Zwei Schweineherzen wurden frisch nach der Schlachtung des Tieres bei einem Fleischer gekauft. Ein Herz wurde anschließend in etwa 0,5 mm dicke Scheiben geschnitten und jeweils ein Schnitt mit einer Fixierungsmethode fixiert (siehe Kapitel 3.2). Das zweite Herz wurde im Ganzen bei -18 °C tiefgefroren. Die daraus extrahierte DNA wurde bei den PCR-Analysen als Positivkontrolle verwendet. Zusätzlich wurden von Dr. Josef Bailer Schweineherzproben bereitgestellt, die bereits im Februar 2007 fixiert worden waren.

3.1.2 Humane Gewebeproben

Die humanen Gewebeproben wurden von Frau Dr. Patzak, Direktorin des pathologisch-anatomischen Bundesmuseums Wien, zur Verfügung gestellt.

Beim frischen Gewebe handelte es sich um zwei, etwa 4 x 4 x 8 cm große Stücke, die jeweils aus Haut-, Fett- und Muskelgewebe bestanden. Sie stammten laut Dr. Patzak von einem älteren europäischen Mann und wurden aus dem Bauchbereich entnommen.

Die Proben wurden tiefgefroren und bei -18 °C gelagert.

Bei den fixierten Proben handelte es sich um Proben von fixierten humanen Herzen in der Größe von etwa 3 x 2 x 2 cm.

Die Proben wurden so gewählt, dass ihr Fixierungsdatum jeweils einige Jahre auseinander lag, um etwaige altersbedingte Einflüsse auf die DNA-Extraktion erkennen zu können.

Tabelle 1 zeigt die Museumsnummer der untersuchten Proben sowie die dokumentierten Fixierdaten.

Tabelle 1: Untersuchte Museumsproben

Museumsnummer	Fixierungsdatum
504	vor 1820
2371	1850/51
5455	1893
16.981/87	1914
17747/1472	1934
9797	1951

Insgesamt wurden im Laufe der Diplomarbeit drei Probenahmen von allen sechs oben angeführten Herzgeweben durchgeführt.

Die Historie der einzelnen Proben hinsichtlich Fixierung, Aufbewahrungslösung, eventueller Nachfixierung und Umbettung, etc. ist nicht bekannt.

3.2 Fixierung von porzinem Herzgewebe

Als Fixierungstypen wurden sowohl für die im Rahmen der Diplomarbeit als auch für die von Dr. Bailer 2007 hergestellten Gewebeproben die Fixierung nach Kaiserling, die Fixierung mit Neutralformol und die Museumsmethode ausgewählt.

Diese Fixierungstypen wurden mit großer Wahrscheinlichkeit im pathologisch-anatomischen Bundesmuseum verwendet.

3.2.1 Fixierung nach Kaiserling

An Stelle der Kaliumverbindungen, die in Kapitel 2.1.4.4 angegeben sind, wurden die jeweiligen Natriumverbindungen verwendet und die eingesetzte Menge der jeweiligen Molarität angepasst.

Zur Herstellung der Fixierlösung nach Kaiserling wurden folgende Chemikalien verwendet:

200 ml H₂O_{dd}

40 ml Formaldehydlösung 38%ig

8,3 g Natriumacetat

2,5 g Natriumnitrat

Für die Fixierung wurden die Chemikalien in einem Erlenmeyerkolben zusammengefügt und eine ca. 5 mm dicke Scheibe des frischen Schweineherzens 5 Tage darin eingelegt. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Konservierungslösung abgegossen, mehrfach mit Leitungswasser gespült und schließlich über Nacht in Leitungswasser stehen gelassen. Am folgenden Tag wurde das Wasser alle zwei Stunden getauscht, die folgenden drei Tage einmal täglich. Abschließend wurde die Probe in Wasser im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt und das Wasser monatlich gewechselt.

3.2.2 Fixierung mit Neutralformol

Zur Herstellung der Fixierlösung wurden 100 ml Formaldehyd und 900 ml Sörensenpuffer pH 7 miteinander gemischt. Für den Sörensenpuffer pH 7 wurden zunächst 2 Stammlösungen hergestellt. Für die Stammlösung A löste man 9,07 g Kaliumhydrogenphosphat in 1000 ml H₂O_{dd}, für die Stammlösung B 11,876 g Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat in 1000 ml H₂O_{dd}. Um die gewünschte Pufferlösung zu erhalten, wurden 61,2 ml Stammlösung B mit 38,8 ml Stammlösung A vermischt. Die Fixierung des Gewebes erfolgte wie unter 3.2.1 beschrieben.

3.2.3 Fixierung mittels der Museumsmethode

Es wurde eine konzentrierte Formaldehydlösung im Verhältnis 1:3 mit Wasser verdünnt. Die Fixierung des Gewebes erfolgte anschließend wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben.

3.3 DNA-Extraktion

Um die DNA in ausreichender Reinheit und Menge zu erhalten, wurden unterschiedliche Extraktionsvarianten getestet. Dabei handelte es sich um zwei kommerziell erhältliche DNA-Extraktionskits, eine Standardmethode, die sogenannten CTAB-Methode, sowie eine in der Literatur beschriebene Alternativmethode auf NaOH-Basis. Zusätzlich wurde die CTAB – Methode in einzelnen Parametern variiert, um etwaige Unterschiede zur Standardmethode festzustellen. In Tabelle 2 sind die durchgeführten Methoden überblicksweise dargestellt.

Tabelle 2: Übersicht über die getesteten Extraktionsvarianten

<i>Extraktionsmethode</i>	<i>Extraktionslösung</i>	<i>Inkubation vor Gewebeverdau</i>	<i>Gewebeverdau</i>	<i>Inkubationszeit nach Verdau</i>	<i>Extraktion/Präzipitationspuffer/Reinigung</i>
CTAB-Standardmethode	CTAB-Extraktionspuffer	30 min bei 65 °C	Prot. K* bei 65 °C für 1-2 h	keine	Chloroform/CTAB-Präzipitationslsg./ Isopropanol & Ethanol abs.
CTAB V1	CTAB-Extraktionspuffer	30 min bei 65 °C	Prot. K* bei 65 °C für 24 h	keine	Chloroform/CTAB-Präzipitationslsg./ Isopropanol & Ethanol abs.
CTAB V2	CTAB-Extraktionspuffer	30 min bei 65 °C	Prot. K* bei 65 °C für 48 h	keine	Chloroform/CTAB-Präzipitationslsg./ Isopropanol & Ethanol abs.
CTAB V3	CTAB-Extraktionspuffer	30 min bei 65 °C	Prot. K* bei 56 °C für 24 h	keine	Chloroform/CTAB-Präzipitationslsg./ Isopropanol & Ethanol abs.
CTAB V4	CTAB-Extraktionspuffer	30 min bei 65 °C	1) Prot. K* bei 56 °C für 2 h 2) 100 °C für 15 min 3) Prot. K* bei 56 °C für 24 h	keine	Chloroform/CTAB-Präzipitationslsg./ Isopropanol & Ethanol abs.
CTAB V5	CTAB-Extraktionspuffer	30 min bei 65 °C	Prot. K* bei 65 °C für 72 h	60 min bei 90 °C	Chloroform/CTAB-Präzipitationslsg./ Isopropanol & Ethanol abs.
CTAB V6	CTAB-Extraktionspuffer	60 min bei 90 °C	Prot. K* bei 65 °C für 24 h	keine	Chloroform/CTAB-Präzipitationslsg./ Isopropanol & Ethanol abs.
CTAB V7	CTAB-Extraktionspuffer + 1% SDS	30 min bei 65 °C	Prot. K* bei 65 °C für 72 h	keine	Chloroform/CTAB-Präzipitationslsg./ Isopropanol & Ethanol abs.
Hot Alkaliextraktion	0,1 M NaOH + 0,5 bzw. 1% SDS	keine	0,1 M NaOH + 0,5 bzw. 1% SDS bei 100 °C für 30 min	keine	Chloroform/ CTAB-Präzipitationslsg./ Isopropanol & Ethanol abs.
QIAamp® DNA Mini Kit	ATL Buffer	keine	Prot. K* bei 56 °C, bis Gewebe lysiert	keine	QIAamp® Mini Spin Säule
QIAamp® DNA FFPE Kit	ATL Buffer	keine	Prot. K* bei 56 °C, bis Gewebe lysiert	60 min bei 90 °C	QIAamp® Mini Spin Säule

* Prot. K = Proteinase K

3.3.1 Reagenzien

PBS-Puffer

3,9 g Natriumdihydrogenphosphat
31,15 g Dinatriumhydrogenphosphat
21,25 g Natriumchlorid
wurden in 2,5 l H₂O_{dd} gelöst

CTAB-Extraktionslösung

20 g/l Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)
1,4 M Natriumchlorid
0,1 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)
0,02 M Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
pH Wert 8,0 mit verdünnter HCl eingestellt

CTAB-Präzipitationslösung

5 g/l CTAB
0,04 M Natriumchlorid

1,2 M Natriumchloridlösung

Chloroform

70% (v/v) Ethanol

Isopropanol abs.

Proteinase K Lösung

100 mg Proteinase K in
4 ml 50% Glycerin, 10 mM Tris-HCl (pH 8)
aliquotiert und bei -18 °C gelagert

RNAse-Lösung

RNAse Stocklösung (29 mg/ml, Sigma)
auf c = 20 µg/ml mit
50% Glycerin, 10 mM Tris-HCl (pH 8) verdünnt
aliquotiert und bei -18 °C gelagert

0,1 M NaOH

10% (w/v) SDS Lösung

QIAamp[®] DNA Mini Kit

QIAamp[®] DNA FFPE Kit

3.3.2 Homogenisierung der Gewebeprouben

Die Homogenisierung der Proben erfolgte gemäß der Empfehlung des QIAamp® DNA Mini Kit Manuals. Dieses empfiehlt die Homogenisierung mit max. 80 µl PBS je 25 mg Gewebe. In den Vorversuchen wurden zunächst 150 mg Gewebe mit 480 µl PBS mit der Kugelmühle homogenisiert und aus der erhaltenen homogenisierten Lösung 100 mg für die DNA-Extraktion weiterverwendet. Da diese Methode bei den 2 Jahre alten Schweineherzproben sowie den Museumspräparaten zu keinem Erfolg führte, wurde bei diesen Proben 100 mg Gewebe mit 320 µl PBS homogenisiert und die gesamte homogenisierte Lösung zur DNA-Extraktion verwendet.

3.3.3 DNA-Extraktion mittels CTAB-Methode

Nach der Homogenisierung wurden 100 mg der erhaltenen Lösung in ein Eppendorfgefäß eingewogen bzw. die gesamte homogenisierte Lösung verwendet, mit 500 µl CTAB-Extraktionslösung versetzt und gründlich mittels Vortex gemischt. Anschließend wurde die Mischung bei 65 °C im Trockenschrank für 30 Minuten inkubiert. Während dieser Zeit wurde die Lösung alle 10 Minuten mittels Vortex gründlich gemischt. Nach Ablauf der 30 Minuten wurden 15 µl Proteinase K Lösung zugegeben und abermals gevortext, bevor die Mischung für 1-2 Stunden bei 65 °C im Trockenschrank inkubiert wurde. Nach der Inkubationszeit wurden 20 µl RNase Lösung zugegeben, gründlich gemischt, 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 10000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert.

Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 200 µl Chloroform versetzt und 1 min kräftig gevortext. Nach 5 min Zentrifugieren bei 10000 rpm zur Phasentrennung wurde die wässrige Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die organische Phase wurde verworfen. Nun wurde die wässrige

Phase mit 2 Volumsteilen CTAB-Präzipitationslösung vermischt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde wieder 5 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das erhaltene Pellet in 350 µl 1,2 M Natriumchloridlösung gelöst. Nach Zugabe von 350 µl Chloroform und 1 min kräftigen Vortexens wurde wieder zur Phasentrennung 5 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert, die organische Phase wurde wieder verworfen. Nun wurden der wässrigen Phase 0,6 Volumsteile Isopropanol zugesetzt und die Lösung kräftig gemischt. Nach 5 min Zentrifugation bei 10000 rpm wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 500 µl eiskaltem 70%igem Ethanol aufgenommen. Nach abermaliger 5 min Zentrifugation bei 10000 rpm wurde der Überstand verworfen und das erhaltene DNA Sediment über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Am nächsten Tag wurde das getrocknete Pellet in 50 – 100 µl H₂O_{dd} aufgenommen und bei –18 °C bis zur Weiterverwendung gelagert.

3.3.4 Abgewandelte CTAB-Methoden zur Optimierung der DNA-Extraktion

3.3.4.1 CTAB V1: 24 h Verdau

150 mg Probe wurden mit 320 µl PBS mit der Kugelmühle homogenisiert. Von der homogenisierten Lösung wurden 100 mg in ein Eppendorfgefäß eingewogen, mit 500 µl CTAB-Extraktionspuffer versetzt und gründlich gemischt. Anschließend wurde die Mischung bei 65 °C 30 min im Trockenschrank inkubiert, wobei die Lösung alle 10 min mittels Vortex gründlich gemischt wurde. Nach Ablauf dieser Zeit wurden 15 µl Proteinase K Lösung zugegeben, gevortext und 24 h bei 65 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 20 µl RNase Lösung zugegeben und in der Folge, wie in Kapitel 3.3.3 bereits beschrieben, weiterverarbeitet.

3.3.4.2 CTAB V2: 48 h Verdau

150 mg Probe wurden mit 320 µl PBS mit der Kugelmühle homogenisiert. Von der homogenisierten Lösung wurden 100 mg in ein Eppendorfgefäß eingewogen, mit 500 µl CTAB-Extraktionspuffer versetzt und gründlich gemischt. Anschließend wurde die Mischung bei 65 °C 30 min im Trockenschrank inkubiert, wobei die Lösung alle 10 min mittels Vortex gründlich gemischt wurde. Nach Ablauf dieser Zeit wurden 15 µl Proteinase K Lösung zugegeben, die Mischung gevortext und 48 h bei 65 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 20 µl RNase Lösung zugegeben und in der Folge, wie in Kapitel 3.3.3 bereits beschrieben, weiterverfahren.

3.3.4.3 CTAB V3: 24 h Verdau bei 56 °C

25 mg Probe wurden mit 80 µl PBS mit der Kugelmühle homogenisiert, mit 500 µl CTAB-Extraktionspuffer versetzt und gründlich gemischt. Anschließend wurde die Mischung bei 56 °C 30 min im Trockenschrank inkubiert, wobei die Lösung alle 10 min mittels Vortex gründlich gemischt wurde. Nach Ablauf dieser Zeit wurden 15 µl Proteinase K Lösung zugegeben, die Mischung gevortext und 24 h bei 56 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 20 µl RNase Lösung zugegeben und in der Folge, wie in Kapitel 3.3.3 bereits beschrieben, weiterverfahren.

3.3.4.4 CTAB V4: 3 Stufenverdau

100 mg Probe wurden mit 320 µl PBS mit der Kugelmühle homogenisiert, mit 500 µl CTAB-Extraktionspuffer versetzt, und gründlich gemischt. Anschließend wurde die Mischung bei 65 °C 30 min im Trockenschrank inkubiert, wobei die Lösung alle 10 min mittels Vortex gründlich gemischt wurde. Nach Ablauf dieser Zeit wurden 15 µl Proteinase K Lösung zugegeben, die Mischung gevortext und 2 Stunden bei 56 °C inkubiert (1. Stufe). Anschließend wurde die Lösung 15 min bei 100 °C im Trockenschrank inkubiert und danach auf Raumtemperatur abgekühlt (2. Stufe). Nach Zugabe von 15 µl frischer Proteinase K Lösung wurde die Probe für 24 h bei 56 °C im Trockenschrank inkubiert (3. Stufe). Nach Ablauf

der Inkubationszeit wurden 20 µl RNase Lösung zugegeben und in der Folge, wie in Kapitel 3.3.3 bereits beschrieben, weiterverfahren.

3.3.4.5 CTAB V5: 72 h Verdau mit anschließender Inkubation bei 90 °C

100 mg Probe wurden mit 320 µl PBS mittels Kugelmühle homogenisiert, mit 500 µl CTAB-Extraktionspuffer versetzt und gründlich gemischt. Anschließend wurde die Mischung bei 65 °C 30 min im Trockenschrank inkubiert, wobei die Lösung alle 10 min mittels Vortex gründlich gemischt wurde. Nach Ablauf dieser Zeit wurden 15 µl Proteinase K Lösung zugegeben, die Mischung gevortext und 72 h bei 65 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 20 µl RNase Lösung zugegeben und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurde die Probe bei 90 °C für 60 min im Trockenschrank inkubiert, anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt und 5 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von 200µl Chloroform wurde, wie bereits in Kapitel 3.3.3 beschrieben, weiterverfahren.

3.3.4.6 CTAB V6: 1 h Inkubation bei 90 °C vor dem Verdau

100 mg Probe wurden mit 320 µl PBS mit der Kugelmühle homogenisiert, mit 500 µl CTAB-Extraktionspuffer versetzt und gründlich gemischt. Anschließend wurde die Mischung bei 90 °C 60 min im Trockenschrank inkubiert, wobei die Lösung alle 10 min mittels Vortex gründlich gemischt wurde. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 15 µl Proteinase K Lösung zupipettiert, die Mischung 24 h bei 65 °C im Trockenschrank inkubiert und in der Folge, wie in Kapitel 3.3.3. beschrieben, weiterverfahren.

3.3.4.7 CTAB V7: 72 h Verdau und Zugabe von 1% SDS (w/v) zum CTAB-Extraktionspuffer

100 mg Probe wurden mit 320 µl PBS mit der Kugelmühle homogenisiert, mit 500 µl CTAB-Extraktionspuffer, zu dem 1% (w/v) SDS zugegeben wurde, versetzt und gründlich gemischt. Anschließend wurde die Mischung bei 65 °C 30 min im Trockenschrank inkubiert, wobei die Lösung alle 10 min mittels Vortex gründlich gemischt wurde. Nach Ablauf dieser Zeit wurden 1 µl Proteinase K Lösung zugegeben, die Mischung gevortext und 72 h bei 65 °C inkubiert. Die weitere Vorgangsweise ist in Kapitel 3.3.3 beschrieben.

3.3.5 Hot Alkaliextraktion

100 mg Probe wurden mit 320 µl PBS mit der Kugelmühle homogenisiert. Anschließend wurde 5 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und die festen Bestandteile in 500 µl 0,1M NaOH + 0,5% bzw. 1% SDS (w/v) aufgenommen. Die Lösung wurde 30 min bei 100 °C im Trockenschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde 5 min zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 200 µl Chloroform versetzt. Die weitere Vorgangsweise nach der Chloroformzugabe ist in Kapitel 3.3.3 beschrieben.

3.3.6 DNA-Extraktion mit dem QIAamp[®] DNA Mini Kit

Die DNA-Extraktion wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. 25 mg Gewebe wurden mit 80 µl PBS mit der Kugelmühle homogenisiert. Nun wurden 100 µl ATL Buffer zugegeben, die Mischung kurz gevortext und 20 µl Proteinase K Lösung zupipettiert. Nach abermaligem Vortexen wurde die Lösung bei 56 °C so lange im Trockenschrank inkubiert, bis das gesamte Gewebe vollständig lysiert war. Während der Inkubationszeit wurde die Lösung alle 10 min kurz gevortext. Nach kurzer Zentrifugation wurden 20 µl RNaseösung zuge-

fügt, die Mischung gevortext und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde wieder kurz zentrifugiert und im Anschluss 200 µl AL Buffer zugegeben. Nun wurde die Lösung wieder gemischt und 10 min bei 70 °C im Trockenschrank inkubiert. Danach wurde kurz zentrifugiert, 200 µl Ethanol abs. zugegeben, gründlich gemischt und abermals kurz zentrifugiert. Anschließend wurde die gesamte Lösung auf eine QIAamp® Mini Spin Säule, ausgestattet mit einem 2 ml Auffanggefäß, aufgetragen und 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Das Auffanggefäß wurde danach ausgetauscht, das Filtrat verworfen und 500 µl AW1 Buffer auf die Säule aufgetragen. Abermals wurde 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert und das Auffanggefäß mit dem Filtrat verworfen. Nachdem die Säule in ein neues Auffanggefäß platziert wurde, wurden 500 µl AW2 Buffer auf die Säule aufgetragen, für 3 min bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert und das Filtrat entsorgt. Nun wurde die Säule auf ein Eppendorfgefäß gesetzt, 200 µl AE Buffer auf die Säule aufgetragen und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert und der gewonnene DNA-Extrakt bei -18 °C gelagert.

3.3.7 DNA-Extraktion mit dem QIAamp® DNA FFPE Kit

Die DNA-Extraktion wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Da die Proben aber nicht in Paraffin eingebettet waren, wurden die Schritte zur Entfernung des Paraffins weggelassen.

25 mg des Gewebes wurden mit 80 µl PBS mittels Kugelmühle homogenisiert und dann 2 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 180 µl ATL Buffer resuspendiert und mit 20 µl Proteinase K Lösung versetzt. Nach gründlichem Mischen wurde die Probe bei 56 °C im Trockenschrank inkubiert, bis das gesamte Gewebe lysiert war. Anschließend wurde die Probe bei 90 °C für 60 min im Trockenschrank inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur und kurzer Zentrifugation wurden 20 µl RNase Lösung zupipettiert, gründlich gemischt und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 200 µl AL Buffer sowie 200 µl Ethanol abs. zugegeben und sorgfältig gemischt. Nach kurzer Zentrifugation wurde die gesamte Lösung auf eine

QIAamp® Mini Spin Säule mit Auffanggefäß aufgetragen und 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat und das Gefäß wurden verworfen, die Säule auf ein neues Auffanggefäß gesetzt und 500 µl AW1 Buffer auf die Säule aufgetragen. Danach wurde wieder 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert, die Säule auf ein neues Auffanggefäß gesetzt und das Filtrat samt Auffanggefäß entsorgt. Nun wurden 500 µl AW2 Buffer auf die Säule pipettiert und wiederum 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Zur vollständigen Trocknung der Säulenmembran wurde nach Aufsetzen der Säule auf ein neues Auffanggefäß 3 min bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert. Danach wurden die Säule auf ein Eppendorfggefäß gesetzt, 50 ATE Buffer auf die Säule aufgetragen und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde bei voller Geschwindigkeit 1 min zentrifugiert und die erhaltene DNA-Lösung bei -18 °C bis zur Weiterverwendung gelagert.

3.3.8 Vermeidung von Kontaminationen

Eines der größten Probleme beim Arbeiten mit humaner DNA ist das Verhindern von Kontaminationen der Proben mit DNA, die nicht aus der Probe selbst stammt. Aus diesem Grund wurden vor Extraktionsbeginn Messer, Schneidbrett, Metallkugeln zur Homogenisierung und Oberflächen mit DNA-EXITUS-PLUS™ gemäß Anleitung des Herstellers behandelt. Frischgewebe wurde stets zum Schluss aufgearbeitet, um die Kontamination der Proben zu vermeiden. Des Weiteren wurden die Aufarbeitung der Proben sowie das Ansetzen der PCR-Platten in getrennten Räumen durchgeführt. Die Pipetten, welche zum Ansetzen der PCR dienten, wurden zusätzlich vor Arbeitsbeginn 60 min mittels eines Transilluminators mit UV-Licht bestrahlt, um etwaige DNA zu zerstören.

3.4 Bestimmung der Konzentration und Reinheit der isolierten DNA

Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit des DNA-Extraktes wurde ein Aliquot im Verhältnis 1:5 mit bidestilliertem Wasser in Mikroküvetten (Gesamtvolumen 80 µl) verdünnt. Anschließend wurde die Extinktion bei den Wellenlängen 260 nm (A_{260}) und 280 nm (A_{280}) mittels eines Photometer gemessen.

Zur Bestimmung der Reinheit wurde der Quotient von A_{260}/A_{280} berechnet, wobei ein Sollwert zwischen 1,8 und 2,2 erreicht werden sollte.

Die DNA-Konzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

$$c [\mu\text{g/ml}] = A_{260} * V * F$$

c = Konzentration

A_{260} = Extinktion bei 260 nm

V = Verdünnungsfaktor

F = Faktor für doppelsträngige DNA (F=50)

3.5 REAL-TIME PCR

Zur Durchführung der Real-Time PCR-Versuche wurde ein iCycler Thermocycler, kombiniert mit einem IQTM5 Multicolor Real-Time Detection System der Firma BioRad verwendet.

Die Ansätze wurden in 96 Wellplatten der Firma BioRad pipettiert, wobei jeder Ansatz ein Gesamtvolumen von 25 µl hatte. Nach dem Befüllen wurde die Platte mit Klebefolie verschlossen.

Pro Analyse wurden auf der Platte Positivkontrollen (DNA aus nicht fixiertem Gewebe) und Negativkontrollen ($\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$) im Doppel- oder Dreifachansatz mitbestimmt. Die Analyse der Proben erfolgte ebenfalls in Doppelansätzen.

Die DNA-Konzentration der Proben und Positivkontrollen wurde durch Verdünnen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ auf 20 ng/µl eingestellt. Wurde diese Konzentration bei den Pro-

ben nicht erreicht, wurde dies, sofern die Konzentration ausreichend war, durch Zugabe von Probe zum Mastermix ausgeglichen (siehe Kapitel 3.5.2). Die Abso- lutmenge an DNA betrug somit bei allen Proben 100 ng pro well.

3.5.1 Primer und Sonden

Für das Design von Primer und Sonden wurde das Softwareprogramm Beacon Designer 7.0 (PREMIER Biosoft International) verwendet.

Als Target wurde eine Gensequenz ausgesucht, die beim Schwein und beim Menschen eine hohe Übereinstimmung aufweist. Dazu wurde die DNA-Datenbank auf www.pubmed.com herangezogen. Die jeweiligen verschiedenen Gene, die für humane und porzine Proteine kodieren, wurden mittels BLAST miteinander abgeglichen und bei hoher Übereinstimmung anschließend nach passenden Primern und Sonden durchsucht.

Schlussendlich wurde das für Albumin kodierende Gen ausgewählt. Dazu pas- send wurden für porzine und humane DNA zur Sonde kompatible Primerpaare ausgewählt. Die so erhaltenen Amplikons unterschieden sich voneinander in der Länge durch ein Basenpaar.

Die Primer wurden von der Firma Sigma bzw. die Sonde von Metabion syntheti- siert. Nach der Lieferung wurden sie auf eine Konzentration von 10 μM (Primer) bzw. 1 μM (Sonde) mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ verdünnt und Aliquote bei $-18\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

3.5.1.1 Kriterien beim Entwerfen von Primern

Folgende Kriterien wurden bei der Auswahl der Primer berücksichtigt:

- ♣ Länge: 16-30 Basenpaare
- ♣ GC-Gehalt: 35 - 65%
- ♣ Nicht mehr als 4 aufeinanderfolgende gleiche Basen
- ♣ Keine 3' Komplementarität, um die Bildung von Primer-Dimeren zu vermei- den

- ▲ T_m zwischen 55 und 80 °C
- ▲ Amplikonlänge zwischen 100 und 250 Basenpaare

3.5.1.2 Kriterien bei der Auswahl der TaqMan-Sonde

Folgende Kriterien wurden bei der Auswahl der TaqMan – Sonde berücksichtigt:

- 5' Ende der Sonde in relativer Nähe des 3' Endes des Primers
- Länge: 20-30 Basenpaare
- GC-Gehalt: 40 –60%
- T_m 5 – 10 °C höher als T_m der Primer
- Quencher am 3' Ende
- Kein G am 5' Ende der Sonde
- Nach Möglichkeit nicht mehr als 3 gleiche Basen in Folge
- Nicht mehr C als G in der Sondensequenz
- Keine Komplementarität zu Primern
- Keine Sekundärstruktur
- Nicht mehr als 3 C oder G in den letzten 5 Basen des 3' Endes

3.5.1.3 Primer und Sonden Sequenzen

In Tabelle 3 sind die Sequenzen der verwendeten Primer und der Sonde, sowie die Accession number, die in der Datenbank der jeweiligen Gensequenz zugeordnet ist, angegeben.

Tabelle 3: Sequenzen der verwendeten Primer und der Sonde

Accession number	Bezeichnung	DNA-Sequenz 5' → 3'
Porzines Albumin AY663543 121 bp Amplikon	<i>F por Alb-Primer</i> <i>R por Alb-Primer</i> <i>TaqMan-Sonde</i>	GCCTGCTAATAATATTTTGATGGG ACTTTTGCAAGATCTGTCACTATC CTCGCCTGAGCCAGAGATTTCCCAA
Humanes Albumin EF649953 122 bp Amplikon	<i>F hum Alb-Primer</i> <i>R hum Alb-Primer</i> <i>TaqMan-Sonde</i>	TCGCATGATAATACCATTTTGATTG ACTTTGGTAAGATCTGTCACTAAC CTCGCCTGAGCCAGAGATTTCCCAA
Humanes Albumin EF649953 171 bp Amplikon	<i>F hum Alb-Primer</i> <i>R hum Alb-Primer</i> <i>TaqMan-Sonde</i>	TCGCATGATAATACCATTTTGATTG CCTGTCATCAGCACATTCAAG CTCGCCTGAGCCAGAGATTTCCCAA

3.5.2 Pipettierschema

Alle PCR-Experimente wurden mit einem Gesamtvolumen von 25 µl pro Well durchgeführt. Der Ansatz bestand dabei jeweils aus:

- 12,5 µl Supermix (IQ™ SYBR® Green bzw. IQ™ Supermix)
- 7,5 µl Mastermix (bestehend aus H₂O_{dd.}, Primern und Sonde
(wenn die DNA-Konzentration ausgeglichen werden musste, wurde ein Teil des H₂O_{dd} durch Probe ersetzt)
- 5,0 µl Probe bzw. H₂O bei Negativkontrolle

Der Mastermix wurde vor jedem PCR-Lauf für die entsprechende Gesamtanzahl der Wells frisch hergestellt. Die gewünschten Primer- bzw. Sondenkonzentrationen im Mastermix wurden durch Zupipettieren von Wasser hergestellt.

Bei Proben, die die erforderliche Konzentration von 20 ng/µl nicht erreichten, wurden zum Ausgleich Teile des Wassers im Mastermix durch Probelösung er-

setzt, um eine Absolutmenge von 100 ng DNA pro Well zu erreichen. In diesem Fall wurde für jede Probe ein eigener Mastermix verwendet.

3.5.3 PCR-Assays

Zur Optimierung der Primerkonzentration und Annealingtemperatur wurde ein SYBR[®] Green Assay verwendet. Die daraus ermittelten optimierten Werte wurden in der Folge in einem TaqMan Assay mit Sonde übernommen und dieser Assay für alle weiteren Analysen angewendet.

3.5.3.1 SYBR[®] Green Assay

Wie bereits in Kapitel 3.5.2 beschrieben, betrug das Gesamtvolumen pro Well 25 µl, bestehend aus 12,5 µl Supermix, 7,5 µl Mastermix (bestehend aus H₂O und Primern) und 5 µl Probe. Der IQ[™] SYBR[®] Green Supermix (BioRad) bestand aus:

- ◆ 100 mM KCl
- ◆ 40 mM Tris-HCl, pH 8,4
- ◆ je 0,4 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP
- ◆ 50 U/ml iTaq-DNA-Polymerase
- ◆ 6 mM MgCl₂
- ◆ SYBR[®] Green I
- ◆ 20 nM Fluorescein
- ◆ Stabilisatoren

Nach Lieferung wurde der Supermix aliquotiert und bei -18 °C aufbewahrt.

3.5.3.2 TaqMan Assay

Wie beim SYBR[®] Green Assay betrug auch hier das Gesamtvolumen pro Well 25 µl, welches sich aus 12,5 µl Supermix, 7,5 µl Mastermix (bestehend aus H₂O, Primern und Sonde) und 5 µl Probe zusammensetzte.

Der für diesen Assay erforderliche Supermix wurde von der Firma BioRad gekauft und besteht laut Firmenangabe aus:

- 100 mM KCl
- 40 mM Tris-HCl, pH 8,4
- je 0,4 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP
- 50 U/ml iTaq-DNA-Polymerase
- 6 mM MgCl₂
- Stabilisatoren

Der IQ Supermix wurde nach Lieferung aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei –18 °C gelagert.

3.5.4 Entwicklung einer Real-Time PCR-Methode zur Amplifikation von DNA aus porzinem Gewebe

3.5.4.1 Optimierung der Annealingtemperatur sowie der Primerkonzentrationen

Zur Optimierung der Annealingtemperatur und der Primerkonzentration wurden sechs unterschiedliche Annealingtemperaturen mit insgesamt neun Mastermixen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Forward- und Reverseprimer im Bereich von 100 bis 300 nM getestet.

Tabelle 4 dient als Überblick für die getesteten Mastermixe.

Tabelle 4: Getestete Mastermixe bei der Primerkonzentrationsoptimierung

Primerkonzentration Forward/Reverse (nM)	Ansatz Forward- primer/Well (c=10 mM)	Ansatz Reverse- primer/Well (c=10 mM)	Ansatz H₂O/ Well
100/100	0,25 µl	0,25 µl	7,00 µl
100/200	0,25 µl	0,50 µl	6,75 µl
100/300	0,25 µl	0,75 µl	6,50 µl
200/100	0,50 µl	0,25 µl	6,75 µl
200/200	0,50 µl	0,50 µl	6,50 µl
200/300	0,50 µl	0,75 µl	6,25 µl
300/100	0,75 µl	0,25 µl	6,50 µl
300/200	0,75 µl	0,50 µl	6,25 µl
300/300	0,75 µl	0,75 µl	6,00 µl

Als Positivprobe diente ein DNA-Extrakt aus nicht fixiertem porzinem Gewebe mit der Konzentration von 20 ng/µl. Jedes Well wurde wie in Kapitel 3.5.2 beschrieben befüllt, anschließend die Platte mit Klebefolie verschlossen und im Thermocycler platziert.

Über die Software wurde das in Tabelle 5 angegebene Temperaturprogramm eingegeben, welches am Ende (Schritt 3) eine Schmelzpunktanalyse enthält. Diese diente zur Überprüfung, ob tatsächlich nur ein Amplikon bestimmter Länge gebildet wurde bzw. gab Aufschluss über eine eventuelle Bildung von Dimeren.

Tabelle 5: Temperaturprogramm zur Optimierung der Primerkonzentration und der Annealingtemperatur

	Dauer	Temperatur	Anzahl der Wiederholungen
Schritt 1	3 min	95 °C	1 x
Schritt 2	20 sec	95 °C	45 x
	40 sec	X	
	10 sec	72 °C	
Schritt 3	10 sec	X'	81 x

X... Temperaturgradient mit T= 61,5; 60,3; 57,4; 55,9; 54,1 und 52,8 °C

X'... Temperaturgradient bei der Schmelzkurvenanalyse: Beginnend bei 55 °C wurde bei jeder Wiederholung die Temperatur um 0,5 °C erhöht

3.5.4.1 Optimierung der Sondenkonzentration

Zur Optimierung der Sondenkonzentration wurden vier verschiedene Sondenkonzentrationen im Bereich von 25 bis 200 nM bei drei verschiedenen Annealingtemperaturen um die optimierte Annealingtemperatur der Primer getestet. Als Primerkonzentration wurden die zuvor ermittelten optimierten Werte verwendet.

Tabelle 6 dient als Überblick für die getesteten Mastermixe.

Tabelle 6: Überblick über die getesteten Mastermixe bei der Optimierung der Sondenkonzentration

Konzentration F-Primer/R-Primer/Sonde (nM)	Ansatz F-Primer/Well (c= 10 mM)	Ansatz R-Primer/Well (c= 10 mM)	Ansatz Sonde/Well (c= 1 mM)	Ansatz H₂O/ Well
300/300/25	0,75 µl	0,75 µl	0,625 µl	5,375 µl
300/300/50	0,75 µl	0,75 µl	1,250 µl	4,750 µl
300/300/100	0,75 µl	0,75 µl	2,500 µl	3,500 µl
300/300/200	0,75 µl	0,75 µl	5,000 µl	1,000 µl

Als Positivprobe wurde ein DNA-Extrakt aus nicht fixiertem porzinem Gewebe mit der Konzentration von 20 ng/µl verwendet. Jedes Well wurde wie in 3.5.2 beschrieben befüllt, anschließend die Platte mit Klebefolie verschlossen und im Thermocycler platziert.

Über die Software wurde das Temperaturprogramm eingestellt, welches in Tabelle 7 angegeben ist.

Tabelle 7: Temperaturprogramm zur Optimierung der Sondenkonzentration

	<i>Dauer</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Anzahl der Wiederholungen</i>
Schritt 1	3 min	95 °C	1 x
Schritt 2	20 sec	95 °C	45 x
	40 sec	X	
	10 sec	72 °C	

X...Temperaturgradient (57,4; 54,9 und 53,1 °C)

3.5.4.2 Bestimmung der Effizienz

Zur Ermittlung der Effizienz wurden DNA-Extrakte (c =20 ng/µl) aus nicht fixiertem porzinem Gewebe seriell verdünnt und diese Lösungen mittels des TaqMan Assay analysiert.

Der Tabelle 8 sind die Verdünnungen und die jeweiligen DNA-Konzentrationen zu entnehmen.

Tabelle 8: Eingesetzte DNA-Verdünnungen zur Ermittlung der Effizienz

<i>Verdünnung</i>	<i>Konzentration (ng/µl)</i>
1	<i>20</i>
1:10	<i>2</i>
1:100	<i>0,2</i>
1:1000	<i>0,02</i>
1:10000	<i>0,002</i>
1:100000	<i>0,0002</i>
1:1000000	<i>0,00002</i>

Die Verdünnungen sowie die Negativproben wurden wie in Kapitel 3.5.2 beschrieben in Wells pipettiert, die Platte mit Klebefolie verschlossen, im Thermocycler platziert und analysiert.

Die Effizienz wurde im Anschluss aus der Steigung der Standardgerade nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Effizienz [\%]} = \left(10^{\left(\frac{-1}{\text{Steigung}}\right)} - 1 \right) * 100$$

3.5.4.3 Anwendung der entwickelten Methode zur Amplifikation von DNA aus fixiertem porzinem Gewebe

Im Rahmen der Diplomarbeit wurden sechs unterschiedliche Proben analysiert: Drei zu Beginn der praktischen Arbeit nach den in Kapitel 3.2 beschriebenen Methoden fixierten Schweineherzen sowie drei Proben, die von Dr. Bailer im Februar 2007 fixiert worden waren.

Für diese Analysen wurden die zuvor optimierten Werte für die Primer- und Sondenkonzentration sowie die optimierte Annealingtemperatur verwendet, welche wie folgt lauteten:

Primerkonzentration (F por Alb-Primer/R por Alb-Primer) (nM): 300/300

Sondenkonzentration (nM): 100

Annealingtemperatur (°C): 54,9

Bei jeder Analyse wurden Positivkontrollen (DNA-Extrakte aus nicht fixiertem Gewebe) und eine Negativkontrolle (autoklaviertes Wasser) mit aufgetragen. Diese wurden wie die Proben im Doppel- oder Dreifachansatz pipettiert.

Die Proben und die Positivkontrolle wurden auf DNA-Konzentrationen von 20 ng/µl eingestellt. Konnte dies bei den Proben aufgrund einer zu niedrigen Konzentration nicht durchgeführt werden, wurde dies ausgeglichen, indem für die jeweilige Probe ein eigener Mastermix hergestellt wurde, bei dem Teile des H₂O durch Probe ersetzt wurden, um auf eine DNA-Absolutmenge von 100 ng/Well zu kommen.

Jedes Well wurde wie in 3.5.2 beschrieben befüllt, anschließend die Platte mit Klebefolie verschlossen und im Thermocycler platziert.

Anschließend wurde das in Tabelle 9 dargestellte Temperaturprogramm in die Software eingegeben.

Tabelle 9: Temperaturprogramm der PCR-Methode für porcine DNA

	Dauer	Temperatur	Anzahl der Wiederholungen
Schritt 1	3 min	95 °C	1 x
Schritt 2	20 sec	95 °C	45 x
	40 sec	54,9 C	
	10 sec	72 °C	

3.5.5 Entwicklung einer Real-Time PCR-Methode zur Amplifikation von DNA aus humanen Geweben

3.5.5.1 Optimierung der Annealingtemperatur sowie der Primerkonzentrationen

Zur Optimierung der Konzentration beider Primerpaare wurden unterschiedliche Annealingtemperaturen mit insgesamt neun Mastermixen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Forward- und Reverseprimern im Bereich von 100 bis 300 nM getestet. Beim kürzeren Amplikon (122 bp) wurden aufgrund der hohen Übereinstimmung mit den Sequenzen der por Alb-Primer nur drei Annealingtemperaturen (57,4; 54,9 und 53,1 °C) um die bereits optimierte Temperatur des porcinen DNA-Assays getestet. (siehe Kapitel 3.5.4)

Beim 171 bp Amplikon wurden wiederum sechs unterschiedliche Annealingtemperaturen (Temperaturgradient 59,3; 57,4; 54,9; 53,1; 51,8; 51,0 °C) getestet. Das Temperaturprogramm ist in Tabelle 5, die Zusammensetzung der einzelnen Mastermixe in Tabelle 4 in Kapitel 3.5.4.1 angegeben.

Als Positivprobe diente ein DNA-Extrakt aus nicht fixiertem humanem Gewebe mit der Konzentration von 20 ng/µl. Jedes Well wurde wie in 3.5.2 beschrieben befüllt, anschließend die Platte mit Klebefolie verschlossen und im Thermocycler platziert. Das verwendete Temperaturprogramm ist in Tabelle 5 in Kapitel 3.5.4.1 angegeben.

3.5.5.2 Optimierung der Sondenkonzentration

Die Sondenkonzentration für den TaqMan-Assay wurde für beide Primerpaare optimiert. Dazu wurden vier verschiedene Sondenkonzentrationen im Bereich von 25 bis 200 nM bei drei verschiedenen Temperaturen rund um die optimierte Annealingtemperatur der Primer getestet. Als Primerkonzentration wurden die zuvor ermittelten optimierten Werte verwendet.

Tabelle 6 in Kapitel 3.5.4.1 zeigt die Zusammensetzung der getesteten Mastermixe.

Als Positivprobe diente ein DNA-Extrakt aus nicht fixiertem humanem Gewebe mit der Konzentration von 20 ng/µl. Jedes Well wurde wie in 3.5.2 beschrieben befüllt, anschließend die Platte mit Klebefolie verschlossen und im Thermocycler platziert.

Das verwendete Temperaturprogramm ist Tabelle 7 in Kapitel 3.5.4.1 zu entnehmen, wobei die getesteten Annealingtemperaturen bei beiden Primerpaaren 59,3; 57,4 und 54,9 °C waren.

3.5.5.3 Bestimmung der Effizienz

Die Bestimmung der Effizienz des entwickelten Assays für humanes Gewebe wurde wie in 3.5.4.2 beschrieben durchgeführt.

3.5.5.4 Anwendung der entwickelten Methode zur Amplifikation von DNA aus fixiertem humanem Gewebe

Sofern aus den vom pathologisch-anatomischen Bundesmuseum zur Verfügung gestellten Herzgewebeproben DNA extrahiert werden konnte, wurden diese Lösungen mit der entwickelten Methode auf amplifizierbare DNA untersucht. Für die Analysen wurden die zuvor optimierten Bedingungen angewendet. Für die hum Alb-Primer (122 bp Amplicon) waren dies:

Primerkonzentration (F hum Alb-Primer/R hum Alb-Primer) (nM): 200/300

Sondenkonzentration (nM): 50

Annealingtemperatur (°C): 57,4

Für die hum Alb-Primer (171 bp Amplicon) waren dies:

Primerkonzentration (F hum Alb-Primer/R hum Alb-Primer) (nM): 300/200

Sondenkonzentration (nM): 50

Annealingtemperatur (°C): 57,4

Jede Analyse wurde mit Positivkontrollen (DNA-Extrakt aus nicht fixiertem Gewebe) und Negativkontrollen (autoklaviertes Wasser) durchgeführt und wie die Proben im Doppel- oder Dreifachansatz durchgeführt.

Die Proben und die Positivkontrolle wurden auf DNA-Konzentrationen von 20 ng/µl eingestellt. Konnte dies bei den Proben aufgrund einer zu niedrigen Konzentration nicht durchgeführt werden, wurde dies ausgeglichen, indem für die jeweilige Probe ein eigener Mastermix hergestellt wurde, bei dem Teile des H₂O durch Probe ersetzt wurde, um auf eine DNA-Absolutmenge von 100 ng/ Well zu kommen.

Jedes Well wurde wie in 3.5.2 beschrieben befüllt, anschließend die Platte mit Klebefolie verschlossen und im Thermocycler platziert.

Anschließend wurde das in Tabelle 10 dargestellte Temperaturprogramm in die Software eingegeben.

Tabelle 10: Temperaturprogramm der PCR-Methode für humane DNA

	Dauer	Temperatur	Anzahl der Wiederholungen
Schritt 1	3 min	95 °C	1 x
Schritt 2	20 sec	95 °C	45 x
	40 sec	57,4 C	
	10 sec	72 °C	

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 DNA-Extraktion

Da bei den fixierten humanen Gewebeproben des pathologisch-anatomischen Museums keine vollständige Dokumentation vorliegt, und damit genaue Fixierung, Aufbewahrungslösung, eventuelle Umbettungen oder Nachfixierungen der Proben nicht bekannt sind, wurde zu Beginn der Diplomarbeit porcines Herzgewebe unter normierten Bedingungen mit drei Fixiermethoden konserviert. Außerdem wurde auf porcine Gewebeproben zurückgegriffen, die bereits 2007 unter gleichen Bedingungen mit den drei Fixiermethoden konserviert worden waren. Anhand der 2007 fixierten Proben wurde auch getestet, ob verschiedene Extraktionsvarianten eine Auswirkung auf die Qualität der extrahierten DNA und somit auf die Amplifizierbarkeit mit der PCR-Methode haben.

Details zur Fixierung des porcinen Herzgewebes sind im Kapitel 3.2 zu finden.

Die DNA-Extraktion aus nicht fixierten und fixierten porcinen und humanen Geweben erfolgte wie in Kapitel 3.3 beschrieben mittels der CTAB-Methode, Varianten der CTAB-Methode, der Hot Alkaliextraktion und zwei kommerziell erhältlichen Kits.

4.1.1 DNA-Extraktion aus nicht fixiertem porcinem Gewebe

Zu Beginn der Diplomarbeit wurde DNA aus nicht fixiertem porcinem Gewebe mit zwei DNA-Extraktionsmethoden isoliert, zum einen mit der CTAB-Methode, zum anderen mit einem kommerziell erhältlichen Kit. Die Details zur Homogenisierung sind in Kapitel 3.3.2, die experimentellen Details in den Kapiteln 3.3.3 und 3.3.6 beschrieben.

Mit der CTAB Methode konnten bis auf wenige Ausnahmen gute Ergebnisse bezüglich Reinheit und Konzentration der DNA erreicht werden. Auch die Extraktion mit dem Kit lieferte diesbezüglich zufriedenstellende Ergebnisse.

Die Tabellen 11 und 12 geben die Reinheit und Konzentration der Extrakte aus nicht fixiertem porzinem Gewebe mit der CTAB-Methode und dem Kit wieder. Die Details zur Berechnung der Reinheit und der Konzentration sind in Kapitel 3.4 beschrieben.

Tabelle 11: Reinheit und Konzentration der mittels der CTAB-Methode aus nicht fixiertem porzinem Gewebe extrahierten DNA

<i>Einwaage zur Homogenisierung [mg]</i>	<i>Einwaage zur Extraktion [mg]</i>	<i>Reinheit A_{260}/A_{280}</i>	<i>DNA-Konz. [ng/μl]</i>	<i>μg DNA/ 100 mg homog. Probe</i>
156	96	1,92	50,00	5,21
156	104	1,62	31,50	3,03
149	104	1,68	63,75	6,13
149	102	1,15	91,25	8,95
146	109	1,28	23,75	2,18
146	128	/	/	/
148	107	2,08	41,50	3,88
148	113	1,07	47,25	4,18
155	108	1,43	50,00	4,63
155	110	1,27	83,50	7,59
153	100	/	/	/
153	112	1,47	29,75	2,66
152	134	2,36	53,00	3,96
152	139	1,38	84,25	6,06
158	130	2,25	38,25	2,94
158	119	2,80	80,50	6,76
150	125	1,97	45,25	3,62
150	137	1,52	57,50	4,20
156	116	0,97	21,00	1,81
156	132	1,27	112,75	8,54
151	108	1,37	188,75	17,48
151	105	1,74	23,00	2,19
155	106	2,00	109,75	10,35
155	114	1,92	112,50	9,87
157	117	1,70	121,75	10,41
157	111	1,50	95,50	8,60
156	131	1,86	65,00	4,96

Fortsetzung Tabelle 11: Reinheit und Konzentration der mittels der CTAB-Methode aus nicht fixiertem porzinem Gewebe extrahierten DNA

156	101	1,23	40,00	3,96
156	130	1,95	131,50	10,12
156	131	2,04	170,00	12,98

/... A₂₆₀ nicht messbar

... für PCR-Analyse verwendet

Tabelle 12: Reinheit und Konzentration der mit dem QIAamp[®] DNA Mini Kit aus nicht fixiertem porzinem Gewebe extrahierten DNA

<i>Einwaage zur Extraktion [mg]</i>	<i>Reinheit A₂₆₀/A₂₈₀</i>	<i>DNA-Konz. [ng/μl]</i>	<i>μg DNA/ 100 mg homogenisierter Probe</i>
32	1,76	15,10	18,88
24	1,86	24,50	40,83
24	1,82	10,40	17,33
30	1,70	22,20	29,60
20	1,73	26,60	53,20
23	1,77	16,80	29,22
25	1,74	18,75	30,00
39	1,82	17,50	17,95
26	1,44	18,00	27,69

Mit der CTAB-Methode konnte die angestrebte DNA-Konzentration von 20 ng/μl sowie eine Reinheit zwischen 1,6 und 2,2 bei fast allen Extraktionsansätzen erreicht werden. Die erhaltene Menge an DNA je 100 mg homogenisierter Probe variierte zum Teil sehr stark und betrug zwischen 2 und 20 μg.

Die Extraktion mit dem QIAamp[®] DNA Mini Kit lieferte größtenteils DNA-Konzentrationen unter 20 ng/μl, die Ausbeute an DNA je 100 mg homogenisierter Probe war jedoch durchwegs größer und lag im Bereich von 17 bis 53 μg. Der Grund für die niedrige Konzentration liegt in der zweimaligen Elution der DNA mit jeweils 200 μl Buffer AE. Durch Verwenden eines kleineren Elutionsvolumens würde die Konzentrationen über 20 ng/μl liegen. Dennoch waren alle erhaltenen DNA-Extrakte für eine PCR-Analyse verwendbar, weil die zu geringe

Konzentration durch den Ersatz von Wasser durch Probelösung im Mastermix ausgeglichen werden konnte (siehe Kapitel 3.5.2).

Basierend auf den oben angeführten Ergebnissen wurden zunächst beide Extraktionsmethoden zur Extraktion von DNA aus Formalin fixiertem porzinem Gewebe verwendet.

4.1.2 DNA-Extraktion aus Formalin fixiertem porzinem Gewebe

4.1.2.1 Frisch fixiertes Gewebe

Im Rahmen der Diplomarbeit wurde frisches porzines Gewebe mit drei unterschiedlichen Fixiermethoden unter normierten Bedingungen konserviert. Die Details zu den verwendeten Fixierungsmethoden sowie der Durchführung der Fixierungen sind in Kapitel 3.2 beschrieben.

An den fixierten porzinen Geweben wurden jeweils zwei unterschiedliche Extraktionsmethoden (CTAB-Methode und Kit) angewendet, und diese Methoden miteinander verglichen. Die Details zur Durchführung der Extraktionsmethoden sind in den Kapiteln 3.3.3 und 3.3.6. beschrieben.

In Tabelle 13 sind die Resultate zusammengefasst, die bei der Extraktion aus nach der Kaiserlingmethode fixiertem porzinem Gewebe erhalten wurden.

Tabelle 13: Ergebnisse der Extraktion aus frisch fixiertem porzinem Gewebe. (Fixierungsmethode: Kaiserling)

<i>Extraktionsmethode</i>	<i>Einwaage zur Homogenisierung [mg]</i>	<i>Einwaage zur Extraktion [mg]</i>	<i>Reinheit A_{260}/A_{280}</i>	<i>DNA-Konz. [ng/μl]</i>	<i>μg DNA/100 mg homog. Probe</i>
CTAB	152	129	2,00	21,50	1,67
	152	124	2,55	60,50	4,88
	157	127	/	/	/
	157	101	/	/	/
	155	118	/	/	/
	155	113	1,09	19,00	1,68
	155	114	2,10	30,50	2,68
	152	121	1,94	42,75	3,53
	152	125	1,97	63,50	5,08
	152	136	2,07	66,25	4,87
	151	123	1,78	53,00	4,31
	151	111	2,36	78,00	7,03
	151	134	1,91	33,50	2,50
	154	117	1,75	70,00	5,98
	154	105	2,31	38,75	3,69
	154	123	2,39	27,75	2,26
DNA Mini Kit	24	-	1,75	23,35	19,46
	23	-	1,71	22,50	19,57

/... A_{260} nicht messbar

-...kein Aliquot, sondern das gesamte homogenisierte Gewebe zur Extraktion verwendet

... für PCR-Analyse verwendet

In Tabelle 14 sind die Resultate zusammengefasst, die bei der Extraktion aus mit Neutralformol fixiertem porzinem Gewebe erhalten wurden.

Tabelle 14: Ergebnisse der Extraktion aus frisch fixiertem porzinem Gewebe (Fixierungsmethode: Neutralformol)

<i>Extraktionsmethode</i>	<i>Einwaage zur Homogenisierung [mg]</i>	<i>Einwaage zur Extraktion [mg]</i>	<i>Reinheit A_{260}/A_{280}</i>	<i>DNA-Konz. [ng/μl]</i>	<i>μg DNA/100 mg homog. Probe</i>
CTAB	153	114	2,21	47,00	4,12
	153	124	2,21	12,75	1,03
	153	129	2,30	7,50	0,58
	153	110	2,13	21,25	1,93
	155	116	2,00	55,75	4,81
	155	105	1,98	33,25	3,17
	155	110	2,02	36,50	3,32
	153	121	2,46	65,25	5,39
	153	151	1,82	47,00	3,11
	153	125	1,67	31,00	2,48
DNA Mini Kit	24	-	1,78	26,35	21,96
	23	-	1,72	25,85	22,48

-...kein Aliquot, sondern das gesamte homogenisierte Gewebe zur Extraktion verwendet

... für PCR-Analyse verwendet

Tabelle 15 gibt die Reinheit und Konzentration der DNA an, die aus mit der Museumsmethode fixiertem porzinem Gewebe mit der CTAB-Methode und dem DNA Mini Kit extrahiert wurde.

Tabelle 15: Ergebnisse der Extraktion aus frisch fixiertem porzinem Gewebe (Fixierung mit der Museumsmethode)

<i>Extraktionsmethode</i>	<i>Einwaage zur Homogenisierung [mg]</i>	<i>Einwaage zur Extraktion [mg]</i>	<i>Reinheit A_{260}/A_{280}</i>	<i>DNA-Konz. [ng/μl]</i>	<i>μg DNA/100 mg homog. Probe</i>
CTAB	156	108	2,24	14,00	1,30
	156	116	1,70	33,50	2,89
	152	104	1,00	53,75	5,17
	152	123	4,60	80,00	6,50

Fortsetzung Tabelle 15: Ergebnisse der Extraktion aus frisch fixiertem porzinem Gewebe (Fixierung mit der Museumsmethode)

CTAB	153	108	1,52	6,50	0,60
	153	114	1,31	10,50	0,92
	153	111	1,77	51,75	4,66
	153	117	1,61	38,25	3,27
	153	115	1,42	25,25	2,20
	153	105	/	/	/
DNA Mini Kit	22	-	1,67	32,62	29,65
	24	-	1,67	38,55	32,13

/... A₂₆₀ nicht messbar

-...kein Aliquot, sondern das gesamte homogenisierte Gewebe zur Extraktion verwendet

... für PCR-Analyse verwendet

Vergleicht man die Ergebnisse mit jenen, die mit nicht fixiertem Gewebe erhalten wurden, zeigt sich, dass bei fixierten Proben bei allen drei Fixierungen eine viel geringere Ausbeute an DNA je 100 mg homogenisierter Probe erzielt wurde. Mit der CTAB-Methode wurden nur DNA-Mengen von 0,6 bis 7 µg je 100 mg homogenisierter Probe erreicht. Auch die Reinheit lag bei allen drei Fixierungen nicht immer im gewünschten Bereich.

Vergleicht man die Ergebnisse für die drei Fixierungsmethoden untereinander, so zeigt sich, dass bei mit Kaiserlinglösung und Neutralformol fixiertem porzinem Gewebe mit der CTAB-Methode öfter deutlich bessere Ergebnisse erhalten wurden als bei jenem Gewebe, das mit der Museumsmethode fixiert wurde.

Bei der Extraktion mit dem QIAamp[®] DNA Mini Kit ergab sich ein ähnlicher Trend, wenngleich bei der Reinheit der extrahierten DNA bei fixierten und nicht fixierten Geweben ähnliche Ergebnisse erzielt wurden. Die erhaltene DNA-Menge je 100 mg homogenisierter Probe lag beim DNA Mini Kit zwischen 19,5 und 32 µg, und damit unter den Mengen die aus nicht fixiertem Gewebe erhalten wurden.

4.1.2.2 2 Jahre alte, fixierte Gewebe

Die Tabellen 16 bis 18 zeigen die Ergebnisse, die bei der Extraktion von zwei Jahre altem fixiertem porzinem Gewebe erhalten wurden.

Tabelle 16: Ergebnisse der Extraktion mit der CTAB-Methode aus 2007 bei der nach Kaiserling fixiertem porzinem Gewebe.

<i>Einwaage zur Homogenisierung [mg]</i>	<i>Einwaage zur Extraktion [mg]</i>	<i>Reinheit A_{260}/A_{280}</i>	<i>DNA-Konz. [ng/μl]</i>	<i>μg DNA/ 100 mg homog. Probe</i>
153	106	1,93	32,25	3,04
153	107	1,85	22,25	2,08
153	111	1,51	12,50	1,13
150	115	2,03	26,00	2,26
150	136	1,99	51,76	3,81
150	121	1,21	12,75	1,05
160	111	1,76	22,50	2,03
160	102	1,46	26,75	2,62
160	111	1,00	13,25	1,19

 ... für PCR-Analyse verwendet

Tabelle 17: Ergebnisse der Extraktion mit der CTAB-Methode aus 2007 mit Neutralformol fixiertem porzinem Gewebe.

<i>Einwaage zur Homogenisierung [mg]</i>	<i>Einwaage zur Extraktion [mg]</i>	<i>Reinheit A_{260}/A_{280}</i>	<i>DNA-Konz. [ng/μl]</i>	<i>μg DNA/ 100 mg homog. Probe</i>
150	109	1,68	22,75	2,09
150	128	1,67	31,00	2,42
150	107	1,57	13,00	1,21
153	148	/	/	/
153	108	/	/	/
153	117	/	/	/

Tabelle17: Ergebnisse der Extraktion mit der CTAB-Methode aus 2007 mit Neutralformol fixiertem porzinem Gewebe.

157	110	2,13	27,75	2,52
157	108	1,84	18,00	1,67
157	110	1,83	17,00	1,55

/... A₂₆₀ nicht messbar

... für PCR-Analyse verwendet

Tabelle 18: Ergebnisse der Extraktion mit der CTAB-Methode und 2 getesteten Varianten aus 2007 mit nach der Museumsmethode fixiertem porzinem Gewebe.

<i>Extraktions- methode</i>	<i>Einwaage Homo- genisierung [mg]</i>	<i>Einwaage zur Extraktion [mg]</i>	<i>Reinheit A₂₆₀ /A₂₈₀</i>	<i>DNA- Konz. [ng/µl]</i>	<i>µg DNA/ 100 mg homog. Probe</i>
CTAB	155	101	/	/	/
	155	99	/	/	/
	155	107	/	/	/
	153	100	1,00	3,25	0,33
	153	105	/	/	/
	153	102	1,27	3,50	0,34
	151	108	1,90	5,25	0,49
	151	136	2,60	7,25	0,53
	151	126	2,00	10,00	0,79
	152	111	2,10	7,50	0,68
	152	104	1,70	13,25	1,27
	152	120	1,09	14,25	1,19
	154	107	1,57	7,50	0,70
	154	106	/	/	/
	154	122	1,05	4,50	0,37
CTAB V1	154	111	/	/	/
	154	105	/	/	/
	154	108	/	/	/
CTAB V2	157	119	/	/	/
	157	121	/	/	/

/... A₂₆₀ nicht messbar

... für PCR-Analyse verwendet

Für die mit der Kaiserlingmethode und mit Neutralformol fixierten Gewebe wurden ähnliche Ergebnisse erzielt wie bei den frisch fixierten Proben. Bei den meisten Proben wurde mit der CTAB-Methode eine ausreichende Reinheit der DNA-Extrakte erzielt. Die Konzentration der DNA-Extrakte lag zwischen 1 und 4 µg je 100 mg homogenisierter Probe.

Bei dem nach der Museumsmethode fixierten Gewebe wurde im Vergleich zur frisch fixierten Probe eine deutlich schlechtere DNA-Ausbeute erzielt. Das Verhältnis von A_{260} zu A_{280} war oftmals außerhalb des angestrebten Bereichs. Mit der CTAB Methode konnte bei dieser Probe kein DNA-Extrakt mit einer Konzentration >20 ng/µl gewonnen werden.

Aus diesem Grund wurde in der Folge die CTAB Methode abgewandelt. Dazu wurde zunächst die Verdauzeit verlängert (CTAB V1 und CTAB V2, siehe Kapitel 3.3.4.1 und 3.3.4.2). Da dies bei der nach der Museumsmethode fixierten Probe ebenfalls keinen Erfolg zeigte, wurden bei den folgenden Extraktionen 100 mg Gewebe homogenisiert und das gesamte homogenisierte Gewebe zur Extraktion verwendet (siehe Kapitel 3.3.2). Zusätzlich wurden weitere Varianten der CTAB-Methode getestet. Dies waren eine dreistufige Verdauvariante (CTAB V4, siehe Kapitel 3.3.4.4), eine Variante mit zusätzlichem Inkubationsschritt vor dem Zellverdau (CTAB V6, siehe Kapitel 3.3.4.6) sowie eine Variante mit dem Detergens SDS im Extraktionspuffer (CTAB V7, siehe Kapitel 3.3.4.7). Ein Überblick über die getesteten Varianten ist in Tabelle 2 in Kapitel 3.3 zu finden.

Die Tabellen 19 bis 21 zeigen die Ergebnisse der getesteten Extraktionsvarianten und der Kits für die mit den verschiedenen Methoden im Jahr 2007 fixierten porzinen Gewebe.

Tabelle 19: Ergebnisse der Extraktion mit den CTAB-Varianten und den Kits für das 2007 nach Kaiserling fixierte porcine Gewebe.

<i>Extraktions- methode</i>	<i>Einwaage zur Extraktion [mg]</i>	<i>Reinheit A_{260}/A_{280}</i>	<i>DNA- Konz. [ng/μl]</i>	<i>μg DNA/ 100 mg Gewebe</i>
CTAB	97	1,86	116,00	11,96
	100	1,70	187,50	18,75
CTAB V1	102	1,82	69,50	6,81
	102	2,10	58,25	5,71
CTAB V4	99	1,87	195,00	19,70
	100	1,65	191,25	19,13
CTAB V6	105	1,89	233,50	22,24
	109	1,73	75,75	6,95
	108	1,86	297,00	27,50
CTAB V7	101	1,97	87,75	8,69
	96	1,56	56,25	5,86
	108	1,74	115,25	10,67
DNA Mini Kit	26	1,23	21,05	8,10
	24	1,29	21,25	8,85
	24	1,64	22,50	9,38
	23	1,47	26,75	11,63
DNA FFPE Kit	31	1,91	57,00	9,19
	27	2,01	35,75	6,62

 ... für PCR-Analyse verwendet

Der Einsatz einer größeren Probemenge zur DNA-Extraktion zeigte bei der CTAB-Methode den gewünschten Effekt. Die erforderliche Reinheit und Konzentration der DNA wurde erreicht.

Die Verlängerung der Verdauzeit von 2 h auf 24 h (CTAB V1) bzw. 48 h (CTAB V2) führte ebenso zu brauchbaren Ergebnissen, schnitt im Vergleich zur Standardmethode bezüglich der extrahierten DNA-Menge aber schlechter ab. Der drei Stufenverdau (CTAB V4) und eine 1 h Inkubation bei 90 °C vor dem Zellverdau (CTAB V6) lieferten im Vergleich zur ursprünglichen CTAB-Methode höhere DNA-Ausbeuten. Die Zugabe von SDS zum Extraktionspuffer (CTAB V7) lieferte ebenfalls DNA-Extrakte ausreichender Qualität.

Die Extraktion mit dem QIAamp[®] DNA Mini Kit führte zwar ebenfalls zu genügend konzentrierten DNA-Extrakten, diese zeigten aber tendenziell eine geringe

gere Reinheit (A_{260}/A_{280} zwischen 1,2 und 1,6). Auch der speziell für Formalin fixierte Gewebe entwickelte DNA FFPE Kit erbrachte ausreichend konzentrierte DNA-Extrakte mit sehr hoher Reinheit.

Tabelle 20: Ergebnisse der Extraktion mit den CTAB-Varianten und den Kits aus 2007 mit Neutralformol fixiertem porzinem Gewebe.

Extraktions- methode	Einwaage zur Extraktion [mg]	Reinheit A_{260}/A_{280}	DNA- Konz. [ng/μl]	μg DNA/ 100 mg Gewebe
CTAB	104	1,85	141,75	13,63
	104	1,96	109,75	10,55
CTAB V1	103	1,80	90,25	8,76
	106	1,94	74,75	7,05
CTAB V4	114	1,94	95,00	8,33
	114	2,10	158,25	13,88
CTAB V6	101	1,21	15,75	1,56
	113	1,53	23,75	2,10
	102	1,72	25,50	2,50
CTAB V7	109	1,36	21,50	1,97
	104	2,05	31,75	3,05
	108	1,90	20,00	1,85
DNA Mini Kit	24	1,30	9,65	4,02
	25	1,49	14,50	5,80
	25	1,54	8,05	3,22
	23	1,58	12,00	5,22
DNA FFPE Kit	28	1,34	31,50	5,63
	30	1,42	13,50	2,25

 ... für PCR-Analyse verwendet

Die Ergebnisse für mit Neutralformol fixiertes porzines Gewebe waren ähnlich jenen, die für nach Kaiserling fixiertes Gewebe erhalten wurden. Durch Erhöhung der Probemenge konnte auch hier die Konzentration des erhaltenen DNA-Extrakts erhöht werden. Eine längere Verdauzeit (CTAB V1) führte jedoch nicht zu besseren DNA-Ausbeuten. Der drei Stufenverdau (CTAB V4) lieferte bei dieser Probe ähnliche Ergebnisse wie die ursprüngliche CTAB-Methode. Die Verlängerung der Inkubationszeit und eine Erhöhung der Temperatur (CTAB V6)

sowie wie die Zugabe von SDS zum Extraktionspuffer (CTAB V7) hatten keine Verbesserung der DNA-Extraktion zur Folge.

Der DNA Mini Kit lieferte überwiegend zu niedrig konzentrierte DNA-Extrakte mit vergleichsweise niedriger Reinheit. Die Extraktion mit dem DNA FFPE Kit führte zu ausreichend konzentrierten DNA-Extrakten, jedoch waren auch hier die Reinheiten vergleichsweise schlecht.

Tabelle 21: Ergebnisse der Extraktion mit den CTAB-Varianten und den Kits aus 2007 mit der Museumsmethode fixiertem porzinem Gewebe.

Extraktions- methode	Einwaage zur Extraktion [mg]	Reinheit A_{260}/A_{280}	DNA- Konz. [ng/μl]	μg DNA/ 100 mg Gewebe
CTAB	104	1,90	106,25	10,22
	113	1,56	39,50	3,50
	102	1,87	84,25	8,26
	100	1,94	40,75	4,08
	105	1,96	14,75	1,40
CTAB V1	103	3,30	31,50	3,06
	107	1,90	14,25	1,33
CTAB V4	97	2,00	30,75	3,17
	118	1,89	65,25	5,53
CTAB V6	103	/	/	/
	110	1,09	3,00	0,27
	113	2,00	19,50	1,73
CTAB V7	100	1,78	12,50	1,25
	112	/	/	/
	108	1,82	21,00	1,94
DNA Mini Kit	25	1,22	9,20	3,68
	23	1,17	8,75	3,80
	26	1,64	9,70	3,73
	25	1,79	6,65	2,66
DNA FFPE KIT	25	/	/	/
	27	2,08	19,75	3,66

/... A_{260} nicht messbar

... für PCR-Analyse verwendet

Für das porzine Gewebe, das nach der Museumsmethode fixiert wurde, wurde im Vergleich zu den anderen Fixierungen die schlechtesten Extraktionsergeb-

nisse erhalten. Generell war die Konzentration der DNA-Extrakte deutlich niedriger bzw. die Reinheit der DNA häufig außerhalb des angestrebten Bereichs. Auch hier führte die größere Probenmenge bei der Extraktion zu besseren Ergebnissen bezüglich Reinheit und Konzentration. Wie bei den beiden anderen fixierten Geweben führte eine längere Verdauzeit (CTAB V1) nicht zu höheren DNA-Ausbeuten. Die Extraktionsmethoden CTAB V4, CTAB V6 und CTAB V7 lieferten DNA-Extrakte mit einer Konzentration zwischen 3 und 65 ng/µl. Die Reinheit der Extrakte lag jedoch öfters außerhalb des angestrebten Bereichs. Die Extraktion mit dem DNA Mini Kit war hingegen nicht erfolgreich, da die DNA-Extrakte zum einen zu gering konzentriert und zum anderen auf Grund der Reinheit nicht für die PCR-Analyse verwendbar waren. Die Extraktion mit dem DNA FFPE Kit lieferte in einem Fall einen DNA-Extrakt mit hoher Reinheit und ausreichender DNA-Konzentration.

4.1.3 DNA-Extraktion aus nicht fixiertem humanem Gewebe

Das nicht fixierte, humane Gewebe wurde vom pathologisch-anatomischen Museum zur Verfügung gestellt und stammte von einem kurz zuvor verstorbenen, älteren europäischen Mann (siehe Kapitel 3.1.2). Die DNA-Extraktion aus nicht fixiertem humanem Gewebe mit der CTAB-Methode wurde, wie im Kapitel 3.3.3 beschrieben, durchgeführt.

Tabelle 22 zeigt die Ergebnisse, die bei der Extraktion mit der CTAB-Methode aus nicht fixiertem humanem Gewebe erhalten wurden.

Tabelle 22: Ergebnisse der Extraktion mit der CTAB-Methode aus nicht fixiertem humanem Gewebe.

<i>Einwaage zur Homogenisierung [mg]</i>	<i>Einwaage zur Extraktion [mg]</i>	<i>Reinheit A_{260}/A_{280}</i>	<i>DNA-Konz. [ng/μl]</i>	<i>μg DNA/ 100 mg homog. Probe</i>
155	107	2,04	127,75	11,94
155	111	2,75	24,75	2,23
155	126	1,50	27,00	2,14
154	121	1,98	83,00	6,86
154	105	2,05	72,50	6,90
154	106	2,27	45,50	4,29
152	112	1,99	164,25	14,67
152	114	1,92	107,75	9,45
152	122	1,89	48,25	3,95
154	119	2,10	112,75	9,47
154	120	1,78	122,50	10,21
154	106	2,21	166,75	15,73
155	106	1,88	78,75	7,43
155	126	1,94	149,25	11,85
155	114	2,03	76,75	6,73
153	116	1,78	109,00	9,40
153	110	1,86	107,50	9,77
153	112	1,90	84,25	7,52

 ... für PCR-Analyse verwendet

Die Extraktion der DNA mit der CTAB-Methode aus nicht fixiertem humanem Gewebe funktionierte sehr gut. Obwohl die extrahierten DNA-Mengen zwischen 2 und 16 μ g pro 100 mg homogenisiertem Gewebe schwankten, konnte bei jeder durchgeführten Extraktion ein Extrakt erhalten werden, der bezüglich Reinheit und DNA-Konzentration die Anforderungen für einen PCR-Assay erfüllte.

Um den Einfluss verschiedener Parameter bei der Extraktion auf die Ausbeute und Reinheit der DNA zu prüfen, wurden unterschiedliche Varianten der CTAB-Methode getestet. Aufgrund der Ergebnisse der Extraktion der DNA aus fixiertem porzinem Gewebe (siehe Kapitel 4.1.2), wurden die Varianten, die zu keiner wesentlichen Verbesserung führten (CTAB V1 und CTAB V2), nicht angewendet. Auch die Extraktion mit dem DNA Mini Kit wurde nicht durchgeführt. Statt

dessen wurden eine Variante mit verlängerter Lysiszeit bei herabgesetzter Temperatur (CTAB V3, siehe Kapitel 3.3.4.3), eine Variante mit einem zusätzlichen Inkubationsschritt nach dem Zellverdau (CTAB V5, siehe Kapitel 3.3.4.5), eine Extraktionsmethode mit alkalischem Zellverdau (Hot Alkaliextraktion, siehe Kapitel 3.3.5) sowie ein Kit für Formalin fixiertes Paraffin eingebettetes Gewebe (siehe Kapitel 3.3.7) getestet. Weiters wurden die Varianten Dreistufenverdau (CTAB V4, siehe Kapitel 3.3.4.4), 1h Inkubation bei 90 °C vor dem Zellverdau (CTAB V6, siehe Kapitel 3.3.4.6) und die Zugabe von SDS zum Extraktionspuffer (CTAB V7, siehe Kapitel 3.3.4.7) angewendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 23 zusammengefasst.

Tabelle 23: Ergebnisse der Extraktionen mit unterschiedlichen Extraktions-Methoden für nicht fixiertes humanes Gewebe.

Extraktionsmethode	Einwaage zur Extraktion [mg]	Reinheit A_{260}/A_{280}	DNA-Konz. [ng/μl]	μg DNA/ 100 mg Gewebe
CTAB V3	27	1,81	86,25	31,94
	27	1,85	78,50	29,07
CTAB V4	24	1,95	307,50	128,13
	29	1,80	516,75	178,19
CTAB V5	117	1,78	161,25	13,78
	113	1,77	75,00	6,64
	113	1,96	96,25	8,52
	109	1,74	108,75	9,98
	122	/	/	/
CTAB V6	103	1,85	348,75	33,86
	106	1,75	163,25	15,40
	114	/	/	/
	125	1,59	155,00	12,40
	104	1,86	262,75	25,26
CTAB V7	102	1,87	467,00	45,78
	107	1,62	500,25	46,75
	109	1,54	571,00	52,39
	116	1,94	297,75	25,67
	113	1,85	113,75	10,07
	109	2,06	121,50	11,15
	106	1,83	70,50	6,65
	117	1,71	46,75	4,00

Fortsetzung Tabelle 23: Ergebnisse der Extraktionen mit unterschiedlichen Extraktions-Methoden für nicht fixiertes humanes Gewebe.

Hot Alkali 0,5 % SDS	98	1,06	8,00	0,82
	103	1,94	8,25	0,80
Hot Alkali 1,0 % SDS	102	/	/	/
	116	1,79	13,00	1,12
DNA FFPE Kit	31	1,84	342,75	55,28
	30	1,92	333,00	55,50

/... A₂₆₀ nicht messbar

Mit einer 72-stündigen Verdauzeit und einer anschließenden Inkubation bei 90 °C (CTAB V5) wurden ähnliche Ergebnisse erzielt wie mit der ursprünglichen Methode. Die anderen Varianten lieferten zum Teil höhere DNA-Ausbeuten. Besonders gute Ergebnisse konnten mit dem 3 Stufenverdau (CTAB V4) und durch die Zugabe von SDS zum Extraktionspuffer (CTAB V7) erzielt werden. Beim 3 Stufenverdau konnten DNA-Ausbeuten von 128 bis 178 µg je 100 mg Gewebe erzielt werden, durch die Zugabe von SDS 4 bis 52 µg pro 100 mg Gewebe.

Der DNA FFPE Kit lieferte ähnlich gute Ergebnisse, mit einer DNA-Ausbeute von 55 µg pro 100 mg Gewebe und einer hohen Reinheit.

Lediglich die Hot Alkaliextraktion erwies sich als nicht erfolgreich. Keiner der Extraktionsansätze führte zu einem DNA-Extrakt mit ausreichend hoher Reinheit und Konzentration.

4.1.4 DNA-Extraktion aus fixiertem humanem Gewebe

Bei den fixierten humanen Proben handelte es sich um sechs verschiedene fixierte Herzgewebe unterschiedlichen Alters. Die Auswahl der Proben erfolgte hinsichtlich ihres Alters, um etwaige altersbedingte Einflüsse auf die DNA-Extraktion erkennen zu können. Insgesamt wurden im Verlauf der Diplomarbeit dreimal Proben aus den bereitgestellten Herzgeweben entnommen, um die aus der 1. Probenahme gewonnenen Ergebnisse zu überprüfen. Die weiteren experimentellen Details sind in Kapitel 3.1.2 angegeben.

Die DNA-Extraktion aus den vom pathologisch-anatomischen Bundesmuseum zur Verfügung gestellten Proben erwies sich als große Herausforderung. Die Schlüsselstelle einer erfolgreichen DNA-Extraktion war der erfolgreiche Verdau des Gewebes, der in vielen Fällen nicht vollständig erreicht werden konnte.

Um den vollständigen Verdau des Gewebes zu bewirken, wurden unterschiedliche Varianten der CTAB-Methode ausprobiert. So wurden neben der Standard Methode (CTAB-Methode, siehe Kapitel 3.3.3) eine Variante mit verlängerter Verdauzeit bei niedrigerer Temperatur (CTAB V3 siehe Kapitel 3.3.4.3), die Variante Dreistufenverdau (CTAB V4, siehe Kapitel 3.3.4.4), eine Variante mit verlängerter Verdauzeit und einem zusätzlichen Inkubationsschritt bei 90 °C nach dem Zellverdau (CTAB V5, siehe Kapitel 3.3.4.5), eine Variante mit 1h Inkubationsschritt bei 90 °C vor dem Zellverdau (CTAB V6, siehe Kapitel 3.3.4.6), eine Variante mit verlängerter Verdauzeit und Zugabe von SDS zum Extraktionspuffer (CTAB V7, siehe Kapitel 3.3.4.7), die Hot Alkaliextraktion (siehe Kapitel 3.3.5) sowie ein kommerzieller Kit (siehe Kapitel 3.3.7) getestet.

Da die Varianten CTAB V1 und CTAB V2 bei fixiertem porzinem Gewebe (siehe Kapitel 4.1.2) zu keiner wesentlichen Verbesserung der Extraktion führten, wurden diese Varianten an den in begrenzter Menge vorliegenden fixierten humanen Proben nicht angewendet. Aus diesem Grund wurde auch die Extraktion mit dem DNA Mini Kit nicht durchgeführt.

Aufgrund der limitierten Probemenge wurde eine Methode zuerst anhand eines Präparats getestet. Nur bei einem erfolgreichen Ergebnis bei zumindest einem Extraktionsansatz wurde die Methode auf die restlichen fünf Proben angewendet.

In den Tabellen 24 bis 29 sind die Ergebnisse der Extraktionsvarianten für die einzelnen Museumsproben zusammengefasst.

Tabelle 24: Ergebnisse der unterschiedlichen Extraktionsvarianten für das Museumspräparat 504 (Fixierung vor 1820)

<i>Extraktionsmethode</i>	<i>Einwaage zur Extraktion [mg]</i>	<i>Reinheit A_{260}/A_{280}</i>	<i>DNA-Konz. [ng/μl]</i>	<i>μg DNA/ 100 mg Gewebe</i>
CTAB	105	/	/	/
	101	/	/	/

Fortsetzung Tabelle 24: Ergebnisse der unterschiedlichen Extraktionsvarianten für das Museumspräparat 504 (Fixierung vor 1820)

CTAB	108	/	/	/
CTAB V3	30	/	/	/
	27	/	/	/
CTAB V4	32	/	/	/
	31	/	/	/
CTAB V5	112	/	/	/
	108	/	/	/
	104	/	/	/
	103	/	/	/
	104	/	/	/
CTAB V6	120	/	/	/
	100	/	/	/
	113	/	/	/
CTAB V7 1. Probenahme	120	/	/	/
	99	/	/	/
	124	/	/	/
CTAB V7 2. Probenahme	106	/	/	/
	113	/	/	/
	113	/	/	/
	103	/	/	/
	114	/	/	/
	104	/	/	/
CTAB V7 3. Probenahme	109	/	/	/
	109	2,70	4,75	0,22
	100	/	/	/
	107	/	/	/
	114	/	/	/
	103	/	/	/
	117	/	/	/
	101	/	/	/
DNA FFPE Kit	101	/	/	/
	97	/	/	/
DNA FFPE Kit	28	1,73	51,00	9,11
	29	1,61	33,50	5,78

/... A₂₆₀ nicht messbar

... für PCR-Analyse verwendet

Bei der ältesten zur Verfügung gestellten Gewebeprobe waren alle Extraktionsversuche mit der CTAB-Methode sowie alle ihre Varianten erfolglos. Das

Hauptproblem war, wie bereits oben erwähnt, dass das Gewebe nicht verdaut werden konnte.

Die Extraktion mit dem DNA FFPE Kit war hingegen erfolgreich und es konnten DNA-Extrakte ausreichender Reinheit und hoher Konzentration gewonnen werden. Da bei dieser Methode der Verdau des Gewebes funktionierte, ist anzunehmen, dass der im Kit enthaltene Extraktionspuffer (ATL) besser für den Verdau des Gewebes geeignet ist als der CTAB-Extraktionspuffer.

Tabelle 25: Ergebnisse der unterschiedlichen Extraktionsvarianten für das Museumspräparat 2371 (Fixierung 1850/51)

Extraktionsmethode	Einwaage zur Extraktion [mg]	Reinheit A_{260}/A_{280}	DNA-Konz. [ng/μl]	μg DNA/ 100 mg Gewebe
CTAB	105	/	/	/
	100	/	/	/
	106	/	/	/
CTAB V5	103	/	/	/
	107	/	/	/
	107	/	/	/
	98	/	/	/
	110	1,36	3,75	0,17
	110	/	/	/
CTAB V6	112	/	/	/
	120	/	/	/
	117	/	/	/
CTAB V7 1. Probenahme	114	/	/	/
	124	/	/	/
	104	/	/	/
CTAB V7 2. Probenahme	114	3,20	4,00	0,18
	106	1,10	10,00	0,47
	103	/	/	/
	102	2,40	3,00	0,15
	106	1,11	3,00	0,14
	108	1,26	3,00	0,14
CTAB V7 3. Probenahme	100	/	/	/
	105	/	/	/
	100	1,75	3,50	0,18
	99	/	/	/
	114	/	/	/
	110	/	/	/

Fortsetzung Tabelle 25: Ergebnisse der unterschiedlichen Extraktionsvarianten für das Museumspräparat 2371 (Fixierung 1850/51)

CTAB V7 3. Probenahme	97	/	/	/
	107	/	/	/
	103	/	/	/
DNA FFPE Kit	28	2,00	46,75	8,35
	28	2,00	17,00	3,04

/... A₂₆₀ nicht messbar

... für PCR-Analyse verwendet

Die Ergebnisse für das Museumspräparat 2371 ähneln jenen, die für die ältesten Gewebeprobe erhalten wurden. Bis auf eine Ausnahme, bei der jedoch die Reinheit des DNA-Extraktes nicht entsprach, konnten auch bei dieser Probe mit der CTAB-Methode und ihren Varianten keine für die PCR ausreichenden DNA-Mengen extrahiert werden.

Der DNA FFPE KIT lieferte auch hier DNA-Extrakte mit hoher Reinheit und ausreichender Konzentration.

Tabelle 26: Ergebnisse der unterschiedlichen Extraktionsvarianten für das Museumspräparat 5455 (Fixierung 1893)

Extraktions-Methode	Einwaage zur Extraktion [mg]	Reinheit A₂₆₀/A₂₈₀	DNA-Konz. [ng/µl]	µg DNA/ 100 mg Gewebe
CTAB	104	/	/	/
	106	/	/	/
	115	/	/	/
CTAB V5	113	1,86	10,75	0,48
	101	5,00	3,75	0,19
	109	/	/	/
	105	1,88	4,25	0,20
	117	/	/	/
	112	1,80	2,25	0,10
CTAB V6	120	/	/	/
	110	/	/	/
	127	/	/	/
CTAB V7 1. Probenahme	103	/	/	/
	102	/	/	/
	100	/	/	/

Fortsetzung Tabelle 26: Ergebnisse der unterschiedlichen Extraktionsvarianten für das Museumspräparat 5455 (Fixierung 1893)

CTAB V7 2. Probenahme	103	/	/	/
	99	/	/	/
	101	/	/	/
	106	/	/	/
	106	2,66	4,00	0,19
	102	/	/	/
CTAB V7 3. Probenahme	106	2,10	5,25	0,25
	109	1,50	3,75	0,17
	108	/	/	/
	110	/	/	/
	112	/	/	/
	102	3,23	4,25	0,21
	98	/	/	/
	105	/	/	/
DNA FFPE Kit	101	/	/	/
	30	1,55	28,25	4,71
	29	1,78	17,75	3,06

/... A₂₆₀ nicht messbar

... für PCR-Analyse verwendet

Die Probe mit der Museumsnummer 5455 lieferte bei einem Extraktionsansatz mit der Methode CTAB V5 einen DNA-Extrakt mit ausreichender Reinheit und DNA-Konzentration. Alle anderen CTAB-Methoden führten nicht zum Erfolg. Die Extraktion mit dem kommerziellen DNA FFPE Kit war wiederum erfolgreich, wenngleich die extrahierte DNA-Menge niedriger war als bei den anderen Präparaten.

Tabelle 27: Ergebnisse der unterschiedlichen Extraktionsvarianten für das Museumspräparat 16981/87 (Fixierung 1914)

Extraktions-Methode	Einwaage zur Extraktion [mg]	Reinheit A₂₆₀ / A₂₈₀	DNA-Konz. [ng/µl]	µg DNA/ 100 mg Gewebe
CTAB	102	/	/	/
	106	1,42	65,50	6,18
	112	/	/	/
CTAB V5	107	/	/	/
	109	/	/	/

Fortsetzung Tabelle 27: Ergebnisse der unterschiedlichen Extraktionsvarianten für das Museumspräparat 16981/87 (Fixierung 1914)

CTAB V5	114	/	/	/
	102	2,10	3,75	0,18
	118	1,90	4,75	0,20
	109	2,30	5,75	0,26
CTAB V6	108	1,51	10,25	0,47
	105	1,94	8,25	0,39
	100	1,00	2,25	0,11
	107	2,75	5,50	0,26
	108	2,77	6,25	0,29
CTAB V7 1. Probenahme	98	1,60	30,50	1,56
	125	1,69	25,00	1,00
	111	1,60	26,00	1,17
CTAB V7 2. Probenahme	94	4,00	12,00	0,64
	110	2,66	8,00	0,36
	96	2,80	8,50	0,44
	99	/	/	/
	111	/	/	/
	102	/	/	/
	114	1,15	7,50	0,33
CTAB V7 3. Probenahme	103	1,18	3,25	0,16
	119	1,25	2,50	0,11
	103	/	/	/
	97	/	/	/
	95	/	/	/
	95	1,42	5,00	0,53
	106	1,5	12,75	1,20
	108	1,42	10,00	0,92
	DNA FFPE Kit	26	1,34	29,25
32		1,46	24,50	3,83

/... A_{260} nicht messbar

 ... für PCR-Analyse verwendet

Bei dieser Probe konnte mit der CTAB V7 Methode mehrmals ausreichend DNA mit hinreichend hoher Reinheit extrahiert werden, wobei die DNA-Konzentrationen im Bereich von 10 bis 30 ng/µl lagen.

Die CTAB-Methode sowie CTAB V6 lieferten jeweils einen DNA-Extrakt mit ausreichender Konzentration, wobei das Verhältnis A_{260}/A_{280} knapp außerhalb des angestrebten Bereiches lag. Trotzdem konnten diese Extrakte für eine

PCR-Analyse herangezogen werden. Mit allen anderen CTAB-Varianten konnte zwar DNA extrahiert werden, allerdings nicht in ausreichender Menge.

Der DNA FFPE Kit lieferte bei diesem Gewebe Extrakte mit ausreichender Konzentration, die Reinheit der Lösungen lag allerdings unterhalb des angestrebten Bereichs.

Tabelle 28: Ergebnisse der unterschiedlichen Extraktionsvarianten für das Museumspräparat 17742/1472 (Fixierung 1934)

<i>Extraktionsmethode</i>	<i>Einwaage zur Extraktion [mg]</i>	<i>Reinheit A_{260}/A_{280}</i>	<i>DNA-Konz. [ng/μl]</i>	<i>μg DNA/ 100 mg Gewebe</i>
CTAB	107	/	/	/
	123	/	/	/
	111	/	/	/
CTAB V5	112	/	/	/
	101	/	/	/
	108	/	/	/
	108	1,63	4,50	0,21
	105	1,28	4,50	0,21
CTAB V6	98	1,00	3,25	0,17
	106	2,50	5,00	0,24
	103	/	/	/
	108	/	/	/
CTAB V7 1. Probenahme	86	1,61	34,75	2,02
	103	1,84	17,50	0,85
	114	1,66	6,25	0,27
CTAB V7 2. Probenahme	99	/	/	/
	111	/	/	/
	109	2,50	14,00	0,64
	11	/	/	/
	123	/	/	/
	114	/	/	/
CTAB V7 3. Probenahme	112	1,22	2,75	0,12
	106	1,20	3,00	0,14
	99	1,83	2,75	0,14
	108	1,15	5,75	0,27
	114	/	/	/
	97	/	/	/
	96	1,62	17,5	1,82
	120	1,45	10,5	0,88
	100	1,51	13,25	1,33

Fortsetzung Tabelle 28: Ergebnisse der unterschiedlichen Extraktionsvarianten für das Museumspräparat 17742/1472 (Fixierung 1934)

DNA FFPE Kit	26	1,49	24,25	4,66
	28	1,44	30,25	5,40

/... A₂₆₀ nicht messbar

... für PCR-Analyse verwendet

Die Methode CTAB V7 führte bei diesem Gewebe insgesamt sechsmal zu erfolgreichen Ergebnissen(Konz.≥10 ng/µl). Die Konzentration lag dabei in einem Bereich von 14 bis 44 ng/µl mit Reinheiten zwischen 1,4 und 2,5. Alle anderen Methoden lieferten Extrakte mit einer zu geringen Konzentration.

Wie bei den anderen Gewebeproben war auch hier die Extraktion mit dem DNA FFPE Kit erfolgreich und lieferte Extrakte mit ausreichender Konzentration, wobei die Reinheiten mit 1,4-1,5 knapp unterhalb des angestrebten Bereichs lagen.

Tabelle 29: Ergebnisse der unterschiedlichen Extraktionsvarianten für das Museumspräparat 9797 (Fixierung 1951)

Extraktionsmethode	Einwaage zur Extraktion [mg]	Reinheit A₂₆₀ /A₂₈₀	DNA-Konz. [ng/µl]	µg DNA/ 100 mg Gewebe
CTAB	96	/	/	/
	115	/	/	/
	117	/	/	/
	116	2,00	10,50	0,91
	118	1,78	8,50	0,36
CTAB V5	108	1,63	4,50	0,21
	101	1,53	10,00	0,50
	102	/	/	/
	104	1,11	4,75	0,23
	108	1,43	13,25	0,61
	103	1,54	14,25	0,69
CTAB V6	106	1,88	2,25	0,11
	108	2,80	3,50	0,16
	105	/	/	/
CTAB V7 1. Probenahme	115	1,60	59,75	2,60
	105	1,28	17,00	0,81
	88	1,64	53,75	3,05

Fortsetzung Tabelle 29: Ergebnisse der unterschiedlichen Extraktionsvarianten für das Museumspräparat 9797 (Fixierung 1951)

CTAB V7 1. Probenahme	82	1,54	37,50	2,29
	69	1,41	41,25	2,99
CTAB V7 2. Probenahme	107	/	/	/
	96	/	/	/
	92	/	/	/
	109	/	/	/
	103	/	/	/
	107	/	/	/
CTAB V7 3. Probenahme	108	1,42	6,75	0,31
	106	/	/	/
	121	1,28	17,00	0,70
	100	1,63	15,50	0,78
	98	1,45	1,50	0,08
	110	2,07	14,50	0,66
	102	1,38	26,00	2,55
	95	2,10	40,00	4,21
Hot Alkali 0,5% SDS	97	1,40	44,50	4,59
	108	/	/	/
Hot Alkali 1,0% SDS	102	/	/	/
	109	/	/	/
DNA FFPE Kit	110	/	/	/
	30	1,21	54,25	9,04
	31	1,85	32,50	5,24

/... A₂₆₀ nicht messbar

... für PCR-Analyse verwendet

Bei der jüngsten Museumsprobe führten die meisten Extraktionsansätze zum Erfolg. Die CTAB-Methode und die Variante CTAB V5 lieferten je einmal eine DNA-Lösung mit ausreichender Konzentration und Reinheit.

Mit der Variante CTAB V7 konnte insgesamt 11 Mal erfolgreich genügend DNA extrahiert werden. Die Konzentration der Lösungen lag dabei in einem Bereich von 10 bis 60 ng/µl mit einer Reinheit von 1,3 bis 2,1. Einzig die Variante CTAB V6 lieferte keinen einzigen brauchbaren DNA-Extrakt.

Auch bei diesem Gewebe war die Extraktion mit dem DNA FFPE Kit erfolgreich.

Generell fällt auf, dass die Anzahl der erfolgreichen Extraktionen bei den CTAB-Methoden mit steigendem Alter der Proben stark abnimmt, während der kommerzielle DNA FFPE Kit bei allen Proben zu erfolgreichen Extraktionen führte.

Als effektivste Extraktionsmethode stellte sich bei der 1. Probenahme jene mit Zugabe von SDS zum Extraktionspuffer (CTAB V7) heraus. Um diese Ergebnisse zu überprüfen, wurden von jedem der Gewebe zwei neuerliche Proben entnommen. Bei der 2. Probenahme führte die favorisierte Methode nicht mehr zum Erfolg. Auch bei jenen Geweben, aus denen zuvor bereits erfolgreich DNA in ausreichender Konzentration extrahiert werden konnte, lieferte die Variante CTAB V7 keine DNA mit einer ausreichend hohen Konzentration und Reinheit. Bei der 3. Probenahme konnten bei jenen Geweben, die bei der 1. Probenahme erfolgreich mit der Variante CTAB V7 sowie mit dem DNA FFPE Kit extrahiert wurden, wiederum DNA-Extrakte mit ausreichender Konzentration und Reinheit gewonnen werden. Da die Probenahme durch eine Angestellte des pathologisch-anatomischen Museums durchgeführt wurde, können etwaige Unterschiede bei den Probenahmen nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Beispielsweise kann es durchaus entscheidend sein, an welcher Stelle des Gewebes die Probe entnommen wurde (dickeres/dünneres Gewebe und damit unterschiedliche Eindringtiefe des Formalins).

Außerdem liegt bei den fixierten humanen Proben keine vollständige Dokumentation vor. Aus diesem Grund gibt es keine genauen Informationen zu Fixierungsart, Aufbewahrungslösung, eventuellen Umbettungen oder Nachfixierungen. Somit ist die Ursache für den teilweise auftretenden, nicht erfolgreichen Verdau bei den Proben nicht ermittelbar.

4.2 Entwicklung einer Real-Time PCR-Methode zur Amplifikation der DNA aus Formalin fixiertem porzinem Gewebe

Als nächstes wurde eine Real-Time PCR-Methode entwickelt, um die Amplifizierbarkeit der aus porzinem Gewebe extrahierten DNA prüfen zu können.

4.2.1 Primer und Sonden

Als Zielsequenz bei der Auswahl des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes wurde das Gen, welches das Protein Albumin codiert (Albumingen *Sus scrofa*, Accession Number: AY663543) gewählt, da dieses eine hohe Übereinstimmung mit dem für das humane Albumin codierende Gen aufweist, und es so wahrscheinlicher war, eine Sonde zu finden, die sowohl für humanes als auch für porzines Gewebe anwendbar ist.

Die Abbildung 4-1 zeigt die gewählten Template in der jeweiligen Gensequenz mit Primer- und Sondensequenzen.

Lage des 121 bp Templats im Gen, welches das **porzine Albumin** codiert:

```
CTAAATTGTC TTGTTATATG TAGTATTTTC CTAGCACGTT CACATAAAAT GTTGCCTGCT
AATAATATTT TGATGGGAAA AATTTATTTT TAGGCATTA GCTCGCCTGA GCCAGAGATT
TCCCAAGGCT GACTTTACAG AGATTTCCAA GATAGTGACA GATCTTGCAA AAGTCCACAA
GGAATGCTGC CATGGTGACC TGCTTGAATG TGCAGATGAC AGGGTAAAGA ATCCTCAGTA
TGCTTTTTGG TAACTTGTGT GGATTAGAAT CACTTGGTIT AGCATCAAAA CAACTGAGAA
```

Lage des 122 bp Templats im Gen, welches das **humane Albumin** codiert:

```
TTTGAATTTT CTTATGAGAA ATAGTATTTG CCTAGTGTTT TCATATAAAA TATCGCATGA
TAATACCATT TTGATTGCGG ATTTTCTTTT TAGGGCAGTA GCTCGCCTGA GCCAGAGATT
TCCCAAAGCT GAGTTTGCAG AAGTTTCCAA GTTAGTGACA GATCTTACCA AAGTCCACAC
GGAATGCTGC CATGGAGATC TGCTTGAATG TGCTGATGAC AGGGTAAAGA GTCGTCGATA
TGCTTTTTGG TAGCTTGCAT GCTCAAGTTG GTAGAATGGA TCGTITGGT ATCATTGGTG
```

Lage des 171 bp Templats im Gen, welches das **humane Albumin** codiert:

```
TTTGAATTTT CTTATGAGAA ATAGTATTTG CCTAGTGTTT TCATATAAAA TATCGCATGA
TAATACCATT TTGATTGCGG ATTTTCTTTT TAGGGCAGTA GCTCGCCTGA GCCAGAGATT
TCCCAAAGCT GAGTTTGCAG AAGTTTCCAA GTTAGTGACA GATCTTACCA AAGTCCACAC
GGAATGCTGC CATGGAGATC TGCTTGAATG TGCTGATGAC AGGGTAAAGA GTCGTCGATA
TGCTTTTTGG TAGCTTGCAT GCTCAAGTTG GTAGAATGGA TCGTITGGT ATCATTGGTG
```


 ...F-Primer
 ...R-Primer
 ...Sonde

Abbildung 4-1: Position der gewählten Template in der jeweiligen Gensequenz.

Die Auswahlkriterien für das Sonden- und Primerdesign sowie die genaue Vorgehensweise zur Auswahl sind in Kapitel 3.5.1 beschrieben.

In der Tabelle 30 sind die Sequenzen der verwendeten Sonde sowie der Forward- und Reverseprimer mit ihren wichtigsten Eigenschaften angegeben:

Tabelle 30: Charakteristika der por Alb-Primer

Bezeichnung	DNA-Sequenz 5' → 3'	Schmelz- temperatur [°C]	GC-Gehalt [%]
F por Alb-Primer	GCCTGCTAATAATATTTTGATGGG	63,1	38
R por Alb-Primer	ACTTTTGCAAGATCTGTCACTATC	60,2	38
TaqMan-Sonde	CTCGCCTGAGCCAGAGATTTCCCAA	69,0	56

Das erhaltene Amplikon hatte eine Länge von 121 Basenpaaren (bp) und eine Schmelztemperatur von 80,0 °C.

4.2.2 Optimierung der Annealingtemperatur und der Primerkonzentration

Um eine effiziente Amplifikation zu gewährleisten, wurden zunächst die optimale Primerkonzentration sowie die optimale Annealingtemperatur ermittelt. Die Primerkonzentrationen 100, 200 und 300 nM wurden in allen möglichen Kombinationen bei unterschiedlichen Annealingtemperaturen, die mit Hilfe eines Temperaturgradienten von 51,0 bis 59,3 °C eingestellt wurden, getestet. Die genaue Durchführung der Optimierung ist in Kapitel 3.5.4.1 beschrieben.

In Abbildung 4-2 sind die bei der Optimierung erhaltenen PCR-Kurven sowie die 1. Ableitung der Schmelzkurven dargestellt.

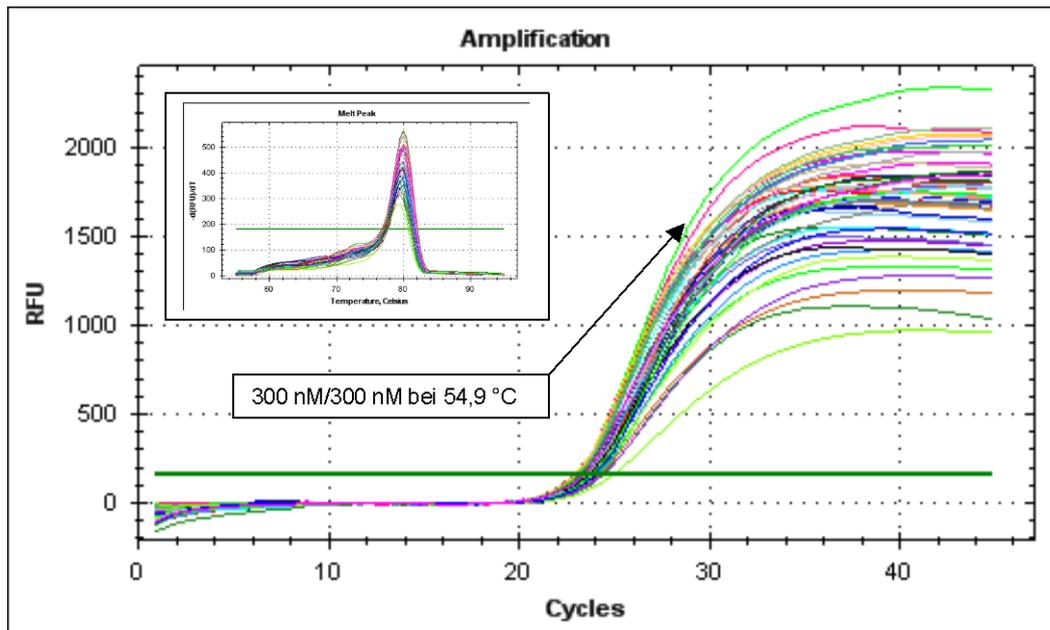


Abbildung 4-2: Optimierung der por Alb-Primerkonzentration und der Annealingtemperatur. PCR-Kurven und 1. Ableitung der Schmelzkurven.

Abbildung 4-3 zeigt die Auswertung der Optimierungsversuche. Dabei sind die C_t -Werte gegen die getesteten Primerkonzentrationen aufgetragen.

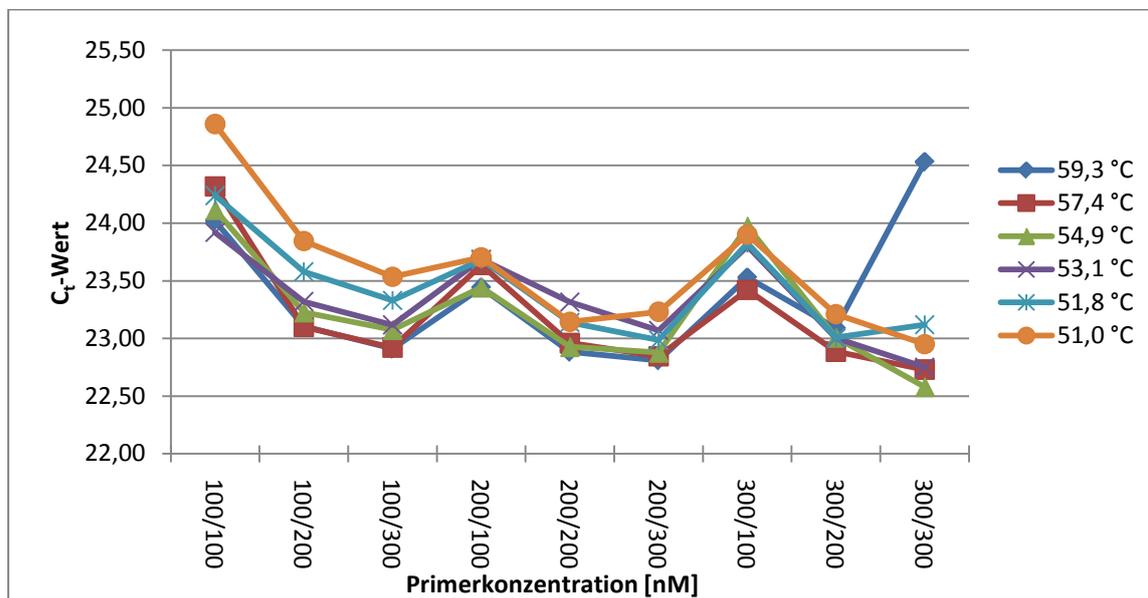


Abbildung 4-3: Auswertung der Optimierung der Primerkonzentration und der Annealingtemperatur.

Jene Bedingungen, die zu den niedrigsten C_t -Werten führten, wurden als optimal betrachtet. Für den Forward- als auch den Reverseprimer ergab sich eine

optimale Konzentration von 300 nM. Für die Annealingtemperatur wurde eine Temperatur von 54,9 °C als optimal ermittelt.

4.2.3 Optimierung der Sondenkonzentration

Als nächstes wurden unterschiedliche Sondenkonzentrationen getestet, um den TaqMan-Assay zu optimieren. Verschiedene Sondenkonzentrationen (25, 50, 100 und 200 nM) wurden bei unterschiedlichen Annealingtemperaturen, die um die zuvor optimierte Annealingtemperatur gewählt wurden, getestet. Die genaue Durchführung ist in Kapitel 3.5.4.1 beschrieben.

Abbildung. 4-4 zeigt die bei der Optimierung des TaqMan-Assays erhaltenen PCR-Kurven.

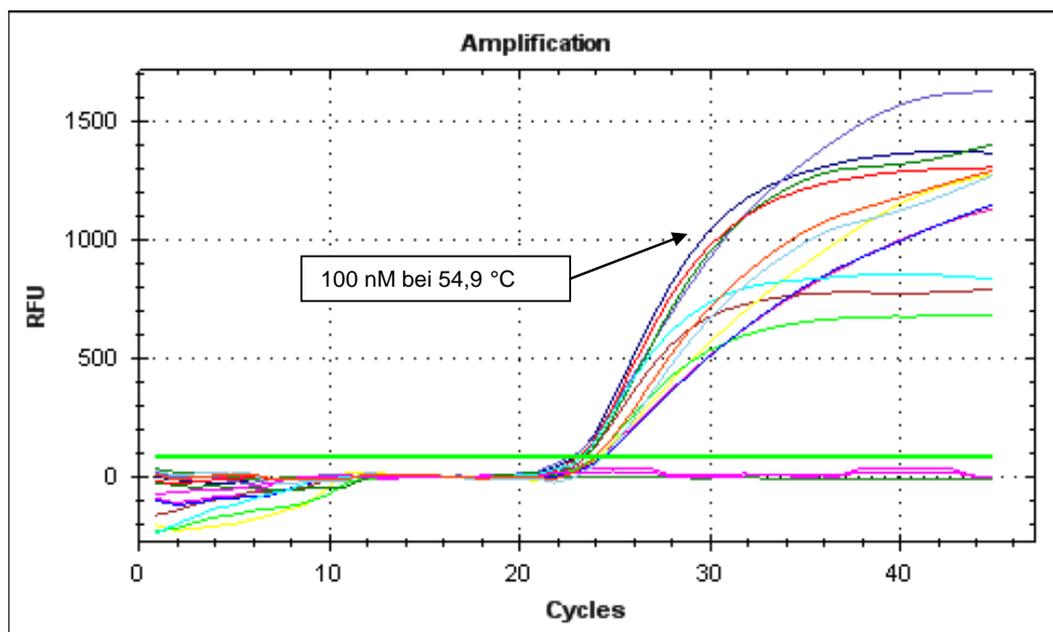


Abbildung 4-4: Bei der Optimierung der Sondenkonzentration erhaltene PCR-Kurven

Abbildung 4-5 zeigt die Auswertung der Sondenkonzentrationsoptimierung, wobei der C_t -Wert gegen die Sondenkonzentration aufgetragen ist.

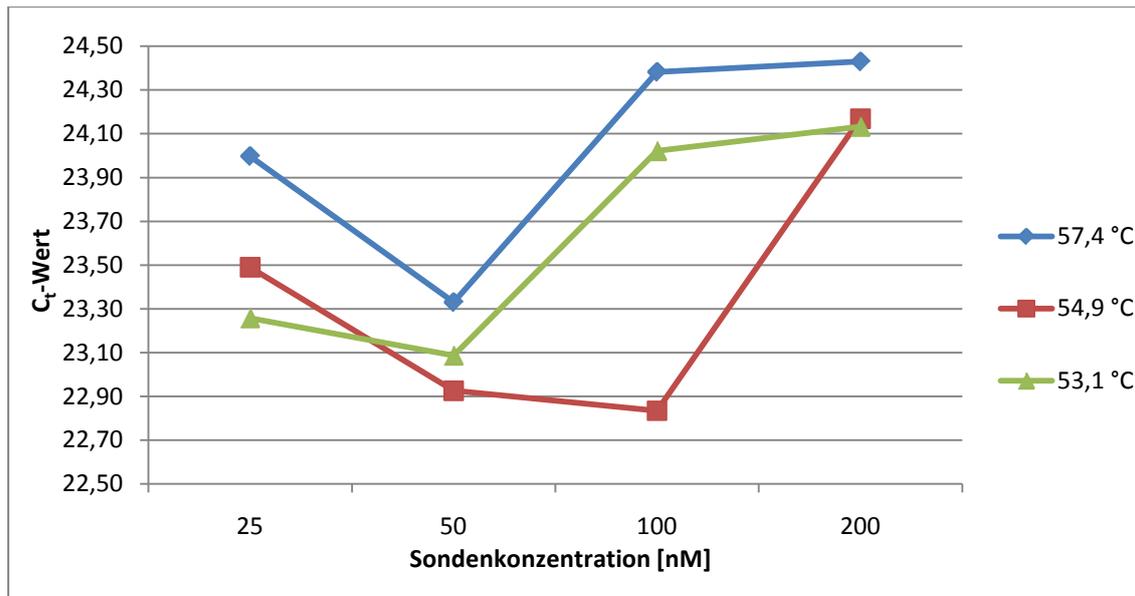


Abbildung 4-5: Auswertung der Optimierung der Sondenkonzentration.

Als optimale Bedingung wurde jene festgelegt, bei der der niedrigste C_t -Werte erhalten wurde:

Der niedrigste C_t -Wert wurde bei einer Sondenkonzentration von 100 nM und einer Annealingtemperatur von 54,9 °C erhalten.

Somit wurden alle folgenden Versuche zur Amplifizierbarkeit von aus porzinem Gewebe extrahierter DNA unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Annealingtemperatur: **54,9 °C**

Forwardprimerkonzentration: **300 nM**

Reverseprimerkonzentration: **300 nM**

Sondenkonzentration: **100 nM**

4.2.4 Bestimmung der Effizienz

Zur Bestimmung der Effizienz wurde DNA, die mit der CTAB-Methode aus nicht fixiertem porzinem Gewebe extrahiert worden war, seriell verdünnt. Dazu wurden ausgehend von einem DNA-Extrakt der Konzentration 20 ng/ μ l serielle Verdünnungen in 1:10 Schritten hergestellt und diese anschließend analysiert. Die DNA-Konzentration betrug 2 pg/ μ l bis 20 ng/ μ l, das heißt, pro Well wurden 10

pg bis 100 ng DNA aufgegeben. Die genaue Durchführung ist in Kapitel 3.5.4.2 beschrieben.

Abbildung 4-6 zeigt die erhaltenen PCR-Kurven.

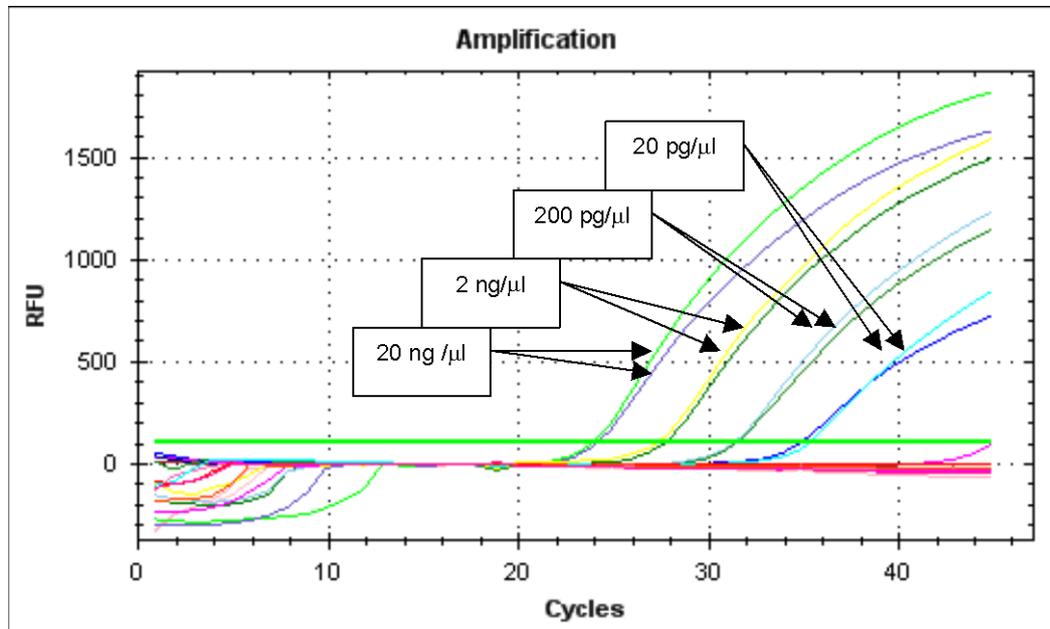


Abbildung 4-6: PCR-Kurven für seriell verdünnte DNA aus nicht fixiertem porzinem Gewebe.

Bis zu einer Konzentration von 20 pg/μl konnte ein Fluoreszenzanstieg beobachtet werden.

Die Effizienz der PCR-Methode wurde durch Auftragen der C_t -Werte gegen den Logarithmus der DNA-Startmenge ermittelt (siehe Abbildung 4-7).

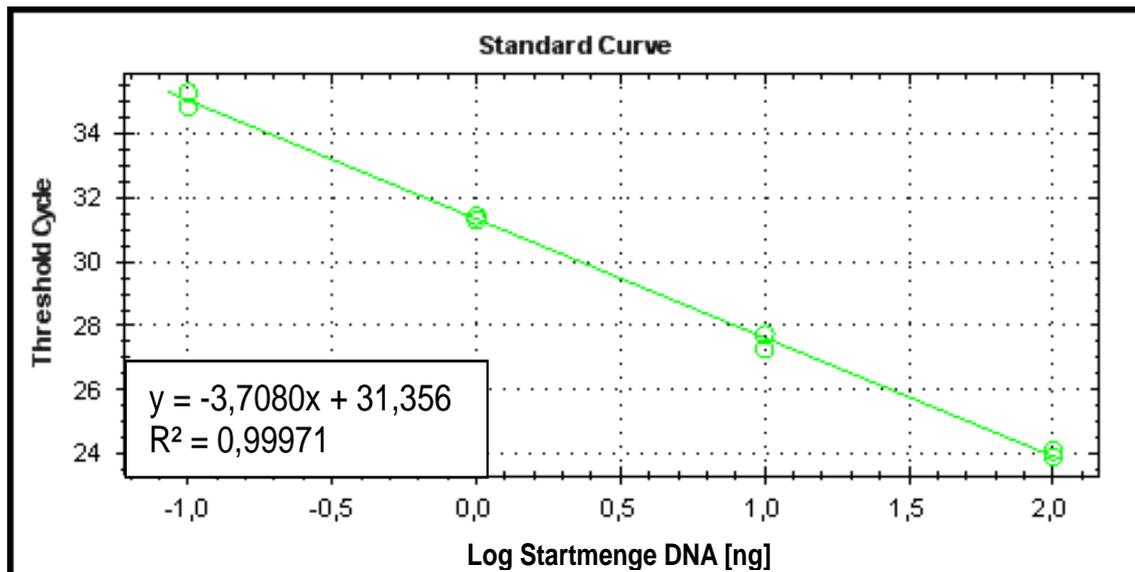


Abbildung 4-7: Standardgerade der Effizienzbestimmung des TaqMan-Assays für porcine DNA.

Aus der Standardgerade wurde die Effizienz berechnet. Diese beträgt 86,1% bei einem Korrelationskoeffizienten R^2 von 0,99971.

4.2.5 Anwendung der entwickelten Methode auf fixiertes porcines Gewebe

DNA, die in ausreichender Menge aus fixierten porcinen Geweben extrahiert werden konnte, wurde mit dem optimierten TaqMan-Assay analysiert, um ihre Amplifizierbarkeit zu überprüfen. Außerdem sollte geprüft werden, ob die Fixiermethode bzw. die Extraktionsmethode die Amplifizierbarkeit der DNA beeinflusst. Konnten mit einer Extraktionsvariante mehrere DNA-Extrakte gewonnen werden, so wurde der Extrakt mit der höchsten Reinheit ausgewählt. Die Ergebnisse der Extraktion sind in den Tabellen 16 bis 21 im Kapitel 4.1.2 zusammengefasst. Die Extrakte, die für die PCR-Analysen verwendet wurden, sind darin grau unterlegt.

Abbildung 4-8 zeigt stellvertretend für alle durchgeführten Analysen die erhaltenen PCR-Kurven für DNA aus frisch fixiertem porcinem Gewebe. Gezeigt wer-

den die Kurven für unterschiedliche Fixierungs- und zwei Extraktionsmethoden. (CTAB-Methode und DNA Mini Kit). Tabelle 31 fasst die Ergebnisse zusammen.

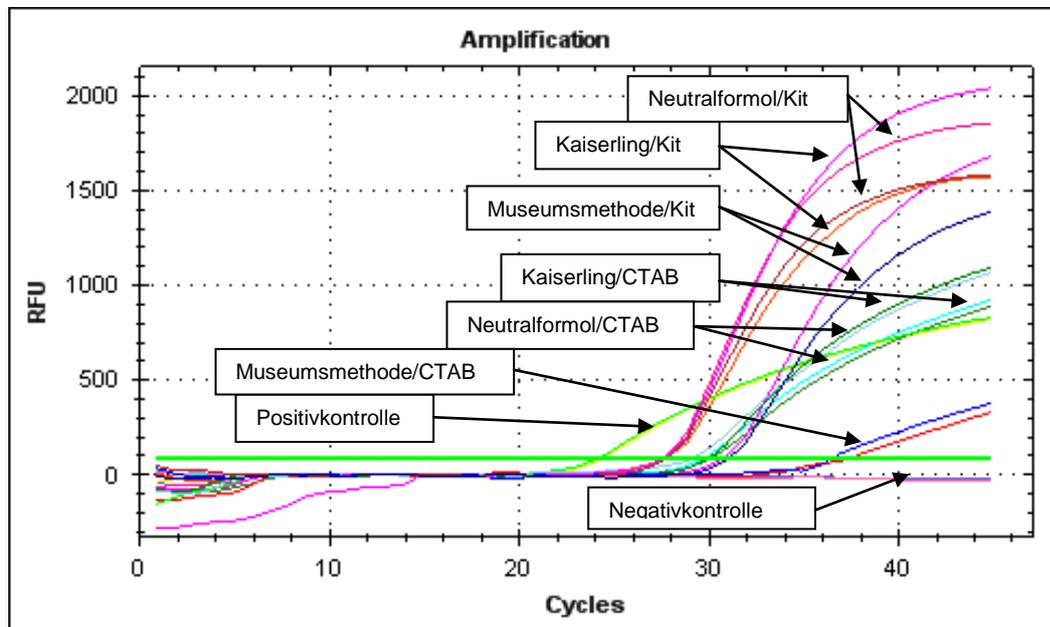


Abbildung 4-8: Amplifikationskurven für DNA aus frisch fixiertem porzinem Gewebe

Tabelle 31: Zusammenfassung der Ergebnisse für fixiertes porzines Gewebe.

Probe	Extraktionsmethode	Fixierung	Reinheit A_{260}/A_{280}	C_t -Wert (Mittelwert aus Doppelbestimmung)
Positivkontrolle	CTAB	<i>keine</i>	1,95	23,67
Frisch fixiertes Gewebe	CTAB	<i>Kaiserling</i>	1,78	29,96
		<i>Neutralformol</i>	2,00	29,36
		<i>Museumsmethode</i>	1,77	36,85
	DNA Mini Kit	<i>Kaiserling</i>	1,75	27,49
		<i>Neutralformol</i>	1,78	27,57
		<i>Museumsmethode</i>	1,67	30,84
Zwei Jahre alte fixierte Gewebe	CTAB	<i>Kaiserling*</i>	2,03	33,07
		<i>Neutralformol*</i>	1,68	33,42
		<i>Museumsmethode*</i>	2,00	36,13
		<i>Kaiserling</i>	1,86	34,94
		<i>Neutralformol</i>	1,85	32,37
		<i>Museumsmethode</i>	1,94	35,53
	DNA Mini Kit	<i>Kaiserling</i>	1,64	32,45
		<i>Neutralformol</i>	1,58	33,02
		<i>Museumsmethode</i>	1,64	35,96

Fortsetzung Tabelle 31: Zusammenfassung der Ergebnisse für fixiertes porcines Gewebe.

Zwei Jahre alte fixierte Gewebe	CTAB V1	<i>Kaiserling</i>	1,82	32,13
		<i>Neutralformol</i>	1,80	31,85
		<i>Museumsmethode</i>	1,90	36,93
	CTAB V4	<i>Kaiserling</i>	1,87	32,84
		<i>Neutralformol</i>	1,94	31,92
		<i>Museumsmethode</i>	2,00	37,19
	CTAB V6	<i>Kaiserling</i>	1,73	29,47
		<i>Neutralformol</i>	1,72	30,93
		<i>Museumsmethode</i>	2,00	34,72
	CTAB V7	<i>Kaiserling</i>	1,97	31,87
		<i>Neutralformol</i>	1,90	30,85
		<i>Museumsmethode</i>	1,82	34,34
DNA FFPE Kit	<i>Kaiserling</i>	1,91	33,32	
	<i>Neutralformol</i>	1,34	34,29	
	<i>Museumsmethode</i>	2,08	38,16	

* ... Proben bei denen zuerst 150 mg Gewebe homogenisiert wurde (siehe die Tabellen 16, 17 und 18)

Wie aus Tabelle 31 ersichtlich ist, konnte sowohl bei den DNA-Extrakten aus frisch konservierten Geweben als auch bei jenen, die 2007 fixiert wurden, das gewählte Templat amplifiziert werden.

Bei frisch fixiertem Gewebe zeigt sich, dass Extrakte, die mit dem DNA Mini Kit gewonnen wurden, niedrigere C_T -Werte lieferten als jene, die mittels der CTAB-Methode erhalten wurden. Da die DNA-Konzentration pro Well normiert wurde, bedeutet ein niedrigerer C_T -Wert eine höhere DNA-Qualität.

Extrakte aus nicht fixierten Geweben lieferten in der Regel C_T -Werte von 23-24. DNA aus frisch fixiertem porcinem Gewebe führte zu einem Anstieg der C_T -Werte (29-36 bei der CTAB Methode bzw. 27-30 beim DNA Mini Kit). Auch die Fixierungsart hatte einen Einfluss auf den C_T -Wert. So führte die Fixierung nach der Museumsmethode sowohl bei der CTAB-Methode als auch bei der DNA Mini Kit Extraktionsvariante, verglichen mit den beiden anderen Fixierungsmethoden, zu deutlich höheren C_T -Werten.

Auch bei den im Jahr 2007 fixierten Proben zeigte sich ein ähnliches Bild. Die C_T -Werte waren im Vergleich zu den für frisch konserviertes Gewebe erhaltenen höher, wobei die unterschiedlichen Extraktionsvarianten annähernd gleiche C_T -Werte für die jeweiligen Fixierungen lieferte. Die niedrigsten C_T -Werte wurden

mit den Extraktionsmethoden CTAB V6 und CTAB V7 erreicht, die denn für frisch fixiertes Gewebe erhaltenen Werten am ähnlichsten sind. Der höchste C_T -Wert wurde auch hier für mit der Museumsmethode fixiertes Gewebe erhalten. Die mit dem DNA FFPE Kit erzielten C_T -Werte waren ebenfalls deutlich höher.

4.3 Entwicklung einer Real-Time PCR-Methode zur Amplifikation der DNA aus Formalin fixiertem humanem Gewebe

4.3.1 Primer und Sonden

Wie bereits in Kapitel 4.2.1 beschrieben diente das Gen, welches für das humane Albumin codiert, als Zielsequenz (Homo Sapiens Albumin Gen, complete cds, Accession Number: EF649953).

Nachdem die zum Nachweis der porzinen DNA verwendete Sonde auch zum Nachweis von humaner DNA verwendet werden sollte, wurden mit dem Beacon Designer 7.0 zwei zur Sonde passende Primerpaare ausgesucht. Dabei wurde ein Primerpaar für ein kürzeres Amplikon (Länge: 122 bp) und ein Primerpaar für ein längeres Amplikon (Länge: 171 bp) gewählt, um einen etwaigen Einfluss der Amplikonlänge auf die Amplifizierbarkeit der DNA aus fixiertem Gewebe feststellen zu können.

Die genauen Auswahlkriterien sowie die Durchführung sind in Kapitel 3.5.1 beschrieben.

Tabelle 32 zeigt die Sequenzen der verwendeten Sonde sowie der Forward- und Reverseprimer für beide Amplikonlängen, mit ihren wichtigsten Parametern.

Tabelle 32: Charakteristika der verwendeten hum Alb-Primer.

Bezeichnung	DNA-Sequenz 5' → 3'	Schmelz- temperatur [°C]	GC- Gehalt [%]
122 bp Amplikon:			
F hum Alb-Primer	TCGCATGATAATACCATTTTGATTG	65,1	32
R hum Alb- Primer	ACTTTGGTAAGATCTGTCACTAAC	57,0	38
TaqMan-Sonde	CTCGCCTGAGCCAGAGATTTCCCAA	69,0	56
171 bp Amplikon:			
F hum Alb-Primer	TCGCATGATAATACCATTTTGATTG	65,1	32
R hum Alb- Primer	CCTGTCATCAGCACATTCAAG	63,3	48
TaqMan-Sonde	CTCGCCTGAGCCAGAGATTTCCCAA	69,0	56

Die Schmelztemperatur des 122 bp langen Amplikons betrug 81,5 °C, die des 171 bp langen Amplikons 83,5 °C.

4.3.2 Optimierung der Annealingtemperatur und der Primerkonzentration

In einem SYBR Green Assay wurden zunächst die Primerkonzentration und die Annealingtemperatur für beide Amplikons optimiert.

Für das 122 bp Amplikon betragen die getesteten Primerkonzentrationen 100, 200, bzw. 300 nM. Sie wurden in allen möglichen Kombinationen bei drei unterschiedlichen Annealingtemperaturen, die mit Hilfe eines Temperaturgradienten von 53,1 bis 57,4 °C eingestellt wurden, getestet. Die genaue Durchführung ist im Kapitel 3.5.5.1 zu finden.

Abbildung 4-9 zeigt die PCR-Kurven für das 122 bp lange Amplikon sowie die 1. Ableitung der Schmelzkurven.

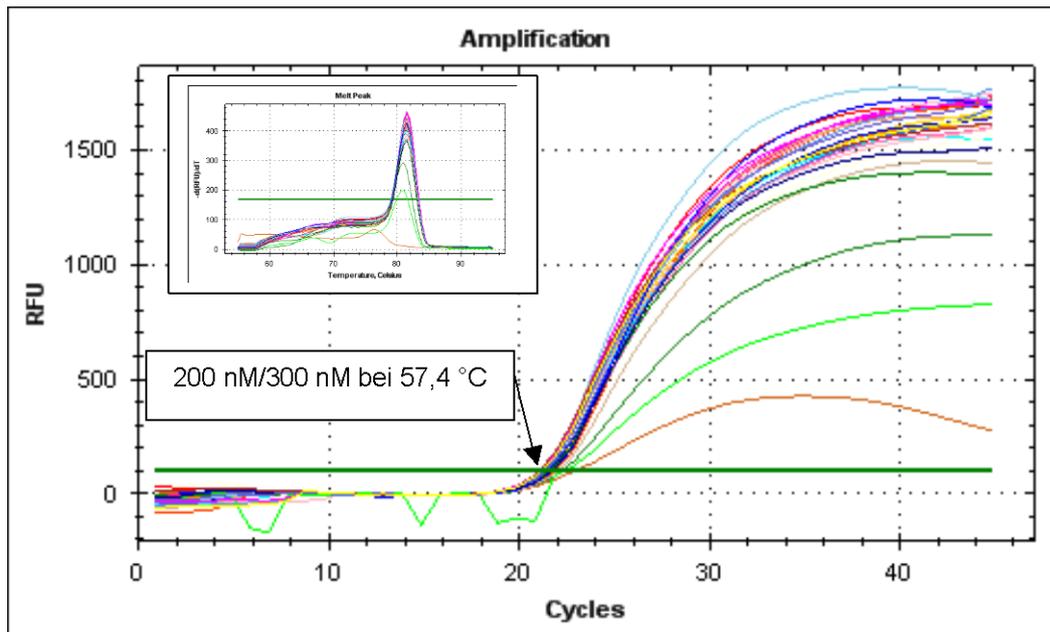


Abbildung 4-9: Optimierung der hum Alb-Primerkonzentration und der Annealingtemperatur für das 122 bp Amplikon. PCR-Kurven und 1. Ableitung der Schmelzkurven.

In Abbildung 4-10 ist die Auswertung der Optimierungsversuche für das 122 bp lange Amplikon dargestellt, wobei die C_T -Werte gegen die Primerkonzentrationen aufgetragen sind.

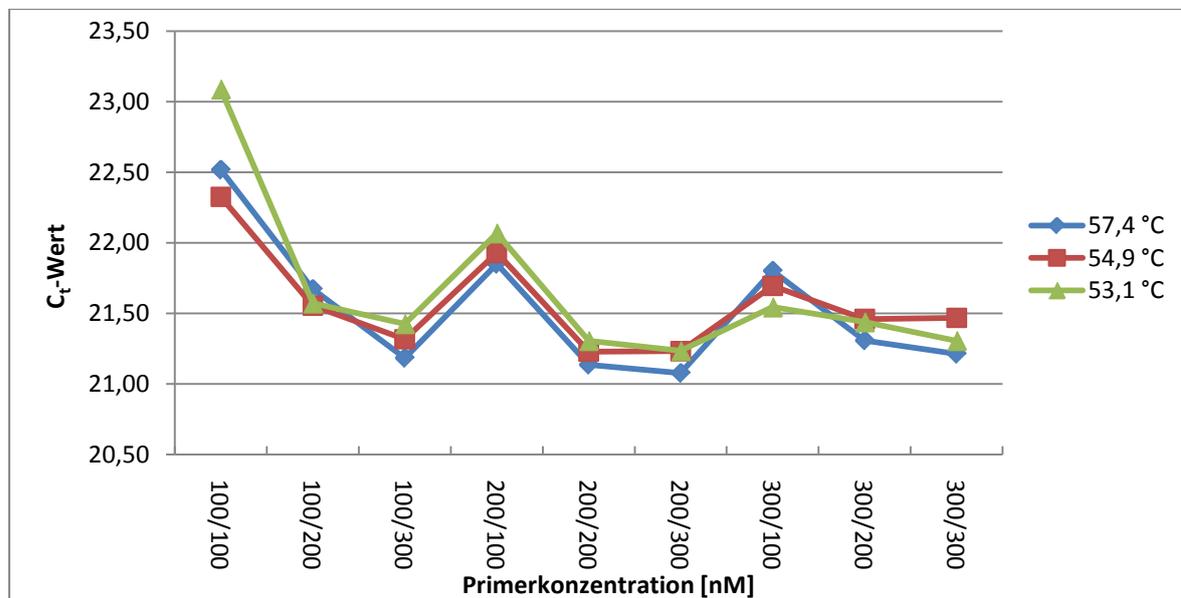


Abbildung 4-10: Auswertung der Optimierung der Primerkonzentration und der Annealingtemperatur für das 122 bp lange Amplikon.

Der geringste C_t -Wert wurde bei einer Forwardprimerkonzentration von 200 nM, einer Reverseprimerkonzentration von 300 nM sowie einer Annealingtemperatur von 57,4 °C erhalten.

Auch die Primer für das 171 bp lange Amplikon wurden hinsichtlich ihrer Konzentration und der Annealingtemperatur optimiert. Die Primerkonzentrationen 100, 200 und 300 nM wurden in allen möglichen Kombinationen bei sechs unterschiedlichen Annealingtemperaturen zwischen 51,0 und 59,3 °C getestet (siehe Kapitel 3.5.5.1).

In der Abbildung 4-11 sind die erhaltenen PCR-Kurven sowie die 1. Ableitungen der Schmelzkurven dargestellt.

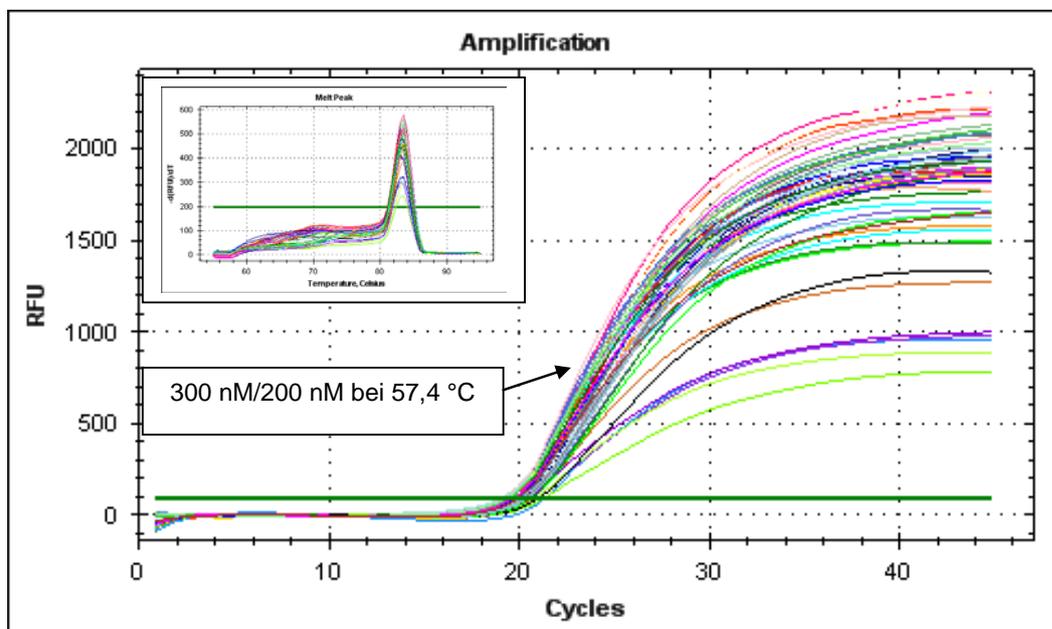


Abbildung 4-11: Ergebnisse der Optimierung der hum Alb-Primerkonzentration und der Annealingtemperatur für das 171 bp Amplikon. PCR-Kurven und 1. Ableitung der Schmelzkurven.

Abbildung 4-12 zeigt die Auswertung der Optimierungsversuche für das 171 bp lange Amplikon.

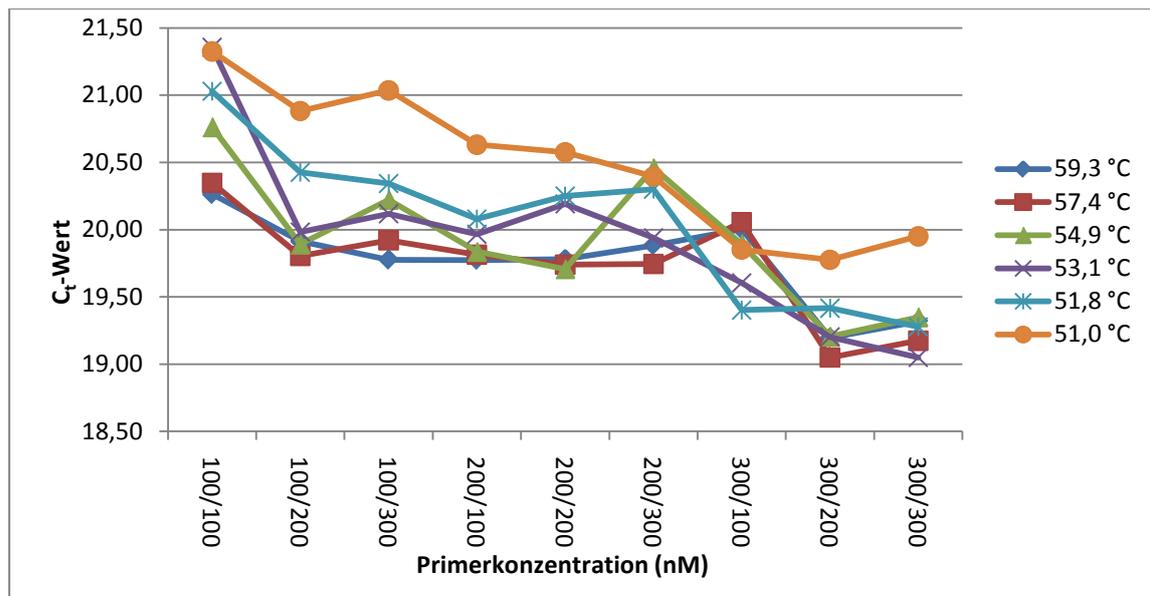


Abbildung 4-12: Auswertung der Optimierung der Primerkonzentration und der Annealingtemperatur für das 171 bp lange Amplikon.

Als optimale Bedingungen wurden eine Forwardprimerkonzentration von 300 nM, eine Reverseprimerkonzentration von 200 nM und eine Annealingtemperatur von 57,4 °C ermittelt.

4.3.3 Optimierung der Sondenkonzentration

Als nächstes wurde für beide Amplikons die Sondenkonzentration optimiert. Dazu wurden verschiedene Sondenkonzentrationen (25, 50, 100 bzw. 200 nM) bei drei unterschiedlichen Annealingtemperaturen um die zuvor optimierte Annealingtemperatur getestet. Die genaue Durchführung ist im Kapitel 3.5.5.2 beschrieben.

In der Abbildung 4-13 sind die Ergebnisse der Optimierungsversuche für das 122 bp lange Amplikon dargestellt.

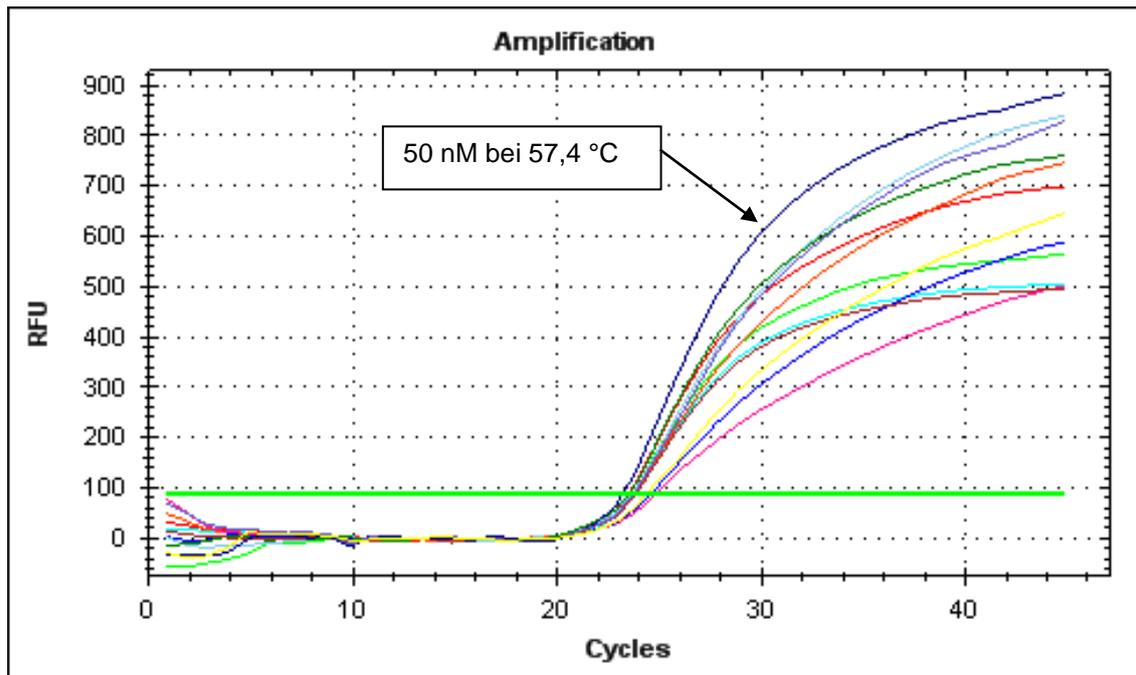


Abbildung 4-13: Bei der Optimierung der Alb-Sondenkonzentration erhaltene PCR-Kurven (122 bp Amplikon).

Abbildung 4-14 zeigt die Auswertung der Optimierungsversuche für das 122 bp lange Amplikon.

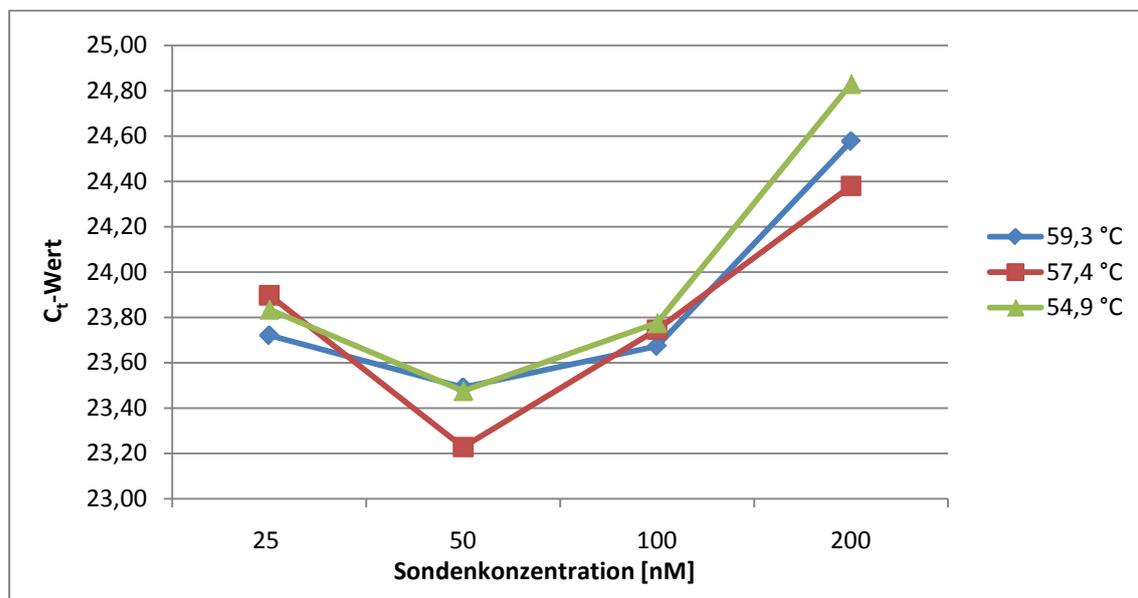


Abbildung 4-14: Auswertung der Optimierungsversuche der Sondenkonzentration für das 122 bp lange Amplikon.

Eine Sondenkonzentration von 50 nM und eine Annealingtemperatur von 57,4 °C lieferten den niedrigsten C_t -Wert.

Alle folgenden Analysen, in denen die Amplifizierbarkeit des Amplikons in humanem Gewebe geprüft wurde, wurden bei folgenden Bedingungen durchgeführt:

Annealingtemperatur: **57,4 °C**

Forwardprimerkonzentration: **200 nM**

Reverseprimerkonzentration: **300 nM**

Sondenkonzentration: **50 nM**

Die Abbildung 4-15 zeigt die bei der Optimierung der Sondenkonzentration für das 171 bp lange Amplikon erhaltenen PCR-Kurven.

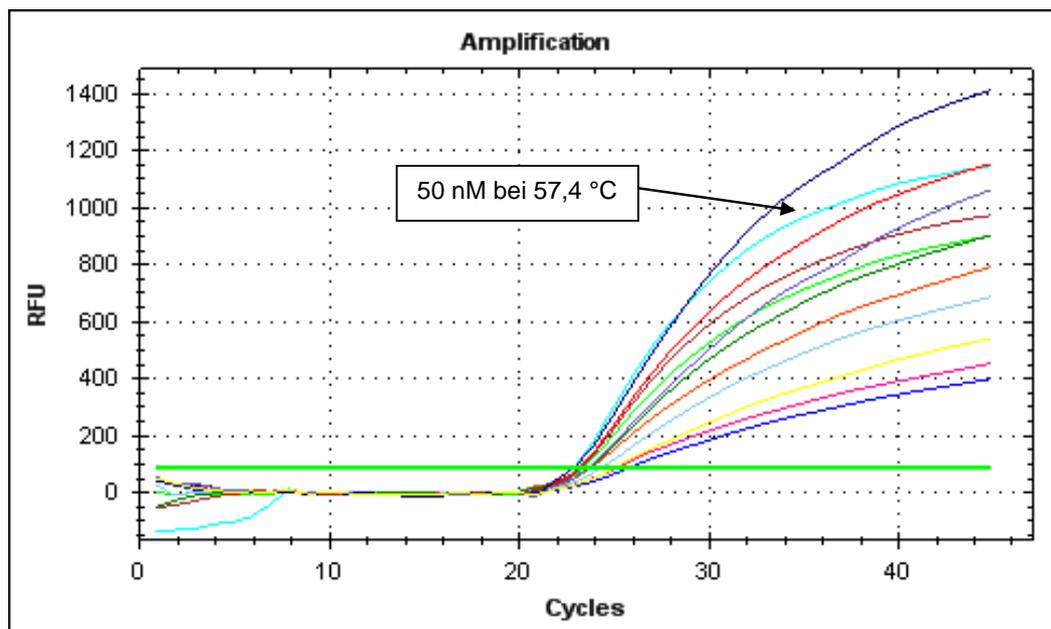


Abbildung 4-15: Bei der Optimierung der Alb-Sondenkonzentration erhaltene PCR-Kurven (171 bp Amplikon).

In der Abbildung 4-16 ist die Auswertung der Optimierung der Sondenkonzentration für das 171 bp lange Amplikon zu sehen.

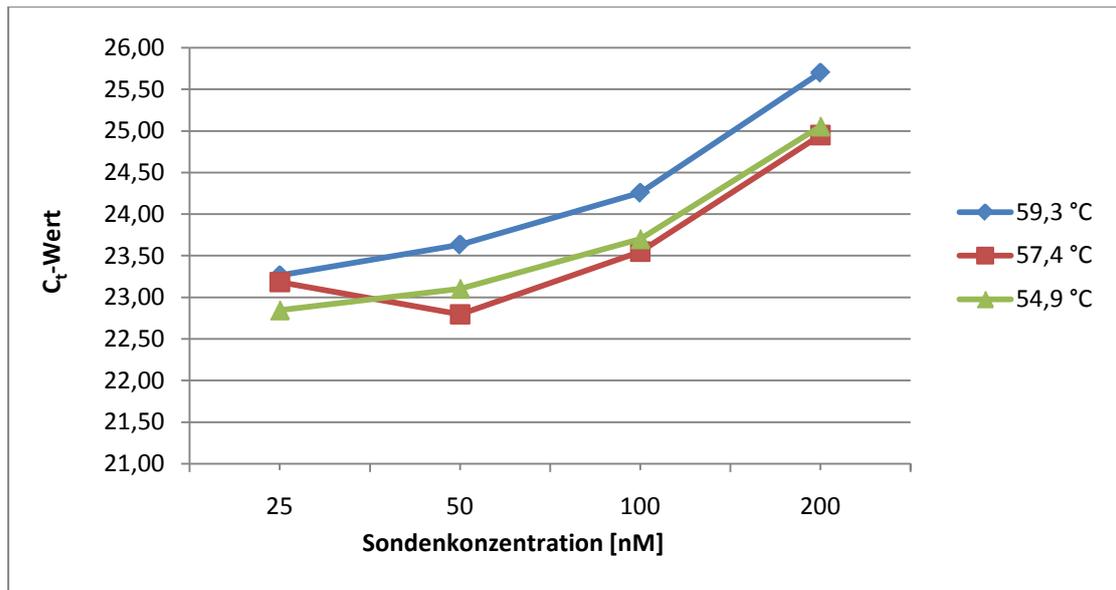


Abbildung 4-16: Auswertung der Optimierungsversuche der Sondenkonzentration für das 171 bp lange Amplikon.

Auch hier erwies sich eine Sondenkonzentration von 50 nM bei einer Annealingtemperatur von 57,4 °C als optimal.

Somit wurden für alle weiteren PCR-Analysen, in denen die Amplifizierbarkeit des 171 bp Amplikons in humanem Gewebe geprüft wurde, folgende optimierte Bedingungen angewendet:

Annealingtemperatur: **57,4 °C**

Forwardprimerkonzentration: **300 nM**

Reverseprimerkonzentration: **200 nM**

Sondenkonzentration: **50 nM**

4.3.4 Bestimmung der Effizienz

Die Effizienz der optimierten Methode für das 122 bp Amplikon wurde durch Analyse seriell verdünnter DNA, die aus nicht fixiertem humanem Gewebe mit der CTAB-Methode extrahiert worden war, bestimmt.

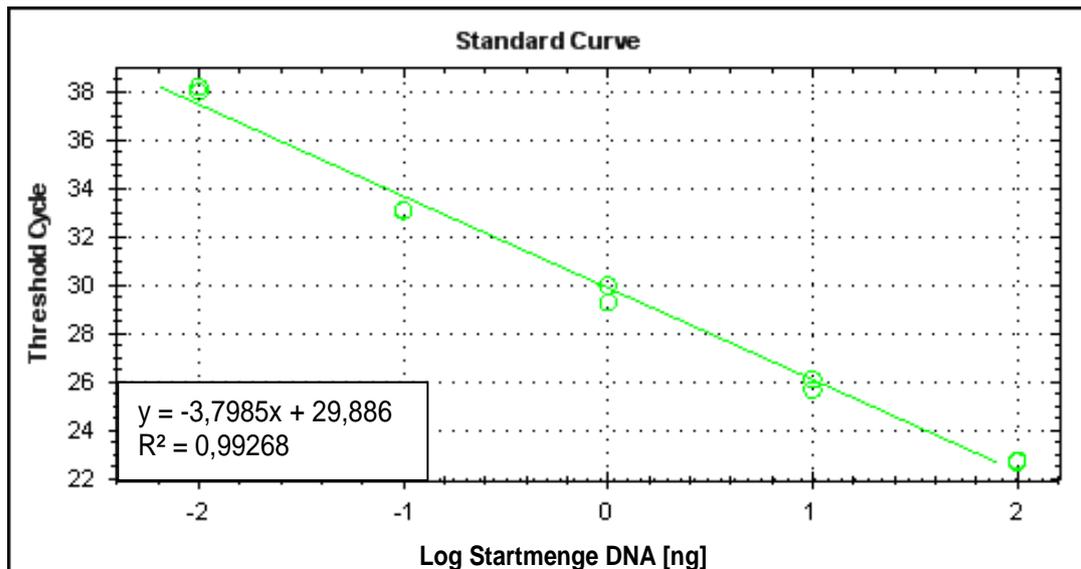


Abbildung 4-18: Standardgerade für seriell verdünnte DNA aus nicht fixiertem humanem Gewebe.

Aus der Steigung der Standardgerade wurde eine Effizienz von 83,3% berechnet, der Korrelationskoeffizient R^2 betrug 0,99268.

4.3.5 Anwendung der entwickelten Methoden zur Amplifikation von DNA aus fixierten Museumspräparaten

Sofern aus den Museumspräparaten genügend hoch konzentrierte DNA-Extrakte erhalten wurden, wurde ihre Amplifizierbarkeit im Hinblick auf das 122 bp Amplikon geprüft.

Jene DNA-Extrakte, die mengenmäßig für einen 2. PCR-Ansatz ausreichten, wurden zusätzlich mit dem Taqman Assay, in dem das 171 bp Amplikon gebildet wird, untersucht.

Die Abbildungen 4-19 und 4-20 zeigen stellvertretend für alle Analysen die erhaltenen PCR-Kurven der Assays für das kurze und das lange Amplikon. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 33 enthalten.

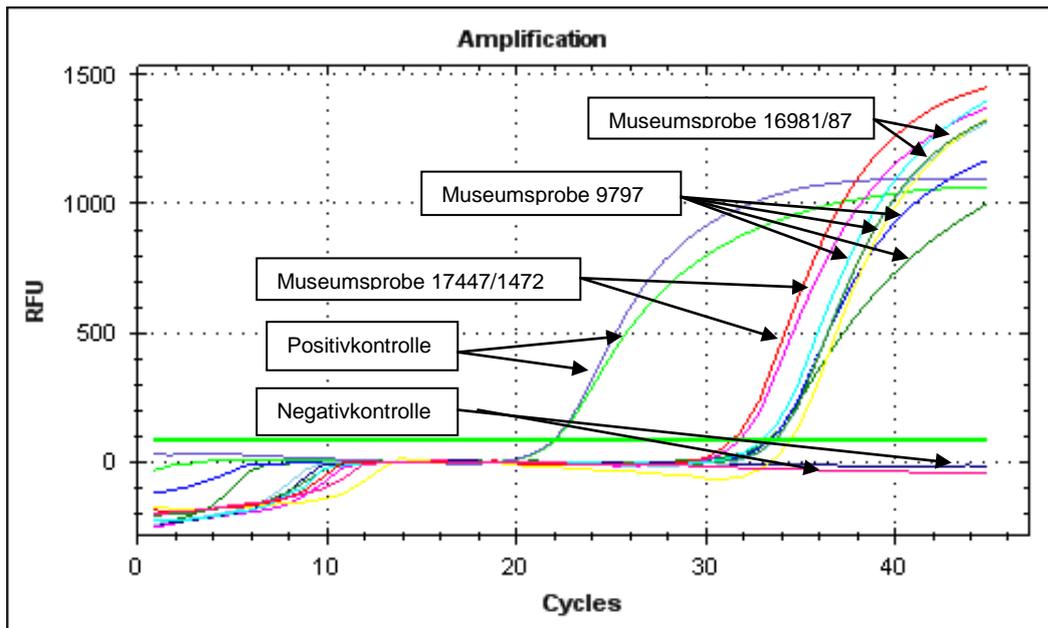


Abbildung 4-19: Amplifikationskurven für DNA aus Museumspräparaten (122 bp Amplikon).

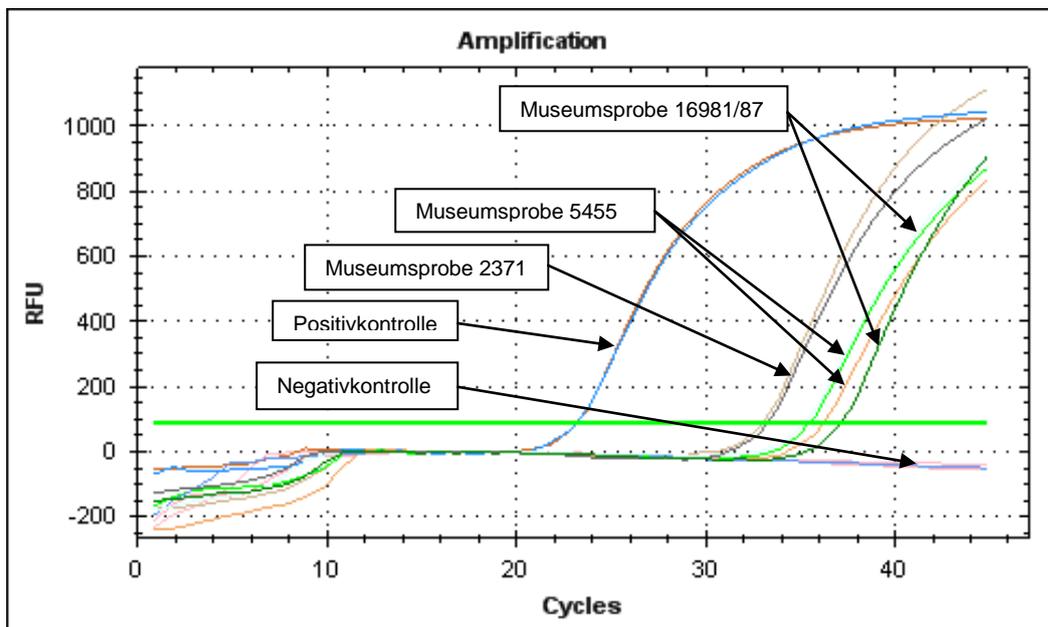


Abbildung 4-20: Amplifikationskurven für DNA aus Museumspräparaten (171 bp Amplikon).

Tabelle 33: Zusammenfassung der PCR-Ergebnisse für DNA aus Museumspräparaten

Museumspräparat	Extraktionsmethode	Reinheit A_{260}/A_{280}	122 bp C_t -Wert (Mittelwert aus Doppelbest.)	171 bp C_t -Wert (Mittelwert aus Doppelbest.)
<i>Positivkontrolle</i>	CTAB	1,98	23,25	23,15
504	DNA FFPE KIT	1,73	34,97	_ ^a
2371	DNA FFPE KIT	2,00	32,12	33,11
5455	CTAB V5	1,86	34,90	_ ^b
	DNA FFPE KIT	1,55	34,68	35,69
16981/87	CTAB	1,42	35,64	_ ^c
	CTAB V6	1,51	31,31	_ ^b
	CTAB V7	1,60	32,97	32,98
	CTAB V7	1,50	33,71	34,28
	DNA FFPE KIT	1,46	35,15	36,28
17447/1472	CTAB V7	1,61	32,42	33,30
	CTAB V7	1,62	31,65	32,04
	DNA FFPE KIT	1,49	33,50	35,25
9797	CTAB V5	1,54	32,15	_ ^b
	CTAB V5	1,53	33,19	_ ^b
	CTAB V7	1,60	33,62	_ ^c
	CTAB V7	1,64	33,16	33,91
	CTAB V7	1,28	33,83	_ ^b
	CTAB V7	1,38	33,92	33,82
	CTAB V7	2,10	33,32	33,55
	DNA FFPE KIT	1,85	35,84	_ ^a

_^a: nicht amplifizierbar (kein Signalanstieg innerhalb von 40 Zyklen)

_^b: Menge des DNA-Extraktes nicht ausreichend

_^c: nicht getestet

Die Tabelle 33 zeigt, dass das kürzere Amplikon in allen DNA-Extrakten amplifiziert werden konnte. Obwohl die DNA aus fixierten Geweben unterschiedlichen Alters stammte, waren die C_t -Werte ähnlich und lagen im Bereich von 32 bis 36. Desweiteren scheint die Extraktionsmethode nur einen geringen Einfluss auf die Amplifizierbarkeit zu haben, wie bei der Museumsprobe 9797 zu sehen ist.

Die Amplifizierbarkeit des 171 bp Amplikons konnte nicht in allen Extrakten getestet werden. Im Gegensatz zum kürzeren Templat konnte das 171 bp lange Templat nicht in allen Extrakten amplifiziert werden. Kam es zu einer Amplifikation, so waren die C_t -Werte gleich bzw. etwas höher als die für das kürzere Amplikon ermittelten C_t -Werte.

4.4 Schlussfolgerungen aus den erzielten Ergebnissen

Die Ergebnisse der in dieser Diplomarbeit durchgeführten DNA-Extraktionen zeigen, dass es grundsätzlich möglich ist, selbst aus sehr alten Formalin fixierten humanen Proben DNA zu extrahieren, wenngleich die extrahierbare Menge an DNA aufgrund der Fixierung mit Formaldehyd stark abnimmt.

Das Alter der Proben hat einen wesentlichen Einfluss auf den Extraktionserfolg. Der entscheidende Schritt für eine erfolgreiche Extraktion von DNA aus sehr alten Formalin fixierten Geweben scheint eine vollständige Gewebeverdauung zu sein. Diese gestaltet sich bei der CTAB-Methode mit zunehmendem Alter immer schwieriger und bedarf einer Optimierung der Bedingungen während des Verdauens.

Die Resultate der durchgeführten PCR-Analysen zeigen, dass DNA aus sehr alten Formalin fixierten Geweben immer noch zugänglich für PCR-Anwendungen ist. Die angewandte Fixierungsmethode scheint jedoch einen Einfluss auf die Amplifizierbarkeit zu haben. Ungepufferte Formaldehydlösung liefert im Vergleich zu Neutralformol und der historischen Kaiserlingmethode deutlich höhere C_t -Werte. Daraus kann auf eine stärkere Schädigung der DNA bei Fixierung mit ungepufferter Formalinlösung geschlossen werden.

Allerdings zeigt sich auch, dass die Länge des ausgewählten, zu amplifizierenden Genabschnitts einen Einfluss auf die Amplifizierbarkeit hat. Je länger das gewählte Templat ist, umso wahrscheinlicher ist das Auftreten von Fehlern innerhalb der Sequenz. Diese Fehler können durch das Alter der Probe oder durch Quervernetzung entstehen. Sie können dazu führen, dass eine PCR-Amplifikation von längeren Genabschnitten nicht mehr möglich ist.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Erforschung des menschlichen Genoms und seiner Funktion ist die Voraussetzung für zukünftige Studien im Bereich der Früherkennung und Heilung von genetischen Erkrankungen. Anatomische Präparatesammlungen, vor allem Feuchtpräparate, wie jene des pathologisch-anatomischen Bundesmuseums in Wien, stellen für diese Studien einen riesigen Pool an vor allem alter DNA dar. Voraussetzung dafür ist die erfolgreiche Extraktion intakter DNA aus solchen Präparaten.

Formaldehyd, das seit Beginn der Präparation als gängiges Fixiermittel eingesetzt wird, führt zur Bildung von Quervernetzungen innerhalb der DNA, was die Extrahierbarkeit der DNA erschwert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten Methoden entwickelt und optimiert werden, um DNA aus humanen Formalin fixierten Museumspräparaten in ausreichender Qualität und Menge zu extrahieren und ihre Amplifizierbarkeit mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) zu prüfen. Weiters sollte der Einfluss der Konservierungsmethode auf die Extrahierbarkeit und Amplifizierbarkeit der DNA untersucht werden. Da jedoch keine Informationen über die angewandten Methoden zur Konservierung der Museumspräparate verfügbar war, sollte auch DNA aus porzinen Geweben, welche unter definierten Bedingungen konserviert worden waren, extrahiert und deren Amplifizierbarkeit untersucht werden.

Zur Entwicklung der PCR-Methoden zur Amplifikation von porziner bzw. humaner DNA wurden anhand der Sequenz des Gens, welches das Protein Albumin codiert, Primer und eine Sonde entworfen. Bei der humanen DNA wurden Primer für ein 122 bp langes Amplikon als auch für ein 171 bp langes Amplikon ausgewählt. Alle Methoden wurden hinsichtlich Primer- und Sondenkonzentration sowie Annealingtemperatur optimiert. Die Effizienzen der TaqMan-Assays betragen 86,1% für DNA aus nicht fixiertem porzinem Gewebe und 83,3% für DNA aus nicht fixiertem humanem Gewebe.

Um den Einfluss der Konservierungsmethode auf die Extrahierbarkeit der DNA untersuchen zu können, wurde ein Schweineherz mit drei Fixiermethoden (mit ungepufferter Formaldehydlösung mit gepufferter Formaldehydlösung und mit der historischen Kaiserlingmethode) fixiert. Zur DNA-Extraktion wurde eine in

der Arbeitsgruppe entwickelte CTAB-Methode, verschiedene Varianten dieser Methode, eine in der Literatur empfohlene Hotalkaliextraktionsmethode sowie zwei kommerzielle DNA-Extraktionskits angewendet.

Als geeignete Extraktionsmethode erwies sich eine Variante der CTAB-Methode mit 1% SDS im Extraktionspuffer und anschließendem 72 h Verdau mit Proteinase K. Allerdings konnte mit dieser Methode nicht aus allen Museumspräparaten DNA extrahiert werden, wobei sich als Schlüsselparameter der erfolgreiche Verdau des Gewebes herauskristallisierte, dieser aber besonders bei den älteren Präparaten nicht erreicht wurde. Die besten Ergebnisse wurden mit einem speziell für FFPE Gewebe entwickelten kommerziellen Extraktionskit erzielt. Die Hotalkaliextraktion erwies sich allerdings nicht als erfolgreich.

Mit der PCR-Methode für porcine DNA konnte in allen untersuchten DNA-Extrakten das gewählte Templat amplifiziert werden. Die erhaltenen C_t -Werte waren von der Fixiermethode abhängig. Die ungepufferte Formaldehydlösung führte zu einer stärkeren Degradation der DNA als die gepufferte Fixierlösung und die Kaiserlingmethode.

Im Falle der humanen fixierten Proben konnte das 122 bp lange Templat in allen untersuchten DNA-Extrakten amplifiziert werden, das 171 bp lange Templat hingegen nicht. Da bei den Museumspräparaten keine Information über die Fixiermethode vorlag, kann jedoch keine Aussage über den Einfluss der Fixiermethode auf die Degradation der DNA getroffen werden.

6 ABSTRACT

Envisioning deep understanding and healing of congenital diseases serves as a strong driving force towards intensive research of the human genome, its structure and functions.

Collections of anatomical preparations constitute a large and interesting pool of old DNA for such research work. One such example is the pathological-anatomical museum in Vienna which owns a large collection of formalin fixed preparations. A prerequisite for gene studies is, however, the possibility to extract intact DNA which can be amplified by PCR.

This diploma thesis describes the development and optimization of real-time PCR assays for the detection of human DNA from formalin fixed museum preparations. Furthermore the influence of the fixation method on DNA extraction and PCR amplification was investigated.

Since no information about the fixation methods of the museum preparations was available, porcine heart tissue was fixed by three different methods (with buffered formalin solution, with unbuffered formalin solution and by the historic Kaiserling method) under defined conditions. These samples were used to develop and optimize a real-time PCR assay for the detection of porcine DNA from formalin fixed tissue, to find out if the fixation method affects the extraction and amplification of DNA.

To develop the PCR methods, the gene sequence coding the protein albumin was chosen to design primers and the probe. In the case of the human DNA assay two different primers were designed, one for a 122 bp and one for a 171 bp template. The efficiencies of the optimized PCR methods for porcine and human DNA were found to be 86.1 and 83.3%, respectively.

For DNA extraction, the following methods were compared: an in house developed CTAB protocol, different variants of the CTAB method, two commercial DNA extraction kits and a method recommended in literature, the so called hot alkali extraction.

The CTAB variant with 1% SDS in the extraction buffer and 72 h digest with proteinase K was found to be appropriate. However, this method did not allow

extraction of DNA from all museum preparations. The key step was complete digestion of the tissue which could not be achieved in all cases. The most efficient extraction method was extraction with a commercial FFPE DNA extraction kit. With this kit, it was possible to extract DNA from each museum sample. The recommended hot alkali extraction method, on the other hand, did not result in satisfactory results with any of the museum samples.

In the case of porcine samples DNA could be amplified in all extracts from formalin fixed tissues. However, the DNA quality depended on the fixation method. The lowest C_T -value and hence the best DNA quality was achieved with buffered formalin solution and the historic Kaiserling method, whereas unbuffered formalin solution led to poor DNA quality.

In the case of formalin fixed museum preparations, the shorter template but not the longer template was amplified in each tested DNA extract. Unfortunately there is no documentation about the exact fixation solution used and the history of the sample. Hence conclusions concerning the influence of the fixation method on DNA quality cannot be drawn.

7 ANHANG

7.1 Abkürzungen

A	Adenin
°	Grad
°C	Grad Celsius
BLAST	<u>B</u> asic <u>L</u> ocal <u>A</u> lignment <u>S</u> earch <u>T</u> ool
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
c	Konzentration
Ct	Threshold cycle
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E	Effizienz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
etc.	et cetera
FFPE	Formalin fixiert Paraffin eingebettet
F-Primer	Forward Primer
G	Guanin
H ₂ O _{dd}	bidestilliertes Wasser
homog.	homogenisiert
mM	Millimolar
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
A ₂₈₀	Extinktion bei 280 Nanometer
A ₂₆₀	Extinktion bei 260 Nanometer
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pH	pondus Hydrogenii
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
R-Primer	Reverse Primer
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
T _m	Schmelztemperatur
UV	Ultra Violett
V	Variante
z.B.	zum Beispiel

7.2 Chemikalienliste

- Autoklaviertes H₂O, Sigma Aldrich
- Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB), Sigma Aldrich
- Chloroform 99%, Roth
- Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, Sigma Aldrich
- DNA-Exitus Plus™, AppliChem GMBH
- EDTA Titriplex III, Merck
- Ethanol abs, Roth
- Formaldehydlösung 38%, Sigma Aldrich
- IQTM Supermix 2x, BioRad
- IQTM SYBR Green Supermix 2x, BioRad
- Isopropanol 99,5%, Sigma Aldrich
- Kaliumdihydrogenphosphat, Sigma Aldrich
- Natriumchlorid, Sigma Aldrich
- Natriumdodecylsulfat, Sigma Aldrich
- Olikonukleotide (Primer, Sigma Aldrich, TaqMan Sonde, Metabion)
- Proteinase K from Tritirachium album, Sigma Aldrich
- Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan), Trizma base, Sigma Aldrich

7.3 Verwendete Geräte

- pH Meter, Metrohm 691
- Analysenwaage, AT 400, Mettler
- Kugelmühle MM 2000, Retsch
- Photometer Genesys 10 UV, Thermo Scientific
- Trockenschrank Model 500, Memmert
- Zentrifuge Model 5424, Eppendorf
- Vortex Janke & Kunkel, IKA Labortechnik
- Kolbenhubpipetten 5 -10 µl, 2-20 µl, 20-200 µl und 100-1000 µl, BioRad
- Thermocycler iCycler, BioRad
- Detektor iQTM5 Multicolor Real-Time PCR Detection System, BioRad
- UV-Lampe Transilluminator 312 nm, Herolab UVT-20
- 96 Well PCR-Platten, BioRad

7.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1:	Aufbau der DNA [Alberts, B. et al. 2004]	14
Abbildung 2-2:	Wasserstoffbrückenbindungen zwischen komplementären Basenpaaren [Alberts, B. et al. 2004].....	15
Abbildung 2-3:	Helixstruktur der DNA [Alberts, B. et al. 2004].....	16
Abbildung 2-4:	Lichtstrahl bei Probendurchgang im Photometer [Otto, M. 2000]	20
Abbildung 2-5:	Schematischer Ablauf einer PCR [Alberts, B. et al. 2004].....	21
Abbildung 2-6:	Funktionsprinzip des fluorescence resonance energy transfer (FRET), modifiziert nach [Mülhardt, C. 2006]	26
Abbildung 2-7:	Funktionsprinzip von SYBR [®] Green [Biorad-Laboratories 2006]	27
Abbildung 2-8	Schmelzpunktanalyse: Unterscheidung von Dimer und richtigem Amplikon	28
Abbildung 2-9:	Funktionsprinzip einer TaqMan-Sonde [Biorad-Laboratories 2006].....	29
Abbildung 2-10:	Parameter bei der Auswertung einer Amplifikationskurve	31
Abbildung 4-1:	Position der gewählten Template in der jeweiligen Gensequenz.....	93
Abbildung 4-2:	Optimierung der por Alb-Primerkonzentration und der Annealingtemperatur. PCR-Kurven und 1. Ableitung der Schmelzkurven.....	95
Abbildung 4-3:	Auswertung der Optimierung der Primerkonzentration und der Annealingtemperatur.....	95
Abbildung 4-4:	Bei der Optimierung der Sondenkonzentration erhaltene PCR-Kurven	96
Abbildung 4-5:	Auswertung der Optimierung der Sondenkonzentration.....	97
Abbildung 4-6:	PCR-Kurven für seriell verdünnte DNA aus nicht fixiertem porzinem Gewebe.....	98
Abbildung 4-7:	Standardgerade der Effizienzbestimmung des TaqMan-Assays für porzine DNA.	99

Abbildung 4-8: Amplifikationskurven für DNA aus frisch fixiertem porzinem Gewebe	100
Abbildung 4-9: Optimierung der hum Alb-Primerkonzentration und der Annealingtemperatur für das 122 bp Amplikon. PCR-Kurven und 1. Ableitung der Schmelzkurven.....	104
Abbildung 4-10: Auswertung der Optimierung der Primerkonzentration und der Annealingtemperatur für das 122 bp lange Amplikon.....	104
Abbildung 4-11: Ergebnisse der Optimierung der hum Alb-Primerkonzentration und der Annealingtemperatur für das 171 bp Amplikon. PCR-Kurven und 1. Ableitung der Schmelzkurven.....	105
Abbildung 4-12: Auswertung der Optimierung der Primerkonzentration und der Annealingtemperatur für das 171 bp lange Amplikon.....	106
Abbildung 4-13: Bei der Optimierung der Alb-Sondenkonzentration erhaltene PCR-Kurven (122 bp Amplikon).	107
Abbildung 4-14: Auswertung der Optimierungsversuche der Sondenkonzentration für das 122 bp lange Amplikon.	107
Abbildung 4-15: Bei der Optimierung der Alb-Sondenkonzentration erhaltene PCR-Kurven (171 bp Amplikon).	108
Abbildung 4-16: Auswertung der Optimierungsversuche der Sondenkonzentration für das 171 bp lange Amplikon.....	109
Abbildung 4-17: PCR-Kurven für seriell verdünnte DNA aus nicht fixiertem humanem Gewebe.....	110
Abbildung 4-18: Standardgerade für seriell verdünnte DNA aus nicht fixiertem humanem Gewebe.....	111
Abbildung 4-19: Amplifikationskurven für DNA aus Museumspräparaten (122 bp Amplikon).	112
Abbildung 4-20: Amplifikationskurven für DNA aus Museumspräparaten (171 bp Amplikon).	112

7.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Untersuchte Museumsproben.....	40
Tabelle 2:	Übersicht über die getesteten Extraktionsvarianten.....	43
Tabelle 3:	Sequenzen der verwendeten Primer und der Sonde.....	55
Tabelle 4:	Getestete Mastermixe bei der Primerkonzentrations- optimierung.....	58
Tabelle 5:	Temperaturprogramm zur Optimierung der Primerkon- zentration und der Annealingtemperatur.....	58
Tabelle 6:	Überblick über die getesteten Mastermixe bei der Optimierung der Sondenkonzentration.....	59
Tabelle 7:	Temperaturprogramm zur Optimierung der Sonden- konzentration.....	60
Tabelle 8:	Eingesetzte DNA-Verdünnungen zur Ermittlung der Effizienz.....	60
Tabelle 9:	Temperaturprogramm der PCR-Methode für porcine DNA.....	62
Tabelle 10:	Temperaturprogramm der PCR-Methode für humane DNA.....	65
Tabelle 11:	Reinheit und Konzentration der mittels der CTAB-Methode aus nicht fixiertem porzinem Gewebe extrahierten DNA.....	67
Tabelle 12:	Reinheit und Konzentration der mit dem QIAamp® DNA Mini Kit aus nicht fixiertem porzinem Gewebe extrahierten DNA.....	68
Tabelle 13:	Ergebnisse der Extraktion aus frisch fixiertem porzinem Gewebe. (Fixierungsmethode: Kaiserling).....	70
Tabelle 14:	Ergebnisse der Extraktion aus frisch fixiertem porzinem Gewebe (Fixierungsmethode: Neutralformol).....	71
Tabelle 15:	Ergebnisse der Extraktion aus frisch fixiertem porzinem Gewebe (Fixierung mit der Museumsmethode).....	71
Tabelle 16:	Ergebnisse der Extraktion mit der CTAB-Methode aus 2007 bei der nach Kaiserling fixiertem porzinem Gewebe.....	73
Tabelle 17:	Ergebnisse der Extraktion mit der CTAB-Methode aus 2007 mit Neutralformol fixiertem porzinem Gewebe.....	73

Tabelle 18:	Ergebnisse der Extraktion mit der CTAB-Methode und 2 getesteten Varianten aus 2007 mit nach der Museumsmethode fixiertem porzinem Gewebe.....	74
Tabelle 19:	Ergebnisse der Extraktion mit den CTAB-Varianten und den Kits für das 2007 nach Kaiserling fixierte porzine Gewebe.....	76
Tabelle 20:	Ergebnisse der Extraktion mit den CTAB-Varianten und den Kits aus 2007 mit Neutralformol fixiertem porzinem Gewebe.	77
Tabelle 21:	Ergebnisse der Extraktion mit den CTAB-Varianten und den Kits aus 2007 mit der Museumsmethode fixiertem porzinem Gewebe.	78
Tabelle 22:	Ergebnisse der Extraktion mit der CTAB-Methode aus nicht fixiertem humanem Gewebe.....	80
Tabelle 23:	Ergebnisse der Extraktionen mit unterschiedlichen Extraktions-Methoden für nicht fixiertes humanes Gewebe.....	81
Tabelle 24:	Ergebnisse der unterschiedlichen Extraktionsvarianten für das Museumspräparat 504 (Fixierung vor 1820).....	83
Tabelle 25:	Ergebnisse der unterschiedlichen Extraktionsvarianten für das Museumspräparat 2371 (Fixierung 1850/51).....	85
Tabelle 26:	Ergebnisse der unterschiedlichen Extraktionsvarianten für das Museumspräparat 5455 (Fixierung 1893).....	86
Tabelle 27:	Ergebnisse der unterschiedlichen Extraktionsvarianten für das Museumspräparat 16981/87 (Fixierung 1914).....	87
Tabelle 28:	Ergebnisse der unterschiedlichen Extraktionsvarianten für das Museumspräparat 17742/1472 (Fixierung 1934).....	89
Tabelle 29:	Ergebnisse der unterschiedlichen Extraktionsvarianten für das Museumspräparat 9797 (Fixierung 1951).....	90
Tabelle 30:	Charakteristika der por Alb-Primer.....	94
Tabelle 31:	Zusammenfassung der Ergebnisse für fixiertes porzines Gewebe.	100
Tabelle 32:	Charakteristika der verwendeten hum Alb-Primer.	103
Tabelle 33:	Zusammenfassung der PCR-Ergebnisse für DNA aus Museumspräparaten.....	113

7.6 Literaturverzeichnis

RÖMPP ONLINE (2001). Der effizientere Zugriff auf das Wissen der Chemie. Stuttgart, Thieme.

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. UND WALTER, P. (2004). Molekularbiologie der Zelle; 4. Auflage; Weinheim, Wiley-VCH.: 221-227; 588-590.

BANKL, H., RADASZKIEWICZ, T. UND BANKL, H.-C. (1996). Klinische Pathologie - Prinzipien der morphologischen Pathologie; Wien Maudrich. 60-62.

BIORAD-LABORATORIES (2006). Real Time Application Guide.

DEDHIA, P., TARALE, S., DHONGDE, G., KHADAPKAR, R. UND DAS, B. (2007). Evaluation of DNA extraction methods and real time PCR optimization on formalin-fixed paraffin-embedded tissues. Asian Pac J Cancer Prev 8 (1): 55.

DORAK, T. M. (2006). Real-time PCR; London, Taylor & Francis: 1-31; 39-59; 93-96; 139-146.

ECHSEL, H. UND RÁCEK, M. (1976). Biologische Präparation: Arbeitsbuch für Interessierte an Instituten und Schulen; Wien, Jugend u. Volk-Verlags-Ges.m.b.H.: 203.

EDWARDS, K., LOGAN, J. UND SAUNDERS, N. (2004). Real-time PCR : an essential guide; Wymondham, Horizon Bioscience: 1-31; 71-83.

FERRER, I., ARMSTRONG, J., CAPELLARI, S., PARCHI, P., ARZBERGER, T., BELL, J., BUDKA, H., STROBEL, T., GIACCONE, G., ROSSI, G., BOGDANOVIC, N., FAKAI, P., SCHMITT, A., RIEDERERS, P., AL-SARRAJ, S., RAVID, R. UND KRETZSCHMAR, H. (2007). Effects of formalin fixation, paraffin embedding, and time of storage on DNA preservation in brain tissue: a BrainNet Europe study. *Brain Pathol* 17 (3): 297.

GILBERT, M. T., HASELKORN, T., BUNCE, M., SANCHEZ, J. J., LUCAS, S. B., JEWELL, L. D., VAN MARCK, E. UND WOROBEY, M. (2007). The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues-which methods are useful when? *PLoS One* 2 (6): e537.

LANG, G. (2006). *Histotechnik- Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik*; Wien, Springer.: 39-66.

MÜLHARDT, C. (2006). *Molekularbiologie, Genomics*; 5. Auflage; Heidelberg, Elsevier Spektrum Akad. Verl.: 80-91; 105-109.

OTTO, M. (2000). *Analytische Chemie*; Weinheim, Wiley-VCH-Verl.: 270-272.

PATZAK, B. (2009). *Faszination und Ekel - Das Pathologisch-Anatomische Bundesmuseum im Wiener Narrenturm*; Graz, Verl. f. Sammler. 8; 61; 65; 90-100.

SANTOS, M. C., SAITO, C. P. UND LINE, S. R. (2008). Extraction of genomic DNA from paraffin-embedded tissue sections of human fetuses fixed and stored in formalin for long periods. *Pathol Res Pract* 204 (9): 633.

SANTOS, S., SA, D., BASTOS, E., GUEDES-PINTO, H., GUT, I., GARTNER, F. UND CHAVES, R. (2009). An efficient protocol for genomic DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Res Vet Sci* 86 (3): 421.

SAUNDERS, G. C., PARKES, H. C. (1999). Analytical molecular biology: quality and validation. Cambridge, Royal Society of Chemistry: 29-44.

SAVIOZ, A., BLOUIN, J. L., GUIDI, S., ANTONARAKIS, S. E. UND BOURAS, C. (1997). A method for the extraction of genomic DNA from human brain tissue fixed and stored in formalin for many years. *Acta Neuropathol* 93 (4): 408.

SHI, S. R., DATAR, R., LIU, C., WU, L., ZHANG, Z., COTE, R. J. UND TAYLOR, C. R. (2004). DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: heat-induced retrieval in alkaline solution. *Histochem Cell Biol* 122 (3): 211.

SHI, S. R., COTE, R. J., WU, L., LIU, C., DATAR, R., SHI, Y., LIU, D., LIM, H. UND 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. *J Histochem Cytochem* 50 (8): 1005.

SKAGE, M. UND SCHANDER, C. (2007). DNA from formalin-fixed tissue: extraction or repair? This is the question. *Marine biology research*, Taylor and Francis 3:5: 289-295.

PRAKTISCHE TÄTIGKEITEN

WS 2010 - SS 2010	Tutor am Institut für Analytische Chemie und Lebensmittelchemie, Universität Wien
WS 2009 - SS 2009	Tutor am Institut für Organische Chemie, Universität Wien
2006-2008	DSM Fine Chemicals Austria Nfg GmbH & Co KG, Linz
Sommer 2003	Machland-Feinkost-Konserven GmbH, Naarn
Dezember 2001- Jänner 2002	Silvretta Montafon Bergbahnen AG, St. Gallenkirch
1999 – 2005	Synthesa Chemie GmbH, Perg