

**Entwicklung und Charakterisierung des RMCA
für *Rattus norvegicus* in nukleärer und
mitochondrialer DNA**



DISSERTATION

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Anne Scheffler

aus Bad Salzungen

Würzburg 2018



Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am:

Gutachter der schriftlichen Arbeit:

1. Gutachter: _____

2. Gutachter: _____

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums:

1. Prüfer: _____

2. Prüfer: _____

3. Prüfer: _____

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am

Für meine Liebsten.

Danksagung

Mein Dank gilt...

...Frau Prof. Dr. Leane Lehmann für die Überlassung des spannenden Themas, die produktiven Diskussionen und Ideen, das Vertrauen, die gemeinsame Freude am Projekt, den Glauben an mich und meine Arbeit und die unbändige Unterstützung über all die Zeit. Von Herzen Danke.

...Herrn Dr. Harald Esch für all die Hilfe und Anregungen, die zum Gelingen meiner Arbeit und allen nicht RMCA-Projekten beigetragen haben.

...Frau Prof. Stopper und Frau Prof. Dr. Mally für die Überlassung der NRK-Zelllinien.

Ganz lieben Dank an die RMCAler Dr. Katja Schmalbach, Dr. Benjamin Spielmann und Jan Fuchs. Es war eine Freude mit euch. Jan, insbesondere Dir möchte ich danken für die vielen hilfreichen Diskussionen um Primer, Interpretationen von Experimenten und den Spaß im Labor.

Ein großer Dank gilt auch meinen WAAsis und Masteranden David Schindelmann, Johanna Oswald, Christine Felbinger, Carolin Horeld, Ersan Elemen, Thomas Kunz, Elisabeth Fischer, Sandra Eichhammer und Kevin Domes, die mich im Rahmen ihrer Abschluss- bzw. Masterarbeiten enorm unterstützt haben. Ihr wart toll!

...dem Deutschen Akademischen Austauschdienst für die finanzielle Unterstützung im Rahmen einer Posterpräsentation auf der Eurotox in Stockholm.

...der Studienstiftung des Deutschen Volkes für die finanzielle Unterstützung meiner Doktorarbeit.

Lieben Dank an Annette Albrecht, Dr. Carolin Kleider, Dr. Susanne Futh, Dr. Daniela Martínez Jaramillo und Miriam Macziol für eure stetige Hilfe in der Zellkultur und anderen Projekten, für die schönen Grillfeten, Weinabende und Kurztrips. Ihr seid die Besten.

Danke an alle ehemaligen und aktuellen Doktoranden des Arbeitskreises Lehmann des Lehrstuhls für Lebensmittelchemie (Daniela, René, Sabrina, Maryam, Marina) für die schönen Momente im und außerhalb des Labors.

Ganz besonders möchte ich mich an dieser Stelle nochmal bei allen bedanken, die mich und meinen Babybauch in den letzten Monaten in Würzburg unterstützt haben. Ohne jeden einzelnen von euch hätte ich das nicht geschafft.

Danke auch an die Liebensteiner Truppe für euer stets offenes Ohr. Bei euch fühle ich mich immer zu Hause auch wenn wir verstreut sind. Das liegt wohl daran, dass ihr supidupi seid...

Danke an meine zwei größten Schätze die ich habe. Ihr habt es immer geschafft mich abzulenken und aufzumuntern falls mal etwas nicht geklappt hat oder die Freude über Erfolge mit mir geteilt. Ein Lächeln von euch und alles andere war egal. Danke dafür. Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinen Eltern und meinem Opi bedanken. Ihr habt mir all das ermöglicht, immer zu mir gehalten, mich motiviert und an mich geglaubt. Diese Arbeit ist für euch.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Spontane und induzierte Mutationen.....	1
1.1.1 Spontane Mutationen	1
1.1.2 Physikalische und chemische Mutagene	1
1.2 Reparatur von DNA-Schäden.....	2
1.3 Mutationstest	3
1.3.1 <i>In vitro</i> Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Test	3
1.3.2 <i>In vivo</i> Mutationstest.....	3
1.3.3 Random Mutation Capture Assay	4
1.4 Mitochondrien als Target für Mutationstests.....	6
1.4.1 Aufbau der Mitochondrien und der mitochondrialen DNA	6
1.4.2 mtDNA Mutationen und physiologische Auswirkungen	7
2 Problemstellung und Zielsetzung.....	8
3 Ergebnisse und Diskussion	10
3.1 Untersuchungen zum mutagenen Potential von Irilon	10
3.1.1 Mutagenes Potential des Isoflavons Irilon in kultivierten V79-Zellen	10
3.1.2 Weiterführende Daten zum mutagenen Potential des Isoflavons Irilon in kultivierten V79-Zellen.....	11
3.2 Zielsequenzen für den RMCA	11
3.2.1 Das TP53-Gen auf der nukleären DNA.....	12
3.2.2 Die 18S rDNA und das mt-Cytb-Gen auf der mitochondrialen DNA.....	23
3.2.3 Übersicht der molekularbiologischen Werkzeuge für den RMCA	27
3.3 Kopiezahlquantifizierung mittels <i>TaqMan</i> [®] -basierter Realtime-PCR.....	32
3.3.1 Herstellung der Standards für die Quantifizierung der Zielsequenzen.....	33
3.3.2 Entwicklung der RT-PCR-Methode zur Bestimmung der Gesamtkopiezahl	38
3.3.3 Sonderfall 18S rDNA	42
3.3.4 Festlegung des Kalibrierbereiches.....	47
3.3.5 Spezifität der Methoden.....	54
3.4 DNA-Isolierung.....	56

3.4.1 Benötigte Kopiezahl zur Bestimmung einer Mutationsfrequenz	58
3.4.2 Häufigkeit nichtquantifizierbarer DNA	65
3.4.3 Reinheit der DNA-Lösungen	65
3.4.4 Gehäkelte DNA als Templat	66
3.4.5 Fazit	67
3.4.6 Ausblick nukleärer RMCA	69
3.5 Erfassung mutierter DNA-Kopien	73
3.5.1 Herstellung des Mutanten-Standards	74
3.5.2 Übertragung der Mutations-PCR auf einen 10 µl Reaktionsansatz	80
3.5.3 Nachweis einer Kopie	84
3.6 Anwendung des RMCA's auf Rattengewebe	89
3.6.1 Organauswahl	89
3.6.2 Bestimmung der mitochondrialen Mutationsfrequenz in Rattenleber	89
3.6.3 Kopiezahl-Quantifizierung des mt-Cytb-Gens in Rattenleber	91
3.6.4 Akzeptierter Bereich der Mutantenzahl	94
3.6.5 Mitochondriale Mutationsfrequenzen der Leber	96
3.6.6 Zusammenfassung und Fazit	100
3.7. Etablierung und Anwendung des HPRT auf Rattenzellen	103
3.7.1 Auswahl der Zellen und Charakterisierung	103
3.7.2 Durchführung des HPRT	111
3.7.3 Zusammenfassung und Diskussion der HPRT Ergebnisse	120
3.8 Nebenprodukte in der Mutations-PCR	123
3.8.1 Nebenprodukte der Mutations-PCR einer spezifischen bp-Länge	126
3.8.2 unspezifische Nebenprodukte der Mutations-PCR	127
4 Zusammenfassung	145
5 Summary	149
6 Material und Methoden	152
6.1 Geräte	152
6.2 Verbrauchsmaterialien	154
6.3 Chemikalien	156

6.4 Puffer und Lösungen.....	159
6.4.1 Desoxydinukleosidtriphosphat (dNTP)-Mix	159
6.4.2 Ethanol (70%ig, v/v)	159
6.4.3 Glykogenlösung.....	159
6.4.4 Homogenisierungspuffer.....	159
6.4.5 Loading Dye für Mutations-PCR	159
6.4.6 Lysepuffer.....	159
6.4.7 Na-Acetat-Lösung (3M)	160
6.4.8 Na ₂ EDTA-Lösung (0,5M).....	160
6.4.9 Primer-Stammlösung und Primer-Mix	160
6.4.10 Proteinase-K-Lösung.....	160
6.4.11 Sodium-Dodecyl-Sulfate (10%ig).....	160
6.4.12 Suspensions-Puffer	161
6.4.13 SYBR®-Green-Verdünnungen.....	161
6.4.14 TaqMan®-Sonden-Stammlösung	161
6.4.15 TE-Puffer	161
6.4.16 Tris-HCl-Lösung (1M)	161
6.4.17 Zellkulturlösungen	162
6.5 Methoden.....	165
6.5.0 Sequenzrecherche	165
6.5.1 Entwicklung der molekularbiologischen Werkzeuge	165
6.5.2 Verwendete Primer.....	168
6.5.3 DNA-Isolierung aus Gewebe und Zellen.....	171
6.5.4 Quantifizierung der DNA.....	175
6.5.5 Polymerase-Kettenreaktion	177
6.5.6 <i>TaqI</i> -Verdau und <i>TaqI</i> -Nachverdau	181
6.5.7 Agarose-Gelelektrophorese.....	183
6.5.8 Aufreinigung der Amplifikate mittels illustra™GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit	183
6.5.9 Nachamplifizierung von Mutanten und erneuter <i>TaqI</i> -Verdau	184

6.5.10 Sequenzierung	185
6.5.11 Statistik.....	185
6.5.12 Bestimmung der Zellzahl	186
6.5.13 Wachstumskurve	188
6.5.14 Plating Efficiency Test	189
6.5.15 Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT)-Test	190
6.5.16 Mikrokern-Test	190
6.5.17 Zellkultur allgemein.....	192
7 Literaturverzeichnis	XV
8. Anhang.....	XXII

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ACI-Ratte	<i>August Copenhagen Irish rat</i>
ATPase	Adenosintriphosphatase
BER	Basenexzisions-Reparatur
Bp	Basenpaar
BPS	Basenpaarsubstitution
C	Cytosin
CHO-Zellen	<i>Chinese hamster ovary cells</i>
COX	Cytochrom c Oxidase
Ct	<i>cycle threshold</i>
CYPs	Cytochrom P450 abhängige Monooxygenasen
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP-	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
D-Loop	<i>displacement loop</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DR	<i>direct reversal repair</i>
DSBR	<i>double-strand break repair</i>
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EMS	Ethylmethansulfonat
F344-Ratte	Fischer-Ratte
FW	<i>forward</i>
G	Guanin
gDNA	Gesamt-DNA
GSH	Glutathion
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
IRI	Irilon
kt-DNA	Kalbsthymus-DNA
M	männlich
MF	Mutationsfrequenz
MM	Mastermix
MMR	<i>mismatch repair</i>

Mt-Cytb-Gen	Gen, welches für das mitochondriale Cytochrom B Protein kodiert
mtDNA	mitochondriale DNA
NADH	Nicotinamidadeninindinukleotid
nDNA	nukleäre DNA
NER	Nucleotidexzisions-Reparatur
NQO	4-Nitroquinolin-1-oxid
NRK-Zellen	<i>normal rat kidney cells</i>
NTS	<i>non transcribed spacer</i>
P	Passage
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	<i>Plating Efficiency /Koloniebildungsfähigkeit</i>
RMCA	<i>Random Mutation Capture Assay</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rRNA	ribosomale RNA
RT-PCR	<i>Realtime PCR</i>
RT-Standard	quantifizierte Referenz für Kopiezahlbestimmung
RV	<i>reverse</i>
SD-Ratte	<i>Sprague Dawley Ratte</i>
SMF	Spontanmutantenfrequenz
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
T	Thymin
T _m	Schmelztemperatur
TM	<i>TaqMan®</i>
TP53-Gen	Gen, welches für das Tumorsuppressorprotein p53 kodiert
TQ	<i>Trace Quantity</i>
tRNA	transfer RNA
UDG	Uracil-DNA-Glycosylase
UV	Ultraviolett
V79-Zellen	Lungenfibroblasten eines chinesischen Hamsters
W	weiblich
18S rDNA	für 18S rRNA kodierende DNA

1 Einleitung

1.1 Spontane und induzierte Mutationen

Mutationen (lat. Mutatio = Veränderung) sind Veränderungen in der DNA, die ein Gen (Genmutation), ein Chromosom (Chromosomenmutation) oder einen Chromosomensatz (Genommutation) betreffen.

Bei Genmutationen handelt es sich meist um Basenpaarsubstitutionen, welche spontan durch zufällige Fehler bei der Replikation oder Rekombination der DNA auftreten oder chemisch bzw. physikalisch induziert werden können. Unterschieden werden je nach Austausch der Basen Transitionen (Purinbase vs. Purinbase bzw. Pyrimidinbase vs. Pyrimidinbase) und Transversionen (Purin- vs. Pyrimidinbase).

1.1.1 Spontane Mutationen

Eine besonders häufige spontane Transition ist die von Guanin/Cytosin (G/C) zu Adenin/Cytosin (A/C), die ihre Ursache in der Tautomerisierung von Guanin hat. Die Umwandlung von der Keto- zur Enolform (Verhältnis 1:10⁴) führt dazu, dass Guanin vorrangig mit Thymin hybridisiert. Eine weitere spontane Mutation ist die Transition von C/G zu Thymin/Adenin (T/A). Diese hat ihren Ursprung in einer spontanen Desaminierung von Cytosin zu Uracil. Wird wiederum Adenin zu Hypoxanthin desaminiert ist eine A/T → G/C Transition die Folge. Neben Tautomerisierungen und Desaminierungen sind auch spontane Depurinierungen möglich. Dadurch entsteht ein apurines Nucleotid, welches keine Basenpaarung mehr eingehen kann (Müller-Esterl, 2009).

1.1.2 Physikalische und chemische Mutagene

Mutationen können allerdings nicht nur spontan, sondern auch durch den Einfluss von Mutagenen entstehen. Dabei wird zwischen physikalischen und chemischen Mutagenen unterschieden. Zu den physikalischen Mutagenen zählen hauptsächlich die Ultraviolette (UV)- und die ionisierende Strahlung (α -, β -, γ - und Röntgen-Strahlung). Durch die ionisierende Strahlung werden freie Radikale erzeugt, welche die DNA-Basen verändern. Hingegen führt UV-Strahlung zur Bildung von Thymindimeren (meist Cyclobutanderivate). Dabei wird die Struktur der DNA verändert und es kommt zu Fehlern während der Replikation und Transkription.

Chemische Mutagene können unter anderem nach Ihrem Wirkmechanismus eingruppiert werden. So gibt es beispielsweise quervernetzende, die Topoisomerase II hemmende und alkylierende (Alkylanzien) Agenzien.

Einleitung

Alkylanzien

Alkylanzien führen Alkylgruppen, meist Ethyl- oder Methylgruppen, in die DNA-Basen ein wobei zunächst DNA-Addukte entstehen. Insbesondere die Hydroxylgruppe der Position 6 von Guanin oder der Position 4 von Thymin sind anfällig für eine Alkylierung. Es kommt zu den Transitionen G/C→A/T und T/A→C/G.

Alkylanzien wie beispielsweise Ethylmethansulfonat (EMS) können zu apurinen bzw. apyrimidinen Stellen führen, wodurch die DNA-Polymerase innerhalb der Replikation gehemmt wird und in Folge ein Einzelstrangbruch entstehen kann. Besonders anfällig sind hierbei N⁷-Alkylguanin sowie Addukte an N³-Guanin, N⁷-Adenin oder N³-Adenin (Pfenning, 2014). Ein Einzelstrangbruch kann in der nächsten S-Phase in einen Doppelstrangbruch und letztlich in einem Mikrokern enden. Genmutationen innerhalb von Genen, welche den Zellzyklus kontrollieren, können auch direkt zu Fehlern in der Chromosomenverteilung führen (Schumacher, 2005; Lehmann, 2002). Diese vielfältigen Wirkweisen werden sich in der pharmazeutischen Industrie zu Nutze gemacht, indem Alkylanzien als Zytostatika zur Krebsbehandlung eingesetzt werden.

Ein weiteres chemisches Mutagen, welches seine Wirkweise unter anderem in der DNA-Adduktbildung hat, ist 4-Nitroquinolin-1-oxid (NQO). Es reagiert vorzugsweise mit dem N² bzw. C⁸ von Guanin und dem N² von Adenin (Bailleul et al., 1989; Tada und Tada, 1976). Chromosomenmutationen können folgen, wobei Mikrokerne, welche kinetochor-negativ sind, entstehen können. Konzentrationsabhängig führt NQO zum Zellzyklusarrest und zur Apoptose. Möglich ist auch die Induktion von oxidativen Schäden.

1.2 Reparatur von DNA-Schäden

Bei den beschriebenen DNA-Schäden und Mutationen ([Kapitel 1.1](#)) darf nicht unberücksichtigt bleiben, dass die Zelle bereits nach der Entstehung eines DNA-Schadens mit Reparaturmechanismen (ausdifferenzierte Zellen) oder der Aktivierung von Zellzyklus-Checkpoints einer Manifestierung von Mutationen entgegenwirkt.

Momentan wird davon ausgegangen, dass nahezu alle Reparaturmechanismen bis auf die Nucleotidexzisions-Reparatur (NER) sowohl in der nukleären (n) DNA als auch in der mitochondrialen (mt) DNA vorkommen (Boesch et al., 2011). Eine Alternative zur NER – eigentlich zuständig für die Entfernung von „*bulky lesions*“ und somit von UV-Strahlung verursachten Schäden- ist das *direct reversal* (DR)-Reparatursystem, welches hauptsächlich Cyclobutanpyrimidine und O⁶-Alkylguanine korrigiert. Zudem stehen die *mismatch repair* (MMR), welche Fehlpaarungen innerhalb des Doppelstrangs und durch die DNA-Polymerase verursachte *slippage* Fehler korrigiert (Saki und Prakash, 2017) und die *double-strand break repair* (DSBR), welche Doppelstrangbrüche entweder durch homologe Rekombination oder

nicht homologes *end joining* repariert als Systeme zur Verfügung. Auf Grund des hohen Aufkommens an reaktiven Sauerstoffspezies in den Mitochondrien, findet dort vornehmlich die Basenexzisions-Reparatur (BER) statt (Boesch et al., 2011). Diese repariert oxidierte, alkylierte oder desaminierte einzelne Basen. Das Prinzip der BER ist, dass die Base durch eine spezifische DNA-Glykosylase entfernt wird. Danach wird durch eine AP-Endonuklease ein Einzelstrangbruch generiert. Eine DNA-Polymerase synthetisiert neue Nucleotide, wahlweise einzeln (*short-patch* BER) oder zwei bis sechs Nucleotide (*long-patch* BER).

Ist ein DNA-Schaden nicht reparabel werden die Mitochondrien durch Lysosomen abgebaut (Chen und Chan, 2009) oder im Falle der nDNA die Apoptose induziert. Bleiben DNA-Schäden jedoch unrepariert beispielsweise durch den Einsatz von Schadens-toleranten Polymerasen (*translesion synthesis*), können Mutationen entstehen. Je nach Lokalisation im Genom können diese Mutationen möglicherweise den Mehrstufenprozess der Kanzerogenese initiieren.

1.3 Mutationstest

Um die Rolle von spezifischen Mutationen in der Entwicklung von Krankheiten zu untersuchen oder mutagene Potentiale von Substanzen abzuschätzen, werden unter anderem *in vitro* und/oder *in vivo* Mutationstests durchgeführt. *In vivo* Mutationstests sind dabei unerlässlich um Ergebnisse aus *in vitro* Tests unter Berücksichtigung der biologischen Verfügbarkeit, intrazellulärer Vorgänge, Verstoffwechslungen oder organspezifische Effekte zu verifizieren.

1.3.1 *In vitro* Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Test

Der phänotypselektive *in vitro* Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-(HPRT)-Test ist ein weit verbreiteter Test zur Untersuchung von Genmutationen in Säugerzelllinien wie beispielsweise den Lungenfibroblasten eines männlichen chinesischen Hamsters, den V79-Zellen (Zettner et al., 2007; Brugger et al., 2006).

Zellen, die Mutationen im HPRT-Gen besitzen, welche dessen Funktionalität oder die des Proteins zerstören, überleben die Zugabe des toxischen 6-Thioguanins und können nach der Bildung von sichtbaren Kolonien selektiert werden (Johnson, 2012).

1.3.2 *In vivo* Mutationstest

Unter idealen Bedingungen würde ein *in vivo* Mutationstest

- viele Mutationsarten detektieren,
- in kodierenden und nicht-kodierenden Gen-Abschnitten anwendbar,
- in jedem Organ durchführbar
- und empfindlich genug für die Detektion von Spontanmutationsfrequenzen sein.

Einleitung

Die derzeitig etablierten Testsysteme zur Detektion von Mutationen *in vivo* weisen jedoch alle Limitierungen auf.

So existieren zur Detektion von Genmutationen (Exons) und manchen Chromosomenmutationen (Deletionen) vier etablierte phänotypselektive Mutationstest in Säugerzellen: der *Aprt mouse assay*, *Tk mouse assay*, *Hprt somatic mutation assay* und der *Dlb-1 specific locus assay* (WHO, 2006). Die ersten drei sind nur auf Gewebe anwendbar, welche die Reportergene exprimieren die *in vitro* subkultiviert werden können. Der *Dlb-1 specific locus assay* kann sogar nur im Dünndarm und eventuell Dickdarm durchgeführt werden (WHO, 2006). Zur Untersuchung von Chromosomenaberrationen und/oder Aneuploidie stehen der *mammalian erythrocyte micronucleus test* (OECD, 1997b), der *mammalian bone marrow chromosome aberration test* (OECD, 1997a), der *rodent dominant lethal test* (OECD, 2014), der *mammalian spermatogonial chromosomal aberration test* (OECD, 2013) und der *mouse heritable translokation assay* (WHO, 2006) zur Verfügung. Dabei erfasst der *in vivo* Mikrokerntest Chromosomen- und Genommutationen im Knochenmark oder in Zellen des peripheren Blutes. Genmutationen werden jedoch nicht erfasst.

Durch die Anwendbarkeit auf alle Organe werden daher für die Testung auf Mutagenität immer mehr transgene Tiermodelle verwendet. Beispiele hierfür sind das *Big Blue® mouse and rat transgenic system* oder das *MutaTM mouse system* (Lambert et al., 2005). D.h. es werden Tiere verwendet, die ein exogenes Reportergen das sogenannte Transgen (z.B. *lacZ* oder *lacI*) besitzen. Es ist prokaryotischen Ursprungs, stark methyliert, kommt in Tandem-Kopien vor und wird nicht transkribiert. Diese Transgene sind selektierbar, leicht klonierbar und sequenzierbar. Somit kann die Mutationsfrequenz in jedem Organ bestimmt werden (Lambert et al., 2005). Ob und in wiefern sich Rückschlüsse auf das Wirtsgenom ziehen lassen bleibt aktuell allerdings umstritten.

Genotypselektive Tests hingegen sind zunächst einmal auf jede DNA-Sequenz in jedem Organ anwendbar. Der publizierte *Random Mutation Capture Assay* (RMCA) verspricht zudem sensitiv zu sein. So wurde in gesundem Mäusegewebe in einem Intron von p53 eine Spontanmutationsfrequenz von $2-3 \cdot 10^{-8}/\text{bp}$ ermittelt (Zheng et al., 2007).

1.3.3 Random Mutation Capture Assay

Der RMCA ist ein genotypselektiver Mutationstest, welcher ursprünglich für das Intron 6 des humanen p53-Gens von Bielas und Loeb entwickelt wurde (Bielas und Loeb, 2005). Er erfasst Basenpaarsubstitutionen oder kleine Deletionen in der Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *TaqI*. *TaqI* ist besonders geeignet da es ein robustes Enzym ist, welches nicht durch DNA-Schäden wie Ethylierung (Bielas und Loeb, 2005) oder Oxidation (Vermulst

Einleitung

et al., 2007) beeinflusst wird. Zudem besteht die Erkennungssequenz von *TaqI* mit TCGA aus allen vier existierenden Nukleotiden. Ein weiterer Vorteil ist, dass es thermostabil ist (Vermulst et al., 2008a).

TaqI-Erkennungssequenzen sind sowohl in kodierenden (Exons) als auch nicht kodierenden Genabschnitten (Introns) in unterschiedlicher Anzahl vorhanden. Um Mutationsfrequenzen mit dem RMCA zu bestimmen, werden folgende Arbeitsschritte durchgeführt (Abbildung 1):

- Isolierung möglichst reiner und intakter DNA
- Vorverdau mit Restriktionsenzymen, welche die zu untersuchende Zielsequenz nicht schneiden. Dies soll die Größe der zu untersuchenden Zielsequenz auf maximal 1000 bp minimieren.
- Anreicherung der zu untersuchenden Zielsequenz mittels DNA-DNA-Hybridisierung an eine zuvor synthetisierten biotinylierte und Uracil-haltige DNA-Sonde, welche an Streptavidin-gekoppelte magnetische Beads bindet. Damit soll die Effizienz des nachfolgenden *TaqI*-Verdaus gesteigert werden.
- Schneiden der nicht-mutierten Zielsequenzen durch einen mehrfachen Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym *TaqI*
- Verdau der DNA-Sonde mit Uracil-DNA-Glykosylase
- Quantifizierung der Gesamtkopiezahl der Zielsequenz durch PCR. Damit sowohl Wildtyp (geschnittene) als auch mutierte (nicht geschnittene) Zielsequenzen erfasst werden, sind die Primer hierfür wahlweise beide links oder rechtsseitig der *TaqI*-Schnittstelle positioniert.
- Bestimmung der Anzahl in der *TaqI*-Schnittstelle mutierter Zielsequenzen mittels PCR. Um nur die mutierten (nicht geschnittenen) Zielsequenzen zu erfassen, werden die Primer beidseitig der *TaqI*-Schnittstelle positioniert. So ergeben nur mutierte Zielsequenzen ein PCR-Produkt, welche wahlweise durch einen erneuten Restriktionsverdau mit *TaqI* oder einer Sequenzierung als Mutanten bestätigt wird.
- Berechnung der Mutationsfrequenz pro Basenpaar, indem die Anzahl der mutierten Zielsequenzen auf die Gesamtanzahl der erfassten Basenpaare (Gesamtkopiezahl mal 4) bezogen wird.

Einleitung

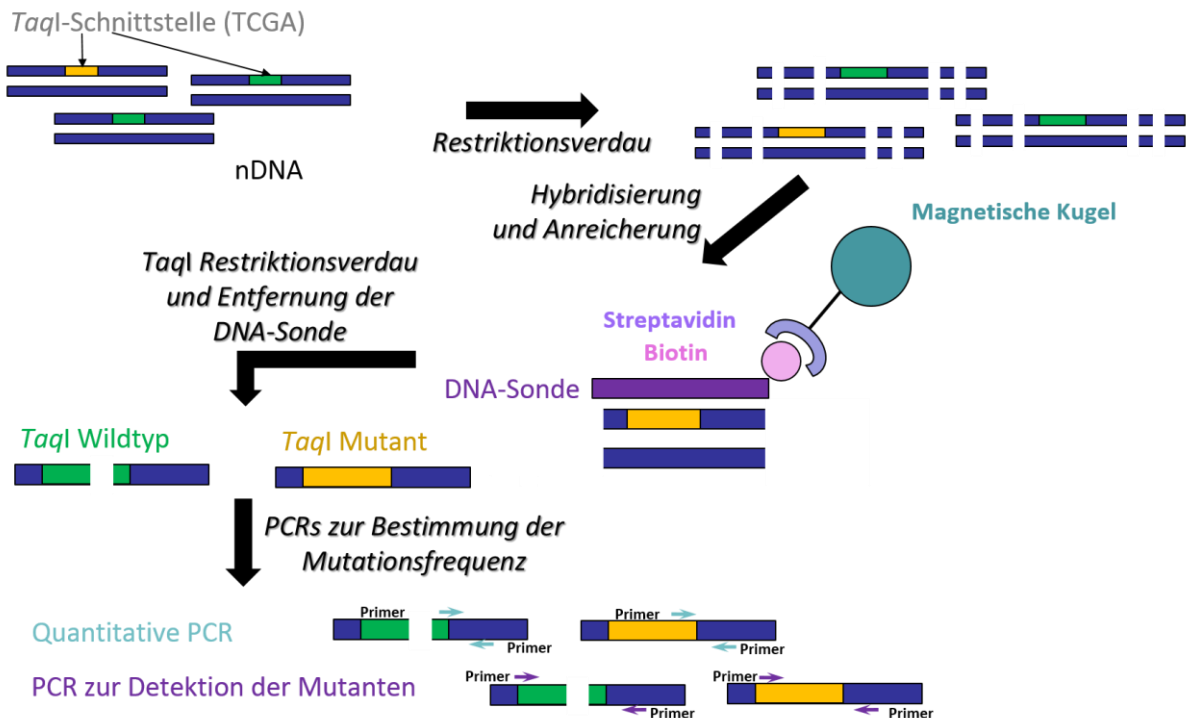


Abbildung 1 Prinzip des *Random Mutation Capture Assays*.

Prinzipiell kann auch auf den ersten Restriktionsverdau und die nachfolgende Anreicherung verzichtet werden, wenn der *TaqI*-Verdau exzessiver (öfter und mit mehr Enzym) durchgeführt wird (Wright et al., 2011).

Wird der RMCA mit mtDNA angewendet, kann auf Grund der geringeren Genomgröße (ca. 16 kbp vgl. mit ca. 3 Gbp) die Ermittlung der Mutationsfrequenz nach erfolgter mtDNA-Isolierung generell mit dem *TaqI*-Restriktionsverdau (Vermulst et al., 2008a) beginnen.

1.4 Mitochondrien als Target für Mutationstests

1.4.1 Aufbau der Mitochondrien und der mitochondrialen DNA

Mitochondrien sind ca. 1 x 2 µm große Zellorganellen und für die Generierung von ATP durch oxidative Phosphorylierung innerhalb der Zelle verantwortlich. Die Anzahl und Gestalt der Mitochondrien kann je nach Zelltyp stark variieren, typisch sind jedoch ca. 2000 Mitochondrien pro Zelle (Koolman, 2002). Durch eine Doppelmembran aus innerer und äußerer mitochondrialer Membran wird der Intermembranraum umschlossen. Die innere Membran, besitzt durch ihre vielen Einstülpungen (Cristae) eine große Oberfläche und umschließt den Innenraum (Matrix). In diesem Matrixraum befindet sich die mtDNA.

Diese ist ringförmig, doppelsträngig, besteht ca. aus 16.000 bp und wird von der mtDNA Polymerase gamma repliziert. Die mtDNA Kopiezahl variiert stark zwischen den Geweben (Khrapko, 2014). Die mtDNA kodiert für 13 Polypeptide, welche alle außer einem Bestandteil der Atmungskette sind, und mit 22 transfer (t) RNAs und 2 ribosomalen (r) RNAs für

Einleitung

Bestandteile der mitochondrialen Translation (Boore, 1999). Der *displacement* (D)-loop ist der einzige größere nicht kodierende Bereich. Hier befinden sich Sequenzen für die Initiation der Replikation und Transkription (Taylor und Turnbull, 2005). Viele andere mitochondriale Proteine werden im Zellkern kodiert, im Zytosol synthetisiert und über spezifische Transporter in das Mitochondrium gebracht (Lang et al., 1999).

1.4.2 mtDNA Mutationen und physiologische Auswirkungen

Mutationen in der mtDNA sind im Gegensatz zur nDNA vergleichsweise häufig. Eine Ursache liegt an der unmittelbaren Umgebung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), welche im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung entstehen. Zusätzlich ist die mtDNA nicht durch Histone geschützt. Reparatursysteme sind vorhanden aber nicht im gleichen Umfang wie die der nDNA ([Kapitel 1.1](#)).

Bekannte Mutationen in der mtDNA sind Basenpaarsubstitutionen (BPS) und große Deletionen (100 bp bis zum ganzen Genom). Die bekannteste und häufigste Deletion ist die *common deletion*, welche 4977 bp groß ist und durch 2 13 bp lange *repeat*-Sequenzen begrenzt ist (Russell und Turnbull, 2014). Ursachen für spontane BPS in der mtDNA sind hauptsächlich spontane Fehler der DNA Polymerase gamma im Rahmen der Replikation (Zheng et al., 2006). Die Deletionen der mtDNA entstehen vorrangig im Rahmen der Reparatur eines Doppelstrangbruchs (Fukui und Moraes, 2009; Krishnan et al., 2008).

Welche Mutationen entstehen gilt als abhängig vom Zelltyp und Alter. Deletionen beispielsweise akkumulieren in nicht-proliferierenden Zellen wie Neuronen und Muskelfasern und sind nicht vorhanden in proliferierendem Gewebe wie der Dickdarm-Schleimhaut (Khrapko, 2014). Auch Unterschiede zwischen den gleichen Zelltyp sind möglich. So wurden in einer Studie an Neuronen statistisch signifikant mehr mtDNA Deletionen in Cytochrom c Oxidase (COX) defizienten Neuronen als in COX positiven Neuronen detektiert (Kraytsberg et al., 2006). In Mäusen wurde mit zunehmendem Alter ein Anstieg an mtDNA Deletionen im Gehirn detektiert (Vermulst et al., 2008b).

Da in der mtDNA exklusiv Komponenten der Atmungskette und rRNAs, welche für deren Translation benötigt werden, kodiert sind, führen Mutationen in der mtDNA zu einer Störung der Atmungskette. Wichtig hierbei ist, dass der genetische Schaden sich erst phänotypisch manifestiert, sobald ein bestimmter *threshold* (*phenotypic threshold*) überschritten ist (Rossignol et al., 2003). Für Deletionen liegt dieser bei ca. 60% (Nakada et al., 2001), für BPS bei ca. 90% (Moraes und Schon, 1996).

2 Problemstellung und Zielsetzung

Mutationen in der nukleären und/oder mitochondrialen DNA tragen nachweislich zur Alterung und der Entstehung von Krankheiten bei. Sie können nicht nur spontan entstehen, sondern auch physikalisch oder chemisch induziert werden. Deshalb ist die Durchführung von Mutationstests unter anderem ein wesentlicher Bestandteil der Grundlagenforschung oder der Bewertung von Lebensmittelinhaltsstoffen. Mutationstests werden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durchgeführt. *In vitro* Tests stellen meist die schnellere und billigere Variante dar, die jedoch keinen oder nur limitierten Aufschluss über die Art der Substanzaufnahme, die biologische Verfügbarkeit, intrazelluläre Vorgänge, Verstoffwechslungen oder organspezifische Effekte geben. *In vivo* Mutationstests sind aktuell entweder in der Detektion der Mutationsart oder der Wahl des zu untersuchenden Zielgens begrenzt. Beispielsweise sind phänotypselektive Genmutationstest auf selektierbare Gene und auf *ex vivo* proliferierende Zellen beschränkt und erfassen somit nur Mutationen, die Exons und/oder gegebenenfalls Promotorregionen betreffen. Obwohl bislang ungeklärt ist, ob Zusammenhänge zwischen Mutationsfrequenzen in phänotypisch selektierbaren Genprodukten und denen von kodierenden und nicht-kodierenden DNA-Abschnitten kritischer Zielgene (Onkogenen und Tumorsuppressorgenen) bestehen, wird insbesondere *in vivo* mangels Alternativen derzeit auf phänotypselektierbare Genmutationstests oder transgene Tiermodelle zurückgegriffen.

Dem gegenüber stehen genotypselektive Mutationstests. Die von Bielas und Loeb (2005) publizierte Technik des *Random Mutation Capture Assay* verspricht eine sensitive Bestimmung von spontanen und induzierten Mutationsfrequenzen in beliebigen Zielsequenzen in beliebigen Organen. Prinzipiell werden nach der DNA-Isolierung und einem Restriktionsverdau mit dem Enzym *TaqI* (Erkennungssequenz TCGA) zwei PCRs durchgeführt: eine zur Bestimmung der Gesamtkopiezahl der Zielsequenz und eine zur Bestimmung der Anzahl an mutierten Zielsequenzen. Dabei werden Basenmutationen oder kleine Deletionen in der Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *TaqI* erfasst.

Um die Datenlage zur Bewertung beispielsweise eines Lebensmittelinhaltsstoffes aufzuwerten, soll in dieser Arbeit innerhalb der Untersuchung des mutagenen Potentials des Isoflavons Irlon, zusätzlich eine Methode zur Erfassung des Mutationsspektrums etabliert werden.

Weiterführend soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob der *Random Mutation Capture Assay* auch für das in Deutschland am dritt-häufigsten verwendeten Versuchstier Ratte (*Rattus norvegicus*), welche in 2016 vorrangig für Versuche zu regulatorischen Zwecken und Routineproduktion (65,2%), der Grundlagenforschung (17%) und der translationalen und angewandten Forschung (14%) eingesetzt wurde (Stand 2016, Bundesministerium für

Problemstellung und Zielsetzung

Ernährung und Landwirtschaft) anwendbar und somit eine Bestimmung von spontanen und induzierten Mutationsfrequenzen ohne Einschränkung in verschiedenen Zielsequenzen möglich ist.

Ursprünglich publiziert für das Intron 6 des humanen für das Tumorsuppressor Protein 53 kodierenden Gen p53, soll der *Random Mutation Capture Assay* in dieser Arbeit für drei Zielsequenzen in der nukleären und mitochondrialen DNA entwickelt und für mindestens eine davon angewendet werden.

Zu Beginn sollen die Zielsequenzen ausgewählt, die benötigten molekularen Werkzeuge hergestellt, diese bezüglich deren Sequenz verifiziert sowie deren PCR-Bedingungen optimiert werden.

Die Mutationsfrequenz berechnet sich aus der Gesamtanzahl der zu untersuchenden Kopien und der Anzahl der davon mutierten Kopien. Deshalb soll als nächstes je Zielsequenz eine spezifische Methode zur Quantifizierung der Gesamt-Kopiezahl etabliert und hinsichtlich Richtigkeit und Reproduzierbarkeit charakterisiert werden.

Danach soll eine DNA-Isolierungsmethode gewählt werden, welche nicht nur intakte, reine und konzentrierte DNA sondern auch eine ausreichende Kopiezahlausbeute für eine Dreifachbestimmung der Mutationsfrequenz ergibt.

Ist die DNA isoliert und die Kopiezahl bestimmt, soll im Anschluss die PCR zur Bestimmung der relativen Anzahl an mutierten Kopien optimiert und hinsichtlich ihrer Leistungsstärke charakterisiert werden.

Im Falle, dass für eine Zielsequenz alle Teilschritte des *Random Mutation Capture Assays* entwickelt und anwendbar sind, soll dieser mit gesundem Rattengewebe von weiblichen und männlichen Tieren durchgeführt und hinsichtlich der zu erwartenden Schwankungen näher charakterisiert werden. Für einen Vergleich der Ergebnisse zwischen phänotypselektiven und genotypselektiven Tests, sollen die mit Modellmutagenen induzierten Mutationsfrequenzen sowohl mit dem Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Test als auch mit dem entwickelten *Random Mutation Capture Assay* bestimmt werden. Da der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Test nicht mit Rattenzellen publiziert ist, soll dieser zuvor etabliert werden.

Abschließend soll die Robustheit des *Random Mutation Capture Assays* beurteilt werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Untersuchungen zum mutagenen Potential von Irilon

Untersuchungen zu mutagenen Potentialen von Chemikalien, Arzneimitteln und Naturstoffen sind essentiell für die Sicherheitsbewertung. Auch manche Lebensmittelinhaltsstoffe sind mutagen und müssen entsprechend bewertet werden.

3.1.1 Mutagenes Potential des Isoflavons Irilon in kultivierten V79-Zellen

So entsprechen nach dem Verzehr von Rotklee-basierten Nahrungsergänzungsmitteln die Plasmakonzentrationen des Isoflavons Irilon (IRI) dem des bereits gut untersuchten Isoflavons Daidzein (Maul und Kulling, 2010).

Da einige Isoflavone genotoxisch sind, wurden *in vitro* Untersuchungen in V79-Zellen zum mutagenen Potential von IRI durchgeführt. Genmutationen wurden durch den Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Test ([Kapitel 6.5.15](#)) bestimmt und mit Hilfe der Sequenzierung von cDNA der mit IRI inkubierten V79-Zellen näher charakterisiert (Scheffler et al., 2015a). Chromosomen- und Genommutationen wurden mit dem Mikrokerntest, welcher mit einer immunchemischen Färbung der Zentromerproteine und Mikrotubuli kombiniert wurde, analysiert ([Kapitel 6.5.16](#)). Die Zellproliferation wurde durch elektronische Zellzählung, Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie überprüft.

IRI beeinflusste die Mutantenfrequenz im HPRT-Gen nicht, veränderte jedoch das Mutationsspektrum insofern, dass der Anteil an Deletionen stieg und der an Basenpaarsubstitutionen abnahm. Ein leichter, aber dennoch signifikanter Anstieg der Mikrokerne, welche zudem Chromosomenfragmente enthielten, unterstützte die Annahme, dass IRI Chromosomenmutationen induziert. Insbesondere unter Berücksichtigung, dass dieser Anstieg trotz Aktivierung von drei Zellzyklus-Checkpoints, welche möglicherweise die Bildung von Mikrokernen stören, detektiert wurde. Darüber hinaus wies IRI ein starkes aneugenes Potenzial auf, welches durch kaputte mitotische Spindeln, Mitose-Arrest und asymmetrische Zellteilungen geprägt war und zu Chromosomenverlust, Kernfragmentierung bis hin zur mitotischen Katastrophe führte. Insofern könnte IRI ein weiteres Isoflavon sein, welches für die Sicherheitsbewertung von Nahrungsergänzungsmitteln zu berücksichtigen ist.

Eine ausführliche Darstellung der Forschungsergebnisse wurde in folgender Fachzeitschrift veröffentlicht:

Scheffler A, Albrecht AE., Esch HL, Lehmann L. (2015). Mutagenic potential of the isoflavone irilone in cultured V79 cells. *Toxicol. Lett.*, Volume 234 (2), 81-91. DOI: 10.1016/j.toxlet.2015.02.013. (siehe auch Anhang dieser Arbeit: Seiten XCV-CV)

3.1.2 Weiterführende Daten zum mutagenen Potential des Isoflavons Irilon in kultivierten V79-Zellen

Ausführliche Daten zur Untersuchung des mutagenen Potentials des Isoflavons Irilon in kultivierten V79 Zellen sind bislang rar. Eine ausführliche Darstellung von Daten, welche die Annahme, dass IRI mutagenes Potential in kultivierten V79-Zellen besitzt stützt (Scheffler et al., 2015b), wurde in folgender Fachzeitschrift veröffentlicht:

Scheffler A, Albrecht AE, Esch HL, Lehmann L. (2015). Data in support of the mutagenic potential of the isoflavone irilone in cultured V79 cells. Data in Brief, Volume 4, 474-487. DOI:10.1016/j.dib.2015.07.010. (siehe auch Anhang dieser Arbeit Seiten CVIII-CXXI)

Diese Daten umfassen:

- a) eine Quantifizierung von Irilon im Kulturmedium während der Zellkulturexperimente,
- b) Informationen zu Veränderungen des Mutationsspektrum in der cDNA des Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Gens von Irilon-behandelten V79-Zellen,
- c) das Auftreten von Karyorrhesis und Apoptose sowie
- d) die Anzahl der Mikrokerne enthaltenden Zellen mit ganzen Chromosomen oder Chromosomenfragmenten.
- e) Auch beispielhafte Mikroskopbilder, verwendet für die fluoreszenzmikroskopische Beurteilung von c) und d) werden vorgestellt.

Mit den zur Untersuchung des mutagenen Potentials von Irilon verwendeten Methoden bleibt die Frage offen, in wie fern diese Ergebnisse auch *in vivo* von Relevanz sind. Mit dem RMCA ([Kapitel 1.3.3](#)) existiert ein genotypselektiver Mutationstest, welcher per se ein hohes Potential zur Klärung von solch übergreifenden Fragestellungen hat.

3.2 Zielsequenzen für den RMCA

Bereits 2005 wurde der RMCA von der Gruppe um Jason Bielas und Lawrence Loeb (2005) für die Bestimmung von Mutationsfrequenzen in nDNA entwickelt. Der genotypselektive Test, welcher Basenmutationen oder kleine Deletionen in der Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *TaqI* erfasst, bietet enormes Potential zur Klärung von übergreifenden Fragestellungen in der Grundlagenforschung der Mutagenese.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob der *Random Mutation Capture Assay* auch für das in Deutschland am dritt-häufigsten verwendeten Versuchstier Ratte (*Rattus norvegicus*), anwendbar und somit eine Bestimmung von spontanen und induzierten Mutationsfrequenzen ohne Einschränkung in verschiedenen Zielsequenzen möglich ist. Dabei sollte der RMCA für drei Zielsequenzen in der nDNA und mtDNA entwickelt und die Anwendbarkeit überprüft

Ergebnisse und Diskussion

werden. Abhängig davon, wie sich der Gesamt-RMCA als anwendbar erweist, sollen ein oder mehrere der denkbaren Zielsequenzen zur Beantwortung folgender Schwerpunkte eingesetzt werden:

- Welche Unterschiede gibt es bei der Induktion von Mutationen in kodierenden und nichtkodierenden DNA-Sequenzen?
- Ist eine Erhöhung der Empfindlichkeit des RMCA durch die Verwendung von der für ribosomale RNA kodierenden DNA oder mitochondrialer DNA erreichbar?
- Sind die in mitochondrialer DNA ermittelten Mutationsfrequenzen ein geeigneter Endpunkt zur Bewertung des mutagenen Potentials einer Substanz?

Mit Hilfe von Datenbanken wurden Zielsequenzen in der nDNA und mtDNA von *Rattus norvegicus* gesucht ([Kapitel 6.5.0](#), [Kapitel 6.5.1](#)). Ausgewählt wurden: das TP53-Gen auf der nukleären DNA (kodiert für das Tumorsuppressor Protein p53; [Kapitel 3.2.1](#)), die für 18S rRNA kodierende DNA (18S rDNA, [Kapitel 3.2.2](#)) sowie das mt-Cytb-Gen, welches auf der mitochondrialen DNA kodiert ist (kodiert für das Cytochrom B Protein, Gene ID: 26192, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/26192>, Stand 13.10.2016; [Kapitel 3.2.2](#)). Alle drei Targets wurden auf ihre Eignung für den RMCA hin geprüft.

3.2.1 Das TP53-Gen auf der nukleären DNA

Das TP53-Gen (Ensembl-Nummer ENSRNOG00000010756; http://www.ensembl.org/Rattus_norvegicus/Gene/Sequence?g=ENSRNOG00000010756;r=10:56399721-56411149, Stand 18.04.2012; entspricht Version Rnor_5.0 http://mar2015.archive.ensembl.org/Rattus_norvegicus/Gene/Sequence?db=core:g=ENSRNOG00000010756;r=10:55932658-55944086;t=ENSRNOT00000046490, Stand 16.11.2016) – bestehend aus 10 Exons und 9 Introns- ist auf Chromosom 10 lokalisiert. Die komplette Sequenz besteht aus 11429 bp. Insgesamt kodieren die Exons für 391 Aminosäuren. Das TP53-Gen wurde bereits als Zielsequenz für den humanen RMCA erfolgreich angewandt (Bielas und Loeb, 2005). Mit seinen 9 *TaqI*-Schnittstellen, welche auf kodierende und nicht-kodierende Abschnitte innerhalb der nDNA von *Rattus norvegicus* aufgeteilt sind, eignet es sich potentiell auch als Zielsequenz für den in dieser Arbeit zu entwickelnden RMCA. Nach einem *in silico* ein Restriktionsverdau ([Kapitel 3.2.1.1](#)) wurden für den potentiell geeigneten Sequenzabschnitt alle für den RMCA notwendigen molekularbiologischen Werkzeuge mit DNA isoliert aus der Leber einer Fischer (F344)-Ratte hergestellt ([Kapitel 3.2.1.2](#), [Kapitel 3.2.1.3](#), [Kapitel 3.2.1.4](#))¹. Die dazu notwendigen Primer sollten möglichst auch auf andere Rattenstämme anwendbar sein. Verschiedene Rattenstämme (Inzucht- und Auszucht) weisen

¹ Wenn nicht anders im Text erwähnt, wiesen die Blindwerte nach Agarose-Gelelektrophorese mit anschließender SYBR®-Green-Detektion keine Banden auf, sodass eine Verunreinigung der Chemikalien mit DNA ausgeschlossen wurde.

Ergebnisse und Diskussion

jedoch genetisch variables Material auf (Guryev et al., 2004). Unterschiede einzelner Nucleotide (*Single nucleotide polymorphisms*, SNPs) beeinflussen bereits die Primer-Entwicklung und nicht zu Letzt die Dateninterpretation. Deswegen sollte im Zuge der Herstellung der molekularbiologischen Werkzeuge *in silico* geprüft werden, ob ein Unterschied in der Sequenzabfolge durch das Vorhandensein eines oder mehrerer SNPs besteht und ob dieser Auswirkungen auf die Entwicklung des RMCA hat ([Kapitel 3.2.1.5](#)).

Eine Einschränkung in der Anwendbarkeit in DNA unterschiedlicher Rattenstämme wäre gegeben, wenn:

- ein oder beide Primer nicht mehr kompatibel zur Zielsequenz sind. Somit wäre die PCR-Produktentstehung verhindert.
- ein SNP innerhalb der *TaqI*-Erkennungssequenz positioniert wäre. Dies würde eine Fehlinterpretation der Mutantenzahl durch Überschätzung zur Folge haben.

Da es jedoch selbst innerhalb eines Rattenstammes zwischen den Unterstämmen zu genetischer Variation kommt (Smits et al., 2004), wurde anschließend in einem praktischen Versuch geprüft, in wie fern sich die Sequenzen der benötigten molekularbiologischen Werkzeuge der in dieser Arbeiten verwendeten Sprague-Dawley (SD)-Ratte und der F344-Ratte unterscheiden ([Kapitel 3.2.1.5](#)).

3.2.1.1 *In silico* Restriktionsverdau

Der *in silico* Restriktionsverdau ([Kapitel 6.5.0](#)) des TP53-Gens mit den von Bielas und Loeb (2005) verwendeten Enzymen *Bam*HI, *Eco*RV, *Pvu*II, *Rsa*I und *Eco*RI ergab 28 Gen-Fragmente, die zwischen 32 bp und 1114 bp lang waren. Mit 20/27 (74%) Schnittstellen war am häufigsten die Erkennungssequenz von *Rsa*I vertreten, gefolgt von *Pvu*II (6/27, 22%) und *Eco*RI (1/27, 4%). Da die Enzyme *Bam*HI und *Eco*RV hingegen keine Erkennungssequenzen auf dem Genabschnitt hatten, wurde auf diese Restriktionsenzyme im weiteren Verlauf verzichtet.

Fünf der neun *TaqI*-Erkennungssequenzen verteilten sich auf die Verdau-Fragmente 3, 5 und 15 im Intron 1, eine auf Intron 8 (Fragment 26) und jeweils eine auf Exon 2 (Fragment 16), Exon 8 (Fragment 23) und Exon 9 (Fragment 26). Auf Grund ihrer Länge <800 bp waren Fragment 5, 15, 16, und 23 ungeeignet für die Anwendung im RMCA ([Kapitel 6.5.1](#)). Für die verbleibenden zwei Fragmente im Intron1 (Fragment 3) und Intron 8/Exon 9 (Fragment 26) wurden die für die Durchführung des RMCA notwendigen molekularbiologischen Werkzeuge entwickelt (Sonden-, Mutations- und Kopiezahl-Primer sowie *TaqMan*® (TM)-Sonde, Anhang Tabelle 1), welche den Anforderungen des RMCA ([Kapitel 6.5.1](#)) entsprachen.

Um zu prüfen, ob mit diesen Primern nun auch die gewollten Sequenzen amplifiziert werden, sollten zunächst die TP53-Sonden (Intron 1 und Exon 9), sowie die Kopiezahl- und

Ergebnisse und Diskussion

Mutationsprodukte in qualitativen PCRs mit genomischer DNA als Templat und den jeweiligen entwickelten Primerpaaren (Anhang Tabelle 1) hergestellt und anschließend sequenziert werden.

TP53-Sonde

Für die Herstellung der TP53-Sonde war zunächst die Bestimmung der optimalen *Annealing*-Temperatur mittels qualitativer PCR (50 ng genomische DNA/ PCR-Ansatz, [Kapitel 6.5.3.1](#)), einem Temperatur-Gradient von 50-65°C und anschließender gelelektrophoretischer Auswertung nötig. Da bei 65°C ein PCR-Produkt mit der gewünschten Amplifikatlänge ohne Bildung von Nebenprodukten entstand, wurden 65°C als *Annealing*-Temperatur festgelegt. Im Rahmen der Sequenzierungsauswertung ([Kapitel 6.5.8](#)) wurde jedoch ersichtlich, dass eine komplette Sequenzierung auf Grund eines Poly-T-Bereiches (bp-Position 396-409/728 DNA-Sonde, Intron 1) bzw. eines Poly-A-Bereiches (bp-Position 397-411, Exon 9) nicht möglich ist. Zwar wurde mit den *reverse* (rv)-Primern die *TaqI*-Schnittstelle erfasst und somit bestätigt, jedoch verursacht der Poly-A- bzw. Poly-T-Bereich möglicherweise Komplikationen bei der Hybridisierung der Sonde an die Zielsequenz. Da sich somit bereits die ausgewählten TP53-Sondensequenzen als ungeeignet für die Anwendung im RMCA erwiesen, wurde auf eine Verifikation des Kopiezahl- und des Mutations-Produktes verzichtet. Eine optimale Positionierung der Primer war entsprechend den Voraussetzungen ([Kapitel 6.5.1](#)) bereits ausgeschöpft. Somit war es notwendig andere Gen-Fragmente durch einen neuen *in silico* Restriktionsverdau mit einer anderen Kombination an Restriktionsenzymen zu erzeugen.

In silico Restriktionsverdau II

Um größere Sequenzabschnitte für die Herstellung der molekularbiologischen Werkzeuge zu erhalten, wurde im Restriktionsverdau auf das Restriktionsenzym *RsaI*, welches am häufigsten geschnitten hat, verzichtet. Es resultierten 8 Fragmente, welche zwischen 461 bp und 2989 bp lang waren, wobei sich die *TaqI*-Schnittstellen lediglich Fragment 1, 4, 7 und 8 verteilten (Abbildung 2).

Ergebnisse und Diskussion

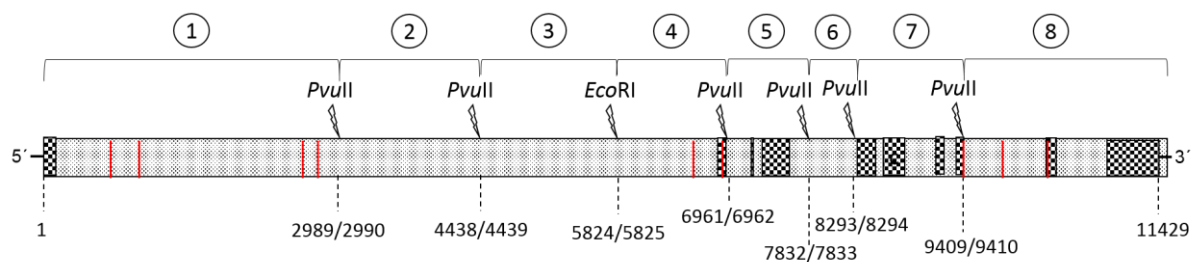


Abbildung 2 Schematische Darstellung des *in silico* Restriktionsverdaus des TP53-Gens (Ensembl-Nummer ENSRNOG00000010756) von *Rattus norvegicus*. Dargestellt sind die Positionen der Exons (schwarz-weiß geschachtelt), Introns (grau), *TaqI*-Erkennungssequenzen (rot) sowie der Erkennungssequenzen von *PvuII* und *EcoRI*. Die Ziffern geben die Basenposition innerhalb des 11429 bp-langen TP53-Gens an. Die Ziffern in den Kreisen geben die Bezeichnungen der jeweiligen Verdau-Fragmente an.

Auf Grund einer Überschreitung der für die Herstellung der molekularbiologischen Werkzeuge gewünschten Länge von ca. 1000 bp ([Kapitel 6.5.1](#)) um das 2- bis 3-fache, wurden Fragment 1 (2989 bp) und 8 (2020 bp) für die weitere Analyse ausgeschlossen. Bereits im Fragment 4 waren nicht nur zwei *TaqI*-Schnittstellen vorhanden sondern diese auch auf ein Intron und ein Exon aufgeteilt. Durch eine geschickte Positionierung der Primer und der TM-Sonde (Abbildung 3, Tabelle 19) war es möglich mit einer einzigen DNA-Sonde sowohl das Intron 1 als auch das Exon 2 zu erfassen sowie die Kopiezahlbestimmung für dieses Intron und Exon mit einer einzigen PCR zu erreichen. Dies brachte sowohl zeitliche Vorteile als auch Ressourcen-Ersparnisse.

Ein BLAST der Kopiezahl-Primer (Primer BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, Stand 24.02.2016) gegen das Genom von *Rattus norvegicus* (Anhang Tabelle 4) ergab, dass theoretisch die Entstehung von 2 Amplifikations-Produkten, welche beide nDNA als Templat haben, möglich ist. Zum einen wurde das gewünschte 135 bp lange Produkt (Templat: Chromosom 10) und zum anderen ein 243 bp langes PCR-Produkt (Templat: Chromosom 6) angezeigt. Dessen Entstehung wurde jedoch als unwahrscheinlich eingestuft, das der forward (fw)- und der rv-Primer 4 bzw. 5 Fehlpaarungen gegenüber dem Templat aufwiesen. Ein BLAST der Mutations-Primer ergab keine weiteren zu erwartenden Amplifikations-Produkte.

Ergebnisse und Diskussion

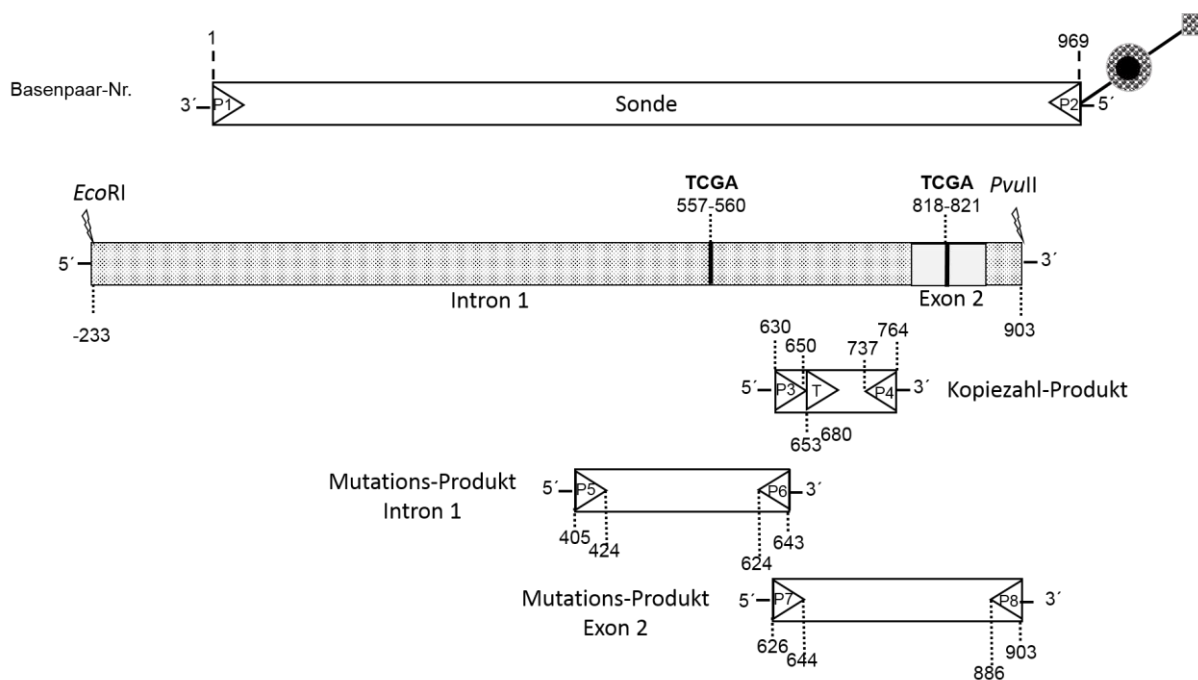


Abbildung 3 Position der Primer zur Erfassung der Kopie- und Mutantenzahl im TP53-Gen von *Rattus norvegicus*. Nach einem Restriktionsverdau der nukleären DNA mit *EcoRI* und *PvuII* wurde im TP53-Gen Fragment Nummer 4 (Basenpaar-Position innerhalb des Gens: 5825-6961) als Zielsequenz ausgewählt. Primer (P) 1 und der biotinylierte (schwarze Kugel) P2 wurden für die Herstellung der 969 bp langen Sonde, verwendet. Somit wurde die Anreicherung der Zielsequenz mit Hilfe von an Magnetkügelchen gekoppelten Streptavidin (Grau gemusterte Kugel mit Viereck) ermöglicht. Für die Amplifizierung der mutierten Kopien wurden P5 und P6 bzw. P7 und P8 beidseits der *TaqI*-Schnittstelle positioniert. Um sowohl mutierte als auch nicht-mutierte Kopien in ihrer Gesamtheit zu quantifizieren, wurden P3, P4 und die *TaqMan*®-Sonde (T) so positioniert, dass keine *TaqI*-Schnittstelle innerhalb des PCR-Produktes lag.

Um zu prüfen ob die *in silico* entwickelten Primerpaare auch experimentell die gewünschten Zielsequenzen amplifizieren, wurden die *Annealing*-Temperaturen sowie die Sequenzen der TP53-Sonde, der Mutations-Produkte sowie des Kopiezahl-Produktes bestimmt. Da im Rahmen des RMCAs für die Bestimmung der Mutationsfrequenz die durch die TP53-Sonde angereicherte Zielsequenz und nicht Gesamt-DNA eingesetzt wird, wurden die Experimente bezüglich der Kopiezahl- und Mutations-Primer mit TP53-Sonde als Templat durchgeführt.

3.2.1.2 TP53-Sonde

Annealing-Temperatur

In einer qualitativen PCR ([Kapitel 6.5.3.1](#)) mit 50 ng genomischer DNA einer F344-Rattenleber, einem Temperaturgradient von 50,0-65,0°C und einer anschließenden agarosegelelektrophoretischen Trennung der PCR-Produkte, war bei jeder Temperatur das gewünschte, 969 bp-lange, Produkt entstanden. Da lediglich im Bereich von 50-59,5°C zusätzlich Nebenprodukte der Größe zwischen 500 und 900 bp entstanden (Anhang

Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 1) und die Spezifität der Primer mit steigender Temperatur zunimmt, wurde für alle weiteren Reaktionen eine *Annealing*-Temperatur von 65°C ausgewählt.

Sequenzierung

In der sich anschließenden Sequenzierung ([Kapitel 6.5.8](#)) der TP53-Sonde wurden 856/969 bp (88,3%) inklusive der beiden *TaqI*-Schnittstellen doppelt und 29/969 bp (3%) einfach sequenziert (Anhang Abbildung 2). Der Vergleich mit der publizierten Originalsequenz (Ensembl-Nummer ENSRNOG00000010756) bestätigte, dass mit den entwickelten Primern P1 und P2 in einer PCR-Reaktion mit Gesamt-DNA der F344-Ratte die gewünschte Sequenz amplifiziert wird, welche zudem keine Abweichungen von der Originalsequenz aufweist.

Uracil-DNA-Glycosylase-Verdau

Nachdem die Sequenz der Sonde durch die Sequenzierung bestätigt war, wurde geprüft ob sich in einer PCR die Sonde auch mit dem für die Anreicherung notwendigen Biotin-markierten Primer und mit dUTP anstelle von dTTP –wichtig für die spätere Entfernung durch die Uracil-DNA-Glycosylase (UDG)- herstellen und ebenso verdauen lässt.

Dazu wurden für die qualitative PCR ([Kapitel 6.5.3.1](#)) zwei Mastermische (MM) hergestellt, wobei einer mit dUTP und der andere mit dTTP innerhalb des dNTP-Mixes versetzt wurde. Dabei diente die Verwendung des dTTP-Mixes zum einen als Positivkontrolle für eine erfolgreiche Amplifikation und zum anderen als Negativkontrolle für den sich anschließenden UDG-Verdau. Nach Durchführung der PCR und dem UDG-Verdau wurde nach anschließender Agarose-Gelelektrophorese sowohl mit dNTPs als auch mit dem dUTP-Mix das zu erwartende Amplifikat von 969 bp detektiert. Zudem wurde eindeutig nachgewiesen, dass die mit dUTP hergestellte Sonde mit UDG verdaubar war (Anhang Abbildung 3). Da somit dieser Genabschnitt für die Hybridisierung innerhalb des RMCAs geeignet war, wurden die *Annealing*-Temperaturen und Sequenzen des Mutations-Produktes im Intron 1 und Exon 2 sowie des Kopiezahl-Produktes ermittelt.

3.2.1.3 Mutations-Produkt im Intron 1 und Exon 2

Annealing-Temperatur

Die Durchführung einer qualitativen PCR ([Kapitel 6.5.3.1](#)) zur Ermittlung der *Annealing*-Temperatur erfolgte mit TP53-Sonde als Templat (50 ng/μl), dem Primerpaar P5/P6 (Intron 1) und einem Gradienten von 50,0-65,0°C.

Nach einer anschließenden Agarose-Gelelektrophorese wurde über den gesamten Temperaturgradient das zu erwartende Amplifikat mit 239 bp detektiert. Zudem wurde auch eine optisch schwächer fluoreszierende Bande bei 969 bp sowie eine ganz stark

Ergebnisse und Diskussion

fluoreszierende Bande knapp über 1000 bp detektiert (Daten nicht gezeigt). Der Blindwert war frei von Produktbanden, sodass eine Verunreinigung mit DNA ausgeschlossen wurde. Ein anschließender BLAST ([Kapitel 6.5.1](#)) des Primerpaares auf die Sequenz der TP53-Sonde ergab keine weiteren zu erwartenden Amplifikations-Produkte. Möglicherweise handelt es sich bei dem 969 bp und dem knapp über 1000 bp langen Produkt um überschüssige Sonde bzw. ein Derivat der Sonde –entstanden durch unspezifische Verlängerung mittels *Taq*-Polymerase. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde anschließend eine Verdünnungsreihe der TP53-Sonde ($4,78 \cdot 10^{10}$ Kopien \pm 50 ng bis $2,45 \cdot 10^4$ Kopien/PCR-Ansatz) pipettiert und eine qualitative PCR ([Kapitel 6.5.3.1](#)) bei 65°C *Annealing*-Temperatur durchgeführt.

Verdünnungsreihe

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Amplifikations-Produkte wurden im Blindwert (Spur L, Abbildung 4) keine Produktbanden detektiert, sodass eine Kontamination der PCR-Reagenzien ausgeschlossen wurde.

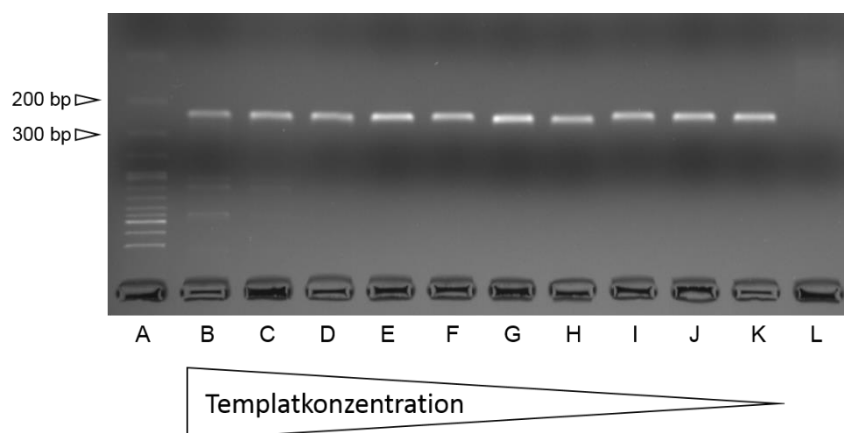


Abbildung 4 PCR-Produkte der Mutations-Primer (P5/P6, Tabelle 19) mit unterschiedlichen Mengen an TP53-Sonde als Templat und 65°C *Annealing*-Temperatur. Das erwartete Amplifikat hat 239 bp. A: 100 bp Leiter, Die Templatkonzentrationen (Kopien/PCR-Ansatz) betragen im Einzelnen: B - $4,78 \cdot 10^{10}$, C - $9,56 \cdot 10^9$, D - $1,91 \cdot 10^9$, E - $3,82 \cdot 10^8$, F - $7,65 \cdot 10^7$, G - $1,53 \cdot 10^7$, H - $3,06 \cdot 10^6$, I - $6,12 \cdot 10^5$, J - $1,22 \cdot 10^5$, K - $2,45 \cdot 10^4$. Die Detektion erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (1,5%; 1 h; 5 V/cm) in 1x TAE-Puffer und Färbung mit SYBR®-Green (1 ng/μl). Spur L: Blindwert.

In allen anderen Reaktionsansätzen war das Mutations-Produkt in der korrekten Länge von 239 bp entstanden. Zudem war ersichtlich, dass bei der Verwendung der gleichen Templatmenge ($4,78 \cdot 10^{10}$ Kopien) wie bei der Bestimmung der *Annealing*-Temperatur ([Kapitel 3.2.1.3. *Annealing*-Temperatur](#)) zwar andere, dennoch aber erneut Nebenprodukte entstanden. Die Verringerung der Templatkonzentration führte zu einer Abnahme der Nebenprodukte, sodass ab einer Templatkonzentration von $1,91 \cdot 10^9$ Kopien nur noch das erwartete Mutations-Produkt entstand (Abbildung 4). Da nachweislich die zu hohe Templatkonzentration für die Entstehung der Nebenprodukte verantwortlich war, wurde die qualitative PCR zur Bestimmung der *Annealing*-Temperatur des Mutationsproduktes im Exon

Ergebnisse und Diskussion

2 des TP53-Gens mit nur noch $3,06 \cdot 10^6$ Kopien/Reaktions-Ansatz durchgeführt. In der anschließenden Agarose-Gelelektrophorese wurden über den kompletten Temperatur-Gradienten nur die erwarteten 278 bp-langen PCR-Produkte detektiert (Anhang Abbildung 4). Da mit steigender Temperatur die Spezifität der Primer zunimmt, wurde die *Annealing*-Temperatur sowohl für das Mutations-Produkt im Intron (P5/P6) als auch im Exon (P7/P8) auf 65°C festgelegt.

Sequenzierung

Um zu testen, ob die mit den Primerpaaren P5/P6 und P7/P8 amplifizierten Sequenzen identisch zu den Literatursequenzen (Ensembl Nr. ENSRNOG00000010756.5) sind und somit die für den RMCA notwendige *TaqI*-Schnittstelle besitzen, wurden die Produktbanden aus dem Experiment zur *Annealing*-Temperatur ([Kapitel 3.2.1.3, Annealing-Temperatur](#)) aus dem Gel vereinigt, aufgereinigt ([Kapitel 6.5.6](#)) und sowohl mit dem fw- als auch dem rv-Primer sequenziert ([Kapitel 6.5.8](#)).

Das Mutationsprodukt im Intron 1 wurde über einen Bereich von 141 bp (59,0%), welcher zudem die *TaqI*-Erkennungssequenz enthielt- doppelt sequenziert. Die Sequenzierung des Antisense-Stranges deckte mit 169 bp/239 bp 70,7% der Gesamtsequenz ab. Am 5'-Ende fehlten 16 bp und am 3'-Ende 33 bp. Der Sense-Strang hingegen wurde zu 75,3% (180 bp/239 bp) sequenziert; es fehlten 45 bp am 5'-Ende und 13 bp am 3'-Ende (Abbildung 5).

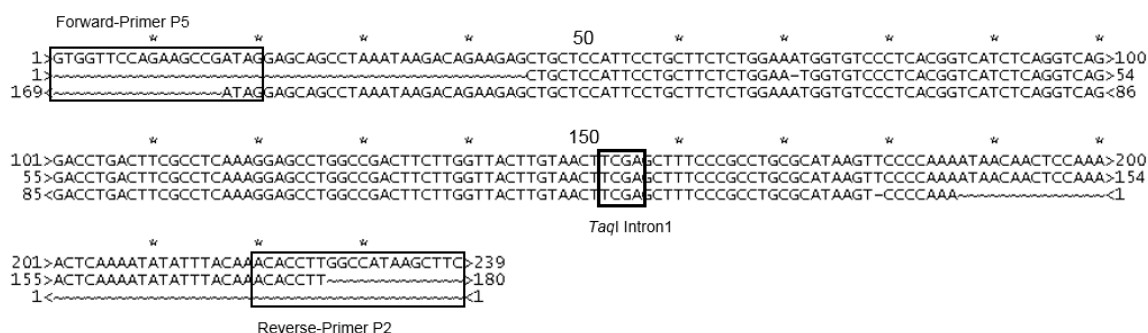


Abbildung 5 Vergleich der Originalsequenz (Ensembl Nr. ENSRNOG00000010756.5, Zeile 1) des Mutations-Produktes im Intron 1 des TP53-Gens mit dem Sequenzierungsergebnis des forward-Primers P5 (Sense-Strang, Zeile 2) und des reverse-Primers P6 (Antisense-Strang, Zeile 3). Mit Kästchen markiert sind die Positionen der Primer sowie die *TaqI*-Schnittstelle. Die Sterne (*) markieren einen Abschnitt von jeweils 10 Basenpaaren.

Das Mutationsprodukt im Exon 2 wurde über einen Bereich von 159 bp (57,2%) doppelt sequenziert. Beim Sense-Strang fehlten 55 bp am 5'- und 14 bp am 3'-Ende. Im Gegensatz dazu fehlten beim Antisense-Strang nur 17 bp am 5'- und 61 bp am 3'-Ende. Mit beiden Primern wurde die Sequenz des kompletten Exons und somit auch die *TaqI*-Erkennungssequenz abgedeckt (Abbildung 6).

Ergebnisse und Diskussion

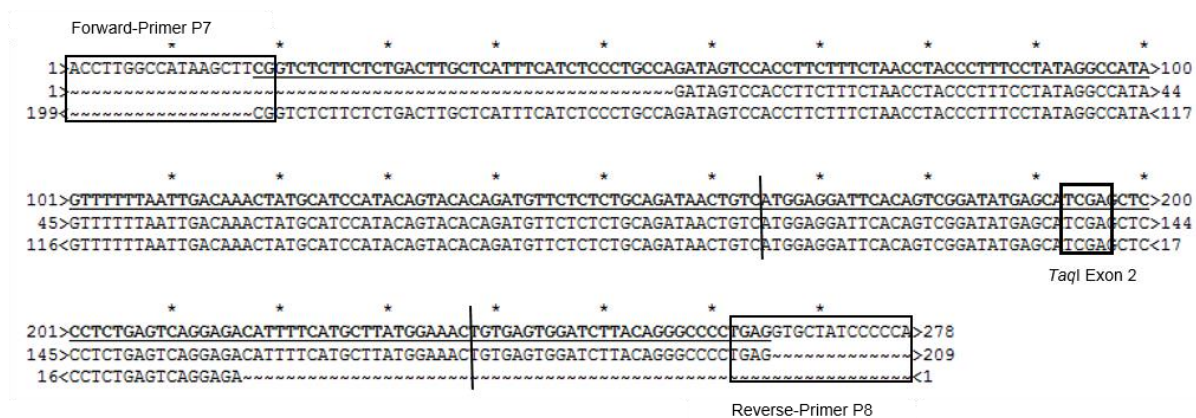


Abbildung 6 Vergleich der Originalsequenz (Ensembl Nr. ENSRNOG00000010756.5, Zeile 1) des Mutations-Produktes im Exon 2 des TP53-Gens mit dem Sequenzierungsergebnis des forward-Primers P7 (Sense-Strang, Zeile 2) und des reverse Primers P8 (Antisense-Strang, Zeile 3). Mit Kästchen markiert sind die Positionen der Primer sowie die TaqI-Schnittstelle. Vertikale Striche: Bereich des Exon 2. Die Sterne (*) markieren einen Abschnitt von jeweils 10 Basenpaaren.

Somit wurde bestätigt, dass die entwickelten Primerpaare für die Amplifizierung der Mutationsprodukte im Intron 1 und Exon 2 mit TP53-Sonde als Templat die gewünschten Zielsequenzen amplifizieren.

3.2.1.4 Kopiezahl-Produkt

Annealing-Temperatur

Auf Grund dessen, dass bereits innerhalb der PCR zum Mutations-Produkt im Intron 1 ([Kapitel 3.2.1.3](#)) der Einsatz von zu viel DNA zu Nebenprodukten führte, wurde zunächst auch mit dem Kopiezahl-Primerpaar P3/P4 eine qualitative PCR ([Kapitel 6.5.3.1](#)) mit TP53-Sonde unterschiedlicher Konzentrationen ($4,78 \cdot 10^{10}$ bis $2,45 \cdot 10^4$ Kopien/Reaktionsansatz) als Templat durchgeführt. Da sich bislang sowohl bei den TP53 Sonden-Primern als auch bei den TP53 Mutations-Primern 65°C Annealing-Temperatur als optimal erwiesen, wurden für dieses Experiment ebenso 65°C als Annealing-Temperatur festgelegt.

Nach agarosegelelektrophoretischer Trennung wurde in jedem Reaktionsansatz das erwartete 135 bp lange Amplifikationsprodukt detektiert. Nebenprodukte entstanden ab einer Templatkonzentration $>3,82 \cdot 10^8$ Kopien TP53-Sonde/PCR-Ansatz (Anhang Abbildung 5). Daher wurden zukünftig $\leq 3,82 \cdot 10^8$ Kopien TP53-Sonde pro Reaktionsansatz verwendet. Für alle nachfolgenden Experimente mit dem Kopiezahl-Primerpaar P3/P4 wurden 65°C als optimale Annealing-Temperatur beibehalten.

Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurden die 135 bp-langen Produktbanden (Anhang Abbildung 5) ausgeschnitten, vereinigt aufgereinigt und die Sequenz nach Sanger bestimmt ([Kapitel 6.5.8](#)).

Ergebnisse und Diskussion

Auf Grund der Kürze des PCR-Produktes wurden nur 36 bp/135 bp in der Mitte der Sequenz doppelt sequenziert. Alle anderen Basen wurden entweder mit dem fw- oder dem rv-Primer einfach sequenziert (Abbildung 7). Somit wurde bestätigt, dass mit dem Primerpaar P3/P4 und TP53-Sonde als Templat die gewünschte Zielsequenz amplifiziert wird.

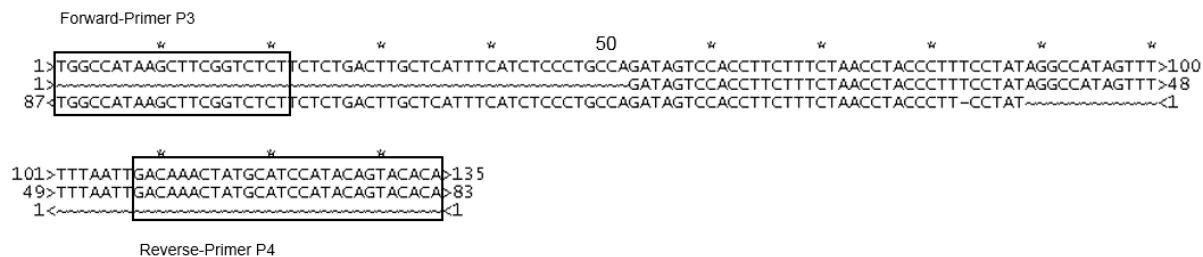


Abbildung 7 Vergleich der Originalsequenz (Ensembl Nr. ENSRNOG00000010756.5, Zeile 1) des Kopiezahl-Produktes im Intron1 des TP53-Gens mit dem Sequenzierungsergebnis des forward-Primers P3 (Sense-Strang, Zeile 2) und des reverse Primers P4 (Antisense-Strang, Zeile 3). Mit Kästchen markiert sind die Positionen der Primer. Die Sterne (*) markieren einen Abschnitt von jeweils 10 Basenpaaren.

3.2.1.5 Verwendung der entwickelten Primerpaare mit DNA verschiedener Rattenstämme

in silico

Um zu prüfen, ob bzw. wo sich in der ausgewählten TP53-Zielsequenz SNPs befinden, wurde die *variant table* der Datenbank *Ensembl Genome Browsers* verwendet (http://www.ensembl.org/Rattus_norvegicus/Gene/Variation_Gene/Table?db=core:g=ENSRNOG00000010756;r=10:55932658-55944086;t=ENSRNOT00000046490#ALL_tablePanel, Stand 15.02.2014). Keiner der angegebenen SNPs war innerhalb der gewählten Zielsequenz für den RMCA lokalisiert. Insofern sollten die entwickelten Primer und damit hergestellten molekularbiologischen Werkzeuge zwischen den Rattenstämmen kompatibel sein.

Experiment

Alle Versuche der bisher beschriebenen Kapitel zum TP53-Gen ([Kapitel 3.2.1.1-In silico Restriktionsverdau](#), [Kapitel 3.2.1.2- TP53-Sonde](#), [Kapitel 3.2.1.3 - Mutations-Produkt im Intron 1 und Exon 2](#), [3.2.1.4 - Kopiezahl-Produkt](#)) wurden mit Gesamt-DNA aus der Leber einer männlichen F344-Ratte bzw. der daraus durch PCR hergestellten Sonde durchgeführt. In qualitativen PCR-Reaktionen wurde nun experimentell geprüft, ob die entwickelten Primerpaare auch für den Sprague-Dawley (SD)-Rattenstamm geeignet sind.

Ergebnisse und Diskussion

Herstellung der TP53-Sonde

In der qualitativen PCR mit Gesamt-DNA -isoliert aus der Leber einer SD-Ratte- und dem Primerpaar P1/P2 (Tabelle 19) wurde nach anschließender Agarose-Gelelektrophorese ausschließlich das erwartete 969 bp-lange Amplifikat detektiert.

Herstellung des Mutations- und Kopiezahl-Produkts

Nach Vereinigung und Gel-Aufreinigung der Produktbanden ([Kapitel 6.5.6](#)) wurde die isolierte DNA zum einen als Templat für eine qualitative PCR mit den Kopiezahl- und Mutations-Primern und zum anderen für die Sequenzierung verwendet. Nach Auftrennung im 3%igen Agarosegel wurde mit jedem Primerpaar das erwartete Produkt ohne gleichzeitige Entstehung eines Nebenproduktes detektiert (Anhang Abbildung 6).

Sequenzierung

Im Rahmen der Sequenzierung der DNA-Sonde wurden 729 bp/969 bp (75,2%) doppelt sequenziert. Alle restlichen Basen wurden entweder durch die Sequenzierung mittels fw- oder rv-Primer bestätigt (Anhang Abbildung 7). Da die Sequenz folglich mit der Originalsequenz übereinstimmt, die für den RMCA wichtige *TaqI*-Erkennungssequenz bestätigt wurde und alle Primerpaare bereits mit der ebenfalls sequenzidentischen DNA der F344-Ratte getestet wurden, wurde von einer Kompatibilität der Primer mit DNA der SD-Ratte ausgegangen.

3.2.2 Die 18S rDNA und das mt-Cytb-Gen auf der mitochondrialen DNA

3.2.2.1 18S rDNA

Die rDNA –bestehend aus 5,8S-, 18S-, 28S-rDNA und *spacer*-Regionen (Srivastava und Schlessinger, 1991)- ist auf den Chromosomen 3,11 und 12 lokalisiert (Tantravahi et al., 1979; Kano et al., 1976). In dem Organismus *Rattus norvegicus* ist sie schätzungsweise in 150-200 Kopien pro haploidem Genom kodiert (Long und Dawid, 1980; Miller et al., 1979) und verspricht somit eine Steigerung der Empfindlichkeit des RMCA bei gleichbleibendem Zell-/Gewebeeinsatz. Die *non transcribed spacer* (NTS) Region (Yavachev et al., 1986) war nicht für den RMCA geeignet, da die Sequenz auch innerhalb einer Spezies nicht konserviert ist (Allard und Honeycutt, 1991). Mit nur 156 Nukleotiden war die Sequenz der 5,8S-rDNA zu kurz um alle notwendigen Primerpaare darin zu positionieren (Anhang Abbildung 8). Die 4786 bp-lange 28S rDNA wies nach dem *in silico*-Restriktionsverdau mit den 5 üblicherweise im RMCA verwendeten Restriktionsenzymen (Bielas und Loeb, 2005) zwei Fragmente mit einer und ein Fragment mit zwei *TaqI*-Schnittstellen auf. Die Fragmente, welche eine *TaqI*-Erkennungssequenz aufwiesen, waren mit 63 bp und 172 bp zu kurz für eine Primerpositionierung. Bei dem dritten, 1215 bp-langen Fragment, lagen die *TaqI*-Schnittstellen nur 75 bp auseinander. Deshalb war hier eine Primerpositionierung nur erschwert möglich (Anhang Abbildung 9). Somit blieb nur noch die 18S rDNA als Zielsequenz übrig.

Die 18S rDNA ist stark konserviert und unterscheidet sich beispielsweise zwischen Mensch und Ratte nur um 0,45% (Gonzalez und Schmickel, 1986). Allerdings waren hier auf Grund von zu nahe beieinander liegender *TaqI*-Erkennungssequenzen oder zu kleinen Fragmentlängen nach einem *in silico* Restriktionsverdau mit den üblicherweise im RMCA verwendeten Restriktionsenzymen (Bielas und Loeb, 2005) die Möglichkeiten für eine Primerpositionierung beschränkt (Abbildung 8). Die 18S rDNA der Ratte ist 1874 bp lang (GenBank: X01117.1; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/X01117>, Stand 28.05.2016) und besitzt 8 *TaqI*-Schnittstellen (Chan et al., 1984).

Ergebnisse und Diskussion

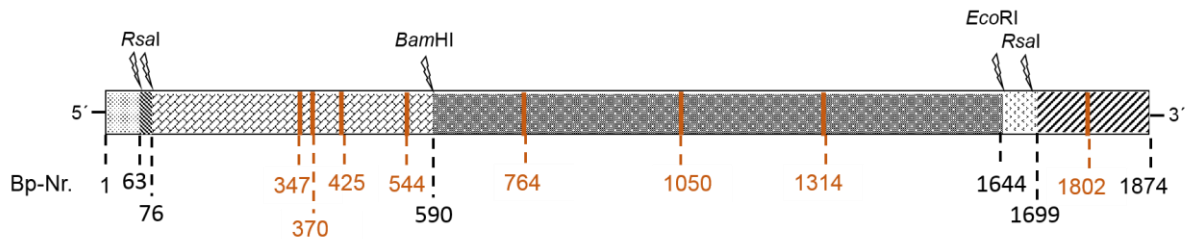


Abbildung 8 Schematische Darstellung der 1874 bp-langen 18S rDNA-Sequenz der Ratte. Unterschiedliche Muster symbolisieren die Sequenz-Fragmente nach dem *in silico* Restriktionsverdau mit den Restriktionsenzymen *RsaI* (GT/AC), *BamHI* (G/GATCC), und *EcoRI* (G/AATTC). Orangene Linien geben die Positionen der *TaqI*-Schnittstellen (T/CGA) an. Alle angegebenen Basenpaar (Bp)-Nummern geben das Basenpaar vor dem Schnitt (/) innerhalb der Erkennungssequenz an (z.B. erste T/CGA-Schnittstelle; das T wäre die Position 347).

Ohne ein Ausweichen auf andere Restriktionsenzyme war lediglich Sequenzabschnitt Nummer 4 auf Grund seiner Länge von 1054 bp und dem gleichzeitigen Vorhandensein von *TaqI*-Schnittstellen für die Positionierung der Primer geeignet (Abbildung 8, Anhang Tabelle 2). Deshalb wurden im Anschluss für dieses Verdau-Fragment alle für den RMCA notwendigen Primerpaare entwickelt (Tabelle 20, Abbildung 9, [Kapitel 6.5.1](#)).

Ergebnisse und Diskussion

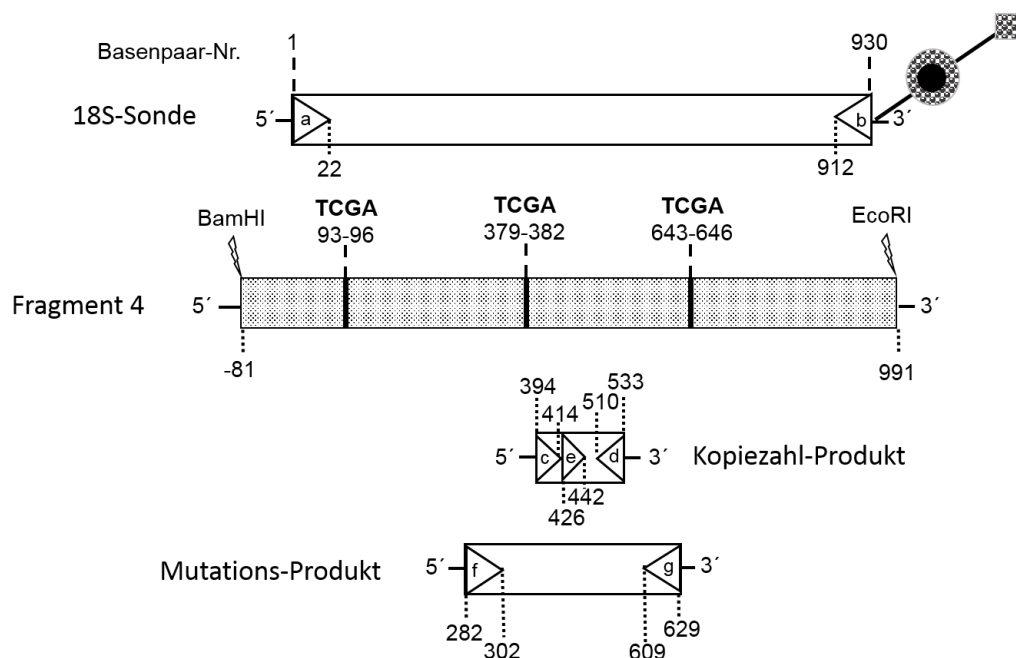


Abbildung 9 Position der Primer zur Erfassung der Kopie- und Mutantenzahl in der 18S rDNA von *Rattus norvegicus*. Nach einem Restriktionsverdau der nukleären DNA mit *EcoRI* und *PvuII* wurde im für die 18S rRNA kodierenden Gen Fragment 4 als Zielsequenz ausgewählt. Primer a und der biotinylierte (schwarze Kugel) Primer b wurden für die Herstellung der 930 bp-langen Sonde, verwendet. Für die Amplifizierung der mutierten Kopien wurden Primer f und g beidseits der *TaqI*-Schnittstelle positioniert. Um sowohl mutierte als auch nicht-mutierte Kopien in ihrer Gesamtheit zu quantifizieren, wurden Primer c, d und die *TaqMan*®-Sonde (e) so positioniert, dass keine *TaqI*-Schnittstelle innerhalb des PCR-Produktes lag.

3.2.2.2 Mt-Cytb auf der mitochondrialen DNA

Die komplette mtDNA der Spezies *Rattus norvegicus* ist zirkulär und umfasst 16300 bp (GenBank: X14848.1, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/X14848.1>, Stand 08.05.2016). Die Sequenz ist in 37 kodierende Bereiche sowie den D-Loop (Replikationsursprung) eingeteilt. Innerhalb der gesamten Sequenz befinden sich 30 *TaqI*-Schnittstellen (Abbildung 10).

Da die Sequenz der mtDNA mit 16300 bp im Vergleich zur nDNA mit 2,83 Gb Basen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/237618/>, Stand 09.02.2016) nur einen Bruchteil ausmacht, wurde für die Durchführung des RMCA kein Restriktions-Verdau zum Zerkleinern der DNA vor dem eigentlichen *TaqI*-Verdau durchgeführt. Somit wurden zunächst alle auf der mtDNA kodierten Gene auf ihre Eignung als Zielsequenz für den RMCA geprüft.

Alle Gene, welche für die tRNA kodieren waren mit Gesamtlängen zwischen 60 bp und 75 bp zu kurz für die Entwicklung der für den RMCA notwendigen molekularen Werkzeuge (Kapitel 6.5.1). Die ATPase subunit 8 (204 bp), die NADH subunit 4L (297 bp) sowie die NADH subunit 6 (519 bp) hatten zwar schon die notwendige Länge von mindestens 150 bp, wiesen jedoch keine *TaqI*-Schnittstelle auf. Somit blieben insgesamt 13 Gene übrig, die sowohl der Länge

Ergebnisse und Diskussion

nach als auch dem Vorhandensein einer *TaqI*-Schnittstelle geeignet waren und hinsichtlich einer möglichen Primerpositionierung überprüft wurden (Abbildung 10, Anhang Tabelle 3).

Die NADH subunit 1 sowie die NADH subunit 5 erwiesen sich als ungeeignet, da die fünf bzw. zwei *TaqI*-Schnittstellen innerhalb der Sequenzen kurz aufeinander folgten und somit eine Positionierung der Primer zur Herstellung des Mutations-Produktes nicht möglich war. Die D-Loop-Region wurde ausgeschlossen, da der RMCA zunächst für einen kodierenden Bereich innerhalb der mtDNA entwickelt werden sollte. Ebenso wurden die für die 12S- und 16S-rRNA kodierenden Gene ausgeschlossen, da bereits die 18S rDNA als ein Zielgen festgelegt war ([Kapitel 3.2.2.1](#)).

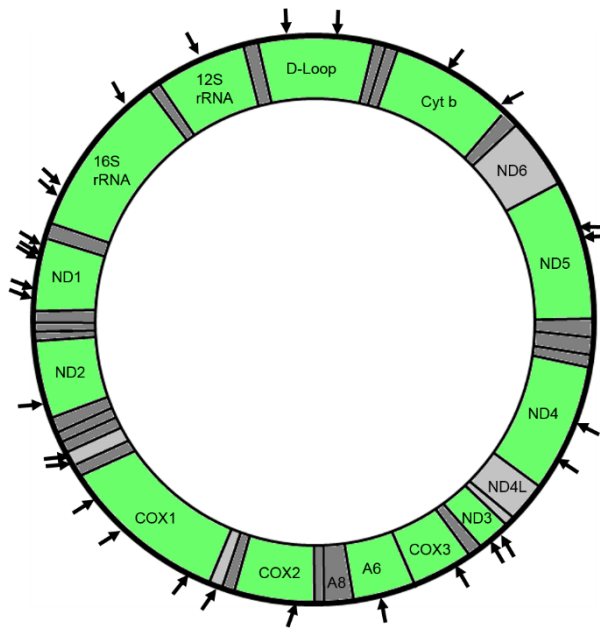


Abbildung 10 Eignung der Gene innerhalb der 16300 bp langen, zirkulären, doppelsträngigen mtDNA von *Rattus norvegicus* für die Entwicklung der für den RMCA notwendigen Kopiezahl- und Mutations-Primer. Notwendige Voraussetzungen sind zum einen eine Mindestlänge von 150 bp sowie das Vorhandensein mindestens einer *TaqI*-Schnittstelle (Pfeil). Farblich markiert ist, ob beide Voraussetzungen gegeben sind (grün), nur eine (hellgrau) oder keine (dunkelgrau).

Von den übrigen 8 Genen erwies sich das 1143 bp lange mt-Cytb-Gen als geeignet ([Kapitel 6.5.1](#)) für die Positionierung aller Primerpaare (Abbildung 11).

Ergebnisse und Diskussion

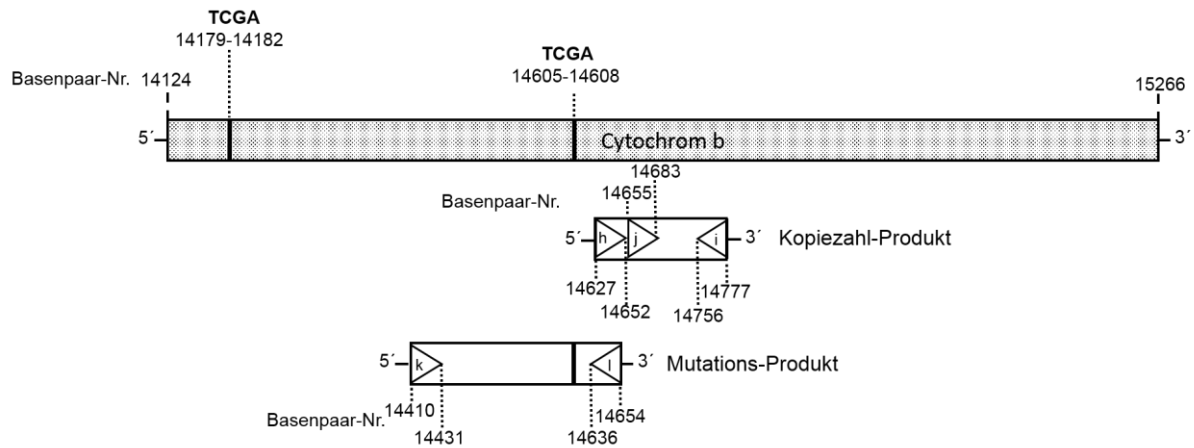


Abbildung 11 Position der Primer zur Erfassung der Kopie- und Mutantenzahl im mt-Cytb-Gen von *Rattus norvegicus*. Für die Amplifizierung der mutierten Kopien wurden Primer k und l beidseits der TaqI-Schnittstelle positioniert. Um sowohl mutierte als auch nicht-mutierte Kopien in ihrer Gesamtheit zu quantifizieren, wurden Primer h, i und die TaqMan®-Sonde (j) so positioniert, dass keine TaqI-Schnittstelle innerhalb des PCR-Produktes lag.

3.2.3 Übersicht der molekularbiologischen Werkzeuge für den RMCA

Im Anschluss wurden sowohl für die Zielsequenz in der 18S rDNA als auch in dem mt-Cytb-Gen die bislang *in silico* entwickelten molekularbiologischen Werkzeuge hergestellt, die PCR-Bedingungen optimiert und die erhaltene Sequenz durch Literaturvergleich verifiziert. Danach wurde *in silico* und experimentell geprüft, ob die entwickelten Primerpaare auch einen anderen Rattenstamm geeignet sind (zusammengefasst in Tabelle 1). Dabei war das Vorgehen identisch zu dem, welches in den Kapiteln zum TP53-Gen: [3.2.1.2 TP53-Sonde](#) (gilt für 18S rDNA), [3.2.1.3 Mutations-Produkt](#), [Kapitel 3.2.1.4 Kopiezahl-Produkt](#) sowie in den [Kapiteln 3.2.1.5](#) und [3.2.1.6 Kompatibilität der Primerpaare](#) (gilt für 18S rDNA und mt-Cytb-Gen) inklusive dem Anhang ([Kapitel 8.1.1](#)) beschrieben wurde.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 1 Entwicklung der molekularbiologischen Werkzeuge in den Zielsequenzen des TP53-Gens, der 18S rDNA sowie dem mt-Cytb-Gen. Die Tabelle fasst je Zielsequenz Informationen zur Sequenz (Seq), dem *in silico*-Restriktionsverdau (RV), den molekularbiologischen Werkzeugen (DNA-Sonde, Mutations- und Kopiezahl-Produkt) sowie der Übertragbarkeit auf andere Rattenstämme (Kompatibilität) zusammen. Sequenzierungen wurden nach Sanger sowohl mit dem *forward* (F)- als auch dem *reverse* (R)-Primer durchgeführt. Die Literatursequenzen wurden bestätigt. Innerhalb der 18S rDNA wurde an Basenpaarposition 319 eine Transition von Adenin zu Guanin festgestellt. In der Tabelle angegebene Sequenzierungsergebnisse weisen auf, wie viel % der sequenzierten Basenabfolge doppelt verifiziert wurde. Die Nummern in der Spalte „Info“ verweisen auf Zusatzinformationen am Ende der Tabelle. $\Sigma TaqI$, Gesamtanzahl *TaqI*-Erkennungssequenzen; T, *TaqMan*®-Sonde; SNP, *single nucleotide polymorphism*. n.a., nicht angewendet/ entwickelt. I1, Intron1; E2, Exon 2.

	Zielsequenz	TP53	18S rDNA	mtDNA/mt-Cytb	Info
Seq	Sequenz	ENSRNOG00000010756	GenBank: X01117.1	GenBank: X14848.1 (mtDNA)	1
	$\Sigma TaqI$ (n)	9	8	30	
In silico RV	Restriktionsenzyme	<i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RV, <i>Pvu</i> II, <i>Eco</i> RI	<i>Rsa</i> I, <i>Eco</i> RI, <i>Bam</i> HI	n.a.	
	Gesamtanzahl Verdau-Fragmente	8	6	mt-Cytb -1143 bp	
	Nummer Zielfragment	4	4	-	
	<i>TaqI</i> (n) in Zielfragment	2	3	2	
DNA-Sonde	Primer (5´-3´)	F gctggctgtgactgaatgct	aaagctcgtagttggatcttgg	n.a.	2
		R gatcagaggcacccaatagc	aatgggggttcaacggggtta;	n.a.	
	Länge	969 bp	930 bp	n.a.	
	Annealing-Temperatur	65°C	63,6°C	n.a.	3
	Sequenzierung	88,3% inkl. <i>TaqI</i>	43,3% inkl. <i>TaqI</i>	n.a.	4
	Position <i>TaqI</i>	557-560; 818-821	93-96; 379-382; 643-646	56-59; 482-485	

Ergebnisse und Diskussion

	Zielsequenz	TP53	18S rDNA	mtDNA/mt-Cytb	Info
Mutations-Produkt (MP)	Primer (5´-3´)	F I1: gtggtccagaagccgatag	gccgctagagggtgaattctt	tccatgtgggacgaggactata	2
		R I1: gaagcttatggccaaggtgt	Acacggacaggattgacagat	gcgtgttagggtgcttg	
		F E2: acctggccataagcttcg			
		R E2: tggggatagcacctcag			
	Länge	I1: 239 bp E2: 278 bp	348 bp	245 bp	
	Annealing-Temperatur	65°C	62,2°C	65°C	5
Sequenzierung	I1: 59,0% inkl. <i>TaqI</i> E2: 57,2% inkl. <i>TaqI</i>	73,6% inkl. <i>TaqI</i>	60,0% inkl. <i>TaqI</i>	6	
Kopiezahl-Produkt (KP)	Primer (5´-3´)	F tggccataagcttcggtctct	taccgtcgtagttccgacat	ctcagtagacaagcaaccctaacac	2
		R tgtgtactgtatggatgcatagttgtc	ttccttaagttcagcttgcaa	gattttgtctgcgtcggagtt	
		T tctgacttgctcattcatctccctgcc	aacgatgccgactggcgatgc	ttcttcgattccacttcatcctccca	
	Länge	135 bp	140 bp	151 bp	
	Annealing-Temperatur	65°C	65°C	65°C	7
	Sequenzierung	26,7%	20,7%	42,4%	8

Ergebnisse und Diskussion

	Zielsequenz	TP53	18S rDNA	mtDNA/mt-Cytb	Info
Kompatibilität	SNPs in Sequenz der molekulargenetischen Werkzeuge (Literatur)	nein	Position 1127: -T #Primer- oder TaqI-Sequenz; F344/NRrc (KNAW)	Position 515: Transition Guanin zu Adenin (R-Primer MP und F-Primer KP); Betrifft Stamm: LCR/1Mco (UMich), LCR/1Mco (UMich)	9
	identische Amplifikate (Praxis)	F344/NcrHsd, SD	F344/NcrHsd, SD	F344/NcrHsd, SD, ACI	10

Ergebnisse und Diskussion

1) Links zu den kompletten Sequenzen:

TP53:

http://mar2015.archive.ensembl.org/Rattus_norvegicus/Gene/Sequence?db=core;g=ENSRNOG0000010756;r=10:55932658-55944086;t=ENSRNOT00000046490, Stand 16.11.2016.

18S rDNA:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/X01117>, Stand 28.05.2016.

mt-Cytb:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/237618/>, Stand 09.02.2016.

2) Detailinformationen zu den Primern in Tabelle 19, Tabelle 20 und Tabelle 21. Ergebnisse zum Primer-BLAST in Anhang Tabelle 4 und Anhang Tabelle 5.

3) Detailinformationen zur *Annealing*-Temperatur der DNA-Sonde in Anhang Abbildung 1 (TP53), Anhang Abbildung 9 und Anhang Abbildung 10 (18S rDNA).

4) Detailinformationen zur Sequenzierung der DNA-Sonde in Anhang Abbildung 2 (TP53) und Anhang Abbildung 11 (18S rDNA).

5) Detailinformationen zur *Annealing*-Temperatur des Mutations-Produktes in Anhang Abbildung 4 (TP53), Anhang Abbildung 12 (18S rDNA) und Anhang Abbildung 18 (mt-Cytb).

6) Detailinformationen zur Sequenzierung des Mutations-Produktes in Abbildung 5 (TP53 Intron 1), Abbildung 6 (TP53 Exon 2), Anhang Abbildung 13 (18S rDNA) und Anhang Abbildung 19 (mt-Cytb).

7) Detailinformationen zur *Annealing*-Temperatur des Kopiezahls-Produktes in Anhang Abbildung 5 (TP53), Anhang Abbildung 14 (18S rDNA) und Anhang Abbildung 20 (mt-Cytb).

8) Detailinformationen zur Sequenzierung des Kopiezahls-Produktes in Abbildung 7 (TP53), Anhang Abbildung 15 (18S rDNA) und Anhang Abbildung 21 (mt-Cytb).

9) Links zu Datenbanken zur SNP-Recherche:

TP53:

http://www.ensembl.org/Rattus_norvegicus/Gene/Variation_Gene/Table?db=core;g=ENSRNOG0000010756;r=10:55932658-55944086;t=ENSRNOT00000046490#ALL_tablePanel, Stand 15.02.2014

18S rDNA:

<http://rgd.mcw.edu/rgdweb/front/variants.html?start=46820989&stop=46822860&chr=14&geneStart=&geneStop=&geneList=Rn18s&mapKey=70&con=&depthLowBound=8&depthHighBound=&excludePossibleError=true&sample1=736&sample2=712&sample3=764&sample4=737&sample5=739&sample6=740&sample7=757&sample8=741&sample9=713&sample10=742&sample11=714&sample12=715&sample13=743&sample14=763&sample15=744&sample16=745&sample17=746&sample18=747&sample19=721&sample20=722&sample21=723&sample22=748&sample23=724&sample24=749&sample25=725&sample26=750&sample27=716&sample28=751&sample29=717&sample30=762&sample31=752&sample32=753&sample33=754&sample34=755&sample35=756&sample36=726&sample37=718&sample38=727&sample39=728&sample40=719&sample41=729&sample42=758&sample43=759&sample44=760&sample45=761&sample46=720>; Stand 05.12.2016.

mt-Cytb:

<http://rgd.mcw.edu/rgdweb/front/variants.html?start=14136&stop=15278&chr=MT&geneStart=&geneStop=&geneList=Mt-cyb&mapKey=60&con=&depthLowBound=8&depthHighBound=&excludePossibleError=true&sample1=603&sample2=500&sample3=510&sample4=604&sample5=601&sample6=521&sample7=602&sample8=512&sample9=511&sample10=513&sample11=522&sample12=605&sample13=514&sample14=606&sample15=501&sample16=507&sample17=607&sample18=502&sample19=523&sample20=608&sample21=629&sample22=631&sample23=630&sample24=632&sample25=609&sample26=515&sample27=610&sample28=611&sample29=612&sample30=613&sample31=614&sample32=516&sample33=615&sample34=616&sample35=517&sample36=617&sample37=618&sample38=620&sample39=619&sample40=520&sample41=621&sample42=508&sample43=622&sample44=503&sample45=623&sample46=624&sample47=504&sample48=509&sample49=625&sample50=627&sample51=518&sample52=626&sample53=628&sample54=519>, Stand 2016_12_06.

10) Detailinformationen zu PCR- sowie Sequenzierungsergebnissen von der 18S rDNA (Anhang Abbildung 16 und Anhang Abbildung 17) sowie dem mt-Cytb-Gen (Anhang Abbildung 22, Anhang Abbildung 23, Anhang Abbildung 24, Anhang Abbildung 25, Anhang Abbildung 26).

Nachdem die Entwicklung der molekularbiologischen Werkzeuge abgeschlossen war, wurde als nächstes eine Methode zur Erfassung der Gesamt-Kopiezahl entwickelt.

3.3 Kopiezahlquantifizierung mittels *TaqMan*[®]-basierter Realtime-PCR

Für die Bestimmung der Mutationsfrequenz muss die Anzahl der mutierten Kopien auf die Gesamtanzahl an untersuchten Kopien bezogen werden. Daher handelte es sich bei der Quantifizierung der Gesamtkopiezahl um einen essentiellen Bestandteil der Arbeit.

In den von Bielas und Loeb (2005) als auch von Vermulst et al. (2007, 2008) beschriebenen RMCAs wurde für die Detektion der DNA-Kopien eine SYBR[®]-Green- basierte Realtime (RT)-PCR verwendet. Ein Nachteil von SYBR[®]-Green ist jedoch, dass sowohl die spezifischen als auch die unspezifischen Amplifikate wie beispielsweise Primer-Dimere detektiert werden. Um beide PCR-Produkte auseinander zu halten ist die Aufzeichnung einer Schmelzkurve im Anschluss an die RT-PCR notwendig. Im Rahmen der Schmelzkurvenauswertung ist das Vorhandensein von SYBR[®]-Green im Reaktionsansatz jedoch nachteilig, da es die Schmelztemperatur des Amplifikates beeinflusst und sowohl als bedingt stabil als auch unter bestimmten Reaktionsbedingungen inhibierend beschrieben wird (Monis et al., 2005). So können spezifische und unspezifische Amplifikationsprodukte möglicherweise nicht separiert werden und eine Überschätzung der Kopiezahl die Folge sein.

Diese methodischen Defizite weist die TM-Sonden basierte RT-PCR nicht auf. Bei der TM-Sonde handelt es sich um ein zur Zielsequenz komplementäres Oligonukleotid, an welches ein Reporter am 5'- und ein Quencher am 3'-Ende gekoppelt werden. Während der Elongation wird die TM-Sonde durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase hydrolytisch gespalten und ein Fluoreszenzsignal, welches zuvor durch die bestehende Nähe von Reporter und Quencher unterdrückt wurde, freigesetzt (Arya et al., 2005). Durch die Verwendung der TM-Sonde werden einzig die spezifischen Amplifikate detektiert, die Aufzeichnung der Schmelzkurven unnötig und schlussfolgernd eine Überschätzung der Kopiezahl vermieden.

Auf Grund dessen wurde in dieser Arbeit eine RT-PCR Methode zur Quantifizierung der Gesamtkopiezahl entwickelt, welche TM-Sonden-basiert ist.

Um innerhalb des RMCAs die Quantifizierung der Gesamtkopiezahl bei mehreren Proben gleichzeitig durchzuführen, sollte diese mittels einer externen Kalibrierung erfolgen. Da für die Erstellung der externen Kalibrierung eine quantifizierte Referenz (Δ RT-Standard) benötigt wurde, sollte zunächst für die Zielsequenzen im TP53-Gen, der 18S rDNA und dem mt-Cytb-Gen jeweils ein RT-Standard mittels PCR hergestellt und dieser mit externer Kalibrierung fluorimetrisch am Plattenfluorimeter quantifiziert ([Kapitel 3.3.1](#)) werden. Mit Hilfe der RT-Standards sollte im nächsten Schritt die Entwicklung der TM-Sonden-basierten RT-PCR-Methoden zur Gesamtkopiezahlquantifizierung erfolgen. Dazu sollte zunächst je Zielsequenz die Optimierung des Temperaturprogrammes und der TM-Sondenkonzentration ([Kapitel 3.3.2](#))

Ergebnisse und Diskussion

durchgeführt und anschließend die Festlegung eines Kalibrierbereiches ([Kapitel 3.3.4](#)) erfolgen. Damit innerhalb des RMCA eine Interpretation der kalkulierten Mutationsfrequenzen erfolgen konnte, sollte anschließend überprüft werden wie spezifisch die Methoden mt- bzw. nDNA detektieren ([Kapitel 3.3.5](#)).

3.3.1 Herstellung der Standards für die Quantifizierung der Zielsequenzen

Die Kopiezahlquantifizierung findet innerhalb des RMCA bei der nDNA nach dem Restriktionsverdau und der Anreicherung mit Hilfe der biotinylierten DNA-Sonde und bei der mtDNA nach dem *TaqI*-Verdau statt.

Um eine genaue Quantifizierung zu erlangen, sollte der RT-Standard für die Kopiezahlquantifizierung innerhalb der PCR mit einer identischen Effizienz wie die Zielsequenz amplifiziert werden. Dies ist möglich, wenn die Sequenzlänge und die Basenpaarzusammensetzung (möglichst auch die Sequenz an sich) der zu quantifizierenden Zielsequenz entsprechen.

Sowohl beim TP53 als auch bei der 18S rDNA entsprachen die jeweiligen DNA-Sonden in Länge und Sequenz nahezu den kompletten zu quantifizierenden Zielsequenzen (TP53: 76,3%, [Kapitel 3.2.1.1](#); 18S rDNA: 86,8%, [Kapitel 3.2.2.1](#)). Da zudem die Kopiezahl-Primer innerhalb der sequenzidentischen Bereiche positioniert und somit die zu amplifizierenden Sequenzen identisch waren, sollten für das TP53-Gen sowie der 18S rDNA die jeweiligen DNA-Sonden als RT-Standard dienen. Da beim mt-Cytb innerhalb des RMCA ohne vorherige Anreicherung mittels DNA-Sonde direkt nach dem *TaqI*-Verdau quantifiziert wird, wurde auf Grund der Primer-Position (neben einer *TaqI*-Schnittstelle, [Kapitel 3.2.3](#)) das Kopiezahl-Produkt ([Kapitel 3.2.1.4](#), [Kapitel 3.2.2](#), [Kapitel 3.2.3](#)) als RT-Standard festgelegt. Die mit den entwickelten Kopiezahl-Primern zu amplifizierenden Sequenzen waren somit zwischen RT-Standard und der zu quantifizierenden Zielsequenz identisch.

Vorüberlegungen zur angestrebten Standard-Kopiezahl bzw. -Menge und deren Herstellung

Die RT-Standards sollten mittels PCR hergestellt, aufgereinigt und fluorimetrisch durch eine externe SYBR®-Green Kalibrierung quantifiziert ([Kapitel 6.5.2.3](#)) werden.

Dabei sollte der RT-Standard

- a) für möglichst alle zukünftigen Reaktionen ausreichen (Gewährleistung der Vergleichbarkeit der Mutationsfrequenzen zwischen den Proben) und
- b) so konzentriert sein, dass eine Kopiezahl von $1,02 \cdot 10^6$ Kopien/ μl^2 verlässlich quantifizierbar ist.

² Diese Konzentration ist notwendig für die Bestimmung der in der Literatur beschriebenen Spontanmutationsfrequenzen der nDNA: Introns im Bereich von $2 \cdot 3 \cdot 10^{-8}$ Basenpaare (Zheng et al.,

Ergebnisse und Diskussion

Herleitung der $1,02 \cdot 10^6$ Kopien/ μ l:

Bei gleichbleibender Anzahl an mutierten Kopien –beispielsweise 8- müssen mindestens $1 \cdot 10^9$ Kopien in der Mutations-PCR eingesetzt werden. Verteilt auf 80 Reaktionen entspricht dies einer Kopiezahl von $12,5 \cdot 10^6$ /well. Da in dieser Arbeit ein PCR-Ansatz von 20 μ l angestrebt wurde, standen maximal 12,2 μ l für Templat zur Verfügung ($\hat{=}$ einer Mindestkonzentration von $1,02 \cdot 10^6$ Kopien/ μ l).

Für die Erfüllung der unter a) und b) genannten Anforderungen sollte der RT-Standard zur Erstellung der Kalibriergeraden eine Mindestkonzentration von ca. $1 \cdot 10^7$ Kopien/ μ l aufweisen. Eine Verdünnung der im RMCA zu quantifizierenden Probe wurde dadurch unnötig (gleichzeitige Minimierung von Quantifizierungsfehlern). Umgerechnet in ng/ml wurde für den TP53- und den 18S rDNA-RT-Standard folglich die Herstellung einer DNA-Lösung von 11 ng/ml ($\hat{=}$ $1,05 \cdot 10^7$ Kopien TP53-Sonde / μ l und $1,1 \cdot 10^7$ Kopien 18S-Sonde/ μ l) und für das Kopiezahl-Produkt des mt-Cytb-Gens von 2,0 ng/ml ($\hat{=}$ $1,23 \cdot 10^7$ Kopien/ μ l) mittels PCR angestrebt.

Herstellung und fluorimetrische Quantifizierung der RT-Standards

Nach der praktischen Herstellung der RT-Standards mittels PCR wurden diese fluorimetrisch quantifiziert ([Kapitel 6.5.2.3](#)).

Auf Grund arbeitskreisinterner historischer Daten (Daten nicht gezeigt) wurde der als varianzenhomogen und linear bekannte Kalibrierbereich von 0,08-0,48 ng DNA/200 μ l ($\hat{=}$ Volumen im well) für das das mt-Cytb-Gen gewählt. Da jedoch der höchste Kalibrierpunkt dieses Bereiches theoretisch nur $1,96 \cdot 10^6$ (TP53) bzw. $2,39 \cdot 10^6$ (18S rDNA) Kopien/ μ l im well entsprachen, war der Kalibrierbereich für das TP53-Gen und die 18S rDNA nicht ausreichend für die Quantifizierung einer ca. $1 \cdot 10^7$ Kopien/ μ l konzentrierten RT-Standard-Lösung. Da es sich bei der Quantifizierung der zwei RT-Standardlösungen (TP53 und 18S rDNA) um zwei Proben mit der gleichen angestrebten Konzentration (11 ng/ml) handelte, wurde ein mit 0,88-1,36 ng DNA/200 μ l im well ($\hat{=}$ Kopien Tabelle 2) eng gefasster (Faktor 1,5) Kalibrierbereich gewählt (Abbildung 12). Da auf Grund der Rentabilität und Routinefähigkeit des RMCA die Kopiezahlquantifizierung innerhalb des RMCA je Probe zukünftig nur einmal abhängig (3 wells) durchgeführt werden soll, wurden bereits bei diesem Experiment die einzelnen

2007); Exons von geschätzt $2-3 \cdot 10^9$ Basenpaare (basierend auf phänotypselektiven Tests). Die Spontanmutationsfrequenz der mtDNA wird in der Literatur -abhängig vom Alter der Tiere- zwischen $6-100 \cdot 10^{-7}$ Basenpaare (Vermulst et al., 2007) angegeben.

Ergebnisse und Diskussion

Kalibrierpunkte sowie die zu quantifizierenden RT-Standards 3-mal abhängig pipettiert. Die interne Wiederfindung bestand aus einer 1:2 (v:v) -Mischung Kalibrierpunkt und Standard.

Die Kalibriergeraden (Abbildung 12) waren varianzenhomogen (F-Test, $p < 0,05$) und linear (Linearitätstest, $p < 0,01$).

Anwendung der Kalibriergeraden zur Quantifizierung der RT-Standards

Die Konzentrationen der Standards betragen zwischen $12,0 \cdot 10^6 \pm 0,09 \cdot 10^6$ Kopien/ μ l und $12,7 \cdot 10^6 \pm 0,38 \cdot 10^6$ Kopien/ μ l (Tabelle 2). Somit wurde bei allen Standards die angestrebte Mindestkonzentration von $10 \cdot 10^6$ Kopien/ μ l erreicht. Die relativen Standardabweichungen waren $< 1\%$. Bei dieser Methode wurden relative Standardabweichungen, welche aus einer abhängigen Bestimmung (3 wells) resultieren von $< 5,3\%$ erwartet und akzeptiert (90te Perzentile, $n=49$, Daten nicht gezeigt). Somit wurde die Quantifizierung als präzise eingestuft.

Die internen Wiederfindungen von $77,07\% \pm 1,93\%$ (TP53-RT-Standard) und $81,08\% \pm 2,48\%$ (18S rDNA-RT-Standard) lassen die Annahme zu, dass der DNA-Gehalt beider Standards unterschätzt wird, wohingegen die interne Wiederfindung von $105,23\% \pm 5,04\%$ beim mt-Cytb-RT-Standard eine richtige Einschätzung des DNA-Gehaltes vermuten lässt. Die relative Abweichung der internen Wiederfindung von 23% (TP53) und 19% (18S rDNA) bedeuten im Hinblick auf die im RMCA zu bestimmende Mutationsfrequenz beispielsweise die Bestimmung einer MF/bp von $1,63 \cdot 10^{-6}$ anstelle einer MF/bp von $2 \cdot 10^{-6}$ (23%). Somit müssen Unterschiede in den Mutationsfrequenzen $> 23\%$ sein um diese zu detektieren.

Um einen möglichen Kopiezahlverlust durch Hydrolyse oder eine eventuell vorhandene DNase-Kontamination zu vermeiden, wurden die Standards aliquotiert (Tabelle 2) und bei -20°C aufbewahrt. Um sie zudem keinen Einfrier-/Auftauzyklen zu unterziehen (Vermeidung eines Kopiezahlverlustes durch Scherkräfte), wurde innerhalb des RMCA für die Erstellung einer Kalibriergeraden zur Kopiezahlquantifizierung ein Aliquot verwendet ([Kapitel 6.5.3.2.1](#)) und ein eventuell verbleibender Rest verworfen.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 2 Übersicht zur SYBR®-Green Quantifizierung der Realtime-Standards des TP53-Gens (TP53-Sonde), der 18S rDNA (18S rDNA-Sonde) sowie des mt-Cytb-Gens (mt-Cytb-Kopiezahl-Produkt). Angegeben sind die angestrebten Standard-Konzentrationen, der Kalibrierbereich (Kalbsthymus-DNA als Standard), sowie die Quantifizierungsergebnisse. Die interne Wiederfindung (1:2 (v:v) –Mischung aus Kalibrierpunkt und Standard) ist angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung (TP53, 18S rDNA) bzw. \pm Range/2 (mt-Cytb). Die Angabe der Konzentration/*well* ist auf die Methode ([Kapitel 6.5.2.3](#)) zurück zu führen. Innerhalb der Kopiezahlquantifizierung ([Kapitel 6.5.3.2.1](#)) sollte ein Aliquot ausreichend für die Herstellung des ersten Kalibrierpunktes sowie deren Verwendung zur Herstellung des 2. Kalibrierpunktes einer dreifach abhängig pipettierten Kalibriergeraden (3 *wells*) sein. Σ Kopien, Gesamtkopiezahl an hergestelltem Standard berechnet aus Konzentration und Menge des hergestellten Standards.

	TP53	18S rDNA	mt-Cytb
Angestrebte Konzentration			
ng/200 μ l im <i>well</i>	1,1	1,1	0,2
Kopien ($\cdot 10^6$)/ μ l im <i>well</i>	5,0	5,0	5,0
Kalibrierbereich:			
ng/200 μ l im <i>well</i>	0,88-1,36	0,88-1,36	0,08- 0,48
Kopien ($\cdot 10^6$)/ μ l im <i>well</i>	4,21-6,50	4,38-6,77	2,45-14,70
Standard (detektiert):			
ng/200 μ l im <i>well</i>	1,27 \pm 0,01	1,24 \pm 0,01	0,21 \pm 0,01
Kopien ($\cdot 10^6$)/ μ l im <i>well</i>	6,05 \pm 0,04	6,0 \pm 0,05	6,4 \pm 0,19
Standard (berechnet):			
Kopien ($\cdot 10^6$)/ μ l	12,1 \pm 0,07	12,0 \pm 0,09	12,7 \pm 0,38
IWF (%)	77,07 \pm 1,93	81,08 \pm 2,48	105,23 \pm 5,04
Menge Standard (ml)	14	14	11
Aliquote (μ l)	15	15	12
Σ Kopien ($\cdot 10^{11}$)	1,69	1,68	1,40

Mit Hilfe der entwickelten Standards wurde als nächstes die RT-PCR-Methode zur Quantifizierung der Kopiezahl entwickelt.

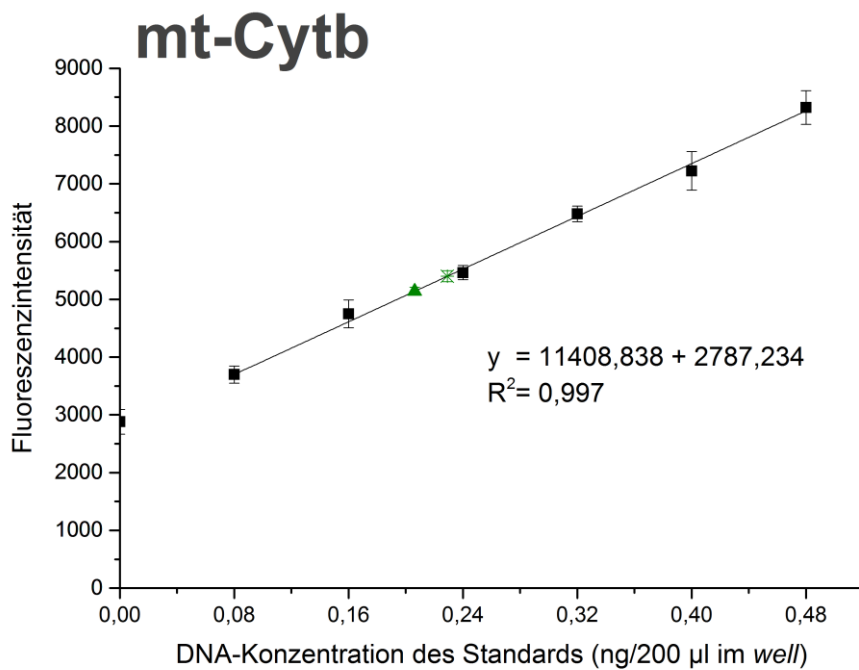
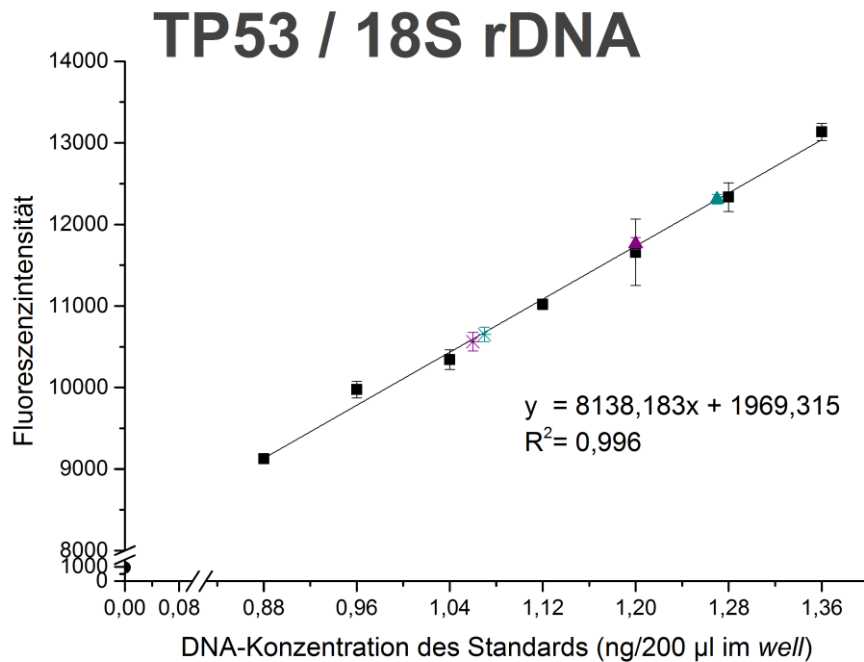


Abbildung 12 Quantifizierung der Realtime-Standards (Dreiecke) für die Zielsequenzen im TP53-Gen (blau), der 18S rDNA (lila) und des mt-Cytb-Gens (grün) mittels externer SYBR®-Green Kalibrierung in TE-Puffer. Nach Herstellung der Standards durch qualitative PCR wurde der DNA-Gehalt am Plattenfluorimeter dreifach abhängig mit Kalbsthymus-DNA als Referenz quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Die interne Wiederfindung (Sterne) wurde dreifach (TP53, 18S rDNA) bzw. zweifach (mt-Cytb; dargestellt als Mittelwert \pm range/2) abhängig durchgeführt.

3.3.2 Entwicklung der RT-PCR-Methode zur Bestimmung der Gesamtkopiezahl

Innerhalb des RMCA sollte die Gesamtkopiezahl mit Hilfe der TM-Sonden-basierten RT-PCR bestimmt werden. Um für jede Zielsequenz eine dafür geeignete Methode zu etablieren, wurde zunächst geprüft, ob im Gegensatz zum bisher bei der Entwicklung der Primer und Herstellung der Standards verwendeten 3-Stufen-Temperaturprogramm auch ein zeitlich kürzeres 2-Stufen-Temperaturprogramm zum gewünschten Produkt und gleicher Amplifikatmenge führt ([Kapitel 3.3.2.1](#)). Danach wurde die *Annealing*-Temperatur der TM-Sonden sowie deren innerhalb der PCR einzusetzende Konzentration optimiert ([Kapitel 3.3.2.2](#)). Die entwickelte Methode wurde anschließend angewendet um einen Kalibrierbereich zur Quantifizierung festzulegen ([Kapitel 3.3.4](#)).

3.3.2.1 Optimierung des Temperaturprogrammes

3-Stufen- versus 2-Stufen-Temperaturprogramm

TP53-Zielsequenz

Im Rahmen der Optimierung des Temperaturprogrammes der PCR zur Kopiezahlquantifizierung sollte das bisher verwendete 3-Stufen- mit dem kürzeren 2-Stufen-Programm (Kürzung innerhalb der Zyklen: Denaturierung 30 s → 15 s; *Annealing*- und Elongation: 30 s + 60 s → 60 s) bezüglich der Produktentstehung (optische Auswertung der Agarose-Gelelektrophorese) und der Amplifikatmenge (densitometrische Auswertung) verglichen werden.

Dabei waren die anderen -innerhalb der PCR vorkommenden- Temperaturstufen gleich. Auf Grund der Sequenzlänge des TP53-Gens ([Kapitel 3.2.1](#)) war eine Anreicherung der Zielsequenz ([Kapitel 3.2.1.1](#)) unabdingbar. Dazu wurde eine Biotin-markierte DNA-Sonde verwendet, die sich dann nach der Hybridisierung an die Zielsequenz mit Hilfe von an Streptavidin-gekoppelten magnetischen Kügelchen aus der DNA-Lösung separieren ließ. Damit die DNA-Sonde im Zuge der Gesamtkopiezahlquantifizierung nicht fälschlicherweise detektiert und folglich die Gesamtkopiezahl überschätzt wird, muss die Entfernung der Biotin-markierten Sonde gewährleistet werden. Deshalb wurde die DNA-Sonde mit dUTP anstelle von dTTP in einer PCR hergestellt und nach der Zielsequenz-Anreicherung ein UDG-Verdau (Inkubation mit UDG bei 37°C) durchgeführt. Um Restkopien an DNA-Sonde im PCR-Ansatz zur Kopiezahlquantifizierung zu vermeiden, wurde zu Beginn des Temperaturprogrammes der Kopiezahlquantifizierung ein 10-minütiger 37°C-Schritt durchgeführt und erneut mit UDG inkubiert (Vermulst et al., 2008a).

Als Templat innerhalb der Gesamtkopiezahlquantifizierung im RMCA diente beim TP53-Gen die mit Hilfe der TP53-Sonde angereicherte Zielsequenz (Abbildung 3). Mit 1137 bp handelte

Ergebnisse und Diskussion

es sich um eine Sequenz >300 bp, weshalb ein initialer Denaturierungsschritt von 5 min bei 95°C notwendig war (Lotti, 2012; Dorak, 2006).

Für den Vergleich zwischen dem 3-Stufen- und dem 2-Stufen-Temperaturprogramm wurden zwei qualitative PCRs ([Kapitel 6.5.3.1](#)) mit TP53-Sonde, den zugehörigen Kopiezahl-Primern (Tabelle 19) und einer *Annealing*-Temperatur von 65°C durchgeführt.

Nach agarosegelelektrophoretischer Trennung und SYBR[®]-Green-Detektion wurden mit beiden Temperaturprogrammen die erwarteten 135 bp-langen Kopiezahl-Produkte detektiert.

Nach densitometrischer Auswertung wurde mit dem 3-Stufen-Temperaturprogramm eine *Trace Quantity* (TQ) von ca. 116.000 Intensität x mm und mit dem 2-Stufen-Temperaturprogramm eine TQ von ca. 129.000 Intensität x mm (+10,9%) ermittelt (Anhang Abbildung 27). Nach dieser einmaligen experimentellen Durchführung deutete der leichte Anstieg in der Amplifikatmenge darauf hin, dass bei der kürzeren Methode mindestens genauso viel Produkt generiert wird. Deshalb wurde sich für die Methodenentwicklung für ein 2-Stufen-Temperaturprogramm entschieden.

18S rDNA und mt-Cytb

Das gleiche Experiment wurde im Anschluss mit den Zielsequenzen der 18S rDNA sowie des mt-Cytb-Gens durchgeführt. Dabei war das Vorgehen identisch zu dem beim TP53-Gen.

Sowohl bei den Zielsequenzen der 18S rDNA als auch dem mt-Cytb wurden mit beiden Temperaturprogrammen die erwarteten Kopiezahl-Produkte (18S rDNA: 140 bp; mt-Cytb: 151 bp) detektiert (Anhang Abbildung 27, Anhang Abbildung 28). Für die 18S rDNA wurde 13,3% mehr Amplifikat nach Verwendung des 3-Stufen-Temperaturprogrammes erhalten. Für die mt-Cytb-Zielsequenz unterschieden sich die TQs zwischen den zwei Temperaturprogrammen um 7,8% (Anhang Tabelle 6). Dies ließ vermuten, dass das 2-Stufen-Programm mindestens genauso effektiv in der Amplifizierung der Zielsequenz ist wie das 3-Stufen-Programm.

Da es sich um eine einmalige experimentelle Durchführung handelte, wurde das Ergebnis der Densitometrie als Orientierungshilfe verstanden und die mit der Verwendung des 2-Stufen-Temperaturprogrammes gewonnene Zeitersparnis von 45 s pro Zyklus stets vorgezogen. Somit wurde für alle folgenden RT-PCRs zur Quantifizierung der Kopiezahl das 2-Stufen-Temperaturprogramm verwendet.

Bestimmung der optimalen *Annealing*-/Elongationstemperatur der TM-Sonde

Die TM-basierte RT-PCR wurde als Methode zur Quantifizierung der Gesamtkopiezahl gewählt ([Kapitel 3.3](#)). Dabei hybridisiert zusätzlich zu den Kopiezahl-Primern eine TM-Sonde, welche am 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff und am 5'-Ende einen fluoreszierenden Reporter-Farbstoff enthält, an die Zielsequenz. In jedem Zyklus wird im Rahmen der Elongation von der Polymerase durch ihre 5'-Nuklease-Aktivität der Reporter-Farbstoff abgespalten. Die Trennung von Quencher und Reporter führt zu einer steigenden Fluoreszenz, welche detektiert werden kann (Arya et al., 2005). Da diese Reaktion proportional zur Amplifikatmenge abläuft, kann die Technik zur Quantifizierung genutzt werden. Um den wichtigen Schritt der TM-Sonden-Hybridisierung und zudem die Hybridisierung der Kopiezahl-Primer zu gewährleisten, wurde die hinsichtlich der kleinsten Standardabweichung der *cycle threshold* (Ct)-Werte und höchsten Effizienz der Primer optimale *Annealing*-/Elongationstemperatur der TM-Sonde bestimmt.

Zum Optimieren werden Temperaturbereiche zwischen 55-65°C (Pfaffl, 2001) oder 55-60°C (Dorak, 2006) empfohlen. Zur Bestimmung der *Annealing*-/Elongationstemperatur wurden deshalb für jede Zielsequenz jeweils drei unabhängige (je verschiedene Tage, 96-well Platten, MM) 2-Stufen-RT-PCRs bei 56°C, 58°C und 60°C durchgeführt. Als Templat dienten die zuvor hergestellten RT-Standards ([Kapitel 3.3.1](#)). Die Amplifikation erfolgte mit den spezifisch für die Zielsequenzen entwickelten Kopiezahl-Primern und deren TM-Sonde (Tabelle 19, Tabelle 20, Tabelle 21).

TP53-Zielsequenz

Die Ct-Werte nahmen tendenziell mit steigender *Annealing*-/Elongationstemperatur zu, unterschieden sich jedoch nicht signifikant (ANOVA, Scheffe, $p < 0,05$; $p = 0,8709-0,9979$). Bereits kleine relative Standardabweichungen der Ct-Werte (<2%) resultieren nach Umrechnung in die Kopiezahlen in relativen Standardabweichungen bis zu 30%. Daher wurde zwischen den Kopiezahlen kein signifikanter Unterschied festgestellt (ANOVA, Scheffe, $p < 0,05$; $p = 0,8184-0,9983$). Mit LinRegPCR ([Kapitel 6.5.3.2.1](#)) wurden mit steigender Temperatur steigende Effizienzen ermittelt, welche sich jedoch nicht signifikant voneinander unterschieden (ANOVA, Scheffe, $p < 0,05$; $p = 0,2203-0,9233$, Anhang Tabelle 7, Anhang Abbildung 29).

Da keine der Temperaturstufen statistisch gesehen zu bevorzugen war, wurde nach Betrachtung der Absolutwerte hinsichtlich geringstem Ct-Wert und einer Effizienz nahe 100% 56°C als optimale *Annealing*-/Elongationstemperatur für die Zielsequenz des TP53-Gens festgelegt.

Ergebnisse und Diskussion

18S rDNA und mt-Cytb

Da sich bei der 18S rDNA sowohl die Ct-Werte (ANOVA, Scheffe, $p < 0,05$; $p = 0,3069-0,7625$) als auch die resultierenden Kopiezahlen (ANOVA, Scheffe, $p < 0,05$; $p = 0,3706-0,9151$) und Effizienzen (ANOVA, Scheffe, $p < 0,05$; $p = 0,6245-0,9122$) abhängig von der Temperatur nicht signifikant voneinander unterschieden (Anhang Tabelle 7, Anhang Abbildung 29), wurde sich aus Gründen der Laborpraxis für eine *Annealing*-/Elongationstemperatur von 56°C entschieden. Somit wurde es ermöglicht in nur einem RT-Lauf sowohl die TP53- als auch die 18S rDNA-Kopien zu quantifizieren und dadurch pro Lauf 65 min Zeit einzusparen.

Auch für die mt-Cytb-Zielsequenz war bei keinem der drei Punkte (Ct: ANOVA, Scheffe, $p < 0,05$; $p = 0,4168-0,9925$; Kopiezahl: ANOVA, Scheffe, $p < 0,05$; $p = 0,4138-0,9670$; Effizienz: ANOVA, Scheffe, $p < 0,05$; $p = 0,4753-0,8311$) eine statistisch signifikante Temperaturabhängigkeit erkennbar (Anhang Tabelle 7, Anhang Abbildung 29). Deshalb wurde sich auf Grund des kleinsten Ct-Absolutwertes ($21,99 \pm 0,06$) für 60°C als optimale *Annealing*-/Elongationstemperatur entschieden und alle zukünftigen RT-PCRs im Rahmen der Kopiezahlquantifizierung damit durchgeführt.

Übersicht der Temperaturprogramme für die TM-Sonden-basierte RT-PCR zur Kopiezahlbestimmung

Tabelle 3 Zusammenfassung der 2-Stufen-Temperaturprogramme zur Bestimmung der Kopiezahl des TP53-Gens, der 18S rDNA sowie dem mt-Cytb-Gen mittels *TaqMan*®-basierter RT-PCR. Unterschiedliche Zeit- und Temperatureinstellungen zwischen den PCR-Programmen für die TP53 bzw. 18S rDNA und die mt-Cytb-Zielsequenz sind **fett** hervorgehoben. n.a., anzuwenden.

Zielsequenz	TP53/ 18S rDNA	mt-Cytb
Vorverdau (37°C)	10 min	n.a.
Denaturierung (95°C)	5 min	2 min
40 Zyklen		
Denaturierung (95°C)	0,25 min	
<i>Annealing</i> /Elongation	1 min bei 56°C	1 min bei 60°C

3.3.2.2 Optimierung der *TaqMan*®-Sondenkonzentration

Nachdem sowohl die Position der TM-Sonde ([Kapitel 3.2](#)) als auch die *Annealing*-/Elongationstemperatur ([Kapitel 3.3.2.1](#)) für alle drei Zielsequenzen optimiert wurden, folgte die experimentelle Ermittlung der optimalen TM-Sondenkonzentration. Nach Iotti et al. (2012)

Ergebnisse und Diskussion

sollten 200-500 nM TM-Sonde pro 25 µl Reaktionsansatz vorliegen. Dies entspricht 160-400 nM in dem in dieser Arbeit angestrebten Reaktionsansatz von 20 µl.

Im Hinblick auf die Kostenoptimierung der Kopiezahlquantifizierung wurden je Zielsequenz drei bis vier TM-Sondenkonzentrationen im Bereich 50 bis maximal 200 nM untersucht (TP53: 100 nM, 150 nM, 200 nM; mt-Cytb: 50 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM).

TP53 und mt-Cytb

Dazu wurden drei unabhängige RT-PCRs ([Kapitel 6.5.3.2.1](#)) mit den für die Zielsequenzen spezifischen RT-Standards und deren zugehörigen Kopiezahl-Primern ([Kapitel 6.5.2](#)) durchgeführt. Ausgewertet wurden die Ct-Werte, die Kopiezahlen am Ct-Wert sowie die Effizienzen der Reaktionen.

Beim TP53 war mit zunehmender TM-Sondenkonzentration eine Verringerung der Ct-Werte zu verzeichnen, welche jedoch nicht statistisch signifikant war (ANOVA, Scheffe, $p < 0,05$, $p = 0,7713-0,9989$). Die mit bis zu 3,4% hohen relativen Standardabweichungen resultierten bei den umgerechneten Kopiezahlen in relativen Standardabweichungen von bis zu 49%. Die Effizienzen unterschieden sich ebenfalls nicht signifikant (ANOVA, Scheffe, $p < 0,05$, $p = 0,4700-0,9144$; Anhang Tabelle 8). Auf Grund der fehlenden Signifikanzen wurde anhand der Absolutwerte 100 nM als optimale TM-Sondenkonzentration (höchste Effizienz und kleinste Standardabweichung bei den Ct-Werten) gewählt.

Bei der mt-Cytb Zielsequenz unterschieden sich die bei der Verwendung von 50 nM TM-Sonde ermittelten Ct-Werte und daraus berechneten Kopiezahlen statistisch signifikant (ANOVA, Scheffe, $p < 0,05$; $p = < 0,001$) von allen anderen TM-Sondenkonzentrationen. Der Ct-Wert nahm tendenziell mit steigender TM-Sondenkonzentration ab, was darauf hindeutet, dass mit 50 nM nicht alle Kopien detektiert wurden. Die mit LinRegPCR ermittelten Effizienzen waren statistisch nicht signifikant unterschiedlich (ANOVA, Scheffe, $p < 0,05$, $p = 0,1690-0,9995$; Anhang Tabelle 8). Um die Reaktionskosten minimal zu halten, wurde sich für 100 nM TM-Sondenkonzentration entschieden: hierbei war die Effizienz der Reaktion am höchsten (94,61%) und der Ct-Wert (21,99) verglichen mit den höheren TM-Sondenkonzentrationen akzeptabel.

3.3.3 Sonderfall 18S rDNA

Die Zielsequenz der 18S rDNA stellte einen Sonderfall in der Entwicklung einer RT-PCR-Methode zur Kopiezahlquantifizierung dar.

Nach Durchführung der ersten der drei unabhängigen RT-PCRs mit $1,20 \cdot 10^5$ Kopien 140 bp-langem 18S-Standard pro Ansatz und den dazugehörigen Kopiezahl-Primern (c/d, Tabelle 20) wies die RT-Kurve nicht ab Zyklus 45, sondern erst ab Ct-Wert 65 ein Plateau auf (Abbildung

Ergebnisse und Diskussion

13). Die Amplifikation des TP53-Standards (zum 18S-RT-Standard vergleichbare Templatmenge von $1,21 \cdot 10^5$ Kopien/PCR-Ansatz und -länge von 135 bp), welche mit dem gleichen MM durchgeführt wurde, verlief hingegen RT-typisch, d.h. das Plateau wurde ab Zyklus 45 erreicht.

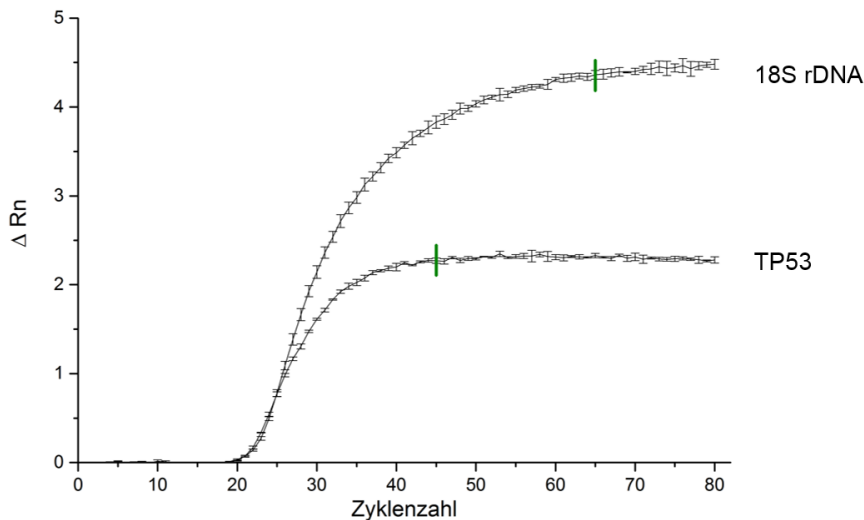


Abbildung 13 Vergleich der Amplifikationskurven der 18S rDNA- und TP53-Zielsequenz. Die Amplifikation erfolgte mit RT-Standard (18S rDNA: $1,20 \cdot 10^5$ Kopien/Ansatz bzw. TP53: $1,21 \cdot 10^5$ Kopien/Ansatz), den jeweiligen Kopiezahl-Primern ([Kapitel 6.5.2](#)) und 100 nM TaqMan®-Sonde/well. Die Annealing-Temperatur betrug 56°C. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung einer abhängigen Dreifachbestimmung. Grün ist der Zyklus markiert, ab dem statistisch (ANOVA, Scheffe, $p < 0,05$) das Plateau erreicht wurde.

Für die korrekte Ermittlung der Ct-Werte als auch der Effizienz mit Hilfe der in dieser Arbeit genutzten SDS 2.4 software ist eine Plateau-Phase und somit ein typischer Kurvenverlauf (exponentielle-, lineare- und Plateau-Phase) jedoch unabdingbar. Anderweitig resultiert eine Störung des Auto-Ct-Algorithmus, der in Folge eine falsche *baseline* und fehlerhafte *threshold*-Parameter generiert (Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System and SDS Enterprise Database, User Guide, 2010). Dieser Fehler wäre nur behebbar durch eine zeitaufwändige Prüfung jeder Amplifikations-Kurve und dem manuellen Nachjustieren des *thresholds*. Um dies zu vermeiden, müsste im Falle der 18S rDNA Zielsequenz die TM-basierte RT-PCR zur Kopiezahlbestimmung über einen Zeitraum von mindestens 65 Zyklen andauern. D.h. gegenüber einem Plateau-Beginn bei 45 Zyklen wäre die Methode zur Kopiezahlquantifizierung der 18S rDNA Zielsequenz per se 25 min länger als die zur Quantifizierung der TP53-Zielsequenz.

Eine Ursache für das späte Plateau könnte eine geringe Effizienz der PCR-Reaktion sein. Eine mögliche Ursache hierfür wäre eine schlechte Primer-Entwicklung. Ein Unterschied in der $T_m > 5^\circ\text{C}$ führt zu ungleichmäßiger Elongation (<http://blog.biosearchtech.com/TheBiosearchTechBlog/bid/63622/qPCR-Troubleshooting>, Stand 09.11.2016). Die verwendeten Primer haben eine TM-

Ergebnisse und Diskussion

Differenz von 0,7°C (Kapitel [6.5.2](#)). Somit wurde dies als Ursache für den Kurvenverlauf ausgeschlossen.

Anhand der Untersuchung verschiedener Parameter wie beispielsweise der Optimierung der Kopiezahl-Primerkonzentrationen durch die Erstellung unterschiedlicher Kombinationen aus fw- und rv-Primerkonzentrationen (Tabelle 4, [Kapitel 3.3.3.1](#)) oder der Optimierung der TM-Sondenkonzentration ([Kapitel 3.3.3.2](#)) sollte geprüft werden, ob die Verschiebung des Plateau-Beginns in Richtung Zyklus ≤ 45 und somit eine zeitliche Optimierung der TM-baiserten RT-PCR möglich ist.

Um sicherzustellen, dass der Kurvenverlauf der 18S rDNA Amplifikation nicht dadurch bedingt ist, dass die Zielsequenz in 150-200 Kopien pro haploidem Genom codiert (Long und Dawid, 1980; Miller et al., 1979) ist, wurden alle Experimente mit quantifiziertem RT-Standard durchgeführt.

3.3.3.1 Optimierung der Kopiezahl-Primerkonzentrationen

Um zu Vergleichen, ob die Verwendung einer bestimmten Kombination an Kopiezahl-Primerkonzentration zu einem Plateau-Beginn kleiner Zyklus 65 führt, wurden verschiedenste Kombinationen an fw- und rv-Kopiezahl (Tabelle 4) für die Amplifikation des 18S rDNA-Standards ($1,20 \cdot 10^5$ Kopien(Ansatz) eingesetzt. Dabei wurde auch die bislang ([Kapitel 3.3.3](#)) verwendete Kombination von 100 nM/100 nM berücksichtigt.

Tabelle 4 Primer-Matrix. Dargestellt sind die neun experimentell untersuchten Kombinationen aus *forward* (FW)- und *reverse*- (RV)-Kopiezahl-Primer (Abbildung 9) unterschiedlicher Konzentrationen (alle Angaben in nM).

	RV	100	300	500
FW				
100		100/100	100/300	100/500
300		300/100	300/300	300/500
500		500/100	500/300	500/500

Äquivalente Konzentrationen führten in diesem Experiment zu den frühesten Plateaus (100 nM/100 nM: Zyklus 55 und 500 nM/500 nM: Zyklus 50, Abbildung 14). Spätestens nach 70 Zyklen waren alle RT-Kurven in der Plateau-Phase (Anhang Abbildung 30). Die Primerverhältnisse –kategorisiert nach Über- oder Unterangebot von fw- bzw.- rv-Primern – zeigten keinen Einfluss auf den Beginn des Plateaus zu haben.

Ergebnisse und Diskussion

Dass die Verwendung von je 100 nM Kopiezahl-Primern zur Generierung eines Plateaus vor Zyklus 65 führte, war widersprüchlich zum Vorversuch (Kopiezahl-Primer je 100 nM, Plateau ab Zyklus 65, [Kapitel 3.3.3](#)). Somit war die Rolle des Einflusses der Primer-Verhältnisse nicht reproduzierbar und weiterhin unklar. Um weitere Daten für eine verlässliche Aussage zu generieren, wurde die Kopiezahl-Primerkonzentration von je 100 nM für die Experimente im Rahmen der Optimierung der TM-Sondenkonzentration ([Kapitel 3.3.3.2](#)) beibehalten.

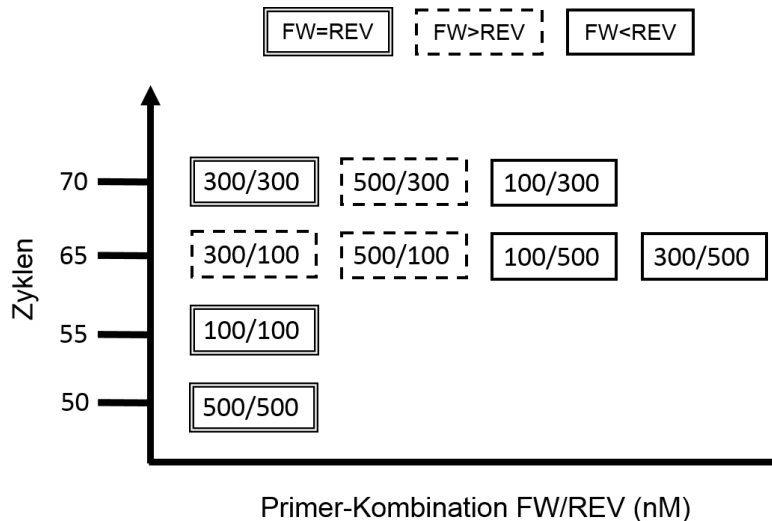


Abbildung 14 Zusammenhang zwischen Zyklenzahl, den Kopiezahl-Primerkonzentrationen im *well* (forward, FW; reverse, REV) und dem Erreichen der Plateau-Phase. Ausgewertet wurde der dreifach abhängige Versuch mit der TM-Sonde den Kopiezahl-Primern c/d (beides Tabelle 20), sowie dem Realtime-Standard der 18S rDNA-Zielsequenz.

3.3.3.2 TM-Sondenkonzentration

Ob eine Änderung der TM-Sondenkonzentration zu einer Verschiebung des Plateau-Beginns in Richtung Ct-Wert ≤ 45 führt, wurde im nächsten Experiment untersucht. Je Reaktionsansatz wurde 18S-RT-Sonde als Templat mit dem Kopiezahl-Primern c/d (je 100 nM im *well*, Abbildung 9, Tabelle 20) amplifiziert. 7 unterschiedliche TM-Sondenkonzentrationen im Bereich von 50-200 nM wurden überprüft.

Nach Auswertung des dreifach abhängigen Versuches (pro TM-Sondenkonzentration wurden 3 *wells* pipettiert) wurde das früheste Auftreten eines Plateaus nach Zyklus 60 und einer Verwendung von 200 nM oder 50 nM TM-Sonde (Abbildung 15) ermittelt. Mit der Verwendung von je 100 nM Kopiezahl-Primern und 100 nM TM-Sonde wurde der erwartete Bereich des Plateau-Beginns von 55 Zyklen ([Kapitel 3.3.3.1](#)) bis 65 Zyklen ([Kapitel 3.3.3](#)) nicht reproduziert.

Somit führte die Abänderung der TM-Sondenkonzentration zu keiner Verschiebung des Bereiches des Plateau-Beginns (<Zyklus 55-65).

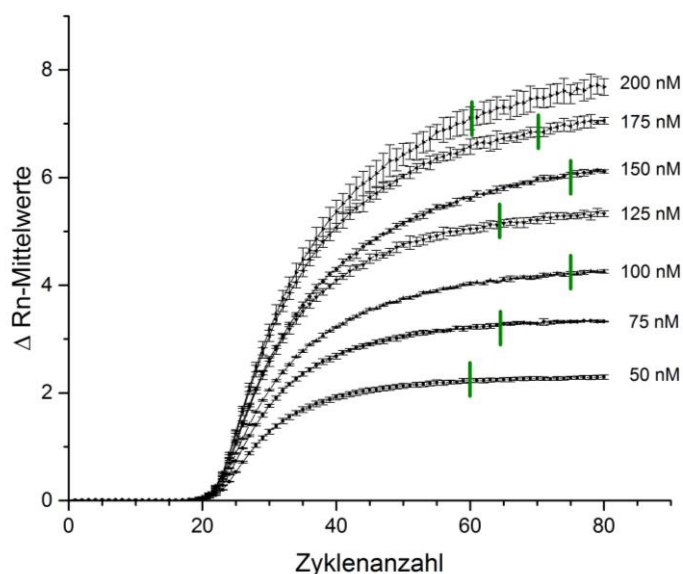


Abbildung 15 Einfluss der *TaqMan*®-Sondenkonzentration auf die Entstehung des Plateaus. Aufgetragen sind die ΔRn -Mittelwerte \pm Standardabweichung gegen die Zyklusanzahl eines dreifach abhängigen (3 *wells* je *TaqMan*®-Sondenkonzentration) Versuches. Grün ist der Zyklus markiert, ab dem statistisch (ANOVA, Scheffe, $p < 0,05$) das Plateau erreicht wurde. Für die Reaktionen wurden je $1,2 \cdot 10^5$ Kopien 18S-RT-Standard als Templat mit dem Kopiezahl-Primern c/d sowie der *TaqMan*-Sonde (beides Tabelle 20) eingesetzt. Die *Annealing*-Temperatur betrug 56°C .

3.3.3.3 Zusammenfassung und Ausblick für die 18S rDNA als Zielsequenz im RMCA

Zusammenfassend erwies sich die Entwicklung einer TM-basierten RT-PCR für die Kopiezahlquantifizierung der 18S rDNA-Zielsequenz als nicht trivial. Der Beginn der Plateauphase lag bei der Verwendung von je 100 nM Kopiezahl-Primern im Bereich von Zyklus 55-65.

Die frühest mögliche Plateauphase wurde ab Zyklus 50 mit folgenden Reaktionsbedingungen erreicht:

- $1,2 \cdot 10^5$ Kopien 18S-Standard/*well*
- 500 nM Kopiezahl-Primer c/d
- 100 nM TM-Sonde „e neu“/*well*
- 56°C *Annealing*-Temperatur

Mit einem beginnenden Plateau ab Zyklus 50 sollte folglich innerhalb der Methode eine Zyklusanzahl von >50 eingepflegt werden, damit dieses als solches erkennbar ist. Im Vergleich zu den Zielsequenzen des TP53-Gens sowie des mt-Cytb-Gens waren das >10 Zyklen und somit 12,5 min mehr pro RT-Lauf ([Kapitel 3.3.2](#)). Es ist jedoch anzumerken, dass die Reproduzierbarkeit des exakten Plateau-Beginns im Gegensatz zur TP53-Kopiezahlquantifizierungsmethode, welche reproduzierbar einen statistischen Plateau-Beginn ab Zyklus 45 aufwies, fraglich ist. Vielmehr sollte von einem „Startfenster“ für den Plateau-Beginn der 18S rDNA Kurve ausgegangen werden.

Ergebnisse und Diskussion

Möglicherweise würde die Entwicklung neuer Kopiezahl-Primer und einer neuen TM-Sonde, welche keinerlei Sekundärstrukturen bilden (Vgl.: Tabelle 20) innerhalb der 18S rDNA zu reproduzierbaren, RT-typischen Kurvenverläufen führen. Ein qualitativer Nachweis der 18S rDNA-Zielsequenz war durch die entwickelte TM-basierte RT-PCR jederzeit möglich.

Auf Grund der gegebenen Unsicherheiten bei der automatischen Auswertung der RT-Daten und dem daraus resultierend großen zeitlichen Aufwand der manuellen Prüfung jeder einzelnen RT-Kurve, wurde im Rahmen dieser Arbeit die 18S rDNA als Zielsequenz für den RMCA zurückgestellt.

Nachdem die RT-PCR-Methoden zur Kopiezahlquantifizierung für die Zielsequenzen im TP53 und mt-Cytb-Gen entwickelt waren, wurde als nächstes ein geeigneter Kalibrierbereich festgelegt ([Kapitel 3.3.4](#)).

3.3.4 Festlegung des Kalibrierbereiches

Der Kalibrierbereich für die Kopiezahlquantifizierung der Zielsequenzen im TP53- ([Kapitel 3.3.3.1](#)) und mt-Cytb-Gen ([Kapitel 3.3.3.2](#)) sollte so gelegt werden, dass möglichst viele Proben damit quantifizierbar sind, ohne dass

- diese vorher > Faktor 10 verdünnt werden müssen (Vermeidung von Schwankungen zwischen den Proben durch Kopiezahl-Verluste während des Verdünnens) bzw.
- zu viel Probe (>5 µl) eingesetzt werden muss und somit Kopien für die Mutations-PCR verloren gehen.

Akzeptable Schwankungen der Ct-Werte wurden im Bereich 15-33 erwartet (Schmalbach, 2014). Deshalb sollte maximal dieser Bereich verwendet werden. Die potentiellen Kalibrierbereiche wurden auf Varianzenhomogenität (F-Test, $p < 0,05$) und Linearität (Linearitätstest, $p < 0,01$) sowie Richtigkeit, Präzision und Effizienz der Reaktion geprüft.

Da die Kalibriergerade mit RT-Standard anstelle von extrahierter DNA erstellt und somit eine Anwesenheit von inhibierenden Substanzen (z.B. Phenol, Chloroform, EDTA, Ethanol) vermieden wurde, wurde eine Effizienz von $\geq 90\%$ (Svec et al., 2015) angestrebt. Zudem wurde eine relative Standardabweichung der Ct-Werte innerhalb der pipettierten Triplikate von $\leq 2\%$ erwartet (Arya et al., 2005). Umgerechnet in Kopien entspricht dies einer relativen Standardabweichung von $\leq 27\%$. Von den maximalen 27% Schwankungen einer Probe ausgehend, sollte für die spätere Detektion von Unterschieden in den Mutationsfrequenzen zwischen unabhängigen Proben (ab Faktor 4) die interne Wiederfindung mindestens im Bereich $90-110\% \pm 20\%$ liegen.

Ergebnisse und Diskussion

3.3.4.1 TP53-Zielsequenz

Zu Beginn wurde an Hand der gesetzten Ct-Wert-Grenzen der größte mögliche Kalibrierbereich ermittelt.

Eingrenzung des Kalibrierbereiches

Für die Kalibriergerade wurde der TP53-RT-Standard ([Kapitel 3.3.1](#)) seriell von $1,21 \cdot 10^7$ Kopien/PCR-Ansatz bis $1,21 \cdot 10^1$ Kopien/PCR-Ansatz mit nukleasefreiem Wasser (H_2O) verdünnt und als Templat in RT-PCR-Ansätzen mit den Kopiezahl-Primern amplifiziert.

Der mit $1,21 \cdot 10^7$ Kopien/PCR-Ansatz höchste Kalibrierpunkt hatte mit $13,53 \pm 0,08$ einen Ct-Wert unter 15, der kleinste Kalibrierpunkt ($1,21 \cdot 10^1$ Kopien/PCR-Ansatz) mit $34,98 \pm 1,13$ einen Ct-Wert über 33 (Abbildung 16). Somit wurden diese beiden Kalibrierpunkte nicht in den Kalibrierbereich eingeschlossen.

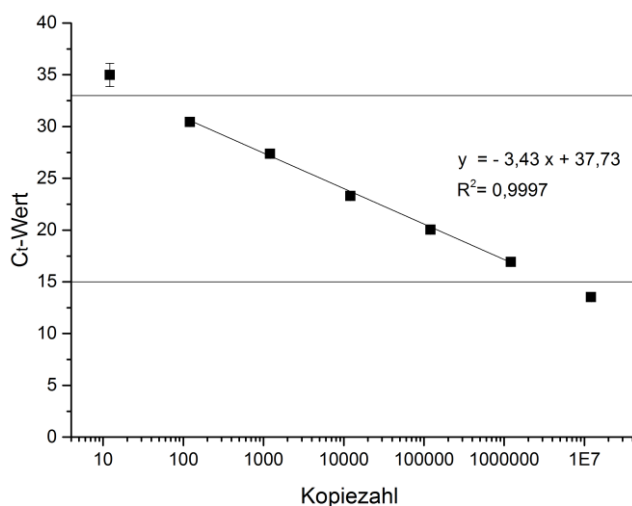


Abbildung 16 Eingrenzung des Kalibrierbereiches für die Kopiezahlquantifizierung der TP53-Zielsequenz. Für die abhängige Dreifachbestimmung wurden zwischen $1,21 \cdot 10^7$ Kopien Realtime-Standard/PCR-Ansatz bis $1,21$ Kopien Realtime-Standard/PCR-Ansatz als Templat sowie die Kopiezahlprimer P3/P4 eingesetzt (Abbildung 3). Die *Annealing*-Temperatur betrug $56^\circ C$ und die Konzentration der *TaqMan*®-Sonde T lag bei 100 nM im *well*. Die horizontalen Linien umschließen den für die Kopiezahlquantifizierung der TP53-Zielsequenz geeigneten Kalibrierbereich.

Der Bereich von $1,21 \cdot 10^6$ bis $1,21 \cdot 10^2$ Kopien/PCR-Ansatz war varianzenhomogen und linear, sodass im nächsten Schritt die Präzision und Richtigkeit bestimmt wurden.

Dafür wurden in drei unabhängigen RT-PCRs die Kalibriergeraden sowie drei Proben pipettiert. Als Proben dienten Verdünnungen des TP53 RT-Standards ([Kapitel 3.3.1](#)), der in in Länge und Sequenz nahezu (76,3%, [Kapitel 3.2.1.1](#)) der kompletten zu quantifizierenden Zielsequenz entsprach. Dabei waren die Kopiezahlkonzentrationen der drei Proben über den gesamten Kalibrierbereich verteilt. Für die Bestimmung der Richtigkeit wurden interne

Ergebnisse und Diskussion

Wiederfindungen mitgeführt, welche aus einer 1+1-Mischung Probe und Kalibrierpunkt bestanden.

Nahezu alle zuvor festgelegten Akzeptanzkriterien für die Kalibrierung wurden eingehalten (Anhang Tabelle 10). Ausnahme waren die Wiederfindungen, welche im äußeren Kalibrierbereich ermittelt wurden. Diese lagen mit $100,99\% \pm 53,28\%$ ($\pm 52,75\%$, oberer Bereich) und $150,71\% \pm 45,23\%$ ($\pm 30,01\%$, unterer Kalibrierbereich) außerhalb der Akzeptanzkriterien. Probenunterschiede wären ab Faktor 6 detektierbar. Der getestete Kalibrierbereich war somit nur bedingt geeignet für die Anwendung im RMCA. Deshalb wurde im nächsten Experiment getestet, ob sich diese Parameter durch eine Einengung des Kalibrierbereiches optimieren lassen.

Richtigkeit und Präzision eines enger gefassten Kalibrierbereiches

Um hinsichtlich Präzision und Richtigkeit eventuell verbesserte Wiederfindungen zu erhalten, wurde der große Kalibrierbereich verkleinert. Um einen direkten Vergleich beider Bereiche zu ermöglichen, wurde der mittlere Kalibrierpunkt mit $1,21 \cdot 10^4$ Kopien Realtime-Standard/PCR-Ansatz beibehalten und nach oben und unten mit 2 weiteren Kalibrierpunkten erweitert. So entstand ein 5-Punkt Kalibrierbereich von $1,09 \cdot 10^5$ Kopien/Ansatz bis $1,34 \cdot 10^3$ Kopien/Ansatz. Wie bereits beim weit gefassten Kalibrierbereich (Kapitel 3.2.4.1) wurde eine dreifach unabhängige Bestimmung mit Kalibriergerade, Proben (Verdünnung des Realtime-Standards) und internen Wiederfindungen (1+1-Mischungen aus Probe und einem Kalibrierpunkt) durchgeführt.

Dieser Kalibrierbereich erfüllte alle zuvor festgelegten Akzeptanzkriterien ([Kapitel 3.3.4](#), Anhang Tabelle 11). Die internen Wiederfindungen unterschieden sich statistisch nicht signifikant (ANOVA, $p < 0,05$), waren aber gegenüber dem weit gefassten Kalibrierbereich in allen Bereichen der Kalibriergeraden zwischen 90% und 100%. Mit relativen Standardabweichungen der internen Wiederfindungen von ($\pm 2,06\%$, mittlerer Kalibrierbereich) bis $\pm 17,07\%$ (unterer Kalibrierbereich) waren diese um mindestens 13% kleiner als beim weit gefassten Kalibrierbereich.

Fazit: weiter oder enger Kalibrierbereich?

Als Fixpunkt für den direkten Vergleich zwischen den beiden Kalibrierbereichen diene der mittlere Kalibrierpunkt. Die internen Wiederfindungen bei der vorliegenden Kopiezahl von $1,21 \cdot 10^4$ Kopien/PCR-Ansatz unterschieden sich mit $100,49\% \pm 10,76\%$ (großer Bereich) und $91,87 \pm 1,89\%$ (kleiner Bereich) jedoch nicht statistisch signifikant (ANOVA, $p < 0,05$). Auffallend hingegen war, dass die Präzision sowohl bei den Proben als auch den Wiederfindungen generell beim kleinen Kalibrierbereich höher ($\pm 1,65\%$ bis $17,07\%$) als beim großen

Ergebnisse und Diskussion

Kalibrierbereich ($\pm 9,29\%$ bis $52,75\%$) war (Anhang Tabelle 10, Anhang Tabelle 11). Die ermittelten Effizienzen wiesen keinen statistisch signifikanten Unterschied auf (ANOVA, $p < 0,05$, Zusammenfassung Tabelle 5).

Auch wenn zwischen den Parametern (interne Wiederfindung, Effizienz) keine statistischen Unterschiede ermittelt wurden, wies der eng gefasste Kalibrierbereich zusätzlich zur höheren Präzision mit durchschnittlich $96,03\% \pm 3,63\%$ ($\pm 3,78\%$) eine akzeptablere Wiederfindung als der große Kalibrierbereich mit $117,40\% \pm 28,85\%$ ($\pm 24,58\%$) auf. Deshalb wurde für die nachfolgenden Kopiezahlquantifizierungen der kleine Kalibrierbereich bevorzugt verwendet.

3.3.4.2 mt-Cytb- Zielsequenz und Zusammenfassung

Für die mt-Cytb-Zielsequenz war die Ermittlung der Kalibrierbereiche zur Kopiezahlquantifizierung identisch zum TP53-Gen ([Kapitel 3.3.4.1](#)).

Ein Kalibrierbereich von $3,18 \cdot 10^6$ bis $7,75 \cdot 10^2$ Kopien/PCR-Ansatz lag innerhalb der gesetzten Ct-Wert-Grenzen (13-33, Abbildung 17).

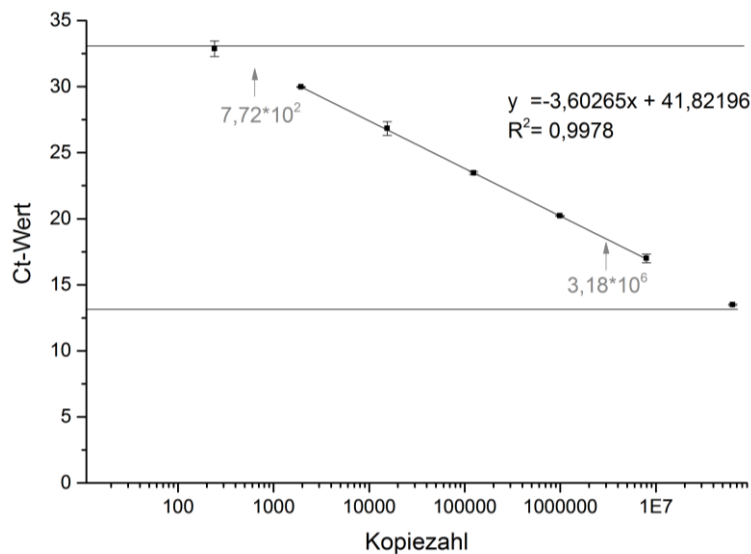


Abbildung 17 Eingrenzung des weit gefassten Kalibrierbereiches zur Quantifizierung der Kopiezahl des mt-Cytb-Gens. Für die abhängige Dreifachbestimmung wurden zwischen $3,18 \cdot 10^6$ Kopien/PCR-Ansatz bis $7,72 \cdot 10^2$ Kopien/PCR-Ansatz als Templat sowie die Kopiezahl-Primer h/ i (Abbildung 11) eingesetzt. Die horizontalen Linien umschließen den für die Kopiezahlquantifizierung der mtCytb-Zielsequenz geeigneten Kalibrierbereich.

Der Kalibrierbereich war varianzenhomogen und linear und erfüllte alle Akzeptanzkriterien ([Kapitel 3.3.4](#), Anhang Tabelle 12). Präzision und Richtigkeit der internen Wiederfindungen wurden über den gesamten Kalibrierbereich ermittelt (Tabelle 5).

Miteinander verglichen wiesen die internen Wiederfindungen von $99,93\% \pm 4,99\%$ (oben), $105,98\% \pm 12,70\%$ (Mitte) und $94,18\% \pm 4,99\%$ (unten) keinen statistisch signifikanten Unterschied auf (ANOVA, $p < 0,05$). Nach Betrachtung der Absolutwerte (Anhang Tabelle 12)

Ergebnisse und Diskussion

war die Richtigkeit als auch die Präzision der internen Wiederfindung im oberen Kalibrierbereich am vertrauenswürdigsten.

Der enger gefasste, varianzenhomogene und lineare Kalibrierbereich erstreckte sich von $3,18 \cdot 10^6$ bis $1,24 \cdot 10^4$ Kopien/PCR-Ansatz (Tabelle 5). Richtigkeit und Präzision der internen Wiederfindungen wurden über den gesamten Kalibrierbereich ermittelt, wobei für einen direkten Vergleich der internen Wiederfindungen die interne Wiederfindung im oberen Kalibrierbereich genauso pipettiert wurde, wie bereits zuvor beim weiten Kalibrierbereich. Die internen Wiederfindungen von $94,22\% \pm 10,53\%$ (oben), $101,15\% \pm 17,54\%$ (Mitte) und $96,67\% \pm 8,93\%$ (unten, Übersicht Tabelle 5) unterschieden sich nicht statistisch signifikant (ANOVA, $p < 0,05$).

Fazit: weiter oder enger Kalibrierbereich?

Beide Kalibrierbereiche waren varianzenhomogen und linear (Zusammenfassung der Daten in Tabelle 5). Fixpunkt für den Vergleich der internen Wiederfindungen ist die interne Wiederfindung im oberen Kalibrierbereich. Im großen Kalibrierbereich betrug die interne Wiederfindung in diesem Bereich $99,93\% \pm 4,99\%$, im kleinen hingegen $94,22\% \pm 10,53\%$. Beide unterschieden sich statistisch nicht signifikant (ANOVA, $p < 0,05$). Die Effizienzen der Reaktionen in den beiden Kalibrierbereichen unterschieden sich ebenso nicht statistisch signifikant (ANOVA, $p < 0,05$). Somit waren beide Bereiche für die Kopiezahl-Quantifizierung geeignet.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 5 Übersicht zu den Eigenschaften der Kalibrierbereiche zur Kopiezahlquantifizierung des TP53- und des mt-Cytb-Gens. Die internen Wiederfindungen wurden über den gesamten Kalibrierbereich ermittelt und bestanden aus einer 1+1-Mischung Kalibrierpunkt und Probe (Realtime-Standard-Verdünnungen). Die Varianzenhomogenität (VH) wurde mittels F-Test und Linearität (L) mittels Kalibo ausgewertet. Für das TP53-Gen war der weite Kalibrierbereich unterteilt in: oberer (OB) $-1,21 \cdot 10^6$ - $1,21 \cdot 10^5$ Kopien/PCR-Ansatz, mittlerer (MB) $-1,21 \cdot 10^4$ Kopien/PCR-Ansatz und unterer Bereich (UB) $-1,21 \cdot 10^3$ - $1,21 \cdot 10^2$ Kopien/PCR-Ansatz. Der enge Kalibrierbereich des TP53-Gens unterteilte sich in: OB $-1,09 \cdot 10^5$ - $3,63 \cdot 10^4$ Kopien/PCR-Ansatz, MB $-1,21 \cdot 10^4$ Kopien/PCR-Ansatz und UB $-4,03 \cdot 10^3$ - $1,34 \cdot 10^3$ Kopien/PCR-Ansatz. Für das mt-Cytb-Gen war der großer Kalibrierbereich unterteilt in: OB $-3,18 \cdot 10^6$ - $7,94 \cdot 10^5$ Kopien/PCR-Ansatz, MB $-7,94 \cdot 10^5$ - $1,98 \cdot 10^5$ Kopien/PCR-Ansatz und UB $-4,96 \cdot 10^4$ - $1,24 \cdot 10^4$ Kopien/PCR-Ansatz. Der enge Kalibrierbereich war beim mt-Cytb-Gen unterteilt in: OB $-3,18 \cdot 10^6$ - $7,94 \cdot 10^5$ Kopien/PCR-Ansatz, MB $-7,94 \cdot 10^5$ - $1,98 \cdot 10^5$ Kopien/PCR-Ansatz und UB $-4,96 \cdot 10^4$ - $1,24 \cdot 10^4$ Kopien/PCR-Ansatz. Zusätzliche Informationen Anhang Tabelle 10, Anhang Tabelle 11, Anhang Tabelle 12 und Anhang Tabelle 13. p, Signifikanzniveau; * wurde mit der Software Valoo ermittelt.

		TP53	mt-Cytb	
	Bereich (Kopien/Ansatz)	$1,21 \cdot 10^6$-$1,21 \cdot 10^2$	$3,18 \cdot 10^6$-$7,75 \cdot 10^2$	
Weiter Kalibrierbereich	VH	p<0,05	p<0,01	
	L	p<0,01 bzw. p<0,05*	p<0,01	
	IWF%	OB	100,99 ± 53,28	99,93 ± 4,99
		MB	100,49 ± 10,76	105,98 ± 12,70
		UB	150,71 ± 45,23	94,18 ± 4,99
	ØEffizienz	1,95 ± 0,03	1,90 ± 0,02	
	Bereich (Kopien/Ansatz)	$1,09 \cdot 10^5$-$1,34 \cdot 10^3$	$3,18 \cdot 10^6$-$1,24 \cdot 10^4$	
Enger Kalibrierbereich	VH	p<0,05	p<0,05	
	L	p<0,01 bzw. p<0,05*	p<0,01	
	IWF%	OB	99,06 ± 7,31	94,22 ± 10,53
		MB	91,87 ± 1,89	101,15 ± 17,54
		UB	96,40 ± 16,45	96,67 ± 8,93
	ØEffizienz	1,97 ± 0,04	1,93 ± 0,03	

Im Rahmen der späteren Anwendung der entwickelten TM-basierten RT-PCR-Methode zur Quantifizierung der Kopiezahl in der TP53- als auch mt-Cytb-Zielsequenz sollten noch weitere Daten bezüglich der Stabilität der Kalibrierlösungen ([Kapitel 3.3.3.3](#)), sowie zu den zu

Ergebnisse und Diskussion

erwartenden Präzisionen und Wiederfindung gesammelt und somit die Methode noch genauer charakterisiert werden.

3.3.4.3 Stabilität der Kalibrierlösungen

Die Quantifizierung der DNA-Kopien bezieht sich auf den entwickelten RT-Standard und stellte im Rahmen der Bestimmung der Mutationsfrequenzen einen wesentlichen Schritt dar. Um die Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten, musste der RT-Standard folglich reproduzierbare Ergebnisse liefern. Damit einem Verlust an DNA-Kopien im RT-Standard beispielsweise durch Hydrolyse vorgebeugt wird, wurde in der täglichen Praxis zur Erstellung der Kalibriergeraden immer ein neues, tiefgefrorenes Aliquot des jeweiligen RT-Standards verwendet ([Kapitel 3.3.1](#)). Nachteilig hierbei waren der zeitliche Aufwand des Pipettierens und der Materialverbrauch. Um zu verifizieren, ob auch eine mehrmalige Verwendung der nDNA- und mtDNA-RT-Standards nach Aufbewahrung im Kühlschrank möglich ist, wurde die Stabilität der Kalibrierlösungen untersucht.

Bei der Herstellung der Kalibriergeraden (2-fach unabhängig) stand von jeder DNA-Konzentration nur ausreichend Lösung für die Durchführung von 3 unabhängigen Versuchen zur Verfügung. Deshalb wurden die Standard-Lösungen an Tag 0, Tag 1 und Tag 8 (=maximaler Zeitraum bei einer Verwendung von 5 µl pro Bestimmung/Tag) quantifiziert und jeweils Kalibriergeraden daraus erstellt. Der manuelle *threshold* wurde auf 0,3 gesetzt und die Steigungen und die y-Abschnitte miteinander verglichen.

Als Referenz dienten 14 aus frisch aufgetauten Standard-Aliquoten ([Kapitel 3.3.1](#)) hergestellte, immer an Tag 0 analysierte Kalibrierlösungen. Von diesen wurde die minimale und maximale Steigung sowie der minimale und maximale y-Abschnitt ermittelt und als Grenze gewählt (Anhang Tabelle 14, Anhang Tabelle 15). Anschließend wurden für die optische Beurteilung mit Hilfe dieser Werte fiktive Kalibriergeraden (\triangle Min, Max, Abbildung 18) erstellt.

Die Steigungen der analysierten nDNA Kalibriergeraden überschritten bereits an Tag 1 teilweise die maximale Steigung von -3,49. Die y-Abschnitte hingegen waren innerhalb der festgelegten Grenzen (Abbildung 18, Anhang Tabelle 16). Die Steigungen und y-Abschnitte derselben Kalibriergeraden lagen an Tag 8 alle außerhalb der festgelegten Grenzen (Abbildung 18, Anhang Tabelle 16). Nach diesem Experiment zu urteilen wurden die nDNA-Kalibrierlösungen als sehr kurz (maximal ein Tag) haltbar eingestuft und die täglich frische Verwendung eines gefrorenen Standard-Aliquotes bevorzugt.

Bei den Kalibrierlösungen für die mtDNA-Kopiezahl-Quantifizierung lagen sowohl an Tag 1 als auch an Tag 8 die ermittelten Steigungen und y-Abschnitte innerhalb der Grenzen (Abbildung 18, Anhang Tabelle 16). Somit wurden die Kalibrierlösungen, hergestellt aus dem mtCytb-RT-

Ergebnisse und Diskussion

Standard, über einen Zeitraum von 8 Tagen als stabil eingestuft und maximal über diesen Zeitraum verwendet.

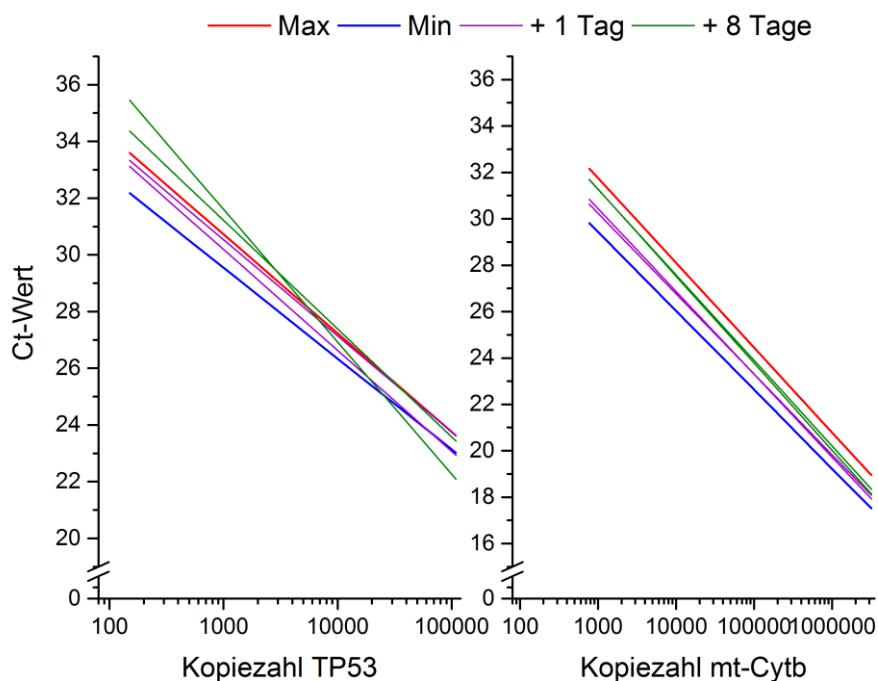


Abbildung 18 Stabilität der Kalibrierlösungen nach einer Lagerung bei 4°C. Dargestellt sind die anhand der Steigungen und y-Abschnitte von 14 frisch hergestellten und sofort vermessenen Kalibriergeraden fiktiv erstellten Kalibriergrenzen (Min/Max, Anhang Tabelle 14, Anhang Tabelle 15). Zudem wurden die die Kalibriergeraden-Verläufe des zweifach unabhängig durchgeführten Experimentes nach einem und acht Tagen Lagerung bei 4°C dargestellt.

3.3.5 Spezifität der Methoden

Nachdem die Methoden zur Kopiezahlquantifizierung des TP53- und des mt-Cytb-Gens entwickelt waren ([Kapitel 3.3.1](#), [Kapitel 3.3.2](#), [Kapitel 3.3.4](#)), sollte im nächsten Schritt experimentell untersucht werden, ob die Reaktionen spezifisch mt- oder nDNA detektieren und somit eine Überschätzung der Kopiezahl, welche eine Unterschätzung der Mutationsfrequenz zur Folge hätte, vermieden wird.

Dabei waren die notwendigen Voraussetzungen für den spezifischen Nachweis von n- bzw, mtDNA –nämlich spezifische Primer- nach Datenbankrecherche erfüllt ([nDNA: Kapitel 3.2.1.1](#), mtDNA: Anhang Tabelle 5).

Für den Nachweis der Primerspezifität wird im Optimalfall eine definierte Menge 100% reiner nDNA-Kopien mit einer definierten Menge 100% reiner mtDNA-Kopien miteinander gemischt und jeweils die nDNA- und mtDNA-Kopiezahlen der Ausgangslösungen (DNA-Lösung A und B) sowie der Mischlösung (DNA-Lösung C) mit der entwickelten TM-basierten RT-PCR ([Kapitel 3.3](#)) ermittelt. Nach einem statistischen Vergleich sollte im Falle spezifischer Primer kein Unterschied zwischen den mtDNA- bzw. nDNA-Kopiezahlen der DNA-Lösungen vor und nach der Mischung (nDNA: A=C, mtDNA: B=C) detektierbar sein.

Ergebnisse und Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 5 DNA-Isolierungsmethoden charakterisiert ([Kapitel 3.4](#)). Mit keiner Methode wurde eine 100% reine mtDNA- oder nDNA-Lösung erhalten. Somit wurden für den Nachweis der Primerspezifität bereits Ausgangslösungen eingesetzt, welche zwar nDNA- (A) oder mtDNA-reich (B) waren, nicht zuletzt jedoch beide DNA-Arten enthielten (Anhang Tabelle 17). Deshalb wurde die Summe an mtDNA- bzw nDNA-Kopien aus Lösung A und B (ΣAB) mit der jeweiligen Kopiezahl aus Lösung C verglichen.

Die nDNA-Kopiezahl der ΣAB unterschied sich statistisch signifikant (t-Test, $p < 0,01$; $p = 0,008$, Abbildung 19) zu der in C. Die mtDNA-Kopiezahl der ΣAB hingegen unterschied sich nicht signifikant zu der aus C (t-Test, $p < 0,05$; $p = 0,2004$).

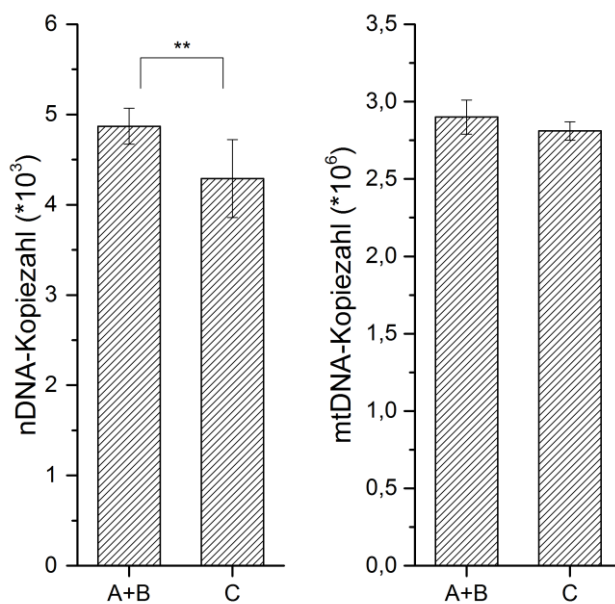


Abbildung 19 Primerspezifität. Vergleich der nDNA- (links) und mtDNA-Kopiezahlen (rechts) vor und nach Mischung (C) einer nDNA-reichen Lösung (A, verunreinigt mit mtDNA) mit einer mtDNA-reichen Lösung (B, verunreinigt mit nDNA). Dargestellt sind die mit Hilfe der TM®-basierten RT-PCR ([Kapitel 3.3](#)) ermittelten TP53- und mt-Cytb-Kopiezahlen. Der statistische Vergleich zwischen der Kopiezahl-Summe aus A und B (A+B) und C wurde mit dem t-Test ($p < 0,05$) durchgeführt (nDNA: $p = 0,008$; mtDNA: $p = 0,2004$).

Im Falle spezifischer Primer –egal ob mtDNA oder nDNA- sollte die Kopiezahl der ΣAB der Kopiezahl von C entsprechen. Detektiert die PCR-Reaktion unspezifisch DNA-Kopien, sollte die Kopiezahl in C erwartungsgemäß höher sein, da alle gewollten Kopien plus andere Kopien detektiert werden ($nDNA \Sigma A+B + mtDNA \Sigma A+B$). Da sowohl mit den nDNA- als auch mit den mtDNA-Kopiezahl-Primern in Lösung C weniger Kopien als in der ΣAB detektiert wurden, war davon auszugehen, dass die entwickelten TM-basierte RT-PCR-Methoden zur Quantifizierung der TP53- und mtCytb-Zielsequenz spezifisch sind.

Nachdem die Entwicklung der spezifischen Kopiezahlquantifizierungsmethoden für die Zielsequenzen in nDNA und mtDNA abgeschlossen war, sollten diese im Rahmen der Auswahl einer für den RMCA geeigneten DNA-Isolierungsmethode angewendet werden.

3.4 DNA-Isolierung

Zur Bestimmung der Mutationsfrequenzen mit dem RMCA wird nDNA oder mtDNA eingesetzt. Auch die Verwendung von gesamt (g) DNA ist prinzipiell möglich, sobald spezifische Primer gewährleistet sind. Voraussetzung für die Anwendung des RMCA ist die Verwendung von intakter, konzentrierter und reiner DNA. In dieser Arbeit wurden 5 verschiedene DNA-Isolierungs-Methoden –inklusive der üblicherweise im RMCA eingesetzten Phenol/Chloroform-Methode (Vermulst et al., 2008a) sowie einem zeitlich effektiven Säulen-basierten Kit – miteinander hinsichtlich einer für die Bestimmung der Mutationsfrequenz ausreichenden Kopiezahlausbeute, der Reinheit (Kontamination mit n bzw. mtDNA, Salze) und nicht zuletzt dem Kosten-/Zeitaufwand verglichen.

Die Methoden

Für den Vergleich wurden DNA-Isolierungsmethoden gewählt, welche gDNA oder nDNA und mtDNA extrahieren. Zur Gewinnung der gDNA wurde die DNA-Isolierung mit DNAzol® (DNZ, [Kapitel 6.5.3.1](#)), mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (modifiziert nach Vermulst et al. (2008); Vg, [Kapitel 6.5.3.5](#)) oder mit dem Silicasäulen-basierten peqGOLD Tissue DNA Mini Kit (PG, [Kapitel 6.5.3.2](#)) durchgeführt. Die getrennte Isolierung von nDNA und mtDNA erfolgte nach Organellseparierung ebenso mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol nach der Methode von Vermulst et al. (2008, nDNA-Fraktion: Vn; mtDNA-Fraktion: V mt, [Kapitel 6.5.3.3](#)) oder zur Gewinnung möglichst noch strikter getrennter Fraktionen mit zusätzlichen Schritten bei der Organellseparierung nach Borralho et al. (2015, mtDNA-Fraktion: V+ mt), wobei für die nDNA je eine Fraktion nach Zentrifugation bei 600 g (V+ n600) und nach 1000 g (V+ n1000) erhalten wurde.

Jede einzelne Methode bringt Vor- und Nachteile mit sich (Tabelle 6). Welche letztlich für eine Anwendung im nukleären und/oder mitochondrialen RMCA geeignet ist, sollte nun geprüft werden.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 6 Übersicht der in dieser Arbeit verglichenen DNA-Isolierungsmethoden zur Isolierung von Gesamt (g)-, nukleärer (n)- oder mitochondrialer (mt)DNA. Für die DNA-Isolierung wurden angewendet: DNAzol® (DNz), das peqGOLD Tissue DNA Mini Kit (PG) sowie die Methode nach Vermulst et al. (2008, V n und V mt), welche zur Gewinnung von gDNA (V g) oder noch reineren mtDNA (V+ mt) bzw. nDNA (V+ n)-Lösungen leicht modifiziert wurde. Angegeben sind die Empfehlungen/Beschränkungen zum Materialeinsatz, der Durchführungsdauer und Kosten für eine Probe sowie eine kurze Beschreibung der Methode. Zudem ist ein Verweis auf die exakte Methodenbeschreibung angegeben.

DNA	Methode	Material	Dauer	Beschreibung	Kosten/ Probe (€)	Info
gDNA	DNz	1-3*10 ⁷ Zellen 25-50 mg Gewebe 0,1 ml Vollblut	10-30 min	gebrauchsfertiges Guanidin-Detergenz-Lyselösung keine extra Lyse notwendig 70-100% DNA-Rückgewinnung	2,80	Kapitel 6.5.3.1 , https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/10503027
	PG	5*10 ⁶ Zellen 40 mg Gewebe 1 cm Mäuseschwanzstücke	30 min + ca. 2 h Lyse	Keine organische Extraktion, keine Alkoholfällung Abtrennung von Enzyminhibitoren oder Kontaminationen Degradierung der zellulären RNA DNA bis 60 kpb Bindekapazität: 50 µg/Säule	1,87	Kapitel 6.5.3.2 , https://de.vwr.com/assetsvc/asset/de_DE/id/17035067/contents
	V g	Zellen, Gewebe oder Blut im mg-g-Bereich	2, 25 h + ca. 2 h Lyse+ über Nacht	Organische Extraktion mit PCI Ethanol-fällung	5,5	Kapitel 6.5.3.5
nDNA + mtDNA	V n und V mt	Zellen, Gewebe oder Blut im	3,5 h + ca. 2 h Lyse+ über Nacht	Getrennte nDNA- und mtDNA-Lösungen durch Organellseparierung mittels differentieller Zentrifugation,		Kapitel 6.5.3.3
	V+ mt, V+ n	mg-g-Bereich	4,5 h + ca. 2 h Lyse+ über Nacht	Organische Extraktion mit PCI, Ethanol-fällung	5,5	Kapitel 6.5.3.4

3.4.1 Benötigte Kopiezahl zur Bestimmung einer Mutationsfrequenz

Zu Beginn sollten die DNA-Isolierungsmethoden hinsichtlich einer ausreichenden Kopiezahl-Ausbeute für eine Dreifach-Bestimmung der Mutationsfrequenz aus einer TaqI-Verdauung verglichen werden. Dabei sollte gleichzeitig der Einfluss der zur DNA-Isolierung verwendeten Gewebemenge untersucht werden.

Erwartungswerte

nDNA

Bei einer erwarteten Spontanmutationsfrequenz von $1-3 \cdot 10^{-8}$ /bp im Intron (Zheng et al., 2007; Bielas und Loeb, 2005) und geschätzt $2-3 \cdot 10^{-9}$ /bp im Exon (basierend auf phänotypselektiven Tests) wurden unter der Annahme einer Detektion von 8 mutierten Kopien $0,7-2,0 \cdot 10^8$ (Intron) bzw. $7,0-10,0 \cdot 10^8$ (Exon) nDNA Kopien für die einmalige Durchführung des RMCA benötigt. Für eine 3-fach abhängige Bestimmung der Spontanmutationsfrequenz einer Probe wurden dementsprechend $2,1-6,0 \cdot 10^8$ (Intron) bzw. $21,0-30,0 \cdot 10^8$ (Exon) nDNA-Kopien gebraucht.

mtDNA

Die Spontanmutationsfrequenz der mtDNA wird in der Literatur -abhängig vom Alter der Tiere- zwischen $6-100 \cdot 10^{-7}$ /bp (Vermulst et al., 2007) angegeben. Umgerechnet sind somit -bei einer angenommenen Detektion von 8 mutierten Kopien- $0,2-3,3 \cdot 10^6$ mtDNA-Kopien für die Durchführung eines RMCA notwendig. D.h. bei einer 3-fach abhängigen Bestimmung der Spontanmutationsfrequenz einer Probe werden $0,6-9,9 \cdot 10^6$ mtDNA-Kopien benötigt.

Durchführung

Vor der eigentlichen DNA-Isolierung wurde das Gewebe unter flüssigem Stickstoff mit einem Mörser pulverisiert und homogenisiert. Um einen Eindruck über die Methodenschwankung zu bekommen, wurde die DNA-Isolierungen je Methode und je Gewebepulvereinwaage (willkürlich gewählt: 12,5 mg, 25 mg, 50 mg und 100 mg) 3-mal durchgeführt. Die Kopiezahl wurde in der anschließenden TM-basierten RT-PCR (Kapitel 3.23) 2-fach abhängig in allen erhaltenen Fraktionen (gDNA, nDNA und mtDNA) bestimmt. Wenn innerhalb der Methode die Möglichkeit bestand präzipitierte DNA zu häkeln, wurde die nDNA-Kopiezahl in der Lösung mit der gehäkelten DNA sowie der resultierenden restlichen Lösung (Rest) quantifiziert. Um die spätere Vergleichbarkeit der mittels RT-PCR bestimmten Kopiezahlen zu gewährleisten, wurde für den gesamten Versuch dasselbe Gewebepulver³ zur DNA-Isolierung eingesetzt.

³ Um im gleichen Zuge abzuschätzen, ob der RMCA innerhalb anderer arbeitskreisinterner Projekte potentiell anwendbar ist, wurde das Gewebepulver aus Teilen des Brustgewebes von 15 August Copenhagen Irish (ACI)-Ratten gewonnen. Dabei stammten die Ratten aus einem Ratten-Modell zur Estrogen-induzierten Tumorentstehung.

3.4.1.1 Kopiezahlausbeute nDNA

Die relativen Schwankungen der nDNA-Kopiezahlbestimmungen innerhalb der einzelnen Isolierungs-Methoden variierten unabhängig vom Gewebeeinsatz stark. Dabei wurden Mediane (n=4) innerhalb einer Methode von 28% (V+ n1000) bis 74% (PG, Anhang Tabelle 18) ermittelt. Auf Grund dieser hohen relativen Schwankungen war ein Methodenvergleich an Hand der Kopiezahlausbeute nicht möglich. Da auch eine Datenergänzung durch weitere Wiederholungen der DNA-Isolierungen auf Grund von nicht ausreichendem Gewebepulver nicht möglich waren, wurde für die Auswertung vom *worst-case*- Szenario ausgegangen und nur die Minima herangezogen.

Beim Einsatz von 12,5 mg sowie 50 mg Gewebepulver wurde die höchste nDNA-Kopiezahl in der Vn Fraktion ermittelt (Abbildung 20). Mit 25 mg Gewebepulver war der höchste Minimum-Wert in der V+ n600 Fraktion. Bei 100 mg wurde die höchste nDNA-Kopiezahl in der mitochondrialen Fraktion Vmt ermittelt.

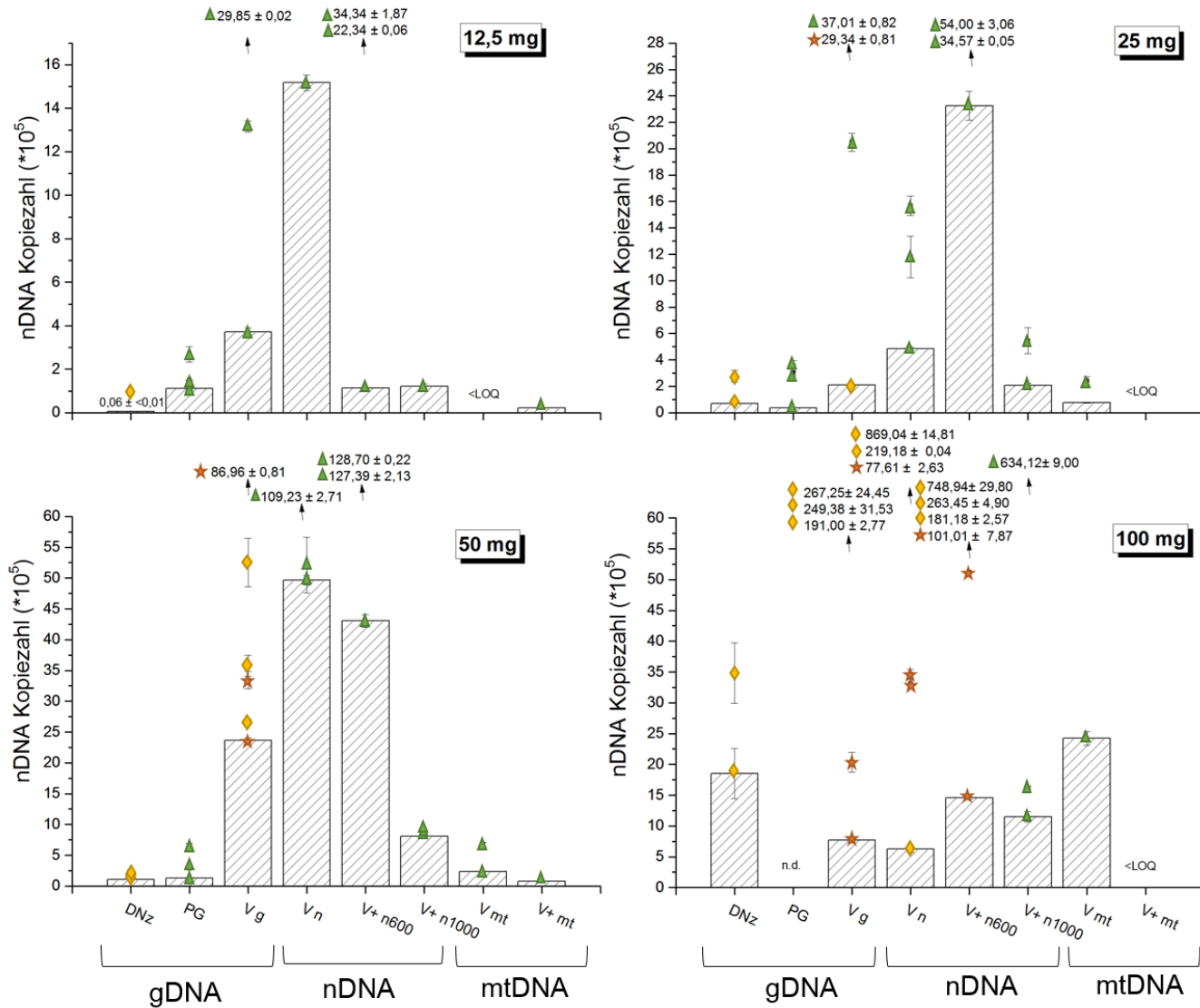
Unter Berücksichtigung, dass in der späteren Praxis auf Grund des erwarteten hohen Salz- und niedrigen DNA-Gehaltes die Rest-Lösungen möglichst nicht verwendet werden sollen, wurden die Kopiezahlausbeuten in den jeweiligen Fraktionen nochmals miteinander verglichen und diesmal keine Rest-Lösungen ausgewertet. Bei einem Einsatz von 12,5 mg-25 mg Gewebepulver blieb das Resultat gleich. Nach Verwendung von 100 mg Gewebepulver wurde das höchste Kopiezahl-Minimum nun in der Fraktion Vg, der zweit-höchste Wert in der V+ n600 Fraktion ermittelt (Abbildung 20). Da die höchsten nDNA-Kopiezahlwerte nahezu alle in einer nDNA-Fraktion waren, wurde eine Trennung in nDNA und mtDNA für alle zukünftigen DNA-Isolationen als sinnvoll erachtet.

Die Kopiezahlen stiegen wie erwartet proportional zum Gewebeeinsatz. Nichtsdestotrotz wurde bei den eingesetzten Gewebemengen weder mit der Methode von Vermulst et al. (2008) noch mit der erweiterten Methode von Vermulst et al. (2008) & Borralho et al. (2015) der angestrebte Kopiezahlbereich von $700-2000 \cdot 10^5$ (Intron) und $7000-10000 \cdot 10^5$ für die Bestimmung von Spontanmutationsfrequenzen erreicht.

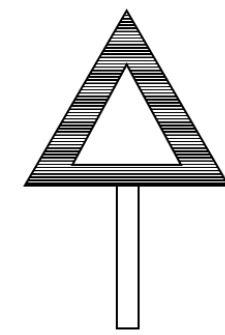
Durch die Steigerung der Gewebemenge auf 400 mg (Wright et al., 2011) bzw. 400 µg gDNA (Bielas et al., 2006) ist potentiell die Isolierung von 1310 nDNA Kopien möglich⁴. Somit wäre eine Bestimmung der Spontanmutationsfrequenz im Intron durchführbar. Für die Ermittlung von Spontanmutationsfrequenzen im Exon müssten demnach schätzungsweise 2100-3000 µg gDNA bzw. die 5-8-fache Gewebemenge-eingesetzt werden.

⁴ Die Berechnung erfolgte auf Grund der Annahme, dass die gDNA zu 99,9% aus nDNA und 0,1% aus mtDNA besteht (Daten nicht gezeigt). Mit Hilfe des *copy number calculators* wurde die Masse in Kopien zurück gerechnet. Länge nDNA: 2,83 Gb. Länge mtDNA 16309 bp.

Ergebnisse und Diskussion



- ▲ nicht gehäkelt
- ◆ gehäkelt
- ★ Rest (4°C)



Zielkopiezahl nDNA (*10⁵)
 700-2000 (Intron)
 7000-10000 (Exon)

Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 20 Vergleich der DNA-Isolierungsmethoden an Hand der nDNA-Kopiezahlen. Die DNA wurde bei jeder Methode (DNAzol, DNz; PeqGold-Kit, PG; Vermulst Gesamt-DNA, Vg; Vermulst, V; Vermulst erweitert, V+) drei Mal unabhängig isoliert und die Kopiezahl anschließend mittels *TaqMan*-basierter Realtime PCR zweifach abhängig bestimmt. Die Ausbeuten sind auf die Einwaagen 12,5 mg, 25 mg, 50 mg und 100 mg normiert. Auf Grund von Herstellerangaben wurden für die PG-Methode maximal 40 mg eingesetzt. Die DNA ist je nach Methode und Gewebeeinsatz in solchen Mengen ausgefallen, dass sie gleich gehäkelt wurde (gelbe Raute) oder über Nacht im Kühlschrank präzipitiert (grünes Dreieck) ist. Falls die DNA gehäkelt wurde, wurde die restliche Lösung ebenfalls über Nacht im Kühlschrank gelagert und deren Kopiezahl quantifiziert (roter Stern). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm range/2 dargestellt, wobei die Minima (Säulen) als Säulen dargestellt wurden. n.d., nicht bestimmt, <LOQ unterhalb der Bestimmungsgrenze von 145 Kopien.

Ergebnisse und Diskussion

Theoretisch detektierbare Mutationsfrequenzen der nDNA

Oftmals steht diese Gewebemenge bei projektübergreifenden Versuchen jedoch nicht zur Verfügung. Somit ist die Bestimmung von Spontanmutationsfrequenzen in der nDNA limitiert. Um zu ermitteln, welche Mutationsfrequenzen abhängig vom Gewebeeinsatz theoretisch sicher bestimmbar wären, wurden die quantifizierten nDNA-Kopiezahl-Minima verwendet und theoretische Mutationsfrequenzen/bp berechnet.

Unter der Annahme von 8 mutierten nDNA Kopien sind bei jeder DNA-Isolierungsmethode in jeder Fraktion mit der höchstmöglichen Einwaage -in diesem Fall 100 mg- die niedrigsten Mutationsfrequenzen/bp detektierbar (Anhang Tabelle 19). Mit der nDNA aus den Fraktionen Vg, Vn und V+ n600 wären Mutationsfrequenzen im Bereich von $1,0 \cdot 10^{-7}/\text{bp}$ (Vg, V+ n600) bis $2,6 \cdot 10^{-7}/\text{bp}$ (Vn) bestimmbar. Dieser Bereich liegt ca. um das 3-10-fache (Intron) bzw. 34-130-fache (Exon) höher als der Erwartungsbereich für Spontanmutationsfrequenzen der nDNA.

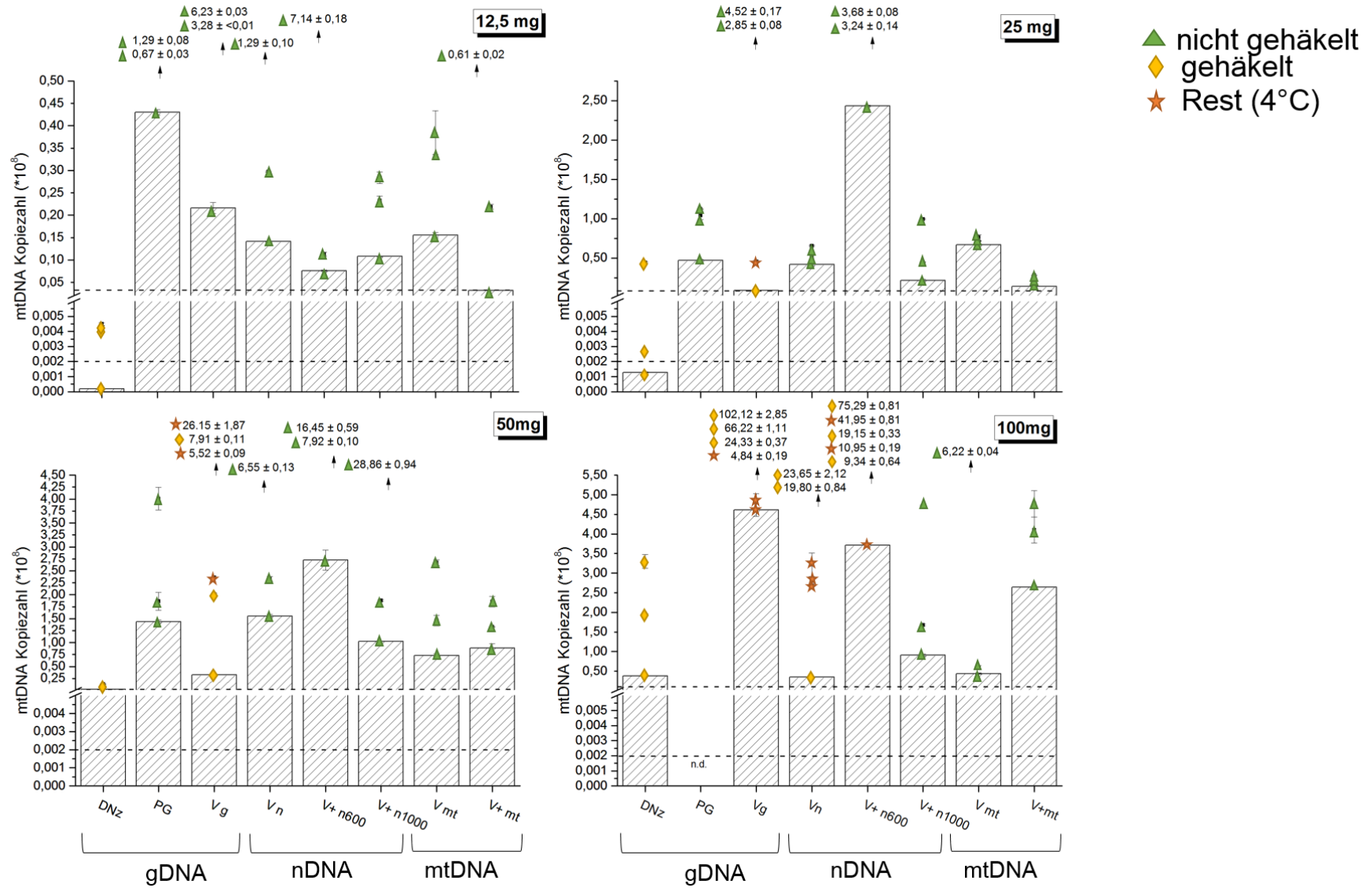
Möglicherweise ist der mit 100 mg Gewebepulver detektierbare Mutationsfrequenzbereich von $10^{-7}/\text{bp}$ jedoch für die Bestimmung von induzierten Mutationsfrequenzen interessant.

3.4.1.2 Kopiezahlausbeute mtDNA

Wie bereits bei der nDNA beschrieben ([Kapitel 3.4.1.1](#)) variierten auch die relativen Schwankungen der mtDNA-Kopiezahlbestimmungen innerhalb der einzelnen DNA-Isolierungs-Methoden unabhängig vom Gewebeeinsatz stark. Dabei wurden Mediane (n=4) innerhalb einer Methode von 37% (V+ mt) bis zu 106% (PG, Anhang Tabelle 20) ermittelt. Auf Grund dieser hohen relativen Schwankungen war eine aussagekräftige Dateninterpretation über alle Werte schwierig. Deshalb wurden auch in diesem Fall nur die Kopiezahl-Minima für eine Auswertung herangezogen.

Die höchsten Kopiezahl-Minima wurden in den Fraktionen PG (12,5 mg), V+ n600 (25 mg, 50 mg) sowie Vg ermittelt. Die pro Gewebeeinsatz niedrigsten Kopiezahl-Minima wurden in den Fraktionen DNz (12,5 mg, 25 mg, 50 mg) und Vn (100 mg) bestimmt (Abbildung 21). Für die Bestimmung von einer Mutationsfrequenz im Bereich von $6-100 \cdot 10^{-7}/\text{bp}$ sind $0,002-0,003 \cdot 10^8$ mtDNA-Kopien notwendig (Annahme: Detektion von 8 Mutanten). Bei der DNA-Isolierungsmethode DNz sowie einem Gewebeeinsatz <50 mg lagen die Minima unter diesem angestrebten Bereich. Mit allen anderen DNA-Isolierungsmethoden wurde unabhängig vom Gewebeeinsatz die angestrebte mtDNA-Kopiezahl erreicht.

Ergebnisse und Diskussion



Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 21 Vergleich der DNA-Isolierungsmethoden an Hand der mtDNA-Kopiezahlen. Die DNA wurde bei jeder Methode (DNAzol, DNz; PeqGold-Kit, PG; Vermulst Gesamt-DNA, Vg; Vermulst, V; Vermulst erweitert, V+) drei Mal unabhängig isoliert und die Kopiezahl anschließend mittels *TaqMan*-basierter Realtime PCR zweifach abhängig bestimmt. Die Ausbeuten sind auf die Einwaagen 12,5 mg, 25 mg, 50 mg und 100 mg normiert. Auf Grund von Herstellerangaben wurden für die PG-Methode maximal 40 mg eingesetzt und für die Auswertungen auf 50 mg normiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm range/2 dargestellt. Die Säulen stellen die minimalen ausbeuten dar. n.d., nicht bestimmt, <LOQ unterhalb der Bestimmungsgrenze von 145 Kopien.

Ergebnisse und Diskussion

Zur weiteren Einschätzung welche DNA-Isolierungsmethode sich für die Anwendung im RMCA eignet, wurde als nächstes die Häufigkeit der nichtquantifizierbaren DNA-Lösungen ermittelt ([Kapitel 3.4.2](#)).

3.4.2 Häufigkeit nichtquantifizierbarer DNA

Unabhängig von der Kopiezahlausbeute sollte die DNA zunächst einmal quantifizierbar sein. Deshalb wurde ausgewertet, in wievielen DNA-Lösungen die mtDNA-Kopiezahl bzw. die nDNA-Kopiezahl kleiner als die Bestimmungsgrenze von 775 Kopien/121 Kopien (Tabelle 5) war.

In allen Fraktionen war die mtDNA immer und unabhängig von der eingesetzten Gewebemenge quantifizierbar (Anhang Tabelle 21). Die Häufigkeit nicht quantifizierbarer nDNA war erwartungsgemäß in den mtDNA-Fraktionen höher (V mt: 58%, V+ mt: 83%) als in den nDNA- (Vn: 17%, V+ n600 0%, V+ n1000 25%) oder gDNA-Fraktionen (PG, 0%, Vg 0% und DNz 25%). Somit war die Trennung der Organellen vor der DNA-Isolation zur Gewinnung von weitestgehend reinen nDNA- bzw mtDNA-Lösungen zielführend.

Dennoch ist anzumerken, dass bei keiner Methode und bei keiner der verwendeten Gewebemengen eine 100%ig reine mt- oder nDNA-Lösung erhalten wurde. Deshalb wurde als nächstes analysiert wie stark die erhaltenen Fraktionen konkret verunreinigt waren ([Kapitel 3.4.3](#)) und ob/welche Auswirkungen dies auf die mögliche Anwendung im RMCA hat.

3.4.3 Reinheit der DNA-Lösungen

Jede mtDNA-Kopie besitzt 30 *TaqI*-Schnittstellen ([Kapitel 3.2.2.2](#)). Im Gegensatz dazu hat bereits eine nDNA-Kopie durchschnittlich 1,6 Millionen⁵ *TaqI*-Schnittstellen. Somit trägt der Anteil an nDNA-Kopien in der zur Bestimmung der Mutationsfrequenz der mtDNA verwendeten DNA-Lösung massiv zur Gesamtanzahl der *TaqI*-Schnittstellen bei. Um im RMCA keine falsch positiven Mutanten zu detektieren, muss ein vollständiger *TaqI*-Verdau gewährleistet sein. Deshalb sollte nicht nur geprüft werden, ob und ggf. wie stark eine Verunreinigung mit nDNA-Kopien in den DNA-Lösungen vorlag, sondern auch in wiefern dies den *TaqI*-Verdau beeinflusst.

Ausgewertet wurde der prozentuale Anteil an nDNA *TaqI*-Schnittstellen im Bezug auf die Gesamtanzahl an *TaqI*-Schnittstellen (mtDNA und nDNA) der DNA-Lösung mit der minimalsten mtDNA-Kopiezahl (*worst-case*). Im Falle, dass in dieser Lösung die nDNA-Kopien

⁵ Die Zahl (1616191 bp) wurde ermittelt, indem je Chromosom (ausgenommen X- und Y-Chromosom) zwei willkürlich gewählte Gene (ausgenommen X- und Y-Chromosom) auf die Anzahl der *TaqI*-Schnittstellen untersucht wurden (Anhang Tabelle 22). Es wurden insgesamt 2969 *TaqI*-Schnittstellen in 5191873 bp ermittelt. Anschließend wurde dies auf die Gesamtbasenzahl einer nDNA Kopie (2826224306 bp) extrapoliert.

Ergebnisse und Diskussion

unter der Bestimmungsgrenze lagen, wurde der prozentuale Anteil der nDNA *TaqI*-Schnittstellen auf zwei Weisen berechnet. Zum einen wurde die Bestimmungsgrenze von 121 Kopien nDNA zur Berechnung verwendet. Zum anderen wurde zusätzlich die nächst höhere DNA-Lösung mit quantifizierbaren nDNA-Kopien ausgewertet.

Die gDNA-Fraktionen hatten einen Anteil an nDNA *TaqI*-Schnittstellen zwischen 14,58% (DNz, 100 mg mit LOQ) und 99,99% (DNz, 12,5 mg, Anhang Abbildung 31). Die DNA-Lösungen der nDNA-Fraktionen wiesen Anteile zwischen 31,62% (V n, 12,5 mg mit LOQ) und nahe 100,00% (V+ n1000, 100 mg) auf. Bei den mtDNA-Fraktionen V mt und V+ mt wurden zwischen 2,40% (V+ mt, 100 mg und LOQ) und 98,77% (V mt, 25 mg) Anteile der nDNA *TaqI*-Schnittstellen ermittelt. Bezogen auf 1 µg Gesamt-DNA entsprechen alle Werte einer Spanne von ca. $1 \cdot 10^{11}$ bis $1 \cdot 10^{12}$ *TaqI*-Schnittstellen, welche von der nDNA-Verunreinigung herrühren.

Das innerhalb der Arbeit verwendete *TaqI*-Enzym (Thermo Scientific, #ER0671) schafft bei Verwendung von 1 U einen kompletten Verdau von 1 µg λ-DNA (Herstellerangabe). Die λ-DNA ist 48502 bp lang (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/J02459.1>, Stand 07.04.2017) und hat 113 *TaqI*-Schnittstellen (ermittelt mit ApE, [Kapitel 6.5.0](#)), d.h. rund 1 *TaqI*-Schnittstelle pro 429,2 bp. Umgerechnet auf 1 µg entspricht dies $1,9 \cdot 10^{10}$ Kopien λ-DNA und somit $2,2 \cdot 10^{12}$ *TaqI*-Schnittstellen. Üblicherweise wird der *TaqI*-Verdau im RMCA mit mindestens 500 U durchgeführt (Vermulst et al., 2008a; Vermulst et al., 2007; Bielas und Loeb, 2005), d.h. es könnten potentiell $1,1 \cdot 10^{15}$ *TaqI*-Schnittstellen geschnitten werden. Da die Verunreinigungen schon bis zu 99,99% der Gesamtanzahl der *TaqI*-Schnittstellen ausmachten und sich nur in der Größenordnung von 10^{11} - 10^{12} befanden, sollte der Verunreinigungsgrad der DNA-Lösungen theoretisch keinen Einfluss auf die Vollständigkeit des *TaqI*-Verdau haben.

Nichtsdestotrotz nahm der Verunreinigungsgrad mit nDNA tendenziell von den mtDNA-Fraktionen über die nDNA-Fraktionen bis zu den gDNA-Fraktionen zu (Anhang Abbildung 31).

Die Reinheit der DNA-Lösung lässt sich nicht nur über die bestehenden DNA-Kontaminationen beschreiben. Substanzen, wie beispielsweise Acetat, EDTA oder Ethanol können die PCR inhibieren und somit einer korrekten Quantifizierung der Kopiezahl entgegenstehen. Deshalb sollte nun geprüft werden, welche DNA-Isolierungsmethoden möglichst frei von PCR-Inhibitoren sind ([Kapitel 3.4.4](#)).

3.4.4 Gehäkelte DNA als Templat

Prinzipiell bestehen 2 Varianten inhibierender Substanzen in der DNA-Lösung zu vermeiden:

- a. Innerhalb der Methode werden per se alle inhibierenden Substanzen abgetrennt.
- b. Es wird präzipitierte, gehäkelte und gewaschene DNA verwendet.

Ergebnisse und Diskussion

Im nächsten Schritt soll ausgewertet werden, bei welchen der in dieser Arbeit verwendeten DNA-Isolierungsmethoden und unter welchem Gewebeeinsatz eine der zwei genannten Varianten gegeben ist.

Unabhängig von Methode, DNA-Fraktion und eingesetzter Gewebemenge war zu keinem Zeitpunkt mtDNA häkelbar. Die nDNA ist einwaagenunabhängig weder bei den mtDNA-Fraktionen (Vmt, V+mt) noch bei der Fraktion V+ n1000 häkelbar gewesen. Einzig bei der höchsten Einwaage (100 mg) war in den beiden anderen nDNA-Fraktionen (Vn, V+ n600) sofort DNA präzipitiert. Im Gegensatz dazu ist bei den Methoden zur gDNA-Isolierung in 100% (DNz) und 58% (Vg) DNA häkelbar gewesen (Anhang Tabelle 23). Da die PG-Methode Säulen-basiert die DNA isoliert, fällt per se zwar keine DNA zum häkeln aus, jedoch wird die Abtrennung von Enzyminhibitoren und der RNA gewährleistet.

Unter dem Gesichtspunkt einer inhibitorfreien DNA-Lösung eignen sich für den Einsatz im RMCA somit die Methoden Dnz und PG. Einwaagenabhängig sind zudem die Methoden Vg, V (Vn) und V+ (V+ n600) geeignet.

3.4.5 Fazit

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die nDNA Kopiezahlausbeute unabhängig von der eingesetzten Gewebemenge bei keiner in dieser Arbeit getesteten DNA-Isolierungsmethode ausreichend für die Bestimmung einer Mutationsfrequenz im Bereich von $1-3 \cdot 10^{-8}/\text{bp}$ im Intron (Zheng et al., 2007; Bielas und Loeb, 2005) und geschätzt $2-3 \cdot 10^{-9}/\text{bp}$ im Exon (basierend auf phänotypselektiven Tests) war. Deshalb wurde bei der Wahl einer geeigneten Methode zunächst im Hinblick auf eine Anwendung im mitochondrialen RMCA ausgewertet.

Die Kopiezahlausbeuten der mtDNA sind ab 50 mg Gewebeeinsatz bei jeder Methode ausreichend zur Bestimmung einer Spontanmutationsfrequenz zwischen $6-100 \cdot 10^{-7}/\text{bp}$ (Vermulst et al., 2007). Stehen nur kleinere Gewebemengen zur Verfügung erwies sich DNz auf Grund zu niedriger Kopiezahlausbeuten als ungeeignet. Die mtDNA war bei jeder Methode und in jeder Fraktion unabhängig vom Gewebeeinsatz quantifizierbar. Möglichst reine –also häkelbare und/oder salzfreie mtDNA wurde mit DNz, PG und zum Teil mit Vg, Vn und V+ n600 erhalten, wobei unter den genannten einzig bei PG die gleichzeitige Kontamination mit nDNA gering war. Wird das Kriterium der häkelbaren/salzfreien DNA zurückgestellt, war die Kontamination mit nDNA zudem in den Fraktionen V mt und V+ mt gering (Tabelle 7).

Bei Betrachtung der Kosten und dem Zeitaufwand liegt PG mit 1,87€/Probe und ca. 2,5 h vor Vg, Vn/Vmt und V+ n/V+ mt (ca. 1 Tag, Tabelle 6).

Somit ist für die Anwendung im mitochondrialen RMCA die Verwendung von PG optimal. Je nach Anwendungsziel eignen sich auch Vn/ Vmt. Die auf Grund zusätzlicher

Ergebnisse und Diskussion

Zentrifugationsschritte länger andauernde und in ihren Kopiezahlen reduzierte V+ Methode eignet sich in besonderen Fällen zur weiteren Aufreinigung der DNA-Fractionen.

In der Literatur beschriebene RMCA-Mutationsfrequenzen wurden in der Hauptsache in DNA bestimmt, welche mit einer Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließender Ethanolfällung isoliert wurde (Vermulst et al., 2008a; Bielas und Loeb, 2005). Für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde in dieser Arbeit deshalb die DNA mit der Methode Vn/Vmt isoliert.

Tabelle 7 Zusammenfassende Übersicht zu den DNA-Isolierungsmethoden für die Gesamt-DNA- (DNAzol, DNz; PeqGold Kit, PG; Vermulst, V g), nDNA- (Vermulst, V n; Vermulst und Borralho; V+ n600, V+ n1000) und die mtDNA-Fractionen (Vermulst, V mt; Vermulst und Borralho, V+ mt). Angegeben ist, ob die mtDNA und nDNA Kopiezahlen (KoZa) quantifizierbar (>LOQ) waren. Zudem ist dargestellt, ob die mtDNA Kopiezahl abhängig von der eingesetzten Gewebemenge (12,5 mg, 25,0 mg, 50,0 mg und 100,0 mg) für die Durchführung eines mitochondrialen RMCA's ausreichend war. Zudem ist zusammengefasst, wie stark der prozentuale Anteil an nDNA *TaqI*-Schnittstellen (% *TaqI*-SS) in den DNA-Lösungen ist. Außerdem ist aufgelistet, ob die Methode ein Häkeln der präzipitierten DNA erlaubt bzw. per se eine salzfreie DNA-Lösung generiert. +, trifft immer zu; -trifft nie zu; ↑, mindestens bei einer Gewebemenge ≥99,99%; ↓, mindestens bei zwei Gewebemengen ≤99,00%; ↔, zwischen ↓ und ↑.

	>LOQ		KoZa RMCA mtDNA		Reinheit	
	mtDNA	nDNA	12,5/25,0	50,0/100,0	% <i>TaqI</i> -SS	häkelbar/salzfrei
DNz	+	9/12	-	+	↑	+
PG	+	+	+	+	↓	+
V g	+	+	+	+	↑	7/12 (ab 50 mg)
V n	+	10/12 (ab 25 mg)	+	+	↔	3/12 (nur 100 mg)
V+ n600	+	+	+	+	↔	3/12 (nur 100 mg)
V+ n1000	+	9/12 (ab 50 mg)	+	+	↑	-
V mt	+	5/12	+	+	↓	-
V+ mt	+	2/12	+	+	↓	-

3.4.6 Ausblick nukleärer RMCA

Auf Grund dessen, dass im Rahmen dieser Arbeit das zur Verfügung stehende Rattengewebe projektübergreifend genutzt wurde, war nicht ausreichend Gewebe vorhanden um mit 2100-3000 µg gDNA bzw. 2,0-3,2 g Gewebe (pro Bestimmung) eine Spontanmutationsfrequenz im Exon zu ermitteln.

3.4.6.1 Kritische Punkte im nukleären RMCA

Zudem sind die Anreicherung der Zielsequenz durch Hybridisierung der an magnetische *beads* gekoppelten biotinylierten DNA-Sonde als auch der nachfolgende UDG-Verdau der Uracilhaltigen, biotinylierten DNA-Sonde als kritische Punkte innerhalb des nukleären RMCAs zu betrachten:

a. Anreicherung durch Hybridisierung

Die Anreicherung soll die Zielsequenz von den anderen nukleären Sequenzen trennen, um beispielsweise die Effizienz des *TaqI*-Verdau der Zielsequenz zu steigern. Zudem soll die Entstehung möglicher Nebenprodukte in einer PCR (Kopiezahl- und Mutations-PCR) durch unspezifische Primerbindungen unterbunden werden. Die Anreicherung der Zielsequenz findet durch die Hybridisierung an eine biotinylierte DNA-Sonde ([Kapitel 3.2.1.2](#)), welche über Streptavidin an magnetische *beads* gekoppelt ist, statt. Für die Anreicherung der Zielsequenz wurde das *Dynabeads*-M-280-Streptavidin Kit empfohlen (Bielas und Loeb, 2005). Dass es sich bei der Anreicherung um einen heiklen Schritt des RMCAs handelt, war bereits an der Methodenbeschreibung von Bielas und Loeb (2005) erkennbar. So hoben sie etwa hervor, dass die gewaschenen *Dynabeads* keinesfalls gelagert werden dürfen und die Hybridisierungseffizienz zwischen biotinylierter Sonde und Zielsequenz durch die Verwendung frisch synthetisierter DNA-Sonde steigt. Damit die Bindekapazität der *beads* (1 mg = 10 µg ds DNA) nicht reduziert wird, sollte während der Generierung des *Dynabeads*-DNA-Sonden Komplexes kein freies Biotin vorhanden sein. Auf Grund der Separierungs- und Waschschriffe im Rahmen der Generierung des *Dynabeads*-DNA-Sonden Komplexes (5x) und der anschließendes Hybridisierung (3x, <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/protocols/proteins-expression-isolation-and-analysis/immunoprecipitation-protocol/dynabeads-m-280-streptavidin.html>, Stand 02.03.2017) kann es zudem möglicherweise zu Kopiezahlverlusten kommen.

b. UDG-Verdau

Der UDG-Verdau folgt nach der Hybridisierung der Zielsequenz an die DNA-Sonde und dient dazu die DNA-Sonde, welche im Rahmen der Anreicherung verwendet wurde, zu

Ergebnisse und Diskussion

entfernen. Ein unvollständiger UDG-Verdau führt im schlechtesten Fall zu einer Detektion von Mutanten, die herstellungsbedingt von der Uracil-haltigen Sonde herrühren und welche nicht (auch nicht durch Sequenzierung) von den Mutanten der Probe unterschieden werden können.

Da die Reaktion zur Herstellung der Uracil-haltigen, biotinylierten TP53-Sonde bereits entwickelt war ([Kapitel 3.2.1.2](#)), sollte im nächsten Experiment ([Kapitel 3.4.1.3](#)) ermittelt werden wie die Mutationsfrequenz der hergestellten TP53-Sonde ist und welche Auswirkungen dies auf den nukleären RMCA hat.

3.4.6.2 Die Mutationsfrequenz der TP53-Sonde

Berechnung der erwarteten Mutationsfrequenz

Die theoretisch erwartete Mutationsfrequenz der TP53-Sonde berechnet sich aus der Anzahl an a) bereits vorhandenen Mutationen des Templats, b) der Fehlerrate der Taq-Polymerase sowie c) der Länge des PCR-Produktes. Innerhalb der ausgewählten SONDENSEQUENZ befinden sich zwei *TaqI*-Schnittstellen, dabei ist eine im Intron 1 und die andere im Exon 2 positioniert ([Kapitel 3.2.1.2](#)).

Die bislang anhand von phänotypselektiven Mutationstests geschätzte Spontanmutationsfrequenz im Exon beträgt $2\text{-}3 \cdot 10^{-9}$ bp (*worst case*: 1 mutiertes bp/ $5 \cdot 10^8$ bp). Wird diese Fehlerrate nun auf das Gesamtgenom der Ratte ($2,75 \cdot 10^9$ bp) bezogen, wurden durchschnittlich 5,5 Fehler pro Kopie erwartet. Im Gegensatz dazu wird für Intronsequenzen eine Mutationsfrequenz von $1,6\text{-}3 \cdot 10^{-8}$ publiziert (Zheng et al., 2007; Bielas und Loeb, 2005). Bezogen auf das Gesamtgenom der Ratte wurden für das Intron also 27,5 Fehler in einer Kopie erwartet. Wie wahrscheinlich ist es, dass diese Fehler genau in der Templatsequenz, welche mit der Mutations-PCR erfasst wird, vorhanden sind?

1. Vorhandene Mutationen des Templats für die TP53 Sondenherstellung

Zur Sondenherstellung mittels PCR wurden 50 ng gDNA eingesetzt. Da 99,9% der Masse die nDNA ausmacht (Daten nicht gezeigt), entsprach dies 16800 Kopien nukleärer dsDNA (copy number calculator; <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>) und somit $3,26 \cdot 10^7$ Basen innerhalb der SONDENSEQUENZ. Wird die geschätzte Fehlerrate von $2 \cdot 10^{-9}$ /bp für die Berechnung verwendet, besitzt jede 327.000ste Kopie der Sonde eine Mutation in der Sequenz um Exon 2 und bei der Fehlerrate von $1,6 \cdot 10^{-8}$ jede 15.210te Kopie der Sonde eine Mutation in der Sequenz in Intron 1 ([Anhang Kapitel 8.4.3](#)).

Schlussfolgernd hat bei einem Einsatz von 16800 Kopien (50 ng, [Kapitel 3.2.1.2](#)) das Templat in der für die Sondenherstellung relevanten Intronsequenz bereits 1 Mutation und das Templat

Ergebnisse und Diskussion

in der für die Sondenherstellung relevanten Exonsequenz 0 Mutationen. Dies wurde für die nachfolgenden Berechnungen im Zyklus 0 berücksichtigt.

b) und c) Fehlerrate Taq-Polymerase und Länge des PCR-Produktes

Taq-Polymerasen arbeiten je nach käuflich erworbenem Exemplar mit einer spezifischen Fehlerrate zwischen $2\text{-}3 \cdot 10^{-4}/\text{bp}$ (<https://www.neb.com/tools-and-resources/feature-articles/polymerase-fidelity-what-is-it-and-what-does-it-mean-for-your-pcr>, Stand 02.03.2017), ca. $3\text{-}6 \cdot 10^{-5}/\text{bp}$ (McInerney et al., 2014) und $8 \cdot 10^{-6}/\text{bp}$ (Cline et al., 1996). Das bedeutet, dass pro PCR-Zyklus eine definierte Menge an Fehlern entsteht. Zusätzlich werden ab dem 2. Zyklus die Fehler des vorherigen Zyklus manifestiert, sodass sich die Gesamtmenge an Mutationen anhäufen (Anhang Formel 5).

Innerhalb des RMCAs werden in der *TaqI*-Schnittstelle mutierte und nicht mutierte Kopien an Hand eines Restriktionsverdau mit *TaqI* unterschieden. Da dieses Restriktionsenzym auf Grund seiner Wechselwirkungen zur Erkennungssequenz nur doppelsträngige DNA schneidet ist jeder einzelne Fehler –also jede einzelne veränderte Base- relevant für die Berechnung der Mutationsfrequenz der Sonde.

Da die praktische Ermittlung der Mutationsfrequenz auf dem Vorhandensein einer intakten oder mutierten Restriktionsschnittstelle -bestehend aus den Basen TCGA- basiert, waren jedoch nur diese 4 Basen relevant für die weitere Berechnung der erwarteten Mutationsfrequenz der TP53-Sonde. Deshalb wurde im nächsten Schritt ermittelt, wie viele von der zuvor berechneten Anzahl an Fehlern in der *TaqI*-Schnittstelle sind (Formel 6).

Für die Ermittlung der Mutationsfrequenz der doppelsträngigen Sonde wurde nun der Fehler in der *TaqI*-Schnittstelle zum Zyklus n auf die Gesamtanzahl an Kopien zum Zyklus n bezogen (Formel 7).

Bei der Berechnung der Mutationsfrequenz der Sonde blieb bislang unberücksichtigt, dass die *TaqI*-Schnittstelle sowohl in einer/zwei/drei oder vier Basen mutiert sein (Wahrscheinlichkeit 0,4%) als auch eine Rückmutation (Wahrscheinlichkeit 0,02%) stattfinden kann (Anhang Formel 8 Formel 9 Formel 10). Dennoch würde dies innerhalb des RMCAs nur als eine mutierte Kopie detektiert werden. In diesem Fall würde die berechnete Mutationsfrequenz höher sein als die praktisch detektierte.

Berechnungen der theoretischen Mutationsfrequenz des Exon 2 und Intron 1 der TP53-Sonde (angenommene durchschnittliche Taq-Poylmerase Fehlerrate von $1 \cdot 10^{-5}/\text{bp}$) ergaben, dass nur bei einem Verbleib von weniger als 714 Kopien Sonde nach dem UDG-Verdau, keine falsch positiven Mutanten in die Bestimmung der Mutationsfrequenz mit eingehen.

Ergebnisse und Diskussion

Um zu prüfen, in wieweit die theoretischen Überlegungen mit der realen Mutationsfrequenz der mittels PCR hergestellten TP53-Sonde übereinstimmen, wurde als nächstes die Mutationsfrequenz dieser bestimmt.

Experimentell ermittelte Mutationsfrequenz der TP53-Sonde

Zunächst wurde die TP53-Sonde ($1 \cdot 10^8$ Kopien \triangleq eingesetzte Menge im nukleären RMCA) 5x mit *TaqI*-verdaut (Bielas und Loeb, 2005). Nach der Mutations-PCR (Verweis Kapitel) mit verdauter TP53-Sonde als Templat und den Mutations-Primern (Abbildung 3) sowie dem anschließenden Nachverdau mit *TaqI* ([Kapitel 6.5.6](#)) wurde eine Agarose-Gelelektrophorese zur Detektion der mutierten Kopien durchgeführt.

Insgesamt wurden ca. 3,3 Millionen TP53-Sondenkopien überprüft. Davon waren 130 in der *TaqI*-Schnittstelle mutiert. Daraus resultierte eine Mutationsfrequenz im Exon 2 der TP53-Sonde von $9,76 \cdot 10^{-6}/\text{bp}$ (Anhang Tabelle 24). Das bedeutet, dass ca. jede 100.000ste Kopie der untersuchten 3,3 Millionen in der *TaqI*-Schnittstelle des Exon 2 mutiert war. Dies ist um den Faktor 140 geringer als die berechnete Mutationsfrequenz.

Warum ist die tatsächliche Mutationsfrequenz um zwei Zehnerpotenzen geringer als berechnet?

Möglicherweise waren die detektierten mutierten TP53-Kopien mehrfach mutiert. Dies wurde durch die Agarose-Gelelektrophorese nicht erfasst und eine Unterschätzung der experimentell ermittelten Mutationsfrequenz wäre die Folge. Desweiteren würde eine geringere Fehlerrate der Taq-Polymerase als die zur Berechnung verwendeten $1 \cdot 10^{-5}/\text{bp}$ zu einer niedrigeren Mutationsfrequenz führen. Die berechnete Mutationsfrequenz der TP53-Sonde basierte zudem auf der Durchführung von 35 Zyklen. Möglicherweise war die PCR-Reaktion bereits ab einem früheren Zyklus limitiert, sodass die Berechnung der Mutationsfrequenz auf einen entsprechend früheren Zyklus bezogen werden müsste.

Wie dem auch sei, mit der ermittelten Mutationsfrequenz der TP53-Sonde von 1 mutierten Kopie in 100.000 muss innerhalb des RMCA bei einem UDG-Verdau der Verbleib von weniger als 100.000 Kopien gewährleistet sein, um keinen falsch positiven Mutanten zu erfassen und somit die Mutationsfrequenz nicht zu überschätzen.

3.4.6.3. Fazit

Die nDNA-Kopien sind nicht ausreichend für die Bestimmung einer spontanen Mutationsfrequenz im Exon 2 des TP53. Für die Anwendung des nukleären RMCA auf das Intron 1 sollten 400 mg Gewebe oder 400 μg gDNA eingesetzt werden, um die in der Literatur angegebenen Mutationsfrequenzen im Bereich von $1-3 \cdot 10^{-8}/\text{bp}$ im Intron zu bestimmen.

Ergebnisse und Diskussion

Im Falle, dass auf Grund von projektübergreifenden Versuchen maximal 100 mg Gewebe zur Verfügung stehen, sind Mutationsfrequenzen im Bereich von $1,0 \cdot 10^{-7}/\text{bp}$ (Vg, V+ n600) bis $2,6 \cdot 10^{-7}/\text{bp}$ (Vn) bestimmbar. Jedoch kann es im Zuge der Anreicherung der Zielsequenz durch Hybridisierung zu Kopiezahlverlusten kommen, welche die Erfassung von Mutationsfrequenzen im Bereich von $10^{-7}/\text{bp}$ zusätzlich erschweren würde.

Die Anreicherung hat den UDG-Verdau der Uracil-haltigen TP53-Sonde zur Folge. Diese wurde mittels PCR hergestellt und jede 100.000ste Kopie ist mutiert. Um im RMCA die ermittelte Mutationsfrequenz nicht zu überschätzen, muss somit gewährleistet werden, dass von den ursprünglich $1 \cdot 10^8$ eingesetzten Kopien Uracil-haltiger TP53-Sonde unter 100.000 Kopien übrig bleiben.

Um die Schwierigkeiten der Anreicherung (Kopiezahlverlust) und des UDG-Verdaus (mutierte Uracil-haltige TP53-Sonde) zu umgehen, ist der direkten Einsatz von nDNA im *TaqI*-Verdau möglich (Wright et al., 2011). Um jedoch eine Inhibierung der Amplifikation während der Mutationsdetektion zu vermeiden, ist die Menge an *TaqI*-Verdau-Lösung und somit gleichzeitig die Kopiezahl innerhalb einer Amplifikation limitiert. Somit ist für eine Bestimmung der Mutationsfrequenzen im Exon und Intron auch ohne Anreicherung eine hohe Kopiezahlkonzentration notwendig.

Nachdem die Kopiezahlausbeute der nDNA unabhängig von den geprüften DNA-Isolierungsmethoden nicht ausreichend für die Bestimmung einer Mutationsfrequenz im Exon war und zusätzlich weitere kritische Punkte innerhalb des RMCA vorhanden sind, welche zur Kopiezahlminimierung oder einer fehlerhaften Einschätzung der Mutationsfrequenz führen können ([Kapitel 3.4.6.1](#), [Kapitel 3.4.6.2](#)), wurde dessen Entwicklung für die TP53 Zielsequenz im Rahmen dieser Arbeit zurückgestellt und sich auf die verbleibende mitochondriale Zielsequenz fokussiert.

3.5 Erfassung mutierter DNA-Kopien

Die Bestimmung von Mutationsfrequenzen mit dem RMCA basiert auf der Erfassung und Quantifizierung in der *TaqI*-Schnittstelle nicht-mutierter ([Kapitel 3.3](#)) und mutierter DNA-Kopien des zu untersuchenden Genabschnittes.

Die Analyse, ob eine Kopie nicht-mutiert oder mutiert ist, findet mit Hilfe der Mutations-PCR statt. Um diese für die Zielsequenz im mt-Cytb-Gen zu etablieren, sollte ein Standard verwendet werden, der wie die später in der Anwendung des RMCA detektierten Kopien, in der *TaqI*-Schnittstelle mutiert ist. Deshalb wurde zunächst ein in der *TaqI*-Erkennungssequenz mutierter Standard (=Mutanten-Standard) hergestellt ([Kapitel 3.5.1](#)). Zudem sollte dieser Mutanten-Standard zukünftig auch als Positivkontrolle in den Mutations-PCRs fungieren.

Je geringer die Mutationsfrequenz ist, desto mehr Kopien müssen insgesamt untersucht werden um eine tatsächlich in der *TaqI*-Schnittstelle mutierte Kopie zu detektieren. Eine Möglichkeit Chemikalien, Materialien und somit Kosten zu sparen, wäre die Reduktion des Reaktionsansatzes. Deshalb sollte getestet werden, ob ein im Volumen minimierter Reaktionsansatz ebenso eine Amplifikation der Zielsequenz ermöglicht ([Kapitel 3.5.2](#)). Sobald die Reaktionsbedingungen optimiert sind, sollte abschließend getestet werden, ob unter diesen Umständen auch die Amplifizierung einer einzelnen Kopie in der Mutations-PCR gegeben ist ([Kapitel 3.5.3](#)).

3.5.1 Herstellung des Mutanten-Standards

Anforderungen

Für die Anwendung als Positivkontrolle sollte der Mutanten-Standard in der *TaqI*-Schnittstelle mutiert sein. Um sicherzustellen, dass der Mutanten-Standard innerhalb der PCR mit einer identischen Effizienz wie die Zielsequenz amplifiziert wird, sollten zudem die Sequenzlänge und die Basenpaarzusammensetzung der zu quantifizierenden Zielsequenz (Tabelle 1, Abbildung 11) entsprechen. Um Verunreinigungen mit dem Mutanten-Standard und somit falsch positiven Ergebnissen vorzubeugen, sollte die Sequenz eine Erkennungssequenz für ein anderes Restriktionsenzym als *TaqI* aufweisen.

3.5.1.1 Herstellung der Linkerstücke

Die Herstellung des mutierten Standards (Abbildung 22, [Kapitel 3.5.1.1](#), [Kapitel 3.5.1.2](#), [Kapitel 3.5.1.3](#)) erfolgte mittels *Overlap Extension* PCR (Widada et al., 2001a; Ho et al., 1989).

Ergebnisse und Diskussion

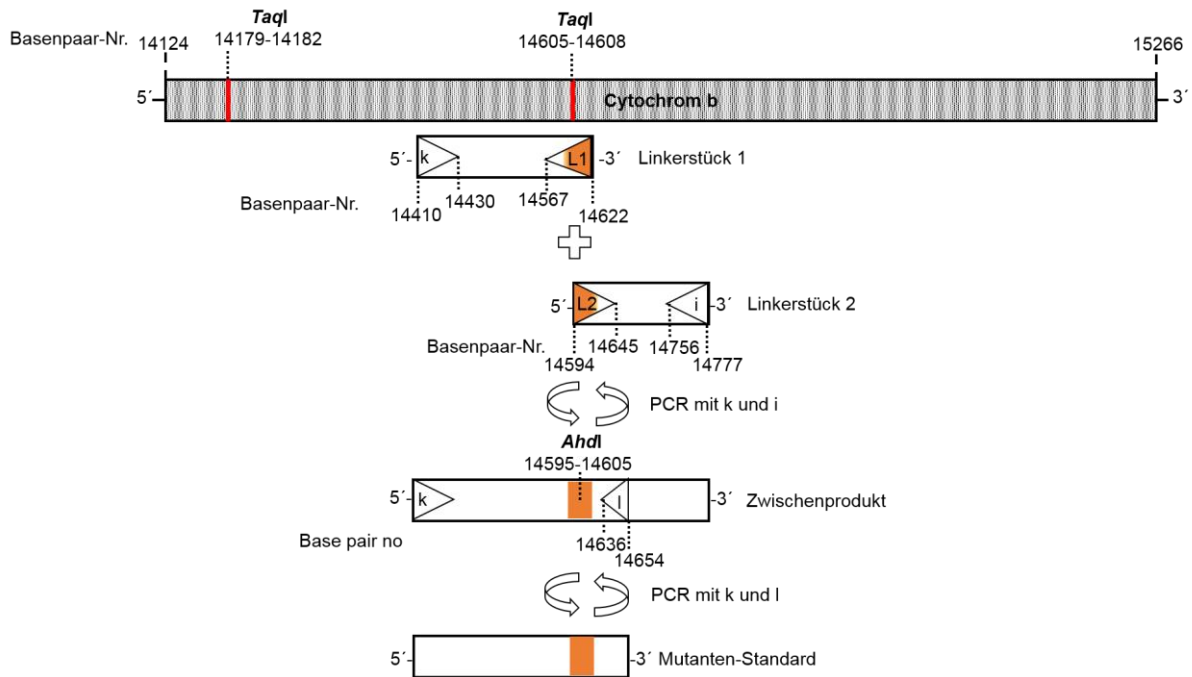


Abbildung 22 Position der Primer zur Herstellung des Mutanten-Standards mittels *Overlap extension* PCR für das mt-Cytb-Gen von *Rattus norvegicus*. Nach Herstellung der Linkerstücke 1 und 2 mit Hilfe der Primerpaare k/L1 und L2/i (Tabelle 8, Abbildung 11) wurden diese in einer *Overlap extension* PCR zu einem Zwischenprodukt zusammengeführt. In den Linkersequenzen (orange, Tabelle 8) wurde die *TaqI*-Erkennungssequenz (5'-TCGA-3') durch die Sequenz 5'-CCGA-3' ersetzt. Zusätzlich wurde eine Erkennungssequenz (für das Restriktionsenzym *AhdI*) in die Linkersequenz integriert (Tabelle 8). Der Mutantenstandard wurde im letzten Schritt mit Zwischenprodukt als Templat sowie den Mutations-Primern k und l amplifiziert.

Für die Generierung der Linkerstücke wurden Primerpaare entwickelt ([Kapitel 6.5.0](#), [Kapitel 6.5.1](#)), deren Linkersequenz (=der nicht zur DNA komplementäre Teil des Linker-Primers) nahezu die gleichen Basenverhältnisse wie die Originalsequenz aufwies, d.h. die Anteile an A und T waren identisch, die Base C war einmal mehr und G einmal weniger als in der Originalsequenz vertreten. Die Linkersequenz war 29 bp lang (Tabelle 8) und anstelle der *TaqI*-Erkennungssequenz (5'-TCGA-3') wurde die Sequenz 5'-CCGA-3' eingebaut. Zusätzlich wurde eine Erkennungssequenz (für das Restriktionsenzym *AhdI*) in die Linkersequenz integriert (Tabelle 8). Eine Bildung von Sekundärstrukturen (*hairpins*, *self dimere*) der Linker-Primer war theoretisch möglich.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 8 Sequenz der Primer und Linker-Primer (Link) zur Generierung der Linkerstücke 1 und 2 für das mt-Cytb-Gen der mtDNA von *Rattus Norvegicus*. **Fett**: Linkersequenz mit eingebauter *AhdI*-Erkennungssequenz (5'→3'**GACGATGCGTC**) und mutierter *TaqI*-Erkennungssequenz (**CCGA**). Rv, reverse; fw, forward.

Primer	Name und Sequenz (5'→3')	Länge (bp)	Amplifikat-Länge (bp)
Linkerstück 1			
k	TCCATGTGGGACGAGGACTAT	21 bp	
rv-Link	TTATTGACAGCTACTCGGACGCATCGTCT CCAATGTAAGGGATAGCTGATAATAGG	56 bp	184 bp+29 bp Linkersequenz
Linkerstück 2			
fw-Link	AGACGATGCGTCCGAGTAGCTGTCAATAA GCTTCTCAGTAGACAAAGCAACC	52 bp	155 bp+29 bp Linkersequenz
i	GATTTTGTCTGCGTCGGAGTTT	22 bp	

Mit den entwickelten Primerpaaren sollten als nächstes die Linkerstücke in einer PCR hergestellt werden. Um zu bestimmen, welche Menge an Templat dafür optimal ist, wurde eine Verdünnungsreihe von 50 ng - 0,005 ng mtDNA/PCR-Ansatz durchgeführt.

Nach Agarose-gelelektrophoretischer Trennung waren deutliche PCR-Banden in den erwarteten Größen (Linkerstück 1: 213 bp, Linkerstück 2: 184 bp) sichtbar (Anhang Abbildung 32). Beide Linkerstücke wurden ab einer Templatmenge von 0,005 ng mtDNA/PCR-Ansatz nicht mehr detektiert. Da bei keiner Templatmenge unspezifische Nebenprodukte zu sehen waren, wurden nachfolgend 50 ng/25 µl PCR-Ansatz für die Herstellung der Linkerprodukte verwendet, die PCR-Produkte aus den PCR-Ansätzen aufgereinigt und diese isolierten DNA-Lösungen als Templat für die Herstellung des Zwischenproduktes verwendet.

3.5.1.2 Herstellung des Zwischenproduktes

Um das Zwischenprodukt des mutierten Standards zu generieren, wurden die zuvor isolierten Linkerstücke miteinander in einer *Overlap Extension* PCR verknüpft. Als Positivkontrolle für die PCR wurden die entwickelten Kopiezahl-Primer (Tabelle 21) mit mtDNA als Templat verwendet. Nach gelelektrophoretischer Auswertung wurde das erwartete 368 bp-lange Zwischenprodukt detektiert (Anhang Abbildung 33). Nach Aufreinigung der PCR-Produkte aus dem Gel (Spur B-D) ergab eine Sequenzanalyse ([Kapitel 6.5.10](#)), dass 69,3% Basenpaare (bp

Ergebnisse und Diskussion

54-bp 309) doppelt sequenziert wurden (Anhang Abbildung 34). Darin enthalten waren sowohl die mutierte *TaqI*- als auch die neu eingebaute *AhdI*-Schnittstelle.

Nachdem die Sequenz verifiziert war und den Erwartungen entsprach wurde das Zwischenprodukt als Templat mit den Mutations-Primern k/l (Abbildung 11) für die Herstellung des Mutanten-Standards verwendet.

3.5.1.3 Amplifizierung des Mutanten-Standards

Um zu untersuchen, ab welcher Templatkonzentration es zur Vermeidung einer Bildung von Nebenprodukten kommt, wurde eine Verdünnungsreihe mit dem Zwischenprodukt (willkürlich 50 ng-0,05 ng/25 µl PCR-Ansatz) durchgeführt.

Nach Agarose-Gelelektrophorese und SYBR®-Green-Detektion wurden über alle Templatmengen die gewünschten 245 bp-langen PCR-Produkte detektiert, wobei bei der Verwendung von 50 ng und 5 ng Templat Nebenprodukte von ca. 400 bp entstanden (Anhang Abbildung 35). Dabei handelte es sich wahrscheinlich um überschüssiges Templat (368 bp). Ab dem Einsatz von 0,5 ng Templat waren keine Nebenprodukte mehr sichtbar, sodass der Mutanten-Standard folglich mit ≤0,5 ng Zwischenprodukt/ PCR-Ansatz hergestellt wurde.

Der Mutanten-Standard sollte zukünftig unter anderem als Positivkontrolle in den Mutations-PCRs verwendet werden. Um den Arbeitsaufwand zukünftig zu verringern wurde als nächstes eine möglichst für alle Mutations-PCRs ausreichende Menge an Mutanten-Standard hergestellt, dieser durch Sequenzierung und *AhdI*-Verdau verifiziert ([Kapitel 3.5.1.4](#)) und anschließend mittels SYBR®-Green fluorimetrisch quantifiziert ([Kapitel 3.5.1.4](#)).

3.5.1.4 Verifizierung des Mutanten-Standards

Für die Herstellung des Mutanten-Standards wurden vier 50 µl-PCR Ansätze mit je 1 ng Zwischenprodukt als Templat sowie den Mutations-Primern k/l (Tabelle 21) verwendet. Da nach der Agarose-Gelelektrophorese die erwarteten Produktbanden und keinerlei Nebenprodukte detektiert wurden, wurden die PCR-Ansätze vereinigt, aufgereinigt und die DNA eluiert. Die Sequenzanalyse ergab, dass 179 bp (bp 54-bp 233, 73,1%) doppelt sequenziert wurden (Anhang Abbildung 36). In diesem Bereich lag auch die *AhdI*- und die mutierte *TaqI*-Erkennungssequenz.

Um zudem zu prüfen, ob der Mutanten-Standard tatsächlich mit *AhdI* und nicht mit *TaqI* verdaubar ist, wurden unterschiedliche Kombinationen der zwei Restriktionsenzyme für den Verdau von Mutanten-Standard und der ursprünglichen Sequenz (Mutations-Produkt =Positivkontrolle) verwendet (Abbildung 23, A). Wie die Sequenzierung bereits vermuten ließ, wurde der Mutanten-Standard nicht von *TaqI* (Abbildung 23 B, Spur F) aber von *AhdI* (Spur H) geschnitten. Dass der *TaqI*-Verdau funktionierte, bewies der Verdau des Mutations-Produktes

Ergebnisse und Diskussion

(Spur G). Von den erwarteten Schnittprodukten (Mutanten-Standard: 54 bp + 191 bp; Mutations-Produkt: 49 bp + 196 bp) wurden jeweils die längeren PCR-Produkte detektiert. Möglichweise wurden die Produkte um 50 bp auf Grund einer zu geringen Auflösung der Agarose-Gelelektrophorese oder einem zu hohen Überschuss an Loading Dye (dunkle Linie <100 bp) nicht detektiert.

A

Reaktion	A	B	C	D	E	F	G	H	I
NEB4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₂ Onf	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BSA	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>TaqI</i>	-	+	+	-	-	+	+	+	+
<i>AhdI</i>	-	-	+	-	-	-	-	+	+
Templat	-	-	-	mutiert	original	mutiert	original	mutiert	original
Erwartung (bp)	-	-	-	245	245	245	49+196	54+191	49+196

B

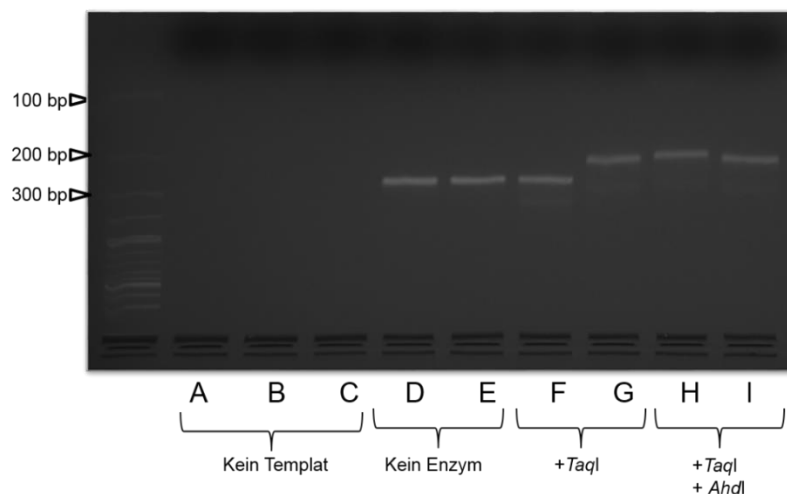


Abbildung 23 Restriktionsverdau des Mutanten-Standards zur Sequenz-Verifizierung. **A** Tabellarische Auflistung der Zusammensetzung der PCR-Ansätze. Als Templat diente wahlweise der Mutanten-Standard (mutiert) oder das als Positivkontrolle dienende Mutations-Produkt (original). Zudem sind die nach dem Restriktionsverdau zu erwartenden PCR-Produkte (bp) aufgelistet. Dabei ist grau das markante Merkmal des Reaktionsansatzes hinterlegt (z-B-kein Enzym). +, Chemikalie ist enthalten; -, Chemikalie ist nicht enthalten. **B** Dargestellt sind eine 100 bp Leiter (A), die Blindwerte (A-C und D-E) sowie die PCR-Produktbanden nach Restriktionsverdau mit *TaqI* (F, G) und *AhdI* (H, I). Färbung mit SYBR®-Green (1 ng/μl). Agarosegelelektrophorese mit 3%igem Agarosegel in 1x TAE-Puffer für 1 h bei 5 V/cm.

Ergebnisse und Diskussion

Zusammenfassend wurde bestätigt, dass es sich beim Mutanten-Standard um ein 245 bp langes PCR-Produkt mit der gewünschten Sequenzabfolge handelt. Deshalb wurde dieser nun fluorimetrisch mit SYBR®-Green quantifiziert.

3.5.1.5 Quantifizierung des Mutanten-Standards und des Mutations-Produktes

Um den Mutanten-Standard in späteren Reaktionen –sei es in der Methodenentwicklung der Mutations-PCR oder in der Anwendung im RMCA- als Positivkontrolle einzusetzen, sollte dieser in zum Mutations-Produkt vergleichbaren Mengen verwendet werden. Deshalb erfolgte die fluorimetrische Quantifizierung ([Kapitel 6.5.4.3](#)) des Mutations-Produktes und des Mutanten-Standards in einem Zuge (gleiche Kalibrierung).

Für die Kalibrierung wurde der als varianzenhomogen und linear bekannte Kalibrierbereich von 0,08-0,48 ng DNA/200 μ l (\triangleq Volumen im *well*) gewählt. Sowohl das Mutations-Produkt als auch der Mutanten-Standard wurden einmal abhängig quantifiziert –ausreichend zur Entwicklung/Optimierung der Mutations-PCR und für qualitative Aussagen (mutiert/nicht mutiert). Dabei wurden die einzelnen Kalibrierpunkte sowie die zu quantifizierenden PCR-Produkte 3-mal abhängig pipettiert. Die interne Wiederfindung bestand aus einer 1:2 (v:v) - Mischung Kalibrierpunkt und PCR-Produkt.

Die Kalibriergerade mit Kalbsthymus-DNA (Abbildung 24) war varianzenhomogen (F-Test, $p < 0,05$) und linear (Linearitätstest, $p < 0,001$).

Die ermittelten Konzentrationen betragen 2,35 ng/ml ($\triangleq 8,89 \cdot 10^9$ Kopien/ml) für den Mutanten-Standard und 2,18 ng/ml ($\triangleq 8,24 \cdot 10^9$ Kopien/ml) für das Mutations-Produkt. Die relativen Standardabweichungen waren $\leq 3,6\%$. Einzig beim Blindwert wurden relative Schwankungen von 5,6% ermittelt. Bei dieser Methode wurden relative Standardabweichungen, welche aus einer abhängigen Bestimmung (3 *wells*) resultieren von $< 5,3\%$ erwartet und akzeptiert (90te Perzentile, $n=49$, Daten nicht gezeigt). Da der Blindwert zwar zur Beurteilung der Kalibrierung verwendet wird, nicht jedoch in die Kalibrierung mit eingeht, wurde die Quantifizierung als präzise akzeptiert.

Die internen Wiederfindungen von $100,1\% \pm 14,1\%$ (Mutanten-Standard) und $100,7 \pm 3,9\%$ (Mutations-Produkt) wiesen auf eine richtige Einschätzung des DNA-Gehaltes hin.

Wie bereits bei der Herstellung der Standards für die Kopiezahl-Quantifizierung ([Kapitel 3.3.1](#)) wurden auch das quantifizierte Mutations-Produkt (nachfolgend Standard^{+TaqI}) und der Mutanten-Standard (nachfolgend Standard^{-TaqI}) aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt um einen möglichen Kopiezahlverlust durch Hydrolyse oder eine eventuell vorhandene DNase-Kontamination zu vermeiden.

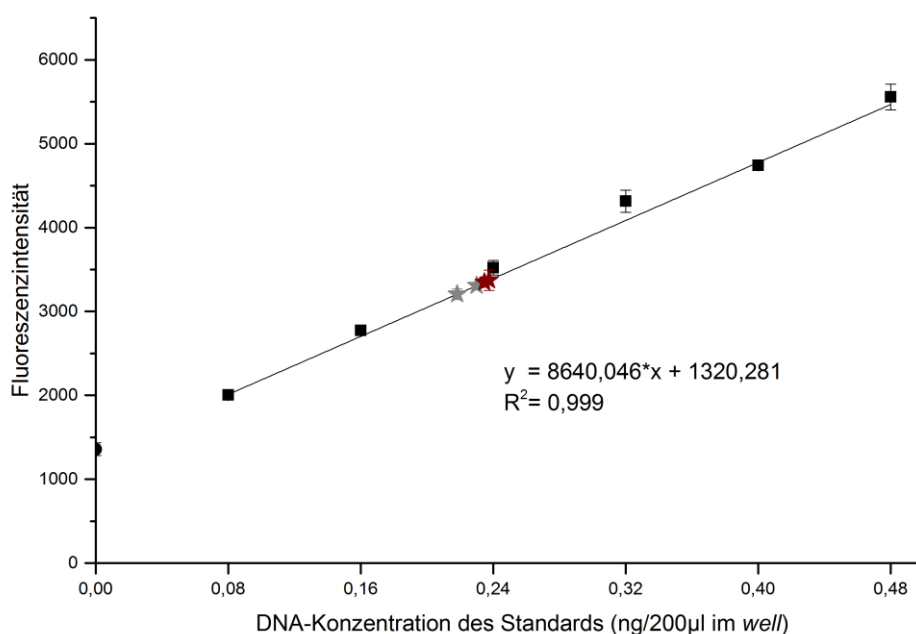


Abbildung 24: Quantifizierung des Mutanten-Standards (dunkelrote Sterne) sowie des Mutations-Produktes (hellgraue Sterne) des mt-Cytb-Gens Kalibriergerade mittels externer SYBR®-Green Kalibrierung in TE-Puffer. Nach Herstellung der PCR-Produkte wurde der DNA-Gehalt am Plattenfluorimeter dreifach abhängig mit Kalbsthymus-DNA als Referenz quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus einer abhängigen Dreifachbestimmung (Anhang Tabelle 25).

3.5.2 Übertragung der Mutations-PCR auf einen 10 µl Reaktionsansatz

Die von Bielas und Loeb (2005) publizierte Methode basiert auf 25 µl Reaktionsansätzen. Eine Möglichkeit die Kosten an Chemikalien zu minimieren sowie schnell und einfach mehr Kopien auf Mutationen zu screenen ist die Adaption der Mutations-PCR auf eine 384 well Platte. Dies bedeutet wiederum, dass der 25 µl Reaktionsansatz auf 10 µl runter skaliert werden muss (Tabelle 27).

Um zu testen, ob es mit diesem Reaktionsansatz überhaupt möglich ist Templat zu amplifizieren, wurde eine Mutations-PCR (SYBR®-Green basierte RT-PCR) mit vergleichbaren Mengen an Standard^{-TaqI} ($2,2 \cdot 10^7$ Kopien/PCR-Ansatz) bzw. Standard^{+TaqI} (Positivkontrolle, $2,06 \cdot 10^7$ Kopien/PCR-Ansatz) als Templat durchgeführt. Je Standard wurde das Experiment 5-mal unabhängig (5 Aliquote) durchgeführt, wobei jedes Aliquot als Templat für zwei Reaktionsansätze in der 384 well Platte verwendet wurde. Um weiterhin zu prüfen in wiefern sich die PCR-Produkte an Hand ihrer Schmelztemperatur (T_m) identifizieren lassen, wurde die RT-PCR mit einer Schmelzkurvenaufzeichnung verbunden (Tabelle 27, Tabelle 28). Eine anschließende Agarose-Gelelektrophorese sollte verifizieren, ob es sich um das PCR-Produkt mit der erwarteten Längen von 245 bp handelt.

Ergebnisse und Diskussion

Von jedem Reaktionsansatz wurden eine Amplifikations-Kurve und eine dazugehörige Schmelzkurve detektiert. Die T_m des Blindwertes betrug $78,3^\circ\text{C}$, die des Standards^{+TaqI} $83,7 \pm 0,12^\circ\text{C}$ und die des Standards^{-TaqI} $84,3 \pm 0,33^\circ\text{C}$. Somit war die T_m und die Schmelzkurve des Blindwertes von den Schmelzkurven der Reaktionen mit Templat deutlich abgrenzbar (Abbildung 25). Die T_m der Standards unterschieden sich trotz optisch starker Überlappung signifikant (T-Test, $p < 0,001$: $p = 1,88 \cdot 10^{-5}$).

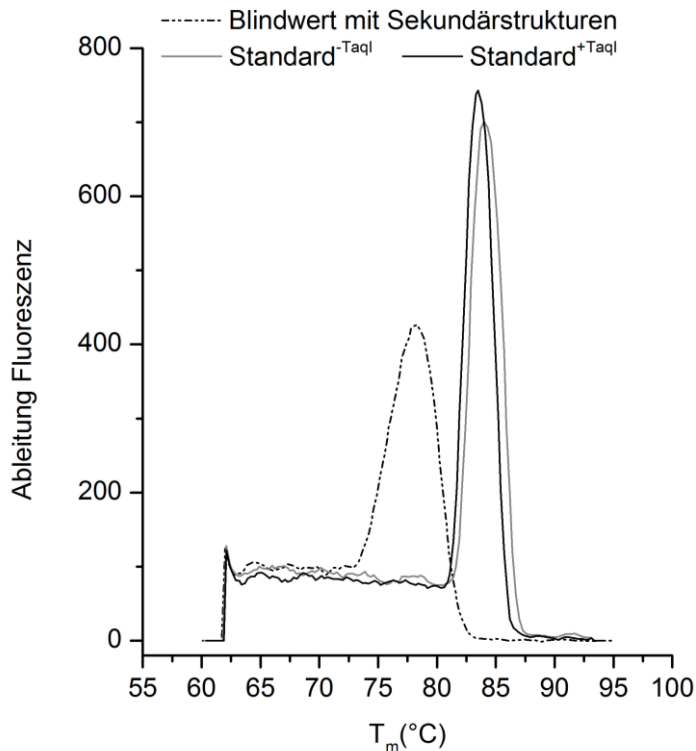


Abbildung 25 Exemplarische Schmelzkurven der PCR-Produkte von Standard^{+TaqI} und Standard^{-TaqI} als Templat mit den Mutations-Primern für das mt-Cytb-Gen nach einer SYBR®-Green basierten RT-PCR.

Im Allgemeinen ist die T_m des PCR-Produktes abhängig vom GC-Gehalt (Rychlik et al., 1990), der Sequenzlänge und der Basenpaarabfolge (Ririe et al., 1997; Breslauer et al., 1986). Des Weiteren haben die SYBR®-Green- und die Templatkonzentration (Monis et al., 2005; Ririe et al., 1997) sowie das Schmelzkurven-Temperaturprogramm (Varga und James, 2006; Ririe et al., 1997) einen Einfluss auf die Schmelzkurve und somit die detektierte Schmelztemperatur. Im Reaktionsansatz waren bis auf die Templatkonzentration, die Basenpaarabfolge und die Sequenz alle Parameter zwischen den beiden Standards (und dem Blindwert) identisch. Möglicherweise waren diese drei Parameter ursächlich für den detektierten Unterschied in den T_m s der Standards.

Nach Agarose-Gelelektrophorese wiesen beide Standards die erwarteten 245 bp-Banden auf, wobei der Standard^{-TaqI} noch eine zusätzliche schwächere Bande bei ca. 500 bp aufwies, die an Hand der Schmelzkurven nicht detektierbar war (Anhang Abbildung 37).. Es ist

Ergebnisse und Diskussion

anzunehmen, dass die zusätzliche Bande aus der hohen Menge an eingesetztem Templat resultierte, welches bei der Herstellung aus dem PCR-Ansatz und nicht aus dem Gel aufgereinigt wurde. Die Spur des Blindwertes wies lediglich Primer-Dimere <100 bp auf (passend zur Aufzeichnung einer Amplifikations- und Schmelzkurve), daher wurden Verunreinigungen ausgeschlossen.

Somit waren den detektierten Schmelzkurven eindeutig die PCR-Banden zuzuordnen. Fraglich ist jedoch, warum beim Standard^{TaqI} eine Schmelzkurve aber zwei PCR-Produkte detektiert wurden. Eine in der Literatur diskutierte Möglichkeit ist die Translokation von SYBR®-Green von einem PCR-Produkt zum anderen während der Schmelzkurvendetektion (Varga und James, 2006; Monis et al., 2005). Scheinbar führt ein zu langer Schmelzyklus bzw. zu hohe Schmelzraten zu einer Translokation oder einer bevorzugten Interkalation von SYBR®-Green mit einem Fragment. Auch ein Verlust der Schmelzkurve durch zu geringe SYBR®-Green- oder Templatkonzentration wurde in der Literatur beschrieben (Monis et al., 2005), wobei die Templatkonzentration bei den in dieser Arbeit verwendeten Mengen von $>10^7$ als Ursache für die Diskrepanz zwischen Agarose-Gel und Schmelzkurve ausgeschlossen wurde.

Zusammenfassend war eine Amplifizierung der Standards und somit von mutierten und unmutierten Sequenzen unter den gegebenen Bedingungen reproduzierbar in einem 10 µl Reaktions-Ansatz möglich. Anhand der Schmelzkurve und der daraus abgeleiteten T_m war die Unterscheidung von spezifischem PCR-Produkt und Blindwert (unspezifische Primer-Dimere) problemlos möglich. Bislang basierte diese Aussage jedoch nur auf einem Experiment mit nur einem einzigen T_m -Wert für den Blindwert. Deshalb sollte als nächstes geprüft werden, ob sich auch bei vielen unabhängigen Experimenten die T_m des Blindwertes statistisch von der T_m des Mutations-Produktes bzw. dem Mutanten-Standard unterscheidet.

3.5.2.1 T_m -Bereiche von Mutations-Produkt und Blindwert

Dazu wurden 10 unabhängige Experimente durchgeführt mit je 144 Reaktionen, bei denen Standard^{TaqI} als Templat (je Experiment 3-mal unabhängig ≤ 48 Kopien in 48 wells) mit den Mutations-Primern für das mt-Cytb-Gen amplifiziert wurde ([Kapitel 6.5.5.2.2](#)). Für Standard^{TaqI} als Templat wurde sich entschieden, da im vorherigen Experiment ([Kapitel 3.5.2](#)) die kleinere Differenz in der T_m zum Blindwert vorlag. Pro Experiment wurden ein Blindwert und eine Positivkontrolle ($>10^7$ Kopien Standard^{TaqI}) mitgeführt.

Es wurden Reaktionen ohne Templat (\triangle Blindwert) und mit Templat (\triangle Positivkontrolle) erwartet. Da T_m s der Schmelzkurven ausgewertet werden sollten und dies eine Amplifikation voraussetzt, wurden nur die Reaktionen ohne Templat ausgewertet, welche eine Amplifikationskurve aufwiesen (Primer-Sekundärstrukturen als PCR-Produkte, Anhang Abbildung 38). Da bereits im Vorexperiment eine eindeutige Zuordnung von Schmelzkurve

Ergebnisse und Diskussion

und PCR-Bande möglich war, wurde in diesem Experiment nur stichprobenartig eine Agarose-Gelelektrophorese nach der RT-PCR durchgeführt (Daten nicht gezeigt).

Die T_m der PCR-Produkte, welche aus Primer-Sekundärstrukturen hervorgingen ($78,8^\circ\text{C} \pm 0,7^\circ\text{C}$) und die der Reaktionen mit $\text{Standard}^{+\text{TaqI}}$ als Templat ($83,6^\circ\text{C} \pm 0,4^\circ\text{C}$) unterschieden sich signifikant (T-Test, $p < 0,05$, Abbildung 26). 2/399 T_m s (0,5%) der Reaktionen mit Templat lagen im T_m -Schwankungsbereich der Reaktionen ohne Templat. In diesen beiden Fällen wurden zwei Schmelzkurven und auf dem Agarose-Gel sowohl eine PCR-Bande bei 245 bp als auch eine < 100 bp detektiert. Die Detektion höherer T_m s in der Positivkontrolle ($84,3^\circ\text{C} \pm 0,09^\circ\text{C}$) gegenüber den T_m s der Reaktionen mit Templat war wahrscheinlich auf die Templatmenge zurückzuführen (Monis et al., 2005).

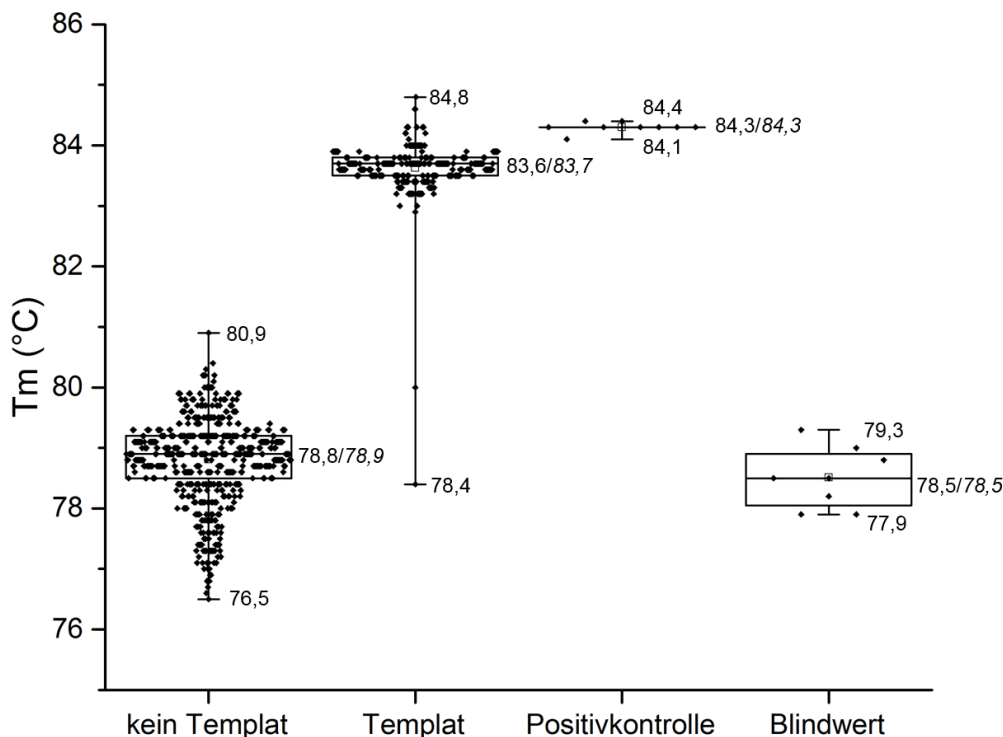


Abbildung 26 Box-Plot der Schmelztemperaturen (T_m) nach Durchführung einer Mutations-PCR. Dargestellt sind T_m s (von unten nach oben: Minimum, Mittelwert/Modalwert, Maximum) von Reaktionen mit keinem Templat ($n=672$), welche zu Sekundärstrukturen geführt haben und Reaktionen mit $\text{Standard}^{+\text{TaqI}}$ als Templat (12, 24 oder 48 Kopien je 48 Reaktionen, $n=399$). Durchgeführt wurden 9 unabhängige Experimente, bei welchen jeweils ein Blindwert ($n=8$) und eine Positivkontrolle ($>10^7$ Kopien $\text{Standard}^{+\text{TaqI}}$, $n=9$) mitgeführt wurde.

Nachdem die Unterscheidung zwischen einer Reaktion mit und ohne Templat in nahezu (99,95%) allen Fällen an Hand der T_m der Schmelzkurve bzw. der Schmelzkurve ansich möglich war, kann theoretisch innerhalb des RMCA die Verifizierung der mutierten Kopien (TaqI -Nachverdau, Gelelektrophorese, Sequenzierung) einzig mit den nach

Ergebnisse und Diskussion

Schmelzkurvenanalyse als positiv analysierten Reaktionsansätzen durchgeführt werden. Dies spart Zeit und Ressourcen.

Ob –wie im Vorversuch ([Kapitel 3.5.2](#)) verlässlich mit Hilfe der T_m bereits auch eine mutierte von einer nicht mutierten Kopie unterscheidbar ist, sollte im weiteren Verlauf dieser Arbeit evaluiert werden. Da eine Amplifikation in einem 10 μ l-Reaktionsansatz möglich war, wurde als nächstes der Nachweis von einer Kopie ([Kapitel 3.5.3](#)) unter diesen Reaktionsbedingungen angestrebt.

3.5.3 Nachweis einer Kopie

Im RMCA wird die Mutationsfrequenz berechnet indem die in der *TaqI*-Erkennungssequenz mutierten Kopien ins Verhältnis zur Gesamtanzahl an Kopien gesetzt werden. Dieses Prinzip setzt jedoch voraus, dass die Methode empfindlich genug ist eine einzelne Kopie nachzuweisen. Deshalb sollte vor der Bestimmung von Mutationsfrequenzen überprüft werden, ob unter den gegebenen Reaktionsbedingungen der Mutations-PCR ([Kapitel 3.5.2](#)) eine einzelne Kopie als Templat amplifiziert und detektiert werden kann.

Dazu wurde dreimal unabhängig eine Mutations-PCR ([Kapitel 6.5.5.2.2](#), 0,5x SYBR-Green im Ansatz) durchgeführt. Dabei wurden -wie auch im RMCA vorgesehen- 10 Kopien Standard^{+TaqI} auf 80 Reaktionsansätze (\triangleq wells) verteilt. Dies entspricht nach Poissonverteilung einer Wahrscheinlichkeit <1%, dass in einem well ≥ 2 Kopien enthalten sind (Anhang Tabelle 27). Wells, in denen eine Amplifikation der Zielsequenz stattgefunden hat, wurden anhand der T_m der Schmelzkurve identifiziert. Um zusätzlich zu gewährleisten, dass es sich bei den Amplifikaten um die zugegebenen Kopien mit *TaqI*-Schnittstelle handelt, wurde mit diesen anschließend ein *TaqI*-Verdau ([Kapitel 6.5.6](#)) und eine Agarose-Gelelektrophorese ([Kapitel 6.5.7](#)) zur Detektion eventueller Schnittprodukte (49 bp und 196 bp) durchgeführt. Je Mutations-PCR wurden eine Positivkontrolle ($>10^6$ Kopien Standard^{+TaqI}, Kontrolle der PCR und des nachfolgenden *TaqI*-Verdau), eine Negativkontrolle ($>10^6$ Kopien Standard^{TaqI}) sowie ein Blindwert mitgeführt.

Nach Poissonverteilung wurden ca. 70,6 wells ohne Templat, 8,8 wells mit einer Kopie und 0,6 well mit 2 oder mehr Kopien erwartet. In drei unabhängigen Experimenten wurden 10, 14 und 7 positive wells (Standard^{+TaqI} als Templat) detektiert. Nach Poisson lag die Wahrscheinlichkeit für ≥ 2 Kopien/well somit zwischen 0,4%-1,4% (Anhang Tabelle 27). Bei 30/31 der PCR-Amplifikate wurde durch *TaqI*-Verdau bestätigt, dass es sich um die Zielsequenz handelt (Abbildung 27). Eine Amplifizierung von einer mt-Cytb Kopie war somit unter den gegebenen Bedingungen möglich.

Insgesamt waren bei 7 Amplifikaten auf dem Agarose-Gel schwache bis keine ca. 200 bp-Banden sichtbar (Spuren b, Abbildung 27). Eine Bande (Spur a) wies dieselbe Größe wie die

Ergebnisse und Diskussion

Kontrolle ohne *TaqI*-Schnittstelle auf. Dass es sich hierbei um keinen Fehler handelte wurde durch ein erneutes auftragen auf Gel nach nochmaligem *TaqI*-Verdau (Spur a') ausgeschlossen. Weiteren Aufschluss würde an dieser Stelle eine Sequenzierung des PCR-Produktes geben. Dass es sich um eine in der *TaqI*-Schnittstelle mutierte Kopie innerhalb des aliquotierten Standard^{-TaqI} handelte war nicht auszuschließen ([Kapitel 3.4.6.2](#)).

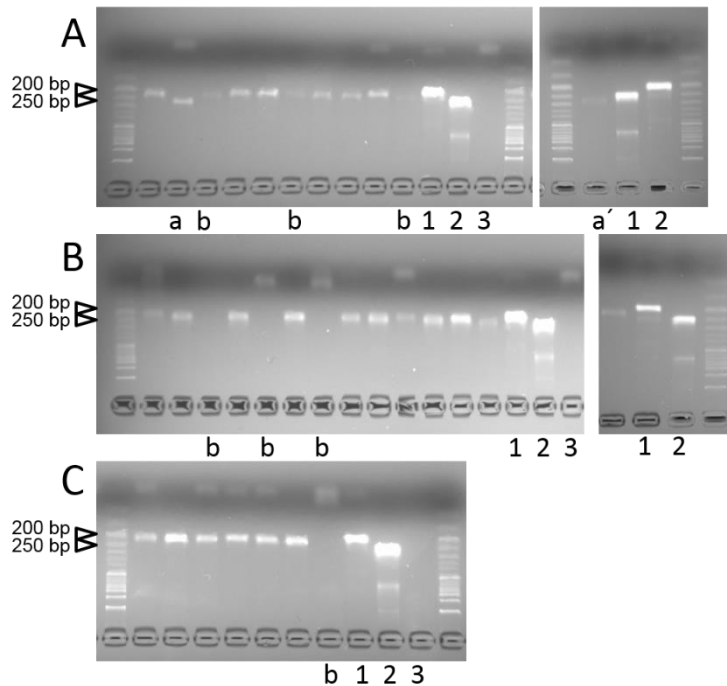


Abbildung 27 Gelelektrophoretische Auftrennung des *TaqI*-Verdauens der Amplifikate, welche eine identische Schmelztemperatur wie die Positivkontrolle hatten. Dargestellt sind die Amplifikate aus drei unabhängigen Versuchen (A-C), sowie eine Kontrolle mit *TaqI*-Schnittstelle (1, 191 bp + 54 bp), eine Kontrolle ohne *TaqI*-Schnittstelle (2, 245 bp) sowie der Blindwert (3) nach Durchführung eines *TaqI*-Verdauens. Mit b gekennzeichnete Spuren haben sehr schwache bis keine sichtbaren Banden, mit a bzw. a' gekennzeichnet ist ein unverdautes Amplifikat. Darstellung der *PCR*-Amplifikate nach Färbung mit 2 μ l SYBR® Green (1 ng/ μ l) und Agarose-Gelelektrophorese (1,5%) in 1xTAE-Puffer bei 5 V/cm für 1 h.

Generell wurden nach dem *TaqI*-Verdau einer unmutierten Kopie Schnittprodukte der Längen 49 bp und 196 bp erwartet. Somit dient nicht nur die ca. 200 bp Bande als Zeichen für einen gelungenen *TaqI*-Verdau, sondern auch möglicherweise Banden von ca. 50 bp (wenn nicht im Blindwert auch vorhanden). Im Versuch zum Nachweis von einer Kopie innerhalb der Mutations-PCR war die Detektion der 50 bp Banden durch den Streifen des *Loading Dyes* erschwert (Abbildung 27). Deshalb wurde als nächstes die Zusammensetzung des *Loading Dyes* angepasst (weniger Bromphenolblau, Kapitel 6.4) und für Mutations-PCRs im RMCA zukünftig angewendet.

Zudem ist bekannt, dass SYBR®-Green unter Umständen die *PCR*-Reaktion inhibiert (Gudnason et al., 2007; Monis et al., 2005). Obwohl die Positivkontrollen als auch die Mehrzahl an Amplifikaten (24/31, 77,4%) deutlich nach Agarose-Gelelektrophorese detektierbar waren,

sollte deshalb geprüft werden in wiefern eine Änderung der SYBR®-Green-Konzentration in der Mutations-PCR zu Änderungen in der PCR-Produktentstehung führt.

3.5.3.1 Optimierung der SYBR®-Green-Konzentration für die Mutations-PCR

Da in der Anwendung des RMCAs letztlich mutierte Kopien nachgewiesen werden sollen, wurde Standard^{-TaqI} mit den Mutations-Primern und 5x bis 0,01x SYBR®-Green (Konzentrationen über und unter dem momentan verwendeten 0,5x) im PCR-Ansatz amplifiziert. Um prinzipiell eine Amplifikation zu gewährleisten und nicht unter Poisson zu fallen, wurden 10, 100 oder 1000 Kopien als Templat verwendet. Zur Verifizierung des gewünschten 245 bp langen Produktes wurde nach der Mutations-PCR der Reaktionsansatz geteilt und mit der einen Hälfte ein *AhdI*-Verdau durchgeführt. Anschließend wurde eine Agarose-Gelelektrophorese mit beiden Hälften des Reaktionsansatzes durchgeführt (unverdaut: Kontrolle der Amplifikation, verdaut: Kontrolle ob es sich um Mutanten-Standard handelt).

Unabhängig von der Templatkonzentration wurde ab der Verwendung von <0,1x SYBR®-Green immer das 245 bp lange Produkt (unverdaut) bzw. die erwarteten Schnittprodukte bei ca. 200 und 50 bp detektiert (Abbildung 28). Im Gegensatz dazu lag bei der Verwendung von SYBR®-Green-Konzentrationen >0,1x im PCR-Ansatz eine komplette Hemmung der PCR (5x, 1x) oder des *AhdI*-Verdau (0,5x, 10 Kopien) vor. Beim Vergleich von 0,1x und 0,01x SYBR®-Green fiel auf, dass unterschiedliche und auch unterschiedlich viele Nebenprodukte >245 bp und <100 bp in den PCR-Reaktionen mit und ohne Templat entstanden. Da bei der Verwendung von 0,01x SYBR®-Green keine Nebenprodukte detektiert wurden, wurde zukünftig die Mutations-PCR mit dieser Konzentration durchgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

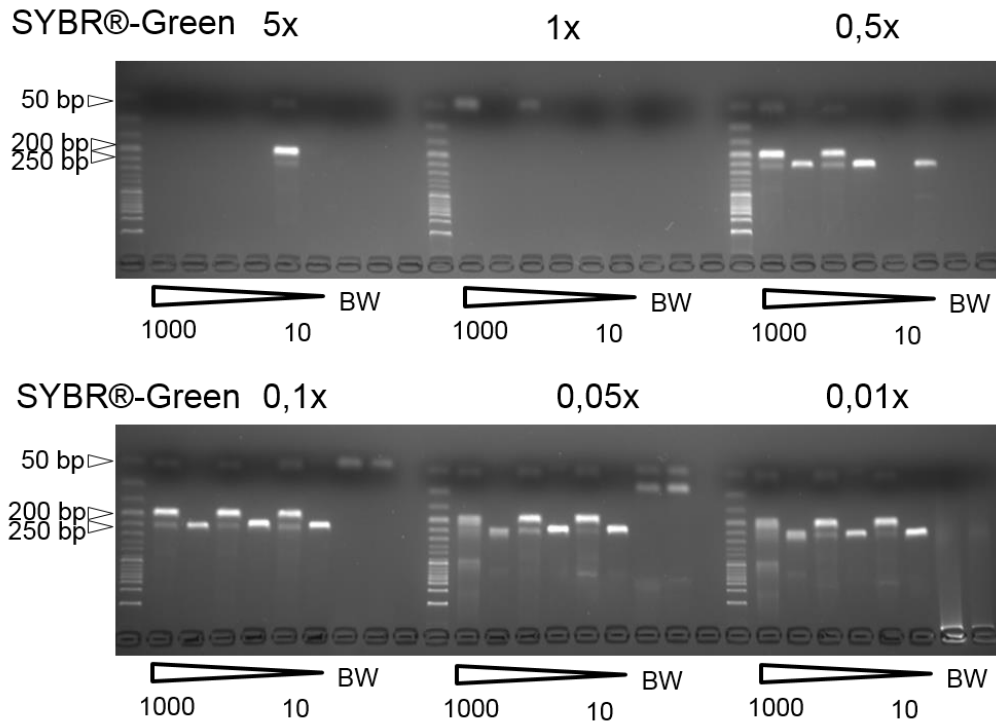


Abbildung 28 Einfluss der SYBR®-Green-Konzentration im PCR-Ansatz auf die Produktentstehung in der Mutations-PCR und den nachfolgenden *AhdI*-Verdau (2,5U, 1 h, 37°C). In einer Mutations-PCR wurde Standard-TaqI (je 1000, 100 oder 10 Kopien) mit den Mutations-Primern für das mt-Cytb-Gen und variierenden SYBR®-Green-Mengen (5x-0,01x) im Reaktionsansatz amplifiziert. Aufgetragen sind die PCR-Produkte jeweils von hohem Templat zu niedrigem Templat, wobei immer das verdaute Produkt (erwartet: 54 bp und 191 bp) zuerst, danach das unverdaute Produkt (erwartet 245 bp) pipettiert wurden. Desweiteren sind die Blindwerte (BW) aufgetragen. Darstellung der *PCR*-Amplifikate nach Färbung mit 2 µl SYBR® Green (1 ng/µl) und Agarose-Gelelektrophorese (3,0%) in 1xTAE-Puffer bei 5 V/cm für 1 h.

Desweiteren fiel auf, dass trotz *AhdI*-Verdau noch Banden des ursprünglichen 245 bp Produktes detektierbar waren. Da in dem Experiment Standard-TaqI verwendet wurde, war davon auszugehen, dass die Ursache in einem unvollständigen *AhdI*-Verdau lag. Da für eine zweifelsfreie Unterscheidung einer realen mutierten Kopie im RMCA und einer Mutanten-Standard Kopie der *AhdI*-Verdau vollständig sein muss, sollte dieser als nächstes optimiert werden.

3.5.3.2 Optimierung des *AhdI*-Verdau

Parameter, die im Rahmen der Optimierung des *AhdI*-Verdau getestet werden sollten, waren die Verdau-Dauer und die Enzymmenge.

Verdau-Dauer

Bisher wurde der Verdau für 1 h bei 37°C mit 2,5 U *AhdI* durchgeführt. Nachdem unter diesen Bedingungen immernoch unverdautes 245 bp langes Produkt detektiert wurde (Abbildung 28), wurde die Verdau-Dauer auf 10 h erweitert und mit den Vorergebnissen verglichen.

Ergebnisse und Diskussion

Nach 10 h *AhdI*-Verdau wurde bei 10 Kopien Templat in der Mutations-PCR kein Mutanten-Standard (245 bp) mehr detektiert (Anhang Abbildung 39). Mit steigenden Templat-Kopiezahlen in der Mutations-PCR wurde auch mehr verbleibender Mutanten-Standard nach dem *AhdI*-Verdau detektiert. Die Erweiterung der Dauer auf 10 h anstelle von 1 h führte folglich nur unter speziellen Bedingungen zu einem effizienteren Verdau des Mutanten-Standards.

Nun sollte getestet werden, ob die Verwendung einer anderen Enzymmenge zu einem effizienteren Verdau führt, d.h. mit weniger Enzym die gleichen Resultate zu verzeichnen oder mit mehr Enzym auch höhere Ausgangskopiezahlen in der Mutations-PCR verdaubar sind.

Enzymmenge

Bislang wurden für einen PCR-Reaktionsansatz 2,5 U *AhdI* verwendet. Diese Menge war ausreichend um einen vollständigen Verdau nach Verwendung von 10 Kopien Templat zu gewährleisten. Deshalb wurden im nächsten Experiment PCR-Produkte, welche aus Standard^{TaqI} und den Mutations-Primern hervorgingen, mit variierenden Mengen an *AhdI* (10 U, 5 U, 2,5 U, 1 U) für 10 h verdaut und anschließend eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

Bei den für die Mutations-PCR eingesetzten Templat-Kopiezahlen von 1000 und 100 wurde unabhängig von der Enzymmenge neben den erwarteten Schnittprodukten von 54 bp und 191 bp zusätzlich die unverdaute Bande bei 245 bp detektiert (Anhang Abbildung 40). Diese Bande war verglichen mit den 245 bp-Banden nach Verwendung höherer Enzymmengen bei 1 U am deutlichsten im Signal, was dafür spricht, dass es sich wie vermutet um verbleibenden Standard^{TaqI} handelt. Wie im Versuch zur Verdau-Dauer (Kapitel 3.4.3.1) wurde reproduzierbar mit 10 Kopien Templat für die Mutations-PCR ab $\geq 2,5$ U keine 245 bp Bande mehr detektiert. Aus Kostengründen wurde sich dementsprechend für die Anwendung im RMCA für die Verwendung von 2,5 U *AhdI*/ Reaktionsansatz entschieden.

Zusammenfassend führte eine Steigerung der Enzymmenge nicht zu einem effizienteren Verdau. Ein vollständiger *AhdI*-Verdau war nach Verwendung von 2,5 u, 10 h und maximal 10 Ausgangskopien Standard^{TaqI} in der Mutations-PCR gegeben. Deshalb sollte beim Einsatz von Standard^{TaqI}, welcher zur Verifizierung im späteren Verlauf verdaut werden sollte, diese Kopiezahl als Templat bzw. bei sofortiger Austragung auf Gel eine Kopiezahl von $1,3 \cdot 10^{166}$ nicht überschritten werden. Im Zweifel, ob es sich bei der 245 bp Bande um Standard^{TaqI} oder einen realen Mutant handelt, sollte eine Sequenzierung durchgeführt werden.

Nachdem die molekularbiologischen Werkzeuge für das mt-Cytb-Gen in der mtDNA von *Rattus norvegicus*, die PCR-Reaktionen für die Kopiezahl- und Mutantenzahl-Bestimmung

⁶ Berechnet unter der Annahme einer exponentiellen Amplifikation mit einer Effizienz von 2 und 50 Zyklen.

entwickelt waren und eine für den mitochondrialen RMCA geeignete DNA-Isolierungsmethode gewählt war, sollte der RMCA in mtDNA von *Rattus norvegicus* angewendet werden.

3.6 Anwendung des RMCAs auf Rattengewebe

Für die nähere Charakterisierung der Robustheit des mitochondrialen RMCAs (z.B. Einfluss des Gewebes, Schwankung zwischen den Tieren, Einfluss des Geschlechtes) wurde Gewebe von je vier gesunden weiblichen (W1-W4) und männlichen (M1-M4) Ratten des Inzucht-Stammes F344/NCrHsd (Harlan Laboratories GmbH, Eystrup, Germany) verwendet ([Kapitel 6.5.3](#)).

3.6.1 Organauswahl

Für die Durchführung eines mitochondrialen RMCAs sollten mindestens 50 mg Gewebe eingesetzt werden ([Kapitel 3.4.5](#)). Damit ausreichend Gewebe für alle Versuche zur Etablierung RMCAs zur Verfügung steht, sollte zunächst das Organ mit der höchsten Masse bestimmt werden. Dazu wurden die Organgewichte aller entnommenen Organe ([Kapitel 6.5.3](#)) innerhalb eines und unter allen Tieren miteinander verglichen.

Unabhängig vom Geschlecht der Tiere hatte die Leber innerhalb eines jeden Tieres das höchste und die Harnblase das geringste Organgewicht (Anhang Tabelle 28). Da das Gewicht der Harnblase im schlechtesten Fall nur 40 mg (W3) betrug, schied dieses Organ für die Etablierung des RMCAs aus. Zwischen den Tieren war zu erkennen, dass die männlichen Tiere höhere Organgewichte aufwiesen als die weiblichen. So schwankten beispielsweise die Lebergewichte zwischen 5,92 g (W4) und 12,31 g (M1).

Neben der Leber wiesen der Dünndarm (2,9 g-5,4 g) und das Gehirn (1,7 g-1,9 g) die höchsten Organgewichte auf (Anhang Tabelle 28), dabei besteht die Leber aus 5 Leberlappen (Anhang Abbildung 41) und der Dünndarm aus drei Abschnitten (Duodenum, Jejunum und Ileum). Die höheren Einzelgewichte der Organteile wurden in der Leber detektiert (Anhang Tabelle 28).

Auf Grund der höchsten Organmasse und der größten Einzelgewichte der Organteile wurde die Leber zur Etablierung des mitochondrialen RMCA genutzt.

3.6.2 Bestimmung der mitochondrialen Mutationsfrequenz in Rattenleber

Der mitochondriale RMCA besteht aus drei Teilschritten zur Probenvorbereitung (Organ pulverisieren, mtDNA isolieren, *TaqI*-Verdau) und zwei PCRs zur Bestimmung der Mutationsfrequenz (Kopiezahl-Bestimmung, Bestimmung der Mutantenzahl). In wiefern

Ergebnisse und Diskussion

welcher Schritt einen Einfluss auf die Mutationsfrequenz (MF) oder deren Schwankung hat, sollte als nächstes geklärt werden wie hoch die Schwankung der MF

- a) nach einer Dreifachbestimmung aus einem einzigen Reaktionsansatz, welcher bereits mit dem Restriktionsenzym *TaqI* verdaut wurde (*TaqI*-Verdau-Lösung, [Kapitel 6.5.6](#)) ist.
- b) in drei mtDNA-Lösungen -isoliert aus einem Organpulver- ist.
- c) zwischen mehreren Tieren ist und ob es einen Einfluss des Geschlechtes gibt (Abbildung 29).

Zur Beantwortung der Fragen a-c wurden zunächst die bei -80°C aufbewahrten Leberlappen einer männlichen Ratte (M2) pulverisiert, die mtDNA isoliert ([Kapitel 6.5.3.3](#)), die Kopiezahl quantifiziert ([Kapitel 3.3](#)) und anschließend eine Mutations-PCR durchgeführt ([Kapitel 6.5.5.2.2](#)). Danach sollte von allen Tieren die MF der Leber bestimmt werden.

Im Rahmen dieses Versuches sollten parallel die Kopiezahlquantifizierungen hinsichtlich der internen Wiederfindungen und deren relativen Standardabweichungen sowie den Standardabweichungen der Probe ausgewertet werden. Mit diesen Daten sollten dann Akzeptanzkriterien für die Methode Kopiezahlbestimmung festgelegt werden ([Kapitel 3.6.3](#)).

Vor der Mutations-PCR sollten Überlegungen zur erwünschten Mutantenzahl erfolgen ([Kapitel 3.6.4](#)).

Ergebnisse und Diskussion

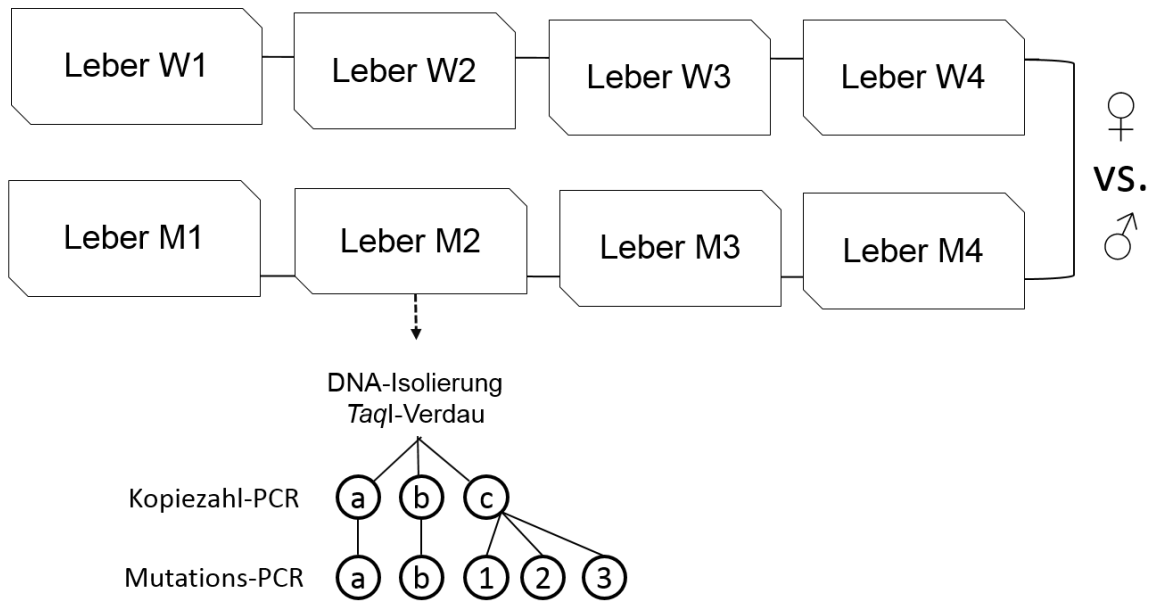


Abbildung 29 Im Rahmen der Etablierung des RMCA sollten die Schwankungen der mitochondrialen Mutationsfrequenz in Rattenleber untersucht werden: Wie hoch sind die Schwankungen innerhalb einer mtDNA-Lösung (Leber M2 c1-3), zwischen verschiedenen mtDNA-Lösungen derselben Leber (Leber M2 a-c) und zwischen mehreren Tieren? Verwendet wurden die Lebern bzw. Leberteile von je vier weiblichen (W) und männlichen (M), gesunden F344-Ratten (Anhang Tabelle 28).

3.6.3 Kopiezah-Quantifizierung des mt-Cytb-Gens in Rattenleber

Nachdem die Methode zur Kopiezahquantifizierung der mt-Cytb-Zielsequenz ([Kapitel 3.3.4.2](#)) entwickelt war, sollten nun im Rahmen der Bestimmung der mitochondrialen Mutationsfrequenz in Rattenleber ([Kapitel 3.6.2](#)) Daten zur internen Wiederfindung als auch der Präzision von interner Wiederfindung und Probe (Triplikate: Aufteilung einer Lösung auf drei wells) gesammelt, ausgewertet und daraus allgemeine Akzeptanzkriterien für eine Kopiezahbestimmung im mitochondrialen RMCA abgeleitet werden.

Interne Wiederfindung in Abhängigkeit vom Kopiezah-Verhältnis Standard/Probe

Die interne Wiederfindung besteht aus dem RT-Standard für die Kopiezahquantifizierung ([Kapitel 3.3.1](#)), welcher möglichst mit einer identischen Effizienz wie die Zielsequenz amplifiziert wird, und der Probe, welche die Zielsequenz enthält. Damit eventuell vorhandene Unterschiede in der Amplifizierungseffizienz zwischen Standard und Probe nicht zu stark bei der Quantifizierung ins Gewicht fallen und somit das Ergebnis verfälschen, wurden einzig interne Wiederfindungen ausgewertet, bei denen das Kopiezah-Verhältnis von Standard/Probe zwischen 0,5-3 lag. Innerhalb dieses Akzeptanzkriteriums lagen ca. 53% (55/103) aller Daten.

Für die Auswertung wurden die Daten je nach vorliegendem Kopiezahverhältnis von Standard/Probe in 5 Klassen (0,5-1,0; 1,1-1,5; 1,6-2,0; 2,1-2,5; 2,6-3,0) eingeteilt und die

Ergebnisse und Diskussion

Quantilen (Q 2,5% und 97,5%), der Mittelwert, die Standardabweichung, die relative Standardabweichung sowie der Median der internen Wiederfindung berechnet.

Bei einem vorliegenden Kopiezahl-Verhältnis von Standard/Probe von 1,1-1,5 betrug die interne Wiederfindung $117\% \pm 19\%$ ($\pm 16,3\%$, Abbildung 30). Ein Unterschied zwischen diesem Mittelwert und dem Modalwert von 116% wies auf eine Normalverteilung der Daten hin. Die relative Standardabweichung nahm tendenziell mit steigendem Kopiezahl-Verhältnis Standard/Probe ab (20,7% bis 9,8%), allerdings nahm gleichzeitig die Datenzahl in den ausgewerteten Klassen ab (19-6), sodass ein verlässlicher Rückschluss aus diesem Trend nicht möglich war.

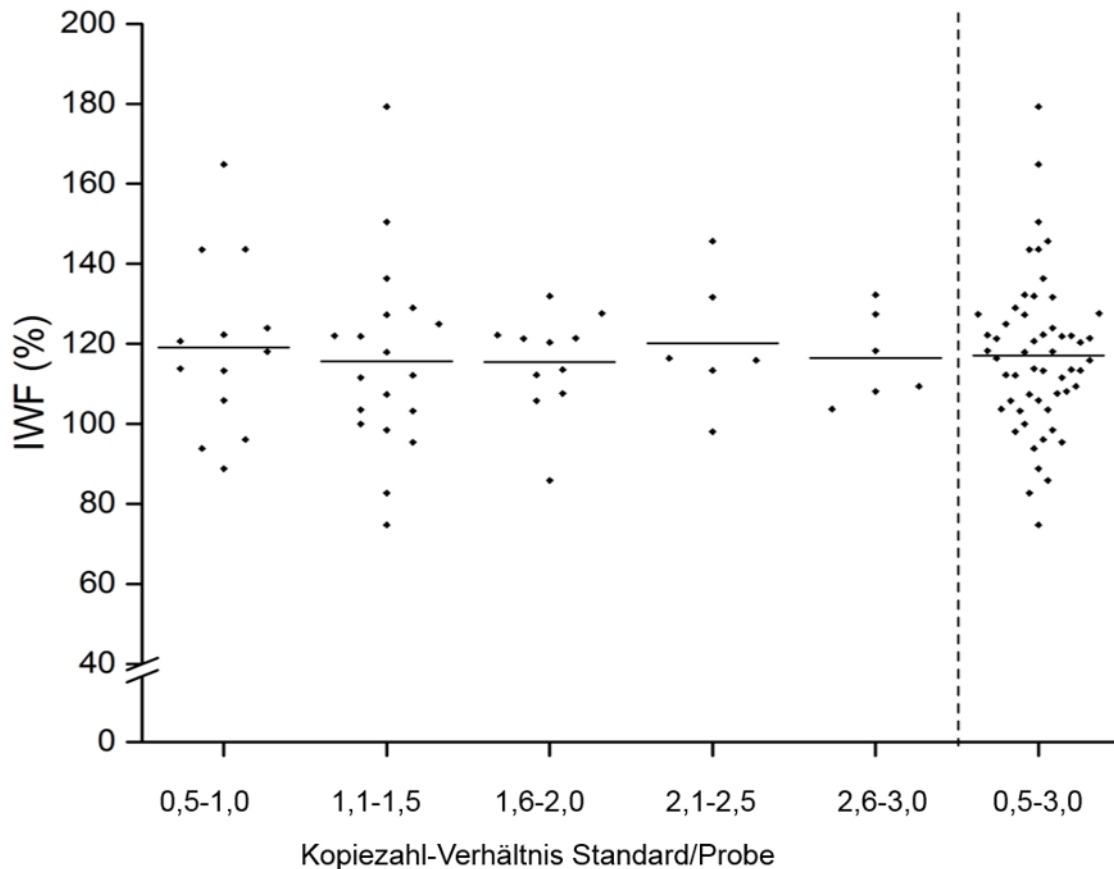
Relative Standardabweichung der internen Wiederfindung

Insgesamt betrug der Modalwert der relativen Standardabweichung der internen Wiederfindung 5% (Anhang Abbildung 42). Die maximal zu erwartende relative Standardabweichung lag im Bereich von 17-20% (91% der Daten berücksichtigt, $n=57$) bzw. 24% (95% der Daten berücksichtigt).

Relative Standardabweichung einer Probe

Der Modalwert der relativen Standardabweichung einer Probe betrug 3% (Anhang Abbildung 43). Bei Berücksichtigung von 90% aller Daten ($n=258$) lag die maximal zu erwartende relative Standardabweichung im Bereich von 17-20%, bei 95% aller Daten stieg diese bis zu 28%.

Ergebnisse und Diskussion



Q 2,5	90,3	78,3	90,8	99,9	104,3	83,8
Q 97,5	158,5	166,3	130,9	143,9	131,6	159,8
MW IWF	119,1	115,7	115,4	120,2	116,5	117,0
SD	21,7	23,9	12,7	16,4	11,4	19,1
rel. SD	18,2	20,7	11,0	13,7	9,8	16,3
MD	118,1	112,1	120,4	116,1	113,8	116,4
n	13	19	11	6	6	55

Abbildung 30 Datenverteilung der Internen Wiederfindung (IWF) im Bezug zum eingesetzten Verhältnis Standard/Probe (%) dargestellt in 5 Klassen. Zusätzlich angegeben sind die Quantile (Q) 2,5%, Q 97,5%, Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD) und relative (rel.) SD sowie der Median (MD) und die Stichprobengröße (n).

An Hand dieser Daten wurde festgelegt, dass die Interne Wiederfindung der Kopiezahlquantifizierung folgenden Kriterien entsprechen sollte, bevor die Kopiezahl der Probe berechnet und anschließend für die Mutations-PCR und somit für Berechnung der MF verwendet wird:

- Verhältnis Standard/Probe: 0,5-3,0
- Interne Wiederfindung: 78-166% ± maximal 20%
- Präzision Probe: maximal 20%

Bei Einhaltung dieser Kriterien, sollte damit gerechnet werden, dass die Probenkopiezahl im schlechtesten Falle um ca. 42% unter- bzw. 86% überschätzt wird. Die als akzeptabel

festgelegte relative Schwankung von 20% führt dazu, dass auch Unterschiede in der MF über 20% sein müssen, um diese zu detektieren.

3.6.4 Akzeptierter Bereich der Mutantenzahl

Äquivalent zur Festlegung von Akzeptanzkriterien für die Kopiezahlbestimmung sollten Akzeptanzkriterien zur Bestimmung der Mutantenzahl/ die Mutations-PCR festgelegt werden. Dabei sollten folgende Fragen adressiert werden:

- a) Wie werden mutierte Zielsequenzen von nicht mutierten Zielsequenzen nach der Mutations-PCR differenziert?
- b) In welchem Bereich sollte sich die Anzahl der mutierten Zielsequenzen in einer Mutations-PCR befinden?
- c) Wie viele mutierte Zielsequenzen werden von einer Probe benötigt um einen statistischen Vergleich des Mutationsspektrums durchzuführen?

Differenzierung zwischen mutierten und nicht-mutierten Zielsequenzen

Im Zuge der Entwicklung der molekularbiologischen Werkzeuge für den mtRMCA ([Kapitel 3.2.2.2](#)) wurden die Primer für die Erfassung der mutierten Zielsequenzen im mt-Cytb-Gen bereits so positioniert, dass eine Unterscheidung der PCR-Produkte nach dem *TaqI*-Verdau möglich war (Abbildung 11). So wurde nach der Mutations-PCR mit anschließendem *TaqI*-Verdau und Agarose-Gelelektrophorese wahlweise eine 245 bp lange Bande (in der *TaqI*-Schnittstelle mutiert), zwei Banden mit 49 bp + 196 bp (z.B. Abbildung 28) oder eine Kombination beider Varianten erwartet.

Um die optisch nach Agarose-Gelelektrophorese detektierten Mutanten-Banden zu bestätigen, wurden diese in jedem Falle ausgeschnitten, aufgereinigt, die DNA extrahiert und eine Nachamplifizierung mit den Mutations-Primern durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde der Standard^{-TaqI} mitgeführt. Zur Überprüfung des *TaqI*-Verdau wurde stichprobenweise Standard^{+TaqI} mitgeführt. Somit waren Mutanten –auch optisch schwach fluoreszierende– eindeutig identifizierbar. Im Zweifelsfall wurde eine Sequenzierung zur Verifizierung des/der Mutanten durchgeführt.

Die Verwendung extrahierter DNA „auslaufender Banden/Striche“ (Anhang Abbildung 44), die auf Höhe der 250 bp detektiert wurden, führte nach erneuter Amplifizierung mit den Mutations-Primern zu keinem detektierbaren PCR-Produkt (Anhang Abbildung 44). Da jedoch die Postivkontrolle nach Agarose-Gelelektrophorese eine Bande bei 250 bp aufwies, lag der auslaufenden Bande/Striche nachweislich keine in der *TaqI*-Schnittstelle mutierte Zielsequenz zu Grunde (2 unabhängige Versuche mit Banden aus 2 verschiedenen Mutations-PCRs, 2. Versuch: Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde dieser Bandentyp als Mutant ausgeschlossen.

Ergebnisse und Diskussion

Eine im Rahmen dieser Arbeit entwickelte densitometrische Methode (Software Image Lab 5.0, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) zur vorzeitigen Detektion von falsch positiven Mutanten über die Ermittlung der relativen PCR-Banden-Intensitäten im Bezug zur Positivkontrolle (Standard^{+TaqI}) erwies sich als nicht verlässlich (Daten nicht gezeigt).

Akzeptanzbereich der Mutantenzahl

Um im Zweifelsfall die Möglichkeit einer Sequenzierung –in diesem Falle der Sanger Sequenzierung- zu haben, sollten die in der Mutations-PCR detektierten Mutanten per se sequenzierbar sein. D.h. wiederum, dass das Elektropherogramm sowohl hinsichtlich der Anzahl der Mutanten (Vermeidung einer Unterschätzung der Mutationsfrequenz) als auch der Mutationssequenz (Auswertung der Mutationsspektren) auswertbar sein sollte.

Bei zwei Mutantensequenzen im Reaktionsansatz ist zwar im Elektropherogramm klar erkennbar, dass es sich um zwei mutierte Zielsequenzen handelt, jedoch eine Zuordnung der exakten Sequenz nicht immer möglich. Bereits ab drei Mutanten ist keine Aussage über Anzahl und Sequenz der Mutanten im Rahmen der Sanger-Sequenzierung mehr möglich. D.h. die Mutantenzahl/*well* sollte den Wert zwei nicht übersteigen. Mit der Poisson-Verteilung wurde nun berechnet wie die Wahrscheinlichkeiten für ≥ 2 Mutanten/*well* in Abhängigkeit der detektierten Gesamtanzahl an positiven *wells* (=wells mit Mutant/en) ist (Anhang Tabelle 27). Rein rechnerisch sind bis zu einer Wahrscheinlichkeit von 2,4% bei einer Gesamtanzahl von 19 positiven *wells* in insgesamt 80 *wells* maximal 2 Mutanten pro *well* vorhanden. Dies wurde als obere Akzeptanzgrenze gewählt.

Als untere Akzeptanzgrenze galt ein Mutant. Im Falle, dass kein einziger Mutant detektiert wurde, wurden solange weitere Mutations-PCRs durchgeführt und dadurch Kopien untersucht bis ein Mutant detektiert wurde. Somit war eine Berechnung der MF und nicht nur eine Abschätzung mit „< als“ explizit möglich.

Langfristig gesehen sollten mit dem RMCA nicht nur die MFs sondern auch die detektierten Mutationsspektren miteinander verglichen werden. D.h. pro Probe sollten um die 30 Mutanten ausgewertet werden -Erfahrungswert (Scheffler et al., 2015a; Scheffler et al., 2015b). Im Rahmen der Etablierung des mitochondrialen RMCAs in Ratte sollten zudem die Schwankungen der MF-Bestimmung ermittelt werden ([Kapitel 3.6.2](#)). Um diesen beiden Ansprüchen gerecht zu werden und dabei nicht unnötig Materialien, Chemikalien und Zeit zu verbrauchen, wurde im Optimalfall eine Mutantenzahl pro PCR von 10 angestrebt.

3.6.5 Mitochondriale Mutationsfrequenzen der Leber

3.6.5.1 Schwankungen der Mutationsfrequenz bestimmt aus einer mtDNA-Lösung im Vergleich zu mehreren mtDNA-Lösungen isoliert aus demselben Organpulver

Für die Beantwortung der Fragen: wie hoch die Schwankung der MFs nach einer Dreifachbestimmung aus einer mtDNA-Lösung und in drei unabhängigen mtDNA-Lösungen isoliert aus einem Organpulver- ist, wurden die experimentell ermittelten Daten aus der Leber einer männlichen F344-Ratte verglichen.

Die MF/bp*10⁻⁶ bestimmt aus einer mtDNA-Lösung (Abbildung 29, Leber M2 c1-c3) betrug nach einer Dreifachbestimmung $4,4 \pm 5,5$ ($\pm 124,3\%$, Tabelle 10). Darin enthalten war eine Bestimmung, in der kein einziger Mutant detektiert wurde. Um das Ergebnis statistisch abzusichern, wurden weitere 6 MFs bestimmt. Nach Auswertung aller 9 Werte betrug die mitochondriale MF in der Leber einer männlichen F344-Ratte $3,2 \pm 3,1 \cdot 10^{-6}/\text{bp}$ ($\pm 96,7\%$).

Die MFs der drei unabhängig isolierten mtDNA-Lösungen -isoliert aus demselben Organpulver (Abbildung 29 Leber M2 a-c)- betragen nach jeweils einer Einzelbestimmung $5,3 \cdot 10^{-6}/\text{bp}$, $8,0 \cdot 10^{-6}/\text{bp}$ und $21,3 \cdot 10^{-6}/\text{bp}$. D.h. durchschnittlich lag die MF hier bei $11,5 \pm 8,6 \cdot 10^{-6}/\text{bp}$ ($\pm 74,3\%$).

Woran liegt es, dass die relative Schwankung nach der Dreifachbestimmung aus unabhängig isolierten mtDNA-Lösungen kleiner war als nach der 9-fachen Bestimmung einer einzigen mtDNA-Lösung? Wahrscheinlich ist dies in diesem Falle der statistischen Auswertung geschuldet. Es wurden Mittelwerte und Standardabweichungen gebildet, die offenbar für die Art und Anzahl der Daten nicht aussagekräftig sind. In der Literatur wird sowohl die Auswertung von MFs als auch die Daten-Darstellung unterschiedlich gehandhabt (Tabelle 9), da die MFs entweder als parametrische oder als nicht-parametrische Daten angesehen werden.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 9 Tabellarische Übersicht zu Auswertungsmöglichkeiten von Mutationsfrequenzen. SEM, Standardfehler; SD, Standardabweichung.

Statistischer Test	Angabe des Endergebnisses	Literaturquelle
Mann-Whitney U	Median + Datenpunkte	(Wright et al., 2011)
Wilcoxon signed rank	Median + Datenpunkte	(Biniecka et al., 2016)
Spearman's rank correlation		
t-Test		
Wilcoxon signed rank	Median ± Interquartile	(Biniecka et al., 2011; Gorman et al., 2010)
Spearman's rank correlation		
Mann-Whitney U	Median ± Interquartile	(Itsara et al., 2014)
t-Test	MW ± SD	(Chen et al., 2010)
Shapiro-Wilk mit Bonferroni-Korrektur	MW ± SEM	(Wu et al., 2015a)
t-Test	MW ± SEM	(Ribas et al., 2016) (Valente et al., 2016) (McGarry et al., 2017) (Dai et al., 2009) (Ericson et al., 2012) (Vermulst et al., 2007)
ANOVA Tukey		
n.a.	MW ± SEM	(Bielas und Loeb, 2005)
Wilcoxon signed rank	n.a.	(Bielas et al., 2006)
One-way ANOVA	Absolutwert	ohne (Schulz et al., 2016)
t-Test	Schwankung	

Die Daten dieser Arbeit wurden deshalb zusätzlich bezüglich des Medians und der absoluten MF ausgewertet. Dabei betrug der Median der $MF \cdot 10^{-6}/bp$ in einer mtDNA-Lösung über alle neun Werte 2,7 (Absolutwert: 2,4). Diese MFs waren ca. 3-mal niedriger als die $MF \cdot 10^{-6}/bp$, welche aus dem gleichen Organpulver jedoch aus drei unabhängigen mtDNA-Lösungen bestimmt wurde (Median 8,0; Absolutwert 11,5).

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 10 Mitochondriale Mutationsfrequenzen im mt-Cytb-Gen im Leberlappen 6 einer männlichen F344-Ratte. Die Tabelle gibt einen Überblick zu den mit Hilfe des in dieser Arbeit entwickelten mitochondrialen RMCA ermittelten Mutationsfrequenzen, welche einmal pro Kopie (MF/Kopie) und einmal pro Basenpaar (MF/bp) berechnet wurde. Zur Berechnung dienten die Mutanten- und die Kopiezahl (KoZa), wobei für die Mutantenzahl der nach Poisson korrigierte Wert wurde.

L6	Mutanten		KoZa	MF/Kopie (*10 ⁻⁶)	MF/bp (*10 ⁻⁶)	MW ± SD (±RSD)	
	Gel	Poisson					
a	2	2	94080	21,3	5,3	11,5 ± 8,6 (74,3%)	
b	8	8	94114	85,0	21,3	Absolut 11,5	
c	3	3	94005	31,9	8,0	Median: 8,0	
c-1	4	4	94238	42,4	10,6	4,4 ± 5,5 (124,3%)	5,3 ± 5,9 (111,8%) Absolut: 2,6 Median: 2,7
c-2	0	0	94238	0,0	0,0	Absolut: 4,4	
c-3	1	1	94238	10,6	2,7	Median: 2,7	
c-4	4	4	365600	10,9	2,7	3,2 ± 3,1 (96,7%)	
c-5	4	4	365600	10,9	2,7	2,5 ± 1,1 (45,3%)	
c-6	6	6	1096800	5,5	1,4	Absolut: 2,4	
c-7	6	6	1096800	5,5	1,4	Median: 2,7	
c-8	16	17	941176	17,0	4,5	Absolut: 2,4	
c-9	24	27	2823529	7,1	2,4	Median: 2,6	

3.6.5.2 Schwankungen zwischen den Tieren und den Geschlechtern

Für die Beantwortung der Frage ob die MFs zwischen mehreren Tieren vergleichbar sind und ob es einen Einfluss des Geschlechtes gibt, wurde in Folge des ersten Versuches ([Kapitel 3.6.5.1](#)) pro Tier eine Aufarbeitung (eine DNA-Isolierung, ein *TaqI*-Verdau, eine Kopiezahl) und aus dem *TaqI*-Verdau jeweils eine unabhängige Dreifachbestimmung der Mutantenzahl durchgeführt. Die MFs wurden zur Information als Mittelwert \pm Standardabweichung berechnet. Zur statistischen Auswertung wurde jedoch der Median herangezogen.

In den Mutations-PCRs wurden nach Gelelektrophorese und Nachamplifizierung zwischen 5 und 17 Mutanten (Poisson korrigiert) bestätigt (Anhang Tabelle 29). Dies lag innerhalb der zuvor festgelegten Grenzen von maximal 19 ([Kapitel 3.6.4](#)). Die eingesetzten Kopiezahlen schwankten zwischen ca. 100.000 und 1 Million.

Die absoluten MFs/bp $\cdot 10^{-6}$ lagen bei den männlichen Tieren zwischen 1,6 (M4), 3,2 (M2) und 34,4 (M1, Abbildung 31, Anhang Tabelle 29). Dies entspricht einem Unterschied von ca. 22 zwischen der niedrigsten und höchsten MF. Bei den weiblichen Tieren variierten die absoluten MFs/bp $\cdot 10^{-6}$ zwischen 3,0 (W4) und 12,9 (W2). Somit lag bei den weiblichen Tieren eine maximale Schwankung in der MF von ca. 4,3 vor. D.h. bereits innerhalb eines Geschlechtes sind die MFs einer biologischen Schwankung unterworfen. Um zu bestimmen, ob dieser teilweise auch größer als der Faktor 22 sein kann, müssten die MFs in der Leber von weiteren F344-Ratten ermittelt werden. Insgesamt unterschieden sich die MFs zwischen männlichen und weiblichen Tieren jedoch nicht statistisch signifikant (Mann-Whitney-Test; $p < 0,05$, Abbildung 31).

Ergebnisse und Diskussion

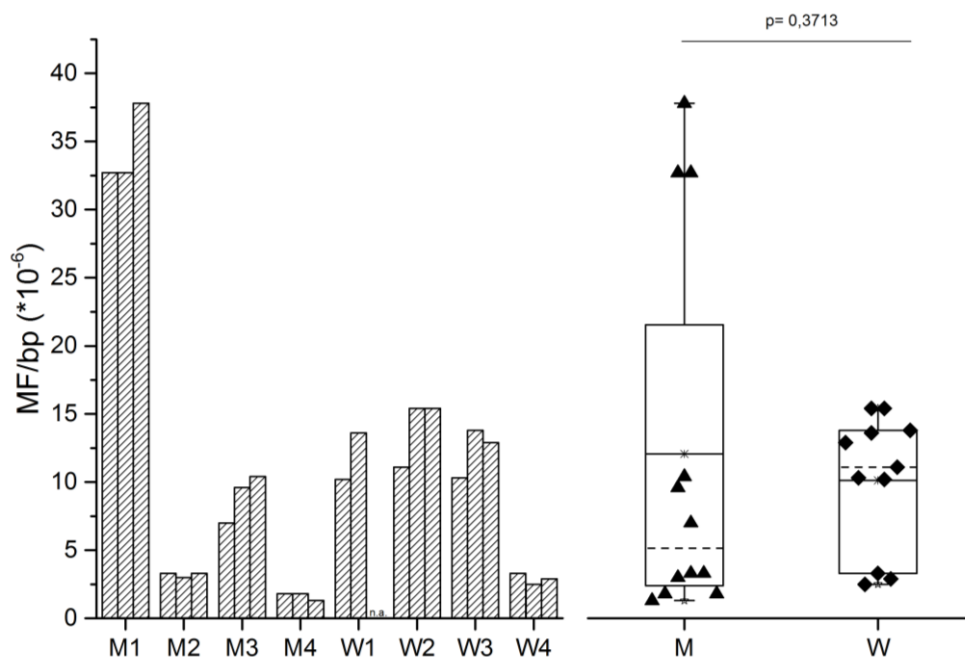


Abbildung 31 Mutationsfrequenzen (MF) im mt-Cytb-gen des Leberlappens 3 von *Rattus norvegicus*. Dargestellt sind die MFs (Balken) von 4 männlichen (M1-M4) und 4 weiblichen (W1-W4) Tieren. Die Kopiezahl wurde mit einer *TaqMan*-basierten Kopiezahl-PCR und die Mutanten mit einer SYBR-Green-basierten Mutations-PCR bestimmt. Für den statistischen Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Tieren wurde der Mann-Whitney-Test ($p < 0,05$) durchgeführt. Dargestellt sind die MFs (Dreieck), der Mittelwert (Querlinie), der Median (gestrichelte Querlinie) sowie das jeweilige Maximum und Minimum.

3.6.6 Zusammenfassung und Fazit

Die Bestimmung der mitochondrialen MFs in Leber wurden durchgeführt, um die Robustheit (z.B. Einfluss des Gewebes, Schwankung zwischen den Tieren, Einfluss des Geschlechtes) des in dieser Arbeit entwickelten mitochondrialen RMCAs näher zu untersuchen.

Sobald die Kriterien für die Kopiezahlquantifizierung (Verhältnis Standard/Probe: 51-300%; Interne Wiederfindung: 78-166% \pm maximal 20%; Präzision Probe: maximal $\pm 20\%$) als auch die Mutantenzahl-Bestimmung (zwischen 1-19 Mutanten) erfüllt waren, wurde die MF/bp ermittelt.

Die MF/bp unterlag nach einer Mehrfachbestimmung aus derselben mtDNA-Lösung relativen Schwankungen bezogen auf den Mittelwert von bis 96,7% ($n=9$). Um diese Schwankung möglicherweise zu minimieren, sollte künftig neben derselben mtDNA-Lösung eine Mehrfachbestimmung immer aus derselben *TaqI*-Verdau-Lösung ([Kapitel 6.5.6](#)) für eine Mehrfachbestimmung der Mutantenzahl verwendet werden. Innerhalb der Untersuchung der MFs in der Leber über mehrere Tiere lag die relative Standardabweichung dann im Durchschnitt bei 13,1%.

Ergebnisse und Diskussion

Welche Schwankungen der mitochondrialen MFs bestimmt mit dem RMCA sind laut Literatur zu erwarten?

Vermulst et al. (2007) ermittelten Spontan-MFs im Gehirn von Wildtyp-Mäusen, welche um $21,1\% \pm 6,1\%$ ($\pm 29,0\%$) schwankten. In der Fruchtfliege wurden MFs ermittelt, welche durchschnittlich eine Schwankung von $32,2\% \pm 16,0\%$ ($\pm 49,6\%$, Kopf) und $72,0\% \pm 26,1\%$ ($\pm 36,2\%$, Brustkorb) aufwiesen (Itsara et al., 2014). Die MFs in der mtDNA isoliert aus humanem Darmgewebe schwankten um $24,0\% \pm 13,3\%$ ($\pm 55,4\%$) (Ericson et al., 2012). Die in dieser Arbeit ermittelten $13,1\%$ lagen im Schnitt ca. um den Faktor 1,6-5,5 niedriger als die Literaturdaten. Unter der Annahme, dass es sich bei dem in dieser Arbeit aufgestellten Datensatz um repräsentative Schwankungen handelt, wäre mit dem entwickelten mtRMCA leichter eine Änderung in der Mutationsfrequenz detektierbar als mit den aus der Literatur zitierten.

Für die weitere statistische Auswertung der MFs wurde sich nach Sichtung der aktuellen Literatur, in welcher kontrovers über die Einordnung von MFs als parametrische oder nicht-parametrische Daten diskutiert wird, auf Grund unserer Datenlage ($n \leq 12$) für die Anwendung nicht-parametrischer Statistik entschieden.

Innerhalb eines Geschlechtes schwankten die MFs bereits um den Faktor 4 oder 22. Ein statistischer Unterschied zwischen den Geschlechtern war jedoch nicht nachweisbar (Mann-Whitney, $p < 0,05$). Die ermittelte absolute MF der Leber von *Rattus norvegicus* lag somit über alle Tiere bei $5,9 \cdot 10^{-6}/\text{bp}$.

Ähnliche mitochondriale Mutationsfrequenzen wurden in Ganglienzellen der Netzhaut von Wistar-Ratten ermittelt. So lag die mit Hilfe des RMCA erhaltene $\text{MF}/\text{bp} \cdot 10^{-6}$ zwischen 1-9 (Wu et al., 2015b).

In 20-24 Wochen alten MutaTMMouse wurden mit Hilfe des RMCA, welcher mit einer droplet digital PCR (ddPCR) gekoppelt wurde, MFs von $2,6 \pm 1,0 \cdot 10^{-6}/\text{bp}$ (12SrRNA) und $2,2 \pm 1,0 \cdot 10^{-6}/\text{bp}$ (ND5) ermittelt (Valente et al., 2016). Dabei handelt es sich bei der MutaTMMouse um eine transgene Maus, bei welcher das Target ein bakterielles lacZ-Gen, das über den Lambda-Phagen in das Genom jeder Mauszelle eingebaut wird, ist. In den gleichen Mäusen wurde die mitochondriale MF in Knochenmark bestimmt und betrug $3,5 \pm 0,7 \cdot 10^{-6}/\text{bp}$ (12SrRNA) und $1,7 \pm 0,2 \cdot 10^{-6}/\text{bp}$ (ND5).

Die mitochondrialen Mutationsfrequenzen in Abhängigkeit vom Alterungsprozess untersuchte Vermulst et al. (2007). Im Gehirn von 1-3 Monate alten Wildtyp-Mäusen wurde eine mitochondriale MF von $0,60 \pm 0,09 \cdot 10^{-6}$ (12SrRNA) und $11 \pm 3 \cdot 10^{-6}$ ermittelt (Vermulst et al., 2007). In der mtDNA vom Herzen lag die MF bei $0,85 \cdot 10^{-6}/\text{bp}$ (2,5 Monate) sowie $13 \cdot 10^{-6}/\text{bp}$

Ergebnisse und Diskussion

(33 Monate). Desweiteren untersuchte Vermulst ebenso das mt-Cytb-Gen. Hier ermittelte er MF/bp von $1,2 \cdot 10^{-6}$ (2,5 Monate) bis $7,9 \cdot 10^{-6}$ (33 Monate).

Die in dieser Arbeit bestimmte MF/bp in Leber von F344-Ratten lag somit maximal 9,8-fach über bzw. 2,2-fach unter den in der Literatur mit dem RMCA in mtDNA ermittelten MFs. Bei der Interpretation der Daten darf nicht unberücksichtigt bleiben, dass der RMCA trotz der vielen Vorteile wie beispielsweise der universellen Anwendbarkeit auf alle Gewebe auch Nachteile hat. Durch die Entwicklung der PCRs auf das Target „TCGA-Schnittstelle“ hin, wird nicht erkannt wie hoch eine einzelne Kopie wirklich mutiert ist. Zwar sind alle Basen in der TCGA-Schnittstelle vertreten, dennoch ist die somit ermittelte Mutationsfrequenz lediglich eine Annahme und Hochrechnung auf das Gesamte DNA-Molekül. Demnach werden mögliche hotspots nicht durch den RMCA abgedeckt (Kraytsberg et al., 2008). Die stetige Sequenzierung der detektierten Mutanten und Auswertung der kompletten Sequenz würde bereits nähere Ergebnisse liefern.

Im Vergleich zu anderen Methoden, welche mitochondriale MFs bestimmen, zählt der RMCA als sensitiv. So wurden bei einem Vergleich zwischen den Methoden *Post-PCR-Cloning*, *single molecule PCR* und dem RMCA mitochondriale MFs im Bereich von $230 \cdot 10^{-6} \pm 100 \cdot 10^{-6}/\text{bp}$ (Post-PCR Cloning) bis $2,5 \cdot 10^{-6} \pm 4,9 \cdot 10^{-6}/\text{bp}$ (RMCA) ermittelt (Greaves et al., 2009). Die mitochondrialen MFs im Gehirn und Muskel einer männlichen F344-Ratte –gleicher Rattenstamm wie in dieser Arbeit– betragen nach Bestimmung mit *Post-PCR-Cloning* $230 \pm 190 \cdot 10^{-6}/\text{bp}$ im Gehirn und $30 \pm 40 \cdot 10^{-6}/\text{bp}$ im Muskel (Khaidakov et al., 2005). Somit waren die mitochondrialen MFs ca. um den Faktor 5-39 höher als die mit dem RMCA in dieser Arbeit ermittelten in der Leber. Auch in der Leber von Wistar-Ratten wurde mit *Post-PCR-Cloning* eine im Vergleich zu unseren Daten 89-fach höhere ($530 \cdot 10^{-6}/\text{bp}$) mitochondriale MF ermittelt (Rotskaya et al., 2010). Beim *Post-PCR-Cloning* wird zunächst die zu untersuchende DNA extrahiert, mittels PCR amplifiziert, in einen bakteriellen Vektor kloniert, das Plasmid dann wiederum reamplifiziert und zum Schluss sequenziert. Eine Ursache für diese Differenzen in den MFs zwischen den Methoden ist somit höchstwahrscheinlich unter anderem die Fehlerrate der Polymerase (Kraytsberg et al., 2008).

Zusammenfassend ist der entwickelte mitochondriale RMCA anwendbar auf den Organismus *Rattus norvegicus*. Prinzipiell ist eine Bestimmung der MF unabhängig vom Geschlecht durchführbar, d.h. innerhalb eines Experiments können weibliche und männliche Tiere eingesetzt werden.

Nach der Etablierung des genotypselektiven RMCA für die Ratte stellte sich die Frage, wie vergleichbar diese ermittelten MFs mit MFs eines *in vitro* Mutations-Tests sind. Um diesen Vergleich durchzuführen, soll der HPRT *in vitro*, der genau wie der RMCA auch BPS und kleine Deletionen detektiert, mit Modellmutagenen verwendet werden. Da der RMCA mit mtDNA

angewendet wird und der HPRT *in vitro* Mutationen im Exon der nDNA detektiert, ist jedoch zu beachten, dass mögliche Unterschiede in der MF entweder durch den Mutationstest ansich oder die untersuchte DNA-Art verursacht werden.

Als vorbereitender Schritt für diese Experimente sollte nächstes der HPRT in Rattenzellen etabliert und mit Modellmutagenen angewendet werden.

3.7. Etablierung und Anwendung des HPRT auf Rattenzellen

In der OECD guideline 476 sind Zelllinien aufgeführt, die typischerweise für in-vitro Säugerzellen Genmutations-Tests verwendet werden und deren Eignung als bestätigt angesehen wird. Es sind jedoch keine Rattenzellen aufgeführt. Es gibt folglich keine etablierten Ratten-Zelllinien, die für die Anwendung im HPRT empfohlen werden.

Deshalb sollte als nächstes eine Ratten-Zelllinie ausgewählt werden, die auf Grund ihrer Zelleigenschaften wie z.B. der Koloniebildungsfähigkeit (PE) und Spontanmutantenfrequenz (SMF) für den HPRT-Test verwendet werden kann ([Kapitel 3.7.1](#)). In dieser sollte an Hand von Modellmutagenen mit bekanntem Wirkmechanismus überprüft werden, ob eine Induktion zu Mutationen führt. Dazu sollen Inkubationen mit dem Adduktbildner NQO und dem Alkylanz EMS durchgeführt werden ([Kapitel 3.7.2](#)).

3.7.1 Auswahl der Zellen und Charakterisierung

Als für unsere Fragestellung geeignet galt eine Zelllinie der Spezies *Rattus norvegicus*, welche

- wenig Spontanmutationen aufweist, d.h. wenig transformiert ist und
- eine Verdopplungszeit hat, welche praktikabel ist um viele Zellen zur DNA-Isolierung (Anwendung des RMCA) zu sammeln.

Nach Literaturrecherche entsprachen die Zelllinien NRK (*normal rat kidney*, unveränderte Ratten-Nierenepithelzellen) und MATLyLu (Ratten-Prostatakrebszellen) diesen Anforderungen.

MatLyLu-Zellen wurden ursprünglich aus dem Dunning R 3327 AT Prostatatumor einer Kopenhagener Ratte gewonnen. Sie werden als Androgen-unempfindlich beschrieben und haben ein hohes metastatisches Potential (Isaacs et al., 1986). NRK-52E-Zellen sind von einer männlichen Ratte gewonnen und haben einen homozygoten Chromosomensatz (de Larco und Todaro, 1978; Huu et al., 1966)

Wann gelten die Zellen für die Verwendung im HPRT als geeignet?

- Um zytotoxische Effekte zu erfassen, sollte der Totanteil innerhalb einer normalen Passage ohne Inkubation gering sein.
- Die SMF sollte < 20 sein um auch geringe Auswirkungen auf die SMF zu erfassen.

Ergebnisse und Diskussion

- Die Koloniebildungsfähigkeit zum Zeitpunkt der Selektion und nach Beendigung der Inkubation soll reproduzierbar sein.
- Um eine gewisse Praktikabilität zu gewährleisten, sollte die Verdopplungszeit der Zellen bei ca. 12 h liegen (vgl. V79 Zellen).

Zur Erfassung der Wachstumseigenschaften wurde je Zelllinie dreifach unabhängig eine Wachstumskurve ausgestreut ([Kapitel 6.5.13](#)) und diese hinsichtlich der Dauer der Latenzzeit und der exponentiellen Phase sowie den Verdopplungszeiten, dem zu erwartenden Totanteil als auch den maximalen Zelldichten ausgewertet ([Kapitel 3.7.1.1](#) und [Kapitel 3.7.1.2](#)). Desweiteren wurde die PE und die SMF im Laufe der Passage bestimmt ([Kapitel 3.7.1.3](#)).

3.7.1.1 Latenzzeit, Verdopplungszeit und maximale Zelldichte

Nach optischer Beurteilung der NRK-Wachstumskurven endete die Latenzzeit ca. nach 23 h und die exponentielle Phase begann. Diese endete ca. 28 h bis 32 h später und ging in die Plateau-Phase über (Abbildung 32). Während der Latenz-Phase betrug die Vervielfachung zwischen 1,5 und 2,1, die Verdopplungszeit während der exponentiellen Phase lag zwischen 10,8 h und 11,2 h. Somit hatten die Zellen eine mehr als doppelt so schnelle Verdopplungszeit wie die von Best et al. (1999) in NRK-52E-Zellen ermittelten 28 h. Die experimentell in dieser Arbeit ermittelte maximale Zelldichte in der exponentiellen Phase lag mit durchschnittlich $1,11 \cdot 10^5 \pm 0,41 \cdot 10^5$ Zellen/cm² ca. 30% unter dem Literaturwert von $1,56 \cdot 10^5$ Zellen/cm² (Best et al., 1999).

Die MATLyLu-Zellen verhielten sich nach Beurteilung der Zelldichten zu den gewählten Zeitpunkten ähnlich wie die NRK-Zellen. Die Latenzzeit endete ebenfalls nach ca. 23 h und das exponentielle Wachstum der Zellen hielt anschließend für 28 h bis 32 h (Abbildung 33). Während der Latenz-Phase betrug die Vervielfachung zwischen 2,3 und 2,5, die Verdopplungszeit während der exponentiellen Phase lag zwischen 11,0 h und 11,5 h. Verglichen mit den in der Zelldatenbank DSMZ (https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-609.html?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=192, Stand 20.08.2017) angegebenen Verdopplungszeit von 15 h wuchsen die Zellen um 23-27% schneller. Als maximale Zelldichte in der exponentiellen Phase wurde $1,80 \cdot 10^5 \pm 0,26 \cdot 10^5$ Zellen/cm² ermittelt.

Ergebnisse und Diskussion

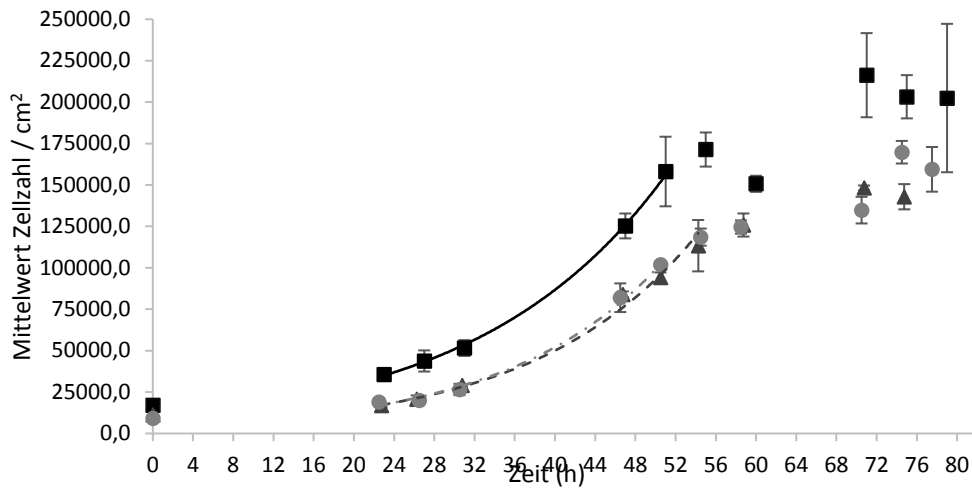


Abbildung 32 : Wachstumskurven der NRK-Zellen. Ausgestreut wurde aus Passage 3. Jeder Datenpunkt wurde in einer abhängigen Dreifachbestimmung ermittelt und ist als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt (Rohdaten Anhang Tabelle 30). Die Ausstreudichten variierten zwischen $17009 \text{ Zellen / cm}^2 \pm 702 \text{ Zellen / cm}^2$ (schwarze Quadrate), $11307 \text{ Zellen / cm}^2 \pm 665 \text{ Zellen / cm}^2$ (dunkelgraue Dreiecke) und $9080 \text{ Zellen / cm}^2 \pm 204 \text{ Zellen / cm}^2$ (hellgraue Kreise).

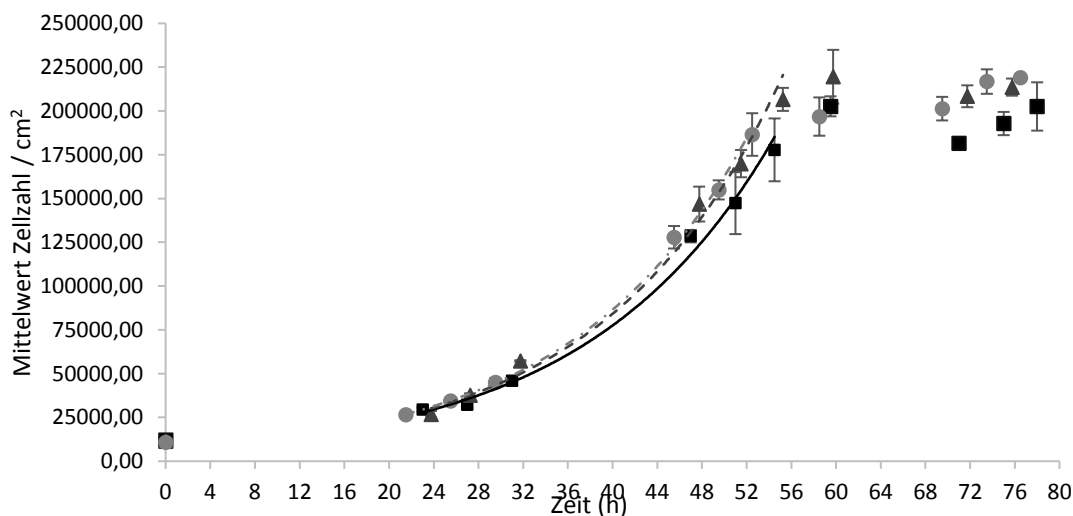


Abbildung 33: Wachstumskurven der MATLyLu-Zellen. Ausgestreut wurde aus Passage 3. Jeder Datenpunkt wurde in einer abhängigen Dreifachbestimmung ermittelt und ist als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt (Rohdaten Anhang Tabelle 31). Die Ausstreudichten variierten zwischen $12067 \text{ Zellen / cm}^2 \pm 36 \text{ Zellen / cm}^2$ (schwarze Quadrate), $11438 \text{ Zellen / cm}^2 \pm 810 \text{ Zellen / cm}^2$ (dunkelgraue Dreiecke) und $10825 \text{ Zellen / cm}^2 \pm 57 \text{ Zellen / cm}^2$ (hellgraue Kreise).

3.7.1.2 Totanteil in Abhängigkeit der Zelldichte und innerhalb der Passage

Um neben der Zellzahl einen weiteren Parameter zur Beurteilung der Vitalität der Zellen zu haben, sollte der Totanteil in Abhängigkeit der Zelldichte und unter Passagebedingungen ermittelt werden.

Ergebnisse und Diskussion

Innerhalb der Passage schwankten die Totanteile der NRK-Zellen zwischen 1,9% und 14,0% (Anhang Tabelle 32), die der MATLyLu-Zellen zwischen 3,2% und 8,2% (Anhang Tabelle 33).

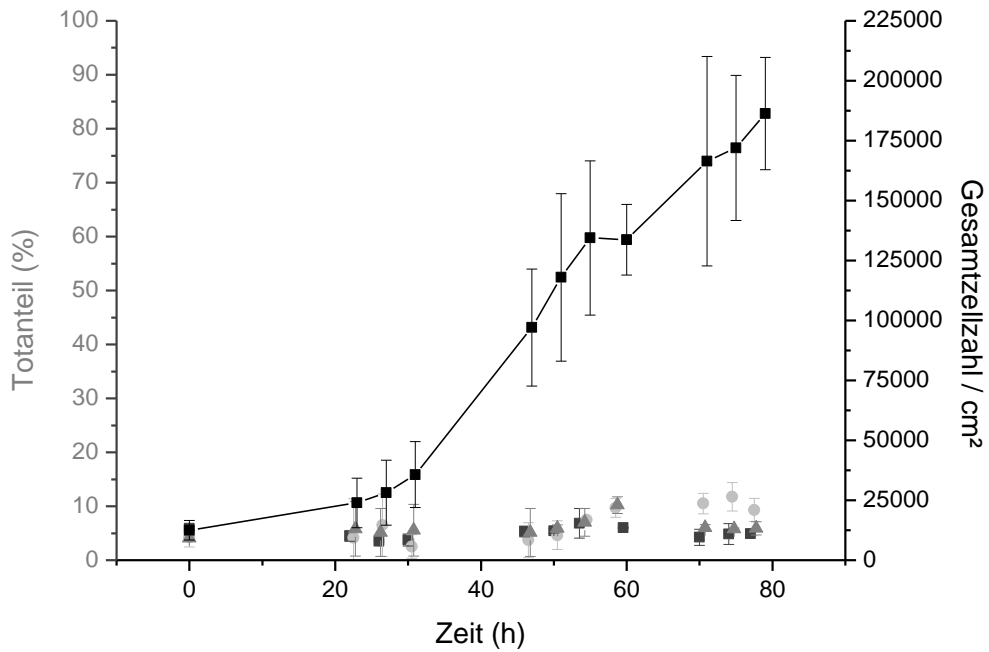
Für die Analyse der Totanteile in Abhängigkeit von der Zelldichte wurde zusätzlich im Rahmen der Wachstumskurven der Anteil der toten Zellen bestimmt, indem bei jedem Zeitpunkt der Totanteil mit der Trypanblaufärbung ([Kapitel 6.5.12.3](#)) analysiert wurde.

Der Anteil an toten Zellen lag bei den NRK-Zellen während der exponentiellen Phase zwischen 2,5% und 7,5% und stieg im schlechtesten Fall in der Plateau-Phase auf 11,8% (Abbildung 34). Bei den MATLyLu-Zellen variierte der Totanteil innerhalb der exponentiellen Phase zwischen 3,0% und 9,1% und stieg in der Plateau-Phase maximal auf 14,1%. Im Gegensatz zu den MATLyLu-Zellen stieg bei den NRK-Zellen die Anzahl der toten Zellen tendenziell mit steigender Zelldichte.

Der ermittelte Totanteil innerhalb der Passage passt zu dem der exponentiellen Phase. Somit war davon auszugehen, dass die Zellen innerhalb der exponentiellen Phase bis zu Zelldichten von $1,11 \pm 0,41 \cdot 10^5$ Zellen/cm² ($\pm 36,7\%$, NRK) bzw. $1,80 \pm 0,26 \cdot 10^5$ Zellen/cm² ($\pm 14,4\%$, MATLyLu) in einem vitalen Zustand sind.

Ergebnisse und Diskussion

NRK



MATLyLu

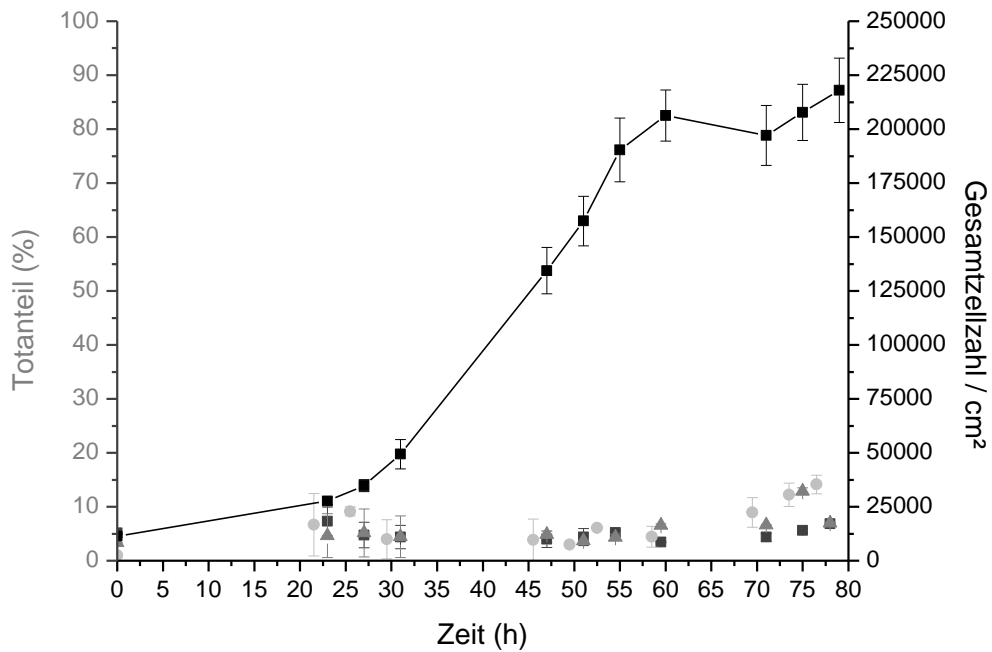


Abbildung 34: Totalteil (%), graue Quadrate, graue Dreiecke, graue Kreise) der NRK- und MATLyLu-Zellen in Abhängigkeit von der Zelldichte. Die unabhängige Dreifachbestimmung erfolgte im Rahmen der Erstellung der Wachstumskurve mittels Trypanblaufärbung und anschließender Zählung der Zellen mit Neubauer Zählkammer. Zur Berechnung des Totalteils wurde die Gesamtzellzahl als 100% gesetzt.

3.7.1.3 PE und SMF

Die Bestimmung der SMF mit Hilfe des HPRT Tests beruht auf der Ermittlung der PE und der Mutantendetektion in ca. 1 Mio Zellen. Durch die Bestimmung der PE und deren Verrechnung wird berücksichtigt, dass nicht alle Zellen koloniebildungsfähig sind. Dabei sollte die PE jedoch mindestens 0,7 sein (OECD, 1997c; Li et al., 1987). Um auch schwache Mutagene zu erfassen, sollte die spontane Mutantenfrequenz (SMF) von >0 bis 20 sein (Li et al., 1987).

Für die Analyse der PE ([Kapitel 6.5.14](#)) und SMF ([Kapitel 6.5.15](#)) der potentiell für den HPRT-Einsatz generierten *batch* (gleiche *batch* von der die Wachstumskurven generiert wurden) wurden die verwendeten Zellen frisch aufgetaut (Passage (P) 1) und bis zu P10 passagiert.

NRK

Bei den NRK-Zellen stieg die PE bis P4 stetig an und schwankte danach zwischen $41,3\% \pm 8,9\%$ (P10) und $48,4\% \pm 1,0\%$ (P8, Abbildung 35). Die dazugehörige SMF variierte in den ersten vier Passagen zwischen 12,6 (P1) und 18,6 (P2), wobei sie ab P5 von $31,6 \pm 4,4$ stetig auf bis zu 226,8 (P10) anstieg (Abbildung 35).

Die PE von maximal 48,4% lag ca. 37% unter der publizierten PE von $85\% \pm 2,8\%$ für NRK-53E-Zellen (Rafferty, 1985) bzw. 12% unter der PE der epithelialen Leber-Zelllinie 6A-6 mit $59,9\% \pm 4,5\%$ (Miyazaki et al., 1986). Auch die im Arbeitskreis bereits etablierten und im HPRT angewendeten V79 Hamster-Zellen wiesen mit einer PE von mind. 70% (Schlechtweg, 2011) bzw. 75-85% (Sirianni et al., 1981) eine um 22% höhere Koloniebildungsfähigkeit auf. Eine verringerte Koloniebildungsfähigkeit der Zellen erschwert generell die Detektion von Mutanten. Dennoch wurden experimentell SMFs von 7-227 ermittelt. Da ab P5 die angestrebte SMF von ≤ 20 überstiegen wurde, sollte im Rahmen eines HPRTs spätestens zu P4 die MF bestimmt werden. Empfindlichkeitseinbußen in der Detektion von mutagenen Potentialen durch die SMF von $18,0 \pm 4,9$ in P4 wurden akzeptiert, da der HPRT in diesem Falle nicht zur Detektion von mutagenen Potentialen sondern zur Klärung übergreifender Fragen zwischen HPRT und RMCA dienen sollte.

MATLyLu

Bei den MATLyLu-Zellen erreichte die PE, welche zwischen $32,3\% \pm 28,7\%$ ($\pm 88,9\%$) und 75,1% schwankte, weder ein Plateau noch war ein Trend erkennbar (Abbildung 36). Eine Berechnung der SMF war auf Grund fehlender Mutantenkolonien nicht durchführbar.

Nachdem mit den regulär ausgestreuten 1 Million Zellen null Mutanten detektiert wurden, wurde die ausgestreute Zellzahl zur Selektion auf 5 und 10 Millionen erhöht. Bei keiner der beiden Zellzahlen wurde eine Mutante detektiert. Somit lag die SMF mindestens $\leq 0,15$ Mutanten/1Million Zellen. Da eine weitere Steigerung der Zelldichte zum Zeitpunkt der

Ergebnisse und Diskussion

Selektion zu große Mengen an Zellen verbrauchen würde um den HPRT-Test praktikabel zu gestalten, wurde die Zelllinie MATLyLu für den Einsatz im HPRT verworfen.

Möglicherweise war die Ursache der erschwerten Detektion von Mutanten darin begründet, dass es sich bei der MATLyLu-Zelllinie um eine Krebszelllinie handelt. Zwar verspricht diese Tatsache ein schnelles Wachstum der Zellen, aber gleichzeitig muss mit einem über die Zellteilung hinweg variablen Chromosomensatz gerechnet werden. Beschrieben wird die Zelllinie mit einer Chromosomenzahl von 61-70 (Isaacs et al., 1986; Wake et al., 1982). Im Falle, dass das X-Chromosom und somit das HPRT-Gen mehrfach vorliegt, wäre eine Selektion mit 6-Thioguanin nicht mehr gegeben. Der variable Chromosomensatz würde zudem die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen inuduzierter MF und SMF nicht gewährleisten.

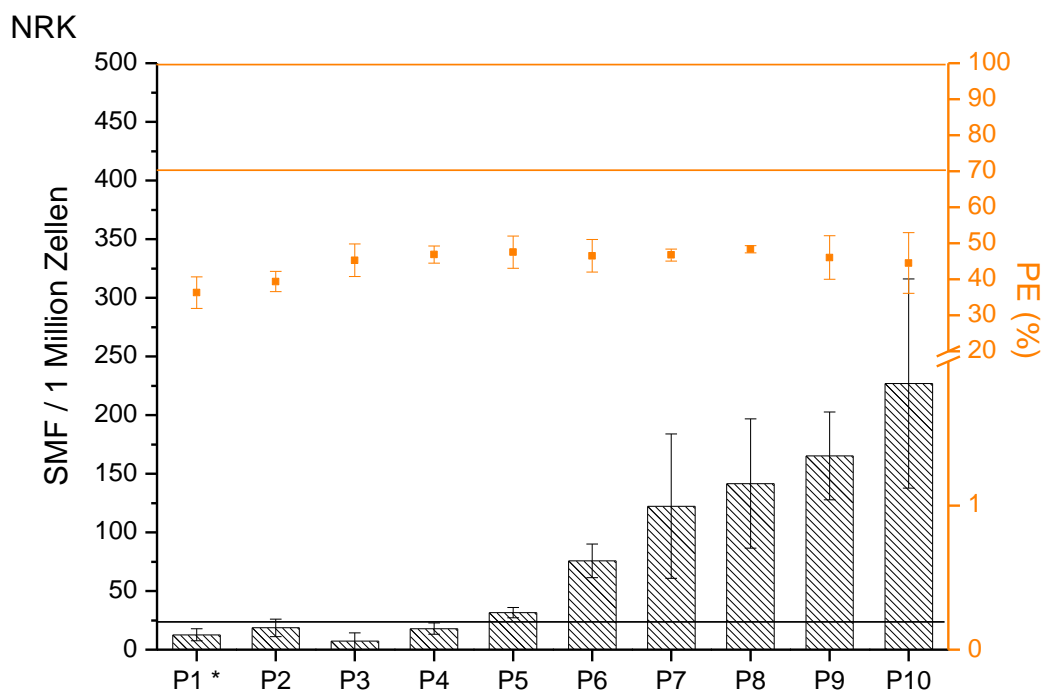


Abbildung 35: Darstellung der PE und SMF von NRK-Zellen von Passage 1-10. Ausgestreut wurden Zellen der eigens für die potentielle Verwendung im HPRT-Test hergestellten batch. Die Zellzahl wurde bestimmt mit der Gesamtzellzahl gemessen am CASY abzüglich der toten Zellen, die mit Trypanblau bestimmt wurden. Angegeben ist jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung. Bei P1 wurde eine Zweifachbestimmung angefertigt.

MATLyLu

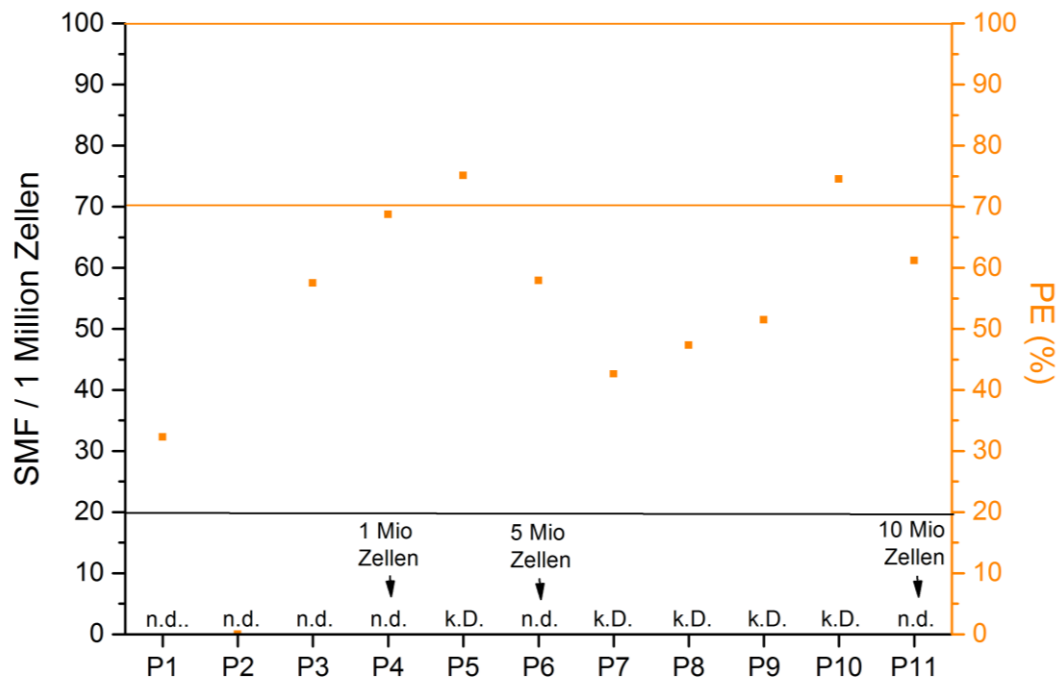


Abbildung 36: Darstellung der PE und SMF von MATLyLu-Zellen im Verlauf der Passage. Ausgestreut wurden Zellen der eigens für die potentielle Verwendung im HPRT-Test hergestellten batch. Die Zellzahl wurde bestimmt mit der Gesamtzellzahl gemessen am CASY abzüglich der toten Zellen, die mit Trypanblau bestimmt wurden. Angegeben ist die PE und SMF einer Einfachbestimmung mit Ausnahme von P1. Hier wurden Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. k.D. = keine Daten vorhanden; n.D. = nicht detektierbar.

Ergebnisse und Diskussion

3.7.1.4 Tabellarische Zusammenfassung

Tabelle 11: Charakterisierung der Zelllinien NRK (*normal rat kidney*, unveränderte Ratten Nierenepithelzellen) und MATLyLu (Prostatakrebszellen) hinsichtlich ihrer Wachstumseigenschaften, Koloniebildungsfähigkeit (PE, Plating Efficiency) und Spontanmutantenfrequenz (SMF). Charakterisiert wurde eine generierte *batch*, welche im Falle einer Eignung künftig für alle HPRTs verwendet werden sollte. Die Wachstumskurven wurden 3-fach unabhängig durchgeführt. T_{0-n} , Latenzzeit; T_{2n} , Verdopplungszeit; T_{exp} , Dauer exponentielle Phase; ZD_{max} , maximale Zelldichte; Tot_P , Totanteil während der Passage; Tot_{exp} , Totanteil innerhalb der exponentiellen Phase; Tot_{Plat} , Totanteil innerhalb der Plateau-Phase.

	NRK	MATLyLu
T_{0-n} (h)	ca. 23	ca. 23
	Verfielfachung: $x1,9 \pm 0,4$ ($\pm 18,5\%$)	Verfielfachung: $x2,4 \pm 0,1$ ($\pm 2,6\%$)
T_{2n} (h)	$11,0 \pm 0,2$ (1,8%)	$11,2 \pm 0,3$ ($\pm 2,7\%$)
T_{exp} (h)	ca. 31	ca. 29
ZD_{max}	$1,11 \pm 0,41 \cdot 10^5$ Zellen/cm ² ($\pm 36,7\%$)	$1,8 \pm 0,26 \cdot 10^5$ Zellen/cm ² ($\pm 14,4\%$)
Tot_P	1,9-14% (Trypanblau)	3,2-8,2%
Tot_{exp}	$\leq 7,5\%$	$< 10\%$
Tot_{Plat}	$\leq 11,8\%$	max 14%
PE	Anstieg bis Passage 4 auf 41,3-48,4%	32,3-75,1% innerhalb der ersten 10 Passagen ohne trend
SMF	Bis P4 $18,0 \pm 4,9$ ($\pm 27,3\%$); ab P5 kontinuierlicher Anstieg über 20 Mutanten/1 Mio Zellen	$< 0,15$ pro 1 Mio zellen (keine mutante bei zelldichten zwischen 1-10 Mio)

Fazit: Die MATLyLu-Zellen erwiesen sich auf Grund der nicht detektierbaren SMF als ungeeignet für die Etablierung des HPRTs. Die NRK-Zellen entsprachen den Anforderungen für die Anwendung im HPRT. Deshalb sollte mit ihnen als nächstes ein HPRT mit Modellmutagenen durchgeführt werden.

3.7.2 Durchführung des HPRT

Der zu etablierende HPRT soll dafür verwendet werden die MFs ermittelt mit dem RMCA und dem HPRT zu vergleichen. Deshalb sollen in ihrer Wirkung bekannte Modellmutagene für die Induktion von Mutationen verwendet werden. Ausgewählt wurden NQO ([Kapitel 3.7.2.4](#)) und EMS ([Kapitel 3.7.2.5](#)).

Ergebnisse und Diskussion

Um die Erfassung der Mutationen mittels RMCA und HPRT zwischen verschiedenen Testsubstanzen (in diesem Falle EMS und NQO) vergleichbar zu machen, sollte jeweils eine Konzentration ermittelt werden, die keine oder nur eine geringe Zytotoxizität aufweist ([Kapitel 3.7.2.1](#)). Ebendiese Konzentration sollte zwar zu einer signifikanten Erhöhung der MF gegenüber der Lösemittelkontroll-MF, nicht jedoch zu einer signifikanten Erhöhung der Mikrokernrate führen ([Kapitel 3.7.2.2](#)).

3.7.2.1 Ermittlung einer nichtzytotoxischen DMSO-Konzentration

Üblicherweise wird im HPRT Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösemittel für hydrophobe Substanzen eingesetzt. Da organische Lösemittel toxisch in Mengen über 2-5% (v/v) sind, wird eine Konzentration von $\leq 0,5\%$ (v/v) empfohlen (Bradley et al., 1981). Die in der Literatur verwendeten Konzentrationen variieren dennoch zwischen 0,1% (v/v) (Kulling und Metzler, 1997) und 1% (v/v) (Scheffler et al., 2015b; Brugger et al., 2006).

Im Nachfolgenden sollte experimentell in einer zweifach unabhängigen Bestimmung ermittelt werden, welche DMSO-Konzentration keine zytotoxischen Effekte auf die Zellen hat. Dazu wurden die Zellen gar nicht (Medium=Kontrolle), mit 0,1% (v/v) oder 1,0% (v/v) DMSO inkubiert und das Wachstumsverhalten, die Zellzahl zum Zeitpunkt 24 h nach der Inkubation mit der PE1 und die MF inklusive der dazugehörigen PE2 bestimmt und ausgewertet.

Zellzahl und PE1

Die absolute Gesamtzellzahl nahm mit zunehmender DMSO-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle ab und betrug 24 h nach der Inkubation 87,2% (0,1% DMSO) bzw. 82,4% (1% DMSO, Anhang Abbildung 45 A). Sie unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Varianzeninhomogenität, $f < 0,05$, Scheffe, $p < 0,05$). Die PE1 hingegen schwankte entgegen diesem Trend zwischen $35,2\% \pm 3,1\%$ (Kontrolle, range/2) und $40,3\% \pm 10,7\%$ (1% DMSO, range/2, Anhang Abbildung 45 B). Sie unterschied sich nicht signifikant zu den erwarteten PEs aus den Vorversuchen (Varianzeninhomogenität, ANOVA, Brown-Forsythe $f < 0,05$, Scheffe $p < 0,05$, [Kapitel 3.7.1](#)). Verglichen an Hand nach den Vorversuchen zu erwarteten Zellzahl, waren die Zellzahlen in diesem Experiment nach der Inkubation bei P2 um das 1,7- bis 2,8-fache niedriger. Möglicherweise war dies den unterschiedlichen experimentellen Bedingungen wie beispielsweise einem „fehlenden“ Mediumwechsel 24 h nach Ausstreuen oder dem Ausstreuen aus einer früheren Passage (P1 vs. P3 in der Wachstumskurve) geschuldet.

MF und PE2

Die absolute Zellzahl am Ende des HPRT lag im Vergleich zur Kontrolle (100%) bei 91,5% (0,1% DMSO) bzw. 56,6% (1% DMSO). Die Gesamtzellzahl war bei beiden DMSO-Konzentrationen ausreichend um ein Zellpellet mit mindestens 10 Mio Zellen zu erhalten um eine MF in einer dreifach abhängigen Bestimmung zu ermitteln.

Ergebnisse und Diskussion

Die MF betrug bei der Kontrolle $40,9 \pm 18,8$ /1 Mio Zellen und sank mit zunehmender DMSO-Konzentration auf $34,3 \pm 3,7$ /1 Mio Zellen (0,1% DMSO) bzw. $25,1$ /1 Mio Zellen (1% DMSO). Somit war die MF der Kontrolle ca. doppelt so hoch wie nach den Vorversuchen ($18,0 \pm 4,9$) erwartet. Die dazugehörige PE2 variierte zwischen $27,5\% \pm 1,8\%$ (Kontrolle) und $33,1\%$ (1% DMSO) und lag folglich 22-17% unter den Erwartungen. Sowohl für dieses Experiment als auch die Vorversuche wurden die Zellen aus der gleichen angefertigten HPRT-*batch* verwendet.

Nichtsdestotrotz, waren die MFs -inkubiert mit DMSO- nicht höher als die MF der Kontrolle. Zudem führten beide DMSO-Konzentrationen gemessen an der Zellzahl zu keinen statistisch signifikanten zytotoxischen Effekten. Somit eigneten sich beide Konzentration für die Verwendung als Lösemittel im HPRT mit NRK-Zellen. Um dennoch kein Risiko einzugehen Mutationen durch das Lösemittel zu erzeugen, wurde die niedrigere DMSO-Konzentration für die nachfolgenden Experimente gewählt.

Zusammenfassend eignet sich der entwickelte NRK-Zellen-HPRT mit einer SMF von $18,0 \pm 4,9$ ($\pm 27,3\%$) und der im Vergleich nicht signifikant unterschiedlichen MF (ANOVA, scheffe, $p < 0,05$, Brown-Forsythe $f < 0,05$) von 0,1% DMSO von $34,3 \pm 3,7$ ($\pm 10,8\%$) zwar nicht zur Erfassung von bislang unbekanntem mutagenen Potentialen, jedoch für die Erzeugung mutierter Zellen und den Nachweis von im HPRT-Gen vorliegenden Mutationen.

3.7.2.3 Bestimmung der Mikrokernrate

Gemäß OECD Test guideline 487 eignen sich Zellen für die Anwendung im Mikrokern-Test, wenn die Mikrokernrate natürlicherweise zwischen 5 und 25 Mikrokernen pro 1000 Zellen liegt. Deshalb sollte ermittelt werden, ob die bislang weniger im Mikrokern-Test eingesetzten NRK-Zellen, diesem Kriterium entsprechen.

Dazu wurden in einem einmal durchgeführten Experiment im Rahmen des HPRT-Testes Zellen von der Kontrolle und die Zellen mit 0,1% DMSO nach der Inkubation aufzentrifugiert, fixiert und mikroskopisch nach DAPI-Färbung analysiert.

Bei der Kontrolle wurden 12,5 Mikrokerne/1000 Zellen und bei 0,1% DMSO 9,5 Mikrokerne/1000 Zellen gezählt. Somit lag die spontane Mikrokernrate innerhalb der erwarteten Werte von 5-25/100 Zellen (OECD, 2010). Beide Mikrokernraten lagen unterhalb den für die verwandte Zelllinie NRK-49F publizierten 25/1000 Zellen (Dunn et al., 1987). Dass bei dieser Einzelbestimmung die Lösemittelkontrolle unterhalb der Kontrolle lag, ließ vermuten, dass beide auf dem gleichen Niveau liegen und somit eine Inkubation mit 0,1% DMSO keinen Einfluss auf die Entstehung von Mikrokernen hat.

Ergebnisse und Diskussion

Anhand dieses Experimentes ist davon auszugehen, dass sich die NRK-52E-Zellen für die Anwendung im Mikrokern-Test eignen. Deshalb wurde er bei den nachfolgenden HPRT-Tests parallel mitgeführt.

3.7.2.4 Inkubation mit NQO

Ziel war es die MF erzeugt mittels HPRT mit der MF nach Durchführung des mitochondrialen RMCAs zu vergleichen. Um Mutationen zu erzeugen wurden die NRK-Zellen mit 0,1 μM NQO für 24 h inkubiert.

Zum Zeitpunkt der PE1 sanken die Zellzahlen im Vergleich zur Lösemittelkontrolle um 33,3%, unterschieden sich jedoch nicht statistisch signifikant (ANOVA, Scheffe $p < 0,05$, Brown-Forsythe, $f < 0,05$). Die PE1 betrug $35,5\% \pm 10,8\%$ ($\pm 30,4\%$), die der Lösemittelkontrolle $42,4\% \pm 4,6\%$ ($\pm 10,8\%$). D.h. es wurden geringe bis kein zytotoxischer Effekt detektiert.

Die MF/1 Mio Zellen lag nach NQO-Inkubation bei $151,2 \pm 19,7$ ($\pm 13,0\%$) und war somit ca. 5,1-fach höher als die der Lösemittelkontrolle ($29,7 \pm 7,6$; $\pm 25,6\%$). Zum Zeitpunkt der Selektion betrug die PE2 $39,2\% \pm 6,0\%$ ($\pm 15,3\%$, 0,1 μM NQO) bzw. $37,3\% \pm 6,4\%$ ($\pm 17,3\%$, 0,1% DMSO). Schwankung von 25,6% erhöht die Schwelle für die Detektion von statistisch relevanten Unterschieden. Die Erhöhung der MF im HPRT bestätigt die Entstehung von Mutationen – in diesem Falle definitiv im Exon des HPRT-Gens. Um zu testen, ob diese MF in irgendeiner Weise vergleichbar mit der möglicherweise im mitochondrialen RMCA detektierten MF ist, wurde zum Zeitpunkt der Selektion mtDNA aus den Zellen isoliert und mittels RMCA analysiert.

Die MF/bp $\cdot 10^{-6}$ der Lösemittelkontrolle betrug $3,48 \pm 0,23$ ($\pm 6,61\%$, $n=2$ unabhängige Mutations-PCRs). Dagegen wurde nach der Inkubation mit 0,1 μM NQO eine MF/bp $\cdot 10^{-6}$ von $10,5 \pm 0,45$ ($\pm 4,31\%$, $n=2$ unabhängige Mutations-PCRs) erhalten. Somit lag eine ca. dreifache Steigerung der MF durch die Inkubation vor.

Die Mikrokernrate betrug nach einer Einfachbestimmung nach der Inkubation mit 0,1% DMSO 9,6/1000 Zellen und mit 0,1 μM NQO 48,6 /1000 Zellen.

Vergleich HPRT und RMCA

Zunächst sollte bei einem Vergleich der MFs bedacht werden, dass mit beiden Tests unterschiedliche Endpunkte detektiert werden und so die Absolutzahlen unabhängig von der Einheit natürlicherweise voneinander abweichen. Der HPRT ist ein phänotypselektiver Test und detektiert Zellen, welche Mutationen im HPRT-Gen aufweisen, welche zum Verlust der Enzymaktivität führen. Es wird nicht detektiert wie viele Mutationen innerhalb des HPRT-Gens vorliegen. Der mitochondriale RMCA detektiert Mutationen in der TaqI-Erkennungssequenz TCGA und extrapoliert eine MF/bp für das ganze Gen.

Ergebnisse und Diskussion

Prinzipiell sollte die Mutationsfrequenz in mtDNA höher sein als in nDNA, da die mtDNA keine Histone besitzt, welche vor DNA-Schäden schützt. Zudem hat die mtDNA zwar ein BER Reparatursystem, aber keine NER. So sind Schäden, welche durch beispielsweise polyaromatische Kohlenwasserstoffe, Mykotoxine oder UV entstehen irreparabel. MMR oder Rekombinations-Mechanismen sind entweder nicht vorhanden oder sehr langsam (Meyer et al., 2013).

Tatsache ist, dass in beiden Tests eine Inkubation (24 h) mit 0,1 μM NQO zu einer Erhöhung der MF führte, wobei der Unterschied deutlicher (5-fach vs. 3-fach) im HPRT detektierbar war.

Da das angestrebte Ziel –keine Änderung der Mikrokernrate zwischen Kontrolle und Testsubstanz- mit der Verwendung von 0,1 μM NQO nicht erreicht wurde, sollte als nächstes eine geringere Konzentration zur Inkubation verwendet werden. Gleichzeitig sollte untersucht werden, ob trotz der Reduktion der Inkubationskonzentration eine Steigerung der Mutationsfrequenz mit dem HPRT und dem RMCA detektierbar bleibt.

Reduktion der NQO-Konzentration

Nach der Durchführung von Vorversuchen mit 0,025 μM , 0,05 μM und 0,075 μM (Daten nicht gezeigt) lag bei 0,075 μM NQO die geringste Zytotoxizität bei gleichzeitig deutlicher Erhöhung der MF vor. Dabei war keine deutliche Steigerung der Mikrokernrate zu beobachten. Deshalb wurden noch zwei weitere unabhängige HPRTs inklusive des Mikrokerntests mit 0,075 μM NQO durchgeführt.

Nach 24 h Inkubation waren die absoluten Zellzahlen 11,3% geringer gegenüber der Lösemittelkontrolle (Abbildung 37), jedoch nicht statistisch signifikant (Varianzenhomogen, $p < 0,01$; t-Test, $p < 0,01$). Die PE1 lag mit $46,4\% \pm 4,2\%$ (Lösemittelkontrolle) und $31,6\% \pm 6,6\%$ (NQO) im nach den Vorversuchen erwarteten Bereich. Obwohl sich die PE1 zwischen Lösemittelkontrolle und NQO um ca. 14% unterschied, war auch dies bei Varianzenhomogenität (F-Test, $p < 0,01$) nicht signifikant (t-Test, $p < 0,01$). Ca. 72 h nach Ende der Inkubation unterschieden sich die mit NQO behandelten Zellen in der Zellproliferation nicht mehr von der Lösemittelkontrolle (Abbildung 37).

Ergebnisse und Diskussion

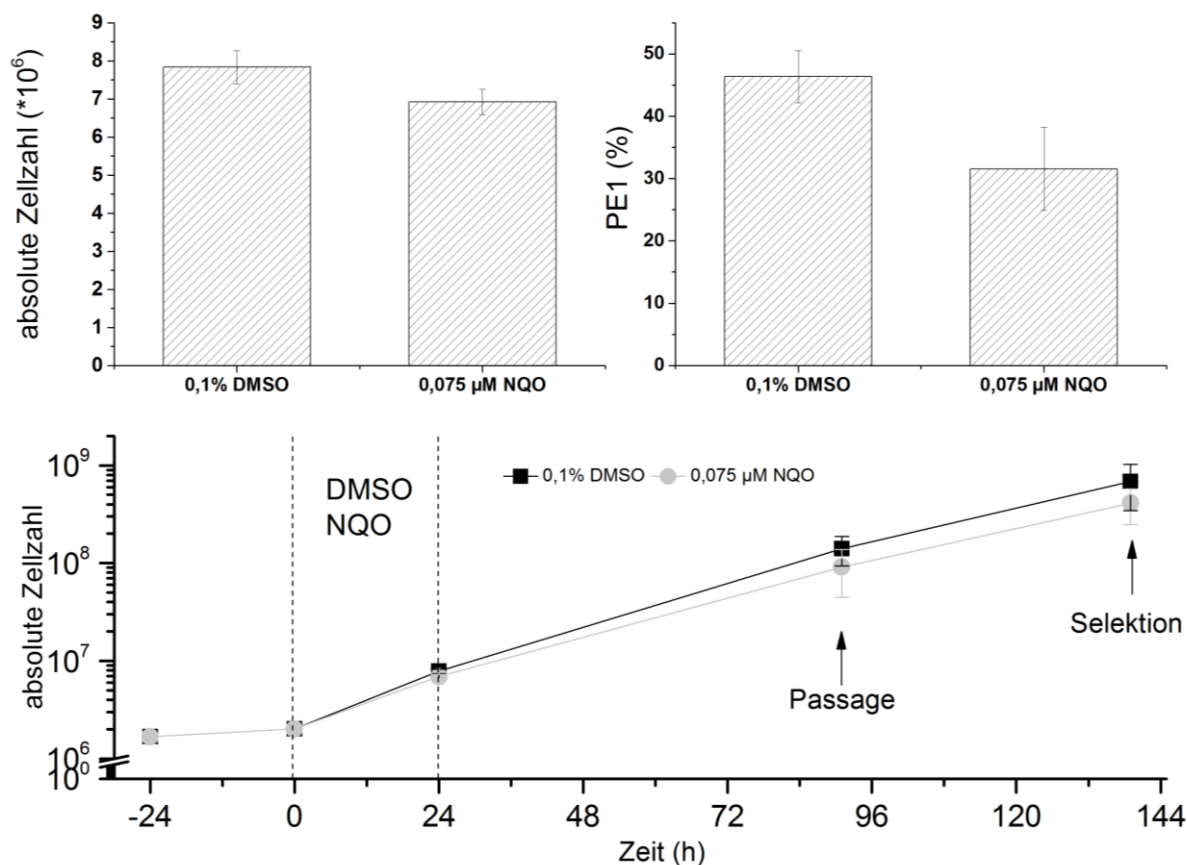


Abbildung 37 Einfluss von NQO auf die Zellzahl und die Plating Efficiency (PE) im Rahmen eines HPRT-Tests. Obere Zeile: Absolute Lebendzellzahl und PE nach Behandlung der Zellen mit 0,1% DMSO (Lösemittelkontrolle) oder 0,075 µM NQO für 24 h. Untere Zeile: Entwicklung der Zellzahl im Laufe des HPRT-Tests. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

Somit wurden insgesamt keine statistisch signifikanten zytotoxischen Effekte nach der Inkubation mit 0,075 µM NQO erhalten und folglich ein signifikanter Anstieg in der MF erwartet.

Die MF nach Inkubation mit 0,075 µM NQO betrug $110,5 \pm 25,7$ ($\pm 23,2\%$) pro 1 Mio Zellen, die der Lösemittelkontrolle $38,8 \pm 10,8$ ($\pm 27,8\%$, Tabelle 12). Dabei waren die relativen Standardabweichungen mit denen vom Vorversuch vergleich- und reproduzierbar (P4, SMF, RSD $\pm 27,3\%$). Der Unterschied von Faktor $2,9 \pm 0,3$ ($\pm 8,9\%$) war statistisch signifikant (varianzenhomogen, $p < 0,05$; t-Test, $p < 0,05$, $p = 0,011$). Die dazugehörige PE2 betrug $42,0\% \pm 4,2\%$ ($\pm 9,9\%$, NQO) bzw. $46,2\% \pm 4,63\%$ ($\pm 10,1\%$, Lösemittelkontrolle) und ließ erkennen, dass sich die Zellen von der Inkubation mit NQO vollständig erholten. Es lag kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den PEs vor (Varianzenhomogen, $p < 0,05$; t-Test, $p < 0,05$).

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 12 Mutantenfrequenzen (6-Thioguanin resistente Kolonien pro 1 Million koloniebildender Zellen) des HPRT-Gens von NRK-Zellen, welche mit 0,1% DMSO (Lösemittelkontrolle) oder 0,075 μ M NQO für 24 h behandelt wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils 3 Zellkulturschalen pro Experiment (1-3) und der daraus gebildete Gesamtmittelwert der drei unabhängigen Experimente.

	Mutantenfrequenz				Mikrokerne			
	1	2	3	MW \pm SD	1	2	3	MW \pm SD
DMSO	43,13	46,79	26,54	38,8 \pm 10,8 (\pm 27,8)	6,52	23,63	21,66	17,27 \pm 9,36 (\pm 54,19)
NQO	113,5	134,6	83,53	110,5 \pm 25,7 (\pm 23,2)	10,93	45,59	43,19	33,24 \pm 19,36 (\pm 58,24)

Nach mikroskopischer Auswertung der Zellkerne ([Kapitel 6.5.16](#)) wurden $33,2 \pm 19,4$ Mikrokerne /1000 Zellen nach NQO-Inkubation und $17,3 \pm 9,4$ Mikrokerne in der Lösemittelkontrolle detektiert (ca. Faktor 1,9, Tabelle 12), wobei die Erhöhung nicht statistisch signifikant war (Fishers Exakt, $p < 0,01$). Die mit 54,2% und 58,2% hohen relativen Standardabweichungen sind möglicherweise auf das geringe Grundniveau der Mikrokernrate zurückzuführen.

Mit durchschnittlich 17 und 33 Mikrokernen pro 1000 Zellen lagen die Mikrokernraten jedoch im Bereich der erwarteten Spontanmikrokernrate von 5-25 (OECD, 2010; Dunn et al., 1987). In der Literatur wurden mitunter für V79 Zellen relative Standardabweichungen von 44% bei der Lösemittelkontrolle beschrieben (Brugger et al., 2006). Vermutlich reagieren NRK-Zellen empfindlicher auf NQO im Mikrokerntest als beispielsweise V79 Zellen. So wurden beispielsweise nach 24 h Inkubation mit einer 6,7-fach höheren Konzentration (0,5 μ M NQO) in V79-Zellen 21 ± 3 Mikrokerne/ 1000 Zellen (Zettner et al., 2007) bzw. $7,4 \pm 1,4$ Mikrokerne/1000 Zellen (Brugger et al., 2006) erhalten.

Zusammenfassend wurden NRK-Zellen für 24 h mit 0,075 μ M NQO inkubiert, was zu keinen zytotoxischen Effekten führte, die MF gegenüber der Lösemittelkontrolle signifikant erhöhte und gleichzeitig keine signifikante Erhöhung der Mikrokernrate bewirkte.

Während der Durchführung dieser Experimente kam es vermehrt zum Auftreten von Nebenprodukten in der Mutations-PCR ([Kapitel 3.8](#)). Während experimentell an einer Lösung dieses Problems gearbeitet wurde, erfolgten zeitgleich die Zellkulturexperimente mit EMS.

3.7.2.5 Inkubation mit EMS

In den Vorversuchen zur Ermittlung der Inkubationskonzentration wurden 1 mM, 2 mM und 3 mM EMS getestet. Die Inkubationszeit betrug ebenso wie bei NQO 24 h. Nachdem der zytotoxische Effekt durch die Inkubation mit 3 mM EMS mit einem starken Zellzahlverlust zum Zeitpunkt 91 h nach Inkubation einherging ($17,1\%$ absolute Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle,

Ergebnisse und Diskussion

Daten nicht gezeigt), wurde diese Inkubationskonzentration als ungeeignet bewertet. Mit 2 mM EMS hingegen gelang es die MF um das 2,7-fache zu steigern und gleichzeitig die Mikrokernrate im Vergleich zur Kontrolle nicht zu erhöhen (EMS: 11,21 vs. Kontrolle: 13,39). Da ebenso die Koloniebildungsfähigkeit gegeben war (PE1: 26,40%; Kontrolle: 39,93%; PE2: 50,27%, Kontrolle: 49,87%) wurde die anschließende Dreifachbestimmung im HPRT mit 2 mM EMS durchgeführt.

Nach 24 h Inkubation lag eine Reduktion der absoluten Zellzahl um ca. 24,5% vor, welche jedoch nicht signifikant (F-Test, $p < 0,01$; t-Test: $p < 0,01$) gegenüber der Lösemittelkontrolle war (Abbildung 38). Die Koloniebildungsfähigkeit war mit $26,7\% \pm 0,5\%$ statistisch signifikant (F-Test, $p < 0,01$; t-Test $p < 0,01$, $p = 0,0057$) im Vergleich zur Lösemittelkontrolle ($44,7\% \pm 5,7\%$) gesunken.

Nach der Inkubation mit 2 mM EMS lag bezogen auf die Lösemittelkontrolle (100%) eine relative Reduktion der Koloniebildungsfähigkeit von ca. 40% vor. Dies lag immernoch über der für den HPRT-Test empfohlenen höchsten Zytotoxizität von 80-90% (OECD, 1997c). Für den Mikrokern-Test sollte maximal eine Zytotoxizität von 55,5% bezogen auf die Lösemittel vorliegen, damit keine zusätzlichen Chromosomenbrüche verursacht und in Folge verfälschte Mikrokernraten generiert werden (OECD, 2010). Deshalb waren die Zellen auch nach 2 mM EMS imkubation für die Verwendung im Mikrokern-Test geeignet.

Ca. 72 h nach Inkubationsende hatten die Zellen wieder das gleiche Proliferationsniveau wie die Lösemittelkontrolle erreicht (Abbildung 38).

Ergebnisse und Diskussion

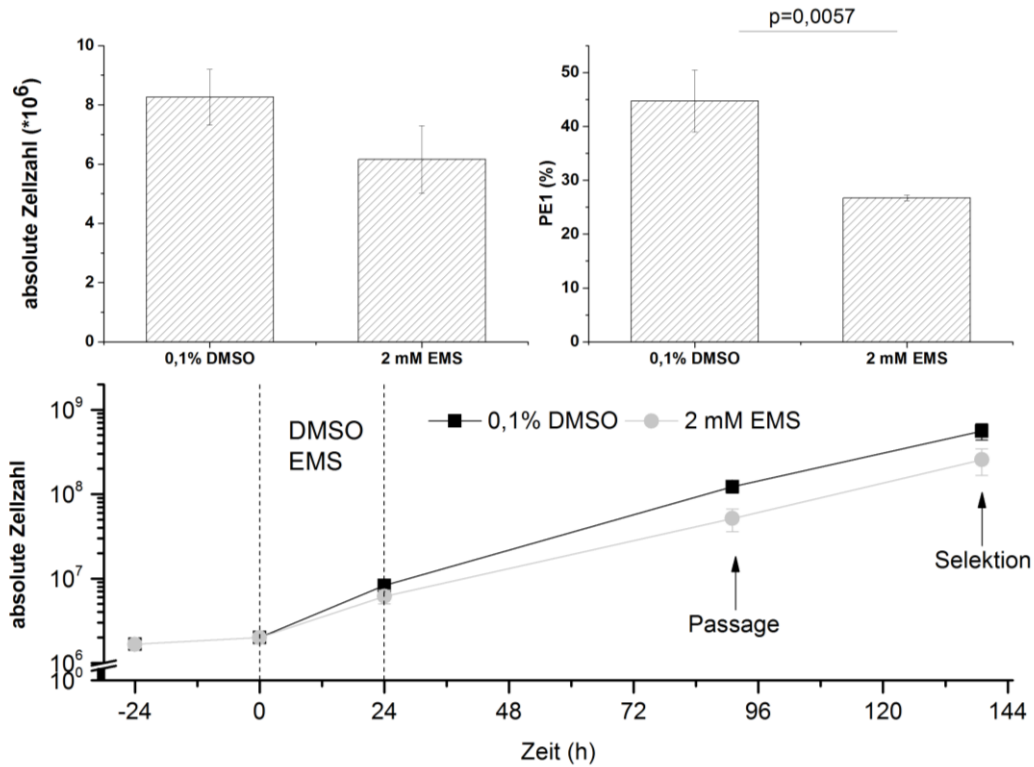


Abbildung 38 Einfluss von EMS auf die Zellzahl und die Plating Efficiency (PE) im Rahmen eines HPRT-Tests. Obere Zeile: Absolute Lebendzellzahl und PE nach Behandlung der Zellen mit 0,1% DMSO (Lösemittelkontrolle) oder 2 mM NQO für 24 h. Untere Zeile: Entwicklung der Zellzahl im Laufe des HPRT-Tests. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Der statistische Unterschied bei der PE1 wurde bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,01$ erhalten (t-Test).

Die MF der Lösemittelkontrolle betrug $31,2 \pm 13,9$ ($\pm 44,5\%$, Tabelle 13), die nach der Inkubation mit 2 mM EMS $66,3 \pm 10,6$ ($\pm 15,9\%$). Dies war eine signifikante Steigerung (F-Test, $p < 0,05$; t-Test, $p < 0,05$, $p = 0,025$) um das $2,3 \pm 0,6$ -fache. Dabei war der Wert der Lösemittelkontrolle zu den Versuchen mit NQO vergleichbar (Tabelle 12). Die mit 44,5% vergleichsweise hohe relative Standardabweichung hingegen wurde nicht erwartet.

Tabelle 13 Mutantenfrequenzen (6-Thioguanin resistente Kolonien pro 1 Million koloniebildender Zellen) des HPRT-Gens von NRK-Zellen, welche mit 0,1% DMSO (Lösemittelkontrolle) oder 2 mM EMS für 24 h behandelt wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils 3 Zellkulturschalen pro Experiment (1-3) und der daraus gebildete Gesamtmittelwert der drei unabhängigen Experimente.

	Mutantenfrequenz				Mikrokerne			
	1	2	3	MW \pm SD	1	2	3	MW \pm SD
DMSO	20,26	46,79	26,54	31,2 \pm 13,9 (44,5)	13,39	23,63	21,66	19,6 \pm 5,4 ($\pm 27,8\%$)
NQO	54,33	74,43	70,01	66,3 \pm 10,6 (15,9)	11,21	25,64	36,19	24,4 \pm 12,5 ($\pm 51,5\%$)

Ergebnisse und Diskussion

Die PE2 betrug bei der Lösemittelkontrolle $49,6\% \pm 3,1\%$ ($\pm 6,3\%$) und bei 2mM EMS $49,2\% \pm 0,9\%$ ($\pm 1,8\%$). Beide unterschieden sich nicht statistisch signifikant (F-Test, $p < 0,05$; T-Test, $p < 0,05$).

Innerhalb von 1000 Zellen wurden bei der Lösemittelkontrolle $19,6 \pm 5,4$ ($\pm 27,8\%$) Mikrokerne und bei 2 mM EMS $24,4 \pm 12,5$ ($\pm 51,5\%$) Mikrokerne detektiert (Tabelle 13). Diese ca. 1,2-fache Vervielfältigung war jedoch nicht signifikant (Fishers Exact, $p < 0,01$). Die relativen Standardabweichungen im Bereich von 50% wurden nach den Versuchen mit NQO erwartet (u.a. 58,2%). Die detektierten Mittelwerte lagen im Bereich der publizierten Spontanmikrokernrate der NRK-49F Zellen von 25 Mikrokernen/1000 Zellen (Dunn et al 1987).

3.7.2.6 Verhältnis von Mikrokernrate zur Mutantenfrequenz

Für den Vergleich zwischen mehreren Testsubstanzen sollte eine im Vergleich zur Lösemittelkontrolle gleichbleibende Mikrokernrate gewährleistet werden. Durch die Bildung des Verhältnisses zwischen Mikrokernrate und Mutantenfrequenz ist eine Abschätzung der Empfindlichkeit des NRK-HPRTs gegenüber der Testsubstanz möglich.

Die Mutantenfrequenz bezieht sich auf 1 Mio koloniebildungsfähige Zellen. Die Mikrokernrate wird üblicherweise pro 1000 Zellen angegeben. Um beide ins Verhältnis setzen zu können, wurde die Mikrokernrate zuvor auf 1 Millionen Zellen extrapoliert.

Für die Lösemittelkontrolle kamen auf 1 HPRT-Mutante, welche innerhalb von 1 Mio. Zellen detektiert wurde, ca. $575,7 \pm 250,1$ (43,5%) Mikrokerne. Für 0,075 μ M NQO wurden $317,3 \pm 211,2$ und für 2 mM EMS $355,9 \pm 155,6$ Mikrokerne pro einem HPRT-Mutant detektiert. Demnach wird in künftigen Experimenten, welche vergleichbar durchgeführt werden, für die Lösemittelkontrolle eine Mikrokernrate/1000 Zellen von $0,6 \pm 0,3$ erwartet. Für Konzentrationen, die einen ersten signifikanten Anstieg in der Mutantenfrequenz bewirken, werden durchschnittlich $0,3 \pm 0,2$ ($\pm 49,7\%$) Mikrokerne pro einem detektierten HPRT-Mutant erwartet.

3.7.3 Zusammenfassung und Diskussion der HPRT Ergebnisse

Der HPRT diente im Rahmen dieser Arbeit zur Klärung übergeordneter Fragen im Rahmen der Etablierung des RMCA in *Rattus norvegicus*.

Beispielsweise sollte geklärt werden, ob das mutagene Potential von NQO und EMS gleichermaßen mit dem RMCA detektiert werden kann. Um diesen Vergleich zu gewährleisten, sollte die Mikrokernrate sich nicht von der der Lösemittelkontrolle unterscheiden. Nachdem dies bei den Inkubationen mit 0,075 mM NQO und 2 mM EMS gegeben war ([Kapitel 3.7.2.3](#), [Kapitel 3.7.2.4](#), Fisher's Exact Test, $p < 0,01$), wurden als nächstes die Ergebnisse des HPRTs direkt gegenüber gestellt (Tabelle 14).

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 14: Gegenüberstellung der HPRT-Daten nach Inkubation mit 0,075 μ M NQO bzw. 2 mM EMS. Die Daten sind prozentual jeweils im Vergleich zur Lösemittelkontroll 0,1% DMSO (100%) angegeben. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen einer unabhängigen Dreifachbestimmung. Unabhängig vom geprüften Parameter gibt es keinen statistisch signifikanten Unterschied (F-Test, $p < 0,05$ und t-Test, $p < 0,05$) zwischen den beiden Inkubationssubstanzen.

	0,075 μ M NQO	2 mM EMS
Anteil der absoluten Zellzahl nach 24 h Inkubation	88,7 \pm 9,1% (\pm 10,2%)	75,5 \pm 18,5% (\pm 24,5%)
Anteil der absoluten PE1	67,7 \pm 9,6% (\pm 14,2%)	60,3 \pm 6,4% (\pm 10,5%)
Steigerung der MF	2,9 \pm 0,3 (\pm 8,9%)	2,3 \pm 0,6 (\pm 26,8%)
Anteil der absoluten PE2	90,8 \pm 0,2% (\pm 0,2%)	100,8 \pm 7,7% (\pm 7,6%)

Unabhängig vom geprüften Parameter gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied (F-Test, $p < 0,05$ und t-Test, $p < 0,05$) zwischen den beiden Inkubationssubstanzen. Dies lässt schlussfolgern, dass bei Einhaltung der „Mikrokernregel: keine signifikante Steigerung der Mikrokerne“ unabhängig von der Testsubstanz reproduzierbare Ergebnisse mit dem NRK-HPRT zu erzielen sind.

Die Inkubation mit NQO lieferte im Gegensatz zu EMS (Faktor 26667) bereits im μ M-Bereich eine signifikante Erhöhung der Mutantenfrequenz. Somit reagieren entweder die NRK-Zellen sensistiver auf NQO als auf EMS oder EMS hat per se ein schwächeres mutagenes Potential. Ist dies an Hand des Wirkmechanismus, der Substanzstabilität oder der Enzymausstattung der Zellen erklärbar?

Wirkmechanismen

NQO bildet nach Reduktion zum 4-Hydroxyaminoquinolin-1-oxid (4HAQO) insbesondere DNA-Addukte mit dem C8 bzw. N² von Guanin und dem N⁶ von Adenin (Bailleul et al., 1989; Tada und Tada, 1976). Wenn diese Schäden nicht durch die NER behoben werden (Jones et al., 1989), entstehen in Folge BPS, welche sowohl im RMCA als auch im HPRT per se detektierbar sind. Gleichzeitig induziert NQO ROS und kann zu oxidativen Schäden führen (Arima et al., 2006; Kohda et al., 1986). Dieser kann in einem gewissen Rahmen von Glutathion (GSH) kompensiert werden. NRK-52E-Zellen weisen beispielsweise hohe Enzymaktivitäten von GSH-abhängigen Enzymen auf: GSH-Peroxidase- (29,0 \pm 5,2 mU/mg Protein), GSH-Disulfid Reduktase- (24,5 \pm 4,8 mU/mg Protein) oder GST-Aktivität (32,8 \pm 3,3 mU/mg Protein (Lash et al., 2002).

EMS alkyliert zelluläre Nucleophile wie beispielsweise das N⁷ von Guanin (Doak et al., 2007). Wenn diese DNA-Alkylierung nicht durch NER, BER oder MMR (Muller et al., 2009) behoben wird, führt die Alkylierung zu Basenpaarsubstitutionen –vorzugsweise GC-AT-Transitionen

Ergebnisse und Diskussion

(Greene et al., 2003). Dennoch wird die mutagene Wirkung von EMS eher der Alkylierung des O⁶ von Guanin zugeschrieben (Doak et al., 2007; Sega, 1984).

Substanzstabilität

Die beiden Inkubationssubstanzen waren über einen Zeitraum von 24 h einer Temperatur von 37°C ausgesetzt. Bereits Bradley et al. (1981) hoben hervor, dass sich Inkubationssubstanzen im Medium zersetzen. EMS beispielsweise hat ca. eine Halbwertszeit von 12 h bei 37°C (Lave et al., 2009). Inwiefern sich in dem in dieser Arbeit durchgeführten HPRT die Inkubationskonzentration auf Grund von Zersetzung änderte wurde nicht ermittelt. Deshalb wäre es ratsam in künftigen HPRTs die Substanzkonzentration an unterschiedlichen Zeitpunkten beispielsweise durch HPLC-Analytik des Inkubations-Mediums (Scheffler et al., 2015b) zu bestimmen.

Vergleich der NRK-Zellen mit anderen HPRT-Zelllinien

Den HPRT-Test mit NRK-Zellen durchzuführen ist unüblich und direkte Vergleichsdaten sind in der Literatur nicht vorhanden. Um dennoch die Ergebnisse einordnen zu können, sollten die in dieser Arbeit ermittelten MFs mit MFs aus HPRTs mit den von der OECD (1997) empfohlenen Zelllinien V79 und CHO erfolgen.

Nach 16 h Inkubation mit 1,6 mM EMS bei 37°C wurden in CHO-Zellen MFs von 737 und 811 detektiert (Hsie et al., 1975). Im Vergleich dazu wurde mit 2 mM EMS in dieser Arbeit eine MF im HPRT-Locus der NRK-Zellen von $66,3 \pm 10,6$ ($\pm 16\%$) erhalten. D.h. obwohl eine höhere Inkubationskonzentration als in der Literatur vorlag, wurde eine MF detektiert, die ca. um den Faktor 12 geringer war. Nach einer 4 h EMS-Inkubation (1,6 mM) wurde in CHO-Zellen eine MF von 176 ermittelt (Moore et al., 1989). D.h. trotz niedrigerer Inkubationskonzentration und niedrigerer Inkubationszeit (20h weniger) wurde in diesem Falle eine 2,6-fach höhere MF detektiert als in der vorliegenden Arbeit mit NRK-Zellen.

Im Arbeitskreis Lehmann wurden V79-Zellen unter anderem im Rahmen von Untersuchungen zu mutagenen Potentialen von 17 β -Estradiol (Jaramillo, 2013), PCBs (Zettner et al., 2007), Mycotoxinen (Schumacher, 2005) und Isoflavonen (Scheffler et al., 2015b) genutzt. Auf Grund seiner bekannten Mutagenität wurde NQO oftmals als Positivkontrolle eingesetzt. So wurden nach Inkubation mit 0,5 μ M NQO MFs zwischen 42 ± 11 (Zettner et al., 2007) bzw. 47 ± 11 (Schumacher et al., 2005) detektiert. Nach der Inkubation mit 1,0 μ M NQO wurden MFs von 81 ± 48 (Schumacher et al., 2005), 156 ± 23 (Jaramillo, 2013) bis hin zu 189 ± 92 (Scheffler et al., 2015b) detektiert. Die MF dieser Arbeit (HPRT mit NRK-Zellen) liegt mit $110,5 \pm 25,7$ ($\pm 23,25\%$, 0,075 μ M NQO) trotz einer ca. 7-13-fach geringeren NQO-Konzentration im vergleichbaren Bereich (siehe Daten 1,0 μ M).

Ergebnisse und Diskussion

Bei Betrachtung der Enzymausstattung weisen NRK-Zellen im Gegensatz zu den V79-Zellen, welche keine Cytochrom-P450-Enzyme exprimieren und deshalb ein aktivierendes System für den Erhalt von CYPs benötigen würden (McGregor et al., 1991), eine ähnlich hohe CYP-Konzentration wie die Leber auf (Mitchell et al., 1977). Und CYPs sind bekanntermaßen in die metabolische Aktivierung als auch die Entstehung von ROS verwickelt.

Neben den CYPs spielt auch die Nitroreduktase und die Peroxidase eine Rolle in der metabolischen Aktivierung von NQO und der damit einhergehenden Entstehung von ROS, (Benson, 1993; Biaglow et al., 1977) welche zu Modifizierung von Basen und anschließenden Mutationen führen können. V79-Zellen besitzen zwar eine niedrige Nitroreduktase, aber eine im Vergleich dazu ca. 10fach höhere Peroxidas-Aktivität (McGregor et al., 1991). Dies erklärt, warum dennoch MFs mit V79-Zellen detektierbar sind.

Zusammenfassend ist der HPRT mit NRK-Zellen durchführbar und sowohl mit NQO als auch mit EMS wurden MFs induziert, die sich signifikant von der SMF der NRK-Zellen unterscheiden. Für weitere Untersuchungen wie beispielsweise dem Vergleich der MFs aus HPRT und RMCA ([Kapitel 3.6.6](#)) wurde bereits die DNA aus einem Teil der Zellen isoliert, welche auch für die Bestimmung der MF ausgestreut wurden.

3.8 Nebenprodukte in der Mutations-PCR

Im Verlauf dieser Arbeit wurden bei der Mutations-PCR nach der Agarose-Gelelektrophorese mit SYBR®-Green-Detektion vermehrt Nebenprodukte detektiert (Abbildung 39).

Eine Mutations-PCR besteht aus ca. 80 PCR-Reaktionen. Als Templat wird die untersuchende DNA- in diesem Falle mtDNA- eingesetzt, welche zuvor mit dem Restriktionsenzym *TaqI* verdaut wurde. Durch die Verwendung der in dieser Arbeit entwickelten Mutations-Primer ([Kapitel 3.2.3](#)) werden nur in der *TaqI*-Schnittstelle mutierte DNA-Sequenzen amplifiziert. Auf Grund statistischer Überlegungen wird gerade so viel Templat eingesetzt, dass nur in ca. 10 Reaktionsansätzen ein Mutations-Produkt (245 bp) erwartet wird ([Kapitel 3.6.4](#)). Ein Anstieg der Nebenprodukte erschwert bzw. verhindert möglicherweise die Detektion der wenigen Mutations-Produkte und in Folge die Auswertung der Mutations-PCR sowie die Berechnung der MF.

Detektiert wurden sowohl Nebenprodukte einer spezifischen Größe ([Kapitel 3.8.1.1](#)) als auch unspezifische DNA-Banden (=Schmierbanden, [Kapitel 3.8.1.2](#)).

Ergebnisse und Diskussion

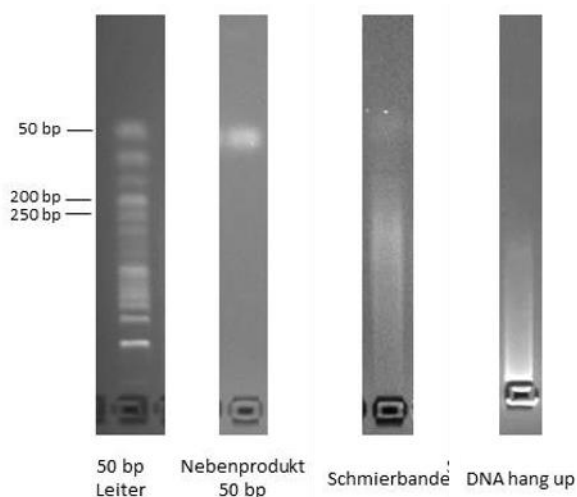


Abbildung 39: Mögliche PCR-Nebenprodukte nach Durchführung einer Mutations-PCR mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese. Eine Mutations-PCR beinhaltete durchschnittlich 80 PCR-Reaktionen mit Mutations-Primern (Tabelle 1) und mtDNA als Templat. Da für die Mutations-PCR mit *TaqI* verdautes Templat eingesetzt und nur in der *TaqI*-Schnittstelle mutierte Zielsequenzen amplifiziert wurden, sollte nur in ca. 10 der 80 Reaktionsansätze eine PCR-Amplifikation stattfinden ([Kapitel 3.6.4](#)) und zu dem 245 bp-langen Mutationsprodukt führen.

Prinzipiell haben die detektierten Nebenprodukte einer spezifischen bp-Länge keine Auswirkungen auf die Auswertung der Mutations-PCR. Solange die erwartete 245 bp-Mutanten-Bande ([Kapitel 3.2.3](#)) deutlich erkennbar und klar abtrennbar ist, kann die Anzahl an mutierten Kopien bestimmt und die Mutationsfrequenz kalkuliert werden. Zudem steht einer Sequenzierung der Bande nach Aufreinigung aus dem Gel nichts entgegen. Deshalb sollte bei diesen Produkten überlegt werden wie diese entstehen und um welche Sequenzen es sich somit handeln könnte ([Kapitel 3.8.1.1](#)).

Anders verhält es sich mit unspezifischen PCR-Nebenprodukten. Beim Auftreten von DNA-Schmierbanden und *hang up* wird eine Auswertung der Mutations-PCR erschwert und im schlechtesten Falle gar nicht mehr möglich. Möglicherweise werden im Reaktionsansatz vorhandene Mutanten nicht detektiert und in Konsequenz die Mutationsfrequenz unterschätzt.

Über einen Zeitraum von knapp 2 Jahren wurden insgesamt 79 Mutations-PCRs mit jeweils 80 Reaktionen durchgeführt. Je nach zu erwartender Mutationsfrequenz wurden zwischen 235 (Minimum) und 37491 (Maximum) Kopien verdaute mtDNA pro Reaktionsansatz als Templat eingesetzt (Abbildung 40 unterer *layer*).

Unabhängig von der verwendeten Templatkonzentration stieg die Häufigkeit der detektierten Schmierbanden in den Mutations-PCRs nach März 2015 von $3,5\% \pm 4,5\%$ ($n=53$, $a' 80$ Reaktionen) auf $12,7\% \pm 10,0\%$ ($n=26$, $a' 80$ Reaktionen, Abbildung 40). Die Häufigkeit von PCR-Produkt, welches optisch in den Agarose-Gel-Taschen hängen blieb (DNA *hang up*) stieg ab Ende März von $0,5\% \pm 2,1\%$ ($n=53$, $a' 80$ Reaktionen) auf maximal 95,0% (Abbildung 40).

Ergebnisse und Diskussion

In 7 Mutations-PCRs (à 80 Reaktionen), welche danach (Juni und Juli 2015) nur mit Reaktionsansätzen ohne Templat durchgeführt wurden, lag der Anteil an detektierten DNA-Schmierbanden pro Mutations-PCR zwischen 25,0% und 38,8%, der des DNA *hang up* zwischen 17,5% und 48,8%.

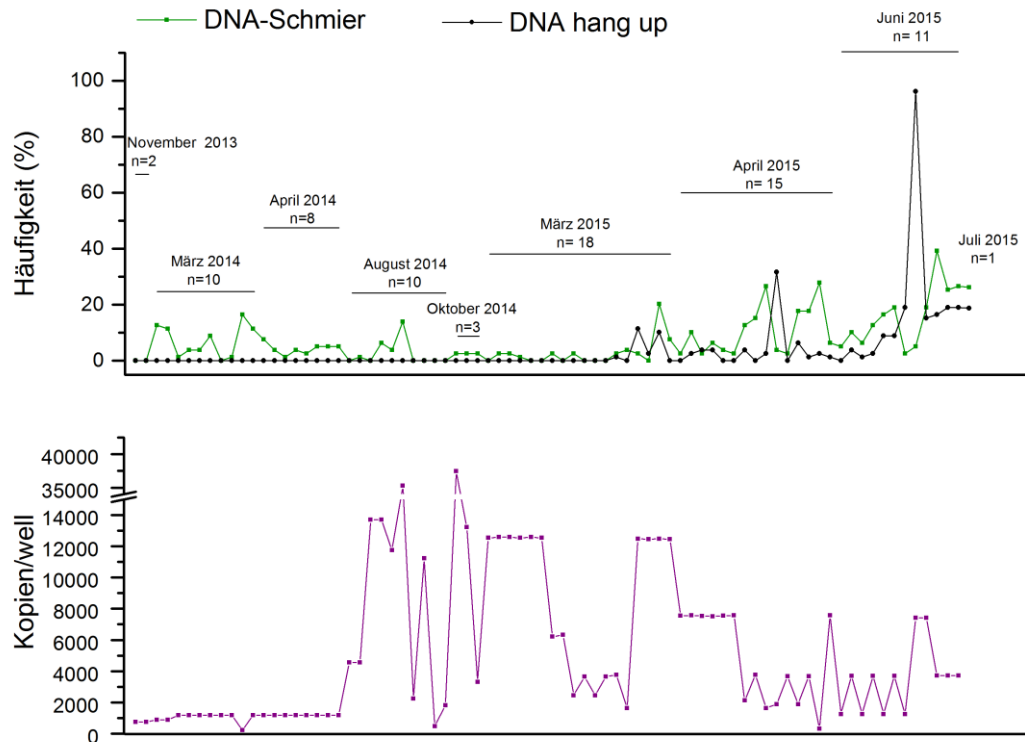


Abbildung 40 **Oberer layer:** Relative Häufigkeit der unspezifischen Nebenprodukte DNA-Schmier (grün) und DNA *hang up* (schwarz) pro Mutations-PCR. **Unterer layer:** Pro Reaktionsansatz einer Mutations-PCR eingesetzte Templatmenge (lila). Als Templat diente mit *TaqI* verdaute mtDNA, wobei die verwendeten Templatlösungen zwischen den Mutations-PCRs variierten. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 79 unabhängigen Mutations-PCRs, welche jeweils 80 PCR-Reaktionen beinhaltenen. Alle Datenpunkte (= Mutations-PCRs) unterhalb eines Querstrichs gehören zum darüberstehenden Zeitraum.

Anhand der 79 unabhängig durchgeführten Mutations-PCRs mit verdauter mtDNA als Templat ist erkennbar, dass das Auftreten der unspezifischen Nebenprodukte nicht von der Templatkonzentration abhängig ist. Die relativen Häufigkeiten der unspezifischen Nebenprodukte über den Zeitraum von November 2013 bis einschließlich März 2015 lassen zudem vermuten, dass auch die Matrix des *TaqI*-Verdaus die PCR-Reaktionen der Mutations-PCR nicht beeinflusst. Zudem ist auffällig, dass in den 7 Mutations-PCRs (à 80 Reaktionen) ohne Templat im Juni und Juli 2015 die unspezifischen Nebenprodukte sogar häufiger auftraten als zum Ende (April-Juli 2015) in den Proben: DNA-Schmier $12,7\% \pm 10,0\%$ in den Proben ($n=26$, à 80 Reaktionen) vgl. mit $30,2\% \pm 6,3\%$ im Blindwert; DNA *hang up* $10,3\% \pm 19,2\%$ in den Proben ($n=26$, à 80 Reaktionen) vgl. mit $35,7\% \pm 12,2\%$ im Blindwert. Das spricht dafür, dass das Vorliegen von Templat Nebenreaktionen zu einem gewissen Grad verdrängt.

Ergebnisse und Diskussion

Die unspezifische Amplifizierung lag sehr wahrscheinlich nicht am Templat, sondern am MM der Mutations-PCR. Deshalb Es sollten Experimente zur Ursachenfindung der unspezifischen Amplifikations-Produkte durchgeführt, Einflussfaktoren bestimmt und das Auftreten dieser Banden-Typen möglichst eliminiert werden ([Kapitel 3.8.1.2](#)).

3.8.1 Nebenprodukte der Mutations-PCR einer spezifischen bp-Länge

Innerhalb der Mutations-PCR traten immer wieder vereinzelt Nebenprodukte auf, die kleiner (60 bp, 100 bp, 150 bp) aber auch größer (500 bp, 600 bp, 900 bp) als das erwartete 245 bp-lange Mutations-Produkt waren. Prinzipiell ist die Entstehung von Nebenprodukte kein unerwarteter Prozess, da diese mit Vorliebe bei geringen Templatkonzentrationen entstehen (C.R. Mahon, 2014) und die Mutations-PCR möglichst nur 1 Templat-Kopie/Reaktionsansatz enthalten sollte. Nach der Anwendung von Primer-BLAST gegen das ganze Genom von *Rattus norvegicus* sollten die entwickelten Primer ([Kapitel 3.2.3](#)) spezifisch für die zu amplifizierende Sequenz sein. Theoretisch möglich wären nur Nebenprodukte der Größe 1142 bp und 2427 bp, wobei die Primer dafür jeweils 3 (fw-Primer) und 4 (rv-Primer) bzw. 5 und 5 Fehlpaarungen mit der DNA-Sequenz eingehen müssten.

Um Rückschlüsse auf eine mögliche Sequenz und Entstehung der Nebenprodukte zu ziehen, sollte als nächstes exemplarisch von jeder PCR-Banden-Größe ein PCR-Produkt aus dem Gel isoliert und reamplifiziert werden. Um gleichzeitig auf das Vorhandensein einer *TaqI*-Schnittstelle in der Sequenz zu testen, wurde anschließend der PCR-Reaktionsansatz geteilt und mit einer Hälfte vor der Agarose-Gelelektrophorese ein *TaqI*-Verdau durchgeführt. Um mögliche alternative Bindungsstellen der entwickelten Mutations-Primer ([Kapitel 3.2.3](#)) an der Zielsequenz mt-Cytb-Gen der mtDNA zu erfassen, wurde die Software OligoAnalyzer 3.1 ([Kapitel 6.5.1](#)) verwendet. Welche Struktur am stabilsten und somit wahrscheinlichsten von allen Vorschlägen ist, wurde mit den von der Software berechneten Reaktionsenthalpien abgeschätzt (M.A. Iquebal, 2015).

Alle Nebenprodukte der Größe 60-150 bp waren mit den Mutations-Primern reamplifizierbar, enthielten keine *TaqI*-Schnittstelle (Anhang Abbildung 46) und resultierten wahrscheinlich aus einer unspezifischen Bindung des rv-Mutations-Primers an einer weiteren Stelle in der Zielsequenz (Anhang Abbildung 47). Auch das 600 bp- und das 900 bp lange Nebenprodukt der Mutations-PCR resultierte aus einer unspezifischen Bindung des rv-Primers (Anhang Abbildung 48). Zusätzlich wurde bei beiden nach dem *TaqI*-Verdau u.a. ein 245 bp PCR-Produkt erhalten, welches unabhängig vom *TaqI*-Verdau entstand (Anhang Abbildung 49). Somit wurde davon ausgegangen, dass es sich um die eigentliche Zielsequenz handelt, welche in der *TaqI*-Schnittstelle mutiert ist. Die Durchführung einer Sequenzierung würde an dieser Stelle genauen Aufschluss darüber geben, um welche Sequenz es sich handelt. Eine Nachamplifizierung des 500 bp-langen PCR-Produktes führte zur Entstehung einer 50 bp- und

Ergebnisse und Diskussion

einer 250 bp-PCR-Bande, die unabhängig von *TaqI*-Verdau entstanden (Anhang Abbildung 49). Vermutlich handelte es sich um ein Selfdimer der eigentlichen Zielsequenz, welche in der *TaqI*-Schnittstelle mutiert ist.

3.8.2 unspezifische Nebenprodukte der Mutations-PCR

Das Auftreten von unspezifischen Nebenprodukten in Mutations-PCRs ohne Templat betrug zum Ende der Experimente zur Bestimmung der Mutationsfrequenz in mtDNA von *Rattus norvegicus* 30,2% ± 6,3% (DNA-Schmier, n=7 a´ 80 Reaktionen) und 35,7% ± 12,2% (DNA *hang up*, n=7 a´ 80 Reaktionen).

Als nächstes sollen Experimente durchgeführt werden, welche Aufschluss über die Reproduzierbarkeit ([Kapitel 3.8.2.1](#)) der unspezifischen Nebenprodukte im Blindwert der Mutations-PCR geben.

3.8.2.1 Reproduzierbarkeit der Mutations-PCR

Für eine Beurteilung der Daten war es wichtig mehrere Reaktionsansätze pro Experiment (willkürlich n=20) zu pipettieren. Um den Einfluss der verwendeten mtDNA-Mutations-Primer auf das Endergebnis abzuschätzen, wurden zusätzlich immer auch Reaktionsansätze mit nDNA-Mutations-Primern ([Kapitel 6.5.2](#)) pipettiert⁷. Um einen möglichen Einfluss des PCR-Cyclers auf die Reproduzierbarkeit der Daten zu eliminieren wurden alle folgenden Experimente mit dem 7900HT Fast Realtime PCR System (Applied Biosystem, Darmstadt) durchgeführt.

a) Reproduzierbarkeit der Gelelektrophorese

Um zuerst zu überprüfen, ob die auftretenden Phänomene wie *hang up* und DNA-Schmier aus der Agarose-Gelelektrophorese resultieren, wurde deren Reproduzierbarkeit überprüft. Um von vornherein mögliche Fehlerquellen auszuschließen wurden immer frischer 1xTAE-Puffer und frisch hergestellte (nicht eingeschmolzene Gele) Agarose-Gele verwendet.

Jeder PCR-Ansatz wurde vor der Agarose-Gelelektrophorese geteilt. Von jeder Hälfte wurde eine separate Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Für diesen Versuch wurden 4 unabhängige Mutations-PCRs durchgeführt.

Von den 20 PCR-Reaktionen aus Durchführung 1 wurden 3-mal (15,0%) keine Bande, 10-mal (50%) ein spezifisches Nebenprodukt, 3-mal (15%) DNA-Schmier, 0-mal (0%) *hang up* und 4-mal (20%) eine Kombination aus dem 245 bp Mutations-Produkt und Nebenprodukt bzw. Schmier erhalten. Die unabhängige Wiederholung der Agarose-Gelelektrophorese führte zu den gleichen Ergebnissen (Anhang Abbildung 50, Anhang Abbildung 51). In Durchführung 2

⁷ Wenn nicht ausdrücklich anders beschrieben, hatten die nDNA-Primer keinen weiteren Einfluss auf den untersuchten Parameter.

Ergebnisse und Diskussion

wurde in 1/20 (5%) Reaktionen keine Bande, in 15/20 (75%) Reaktionen ein spezifisches Nebenprodukt, in 1/20 (5%) Reaktionen DNA-Schmier, in 0/20 (0%) DNA *hang up* und in 3/20 (15%) Reaktionen das 245 bp Mutations-Produkt detektiert. Auch hier führte die Wiederholung der gelelektrophoretischen Trennung zu keiner Änderung der detektierten PCR-Produkte.

Im Gegensatz dazu wurde nach Durchführung 3 in 20/20 Reaktionen *hang up* detektiert. Auch nach der zweiten Agarose-Gelelektrophorese wurde zu 100% DNA *hang up* detektiert. Die 4. Unabhängige Durchführung des Experimentes resultierte in 19/20 Reaktionen in DNA-Schmier (95%) und 1 Reaktion ohne Bande (5%). Ebenso wurde dieses Ergebnis in einer 2 Agarose-Gelelektrophorese bestätigt.

Zusammenfassend resultierte die Agarose-Gelelektrophorese bei unabhängiger Durchführung in denselben Ergebnissen. Andererseits wurden in den 4 unabhängigen Versuchen auch 4 unterschiedliche relative Häufigkeiten an PCR-Produkten detektiert, d.h. die Mutations-PCR ohne Templat war nicht reproduzierbar. Deshalb sollte als nächstes geprüft werden, in wie fern die die Entstehung der PCR-Produkte (Nebenprodukte, Hauptprodukt, DNA-Schmierbanden, *hang up*) innerhalb eines PCR-Mastermix reproduzierbar war.

b) Reproduzierbarkeit der Mutations-PCR aus einem Mastermix

Dazu wurde zunächst ein großer Mastermix hergestellt und geteilt. Die Hälften wurden in zwei aufeinanderfolgenden Mutations-PCRs eingesetzt. Die Zwischenlagerung der 2. Hälfte war im Kühlschrank bei 4°C. Dieses Experiment wurde 3 x unabhängig wiederholt.

Nach Durchführung 1 des Experimentes wurde durch die 1. Mutations-PCR 3-mal (15%) keine Bande, 10-mal (50%) spezifisches Nebenprodukt, 3-mal (15%) DNA-Schmier, 0-mal DNA *hang up* (0%), 1-mal (5%) 245 Mutations-Produkt und 3-mal (15%) eine Kombination aus dem 245 bp Mutations-Produkt und Nebenprodukt bzw. Schmier erhalten (Anhang Tabelle 34). Die 2. PCR, welche mit dem gleichen Mastermix durchgeführt wurde, führte zur Detektion von 1-mal keiner Bande (5%), 12-mal spezifischem Nebenprodukt (60%), 2-mal (10%) *hang up*, 2-mal DNA Schmier (10%), 1-mal 245 bp Mutations-Produkt (5%) und 2-mal (10%) 245 bp Mutations-Produkt und spezifischem Nebenprodukt. D.h. der gleiche Mastermix führte nach Agarose-Gelelektrophorese nicht zu identischen (Häufigkeit/Art) PCR-Produkten.

Die 2. und 3. Durchführung hingegen resultierte sowohl in der ersten als auch der zweiten PCR in 100% *hang up*

Zusammenfassend resultierte die Mutations-PCR entweder nicht in reproduzierbaren PCR-Banden oder eine Aussage zur Reproduzierbarkeit war auf Grund von kompletten *hang up* nicht möglich (Anhang Tabelle 34). Es lag keine Reproduzierbarkeit innerhalb eines Mastermixes vor und somit auch keine zwischen den unabhängigen Bestimmungen.

Ergebnisse und Diskussion

Da folglich die grundlegenden Reproduzierbarkeitsdefizite bereits innerhalb eines MM bestanden, wurde als nächstes geprüft, ob bereits die praktische Durchführung der MM-Herstellung einen Einfluss auf eine stabile PCR-Reaktion hat.

c) Einfluss des Pipettiergefäßes auf die Reproduzierbarkeit

Als nächstes sollte getestet werden, ob es im Vergleich zur Verwendung von autoklavierten 1,5 ml Reagiergefäßen (Eppis) eine Verbesserung der Reproduzierbarkeit durch die Verwendung von heißsterilisierten Glasgefäßen oder zertifizierten *Safelock-Tubes* während der Erstellung des Mastermix gibt. Dazu wurde ein großer Mastermix hergestellt und geteilt. Die Hälften wurden in zwei aufeinanderfolgenden Mutations-PCRs eingesetzt. Die Zwischenlagerung der 2. Hälfte war im Kühlschrank bei 4°C. Dieses Experiment wurde dreimal unabhängig je Pipettiergefäß durchgeführt.

Wie nach den bisherigen Experimenten ([Kapitel 3.8.2.1](#)) zu erwarten, waren die Art und Anzahl der detektierten Banden unabhängig vom Gefäß sowohl zwischen PCR 1 und PCR 2 der jeweiligen Durchführung als auch den drei unabhängigen Durchführungen nicht reproduzierbar (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurden für einen Vergleich der Pipettiergefäße alle 120 Reaktionen pro Gefäß zusammengefasst und diese Ergebnisse gegeneinander verglichen. Dabei ist zu beachten, dass es unter der Verwendung von Eppis und *Safelock Tubes* in Wiederholung 2 und 3 des Experimentes zum Auftreten von 100% *hang up* kam (einzige reproduzierbare Daten).

Unter Verwendung der autoklavierten 1, 5 ml Reagiergefäße traten nach gelelektrophoretischer Trennung in 3,3% keine Bande, in 18,3% ein spezifisches Nebenprodukt, in 4,2% Schmier, in 68,3% *hang up*, in 1,7% das Mutations-Produkt und in 4,1% der Reaktionsansätze ein Mutations-Produkt mit einem spezifischen Nebenprodukt oder Schmier auf.

Verglichen damit wurden mit dem heißsterilisierten Glasgefäß in 2,5% keine Bande, in 32,4% ein spezifisches Nebenprodukt, in 16,6% Schmier, in 29,2% *hang up*, 0,8% das Mutations-Produkt und in 18,3% der Reaktionsansätze ein Mutations-Produkt mit einem spezifischen oder unspezifischen Nebenprodukt detektiert.

Das Pipettieren des Mastermix im *Safelock Tube* resultierte zu 0% in keiner Bande, zu 2,5% in einem spezifischen Nebenprodukt, zu 0% in Schmier, zu 89,2% in *hang up*, zu 0% im Mutations-Produkt und zu 8,8% in einem Mutations-Produkt mit einem spezifischen oder unspezifischen Nebenprodukt.

Die geringsten Unterschiede zwischen den detektierten PCR-Banden in Lauf 1 und 2 wurden mit dem 1,5 ml Reagiergefäß erhalten (10%, Anhang Tabelle 35).

Ergebnisse und Diskussion

Mit der Verwendung von heißsterilisierten Glasgefäßen und mtDNA-Mutations-Primern lag der geringste Anteil an DNA *hang up* und Schmierbanden vor (49,2%, Tabelle 15). Zwar ist der Anteil an Mutations-Produkt im Blindwert mit 19,2% gegenüber den anderen Pipettiergefäßen ca. 11-13% höher, dennoch ist zumindest eine Detektion dieser Banden und somit eine Problemerkennung möglich. Beim Auftreten von *hang up* war keine Auswertung des sich dahinter verbergenden PCR-Produktes möglich. Deshalb sollte der Mastermix aller künftigen Reaktionen in heißsterilisierten Glasgefäßen pipettiert werden.

Tabelle 15 Zusammenfassung der relativen Häufigkeiten der PCR-Produkte im Blindwert nach Verwendung eines autoklavierten Eppis, eines heißsterilisierten Glasgefäßes oder zertifizierter *Safelock Tubes* als Pipettiergefäß für die Mutations-PCR mit mtDNA-Mutations-Primern. Das PCR-Produkt DNA *hang up*/Schmier beinhaltet folgende PCR-Produkt-Kombinationen: Produkt+*hang up*, *hang up*, Produkt+DNA-Schmier, DNA-Schmier und Produkt, Schmier inklusive Nebenbande. Das PCR-Produkt „Mutations-Produkt“ in Reaktionen ohne Templat beinhaltet die Kombinationen Produkt, Produkt+Nebenprodukt, Produkt+ *hang up*, Produkt +DNA-Schmier, und Produkt, DNA-Schmier inklusive Nebenprodukt.

PCR-Produkt	Relative Häufigkeit (%)			
	Templat	Eppi	Glas	<i>Safelock Tube</i>
DNA <i>hang up</i> / Schmier	nein	73,3	49,2	92,5
Mutationsprodukt	nein	5,8	19,2	8,3

Unabhängig davon sollten als nächstes zwei Fragestellungen, welche die verunreinigten Blindwerte mit sich bringen, bearbeitet werden:

- Welche Auswirkungen hat das Auftreten von DNA *hang up* und kann es vermieden werden ([Kapitel 3.8.2.2](#))?
- Handelt es sich bei der 245 bp Bande um das Mutations-Produkt mit der gewünschten Zielsequenz ([Kapitel 3.2.3](#)) und welche Auswirkungen hat das Auftreten im Blindwert für die Ermittlung der Mutationsfrequenz ([Kapitel 3.8.2.3](#))?

3.8.2.2 Untersuchung des DNA *hang up*

Das Auftreten von DNA *hang up* führt dazu, dass der entsprechende Reaktionsansatz nicht auswertbar ist. Als Ursachen werden in der Literatur und *troubleshooting guides* zu hohe Salz- oder Templatkonzentrationen (AlkambiBiosystems, 1999; Hillis, 1996; Fermentas), Fehler im PCR-Programm (Bell und DeMarini, 1991), Verunreinigungen mit hochmolekularer DNA (JointGenomeInstitute, 2014; AlkambiBiosystems, 1999) oder mit DNA-bindenden Proteinen (JointGenomeInstitute, 2014; Fermentas; ThermoFisherSCIENTIFIC) genannt. Auch schlecht geformte Geltaschen (Fermentas) oder eine verringerte Mobilität der DNA durch einen positiv geladenen Fluoreszenzfarbstoff (Tietz et al., 1992) werden diskutiert.

Ergebnisse und Diskussion

An Hand der bisher durchgeführten Experimente konnten bereits 4 mögliche Ursachen ausgeschlossen werden:

- Da der *hang up* im Blindwert auftritt ([Kapitel 3.8.2.1](#)), ist eine zu hohe Templatkonzentration nicht ursächlich.
- Nach optischer Überprüfung waren alle Geltaschen gleichmäßig geformt. Eine Auftrennung der DNA-Leiter war immer vorhanden. Somit wurden schlecht geformte Geltaschen und die verringerte Mobilität der DNA durch einen positiv geladenen Fluoreszenzfarbstoff ausgeschlossen.
- Die *ratio* der Absorption bei 260 nm zu 280 nm lag bei 1,9 (Daten nicht gezeigt). Läge eine Verunreinigung mit Proteinen vor, so sollte diese <1,8 sein (Shim et al., 2010).

Als nächstes sollte überprüft werden, ob eine zu hohe Salzkonzentration die Entstehung des DNA *hang up* beeinflusst. Dazu wurden drei *hang up* Banden aus drei unabhängigen PCRs ausgeschnitten, aufgereinigt und so Enzyme, Primer, dNTPs und MgCl₂ entfernt (GeHealthcare, 2007). Dieses Eluat wurde in einer Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Zwar wurden nun in 3/3 Fällen Banden des Mutations-Produktes aber auch erneut *hang up* detektiert (Anhang Abbildung 52). D.h. eine zu hohe Salzkonzentration war nicht die Ursache des *hang up*.

Desweiteren stellte sich die Frage, ob der *hang up* per se schon vor der Durchführung einer PCR im Mastermix enthalten und in einer Agarose-Gelelektrophorese detektierbar ist. Dazu wurde eine Mutations-PCR ohne Templat pipettiert (5 Reaktionen) und nur mit einer Hälfte davon eine PCR durchgeführt. In der sich anschließenden Agarose-Gelelektrophorese wurde in 5/5 Ansätzen ohne PCR kein *hang up* detektiert, wobei in 5/5 Ansätzen mit PCR erneut *hang up* entstand (Abbildung 41). Das Ergebnis spricht dafür, dass zumindest im Mastermix keine detektierbaren Verunreinigungen vorhanden sind und der *hang up* erst durch die PCR detektierbar wird oder entsteht.

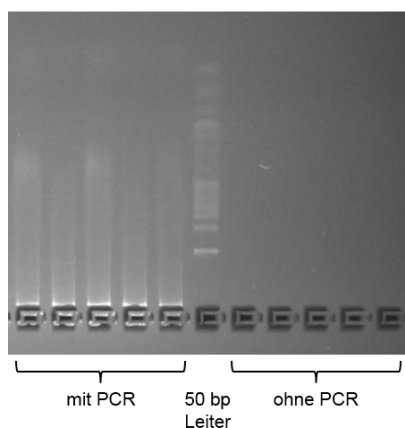


Abbildung 41 Vergleich der detektierten PCR-Banden vor und nach der Durchführung einer Mutations-PCR. Dargestellt ist die gelelektrophoretische Auftrennung der Reaktionsansätze ohne Templat. Zu Beginn des Experimentes wurde ein Mastermix pipettiert, welcher geteilt wurde. Mit der einen Hälfte wurde keine PCR durchgeführt, mit der anderen Hälfte schon. Die Auftrennung erfolgte mit Hilfe einer 3,5%igen Agarose-Gelelektrophorese in 1x TAE-Puffer für 1 h bei 5V/cm und der Verwendung von 1 ng/μl SYBR®-Green.

Worum handelt es sich nun beim *hang up*? Um diese Frage zu adressieren wurden 3 *hang up* Banden aus Blindwert-Reaktionen ausgeschnitten, aufgereinigt und sequenziert ([Kapitel 6.5.8](#), [Kapitel 6.5.9](#) und [Kapitel 6.5.10](#)). Alle (3/3) Elektropherogramme der *hang up* Banden aus den Blindwertreaktionen waren nicht auswertbar.

Die durchgeführten Experimente trugen nicht zur Beseitigung oder Reduktion des DNA *hang up* bei. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass es sich beim *hang up* um PCR-Produkte handelt, sollten die Spuren mit *hang up* nicht in der Auswertung der Mutations-PCR berücksichtigt werden.

3.8.2.3 Untersuchung der 245 bp Verunreinigung im Blindwert

Neben dem DNA *hang up* traten im Blindwert auch DNA-Schmierbanden oder Nebenprodukte auf Höhe des in der Mutations-PCR gewollten 245 bp PCR-Produktes ([Kapitel 3.2.3](#)) auf (z.B. Anhang Abbildung 50, Anhang Abbildung 51). Diese konnten bislang nicht auf eine spezifische Ursache zurückgeführt werden.

An dieser Stelle kam die Frage auf, ob es schon im Rahmen der Bestimmung der MF der Rattenleber einen gewissen Hintergrund an Mutanten gab, der fälschlicherweise mit einberechnet wurde? Fakt ist, dass bei der Bestimmung der MF in der Rattenleber pro Mutations-PCR nur eine Blindwert-Reaktion mitgeführt wurde und diese möglicherweise nicht aussagekräftig genug war.

Um eine Idee zu bekommen wie viele Mutanten bereits im Blindwert vorhanden sein könnten, sollte das Experiment zum Einfluss der Pipettiergefäße ([Kapitel 3.8.2.1](#)) hinsichtlich der Häufigkeit der 245 bp Bande im Blindwert ausgewertet werden. Um zu verifizieren, ob es sich

Ergebnisse und Diskussion

um eine in der *TaqI*-Schnittstelle mutierte Zielsequenz handelt, sollten diese PCR-Produkte ausgeschnitten, reamplifiziert und gegebenenfalls sequenziert werden.

Mit mtDNA-Mutations-Primern waren in 5,8% bis 19,2% der Reaktionsansätze die 245 bp-Bande detektierbar (Tabelle 16). Um bestätigte Mutanten handelte es sich in null (*Safelock Tube*), drei (Eppi) und 5 (Glas) Fällen. Da nicht alle im Blindwert detektierten PCR-Banden auf 245 bp Höhe aufgereinigt und nachamplifiziert wurden, wurde zudem das *worst-case* szenario berechnet, in dem die nicht ausgeschnittenen 245 bp-Banden als bestätigte Mutanten angesehen wurden. Im Mittel handelte es sich bei $45,4\% \pm 10,1\%$ ($\pm 22,3\%$) der in den 360 Reaktionsansätzen im Blindwert detektierten 245 bp Banden um die in der *TaqI*-Schnittstelle mutierte Zielsequenz.

Mit nDNA-Mutations-Primern wurden im *worst-case* 11 Mutanten in 360 Blindwert-Reaktionen detektiert (Tabelle 16). Durchschnittlich handelte es sich bei $12,6\% \pm 11,3\%$ ($\pm 89,3\%$) der in den 360 Reaktionsansätzen im Blindwert detektierten 245 bp Banden um die in der *TaqI*-Schnittstelle mutierte Zielsequenz. Dies entspricht 2 Mutanten in einer typischerweise durchgeführten Mutations-PCR mit 80 Reaktionen.

Im Detail handelte es sich unabhängig von den eingesetzten Primern bei den Mutationen um T zu C und G zu A Transitionen. In einem Fall wurde eine 1 bp-Insertion detektiert. Ein Elektropherogramm führte nach Auswertung zur Originalsequenz TCGA. Jedoch war ersichtlich (mehrere Peaks unterschiedlicher Intensität), dass sich noch eine andere DNA-Sequenz in kleinerer Konzentration im Reaktionsansatz befindet. Auch in wildtyp Mäusen wurden mit dem RMCA hauptsächlich C zu T und G zu A Transitionen detektiert (Wright et al., 2011; Vermulst et al., 2007).

Das Mutationsspektrum ist typisch für spontane Mutationen. Ca. 2-8% der Cytosine in Säugerzellen sind methyliert (Knippers, 2006) und somit anfällig für BPS. Die detektierten Transitionen entstehen vorzugsweise durch die hydrolytische Desaminierung von 5-Methylcytosin. Es entsteht Thymin, welches nicht als Mutations sondern als normaler Baustein der DNA wahrgenommen und dadurch nicht repariert wird.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 16 Häufigkeit des 245 bp-PCR-Produktes in den Blindwertreaktionen der Mutations-PCRs zum Experiment „Einfluss des Pipettiergefäßes“ ([Kapitel 3.8.2.1](#)). Zusammengefasst sind die Ergebnisse aller Blindwertreaktionen mit mtDNA- und nDNA-Mutations-Primern (n= je 120). Die detektierten Banden wurden aus dem Gel aufgereinigt und das Eluat erneut für eine Mutations-PCR als Templat eingesetzt. Zur Testung auf eine vorliegende Mutation in der *TaqI*-Schnittstelle wurde ein *TaqI*-Verdau durchgeführt (Experiment). Bestätigte Mutanten wurden zudem sequenziert und die Mutation innerhalb der *TaqI*-Schnittstelle TCGA untersucht. Da nicht alle im Blindwert detektierten PCR-Banden auf 245 bp Höhe aufgereinigt und nachamplifiziert wurden, wurde zudem das *worst-case* szenario berechnet, in dem die nicht ausgeschnittenen 245 bp-Banden als bestätigte Mutanten angesehen wurden.

	Produktbanden	Nachamplifizierbar/ Ausgeschnitten		Mutiert in <i>TaqI</i>		Mutation
		Experiment	<i>Worst case</i>	Experiment	<i>Worst case</i>	
mtDNA	Eppi	7/120 (5,8%)	5/6 (83,3%)	3/5 (60,0%)	4/7 (57,1%)	2x CCGA 1x TCAA
	Glas	23/120 (19,2%)	17/19 (89,5%)	5/17 (29,4%)	9/23 (39,1%)	3x CCGA 1x TCAA 1x TCCGA
	SafeLock	10/120 (8,3%)	0/6 (0,0%)	n.a.	4/10 (40,0%)	n.a.
	Eppi	37/120 (30,8%)	30/36 (83,3%)	5/30 (16,7%)	6/37 (16,2%)	4x CCGA 1x TCGA
nDNA	Glas	1/120 (0,8%)	1/1 (100,0%)	0/1 (0,0%)	0/1 (0,0%)	n.a.
	SafeLock	23/120 (19,2%)	15/19 (78,9%)	1/15 (6,7%)	5/23 (21,7%)	1x TCAA

Ergebnisse und Diskussion

Auswirkungen auf die ermittelten Mutationsfrequenzen in der Rattenleber

Was haben diese bestätigten Mutanten im Blindwert nun für Auswirkungen auf die in dieser Arbeit kalkulierten mitochondrialen Mutationsfrequenzen in der Leber von männlichen und weiblichen Ratten?

Um diese Frage zu klären, sollten die um den Hintergrund korrigierten Mutationsfrequenzen mit den zuvor ermittelten verglichen werden.

Für eine Korrektur der Werte wurden pro Mutations-PCR (80 Reaktionen) 4 Mutanten abgezogen. Dies entspricht dem schlechtesten Fall von 17 Mutanten/360 Reaktionen. Da in einer Kopiezahlbestimmung im Blindwert die Werte <LOQ waren (Daten nicht gezeigt) war eine Korrektur der Kopiezahl vernachlässigbar.

Die mitochondrialen Mutationsfrequenzen/bp reduzierten sich um ca. 30% (Anhang Tabelle 36). Eine Ausnahme stellte die Reduktion der Mutationsfrequenz/bp des männlichen und weiblichen Tieres Nr 4 dar. Hier wurde die Mutationsfrequenz/bp um ca. 62% bzw. 48% reduziert. Insgesamt lagen auch die korrigierten Mutationsfrequenzen/bp $\cdot 10^{-6}$ mit $0,6 \pm 0,3$ bis $8,9 \pm 1,8$ und $24,4 \pm 2,9$ noch in dem in der Literatur genannten Bereichen ([Kapitel 3.6.6](#)).

Ob letztlich die korrigierte oder die experimentell bestimmte mitochondriale Mutationsfrequenz der Realität entsprechen, war anhand der vorliegenden Daten nicht bestimmbar.

3.8.2.4 Schmelztemperatur der PCR-Produkte der Mutations-PCR

Alle Mutations-PCRs schlossen mit der Aufnahme einer Schmelzkurve ab. An Hand dieser wurden Tms bestimmt. Die Tm ist abhängig vom GC-Gehalt, der Sequenzlänge und der Sequenz an sich (Ririe et al., 1997). Theoretisch sollte somit eine spezifische Zuordnung der entstandenen PCR-Produkte möglich sein.

Deshalb sollte als nächstes untersucht werden, ob in der Tat die detektierten Schmelztemperaturen spezifisch für die in der Agarose-Gelelektrophorese detektierte PCR-Banden sind und möglicherweise zukünftig auf die Geldetektion in Teilen verzichtet werden kann.

Für die Auswertung der Daten wurden zum einen alle Mutations-PCRs vor und zum anderen mit dem offensichtlichen Auftreten der Verunreinigungen (Daten aus Reproduzierbarkeits Experiment Pipettiergefäß Kapitel 3.7.2.1) zusammengefasst. Verglichen wurden Daten, welche mit den mtDNA-Mutations-Primern generiert wurden. Je nach im Gel auftretenden PCR-Banden wurden Gruppen zusammengefasst und die Variation der Tm in einem Box-Plot graphisch dargestellt.

Die aufgetretenen PCR-Produkte ließen sich grob in drei Kategorien einteilen:

Ergebnisse und Diskussion

- Die Primerdimere oder kleinere PCR-Produkte (zusammengefasst als Primerartefakte), welche durch eine unspezifische Bindung der Mutations-Primer zustande kommen ([Kapitel 3.8.1](#)),
- Die Zielsequenz (das Mutations-Produkt), welche sich nach einem *TaqI*-Verdau als mutiert oder nicht-mutiert einordnen lässt und
- Die Unspezifischen Nebenprodukte wie DNA-Schmierbanden oder *hang up*, welche gleichzeitig mit oder ohne weitere PCR-Banden detektiert wurden.

Die T_m der 50 bp-Bande lag zwischen $78,5^\circ\text{C}$ und $79,3^\circ\text{C}$ ⁸ (Abbildung 42). Wie zu erwarten stieg die T_m mit steigender Amplifikatlänge. Bei Reaktionsansätzen mit bestätigten Mutanten schwankte die T_m zwischen $82,4^\circ\text{C}$ und $83,3^\circ\text{C}$. Die T_m der unmutierten Zielsequenz betrug $82,7^\circ\text{C}$ - $83,2^\circ\text{C}$. D.h. wie zu erwarten war, ist eine einzelne Mutation in der Sequenz nicht ausreichend um die T_m zu verschieben und sowohl die mutierte als auch die unmutierte Zielsequenz besitzen die gleiche T_m . Somit ist auch eine sich nach dem *TaqI*-Verdau anschließende Agarose-Gelelektrophorese zwingend notwendig zur eindeutigen Identifizierung eines Mutanten. DNA-Schmierbanden hatten T_m s im Bereich von $83,6^\circ\text{C}$ - $86,9^\circ\text{C}$, die T_m des *hang up* lag zwischen $86,6^\circ\text{C}$ und $87,2^\circ\text{C}$ (Abbildung 42). Folglich waren die T_m s mit unspezifischen Nebenprodukten um $0,3$ - $3,9^\circ\text{C}$ höher als die der Zielsequenz. Sobald jedoch zusätzlich PCR-Banden im Reaktionsansatz detektiert wurden, schwankte die T_m über einen breiteren Bereich (Abbildung 42), sodass die T_m s mit denen der Primerartefakte und Zielsequenzen überlagerten.

Die Reaktionsansätze mit Templat führten entweder zu *hang up*, zum gewollten Mutations-Produkt oder Kombinationen dessen mit unspezifischen Nebenprodukten. Auf Grund der Überschneidung der Temperaturbereiche war eine eindeutige Zuordnung von *hang up* oder unspezifischen Nebenprodukten mit Produkt-Banden erst nach der Agarose-Gelelektrophorese möglich.

Insgesamt lagen die T_m s der Zielsequenz in den Reaktionsansätzen ohne Templat mit $81,5^\circ\text{C}$ - $83,3^\circ\text{C}$ (Abbildung 43) im gleichen Bereich wie die der Reaktionsansätze mit Templat ($82,6^\circ\text{C}$ - $82,7^\circ\text{C}$). Ebenso überschritten sich die T_m -Bereiche der unspezifischen Nebenprodukte zwischen Blindwert- und Templatreaktionen. Somit ist eine Zuordnung des Ursprungs der Banden, insbesondere der 245 bp-Mutantenbande nicht möglich.

Sowohl die T_m s des 245 bp-Mutations-Produktes als auch die der unspezifischen Nebenprodukte lagen vor und nach dem Auftreten der Verunreinigungen im Blindwert im gleichen Bereich ($82,4^\circ\text{C}$ - $83,3^\circ\text{C}$ vs. $82,6^\circ\text{C}$ - $82,7^\circ\text{C}$ und $83,6^\circ\text{C}$ - $87,2^\circ\text{C}$ vs. $84,4^\circ\text{C}$ - $85,7^\circ\text{C}$). In Reaktionsansätzen, welche sowohl unspezifische Nebenprodukte als auch das Mutations-

⁸ Wenn nicht anders beschrieben, wurden zur Diskussion das 25te und 75te Perzentil verwendet.

Ergebnisse und Diskussion

Produkt enthielten, war an Hand der T_m nicht nachvollziehbar, dass auch ein Mutations-Produkt enthalten war. Deshalb muss eine Agarose-Gelelektrophorese erfolgen. Da unter diesen Umständen kein Mehrwert durch die Schmelztemperatur erhalten wird, kann die Detektion einer Schmelzkurve auch entfallen.

Ergebnisse und Diskussion

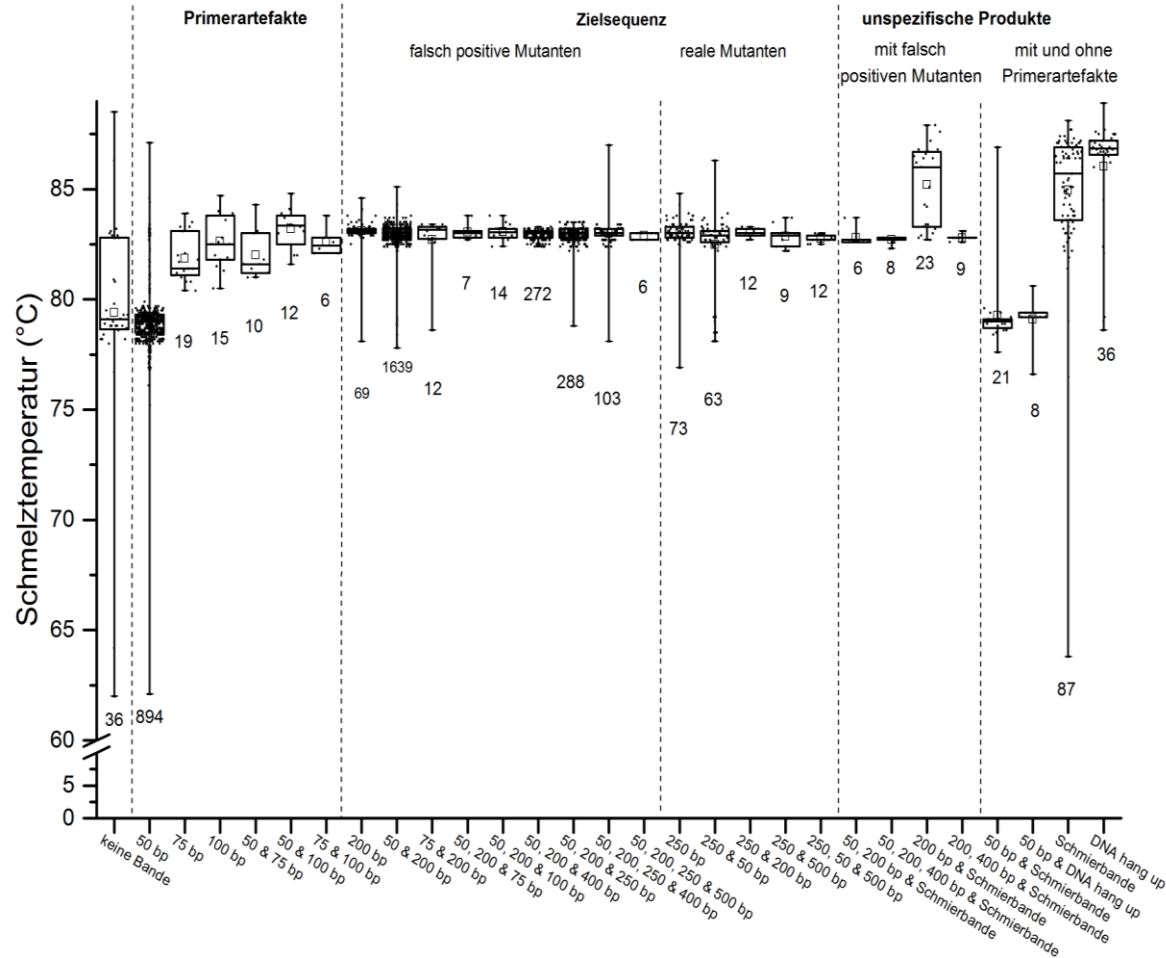


Abbildung 42:

Schmelztemperaturen (Datenpunkte) und die dazugehörigen nach Agarose-Gelelektrophorese detektierten PCR-Produkte aus 68 Mutations-PCRs vor dem Auftreten der Verunreinigungen (November 2013 bis April 2015, Reaktionsansätze=3723). Alle PCR-Produkt-Kombinationen, welche weniger als 5x detektiert wurden, sind nicht berücksichtigt. Schmelztemperaturen von Reaktionsansätzen, bei denen keine Bande nach der Agarose-Gelelektrophorese detektierbar war, wurden nur ausgewertet wenn der Ct-Wert <40 war. Dargestellt sind Median (horizontale Linie) und Mittelwert (Quadrat) sowie das 25te und 75te Perzentil (Box) als auch das Minimum und Maximum (Whisker) der Schmelztemperaturen. Unter jeder Box ist die Gesamtanzahl an Reaktionsansätzen pro Gruppe angegeben.

Ergebnisse und Diskussion

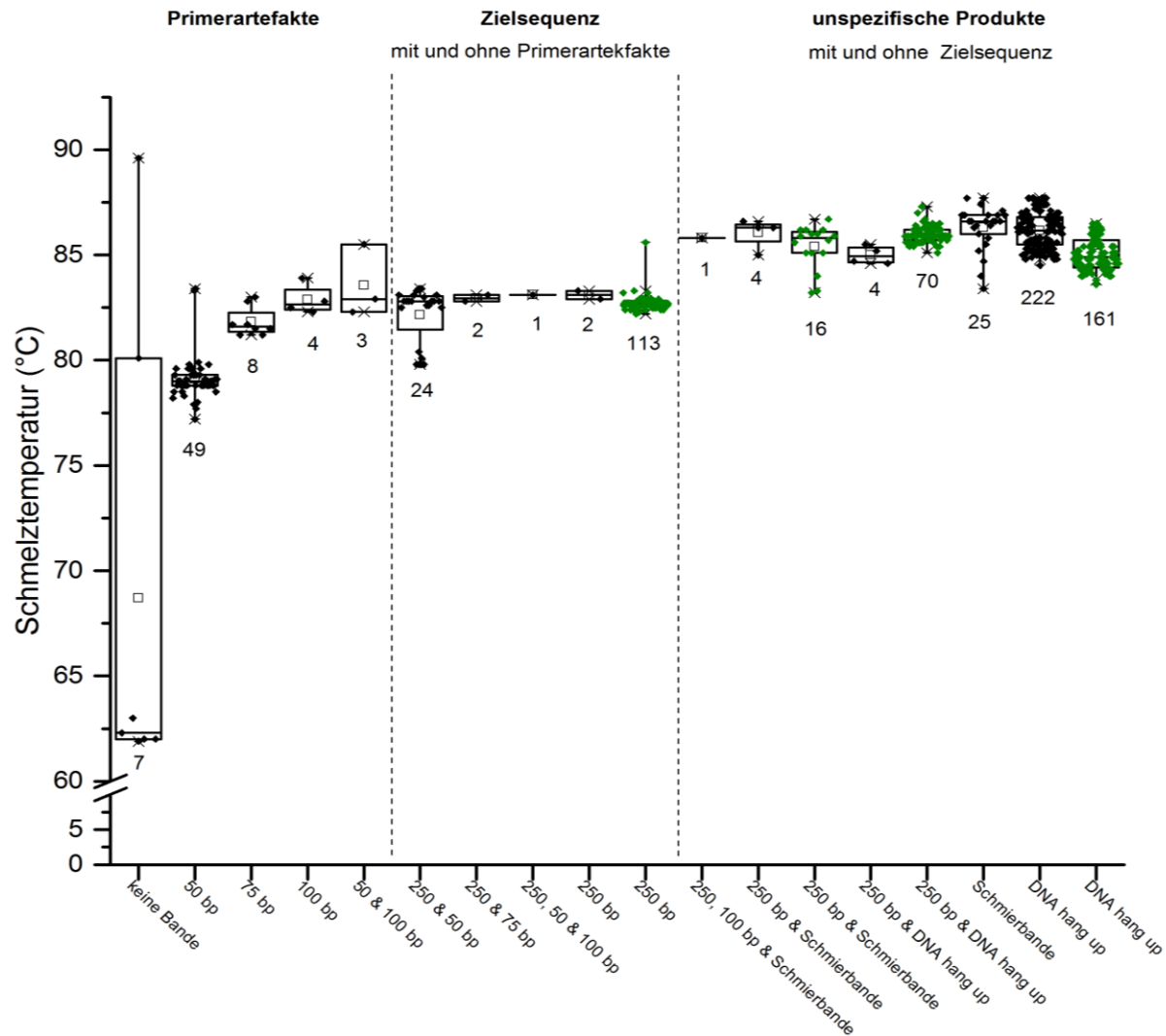


Abbildung 43:

Schmelztemperaturen (Datenpunkte) und die dazugehörigen nach Agarose-Gelelektrophorese detektierten PCR-Produkte aus 360 Reaktionsansätzen mit (grün, Gesamt-DNA, $7,6 \cdot 10^3$ mtDNA-Kopien/ μ l) und 360 Reaktionsansätzen ohne (schwarz) Templat des Experiments zum Einfluss des Pipettiergefäßes. Schmelztemperaturen von Reaktionsansätzen, bei denen keine Bande nach der Agarose-Gelelektrophorese detektiert war, wurden nur ausgewertet wenn der Ct-Wert <40 war. Dargestellt sind Median (horizontale Linie) und Mittelwert (Quadrat) sowie das 25te und 75te Perzentil (Box) als auch das Minimum und Maximum (Whisker) der Schmelztemperaturen. Unter jeder Box ist die Gesamtanzahl an Reaktionsansätzen pro Gruppe angegeben

Ergebnisse und Diskussion

In den bisherigen Untersuchungen wurde festgestellt, dass es sich bei den im Blindwert detektierten 245 bp Banden ([Kapitel 3.8.2.3](#)) teilweise um die Zielsequenz handelt. Unter diesen Umständen ist eine verlässliche Kalkulation der Mutationsfrequenz nicht möglich.

Deshalb sollten weitere Experimente erfolgen, welche sowohl das Auftreten von *hang up* und DNA-Schmierbanden als auch die Verunreinigungen im Blindwert beseitigen.

3.8.2.5 Weitere Untersuchungen zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit der Mutations-PCR und zu Verringerung der unspezifischen Nebenprodukte

Wie bei den ersten Experimenten zur Reproduzierbarkeit wurden mehrere Reaktionsansätze pro Experiment (n=20) pipettiert. Es sollten Parameter wie der MM und die Polymerase untersucht werden.

1. Verwendung eines fertigen, käuflich erwerbbaeren Mastermix

Um eine fehlerhafte Komposition des MMs (z.B. falsche oder nicht optimale Konzentrationen) als Ursache für die Entstehung der unspezifischen Nebenprodukte und eine Verunreinigung auszuschließen, sollte die Mutations-PCR mit einem fertigen MM durchgeführt werden. Bleibende Einflussfaktoren waren einzig die Mutations-Primer.

Es wurde der RedMastermix (<http://www.genaxxon.com/shop/en/shop-all-products/pcr-related/pcr-master-mixes/368/redmastermix-2x-pcr-master-mix-with-red-dye>, Stand 17.11.2017) verwendet. Dazu wurden Primer gefügt. Der MM wurde geteilt. Die Hälften wurden in zwei aufeinanderfolgenden Mutations-PCRs eingesetzt. Die Zwischenlagerung der 2. Hälfte war im Kühlschrank bei 4°C. Das Experiment wurde einmal wiederholt.

In Durchführung 1 wurden nach gelelektrophoretischer Trennung zu 90% *hang up* und zu 10% eine Kombination aus Mutations-Produkt und spezifischem Nebenprodukt detektiert. In der dazugehörigen 2. PCR wurde zu 100% *hang up* detektiert. Die zweite Durchführung resultierte nach PCR-Lauf 1 in 85% *hang up*, 5% DNA-Schmier, 5% spezifischem Nebenprodukt und 5% Kombination aus Mutations-Produkt und spezifischem Nebenprodukt. Die zweite PCR mit demselben MM resultierte hingegen in 70% *hang up*, 0% Schmier, 5% spezifischem Nebenprodukt und 25% Mutations-Produkt mit spezifischem Nebenprodukt.

Die Ergebnisse der Mutations-PCR waren nicht reproduzierbar (Anhang Abbildung 53). Das Auftreten von unspezifischen Nebenprodukten wurde durch die Verwendung eines Fertig-MM nicht eliminiert.

2. Verwendung einer anderen Polymerase

Bislang wurde in allen Experimenten, welche keinen fertigen Mastermix benutzten, die TEMPase für die Mutations-PCR eingesetzt. Möglicherweise führt die Verwendung einer anderen Polymerase zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit.

Deshalb wurde nun die Mutations-PCR mit der ReproFast DNA-Polymerase (<http://www.genaxxon.com/shop/en/shop-all-products/pcr-related/dna-polymerases/276/reprofast-proofreading-polymerase>, Stand 17.11.2017) und dem ursprünglichen TEMPase-Mastermix (Tabelle 27) verwendet. Der Mastermix wurde geteilt. Die Hälften wurden in zwei aufeinanderfolgenden Mutations-PCRs eingesetzt. Die Zwischenlagerung der 2. Hälfte war im Kühlschrank bei 4°C. Das Experiment wurde einmal wiederholt. Als Temperaturprogramm wurde das vom Hersteller der Polymerase angegebene verwendet (Tabelle 17). Auch die Konzentrationen der Mastermix-Komponenten wurden den Empfehlungen des Herstellers angepasst.

In den Blindwertreaktionen wurde in 55% (Lauf 2) -95% (Lauf 1) der Reaktionen Schmierbanden, in 5% (PCR Lauf 1)- 20% (PCR-Lauf 2) keine Banden und in 25% eine 50 bp-Bande (PCR-Lauf 2) detektiert (Abbildung 44 A).

Bei der unabhängigen Wiederholung des Experimentes wurde nach PCR Lauf 1 zu 100% DNA Schmier detektiert. Nach PCR-Lauf 2 wurde zu 90% DNA-Schmier und zu jeweil 5% keine Bande bzw. ein spezifisches Nebenprodukt detektiert (Abbildung 44 B).

Die Verwendung der ReproFast DNA-Polymerase führte im Blindwert zur Verhinderung von DNA *hang up*. Desweiteren entstand kein 245 bp Mutations-Produkt. Aus diesen Gründen erschien es prinzipiell möglich die Mutations-PCR künftig mit dieser Polymerase durchzuführen.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 17. Vergleich Temperaturprogramme für eine Mutations-PCR. Da es sich bei der TEMPase um eine Hotstart-Polymerase handelt, wurde der initiale Denaturierungsschritt vom GENAXXON-Temperaturprogramm angepasst

	ursprüngliches Temperaturprogramm		Temperaturprogramm von GENAXXON	
	Temperatur (°C)	Zeit (min)	Temperatur (°C)	Zeit (min)
Denaturierung	95	15,00	94	15,00
Zyklus 47x				
Denaturierung	95	0,50	94	0,50
Annealing	65	0,50	65	0,25
Elongation	72	1,00	72	0,30
Zyklus Ende				
Denaturierung			94	0,50
Elongation	72	5,00	72	5,00
	95	0,25	95	0,25
Schmelzkurve	60	0,25	60	0,25
	95	0,25	95	0,25

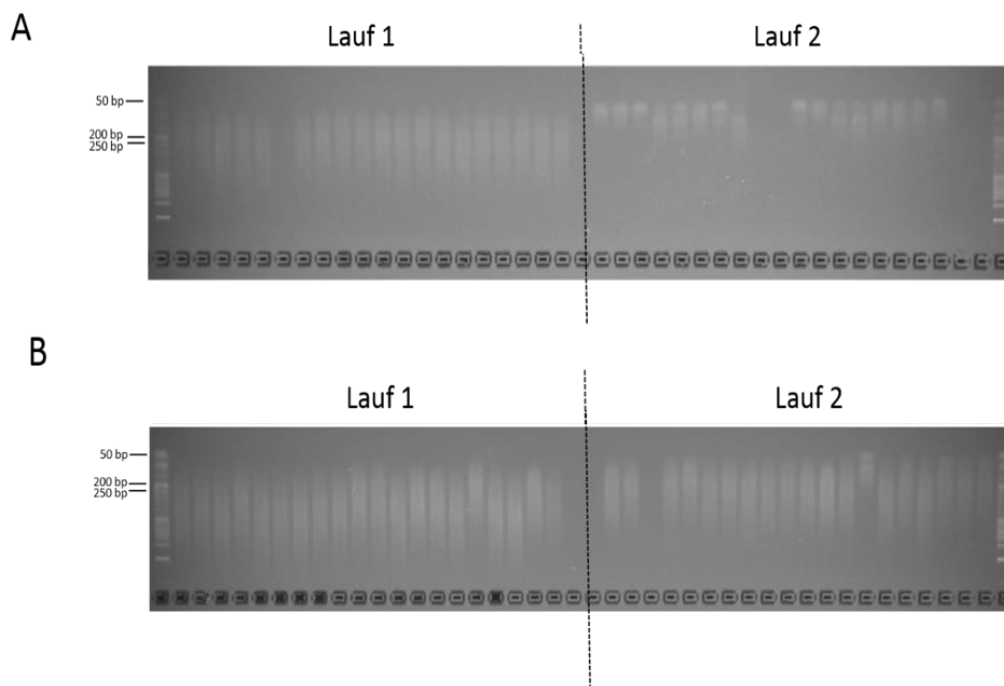


Abbildung 44 Reproduzierbarkeit der PCR-Produkte der Mutations-PCR unter der Verwendung der ReproFast DNA-Polymerase (Genaxxon bioscience) und mtDNA-Mutations-Primern. Der komplette Mastermix wurde geteilt und in 2 aufeinanderfolgenden PCRs (Lauf 1 und 2) verwendet. Der Versuch wurde zweimal unabhängig durchgeführt (A+B). Die Auftrennung erfolgte mittels 3%igem Agarosegel in 1x TAE-Puffer für 1 h bei 5 V/cm und einer SYBR® Green-Konzentration von 1 ng/μl. Als DNA-Leiter funktierte eine 50 bp Leiter (jeweils ganz außen im Bild).

3. Empfindlichkeit der ReproFast DNA-Polymerase

Für die Anwendung der ReproFast DNA-Polymerase innerhalb der Mutations-PCR im RMCA muss die Detektion eines einzelnen Mutanten gewährleistet sein. Deshalb sollte als nächstes getestet werden, wie sensitiv die ReproFast-DNA-Polymerase 1 Kopie detektiert. Dazu sollten zunächst unterschiedliche Konzentrationen Standard amplifiziert werden. Im Falle ausreichender Empfindlichkeit sollte wie in realen Proben eine Kopie mutierter Standard^{-TaqI} in vielen geschnittenen unmutierten Standard^{+TaqI}-Kopien (bis ca. 40.000 vgl. Kapitel 3.7) amplifiziert werden.

Für die Untersuchung, ob die ReproFast-DNA-Polymerase 1 Kopie detektiert, wurde als Templat mutierter Standard^{-TaqI} ([Kapitel 3.5.1](#)) eingesetzt und dieser von 10.000 Kopien/well bis hin zu 1 Kopie/well verdünnt. Von allen Konzentrationen wurden 3 wells pipettiert, außer von den beiden niedrigsten 10 Kopien/well und 1 Kopie/well. Um die Wahrscheinlichkeit eine Mutanten zu detektieren zu erhöhen ([Kapitel 3.5.3](#)), wurden von diesen Konzentrationen 10 Reaktionen pipettiert.

Mit 10.000 Kopien/well entstanden deutliche Produktbanden ohne Nebenprodukte. Ab 1000 Kopien/well entstand DNA-Schmier und ab 10 Kopien/well war nach Agarose-Gelelektrophorese keine PCR-Bande mehr detektierbar (Abbildung 45). Auf Ebene der Schmelzkurven spiegelte sich dies in einer Verschiebung der Schmelztemperatur wieder. So änderten sich die Schmelztemperaturen von 81,4°C (10.000 Kopien/well) über Schmelzkurven mit Doppelpeaks (81,4°C und 84,5°C) hin zu einer Schmelztemperatur von 85,5°C-85,7°C (DNA-Schmierbande).

Ergebnisse und Diskussion

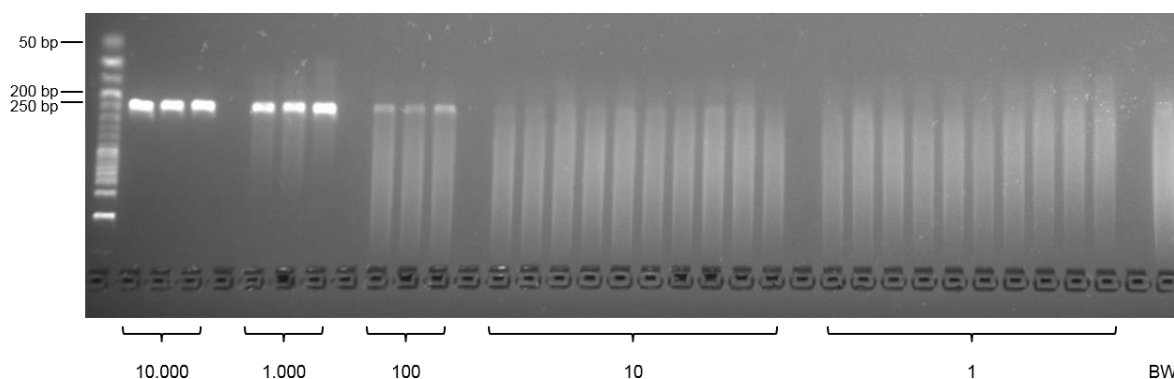


Abbildung 45 Empfindlichkeit der ReproFast DNA Polymerase (Genaxxon bioscience) in Detektion von in der TaqI-Schnittstelle mutierten mtDNA-Kopien. Dargestellt ist die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte, welche innerhalb einer Mutations-PCR mit Standard-TaqI und mtCytb-Mutations-Primern, entstanden. Dabei variierte die Templatmenge/Reaktionsansatz zwischen 10.000 Kopien bis hin zu 1 Kopie. BW, Blindwert, Die Auftrennung erfolgte mittels 3%igem Agarosegel in 1x TAE-Puffer für 1 h bei 5 V/cm und einer SYBR® Green-Konzentration von 1 ng/µl. Als DNA-Leiter fungierte eine 50 bp Leiter (ganz links).

Insgesamt war die Empfindlichkeit der Polymerase zum Zeitpunkt der Experimente somit nicht ausreichend zur Detektion einer einzelnen mutierten mtDNA-Kopie. Die ReproFast DNA Polymerase war folglich für die Verwendung in der Mutations-PCR innerhalb des RMCA nicht geeignet.

3.8.2.7 Fazit

Insgesamt wurden für die Mutations-PCR keine experimentellen Bedingungen geschaffen, welche zunächst zu reproduzierbaren Ergebnissen führten. Desweiteren war es nicht gelungen durch die Änderung von chemischen oder physikalischen Parametern eine Reduktion von DNA-Schmier oder *hang up* zu erreichen. Eine Ausnahme stellte die Verwendung der ReproFast DNA-Polymerase dar, welche jedoch nicht sensitiv genug war um eine einzelne Kopie zu amplifizieren. Die Mutations-PCR war unter diesen Umständen nicht weiter durchführbar.

Auf Grund der in dieser Arbeit aufgetretenen Verunreinigungen im Blindwert ist es fraglich, ob auch bei einer neu entwickelten Mutations-PCR nicht erneut Verunreinigungen im Blindwert detektiert werden. Um das Risiko zu minimieren, sollte im Falle einer Neuentwicklung der Mutations-PCR ein anderes Zielgen gewählt und die ersten Versuche eventuell in anderen Laborräumlichkeiten als bislang durchgeführt werden. Möglicherweise sind auch die von Wu et al. (2015) verwendeten Primer nutzbar.

Insgesamt ist die Bestimmung der MF im mt-Cyt-b Gen instabil und vor einen routinemäßigen Einsatz nicht geeignet.

4 Zusammenfassung

Mutationstests werden *in vitro* und *in vivo* durchgeführt. Insbesondere die phänotypselektiven Mutationstests sind meist beschränkt auf die Detektion von Mutationen im Exon und gegebenenfalls in Promotorregionen.

Um zunächst die Datenlage zu den üblicherweise verwendeten *in vitro* Mutationstests zu erweitern und somit eine Bewertung der zu untersuchenden Substanz zu erleichtern, sollte eine Methode zur Erfassung des Mutationsspektrums etabliert und im Rahmen der Untersuchung des mutagenen Potentials des Lebensmittelinhaltsstoffes Irilon angewendet werden.

Es wurde eine Methode entwickelt, welche die Sequenzierung eines jeden einzelnen im Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Test entstandenen 6-Thioguanin-resistenten Mutanten erlaubt und somit auch Rückschlüsse auf Mechanismen der Mutationsentstehung zulässt. Im Rahmen der Untersuchung zum mutagenen Potential des Lebensmittelinhaltsstoffes Irilon, wurde zwar kein Unterschied in der Mutantenfrequenz, jedoch sehr wohl ein mit steigenden Deletionen und sinkenden Basenpaarsubstitutionen verändertes Mutationsspektrum detektiert. Die Auswertung des Mikrokerntests unterstützte die Annahme, dass Irilon Chromosomenmutationen induziert. Zudem wies Irilon ein starkes aneugenes Potential auf.

Im Gegensatz zu den phänotypselektiven Mutationstests weisen genotypselektive Tests hingegen theoretisch keine Limitierungen hinsichtlich der zu untersuchenden Zielsequenz und der Organwahl auf. Ein Vertreter der genotypselektiven Tests ist der *Random Mutation Capture Assay*, der 2005 von Bielas und Loeb für das Intron 6 des humanen TP53-Gens publiziert wurde.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen ob die Technik des *Random Mutation Capture Assays* auf die Ratte übertragbar und ob bzw. unter welchen Bedingungen die Bestimmung von spontanen und induzierten Mutationsfrequenzen in verschiedenen Zielsequenzen möglich ist.

Deshalb wurden zunächst das für das Tumorsuppressor Protein 53 kodierende Gen p53, die für die 18S ribosomale RNA kodierende DNA und das mitochondriale Cytochrom b Gen als Zielsequenzen gewählt und deren Eignung für die Anwendung im *Random Mutation Capture Assays* geprüft.

Für jede Zielsequenz wurden alle für die Durchführung des *Random Mutations Capture Assays* benötigten molekularen Werkzeuge unter optimierten PCR-Bedingungen hergestellt und verifiziert. Für die Quantifizierung der Gesamtkopiezahl wurde je Zielsequenz eine spezifische

Zusammenfassung

Echtzeit-PCR-Methode entwickelt, welche *TaqMan*[®]-Sonden-basiert ist. Nach Optimierung der PCR-Bedingungen wurden je Zielsequenz Wiederfindungen im angestrebten Bereich von ca. 90-100% mit Schwankungen von maximal 20% erreicht. Ausgenommen hiervon war die für die 18S ribosomale DNA kodierende Zielsequenz. Eine Änderung der Echtzeit-PCR-Bedingungen führte zu keiner praktikablen Methode. Daher war diese Zielsequenz, welche trotz geringer DNA-Mengen versprach mehr DNA Kopien zu erhalten und somit die Bestimmung von geringen Mutationsfrequenzen zu erleichtern, nicht im *Random Mutation capture Assay* anwendbar.

Für die Wahl einer DNA-Isolierungsmethode wurden 5 Methoden hinsichtlich einer für die Mutationsfrequenz-Bestimmung ausreichenden Kopiezahl, der Reinheit und des Kosten-/Zeitaufwands verglichen. Mit zwei der fünf Methoden wurde aus 100 mg Gewebe die höchste nukleären Kopiezahl isoliert, ausreichend um Mutationsfrequenzen im Bereich $1-2 \cdot 10^{-7}/\text{bp}$ zu bestimmen. Um jedoch die erwarteten Mutationsfrequenzen im Bereich von $1-3 \cdot 10^{-8}/\text{bp}$ (Intron) bzw. $2-3 \cdot 10^{-9}/\text{bp}$ (Exon) zu detektieren, wären 2-3 g Gewebe bzw. 3 mg DNA notwendig. Auf Grund der anatomischen Organgewichte wäre die Durchführung des nukleären *Random Mutation Capture Assays* somit auf vereinzelte Organe wie Leber, Dünndarm und Gehirn beschränkt. Zudem bestanden mit der Hybridisierung und dem Uracil-DNA-Glycosylase-Verdau zwei zusätzliche kritische Punkte, welche zu einer Minimierung der Kopiezahl oder einer fehlerhaften Einschätzung der Mutationsfrequenz führen können.

Aus diesen Gründen wurde eine Entwicklung des *Random Mutation Capture Assays* für die Zielsequenz im p53-Gen verworfen. Die Kopiezahl ausbeuten der mitochondrialen DNA waren ab 50 mg Gewebeinsatz bei jeder der 5 untersuchten Methoden ausreichend zur Bestimmung einer angestrebten Spontanmutationsfrequenz zwischen $6-100 \cdot 10^{-7}/\text{bp}$. Bei Gewebemengen unter 50 mg erwies sich die Aufarbeitung mit DNAzol[®] auf Grund zu niedriger Kopiezahl ausbeuten als ungeeignet. In dieser Arbeit wurde nachfolgend die Phenol-Chloroform-Extraktion nach Vermulst et al (2008) verwendet.

Im Rahmen der Etablierung der PCR zur Erfassung der Anzahl mutierter Kopien (Mutations-PCR) wurde ein Mutanten-Standard zur Anwendung als Positivkontrolle in PCR und Agarose-Gelelektrophorese hergestellt, verifiziert und fluorimetrisch quantifiziert. Wiederfindungsexperimente bestätigten, dass mit der etablierten Mutations-PCR eine einzelne Kopie amplifizier- und detektierbar ist. Um eine Auswertung einer Sequenzierung hinsichtlich Anzahl der Mutanten als auch der Sequenz an sich zu gewährleisten, wurde der akzeptierte Bereich an detektierten 1-19 (80 Reaktionen) gesetzt.

Nachfolgend wurde in der gesunden Leber von männlichen und weiblichen Ratten erfolgreich die mitochondriale Spontanmutationsfrequenz mit dem entwickelten *Random Mutation Capture Assay* bestimmt. Diese betrug innerhalb einer mitochondrialen DNA-Lösung $3,2 \pm 3,1$

Zusammenfassung

10^{-6} /bp (Median 2,7). Die Mutationsfrequenzen von 3 unabhängigen mitochondrialen DNA-Lösungen -isoliert aus demselben Organpulver- betragen durchschnittlich $11,5 \pm 8,6 \cdot 10^{-6}$ /bp (Median 8,0) und waren somit ca. 3-mal höher. Ein Vergleich zwischen den Mutationsfrequenzen der männlichen und weiblichen Tiere resultierte in mitochondrialen Mutationsfrequenzen zwischen $1,6-34,4 \cdot 10^{-6}$ /bp (männlich) und $3,0-12,9 \cdot 10^{-6}$ /bp (weiblich), wobei zwischen männlichen und weiblichen Tieren kein statistischer Unterschied bestand (Mann-Whitney-Test; $p < 0,05$).

Um zu prüfen, ob die Mutationsraten bestimmt mit dem mitochondrialen *Random Mutation Capture Assay* und einem phänotypselektiven Mutationstest zu gleichem Maße auf ein mutagenes Potential hinweisen, wurde als nächstes der phänotypselektive Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Test für normale Nierenepithelzellen der Ratte (NRK-Zelllinie) entwickelt. Nach einer 24 h Inkubation mit $0,1 \mu\text{M}$ 4-Nitrochinolin-1-oxid, einem bekannten Adduktbildner, stieg die Mutationsfrequenz im Exon des Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Gens um den Faktor 5 im Vergleich zur Lösemittelkontrolle an. Mit Hilfe des entwickelten *Random Mutation Capture Assays* wurde in der DNA -isoliert zum Zeitpunkt der Selektion- eine dreifache Steigerung der Mutationsfrequenz im mt-Cytb-Gen detektiert. Somit war mit beiden Tests eine Erhöhung der Mutationsfrequenz in der gleichen Größenordnung detektierbar, wobei der phänotypselektive Mutationstest sensitiver war.

Nachdem die Mutations-PCR ca. 1,5 Jahren angewendet wurde, stieg innerhalb von 4 Monaten unabhängig von der verwendeten Templatkonzentration sowohl die Häufigkeit der detektierten Schmierbanden (3,5% zu 12,7%) als auch die des DNA *hang up* (0,5% zu maximal 95,0%) an. In 7 Mutations-PCRs, welche nach diesen Phänomenen nur mit Blindwerten durchgeführt wurden, lag der Anteil an detektierten DNA-Schmierbanden pro Mutations-PCR zwischen 25,0% und 38,8%, der des DNA *hang up* zwischen 17,5% und 48,8%. Das war häufiger als in Reaktionen mit Templat; ein Hinweis dafür, dass das Vorliegen von Templat Nebenreaktionen zu einem gewissen Grad verdrängte und dass die unspezifische Amplifizierung am Mastermix der Mutations-PCR lag. Eine Änderung von chemischen oder physikalischen Parametern innerhalb der PCR-Reaktion führte zu keiner Reduktion der Nebenprodukte. Somit war der für das mitochondriale Cytochrom b-Gen entwickelte *Random Mutation Capture Assay* nicht robust gegenüber Nebenreaktionen und ist daher nicht für einen routinemäßigen Einsatz geeignet.

Zusammenfassend war eine Entwicklung der Primer und der molekularen Werkzeuge des *Random Mutation Capture Assays* vom Mensch auf Ratte mit allen drei gewählten Zielsequenzen möglich. Im Rahmen der Experimente zeigte sich, dass die Kopiezahl-PCR der Zielsequenz in der 18S ribosomale RNA kodierenden DNA nicht praktikabel und eine Bestimmung der Mutationsfrequenzen für das Tumorsuppressor Protein 53 kodierenden Gen

Zusammenfassung

p53 nur unter Berücksichtigung einer eingeschränkten Organauswahl möglich war. Für die Zielsequenz des mitochondrialen Cytochrom b Gens war der *Random Mutation Capture Assay* durchführbar. Allerdings erwies sich die Mutations-PCR als instabil. Folglich ist eine Bestimmung von Mutationsfrequenzen mit dem *Random Mutation Capture Assay* in *Rattus norvegicus* nur sehr begrenzt möglich.

5 Summary

Mutation tests are performed *in vitro* and *in vivo*. Especially, the phenotype-selective mutation tests are often limited to the detection of mutations in the exon and possibly promoter regions.

In order to increase the number of data on the commonly used *in vitro* mutation tests and thus to facilitate an assessment of the substance to be examined, a method for detecting the mutational spectra should be established and used within the investigation of the mutagenic potential of the food ingredient irilone.

A method which allows the sequencing of each individual 6-thioguanine-resistant mutant formed in the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase assay has been developed, making it possible to draw conclusions about the mechanism of mutation formation. Although no difference in the mutant frequency was detected in the study on the mutagenic potential of the food ingredient irilone, an altered mutation spectrum with increasing deletions and decreasing base pair substitutions was detected. The evaluation of the micronucleus test supported the assumption that irilone induces chromosome mutations. In addition, irilone had a strong aneugene potential.

In contrast to the phenotype-selective mutation tests, genotype-selective tests theoretically have no limitations regarding the target sequence or organ selection. One representative for a genotype-selective test is the *Random Mutation Capture Assay*, published in 2005 by Bielas and Loeb for the intron 6 of the human TP53 gene.

Thus, the next aim of this work was to investigate whether the technique of *Random Mutation Capture Assay* is transferable to the genome of the rat and whether or more specifically under which conditions the determination of spontaneous and induced mutation frequencies in different target sequences is possible.

Therefore, the p53 tumor suppressor protein p53 gene, the 18S ribosomal RNA encoding DNA and the mitochondrial cytochrome b gene were selected as target sequences. Then their suitability for use in the *Random Mutation Capture Assay* was analyzed.

For each target sequence, all molecular tools needed to perform the *Random Mutation Capture Assay* were prepared and verified under optimized PCR conditions. For the quantification of the total copy number, a specific TaqMan® real-time PCR method was developed for each target sequence. After optimization of the PCR conditions, recoveries in the desired range of about 90-100% with variations of a maximum of 20% were achieved per target sequence., except the target sequence coding for the 18S ribosomal DNA. Changing the real-time PCR conditions did not lead to any practicable method. Therefore, this target sequence, which promised to obtain more DNA copies despite lower DNA levels and thus facilitate the

Summary

determination of low mutation frequencies, was not applicable in *Random Mutation Capture Assay*.

To make a choice regarding a DNA isolation method, 5 methods were compared with respect to the copy number, purity and the cost / time effort, sufficient for the mutation frequency determination. With two of these five methods it was possible to isolate a sufficient number of nuclear copies from 100 mg of tissue to determine mutation frequencies in the range $1-2 \cdot 10^{-7}$ / bp. However, to detect the expected mutation frequencies in the range of $1-3 \cdot 10^{-8}$ / bp (intron) and $2-3 \cdot 10^{-9}$ / bp (exon), 2-3 g of tissue or 3 mg of DNA would be necessary. Due to the anatomical organ weights, the implementation of the nuclear *Random Mutation Capture Assay* would be limited to individual organs such as liver, small intestine and brain. In addition, hybridization and uracil-DNA glycosylase digestion gave rise to two additional critical points that could lead to a minimization of copy number or a misjudgment of the mutation frequency. For these reasons, development of the *Random Mutation Capture Assay* for the target sequence in the p53 gene was discarded. Using at least 50 mg of tissue, the copy number yields of mitochondrial DNA were sufficient to determine a desired spontaneous mutation frequency between $6-100 \cdot 10^{-7}$ / bp in each of the 5 investigated methods. For tissue levels below 50 mg, preparation with DNAzol® was unsuitable due to low copy number yields. In this work, the phenol-chloroform extraction according to Vermulst et al (2008) was used.

During the establishment of the PCR detecting the number of mutated copies (mutation PCR), a mutated standard used as a positive control in PCR and agarose gel electrophoresis was prepared, verified and fluorometrically quantified. Recovery experiments confirmed that a single copy can be amplified and detected using the established mutation PCR. In order to ensure a sequencing evaluation with respect to the number of mutants as well as the sequence itself, the accepted range of detected mutants was set to 1-19 (80 reactions).

Next, the mitochondrial spontaneous mutation frequency was successfully determined in healthy livers of male and female rats using the developed *Random Mutation Capture Assay*. The mutations frequency of a mitochondrial DNA solution was $3.2 \pm 3.1 \cdot 10^{-6}$ / bp (median 2.7). The mutation frequencies of 3 independent mitochondrial DNA solutions isolated from the same organ powder were on average $11.5 \pm 8.6 \cdot 10^{-6}$ / bp (median 8.0) and thus were about 3 times higher. A comparison between the mutation frequencies of the male and female animals resulted in mitochondrial mutation frequencies between $1.6-34.4 \cdot 10^{-6}$ / bp (male) and $3.0-12.9 \cdot 10^{-6}$ / bp (female). There was no statistical difference between male and female animals (Mann-Whitney test, $p < 0.05$).

To test whether the mutation rates determined by the mitochondrial *Random Mutation Capture Assay* and a phenotype-selective mutation test indicate a mutagenic potential to the same

Summary

extent, the phenotype-selective hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase test for normal renal epithelial cells of the rat (NRK cell line) was developed. After a 24 h incubation with 0.1 μM 4-nitroquinoline-1-oxide, a known adduct former, the mutation frequency in the exon of the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene increased by a factor of 5 compared to the solvent control. Using the developed *Random Mutation Capture Assay*, a threefold increase in the mutation frequency in the mitochondrial Cytochrome b gene was detected in the DNA isolated at the time of selection. Thus, both tests showed an increase in the mutation frequency of the same order of magnitude, with the phenotype-selective mutation test being more sensitive.

After the mutation PCR was applied for about 1.5 years, the frequency of the detected smear bands (3.5% to 12.7%) as well as that of the DNA hang up (0.5% to a maximum of 95.0%) increased regardless of the template concentration used. In 7 mutation PCRs, which were performed after these phenomena only with blank values, the proportion of detected DNA smear bands per mutation PCR was between 25.0% and 38.8%, that of the DNA hang up between 17.5% and 48.8%. This was more often than in reactions with template -an indication that the presence of template displaced side reactions to a certain extent and that the non-specific amplification was due to the master mix of the mutation PCR. Changing chemical or physical parameters within the PCR reaction did not result in a reduction of the by-products. Thus, the *Random Mutation Capture Assay* developed for the mitochondrial cytochrome b gene was not robust to side reactions and is therefore not suitable for routine use.

In summary, it was possible to develop the primers and the molecular tools of *Random Mutation Capture Assay* with all three selected target sequences of the rat genome. The experiments showed that the copy number PCR of the target sequence in 18S ribosomal RNA-encoding DNA was impractical and determination of the mutation frequencies for the tumor suppressor protein 53-encoding gene p53 was only possible with limited organ selection. For the target sequence of the mitochondrial cytochrome b gene, the *Random Mutation Capture Assay* was feasible. However, the mutation PCR proved unstable. Consequently, determination of mutation frequencies with the *Random Mutation Capture Assay* in *Rattus norvegicus* is very limited.

6 Material und Methoden

6.1 Geräte

Adapter UVette®	<i>Light center heighter</i> 15/8,5 mm (4099101.003, Eppendorf AG, Hamburg)
Analysenwaage	Mettler Analytical balance AE 240 Dual Range Balance (Mettler Waagen GmbH, Gießen)
Biofreezer	Typ 6483 (GFL – Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel)
Brutschrank	Binder CB 150 # 02-32183 (Binder, Tuttlingen) HERAcell 240i CO ₂ -Inkubator (Thermo Scientific, Langenselbold)
Casy® Cell Counter	Modell DT (innovatis AG, Reutlingen)
Dokumentationsgerät für Platten	Molecular Imager®, ChemiDoc™ XRS+(BIO-RAD Laboratories GmbH, München)
Feinwaage	AT21 Comparator (Mettler-Toledo GmbH, Gießen)
Hybridisierungs-ofen	PerfectBlot (PeQLab Biotechnologies GmbH, Erlangen)
Inverses Phasenkontrastmikroskop	Axio Observer.D1 (Carl Zeiss GmbH, Göttingen) Nikon Eclipse TS100 10x/0,25 Ph1 (Nikon GmbH, Düsseldorf)
Inverses Mikroskop für Durchlicht und Auflichtfluoreszenz	Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss GmbH, Göttingen), Bildbearbeitungssoftware: ZEN 2011 (ZEISS Efficient Navigation) – PRO, Version 1.0.1.0.
Kamera fürs Mikroskop	Digital Sight DS-U3 (Nikon GmbH, Düsseldorf)
Küvetten-Photometer	UVmini-1240 (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg)
Lichtunterlage	Lichtunterlage: Color-Control-5000 (Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen)

Material und Methoden

Mikroskop-Beleuchtungseinrichtung	Am Axio Observer D.1 HBO 100 (Carl Zeiss GmbH, Göttingen) Am Axio Observer Z.1 HXP 120 C (Carl Zeiss GmbH, Göttingen)
Mikrotiterplattenlesegerät	infinite® F2000 (Tecan Austria GmbH, Grödig)
Molekular Imager	Molekular Imager ChemiDoc™ XRS+ Imaging System (Bio-Rad Industries, Berkeley – USA)
Neubauer-Zählkammer	Tiefe 0,1 mm; 0,0025 mm ² (Hartenstein, Würzburg)
pH-Elektrode	SenTix-81, pH 0 - pH 14, 0°C – 100°C, 3 mol KCl (WTW GmbH, Weilheim)
pH-Meter	inoLab pH 720 (WTW GmbH, Weilheim)
Präzisionswaage	SI-2002 (Denver Instrument G, Göttingen)
Rotator-Schüttler	Multi Bio RS-24 (PeQLab Biotechnologies GmbH, Erlangen)
Thermomixer	Thermomixer kompakt (Eppendorf GmbH, Hamburg)
Wasserbad	WNB 10 (Mettler, Schwabach)
Wheaton Dounce Tissue Grinder	1ml, 7ml, 15ml (Milliville NJ, USA)
Vortex	Combi- Spin FVL- 2400N (PeQLab Biotechnologies GmbH, Erlangen)
Zentrifugen	Heraeus MULTIFUGE® 3SR+ (Fisher Scientific GmbH, Schwerte) Heraus Fresco 21 Centrifuge (Thermo Scientific, Langenselbold) ScanSpeed Micro Centrifuge mini (LaboGene ApS, Lyngø) Tischzentrifuge Combi Spin FVL-2400N mit Vortex (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) Cellspin I – Typ 1206-14 (THARMAC GmbH, Waldsolms) EBA 12 (Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen), Radi-us 10 cm.

6.2 Verbrauchsmaterialien

Casy ® Clean	Kapillar- und Systemreiniger (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) Art.-Nr.: 10553900
Casy ® Ton	Isotone Salzlösung (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) Art.-Nr.: 05651808001
Kryogefäß	Cryo_Pure Gefäß, 1,8 ml, weiß, steril, nicht mutagen, nicht zytotoxisch, pyrogenfrei (Sarstedt, Nümbrecht) Art.-Nr.: 72.379
Küvette:	Uvette® 220-1600 nm, RNase-, DNA- und Protein-frei (952010051, Eppendorf AG, Hamburg)
Microtest Plate 96-well:	(82.1581, Sarstedt, Nümbrecht)
Objektträger	Polysine geputzt, gebrauchsfertig und geschliffen 25x75x1,0 mm (Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig), Art.-Nr.: J2800AMNZ Polysine geputzt und gebrauchsfertig 76x26 mm (Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig)
Petrischalen	Cellstar® 35x10 mm , nicht zytotoxisch, steril (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen), Art.-Nr.: 627160 Cellstar® 100x20 mm, nicht zytotoxisch, steril (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen), Art.-Nr.: 664160 Cellstar® 145x20 mm, nicht zytotoxisch, steril (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen), Art.-Nr.: 639160
Reagiergefäße	1,5 ml (Sarstedt, Nümbrecht), Art.-Nr.: 72.690.001 2,0 ml (Sarstedt, Nümbrecht), Art.-Nr.: 27.695.500

Material und Methoden

Sterilfilter	Nalgene® <i>Bottle Top</i> Filter 500 ml, Porengröße 0,2 µm/ 0,45 µm (Nalgene Nunc International, New York) Pyrogenfreie, Sterile-R, 0,20 µm (83.1828.001, Sarstedt, Nümbrecht), Art.- Nr.: 83.1826.001
Zellkulturflaschen	Cellstar 550 ml, 175 cm ² , steril (Greiner Bio- One, Frickenhausen), Art.-Nr.: 660 175 Cellstar 550 ml, 75 cm ² , steril (Greiner Bio- One, Frickenhausen), Art.-Nr.: 658 175
Zentrifugenröhrchen	15 ml mit Deckel (Sarstedt, Nümbrecht) 15 ml mit Deckel (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) Cellstar® Tubes 50 ml mit Deckel (Greiner Bio-One, Frickenhausen), Art.-Nr.: 227261

6.3 Chemikalien

Agarose	for routine use (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) Art. Nr. A9539-500g
BSA	(New England Biolabs, Frankfurt am Main, Germany)
Chloroform:	reinst (#24216, Riedel-de Haën, Sigma Aldrich Chemie GmbH)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Reinheit $\geq 99,9\%$ (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) Art. Nr. 154938
EDTA (2 Na x 2 H ₂ O):	$\geq 99\%$, p.a., ACS (8043.1, Carl Roth GmbH & Co. KG)
Ethanol, absolut:	Reinheit $>99,9\%$ (32205, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) $>99,5\%$, Ph. Eur., reinst (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe); Art.-Nr. 5054.2
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	geeignet für Zellkultur (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) Art. Nr. E6758
Fetales Kälberserum (FKS)	(GIBCO invitrogen, Darmstadt) Art. Nr. 10270-106
Glutamin	200 mM (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) Art. Nr. G7513
Glycerin	Reinheit $\geq 99,5\%$, p.a. wasserfrei (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) Art.-Nr. 3783.1
Kalbsthymus-DNA:	Desoxyribonucleic acid sodium salt, from calf thymus (D1501-100MG, Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
Kaliumchlorid	Reinheit $\geq 99\%$, geeignet für Zellkultur (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) Art. Nr. P5405

Material und Methoden

Kaliumdihydrogenphosphat	Reinheit $\geq 99,0\%$, geeignet für Zellkultur (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) Art. Nr. P5655
Kulturmedium für MATLyLu-Zellen	RPMI-1640 Medium, sterile filtered, Endotoxin tested (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) Art. Nr. R8758
Kulturmedium für NRK-Zellen	Dulbecco's Modified Eagle's Medium – HEPES Modification, sterile filtered, Endotoxin tested (DMEM) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) Art. Nr. D6171
Mehtylenblau Hydrat	Reinheit $\geq 97,0\%$ (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) Art. Nr. 66720
Na-Acetat:	$\geq 98,5\%$, reinst, wasserfrei (# X891.1, Carl Roth GmbH & Co. KG)
NaCl:	Bio Reagent, $\geq 99,5\%$ (Titration), geeignet für die Zellkultur (# 95886, Sigma Aldrich Chemie GmbH)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	geeignet für Zellkultur, Reinheit $\geq 99,5\%$ (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) Art. Nr. S5761
Natriumhydrogenphosphat	geeignet für Zellkultur (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) Art. Nr. S5136
Natronlauge	1 N Maßlösung (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) Art. Nr. K021.1
NEB4-Puffer	(New England Biolabs, Frankfurt am Main, Germany)
Non essential Amino Acids (MEM)	100x (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) Art. Nr. M7145
Nukleasefreies Wasser	A7398 (Applichem, Darmstadt, Germany)

Material und Methoden

Penicillin-Streptomycin	stabilisierte Lösung, geeignet für Zellkultur (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) Art. Nr. P4458
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol:	25:24:1 (A156.2, Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Proteinase-K	Tritirachium album serine, Aktivität 44,4 mAnsonU/mg (# A3830, AppliChem GmbH)
RNase-A	20 µg/µl
Saccharose:	(1.07687.0250, Merck, Darmstadt)
Sodium-Dodecyl-Sulfate	ultra pure, ≥ 99% für Elektrophorese (# 2326.1, Carl Roth GmbH & Co. KG)
SYBR®-Green:	10.000x in DMSO (S-7567, Molecular Probes, Darmstadt)
Taq ^{ql}	R0149 (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Germany)
6-Thioguanine	minimum 98% (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) Art. Nr. A4882-500MG
Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)	PUFFERAN®, ≥99,9 %, p.a. (# 4855.1, Carl Roth GmbH & Co. KG)
Trypanblau	C.I. 23830 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) Art. Nr. CN76.1
Trypsin	10x Lösung, steril filtriert (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) Art. Nr. T4549

6.4 Puffer und Lösungen

6.4.1 Desoxydinukleosidtriphosphat (dNTP)-Mix

Reagenzien: Desoxyadenosintriphosphat (dATP), Desoxythymindintriphosphat (dTTP), Desoxyguanosintriphosphat (dGTP), Desoxycytidintriphosphat (dCTP) jeweils 100 mM

Durchführung: Um eine Endkonzentration von 10 mM je Desoxynukleosidtriphosphat zu erhalten, wurden beispielsweise jeweils 10 µl der Desoxynukleosidtriphosphate mit 60 µl nukleasefreiem Wasser gemischt.

6.4.2 Ethanol (70%ig, v/v)

Reagenzien: 70 ml Ethanol absolut

Durchführung: Der Ethanol wird mit 30 ml nukleasefreiem Wasser gemischt.

6.4.3 Glykogenlösung

Reagenzien: 1,39 mg Glykogen

Durchführung: Das Glykogen wird in 1,39 ml nukleasefreiem Wasser gelöst. Um eine Endkonzentration von 10 µM herzustellen wird 1/100 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt. Die Lösung wird bei -20°C aufbewahrt.

6.4.4 Homogenisierungspuffer

Reagenzien: 93,1 mg EDTA (2 Na x 2 H₂O), 27,4 g Saccharose, 302,8 mg Tris-HCl

Durchführung: Für 250 ml Homogenisierungspuffer werden die Chemikalien in ca. 200 ml destilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und alles mit destilliertem Wasser im Messkolben auf 250 ml aufgefüllt. Der Puffer wird vor der Lagerung im Kühlschrank sterilfiltriert.

6.4.5 Loading Dye für Mutations-PCR

Reagenzien: 0,25 mg Bromphenolblau, 4 g Saccharose, 0,2 ml 0,5M EDTA, 0,05 ml 10% SDS-Lösung

Durchführung: Alle Chemikalien werden gemischt und mit destilliertem Wasser auf 1 ml aufgefüllt (=Loading Dye 1). Anschließend wird dasselbe wiederholt und dabei das Bromphenolblau weggelassen (=Loading Dye 2). Anschließend werden 1 ml Loading Dye 1 mit 140 µl Loading Dye 2 vermischt.

6.4.6 Lysepuffer

Reagenzien: 2,2 g NaCl, 4,7 g EDTA (2 Na x 2 H₂O), 12,5 ml 10%iges SDS, 302,8 mg Tris-HCl

Material und Methoden

Durchführung: Für 250 ml werden die Chemikalien in ca. 200 ml destilliertem Wasser gelöst, der pH auf 8,0 eingestellt und im Messkolben mit destilliertem Wasser auf 250 ml aufgefüllt. Vor der anschließenden Lagerung bei Raumtemperatur wird der Lysepuffer sterilfiltriert. Für die Anwendung bei der DNA-Isolation wird der Puffer auf 55°C erwärmt.

6.4.7 Na-Acetat-Lösung (3M)

Reagenzien: 24,6 g Na-Acetat

Durchführung: Für die Herstellung von 100 ml einer 3M Na-Acetat-Lösung wird das Na-Acetat in ca. 85 ml destilliertem Wasser gelöst, der pH auf 5,2 eingestellt und im Messkolben mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Vor der Lagerung bei Raumtemperatur wird die Lösung autoklaviert.

6.4.8 Na₂EDTA-Lösung (0,5M)

Reagenzien: 46,53 g Ethylendiamin-Tetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat (Na₂EDTA)

Durchführung: Das Na₂EDTA wird in ca. 200 ml destilliertem Wasser gelöst, auf pH 8,0 eingestellt und im Messkolben mit destilliertem Wasser auf 250 ml aufgefüllt. Vor der Lagerung bei Raumtemperatur wird die Lösung autoklaviert.

6.4.9 Primer-Stammlösung und Primer-Mix

Reagenzien: Primer, nukleasefreies Wasser

Durchführung: Alle Primer wurden in getrocknetem Zustand bestellt. Zu Beginn wurden die Reagiergefäße mit den Primern für 5 min in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Für eine 100 µM Stammlösung wurde die auf dem Produktblatt angegebene Menge nukleasefreies Wasser zupipettiert, 30 s geschüttelt, 5 min bei Raumtemperatur im Thermomixer geschüttelt und anschließend erneut zentrifugiert. Der Vorgang wurde noch zwei weitere Male wiederholt.

Im Primer-Mix wurden sowohl der fw- als auch der rv-Primer so verdünnt, dass je Primer eine Konzentration von 5 µM vorlag. So wurden beispielsweise 10 µl fw-Primer, 10 µl rv-Primer und 180 µl nukleasefreies Wasser miteinander vermischt. Sowohl die Primerstammlösungen als auch die Primer-Mixe wurden aliquotiert und bei -20°C gelagert.

6.4.10 Proteinase-K-Lösung

Reagenzien: Proteinase-K, nukleasefreies Wasser

Durchführung: Je nach Bedarf wird Proteinase-K frisch abgewogen und in nukleasefreiem Wasser gelöst, sodass die Lösung eine Konzentration von 26,4 µg/µl hat.

6.4.11 Natrium-Dodecyl-Sulfate (10%ig)

Reagenzien: 100 g Natrium-Dodecyl-Sulfate

Material und Methoden

Durchführung: Bei 68°C wird das Natrium-Dodecyl-Sulfate in 900 ml destilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert auf 7,2 eingestellt und im Messkolben mit destilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt.

6.4.12 Suspensions-Puffer

Reagenzien: 4,28 g Saccharose, 373 mg KCl, 119 mg HEPES, 27 mg KH_2PO_4

Durchführung: Die Reagenzien werden in 80 ml destilliertem Wasser gelöst

6.4.13 SYBR®-Green-Verdünnungen

Reagenzien: SYBR®-Green, nukleasefreies Wasser, TE-Puffer

SYBR®-Green-Stammlösung: 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ DMSO \triangleq 10.000x

SYBR®-Green V1: 5 μl SYBR®-Green-Stammlösung + 495 μl nukleasefreies Wasser \triangleq 10 $\text{ng}/\mu\text{l}$ \triangleq 100x

SYBR®-Green V2: V1// 100 μl /1000 μl Glycerin/1x TAE-Puffer (1/1-Gemisch) \triangleq 1 $\text{ng}/\mu\text{l}$ \triangleq 10x

SYBR®-Green V3: V1// 100 μl /1000 μl TE-Puffer \triangleq 1 $\text{ng}/\mu\text{l}$ \triangleq 10x // 1000 μl + 9000 μl TE-Puffer \triangleq 0,1 $\text{ng}/\mu\text{l}$ \triangleq 1x

6.4.14 TaqMan®-Sonden-Stammlösung

Die bestellten TM-Sonden wurden in getrocknetem Zustand geliefert. Zu Beginn wurde für 5 min in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Um eine 50 μM Lösung zu generieren, wurde die auf dem Produktblatt für 100 μM angegebene Menge nukleasefreies Wasser verdoppelt und zupipettiert, 30 s geschüttelt, 5 min bei Raumtemperatur im Thermomixer geschüttelt und anschließend erneut zentrifugiert. Der Vorgang wurde noch zwei weitere Male wiederholt.

Im Reaktionsansatz hatte die TM®-Sonde eine Konzentration von 100 nM. Damit die TM-Sonde keinen Gefrier-Auftauzyklen unterliegt, wurden Aliquote mit einer Konzentration von 2500 nM hergestellt und bei -20°C im Gefrierschrank gelagert.

6.4.15 TE-Puffer

Reagenzien: 2,5 ml 1M Tris-HCl-Lösung, 50 μl 0,5M Na_2EDTA -Lösung

Durchführung: Die Reagenzien werden in ca. 200 ml destilliertem Wasser gelöst, auf pH 8,0 eingestellt und im Messkolben mit destilliertem Wasser auf 250 ml aufgefüllt. Vor der Lagerung bei Raumtemperatur wird der Puffer autoklaviert.

6.4.16 Tris-HCl-Lösung (1M)

Reagenzien: 121,14 g Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)

Material und Methoden

Durchführung: Chemikalie in ca. 800 ml destilliertem Wasser lösen und mit HCl auf pH 8,0 einstellen. Danach im Messkolben auf 1 l auffüllen, autoklavieren und bei Raumtemperatur lagern.

6.4.17 Zellkulturlösungen

Phosphatpuffer (PBS)

Reagenzien: 80 g NaCl, 2,0 g KCl, 11,5 g Na₂HPO₄ (wasserfrei), 2,0 g KH₂PO₄

Durchführung: Alle genannten Reagenzien werden unter Rühren in 1l destilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert auf pH 7,4 eingestellt (=10x PBS). Diese Lösung wird bis auf weiteres in einer Schottflasche im Kühlschrank gelagert.

Für die Anwendung in der Zellkultur wird eine 1/10-Verdünnung hergestellt. Dazu werden (v:v) 1 Teil PBS und 9 Teile destilliertes Wasser gemischt und der pH auf 7,4 eingestellt. Nach Portionierung in ca. 20 ml Aliquote, werden diese aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Vor der Verwendung wird die Lösung bei 37°C im Wasserbad aufgetaut.

Trypsin-Lösung

Reagenzien: 200 mg Ethylendiamin-Tetraessigsäure, 900 ml 1x PBS, 10x Trypsin-Lösung

Durchführung: 200 mg Ethylendiamin-Tetraessigsäure werden in 900 ml 1x PBS gelöst und auf pH 7,4 eingestellt. Diese Lösung wird autoklaviert. Danach erfolgt die Zugabe von 100 ml 10x Trypsin-Lösung unter der sterilen Werkbank. Nach Mischen dieser Lösung, wird das Ganze portioniert und bei -20°C gelagert.

Trypanblau-Lösung

Reagenzien: 0,25 g Trypanblau, 0,45 g NaCl

Durchführung: Die Reagenzien werden zusammen in 50 ml destilliertem Wasser gelöst. Es entsteht eine 5,7 mM Trypanblau-Lösung. Bei der Herstellung und dem Umgang mit dieser Lösung sollten Handschuhe getragen werden.

Selektionsmedium (6-Thioguanin-haltiges Medium):

Reagenzien: 6-Thioguanin, 1M NaOH

Durchführung: 6 Thioguanin in 1M NaOH zu einer Konzentration von 20 mg/ml lösen.

Zu 100 ml Passagemedium wird so viel 6-Thioguanin-Stammlösung zupipettiert, dass die Endkonzentration 7 µg/ml Medium beträgt. Danach wird das Selektionsmedium sterilfiltriert. Das Medium ist immer frisch herzustellen.

Material und Methoden

NaCl-Lösung 0,9%ig (m:v)

Reagenzien: 4,5 g NaCl

Durchführung: Das NaCl in 500 ml destilliertem Wasser lösen. Vor Gebrauch immer frisch herstellen.

Methylenblau-Lösung 0,5% (m:v)

Reagenzien: 5 g Methylenblau, 100% Methanol

Durchführung: Das Methylenblau wird in eine dunkle Schottflasche gegeben und mit 1l 100%igem Methanol aufgefüllt und gelöst.

Carnoy-Reagenz

Reagenzien: Methanol, Eisessig

Durchführung: 3 Teile Methanol werden mit einem Teil Eisessig gemischt. Pro Coplin-Becher werden 50 ml Carnoy-Reagenz hergestellt. Vor Verwendung wird das Reagenz bei -20°C gelagert. Die Lösung wird 24h vor Gebrauch stets frisch hergestellt.

Antifade-Lösung

Reagenzien: 100 mg p-Phenylendiamin-Dihydrochlorid, 10 ml PBS, 0,5 M NaHCO₃-Lösung, Glycerin

Durchführung: p-Phenylendiamin-Dihydrochlorid wird in PBS gelöst und mit NaHCO₃ auf pH 8,0 eingestellt. Diese Lösung danach mit Glycerin zu 100 ml auffüllen. Nach Sterilfiltration wird die Antifade-Lösung dunkel und bei -20°C gelagert.

DAPI-Lösung

Reagenzien: 1 mg DAPI

Durchführung: Das DAPI wird in 1 ml destilliertem Wasser gelöst.

DAPI-Antifade

Reagenzien: 10 µl DAPI-Lösung, 10 ml Antifade-Lösung

Durchführung: Die DAPI-Lösung und die Antifade-Lösung werden gemischt, sodass eine Konzentration von 1 µg/ml entsteht. Diese Lösung wird nach dem Aliquotieren dunkel bei -20°C gelagert. Vor Verwendung auf Raumtemperatur temperieren.

Material und Methoden

Sodium-Dodecyl-Sulfat (10%)

Reagenzien: 100 g Sodium-Dodecyl-Sulfat

Durchführung: Das Sodium-Dodecyl-Sulfat wird bei 68°C in 900 ml destilliertem Wasser gelöst. Nachdem der pH auf 7,2 eingestellt wurde, wird mit destilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt.

0,5M Na₂EDTA

Reagenzien: 46,53 g Ethylendiamin-Tetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat (Na₂EDTA)

Durchführung: Na₂EDTA in 200 ml destilliertem Wasser lösen und auf pH 8,0 einstellen. Danach im Messkolben mit destilliertem Wasser auf 250 ml auffüllen und autoklavieren. Die Lösung wird bei Raumtemperatur gelagert.

6.5 Methoden

6.5.0 Sequenzrecherche

Mit Hilfe der frei zugänglichen Datenbanken des *Ensembl Genome Browsers* (<http://www.ensembl.org/index.html>) und des *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) wurden die Zielsequenzen gesucht. Um die Sequenz hinsichtlich der vorhandenen Schnittstellen, der Länge und der Anzahl der resultierenden DNA-Fragmente als auch der Anzahl und Positionen der *TaqI*-Schnittstellen zu analysieren. Anschließend wurde mit *ApE- A plasmid Editor* (frei downloadbar unter <http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>, Stand 15.10.2015) *in silico* ein Restriktionsverdau durchgeführt.

6.5.1 Entwicklung der molekularbiologischen Werkzeuge

Nach dem *in silico* Restriktionsverdau wurden die erhaltenen Genfragmente mit einer *TaqI*-Schnittstelle hinsichtlich ihrer Eignung für die Entwicklung der innerhalb des den RMCA notwendigen molekularbiologischen Werkzeuge geprüft.

Primer zur Entwicklung der molekularbiologischen Werkzeuge wurden mit Hilfe des Programms „Primer3Plus“ (frei zugänglich unter <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>, Tabelle 18) erstellt und mit Hilfe der Programme „PCR Primer STATS XHTML 1.0“ (frei downloadbar unter http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html), „Primer Express® 3.0“ (Applied Biosystems™) und Oligo Analyzer 3.1 (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>, Stand September 2015) auf mögliche Sekundärstrukturen untersucht. Zudem wurden die Primer mit Hilfe des frei zugänglichen Programmes Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, Stand 18.04.2016) auf ihr Potential Nebenprodukte zu bilden getestet.

a) Sonden-Primer zur Herstellung der Biotin-markierten DNA-Sonde zur Anreicherung der Zielsequenz

Die biotinylierte DNA-Sonde wurde für den Einsatz im RMCA mit nDNA entwickelt. Sie dient dazu mit Hilfe von Streptavidin-gekoppelten magnetischen Beads nach dem Restriktionsverdau spezifisch die zu untersuchende Zielsequenz, welche mindestens eine *TaqI*-Schnittstelle enthält, von dem restlichen Genom zu separieren. Somit wird nicht nur die Gesamtanzahl der *TaqI*-Schnittstellen reduziert und die Effizienz des *TaqI*-Verdaus gesteigert, sondern gleichzeitig die mögliche Bindung von Primern an andere Sequenzen im Genom ausgeschlossen.

Die Biotin-markierte DNA-Sonde sollte

- zur Mutationserfassung mindestens eine *TaqI*-Schnittstelle enthalten,

Material und Methoden

- für eine erleichterte Positionierung der Kopiezahl- und Mutanten-Primer eine Länge von 800-1000 bp aufweisen,
- für die Hybridisierung an die nDNA einen 3'- oder 5'-Überhang haben,
- und mit dUTP anstelle von dTTP hergestellt sein, damit diese enzymatisch mit der UDG nach der Anreicherung und dem *TaqI*-Verdau enzymatisch entfernbar und somit nicht fälschlicherweise miterfasst wird.

b) Kopiezahl-Primer und TaqMan®-Sonde zur Erfassung der Gesamtkopiezahl

Die Gesamtkopiezahl erfasst sowohl die in der *TaqI*-Schnittstelle mutierten, als auch die nicht-mutierten Kopien und wurde mittels *TaqMan*®-Sonden-basierter Real-Time-PCR bestimmt. Das Kopiezahl-Produkt sollte

- demnach neben der *TaqI*-Schnittstelle positioniert sein, um alle Kopien zu erfassen.
- für eine Amplifizierung mittels Realtime-PCR eine Länge von mindestens 150 bp aufweise (Dorak, 2006). Gleichzeitig ermöglicht diese Länge eine Sequenzierung nach Sanger und somit eine Verifizierung des Kopiezahl-Produktes.

c) Mutations-Primer zur Erfassung der mutierten Kopien

Mit den Mutations-Primern, welche beidseits der Erkennungssequenz positioniert sind, wurde nach dem Restriktions-Verdau mit *TaqI* eine PCR-Reaktion durchgeführt. Durch die Lage der Mutations-Primer werden mutierte Kopien amplifiziert und nicht-mutierte (\triangle geschnittene) Kopien nicht vervielfältigt. Eine Verifizierung der Mutanten ist essentiell für die Berechnung der MF und wurde über mehrere Stufen gewährleistet:

- *Die Bestätigung im Agarose-Gel:* Um falsch positive Reaktionen auszuschließen, wurde vor der Agarose-Gelelektrophorese ein erneuter *TaqI*-Verdau durchgeführt. Geschnittene und somit nicht-mutierte PCR-Produkte sollten im Gel daher deutlich erkennbar und vor allem von der Mutante unterscheidbar sein. Im Optimalfall sollten deshalb die Schnittprodukte der Nicht-Mutante sich mindestens um 50 bp Länge von der Mutante unterscheiden. Zudem muss das Schnittprodukt zur Detektion im Gel mindestens 50 bp lang sein. Deshalb ist es notwendig, dass die *TaqI*-Schnittstelle mindestens 50 bp innerhalb der Sequenz positioniert ist.
- *Die Bestätigung durch Sequenzierung:* Das Amplifikat sollte mindestens 150 bp lang sein um eine Sequenzierung nach Sanger und somit eine Verifizierung der Mutante zu ermöglichen.

d) Modifiziertes Mutationsprodukt zur Verwendung als Positivkontrolle

Der Standard sollte in der *TaqI*-Erkennungssequenz mutiert sein und die gleiche Länge wie das Mutationsprodukt aufweisen. Um Verunreinigungen mit diesem künstlich mutierten

Material und Methoden

Standard und somit falsch positiven Ergebnissen vorzubeugen, sollte die Sequenz des Standards zudem eine zusätzliche Erkennungssequenz für ein anderes Restriktionsenzym haben.

Die Herstellung des mutierten Standards erfolgte mittels Overlap Extension PCR (Widada et al., 2001b; Ho et al., 1989). Daher wurden zunächst die Primerpaare zur Generierung der zwei Linkerstücke entwickelt. Diese sollten keine bzw. wenig Sekundärstrukturen aufweisen. Weiterhin sollte die Linkersequenz, d.h. der nicht zur DNA komplementäre Teil des Linkerprimers, die gleichen Basenverhältnisse wie die Originalsequenz haben.

Tabelle 18: Einstellungen in den „general Settings“ des Programmes Primer3Plus.

	Bereich	Optimum
Länge (bp)	18-25	20
Schmelztemperatur T _m (°C)	57-63	60
Differenz T _m zwischen fw und rv-Primer (°C)	≤0,9	
GC-Gehalt (%)	45-80	

Material und Methoden

6.5.2 Verwendete Primer

TP53-Gen

Tabelle 19 Sequenz und Eigenschaften (nach https://www.sigmaaldrich.com/configurator/servlet/DesignTool#Calcs_0) der forward (F) – und reverse (R)-Primer, sowie der TaqMan®-(T)-Sonden im Intron 1 und Exon 2 innerhalb des Gen-Fragmentes 4 des TP53-Gens, welches aus dem Restriktionsverdau der nukleären DNA mit *PvuII* und *EcoRI* entstand. Die Position der Primer (P1-P8) ist in Abbildung 3 dargestellt. T_m, Schmelztemperatur; HP, *hairpin*; SD, *self dimer*; CD, *cross dimer*.

P	Sequenz (5'→3')	Länge (bp)	T _m (°C)	GC (%)	Amplifikation-Länge (bp)	Sekundärstruktur		
						HP	SD	CD
F P1	gctggctgtgactgaat	20	63,6	55,0	969	✓	✓	✓
R P2	gtc							
R P2	gatcagaggcaccca	20	63,5	55,0		x	✓	
F P3	atagc							
F P3	tggccataagcttcggt	21	67,0	52,4		x	✓	
R P4	ctct							
R P4	tgtgtactgtatggatgc	28	65,6	39,3	135	✓	✓	✓
T T	atagttgtc							
T T	tctgacttgctcatttcat	28	74,9	50,0		x	x	
F P7	ctcccctgcc							
F P7	accttgccataagctt	19	64,0	52,7	278	x	✓	x
R P8	cg							
R P8	tgggggatagcacctc	18	63,8	61,2		x	x	
F P5	ag							
F P5	gtggtccagaagccg	20	63,5	55,0	239	x	x	✓
R P6	atag							
R P6	gaagcttatggccaag	20	62,9	50,0		✓	✓	
	gtgt							

Material und Methoden

18S rDNA

Tabelle 20 Sequenz und Eigenschaften (nach https://www.sigmaaldrich.com/configurator/servlet/DesignTool#Calcs_0) der forward (F) – und reverse (R)-Primer, sowie der TaqMan®-(T)-Sonden in der für die 18S rRNA kodierenden DNA. Die Position der Primer (P) a-g ist in Abbildung 9 **Fehler! erweisquelle konnte nicht gefunden werden.** dargestellt. Tm, Schmelztemperatur; HP, *hairpin*; SD, *self dimer*; CD, *cross dimer*.

P	Sequenz (5'→3')	Länge (bp)	Tm (°C)	GC (%)	Amplifikation-Länge (bp)	Sekundärstruktur		
						HP	SD	CD
F a	aaagctcgtagttggat	22	63,3	45,4	926	✓	x	
	cttgg							
R b	aatgggggtcaacggg	19	63,9	47,3		x	✓	✓
	tta							
F c	taccgctcgtagttccga	21	65,4	52,4		✓	✓	
R d	ttcctttaagttcagcttt	24	64,7	33,4	140	x	✓	✓
T e	actggcgatgcggcgg	17	75,6	76,5		x	x	
F f	gccgctagaggtgaa	21	63,4	47,7	348	✓	✓	x
	attctt							
R g	acacggacaggattg	21	63,4	47,7		x	x	
	acagat							

Material und Methoden

mt-Cytb-Gen

Tabelle 21 Sequenz und Eigenschaften (nach https://www.sigmaaldrich.com/configurator/servlet/DesignTool#Calcs_0) der forward (F) – und reverse (R)-Primer, sowie der TaqMan®-(T)-Sonden in dem mitochondrialen Cytb-Gen. Die Position der Primer (P) h-l ist in Abbildung 11 dargestellt. T_m, Schmelztemperatur; HP, *hairpin*; SD, *self dimer*; CD, *cross dimer*.

P	Sequenz (5'→3')	Länge (bp)	T _m (°C)	GC (%)	Amplifikation-Länge (bp)	Sekundärstruktur		
						HP	SD	CD
F h	ctcagtagacaaagca accctaacac	26	64,9	46,2		✓	x	
R i	Kopie- zahl gattttgtctgcgctcgga gttt	22	66,3	45,5	151	x	x	✓
T j	ttcttcgcattccactca tctccca	27	75,9	48,2		x	x	
F k	Mutant tccatgtgggacgagg actata	22	65,4	50		x	✓	
R l	gcgtgtagggtgcttt g	19	63,2	52,7	245	x	x	✓

Bei den im Kapitel 3.7 eingesetzten nDNA-Primern zur Untersuchung der unspezifischen Nebenprodukte und Verunreinigungen im Blindwert handelte es sich um:

Mutantenzahl-Primer: HPRT_I6_Mut2_fw: 5'-GAATTGCTCACAGACGCAGA-3'

HPRT_I6_Mut3_rev: 5'-GACCTGAGCTTTCCTCTATACAAA-3'

6.5.3 DNA-Isolierung aus Gewebe und Zellen

In dieser Arbeit wurde Gewebe von vier männlichem (175-199 g) und vier weiblichen (125-149 g) Ratten des Inzucht-Stammes F344/NCrHsd (Harlan Laboratories GmbH, Eystrup, Germany) verwendet. Um sich zu akklimatisieren wurden die 9 Wochen alten Tiere noch eine zusätzliche Woche in ihren Käfigen gehalten bevor sie anschließend mit CO₂ getötet wurden. Die Leber, der Dickdarm, der Dünndarm, die Niere, die Milz, die Harnblase, die Lunge, das Herz, das Gehirn, das Knochenmark sowie je nach Geschlecht der Tiere die Hoden, der Uterus und Ovarien wurden entnommen, gewogen, sofort in flüssigem Stickstoff gefroren und für die spätere Untersuchung bei -80°C aufbewahrt.

Im Zuge der Organentnahme wurde die Leber in ihre Leberlappen aufgeteilt, wobei der lobus lateralis sinister nochmals geteilt wurde (Leberlappen 5 und 6, Anhang Abbildung 41). Auch der Dünndarm wurde in Duodenum, Jejunum und Ileum aufgeteilt, ebenso die Niere (linke und rechte), die Hoden (linker und rechter) und die Ovarien (linke und rechte).

Das Knochenmark wurde aus den Oberschenkelknochen entnommen, indem diese mit je 2 ml FKS durchgespült wurden.

6.5.3.1 DNAzol®

Reagenzien: DNAzol®, 75% (v/v) Ethanol, TE-Puffer (1M Tris-HCL, 0,5M Na₂EDTA)

Durchführung: Homogenisiertes Gewebe wurde in ein 2 ml Reagiergefäß überführt, 1 ml DNAzol® (Guanidin-Detergenz-Lyselösung) mit einer Transferpipette zugegeben und beides mit ebendieser durchmischt. Das Homogenat wurde anschließend für 10 min bei 4°C (10.000 x g) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 2 ml Reagiergefäß überführt, das Pellet (u.a. RNA, überschüssige Polysaccharide) wurde verworfen. Nach Zugabe von 500 µl 100%igen Ethanol wurde das Reagiergefäß leicht geschwänkt und anschließend 1-3 min bei Raumtemperatur stehen gelassen (Inkubationszeit). Die präzipitierte Gesamt (g)-DNA wurde mit einer an der Spitze gebogenen Pasteurpipette „rausgehäkelt“ und in ein neues 1,5 ml Reagiergefäß überführt. Zum Waschen wurde 1 ml 70%iger Ethanol zupipettiert, kurz geschwenkt, das Gefäß 1 min stehen gelassen und der Ethanol mit Hilfe einer Kanüle wieder abgesaugt. Dieser Waschprozess wurde 1-mal wiederholt. Nach einem 1 minütigen Trocknungsschritt an der Raumluft (offen und staubgeschützt), wurde die DNA in so wenig TE-Puffer wie möglich gelöst, mindestens jedoch in 10 µl.

Bei zu geringer DNA-Menge (<15 µg) wurden die Reagiergefäße nach dem Fällungsschritt für 1-2 min bei 4°C (4.000 x g) zentrifugiert um ein DNA-Pellet zu erhalten.

Um eventuell vorhandene DNAsen zu denaturieren, wurde die Probe anschließend 10 min bei 65°C (850 rpm) im Thermomixer geschüttelt.

6.5.3.2 *peqGOLD Tissue DNA Mini Kit*

Reagenzien: peqGOLD Tissue DNA Mini Kit, 100% Ethanol, TE-Puffer

Durchführung: Homogenisiertes Gewebe (max. 40 mg) wurde in ein 1,5 ml reagiergefäß gegeben und mit 400 µl *Lysis Buffer T*, 20 µl Proteinase K-Lösung (26 mg/ml) und 15 µl RNase A-Lösung (20 mg/ml) versetzt. Anschließend wurde für 10 s geschüttelt. Nach einer 1-3 h Lyse (bis Probe klar ist) im Thermomixer bei 50°C (800 rpm), wurde die Probe für 30 s bei 10.000 x g zentrifugiert (unlöslichen Debris pelletieren) und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reagiergefäß überführt.

Zur Überstandslösung wurden 200 µl *DNA Binding Buffer* zupipettiert (je 400 µl *Lysis Buffer T* kommen 200 µl *DNA Binding Buffer*) und beides gemischt bis keine Schlieren mehr sichtbar waren. Danach wurde die Lösung in die *PerfectBind DNA Column* pipettiert, welche zuvor auf ein *Collection Tube* gesteckt wurde. Nach einem 2-minütigem Zentrifugationsschritt (10.000 x g) wurde der Durchfluss verworfen und die Säule mit 650 µl *DNA Wash Buffer* versetzt. Anschließend folgte eine Zentrifugation für 1 min bei 10.000 x g. Der Durchfluss wurde verworfen und der Waschschrift 1x wiederholt. Zum Trocknen der Säule bzw. der DNA wurde anschließend 2 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Für die Elution wurde die *PerfectBind DNA Column* in ein neues autoklaviertes 1,5 ml Reagiergefäß gesteckt und 120 µl *Elution Buffer* in die Säule gegeben. Nach 3-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde 1 min bei 6.000 x g zentrifugiert und die Säule verworfen.

6.5.3.3 *DNA-Isolierung nach Vermulst et al. (2008) zur Trennung von nDNA und mtDNA*

Reagenzien: Chloroform, Ethanol (70% (v/v) und 100%), Glykogen-Lösung (10 µM), Homogenisierungspuffer (0,32M Saccharose, 10mM Tris-HCl, 1mM Na₂EDTA), Lysepuffer (0,15M NaCl, 10 mM Tris-HCl, 0,05M Na₂EDTA, 0,5% SDS) , Na-Acetat (3M), Phenyl-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (v/v: 25/24/1), Proteinase-K-Lösung (26,4 mg/ml), RNase-A-Lösung (20 mg/ml), TE-Puffer (1M Tris-HCl, 0,5M Na₂EDTA)

Durchführung: Die DNA-Isolierung erfolgte in Anlehnung an Vermulst et al.(2008).

a) Homogenisierung und Organell-Trennung

Gewebe: Das bei -80°C gelagerte und tiefgefrorene Gewebe wurde mit Hilfe eines speziell angefertigten rostfreien Edelstahlzylinders in flüssigem Stickstoff pulverisiert. Pro 1 g Gewebepulver wurden 4 ml Homogenisierungspuffer zugegeben.

Zellpellet: Das Zellpellet wurde mit 1 ml Homogenisierungspuffer versetzt.

Der anschließende Zellaufschluss wurde in einem *Wheaton Dounce Tissue Grinder* (zuvor mit UV-Licht bestrahlt und mit eiskaltem Homogenisierungspuffer gespült) auf Eis durchgeführt:

Material und Methoden

10 Stöße mit dem *loose*-Stösel, 2 min auf Eis stehen lassen (quellen), 10 Stöße mit dem *tight*-Stösel. Anschließend wurde das Homogenisat durch vorsichtiges Schütten in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt, mit so wenig wie möglich Homogenisierungspuffer nachgespült und 10 min bei 1000 g (4°C) zentrifugiert. Das Pellet enthält die Zellkerne und wurde direkt mit Proteinase-K lysiert. Der Überstand –welcher die Mitochondrien enthält- wurde in ein 2 ml Reagiergefäß überführt und bei 13.000 x g (4°C) für 5 min zentrifugiert: Das entstandene Mitochondrien-Pellet wurde mit 750 µl Homogenisierungspuffer aufgeschlämmt, erneut zentrifugiert (13.000 x g, 4°C, 10 min) und der Überstand verworfen.

b) Lyse

Zellkernpellet Gewebe: Es wurden 61-111 µl Proteinase-K-Lösung und 2 ml Lysepuffer zugegeben.

Zellkernpellet Zellen: Pro 1 Million Zellen wurden 50 µl Lyse-Puffer und 2 µl Proteinase-K-Lösung zugegeben.

Mitochondrienpellet Gewebe oder Zellen: Das Mitochondrien-Pellet wurde mit 650 µl Lyse-Puffer und 10-30 µl Proteinase-K-Lösung versetzt.

Danach wurden die Lyse-Lösungen für mindestens 2 h bei 55°C in den Hybridisierungsöfen gegeben (Rotation Stufe 2). Die Lyse wurde als vollständig angesehen, sobald das Lysat klar war. Falls nach 2 h noch eine Trübung bestand, wurden erneut 50 µl (nDNA) bzw. 10 µl (mtDNA) Proteinase-K-Lösung zugegeben.

Nach der Lyse wurden alle DNA-Fractionen gleich behandelt.

c) RNase-A-Verdau

Durch eine 15 min Inkubation im Wasserbad oder Hybridisierungsöfen bei 65°C wurde zunächst die Proteinase-K inaktiviert. Um anschließend die RNA zu degradieren, wurde 1 µl der RNase-Lösung zugegeben und 1 h bei 37°C im Hybridisierungsöfen inkubiert (Rotation Stufe 2).

d) Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion und Chloroform-Extraktion

Die Proteine wurden mit einem Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch ausgefällt. Dazu wurde zunächst zum Lysat das gleiche Volumen an Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch pipettiert, 30 s stark geschüttelt und anschließend für 2 min (4°C) bei 13.000 x g (mitochondriale DNA) oder 1000 x g (nukleäre DNA) zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt (mtDNA: 2 ml; nDNA: 15 ml) und der Vorgang ein weiteres Mal wiederholt. Dabei wurde die untere organische Phase jeweils verworfen. Anschließend wurden die Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Reste mit Chloroform ausgeschüttelt um Reste

Material und Methoden

des Phenols zu entfernen. Dazu wurde den Proben das gleiche Volumen an Chloroform zupipettiert, 30 s geschüttelt, erneut zentrifugiert (2 min, 4°C, 1000 x g für nDNA bzw 13.000 x g für mtDNA) und die obere wässrige Phase abgenommen. Die untere Phase wurde verworfen.

e) Ausfällen und Resuspendieren der DNA

Dem Überstand wurde Na-Acetat-Lösung im Verhältnis von 1/20 (Na-Acetat/Probe) und 2 µl Glykogen-Lösung zupipettiert und alles kurz geschwenkt. Daraufhin wurde das 2,5-fache Probevolumen an 100%igem Ethanol zupipettiert, vorsichtig geschwenkt bis eine klare Lösung entstand. Bei genügend hoher DNA-Konzentration fällt sichtbare DNA aus, die mit Hilfe einer heißsterilisierten Pasteurpipette aus der Lösung herausgefischt, in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt und mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen wurde. Die restliche Lösung bzw. eine Lösung, in der keine sichtbare DNA ausfiel, wurde über Nacht im Kühlschrank (4°C) gelagert. Am nächsten Morgen wurden die Präzipitate bei 1000 x g (4°C) für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet ebenfalls mit 70%igem Ethanol gewaschen. D.h. die Gefäße, welche DNA und Ethanol enthielten wurden vorsichtig geschwenkt und 30 min im Kühlschrank (4°C) gelagert. Nach kurzem zentrifugieren bei 1000 x g (4°C) für 5 min wurde der Ethanol abpipettiert, das Pellet an der Luft staub- und UV-geschützt getrocknet und in TE-Puffer resuspendiert (mind. 10 µl). Zum Inaktivieren eventuell vorhandener DNase sowie einem schnelleren Lösen wurde die DNA-Suspension für 10 min bei 65°C und 850 rpm im Thermocycler geschüttelt. Anschließend wurden die Lösungen bis zum vollständigen Lösen bei Raumtemperatur in den Rotator-Mixer gestellt. Falls kein vollständiger Löseprozess eintrat, wurde erneut TE-Puffer zugegeben.

6.5.3.4 Vermulst et al. (2008) & Borralho et al. (2015) für reine nDNA und mtDNA

Für eine optimale Trennung der Organellen und somit den Erhalt von reinen nDNA- und mtDNA-lösungen wurde die schon beschriebene Methode nach Vermulst et al. (2008, [Kapitel 6.5.3.3](#)) um zusätzliche Zentrifugationsschritte (Borralho et al., 2015) erweitert.

Reagenzien: siehe [Kapitel 6.5.3.3](#), Suspensionspuffer

Durchführung: Die Homogenisierung des Gewebepulvers oder der Zellen war identisch zu Kapitel 6.5.3.3. Das erhaltene Homogenat wurde anschließend bei 600 x g (4°C) für 10 min zentrifugiert, der Überstand (Mitochondrien) mit Hilfe einer Transferpipette in ein neues Reagiergefäß überführt und nun bei 1000 x g (4°C) für 10 min zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde in ein 2 ml Reagiergefäß pipettiert. Die entstandenen Pellets (Zellkerne) beider Zentrifugationsschritte wurden lysiert.

Der Überstand mit den Mitochondrien wurde nochmals aufgereinigt, indem für 10 min (4°C) bei 7700 x g zentrifugiert wurde. Das erhaltene Mitochondrien-Pellet wurde mit 80 µl

Material und Methoden

Homogenisierungspuffer versetzt, aufgeschlämmt und unter gleichen Bedingungen nochmals zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 600 µl Homogenisierungspuffer resuspendiert und bei 7700 x g (4°C) für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Waschschrift 1x wiederholt. Das resultierende Pellet wurde in 40 µl Suspensionspuffer resuspendiert. Anschließend erfolgte die Lyse.

Die Lyse der Mitochondrien- und Zellkern-Pellets, sowie die Waschschrift und Resuspension waren identisch zu dem in Kapitel 6.5.3.3 beschriebenen Vorgehen.

6.5.3.5 Vermulst et al. (2008) zur Isolierung der Gesamt-DNA

Im Rahmen der Arbeit wurde Gesamt-DNA mit Verwendung einer leicht modifizierten DNA-Isolierungs-Methode nach Vermulst et al. (2008) erhalten.

Reagenzien: siehe [Kapitel 6.5.3.3](#)

Durchführung: Das in flüssigem Stickstoff pulverisierte Gewebe wurde direkt mit 2 ml Lysepuffer und 70 µl Proteinase K versetzt. Alle nachfolgenden Schritte zur DNA-Isolierung waren identisch mit den in Kapitel 6.5.3.3 beschriebenen.

6.5.4 Quantifizierung der DNA

6.5.4.1 Photometrische Quantifizierung mit dem Tecan Infinite® Plattenlesegerät

Reagenzien: DNA-Lösung, TE-Puffer, Ethanol 70% (v/v)

Durchführung: Für die photometrische Quantifizierung der DNA-Lösung wurde das Tecan Infinite® F200 Plattenlesegerät und die NanoQuant-Platte verwendet. Nach Säuberung der Platte mit Ethanol und Wasser wurde zunächst der Blindwert bestimmt, indem 2 µl TE-Puffer auf das *well* pipettiert und ein Nullabgleich durchgeführt wurde. Nach anschließender Trocknung des *well*s wurden 2 µl Probe darauf pipettiert und die Absorption bei 260 nm, 280 nm und 340 nm gemessen. Die Absorption, die DNA-Konzentration sowie die *ratio* (Verhältnis Absorption_{260 nm}/ Absorption_{280 nm}) der Probe wurden automatisch von der Software i-control™ berechnet.

Absorption

$$\text{Absorption}_{\text{Blindwert}} = \text{Absorption}_{260 \text{ nm}} - \text{Absorption}_{340 \text{ nm}}$$

$$\text{Absorption}_{\text{Probe}} = (\text{Absorption}_{260 \text{ nm}} - \text{Absorption}_{340 \text{ nm}}) - \text{Absorption}_{\text{Blindwert}}$$

DNA-Konzentration

Konzentration DNA (ng/µl) = Absorption_{260 nm} x Verdünnungsfaktor x Wellenlängen-abhängiger Extinktionskoeffizient

Für reine DNA-Lösungen sollte die *ratio* zwischen 1,8 und 1,9 liegen (U. Wollenberger, 2003). Die Bestimmungsgrenze des Gerätes lag bei 100 ng/μl, die Nachweisgrenze bei 1 ng/μl (*NanoQuant Plate™ Quick Guide*, <http://www.tecan.com/platform/apps/product/index.asp?MenuID=2252&ID=4015&Menu=1&Item=21.2.10.7>, Stand 08.10.2015)

6.5.4.2 Photometrische Quantifizierung mit dem Shimadzu Küvettenphotometer

Reagenzien: DNA-Lösung, TE-Puffer

Durchführung: Nach einer Basislinienkorrektur wurde die leere Küvette eingesetzt und die Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Daraufhin wurde der Blindwert (Küvette + TE-Puffer) gefolgt von der DNA-Lösung analysiert. Die DNA-Konzentration und die *ratio* (Kapitel 6.2.2.1) wurden manuell berechnet.

DNA-Konzentration (ng/μl) = Absorption_{260 nm} x 50 ng/μl (Matissek, 2010)

6.5.4.3 Fluorimetrische Quantifizierung

Reagenzien: Kalbsthymus (kt)-DNA, TE-Puffer, SYBR®-Green V3

Durchführung: Die fluorimetrische Quantifizierung der DNA-Lösung wurde mit Hilfe einer externen Kalibriergerade aus kt-DNA unter Verwendung von SYBR®-Green am Tecan Infinite® F200 Plattenlesegerät durchgeführt.

Nach photometrischer Quantifizierung der kt-DNA-Lösung (Kapitel 6.2.2.1) wurde diese Stammlösung mit TE-Puffer auf ca. 10 μg/ml verdünnt und am Shimadzu-Photometer quantifiziert (Kapitel 6.2.2.2). Mit dieser Lösung wurde dann die Kalibriergerade erstellt, die einen Bereich von 0,8-4,8 ng DNA/ml abdeckt. Es wurden 100 μl der zu quantifizierenden DNA-Lösung in ein *well* einer 96-well Platte pipettiert, 100 μl SYBR®-Green V3 mit der Multipette zugegeben und unmittelbar mittels Tecan-Plattenlesegerät (Tabelle 22) die Fluoreszenzintensität bestimmt.

Material und Methoden

Tabelle 22: Messmodus der Fluoreszenzintensität im Rahmen der SYBR®-Green-basierten Quantifizierung von DNA-Lösungen am Tecan-Plattenlesegerät.

Schritt	Einstellung / Zeit
Schütteln	1 mm, linear / 1 min
Warten	4 min
Absorption	485 nm
Emission	535 nm
Gain	64
Anzahl der Blitze	20
Integrationszeit	20 μ s

6.5.4.4 Berechnung der Kopiezahl mittels copy number calculator

Um eine ermittelte DNA-Masse in DNA-Kopien umzurechnen wurde das Programm „Calculator for determining the number of copies of a template“ (<http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>, Stand 01.11.2016) verwendet. Als bekannte Größen wurden die Menge an DNA (ng) sowie die Länge der DNA (bp) vorausgesetzt.

6.5.5 Polymerase-Kettenreaktion

Grundsätzlich wurden alle Polymerase-Kettenreaktionen an der DNA-Workstation pipettiert.

6.5.5.1 Qualitative Polymerase-Kettenreaktion

Nach mindestens 15-minütiger Bestrahlung der Arbeitsfläche mit UV-Licht, wurden zuerst alle Reagiergefäße vorbereitet und dann die Polymerase-Kettenreaktion (Tabelle 23) pipettiert. Dabei wurde immer zuerst ein MM, der alle Bestandteile enthält die für jeden Reaktionsansatz gleich sind, und dann die fehlenden Reagenzien pipettiert. Zudem wurde immer ein Blindwert mitgeführt. Dieser enthält alle Reagenzien außer dem Templat.

Material und Methoden

Tabelle 23: Pipettierschema für eine Reaktion einer qualitativen Polymerase-Kettenreaktion.

Chemikalie	Anfangskonzentration	Endkonzentration	Reaktionsansatz (µl)
Inkubationspuffer	10x	1x	2,5
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	2,5
dNTP-Mix	10 mM	0,2 mM	0,5
Taq-Polymerase	5 U/µl	0,025 U/µl	0,125
Primer-Mix	5 µM	0,4 µM	2,0
Nukleasefreies Wasser	-	-	16,375
Templat	50 ng/µl	2 ng/µl	1,0
Gesamtvolumen			25

Das Temperaturprogramm (Tabelle 24) wurde standardmäßig mit 35 Zyklen verwendet.

Tabelle 24: Temperaturprogramm einer qualitativen Polymerase-Kettenreaktion.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min)	
Deckelheizung an	110	-	
Denaturierung	95	5,0	
Denaturierung	95	0,5	} 35x
<i>Annealing</i>	Primer-spezifisch	0,5	
Elongation	72	1,0	
Elongation	72	5,0	
Deckelheizung aus	-	-	
Kühlung	8	∞	

6.5.5.2 Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion

6.5.5.2.1 Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion zur Bestimmung der Kopiezahl

Die quantitative RT-Polymerase-Kettenreaktion wurde mit TM-Sonden durchgeführt. Alle Arbeitsschritte wurden wie bei einer qualitativen Polymerase-Kettenreaktion ([Kapitel 6.5.5.1](#)) durchgeführt. Zuerst wurde ein MMx pipettiert, danach das zu quantifizierende Templat

Material und Methoden

(Tabelle 25). Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug 20 μl . In eine 96-*well*-Platte wurden pro *well* erst die 5 μl Templat vorgelegt und danach 15 μl Mastermix zupipettiert. Ein Blindwert wurde mitgeföhrt. Danach wurde die Platte mit einem *optical adhesive film* verschlossen, bei 1400 g für 5 min (4°C) zentrifugiert und ein *two step*-Temperaturprogramm verwendet (Tabelle 26).

Tabelle 25: Pipettierschema für eine Reaktion einer quantitativen TaqMan®-Sonden-basierten Realtime Polymerase-Kettenreaktion.

Chemikalie	Anfangskonzentration	Endkonzentration	Reaktionsansatz (μl)
Inkubationspuffer	10x	1x	2,0
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	2,0
dNTP-Mix	10 mM	0,25 mM	0,5
Taq-Polymerase	5 U/ μl	0,025 U/ μl	0,1
Primer-Mix	5 μM	0,5 μM	2,0
Nukleasefreies Wasser	-	-	7,2
Reference Dye	100x	1x	0,2
TaqMan®-Sonde	variabel	variabel	1,0
Templat	variabel	variabel	5,0
Gesamtvolumen			20

Tabelle 26: Temperaturprogramm einer quantitativen *TaqMan*®-Sonden-basierten Realtime Polymerase-Kettenreaktion.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min)
Deckelheizung an	103	-
Denaturierung	95	2,0
Denaturierung	95	0,25
<i>Annealing</i> TaqMan®-Sonden-spezifisch		1,0

} 40

Die Auswertung der Effizienz erfolgte entweder durch eine Kalibriergerade oder mit Hilfe von der Software „LinRegPCR“ (kostenfrei downloadbar unter <http://www.hartfaalcentrum.nl/index.php?main=files&fileName=LinRegPCR.zip&description=>

Material und Methoden

LinRegPCR: %20analysis%20of%20quantitative%20PCR%20data&sub=LinRegPCR, Stand 09.10.2015). Bei der Kalibriergerade wurde die Effizienz über den Anstieg berechnet (Lievens et al., 2012; Pfaffl, 2001). Die prozentuale Angabe bezog sich auf die theoretisch maximale Amplifizierungseffizienz von 2.

$$\text{Effizienz} = 10^{(-1/\text{Anstieg})}$$

$$\text{Effizienz (\%)} = (\text{Effizienz}/2) * 100$$

Das Programm LinRegPCR ermöglichte eine manuelle Auswertung der Effizienz an Hand der exponentiellen Bereiche der Amplifikationskurven.

Die Auswertung der Kopiezahl erfolgte mit Hilfe einer Kalibriergeraden. Wurde keine Kalibriergerade mitgeführt, wurde die Kopiezahl am *threshold cycle* unter der Annahme einer vorliegenden Effizienz von 2 ermittelt (Ruijter et al., 2009).

$$\text{Kopiezahl am Ct-Wert} = \text{Anfangskopiezahl} \times \text{Effizienz}^{\text{Ct-Wert}}$$

6.5.5.2.2 Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion zur Bestimmung der Anzahl an Mutanten

Um zu analysieren, wie viele mtDNA-Kopien in der *TaqI*-Schnittstelle mutiert sind, wurden die PCR in Anlehnung an Poisson pipettiert. Das bedeutet, dass in der Gesamtanzahl an Reaktionen die Kopien so verteilt sind, dass die Wahrscheinlichkeit für 1 Mutanten pro *well* bei x% liegt. Erst wurde ein MM pipettiert, dann das Templat zugegeben (Tabelle 27), alles gemischt und in ein autoklaviertes Reservoir überführt, damit mit einer Oktapipette zügig das gesamte Volumen verteilt werden konnte.

Tabelle 27: Pipettierschema für eine Reaktion einer SYBR®-Green-basierten Realtime Polymerase-Kettenreaktion zur Bestimmung der Mutantenzahl.

Chemikalie	Anfangskonzentration	Endkonzentration	Reaktionsansatz (µl)
Tempase Puffer I	10x	1x	1,0
MgCl ₂	25 mM	1 mM	0,4
dNTP-Mix	10 mM	0,2 mM	0,2
Tempase	5 U/µl	0,05 U/µl	0,1
Primer-Mix	5 µM	0,8 µM	1,6
SYBR®-Green	2x	0,1x	0,5
Nukleasefreies Wasser	-	-	1,2
Templat	variabel	variabel	5,0
Gesamtvolumen			10

Material und Methoden

Tabelle 28: Temperaturprogramm für eine SYBR®-Green-basierten Realtime Polymerase-Kettenreaktion zur Bestimmung der Mutantenzahl.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min)	
Deckelheizung an	103	-	
Denaturierung	95	15,0	
Denaturierung	95	0,5	} 47
<i>Annealing</i>	65	0,5	
Elongation	72	1,0	
Elongation	72	5,0	
Schmelzkurve	95	0,25	
	60	0,25	
	95	0,25	

Nach Beendigung des Temperaturprogrammes und einer ersten optischen Auswertung der Polymerase-Kettenreaktion bezüglich Anzahl der Amplifikationskurven, deren Ct-Werte sowie den dazugehörigen Schmelzkurven, wurde zur späteren gelelektrophoretischen Detektion von falsch positiven Reaktionen ein erneuter *TaqI*-Restriktionsverdau durchgeführt.

6.5.6 *TaqI*-Verdau und *TaqI*-Nachverdau

Der *TaqI*-Verdau erfolgt vor der Kopiezahlbestimmung. Dabei werden durch das Enzym *TaqI* alle Kopien, die nicht in der *TaqI*-Schnittstelle (T/CGA) mutiert sind, geschnitten und somit nicht mehr innerhalb einer Mutations-PCR amplifiziert.

Durchführung

Der Verdau wird in einem 200 µl Ansatz mit insgesamt 500 U *TaqI* pipettiert (Tabelle 29). Diese werden gestaffelt a´100 U über 5 Runden zugegeben, wobei sich eine Runde auf 1 h bei 65°C, 1 min bei 95°C und 1 min bei 50°C beläuft.

Material und Methoden

Tabelle 29 Pipettierschema *TaqI*-Verdau.

Reagenz	Ausgangskonzentration	Endkonzentration	Volumen (μl)
NEB4-Puffer	10x	1x	20
BSA	100x	1x	2
<i>TaqI</i>	100.000 U/ml	500 U/200 μl	5x1/h
mtDNA/ nDNA	variabel	1 μg /120 μg	variabel
H ₂ O nf	-	-	variabel
Endvolumen			200

Nachverdau:

Um eventuell noch vorhandene falsch positive Reaktionen –ausgelöst durch unvollständigen *TaqI*-Verdau der PCR-Produkte mit intakter Schnittstelle- zu eliminieren wird nach der Mutations-PCR zusätzlich ein weiterer *TaqI*-Verdau (\triangle *TaqI*-Nachverdau) durchgeführt. Hierbei wird in jedes *well*, welches eine Amplifikationskurve und eine Schmelzkurve mit produktspezifischer Schmelztemperatur aufweist, erneut *TaqI* zugegeben. Da sich pro *well* bereits 10 μl Volumen befinden und das entstandene PCR-Produkt nicht unnötig stark verdünnt werden soll, werden nur 2 μl für den Verdau zugegeben (Tabelle 30). Anschließend wurde die Platte erneut mit einem *optical adhesive film* verschlossen, die Ansätze durch klopfen der Platte gegen den Tisch geschüttelt und bei 1400 g für 5 min (4°C) zentrifugiert. Danach wurde wie zuvor für 1 h bei 65°C, 1 min bei 95°C und 1 min bei 50 C inkubiert.

Tabelle 30: Pipettierschema für den *TaqI*-Nachverdau bezogen auf ein resultierendes Gesamtvolumen von 12 μl im *well*.

Chemikalie	Anfangskonzentration	Endkonzentration	Reaktionsansatz (μl)
NEB4-Puffer	10x	1x	1,20
BSA	100x	1x	0,12
<i>TaqI</i>	20 U/ μl		0,10
Nukleasefreies Wasser	-	-	0,58
Gesamtvolumen			2,00
Volumen im <i>well</i>			12,00

Im nächsten Schritt wurde eine Agarose-Gelelektrophorese zur Identifikation der mutierten Kopien durchgeführt.

6.5.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde genutzt um Amplifikationsprodukte sichtbar zu machen. Dabei wurde das PCR-Produkt mit SYBR®-Green und Loading-Dye versetzt (Tabelle 31), in die Taschen eines Agarose-Gels pipettiert, mit 1x TAE-Puffer überschichtet und für 1 h eine Spannung von 5 V/cm angelegt. Das Gel wurde anschließend in dem *Molecular Imager* (software: Image Lab 5.0) mit UV-Licht bestrahlt, sodass die Banden sichtbar wurden. Anhand der mitgeführten DNA-Leiter wurden die Amplifikate hinsichtlich ihrer Länge (bp) ausgewertet.

Innerhalb dieser Arbeit wurden die Gelbilder zum Zwecke einer anschaulichen Darstellung maximal im Kontrast, der Helligkeit sowie der Reihenfolge der Banden auf dem Gel bearbeitet.

Tabelle 31: Pipettierschema für eine Agarose-Gelelektrophorese. Angegeben sind die Volumina für eine qualitative PCR (vor dem *slash*) und eine Mutations-PCR (nach dem *slash*).

	DNA-Leiter (µl)	PCR-Produkt (µl)
SYBR®-Green V2	4 / 8	2 / 2
Loading-Dye	2 / 4	2 / 2
DNA-Leiter	1 / 2	- / -
PCR-Produkt	- / -	10 / 8
Nukleasefreies Wasser	10 / 20	- / -
Gesamtvolumen	17 / 34	14 / 12

Wurde ein PCR-Produkt erneut als Templat –beispielsweise für eine Sequenzierung oder eine Nachamplifizierung- eingesetzt, folgte eine Aufreinigung aus dem Agarose-Gel oder dem PCR-Produkt.

6.5.8 Aufreinigung der Amplifikate mittels *illustra™GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit*

Die Aufreinigung der Amplifikate erfolgte wahlweise aus dem PCR-Ansatz oder dem Agarose-Gel. Dazu waren bis zum Laden der Säule unterschiedliche Arbeitsschritte notwendig:

a) *Aufreinigung aus dem PCR-Produkt*

Zum PCR-Ansatz ≤100 µl wurden 500 µl *Capture buffer type 3* hinzupipettiert, gemischt und kurz nach unten zentrifugiert.

b) *Aufreinigung aus dem Agarose-Gel*

Zum Ausschneiden der Bande wurde das Agarose-Gel auf einen UV-Tisch gelegt. Die Bande wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten, in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt und gewogen. Pro 10 mg Gel wurden 10 µl *Capture Buffer Type 3* zupipettiert (mindestens jedoch 300 µl). Zum Lösen des Gels wurde anschließend 10 min bei 60°C und 1100 rpm im Thermomixer inkubiert bis keine Schlieren mehr sichtbar waren und die Lösung kurz an einer Tischzentrifuge zentrifugiert.

Der Lösungsmix wurde in eine *illutra™GFX™MicroSpin™* Säule, welche in einem *Collection Tube* steckt, überführt. Nachdem für 60 s bei Raumtemperatur inkubiert und 30 s bei 16.000 g zentrifugiert wurde, wurde das Eluat verworfen. Für den anschließenden Waschschrift wurden 500 µl *Wash buffer type 1* auf die Säule pipettiert, 60 s bei 16.000 g zentrifugiert und das Eluat verworfen. Im Falle einer Aufreinigung für die Sequenzierung wurde ein weiterer Waschschrift mit 300 µl *Wash buffer type 1* angeschlossen. Um alle Reste des *Wash buffers* zu entfernen, wurde danach erneut für 60 s bei 16.000 g zentrifugiert. Die Säule wurde nun in ein neues 1,5 ml Reagiergefäß gesteckt, 12 µl *Elution buffer type 6* auf die Säule pipettiert, 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und 60 s bei 16.000 g zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule verworfen und das Eluat im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

6.5.9 Nachamplifizierung von Mutanten und erneuter *TaqI*-Verdau

Die Nachamplifizierung der Mutanten wurde durchgeführt wie eine qualitative PCR ([Kapitel 6.5.5.1](#)). Um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, wurde erneut ein *TaqI*-Verdau durchgeführt. Dazu wurde ein MM hergestellt (Tabelle 32), 2 µl pro Reaktionsansatz zupipettiert, gemischt, mit einer Tischzentrifuge kurz zentrifugiert und für 1 h bei 65°C im Thermocycler inkubiert.

Material und Methoden

Tabelle 32: Pipettierschema für einen *TaqI*-Nachverdau nach der Nachamplifikation von Mutanten.

Chemikalie	Anfangskonzentration	Endkonzentration	Reaktionsansatz (μ l)
BSA	100x	1x	0,27
<i>TaqI</i>	20 U/ μ l	1 U	0,05
Nukleasefreies Wasser	-	-	1,68
Gesamtvolumen			2,00
Volumen im Gesamtansatz			27,00

6.5.10 Sequenzierung

Durchführung:

Sequenzierungen nach Sanger wurden in dieser Arbeit extern von LGC (<https://shop.lgcgenomics.com/>, Stand 15.10.2015) durchgeführt. Zur Vorbereitung wurden 10 μ l der DNA-Lösung + 4 μ l des 5 μ M fw- oder rv-Primers in ein 1,5 ml Reagiergefäß pipettiert. Dieses wurde mit einem von LGC gestellten Barcode versehen und mit der Post verschickt.

Auswertung:

Die fertigen Elektropherogramme wurden per e-mail erhalten und mit Chromas Lite 2.01 (frei downloadbar unter <http://www.softpedia.com/get/Science-CAD/Chromas-Lite.shtml>) ausgewertet. Zudem wurden die Sequenzen exportiert, indem „Edit“ → „Copy Sequence“ → „Plain Text“ angewählt wurde. Die Auswertung einer Sequenz –beispielsweise Sequenzvergleiche, Restriktionsschnittstellen, Positionen innerhalb einer Sequenz) erfolgte mit ApE ([Kapitel 6.5.0](#)).

6.5.11 Statistik

Statistische Tests wie ANOVA oder t-Tests wurden mit Hilfe von OriginPro® (Version 2016G 64bit, OriginLab Corporation) durchgeführt. Tests auf Varianzenhomogenität (F-Test) und Linearität erfolgten unter anderem mit Valoo® (analytik-software, Leer, Deutschland) oder Kalibo (lizensiert auf einem PC des Lehrstuhls). Statistische Vergleiche im Falle von Häufigkeiten wurden mit dem Fisher's Exact Test (<http://www.socscistatistics.com/tests/fisher/default2.aspx>) durchgeführt.

6.5.12 Bestimmung der Zellzahl

6.5.12.1 Bestimmung der elektronischen Zellzahl

Die elektronische Zellzahlbestimmung wurde mit dem CASY® durchgeführt. Um eine verlässliche Zählung zu erhalten, welche auf der Detektion der unterschiedlichen Größe von Debris, toten und lebenden Zellen an Hand von Widerstandsmessungen basiert, wurden die Zellsuspension unter dem Mikroskop kontrolliert und die Zellen gegebenenfalls erneut vereinzelt.

Nach der Ermittlung der Größenverteilung der Zellen (dreifach unabhängig, Daten nicht gezeigt) entsprechend den Vorgaben des CASY®-Systems (Benutzerhandbuch CASY®) wurden im Gerät die Schranken für die Unterscheidung zwischen Debris, toten und lebenden Zellen programmiert.

Tabelle 33 Schranken für die elektronische Ermittlung der Zellzahl mit dem Zellzählgerät CASY®.

	NRK	MATLyLu
Debris (µm)	3,0-5,0	3,3-5,3
Tote Zellen (µm)	5,0-11,0	5,3-11,0
Lebende Zellen (µm)	11,0-100,0	11,0-100,0
Gesamtzellzahl (µm)	6,0-100,0	5,3-100,0

War eine Vereinzlung der Zellen gegeben, wurde ein definiertes Aliquot entnommen und in ein 10 ml isotonische Elektrolytlösung (CASY®ton) enthaltendes CASY® cup pipettiert. Am CASY® wurde der Faktor (Formel 1) eingestellt, welcher dem Aliquotvolumen entsprach:

Formel 1

$$Faktor = \frac{10 \text{ ml} + \text{Aliquot (ml)}}{\text{Aliquot (ml)}}$$

Zudem wurde das Ansaugvolumen definiert (3x400 µl oder 3x200 µl). Nach mehrmaligem Schwenken des CASY® cups zur Resuspension der Zellen wurde die Zellzahl bestimmt. Die ermittelten Zellzahlen wurde akzeptiert, wenn die resultierenden counts zwischen 1700 und 7500 (Macziol, 2012) lagen.

6.5.12.2 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer

Die Zellzahlbestimmung mit der Neubauer Zählkammer erfolgte mit Hilfe eines Lichtmikroskopes. Zu Beginn wurde das Deckglas durch leichtes Schieben auf der

Material und Methoden

Zählkammer angebracht. Das Erscheinen der Newtonschen Ringe zeigte an, dass die Tiefe zum Mittelsteg richtig eingestellt war (0,1 mm) und das Deckglas richtig haftete.

Es wurden 20 µl der zu bestimmenden Zellsuspension entnommen, an den Rand der Zählkammer pipettiert und wird dort durch Kapillarkräfte in die Kammer gesaugt. Um eine übersichtliche Zählung zu gewährleisten, sollte eine Zelldichte der Zellsuspension von $\leq 1,6$ Mio Zellen/ml nicht überschritten werden. Um auf der anderen Seite eine Präzision von $\leq 10\%$ zu erhalten, sollte mindestens eine Zelldichte von 100.000 Zellen/ml (≈ 10 Zellen pro Großquadrat) angestrebt werden

Die Zellen im Zählnetz wurden unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.

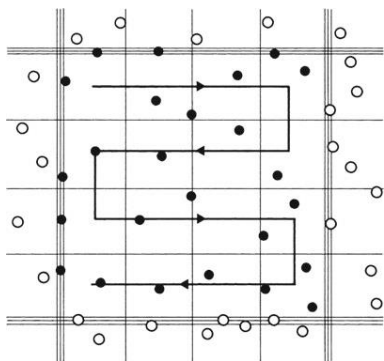


Abbildung 46: Aufbau eines Zählkreuzes (Schmitz, 2011). Dargestellt ist eines der vier Quadrate – bestehend aus 16 Einzelquadraten- der Neubauer Zählkammer. Die dunkel markierten Zellen werden bei der Zählung berücksichtigt, die hellen nicht. Zellen, die auf dem Rand des Zählkreuzes liegen, werden nur an zwei Seiten für die Zählung berücksichtigt.

Zur Berechnung wurde berücksichtigt, dass sich in jedem Zählkreuz mit 16 Quadraten 0,1 µl Zellsuspension befinden (Schmitz, 2011). Somit lässt sich die Zellzahl in 1 ml berechnen. In Abhängigkeit davon, wie viele Zählkreuze ausgezählt wurden, wurde ein anderer Faktor zur Berechnung verwendet: 1x 16 Quadrate = Faktor 10000, 2x 16 Quadrate = Faktor 7500, 3x 16 Quadrate = Faktor 5000 und 4x 16 Quadrate = Faktor 2500 (Formel 2).

Formel 2

$$\text{gezählte Zellen} \times \text{Faktor (abhängig von Anzahl ausgezählter Quadrate)} = \text{Zellzahl pro ml}$$

6.5.12.3 Bestimmung des Totanteils mittels Trypanblaufärbung

Die Färbung mit Trypanblau ermöglicht die Unterscheidung von toten und lebenden Zellen auf Grund ihrer Membraneigenschaften. Tote Zellen haben eine durchlässige Membran, der Farbstoff wird von den Zellen aufgenommen und die Zellen erscheinen somit unter dem Lichtmikroskop blau.

20 µl einer Zellsuspension mit einer Zelldichte von $2 \cdot 10^5$ bis $4 \cdot 10^7$ Zellen/ml (Schmitz, 2011) wurden mit 80 µl einer 5,7 mM Trypanblau-Lösung gemischt (5-mal). Danach wurden 20 µl der

Mischung entnommen und in die Neubauer Zählkammer gegeben. Da Trypanblau zytotoxisch ist, war eine zügige Zellzahlbestimmung enorm wichtig.

Auswertung: Es wurden zunächst alle Zellen gezählt (blau und farblos), danach die blau erscheinenden, toten Zellen Abbildung 47.

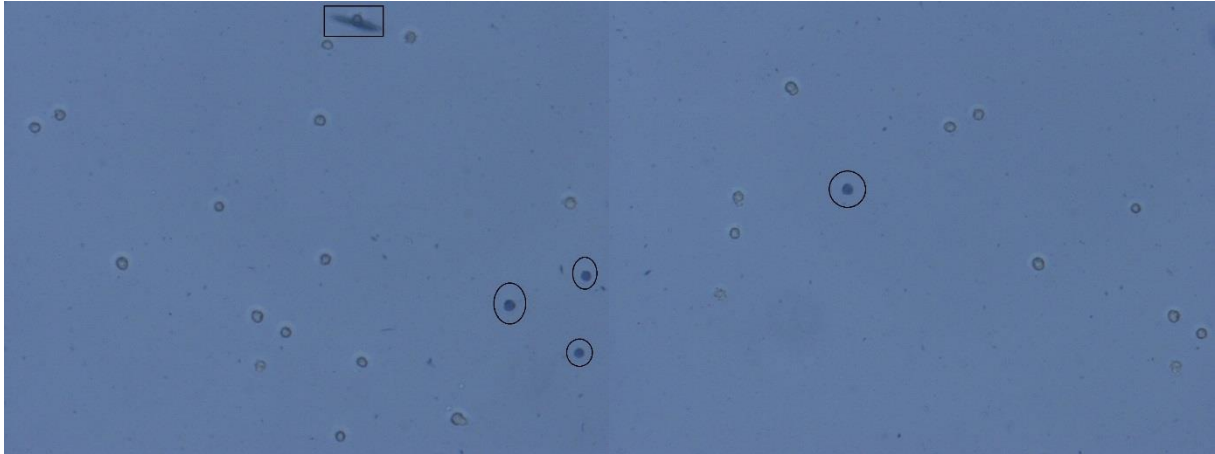


Abbildung 47 Lebende Zellen (farblos) mit vereinzelt toten Zellen (blau, Kreis) und Zellschrott (Quadrat). Gefärbt wurde mit 5,7 mM Trypanblaulösung, fotografiert wurde am Mikroskop (DIC, 10-fach, 2,5 s).

6.5.13 Wachstumskurve

Für die experimentelle Ermittlung des Wachstumsverhaltens der Zelllinien NRK und MATLyLu wurden Wachstumskurven erstellt. An Hand derer sollten Rückschlüsse bezüglich der Latenzzeit, der Verdopplungszeit innerhalb der exponentiellen Phase sowie der maximal erreichbaren Zelldichte getroffen werden.

Nach Bestimmung der Zellzahl wurden –angelehnt an den angestrebten HPRT-Test- 10000 Zellen/cm² mit 526 µl/cm² in Petrischalen mit 8,7 cm² ausgestreut. Nach 24 h und 71 h wurde das Medium gewechselt und zeitgleich auf 118 µl / cm² reduziert.

Die Zellzahlen wurden je Zeitpunkt dreifach ermittelt, indem das Medium abgegossen, mit PBS gespült und je Petrischale 200 µl Trypsin zugegeben wurden. Nach 30 s (MATLyLu) bzw. 2 min (NRK) bei Raumtemperatur wurde das Ablösen der Zellen mit 2 ml Medium abgestoppt. Anschließend wurde mit 1 ml Volumen der Boden dreifach gespült und die Zellsuspension 20-mal (MATLyLu) bzw. 25-mal (NRK) vereinzelt.

Zur Auswertung wurde Excel verwendet. Nach optischer Beurteilung wurde der exponentielle Bereich festgelegt und eine exponentielle Trendlinie eingefügt. Mit Hilfe des Exponenten aus der Regression wurde die Verdopplungszeit berechnet (Formel 3).

Formel 3 Verdopplungszeit= $\ln 2 / \text{Exponent}$

Als Latenzzeit wurde die Zeit zwischen Ausstreuen und Beginn der exponentiellen Phase angenommen.

6.5.14 Plating Efficiency Test

Die PE beschreibt die Koloniebildungsfähigkeit von adhärennten Zellen.

Materialien und Chemikalien: Zellkulturschalen 94 x 16 mm, Wachstumsmedium, Zellsuspension, Methyleneblau-Lösung, Ethanol zum Färben, 0,9% (m/w) NaCl-Lösung

Durchführung: Pro Zellkulturschale werden 500 Zellen in 10 ml Kulturmedium ausgestreut. Im Falle der NRK-Zellen wird für 7 Tage und im Falle der MATLyLu-zellen für 5 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wird visuell auf Kolonien überprüft, die Platten aus dem Brutschrank entnommen und fixiert. In dieser Arbeit wurden zwei Methoden angewendet:

Ethanolfixierung

Das Medium wird vorsichtig abgegossen und vorsichtig 0,9%ige NaCl-Lösung in die Zellkulturschale gegeben bis der Boden bedeckt ist. Nachdem auch diese Lösung abgegossen wurde, folgt die Zugabe von 99%igem Ethanol bis der Boden bedeckt ist. Nach 15 min wird auch dieser abgegossen.

Säurefixierung mit Carnoy

Werden die Kolonien mit eiskaltem Carnoy fixiert, wird je nach in der Zellkulturschale vorhandenem Medium das entsprechende Volumen Carnoy zugesetzt: bei 10 ml Medium 30 ml Carnoy; bei 30 ml Medium 100 ml Carnoy. Nach einer Stunde im Kühlschrank wird die komplette Flüssigkeit abgegossen und die Zellkulturschale mit destilliertem Wasser vorsichtig gewaschen.

Die eventuell vorhandenen Kolonien werden für 30 min mit einer Methyleneblau-Lösung versetzt. Danach wird die Lösung abgegossen, die Zellkulturschalen mit Wasser abgewaschen und anschließend getrocknet. Abschließend werden die Platten mit dem Dokumentationsgerät für Platten fotografiert und die Kolonien gezählt.

Auswertung

$$PE = \frac{\text{gebildete Kolonien}}{\text{ausgestreute Zellen}}$$

6.5.15 Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT)-Test

Eine Methode zur Ermittlung von MFs stellt der HPRT dar. In diesem Test werden durch die Selektion mit 6-Thioguanin Zellen mit einer Mutation im Exon des HPRT-Gens detektiert.

Materialien und Chemikalien: Selektionsmedium, Zellkulturschalen 145 x 20 mm (168 cm²), zudem siehe Kapitel 6.5.14

Durchführung: Pro Zellkulturschale werden 1 Million Zellen pro 30 ml Selektionsmedium plattiert. Im Zuge einer Passage wird nach dem Abtrypsinieren der Zellen die Zellzahl bestimmt und das entsprechende Volumen der Zellsuspension in ein Becherglas überführt. Danach wird mit Selektionsmedium aufgefüllt und die Zellen mit Hilfe einer 20 ml Messpipette vereinzelt. Danach werden die Zellen in die Zellkulturschale überführt und bei 37°C und 5% CO₂ für 7 Tage (NRK) bzw. 5 Tage (MATLyLu) inkubiert. Gleichzeitig erfolgt die Bestimmung der PE (Kapitel 6.5.14).

Danach folgt eine Färbung wie in [Kapitel 6.5.14](#) angegeben.

Auswertung

$$\text{Mutantenfrequenz} = \frac{\text{Anzahl HPRT Mutanten} \times 10^6}{\text{PE} \times \text{ausgestreute Kolonien}}$$

6.5.16 Mikrokern-Test

Beim Mikrokern-Test werden Mikrokerne erfasst. Dabei handelt es sich um kleine, chromatinhaltige Partikel, die von einer Kernhülle umgeben sind und neben dem Hauptkern in einer Zelle vorliegen. Mikrokerne enthalten wahlweise ganze Chromosomen (CREST positiv) oder nur Chromosomenfragmente (CREST negativ). Die Entstehung der Mikrokerne ist auf verschiedenen Wegen möglich, wobei die Zellen mindestens eine Zellteilung durchlaufen müssen.

Aufzentrifugieren der Zellen

Nach der Inkubation wurden die Zellen pro Konzentration auf zwei PolysineTM-beschichtete Objektträger aufzentrifugiert. Dazu wurde aus der Zellsuspension ein Aliquot mit 66000 Zellen entnommen und in Medium pipettiert (Endkonzentration 66000 Zellen/ml). Nach erneutem Vereinzeln der Zellen wurden 500 µl dieser Zellsuspension in den Trichter des Cellfunnel® gegeben und durch die Zentrifugation auf den Objektträger aufgetragen. Die Zentrifugation erfolgte bei 700 rpm (=54,8 x g) für 10 min.

Fixierung

Nachdem die Zellen aufzentrifugiert waren, wurden die Objektträger sofort in -21°C-kaltes Carnoy gegeben und bei -21°C mindestens für 48 h gelagert.

Material und Methoden

Färbung der Zellen

Anschließend wurden die Objektträger aus dem Carnoy-Fixans geholt und 30 min luftgetrocknet. Die Färbung erfolgte anschließend mit DAPI-Antifade-Lösung. Um eine Schwächung des Fluoreszenzsignals zu vermeiden, wurden die Objektträger bis zur Auswertung am Mikroskop lichtgeschützt aufbewahrt.

Mikroskopieren und Fotografieren

Die Objektträger wurden mikroskopisch untersucht (

- Software: ZEN Version 1.0.1.0.2011
- Objektiv; 40x → Okkular hat 10x → ergibt Gesamtvergrößerung 400x
- Reflector: 49-DAPI
- Optovar: 1x

Das eigentliche Auswertungsmaterial waren jedoch die Fotos von den Zellkernen. Von jedem Abschnitt (beginnend oben links, danach nach rechts bis zum Rand, runter und links bis zum Rand usw.) wurde ein Foto gemacht. Dabei war zu beachten, dass die Belichtung so eingestellt wurde, dass die Belichtungskurve möglichst über den gesamten Bereich des Histogramms verteilt war. Waren auf einem Bild beispielsweise mitotische Zellkerne zu erkennen, wurde ein zweites Foto der Kerne mit angepasster Belichtungszeit gemacht, sodass die Chromosomenärmchen gut zu erkennen sind.

Pro Objektträger wurden so viele Fotos aufgenommen, dass mindestens 1000 Zellkerne (voll und ganz auf Foto erkennbar) erfasst wurden. Diese sollten im Ganzen auf dem Foto abgebildet sein, damit keine zugehörigen Mikrokernkerne unentdeckt bleiben. Kaputte Zellkerne wurden nicht mitgezählt.

Um eine statistisch relevante Menge an Zellen zu überprüfen, wurden je Konzentration 2000 Zellen ausgewertet (Vohr, 2010) und die Mikrokernrate auf 1000 Zellen normiert (OECD, 2014) berechnet

Kriterien zur Identifizierung von Mikrokernen

Damit die Auswertung der Bilder möglichst unbeeinflusst geschieht, werden diese codiert und von einer zweiten Person ausgewertet. Um als Mikrokern (Abbildung 48) zu gelten, müssen folgende Kriterien (Fenech, 2000; Countryman und Heddle, 1976) erfüllt sein:

- Durchmesser $\leq 1/3$ des Hauptkerndurchmessers
- keine Verbindung zum Hauptkern
- Abstand zum Hauptkern maximal 3-mal so groß, wie der des Hauptkerndurchmessers
- Gleiche Fokussierungsebene wie Hauptkern

- glatter, runder bis ovaler Umriss
- gleiche Strukturierung wie Hauptkern
- pro Hauptkern höchstens 2 Mikrokerne

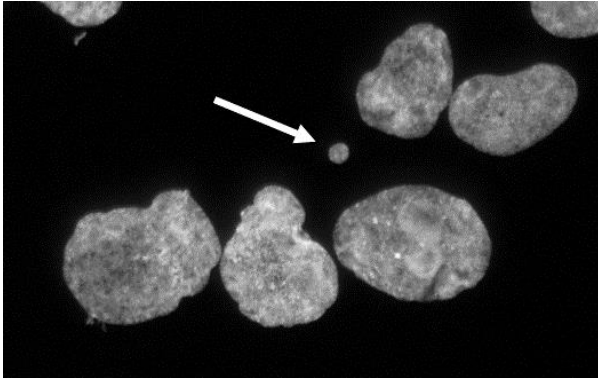


Abbildung 48 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Zellkerne und einem Mikrokerneln der NRK-Zellen nach Färbung mit DAPI. Aufgenommen wurde das Bild am inversen Mikroskop mit DAPI-Filter bei 400-facher Vergrößerung mithilfe der ZEN - Bildbearbeitungssoftware (Version 1.0.1.0. 2011).

6.5.17 Zellkultur allgemein

Medium

Für die Kultivierung der NRK-Zellen wurde dem Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) 10% Fetales Kälberserum, 2% Penicillin/Streptomycin (P/S), 1% Glutamin und 1% non-essential Aminoacids (MEM) zugegeben (z.B. 500 ml DMEM, 50 ml FKS, 2 ml P/S, 5 ml Glutamin, 5 ml MEM). Das Medium wurde bei 4°C im Kühlschrank gelagert und vor Verwendung auf 37°C im Wasserbad temperiert.

Die MATLyLu-Zellen wurden in Roswell-Park-Memorial-Institute (RPMI)-Medium kultiviert, welchem vor Verwendung unter der sterilen Werkbank noch 10% hitzeinaktiviertes FKS und 2% P/S zugegeben wurde (z.B. 500 ml RPMI, 50 ml hitzeinaktiviertes FKS, 10 ml P/S).

Die Kultivierung beider Zelllinien erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank.

Auftauen der Zellen

Der Auftauprozess der bei -196°C gelagerten Zellen sollte prinzipiell zügig von statten gehen, damit das DMSO, welches zu 10% im Einfriermedium vorhanden ist, nicht die Zellen schädigt. Das Kryo mit den gefrorenen Zellen wird im Wasserbad bei 37°C erwärmt, bis sich der Inhalt gerade eben von der Kryowand löst. Unter der sterilen Werkbank wird der Inhalt in 10 ml 37°C warmes Kulturmedium, welches in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt war, überführt. Diese Zellsuspension wird bei 200 x g für 5 in bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der resultierende Überstand wird vorsichtig abgesaugt und das Pellet mit ca. 1,5 ml Kulturmedium resuspendiert. Mit Hilfe einer Transferpipette wird die Zellsuspension in eine Zellkulturflasche

Material und Methoden

mit vorgelegtem Medium überführt. Die Zellen werden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert.

Nach 24^h erfolgt ein Mediumwechsel, indem das alte Medium unter der sterilen Werkbank abgesaugt und durch 10 ml (75cm²-Flaschen) bzw. 20 ml (175 cm²-Flaschen) ersetzt wird ohne dabei den Zellrasen zu berühren.

Passagieren der Zellen

Die adhärennten Zellen unteren der sterilen Werkbank werden durch Absaugen vom Medium befreit. Daraufhin wird ca. 10 ml steriles PBS zugegeben, vorsichtig geschwenkt und die Waschlösung wieder abgesaugt ohne den Zellrasen zu beschädigen. Nach Zugabe von sterilem Trypsin erfolgt eine Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ für ca. 2 Minuten. Danach werden die Zellen mikroskopisch auf vollständiges Ablösen vom Flaschenboden überprüft (kugeliges Aussehen, Beweglichkeit) und rasch mit Kulturmedium versetzt (s. Mediumwechsel).

Nach dem Vereinzeln der Zellen mit Hilfe einer Pipette vereinzelt und wahlweise elektronisch oder mit der Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt. Ein Aliquot mit der gewünschten Zellzahl wird in eine neue Zellkulturflasche überführt, in welche bereits Kulturmedium vorgelegt wurde. Nach Vereinzeln der Zellen und mikroskopischer Prüfung, dass Zellen überführt wurden, wird wie zuvor beschrieben inkubiert.

7 Literaturverzeichnis

- AlkabiBiosystems (1999). Alkabi Quick Guide for PCR-A laboratory reference for the Polymerase Chain Reaction. A. Biosystems. USA, Alkabi Biosystems, Inc. 1. **Auflage.**
- Allard, M. W. und Honeycutt, R. L. (1991). "Ribosomal DNA variation within and between species of rodents, with emphasis on the genus *Onychomys*." Molecular biology and evolution **8**(1): 71-84.
- Arima, Y., Nishigori, C., Takeuchi, T., Oka, S., Morimoto, K., Utani, A. und Miyachi, Y. (2006). "4-Nitroquinoline 1-oxide forms 8-hydroxydeoxyguanosine in human fibroblasts through reactive oxygen species." Toxicol Sci **91**(2): 382-392.
- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N. und Patel, H. R. (2005). "Basic principles of real-time quantitative PCR." Expert Rev Mol Diagn **5**(2): 209-219.
- Bailleul, B., Daubersies, P., Galiegue-Zouitina, S. und Loucheux-Lefebvre, M. H. (1989). "Molecular basis of 4-nitroquinoline 1-oxide carcinogenesis." Jpn J Cancer Res **80**(8): 691-697.
- Bell, D. A. und DeMarini, D. M. (1991). "Excessive cycling converts PCR products to random-length higher molecular weight fragments." Nucleic Acids Res **19**(18): 5079.
- Benson, A. M. (1993). "Conversion of 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) to 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide by a dicumarol-resistant hepatic 4NQO nitroreductase in rats and mice." Biochem Pharmacol **46**(7): 1217-1221.
- Best, C. J., Tanzer, L. R., Phelps, P. C., Merriman, R. L., Boder, G. G., Trump, B. F. und Elliget, K. A. (1999). "H-ras-transformed NRK-52E renal epithelial cells have altered growth, morphology, and cytoskeletal structure that correlates with renal cell carcinoma in vivo." In Vitro Cell Dev Biol Anim **35**(4): 205-214.
- Biaglow, J. E., Jacobson, B. E. und Nygaard, O. F. (1977). "Metabolic reduction of 4-nitroquinoline N-oxide and other radical-producing drugs to oxygen-reactive intermediates." Cancer Res **37**(9): 3306-3313.
- Bielas, J. H., Loeb, K. R., Rubin, B. P., True, L. D. und Loeb, L. A. (2006). "Human cancers express a mutator phenotype." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(48): 18238-18242.
- Bielas, J. H. und Loeb, L. A. (2005). "Quantification of random genomic mutations." Nature methods **2**(4): 285-290.
- Biniecka, M., Canavan, M., McGarry, T., Gao, W., McCormick, J., Cregan, S., Gallagher, L., Smith, T., Phelan, J. J., Ryan, J., O'Sullivan, J., Ng, C. T., Veale, D. J. und Fearon, U. (2016). "Dysregulated bioenergetics: a key regulator of joint inflammation." Ann Rheum Dis **75**(12): 2192-2200.
- Biniecka, M., Kennedy, A., Ng, C. T., Chang, T. C., Balogh, E., Fox, E., Veale, D. J., Fearon, U. und O'Sullivan, J. N. (2011). "Successful tumour necrosis factor (TNF) blocking therapy suppresses oxidative stress and hypoxia-induced mitochondrial mutagenesis in inflammatory arthritis." Arthritis research & therapy **13**(4): R121.
- Boesch, P., Weber-Lotfi, F., Ibrahim, N., Tarasenko, V., Cosset, A., Paulus, F., Lightowlers, R. N. und Dietrich, A. (2011). "DNA repair in organelles: Pathways, organization, regulation, relevance in disease and aging." Biochimica et biophysica acta **1813**(1): 186-200.
- Boore, J. L. (1999). "Animal mitochondrial genomes." Nucleic Acids Res **27**(8): 1767-1780.
- Borrvalho, P. M., Rodrigues, C. M. und Steer, C. J. (2015). "microRNAs in Mitochondria: An Unexplored Niche." Adv Exp Med Biol **887**: 31-51.
- Bradley, M. O., Bhuyan, B., Francis, M. C., Langenbach, R., Peterson, A. und Huberman, E. (1981). "Mutagenesis by chemical agents in V79 chinese hamster cells: a review and analysis of the literature. A report of the Gene-Tox Program." Mutat Res **87**(2): 81-142.
- Breslauer, K. J., Frank, R., Blocker, H. und Marky, L. A. (1986). "Predicting DNA duplex stability from the base sequence." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(11): 3746-3750.

Literaturverzeichnis

- Brugger, E. M., Wagner, J., Schumacher, D. M., Koch, K., Podlech, J., Metzler, M. und Lehmann, L. (2006). "Mutagenicity of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells." *Toxicol Lett* **164**(3): 221-230.
- C.R. Mahon, D. C. L., G. Manuselis (2014). *Textbook of Diagnostic Microbiology*. Saunders Elsevier, Maryland Heights, Missouri.
- Chan, Y. L., Gutell, R., Noller, H. F. und Wool, I. G. (1984). "The nucleotide sequence of a rat 18 S ribosomal ribonucleic acid gene and a proposal for the secondary structure of 18 S ribosomal ribonucleic acid." *J Biol Chem* **259**(1): 224-230.
- Chen, H. und Chan, D. C. (2009). "Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases." *Hum Mol Genet* **18**(R2): R169-176.
- Chen, H., Vermulst, M., Wang, Y. E., Chomyn, A., Prolla, T. A., McCaffery, J. M. und Chan, D. C. (2010). "Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations." *Cell* **141**(2): 280-289.
- Cline, J., Braman, J. C. und Hogrefe, H. H. (1996). "PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases." *Nucleic Acids Res* **24**(18): 3546-3551.
- Countryman, P. I. und Heddle, J. A. (1976). "The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **41**(2): 321-331.
- Dai, D. F., Santana, L. F., Vermulst, M., Tomazela, D. M., Emond, M. J., MacCoss, M. J., Gollahon, K., Martin, G. M., Loeb, L. A., Ladiges, W. C. und Rabinovitch, P. S. (2009). "Overexpression of catalase targeted to mitochondria attenuates murine cardiac aging." *Circulation* **119**(21): 2789-2797.
- de Larco, J. E. und Todaro, G. J. (1978). "Epithelioid and fibroblastic rat kidney cell clones: epidermal growth factor (EGF) receptors and the effect of mouse sarcoma virus transformation." *Journal of cellular physiology* **94**(3): 335-342.
- Doak, S. H., Jenkins, G. J., Johnson, G. E., Quick, E., Parry, E. M. und Parry, J. M. (2007). "Mechanistic influences for mutation induction curves after exposure to DNA-reactive carcinogens." *Cancer Res* **67**(8): 3904-3911.
- Dorak, M. T., (2006). *Real-time PCR*. Taylor & Francis, New York.
- Dunn, T. L., Gardiner, R. A., Seymour, G. J. und Lavin, M. F. (1987). "Genotoxicity of analgesic compounds assessed by an in vitro micronucleus assay." *Mutat Res* **189**(3): 299-306.
- Ericson, N. G., Kulawiec, M., Vermulst, M., Sheahan, K., O'Sullivan, J., Salk, J. J. und Bielas, J. H. (2012). "Decreased mitochondrial DNA mutagenesis in human colorectal cancer." *PLoS Genet* **8**(6): e1002689.
- Fenech, M. (2000). "The in vitro micronucleus technique." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **455**(1): 81-95.
- Troubleshooting Guide for DNA Electrophoresis.
- Fukui, H. und Moraes, C. T. (2009). "Mechanisms of formation and accumulation of mitochondrial DNA deletions in aging neurons." *Hum Mol Genet* **18**(6): 1028-1036.
- illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit.
- Gonzalez, I. L. und Schmickel, R. D. (1986). "The human 18S ribosomal RNA gene: evolution and stability." *American journal of human genetics* **38**(4): 419-427.
- Gorman, S., Fox, E., O'Donoghue, D., Sheahan, K., Hyland, J., Mulcahy, H., Loeb, L. A. und O'Sullivan, J. (2010). "Mitochondrial mutagenesis induced by tumor-specific radiation bystander effects." *Journal of molecular medicine* **88**(7): 701-708.
- Greaves, L. C., Beadle, N. E., Taylor, G. A., Commane, D., Mathers, J. C., Khrapko, K. und Turnbull, D. M. (2009). "Quantification of mitochondrial DNA mutation load." *Aging Cell* **8**(5): 566-572.
- Greene, E. A., Codomo, C. A., Taylor, N. E., Henikoff, J. G., Till, B. J., Reynolds, S. H., Enns, L. C., Burtner, C., Johnson, J. E., Odden, A. R., Comai, L. und Henikoff, S. (2003). "Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in Arabidopsis." *Genetics* **164**(2): 731-740.
- Gudnason, H., Dufva, M., Bang, D. D. und Wolff, A. (2007). "Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature." *Nucleic Acids Res* **35**(19): e127.

Literaturverzeichnis

- Guryev, V., Berezikov, E., Malik, R., Plasterk, R. H. und Cuppen, E. (2004). "Single nucleotide polymorphisms associated with rat expressed sequences." Genome Res **14**(7): 1438-1443.
- Hillis, D. M., (1996). Molecular systematics. Sinauer Assoc., Sunderland, Massachusetts U.S.A.
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K. und Pease, L. R. (1989). "Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction." Gene **77**(1): 51-59.
- Hsie, A. W., Brimer, P. A., Mitchell, T. J. und Gosslee, D. G. (1975). "The dose-response relationship for ethyl methanesulfonate-induced mutations at the hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase locus in Chinese hamster ovary cells." Somatic Cell Genet **1**(3): 247-261.
- Huu, D.-N., Rosenblum, E. N. und Zeigel, R. F. (1966). "Persistent infection of a rat kidney cell line with Rauscher murine leukemia virus." Journal of bacteriology **92**(4): 1133-1140.
- Isaacs, J. T., Isaacs, W. B., Feitz, W. F. und Scheres, J. (1986). "Establishment and characterization of seven Dunning rat prostatic cancer cell lines and their use in developing methods for predicting metastatic abilities of prostatic cancers." Prostate **9**(3): 261-281.
- Itsara, L. S., Kennedy, S. R., Fox, E. J., Yu, S., Hewitt, J. J., Sanchez-Contreras, M., Cardozo-Pelaez, F. und Pallanck, L. J. (2014). "Oxidative stress is not a major contributor to somatic mitochondrial DNA mutations." PLoS Genet **10**(2): e1003974.
- Jaramillo, D. M. (2013). Einfluss einer definierten Enzymausstattung auf die Mutagenität von 17 β -Estradiol und dessen Metaboliten. J.-M.-U. Würzburg.
- Johnson, G. E. (2012). "Mammalian cell HPRT gene mutation assay: test methods." Methods Mol Biol **817**: 55-67.
- Genomic DNA Sample QC.
- Jones, C. J., Edwards, S. M. und Waters, R. (1989). "The repair of identified large DNA adducts induced by 4-nitroquinoline-1-oxide in normal or xeroderma pigmentosum group A human fibroblasts, and the role of DNA polymerases alpha or delta." Carcinogenesis **10**(7): 1197-1201.
- Kano, Y., Maeda, S. und Sugiyama, T. (1976). "The location of ribosomal cistrons (rDNA) in chromosomes of the rat." Chromosoma **55**(1): 37-42.
- Khaidakov, M., Chavannes-Turesky, N., Cooney, C. A., Dupont-Versteegden, E. E., Kennedy, R. H., Siegel, E. R., Khaidakova, G. und Shmookler Reis, R. J. (2005). "Contribution of de novo point mutations to the overall mutational burden in mitochondrial DNA of adult rats." Exp Gerontol **40**(5): 396-402.
- Khrapko, K. T., D. (2014). Mitochondrial DNA Mutations in Aging. Progress in Molecular Biology and Translational Science. H. D. Osiewacz, Elsevier Inc. **127**.
- Knippers, R., (2006). Molekulare Genetik. Thieme, Stuttgart.
- Kohda, K., Tada, M., Kasai, H., Nishimura, S. und Kawazoe, Y. (1986). "Formation of 8-hydroxyguanine residues in cellular DNA exposed to the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide." Biochem Biophys Res Commun **139**(2): 626-632.
- Koolman, J. R., K.-H., (2002). Taschenatlas der Biochemie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Kraytsberg, Y., Kudryavtseva, E., McKee, A. C., Geula, C., Kowall, N. W. und Khrapko, K. (2006). "Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons." Nat Genet **38**(5): 518-520.
- Kraytsberg, Y., Nicholas, A., Caro, P. und Khrapko, K. (2008). "Single molecule PCR in mtDNA mutational analysis: Genuine mutations vs. damage bypass-derived artifacts." Methods **46**(4): 269-273.
- Krishnan, K. J., Reeve, A. K., Samuels, D. C., Chinnery, P. F., Blackwood, J. K., Taylor, R. W., Wanrooij, S., Spelbrink, J. N., Lightowlers, R. N. und Turnbull, D. M. (2008). "What causes mitochondrial DNA deletions in human cells?" Nat Genet **40**(3): 275-279.

Literaturverzeichnis

- Kulling, S. E. und Metzler, M. (1997). "Induction of micronuclei, DNA strand breaks and HPRT mutations in cultured Chinese hamster V79 cells by the phytoestrogen coumestrol." Food Chem Toxicol **35**(6): 605-613.
- Lambert, I. B., Singer, T. M., Boucher, S. E. und Douglas, G. R. (2005). "Detailed review of transgenic rodent mutation assays." Mutation research **590**(1-3): 1-280.
- Lang, B. F., Gray, M. W. und Burger, G. (1999). "Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes." Annu Rev Genet **33**: 351-397.
- Lash, L. H., Putt, D. A., Hueni, S. E., Cao, W., Xu, F., Kulidjian, S. J. und Horwitz, J. P. (2002). "Cellular energetics and glutathione status in NRK-52E cells: toxicological implications." Biochem Pharmacol **64**(10): 1533-1546.
- Lave, T., Birnbock, H., Gotschi, A., Ramp, T. und Pahler, A. (2009). "In vivo and in vitro characterization of ethyl methanesulfonate pharmacokinetics in animals and in human." Toxicol Lett **190**(3): 303-309.
- Lehmann, L. (2002). Untersuchungen zum genotoxischen Potenzial von Substanzen mit estrogenen Wirkung. U. Karlsruhe.
- Li, A. P., Carver, J. H., Choy, W. N., Hsie, A. W., Gupta, R. S., Loveday, K. S., O'Neill, J. P., Riddle, J. C., Stankowski, L. F., Jr. und Yang, L. L. (1987). "A guide for the performance of the Chinese hamster ovary cell/hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase gene mutation assay." Mutation research **189**(2): 135-141.
- Lievens, A., Van Aelst, S., Van den Bulcke, M. und Goetghebeur, E. (2012). "Enhanced analysis of real-time PCR data by using a variable efficiency model: FPK-PCR." Nucleic Acids Res **40**(2): e10.
- Long, E. O. und Dawid, I. B. (1980). "Repeated genes in eukaryotes." Annual review of biochemistry **49**: 727-764.
- M.A. Iquebal, S. J., C.S. Mukhopadhyay, C.Sarkar, A. Rai, D. Kumar (2015). Applications of Bioinformatics in Plant and Agriculture.
- Macziol, M. (2012). Vorversuche zur Untersuchung des mutagenen Potenzials von MT02 in kultivierten V79-Zellen. J.-M.-U. Würzburg.
- Matissek, R., Steiner, G., Fischer, M., (2010). Lebensmittelanalytik. Springer Verlag, **4. Auflage**, Heidelberg.
- Maul, R. und Kulling, S. E. (2010). "Absorption of red clover isoflavones in human subjects: results from a pilot study." Br J Nutr **103**(11): 1569-1572.
- McGarry, T., Biniacka, M., Gao, W., Cluxton, D., Canavan, M., Wade, S., Wade, S., Gallagher, L., Orr, C., Veale, D. J. und Fearon, U. (2017). "Resolution of TLR2-induced inflammation through manipulation of metabolic pathways in Rheumatoid Arthritis." Sci Rep **7**: 43165.
- McGregor, D. B., Edwards, I., Wolf, C. R., Forrester, L. M. und Caspary, W. J. (1991). "Endogenous xenobiotic enzyme levels in mammalian cells." Mutat Res **261**(1): 29-39.
- McInerney, P., Adams, P. und Hadi, M. Z. (2014). "Error Rate Comparison during Polymerase Chain Reaction by DNA Polymerase." Mol Biol Int **2014**: 287430.
- Meyer, J. N., Leung, M. C., Rooney, J. P., Sendoel, A., Hengartner, M. O., Kisby, G. E. und Bess, A. S. (2013). "Mitochondria as a target of environmental toxicants." Toxicol Sci **134**(1): 1-17.
- Miller, O. J., Tantravahi, R., Miller, D. A., Yu, L. C., Szabo, P. und Prenskey, W. (1979). "Marked increase in ribosomal RNA gene multiplicity in a rat hepatoma cell line." Chromosoma **71**(2): 183-195.
- Mitchell, J. R., McMurtry, R. J., Statham, C. N. und Nelson, S. D. (1977). "Molecular basis for several drug-induced nephropathies." Am J Med **62**(4): 518-526.
- Miyazaki, M., Handa, Y., Suzuki, Y. und Sato, J. (1986). "Promotion of 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene-initiated adult rat liver cells to malignant state by phenobarbital in culture." Int J Cancer **37**(5): 769-773.
- Monis, P. T., Giglio, S. und Saint, C. P. (2005). "Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis." Anal Biochem **340**(1): 24-34.

Literaturverzeichnis

- Moore, M. M., Harrington-Brock, K., Doerr, C. L. und Dearfield, K. L. (1989). "Differential mutant quantitation at the mouse lymphoma tk and CHO hgprr loci." Mutagenesis **4**(5): 394-403.
- Moraes, C. T. und Schon, E. A. (1996). "Detection and analysis of mitochondrial DNA and RNA in muscle by in situ hybridization and single-fiber PCR." Methods Enzymol **264**: 522-540.
- Müller-Esterl, W., (2009). Biochemie. Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler.. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Muller, L., Gocke, E., Lave, T. und Pfister, T. (2009). "Ethyl methanesulfonate toxicity in Viracept--a comprehensive human risk assessment based on threshold data for genotoxicity." Toxicol Lett **190**(3): 317-329.
- Nakada, K., Inoue, K., Ono, T., Isobe, K., Ogura, A., Goto, Y. I., Nonaka, I. und Hayashi, J. I. (2001). "Inter-mitochondrial complementation: Mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA." Nat Med **7**(8): 934-940.
- OECD (1997a). Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test- 475. OECD guideline for the testing of chemicals.
- OECD (1997b). Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test- 474. OECD guideline for the testing of chemicals.
- OECD (1997c). OECD guideline for testing of chemicals ; In vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test.
- OECD (2010). "OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS - In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test."
- OECD (2013). Draft Mammalian Spermatogonial Chromosomal Aberration Test- 483. OECD guideline for the testing of chemicals.
- OECD (2014). Draft Rodent Dominant Lethal Test- 478. OECD guideline for testing of chemicals.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Res **29**(9): e45.
- Pfenning, C. (2014). Untersuchungen zum genotoxischen Wirkmechanismus des Mykotoxins Patulin: Reaktivität gegenüber DNA-Basen unter dem Einfluss von Glutathion. L. f. L. Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Rafferty, K. A., Jr. (1985). "Growth potential of the cells of permanent lines (HeLa, BHK/21, NRK)." Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol **50**(2): 167-180.
- Ribas, V., Drew, B. G., Zhou, Z., Phun, J., Kalajian, N. Y., Soleymani, T., Daraei, P., Widjaja, K., Wanagat, J., de Aguiar Vallim, T. Q., Fluitt, A. H., Bensinger, S., Le, T., Radu, C., Whitelegge, J. P., Beaven, S. W., Tontonoz, P., Lusic, A. J., Parks, B. W., Vergnes, L., Reue, K., Singh, H., Bopassa, J. C., Toro, L., Stefani, E., Watt, M. J., Schenk, S., Akerstrom, T., Kelly, M., Pedersen, B. K., Hewitt, S. C., Korach, K. S. und Hevener, A. L. (2016). "Skeletal muscle action of estrogen receptor alpha is critical for the maintenance of mitochondrial function and metabolic homeostasis in females." Sci Transl Med **8**(334): 334ra354.
- Ririe, K. M., Rasmussen, R. P. und Wittwer, C. T. (1997). "Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction." Anal Biochem **245**(2): 154-160.
- Rosignol, R., Faustin, B., Rocher, C., Malgat, M., Mazat, J. P. und Letellier, T. (2003). "Mitochondrial threshold effects." Biochem J **370**(Pt 3): 751-762.
- Rotskaya, U. N., Rogozin, I. B., Vasyunina, E. A., Malyarchuk, B. A., Nevinsky, G. A. und Sinitsyna, O. I. (2010). "High frequency of somatic mutations in rat liver mitochondrial DNA." Mutation research **685**(1-2): 97-102.
- Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M. J. und Moorman, A. F. (2009). "Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data." Nucleic Acids Res **37**(6): e45.
- Russell, O. und Turnbull, D. (2014). "Mitochondrial DNA disease-molecular insights and potential routes to a cure." Exp Cell Res **325**(1): 38-43.

Literaturverzeichnis

- Rychlik, W., Spencer, W. J. und Rhoads, R. E. (1990). "Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro." Nucleic Acids Res **18**(21): 6409-6412.
- Saki, M. und Prakash, A. (2017). "DNA damage related crosstalk between the nucleus and mitochondria." Free Radic Biol Med **107**: 216-227.
- Scheffler, A., Albrecht, A. E., Esch, H. L. und Lehmann, L. (2015a). "Data in support of the mutagenic potential of the isoflavone irilone in cultured V79 cells." Data Brief **4**: 474-487.
- Scheffler, A., Albrecht, A. E., Esch, H. L. und Lehmann, L. (2015b). "Mutagenic potential of the isoflavone irilone in cultured V79 cells." Toxicol Lett **234**(2): 81-91.
- Schlechtweg, A. (2011). Etablierung einer RT-PCR basierten Methode zur bestimmung des Mutationsspektrums des *hprt*-Gens. L. f. L. Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Schmalbach, K. (2014). Identification of factors influencing 17beta-estradiol metabolism in female mammary gland. Lehrstuhl für Lebensmittelchemie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg. Dr.: 235.
- Schmitz, S., (2011). Der Experimentator: Zellkultur. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, **3**.
- Schulz, D., Wirth, M., Piontek, G., Buchberger, A. M., Schlegel, J., Reiter, R., Multhoff, G. und Pickhard, A. (2016). "HNSCC cells resistant to EGFR pathway inhibitors are hypermutated and sensitive to DNA damaging substances." Am J Cancer Res **6**(9): 1963-1975.
- Schumacher, D. (2005). Untersuchungen zur genotoxischen und mutagenen Wirkung des Mykotoxins Patulin. U. Karlsruhe.
- Schumacher, D. M., Metzler, M. und Lehmann, L. (2005). "Mutagenicity of the mycotoxin patulin in cultured Chinese hamster V79 cells, and its modulation by intracellular glutathione." Arch Toxicol **79**(2): 110-121.
- Sega, G. A. (1984). "A review of the genetic effects of ethyl methanesulfonate." Mutat Res **134**(2-3): 113-142.
- Shim, S. M., Kim, J. H., Jung, S. E., Kim, D. J., Oh, J. H., Han, B. G. und Jeon, J. P. (2010). "Multilaboratory assessment of variations in spectrophotometry-based DNA quantity and purity indexes." Biopreserv Biobank **8**(4): 187-192.
- Sirianni, S. R., Chen, H. H. und Huang, C. C. (1981). "Effects of retinoids on plating efficiency, sister-chromatid exchange (SCE) and mitomycin-C-induced SCE in cultured Chinese hamster cells." Mutat Res **90**(2): 175-182.
- Smits, B. M., van Zutphen, B. F., Plasterk, R. H. und Cuppen, E. (2004). "Genetic variation in coding regions between and within commonly used inbred rat strains." Genome Res **14**(7): 1285-1290.
- Srivastava, A. K. und Schlessinger, D. (1991). "Structure and organization of ribosomal DNA." Biochimie **73**(6): 631-638.
- Svec, D., Tichopad, A., Novosadova, V., Pfaffl, M. W. und Kubista, M. (2015). "How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments." Biomol Detect Quantif **3**: 9-16.
- Tada, M. und Tada, M. (1976). "Main binding sites of the carcinogen, 4-nitroquinoline 1-oxide in nucleic acids." Biochim Biophys Acta **454**(3): 558-566.
- Tantravahi, R., Miller, D. A., D'Ancona, G., Croce, C. M. und Miller, O. J. (1979). "Location of rRNA genes in three inbred strains of rat and suppression of rat rRNA activity in rat-human somatic cell hybrids." Experimental cell research **119**(2): 387-392.
- Taylor, R. W. und Turnbull, D. M. (2005). "Mitochondrial DNA mutations in human disease." Nat Rev Genet **6**(5): 389-402.
- Tietz, D., Aldroubi, A., Pulyaeva, H., Guszczynski, T., Garner, M. M. und Chrambach, A. (1992). "Advances in DNA electrophoresis in polymer solutions." Electrophoresis **13**(9-10): 614-616.
- U. Wollenberger, R. R., F.F. Bier, F.W. Scheller, (2003). Analytische Biochemie -Eine praktische Einführung in das Messen mit Biomolekülen. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

- Valente, W. J., Ericson, N. G., Long, A. S., White, P. A., Marchetti, F. und Bielas, J. H. (2016). "Mitochondrial DNA exhibits resistance to induced point and deletion mutations." Nucleic Acids Res **44**(18): 8513-8524.
- Varga, A. und James, D. (2006). "Real-time RT-PCR and SYBR Green I melting curve analysis for the identification of Plum pox virus strains C, EA, and W: effect of amplicon size, melt rate, and dye translocation." J Virol Methods **132**(1-2): 146-153.
- Vermulst, M., Bielas, J. H., Kujoth, G. C., Ladiges, W. C., Rabinovitch, P. S., Prolla, T. A. und Loeb, L. A. (2007). "Mitochondrial point mutations do not limit the natural lifespan of mice." Nature genetics **39**(4): 540-543.
- Vermulst, M., Bielas, J. H. und Loeb, L. A. (2008a). "Quantification of random mutations in the mitochondrial genome." Methods **46**(4): 263-268.
- Vermulst, M., Wanagat, J., Kujoth, G. C., Bielas, J. H., Rabinovitch, P. S., Prolla, T. A. und Loeb, L. A. (2008b). "DNA deletions and clonal mutations drive premature aging in mitochondrial mutator mice." Nature genetics **40**(4): 392-394.
- Vohr, H.-W., (2010). Toxikologie. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **1. Auflage**, Weinheim.
- Wake, N., Isaacs, J. und Sandberg, A. A. (1982). "Chromosomal changes associated with progression of the Dunning R-3327 rat prostatic adenocarcinoma system." Cancer Res **42**(10): 4131-4142.
- WHO (2006). Transgenic animal mutagenicity assays. Geneva. **Environmental Health Criteria 233**.
- Widada, J., Nojiri, H., Kasuga, K., Yoshida, T., Habe, H. und Omori, T. (2001a). "Quantification of the carbazole 1,9a-dioxygenase gene by real-time competitive PCR combined with co-extraction of internal standards." FEMS microbiology letters **202**(1): 51-57.
- Widada, J., Nojiri, H., Kasuga, K., Yoshida, T., Habe, H. und Omori, T. (2001b). "Quantification of the carbazole 1,9a-dioxygenase gene by real-time competitive PCR combined with co-extraction of internal standards." FEMS Microbiol Lett **202**(1): 51-57.
- Wright, J. H., Modjeski, K. L., Bielas, J. H., Preston, B. D., Fausto, N., Loeb, L. A. und Campbell, J. S. (2011). "A random mutation capture assay to detect genomic point mutations in mouse tissue." Nucleic acids research **39**(11): e73.
- Wu, J. H., Zhang, S. H., Nickerson, J. M., Gao, F. J., Sun, Z., Chen, X. Y., Zhang, S. J., Gao, F., Chen, J. Y., Luo, Y., Wang, Y. und Sun, X. H. (2015a). "Cumulative mtDNA damage and mutations contribute to the progressive loss of RGCs in a rat model of glaucoma." Neurobiol Dis **74**: 167-179.
- Wu, J. H., Zhang, S. H., Nickerson, J. M., Gao, F. J., Sun, Z., Chen, X. Y., Zhang, S. J., Zhang, R., Gao, F., Chen, J. Y., Luo, Y., Wang, Y. und Sun, X. H. (2015b). "Cumulative mtDNA damage and mutations contribute to the progressive loss of RGCs in a rat model of glaucoma." Neurobiol Dis **74**: 167-179.
- Yavachev, L. P., Georgiev, O. I., Braga, E. A., Avdonina, T. A., Bogomolova, A. E., Zhurkin, V. B., Nosikov, V. V. und Hadjiolov, A. A. (1986). "Nucleotide sequence analysis of the spacer regions flanking the rat rRNA transcription unit and identification of repetitive elements." Nucleic acids research **14**(6): 2799-2810.
- Zettner, M. A., Flor, S., Ludewig, G., Wagner, J., Robertson, L. W. und Lehmann, L. (2007). "Quinoid metabolites of 4-monochlorobiphenyl induce gene mutations in cultured Chinese hamster v79 cells." Toxicol Sci **100**(1): 88-98.
- Zheng, L., Dai, H., Zhou, M., Li, M., Singh, P., Qiu, J., Tsark, W., Huang, Q., Kernstine, K., Zhang, X., Lin, D. und Shen, B. (2007). "Fen1 mutations result in autoimmunity, chronic inflammation and cancers." Nature medicine **13**(7): 812-819.
- Zheng, W., Khrapko, K., Coller, H. A., Thilly, W. G. und Copeland, W. C. (2006). "Origins of human mitochondrial point mutations as DNA polymerase gamma-mediated errors." Mutat Res **599**(1-2): 11-20.

8. Anhang

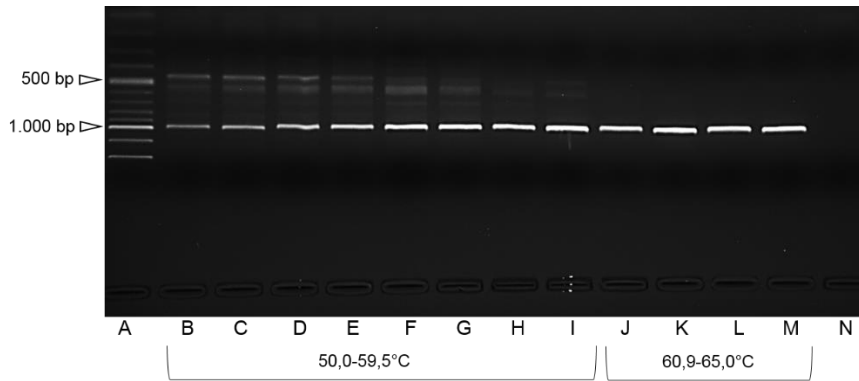
Zielsequenzen für den RMCA

TP53-Gen auf der nukleären DNA

Anhang Tabelle 1 Übersicht der entwickelten Primer und deren Eigenschaften für die Zielsequenzen im TP53-Gen. Alle Angaben zu Länge, Schmelztemperatur (T_m), GC-Gehalt, der Amplifikatlänge sowie den Sekundärstrukturen basieren auf den Programmen: „Primer3Plus“ (frei zugänglich unter <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), „PCR Primer STATS XHTML 1.0“ (frei downloadbar unter http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html), „Primer Express® 3.0“ (Applied Biosystems™) sowie dem Oligo-Order Tool von Sigma Aldrich (https://www.sigmaaldrich.com/configurator/servlet/DesignTool?prod_type=STANDARD; Stand 14.10.2016). F, *forward*-Primer; R, *reverse*-Primer; T, *TaqMan*®-Sonde; HP, *Hair pin*; SD, *self-dimer*; CD, *cross-dimer*; ✓, vorhanden; x, nicht vorhanden.

	Primer	Sequenz (5'→3')	Länge (bp)	T _m (°C)	GC (%)	Amplifikat-Länge (bp)	Sekundärstruktur		
							HP	SD	CD
Intron 1 TP53	F Sonde	tgctgggtgatgggaact	18	60,0	55,6	728	x	x	✓
	R Sonde	cggactgcacttaggacctc	20	59,9	60,0		x	✓	
	F Mutant	taagaccccgtagcatcctg	20	60,1	55	382	x	x	✓
	R Mutant	tttctccccttgctactcc	21	59,7	47,6		x	x	
	F Kopie	tccaaggaagcctgaagca	20	60,0	50,0		x	x	
	R Kopie	ctgcaagcggcagaaatgtaa	22	59,2	50,0	135	✓	✓	✓
T Kopie	agcgggtgctagccagaagtgttggcc	26	70,0	58,0		✓	✓		
Exon 9 TP53	F Sonde	acaagctggcagggaaatg	20	58,8	50,0	817	x	✓	✓
	R Sonde	agtagtaagacttcataggaccct	24	58,6	42,5		x	✓	
	F Mutant	cagctcaagttgggatca	19	59,8	52,6	353	X	✓	✓
	R Mutant	gccagggtgagtaaccata	20	60,1	55,0		x	x	
	F Kopie	gttccgagagctgaatgagg	20	60,0	55,0		x	✓	
	R Kopie	gtgctcaggaggtcagg	18	59,3	66,7	138	x	x	✓
T Kopie	cgtgctgccgaggagtcagg	20	69,0	70,0		✓	✓		

Anhang

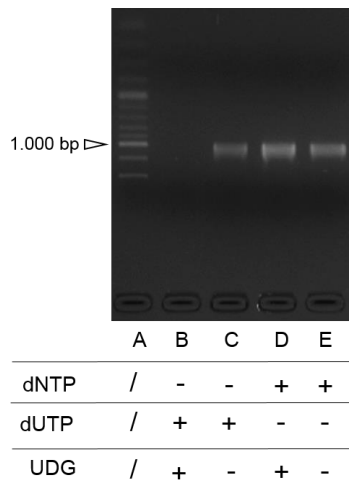


Anhang Abbildung 1 Bestimmung der optimalen *Annealing*-Temperatur des Primerpaares P1 und P2 (TP53-Sonde) bei einem Temperaturgradienten von 50-65°C. Für die PCR wurden 50 ng genomische DNA einer F344-Ratten-Leber/Ansatz verwendet. Dargestellt sind eine 100 bp Leiter (A), die PCR-Produkte (B-M) sowie der Blindwert (N) nach Agarose-Gelelektrophorese (1,5%; 1 h; 5 V/cm) in 1x TAE-Puffer und Färbung mit SYBR®-Green (1 ng/µl).

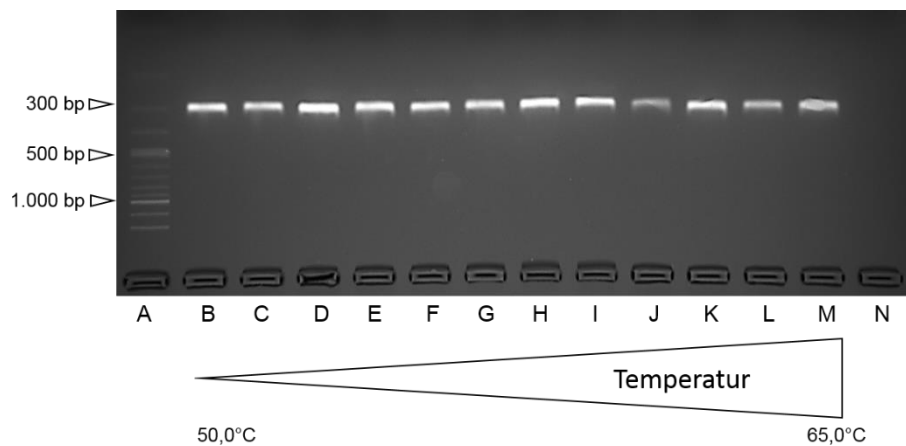


Anhang Abbildung 2 Sequenzierung der TP53-Sonde. Dargestellt ist der Vergleich zwischen der Originalsequenz (Ensembl-Nummer ENSRNOG0000010756; jeweils Zeile 1), dem Sense-Strang (jeweils Zeile 2) sowie dem Antisense-Strang (jeweils Zeile 3). Umrandet sind die Positionen der Primer (P1 und P2) und der *TaqI*-Schnittstellen. Die Einzeichnung der vertikalen Striche grenzt das Intron 1 vom Exon 2 und dem Intron 2 ab. Die Sterne (*) markieren einen Abschnitt von jeweils 10 Basenpaaren.

Anhang

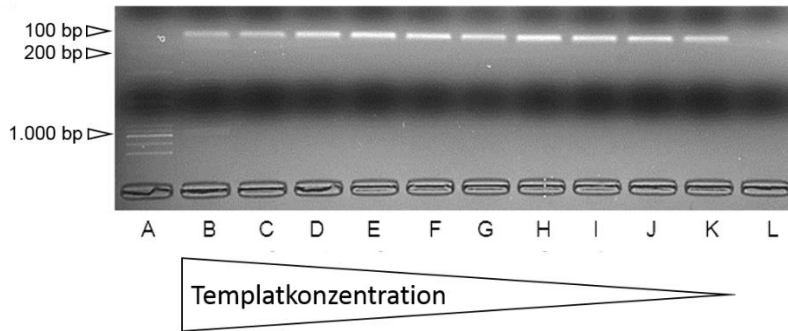


Anhang Abbildung 3 Verifizierung der Uracil-haltigen TP53-Sonde auf Produktentstehung und Verdaubarkeit mit Uracil-DNA-Glykosylase-(UDG). Vergleichend dargestellt sind die PCR-Produkte welche mit Gesamt-DNA aus F344-Rattenleber (50 ng/PCR-Ansatz), dem Primerpaar P1/P2 und wahlweise einem dNTP- oder dUTP-Mix erhalten wurden. Für die Prüfung, ob tatsächlich dUTP in die Sequenz eingebaut wurde, erfolgte ein UDG-Verdau. +, im Reaktionsansatz enthalten; -, nicht im Reaktionsansatz enthalten. Spur A: 100 bp Leiter. Die Detektion erfolgte mit Agarose-Gelelektrophorese (1,5%; 1 h; 5 V/cm) in 1x TAE-Puffer und Färbung mit SYBR®-Green (1 ng/μl).

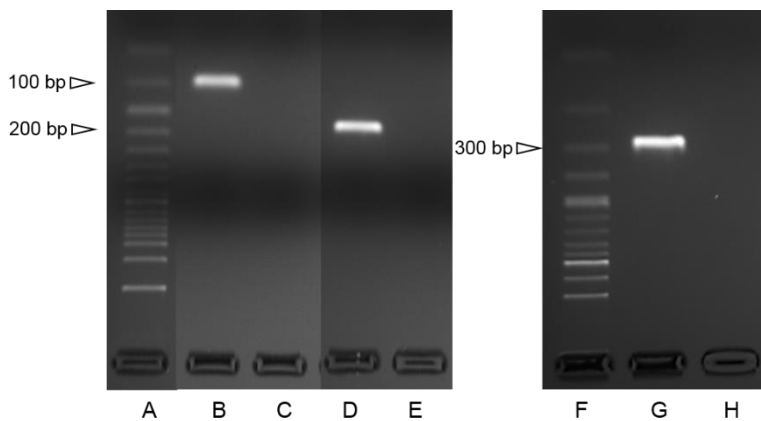


Anhang Abbildung 4 PCR-Produkte (278 bp) des Primerpaares P7/P8 (Primerpaar Mutant Exon 2) mit TP53-Sonde als Templat ($3,06 \cdot 10^6$ Kopien/PCR-Ansatz) und einem *Annealing*-Temperaturgradient von 50-65°C nach Agarose-Gelelektrophorese (1,5%; 1 h; 5 V/cm) in 1x TAE-Puffer und Färbung mit SYBR®-Green (1 ng/μl). Spur A: 100 bp Leiter.

Anhang

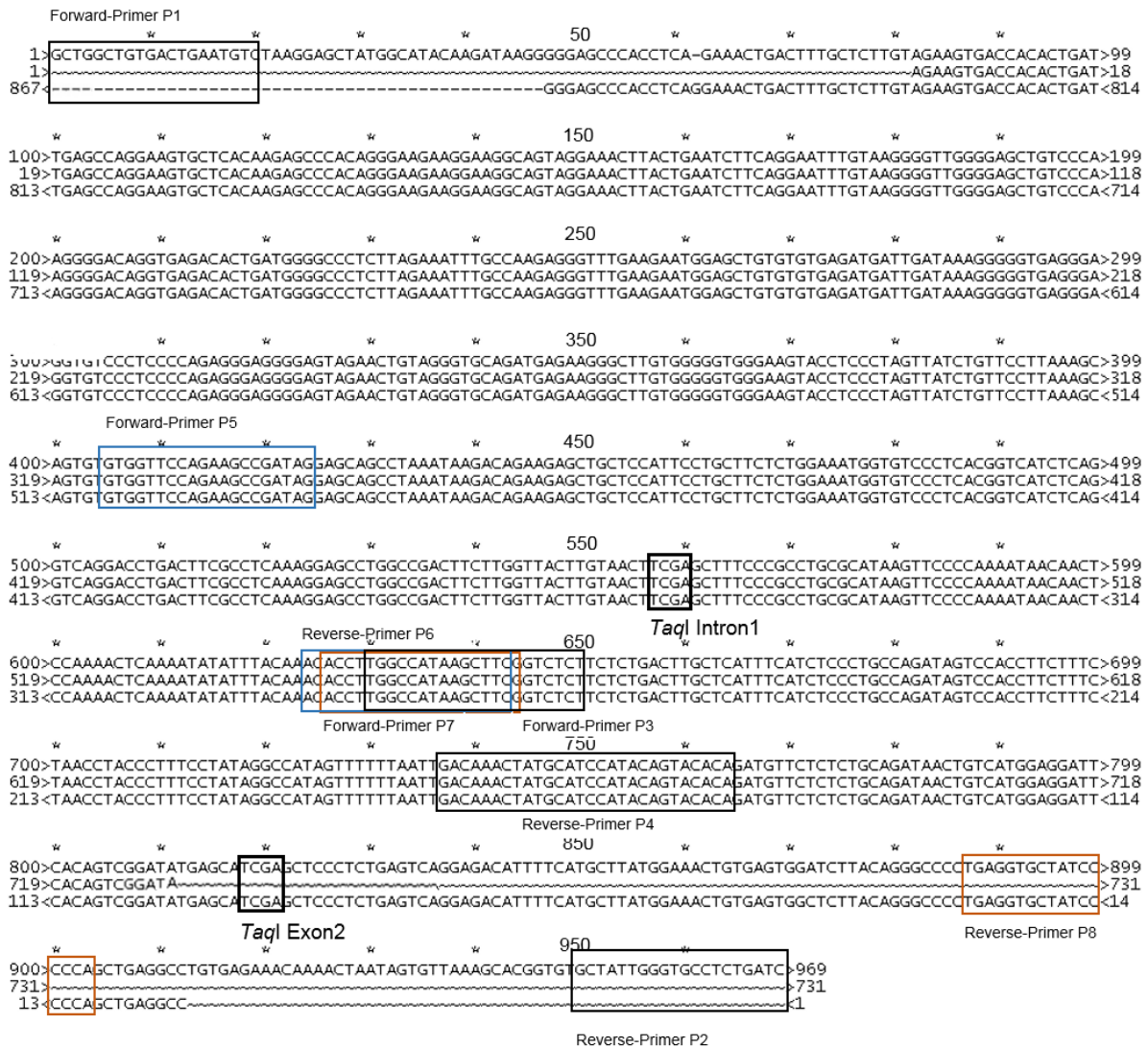


Anhang Abbildung 5 PCR-Produkte (135 bp) des Kopiezahl-Primerpaares P3/P4 mit unterschiedlichen Mengen an TP53-Sonde als Templat ($4,78 \cdot 10^{10}$ Kopien Spur B bis $2,45 \cdot 10^4$ Kopien Spur K) und 65°C *Annealing*-Temperatur nach Agarose-Gelelektrophorese (1,5%; 1 h; 5 V/cm) in 1x TAE-Puffer und Färbung mit SYBR®-Green (1 ng/ μl). Spur A: 100 bp Leiter, Spur L: Blindwert. Die Produktbanden der Spuren D-K wurden für die Sequenzierung verwendet.



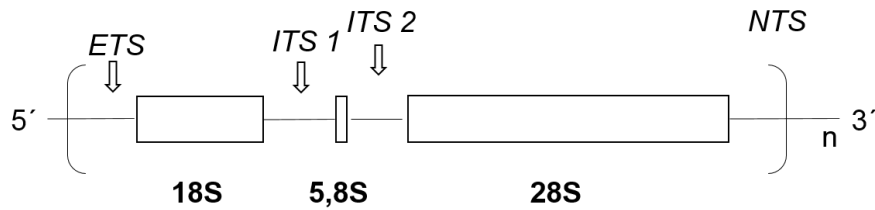
Anhang Abbildung 6 PCR-Produkte mit TP53-Sonde ($2,03 \cdot 10^6$ Kopien/PCR-Ansatz) hergestellt aus Gesamt-DNA aus Leber einer SD-Ratte als Templat sowie dem Primerpaar P3/P4 (Kopiezahl-Produkt 135 bp, Spur B), P5/P6 (Mutations-Produkt Intron 1, 239 bp, Spur D) oder P7/P8 (Mutations-Produkt Exon 2, 278 bp, Spur G). Blindwerte: Spur C, E und H. Spur A: 50 bp Leiter, Spur F: 100 bp Leiter. Detektion: Agarose-Gelelektrophorese (1,5%; 1 h; 5 V/cm) in 1x TAE-Puffer und Färbung mit SYBR®-Green (1 ng/ μl).

Anhang



Anhang Abbildung 7 Sequenzierung der TP53-Sonde mit Gesamt-DNA isoliert aus der Leber einer SD-Ratte als Templat sowie dem Primerpaar P1/P2. Dargestellt ist der Vergleich zwischen der Originalsequenz (Ensembl-Nummer ENSRNOG0000010756; jeweils Zeile 1), dem Sense-Strang (jeweils Zeile 2) sowie dem Antisense-Strang (jeweils Zeile 3). Umrandet sind die Positionen der Primer (P1 und P2), der TaqI-Schnittstellen sowie der Mutations- (P5/P6, blau bzw. P7/P8, braun) und Kopiezahlprimer (P3/P4). Die Sterne (*) markieren einen Abschnitt von jeweils 10 Basenpaaren.

18S rDNA



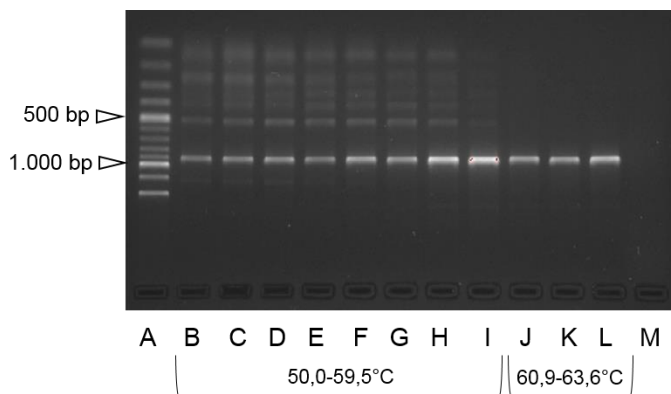
L (bp)	1874	156	4786
<i>TaqI</i> (n)	8	3	4
Σ ES (n)	5	0	12
$\Sigma F(TaqI)$	3	3	3

Anhang Abbildung 8 Organisation der rDNA von *Rattus norvegicus*. Eine wiederholende Einheit umfasst den *external transcribed spacer* (ETS), das 18S-Gen (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NR_046237.1), den *internal transcribed spacer 1* (ITS 1, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/J00781.1>), das 5,8S-Gen (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NR_046238.1), den *internal transcribed spacer 2* (ITS 2, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/J00781.1>), das 28S-Gen (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NR_046246.1) sowie einen *nontranscribed spacer* (NTS). Konservierte Sequenzen sind **fett** hervorgehoben; nicht konservierte Sequenzen *kursiv*. Des Weiteren sind die Länge (L) sowie die Anzahl der *TaqI*-Erkennungssequenzen als auch die Gesamtanzahl der Erkennungssequenzen (Σ ES) der üblicherweise im RMCA verwendeten Restriktionsenzyme (*Bam*HI, *Eco*RI, *Eco*RV, *Pvu*II, *Rsa*I) der konservierten Regionen angegeben. Zudem ist die Anzahl der Fragmente, welche eine *TaqI*-Erkennungssequenz enthalten ($\Sigma F(TaqI)$) angegeben. Auf Grund zu kurzer Sequenzlängen oder zu nahe beieinander liegender *TaqI*-Erkennungssequenzen innerhalb dieser Fragmente kamen die 5,8S und die 28S rDNA nicht in Frage. Lediglich eins (Fragment Nummer 4) von drei Verdau-Fragmenten mit *TaqI*-Erkennungssequenzen innerhalb der 18S rDNA war für eine Primerpositionierung geeignet.

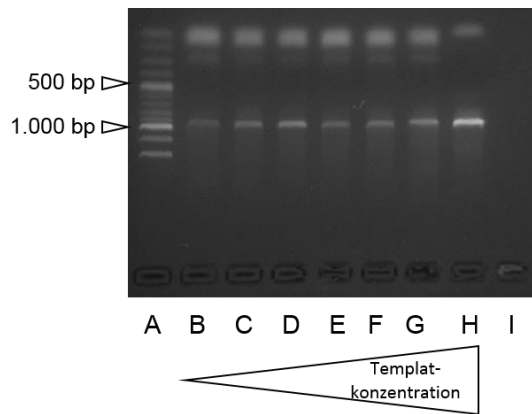
Anhang

Anhang Tabelle 2 Sequenzabschnitte (SA) der 1874 bp-langen 18S rDNA (GenBank: X01117.1), welche durch den gleichzeitigen Restriktionsverdau mit *RsaI* (GT/AC), *Bam*HI (G/GATCC) und *Eco*RI (G/AATTC) entstehen. Angegeben sind die Positionen und die Gesamtlänge (L) der Sequenzabschnitte innerhalb 18S rDNA sowie die für den Schnitt der Sequenz verantwortlichen Restriktionsenzyme. Ob ein Sequenzabschnitt für die Entwicklung der molekularbiologischen Werkzeuge ([Kapitel 6.5.1](#)) geeignet ist, wurde vereinfacht durch x (\triangleq nein) und \checkmark (ja) dargestellt.

SA	Bp Position	Restriktionsenzym	L (bp)	Längen- kriterium	<i>TaqI</i> -Schnittstelle (Anzahl)
1	0-63	<i>RsaI</i>	63	x	x
2	64-76	<i>RsaI</i> - <i>Bam</i> HI	13	x	x
3	77-590	<i>Bam</i> HI - <i>Eco</i> RI	514	x	\checkmark (4)
4	591-1644	<i>Eco</i> RI - <i>RsaI</i>	1054	\checkmark	\checkmark (3)
5	1645-1699	<i>RsaI</i> - <i>RsaI</i>	55	x	x
6	1700-1874		175	x	\checkmark (1)

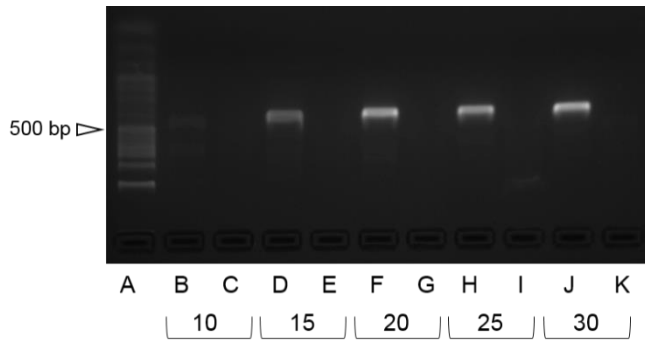


Anhang Abbildung 9 Bestimmung der optimalen *Annealing*-Temperatur des Primerpaares a/b (18S-Sonde) bei einem Temperaturgradienten von 50-63,6°C. Für die PCR wurden 50 ng genomische DNA einer F344-Ratten-Leber/Ansatz verwendet. Dargestellt sind eine 100 bp Leiter (A), die PCR-Produkte (B-L) sowie der Blindwert (M) nach Agarose-Gelelektrophorese (1,5%; 1 h; 5 v/cm) in 1x TAE-Puffer und Färbung mit SYBR-Green (1 ng/ μ l).

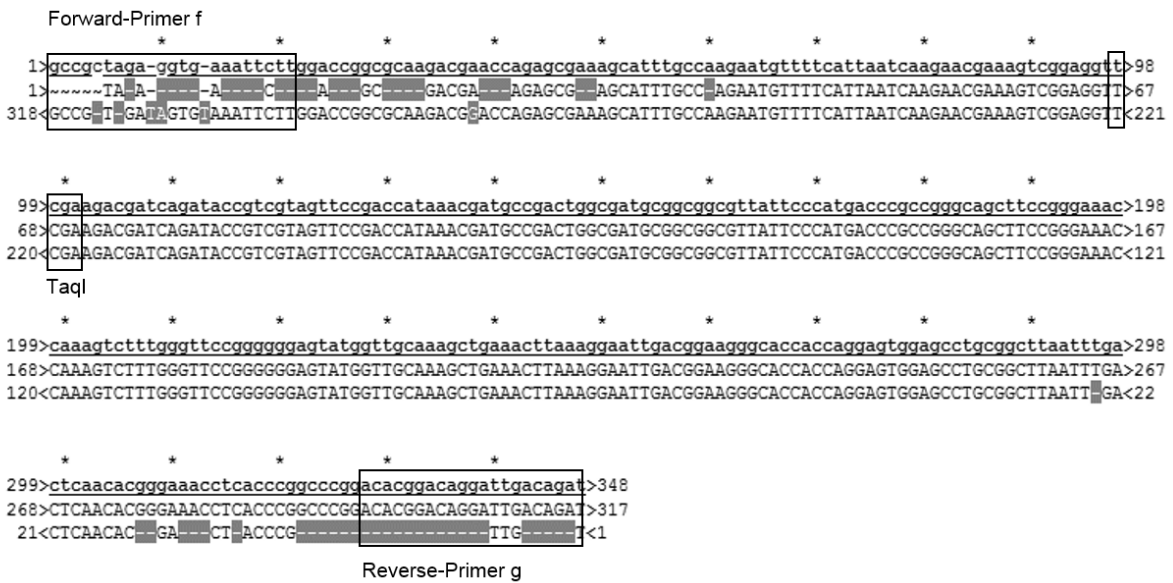


Anhang Abbildung 10 PCR-Produkte des Primerpaares a/b (18S-Sonde) mit unterschiedlichen Mengen an 18S-Sonde als Templat ($7,5 \cdot 10^8$ Kopien Spur B bis $5,0 \cdot 10^{10}$ Kopien Spur H) und $63,6^\circ\text{C}$ *Annealing*-Temperatur nach Agarose-Gelelektrophorese (1,5%; 1 h; 5 v/cm) in 1x TAE-Puffer und Färbung mit SYBR®-Green (1 ng/ μl). Spur A: 100 bp Leiter, Spur I: Blindwert.

Anhang

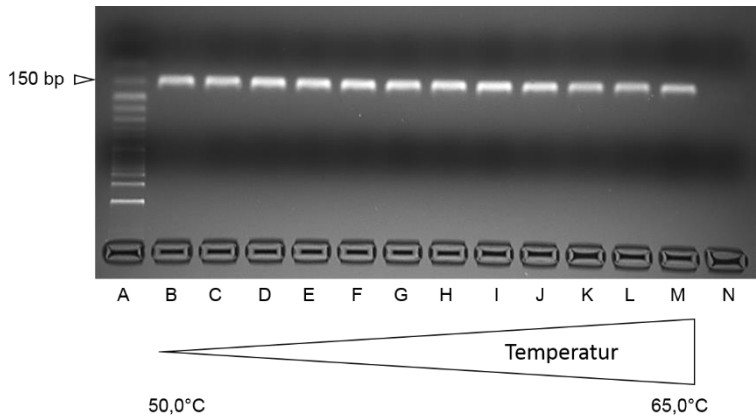


Anhang Abbildung 12 Zyklenabhängigkeit der PCR-Produkt-Entstehung (Mutations-Produkt). Dargestellt sind die Amplifikate nach 10,15,20,25 und 30 Zyklen, welche aus dem Primerpaar f/g (Primerpaar-Mutanten, 18S rDNA) mit 10 ng 18S-Sonde/Ansatz und 62,2°C *Annealing*-Temperatur resultieren. Die Detektion erfolgte nach Agarose-Gelelektrophorese (1,5%; 1 h; 5 v/cm) in 1x TAE-Puffer durch Färbung mit SYBR-Green (1 ng/μl). Spur A: 50 bp-Leiter, Spuren B, D, F, H, J, PCR-Produkte; Spuren C, E, G, I, K; zugehörige Blindwerte.

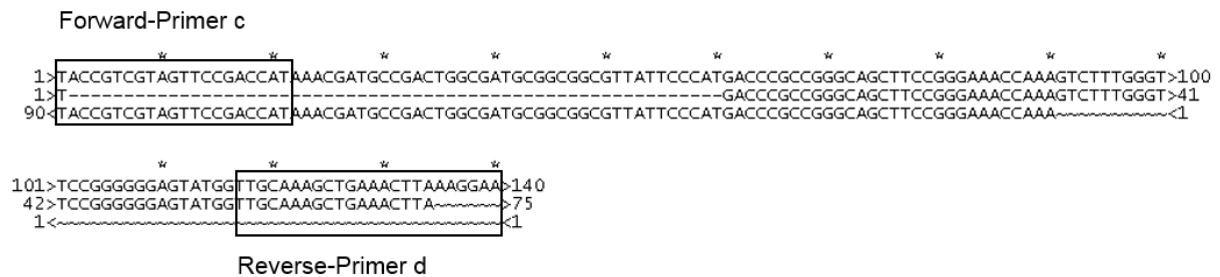


Anhang Abbildung 13 Vergleich der Originalsequenz (GenBank: X01117.1, Zeile 1) des Mutations-Produktes in der 18S rDNA mit dem Sequenzierungsergebnis des forward-Primers f (Sense-Strang, Zeile 2) und des reverse Primers g (Antisense-Strang, Zeile 3). Mit Kästchen markiert sind die Positionen der Primer sowie der TaqI-Schnittstelle. Die Sterne (*) markieren einen Abschnitt von jeweils 10 Basenpaaren.

Anhang



Anhang Abbildung 14 PCR-Produkte des Primerpaares c/d (Kopiezahl) mit 50 ng Gesamt-DNA/PCR-Ansatz als Templat bei einem *Annealing*-Temperaturgradient von 50-65°C. Die Detektion erfolgte nach Agarose-Gelelektrophorese (1,5%; 1 h; 5 v/cm) in 1x TAE-Puffer durch Färbung mit SYBR®-Green (1 ng/μl). Spur A: 50 bp Leiter.



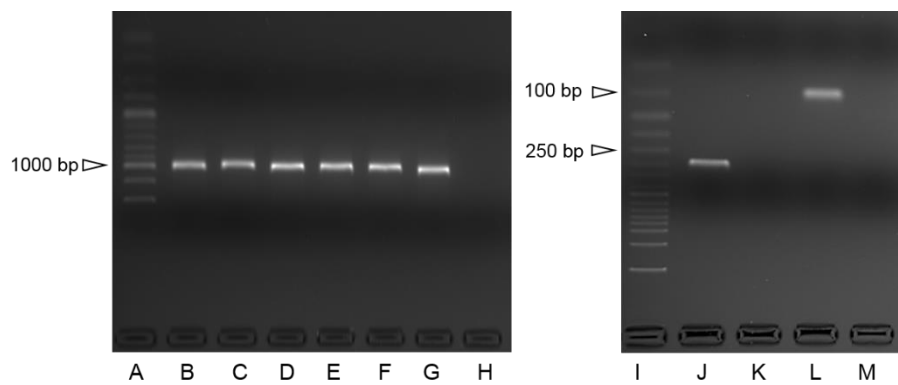
Anhang Abbildung 15 Vergleich der Originalsequenz (GenBank: X01117.1, Zeile 1) des Kopiezahl-Produktes in der 18S rDNA mit dem Sequenzierungsergebnis des forward-Primers c (Sense-Strang, Zeile 2) und des reverse Primers d (Antisense-Strang, Zeile 3). Mit Kästchen markiert sind die Positionen der Primer. Die Sterne (*) markieren einen Abschnitt von jeweils 10 Basenpaaren.

Anhang



Anhang Abbildung 16 Sequenzierung der 18S-Sonde hergestellt aus Gesamt-DNA (isoliert aus der Leber einer SD-Ratte) als Templat sowie dem Primerpaar a/b. Dargestellt ist der Vergleich zwischen der Originalsequenz (GenBank: X01117.1; jeweils Zeile 1), dem Sense-Strang (jeweils Zeile 2) sowie dem Antisense-Strang (jeweils Zeile 3). Umrandet sind die Positionen aller für den RMCA benötigten Primerpaare (Sonden-Primer a/b; Mutations-Primer f/g; Kopiezahl-Primer c/d) sowie der TaqI-Schnittstellen. Die Sterne (*) markieren einen Abschnitt von jeweils 10 Basenpaaren.

Anhang



Anhang Abbildung 17 PCR-Produkte hergestellt mit Gesamt-DNA -isoliert aus Leber einer SD-Ratte- (50 ng/PCR-Ansatz; Abbildung links) oder mit 18S-Sonde ($2,13 \cdot 10^6$ Kopien/PCR-Ansatz; Abbildung rechts) als Templat sowie dem Primerpaar a/b (Sonde, 930 bp, Spuren B-G), Primerpaar f/g (Mutations-Produkt, 248 bp, Spur J), Primerpaar c/d (Kopiezahl-Produkt, 140 bp, Spur L). Blindwerte: Spur H, K und M. Größenmarker: 100 bp-Leiter (Spur A) und 50 bp-Leiter (Spur I). Die Detektion erfolgte nach Agarose-Gelelektrophorese (1,5%; 1 h; 5 v/cm) in 1x TAE-Puffer durch Färbung mit SYBR-Green (1 ng/ μ l).

Anhang

mtDNA

Anhang Tabelle 3 Tabellarische Übersicht aller Gene inklusive deren Position innerhalb der mitochondrialen DNA von *Rattus norvegicus*. Für die Bewertung, ob die Gene als Zielsequenz für den RMCA in Betracht kommen, wurden die die Gene nach ihrer Gesamtlänge (L), sowie dem Vorhandensein einer *TaqI*-Schnittstelle (Angabe der genauen Position) sortiert.

	L	Gen	Position	<i>TaqI</i> -Schnittstelle
	31	ori	5140-5170	x
	60	tRNA-Ser	11591-11650	x
	64	tRNA-Lys	7678-7741	x
	66	tRNA-Trp	4928-4993	x
	66	tRNA-Tyr	5242-5307	x
	67	tRNA-Phe	1-67	x
	67	tRNA-Thr	15268-15334	x
	68	tRNA-Met	3824-3891	x
	68	tRNA-Cys	5171-5238	5201-5204 5214-5217
Zu kurz	68	tRNA-Gly	9368-9435	x
	68	tRNA-Asp	6922-6989	x
	68	tRNA-Arg	9785-9852	9815-9818
	68	tRNA-His	11523-11590	x
	68	tRNA-Pro	15336-15403	x
	69	tRNA-Val	1026-1094	x
	69	tRNA-Ile	3684-3752	x
	69	tRNA-Ala	4995-5063	x
	69	tRNA-Glu	14050-14118	x
	70	tRNA-Ser	6850-6919	6866-6869
	71	tRNA-Gln	3750-3820	x
	71	tRNA-Leu	11650-11720	x
	74	tRNA-Asn	5066-5139	x
	75	tRNA-Leu	2654-2728	x
Keine <i>TaqI</i>	204	ATPase subunit 8	7743-7946	x
	297	NADH subunit 4L	9855-10151	x
	519	NADH subunit 6	13531-14049	x
	348	NADH subunit 3	9436-9783	9557-9560 9629-9632
	681	ATPase subunit 6	7904-8584	8334-8337
	684	Cytochrom c oxidase II	6991-7674	7646-76491
	784	Cytochrom c oxidase III	8584-9367	9128-9131
	897	D-loop	15404-16300	15834-15837 16004-16007
	957	12S rRNA	69-1025	634-637
	957	NADH subunit 1	2729-3685	3310-3313 3321-3324 3366-3369
Geeignet				3547-3550 3568-3571
	1038	NADH subunit 2	3892-4929	4773-4776
	1143	Cytochrome b	14124-15266	14179-14182 14605-14608
	1378	NADH subunit 4	10145-11522	10509-10512 11179-11182
	1545	Cytochrom-c oxidase I	5309-6853	5419-5422 5967-5970 6822-6825
	1559	16S rRNA	1095-2653	1426-1429 2396-2399 2418-2421
	1833	NADH subunit 5	11721-13553	12788-12791/ 12907-12910

Anhang

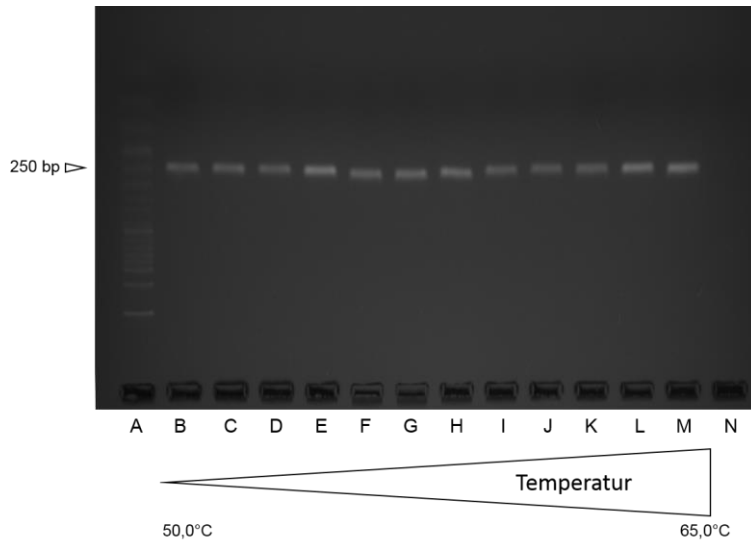
Anhang Tabelle 4 Parameter zur Anwendung des Programmes Primer-BLAST bei der Prüfung der Kopiezahl-Primer der Zielsequenzen im mt-Cytb- sowie des TP53-Gens.

Parameter	Werte
<i>Database</i>	<i>Genome (chromosomes from all organisms)</i>
<i>Organism</i>	<i>Rattus norvegicus (taxid: 10116)</i>
<i>at least x total mismatches to untended targets</i>	2 - 6
<i>including at least x mismatches</i>	2 - 6
<i>within the last x bps</i>	5 - 22
<i>ignore targets with $\geq x$ mismatches to the Primer</i>	6 - 9
<i>Max target size</i>	6000

Anhang Tabelle 5 Ergebnisse des Primer-BLAST der mtDNA-Kopiezahl-Primer h/i gegen die n- als auch mtDNA von *Rattus norvegicus*. Angegeben sind das Templat sowie der Lokus der Zielsequenz, die Primerkombination, deren Fehlpaarungen gegenüber dem Templat sowie die Amplifikatlänge.

Templat	Primer	Fehlpaarungen	Amplifikat (bp)
mtDNA (Cyt b)	FW/RV	0/0	151
nDNA (Chromosom 1)	FW/FW	8/7	2778
nDNA (Chromosom 3)	FW/FW	7/6	3886
nDNA (Chromosom 5)	FW/RV	8/5	4169
nDNA (Chromosom 6)	FW/RV	8/5	696
nDNA (Chromosom 8)	FW/FW	7/7	3020
nDNA (Chromosom 9)	RV/RV	5/5	4794
nDNA (Chromosom 19)	FW/FW	7/7	2533

Anhang



Anhang Abbildung 18 PCR-Produkte des Primerpaares k/l (Mutanten-Primer mtDNA) mit 50 ng Gesamt-DNA einer SD-Rattenleber/PCR-Ansatz als Templat bei einem *Annealing*-Temperaturgradient von 50-65°C. Spur A: 50 bp Leiter; Spur N: Blindwert. Die Detektion erfolgte nach Agarose-Gelelektrophorese (1,5%; 1 h; 5 v/cm) in 1x TAE-Puffer durch Färbung mit SYBR®-Green (1 ng/µl).

Forward-Primer k

```

1>TCCATGTGGGACGAGGACTATATCTATGGATCCTACACTTTCCTAGAAACCTGAAACATTGGGATCATCCTACTATTGCGAGTCATAGCAACTGCATTCA>100
1>~~~~~AAACATTGGGATCATCCTACTATTGCGAGTCATAGCAACTGCATTCA>48
187<~~~~~AGGACTATATCTATGGATCCTACACTTTCCTAGAAACCTGAAACATTGGGATCATCCTACTATTGCGAGTCATAGCAACTGCATTCAI<101

```

101>GGGCTATGTACTCCCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGAGCTACAGTAATTACAAACCTATTATCAGCTATCCCTTACATTGGGACTACCCCTAGTCGAA>200
49>GGGCTATGTACTCCCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGAGCTACAGTAATTACAAACCTATTATCAGCTATCCCTTACATTGGGACTACCCCTAGTCGAA>148
100<GGGCTATGTACTCCCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGAGCTACAGTAATTACAAACCTATTATCAGCTATCCCTTACATTGGGACTACCCCTAGTCGAA<1

TaqI

```

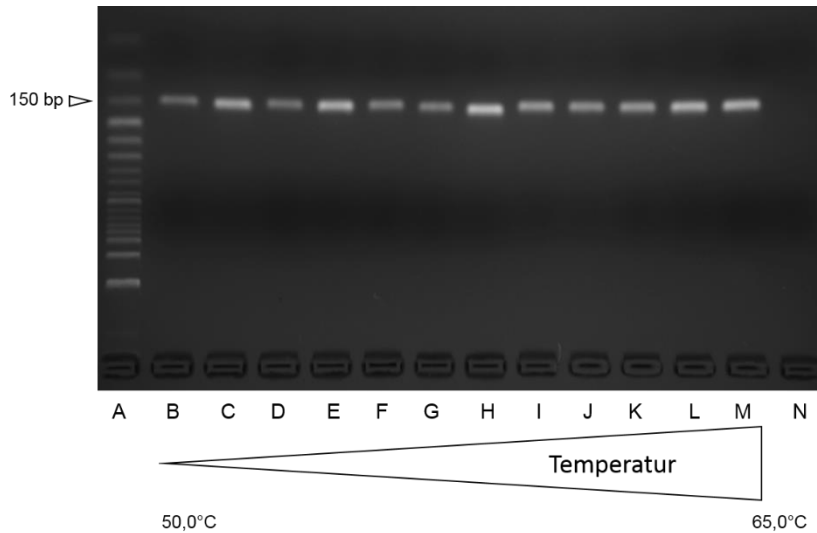
201>TGAATCTGAGGAGGCTTCTCAGTAGACAAAGCAACCCTAACACGC>245
149>TGAATCTGAGGAGGCTTCTCAGTAGACAAAGCA~~~~~>181
1<~~~~~>1

```

Reverse-Primer l

Anhang Abbildung 19 Vergleich der Originalsequenz (GenBank: X14848.1, Zeile 1) des Mutations-Produktes in der mtDNA mit dem Sequenzierungsergebnis des forward-Primers k (Sense-Strang, Zeile 2) und des reverse Primers l (Antisense-Strang, Zeile 3). Mit Kästchen markiert sind die Positionen der Primer sowie der *TaqI*-Schnittstelle. Die Sterne (*) markieren einen Abschnitt von jeweils 10 Basenpaaren.

Anhang



Anhang Abbildung 20 PCR-Produkte des Primerpaares h/i (Kopiezahl Primer mt-DNA) mit 50 ng Gesamt-DNA einer SD-Rattenleber/PCR-Ansatz als Templat bei einem *Annealing*-Temperaturgradient von 50-65°C. Spur A: 50 bp Leiter; Spur N: Blindwert. Die Detektion erfolgte nach Agarose-Gelelektrophorese (1,5%; 1 h; 5 v/cm) in 1x TAE-Puffer durch Färbung mit SYBR®-Green (1 ng/µl).

Forward-Primer h

```

1>CTCAGTAGACAAGCAACCCTAACACGCTTCTTCGCATTCCACTTCATCCTCCCAATCATTATCGCCGCCCTTGCAATTGTACATCTTCTTTCTCCA>99
1>CTCAGTAGACAAGCAACCCTAACACGCTTCTTCGCATTCCACTTCATCCTCCCAATCATTATCGCCGCCCTTGCAATTGTACATCTTCTTTCTCCA>56
108<TCTCAGTAGACAAGCAACCCTAACACGCTTCTTCGCATTCCACTTCATCCTCCCAATCATTATCGCCGCCCTTGCAATTGTACATCTTCITTCCTCCA<9

```

Reverse-Primer i

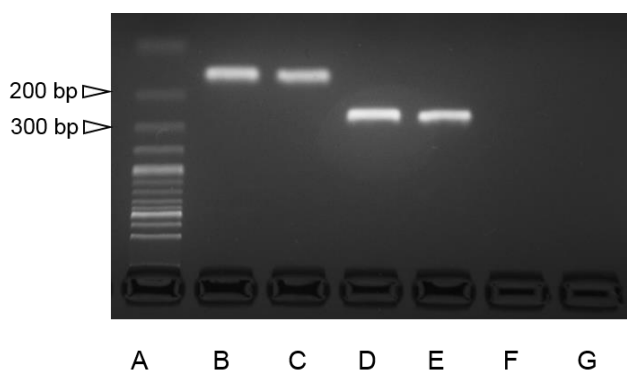
```

100>CGAAACAGGATCAAATAACCCACAGGATTAAGTCCGACGCAGACAAAATC>151
57>CGAAACAGGATCAAATAACCCACAGGATTAAGTCCGACGCAGACAAAATC>108
8<CGAAACAG~<1

```

Anhang Abbildung 21 Vergleich der Originalsequenz (GenBank: X14848.1, Zeile 1) des Kopiezahl-Produktes in der mtDNA mit dem Sequenzierungsergebnis des forward-Primers h (Sense-Strang, Zeile 2) und des reverse-Primers i (Antisense-Strang, Zeile 3). Mit Kästchen markiert sind die Positionen der Primer. Die Sterne (*) markieren einen Abschnitt von jeweils 10 Basenpaaren.

Anhang



Anhang Abbildung 22: Kompatibilitätsprüfung der Primerpaare Kopiezahl- (h/i) und Mutations-Produkt (k/l) der Zielsequenz mt-Cytb. Spur A: 100 bp Leiter, Spur G: Blindwert Mutations-Produkt, Spur F: Blindwert Kopiezahl-Produkt. Die Detektion erfolgte nach Agarose-Gelelektrophorese (1,5%; 1 h; 5 v/cm) in 1x TAE-Puffer durch Färbung mit SYBR®-Green (1 ng/µl).

```

Forward-Primer k
1>TCCATGTGGGACGAGGACTATCTATGGATCCTACACTTTCCTAGAAACCTGAAACATTGGGATCATCCTACTATTTGCAGTCATAGCAACTGCATTCA>100
1>~~~~~AACAATTGGGATCATCCTACTATTTGCAGTCATAGCAACTGCATTCA>47
1>~~~~~GAGGACTATCTATGGATCCTACACTTTCCTAGAAACCTGAAACATTGGGATCATCCTACTATTTGCAGTCATAGCAACTGCATTCA>88

101>GGGCTATGTACTCCCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGAGCTACAGTAATTACAAACCTATTATCAGCTATCCCTTACATTGGGACTACCCCTAGTCGAA>200
48>GGGCTATGTACTCCCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGAGCTACAGTAATTACAAACCTATTATCAGCTATCCCTTACATTGGGACTACCCCTAGTCGAA>147
89>GGGCTATGTACTCCCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGAGCTACAGTAATTACAAACCTATTATCAGCTATCCCTTACATTGGGACTACCCCTAGTCGAA>188
Taql

201>TGAATCTGAGGAGGCTTCTCAGTAGACAAAGCAACCCCTAACACGG>245
148>TGAATCTGAGGAGGCTTCTCAGTAGACAAAGCA~~~~~>180
188>~~~~~>188
Reverse-Primer l
  
```

Anhang Abbildung 23: Sequenzierung des Mutations-Produktes nach PCR mit F344-Ratten-DNA als Templat. Vergleich der Originalsequenz (GenBank: X14848.1, Zeile 1) des Mutations-Produktes in der mtDNA mit dem Sequenzierungsergebnis des forward-Primers k (Sense-Strang, Zeile 2) und des reverse Primers l (Antisense-Strang, Zeile 3). Mit Kästchen markiert sind die Positionen der Primer sowie der *TaqI*-Schnittstelle. Die Sterne (*) markieren einen Abschnitt von jeweils 10 Basenpaaren.

Anhang

```
Forward-Primer h
* * * * *
1>CTCAGTAGACAAAGCAACCCTAACACGCTTCTTCGCATTCCACTTCATCCTCCCATTCATTATCGCCGCCCTTGCAATTGTACATCTTCTTTTCCTCCAC>100
1>~~~~~ACTTCATCCTCCCATTCATTATCGCCGCCCTTGCAATTGTACATCTTCTTTTCCTCCAC>59
1>CTCAGTAGACAAAGCAACCCTAACACGCTTCTTCGCATTCCACTTCATCCTCCCATTCATTATCGCCGCCCTTGCAATTGTACATCTTC-ITTCCTCCAC>100

* * * * *
101>GAAACAGGATCAAATAACCCACAGGATAAACTCCGACGCAGACAAAAT>151
60>GAAACAGGATCAAATAACCCACAGGATAAACTCCGACGCAGACAAAAT>109
101>GAAACAGGATC~~~~~>112

Reverse-Primer i
```

Anhang Abbildung 24 Sequenzierung des Kopiezahl-Produktes nach PCR mit F344-Ratten-DNA. Vergleich der Originalsequenz (GenBank: X14848.1, Zeile 1) des Kopiezahl-Produktes in der mtDNA mit dem Sequenzierungsergebnis des *forward*-Primers h (Sense-Strang, Zeile 2) und des *reverse*-Primers i (Antisense-Strang, Zeile 3). Mit Kästchen markiert sind die Positionen der Primer. Die Sterne (*) markieren einen Abschnitt von jeweils 10 Basenpaaren.

```
Forward-Primer k
* * * * *
2>ccatgtgggacgaggactatactatggatcctacactttcctagaaacctgaaacattgggatcatcctactatttgcagtcatagcaactgcattcatg>101
1>~A-----ACT-----GA-----AC-----TTGGGATCATCCTACTATTTCAGTCATAGCAACTGCATTATG>52
191>CCATGTGGGACGAGGACTATACTATGGATCCTACACTTTCCTAGAAACCTGAAACATTGGGATCATCCTACTATTTCAGTCATAGCAACTGCATTATG<92

* * * * *
102>ggctatgtactcccatgaggacaaatatcattctgaggagctacagtaattacaaacctattatcagctatcccttacattgggactaccctactcgaat>201
53>GGCTATGTACTCCCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGAGCTACAGTAATTACAAACCTATTATCAGCTATCCCTTACATTGGGACTACCCTAGTCGAAT>152
91<GGCTATGTACTCCCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGAGCTACAGTAATTACAAACCTATTATCAGCTATCCCTTACATTGGGACTACCC~><1

* * * * *
202>gaatctgaggaggcttctcagtagcaaaagcaaccctaacacg>244
153>GAATCTGAGGAGGCTTCTCAGTAGCAAGCAACCCTAACACG>195
1<~~~~~>1

Reverse-Primer l
Taql
```

Anhang Abbildung 25 Sequenzierung des Mutations-Produktes nach PCR mit ACI-Ratten-DNA als Templat. Vergleich der Originalsequenz (GenBank: X14848.1, Zeile 1) des Mutations-Produktes in der mtDNA mit dem Sequenzierungsergebnis des *forward*-Primers k (Sense-Strang, Zeile 2) und des *reverse* Primers l (Antisense-Strang, Zeile 3). Mit Kästchen markiert sind die Positionen der Primer sowie der *TaqI*-Schnittstelle. Die Sterne (*) markieren einen Abschnitt von jeweils 10 Basenpaaren.

Anhang

Forward-Primer h

```
1>ctcagtagacaagcaaccctaacagcttcttgcattccaacttcacctcccattcattatcgccgcccttgcaattgtacatcttcttttctccac>100
1>~~~~~AC~~~~~TCCTCCCAATTCATTATCGCCGCCCTTGCAATTGTACATCTTCTTTTCCTCCAC>55
99<CTCAGTAGACAAGCAACCCTAACAGSCTTCTTTCGCATTCCACTTCATCCTCCCAATTCATTATCGCCGCCCTTGCAATTGTACATCTTCTTTCTCCA<2
```

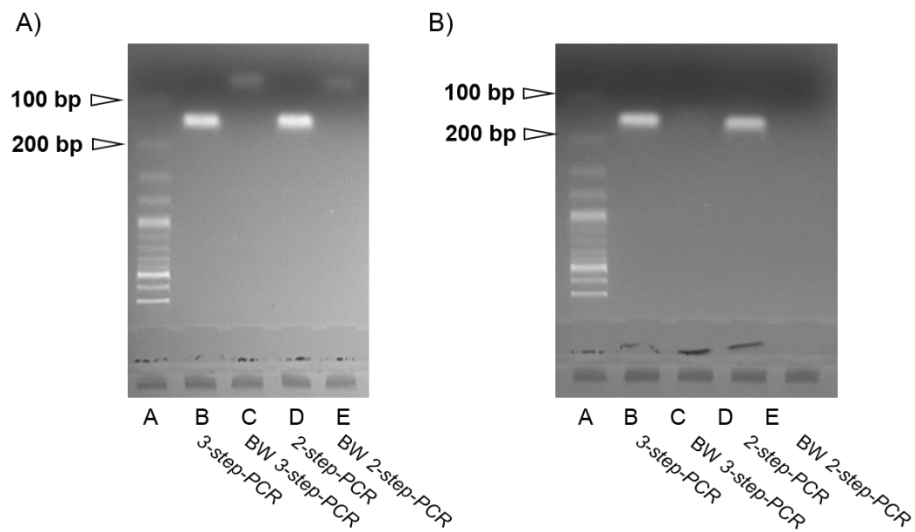
101>gaacacaggatcaaataaccccacaggattaaactccgacgcagacaaaatc>151
56>GAAACAGGATCAAATAACCCCACAGGATTAAGTCCGACGCAGACAAAAT~>105
1<~~~~~C<1

Reverse-Primer i

Anhang Abbildung 26 Sequenzierung des Kopiezahl-Produktes nach PCR mit ACI-Ratten-DNA. Vergleich der Originalsequenz (GenBank: X14848.1, Zeile 1) des Kopiezahl-Produktes in der mtDNA mit dem Sequenzierungsergebnis des *forward*-Primers h (Sense-Strang, Zeile 2) und des *reverse*-Primers i (Antisense-Strang, Zeile 3). Mit Kästchen markiert sind die Positionen der Primer. Die Sterne (*) markieren einen Abschnitt von jeweils 10 Basenpaaren.

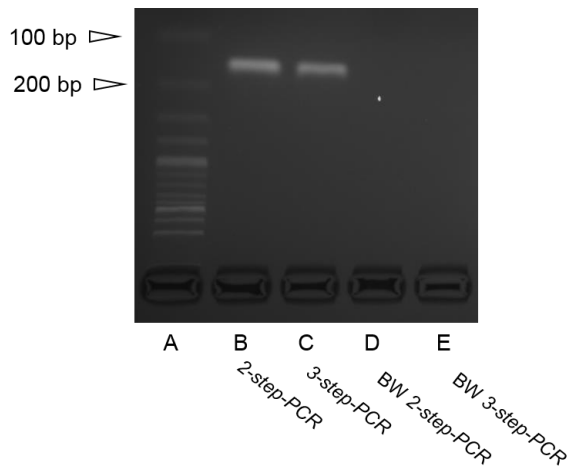
Kopiezahlquantifizierung mittels TaqMan®-basierter Realtime-PCR

Entwicklung einer Realtime-PCR zur Bestimmung der Gesamtkopiezahl



Anhang Abbildung 27 Vergleich eines 2-Stufen (2-step)- mit einem 3-Stufen (3-step)-Temperaturprogrammes. Dargestellt sind die Kopiezahl-Produkte von TP53 (A, 135 bp; $6,07 \cdot 10^6$ Kopien/PCR-Ansatz) und 18S rDNA (B, 140 bp), welche mit der jeweiligen DNA-Sonde als Templat und den dazugehörigen Kopiezahl-Primern hergestellt wurden. Spur A: 100 bp-Leiter. Die Detektion erfolgte nach Agarose-Gelelektrophorese (3%; 1 h; 5 v/cm) in 1x TAE-Puffer durch Färbung mit SYBR-Green (1 ng/ μ l).

Anhang



Anhang Abbildung 28 Vergleich eines 2-Stufen- (2-step)- mit einem 3-Stufen- (3-step)- Temperaturprogrammes zur Kopiezahlquantifizierung. Dargestellt sind die Kopiezahl-Produkte (151 bp), welche mit 50 ng Ratten-Leber-DNA einer SD-Ratte/PCR-Ansatz und den Kopiezahl-Primern für das mt-Cytb-Gen hergestellt wurden. Spur A: 100 bp-Leiter. Die Detektion erfolgte nach Agarose-Gelelektrophorese (3%; 1 h; 5 v/cm) in 1x TAE-Puffer durch Färbung mit SYBR-Green (1 ng/μl).

Anhang Tabelle 6 Vergleich der Amplifikatmenge nach Verwendung eines 2-Stufen- bzw. 3-Stufen-Temperaturprogrammes zur Kopiezahlquantifizierung. Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der Kopiezahl-Produkte aus Anhang Abbildung 27 Anhang Abbildung 28. TQ, *Trace Quantity*.

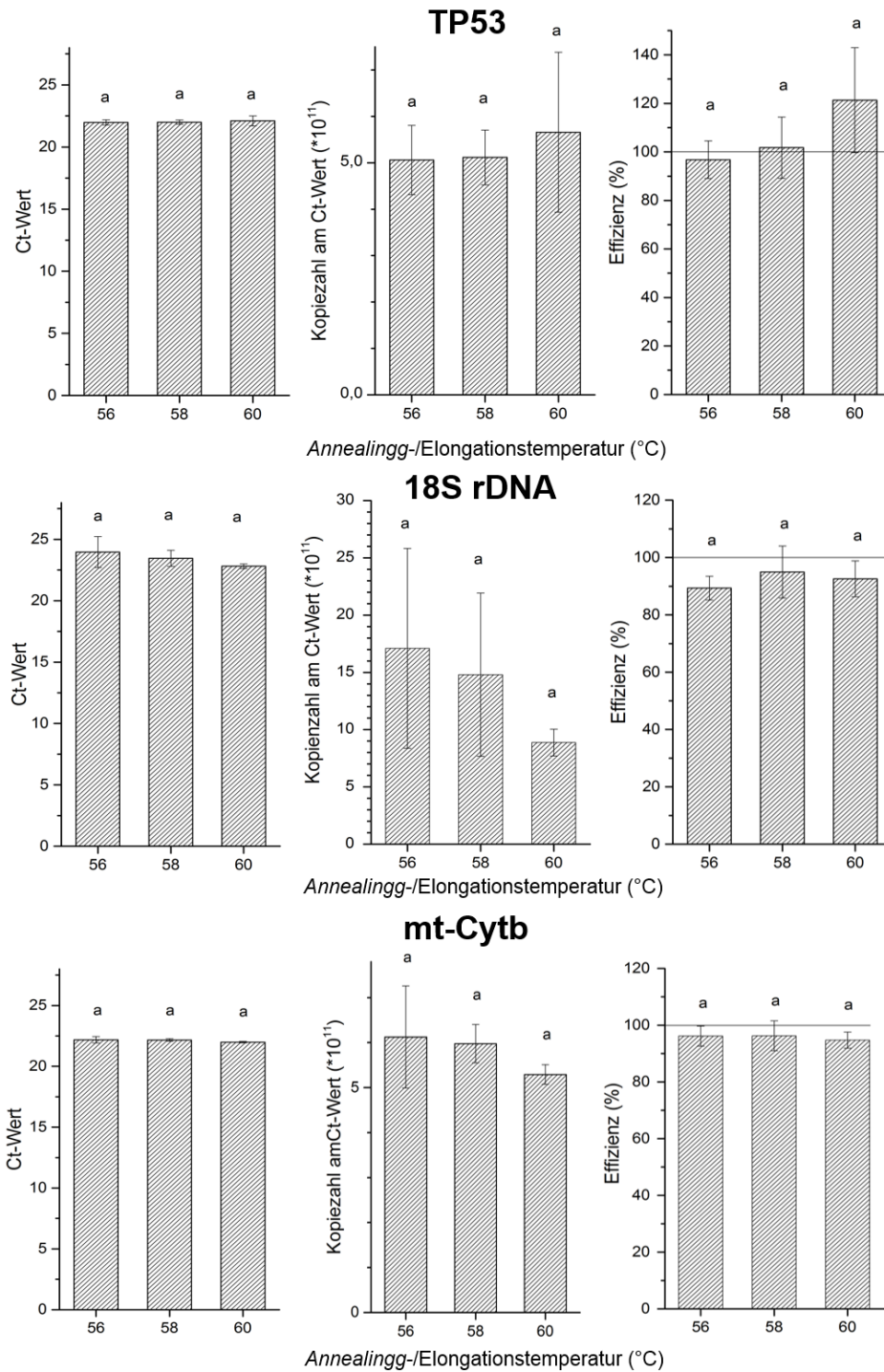
Kopiezahl-Produkt der Zielsequenz	TQ 3-Stufen-Programm (Intensität x mm)	TQ 2-Stufen-Programm (Intensität x mm)
TP53	116260,800	128951,700
18S rDNA	143825,800	126923,000
mt-Cytb	79533,900	85741,900

Anhang

Anhang Tabelle 7 Rohdaten zur Ermittlung der optimalen *Annealing*-/Elongationstemperatur der *TaqMan*®-Sonde und den zugehörigen Kopiezahl-Primern. Ct-Werte, daraus berechnete Kopiezahlen und mit LinRegPCR ermittelte Effizienzen der PCR-Reaktionen der Zielsequenzen im TP53-Gen, der 18S rDNA und dem mt-Cytb-Gen.

<i>Annealing</i> -/Elongationstemperatur (°C)		Ct-Wert	Kopiezahl *10 ¹¹	Effizienz (%)
TP53				
56	Lauf 1	21,99 ± 0,01	5,04 ± 0,05	93,57 ± 15,89
	Lauf 2	21,77 ± 0,04	4,33 ± 0,11	91,16 ± 7,30
	Lauf 3	22,20 ± 0,02	5,82 ± 0,08	105,61 ± 32,92
		21,99 ± 0,21	5,06 ± 0,74	96,78 ± 7,74
58	Lauf 1	22,06 ± 0,09	5,31 ± 0,32	115,05 ± 24,99
	Lauf 2	21,80 ± 0,18	4,45 ± 0,54	90,01 ± 4,72
	Lauf 3	22,14 ± 0,05	5,58 ± 0,19	100,19 ± 2,11
		22,00 ± 0,18	5,12 ± 0,59	101,75 ± 12,59
60	Lauf 1	21,81 ± 0,07	4,46 ± 0,20	115,37 ± 16,19
	Lauf 2	22,57 ± 0,25	7,63 ± 1,30	145,29 ± 4,37
	Lauf 3	21,95 ± 0,02	4,89 ± 0,08	103,23 ± 2,73
		22,11 ± 0,40	5,66 ± 1,72	121,30 ± 21,65
18S rDNA				
56	Lauf 1	23,46 ± 0,30	14,02 ± 3,07	93,13 ± 10,59
	Lauf 2	23,03 ± 0,10	10,27 ± 0,72	90,02 ± 8,15
	Lauf 3	25,40 ± 2,02	26,91 ± 5,55	84,91 ± 23,84
		23,96 ± 1,26	17,07 ± 8,73	89,35 ± 4,15
58	Lauf 1	22,95 ± 0,02	9,69 ± 0,16	104,77 ± 2,70
	Lauf 2	23,22 ± 0,13	11,76 ± 1,08	86,90 ± 8,26
	Lauf 3	24,19 ± 0,01	22,95 ± 0,17	93,19 ± 8,79
		23,45 ± 0,65	14,80 ± 7,13	94,95 ± 9,06
60	Lauf 1	22,70 ± 0,05	8,16 ± 0,29	95,12 ± 5,89
	Lauf 2	22,71 ± 0,06	8,25 ± 0,35	85,43 ± 8,06
	Lauf 3	23,02 ± 0,08	10,22 ± 0,55	97,12 ± 2,97
		22,81 ± 0,18	8,88 ± 1,17	92,56 ± 6,25
mt-Cytb				
56	Lauf 1	22,16 ± 0,05	5,97 ± 0,25	95,17 ± 4,86
	Lauf 2	21,93 ± 0,08	5,08 ± 0,28	93,33 ± 2,30
	Lauf 3	22,45 ± 0,16	7,32 ± 0,82	100,17 ± 1,58
		22,18 ± 0,26	6,12 ± 1,13	96,22 ± 3,54
58	Lauf 1	22,21 ± 0,07	6,17 ± 0,28	96,17 ± 6,91
	Lauf 2	22,04 ± 0,05	5,49 ± 0,18	96,17 ± 3,72
	Lauf 3	22,24 ± 0,04	6,26 ± 0,18	101,67 ± 6,55
		22,16 ± 0,11	5,97 ± 0,42	98,00 ± 3,18 (±)
60	Lauf 1	21,97 ± 0,02	5,21 ± 0,08	91,33 ± 6,75
	Lauf 2	21,94 ± 0,07	5,13 ± 0,26	96,17 ± 2,62
	Lauf 3	22,05 ± 0,08	5,55 ± 0,31	96,33 ± 3,25
		21,99 ± 0,06	5,29 ± 0,22	94,61 ± 2,84

Anhang



Anhang Abbildung 29 Ermittlung der optimalen *Annealing-/Elongations*-Temperatur für die Zielsequenzen TP53, 18S rDNA und mt-Cytb. Dargestellt sind je Zielsequenz die in einer dreifach unabhängigen Bestimmung ermittelten Mittelwerte \pm Standardabweichung der Ct-Werte, der daraus berechneten Kopiezahl am Ct-Wert (linke Seite der Abbildung) sowie der mit LinRegPCR ermittelten Effizienzen (rechte Seite der Abbildung). Unterschiedliche Buchstaben weisen auf statistische Unterschiede hin (ANOVA, Scheffe, $p < 0,05$). Der Strich in den Abbildungs-Layern zur Effizienz markiert die angestrebte Effizienz von 100%.

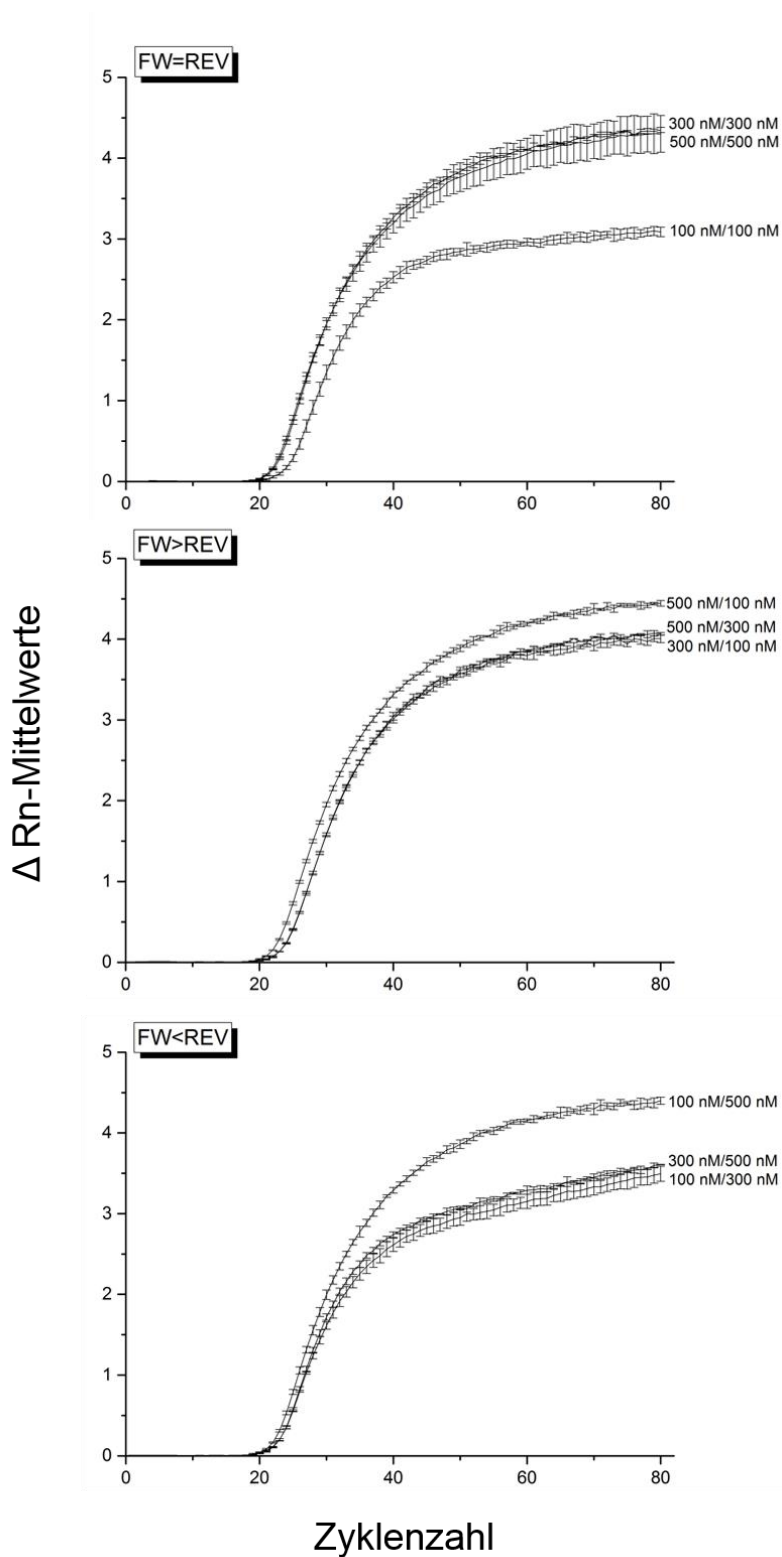
Anhang

Anhang Tabelle 8 Rohdaten zur Ermittlung der optimalen *TaqMan*® (TM)-Sondenkonzentration der Zielsequenzen im TP53- und mt-Cytb-Gen einer unabhängigen Dreifachbestimmung. Als *Annealing*-Temperatur wurde 56°C (TP53) bzw. 60°C (mt-Cytb) verwendet. *, *range/2*.

TM-Sondenkonzentration (nM im <i>well</i>)	Ct-Wert	Kopiezahl *10 ¹¹	Effizienz (%)	
TP53				
100	Lauf 1	20,74 ± 0,28	2,14 ± 0,42	94,50 ± 7,69
	Lauf 2	21,96 ± 0,05	4,92 ± 0,18	101,67 ± 11,60
	Lauf 3	21,36 ± 0,38	3,34 ± 0,92	101,50 ± 1,77*
		21,35 ± 0,61 (±2,85)	3,47 ± 1,40 (±40,21)	99,22 ± 4,09 (±4,12)
150	Lauf 1	20,34 ± 0,64	1,71 ± 0,66	85,33 ± 12,60
	Lauf 2	21,73 ± 0,14	4,23 ± 0,39	113,00 ± 21,02
	Lauf 3	20,78 ± 0,31	2,22 ± 0,46	86,00 ± 2,83*
		20,95 ± 0,71 (±3,39)	2,72 ± 1,33 (±49,01)	94,78 ± 15,78 (±16,65)
200	Lauf 1	20,77 ± 0,21*	2,18 ± 0,32*	102,00 ± 7,07*
	Lauf 2	21,72 ± 0,12	4,19 ± 0,33	74,50 ± 7,42*
	Lauf 3	20,45 ± 0,76	1,88 ± 0,86	76,33 ± 9,52
		20,98 ± 0,66 (±3,16)	2,75 ± 1,26 (±45,59)	84,28 ± 15,38 (±18,24)
mt-Cytb				
50	Lauf 1	22,44 ± 0,23	7,29 ± 1,20	95,67 ± 9,06
	Lauf 2	22,63 ± 0,05	8,27 ± 0,27	94,50 ± 2,00
	Lauf 3	22,66 ± 0,02	8,40 ± 0,15	92,83 ± 0,79
		22,58 ± 0,12 (±0,53)	7,98 ± 0,61 (±7,58)	94,33 ± 1,42 (±1,51)
100	Lauf 1	21,97 ± 0,02	5,21 ± 0,08	91,33 ± 6,75
	Lauf 2	21,94 ± 0,07	5,13 ± 0,26	96,17 ± 2,62
	Lauf 3	22,05 ± 0,08	5,55 ± 0,31	96,33 ± 3,25
		21,99 ± 0,06 (±0,26)	5,29 ± 0,22 (±4,21)	94,61 ± 2,84 (±3,00)
150	Lauf 1	21,71 ± 0,17	4,37 ± 0,50	91,83 ± 0,92
	Lauf 2	21,72 ± 0,13	4,40 ± 0,40	88,67 ± 3,37
	Lauf 3	21,87 ± 0,10	4,89 ± 0,35	97,67 ± 3,02
		21,77 ± 0,09 (±0,41)	4,55 ± 0,29 (±6,41)	92,72 ± 4,57 (±4,92)
200	Lauf 1	21,66 ± 0,07	4,20 ± 0,19	89,83 ± 6,00
	Lauf 2	21,63 ± 0,05	4,12 ± 0,15	88,33 ± 5,25
	Lauf 3	21,62 ± 0,09	4,09 ± 0,23	88,00 ± 4,00
		21,65 ± 0,02 (±0,10)	4,14 ± 0,06 (± 1,40)	88,72 ± 0,98 (±1,10)

Anhang

Daten zum Sonderfall 18S rDNA



Anhang Abbildung 30 Primer-Matrix mit den Kopiezahl-Primern c/d (Abbildung 9), der *TaqMan*[®]-Sonde und Realtime-Standard der 18S rDNA-Zielsequenz ($1,21 \cdot 10^5$ Kopien/Ansatz) als Templat. Dargestellt sind die Kurvenverläufe aller Reaktionsansätze aufgeteilt nach den Verhältnissen zwischen forward (FW)- und reverse (REV)-Primer.

Anhang

Anhang Tabelle 9 Daten zur Primer-Matrix mit 100 nM *TaqMan*[®]-Sonde und dem Realtime-Standard der 18S rDNA-Zielsequenz ($1,21 \cdot 10^5$ Kopien/PCR-Ansatz). Zur Amplifikation verwendet wurden die dazugehörigen Kopiezah-Primer c (Forward, FW) und d (Reverse, REV). Aufgelistet sind Ct-Werte, die daraus berechneten Kopiezahlen sowie die mittels LinRegPCR ermittelte Effizienz der Reaktion. Unterschiedliche Farben stehen innerhalb der Spalte für signifikante Unterschiede (ANOVA, Scheffe, $p < 0,05$).

FW/REV (nM)		Ct-Wert	Kopiezahl *10 ¹²	Effizienz (%)
100/100		24,06 ± 0,04	2,11 ± 0,06	92,78 ± 7,07
300/300	FW=REV	22,41 ± 0,05	0,67 ± 0,02	98,86 ± 9,34
500/500		22,15 ± 0,08	0,56 ± 0,03	102,93 ± 2,32
300/100		23,65 ± 0,05	1,58 ± 0,06	89,28 ± 2,73
500/100	FW>REV	23,62 ± 0,03	1,55 ± 0,03	90,21 ± 0,66
500/300		22,35 ± 0,05	0,64 ± 0,02	94,99 ± 5,28
100/300		22,95 ± 0,11	0,98 ± 0,07	91,79 ± 6,78
100/500	FW<REV	22,95 ± 0,08	0,97 ± 0,05	88,90 ± 5,31
300/500		22,21 ± 0,09	0,58 ± 0,03	91,13 ± 5,27

Anhang

Festlegung der Kalibrierbereiche für das TP53- und mt-Cytb-Gen

Anhang Tabelle 10 Rohdaten zur statistischen Verifizierung des weit gefassten Kalibrierbereiches ($1,21 \cdot 10^6$ - $1,21 \cdot 10^2$ Kopien/PCR-Ansatz) des TP53-Gens. Dargestellt sind die Ct-Werte (Ct) aus drei unabhängigen (Lauf 1-3) Bestimmungen (je Konzentration 3 wells) sowie die damit berechneten Kopiezahlen der Proben 1-3 (bestehend aus einer Verdünnung des Real-Time-Standards). Die internen Wiederfindungen (IWF) wurden aus einer 1+1 –Mischung Probe und Kalibrierpunkt hergestellt. MW, Mittelwert; PG, errechnete Prüfgröße beim F-Test mit einem Signifikanzniveau von 95%. Für Varianzenhomogenität muss die PG $\leq 19,0$ sein.

Kopiezahl/well	Ct Lauf 1	Ct Lauf 2	Ct Lauf 3	Kopiezahl/well
$1,21 \cdot 10^6$	$17,87 \pm 0,06$	$16,98 \pm 0,19$	$17,56 \pm 0,19$	
$1,21 \cdot 10^5$	$21,17 \pm 0,10$	$20,62 \pm 0,14$	$21,35 \pm 0,10$	
$1,21 \cdot 10^4$	$24,74 \pm 0,07$	$24,39 \pm 0,11$	$24,66 \pm 0,04$	
$1,21 \cdot 10^3$	$28,19 \pm 0,08$	$27,57 \pm 0,21$	$28,10 \pm 0,09$	
$1,21 \cdot 10^2$	$31,57 \pm 0,04$	$30,45 \pm 0,43$	$30,45 \pm 0,43$	
Gerade	$Y = -3,43025x + 38,71992$	$Y = -3,52313x + 38,584222$	$Y = -3,39307x + 38,50942$	
Effizienz	1,96 (=97,83%)	1,92 (=96,12%)	1,97 (=98,56%)	
PG	2,47	4,95	1,41	
varianzenhomogen				
Probe 1	$19,17 \pm 0,09$	$18,54 \pm 0,10$	$18,96 \pm 0,10$	$5,24 \cdot 10^5 \pm 0,49 \cdot 10^5$ ($\pm 9,29\%$)
Probe 2	$24,91 \pm 0,08$	$24,17 \pm 0,11$	$24,96 \pm 0,16$	$1,09 \cdot 10^4 \pm 0,13 \cdot 10^4$ ($\pm 11,90\%$)
Probe 3	$29,69 \pm 0,15$	$29,14 \pm 0,05$	$29,78 \pm 0,15$	$4,28 \cdot 10^2 \pm 0,52 \cdot 10^2$ ($\pm 12,10\%$)
IWF 1	$19,79 \pm 0,01$	$19,16 \pm 0,13$	$19,86 \pm 0,09$	
IWF 2	$24,91 \pm 0,03$	$24,12 \pm 0,03$	$24,76 \pm 0,13$	
IWF 3	$30,27 \pm 0,09$	$29,57 \pm 0,02$	$30,31 \pm 0,08$	
IWF 1 (%)	$129,74 \pm 3,41$	$133,72 \pm 46,21$	$39,52 \pm 31,82$	$100,99 \pm 53,28$ ($\pm 52,75$)
IWF 2 (%)	$88,24 \pm 4,00$	$108,41 \pm 4,23$	$104,82 \pm 16,34$	$100,49 \pm 10,76$ ($\pm 10,71$)
IWF 3 (%)	$125,96 \pm 28,23$	$202,92 \pm 9,32$	$123,26 \pm 22,00$	$150,71 \pm 45,23$ ($\pm 30,01$)

Anhang

Anhang Tabelle 11 Kopiezahl-Rohdaten zur statistischen Verifizierung des eng gefassten Kalibrierbereiches ($1,09 \cdot 10^5$ - $1,34 \cdot 10^3$ Kopien/PCR-Ansatz) des TP53-Gens. Dargestellt sind die Ct-Werte (Ct) aus drei unabhängigen (Lauf 1-3) Bestimmungen (je Konzentration 3 wells) sowie die damit berechneten Kopiezahlen der Proben 1-3 (bestehend aus einer Verdünnung des Real-Time-Standards). Die internen Wiederfindungen (IWF) wurden aus einer 1+1 –Mischung Probe und Kalibrierpunkt hergestellt. MW, Mittelwert; PG, errechnete Prüfgröße beim F-Test mit einem Signifikanzniveau von 95%. Für Varianzenhomogenität muss die $PG \leq 19,0$ sein.

Kopiezahl/well	Lauf 1	Lauf 2	Lauf 3	Kopiezahl/well
$1,09 \cdot 10^5$	20,91 ± 0,09	21,53 ± 0,17	21,66 ± 0,09	
$3,63 \cdot 10^4$	22,61 ± 0,07	23,38 ± 0,14	23,40 ± 0,09	
$1,21 \cdot 10^4$	24,29 ± 0,07	25,02 ± 0,10	25,02 ± 0,11	
$4,03 \cdot 10^3$	25,83 ± 0,01	26,71 ± 0,17	26,65 ± 0,13	
$1,34 \cdot 10^3$	27,31 ± 0,18	27,93 ± 0,12	28,40 ± 0,12	
Gerade	Y= -3,38817x + 38,04463	Y=-3,3184 x + 38,47554	Y= -3,50774x + 39,35063	
Effizienz	1,97 (=98,65%)	2,00 (=100,00%)	1,93 (=96,39%)	
PG	3,66	1,93	1,68	
varianzenhomogen				
Probe 1	21,91 ± 0,03	22,66 ± 0,04	22,60 ± 0,10	$5,87 \cdot 10^4 \pm 0,10 \cdot 10^4$ (±1,65%)
Probe 2	24,28 ± 0,10	25,08 ± 0,07	25,30 ± 0,09	$1,09 \cdot 10^4 \pm 0,07 \cdot 10^4$ (±6,21%)
Probe 3	26,51 ± 0,31	27,24 ± 0,08	27,14 ± 0,01	$2,68 \cdot 10^3 \pm 0,31 \cdot 10^3$ (±11,89%)
IWF 1	22,26 ± 0,16	22,92 ± 0,05	22,95 ± 0,11	
IWF 2	24,29 ± 0,13	25,07 ± 0,15	25,24 ± 0,04	
IWF 3	26,87 ± 0,08	27,73 ± 0,15	27,60 ± 0,01	
Mw IWF 1	92,91 ± 28,81	107,14 ± 8,46	97,12 ± 18,95	99,06±7,31 (±7,38)
Mw IWF 2	93,99 ± 16,26	91,27 ± 18,56	90,36 ± 4,41	91,87±1,89 (±2,06)
MW IWF 3	104,08 ± 16,13	77,51 ± 26,34	107,61 ± 2,94	96,40±16,45 (±17,07)

Anhang

Anhang Tabelle 12 Kopiezahl-Rohdaten zur statistischen Verifizierung des weit gefassten Kalibrierbereiches ($3,18 \cdot 10^6$ $7,75 \cdot 10^2$ Kopien/PCR-Ansatz) der mt-Cytb-Zielsequenz. Dargestellt sind die Ct-Werte (Ct) aus drei unabhängigen (Lauf 1-3) Bestimmungen (je Konzentration 3 wells) sowie die damit berechneten Kopiezahlen der Proben 1-3 (bestehend aus einer Verdünnung des Real-Time-Standards). Die internen Wiederfindungen (IWF) wurden aus einer 1+1 –Mischung Probe und Kalibrierpunkt hergestellt. MW, Mittelwert; PG, errechnete Prüfgröße beim F-Test mit einem Signifikanzniveau von 95%. Für Varianzenhomogenität muss die $PG \leq 19,0$ sein.

Kopiezahl/well	Lauf 1	Lauf 2	Lauf 3	Kopiezahl/well
$3,18 \cdot 10^6$	$17,34 \pm 0,01$	$16,79 \pm 0,10$	$15,82 \pm 0,12$	
$3,97 \cdot 10^5$	$20,48 \pm 0,06$	$20,02 \pm 0,14$	$19,16 \pm 0,22$	
$4,96 \cdot 10^4$	$23,72 \pm 0,01$	$23,17 \pm 0,02$	$22,34 \pm 0,13$	
$6,20 \cdot 10^3$	$26,91 \pm 0,04$	$26,57 \pm 0,04$	$25,63 \pm 0,09$	
$7,75 \cdot 10^2$	$30,38 \pm 0,06$	$29,73 \pm 0,21$	$28,76 \pm 0,06$	
Gerade	$Y = -3,54244x + 40,36448$	$Y = -3,61232x + 40,15784$	$Y = -3,57624x + 39,12058$	
Effizienz	1,92 (=96,0%)	1,89 (=94,5%)	3,30 (=165,0%)	
PG	3,07	3,07	1,90	
varianzenhomogen				
Probe 1	$18,81 \pm 0,13$	$18,30 \pm 0,03$	$17,91 \pm 0,11$	$1,07 \cdot 10^6 \pm 0,04 \cdot 10^6$ ($\pm 3,85\%$)
Probe 2	$25,70 \pm 0,05$	$25,38 \pm 0,06$	$24,56 \pm 0,08$	$1,26 \cdot 10^4 \pm 0,006 \cdot 10^4$ ($\pm 0,44\%$)
Probe 3	$29,51 \pm 0,07$	$28,88 \pm 0,06$	$28,11 \pm 0,13$	$1,23 \cdot 10^3 \pm 0,03 \cdot 10^3$ ($\pm 2,32\%$)
IWF 1	$17,89 \pm 0,05$	$17,47 \pm 0,05$	$16,42 \pm 0,16$	
IWF 2	$24,52 \pm 0,05$	$23,83 \pm 0,15$	$22,89 \pm 0,23$	
IWF 3	$27,79 \pm 0,05$	$27,27 \pm 0,26$	$26,52 \pm 0,20$	
Mw IWF 1	$100,66 \pm 4,46$	$85,13 \pm 3,82$	$114,00 \pm 14,92$	$99,93 \pm 14,45$ ($\pm 14,46$)
Mw IWF 2	$92,06 \pm 3,74$	$108,93 \pm 12,18$	$116,94 \pm 20,93$	$105,98 \pm 12,70$ ($\pm 11,98$)
MW IWF 3	$95,39 \pm 3,59$	$98,45 \pm 19,31$	$88,70 \pm 14,10$	$94,18 \pm 4,99$ ($\pm 5,29\%$)

Anhang

Anhang Tabelle 13 Kopiezahl-Rohdaten zur statistischen Verifizierung des eng gefassten Kalibrierbereiches ($3,18 \cdot 10^6$ – $1,24 \cdot 10^4$ Kopien/PCR-Ansatz) der mt-Cytb-Zielsequenz. Dargestellt sind die Ct-Werte (Ct) aus drei unabhängigen (Lauf 1-3) Bestimmungen (je Konzentration 3 *wells*) sowie die damit berechneten Kopiezahlen der Proben 1-3 (bestehend aus einer Verdünnung des Real-Time-Standards). Die internen Wiederfindungen (IWF) wurden aus einer 1+1 –Mischung Probe und Kalibrierpunkt hergestellt. MW, Mittelwert; PG, errechnete Prüfgröße beim F-Test mit einem Signifikanzniveau von 95%. Für Varianzenhomogenität muss die $PG \leq 19,0$ sein.

Kopiezahl/ <i>well</i>	Ct Lauf 1	Ct Lauf 2	Ct Lauf 3	Kopiezahl/ <i>well</i>
$3,18 \cdot 10^6$	$18,02 \pm 0,05$	$17,53 \pm 0,03$	$17,27 \pm 0,10$	
$7,94 \cdot 10^5$	$20,07 \pm 0,04$	$19,77 \pm 0,13$	$19,39 \pm 0,07$	
$1,98 \cdot 10^5$	$22,21 \pm 0,04$	$21,77 \pm 0,10$	$21,55 \pm 0,02$	
$4,96 \cdot 10^4$	$24,30 \pm 0,14$	$23,78 \pm 0,10$	$23,73 \pm 0,07$	
$1,24 \cdot 10^4$	$26,32 \pm 0,03$	$25,88 \pm 0,02$	$25,88 \pm 0,02$	
Gerade	$Y = -3,4494x + 40,44845$	$Y = -3,46536x + 40,06425$	$Y = -3,59568x + 40,59848$	
Effizienz	1,95	1,94	1,90	
PG	0,40	0,46	0,06	
varianzenhomogen				
Probe 1	$18,25 \pm 0,02$	$18,00 \pm 0,07$	$18,86 \pm 0,03$	$2,06 \cdot 10^5 \pm 8,37 \cdot 10^5$ ($\pm 40,72\%$)
Probe 2	$21,79 \pm 0,04$	$21,69 \pm 0,07$	$22,84 \pm 0,03$	$1,82 \cdot 10^5 \pm 0,87 \cdot 10^5$ ($\pm 47,67\%$)
Probe 3	$24,98 \pm 0,06$	$24,98 \pm 0,07$	$25,57 \pm 0,23$	$2,28 \cdot 10^4 \pm 0,76 \cdot 10^4$ ($\pm 33,53\%$)
IWF 1	$18,13 \pm 0,01$	$17,91 \pm 0,06$	$17,84 \pm 0,13$	
IWF 2	$21,95 \pm 0,04$	$21,83 \pm 0,03$	$21,89 \pm 0,03$	
IWF 3	$24,67 \pm 0,05$	$24,20 \pm 0,10$	$24,47 \pm 0,06$	
MW IWF 1	$101,10 \pm 13,21$	$82,10 \pm 6,38$	$99,47 \pm 11,06$	$94,22 \pm 10,53$ ($\pm 11,18$)
MW IWF 2	$103,71 \pm 6,67$	$82,46 \pm 4,11$	$117,27 \pm 3,42$	$101,15 \pm 17,54$ ($\pm 17,34$)
MW IWF 3	$90,13 \pm 4,59$	$106,85 \pm 9,75$	$93,04 \pm 4,58$	$96,67 \pm 8,93$ ($\pm 9,24\%$)

Anhang

Stabilität der Kalibrierlösungen

Anhang Tabelle 14 Daten der Kalibriergeraden zur Quantifizierung der nDNA mittels *TaqMan*®-basierter Realtime-PCR. Die Kalibrierlösungen wurden aus einem frisch aufgetauten Aliquot hergestellt und sofort analysiert. Markiert sind höchster (fett) und niedrigster (*kursiv*) Wert.

Steigung	y-Achsenabschnitt	R ²
-3,20218	<u>39,14974</u>	0,99978
-3,20576	39,48500	0,99941
-3,28266	40,20702	0,99995
-3,30069	40,25205	0,99959
-3,31869	39,81185	0,99719
-3,33535	39,50921	0,99989
-3,35134	39,80762	0,99988
-3,37310	39,86393	0,99991
-3,38686	40,16435	0,99924
-3,41548	40,62580	<u>0,99694</u>
-3,41987	40,13232	0,99954
-3,43384	41,18759	0,99997
-3,45072	40,49217	0,99937
<u>-3,48703</u>	40,66267	0,99970

Anhang Tabelle 15 Daten der Kalibriergeraden zur Quantifizierung der mtDNA mittels *TaqMan*®-basierter Realtime-PCR. Die Kalibrierlösungen wurden aus einem frisch aufgetauten Aliquot hergestellt und sofort analysiert. Markiert sind höchster (fett) und niedrigster (*kursiv*) Wert.

Steigung	y-Achsenabschnitt	R ²
-3,40435	<u>39,64984</u>	0,99989
-3,40833	39,96614	0,99958
-3,42881	40,28321	0,99834
-3,44721	40,30948	0,99980
-3,45401	40,58866	0,99952
-3,46727	41,31107	0,99988
-3,47008	40,42044	0,99954
-3,47074	40,55900	0,99975
-3,49748	40,22183	<u>0,99778</u>
-3,50976	41,15017	0,99801
-3,52937	41,99170	0,99978
-3,57318	41,68007	0,99843
-3,58700	41,07000	0,99967
<u>-3,66008</u>	42,74016	0,99891

Anhang

Anhang Tabelle 16 Ermittelte γ -Abschnitte und Steigungen der Kalibriergeraden, welche aus TP53-(nDNA) bzw. mtCytb(mtDNA) RT-Standard ([Kapitel 3.2.1](#)) hergestellt und anschließend sofort (Tag 0), nach einem und nach acht Tagen analysiert wurden. Vergleichend dazu sind die minimalen (Min) und maximalen (Max) Steigungen und γ -Abschnitte aufgeführt, welche aus 14 immer an Tag 0 analysierten Kalibrierlösungen und den daraus ermittelten Kalibriergeraden hervorgehen.

		Min	Max	Tag 0	Tag 1	Tag 8
nDNA	Steigung	-3,49	-3,20	-3,49	-3,56	-4,67
				-3,20	-3,39	-3,82
	y-Abschnitt	39,15	41,19	39,15	40,70	42,67
				41,19	40,87	45,61
mtDNA	Steigung	-3,66	-3,40	-3,66	-3,57	-3,75
				-3,40	-3,47	-3,69
	y-Abschnitt	39,65	42,74	39,65	40,64	42,34
				42,74	41,14	42,54

Spezifität der Kopiezahlbestimmung

Anhang Tabelle 17 Daten zum Experiment Primerspezifität. Dargestellt sind die ermittelten Kopiezahlen in allen DNA-Lösungen (A, nDNA-reich; B, mtDNA-reich; C, Mischung der Kopiezahl-Mengen aus A und B). Die Kopiezahlen wurden mit Hilfe der TM-Basierten RT-PCR (Kapitel 3.2) dreifach abhängig (3 wells) ermittelt.

	A	B	C
nDNA (Kopien *10³)	2,51 ± 0,23	2,35 ± 0,04	4,29 ± 0,43
mtDNA (Kopien*10⁶)	0,16 ± 0,01	2,74 ± 0,13	2,81 ± 0,06

Anhang

DNA-Isolierung

Methoden-Vergleich Kopiezahl-Ausbeute und theoretisch erreichbare Mutationsfrequenzen

Anhang Tabelle 18 nDNA Kopiezahl ausbeuten (*10⁵ Kopien) nach einer dreifach unabhängigen DNA-Isolierung aus 12,5 mg, 25 mg, 50 mg oder 100 mg ACI-Rattenbrustgewebepulver und anschließender 2-fach abhängig durchgeführten TaqMan®-basierten Realtime PCR. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung (± relative Standardabweichung). *, range/2; #, Einzelwert, n.d., nicht durchgeführt; <LOQ, Daten unterhalb der Bestimmungsgrenze von 145 nDNA-Kopien.

F	Methode	12,5 mg	25 mg	50 mg	100 mg
gDNA	DNz	0,47± 0,41 (86,66)*	1,72± 1,04 (60,54)*	1,87± 0,76 (40,66)	26,66± 8,16 (±30,62)*
	PG	1,77± 0,82 (46,45)	2,33 ± 1,71 (73,56)	3,57± 2,74 (76,29)	nd
	V g	15,58±13,24 (84,97)	29,64± 8,41 (28,36)	86,34±36,18 (41,90)	245,23±40,32 (16,44)
nDNA	V n	15,18± 0,35 (2,32)#	10,78± 5,49 (50,98)	70,32±33,72 (47,95)	413,29±473,85 (114,65)
	V+ n600	19,27±16,82 (87,25)	37,28±15,55 (41,73)	99,71±49,07 (49,21)	453,45±348,49 (76,85)
	V+ n1000	1,21± 0,13 (10,52)#	3,77± 1,69 (44,90)*	8,51± 0,47 (5,50)	220,61±358,12 (162,33)
mtDNA	V mt	<LOQ	1,58± 0,81 (51,08)*	4,50± 2,16 (47,92)*	24,33± 1,12 (4,61)#
	V+ mt	0,22± 0,01 (4,76)#	<LOQ	0,77± 0,01 (0,94)#	<LOQ

Anhang

Anhang Tabelle 19 Theoretisch detektierbare Mutationsfrequenzen ($\cdot 10^{-6}/\text{bp}$) der nDNA. Die Gesamt-DNA (DNz, PG, Vg), die nDNA (Vn, V+ n600, V+ n1000) und die mtDNA (Vmt, V+ mt) wurden in einer dreifach unabhängigen Bestimmung isoliert (12,5 mg, 25 mg, 50 mg, 100 mg). Anschließend wurde die nDNA Kopiezahl mittels *TaqMan*® basierter RealTime-PCR zweifach abhängig bestimmt. Die Kopiezahlen sind auf die Einwaagen normiert. Die Mutationsfrequenz wurde unter Annahme von 8 detektierten Mutanten und der Verwendung der Kopiezahl Minima der gehäkelten bzw. ungehäkelte DNA-Lösung berechnet. Die niedrigste Mutationsfrequenz/bp innerhalb einer Einwaage ist **fett** markiert. Die niedrigste Mutationsfrequenz innerhalb einer Methode ist grün markiert. n.d. nicht bestimmt, da <LOD von 145 Kopien; n.a. auf Grund der Herstellerangaben nicht angewendet. *, der Wert basiert auf einem Einzelwert aus der Kopiezahl-Bestimmung, da die beiden anderen Kopiezahlen <LOQ waren.

Fraktion	Methode	12,5 mg	25,0 mg	50,0 mg	100 mg
gDNA	DNz	316,16	29,39	19,29	1,08
	PG	17,94	53,61	15,98	n.a.
	Vg	5,39	9,59	0,75	0,10
nDNA	Vn	1,32*	4,13	0,40	0,26
	V+ n600	17,54	0,86	0,46	0,11
	V+ n1000	16,55*	9,64	2,48	1,74
mtDNA	Vmt	n.d.	25,83	8,53	0,83*
	V+ mt	92,11*	n.d.	26,04*	n.d.

Anhang

Anhang Tabelle 20 mtDNA Kopiezahl ausbeuten (*10⁸ Kopien) nach einer dreifach unabhängigen DNA-Isolierung aus 12,5 mg, 25 mg, 50 mg oder 100 mg ACI-Rattenbrustgewebepulver und anschließender 2-fach abhängig durchgeführten TaqMan®-basierten Realtime PCR. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung (± relative Standardabweichung). n.d., nicht durchgeführt.

F	Methode	12,5 mg	25 mg	50 mg	100 mg
gDNA	DNz	<0,01± 0,01 (80,86)	0,15± 0,25 (170,93)	0,09± 0,06 (65,47)	1,88± 1,46 (77,63)
	PG	0,80± 0,44 (55,61)	0,88± 0,36 (40,60)	2,44± 1,38 (56,52)	n.d.
	V g	3,26± 3,03 (92,59)	1,98± 2,09 (105,70)	7,38± 9,59 (129,98)	40,63±43,02 (105,90)
nDNA	V n	0,58± 0,62 (108,21)	0,52± 0,12 (23,08)	3,48± 2,69 (77,28)	8,75±10,17 (116,29)
	V+ n600	2,44± 4,07 (166,49)	3,11± 0,63 (20,24)	9,03± 6,93 (76,72)	26,73±27,31 (102,15)
	V+ n1000	0,21± 0,09 (43,45)	0,55± 0,40 (72,35)	10,59±15,83 (149,48)	2,44± 2,01 (82,69)
mtDNA	V mt	0,29± 0,12 (40,98)	0,71± 0,05 (6,40)	1,62± 0,98 (60,51)	2,42± 3,29 (136,29)
	V+ mt	0,29± 0,30 (102,87)	0,20± 0,08 (39,12)	1,36± 0,49 (35,80)	3,84 ± 1,09 (28,30)

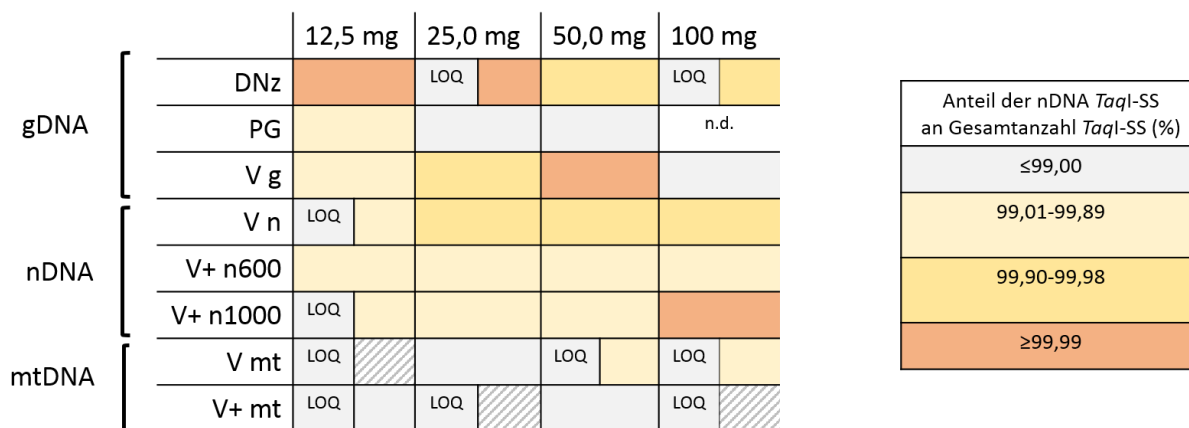
Anhang

Methodenvergleich DNA-Isolierung mtDNA: Quantifizierbarkeit und Reinheit

Anhang Tabelle 21 Absolute Häufigkeiten nicht quantifizierbarer nDNA (grau) bzw. mtDNA-Kopiezahlen. Jede DNA-Isolations-Methode wurde mit 12,5 mg, 25 mg, 40 (PeqGold, PG) /50 mg und 100 mg Gewebemenge je 3-mal unabhängig durchgeführt. Danach erfolgte die Kopiezahlbestimmung mittels *TaqMan*®-abhängiger RT-PCR in einer 2-fach abhängigen Bestimmung. Σ_G , Summe der Häufigkeiten bezogen auf die eingesetzte Gewebemenge; Σ_i , Summe der Häufigkeiten bezogen auf die verwendete DNA-Isolationsmethode. Grau hinterlegt sind Werte ungleich 0. DNz, DNazol; PG, PeqGold Kit; V g, Vermulst Gesamt-DNA; V n, Vermulst nDNA; V mt, Vermulst mtDNA; V+ n600, Vermulst erweitert 600g-Fraktion; V+ n1, Vermulst erweitert 1000g-Fraktion; V+ mt, Vermulst erweitert mtDNA; gDNA, Gesamt-DNA.

		12,5 mg		25 mg		40/50 mg		100 mg		Σ_i (nDNA)	Σ_i (mtDNA)
		nDNA	mtDNA	nDNA	mtDNA	nDNA	mtDNA	nDNA	mtDNA		
gDNA	DNz	1	0	1	0	0	0	1	0	3/12 (25%)	0/12 (0%)
	PG	0	0	0	0	0	0	n.d.	n.d.	0/9 (0%)	0/9 (0%)
	V g	0	0	0	0	0	0	0	0	0/12 (0%)	0/12 (0%)
nDNA	V n	2	0	0	0	0	0	0	0	2/12 (17%)	0/12 (0%)
	V+ n600	0	0	0	0	0	0	0	0	0/12 (0%)	0/12 (0%)
	V+ n1000	2	0	1	0	0	0	0	0	3/12 (25%)	0/12 (0%)
mtDNA	V mt	3	0	1	0	1	0	2	0	7/12 (58%)	0/12 (0%)
	V+ mt	2	0	3	0	2	0	3	0	10/12 (83%)	0/12 (0%)
Σ_G		10/24 (42%)	0/24 (0%)	6/24 (25%)	0/24 (0%)	3/24 (13%)	0/24 (0%)	6/21 (29%)	0/21 (0%)		

Anhang



Anhang Abbildung 31 Vergleich der DNA-Isolierungsmethoden bzw. DNA-Fractionen an Hand dem Verunreinigungsgrad der DNA-Lösungen mit nDNA-Kopien. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der nDNA-*TaqI*-Schnittstellen (SS) an der Gesamtheit an *TaqI*-SS in der DNA-Lösung mit der minimalsten mtDNA-Kopiezahl. Sollte in dieser die nDNA-Kopien nicht quantifizierbar sein (LOQ) wurden zwei Berechnungen durchgeführt. Jeweils links in der Spalte: für die nDNA-Kopiezahl wurde die Bestimmungsgrenze von 121 Kopien verwendet. Jeweils rechts in der Spalte: angegeben ist die DNA-Lösung, welche die nächst höhere mtDNA-Kopiezahl und gleichzeitig quantifizierbare nDNA aufwies. Im Falle, dass dies auch nicht möglich war, da alle nDNA Kopiezahlen kleiner der Bestimmungsgrenze lagen, wurde das Kästchen gestreift dargestellt.

Anhang Tabelle 22 Angabe der Quelle und Länge des nukleären Gens und die darin enthaltene Anzahl an *TaqI*-Schnittstellen (*TaqI*-SS). Angegeben sind zudem die Länge des Gens (L) und wie viele bp auf eine *TaqI*-SS folgen (Anzahl bp/1 *TaqI*-SS).

Name	Quelle	Länge (bp)	<i>TaqI</i> -SS	Anzahl bp / 1 <i>TaqI</i> -SS
λ-DNA	http://www.thermoscientificbio.com/uploadedFiles/Products/Molecular_Cloning/Vectors_and_Phage_DNA/Lambda%20DNA.txt , Stand: 23.01.2013	48502	113	429,2
Chromosom 1				
Estrogenrezeptor 1	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NW_003805777.1?from=1451978&to=1953710&report=fasta , Stand: 23.01.2014	501733	232	2162,6
Insulin-like growth factor 1 receptor	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NW_003806221.1?from=4728623&to=5087158&report=fasta , Stand: 23.01.2014	358536	273	1313,3

Anhang

Chromosom 2

3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/W_003806684.1?from=231559&to=258303&report=fasta , Stand: 23.01.2014	26745	20	1337,3
bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/W_003807110.1?from=2821215&to=2829255&report=fasta , Stand: 23.01.2014	8041	10	804,1

Chromosom 3

Glucagon	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/W_003807551.1?from=1153733&to=1165001&report=fasta , Stand: 23.01.2014	11269	5	2253,8
coagulation factor II	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/W_003807626.1?from=188188&to=205094&report=fasta , Stand 23.01.2014	16907	11	1537

Chromosom 4

Leptin	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/W_003807990.1?from=770262&to=787925&report=fasta , Stand: 23.01.2014	17664	8	2208
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/W_003808212.1?from=3200283&to=3357355&report=fasta , Stand 23.01.2014	157073	71	2212,3

Chromosom 5

Jun proto-oncogene	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/W_003808622.1?from=1861360&to=1865226&report=fasta , Stand: 23.01.2014	3867	3	1289
Natriuretic peptide B	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/W_003808753.1?from=341854&to=343557&report=fasta , Stand 23.01.2014	2048	2	1024

Anhang

Chromosom 6

Luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/W_003808796.1?from=177855&to=254372&report=fasta , Stand: 23.01.2014	76518	21	3643,7
FBJ osteosarcoma oncogene	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/W_003809046.1?from=1279678&to=1283261&report=fasta , Stand 23.01.2014	3584	3	1194,7

Chromosom 7

Interferon gamma	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/W_003809448.1?from=2151332&to=2156377&report=fasta , Stand: 25.01.2014	5046	7	720,9
Activity-regulated cytoskeleton-associated protein	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/W_003809564.1?from=1637247&to=1641571&report=fasta , Stand: 25.01.2014	4325	1	4235

Chromosom 8

Progesterone receptor	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/W_003809674.1?from=455338&to=528921&report=fasta , Stand: 25.01.2014	73584	40	1839,6
Cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/W_003809836.1?from=277239&to=284783&report=fasta , Stand: 25.01.2014	7545	3	2515

Chromosom 9

cAMP responsive element binding protein 1	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/W_003810240.1?from=986502&to=1072786&report=fasta , Stand: 25.01.2014	86285	44	1961
Peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/W_003810297.1?from=1571149&to=1577039&report=fasta , Stand: 25.01.2014	5891	8	736,4

Anhang

Chromosom 10

Heat shock protein 4	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/W_003810431.1?from=3549521&to=3600665&report=fasta, Stand: 25.01.2014	51145	30	1704,8
Chemokine (C-C motif) ligand 2	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/W_003810505.1?from=1875026&to=1877273&report=fasta, Stand: 25.01.2014	2248	4	562

Chromosom 11

superoxide dismutase 1, soluble	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/W_003810682.1?from=2763204&to=2770174&report=fasta, Stand: 25.01.2014	6971	8	871,4
adiponectin, C1Q and collagen domain containing	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/W_003810793.1?from=105212&to=128616&report=fasta, Stand: 25.01.2014	23405	16	1462,8

Chromosom 12

insulin receptor	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/W_003810873.1?from=1&to=168859&report=fasta, Stand: 25.01.2014	168859	106	1593
ubiquitin C	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/W_003811057.1?from=433256&to=439442&report=fasta, Stand: 25.01.2014	6187	16	386,7

Chromosom 13

interleukin 10	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/W_003811273.1?from=886610&to=891567&report=fasta, Stand: 25.01.2014	4958	5	991,6
coagulation factor V	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/W_003811314.1?from=3140197&to=3217330&report=fasta, Stand: 25.01.2014	77134	40	1928,4

Anhang

Chromosom 14

solute carrier				
family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 4	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NW_003811475.1?from=1294846&to=1821328&report=fasta, Stand: 25.01.2014	526483	354	1487,3
reticulon 4	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NW_003811695.1?from=404212&to=463810&report=fasta, Stand: 25.01.2014	59599	25	2384

Chromosom 15

surfactant protein C	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NW_003811889.1?from=1286234&to=1289911&report=fasta, Stand: 25.01.2014	3678	2	1839
bone morphogenetic protein 4	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NW_003811762.1?from=2494793&to=2513478&report=fasta, Stand: 25.01.2014	18686	20	934,3

Chromosom 16

choline O-acetyltransferase	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NW_003812023.1?from=5926954&to=8260405&report=fasta, Stand: 25.01.2014	2333452	1260	1851,9
adrenoceptor beta 3	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NW_003812244.1?from=73041&to=76496&report=fasta, Stand: 25.01.2014	3457	4	864,3

Chromosom 17

prolactin	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NW_003812416.1?from=73399&to=85976&report=fasta, Stand: 25.01.2014	12578	10	1257,8
cAMP responsive element modulator	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NW_003812457.1?from=1570410&to=1654204&report=fasta, Stand: 25.01.2014	83795	31	2703,1

Anhang

Chromosom 18

cadherin 2	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/W_003812579.1?from=849223&to=1124829&report=fasta , Stand: 25.01.2014	275604	171	1611,7
fibroblast growth factor 1 (acidic)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/W_003812643.1?from=483077&to=590595&report=fasta , Stand: 25.01.2014	107519	54	1991,1

Chromosom 19

metallothionein 1a	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/W_003812809.1?from=354717&to=355987&report=fasta , Stand: 25.01.2014	1271	0	
calreticulin	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/W_003812858.1?from=6557678&to=6563796&report=fasta , Stand: 25.01.2014	6119	8	764,9

Chromosom 20

GABA-B receptor 1	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/W_003812996.1?from=444517&to=480985&report=fasta , Stand: 25.01.2014	36469	25	1458,8
gap junction protein, alpha 1	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/W_003813099.1?from=338913&to=354507&report=fasta , Stand: 25.01.2014	15595	18	866,4

Anhang

Anhang Tabelle 23 Vergleich der DNA-Isolierungsmethoden nach den Häufigkeiten sofort präzipitierter, häkelbarer gDNA bzw. nDNA. Ausgewertet wurden je Methode 9 (PeqGold, PG) bzw. 12 unabhängige Versuche, wobei drei pro Einwaage (12,5-100 mg) durchgeführt wurden. Zudem ist die Summe (Σ) der Häufigkeiten für häkelbare DNA pro Methode zusammengefasst. *, die Methode PG basiert auf einer DNA-Isolierung mit Hilfe einer Säule. Somit werden per se RNA, Kontaminationen und mögliche Inhibitoren abgetrennt. Grau hinterlegt sind Häufigkeiten > null. DNz, DNAzol; Vg, Vermulst Gesamt-DNA; Vn, Vermulst nDNA; Vmt, Vermulst mtDNA; V+ n600, Vermulst erweitert 600g-Fraktion; V+ n1000, Vermulst erweitert 1000g-Fraktion; V+ mt, Vermulst erweitert mtDNA.

Einwaage (mg)	Dnz	PG	Vg	Vn	V+ n600	V+ n1000	Vmt	V+mt
12,5	3/3	salzfrei*	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
25,0	3/3	salzfrei*	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
50,0	3/3	salzfrei*	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
100,0	3/3	n.d.	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3
Σ	12/12 (100%)	9/9 (100%)	7/12 (58%)	3/12 (25%)	3/12 (25%)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	0/12 (0%)

Mutationsfrequenz der TP53-Sonde

Formel 4 Berechnung der Häufigkeit einer in der *TaqI*-Erkennungssequenz des Exons 2 TP53 mutierten Kopie.

$$\frac{\text{Menge in der 1 Mutant erwartet wird (bp)}}{\text{Rattengenom (bp)}} \times \frac{\text{Menge in der 1 Mutant erwartet wird (bp)}}{\text{Länge PCR-Produkt (bp)}}$$

$$\text{Exon: } \frac{5 \cdot 10^8}{2,75 \cdot 10^9} \times \frac{5 \cdot 10^8}{278} = 3,27 \cdot 10^5$$

$$\text{Intron: } \frac{1 \cdot 10^8}{2,75 \cdot 10^9} \times \frac{5 \cdot 10^8}{239} = 1,52 \cdot 10^4$$

Formel 5 Berechnung der Gesamtanzahl Fehler pro DNA-Strang nach Zyklus n abhängig von der Taq-Polymerase und den PCR-Zyklen. n, Zyklus; x, Fehler, die im ersten Zyklus eingebaut werden \triangle Fehlerrate Taq-Polymerase.

$$\text{Gesamtanzahl Fehler } y(n) = \text{Fehler Templat} \cdot 2^n + (x \cdot 2^{n-1}) + (x \cdot 2^{n-2} \cdot (n-1) \cdot 2)$$

Anhang

Formel 6 Berechnung der Fehler, die in der Restriktions-Schnittstelle von *TaqI* (TCGA) liegen.

Fehler in TaqI – Schnittstelle (n)

$$\begin{aligned} &= \text{Gesamtanzahl Fehler}(n) \times \left(\frac{\text{Anzahl Basen der Schnittstelle}}{\text{Länge des PCR – Produktes}} \right) \\ &= \text{Gesamtanzahl Fehler}(n) \times \left(\frac{4}{969} \right) \end{aligned}$$

Formel 7 Berechnung der Mutationsfrequenz der doppelsträngigen Sonde.

$$\text{Mutationsfrequenz doppelsträngige Sonde } (n) = \frac{\text{Fehler in TaqI-Schnittstelle } (n)}{\text{Gesamtanzahl an Kopien } (n)}$$

Formel 8

Wahrscheinlichkeit für 1 Fehler pro TaqI – Schnittstelle

$$= \left(\left(\frac{4}{969} \right) \times \text{Fehlerrate Polymerase} \right)$$

Formel 9

Wahrscheinlichkeit für eine Rückmutation

$$= \text{Wahrscheinlichkeit 1 Fehler pro Schnittstelle} \times \left(\frac{1}{969} \right) \times \frac{1}{4}$$

Formel 10

Wahrscheinlichkeit für 2 Fehler pro TaqI – Schnittstelle

$$= \text{Wahrscheinlichkeit für 1 Fehler pro TaqI – Schnittstelle} \times \left(\frac{4}{969} \right)$$

Anhang

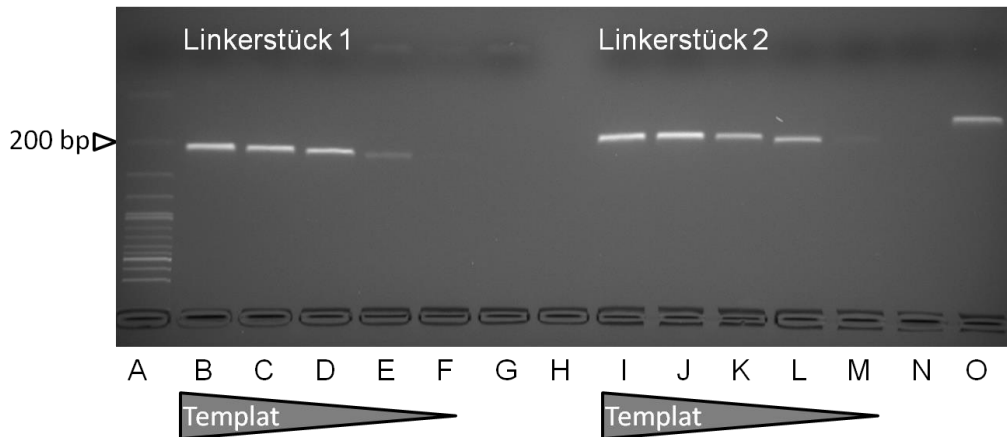
Experimentell ermittelte Mutationsfrequenz der TP53 Sonde

Anhang Tabelle 24 Daten zur Ermittlung der Mutationsfrequenz (MF) der TP53-Sonde. Dargestellt sind die Resultate aus 7 Mutations-PCRs, in welchen zwischen 433112 und 941176 Kopien TP53-Sonde nach einem 5-fachen *TaqI*-Verdau von $1 \cdot 10^8$ Kopien für die Mutations-PCR (80 *wells*) eingesetzt wurden. Nach dem *TaqI*-Nachverdau und wurden die mutierten Kopien mit Agarose-Gelelektrophorese (3%, 5V/cm, 1 h) detektiert. Die experimentelle Bestimmung der Mutationsfrequenz fällt unter die Poisson-Verteilung. Mit Hinblick auf eine eventuelle Sequenzierung ist anzumerken, dass nach der Poisson-Verteilung die Wahrscheinlichkeit für ≥ 2 Mutanten pro *well* ab 17 Mutanten/80 Reaktionen auf 2% ($\cong 1,6$ wells mit ≥ 2 Mutanten) und ab 25 Mutanten/80 Reaktionen auf 4% ($\cong 3,2$ wells mit ≥ 2 Mutanten) steigt.

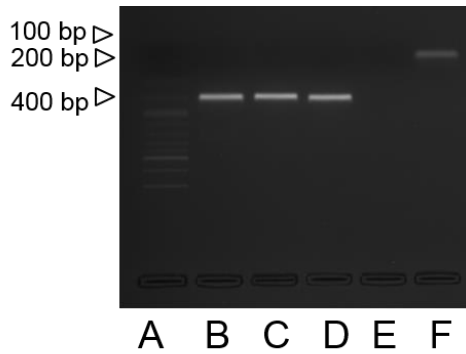
Kopien	Mutanten	MF/Kopie ($\cdot 10^{-6}$)	MF/bp ($\cdot 10^{-6}$)
941176	25	26,6	6,64
433112	7	16,2	4,04
649233	27	41,6	10,40
435727	10	23,0	5,74
435727	14	32,1	8,03
435727	29	66,6	16,64
435727	18	41,3	10,33
Σ 3330702,2	130	39,0	9,76

Erfassung mutierter DNA-Kopien

Herstellung des Mutanten-Standards



Anhang Abbildung 32 Herstellung der Linkerstücke 1 und 2. Dargestellt sind eine 100 bp Leiter (A), die Blindwerte (G, N) sowie die PCR-Produkte von mtDNA mit dem Primerpaar Linkerstück 1 (B-F) bzw. dem Primerpaar Linkerstück 2 (I-M, Tabelle 8). Das PCR-Produkt aus mtDNA und dem Kopiezahl-Primerpaar (Spur O) diente als Positivkontrolle. Die pro 25 μ l PCR-Ansatz eingesetzten Templatmengen betragen von links nach rechts je 50 ng, 5 ng, 0,5 ng, 0,05 ng und 0,005 ng. Färbung mit SYBR[®]-Green (1 ng/ μ l). Agarose-Gelelektrophorese mit 3%igem Agarosegel in 1x TAE-Puffer für 1 h bei 5 V/cm.



Anhang Abbildung 33 Generierung des Zwischenproduktes im Rahmen der Herstellung eines mutierten Standards für die Mutations-PCR. Dargestellt sind eine 100 bp-Leiter und die PCR-Produkte von Linkerstück 1 und Linkerstück 2 mit dem Primerpaar k/i (Spur B-D, Tabelle 8, Abbildung 11, Abbildung 22). Das PCR-Produkt aus mtDNA und dem Kopiezahl-Primerpaar (Spur F) diente als Positivkontrolle. Blindwert: Spur E. Die pro 25 μ l PCR-Ansatz eingesetzten Templatmengen betragen von links nach rechts je 10 ng, 2 ng, 0,4 ng. Das Temperaturprogramm bestand aus: 2 min 98°C, 30 zyklen \times 10 s 98°C, 10 s 65°C, 20 s 72°C und einer anschließenden Elongationszeit von 3 min bei 72°C. Färbung mit SYBR®-Green (1 ng/ μ l). Agarosegelelektrophorese mit 1,5%igem Agarosegel in 1x TAE-Puffer für 1 h bei 5 V/cm.

Anhang

Forward-Primer k

```

1>TCCATGT---GGGACGAGGACTATACTATGGATCCTACACTTTCTAGAAAACCTGAAACATTGGGATCATCCTACTATTT>77
1>TC A GT---T---CTA---CT---TT---CTAGA---CTG A ACATTGGGATCATCCTACTATTT>45
1>CCCAT TTTGGGA GAGGACTATACTATGGATCCTACACTTTCTAGAAAACCTGAAACATTGGGATCATCCTACTATTT>78

```

* * * * *

```

78>GCAGTCATAGCAACTGCATTTCATGGGCTATGTACTCCCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGAGCTACAGTAATTACAAA>157
46>GCAGTCATAGCAACTGCATTTCATGGGCTATGTACTCCCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGAGCTACAGTAATTACAAA>125
79>GCAGTCATAGCAACTGCATTTCATGGGCTATGTACTCCCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGAGCTACAGTAATTACAAA>158

```

* * * * *

① ②

Reverse-Primer l

```

158>CCTATTATCAGCTATCCCTTACATTGGAGACGATGCGTCCGAGTAGCTGTCAATAAGCTTCTCAGTAGA CAAAGCAACCC>237
126>CCTATTATCAGCTATCCCTTACATTGGAGACGATGCGTCCGAGTAGCTGTCAATAAGCTTCTCAGTAGA CAAAGCAACCC>205
159>CCTATTATCAGCTATCCCTTACATTGGAGACGATGCGTCCGAGTAGCTGTCAATAAGCTTCTCAGTAGA CAAAGCAACCC>238

```

* * * * *

```

238>TAACACGCTTCTTCGCATTCCACTTCATCCTCCCATTTCATTATCGCCGCCCTTGCAATTGTACATCTTCTTTCTCCAC>317
206>TAACACGCTTCTTCGCATTCCACTTCATCCTCCCATTTCATTATCGCCGCCCTTGCAATTGTACATCTTCTTTCTCCAC>285
239>TAACACGCTTCTTCGCATTCCACTTCATCCTCCCATTTCATTATCGCCGCCCTTGCAATTGTACATCTTCTTTCTCCAC>317

```

* * * * *

```

318>GAAACAGGATCAAATAACC-CCACAGGATTAAACTCCGAC--GCAGACAAAAT--C>368
286>GAAACAGGATCAAATAACC-CCACAGGATTAAACTCCGACAAAATAAAAATAAAC>340
318>GAAACA GATC AAT CC CC C-----CT G-----T~>340

```

Reverse-Primer i

Anhang Abbildung 34 Vergleich der Originalsequenz (GenBank: X14848.1, Zeile 1) des Mutations-Produktes im mt-Cytb-Gens mit dem Sequenzierungsergebnis des forward-Primers k (Sense-Strang, Zeile 2) und des reverse-Primers i (Antisense-Strang, Zeile 3). Mit Kästchen markiert sind die Positionen der Primer. Desweiteren sind die Positionen der mutierten *TaqI*-Schnittstelle (Kreis mit 2) sowie der neu eingebauten *AhdI*-Schnittstelle (Kreis mit 1) gekennzeichnet. Die Sterne (*) markieren einen Abschnitt von jeweils 10 Basenpaaren.

Anhang

Anhang Tabelle 25 Fluoreszenzintensitäten (FI) sowie deren Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (Stabw) der Kalbsthymus-DNA-Kalibriergeraden (in ng/200 µl im *well*), des Mutations-Produktes (MP), des Mutanten-Standards (MS) und deren internen Wiederfindungen (IWF).

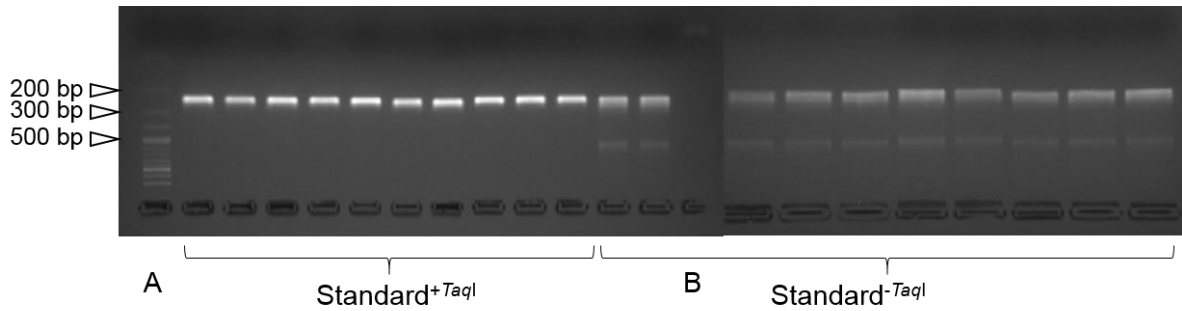
DNA (ng/200 µl)	FI (willkürliche Einheit)			Mw FI	Stabw FI
0,00	1408	1393	1270	1357,0	75,7
0,08	2018	1992	2005	2005,0	13,0
0,16	2746	2824	2750	2773,3	43,9
0,24	3517	3609	3437	3521,0	86,1
0,32	4218	4465	4261	4314,7	132,0
0,40	4741	4710	4775	4742,0	32,5
0,48	5540	5414	5717	5557,0	152,2
MP	3278	3183	3159	3206,7	62,9
MP IWF	3309	3285	3329	3307,7	22,0
MS	3291	3369	3384	3348,	49,9
MS IWF	3513	3294	3310	3372,3	122,1

Optimierung der Mutations-PCR

Anhang Tabelle 26 10 µl Reaktionsansatz für eine Mutations-PCR im 384 *well* System.

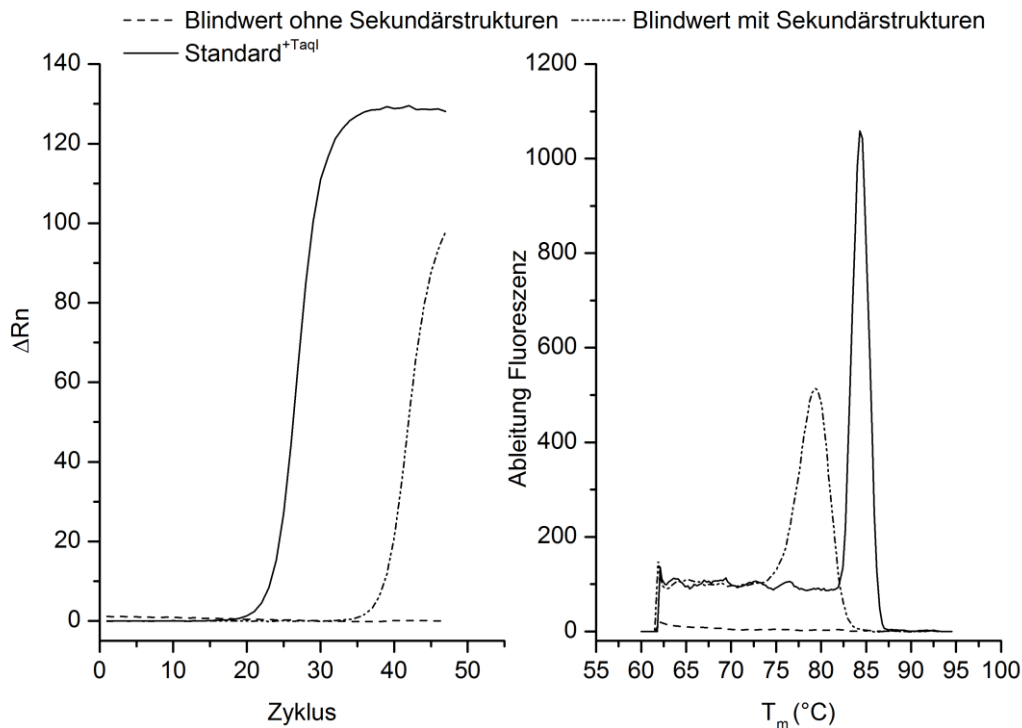
Reagenz	Ausgangskonzentration	Endkonzentration im PCR-Ansatz	Volumen (µl)
Tempase-Puffer	10x	1x	1,0
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	0,4
dNTPs	je 10 mM	je 200 µM	0,2
Tempase	5U/µl	0,05U/µl	0,1
Primermix	5 µM	0,8 µM	1,6
SYBR-Green	2,5x	0,5x	2,0
Wasser nf	/	/	2,2
Templat	variabel	variabel	2,5
Endvolumen			10

Anhang



Anhang Abbildung 37 Gelelektrophoretische Trennung der PCR-Produkte von Standard^{+TaqI} bzw. Standard^{-TaqI} als Templat und den Mutations-Primern für das mt-Cytb-Gen. Dargestellt sind die 100 bp Leiter (A), die PCR-Produkte mit Standard^{+TaqI} als Templat ($2,06 \cdot 10^7$ Kopien/PCR-Ansatz) oder mutierten Standard^{-TaqI} ($2,2 \cdot 10^7$ Kopien/PCR-Ansatz) sowie ein Blindwert (B). Nach Färbung der dsDNA mit SYBR[®]-Green (1 ng/ μ l) wurde die Agarose-Gelelektrophorese (3%) in 1xTAE-Puffer bei 5 V/cm für 1 h durchgeführt.

Erfassung von einer Kopie in der Mutations-PCR

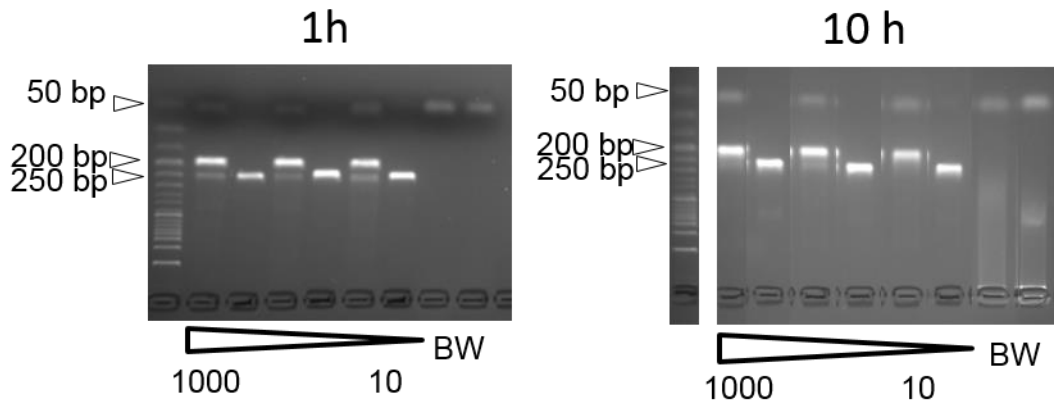


Anhang Abbildung 38: Darstellung der Amplifikations- und Schmelzkurven der Positivprobe (Standard^{+TaqI}) sowie jeweils eines Blindwertes mit und ohne Sekundärstrukturen.

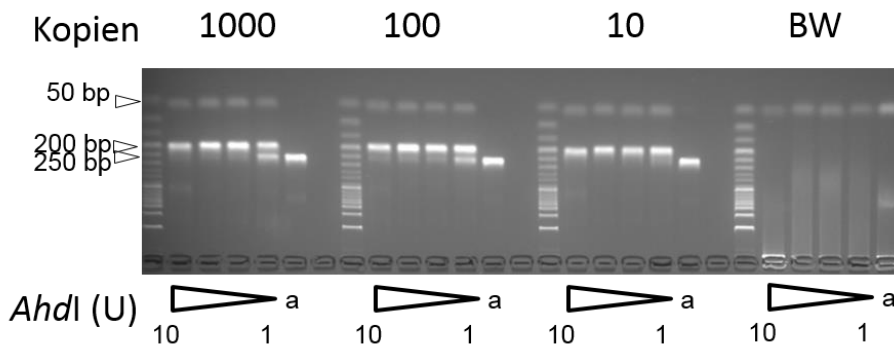
Anhang

Anhang Tabelle 27 Tabellarische Zusammenfassung der Wahrscheinlichkeiten (P , berechnet mit der Poissonverteilung) für ≥ 2 Mutanten in einem well in Abhängigkeit von der Gesamtanzahl (n) der Reaktionsansätze (\triangleq wells) und der detektierten Gesamtanzahl an Mutanten. Zudem ist die Anzahl (n) der wells ≥ 2 Mutanten angegeben, welche anhand von P berechnet wurde.

n Mutanten		Wells ≥ 2 Mutanten		n Mutanten		Wells ≥ 2 Mutanten	
in 40 wells		P (%)	n wells	in 80 wells		P (%)	n wells
5	0,7	0,29	5	0,2%	0,15		
6	1,0	0,41	6	0,3%	0,21		
7	1,4	0,55	7	0,4%	0,29		
8	1,8	0,70	8	0,5%	0,37		
9	2,2	0,87	9	0,6%	0,50		
10	2,6	1,06	10	0,7%	0,58		
11	3,2	1,26	11	0,9%	0,69		
12	3,7	1,48	12	1,0%	0,81		
13	4,3	1,71	13	1,2%	0,95		
14	4,9	1,95	14	1,4%	1,09		
15	5,5	2,20	15	1,6%	1,24		
16	6,2	2,46	16	1,8%	1,40		
17	6,8	2,74	17	2,0%	1,60		
18	7,5	3,02	18	2,2%	1,75		
19	8,3	3,31	19	2,4%	1,93		
20	9,0	3,62	20	2,6%	2,12		
21	9,8	3,92	21	2,9%	2,32		
22	10,6	4,23	22	3,2%	2,52		
23	11,4	4,55	23	3,42	2,74		
24	12,2	4,88	24	3,7%	2,95		
25	13,0	5,21	25	4,0%	3,18		



Anhang Abbildung 39 Abhängigkeit des *AhdI*-Verdau des Mutanten-Standards von der Zeit. Dargestellt sind die PCR-Produkte von Standard-TaqI (je 1000, 100 oder 10 Kopien) und Mutations-Primern für das mt-Cytb-Gen sowie 0,1x SYBR-Green im Reaktionsansatz. Pro Templat-Kopiezahl sind zuerst der verdaute und dann der unverdaute Reaktionsansatz aufgetragen. Nach Färbung der dsDNA mit SYBR®-Green (1 ng/μl) wurde die Agarose-Gelelektrophorese (3%) in 1xTAE-Puffer bei 5 V/cm für 1 h (links) oder 10 h (rechts) durchgeführt.



Anhang Abbildung 40 Abhängigkeit des *AhdI*-Verdau des Mutanten-Standards von der Enzymmenge. Dargestellt sind die PCR-Produkte von Standard-TaqI (je 1000, 100 oder 10 Kopien) und Mutations-Primern für das mt-Cytb-Gen sowie 0,1x SYBR-Green im Reaktionsansatz. Pro Templatkonzentration sind die PCR-Produkte nach *AhdI*-Verdau mit 10, 5, 2,5 oder 1 U aufgetragen (erwartet nach Verdau: 54 bp + 191 bp). Als Negativ-Kontrolle für einen vollständigen Verdau wurde unverdauter Mutanten-Standard (a, 245 bp) pipettiert. Nach Färbung der dsDNA mit SYBR®-Green (1 ng/μl) wurde die Agarose-Gelelektrophorese (3%) in 1xTAE-Puffer bei 5 V/cm für 10 h.

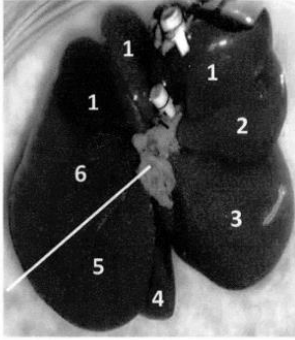
Anhang

Anwendung des RMCAs auf Rattengewebe

Organauswahl

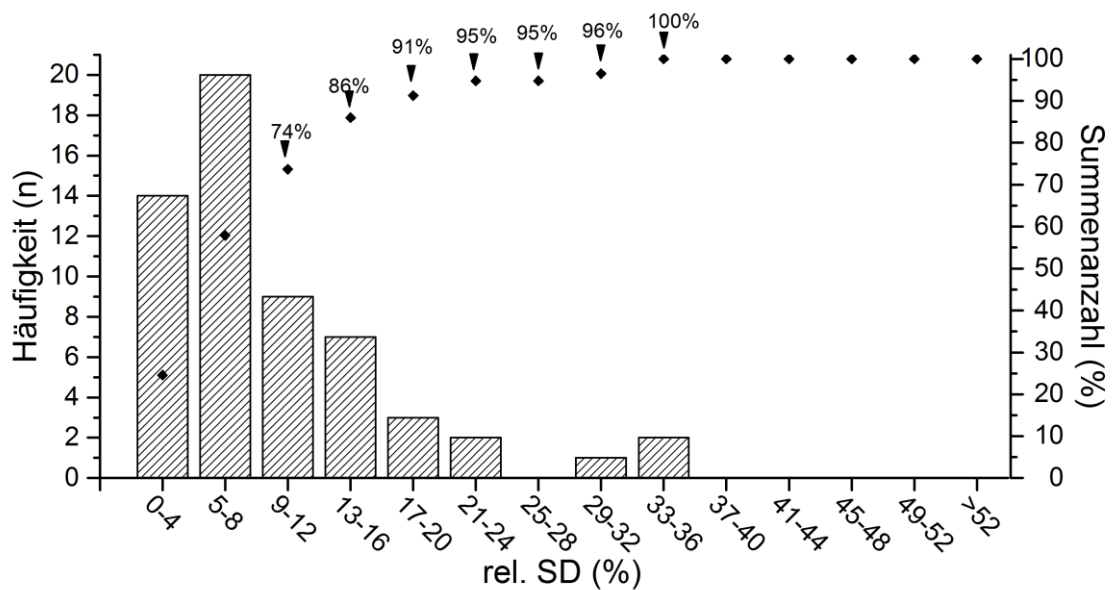
Anhang Tabelle 28 Zusammenfassung der Organgewichte (g) der in dieser Arbeit zur Etablierung des mitochondrialen RMCAs verwendeten F344-Ratten. **Grün** hinterlegt sind die drei Organe mit dem höchsten Gesamtgewicht im jeweiligen Tier. Absteigende Reihenfolge der Organgewichte (g): **männliches Tier (M1-M4)** : Leber > Dünndarm > Hoden > Gehirn > Niere > Lunge = Dickdarm > Herz > Milz > Knochenmark = Harnblase; **weibliches Tier (W1-W4)**: Leber > Dünndarm > Gehirn > Niere > Dickdarm > Lunge > Herz > Milz = Uterus > Ovarien > Knochenmark > Harnblase.

	M1	M2	M3	M4	W1	W2	W3	W4
Gesamtgewicht Tier (g)	216	211	205	201	147	153	137	147
Organ								
Leberlappen 1	2,39	1,45	1,4	1,32	1,11	1,25	1,31	0,92
Leberlappen 2	1,37	1,54	1,57	1,36	1,06	1,04	0,74	0,75
Leberlappen 3	3,02	2,72	2,5	2,29	1,8	2,22	1,32	1,56
Leberlappen 4	1,61	1,38	1,1	1,19	0,89	1,03	0,79	0,77
Leberlappen 5	1,93	1,77	2,04	1,15	0,94	1,29	1,05	1,05
Leberlappen 6	1,99	1,6	1,66	1,58	1,04	1,22	1,1	0,87
Σ	12,31	10,46	10,27	8,89	6,84	8,05	6,31	5,92
Dickdarm	0,83	1,25	1,02	1,27	0,88	0,74	0,71	0,71
Dünndarm								
Duodenum	0,61	0,64	0,78	0,64	0,45	0,33	0,43	0,29
Jejunum	3,16	2,82	2,80	2,62	1,6	1,46	1,67	1,25
Ileum	1,61	1,58	1,49	1,44	1,38	1,54	0,97	1,4
Σ	5,38	5,04	5,07	4,7	3,43	3,33	3,07	2,94
Niere								
links	0,92	0,82	0,82	0,79	0,67	0,62	0,56	0,55
rechts	0,93	0,89	0,92	0,81	0,61	0,69	0,62	0,56
Σ	1,85	1,71	1,74	1,6	1,28	1,31	1,18	1,11
Milz	0,49	0,5	0,56	0,48	0,4	0,54	0,38	0,35
Harnblase	0,11	0,1	0,1	0,07	0,06	0,06	0,04	0,07
Hoden								
links	1,4	1,35	1,4	1,34	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
rechts	1,37	1,26	1,33	1,29	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Σ	2,77	2,61	2,73	2,63	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Ovarien								
links	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0,05	0,06	0,06	0,04
rechts	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0,06	0,08	0,06	0,04
Σ	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0,11	0,14	0,12	0,08
Lunge	1,09	1	1,16	0,85	0,67	0,66	0,96	0,81
Herz	0,75	0,7	0,69	0,57	0,48	0,5	0,49	0,51
Gehirn	1,86	1,82	1,76	1,88	1,73	1,73	1,71	1,76
Knochenmark	0,14	0,14	0,15	0,1	0,08	0,08	0,1	0,07
Uterus	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0,33	0,31	0,35	0,3

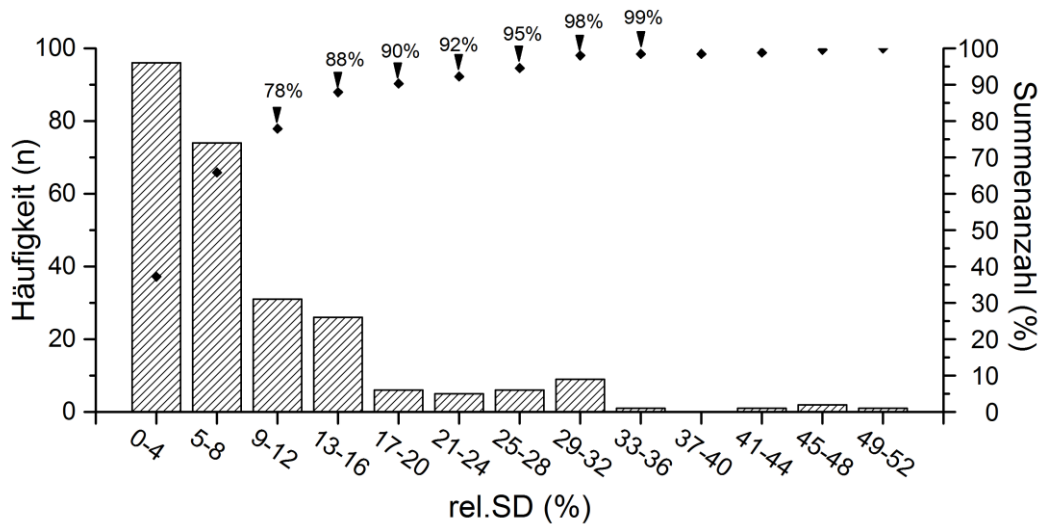


Anhang Abbildung 41 Leber einer F344-Ratte und deren Präparation. Im Rahmen der Arbeit wurden die Leberlappen einzeln entnommen, wobei der lobus lateralis sinister auf Grund seiner Größe nochmals geteilt wurde (5+6). 1. lobus caudatus, 2. lobus lateralis dexter, 3. lobus medialis dexter, 4. lobus medialis sinister.

Festlegung der Akzeptanzkriterien für die Kopiezahquantifizierung

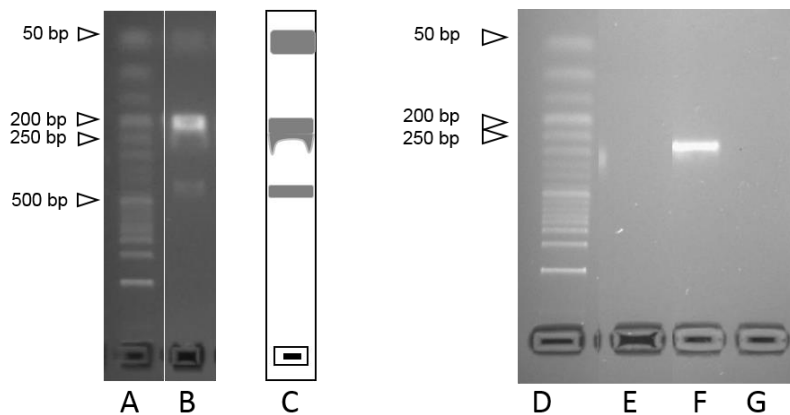


Anhang Abbildung 42 Relative Standardabweichungen (rel. SD, Balken) der internen Wiederfindung (Triplikate) im Rahmen der Kopiezahquantifizierung und deren Summenkurve (Rauten). n = 57. Klassenzahl und Klassenbreite wurden nach DIN 55302 berechnet.



Anhang Abbildung 43 Relative Standardabweichung (rel. SD, Balken) der Kopiezahl der Probe (Triplikate) und deren Summenkurve (Rauten). $n = 258$. Klassenzahl und Klassenbreite wurden nach DIN 55302 berechnet.

Mitochondriale Mutationsfrequenzen der Rattenleber



Anhang Abbildung 44 Charakterisierung des Bandentyps „auslaufende Bande“ (schematisch Spur C). **Spur B + C:** agarose-gelelektrophoretische Auftrennung nach Mutations-PCR von Rattenleber als Templat mit Mutations-Primern und anschließendem *TaqI*-Verdau. **Spur E:** agarose-gelelektrophoretische Auftrennung nach Nachamplifizierung der auslaufenden Enden auf Höhe der 250 bp Bande von Spur B und anschließendem *TaqI*-Verdau. Spur A+ D: 50 bp Leiter, Spur F: Standard-*TaqI*, Spur G: Blindwert. Die Agarose-Gelelektrophorese wurde mit einem 3%igem Gel, in 1x TAE-Puffer für 1h bei 5 V/cm durchgeführt. SYBR®-Green: 1 ng/ μ l.

Anhang

Anhang Tabelle 29: Mutationsfrequenzen im mt-Cytb-Gen des Leberlappens 3 von *Rattus norvegicus* in Abhängigkeit vom Geschlecht der Tiere. Die Tabelle gibt einen Überblick zu den mit Hilfe des in dieser Arbeit entwickelten mitochondrialen RMCA ermittelten Mutationsfrequenzen (MF), welche einmal pro Kopie (MF Kopie) und einmal pro Basenpaar (MF bp) berechnet wurde. Zur Berechnung dienten die Mutanten- und die Kopiezahl (KoZa), wobei für die Mutantenzahl der nach Poisson korrigierte Wert und weder die Mutantenzahl nach der Agarose-Gelelektrophorese (Gel), noch jene nach der Bestätigung durch die Nachamplifizierung (NAmp) verwendet wurde.

	Tier	Mutanten			KoZa	MF Kopie (*10 ⁻⁶)	MF bp (*10 ⁻⁶)	MW ± SD (±RSD)	
		Gel	NAmp	Poisson					
Männlich	1	12	12	13	99316	130,9	32,7	34,4 ± 2,9 (8,5%)	
		12	12	13	99316	130,9	32,7		
		16	14	15	99316	151,0	37,8		
	2	12	12	13	990567	13,1	3,3	3,2 ± 0,1 (±4,6%)	11,0 ± 10,5 *10 ⁻⁶ /bp (±95,3%)
		11	11	12	990567	12,1	3,0		
		12	12	13	990567	13,1	3,3		
	3	13	13	14	499930	28,0	7,0	9,0 ± 1,8 (±19,8%)	Median: 5,15
		13	10	11	287838	38,2	9,6		
		11	11	12	287838	41,7	10,4		
	4	7	7	7	994768	7,0	1,8	1,6 ± 0,3 (±18,2%)	Absolut: 5,9*10 ⁻⁶ /bp
		7	7	7	994768	7,0	1,8		
		5	5	5	994768	5,0	1,3		
Weiblich	1	11	11	12	293211	40,9	10,2	11,5 ± 1,3 (±11,1%)	Median: 10,2
		14	14	15	293211	51,2	12,8		
	2	12	12	13	292151	44,5	11,1	13,4 ± 2,0 (±14,7%)	10,0 ± 4,8 *10 ⁻⁶ /bp (±48,0%)
		16	16	17	292151	58,2	14,5		
		16	16	17	292151	58,2	14,5		
	3	13	11	12	290906	41,3	10,3	12,3 ± 1,8 (±14,5%)	Median: 11,1
		16	15	16	290906	55,0	13,8		
		14	14	15	290906	51,6	12,9		
	4	12	12	13	983318	13,2	3,3	2,9 ± 0,4 (±13,7%)	
		6	6	6	598541	10,0	2,5		
		7	7	7	598541	11,7	2,9		

Anhang

Anwendung des RMCA auf Zellen

Anhang Tabelle 30: Berechneten Mittelwerte (MW) der Gesamtzellzahl/cm² der Wachstumskurven der NRK-Zellen. Außerdem wurden die Standardabweichung (STABW) und relative Standardabweichung (RSD) angegeben.

Wachstumskurve 1			
Zeit (h)	MW (Zellzahl/cm ²)	STABW (Zellzahl/cm ²)	RSD (%)
0	17009,4	702,3	4,1
22	35689,7	727,7	2,0
26	43765,7	6386,7	14,6
30	51575,0	4773,3	9,3
46	125264,3	7511,4	6,0
50	158105,0	21008,2	13,3
53,5	171372,4	10299,4	6,0
59,5	150678,9	4858,2	3,2
70	216232,2	25390,7	11,7
74	203217,6	13050,0	6,4
77	202442,1	44779,3	22,1

Wachstumskurve 2			
Zeit (h)	MW (Zellzahl/cm ²)	STABW (Zellzahl/cm ²)	RSD (%)
0	11307,0	664,7	5,9
22,75	16875,9	1018,8	6,0
26,25	20744,9	2252,3	10,9
30,75	29022,3	680,8	2,3
46,75	83970,0	1770,8	2,1
50,50	94095,1	3101,2	3,3
54,25	113343,8	15503,2	13,7
58,75	125818,1	6973,0	5,5
70,75	148183,9	1482,9	1,0
74,75	142878,6	7617,0	5,3
77,75	197064,4	3465,5	1,8

Wachstumskurve 3			
Zeit (h)	MW (Zellzahl/cm ²)	STABW (Zellzahl/cm ²)	RSD (%)
0	9080,0	203,9	2,2
22,5	19090,3	1706,5	8,9
26,5	20014,9	1328,2	6,6
30,5	26565,8	3424,3	12,9
46,5	81938,6	8646,8	10,6
50,5	101840,6	1880,5	1,8
54,5	118522,7	5155,7	4,3
58,5	124611,0	3975,5	3,2
70,5	134790,0	8046,2	6,0
74,5	169749,0	6809,3	4,0
77,5	159424,1	13484,7	8,5

Anhang

Anhang Tabelle 31: Berechneten Mittelwerte der Gesamtzellzahl/cm² der Wachstumskurven der MATLyLu-Zellen. Außerdem wurden die Standardabweichung (STABW) und relative Standardabweichung (RSD) angegeben.

Wachstumskurve 1			
Zeit (h)	MW (Zellzahl/cm ²)	STABW (Zellzahl/cm ²)	RSD (%)
0	12067,0	35,6	0,3
23	29482,0	1115,7	3,8
27	32140,0	1971,6	6,1
31	45871,3	823,7	1,8
47	128496,0	3557,0	2,8
51	147382,3	17704,9	12,0
54,5	177776,9	17943,9	10,1
59,5	202627,6	5714,4	2,8
71	181525,3	2689,4	1,5
75	192795,9	6634,0	3,4
78	202554,3	13789,4	6,8
Wachstumskurve 2			
Zeit (h)	MW (Zellzahl/cm ²)	STABW (Zellzahl/cm ²)	RSD (%)
0	11438,0	810,0	7,1
23,75	26792,9	1828,3	6,8
27,25	37660,1	1117,3	3,0
31,75	57235,4	455,6	0,8
47,75	146832,7	9952,7	6,8
51,5	169924,3	7785,3	4,6
55,25	206603,1	6571,3	3,2
59,75	219519,5	15355,5	7,0
71,75	208379,6	6245,8	3,0
75,75	213598,9	4891,0	2,3
78,75	232294,7	11270,5	4,9
Wachstumskurve 3			
Zeit (h)	MW (Zellzahl/cm ²)	STABW (Zellzahl/cm ²)	RSD (%)
0	10824,6	56,7	0,5
21,5	26563,5	1781,7	6,7
25,5	34436,9	580,4	1,7
29,5	45089,9	2400,4	5,3
45,5	127868,0	6421,9	5,0
49,5	154917,9	5464,1	3,5
52,5	186534,7	12156,9	6,5
58,5	196786,2	10941,3	5,6
69,5	201304,2	6725,7	3,3
73,5	216770,8	6994,7	3,2
76,5	218955,6	13869,3	6,3

Anhang

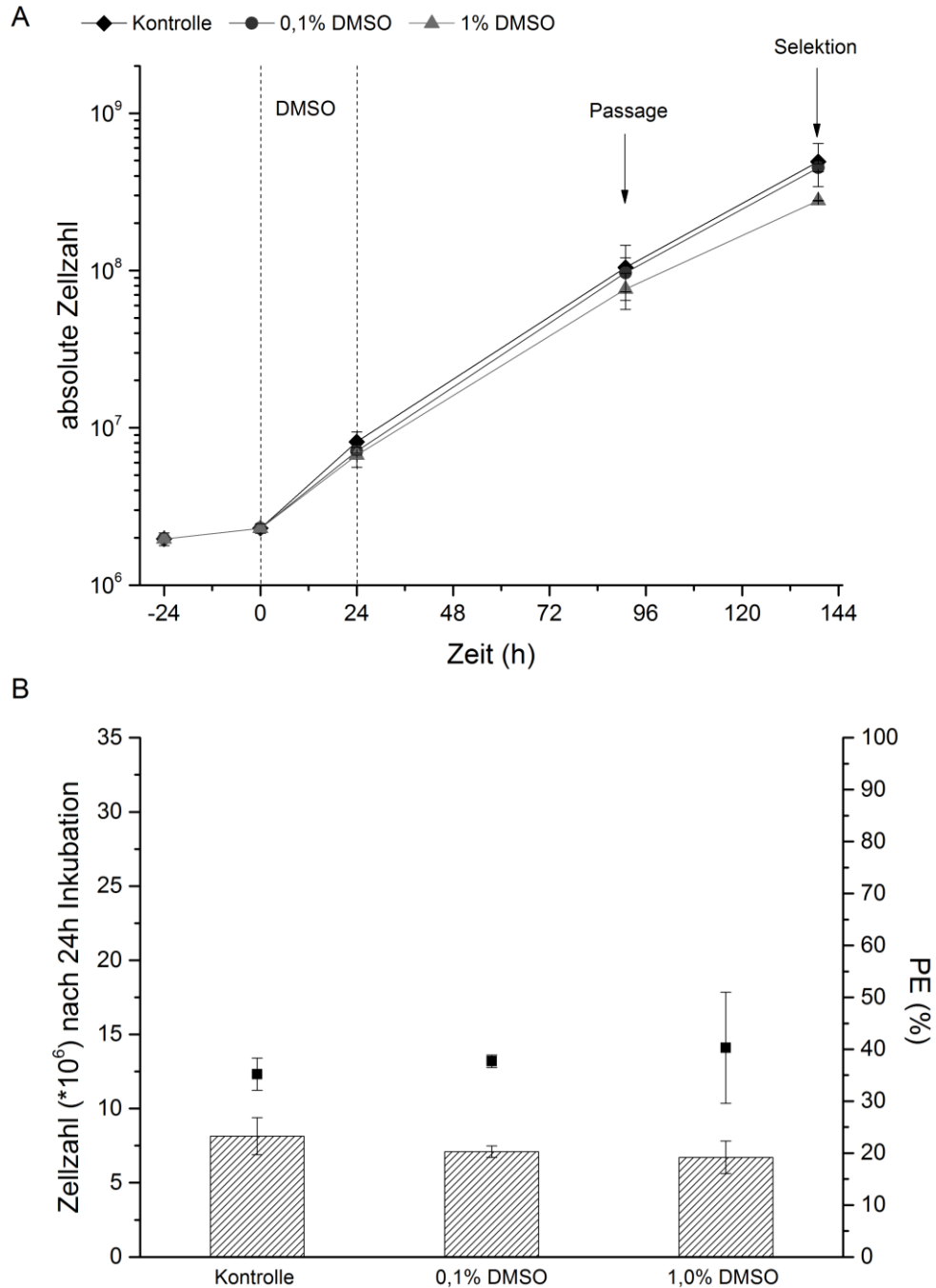
Anhang Tabelle 32: Totanteile der NRK-Zellen innerhalb der Passage durch Färbung der Zellsuspension mit Trypanblau. Die Totanteile wurden jeweils auf die Gesamtzellzahl bezogen.

	Mittelwert (%)	Stabw (%)	Rel. Stabw (%)
Färbung 1, Passage 35 (3x400 µl, 1000 µl)			
Totanteil Neubauer	14,0	9,3	66,0
Färbung 2, Passage 36 (3x400 µl, 50 µl)			
Totanteil Neubauer	8,1	2,0	24,4
Färbung 3, Passage 37 (3x400 µl, 50 µl)			
Totanteil Neubauer	3,8	0,5	14,2
Färbung 4, Passage 38 (3x400 µl, 50 µl)			
Totanteil Neubauer	7,8	1,1	14,1
Färbung 5, Passage 39 (3x400 µl, 50 µl)			
Totanteil Neubauer	9,6	1,4	14,3
Färbung 6, Passage 40 (3x400 µl, 50 µl)			
Totanteil Neubauer	1,9	1,3	66,2
Färbung 7, Passage 41 (3x400 µl, 50 µl)			
Totanteil Neubauer	8,9	1,6	17,8
Färbung 8, Passage 42 (3x400 µl, 50 µl)			
Totanteil Neubauer	7,6	1,2	15,5

Anhang Tabelle 33: Berechnung der Totanteile der MATLyLu-Zellen innerhalb der Passage durch Färbung mit Trypanblau. Die Totanteile wurden jeweils auf die Gesamtzellzahl bezogen.

	Mittelwert (%)	Stabw (%)	Rel. Stabw (%)
Färbung 1, Passage 31 (3x400 µl, 1000 µl)			
Totanteil Neubauer	3,9	4,2	107,9
Färbung 2, Passage 32 (3x400 µl, 50 µl)			
Totanteil Neubauer	5,8	1,6	27,3
Färbung 3, Passage 33 (3x400 µl, 50 µl)			
Totanteil Neubauer	5,6	1,4	24,4
Färbung 4, Passage 34 (3x400 µl, 50 µl)			
Totanteil Neubauer	7,5	0,4	5,0
Färbung 5, Passage 35 (3x400 µl, 50 µl)			
Totanteil Neubauer	4,6	0,9	19,2
Färbung 6, Passage 36 (3x400 µl, 50 µl)			
Totanteil Neubauer	3,2	1,1	34,5
Färbung 7, Passage 37 (3x400 µl, 50 µl)			
Totanteil Neubauer	4,8	1,2	24,3
Färbung 8, Passage 38 (3x400 µl, 50 µl)			
Totanteil Neubauer	8,2	1,8	21,8

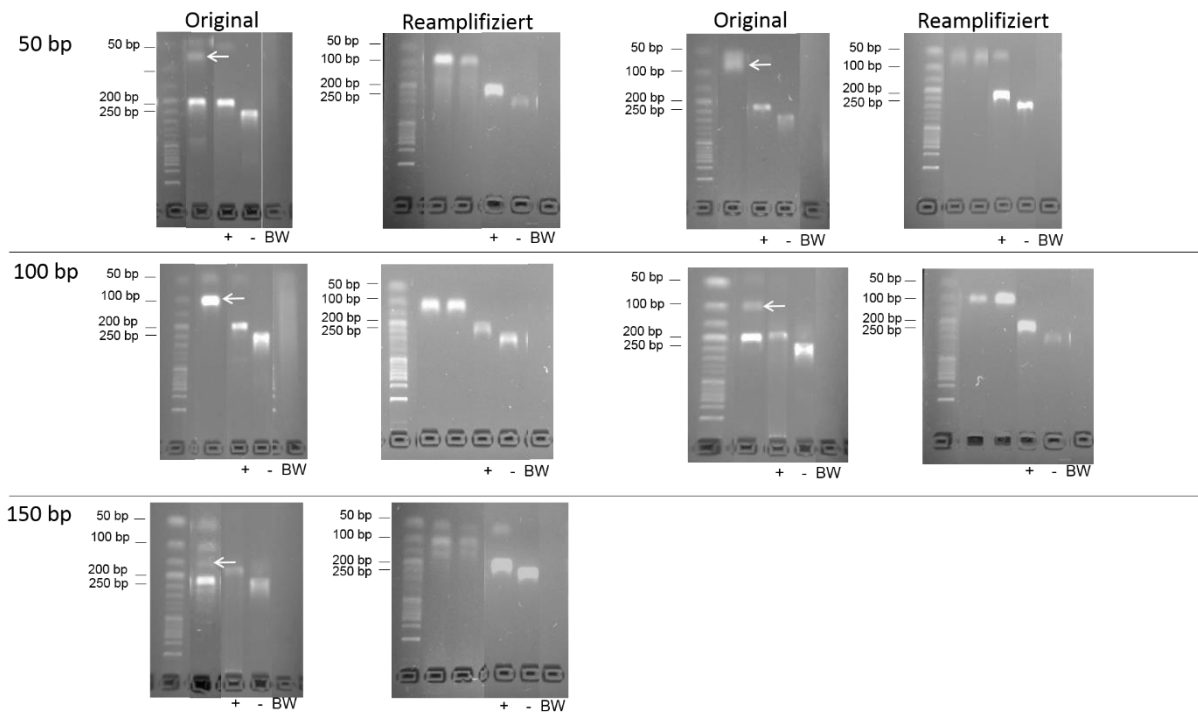
Anhang



Anhang Abbildung 45: Einfluss von DMSO auf die Zellzahl und Plating Efficiency (PE) während des HPRT-Tests. **A** Entwicklung der absoluten Zellzahl im Laufe des HPRT-Tests. Die absolute Zellzahl (lebende Zellen) wurde anhand der Zellzahlbestimmungen jeder Flasche zum Ausstreuzeitpunkt, vor der Inkubation, bei jeder Passage und der Selektion berechnet. Bei jeder Passage wurden 10000 Zellen / cm² ausgestreut ausgenommen Passage 2, bei der 5217 Zellen / cm² ausgestreut wurden (Rohdaten Tabelle 8-37) Dargestellt sind Mittelwert ± range/2. **B** Zellzahl (lebend, Balken) und PE (Punkte) nach 24 h Inkubation der NRK-Zellen mit 0,1% oder 1,0% DMSO. Dargestellt sind Mittelwert ± range/2 (Rohdaten Tabelle 8-38 und Tabelle 8-39).

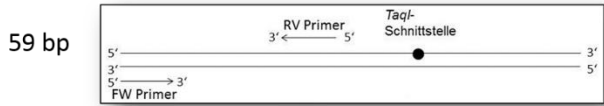
Nebenprodukte in der Mutations-PCR

Nebenprodukte der Mutations-PCR mit einer spezifischen bp-Länge

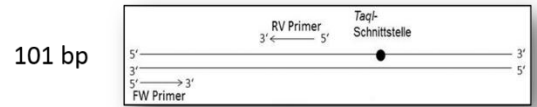


Anhang Abbildung 46: Nachamplifizierung von aufgereinigten Nebenprodukten und gelelektrophoretische Auftrennung. Die Nebenprodukte (50 bp, 100 bp, 150 bp) wurden aus dem Gel ausgeschnitten, aufgereinigt und als Templat mit den Mutations-Primern für eine Mutations-PCR eingesetzt. Anschließend wurde der Reaktions-Ansatz geteilt und mit der einen Hälfte vor der Agarose-Gelelektrophorese ein TaqI-Verdau durchgeführt. Als Positivkontrolle für den TaqI-Verdau und die PCR wurden Mutantenstandard+TaqI (+) und Mutantenstandard ohne TaqI (-) verwendet. Als Größenmarker wurde immer eine 50 bp Leiter mitgeführt (1.Spur). Für jede PCR-Reaktion wurde ein Blindwert (BW) mitgeführt. Die Agarose-Gelelektrophorese wurde mit einem 3%igem Gel, in 1x TAE-Puffer für 1h bei 5 V/cm durchgeführt. SYBR®-Green: 1 ng/μl.

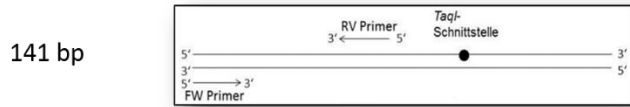
Anhang



GT TT CGTTGGGATT GTGCG
 : : : ||||| : :
 5'- TCCA TGTGGGACGA GGACTATACT ATGGATCCTA CACTTTCCTA GAAACCTGAA ACATT -3'
 3'- AGGT ACACCTGCT CCTGATATGA TACCTAGGAT GTGAAAGGAT CTTTGGACTT TGTA -5'
 ||||| |||||
 TCCA TGTGGGACGA GGACTATA

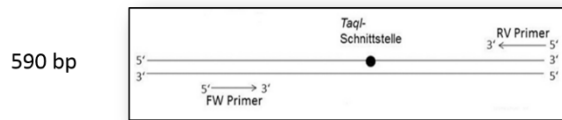


GT TTCGTTGGGA TTGTGCG
 : : : ||||| : :
 5'- TCCA TGTGGGACGA GGACTATACT ATGGATCCTA ... TTTGCAGTCA TAGCAACTGC ATTCATG -3'
 3'- AGGT ACACCTGCT CCTGATATGA TACCTAGGAT ... AACGTCAGT ATCGTTGACG TAAGTAC -5'
 ||||| |||||
 TCCA TGTGGGACGA GGACTATA

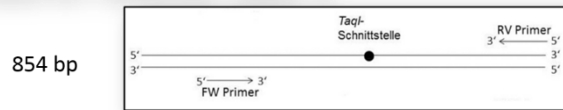


GT TTCGTTGGGA TTGTGCG
 || ||
 5'- TCCA TGTGGGACGA GGACTATACT ... TATGTA CTCC CATGAGGACA AATATCATTC TGAGGAG -3'
 3'- AGGT ACACCTGCT CCTGATATGA ... ATACATGAGG GTACTCCTGT TTATAGTAAG ACTCCTC -5'
 ||||| |||||
 TCCA TGTGGGACGA GGACTATA

Anhang Abbildung 47 Theoretische Primerbindungsstellen der Mutations-Primer im mt-Cyt-b-Gen zur Entstehung des ca. 50 bp, 100 bp und 150 bp-langen PCR-Produkte. Dargestellt sind die Position im Verhältnis zur TaqI-Schnittstelle (Kasten) und die Position und Bindung der Primer innerhalb der exakten Sequenz.



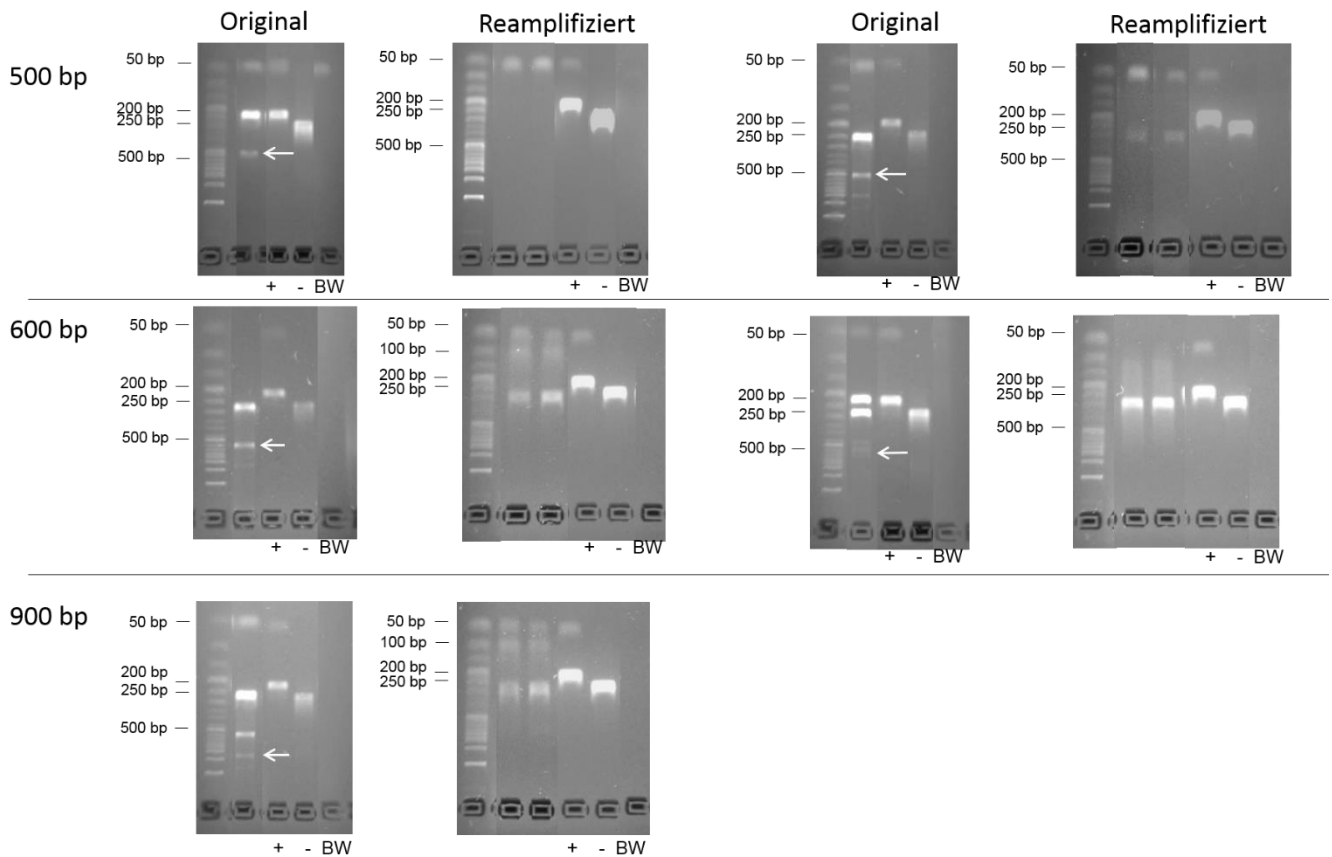
GTT TCGTTGGGAT TGTGCG
 ||| | :
 5'- TCCA TGTGGGACGA GGACTATACT ... CTACGCTCCA TTCCAACAA ACTAGGAGGG GTCGTA -3'
 3'- AGGT ACACCTGCT CCTGATATGA ... GATGCGAGGT AAGGGTTGTT TGATCCTCCC CAGCAT -5'
 ||||| |||||
 TCCA TGTGGGACGA GGACTATA



GTTTCGTTG GGATTGTGCG
 |||| : :
 5'- TCCA TGTGGGACGA GGACTATACT ... AATCTCTGGA ATTGTTGAAG ACAAATGTT AAAATGAAAT -3'
 3'- AGGT ACACCTGCT CCTGATATGA ... TTAGAGACCT TAACAACCTC TGTTTTACAA TTTTACTTTA -5'
 ||||| |||||
 TCCA TGTGGGACGA GGACTATA

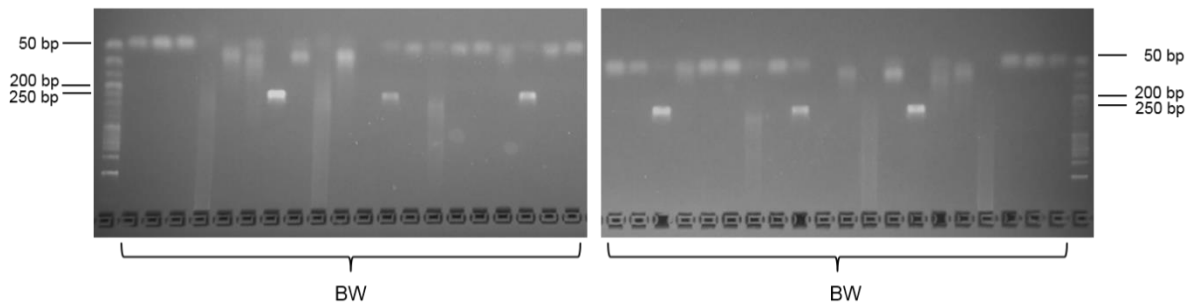
Anhang Abbildung 48 Theoretische Primerbindungsstellen der Mutations-Primer im mt-Cyt-b-Gen zur Entstehung des ca. 50 bp, 100 bp und 150 bp-langen PCR-Produkte. Dargestellt sind die Position im Verhältnis zur TaqI-Schnittstelle (Kasten) und die Position und Bindung der Primer innerhalb der exakten Sequenz.

Anhang

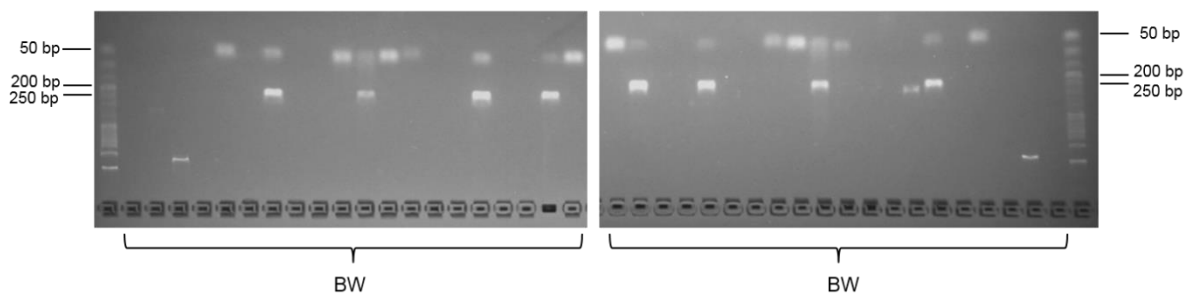


Anhang Abbildung 49 Nachamplifizierung von aufgereinigten Nebenprodukten und gelelektrophoretische Auftrennung. Die Nebenprodukte (500 bp, 600 bp, 900 bp) wurden aus dem Gel ausgeschnitten, aufgereinigt und als Templat mit den Mutations-Primern für eine Mutations-PCR eingesetzt. Anschließend wurde der Reaktions-Ansatz geteilt und mit der einen Hälfte vor der Agarose-Gelelektrophorese ein TaqI-Verdau durchgeführt. Als Positivkontrolle für den TaqI-Verdau und die PCR wurden Mutantenstandard+TaqI (+) und Mutantenstandard ohne TaqI (-) verwendet. Als Größenmarker wurde immer eine 50 bp Leiter mitgeführt (1. Spur). Für jede PCR-Reaktion wurde ein Blindwert (BW) mitgeführt. Die Agarose-Gelelektrophorese wurde mit einem 3%igem Gel, in 1x TAE-Puffer für 1h bei 5 V/cm durchgeführt. SYBR®-Green: 1 ng/µl.

Unspezifische Nebenprodukte



Anhang Abbildung 50 Gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte der Mutations-PCR mit mtDNA-Mutations-Primern zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Agarosegelelektrophorese. Die Hälfte eines Ansatzes wurde jeweils auf Gel 1, die andere Hälfte spiegelverkehrt auf Gel 2 aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte mittels 3%igem Agarosegel in 1x TAE-Puffer für 1 h bei 5 V/cm und einer SYBR® Green-Konzentration von 1 ng/μl. Als DNA-Leiter funktierte eine 50 bp Leiter (ganz außen im Bild).



Anhang Abbildung 51 Gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte der Mutations-PCR mit nDNA-Mutations-Primern zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Agarosegelelektrophorese. Die Hälfte eines Ansatzes wurde jeweils auf Gel 1, die andere Hälfte spiegelverkehrt auf Gel 2 aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte mittels 3%igem Agarosegel in 1x TAE-Puffer für 1 h bei 5 V/cm und einer SYBR® Green-Konzentration von 1 ng/μl. Als DNA-Leiter funktierte eine 50 bp Leiter (ganz außen im Bild).

Anhang

Anhang Tabelle 34 Reproduzierbarkeit der detektierten PCR-Banden einer Mutations-PCR mit mtDNA- oder nDNA-Mutations-Primern. Ein Mastermix wurde für die Reaktionsansätze in zwei aufeinanderfolgenden PCR-Läufen mit je 20 Reaktionsansätzen verwendet. Das Experiment wurde dreimal unabhängig durchgeführt. n.d., nicht detektiert.

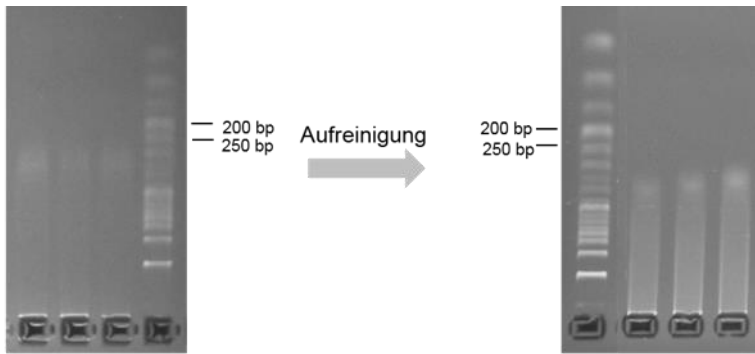
	Durchführung 1				Durchführung 2				Durchführung 3			
	mtDNA-Primer		nDNA-Primer		mtDNA-Primer		nDNA-Primer		mtDNA-Primer		nDNA-Primer	
	PCR 1	PCR 2	PCR 1	PCR 2	PCR 1	PCR 2	PCR 1	PCR 2	PCR 1	PCR 2	PCR 1	PCR 2
keine Bande	3 (15%)	1 (5%)	10 (50%)	10 (50%)	n.d.	n.d.	1 (5%)	n.d.	n.d.	n.d.	1 (5%)	n.d.
Nebenprodukt 50 bp	9 (45%)	9 (45%)	3 (15%)	5 (25%)	n.d.	n.d.	11 (55%)	5 (25%)	n.d.	n.d.	11 (55%)	n.d.
Nebenprodukt 100 bp	1 (5%)	3 (15%)	1 (5%)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Nebenprodukt 950 bp	n.d.	n.d.	n.d.	1 (5%)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Nebenprodukt 50 bp & 100 bp	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2 (10%)	n.d.
Nebenprodukt 200 bp & 400 bp	n.d.	n.d.	1 (5%)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Produkt & Nebenprodukt 50 bp	2 (10%)	2 (10%)	1 (5%)	3 (15%)	n.d.	n.d.	3 (15%)	2 (10%)	n.d.	n.d.	1 (5%)	15 (75%)
Produkt	1 (5%)	1 (5%)	3 (15%)	n.d.	n.d.	n.d.	1 (5%)	n.d.	n.d.	n.d.	2 (10%)	2 (10%)
Produkt & DNA hang up	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1 (5%)
DNA hang up	n.d.	2 (10%)	n.d.	n.d.	20 (100%)	20 (100%)	2 (10%)	9 (45%)	20 (100%)	20 (100%)	1 (5%)	n.d.
Produkt & Schmierbande	1 (5%)	n.d.	n.d.	1 (5%)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2 (10%)
Schmierbande	3 (15%)	2 (10%)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2 (10%)	4 (20%)	n.d.	n.d.	2 (10%)	n.d.
Produkt, Schmierbande & Nebenprodukt 75 bp	n.d.	n.d.	1 (5%)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Anhang

Anhang Tabelle 35: Prozentuale Unterschiede des Anteils des PCR-Banden-Typs in den Reaktionsansätzen einer Mutations-PCR zwischen PCR-Lauf 1 und 2 (je 20 Reaktionen). Zur Herstellung des Mastermix wurden entweder 1,5 ml Reagiergefäße (Eppis), heißsterilisierte Glasgefäße oder zertifizierte *Safelock Tubes* verwendet. Alle Nullwerte sind zur besseren Übersichtlichkeit grau dargestellt. n.d., nicht detektier-/auswertbar, da alle Reaktionen einzig *hang up* aufwiesen.

Pipettiergefäß		Prozentuale Unterschiede der Anteile der detektierten Banden zwischen PCR-Lauf 1 und 2								
		autoklaviertes Eppi			heißsterilisiertes Glas			<i>Safelock Tube</i>		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
mit Templat	Produkt	5	n.d.	n.d.	0	10	10	0	n.d.	n.d.
	Produkt & <i>DNA hang up</i>	10	n.d.	n.d.	5	5	15	10	n.d.	n.d.
	<i>DNA hang up</i>	0	n.d.	n.d.	0	0	5	10	n.d.	n.d.
	Produkt & Schmierbande	0	n.d.	n.d.	5	5	5	0	n.d.	n.d.
	Schmierbande	5	n.d.	n.d.	0	0	0	0	n.d.	n.d.
	keine Bande	0	n.d.	n.d.	0	0	0	0	n.d.	n.d.
Blindwerte	keine Bande	10	n.d.	n.d.	0	10	5	0	n.d.	n.d.
	Nebenprodukt 50 bp	0	n.d.	n.d.	10	50	20	15	n.d.	n.d.
	Nebenprodukt 75 bp	0	n.d.	n.d.	5	20	5	0	n.d.	n.d.
	Nebenprodukt 100 bp	10	n.d.	n.d.	0	0	0	0	n.d.	n.d.
	Nebenprodukt 50 bp & 100 bp	0	n.d.	n.d.	0	0	5	0	n.d.	n.d.
	Produkt & Nebenprodukt 50 bp	0	n.d.	n.d.	0	5	15	30	n.d.	n.d.
	Produkt, Nebenprodukt 50 bp & 100 bp	0	n.d.	n.d.	0	0	5	0	n.d.	n.d.
	Produkt	0	n.d.	n.d.	5	0	0	0	n.d.	n.d.
	Produkt & <i>DNA hang up</i>	0	n.d.	n.d.	0	0	0	20	n.d.	n.d.
	<i>DNA hang up</i>	10	0	0	20	100	5	65	0	0
	Produkt & Schmierbande	5	n.d.	n.d.	0	0	5	0	n.d.	n.d.
	Schmierbande	5	n.d.	n.d.	0	15	15	0	n.d.	n.d.
	Produkt, Schmierbande & Nebenprodukt 100 bp	0	n.d.	n.d.	0	0	5	0	n.d.	n.d.
	Maximum	10	0	0	20	100	20	65	0	0

Anhang



Anhang Abbildung 52 Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte einer Mutations-PCR ohne Templat und mtDNA Mutations-Primern. Der innerhalb der ersten PCR entstandene *hang up* wurde aus dem Gel ausgeschnitten, aufgereinigt und mit dem Eluat nochmals eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

Anhang Tabelle 36 Vergleich der Mutationsfrequenzen in Rattenleber (Leberlappen 3) von 4 weiblichen (W1-W4) und 4 männlichen (M1-M4) F344-Ratten vor und nach der Korrektur um die möglicherweise im Blindwert vorhandenen Mutanten. **Signifikante Unterschiede** lagen vor, sobald der p-Wert <0,05 war (t-Test, p<0,05). *, Angabe der Schwankung als range/2.

	MF/bp (*10 ⁻⁶)	MF/bp (*10 ⁻⁶) korrigiert	p-Wert
M1	34,4 ± 2,9	24,4 ± 2,9	0,0135
M2	3,2 ± 0,1	2,2 ± 0,1	0,0010
M3	9,0 ± 1,8	6,0 ± 1,0	0,0634
M4	1,6 ± 0,3	0,6 ± 0,3	0,0131
W1*	11,9 ± 1,7	8,5 ± 1,7	0,2929
W2	12,5 ± 3,6	7,9 ± 5,7	0,2253
W3	12,3 ± 1,8	8,9 ± 1,8	0,0783
W4	2,9 ± 0,4	1,5 ± 0,8	0,0413

Anhang

Anhang Tabelle 37: Auf dem Agarosegel detektierte Bandenkombinationen mit n>5. Angegeben ist die Gesamtanzahl an Reaktionsansätzen (n gesamt) bei denen diese Bandenkombination auftrat, die minimale und maximale Schmelztemperatur, sowie Median, 25. und 75. Perzentil (P25 bzw. P75) der Schmelztemperatur.

	n gesamt	Minimum (°C)	Median (°C)	Maximum (°C)	P25 (°C)	P75 (°C)
keine Bande	36	62,0	79,1	88,5	78,7	82,8
50 bp	893	62,1	79,0	87,1	78,5	79,3
75 bp	19	80,4	81,4	83,9	81,1	83,1
100 bp	15	80,5	82,5	84,7	81,8	83,8
50 & 75 bp	10	81,0	81,6	84,3	81,2	83,0
50 & 100 bp	12	81,6	83,4	84,8	82,5	83,8
75 & 100 bp	6	82,1	82,5	83,8	82,1	82,8
200 bp	69	78,1	83,1	84,6	83,0	83,2
50 & 200 bp	1639	77,8	83,0	85,1	82,8	83,2
75 & 200 bp	12	78,6	83,2	83,4	82,8	83,3
50, 200 & 75 bp	7	82,7	83,0	83,8	82,8	83,1
50, 200 & 100 bp	14	82,4	83,1	83,8	82,8	83,2
50, 200 -& 400 bp	272	82,4	83,0	83,3	82,8	83,1
50, 200 & 250 bp	288	78,8	83,0	83,5	82,8	83,2
50, 200, 250 & 400 bp	103	78,1	83,0	87,0	82,9	83,2
50, 200, 250 & 500 bp	6	82,7	83,0	83,0	82,7	83,0
250 bp	73	76,9	83,0	84,8	82,8	83,3
250 & 50 bp	63	78,1	82,9	86,3	82,6	83,1
250 & 200 bp	12	82,7	83,0	83,3	82,9	83,2
250 & 500 bp	9	82,2	82,9	83,7	82,4	83,0
250, 50 & 500 bp	12	82,5	82,7	83,0	82,7	82,9
50, 200 bp & Schmierbande	6	82,6	82,6	83,7	82,6	82,7
50, 200, 400 bp & Schmierbande	8	82,3	82,8	82,8	82,7	82,8
200 bp & Schmierbande	23	82,7	86,0	87,9	83,3	86,7
200, 400 bp & Schmierbande	9	82,6	82,8	83,1	82,8	82,8
50 bp & Schmierbande	21	77,6	79,0	86,9	78,7	79,1

Anhang

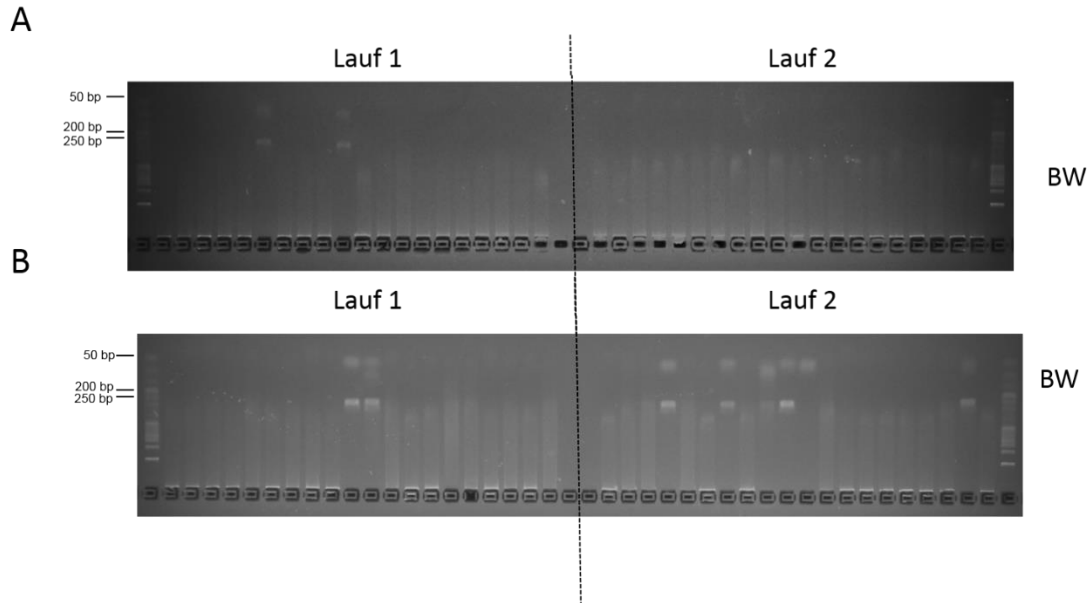
	n gesamt	Minimum (°C)	Median (°C)	Maximum (°C)	P25 (°C)	P75 (°C)
50 bp & <i>DNA hang up</i>	8	76,6	79,2	80,6	79,2	79,4
Schmierbande	87	63,8	85,7	88,1	83,6	86,9
<i>DNA hang up</i>	36	78,6	86,9	88,9	86,6	87,2

Anhang

Anhang Tabelle 38: Auf dem Agarosegel detektierte Bandenkombinationen aus Reaktionsansätzen mit und ohne Templat mit mtDNA-Primern. Angegeben ist die Gesamtanzahl an Reaktionsansätzen (n gesamt) bei denen diese Bandenkombination auftrat, die minimale und maximale Schmelztemperatur, sowie Median, 25. und 75. Perzentil (P25 bzw. P75) der Schmelztemperatur.

	n gesamt	Minimum (°C)	Median (°C)	Maximum (°C)	P25 (°C)	P75 (°C)
<u>Blindwerte</u>						
keine Bande	7	61,9	62,3	89,6	62,0	80,1
50 bp	49	77,2	79,0	83,4	78,8	79,3
75 bp	8	81,2	81,6	83,0	81,4	82,3
100 bp	4	82,3	82,7	83,9	82,4	83,4
50 & 100 bp	3	82,3	82,9	85,5	82,3	85,5
250 & 50 bp	24	79,8	82,8	83,4	81,5	83,1
250 & 75 bp	2	82,8	83,0	83,1	82,8	83,1
250, 50 & 100 bp	1	83,1	83,1	83,1	83,1	83,1
250 bp	2	82,9	83,1	83,3	82,9	83,3
250, 100 bp & Schmierbande	1	85,8	85,8	85,8	85,8	85,8
250 bp & Schmierbande	4	85,0	86,3	86,6	85,7	86,5
250 bp & <i>DNA hang up</i>	4	84,6	85,0	85,5	84,7	85,4
Schmierbande	25	83,4	86,6	87,7	86,0	86,9
<i>DNA hang up</i>	222	84,5	86,2	87,7	85,5	86,8
<u>Reaktionsansätze mit Templat</u>						
250 bp	113	82,2	82,7	85,6	82,6	82,7
250 bp & Schmierbande	16	83,2	85,8	86,7	85,1	86,1
250 bp & <i>DNA hang up</i>	70	85,1	85,9	87,3	85,7	86,2
<i>DNA hang up</i>	161	83,6	84,9	86,5	84,4	85,7

Anhang

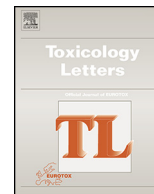


Anhang Abbildung 53 Reproduzierbarkeit der PCR-Produkte der Mutations-PCR unter der Verwendung des RedMastermix (Genaxxon bioscience) und mtDNA-Mutations-Primern. Der komplette Mastermix wurde geteilt und in 2 aufeinanderfolgenden PCRs (Lauf 1 und 2) verwendet. Der Versuch wurde zweimal unabhängig durchgeführt (A+B). Die Auftrennung erfolgte mittels 3%igem Agarosegel in 1x TAE-Puffer für 1 h bei 5 V/cm und einer SYBR® Green-Konzentration von 1 ng/µl. Als DNA-Leiter funktierte eine 50 bp Leiter (jeweils ganz außen im Bild).



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxlet

Mutagenic potential of the isoflavone irilone in cultured V79 cells

Anne Scheffler¹, Annette E. Albrecht¹, Harald L. Esch, Leane Lehmann*

Institute of Pharmacy and Food Chemistry, Chair of Food Chemistry, University of Würzburg, Am Hubland, D-97074 Würzburg, Germany

HIGHLIGHTS

- The isoflavone irilone was tested in cultured Chinese hamster lung fibroblast V79, and . . .
- Inhibited proliferation and did not increase the mutant frequency in the HPRT assay.
- Altered significantly the mutation spectrum.
- Significantly increased micronuclei with chromosomal fragments.
- Disrupted mitosis and significantly increased micronuclei with whole chromosomes.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 December 2014
Received in revised form 11 February 2015
Accepted 16 February 2015
Available online 19 February 2015

Keywords:

Dietary supplements
Irilone
Isoflavone
Mutagenicity
Mutation spectrum

ABSTRACT

After consumption of red clover-based dietary supplements, plasma concentrations of the isoflavone irilone (IRI) equal that of the well-investigated daidzein. Since some isoflavones are genotoxic, the potential of IRI to induce mutations was investigated.

Gene mutations were determined by hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) assay and sequencing of mutant cDNA, chromosome and genome mutations by micronucleus assay complemented by immunochemical staining of centromere proteins and microtubules in cultured V79 cells. Cell proliferation was monitored by electronic cell counting, flow cytometry and fluorescence microscopy.

IRI did not affect the mutant frequency in the *Hprt* locus but altered the mutation spectrum by increasing the proportion of deletions and decreasing that of base pair substitutions. Induction of chromosome mutations was supported by a slight but significant increase in the number of micronucleated cells containing chromosomal fragments despite activation of three cell cycle checkpoints possibly interfering with micronuclei formation. Moreover, IRI exhibited a strong aneugenic potential characterized by disrupted mitotic spindles, mitotic arrest, and asymmetrical cell divisions leading to chromosome loss, nuclear fragmentation as well as mitotic catastrophe. Thus, IRI might be another isoflavone to be taken into account in safety assessment of dietary supplements.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The isoflavone irilone (IRI, Fig. 1) was first isolated in 1973 from rhizomes of *Iris germanica* (Dhar and Kalla, 1973). In the following years, IRI was also detected in other plant species including red clover (Wu et al., 2003) and kudzu (Mansoor et al., 2011), the extracts of which are used in dietary supplements.

Abbreviations: 6-TG, 6-thioguanine; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; DES, diethylstilbestrol; EMS, ethyl methanesulfonate; ETO, etoposide; HPRT, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase; IRI, irilone; MMC, mitomycin C; NQO, 4-nitroquinoline *N*-oxide; PE, plating efficiency.

* Corresponding author. Tel.: +49 931 318 5481; fax: +49 931 318 5484.

E-mail address: leane.lehmann@uni-wuerzburg.de (L. Lehmann).

¹ Anne Scheffler and Annette Albrecht contributed equally to this work.

Data on the IRI content in red clover based dietary supplements are scarce but suggest that in relation to the main red clover isoflavones formononetin and biochanin A aglycone and glycoside IRI accounts for about 3–14% and 5–18%, respectively (Lutter et al., 2014). A human intervention pilot study with red clover dietary supplements revealed IRI plasma levels of 0.2–0.6 μM , which was equal or higher than those of formononetin and biochanin A and their metabolites daidzein and genistein (Maul and Kulling, 2010). Despite the high levels reached in human plasma information on the biological effects of IRI in mammalian cells is scarce. IRI was estrogenic in two cultured human cell lines (Lutter et al., 2014). Starting at slightly cytotoxic concentrations, IRI induced NAD(P)H:quinone reductase activity 2-fold in cultured mouse hepatoma cells (Wollenweber et al., 2003), and induced apoptosis in cultured human hepatoma cells (Mansoor et al., 2011).

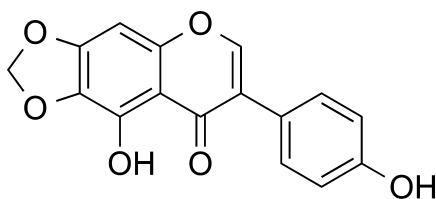


Fig. 1. Chemical structure of IRI.

Information on the mutagenicity and genotoxicity of IRI is lacking completely. Isoflavones have been known to cause gene mutations (Tsutsui et al., 2003) and to induce micronuclei (Kulling et al., 2002) in cultured mammalian cells. Thus, the ability of IRI to induce mutations at the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (*Hprt*) gene locus and to induce micronuclei in Chinese hamster V79 lung fibroblast was investigated. In addition, cDNA sequencing of mutant colonies was performed to allow the molecular characterization of the mutant phenotype.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

IRI (purity >95%) was obtained from ChromaDex™, Irvine, CA, USA) and diethylstilbestrol (DES, >98%) from Biomol, Germany. Mitomycin C (MMC, ≥98%), etoposide (ETO, ≥98%), ethyl methanesulfonate (EMS), 4-nitroquinoline *N*-oxide (NQO, ≥98%), and DMSO (99.9%) were obtained from Sigma–Aldrich, Germany. PCR reagents and equipment were obtained from Applied Biosystems, Germany, and all other chemicals, cell culture media and medium supplements were obtained from Sigma–Aldrich or Roth, Germany unless specified otherwise.

2.2. Cell culture conditions

In all experiments, the well-characterized V79 Chinese hamster fibroblast cell line (Bradley et al., 1981) was used which does not express any cytochrome P450-dependent monooxygenases, uridine diphosphate glucuronosyltransferases (Glatt et al., 1987) or sulfotransferases (Glatt et al., 2000) but has detectable activity of soluble catechol-*O*-methyl transferase (118 ± 51 pmol quercetin/min/mg cytosolic protein; unpublished data) and glutathione-*S*-transferase activity (Glatt et al., 1987). V79 MZ cells, kindly provided by H. Glatt (German Institute of Human Nutrition, Potsdam, Germany), were cultured in DMEM supplemented with 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 10% fetal calf serum (Invitrogen™ Life Technologies, Germany) referred to as DMEM complete.

2.3. *Hprt* mutant frequency and mutational spectrum

2.3.1. HPRT assay

The HPRT assay has been performed as described previously (Schumacher et al., 2005) with slight modifications. 1.5×10^6 V79 cells were seeded in cell culture flasks (175 cm², Greiner Bio-one, Germany) containing 20 ml DMEM complete. After 24 h, the medium was changed (day 0) and cells were treated with different concentrations of IRI or 1 µM NQO or 1% DMSO for 24 h. A total of 1×10^6 treated cells were subcultured in fresh medium directly after treatment (day 1) and again on day 4. On days 1, 4, and 6, the number of viable cells and cells with disintegrated cell membrane were counted with an electronic cell counter (CASY Model DT, Schaefer System GmbH, Germany) as a measure for cytotoxicity and proliferation. On day 6, cells with mutations at the *Hprt* gene locus

were selected by growing cells in DMEM complete, and 7 µg 6-thioguanine (6-TG)/ml using three tissue culture dishes (145 mm, Greiner Bio-one) with 1×10^6 cells per dish. To determine the plating efficiency (PE) on days 1 and 6, cells were grown in the absence of 6-TG (500 cells per 100 mm dish, three dishes). After 1 week, cells were fixed with ethanol and stained with methylene blue. Colonies were counted and the PE, i.e., the number of colonies per number of seeded cells, and the mutant frequency, i.e., the number of colonies/(number of seeded cells × the PE at day 6), were calculated.

2.3.2. Cloning and cDNA preparation

For cDNA sequencing of 6-TG-resistant mutants were cloned using cloning rings, total RNA was isolated, and reversely transcribed (using oligo-(dT) 18 primer) as detailed in Scheffler et al. (2015).

2.3.3. Amplification, isolation and sequencing of V79 cDNA

Reverse primer 5'-ATGAAGTGAAGTCTTTCACA-3' (exact positions depicted in Fig. 3 in Scheffler et al. (2015)) and forward primer 5'-CTTCTCTCACACCGTCT-3' were checked for lack of secondary structures and unspecific amplification products by PrimerExpress 3.0-licensed-(Applied Biosystems). Positioning of primers in the 3'- and 5'-untranslated region of *Hprt* cDNA, respectively, ensured reliable sequencing and duplicate determination of all exons (Fig. 3 in Scheffler et al. (2015)). 600 ng *Hprt* cDNA dissolved in nuclease free water and 4 µl forward or reverse primer (5 µM), respectively were mixed in a volume of 14 µl and subjected to Sanger sequencing by LGC Genomics, Germany.

2.3.4. Analysis of sequencing data and of mutational spectra

Resulting electropherograms were analyzed using Chromas Lite (freely available at <http://www.softpedia.com/get/Science-CAD/Chromas-Lite.shtml>) and resulting sequences were compared using ApE (freely available at <http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>) and Referenz Sequenz cDNA: GenBank: J00060.1; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/J00060.1>. type and position of mutations within the cDNA were determined by sequence alignment.

2.4. Micronucleus assay

2.4.1. Cell exposure

V79 cells were grown on chamber slides (Thermo Fisher Scientific Inc., Germany) with eight chambers per slide ($5-7 \times 10^3$ cells per cm²) for 24 h prior to incubation with IRI, DES, ETO, MMC, and EMS or with the solvent (1% DMSO) for 6 h with and without subsequent substance-free incubation for up to 40 h.

2.4.2. Fixation and immunological staining

Following incubation with the test compounds, cells were stained as described previously (Lehmann and Metzler, 2004) with slight modifications (Scheffler et al., 2015). Briefly, cells were fixed with paraformaldehyde and methanol and stained with anti-α-tubulin (Sigma–Aldrich) for the evaluation of cell morphology and the detection of freshly divided cells, and with anti-centromere protein antibodies (from patients with limited systemic scleroderma/CREST syndrome, Antibodies Inc., Davis, CA, USA) followed by secondary Cy3-conjugated goat anti-mouse antibody (Jackson Immune Research Laboratories, Inc., West Grove, USA) and FITC-conjugated goat polyvalent anti-human antibody (Sigma–Aldrich). Finally, slides were mounted with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) containing antifade solution.

2.4.3. Fluorescence microscopic analysis

Slides were coded and analyzed with an Observer Z1 fluorescence microscope (Zeiss, Germany) equipped with a

Plan-Apochromat objective 63×/1.4 Oil DIC by a person not knowing the code.

Scoring criteria for micronuclei (Corvi et al., 2008) were considered, supplemented by the following: nucleus and micronucleus/micronuclei were to lie within the same cytoskeleton (i.e., α -tubulin staining). Moreover, normal and disrupted mitotic stages, freshly divided cells (i.e., cells with cytoplasmic bridges) as well as nuclear fragmentation and apoptotic cells were scored (see Scheffler et al., (2015) for details and exemplary micrographs). At least 1000 cells or 100 cells with micronuclei were scored per slide with respect to micronuclei, morphology of mitosis, cell divisions and signs of cytotoxicity such as nuclear fragmentation, apoptotic bodies, and depolymerized cytoplasmic microtubule complex.

2.5. Cell numbers and cell cycle distribution

V79 cells were grown and treated with IRI under the same conditions as described in Section 2.4.1 but in 24-well plates (Nunc™). For the determination of cell numbers, cells were trypsinized, resuspended in medium and counted electronically. Differentiation between living cells and dead cells (i.e., cells with disrupted cell membrane) was performed based on size distribution of the trypsinized single cell population during electronic cell counting. Calibration of size distribution for living and dead cells was performed using the native cell population and cells treated with ethanol, respectively. For living V79 cells, a diameter of $\geq 9.5 \mu\text{m}$ was determined, whereas dead cells were smaller ($5.5\text{--}9.5 \mu\text{m}$).

For the determination of the cell cycle distribution, cells were lysed and stained using the two-step reagents from Partec, Germany. Flow cytometry was carried out with a CyFlow®-Space

(Partec) and analyzed with FlowMax® software version 2.60 (Partec). Small nuclear fragments with fluorescence intensities smaller than 1/4 of G1/G0 nuclei were excluded from analysis.

2.6. Quantitation of IRI in cell culture medium before and after incubation

In each experiment, about 1 ml of the incubation medium (freshly prepared and after incubation) was flash frozen with liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis. To quantify IRI, the method previously described for the determination of IRI in dietary supplements (Lutter et al., 2014) was used with slight modifications. $2.0 \mu\text{g}$ internal standard (4,4'-isopropylidendiphenol) was added to $250 \mu\text{l}$ ($< 10 \mu\text{M}$ IRI) or $50 \mu\text{l}$ ($> 10 \mu\text{M}$ IRI) medium prior to extraction with ethyl acetate. Organic phases were collected, evaporated, and the remainder was reconstituted in $50 \mu\text{l}$ methanol. HPLC analyses were run on a HP Agilent Series 1100 (Agilent Technologies, Germany) equipped with a DAD. $5 \mu\text{l}$ reconstituted extract was separated on a C18 phase (Eurospher-100, $250 \times 4 \text{mm}$, $5 \mu\text{m}$, Knauer, Germany) at 1ml/min using acidified acetonitrile:water (0.1% formic acid in water (A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (B); gradient was from 30% B to 39% B over 54 min and then from 39% B to 55% over 16 min), detected by its absorbance at 280 nm and relative peak areas compared to the calibration curve (24, 44, 64, 84, and 104 ng IRI together with 200 ng internal standard on column).

2.7. Statistical methods

Number of independent experiments (new batch of cells and fresh solution of test compound) and details on statistical

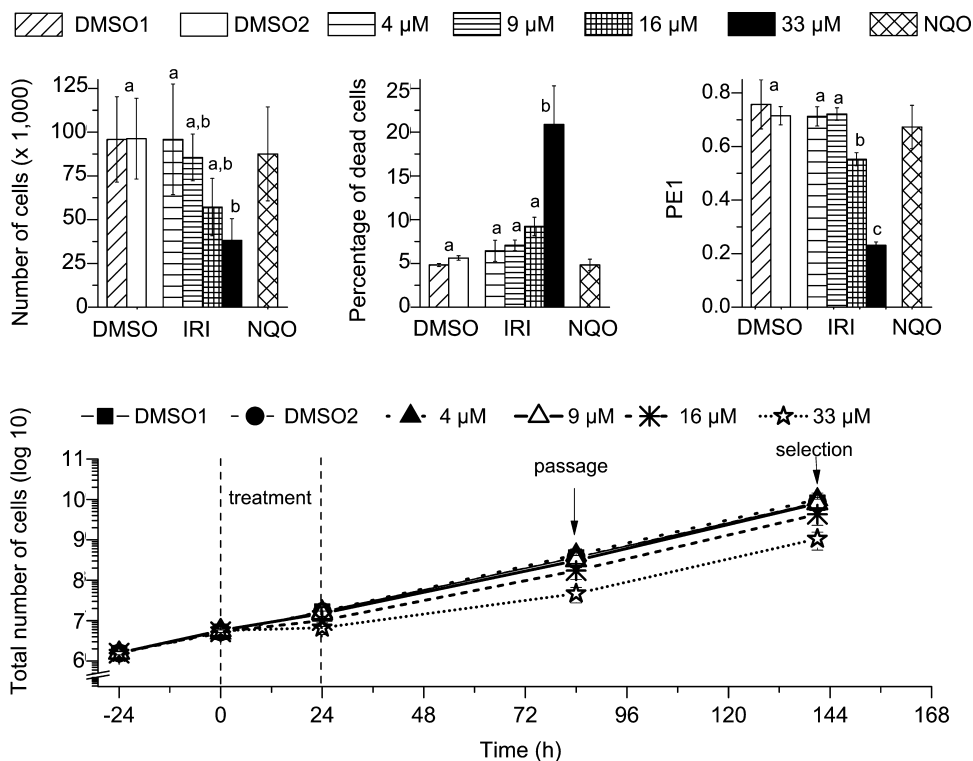


Fig. 2. Impact of IRI on cell numbers and plating efficiency (PE) during the HPRT assay. Upper panel: numbers of living cells, percentages of cells with disintegrated cell membrane (dead cells) and PE immediately after treatment of V79 cells (PE1) with solvent (1% DMSO) or IRI for 24 h. Lower panel: development of cell numbers during the HPRT assay. Based on cell number determinations in each flask at seeding, prior to treatment, at each passage, and at selection, total living cell numbers were calculated. DMSO1 was handled always first, DMSO2 always last. At each endpoint, results of DMSO1 did not differ significantly from that of DMSO2 (t -test). Data represent means \pm standard deviations of at least 3 independent experiments. Different characters signify statistically different data groups (ANOVA/Tukey) testing combined results of solvent controls together with different IRI concentrations. Populations treated with NQO did not yield statistically different results from that treated with solvent at any endpoint (t -test). For the sake of clarity, no statistical information has been included in the lower panel.

comparisons and levels of significance can be found in the captions of figures/tables. If not indicated otherwise, statistical tests were performed using OriginPro[®] 9.1 or R (version 3.0.1).

When analyzing concentrations of IRI in cell culture media, cell numbers, cell cycle distributions, and PE, statistical difference of two data groups was tested with *t*-test and multiple data groups were analyzed by ANOVA with comparison of the means by Tukey. Mutant frequencies were analyzed by *U*-test and Kruskal–Wallis test as appropriate. Occurrence of specific mutations and endpoints scored microscopically were compared by Fisher's exact test as recommended (Kirkland, 1994). Mutation spectra were analyzed as described by Cariello et al. (1994). The required software is freely available at <http://www.ibiblio.org/dnam/main-page.html> and each comparison was performed with 1700 iterations as recommended (Cariello et al., 1994).

3. Results

To detect all kinds of mutations, the mutagenic potential of IRI was assessed in the HPRT assay *in vitro*, a gene mutation assay which particularly detects DNA base pair substitutions, but does not respond well to clastogens (Moore et al., 1989), and the micronucleus assay *in vitro*, which detects a variety of DNA lesions

and other lesions leading to large deletions (chromosome mutation) and to chromosome loss (numerical genome mutation). In human plasma high IRI levels were detected (Maul and Kulling, 2010). Thus, in the present study, micronucleus testing was performed without activating system.

Being an important factor in the conversion of DNA damage into mutation, proliferation was monitored at different endpoints.

To evaluate the stability of IRI in medium under incubation conditions, aliquots of incubation media were either sampled immediately or at the end of the treatment period and concentrations of IRI were quantified by HPLC–UV: Concentrations of IRI in the culture media at the end of the treatment period of both the HPRT and micronucleus assay, were not statistically different from that before treatment, yet mean values were slightly decreased (Fig. 1 in Scheffler et al. (2015)). Therefore, extensive chemical or enzyme-induced instability of IRI can be excluded.

3.1. Gene mutagenic potential of IRI at the *Hprt* locus of V79 cells

The HPRT assay was performed with a 24 h treatment period followed by a 5 day expression period and was completed with selection of mutants. 6-TG-resistant mutant colonies were cloned and mutation spectra of *Hprt* cDNA determined. NQO served as

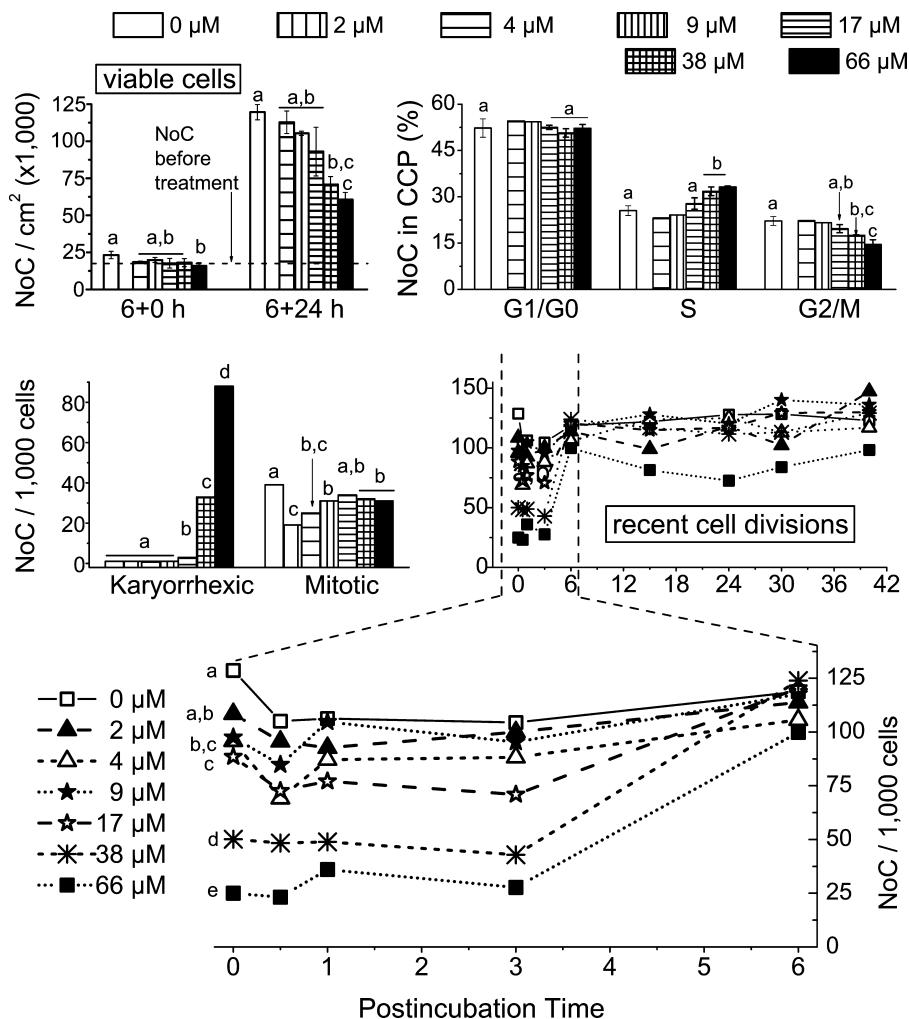


Fig. 3. Number of viable cells (NoC) per cm² in a specific cell cycle phase (CCP, top panel) as well as microscopic markers of cytotoxicity (karyorrhetic cells) and proliferation (mitotic cells) of V79 cells immediately after treatment with IRI for 6 h (6+0 h; NoC and CCP), and after 24 h postincubation (NoC) as well as kinetics of recent cell divisions during IRI-free postincubation for up to 40 h (lower panels). Data represent mean \pm standard deviation of three determinations (NoC), mean \pm standard deviation of three independent experiments (cell cycle, IRI 4–9 μ M single experiment and 2 μ M not determined), statistically analyzed by ANOVA/Tukey. Microscopic markers, presented as sum of minimum three independent experiments, were statistically analyzed by Fisher's exact test. Different characters signify statistically different data groups (if applicable) at the respective postincubation time at $p < 0.05$.

positive control and two solvent controls (1% DMSO) were used per assay: DMSO1 was handled always first, DMSO2 always last, flanking the cell populations treated with IRI and NQO.

3.1.1. Cytotoxicity and impact of IRI on proliferation activity

Proliferation of cells during the HPRT assay is necessary for the conversion of DNA damage into mutations. Thus, the impact of IRI on proliferation during treatment and the IRI-free postincubation period was determined by electronic cell counting. Furthermore, PEs were determined after IRI treatment and at the day of selection.

After treatment with 4–33 μM IRI for 24 h, the numbers of cells were significantly reduced by 16 and 33 μM IRI when compared to solvent control (Fig. 2). Furthermore, a concentration-dependent increase in the percentage of dead cells was observed, reaching statistical significance at the highest concentration of IRI (Fig. 2). PEs were decreased significantly only by 16 and 33 μM IRI (Fig. 3). In contrast, neither percentage of dead cells at the following cell passage and at selection nor PE at selection was affected by IRI (data not shown). Accordingly, compared to the population treated with solvent only, kinetics of cell number development of the cell populations treated with IRI were characterized by a reduced increase (16 μM) or even decrease (33 μM) in cell numbers during treatment, followed by immediate (16 μM) or delayed (33 μM) resumption of normal cell proliferation as indicated by parallel slopes of the proliferation curves (Fig. 2). Thus, concentrations of IRI for the HPRT assay ranged from one no-observed effect concentration (4 μM) and two inducing growth inhibition/ slight cytotoxicity (9 and 16 μM) to one inducing cell death (33 μM).

3.1.2. Irilone did not affect the frequency of 6-TG-resistant mutants

Mutant frequency of V79 cells treated with solvent was 6.9 ± 1.6 (DMSO1) and 8.0 ± 2.7 (DMSO2) per million colony forming cells which lies within the expected range for the V79 cell population used in the authors' lab (Schumacher et al., 2005; Brugger et al., 2006; Zettner et al., 2007) and within the recommended range (Bradley et al., 1981). Since both controls did not differ significantly from each other (*U*-test, $p = 0.8411$), results of both controls were combined. As expected (Schumacher et al., 2005; Zettner et al., 2007), after treatment with the positive control NQO (1 μM), a significant increase in mutant frequency was observed (Table 1).

Treatment with 4–33 μM IRI caused a slight, not statistically significant (Kruskall–Wallis, $p = 0.07843$) increase in mutant frequency at 16 μM IRI to 14.6 ± 5.2 per million colony forming cells, which still lies within the range of historical controls in the authors' lab (up to 15 per million colony forming cells).

Table 1

Mutant frequencies (6-TG-resistant colonies per 10^6 colony forming cells) at *Hprt* locus of V79 cell populations treated with solvent (1% DMSO), IRI or the known mutagen NQO. Data represent sum of 3 petri dishes in the respective experiments 1–4 and mean of at least 3 independent experiments. Statistically significant difference between DMSO and the different IRI groups was missed narrowly (Kruskall–Wallis, $p = 0.07843$).

	Mutant frequency				Mean
	Experiment				
	1	2	3	4	
DMSO1 + 2	7.8	6.3	7.7	8.0	7.4 ± 0.6
IRI 4 μM	n.d.	1.7	14.0	10.4	8.7 ± 6.3
IRI 9 μM	11.1	10.1	7.9	n.d.	9.7 ± 1.6
IRI 16 μM	14.1	13.5	9.2	21.7	14.6 ± 5.2
IRI 33 μM	10.2	11.5	14.1	n.d.	11.9 ± 2.0
NQO 1 μM	104*	140*	198*	313*	189 ± 92

n.d., not determined. *The positive control NQO significantly induced mutant frequency ($p = 0.03038$, *U*-test). Mutants from experiments 1 to 3 were cloned for cDNA sequencing.

However, since the increase in mutant frequency was observed in every independent experiment (Table 1), the mutation spectrum of the 6-TG resistant mutants collected from populations treated with 16 μM IRI was determined.

3.1.3. Irilone affected the mutation spectrum of 6-thioguanine-resistant V79 cell mutants

Assuming that resistance of mutants to 6-TG has got to be reflected at *Hprt* mRNA level, the mutation spectra of *Hprt* cDNAs were determined. Thus, a minimum of ten 6-TG-resistant colonies derived from solvent- and IRI-treated cell populations were chosen randomly during each independent HPRT assay (Table 1), cloned, total RNA was isolated, mRNA was reversely transcribed, cDNA was amplified by PCR and the amplification product purified and sequenced by Sanger method. Thus, a total of 70 cDNAs, derived from 6-TG-resistant colonies of the populations treated with DMSO and 34 cDNAs, derived from populations treated with 16 μM IRI were analyzed. Each cDNA exhibited at least one mutation, i.e., deletions of exons 2–4, 6, and of untranslated region + exons, transitions, and +1-frameshift mutations (Table 1 in Scheffler et al. (2015)). Mutation spectrum of 6-TG-resistant mutants derived from cells of the solvent control were characterized by exon deletions (67%) and base pair substitutions (33%, Table 2).

Comparison of spontaneously occurring mutation spectrum with published data was hindered due to methodical differences and variation between V79 cell lines as detailed in Scheffler et al. (2015). Thus, it can only be stated that the mutation spectrum of the DMSO-treated, 6-TG resistant V79 cell population in the present study seems not to be unusual for the V79 MZ population.

Mutation spectra did not differ significantly between the controls (test according to Cariello et al. (1994), $p = 0.2176$). In contrast, mutation spectrum observed after treatment with 16 μM IRI completely lacked base pair substitutions, increasing the percentage of exon deletions to 94%. In addition, two +1 frameshift mutations were observed (Table 2), which did not occur in 70 mutants derived from control cell populations (Table 1 in Scheffler et al. (2015)). The differences in the mutation spectra observed in mutants derived from the cell population treated with solvent and with IRI, in particular the lack of base pair substitutions in the population treated with 16 μM IRI (Table 2) were observed in every one of the three independent HPRT assays (Table 1 in Scheffler et al. (2015)).

To estimate concentration dependency, in a single HPRT experiment, mutations in 10 and 12 *Hprt* cDNAs of 6-TG-resistant mutants derived from the cell populations treated with 4 and 33 μM IRI, respectively, were compared with that observed in the cell populations treated with DMSO and 16 μM IRI. Mutation spectrum of *Hprt* cDNAs derived from cells treated with 4 μM IRI exhibited one transition besides exon deletions (not observed in a total of 46 cDNAs obtained from populations treated with 16 and 33 μM IRI) and did not differ significantly from that observed in control cells (Table 2). In contrast, *Hprt* cDNA derived from cells treated with 33 μM IRI exhibited exclusively exon deletions and differed significantly from that observed in control *Hprt* cDNA ($p = 0.02824$; Table 2) but not from that in cDNA derived from cells treated with 16 μM IRI (test according to Cariello et al. (1994), $p = 1.0000$). Consideration of independent instead of total mutations, confirmed the statistical significance of the main observations, i.e., decrease in base pair substitutions and alteration of mutation spectrum by 16 μM IRI (Table 2).

3.2. Induction of micronuclei by IRI

Although exon deletions at cDNA level are caused by both deletions, base pair substitutions, and frameshift mutations at DNA level (Zhang et al., 1992), the increase in exon deletions in mutation

Table 2

Number (n) of exon deletions (ExDel), base pair substitutions (BSubst), and frameshift mutations (FS) and the respective percentage of total mutations (%) detected in *Hprt* cDNAs derived from 6-TG-resistant colonies selected from V79 cell populations treated with solvent (1% DMSO) or IRI. ExDel were deletions of exons 2–3, 4, 6, and untranslated region + exons, BSubst were transitions, and FS were +1-frameshift mutations see Table 1 in Scheffler et al. (2015). During the HPRT assay, every cell population within one flask was reduced every 2–3 days to 1×10^6 cells, thus in theory, only one mutant of the mutant clones formed by proliferation of the initial mutant was included in the next flask and therefore, multiple selection of mutant clones deriving from the same mutational event should be unlikely. Yet two or more identical mutations at the same position of *Hprt* cDNA were observed in mutants selected from the same flask. Therefore, mutations were only included in the spectrum of specific independent (i) mutations (Σ_i) if they were either at different positions of the *Hprt* cDNA sequence, occurred in different experiments which were performed with a freshly thawed stock of cells, or occurred in cell populations treated in different flasks during the same HPRT assay. Statistical comparisons of the occurrence of specific mutations (e.g., ExDel) between treatment groups and control group DMSO_Σ were performed by Fisher's exact test. Both total (n_t) and independent (n_i) mutations were statistically compared and significant differences indicated by asterisks: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Statistical comparison of clustered mutation spectra was performed according to (Kirkland, 1994), testing both the spectra of total mutations (Σ_t) and that of independent mutations (Σ_i) observed after treatment with DMSO₁, DMSO₂ or IRI against the mutation spectrum determined with mutants collected from all populations treated with DMSO (DMSO_Σ).

	ExDel			BSubst			FS (+1)			Σ Mutations		p value Σ_t	p value Σ_i
	n_i	n_t	%	n_i	n_t	%	n_i	n_t	%	Σ_i	Σ_t		
DMSO ₁	5	27	75	4	9	25	0	0	0	9	36	0.49529	1.00000
DMSO ₂	7	20	59	7	14	42	0	0	0	14	34	0.52177	1.00000
DMSO _Σ	12	47	67	11	23	33	0	0	0	23	70	n.a.	n.a.
IRI 16	7	32**	94	0*	0***	0	2	2	6	9	34	<0.00000	0.00177
IRI 4	2	11	92	1	1	8	0	0	0	3	12	0.10647	–
IRI 33	2	12*	100	0	0*	0	0	0	0	2	12	0.02824	–

n.a., not applicable; –, test not performed due to small number of mutations.

spectra of 6-TG resistant V79 cells indicated a clastogenic mode of action, which is known to be detected insufficiently by the *Hprt* gene mutation assay (Moore et al., 1989). Thus, the putatively clastogenic potential of IRI was further investigated using the micronucleus assay, which responds to both clastogens inducing micronuclei containing chromosomal fragments (CREST antibody signal-negative micronuclei) and aneugens inducing micronuclei containing whole chromosomes (CREST antibody signal-positive).

Formation of micronuclei is only possible in proliferating cells and requires, depending on the genotoxic mode of action and phase of the cell cycle in which the initial DNA damage occurs, one or more S-phase(s) and/or at least one mitosis. Since genotoxins are likely to induce arrests in one or more phases of the cell cycle, a protocol with a treatment period of 0.5 population doublings (6 h), followed by a substance-free postincubation period was applied. Since DNA lesions cause lesion-specific kinetics of micronuclei formation (summarized by Kirsch-Volders et al. (2011)), kinetics of micronuclei formation was monitored after treatment of V79 cells with IRI, followed by a IRI-free postincubation period for up to 40 h and was compared with positive controls with known modes-of-action. Since the V79 cell line is characterized by >90% proliferating cells (von der Hude et al., 2000) and cell proliferation during the postincubation period was monitored, the micronucleus assay was performed without addition of cytochalasin B to induce binucleated cells (Corvi et al., 2008).

3.2.1. Effect of IRI on cell proliferation

Cytotoxicity and cell proliferation during the micronucleus test was monitored in parallel experiments with the same incubation conditions (number of cells/area and volume of medium, respectively), and the influence of IRI on the number of cells was determined by electronic cell counting. Immediately after treatment with 2–66 μ M IRI for 6 h, numbers of cells were reduced compared to solvent control, reaching statistical significance at 66 μ M IRI (Fig. 3, left top panel). Due to the small difference in cell numbers, after an incubation time of 0.5 times cell cycle length, only the number of control cells was significantly higher than at the beginning of treatment with IRI (t -test, $p = 0.0318$, data not shown). After treatment with 66 μ M IRI, cell numbers were even lower than at the beginning of the treatment period (Fig. 3, left top panel), indicating cell death during treatment with IRI. Thus, the morphology of nuclei and cytoskeletons was determined microscopically.

As expected, no significant increase in the frequency of cells containing nuclear fragments with condensed chromatin, i.e., apoptotic bodies (Section 2.4.4 in Scheffler et al. (2015)), was observed immediately after treatment with IRI for 6 h (Fig. 2 in Scheffler et al. (2015)). After IRI-free postincubation for up to 40 h, small increases in the frequencies of cells with apoptotic bodies were observed after treatment with 38 and 66 μ M IRI (maximum 4 and 10 cells/1000 cells, respectively, at 15 h postincubation, Fig. 2 in Scheffler et al. (2015)).

However, after treatment with 17, 38, and 66 μ M IRI, a strong increase in the frequency of nuclear fragmentation (karyorrhexis) without chromatin condensation was observed (Fig. 3, left middle panel), decreasing during postincubation time and remaining statistically significant until 6 h (38 μ M) and 15 h (66 μ M) of postincubation (Fig. 2 in Scheffler et al. (2015)).

Impact of IRI on cell proliferation was assessed by determination of cell cycle distribution by flow cytometry and fluorescence microscopic scoring of mitotic cells and recent cell divisions indicated by remnants of the midbody stained with anti- α -tubulin antibody (Lehmann et al., 2006).

Cell cycle analysis revealed a concentration-dependent and significant increase in the proportion of cells in S-phase and decrease in the proportion of cells in G2/M-phase at 38 and 66 μ M IRI (Fig. 3, right top panel). Accordingly, the number of mitotic cells was significantly reduced at most concentrations of IRI tested, but no concentration-dependency was observed (Fig. 3, left middle panel). Fluorescence microscopy also revealed a strong and concentration-dependent decrease in recent cell divisions after treatment with 9 μ M IRI and more, reaching only 20% of that of solvent-treated cells at 66 μ M IRI (Fig. 3, bottom panel). Surprisingly, the percentage of cells in G1/G0 phase of the cell cycle determined by flow cytometry was not affected by treatment with IRI (Fig. 3, right top panel). G1 phase takes about 5 h in the V79 cell population used (Schumacher et al., 2005). Thus, if the transition between G1 and S phase had been normal, nearly all G1 cells would have left G1 phase without being completely replaced by early G1 cells during the treatment period of 6 h. Therefore, the lack of decrease in G1/G0 population indicated another cell cycle arrest in G1 phase.

Taken together, IRI strongly affected cell cycle distribution inducing cell cycle arrest not only in S-phase but also in G1/G0 phase of cell cycle probably impeding formation of micronuclei in the presence of IRI.

To assess if micronuclei formation was even possible in the IRI-free postincubation period, the number of cells after IRI-free postincubation for 24 h and the kinetics of recent cell divisions was analyzed. After postincubation for 24 h, numbers of cells treated with 4–66 μM IRI were reduced concentration-dependently compared to solvent control, reaching statistical significance at 38 and 66 μM IRI (Fig. 3, left top panel). At the highest concentration of IRI (66 μM), the absolute number of cells was still about three-fold higher than that at the beginning of treatment, indicating a certain proliferative activity but also demonstrating that the highest possible concentration was reached.

Accordingly, the decrease in recent cell divisions observed immediately after treatment with 4–66 μM IRI for 6 h was completely reversed (4–38 μM) or reduced (66 μM) within the first 6 h of the postincubation period (Fig. 3, right middle and bottom panel).

Having assured that with 2–66 μM IRI an appropriate concentration range for micronucleus assay was applied, slides were analyzed with respect to induction of micronuclei containing chromosomal fragments and whole chromosomes.

3.2.2. Induction of micronuclei containing chromosomal fragments by IRI

In the V79 cell population treated with solvent only, 20–34 cells containing CREST antibody signal-negative micronuclei (i.e., chromosomal fragments)/3000 cells were observed (Fig. 4) which lies within the normal range (Galluzzi et al., 2012). The aneugen DES did not affect the frequency of micronucleated cells with chromosomal fragments at any time point (Supplemental table in Scheffler et al. (2015)). The occurrence of micronuclei containing chromosomal fragments induced by other positive controls followed different kinetics: whereas the topoisomerase poison ETO significantly increased the frequency of cells with CREST antibody signal-negative micronuclei already at 6 h postincubation time, the DNA–DNA cross-linker MMC and the alkylating agent

EMS induced an increase in micronucleated cells at 15 and 24 h, respectively (Fig. 4). In cell populations treated with 38 and 66 μM IRI, a slight but significant ($p < 0.05$, Fisher's exact test) increase in the frequencies of micronucleated cells containing chromosomal fragments at 6–40 h (38 and 66 μM) postincubation time to maximum 53 and 64 micronucleated cells/3000 cells, respectively, was observed (Fig. 4), supporting a weak clastogenic potential of IRI. Although the increase in micronucleated cells was too small to draw strong conclusions from its time-dependency, a mode of action needing rather a shorter postincubation period (such as observed with ETO or MMC) than a longer postincubation period (as observed with EMS) was indicated.

3.2.3. Induction of micronuclei containing whole chromosomes by IRI

After treatment with the known aneugen DES (15 and 25 μM), the frequency of cells with micronuclei containing whole chromosomes at 0–15 h postincubation time was increased to maximum 89 micronucleated cells/3000 cells (25 μM , 6 h postincubation) compared to 2.6–6.1 micronucleated cells/3000 cells observed with the solvent control (Fig. 5). Likewise, after treatment with 38 and 66 μM IRI, the frequency of micronucleated cells was increased to maximum 40 (38 μM , 3 h postincubation) and 41 (66 μM , 6 h postincubation) micronucleated cells/3000 cells. Due to the putative aneugenic potential of IRI, mitotic cells were re-evaluated by fluorescence microscopy at the time points 6+0, 6+0.5, 6+1, 6+3, and 6+6 h with respect to disruption of mitotic stages possibly causing aneuploidy.

3.2.4. Effect of IRI on mitosis

The proportion of cells in G2/M and the number of recent cell divisions was significantly decreased by 9–66 μM IRI (Fig. 3). However, due to the strong interference of IRI with cell cycle progression in G1 and S phase (Section 3.2.1), it was possible that this decrease was caused by lack of cells actually reaching G2 phase and mitosis. A decrease in the number of recent cell divisions could also be caused by mitotic arrest, i.e., delay or stop of cells in

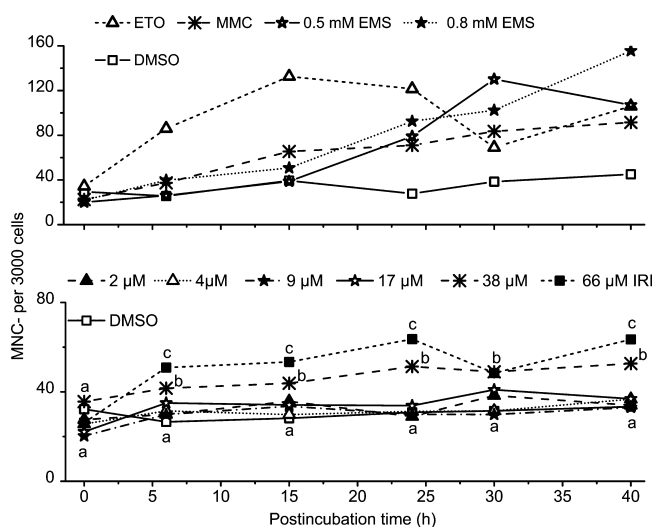


Fig. 4. Cells with micronuclei containing chromosomal fragments (MNC-) after treatment with various concentrations of the positive controls ETO (0.25 μM), MMC (2.5 μM), and EMS (upper panel) or IRI (lower panel) for 6 h and compound-free postincubation for up to 40 h. For exemplary micrographs of scored micronuclei see Section 2.4.4 in Scheffler et al. (2015). Data represent sum of minimum three independent experiments (0.5 mM EMS and 2 μM IRI, single experiments). For the results of each experiment see Supplemental table in Scheffler et al. (2015). Different characters signify statistically different data groups of IRI treatment at the respective postincubation time ($p < 0.05$, Fisher's exact test). ETO (6–40 h), MMC (15–40 h), and EMS (24–40 h) significantly increased the number of MNC-. For the sake of clarity, this information has not been included in the respective graphs.

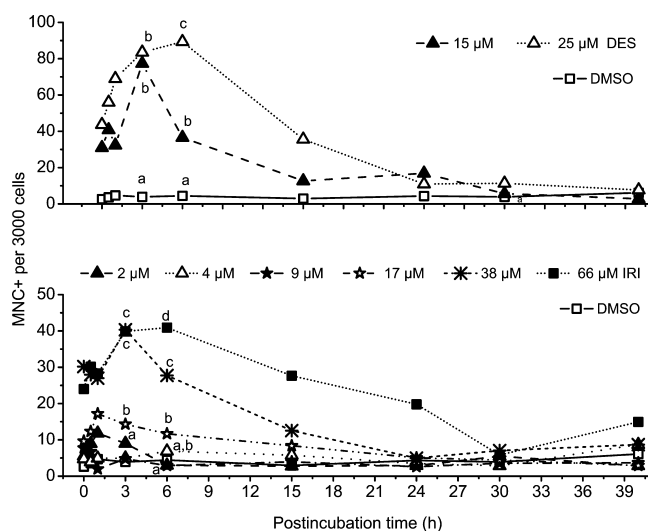


Fig. 5. Cells with micronuclei containing whole chromosomes (MNC+) after treatment with various concentrations of the positive control DES (upper panel) or IRI (lower panel) for 6 h and compound-free postincubation for up to 40 h. For exemplary micrographs of scored micronuclei, see Section 2.4.4 in Scheffler et al. (2015). Data represent sum of minimum three independent experiments (IRI 2 μM one experiment, DES 15 μM two experiments). For the results of each experiment see Supplemental table in Scheffler et al. (2015). Different characters signify statistically different data groups at the postincubation times where maximum increase in MNC+ was observed (3 and 6 h, respectively, $p < 0.05$, Fisher's exact test): DMSO vs. DES 15/25 μM (3/6 h): $p < 0.0001$. DMSO vs. IRI 17 μM (3/6 h): $p = 0.0011/0.0113$; DMSO vs. IRI 38/66 μM (3/6 h): $p < 0.0001$.

metaphase of mitosis, caused by activation of the spindle assembly checkpoint preventing onset of anaphase. Usually (without induction of other cell cycle arrests), mitotic arrest is accompanied by an increase in mitotic index. However, the mitotic index was decreased by IRI (Fig. 3, left middle panel).

Using DAPI fluorescence to assess chromosomes and Cy3 fluorescence of anti- α -tubulin antibody-stained mitotic spindles, the morphology of mitotic stages was determined. Mitotic stages from prophase to telophase were scored and metaphases and ana-/telophases were further classified as: (i) normal, (ii) multipolar spindles and/or lagging chromosomes in ana-/telophase causing predominately aneuploidy, i.e., chromosome loss due to micronuclei containing whole chromosomes (summarized by Kirsch-Volders et al. (2011)), and (iii) structurally damaged mitotic spindles and/or misaligned chromosomes causing predominately non-disjunction, polyploidy (summarized

by Kirsch-Volders et al. (2011)), or mitotic catastrophe (summarized by Vakifahmetoglu et al. (2008)).

Immediately after incubation with solvent, 21 mitotic cells/1000 total cells had not passed the spindle assembly checkpoint (i.e., were in prophase–metaphase) and 15 mitotic cells/1000 total cells had passed (i.e., were in anaphase–telophase, Fig. 6), summing up to a typical mitotic index for the V79 cell population used (Brugger et al., 2006). One metaphase/1000 cells appeared disrupted. The number of mitotic cells prior to onset of anaphase was not affected after treatment with 9 μ M IRI, but decreased at 2 and 4 μ M IRI and slightly elevated to 26–30/1000 total cells at 17–66 μ M IRI. Yet the number of metaphases with structural damage was increased concentration-dependently by 2–66 μ M IRI, reaching 87% structurally disrupted pro-metaphases at 66 μ M IRI. It is unlikely, that metaphases with structural damage pass spindle assembly checkpoint. Accordingly, the number of ana- and telophases was reduced concentration-dependently to merely 3/1000 total cells at 66 μ M IRI (Fig. 6; 6+0 h) indicating a pronounced mitotic arrest. Moreover, the occurrence of multipolar metaphases induced by 38 and 66 μ M IRI coincided with multipolar ana- and telophases (Fig. 6). Thus, half and two third of the few mitotic cells being able to undergo mitosis under the influence of 38 and 66 μ M IRI, respectively, were multipolar and thus prone to asymmetric cell division.

After IRI-free postincubation for 0.5 h, an increase in the number of cells in ana-/telophase to a normal frequency was observed, indicating at least partial reversibility of the mitotic arrest. However, cells previously treated with 17–66 μ M IRI still exhibited ana-/telophases with lagging chromosomes and/or multipolar spindles.

Besides micronuclei, asymmetric mitoses seemed to lead to asymmetric cell divisions forming two or more daughter cells containing single small "nuclei" or several nuclear fragments without condensation of chromatin lying within a normal cytoplasmic microtubule complex (Section 2.4.4 in Scheffler et al. (2015)).

The number and morphology of mitotic stages were still affected after 1 and 3 h IRI-free postincubation (Fig. 6). Whereas the persisting occurrence of disrupted mitoses further supports the aneugenic potential of IRI, the number of mitotic cells both before and after spindle assembly checkpoint at these time points could also be affected by other cell cycle arrests indicated by flow cytometry and fluorescence microscopy (Fig. 3).

Taken together, the occurrence of IRI-induced micronuclei containing whole chromosomes was preceded/accompanied by a pronounced effect on morphology of mitosis, which was also visible at concentrations not affecting frequencies of micronuclei. Multipolar ana-/telophases and lagging chromosomes observed immediately after treatment of V79 cells with 38 and 66 μ M IRI could account for micronuclei containing whole chromosomes observed immediately after treatment with IRI and within the subsequent postincubation period. Moreover, multiple cytokineses (Section 2.4.4 in Scheffler et al. (2015)) resulting from mitotic spindles exhibiting multiple spindle poles seemed to cause to the high prevalence of nuclear fragmentation observed after treatment with IRI. Severe structural disruption of chromosomes/mitotic spindles leading to prolonged mitotic arrest also causes mitotic catastrophe (summarized by Vakifahmetoglu et al. (2008)), i.e., apoptosis (summarized by Galluzzi et al. (2012)) as observed after treatment with 38 and 66 μ M IRI (Fig. 2 in Scheffler et al. (2015)).

4. Discussion

Up to now, the genotoxicity of IRI has been investigated neither *in vitro* nor *in vivo*. During the experiments of the present study,

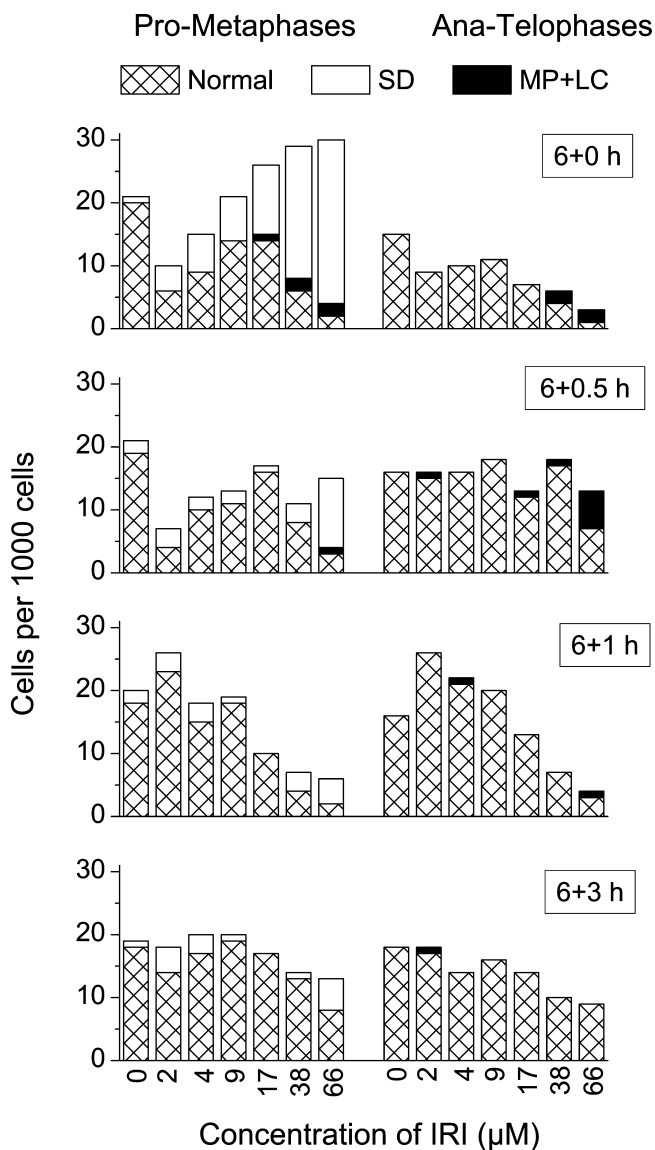


Fig. 6. Number and morphology of mitotic stages of V79 cells immediately after treatment with IRI for 6 h (6+0h) and IRI-free postincubation for 0.5–3 h. For exemplary micrographs of normal and disrupted stages of mitosis see Section 2.4.4 in Scheffler et al. (2015). Data represent sum of minimum three independent experiments (IRI 2 μ M single experiment). A minimum of 1000 cells was scored in each independent experiment. N, normal; SD, structural disruption of mitotic spindle and/or chromosomes; MP, multipolar spindle and/or lagging chromosome (s) (LC).

cytostatic effects of IRI were observed as well as nuclear fragmentation, which predominated over apoptosis. Induction of apoptosis by IRI was previously described in human hepatoma HuH-7 cell line (Mansoor et al., 2011).

In the present study, IRI induced a change in the mutation spectrum while not affecting significantly mutant frequencies in the *Hprt* locus of V79 cells. Furthermore, a slight but significant increase in cells containing chromosomal fragments was observed. The most pronounced effect observed was the induction of disrupted mitosis and subsequent chromosome loss.

4.1. Induction of chromosome mutations by IRI

4.1.1. Interpretation of the results of the HPRT assay

IRI was tested in a broad concentration range. Growth curves did not indicate any interference with mutant expression at the lower concentrations. IRI increased mutant frequency about 2-fold at 16 μM missing statistical significance ($p = 0.07843$) and without clear concentration dependency (Table 1). Furthermore, mutant frequencies observed after treatment with 16 μM IRI were well within the range of historical controls of the laboratory (Schumacher et al., 2005; Brugger et al., 2006; Zettner et al., 2007), and described for the V79 cell line elsewhere (Bradley et al., 1981), albeit at the upper level. Thus, based on mutant frequencies alone, IRI would be considered not mutagenic in the HPRT assay. In contrast, IRI clearly affected the mutation spectrum, decreasing the percentage of base pair substitutions and increasing that of deletions at cDNA level (Table 2).

The determination of the mutation spectrum had two limitations as detailed in Scheffler et al. (2015) rendering a discussion of the putative genotoxic mode of action of IRI and of the cause for the lack of increase in mutant frequency rather speculative. Yet it can be concluded that the HPRT assay is known to be rather insensitive for the detection of clastogens, i.e., induction of chromosome mutations (Moore et al., 1989), whereas induction of base pair substitutions would probably have increased also the frequency of 6-TG-resistant mutants.

4.1.2. Interpretation of the IRI-induced increase in the frequency of micronuclei containing chromosomal fragments

Although the increase in the proportion of deletions observed in *Hprt* cDNA of IRI treated V79 cells hinted at a clastogenic mode of action, only a small increase in the number of cells containing chromosomal fragments was observed in the micronucleus test. The effect reached statistical significance and moderately exceeded the range of historical controls observed in the Authors' laboratory. However, maximum micronuclei induction was much smaller than that observed with the positive controls EMS, ETO and MMC. The ambiguous time course of micronuclei induction resembled rather the topoisomerase poison ETO and the cross-linker MMC than the alkylating agent EMS, further supporting the conclusion drawn from the HPRT assay and mutation spectrum.

IRI concentrations tested spanned a broad range, although the lowest concentration tested already affected the number of recent cell divisions observed immediately after treatment with IRI (Fig. 3). Increase in the number of micronucleated cells was observed at the same concentrations which induced nuclear fragmentation and apoptosis, rendering microscopic scoring of micronuclei prone to artifacts. Yet using the information of both DAPI-stained nuclei and immunochemically stained microtubuli, apoptotic bodies, nuclear fragmentation and cells containing micronuclei could be well differentiated microscopically (Section 2.4.4 in Scheffler et al. (2015)). Furthermore, time courses of both apoptotic cells and nuclear fragmentation (Fig. 2 in Scheffler et al. (2015)) differed from that of cells containing kinetochore-negative chromosomal fragments (Fig. 4).

Although a protocol of the micronucleus test with substance free postincubation period was chosen, formation of micronuclei may be hampered by the unusual number of cell cycle arrests induced by IRI, which was only revealed by the combination of microscopic analysis of freshly divided cells (Fig. 3) and mitosis stages (Fig. 6) at different time points together with flow cytometry immediately after the treatment period (Fig. 3).

Thus, activation of cell cycle checkpoints at the transition of G1 to S phase, intra S phase and intra mitosis were observed after treatment with IRI. Although the checkpoints at G1/S, intra S and at G2/M are distinct, they all respond to DNA damage and distinct upstream DNA detectors feed into common downstream effectors which cause a cascade of events that result in cell cycle arrest, apoptosis, DNA repair, and/or activation of damage induced transcription programs (summarized by Heijink et al. (2013) and Houtgraaf et al. (2006)). V79 cells lack functional TP53 protein (Chaung et al., 1997) thus missing an important effector in DNA damage response needed for maintenance of arrest of the cell cycle at G1/S. However, the effector proteins checkpoint kinase 1, and 2 can also activate G1/S, intra S and G2/M checkpoints via cell division cycle 25 phosphatases (summarized by Houtgraaf et al. (2006)). The multitude of cell cycle checkpoints activated by IRI further supports a genotoxic potential of IRI.

Taken together, albeit only a small increase in the number of micronucleated cells was observed, the potential of IRI to induce chromosome mutations *in vitro* cannot be denied. Its extent might be underestimated due to strong interference of IRI with cell proliferation.

In the light of microscopic analysis revealing the aneugenic potential of IRI, also the results of the HPRT test could to be affected more by growth inhibition than presumed based on PEs, cell numbers and growth curves.

4.2. Strong aneugenic potential of IRI

The induction of micronuclei containing whole chromosomes by IRI was preceded by mitotic arrest and disrupted mitoses with multipolar spindles and lagging chromosomes. Multipolar telophases seemed to cause the high frequency of nuclear fragmentation observed immediately after treatment with IRI whereas prolonged mitotic arrest leading to mitotic catastrophe might be the reason for apoptotic bodies observed at later time points (Galluzzi et al., 2012). Despite coinciding with nuclear fragmentation and (at 38 and 66 μM) apoptotic cells, the micronucleated cells could be well differentiated.

Mitotic arrest at spindle assembly checkpoint, observed (to a varying extent) with aneugenic compounds (von der Hude et al., 2000; Thompson et al., 2010) became apparent by separate analysis of mitotic stages until and after metaphase. The mitotic index, the endpoint commonly expected to indicate mitotic arrest, was not meaningful due to other cell cycle arrests in G1 and S phase. For the same reason, the mitotic index was also not suitable for evaluation of proliferation as usual (OECD, 2014): due to mitotic arrest together with other cell cycle arrests, the number of mitotic cells was barely significantly reduced by the highest concentration of IRI and appeared inconspicuous. Only microscopic analysis of remnants of the midbody (Section 2.4.4 in Scheffler et al. (2015)), indicative for recent cell divisions, revealed the strong inhibition of to about 20% of cytokineses that of control cells. Strikingly, even cell cycle analysis without taking into account microscopy would not have indicated any strong effect.

Thus, only including evaluation of microtubules in analysis of the micronucleus test, rendered (i) analysis of micronuclei despite nuclear fragmentation and (ii) correct assessment of proliferation possible. Although both can be achieved by the micronucleus test

variant using cytochalasin B, the immunological staining procedure seems to be a suitable option for cell lines.

4.3. Mechanistic interaction of clastogenicity and aneuploidy

IRI exhibited a clastogenic as well as aneuploidic potential which raises the question whether one might affect or even cause the other. Whereas low levels of DNA breaks do not interfere with exit from mitosis, mitotic cells with excessive DNA strand breaks affecting kinetochore function will arrest at spindle assembly checkpoint. If these cells escape mitotic arrest, they can form micronucleated daughter cells containing whole chromosomes or, if preexisting double strand breaks are physically torn apart, possibly also chromosomal fragments (summarized by Heijink et al. (2013)). Thus, although the clastogenic potential of IRI seemed to be weak and arrest in mitosis induced by IRI (Fig. 6) can be well explained by an aneuploidic mode of action such as the occurrence of several kinds of disrupted mitotic spindles, induction of DNA strand breaks cannot be excluded to have contributed to mitotic arrest as well.

Vice versa, cells can produce DNA breaks *de novo* when defectively aligned chromosomes are subjected to prolonged mitosis (i.e., mitosis lasting for 5–6 h or more, summarized by Ganem and Pellman (2012)). The treatment period in the present experiments and thus the maximum duration of mitosis was 6 h in the micronucleus test and 24 h in the HPRT assay. Therefore although the time courses of the induction of micronucleated cells containing chromosomal fragments (Fig. 4) and whole chromosomes (Fig. 5) in the micronucleus assay were different, prolonged mitotic arrest may contribute to the clastogenic potential of IRI. Furthermore, anaphase lagging chromosomes were observed after treatment with IRI and after a short postincubation period (Fig. 6). Due to the pull of the microtubules, these chromosomes experience a force that is strong enough to lead to the physical deformation of their kinetochores and underlying centromeric DNA and which, together with imperceptible DNA damage caused by prolonged mitosis, cohesion fatigue or other mitotic defects, may promote chromosome breaks at centromeres (summarized by Ganem and Pellman (2012)).

Since the aneuploidic potential of IRI can be followed convincingly from disrupted mitotic spindles to mitotic arrest to asymmetrical cell divisions leading to chromosome loss, nuclear fragmentation as well as apoptosis, it is assumed by the authors to be the predominant mechanism by which IRI exerts its genotoxic potential.

Conclusion

Taken together, only looking at different endpoints together, a weak clastogenic effect of IRI became apparent. Also analysis of both morphology of mitoses and occurrence of micronuclei containing whole chromosomes draws a convincing picture of the aneuploidic potential of IRI. The genotoxic potential of IRI occurred at concentrations severely affecting cell proliferation and causing cell death. Though inhibition of proliferation and induction of cell death can be expected to accompany clastogenicity and aneuploidy (summarized by Heijink et al. (2013)), the biological relevance of this observation is hard to evaluate: in different cell types expressing different patterns of proteins involved in cell signaling pathways, other combinations of cell cycle arrests may occur; some putatively favoring cell death, others putatively favoring chromosome and/or genome mutation. Whereas death of e.g., tumor cells might even impede carcinogenesis, induction of mutations might contribute to it.

At any rate, after consumption of red clover-based dietary supplements, plasma concentrations of IRI (0.2–0.6 μM) were comparable to that of the well-investigated isoflavone daidzein

(Maul and Kulling, 2010). The findings of the present study, together with the recently published moderate estrogenic potential of IRI (Lutter et al., 2014), identify IRI as new isoflavone to be taken into account in safety and efficacy assessment of dietary supplements.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found in the online version.

Acknowledgements

The authors are indebted to Bettina Helfrich who helped with micronucleus test and to Carolin Pfenning who helped with HPLC analysis of cell culture media.

References

- Bradley, M.O., Bhuyan, B., Francis, M.C., Langenbach, R., et al., 1981. Mutagenesis by chemical agents in V79 Chinese hamster cells: a review and analysis of the literature. A report of the Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* 87, 81–142.
- Brugger, E.M., Wagner, J., Schumacher, D.M., Koch, K., et al., 2006. Mutagenicity of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells. *Toxicol. Lett.* 164, 221–230.
- Cariello, N.F., Piegorsch, W.W., Adams, W.T., Skopek, T.R., 1994. Computer program for the analysis of mutational spectra: application to p53 mutations. *Carcinogenesis* 15, 2281–2285.
- Chang, W., Mi, L.J., Boorstein, R.J., 1997. The p53 status of Chinese hamster V79 cells frequently used for studies on DNA damage and DNA repair. *Nucleic Acids Res.* 25, 992–994.
- Corvi, R., Albertini, S., Hartung, T., Hoffmann, S., et al., 2008. ECVAM retrospective validation of in vitro micronucleus test (MNT). *Mutagenesis* 23, 271–283.
- Dhar, K.L., Kalla, A.K., 1973. A new isoflavone from *Iris germanica*. *Phytochemistry* 12, 734–735.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., et al., 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2012. *Cell Death Differ.* 19, 107–120.
- Ganem, N.J., Pellman, D., 2012. Linking abnormal mitosis to the acquisition of DNA damage. *J. Cell Biol.* 199, 871–881.
- Glatt, H., Gemperlein, I., Turchi, G., Heinritz, H., et al., 1987. Search for cell culture systems with diverse xenobiotic-metabolizing activities and their use in toxicological studies. *Mol. Toxicol.* 1, 313–334.
- Glatt, H., Engelke, C.E., Pabel, U., Teubner, W., et al., 2000. Sulfotransferases: genetics and role in toxicology. *Toxicol. Lett.* 112–113, 341–348.
- Heijink, A.M., Krajewska, M., van Vugt, M.A., 2013. The DNA damage response during mitosis. *Mutat. Res.* 750, 45–55.
- Houtgraaf, J.H., Versmissen, J., van der Giessen, W.J., 2006. A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. *Cardiovasc. Revasc. Med.* 7, 165–172.
- Kirkland, D.J., 1994. Statistical evaluation of mutagenicity test data: recommendations of the U.K. Environmental Mutagen Society. *Environ. Health Perspect.* 102 (Suppl. 1), 43–47.
- Kirsch-Volders, M., Plas, G., Elhajouji, A., Lukamowicz, M., et al., 2011. The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Arch. Toxicol.* 85, 873–899.
- Kulling, S.E., Lehmann, L., Metzler, M., 2002. Oxidative metabolism and genotoxic potential of major isoflavone phytoestrogens. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 777, 211–218.
- Lehmann, L., Metzler, M., 2004. Bisphenol A and its methylated congeners inhibit growth and interfere with microtubules in human fibroblasts in vitro. *Chem. Biol. Interact.* 147, 273–285.
- Lehmann, L., Wagner, J., Metzler, M., 2006. Estrogenic and clastogenic potential of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells. *Food Chem. Toxicol.* 44, 398–408.
- Lutter, S., Schmalbach, K., Esch, H.L., Lehmann, L., 2014. The isoflavone irilone contributes to the estrogenic potential of dietary supplements containing red clover. *Arch. Toxicol.* 88, 309–321.
- Mansoor, T.A., Ramalho, R.M., Luo, X., Ramalhe, C., et al., 2011. Isoflavones as apoptosis inducers in human hepatoma HuH-7 cells. *Phytother. Res.* 25, 1819–1824.
- Maul, R., Kulling, S.E., 2010. Absorption of red clover isoflavones in human subjects: results from a pilot study. *Br. J. Nutr.* 103, 1569–1572.

- Moore, M.M., Harrington-Brock, K., Doerr, C.L., Dearfield, K.L., 1989. Differential mutant quantitation at the mouse lymphoma tk and CHO hgp^rt loci. *Mutagenesis* 4, 394–403.
- OECD Test No. 476, 2014. In vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 4 OECD Publishing, Paris, http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-476-in-vitro-mammalian-cell-gene-mutation-test_9789264071322-en.
- Scheffler, A., Albrecht, A.E., Esch, H.L., Lehmann, L., 2015. Data in support of the mutagenic potential of the isoflavone irilone in cultured V79 cell, [submitted for publication].
- Schumacher, D.M., Metzler, M., Lehmann, L., 2005. Mutagenicity of the mycotoxin patulin in cultured Chinese hamster V79 cells, and its modulation by intracellular glutathione. *Arch. Toxicol.* 79, 110–121.
- Thompson, S.L., Bakhom, S.F., Compton, D.A., 2010. Mechanisms of chromosomal instability. *Curr. Biol.* 20, R285–R295.
- Tsutsui, T., Tamura, Y., Yagi, E., Someya, H., et al., 2003. Cell-transforming activity and mutagenicity of 5 phytoestrogens in cultured mammalian cells. *Int. J. Cancer* 105, 312–320.
- Vakifahmetoglu, H., Olsson, M., Zhivotovsky, B., 2008. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ.* 15, 1153–1162.
- Wollenweber, E., Stevens, J.F., Klimo, K., Knauff, J., et al., 2003. Cancer chemopreventive in vitro activities of isoflavones isolated from *Iris germanica*. *Planta Med.* 69, 15–20.
- Wu, Q., Wang, M., Simon, J.E., 2003. Determination of isoflavones in red clover and related species by high-performance liquid chromatography combined with ultraviolet and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* 1016, 195–209.
- Zettner, M.A., Flor, S., Ludewig, G., Wagner, J., et al., 2007. Quinoid metabolites of 4-monochlorobiphenyl induce gene mutations in cultured Chinese hamster V79 cells. *Toxicol. Sci.* 100, 88–98.
- Zhang, L.H., Vrieling, H., van Zeeland, A.A., Janssen, D., 1992. Spectrum of spontaneously occurring mutations in the hprt gene of V79 Chinese hamster cells. *J. Mol. Biol.* 223, 627–635.
- von der Hude, W., Kalweit, S., Engelhardt, G., McKiernan, S., et al., 2000. In vitro micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells – results of a collaborative study with in situ exposure to 26 chemical substances. *Mutat. Res.* 468, 137–163.

Erklärung zur Autorenschaft

Titel der Arbeit:

Entwicklung und Charakterisierung des RMCA für *Rattus norvegicus* in nukleärer und mitochondrialer DNA

Titel der Veröffentlichung:

Mutagenic potential of the isoflavone irilone in cultured V79 cells. Scheffler A, Albrecht AE, Esch HL, Lehmann L., Toxicol. Lett. 2015, Volume 234, 81-91

Detaillierte Darstellung der Anteile an der Veröffentlichung (in %)

Angabe Autoren/innen (ggf. Haupt- / Ko- / korrespondierende/r Autor/in) mit Vorname Nachname (Initialen)

Autor/in 1 Anne Scheffler (A.S.), Autor/in 2 Annette Albrecht (A.A.), Autor/in 3 Harald Esch (H.E.), Autor/in 4 Leane Lehmann (L.L.)

Autor	A.S.	A.A.	H.E.	L.L.	Σ in Prozent
Methodenabklärung Mutationsspektrum	100				15%
Durchführung Quantifizierung Irilon im Medium		100			4%
Durchführung HPRT-Test	50	50			15%
Durchführung Mutantenspektrum	100				15%
Durchführung Mikroerntest		100			15%
Datenanalyse	45	45		10	10%
Ergebnisdarstellung	30	30	10	30	10%
Recherche	30	30	30	10	10%
Verfassen der Veröffentlichung	30	10	30	30	2%
Korrektur der Veröffentlichung			50	50	2%
Koordination der Veröffentlichung				100	2%
Summe					100%

Die Mitautoren der in dieser (teil-)kumulativen Dissertation verwendeten Manuskripte sind sowohl über die Nutzung als auch über die angegebenen Eigenanteile informiert und stimmen dem zu.



*Angabe Autorenschaft: Anwählen Dropdownmenü / Autorenunterschrift **oder** Angabe Verweis: Kontrollkästchen über Eigenschaften aktivieren !*

Anne Scheffler
Autor/in 1
Hauptautor/in

Verweis: E-Mail hinterlegt

Annette Albrecht
Autor/in 2
Hauptautor/in

Verweis: E-Mail hinterlegt

Dr. Harald Esch
Autor/in 3
Koautor/in

Verweis: E-Mail hinterlegt

Prof. Dr. Leane Lehmann
Autor/in 4

Korrespondenzautor/in

Verweis: E-Mail hinterlegt

Würzburg, den

Prof. Dr. Leane Lehmann



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Data in Brief

journal homepage: www.elsevier.com/locate/dib



Data Article

Data in support of the mutagenic potential of the isoflavone irilone in cultured V79 cells

Anne Scheffler¹, Annette E. Albrecht¹, Harald L. Esch, Leane Lehmann*

Institute of Pharmacy and Food Chemistry, Chair of Food Chemistry, University of Würzburg, Am Hubland, D-97074 Würzburg, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 July 2015

Accepted 8 July 2015

Available online 17 July 2015

ABSTRACT

The isoflavone irilone is found in human plasma after ingestion of red clover-based dietary supplements, but information allowing safety assessment is rare. Here, data in support of the mutagenic potential of irilone in cultured V79 cells [1] are presented. These data include (i) a quantitative assessment of irilone in the culture medium during the cell culture experiments, (ii) changes in the mutation spectrum in cDNA of the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase locus of irilone-treated V79 cells, (iii) occurrence of karyorrhexis and apoptosis as well as (iv) number of micronucleated cells containing whole chromosomes or chromosomal fragments. Also exemplary micrographs, used for the fluorescence microscopic assessment of (iii) and (iv) are presented.

© 2015 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Specifications Table

Subject area	Biology
More specific subject area	Toxicology, mutagenicity
Type of data	Table, figure, image (microscopy)

DOI of original article: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.02.013>

* Corresponding author. Tel.: +49 931 318 5481; fax: +49 931 318 5484.

E-mail address: leane.lehmann@uni-wuerzburg.de (L. Lehmann).

¹ Contributed equally.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2015.07.010>

2352-3409/© 2015 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

How data was acquired	DNA sequencing by Sanger method at LGC Genomics, Germany, Observer Z1 fluorescence microscope (Zeiss, Germany) equipped with a Plan-Apochromat objective 63x/1.4 Oil DIC
Data format	Raw (micronucleus data), analyzed (DNA sequencing, irilone in culture medium), and micrograph
Experimental factors	Cultured Chinese hamster V79 fibroblasts were treated with irilone. For cDNA sequencing total RNA was isolated from cloned mutants selected from irilone-treated, cultured Chinese hamster V79 fibroblasts, reversely transcribed, and amplified. For micronucleus data, cells were fixed, α -tubulin (Cy3), and centromere proteins (FITC) were stained immunochemically. DNA was stained with DAPI
Experimental features	Irilone in cell culture medium was quantified by HPLC-DAD. Mutation spectrum in cDNA of irilone-treated V79 cells was determined by Sanger method. Apoptosis, karyorrhexis, and micronucleus formation were assessed by fluorescence microscopy.
Data source location	
Data accessibility	Data are with this article only.

Value of the data

- Specifies mutation spectra and detailed discussion thereof.
- Complements data on mutagenicity, and cytotoxicity of irilone.
- Provides extensive raw data on time course of micronuclei formation observed with positive controls and irilone
- Methodical insight into scoring criteria for fluorescence microscopic evaluation

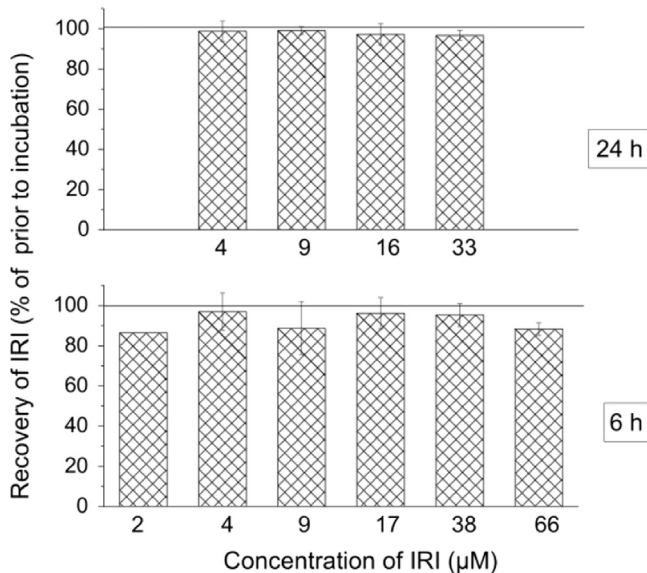


Fig. 1. Recovery of IRI in cell culture medium after the incubation period in the hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase (HPRT) assay (24 h, upper panel) and in the micronucleus test (6 h, lower panel). Prior to incubation, mean concentrations of IRI in medium and standard deviations of at least 3 independent experiments were $4.2 \pm 0.4 \mu\text{M}$, $8.8 \pm 1.1 \mu\text{M}$, $16.1 \pm 1.7 \mu\text{M}$, and $32.7 \pm 2.1 \mu\text{M}$ in HPRT assays, and $2.2 \mu\text{M}$ (single experiment), $4.1 \pm 1.9 \mu\text{M}$, $8.6 \pm 2.5 \mu\text{M}$, $17.4 \pm 2.2 \mu\text{M}$, $38.4 \pm 6.7 \mu\text{M}$ and $65.9 \pm 14.1 \mu\text{M}$ in micronucleus assays. In each experiment, the concentrations after incubation were related to the ones before incubation (100%). Data represent means \pm standard deviations of at least three independent experiments (6 h, $2 \mu\text{M}$, single experiment). No significant differences between IRI concentrations before and after incubation were observed (t -test, adjusted $p > 0.05$).

Table 1

Mutation spectra of *Hprt* cDNAs derived from 6-thioguanine (6-TG)-resistant colonies selected from V79 cell populations treated with solvent (1% DMSO) or IRI. In each independent HPRT experiment (1, 2, 3), two flasks were treated with solvent (DMSO1 and DMSO2) and one flask each with various concentrations of IRI. The change in the sequence of cDNA is given in 5' → 3' direction. Despite sufficient amount and quality of total RNA, 23% of *Hprt* cDNAs collected after treatment with DMSO yielded no PCR product, which did not differ statistically from the percentage observed after treatment with 16 μM IRI (18%, $p=0.6166$, Fischer's exact test). Since the primer binding sites were in the untranslated regions (UTR) flanking exons 1–9 and the mutant clone was 6-TG-resistant, no PCR product can only be due to complete lack of *Hprt* cDNA or deletions affecting one or more exons together with one or both primer binding sites. Thus, mutants not yielding a PCR product were scored "deletions of UTR+exons (UTR+?)". The same mutation at the same locus in cDNA extracted from colonies of the same V79 cell population (i.e. one flask) may be due to the same event and were therefore counted only once for the determination of the spectra of certain independent mutations (Σi). In the table, each independent mutation is highlighted by a grey background, thus the number of grey rectangles per treatment group corresponds to Σi . Statistical comparison of complete mutation spectra (Σ , Σi) was performed according to [2].

Position		Change in sequence		Number of mutations										
Exon	Bp	cDNA	Amino acid	DMSO1		DMSO2		IRI 16 μM			IRI 4 μM	IRI 33 μM		
				1	2	3	1	2	3	1	2	3	3	3
1	81	ACC→ACG	Thr→Thr	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
3	241	CGA→TGA	Arg→Stop	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
6	493	GAT→AAT	Asp→Asn	0	5	2	0	0	2	0	0	0	0	0
6	499	ATT→TTT	Ile→Phe	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
6	505	ACT→CCT	Thr→Pro	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	584	CTG→GGG	Val→Gly	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0
8	631	TTT→ATT	Phe→Ile	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
8	662	TAT→TGT	Tyr→Cys	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
8	681	GAG→GAC	Glu→Asp	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	707	TGT→TAT	Cys→Tyr	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
3	405/406	Insertion C		0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
8/9	699/700	Insertion G		0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
2+3	109–409	Deletion	Deletion	0	0	0	0	0	2	0	3	0	0	0
2	110–225	Deletion	Deletion	00	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
4	413–478	Deletion	Deletion	7	0	9	2	3	5	10	7	5	8	7
6	493–575	Deletion	Deletion	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
UTR+?	?	Deletion	Deletion	3	7	1	3	2	0	0	1	5	3	5
				$\Sigma 36$ (Σi 9)		$\Sigma 34$ (Σi 14)		$\Sigma 34$ (Σi 9)			$\Sigma 12$ (Σi 3)		$\Sigma 12$ (Σi 2)	
<i>p</i> Value of comparison Σ treatment group vs. Σ DMSO1+2				0.67059		0.84118		0.02941			0.357060		0.70177	
<i>p</i> Value of comparison Σi treatment group vs. Σi DMSO1+2				1.00000		1.00000		0.66353			-		-	

1. Data

1.1. Stability of irilone (IRI) under experimental incubation conditions

To evaluate the stability of IRI in cell culture medium under incubation conditions, aliquots of incubation media were either sampled immediately or at the end of the treatment period and concentrations of IRI were quantified by HPLC–UV: Concentrations of IRI in the culture media at the end of the treatment period of both the HPRT and micronucleus assay were not statistically different from that before treatment, yet mean values were slightly decreased (Fig. 1). Therefore, extensive chemical or enzyme-induced instability of IRI can be excluded.

1.2. Mutation spectra of IRI-induced V79 mutants

The mutation spectra of IRI-induced mutants formed during the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) assay in cultured V79 cells was investigated. Assuming that resistance of mutants to 6-TG has got to be reflected at *Hprt* mRNA level, the mutation spectra of *Hprt* cDNAs were determined. Thus, a minimum of ten 6-TG-resistant colonies derived from solvent- and IRI-treated cell populations were chosen randomly during each independent HPRT assay, cloned, total RNA was isolated, mRNA was reversely transcribed, cDNA was amplified by PCR, the amplification

product purified, and sequenced by Sanger method. Thus, a total of 70 cDNAs, derived from 6-TG-resistant colonies of the populations treated with DMSO and 34 cDNAs, derived from populations treated with 16 μM IRI were analyzed. Each cDNA exhibited at least one mutation, i.e. deletions of exons 2–3, 4, 6, and of untranslated region+exons, transitions, and +1-frameshift mutations (Table 1). Mutation spectrum of 6-TG-resistant mutants derived from cells of the solvent control were characterized by exon deletions (67%) and base pair substitutions (33%, Table 1).

After treatment with 4 μM IRI the mutation spectrum of *Hprt* cDNAs exhibited one transition besides exon deletions (not observed in a total of 46 cDNAs obtained from populations treated with 16 and 33 μM IRI) and did not differ from that observed in control cells. In contrast, *Hprt* cDNA derived from cells treated with 33 μM IRI exhibited exclusively exon deletions and differed significantly from that observed in control *Hprt* cDNA (Table 1).

Comparison of spontaneously occurring mutation spectrum with published data was hindered due to methodical differences and variation between V79 cell lines: analysis of *Hprt* exons 1–9 of 30 and 40 DNAs derived from a V79 cell line originating in the same laboratory as the one used in the present study, revealed that exon deletions accounted for 40% [3] and 53% [4] of total mutations, respectively. However, at cDNA level, deletions are not only caused by exon deletions but also by base pair substitution(s), frameshift mutations and other events [5].

Thus, the proportion of exon deletions at cDNA level observed in the present study (67%) is probably lower at DNA level and thus comparable or even lower than that observed at DNA level with the same V9 MZ, yet higher than that determined at cDNA level in a V79 cell line of unknown origin. Since no mutants with deletions in one or more exons of *Hprt* DNA were observed in the V79-UL cell population, which is also a “normal” V79 cell line from another laboratory [3,4], big variances between different V79 cell lines can be expected. It is known that also the response to mutagens differs between “normal” V79 cell populations [6]. Thus, it can only be stated that the mutation spectrum of the DMSO-treated, 6-TG resistant V79 cell population in the present study seems not to be unusual for the V79 MZ population.

The determination of the mutation spectrum had two limitations:

- (i) two or more identical mutations at the same position of *Hprt* cDNA were observed in mutants selected from the same flask. Therefore, mutations were only assumed to be independent, if they were either at different positions of the *Hprt* cDNA sequence, occurred in different experiments, which were performed with a freshly thawed stock of cells, or occurred in cell populations treated in different flasks during the same HPRT assay. As a consequence, despite sequencing 70 cDNAs derived from control cell populations and 34 cDNAs derived from populations treated with IRI, the number of independent mutations for which clonal expansion could be completely excluded was small (Table 1). Yet, the effect was still obvious without any statistical analysis and reached statistical significance despite the rather small number of observations. Independency of mutations observed *in vitro* is defined and dealt with heterogeneously in literature: (a) mentioning the possibility of clonal expansion in discussion but ignoring it in data analysis (e.g. [7]), (b) defining mutations to be independent if picked from different petri dishes seeded from the same cell solution (e.g. [8]), (c) same as (b) and repeating the experiment once, e.g. [3], (d) splitting the culture after treatment into different flasks (e.g. [9]). Thus, the authors' approach was the most conservative one possible, comparable to that of [9].
- (ii) *Hprt* cDNAs instead of *Hprt* exons were sequenced for assessment of mutation spectra. However, base pair substitutions, frameshift mutations, and deletions in *Hprt* introns and exons may cause the same results on cDNA level [5]. Thus, information on the genotoxic mode of action derived from analysis of *Hprt* cDNA was not as detailed as the one that would have been derived from analysis of *Hprt* exons, and unambiguous information could only be achieved by analysis of both *Hprt* exons and introns together. Due to the higher information content, it can be assumed that analysis of DNA would detect a shift in mutation spectrum rather more sensitively than analysis of cDNA. Thus, the observed IRI-induced alteration of the mutation spectrum at cDNA level can be assumed to be confirmed at DNA level. However, the multiple causes possibly leading to the observed increase in the proportion of cDNA deletions induced by IRI [1], would render a detailed

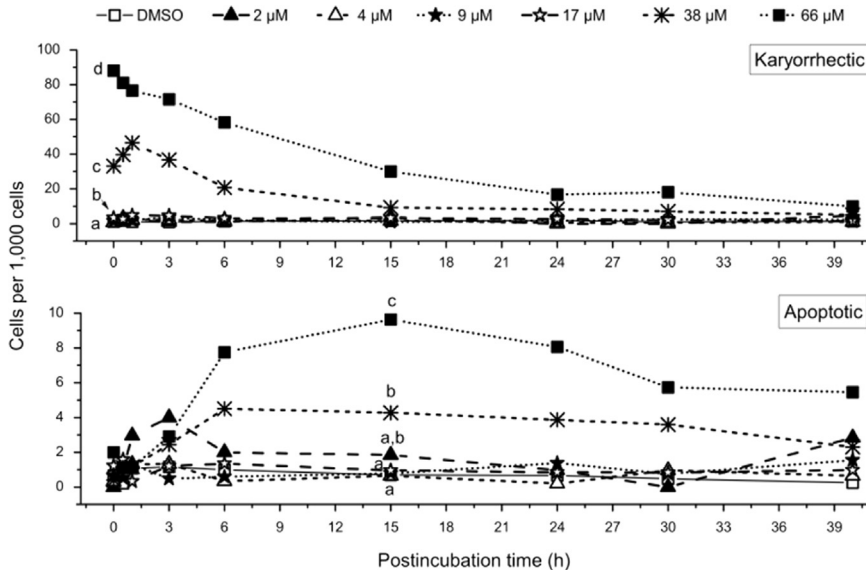


Fig. 2. Number of cells exhibiting nuclear fragmentation without (i.e. karyorrhetic, top panel) and with chromatin condensation (i.e. apoptotic, bottom panel) in V79 cells immediately after treatment with IRI for 6 h and subsequent IRI-free postincubation for up to 40 h. Data represent sums of minimum three independent experiments, statistically analyzed by Fisher's exact test. Different characters signify statistically different data groups at the respective postincubation time ($p < 0.05$). The number of karyorrhetic cells in the population of cells treated with 38 and 66 μM IRI stayed statistically different from control populations until postincubation for 40 h (information not included in the graph).

discussion of the putative genotoxic mode of action of IRI and of the cause for the lack of increase in mutant frequency rather speculative.

Although exon deletions at cDNA level are caused by both deletions, base pair substitutions, and frameshift mutations at DNA level [5], the increase in exon deletions in mutation spectra of 6-TG resistant V79 cells indicated a clastogenic mode of action, which is known to be detected insufficiently by the *Hprt* gene mutation assay [10]. Thus, the putatively clastogenic potential of IRI was further investigated using the micronucleus assay, which responds to both clastogens inducing micronuclei containing chromosomal fragments (CREST antibody signal-negative micronuclei) and aneugens inducing micronuclei containing whole chromosomes (CREST antibody signal-positive).

1.3. Fluorescence microscopic assessment of cytotoxicity, apoptosis, and micronuclei formation

As expected, no significant increase in the frequency of cells containing nuclear fragments with condensed chromatin, i.e. apoptotic bodies (Fig. 2), was observed immediately after treatment with IRI for 6 h (Fig. 2). After IRI-free postincubation for up to 40 h, small increases in the frequencies of cells with apoptotic bodies were observed after treatment with 38 and 66 μM IRI (maximum 4 and 10 cells/1000 cells, respectively, at 15 h postincubation, Fig. 2). However, after treatment with 17, 38, and 66 μM IRI, a strong increase in the frequency of nuclear fragmentation (karyorrhexis) without chromatin condensation was observed, decreasing during postincubation time and remaining statistically significant until 6 h (38 μM) and 15 h (66 μM) of postincubation (Fig. 2).

In the V79 cell population treated with solvent only, 20–34 cells containing CREST antibody signal-negative micronuclei (i.e. chromosomal fragments)/3000 cells were observed (Supplemental Table, and [1]) which lies within the normal range [11]. The aneugen diethylstilbestrol (DES) did not affect

the frequency of micronucleated cells with chromosomal fragments at any time point (Supplemental Table). The occurrence of micronuclei containing chromosomal fragments induced by other positive controls followed different kinetics: whereas the topoisomerase poison etoposide significantly increased the frequency of cells with CREST antibody signal-negative micronuclei already at 6 h postincubation time, the DNA-DNA cross-linker mitomycin C and the alkylating agent ethyl methanesulfonate induced an increase in micronucleated cells at 15 and 24 h, respectively. In cell populations treated with 38 and 66 μM IRI, a slight but significant ($p < 0.05$, Fisher's exact test) increase in the frequencies of micronucleated cells containing chromosomal fragments at 6–40 h (38 and 66 μM) postincubation time to maximum 53 and 64 micronucleated cells/3000 cells, respectively, was observed, supporting a weak clastogenic potential of IRI. Although the increase in micronucleated cells was too small to draw strong conclusions from its time-dependency, a mode of action needing rather a shorter postincubation period (such as observed with etoposide or mitomycin C) than a longer postincubation period (as observed with ethyl methanesulfonate) was indicated (Supplemental Table, and [1]).

After treatment with the known aneugen diethylstilbestrol (15 and 25 μM), the frequency of cells with micronuclei containing whole chromosomes at 0–15 h postincubation time was increased to maximum 89 micronucleated cells/3000 cells (25 μM , 6 h postincubation) compared to 2.6–6.1 micronucleated cells/3000 cells observed with the solvent control (Supplemental Table, and [1]). Likewise, after treatment with 38 and 66 μM IRI, the frequency of micronucleated cells was increased to maximum 40 (38 μM , 3 h postincubation) and 41 (66 μM , 6 h postincubation) micronucleated cells/3000 cells (Supplemental Table, and [1]).

2. Experimental designs, material and methods

2.1. General cell culture conditions

V79 MZ cells, kindly provided by H. Glatt (German Institute of Human Nutrition, Potsdam, Germany), were cultured in DMEM supplemented with 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin, and 10% fetal calf serum (Invitrogen™ Life Technologies, Germany) referred to as DMEM complete. Cells were kept at 37 °C in a humidified atmosphere and 5% CO_2 .

2.2. Quantitation of IRI in cell culture medium before and after incubation

In each experiment, about 1 ml of the incubation medium (freshly prepared and after incubation) was flash frozen with liquid nitrogen and stored at -80 °C until analysis. To quantify IRI, the method previously described for the determination of IRI in dietary supplements [12] was used with slight modifications. 2.0 μg internal standard (4,4'-isopropylidendiphenol) was added to 250 μl (< 10 μM IRI) or 50 μl (> 10 μM IRI) medium prior to extraction with ethyl acetate. Organic phases were collected, evaporated, and the remainder was reconstituted in 50 μl methanol. HPLC analyses were run on a HP Agilent Series 1100 (Agilent Technologies, Germany) equipped with a diode array detector. 5 μl reconstituted extract was separated on a C18 phase (Eurospher-100, 250 \times 4 mm, 5 μm , Knauer, Germany) at 1 ml/min using acidified acetonitrile:water (0.1% formic acid in water (A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (B); gradient was from 30% B to 39% B over 54 min and then from 39% B to 55% B over 16 min), detected by its absorbance at 280 nm and relative peak areas compared to the calibration curve (24, 44, 64, 84, and 104 ng IRI together with 200 ng internal standard on column).

2.3. Mutation spectrum of IRI treated V79 cells

2.3.1. HPRT assay for the generation of mutants

HPRT assays have been performed as described previously [13] with slight modifications. 1.5×10^6 V79 cells were seeded in cell culture flasks (175 cm^2 , Greiner Bio-one, Germany) containing 20 ml DMEM complete. After 24 h, the medium was changed (day 0) and cells were treated with different

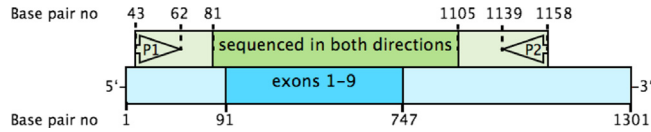


Fig. 3. *Hprt* primer positions, amplified and sequenced sequences of *Hprt* cDNA. Primers (P1 and P2) were positioned in the 3'- and 5'-untranslated region (light blue) of *Hprt* cDNA (reference cDNA sequence: GenBank: J00060.1; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/J00060.1>) 29 base pairs distant from exon 1 (P1) and 392 base pairs distant from exon 9 (P2). The first few base pairs cannot be analyzed reliably by Sanger sequencing (light green) but base pairs 81 and higher as well as 1105 and lower were analyzable in every sequencing reaction (green). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

concentrations of IRI or $1 \mu\text{M}$ NQO or 1% DMSO for 24 h. A total of 1×10^6 treated cells were subcultured in fresh medium directly after treatment (day 1) and again on day 4. On day 6, cells with mutations at the *Hprt* gene locus were selected by growing cells in DMEM complete, and $7 \mu\text{g}$ 6-thioguanine (6-TG)/ml using three tissue culture dishes (145 mm, Greiner Bio-one) with 1×10^6 cells per dish.

2.3.2. Cloning of 6-TG-resistant mutants

After 12 days, medium from the dishes containing the *Hprt* mutants was removed and single *Hprt* mutant colonies were trypsinized within sterilized stainless steel rings, placed around single colonies using silicone grease. Detached cells were transferred into single wells of 6-well plates (Nunc™, Thermo Fisher Scientific, Germany) and cultured for another 2–4 days until isolation of total RNA.

2.3.3. RNA isolation and reverse transcription

Total RNA was isolated using the GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit followed by DNase digestion by DNase I Amplification Grade Kit (both kits Sigma-Aldrich) and stored at -80°C . One μg total RNA was reversely transcribed using oligo-(dT)18 primer, 10 mM dNTPs, 20 U RiboLock™ RNase-Inhibitor, and 200 U RevertAid™ Reverse Transcriptase according to the manufacturer's instructions (Thermo Scientific, Germany). cDNA was stored at -20°C .

2.3.4. Amplification, isolation and sequencing of V79 cDNA

Reverse primer 5'-ATGAACTGAGTGCTTTCACA-3' (exact positions depicted in Fig. 3) and forward primer 5'-CTTCTCTCTCACACCGCTCT-3' were checked for lack of secondary structures and unspecific amplification products by PrimerExpress 3.0 – licensed – (Applied Biosystems). Positioning of primers in the 3'- and 5'-untranslated region of *Hprt* cDNA, respectively, ensured reliable sequencing and duplicate determination of all exons (Fig. 3). 600 ng *Hprt* cDNA dissolved in nuclease free water and $4 \mu\text{l}$ forward or reverse primer ($5 \mu\text{M}$), respectively were mixed in a volume of $14 \mu\text{l}$ and subjected to Sanger sequencing by LGC Genomics, Germany.

2.3.5. Analysis of sequencing data and of mutational spectra

Resulting electropherograms were analyzed using Chromas Lite (freely available at <http://www.softpedia.com/get/Science-CAD/Chromas-Lite.shtml>) and resulting sequences were compared using ApE (freely available at <http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>) and Referenz Sequenz cDNA: GenBank: J00060.1; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/J00060.1>. Type and position of mutations within the cDNA were determined by sequence alignment.

2.4. Micronucleus assay

2.4.1. Cell exposure

V79 cells were grown on chamber slides (Thermo Fisher Scientific Inc., Germany) with eight chambers per slide ($5-7 \times 10^3$ cells/cm²) for 24 h prior to incubation with IRI (ChromaDex™, Irvine, CA, USA), diethylstilbestrol (Biomol, Germany), etoposide, mitomycin C, and ethyl methanesulfonate

(all Sigma-Aldrich, Germany) or with the solvent (1% DMSO) for 6 h with and without subsequent substance-free incubation for up to 40 h.

2.4.2. Fixation and immunological staining

Following incubation with the test compounds, cells were stained as described previously [14] with slight modifications. Cells were fixed with freshly depolymerized 3.5% paraformaldehyde in enriched PBS pH 6.1 for 1 min at room temperature and methanol at -18°C for at least 1 h. Non-specific binding of antibodies was blocked by incubation with goat serum (Sigma-Aldrich) for 1 h at 37°C . Cells were stained with anti- α -tubulin (Sigma-Aldrich, 1:500 in 1% bovine serum albumin containing PBS) for the evaluation of cell morphology and the detection of freshly divided cells, and with anti-centromere protein antibodies (from patients with limited systemic sclerosis/CREST syndrome, Antibodies Inc., Davis, CA, USA, 1:100 in 1% bovine serum albumin containing PBS) followed by secondary Cy3-conjugated goat anti-mouse antibody (Jackson Immune Research Laboratories, Inc., West Grove, USA, diluted 1:250 in PBS) and FITC-conjugated goat polyvalent anti-human antibody (Sigma-Aldrich, diluted 1:148 in PBS) for 1 h at 37°C each. Finally, slides were mounted with antifade solution containing $1\ \mu\text{g}$ 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)/ml.

2.4.3. Fluorescence microscopic analysis

Slides were coded and analyzed with an Observer Z1 fluorescence microscope (Zeiss, Germany) equipped with a Plan-Apochromat objective 63x/1.4 Oil DIC by a person not knowing the code. Scoring criteria for micronuclei [15] were considered, supplemented by the following: nucleus and micronucleus/micronuclei were to lie within the same cytoskeleton (i.e. α -tubulin staining). Moreover, normal and disrupted mitotic stages, freshly divided cells (i.e. cells with cytoplasmic bridges) as well as nuclear fragmentation and apoptotic cells were scored (see exemplary micrographs next section).

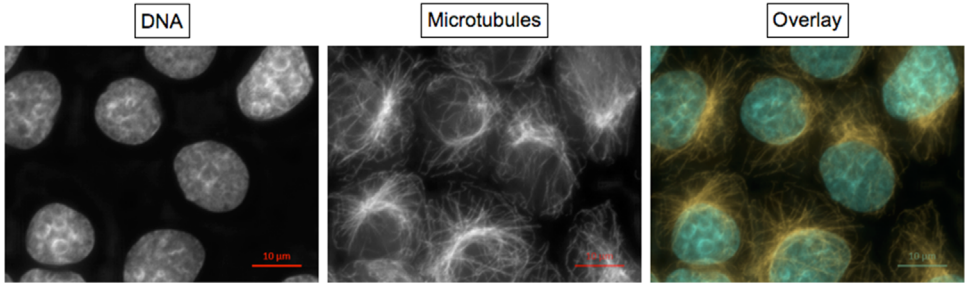
On each slide, nuclei and micronuclei were visualized using ultraviolet excitation (characteristics of excitation filter, beam splitter, and emission filter were EX G 365, BS FT 395, EM BP 445/50, respectively) and the microtubules (forming the cytoplasmic microtubule complex, the midbody and the mitotic spindle) and signals of centromere proteins were analyzed under green (EX BP 550/25, BS FT 570, EM BP 605/70) and blue (EX BP 470/40, BS FT 495, EM BP 525/50) excitation, respectively. All signals were visualized simultaneously by means of a triple bandpass filter (EX TBP 406+489+561; BS TFT 427+503+578; EM TBP 459+525+608). At least 1000 cells or 100 cells with micronuclei were scored per slide with respect to micronuclei, morphology of mitosis, cell divisions and signs of cytotoxicity such as nuclear fragmentation, apoptotic bodies, and depolymerized cytoplasmic microtubule complex.

2.4.4. Exemplary micrographs of endpoints scored microscopically

Micrographs were taken using AxioCam MRm3 S/N 5925 digital camera controlled by ZEN pro 2011 software (Zeiss, Germany). Each event was photographed with the optical filter set specific for DAPI fluorescence of DNA, Cy3 fluorescence of α -tubulin, and, in some cases, FITC fluorescence of centromere proteins, using 37 Z-Stacks (i.e. focal planes). Exposure time was set individually to use maximum dynamic range indicated by the histogram. Calibration bars were added to original.czi files using *Insert Scale Bar* function of the ZEN desk 2012 software (Zeiss). Then, Z-Stacks were reduced to one plane by the algorithm *Extended Depth of Focus* using the variants *Contrast*, *Wavelets* or *Variance* as appropriate. Alternatively, a single Z-Plane was chosen. If image sections were needed, they were generated using *Create Image Subset*.

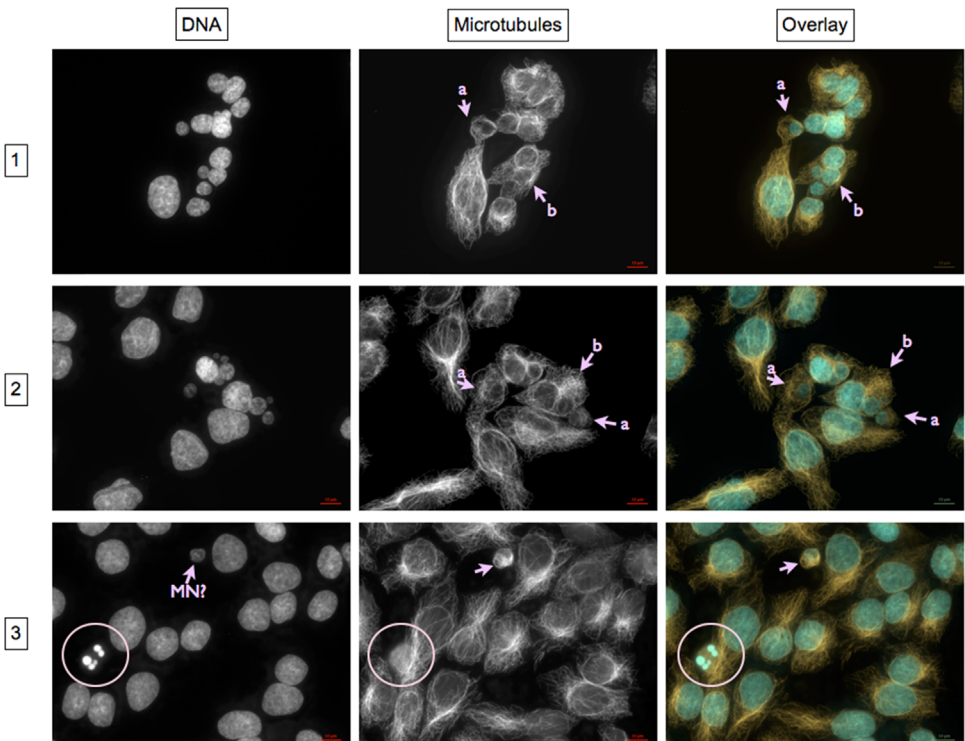
To generate overlays, micrographs of the same event taken with different optical filter sets, were merged using *Add Channels*. Channels were colored individually light blue (DNA), orange/red (α -tubulin), and – when applicable – green (centromere proteins).

Normal interphase cells



Each nucleus lies within a single cytoplasmic microtubule complex (CMTC). Intact microtubuli are oriented from the microtubule organizing center (usually indicated by the highest fluorescence intensity of α -tubulin staining within the CMTC) towards the cell membrane.

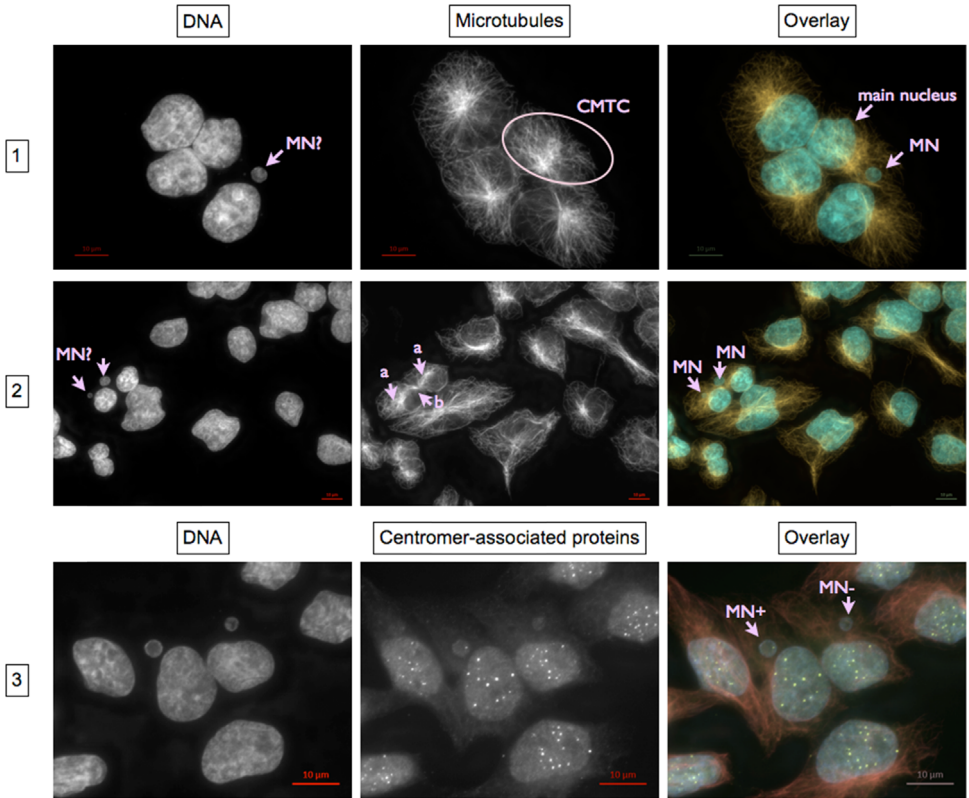
Nuclear fragmentation without and with chromatin condensation



Panel 1 and 2: One (a) or multiple (b) nuclear fragments without chromatin condensation lie within an intact CMTC. In the latter case, no apparent main nucleus is discernible.

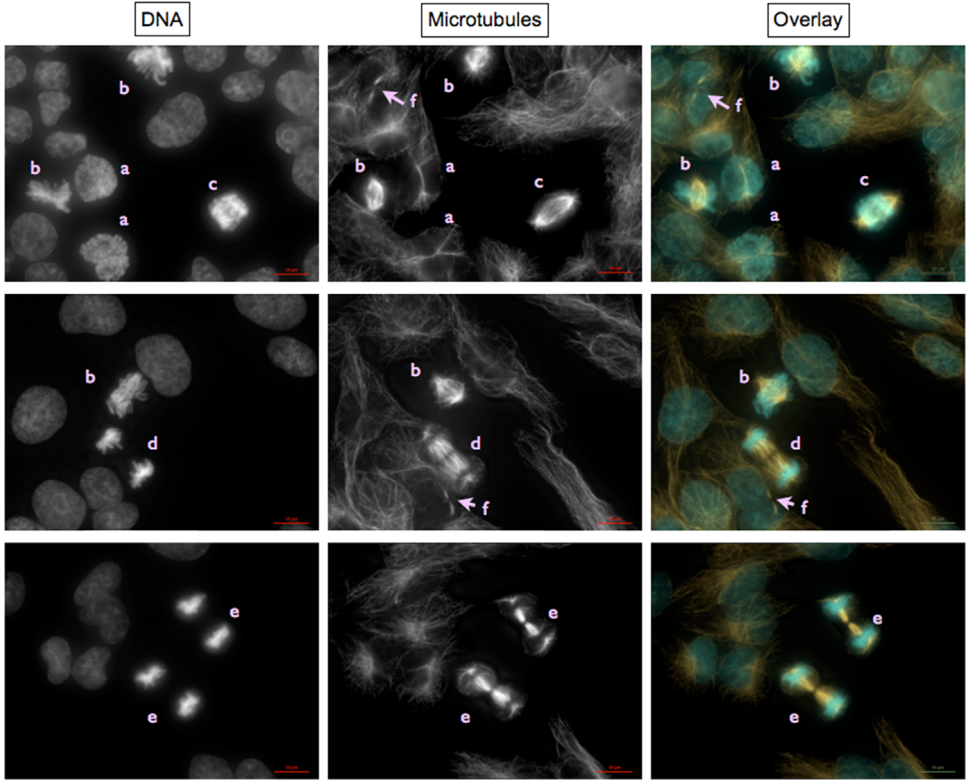
Panel 3: Besides fragmentation of the nucleus, apoptosis is indicated by condensed chromatin (bright DAPI staining of DNA, encircled) and depolymerized microtubules (encircled). DAPI fluorescence indicates a micronucleus (MN?), which is disproved by lack of a main nucleus within the same cytoplasmic microtubule complex.

Micronucleated cells



- Panel 1: The micronucleus (MN) lies together with an obvious main nucleus within the CMTC of a single cell indicated by a single microtubule organizing center.
- Panel 2: Remnants of the midbody identify daughter nuclei formed during a recent cytokinesis. Thus, each of the two micronuclei visible belongs to one of the two daughter cells.
- Panel 3: Signals of immunochemically stained centromere proteins identify MN containing whole chromosomes. Thus in panel 3, the MN on the left contains a whole chromosome (MN+) and the MN on the right contains a chromosomal fragment (MN-).

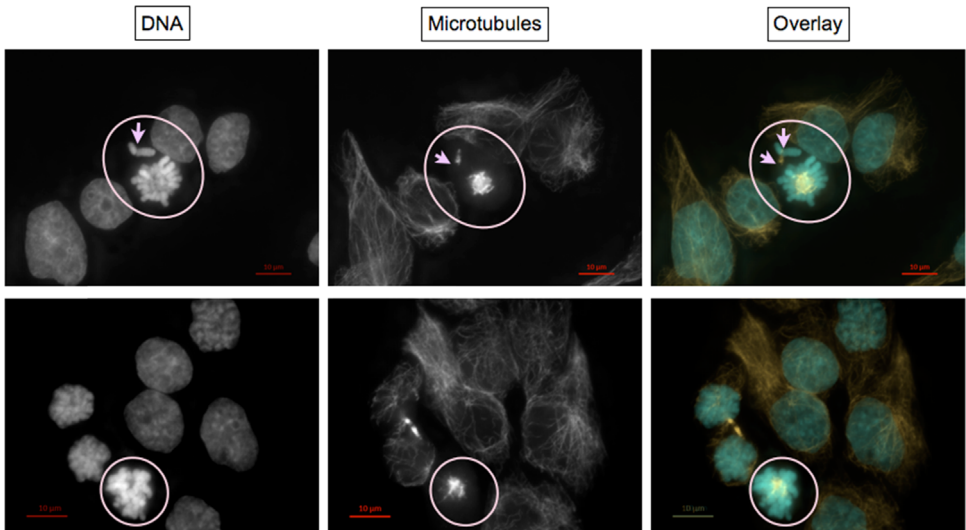
Normal mitotic stages and interphase cells



a—prophase; *b*—metaphase; *c*—anaphase I; *d*—anaphase II; *e*—telophase; *f*—two daughter cells formed during a recent cell division identified by remnants of the midbody indicating position of cytokinesis.

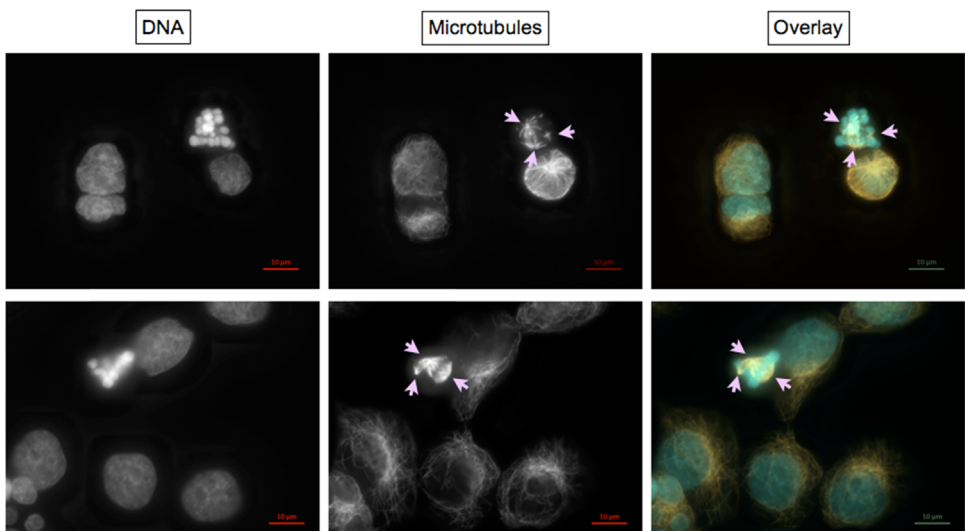
Disrupted mitotic stages

Metaphases with disrupted mitotic spindles



Encircled mitotic spindles contain less and/or shorter and/or disorganized microtubules and/or are monopolar; most likely leading to polyploidy or mitotic catastrophe. More examples are visible in the micrographs shown at “Asymmetric cell divisions...” panels 2, 4, and 5, circles c.

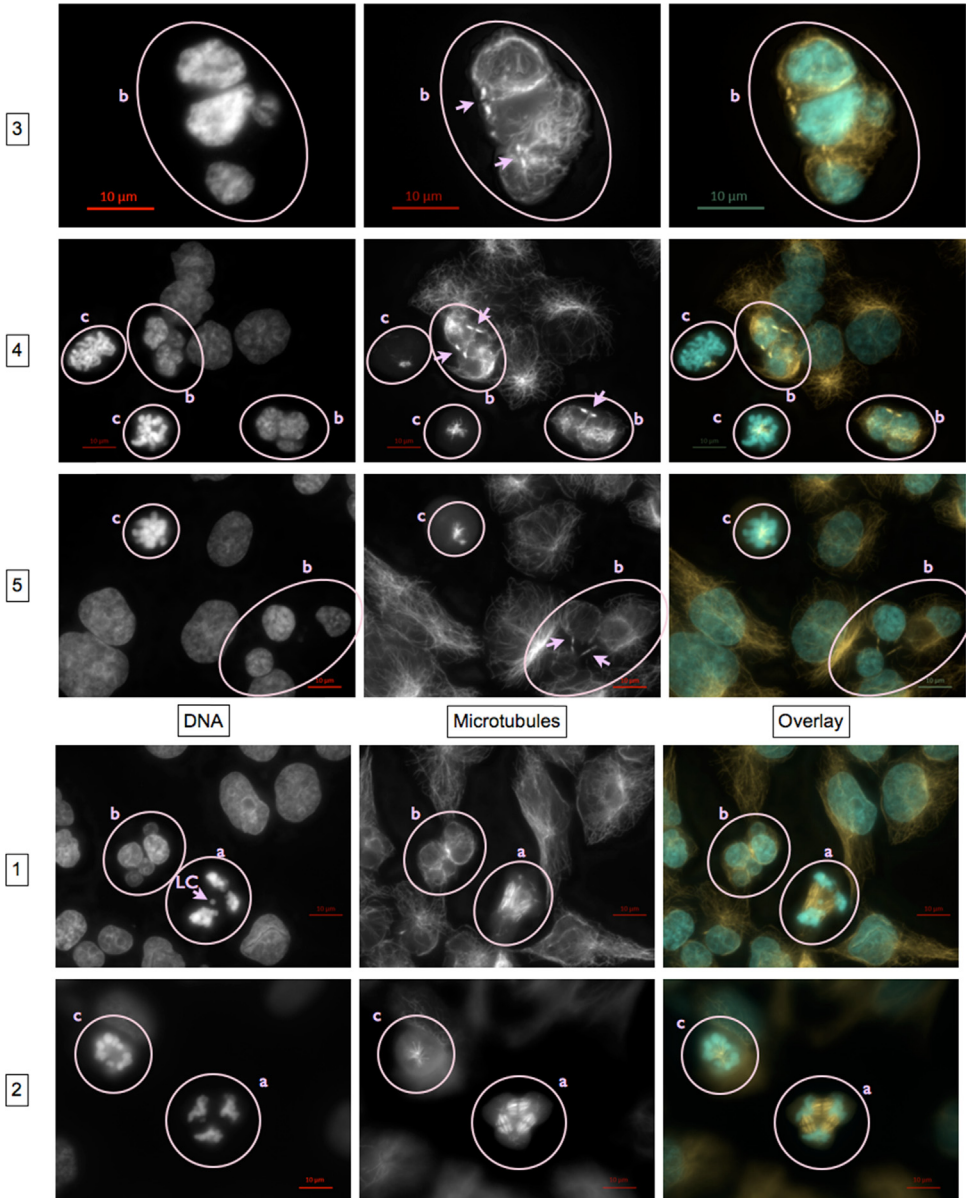
Metaphases with tri- and multipolar mitotic spindles



Chromosomes are oriented between three or more spindle poles (arrows).

Anhang

Asymmetric cell divisions caused by ana- and telophases with tri- and multipolar mitotic spindles and lagging chromosomes



Panels 1 and 2, circles a:

Chromosomes are oriented between three or more spindle poles. Depending on the distribution of the other chromosomes, lagging chromosomes (LC) might appear as one of several “nuclei” distributed evenly or unevenly between two or more daughter cells, in some cases meeting the criteria for micronuclei.

Panels 1, 3, 4, and 5, circles b:

Possible results of asymmetrical mitotic spindle assembly. Chromatin is distributed unevenly between several “nuclei” of different sizes which lie within 2 to 3 daughter cells as identified by remnants of the midbody indicating position of previous cytokinesis (arrows).

Panels 2, 4, and 5 circle c:

Disrupted mitotic spindles in (pro-)metaphase.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2015.07.010>.

References

- [1] A. Scheffler, A.E. Albrecht, H.L. Esch, L. Lehmann, Mutagenic potential of the isoflavone irilone in cultured V79 cells, *Toxicol. Lett.* 234 (2015) 81–91.
- [2] N.F. Cariello, W.W. Piegorsch, W.T. Adams, T.R. Skopek, Computer program for the analysis of mutational spectra: application to p53 mutations, *Carcinogenesis* 15 (1994) 2281–2285.
- [3] B. Köberle, C. Roscheisen, R. Helbig, G. Speit, Molecular characterization of methyl methanesulphonate (MMS)-induced HPRT mutations in V79 cells, *Mutat. Res.* 310 (1993) 65–71.
- [4] R. Helbig, E. Gerland, G. Speit, The molecular nature of mutations induced by adriamycin at the hprt locus of V79 cells, *Mutagenesis* 9 (1994) 113–116.
- [5] L.H. Zhang, H. Vrieling, A.A. van Zeeland, D. Jenssen, Spectrum of spontaneously occurring mutations in the *Hprt* gene of V79 Chinese hamster cells, *J. Mol. Biol.* 223 (1992) 627–635.
- [6] G. Speit, B. Habermeier, R. Helbig, Differences in the response to mutagens between two V79 sublines, *Mutat. Res.* 325 (1994) 105–111.
- [7] B. Mahadevan, W.M. Dashwood, A. Luch, A. Pecaj, J. Doehmer, A. Seidel, C. Pereira, W.M. Baird, Mutations induced by (–)-anti-11R,12S-dihydrodiol 13S, 14R-epoxide of dibenzo[a,l]pyrene in the coding region of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase (*Hprt*) gene in Chinese hamster V79 cells, *Environ. Mol. Mutagen.* 41 (2003) 131–139.
- [8] S.J. Wei, R.L. Chang, E. Hennig, X.X. Cui, K.A. Merkle, C.Q. Wong, H. Yagi, D.M. Jerina, A.H. Conney, Mutagenic selectivity at the HPRT locus in V-79 cells: comparison of mutations caused by bay-region benzo[a]pyrene 7,8-diol-9,10-epoxide enantiomers with high and low carcinogenic activity, *Carcinogenesis* 15 (1994) 1729–1735.
- [9] R. Helbig, G. Speit, The pattern of adriamycin-induced mutations in V-E5 Chinese hamster cells with chromosomal instability, *Mutat. Res.* 348 (1995) 1–6.
- [10] M.M. Moore, K. Harrington-Brock, C.L. Doerr, K.L. Dearfield, Differential mutant quantitation at the mouse lymphoma tk and CHO hprt loci, *Mutagenesis* 4 (1989) 394–403.
- [11] L. Lehmann, J. Wagner, M. Metzler, Estrogenic and clastogenic potential of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells, *Food Chem. Toxicol.* 44 (2006) 398–408.
- [12] S. Lutter, K. Schmalbach, H.L. Esch, L. Lehmann, The isoflavone irilone contributes to the estrogenic potential of dietary supplements containing red clover, *Arch. Toxicol.* 88 (2014) 309–321.
- [13] D.M. Schumacher, M. Metzler, L. Lehmann, Mutagenicity of the mycotoxin patulin in cultured Chinese hamster V79 cells, and its modulation by intracellular glutathione, *Arch. Toxicol.* 79 (2005) 110–121.
- [14] L. Lehmann, M. Metzler, Bisphenol A and its methylated congeners inhibit growth and interfere with microtubules in human fibroblasts in vitro, *Chem. Biol. Interact.* 147 (2004) 273–285.
- [15] R. Corvi, S. Albertini, T. Hartung, S. Hoffmann, D. Maurici, S. Pfuhler, J. van Benthem, P. Vanparys, ECVAM retrospective validation of in vitro micronucleus test (MNT), *Mutagenesis* 23 (2008) 271–283.

Erklärung zur Autorenschaft

Titel der Arbeit:

Entwicklung und Charakterisierung des RMCA für *Rattus norvegicus* in nukleärer und mitochondrialer DNA

Titel der Veröffentlichung:

Data in support of the mutagenic potential of the isoflavone irilone in cultured V79 cells. Scheffler A, Albrecht AE, Esch HL, Lehmann L., Data in Brief, 2015, Volume 4, 474-487

Detaillierte Darstellung der Anteile an der Veröffentlichung (in %)

Angabe Autoren/innen (ggf. Haupt- / Ko- / korrespondierende/r Autor/in) mit Vorname Nachname (Initialen)

Autor/in 1 Anne Scheffler (A.S.), Autor/in 2 Annette Albrecht (A.A.), Autor/in 3 Harald Esch (H.E.), Autor/in 4 Leane Lehmann (L.L.)

Autor	A.S.	A.A.	H.E.	L.L.	Σ in Prozent
Methodenabklärung Mutationsspektrum	100				15%
Durchführung Quantifizierung Irilon im Medium		100			4%
Durchführung HPRT-Test	50	50			15%
Durchführung Mutantenspektrum	100				15%
Durchführung Mikroerntest		100			15%
Datenanalyse	45	45		10	10%
Ergebnisdarstellung	30	30	10	30	10%
Recherche	30	30	30	10	10%
Verfassen der Veröffentlichung	30	10	30	30	2%
Korrektur der Veröffentlichung			50	50	2%
Koordination der Veröffentlichung				100	2%
Summe					100%

Die Mitautoren der in dieser (teil-)kumulativen Dissertation verwendeten Manuskripte sind sowohl über die Nutzung als auch über die angegebenen Eigenanteile informiert und stimmen dem zu.



*Angabe Autorenschaft: Anwählen Dropdownmenü / Autorenunterschrift **oder** Angabe Verweis: Kontrollkästchen über Eigenschaften aktivieren !*

Anne Scheffler
Autor/in 1
Hauptautor/in

Verweis: E-Mail hinterlegt

Annette Albrecht
Autor/in 2
Hauptautor/in

Verweis: E-Mail hinterlegt

Dr. Harald Esch
Autor/in 3
Koautor/in

Verweis: E-Mail hinterlegt

Prof. Dr. Leane Lehmann
Autor/in 4

Korrespondenzautor/in

Verweis: E-Mail hinterlegt

Würzburg, den

Prof. Dr. Leane Lehmann