

Aus dem Institut für Humangenetik
der Universität Würzburg
Vorstand Prof. Dr. med. Holger Höhn

**Selektive Amplifikation, Klonierung und
Sequenzierung eines hypermutablen
Bereiches des Fanconi Anämie A (FANCA)
Gens aus Fibroblasten-Kulturen
unterschiedlicher Passagen und Genotypen.**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Cornelia Fach

Würzburg, Februar 2004

Referent: Prof. Dr. med. H. Höhn

Koreferent: Prof. Dr. med. T. Grimm

Dekan: Prof. Dr. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.2004

Die Promovendin ist Zahnärztin.

Diese Arbeit widme ich meinen Eltern.

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
1. 1. Fanconi-Anämie	1
1. 2. genomische Instabilität bei Fanconi-Anämie	2
1. 3. Fragestellung dieser Arbeit	4
2. Material und Methoden	5
2. 1. Material	5
2. 1. 1. Material für die Zellkultur	5
2. 2. 2. Verwendete Kits	5
2. 2. 3. Chemikalien	5
2. 2. 4. Zelllinien	6
2. 2. 5. Enzyme	6
2. 2. 6. Oligonukleotide	6
2. 2. 7. Geräte	6
2. 2. Methoden	7
2. 2. 1. Zellkultur	7
2. 2. 1. 1. Zellkultivierung	8
2. 2. 1. 2. Auftauen von in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen, Einfrieren von Zellen	8
2. 2. 1. 3. Passagieren von Zellen	9
2. 2. 1. 4. Gewinnung von Zellen für die DNA Isolierung	10
2. 2. 1. 5. MMC-Behandlung von Zelle	10
2. 2. 2. DNA-Isolierung aus Fibroblasten-Zellen	10
2. 2. 3. Enzymatische Reaktionen an DNA	11
2. 2. 3. 1. PCR	11
2. 2. 3. 2. Restriktionsverdau	13
2. 2. 3. 3. Dephosphorylierung des Plasmids	13
2. 2. 3. 4. DNA-Ligation	14
2. 2. 3. 5. DNA-Sequenzierung	14
2. 2. 4. Agarose-Gelelektrophorese	15
2. 2. 5. Arbeiten mit Bakterien	16

2. 2. 4. 1. Transformation	16
2. 2. 4. 2. Plasmisolation	16
2. 2. 4. 3. Kolonie-PCR	17
3. Ergebnisse	19
3. 1. Kultivierung von Fibroblasten	19
3. 1. 1. Serielle Passagierung der Fibroblasten	19
3. 1. 2. Kultivierung der Zellen mit Zugabe von MMC	22
3. 2. DNA-Isolierung und Amplifikation der Fanca-Ex10 Sequenzen	
3. 2. 1. DNA-Isolierung	22
3. 2. 2. Optimierung, Reinigung und Ligation der PCR	23
3. 2. 2. 1. Optimierung der PCR Bedingungen	23
3. 2. 2. 2. Optimierung der Reinigung der PCR-Produkte	24
3. 2. 2. 3. Ligation der PCR-Produkte	25
3. 3. Klonierung der Amplifikationsprodukte	26
3. 3. 1. Versuch der Klonierung multimerer PCR-Produkte	26
3. 3. 2. Klonierung von Fragmentmonomeren	26
3. 4. Analyse der Klone	27
3. 4. 1. Plasmidisolation	27
3. 4. 2. Optimierung der Kolonie-PCR	28
3. 4. 3. Sequenzanalyse der Klone	30
3. 4. 3. 1. Mutationen in der Kontroll-Zelllinie 1994-17, Passage 8	31
3. 4. 3. 2. Mutationen in der Fanconi-Zelllinie 1994-38, Passage 9	37
3. 4. 3. 3. Mutationen in der Kontroll-Zelllinie 1994-17, mit MMC kultiviert	38
3. 4. 3. 4. Mutationen in der Fanconi-Zelllinie 1994-38, mit MMC kultiviert	38
3. 4. 3. 5. Mutationen in der Fanconi-Zelllinie 1994-38 (P0)	38
4. Diskussion	41
5. Zusammenfassung	45
Literaturverzeichnis	46

1. Einleitung

1. 1. Fanconi-Anämie

Fanconi-Anämie ist eine autosomal rezessive Erkrankung und gehört zu den sogenannten Chromosomenbruch-Syndromen wie auch die Erkrankungen Ataxia teleangiectasia, das Bloom-Syndrom und das Werner-Syndrom.

Die Erkrankung äußert sich in prä- und postnatalen Wachstums- und Entwicklungsstörungen. Zu den häufigen Entwicklungsstörungen gehören Minderwuchs, Skelettanomalien wie hypoplastische oder aplastische Daumen, Radialstrahldefekte, Nierenfehlbildungen, und lokalisierte Pigmentveränderungen in Form der Cafe au lait-Flecken. Postnatal kann sich schon in den ersten Lebensjahren eine Knochenmarksinsuffizienz, das Leitsymptom der Fanconi Anämie, manifestieren. Nach der Internationalen Fanconi Anemia Registry liegt die Inzidenz des Knochenmarksversagens im Kindesalter bei 80%. Meist beginnt die Erkrankung mit einer Thrombozytopenie, später kann eine Erythrozytopenie, anschließend eine Leukozytopenie auftreten. Selten ist die Lymphozyten-Reihe betroffen.

Eine weitere Folge der Fanconi-Anämie kann eine Neoplasie sein. In 61% der von Neoplasien betroffenen FA-Patienten treten hämatologische Tumoren auf. Die zwei häufigsten Formen sind die akute myeloische Leukämie und das myelodysplastische Syndrom. Bei 20% der Patienten kommt es zu squamösen Zell-Karzinomen besonders im Mund und Genitalbereich. Im Finalstadium versterben die Patienten meist an Malignomen oder Infektionen (Digweed und Sperling, 1996; Tischkowitz und Hodgson, 2003).

Therapeutisch besteht die Möglichkeit einer Knochenmarkstransplantation. Allerdings zeigen die Prognosen weiterhin eine hohe Sterblichkeitsrate mit 38%. (Kutler et al., 2002).

Die Diagnose Fanconi Anämie kann erstellt werden, da die Zellen einen charakteristischen Phänotyp zeigen. Metaphase-Chromosomen zeigen Chromosomenbrüche und im Zellzyklus kann ein G2-Phasen-Arrest festgestellt werden.

Diese zellulären Charakteristika werden durch die Einwirkungen der alkylierenden Agentien Mitomycin C und Diepoxybutan und durch erhöhte Sauerstoffkonzentrationen noch verstärkt (Liebetau et al., 1997; Pagano, 2000; Jung, 2001). Dies wird für die Diagnostik ausgenutzt.

Die Zellen von den Patienten werden in Anwesenheit von Mitomycin C kultiviert und anschließend auf Chromosomenbruchraten überprüft, alternativ wird eine Zellzyklusanalyse durchgeführt.

Hierbei weisen Patienten-Zellen bei einer MMC-Konzentration von 100ng/ml chromosomale Aberrationen auf. Kontroll-Zellen jedoch zeigen keine oder nur wenige Brüche, diese Zellen sind somit unempfindlicher gegenüber MMC.

Die Zellzyklusanalyse wird mit Hilfe der Durchflußzytometrie durchgeführt. Hierbei wird die quantitative Verteilung der Zellen in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus festgestellt. Bei den FA-Patienten sieht man eine Arretierung der peripheren Lymphozyten in der G2-Phase. Bei Zugabe von MMC wird dieser G2-Phasen-Arrest noch verstärkt (Jung, 2001). Unter Einfluß von MMC ist bei den Betroffenen außerdem ein verringertes Zellwachstum festgestellt worden.

Die Zellen heterozygoter Überträger zeigen im Gegensatz zu den homozygot Betroffenen diesen Phänotyp nicht.

1. 2. genomische Instabilität bei Fanconi-Anämie

Die FA-Gene sind der Gruppe der „Caretaker-Gene“ zuzuordnen, deren Aktivitäten die genomische Integrität des Organismus gewährleisten sollen.

Werden Gene dieser Gruppe durch Mutationen in ihrer Funktion beeinträchtigt, so treten gehäuft Mutationen, d.h. Veränderungen der DNA-Sequenzen auf. In der Folge führt das zu einer Erhöhung des Neoplasie-Risikos, das dann das oben geschilderte phänotypische Erscheinungsbild der FA prägt.

Exogene und endogene DNA-Schädigungen sind zahlreich: Alleine die Tatsache, dass die Zellaktivität und damit auch die Zellteilung und Replikation der DNA bei einer Temperatur von 37 °C stattfindet, bedingt, dass DNA-Schäden induziert werden. Weitere Ursache der endogenen Genomschädigung ist die unvermeidliche Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (sog. „freie Radikale“) während der Zellatmung (Kalb und Höhn, 2003).

Die genetische Instabilität, die bei FA-Patienten beobachtet wird, könnte das Phänomen des Mosaizismus bei FA mitbedingen, d. h. die Ko-Existenz von homozygot-mutierten und heterozygoten Zellen im Körper der Patienten (Waisfisz et al., 1999; Gregory et al., 2001).

Es wird vermutet, daß ca. 25% der FA-Patienten Mosaik-Konstellationen aufweisen.

Mosaikpatienten sind in ihren Blutzellen heterozygot, d. h. weisen ein Allel mit Wildtyp-Funktion und ein mutiertes Allel auf. Dadurch kann die Funktion der Blutzellen teilweise oder vollständig wiederhergestellt werden, was die Langzeitprognose günstig beeinflusst. Eine Verbesserung des hämatologischen Status konnte in einem Beobachtungszeitraum von 3-6 Jahren verzeichnet werden, da sich die revertierten Zellen aufgrund des Selektionsvorteils schneller teilen und damit die ursprünglichen FA-Zellen ersetzen (Gross, 2003).

Somatische Mutationen werden bei der Zellteilung auf die Tochterzellen übertragen. Damit entstehen heterogene somatische Zelllinien. Die Zellen, die von einer Mutterzelle abstammen

und eine somatische Mutation aufweisen, zeigen den mutierten Genotyp und unterscheiden sich damit von anderen somatischen Zellen. Dies wird als Mosaizismus bezeichnet.

Durch eine somatische Mutation kann eine konstitutionelle Mutation revertieren. Durch die Reversion wird ein durch Mutation geschädigtes Gen in der Funktion wiederhergestellt. Bei FA-Patienten können in der Zellzyklusanalyse dabei unterschiedliche Zelllinien festgestellt werden: Die klassischen FA-Zellen, die einen G2-Phasen-Arrest aufweisen, der durch Zugabe von MMC noch drastisch verstärkt wird, und eine Zellpopulation, die eine dem Wildtyp vergleichbaren Verteilung des Zellzyklus aufweist (Schindler et al., 2003).

Eine durch die Erkrankung bedingte Erhöhung der Mutationsrate könnte damit auch die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer spontanen Reversion erhöhen.

Theoretisch können vier verschiedene Mechanismen zu solchen genetischen Reversionen führen (Gross, 2002a; Gross et al., 2002 b).

Zum einen kann die Reversion durch ein Rekombinationsereignis entstanden sein. „Crossing-over“ komplementärer DNA-Sequenzen homologer Chromosome führen zum reversen Austausch der Genomabschnitte. Durch Segregation kann in einer Population ein Wildtyp-Allel und in einer Population ein Allel mit beiden Mutationen entstehen. Voraussetzung dafür ist der compound-heterozygote Status der konstitutionellen Mutationen.

Weiterhin können Rückmutationen, die meist während der Replikation auftreten, zur Reversion des Phänotyps führen. Bei einer Rückmutation kann ein Allel entstehen, bei dem die Wildtyp-Funktion wiederhergestellt ist.

Kompensatorische Mutationen sind eine weitere Möglichkeit der Reversion. Dabei wird die Funktion des Proteins wiederhergestellt, eine exakte Kopie des Wildtyp-Allels jedoch nicht gebildet. Mechanistisch ist diese Form der Rückmutation vergleichbar.

Ergänzend kann noch als Möglichkeit der Reversion die Genkonversion angeführt werden. Mechanistisch ist hier, wie beim „crossing-over“ auch, eine Paarung der homologen Chromosomen notwendig. Die Information eines Allels dient dabei der Reparatur des homologen Abschnittes des 2. Allels. Der DNA-Austausch ist damit nicht wie beim klassischen „crossing-over“ reziprok, sondern in diesem Fall geht ein Teil der Information verloren.

1. 3. Fragestellung

Die beschriebene erhöhte Mutationsrate von FA-Zellen soll im Hinblick auf das Mosaik-Phänomen näher charakterisiert werden. Da sich Mutationen mit der Anzahl an Zellteilungen akkumulieren, wurden sowohl Zellen, die den FA-Phänotyp aufweisen (1994-38), als auch Kontroll-Zellen (1994-17) „gealtert“, das heißt kontinuierlich passagiert. Desweiteren wurden diese beiden Zelllinien auch in Anwesenheit von MMC kultiviert, um einen möglichen Einfluß auf die Mutationsrate feststellen zu können. DNA aus den kultivierten Zellen wurde isoliert und ein spezifischer Abschnitt des Genoms auf Mutationen analysiert.

Ein Abschnitt des FANCA-Gens wurde dabei mit folgender Begründung als zu untersuchender Genomabschnitt ausgewählt:

Das FANCA-Gen zeichnet sich durch besondere Heterogenität des Mutationsspektrums aus (Gross, 2003 und Zitate dort). Verantwortlich dafür sind einerseits die Anhäufung von Sequenzwiederholungen, sgn. repetitiven Elementen, kurze direkte Sequenzwiederholungen, Homonukleotidabschnitte und Alu-Wiederholungen, und andererseits das vermehrte Auftreten von CpG Sequenzmotiven oder CCTG/CAGG Motiven, die als „Hot-Spots“ der Mutationsentstehung angesehen werden.

Ein solcher Teilbereich, der einen Teil von Exon 10 des FANCA Gens beinhaltet, wurde für die Mutationsanalyse ausgewählt. In diesem Sequenzbereich wurden bei einer Reihe von Mosaik-Patienten sowohl krankheitsverursachende Mutationen wie auch Reversionen detektiert (Gross, 2003).

Dieser Genomabschnitt wurde daher aus den isolierten DNA-Proben amplifiziert, die erhaltenen Fragmente kloniert und die Klone einer Sequenzanalyse unterzogen. Durch die vergleichende Sequenzanalyse eines für Mutationen offenbar besonders „anfälligen“ Abschnitt des FANCA-Gens in jungen und alten Zellen sowie Zellen von FA-Patienten und Kontrollen werden Aussagen über die somatische Stabilität (bzw. Instabilität) des untersuchten Genabschnittes erwartet.

2. Material und Methoden:

2. 1. Material

2. 1. 1. Material für die Zellkultur:

aqua ad injectabilia	Delta-Pharma	Delta-Pharma GmbH, Pfullingen
Gewebekulturflaschen		Greiner bio-one, Frickenhausen
Neubauer-Zählkammer		Blaubrand®, Brand
Nunc CryoTube™ Vials		NUNC™ Brand Products, Denmark
Petrischalen für Hefe und Bakterienplatten		Greiner, Frickenhausen
PP-Röhrchen		Greiner bio-one, Frickenhausen

2. 2. 2. Verwendete Kits:

High Pure PCR Template,		
DNA-Isolation Preparation Kit		Firma Roche, Mannheim
NucleoSpin® Extract		Macherey & Nagel H & Co. KG, Düren
NucleoSpin® Plasmid		Macherey & Nagel H & Co. KG, Düren
Qiagen MinElute PCR Purification Kit		Qiagen GmbH, Hilden
Qiagen MinElute Reaction Cleanup Kit		Qiagen GmbH, Hilden
TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing		Invitrogen life technologies, Paisley PA49RF, UK

2. 2. 3. Chemikalien:

Ampicillin		Roth, Karlsruhe
Borsäure		Riedel-de-Haëen, Seelze
Dimethylsulfoxid (DMSO)		Merck, Darmstadt
dNTPs		Invitrogen life technologie, Paisley, Scotland
Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline(PBS-Puffer)		PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria
EDTA, Ethanol		
Ethidiumbromid		Boehringer, Mannheim
Fetales Kälberserum (FKS)		PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Glycerin		Roth, Karlsruhe

Natriumacetat	Riedel-de-Haën, Seelze
Natriumchlorid zur Analyse	Appli Chem GmbH, Darmstadt
Minimum-essential-Medium (MEM)	Invitrogen life technologie, Karlsruhe
Select Agar	Invitrogen life technologie, Paisley, Scotland
Select Peptone 140	Gibco BRLR Life Technologies, Paisley, Scotland
Select Yeast Extract	Gibco BRLR Life Technologies, Paisley, Scotland
Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan (Tris)	Roth, Karlsruhe

2. 2. 4. Zelllinien:

1994-17: Kontroll-Fibroblasten (fragiles X-Syndrom)

1994-38: Patienten-Fibroblasten (Fanconi Anämie, Komplementationsgruppe FA-G)

2. 2. 5. Enzyme:

<i>EcoRI</i>	BioLabs® Inc, New England
Exonuclease1	USB, Cleveland, Ohio, USA
SAP	USB, Cleveland, Ohio, USA
T4 DNA Ligase	BioLabs® Inc, New England
Taq-Polymerase	Invitrogen life technologie, Karlsruhe
Trypsin-EDTA Solution	Invitrogen life technologie, Karlsruhe

2. 2. 6. Oligonukleotide:

Oligodeoxyribonukleotide	MWG Biotech AG, München
EcoFancA Rev: 5'-CGG ATT TCC AGC ACC TCA CGA TCT TGT G-3'	
EcoFAA, ex10: 5'-CGG AAT TCT GGG GGG TTG AAG TGG ATC-3'	
T3: 5'-ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA-3'	
T7: 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'	

2. 2. 7. Geräte:

Allegra 21R Centrifuge	Beckman Coulter, Krefeld
------------------------	--------------------------

Brutschrank	Heraeus Holding GmbH, Zweigniederlassung Rhein-Main
CEQ 8000 Genetic Instrumenten-Typ CEQ 2000 XL	Beckman-Coulter, Fullerton
Inkubator Techne DRI-Block DB-2A	Thermo-DUX GmbH, Wertheim
Magnetrührer GLW	Hartenstein, Würzburg
Mettler E 200	Mettler Waagen GmbH, Giessen
Mikrowellenherd	Sharp-Elektronik, Hamburg
Schüttelinkubator	Infors, München
Spannungsgerät Electrophoresis Power Supply-EPS 200	Pharmacia Biotech, Freiburg
Spektralphotometer „Ultrospec plus“	Pharmacia Biotech, Freiburg
sterile Bank	Holten LaminAir®, Dänemark
Thermocycler BiometraR	biomed. Analytik GmbH, Göttingen
Tisch-Schüttelinkubator Thermomixer 5436	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Tisch-Zentrifuge Centifuge 5415C	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
UV-Tisch	INTAS®, Göttingen
Vortex Mixer VM-300	neo Lab Migge, Heidelberg

2. 2. Methoden

2. 2. 1. Zellkultur

In dieser Arbeit wurden eine FA-Fibroblasten-Zelllinie und eine Kontroll-Fibroblasten-Zelllinie seriell passagiert, um einen in vitro-Alterungsprozeß der Zellen auszulösen. Zu diesem Zweck wurden die Zelllinien, die nach Etablierung der Linien nach der 2. Passage tiefgefroren wurden, aufgetaut (siehe 2. 2. 1. 2.), in Nährmedium kultiviert (siehe 2. 2. 1. 1.) und im konfluenten Stadium passagiert (siehe 2. 2. 1. 3.). Für die Zelllinie 1994-17 wurden im Verlauf von 10 Wochen 9 Passagen, die einer Teilungshäufigkeit von 24,67mal entspricht, durchgeführt. Dagegen wurden bei der Zelllinie 1994-38 innerhalb von 13 Wochen 10 Passagen, in denen sich die Zellen 24,54mal geteilt haben, durchgeführt.

Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Fibroblasten für eine DNA-Isolierung geerntet (siehe 2. 2. 1. 4.).

Beide Zelllinien wurden während der Kultivierung auch dem Klastogen MMC ausgesetzt (siehe 2. 2. 1. 5.), und daran anschließend die DNA der Zellen isoliert.

2. 2. 1. 1. Zellkultivierung

Die adhärennten Zelllinien wurden bei 37°C und bei 5% CO₂ in einem Minimum-essential-Medium (MEM) mit 10% Fetalem Kälberserum (FKS) kultiviert. Dabei wurden Zellkulturflaschen mit einer 80cm² großen Bodenfläche verwendet.

2. 2. 1. 2. Auftauen von in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen, Einfrieren von Zellen

Die im flüssigen Stickstoff gelagerten Fibroblasten-Zellen befinden sich in 2 ml Kryoröhrchen. Der Auftauprozess sollte möglichst schnell erfolgen. Eine Zellkulturflasche (80 cm² Bodenfläche) wurde mit 10 ml auf 37°C vorgewärmtem Medium (MEM mit 10% FKS) gefüllt. Das Kryoröhrchen wurde direkt vom flüssigen Stickstoff in ein 37 °C Wasserbad gegeben. Nach etwa 30 sec sind dabei die Zellen aufgetaut und können in das vorgewärmte Medium gegeben werden.

Da das Einfriermedium 10% DMSO enthält, sollte das Medium möglichst schnell nach Absetzen der Zellen entfernt werden. Nach etwa 8 h haben sich die Zellen abgesetzt und das Medium kann gewechselt werden. Das gesamte Medium wird abgenommen und mit 10 ml MEM + 10%FKS ersetzt.

Für das Einfrieren von Zellen werden noch nicht völlig konfluente Zellen eingesetzt. Diese werden trypsinisiert (siehe 2. 2. 1. 3.) und anschließend in einem Falconröhrchen bei 1100rpm für 10 min. zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes werden 3ml Einfrier-Medium (MEM + 10%FKS +10% DMSO) zugegeben und die Zellen durch Auf- und Abpipettieren homogen in dem Medium verteilt. Die Zellen werden in zwei Nunc CryoTube™Vials-Tuben verteilt. Entgegen dem Auftauvorgang sollten die Zellen schonend und damit langsam eingefroren werden. Die Kryoröhrchen werden in eine Isopropanol-Einfrierbox gestellt und in den -80°C Eisschrank gestellt. In dieser Einfrierbox wird durch den Isopropanol-Mantel eine

langsame Herunterkühlung der Zellsuspension erreicht. 8 Stunden später können die Zellen in den Stickstofftank überführt werden.

2. 2. 1. 3. Passagieren von Zellen

Die Fibroblastenzellen werden inkubiert, bis der Zellrasen auf dem Flaschenboden konfluent ist und so durch Kontaktinhibition die weitere Teilung der Zellen verhindert wird.

Die Zellen werden vom Flaschenboden gelöst, und eine geringe Anzahl der Zellen (250.000 in den frühen Passagen und 100.000 bei den späteren Passagen) wird in eine neue Kulturflasche überführt.

Zuerst wird das verbrauchte Medium abpipettiert und der Zellrasen mit 5ml PBS gewaschen. Anschließend wird 2ml Trypsin (PBS/0,05% 1:250 Trypsin/0,02% (w/v) EDTA-Lösung) auf die Zellen gegeben. Die Kulturflasche wird dabei vorsichtig geschwenkt, um eine vollständige Benetzung des Zellrasens zu gewährleisten. Trypsin spaltet die Adhäsionsproteine und damit lösen sich die Zellen vom Boden ab. Dieser Vorgang wird unter dem Mikroskop verfolgt. Eine Einwirkdauer von ca. 3-5 Minuten bei 37°C ist ausreichend, um die Zellen vom Untergrund zu lösen. Vorsichtig werden die Zellen nun mit der Pipette hoch- und hinunter pipettiert, um Zellverbände zu vereinzeln.

Nun werden 8ml MEM +10% FKS in die Kultivierungsflasche gegeben, um das Trypsin zu inaktivieren.

Auf einer Neumann-Zählkammer wird ein Tropfen dieser Lösung aufgetragen und die Zellen werden unter dem Mikroskop gezählt. Über einen Umrechnungsfaktor wird die Zellzahl pro ml Medium errechnet. 100 000 Zellen werden in eine neue Kultivierungsflasche (80 cm² Bodenfläche) gegeben und bis auf 10 ml mit Medium aufgefüllt.

Die Zellen werden kultiviert, bis sie wieder konfluent sind und dann erneut passagiert.

Auch wenn die Zellen nicht passagiert werden muß in regelmäßigen Abständen das Medium gewechselt werden. Hierzu wird das in der Flasche befindliche Medium verworfen und neues Medium zugegeben. Ein Indikator für den Mediumwechsel ist die gelbliche Verfärbung des Kulturmediums.

2. 2. 1. 4. Gewinnung von Zellen für die DNA Isolierung

Sollten Zellen für die DNA Isolierung gewonnen werden, so wurde nicht nur eine Kulturflasche mit Zellen inkubiert, sondern eine weitere Flasche für die DNA Isolierung angesetzt. Auch hier wurden die Zellen im konfluenten Zustand geerntet. Die Gesamtmenge der in der Flasche befindlichen Zellen wurde aber verwendet. Nach Beenden der Trypsinbehandlung mit 8 ml Medium wurden die Zellen in 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und für 10 min bei Raumtemperatur und 1100 rpm pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml PBS resuspendiert und erneut unter identischen Bedingungen pelletiert. Dieser Waschschrift wurde ein weiteres Mal wiederholt, das PBS abpipettiert und das Zellpellet bei -20 °C bis zur DNA Isolierung gelagert.

2. 2. 1. 5. MMC-Behandlung von Zellen

Für die MMC Behandlung wurden Zellen mit einer geringen Passagenzahl (1-2 Passagen) nach der Etablierung der Zelllinie verwendet. Die Zellen wurden aufgetaut, am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt und ein mit MMC versetztes Medium zugegeben. Es wurde 10µl des 1 µg/ml konzentrierten MMC zu dem Medium gegeben. Sobald das Medium verbraucht war, wurde dieses von den Zellen abgezogen und mit frischem mit MMC versetztem Medium ausgetauscht. Dies wurde solange praktiziert, bis die Zellen entweder passagiert werden konnten oder für die DNA-Isolierung verwendet wurden.

2. 2. 2. DNA-Isolierung aus Fibroblasten-Zellen

Zur DNA-Isolierung wurde der Kit „High Pure PCR Template, DNA-Isolation Preparation Kit“ der Firma Roche, Mannheim verwendet und es wurde genau nach den Angaben des Herstellers verfahren.

Die Zellen werden dabei mechanisch vom Boden gelöst und es schließt sich eine Lyse der Zellen an. Die sich nun in Lösung befindende DNA wird mit Proteinase behandelt und mittels einer Ionentauschersäule gereinigt.

Für eine PCR (siehe 2. 2. 4. 1.) werden 100 ng der so erhaltenen Template-DNA verwendet. Eine Bestimmung der DNA Konzentration ist also notwendig.

Die Konzentration der DNA wurde mittels Absorptionsmessung ermittelt:

Die Absorption einer Substanz bei einer spezifischen Wellenlänge ist von der Konzentration dieser Substanz abhängig.

Diese Proportionalität von Stoffmenge und Absorption ist durch das Lambert-Beersche

Gesetz erfaßt: $E = \epsilon \times c \times d$

E ist die gemessene Extinktion bei 260 nm

ϵ ist der molare Extinktionskoeffizient [$1/M \times cm$]

d ist die Schichtdicke der Küvette [cm]

Eine Absorptionseinheit bei 260 nm entspricht dabei näherungsweise einer DNA-Konzentration von 50 $\mu g/ml$:

$$1 A_{260nm} = 50 \mu g/ml$$

Der lineare Zusammenhang von Konzentration und Absorption ist nur in einem Meßbereich von $E=0.1$ bis $E=1$ gegeben. Die DNA muß daher vor der Messung geeignet verdünnt werden. Liegt der Meßwert nicht in diesem Bereich, muß die Messung mit einer neuen Verdünnung wiederholt werden.

2. 2. 3. Enzymatische Reaktionen an DNA

2. 2. 3. 1. PCR

Die Polymerase Ketten-Reaktion (**PCR**, **P**olymerase **C**hain **R**eaction) dient zur selektiven Vermehrung spezifischer Ausschnitte aus dem Genom. Voraussetzung dieser Vermehrung ist, daß ein Teil des zu vermehrenden DNA-Abschnittes, genauer die diesen Abschnitt flankierenden Sequenzen, in Form kurzer Oligonukleotide zur Verfügung steht. Diese Primer dienen dann als „Startermoleküle“ der DNA-Synthese.

Die DNA, die eine zu amplifizierende Sequenz enthält, wird erhitzt. Durch die Erhitzung wird die doppelsträngige DNA in ihre Einzelstränge aufgetrennt. Diese einzelsträngige DNA kann nun mit den zwei Oligonukleotiden reagieren. Diese zwei strangspezifischen Primer sind so gewählt, daß sie den zu untersuchenden Abschnitt der DNA einrahmen. Da die DNA-Synthese immer an das 3'-Ende der DNA neue Bausteine anfügt, binden die beiden Primer an die jeweilig komplementären Stränge.

In dieser Arbeit wurde ein Teil der genomischen DNA des FANCA-Gens amplifiziert. Die Primersequenzen sind unter 2. 2. 6. aufgelistet.

Für die PCR wurde Taq Polymerase der Firma Invitrogen verwendet. Die Firma liefert dabei einen 10-fach konzentrierten Puffer mit.

Folgende Bedingungen wurden für die PCR mit diesen Primern gewählt:

Puffer: 1x konzentriert

dNTPs: 200 μ M

MgCl₂: 1,5 mM

Polymerase: 2,5 U

Primer: 5 pmol Fw und 5 pmol Rev/Ansatz

Template DNA: 100 ng/Ansatz

Ansatzvolumen: 50 μ l

Das PCR Programm wurde wie folgt gestaltet:

1. 98 °C 1 min Start der PCR, dieser Schritt soll gewährleisten, daß die DNA (sowohl Primer als auch Template-DNA) einzelsträngig vorliegen.
2. 96 °C 30 sec Denaturierungsschritt der PCR
3. 60 °C 30 sec Hybridisierungsschritt der PCR
4. 72 °C 1 min Verlängerungsschritt der PCR

Die Schritte 2 bis 4 werden 33 mal durchlaufen (33 Zyklen)

Daran anschließend wird das Gerät auf 4 °C ohne Zeitbegrenzung programmiert.

Im Agarosegel wird die Qualität des PCR-Produktes überprüft (siehe 2. 2. 4.).

Die Reinigung der PCR-Produkte erfolgte mit dem „Qiagen Mini-Elute PCR-Purification-Kit“ der Firma Qiagen. Mit diesem Kit können nach dem Prinzip der Ionenaustauschchromatographie auch sehr kleine PCR Produkte gereinigt werden. Die Anweisungen des Herstellers wurden dabei verwendet.

2. 2. 3. 2. Restriktionsverdau

Die doppelsträngigen, gereinigten PCR-Produkte werden durch die Restriktionsendonuklease *Eco* RI geschnitten. Die Erkennungssequenz für diese Restriktionsendonuklease wurde durch die synthetischen Primersequenzen terminal an die PCR Fragmente angebracht.

In einem 30µl Gesamtansatz wurden 26µl des gereinigten PCR Produktes, 3µl 10fach Inkubationspuffer (dieser wird mit dem Enzym geliefert, NewEngland Biolabs) und 1µl *Eco* RI für mindestens 2 h bei 37 °C inkubiert.

Nach dem *Eco*-Verdau wurde die Reaktion gereinigt. Die Reinigung erfolgte mit dem Kit „Qiagen MinElute Reaction Cleanup Kit“ von Qiagen. Die Herstelleranweisungen wurden eingehalten.

Die Multimere des PCR-Fragments sollen im folgenden in einen Plasmid-Vektor ligiert werden. Dieser Vektor muß daher mit kompatiblen DNA-Enden versehen werden, um diesen Verknüpfungsschritt zu ermöglichen. Das Plasmid des Klonierungskits, pCR2.1, wurde daher auch folgendermaßen mit *Eco* RI verdaut: 17µl Plasmid, 2µl *Eco* RI 10xPuffer und 1µl *Eco* RI.

Dieser Verdau wird bei 37°C für 2 Stunden inkubiert.

Durch Auftragung des *Eco* RI-Verdau auf ein 1%-iges Agarosegel kann der Restriktionsverdau kontrolliert werden..

2. 2. 3. 3. Dephosphorylierung des Plasmids

Das *Eco* RI verdaute Plasmid wird im Agarosegel getrennt. Dabei wird der gesamte Verdau auf 3 Geltaschen verteilt und getrennt. Die Rückgewinnung des Plasmids erfolgt mit dem Kit „NucleoSpin® Extract“ von Macherey & Nagele.

Anschließend wird der Vektor mit dem Enzym SAP dephosphoryliert. Die Phosphatreste an beiden 5'-Enden der DNA werden durch Phosphatase-Behandlung entfernt um eine Selbstligierung, also das Verknüpfen der DNA-Enden des Vektors miteinander, ohne ein „fremdes“ DNA-Fragment, zu verhindern. Folgender Ansatz wird dabei gewählt:

8µl *Eco*-verdauter, gereinigter Vektor, 1µl SAP (Promega), 1µl SAP 10x-Puffer (200mM Tris, pH 8,0 und 100mM MgCl).

Die Dephosphorylierung wird für 1h bei 37 °C und anschließend für 15 min bei 75°C inkubiert. Die Inkubation bei 75 °C dient der Hitzeinaktivierung des Enzyms.

2. 2. 3. 4. DNA-Ligation

Um in einer Sequenzierreaktion mehrere Sequenzen gleichzeitig analysieren zu können, werden die PCR-Fragmente multimerisiert.

Hierbei werden die verdauten und gereinigten PCR-Produkte durch das Enzym Ligase über Phosphodiesterbindungen miteinander verknüpft. Das Restriktionsenzym *Eco* RI schneidet die DNA versetzt, es entstehen kurze überhängende Enden der doppelsträngigen DNA, die komplementär zueinander sind. Die Ligation wird bei 16 °C durchgeführt, um die Basenpaarung der komplementären DNA-Abschnitte zu stabilisieren.

Für die Reaktion wird die ATP-abhängige Ligase des T4-Phagen verwendet (New England, BioLabs).

Um zu überprüfen, ob auch ein multimeres Produkt entstanden ist, wird die Ligation auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen.

Der Multimerisierungsansatz enthielt 25µl des *Eco* RI verdauten und daran anschließend gereinigtem PCR-Produktes, 3µl 10x T4-Ligase-Puffer (wird von der Firma mit dem Enzym T4-DNA-Ligase geliefert) und 3µl T4-Ligase (2U/µl). Dieser Ansatz wird für mindestens 8 h bei 16 °C inkubiert.

Bei der Klonierung wird ein Fragment (in diesem Fall das Multimer des FANCA-Abschnittes, siehe oben) in einen Vektor ligiert. Der Vektor muß dabei kompatible Enden aufweisen, also in diesem Fall auch *Eco* RI überhängende DNA-Enden.

Diese Reaktion wird wie folgt durchgeführt: 1µl geschnittener und gereinigter, dephosphorylierter Vektor (100 ng/µl), 6µl multimeres PCR-Produkt, 2µl Ligase, 1,5µl 10x Ligase-Puffer und 5,5µl ddH₂O. Die Reaktion wird für mindestens 8 h bei 16 °C inkubiert.

2. 2. 3. 5. DNA-Sequenzierung

Sequenziert wurden sowohl Plasmide als auch PCR-Produkte, die nach „Kolonie-PCR“ (siehe 2. 2. 4. 3.) erhalten wurden.

Während Plasmide direkt für die DNA-Sequenzierung eingesetzt werden können, müssen PCR-Produkte erst von den nicht umgesetzten Primern und den nicht eingebauten dNTPs befreit werden. Dazu wird das PCR-Fragment mit den Enzymen Exonuklease I und SAP (Shrimps alkaline phosphatase) behandelt. Exo I degradiert einzelsträngige DNA, also die

verbliebenen Primer, nicht jedoch das doppelsträngige PCR-Produkt. SAP baut nicht umgesetzte dNTPs ab, indem die Phosphatreste abgespalten werden.

Beide Enzyme wurden von Amersham bezogen.

Folgender Ansatz wird verwendet: 4µl des PCR-Produktes und 0,5µl Enzymgemisch (1:1; Exonuklease 1 (10U/µl) und SAP (1U /µl). Dieser Ansatz wird 15 min bei 37 °C und anschließend 15 min bei 83 °C inkubiert. Die Hitzebehandlung dient der Inaktivierung der Enzyme.

Sowohl von Plasmid-Minipräparationen (siehe 2. 2. 4. 2.) als auch von dem oben beschriebenen Exo1/SAP-Verdau werden je 2µl in einen Sequenzieransatz eingesetzt. Vom entsprechenden Sequenzierprimer (T7 oder T3, siehe 2. 2. 6.) wird 1 µl einer 5 pmol/µl Lösung zugegeben, 5µl H₂O und 2µl QuickStart Sequenzier-Mix (Beckman-Coulter, Fullerton).

Die Sequenzierreaktion wurde nach Angaben des Kitherstellers durchgeführt. Der Sequenzieransatz wurde auf einem Kapillar-DNA-Sequenziergerät (CEQ8000, Beckman-Coulter) getrennt und mit Hilfe von Alignmentprogrammen (SequenceInvestigator, Beckman und Sequencher, Gene Codes Corporation) ausgewertet.

2. 2. 4. Agarose-Gelelektrophorese

In einem Gefäß wird 1g Agarose mit 100 ml 1x TBE-Puffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 20 mM Na₂EDTA (pH 8,3)) vermischt und in einer Mikrowelle zum Kochen gebracht.

Anschließend wird diese Flüssigkeit auf ca. 60 °C abgekühlt und ein Tropfen Ethidiumbromid (2 mg/ml in H₂O) zugegeben. Dies wird dann in ein Schiffchen geschüttet, das an den offenen Seiten mit Klebeband abgedichtet wurde. In die vorgeformten Vertiefungen sind die „Kämme“ (Former der Auftragstaschen) gesteckt worden. Wenn das Gel ausgehärtet ist, werden die Kämmen aus den Schiffen entfernt, so daß die Taschen entstehen.

Das Gel wird in eine Elektrophoresekammer gelegt und mit 1xTBE Laufpuffer geflutet.

In die erste Tasche werden 5µl eines Größenstandards gefüllt, in die folgenden werden je 3-5µl PCR-Produkt gegeben, die mit 1-2µl Ladepuffer (40% Saccharose in 0.1 mal TBE) versetzt wurden, um die PCR-Fragmente in die Taschen abzusenken und den Probenlauf im Gel verfolgen zu können. Die Separierung wird bei 10V/cm durchgeführt. Das

Ethidiumbromid lagert sich in die DNA ein, diese wird dadurch auf einem Transilluminator bei Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar und kann photographiert werden. Im elektrischen Feld wandert die DNA als Polyanion vom + zum – Pol, die Trennstrecke ist dabei proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts, die DNA wird also der Größe nach getrennt.

2. 2. 5. Arbeiten mit Bakterien

2. 2. 5. 1. Transformation

Der Kit „TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing“ von Invitrogen wurde für die Transformation der Vektoren in die chemisch kompetenten Zellen verwendet. Dieser Kit enthält portionierte kompetente Bakterienzellen des *E.coli* Stammes DH5 α -T1. Diese bei –80 °C gelagerten Zellen werden auf Eis aufgetaut und mit den Vektor-Fragment-Ligationsprodukten versetzt. Dabei wird das Protokoll des Kits unverändert übernommen. Verändert wurde nur der letzte Schritt des Protokolls: Es wurden nicht nur die empfohlenen 10-50 μ l der transformierten Bakterien ausplattiert, sondern auf 2 weiteren Agarplatten das Restvolumen von 2mal 100 μ l. Alle Angaben, auch die der Nährmedien und der Konzentration des Antibiotikums Ampicillin, das der Selektion der erfolgreich transformierten Bakterien dient, wurde nach Anweisung des Herstellers eingesetzt. Bei der von der Firma erhältliche Anweisung des „TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing“ handelte es sich um Version J (051302).

2. 2. 5. 2. Plasmidisolation

Die Plasmide der Transformanden wurden mit Hilfe des Kits „NucleoSpin® Plasmid“ von Macherey & Nagele isoliert.

Die Klone werden dafür in 2 ml LB (1% Hefe-Extrakt, 1,5% Trypton, 0,5% NaCl in Wasser) mit 100 μ g/ml Ampicillin über Nacht unter Schütteln bei 37 °C inkubiert.

Die Kolonien auf den Agar-Platten werden dabei mit sterilen Spitzen angeimpft. In jedes Röhrchen wird nur eine Kolonie der Agarplatte gegeben.

Die Bakterien werden nach der Inkubation durch Zentrifugation pelletiert (6000 rpm, 5 min, RT) und in Puffer aufgenommen („NucleoSpin® Plasmid“ von Macherey & Nagele), und in 1,5 ml Eppendorf-Caps überführt.

Die anschließenden Schritte werden nach dem Protokoll des Kits durchgeführt. Die Bakterien werden dabei alkalisch lysiert, der Großteil der Proteine sauer gefällt, und der erhaltene Überstand auf eine Ionentauscher-Säule aufgebracht. Nach Waschschrinen kann dann die Plasmid-DNA eluiert werden.

Die Menge und Reinheit des erhaltenen Plasmids kann im Agarosegel überprüft werden.

2. 2. 5. 3. Kolonie-PCR

Ähnlich wie bei der Animpfung einer Über-Nacht Kultur für die Plasmidgewinnung (siehe 2. 2. 4. 2.) können auch Kolonien in ein PCR-Mix „angeimpft“ werden. Schon ganz geringe Mengen an Bakterien enthalten genügend Plasmid-DNA, um daraus das inserierte Fragment amplifizieren zu können. Der Vorteil einer PCR ist der enorme Zeitgewinn und die Möglichkeit, eine wesentlich größere Menge an Klonen weniger kostenaufwendig einer Analyse zuzuführen.

Der Mix für die PCR setzt sich folgendermaßen zusammen:

Puffer: 1x konzentriert

dNTPs: 200 μ M

MgCl₂: 1,5 mM

Polymerase: 2,5 U

Primer: 5 pmol T7 und 5 pmol T3/Ansatz

Jeweils 25 μ l des Mixes werden in PCR Reaktionsgefäße vorgelegt und mit einem geringen Teil des Klons von der Agarplatte “angeimpft“.

Folgendes PCR Programm wird dann angewendet:

- | | |
|-----------------|---|
| 1. 98 °C 4 min | Start der PCR, die Bakterien sollen dabei vollständig lysiert werden. |
| 2. 96 °C 30 sec | Denaturierungsschritt |
| 3. 63 °C 30 sec | Hybridisierungsschritt |
| | Touch Down 1 °C/Zyklus, bei jedem Zyklus wird die Hybridisierungstemperatur um 1 °C verringert. |
| 4. 72 °C 1 min | Verlängerungsschritt der PCR |

Die Schritte 2 bis 4 werden 10 mal durchlaufen (10 Zyklen)

- | | |
|-----------------|--------------------------------|
| 5. 94 °C 30 sec | Denaturierungsschritt |
| 6. 63 °C 30 sec | Hybridisierungsschritt der PCR |
| 7. 72 °C 1 min | Verlängerungsschritt der PCR |

Die Schritte 5 bis 7 werden 25 mal durchlaufen (25 Zyklen).

Die erhaltenen PCR-Produkte werden im Agarosegel (siehe 2. 2. 4.) überprüft, mit Exonuklease1 und SAP behandelt und anschließend sequenziert (siehe 2. 2. 3. 5.).

3. Ergebnisse

3. 1. Kultivierung von Fibroblasten

3. 1. 1. Serielle Passagierung der Fibroblasten

Werden primäre Fibroblastenlinien seriell passagiert, setzt ein Alterungsprozeß ein, der phänotypisch beschreibbar ist: Das Wachstum dieser Zellen verlangsamt sich mit steigender Anzahl an Passagen, die Morphologie der Zellen ändert sich, diese werden grösser und langgezogener, während „junge“ Zellen eine eher kompakte Spindelform aufweisen. Dieser Alterungsprozeß wurde durch eine kontinuierliche Passage der Zelllinien ausgelöst: Sobald der Zellrasen konfluent war, wurden anfangs 250 000 Zellen in eine neue Kulturflasche eingesät, später wurden 100 000 Zellen in die neue Flasche eingesät. Durch diese weitere Reduktion der Zahl an eingesäten Zellen konnten mehr Teilungen der Zellen erzielt werden, bevor diese erneut passagiert werden mußten. Damit vergrößerte sich der Zeitabstand zwischen zwei Passagen.

In Tabelle 1 und 2 sind die Anzahl an Zellen in der Kulturflasche und die Anzahl an Teilungen für die Zelllinien 1994-17 und 1994-38 angegeben.

Nach dem Auftauen der Zellen wurde der Tag „0“ definiert, als die Zellen in der Kulturflasche konfluent waren.

Innerhalb von 10 Wochen sinkt die Zellanzahl von 2,4 Mio. Zellen / Flasche auf 700 000 Zellen / Flasche bei der Zelllinie 1994-17, (siehe Abbildung 1). Bei der Zelllinie 1994-38 sieht man einen ähnlichen Kurvenverlauf (Abb.2). Hier fällt die Zellanzahl von 2,725 Mio. Zellen pro Flasche auf 600 000 Zellen / Flasche innerhalb von 13 Wochen ab.

Diese Reduktion der Zellzahl pro Flasche ist zu beobachten, obwohl das Zeitintervall der Kultivierung in einer Flasche stetig verlängert wurde. Damit wird deutlich, daß die Teilungsaktivität beider Zelllinien stetig abnahm.

Die Gesamtanzahl an Teilungen der Zelllinie 1994-17 beträgt 24,67 und die der Zelllinie 1994-38 24,54. Die Teilungsrate der Zelllinie 1994-17 ist innerhalb von 10 Wochen genauso hoch, wie die Rate der Zelllinie 1994-38, die dafür aber 13 Wochen kultiviert werden mußte. Die Anzahl der Zellen pro Flasche (y) ist durch folgende Formel gegeben:

$$y = 2^n \times z$$

n ist dabei die Anzahl an Zellteilungen, z die Zellzahl zu Beginn der Kultivierung. Die Anzahl an Zellteilungen läßt sich damit folgendermaßen berechnen:

$$n = (\ln y - \ln z) : \ln 2$$

Zelllinie 1994-17		
Tage	Teilungen	Zellen / Flasche
0		2.400.000
5	2,29	1.225.000
11	2,94	1.925.000
20	2,93	1.900.000
27	3,31	2.475.000
34	3,05	2.075.000
44	4,13	1.750.000
56	3,21	925.000
70	2,81	700.000

**Tabelle 1: Kultivierung der Zelllinie 1994-17;
Teilungsrate und Anzahl der Zellen in der Kulturflasche**

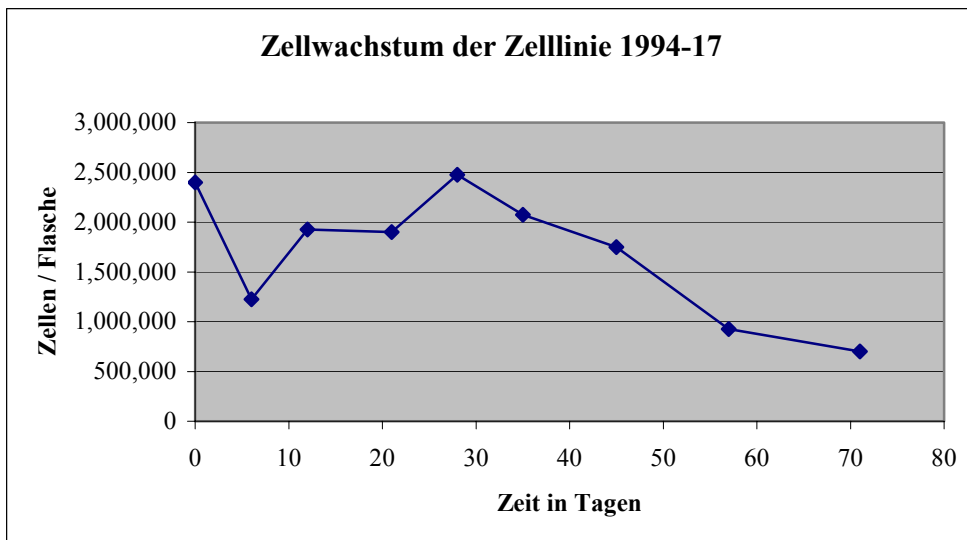


Abb. 1: Zellwachstumskurve der Zelllinie 1994-17

Zelllinie 1994-38		
Tage	Teilungen	Zellen / Flasche
0	0,00	2.725.000
5	3,32	2.500.000
11	3,05	2.075.000
20	2,87	1.825.000
27	3,12	2.175.000
34	2,41	1.325.000
56	2,81	700.000
65	1,38	1.100.000
72	3,00	800.000
91	2,58	600.000

**Tabelle 2: Kultivierung der Zelllinie 1994-38;
Teilungsrate und Anzahl der Zellen in der Kulturflasche**

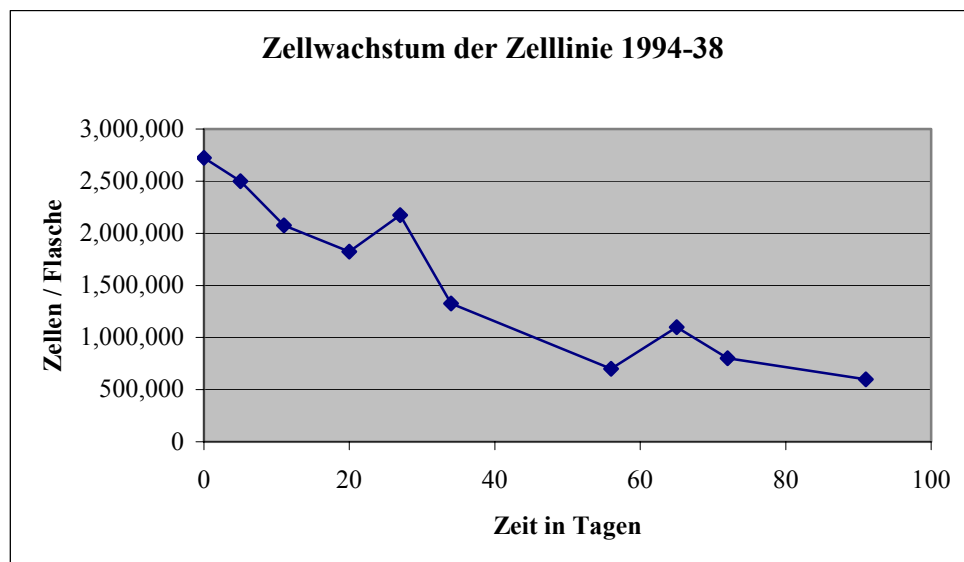


Abb. 2: Zellwachstumskurve der Zelllinie 1994-38

Zellen wurden zu Beginn der Kultivierung (Passage 1) und am Ende der Zellkultivierung (Passage 8 für Zelllinie 1994-38 und Passage 9 für Zelllinie 1994-17) geerntet und die DNA

der Zellen isoliert. Daraus wurde ein Teil des Exon 10 von FANCA amplifiziert und kloniert. Die erhaltenen Klone wurden analysiert (siehe 3.4.3.).

3. 1. 2. Kultivierung der Zellen mit Zugabe von MMC

In eine kleine (25 cm² Bodenfläche) Kulturflasche wurden 100 000 Zellen eingesät. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt und MMC-haltiges Medium zugegeben.

Die Zelllinie 1994-17 konnte nach der Einsaat noch zweimal passagiert werden. Die Zelllinie 1994-38 dagegen konnte nur noch einmal geteilt werden.

Die Zellverdopplungszahlen n der Zelllinie 1994-17 betrug dabei 4,2 und 3,9 für die 1. und 2. Passage, die der Zelllinie 1994-38 betrug 2,9.

Nach der Passage der Zellen wurden die Zellen geerntet und die DNA isoliert. Ein Teil des Exon 10 wurde amplifiziert, kloniert und die erhaltenen Klone analysiert (siehe 3.4.3.).

3. 2. DNA-Isolierung und Amplifikation der FANCA-Ex10 Sequenzen

3. 2. 1. DNA-Isolierung

Nachdem die DNA aus den Fibroblasten isoliert wurde (siehe 2.2.2.), wurde die Konzentration photometrisch bestimmt (2.2.2.). In Tabelle 3 sind die erhaltenen DNA-Mengen der einzelnen Isolierungen gegeben.

Zelllinie	Verdünnungs-Faktor	Gesamtvolumen in [µl]	Extinktionswert bei A _{260nm}	Gesamtmenge DNA in [µg]
1994-17	20	100	0,259	26
1994-17 P8	20	100	0,248	24,8
1994-17 MMC	20	100	0,407	40,7
1994-38	20	100	0,387	38,7
1994-38 P9	20	100	0,801	80
1994-38 MMC	10	100	0,194	9,7

Tabelle 3: Für alle Zelllinien sind Verdünnungsfaktor, Gesamtvolumen, Extinktionswert und Gesamtmenge der isolierten DNA angegeben

3. 2. 2. Optimierung, Reinigung und Ligation der PCR-Produkte

3. 2. 2. 1. Optimierung der PCR Bedingungen

Die PCR wurde in 1x PCR Puffer der 1,5 mM MgCl₂ und 200 µM dNTPs enthielt durchgeführt.

Folgende Parameter wurden für die Optimierung der PCR variiert:

1. Zusatz von Formamid (Endkonzentration 5%)
2. Hybridisierungstemperatur: Die niedrigste Temperatur war dabei 56°C, die höchste 63°C. Angewendet wurde ein Gradienten-Cycler, die Hybridisierungstemperatur wurde in Stufen von einem Grad Celsius erhöht.

Unter Zusatz von Formamid konnten keine PCR Produkte erhalten werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

Wird der PCR kein organisches Lösungsmittel zugegeben, so sieht man einen nur schwachen Effekt der Hybridisierungstemperatur: Die Banden bei den höheren Temperaturen (60°-63°C) zeigen etwas mehr Produkt als die bei geringerer Temperatur (siehe Abb. 3). Für alle weiteren Amplifizierungen wurde daher eine Hybridisierungstemperatur von 60°C gewählt.

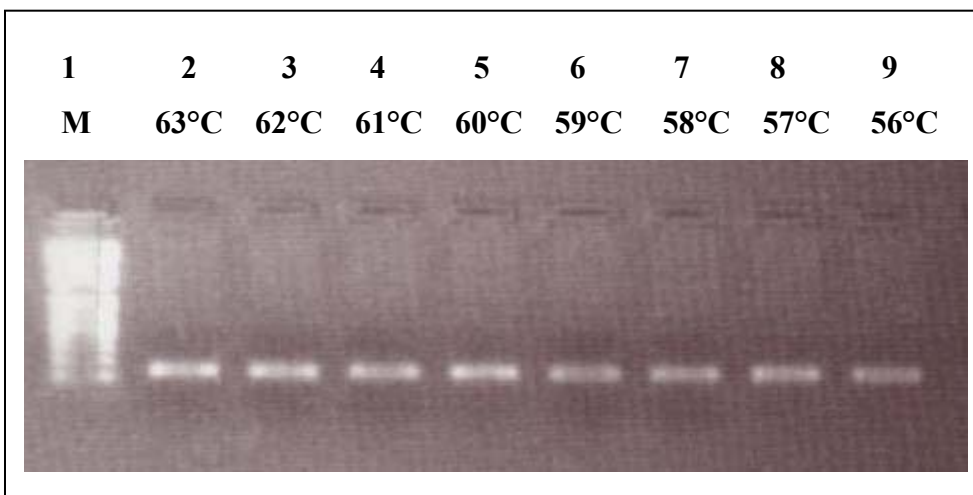


Abb. 3: Agarosegel-Elektrophorese der PCR Fragmente, Spur 1: Größenmarker, Spuren 2-9: PCR-Produkte bei verschiedenen Hybridisierungstemperaturen. 5 µl der PCR Produkte wurden aufgetragen.

3. 2. 2. 2. Optimierung der Reinigung der PCR-Produkte

Nach der PCR mußten die PCR-Produkte von den Enzymen, Basen und weiteren Zusätzen gereinigt werden, da diese sonst bei nachfolgenden enzymatischen Reaktionen stören würden. Wurde der „PCR Purification Kit“ dabei eingesetzt, so ging ein Großteil der PCR-Produkte verloren. Die geringe Länge des PCR Produktes (etwa 120 Bp) war dafür die Ursache. Eine andere Reinigungsmethode mußte daher zu Hilfe genommen werden.

In Abb. 4 ist die Überprüfung der Reinigung in einem Agarosegel gezeigt. In den Spuren 1 und 2 sind je 5 µl der nicht gereinigten PCR-Produkte aufgetragen. Nach Reinigung und Elution gereinigter Produkte in einem Gesamtvolumen, das dem Ausgangsvolumen entspricht, wurden in den Spuren 3 und 4 wieder je 5 µl der Probe aufgetragen.

Nachdem die gereinigten PCR Produkte mit dem Enzym *Eco* R I verdaut, und erneut über Säulen gereinigt wurden, waren keine Banden im Agarosegel mehr sichtbar (Spuren 5 und 6).

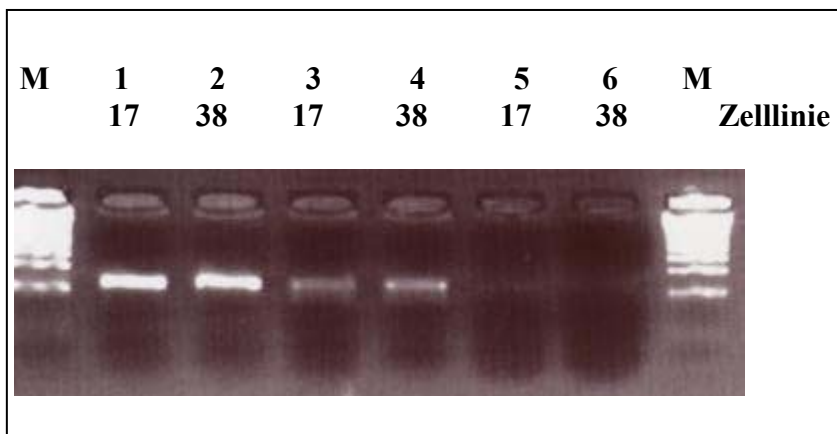


Abb. 4: Agarosegel-Elektrophorese der PCR Fragmente, M: Größenmarker, Spuren 1 und 2: ungereinigte PCR-Produkte unter Verwendung der isolierten DNA aus den Zelllinien 17 und 38. 5 µl der PCR-Produkte wurden aufgetragen. Spuren 3 und 4: Produkte nach Reinigung, Spuren 5 und 6: Produkte nach *Eco*RI Verdau und erneuter Reinigung.

In Abb. 5 werden nochmals die gereinigten PCR-Produkte auf einem Agarosegel gezeigt. Hierbei wurde der PCR Purification Kit von Qiagen verwendet. Es wurden auch hier in jeder Spur je 5µl aufgetragen.

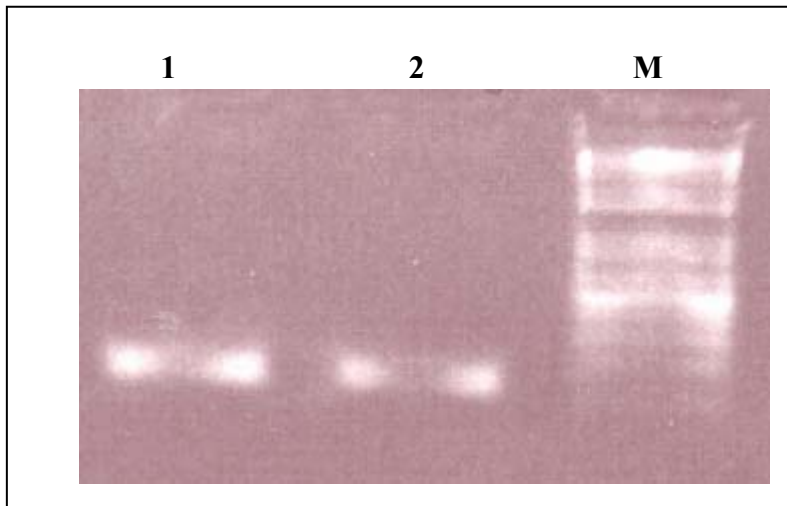


Abb. 5: Agarosegel-Elektrophorese der PCR Fragmente, M: Größenmarker; Spur 1: ungereinigtes PCR-Produkt; Spur 2: PCR-Produkt nach Reinigung, 5 µl der Proben wurden aufgetragen.

3. 2. 2. 3. Ligation der PCR-Produkte

Nachdem die PCR-Produkte mit dem Enzym *Eco* RI geschnitten worden sind (2.2.3.2.), wurden sie mit Hilfe des Enzyms DNA-Ligase zu Multimeren ligiert (2.2.3.4.). Wie man in Abb. 6 sehen kann, wurden Dimere und höhere Multimere gebildet. Allerdings verblieb auch ein Rest an Monomeren. Die am weitesten laufende Bande des Markers ist ein 100 Bp-Fragment. Die weiteren Fragmente sind jeweils 100 Bp länger. Gut separiert sind noch die Banden der Di- und Trimere, die Banden höherer Multimere werden in dem gewählten Agarosegel nicht mehr als distinkte Banden getrennt.

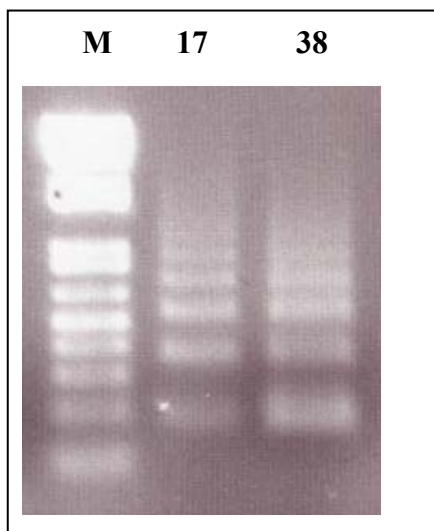


Abb. 6: Agarosegel-Elektrophorese der Multimerisierungsprodukte der PCR Fragmente unter Verwendung der PCR-Produkte aus der DNA der Zelllinien 1994-17 und -38.

3. 3. Klonierung der Amplifikationsprodukte

3. 3. 1. Versuch der Klonierung multimerer PCR-Produkte

Nach der Ligation konnte die erfolgreiche Multimerisierung im Agarosegel gezeigt werden (siehe Abb. 6). Diese sollten in einen *Eco* RI geschnittenen Vektor ligiert werden. Dazu wurde der Vektor aus dem TOPO TA Cloning® Kit, pCR4 TOPO, verwendet.

In den Vektor ließen sich selektiv die Monomere inserieren, aber nur eine geringe Anzahl an Multimeren. Bei dem Versuch die Inserts in den Vektor zu ligieren, enthielten von 70 analysierten Klonen nur 5 Klone Multimere.

Die Inserts der Klone wurden mittels Kolonie-PCR amplifiziert und im Agarosegel analysiert. In Abb. 7 ist ein Ausschnitt eines Agarose-Gels gezeigt.

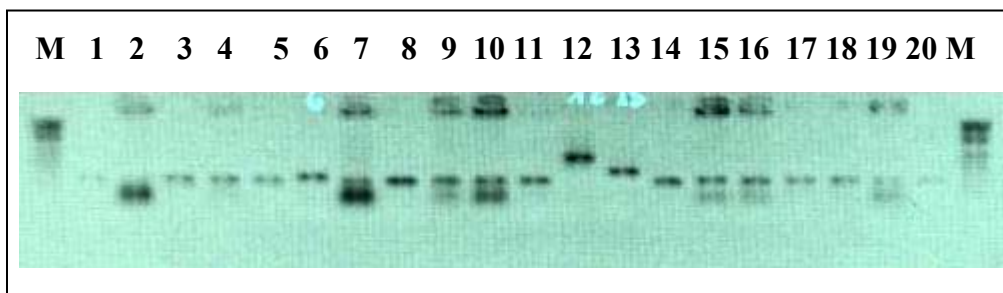


Abb. 7: Agarosegel-Elektrophorese der Analyse der Klone: M: Größenmarker, Spuren 1-20: PCR Produkte der Klone 1-20. Spur 2: Die PCR Produkt-Größe entspricht hier der Größe, die erhalten wird, wenn der Leervektor als Matrize der Kolonie-PCR fungiert. Spuren 1, 3, 4, 5, 6, 8, 11, 14, 15, 16, 17, 18 und 20: Insertion eines Monomers, Spuren 12 und 13: Insertion von Multimeren, Spuren 7, 9, 10, 15, 16 und 19: eine dem Leervektor und dem Monomer entsprechende Bande sind sichtbar.

3. 3. 2. Klonierung von Fragmentmonomeren

Da die Effizienz der Multimerenklonierung so gering war, wurde im folgenden das erhaltene PCR Produkt ohne weitere enzymatische Schritte in den unbehandelten Vektor des TOPO TA Cloning® Kit ligiert. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers vorgegangen. Die Gesamtmenge des Transformationsansatzes wurde jedoch auf Agarplatten ausgestrichen: Auf eine Platte wurden 10µl, auf eine weitere je 50µl und auf eine 3. Platte je 100µl des Transformationsansatzes ausplattiert. In Tabelle 4 sind die Ergebnisse der Klonierungen zusammengefaßt. Angegeben ist dabei die hochgerechnete ungefähre Anzahl an Klonen im gesamten Transformationsansatz.

ausplattierte Gesamtmenge des Transformations- ansatzes	10µl	50µl	100µl
gebildete Klone 1994-17 (T0)	nicht plattiert	nicht plattiert	ca. 700 Kolonien
gebildete Klone 1994-38 (T0)	nicht plattiert	nicht plattiert	ca. 1000 Kolonien
gebildete Klone 1994-17 (T8)	8	45	94
gebildete Klone 1994-38 (T9)	17	66	ca. 200
gebildete Klone 1994-17 MMC	11	34	ca. 100
gebildete Klone 1994-38 MMC	6	39	56

Tabelle. 4: Bei der Klonierung gebildeten Klone pro ausplattierter Menge des Transformationsansatzes. 0-Wert: PCR-Produkt unter Verwendung der zu Beginn der Kultivierung isolierten DNA; (T8) und (T9) Werte: DNA-Isolierung nach Passagieren der Zellen; MMC: DNA Isolierung nach Kultivierung der Zellen mit MMC.

3. 4. Analyse der Klone

3. 4. 1. Plasmidisolation

Plasmide der Klone wurden wie angegeben isoliert (siehe 2.2.4.2.).

In Abb. 8 ist die Überprüfung der Plasmidisolationen im Agarosegel gezeigt.

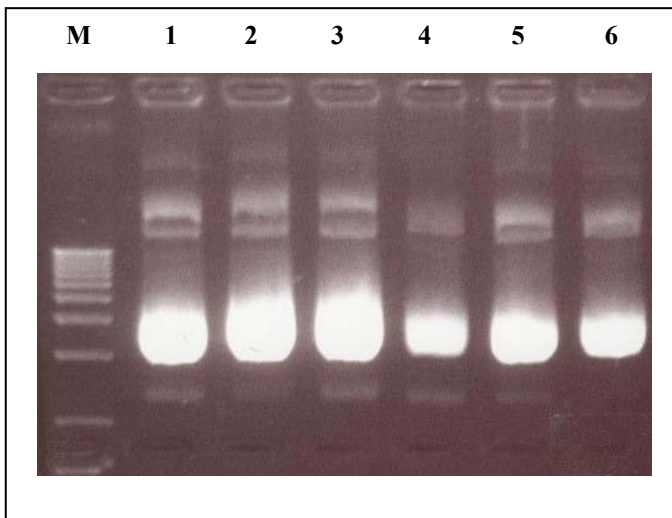


Abb. 8: Agarosegel-Elektrophorese der isolierten Plasmide: M: Größenmarker, Spuren 1-6: Plasmide der Klone 1-6

Die Isolierung der Plasmide diente nur der Kontrolle: Die nachfolgende Sequenzierung der Klone sollte dabei überprüft werden. Der Vergleich der Sequenzen, die vom Plasmid erhalten wurden mit den Sequenzen der „Kolonie-PCR-Produkte“ sollte zeigen, dass die wesentlich weniger aufwändige „Kolonie-PCR“, die einen deutlich höheren Durchsatz an Klonen ermöglicht, qualitativ mit der Plasmid-Sequenzierung vergleichbar ist (Ergebnisse nicht gezeigt). Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde daher ausschließlich die Methode der Kolonie-PCR mit nachfolgender Sequenzierung des PCR Produktes verwendet.

3. 4. 2. Optimierung der Kolonie-PCR

Für die Kolonie-PCR wurde die Hybridisierungstemperatur optimiert. Dabei wurde die Temperatur in einem Intervall von 60,5°C und 53,5°C variiert. In Abb. 9 ist die Überprüfung der PCR-Fragmente im Agarosegel gezeigt.

Nur bei den geringeren Hybridisierungstemperaturen (ab Spur 5 bis Spur 8) sind Fragmente der gewünschten Größe sichtbar. Nach weiteren Versuchen (Ergebnisse nicht gezeigt) wurde dann ein „TouchDown“ Programm (TD 52) für die Amplifizierung der PCR ausgehend von den Klonen verwendet. Diese Methode ist unter 2.2.4.3. beschrieben.

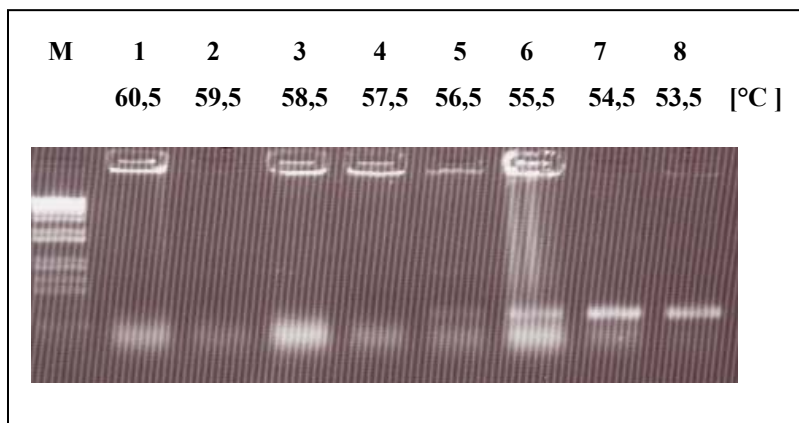


Abb. 9: Agarosegel-Elektrophorese der Kolonie-PCR-Produkte. M: Größenmarker, Spuren 1-8: Temperaturgradient der Hybridisierungstemperatur.

Von den erhaltenen Klonen wurden die inserierten Fragmente mittels der so optimierten Kolonie-PCR amplifiziert. Die Analyse der PCR-Fragmente zeigte, dass weniger als 1% aller Klone kein inseriertes Fragment enthielt. Hier wurde ein Fragment enthalten, das einer Amplifizierung unter Verwendung eines Leervektors entsprach. Etwa 2 % aller Klone zeigten Fragmentgrößen, die über der des gewünschten Fragments lagen. Diese PCR Fragmente wurden nicht einer DNA-Sequenzanalyse unterzogen.

In Abb. 10 ist exemplarisch ein Agarosegel gezeigt. Hier werden die Klone 1 bis 94 der PCR-Fragmente, die unter Verwendung der aus Zelllinie 1994-38 nach der Passage 8 isolierten DNA erhalten wurde, gezeigt. In dieses Agarosegel wurden für die Geltaschenbildung 4 Gel-Kämme eingesetzt.

Der Längenstandard wurde bei den Geltaschen in der oberen Reihe in Spur 1 aufgetragen und in den folgenden Reihen jeweils um eine Spur nach innen versetzt. Jeweils 24 PCR-Produkte wurden pro Gel-Kamm analysiert. Die PCR-Produkte, die schwach ausgeprägt sind (Klone 22, 95 und 96, siehe Pfeil), wurden nicht sequenziert.

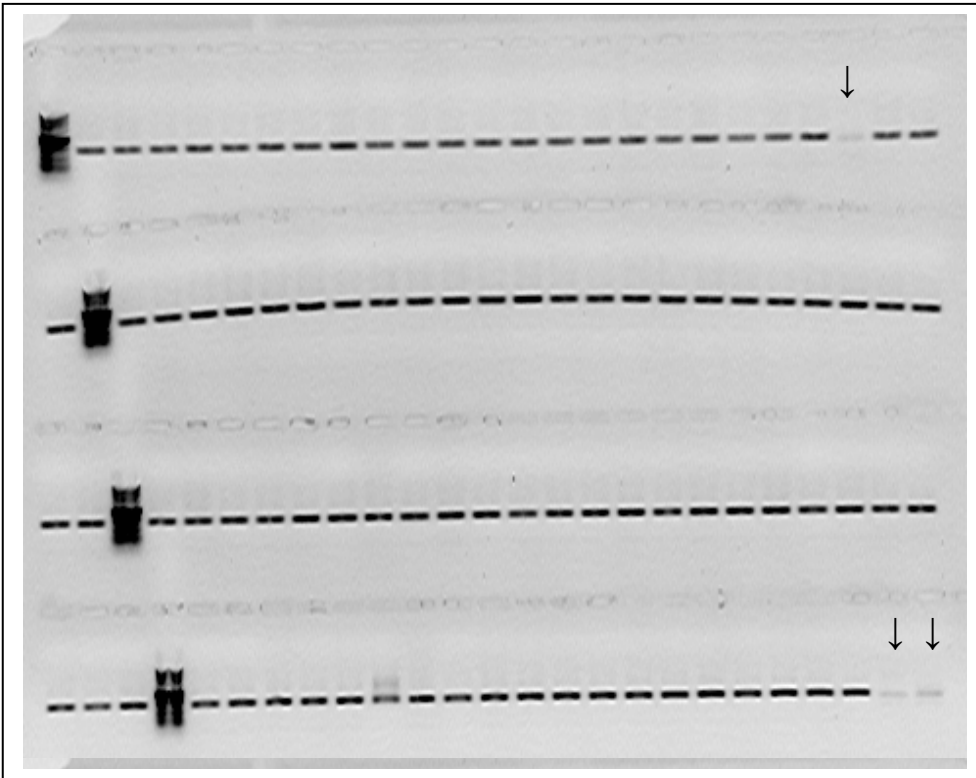


Abb. 10: Überprüfung der PCR Produkte der Klone „1994-38, Passage 9, Klone 1-96“ im Agarosegel.

3. 4. 3. Sequenzanalyse der Klone

Nach Amplifizierung der inserierten Fragmente der Klone wurden die erhaltenen PCR-Fragmente sequenziert. In Abb. 11 ist die Basenabfolge der untersuchten Sequenz dargestellt.

```

TCTGGGGGGTTGAAGTGGATCTGTTGTCTGAAAGCGCCTGGGGATT
GTTTCTGGTGGGCTGCCGCCGTGTGCTGACATCTGTTTTCTGTTCCTG
GCTCTGTCTTCAGTTGCACTTGACGCTTTGGCTGCTGGAGTACAGGA
GGAGTCCTCCACTCACAAAGATCGTGAGGTGCTG

```

Abb. 11: untersuchte DNA-Sequenz. Schattiert sind terminal die Primersequenzen 1 („forward-Primer“) und 2 („reverse Primer“)..

In der Datenbank unter der Genbanknummer AC 005567.1 entspricht dieser Abschnitt den Basen 9828 bis 9962. Dabei ist die Position 9828 das „T“, das direkt nach dem Primer 1

folgt. Dieses „T“ wird im folgenden mit der Basennummer 1 gekennzeichnet, da diese Base die erste Base des auf Mutationen analysierten DNA-Abschnitts darstellt.

Die Auswertung der Sequenzen erfolgte nach folgendem Schema:

1. Die Sequenzen wurden mit folgenden Parametern analysiert:
 - „call threshold“: 0.6
 - „default“ Analyseparameter
 - „Quality based Trimming“: „Both ends“ unter der Option „high“
(Diese Parameter der Analyse sind unter „CEQ8000 Software-Guide“ zu finden)
2. Alle Sequenzen, die nach dem Trimmen weniger als 200 Basen mit der geforderten Qualität aufwiesen, wurden ausgeschlossen.
3. Die verbleibenden Sequenzen wurden mit dem Programm „Sequencher“ aliniert. Alle Sequenzabschnitte, die dem Vektor oder der Primersequenz entsprachen wurden abgeschnitten, die verbleibende Sequenz entsprach dem durch die Polymerase generierten Genomabschnitt. Die gefundenen Mutationen wurden in Tabellenform dargestellt.

3. 4. 3. 1. Mutationen in der Kontroll-Zelllinie 1994-17, Passage 8

Von der gealterten Zelllinie 1994-17 (P8) wurden 110 Klone sequenziert. Im folgenden ist für diese Analyse exemplarisch die erhaltene Tabelle (Tab. 5) gezeigt. In der ersten Spalte ist der Sequenzname angegeben, in der 2. Spalte die gesamte Länge der Sequenz und in der 3. Spalte die Sequenzlänge nach Trimmen der DNA-Enden. Für das Entfernen von Sequenzabschnitten werden die Qualitätsparameter der Basen verwendet, die ein Maß für die Verlässlichkeit der Sequenz darstellen. Sind somit die Sequenzen nach dem Trimmen deutlich kürzer als die ursprüngliche Sequenz, so läßt das auf eine unzuverlässige Sequenz schließen. Um daher Mutationen, die durch Sequenzierartefakte verursacht wurden, zu vermeiden, wurden durch dieses Ausschlußkriterium nur qualitativ hochwertige Sequenzen weiter analysiert.

Klon 17 P8 10 z. B. weist eine Sequenzlänge von 272 Basen auf, nach dem Trimmen verbleiben nur 69 Basen mit ausreichend hoher Qualität. Diese Sequenz wurde daher ausgeschlossen. Andere Sequenzen (siehe 17 P8 Klon 14) zeigen in Spalten 2 und 3 den Wert 0. Hier waren die Sequenzen nicht auswertbar.

Result Name	Original Sequence Length	Length after Quality-based Trimming
Copy of 17 P8 1.A01_030719220E	255	221
Copy of 17 P8 10.B02_030719220G	272	69
Copy of 17 P8 11.C02_030719220H	256	224
Copy of 17 P8 12.D02_030719220I	219	216
Copy of 17 P8 13.E02_030719220J	257	242
Copy of 17 P8 14.F02_030719220K	0	0
Copy of 17 P8 15.G02_030719220K	262	85
Copy of 17 P8 16.H02_030719220L	508	3
Copy of 17 P8 17.A03_030719220N	223	211
Copy of 17 P8 18.B03_030719220Q	256	243
Copy of 17 P8 19.C03_030719220T	255	234
Copy of 17 P8 2.B01_030719220V	221	216
Copy of 17 P8 20.D04_030719220X	259	241
Copy of 17 P8 21.E04_0307192210	259	241
Copy of 17 P8 22.F03_0307192212	257	226
Copy of 17 P8 23.G04_0307192216	250	245
Copy of 17 P8 24.H03_0307192218	255	130
Copy of 17 P8 25.A04_030719221A	220	213
Copy of 17 P8 26.B04_030719221B	224	217
Copy of 17 P8 27.C04_030719221C	225	218
Copy of 17 P8 28.D04_030719221D	262	147
Copy of 17 P8 29.E04_030719221E	254	251
Copy of 17 P8 3.C01_030719221F	434	4
Copy of 17 P8 30.F04_030719221G	223	215
Copy of 17 P8 31.G04_030719221G	225	221
Copy of 17 P8 32.H04_030719221H	257	254
Copy of 17 P8 33.A05_030719221I	255	249
Copy of 17 P8 34.B05_030719221J	256	242
Copy of 17 P8 35.C05_030719221K	253	251
Copy of 17 P8 36.D05_030719221L	257	243
Copy of 17 P8 37.E05_030719221M	258	253
Copy of 17 P8 38.F05_030719221N	221	217
Copy of 17 P8 39.G05_030719221O	226	216
Copy of 17 P8 4.D01_030719221P	258	39
Copy of 17 P8 40.H05_030719221P	257	242
Copy of 17 P8 41.A06_030719221Q	268	34
Copy of 17 P8 42.B06_030719221R	257	210
Copy of 17 P8 43.C06_030719221T	223	221
Copy of 17 P8 44.D06_030719221T	385	4
Copy of 17 P8 45.E06_030719221V	258	243
Copy of 17 P8 46.F06_030719221V	256	242
Copy of 17 P8 47.G06_030719221W	237	232
Copy of 17 P8 48.H06_030719221Y	254	72
Copy of 17 P8 49.A07_030719221Z	258	247
Copy of 17 P8 5.E01_0307192220	258	85
Copy of 17 P8 50.B07_0307192221	256	227
Copy of 17 P8 51.C07_0307192221	256	242
Copy of 17 P8 52.D07_0307192223	256	242
Copy of 17 P8 53.E07_0307192224	254	246

Copy of 17 P8 54.F07_0307192224	253	247
Copy of 17 P8 55.G07_0307192225	270	245
Copy of 17 P8 56.H07_0307192226	257	251
Copy of 17 P8 57.A08_0307192228	270	105
Copy of 17 P8 58.B08_0307192228	264	74
Copy of 17 P8 59.C08_0307192229	255	242
Copy of 17 P8 6.F01_030719222A	255	212
Copy of 17 P8 60.D08_030719222B	256	226
Copy of 17 P8 61.E08_030719222C	258	242
Copy of 17 P8 62.F08_030719222D	256	242
Copy of 17 P8 63.G08_030719222E	255	245
Copy of 17 P8 64.H08_030719222F	255	253
Copy of 17 P8 65.A09_030719222G	271	243
Copy of 17 P8 66.B09_030719222H	256	242
Copy of 17 P8 67.C09_030719222I	270	256
Copy of 17 P8 68.D09_030719222J	257	247
Copy of 17 P8 69.E09_030719222K	268	256
Copy of 17 P8 7.G01_030719222L	283	54
Copy of 17 P8 70.F09_030719222N	269	256
Copy of 17 P8 71.G09_030719222O	270	242
Copy of 17 P8 72.H09_030719222P	257	242
Copy of 17 P8 73.A10_030719222Q	267	243
Copy of 17 P8 74.B10_030719222Q	270	256
Copy of 17 P8 75.C10_030719222S	267	243
Copy of 17 P8 76.D10_030719222T	265	254
Copy of 17 P8 77.E10_030719222U	269	256
Copy of 17 P8 78.F10_030719222U	308	89
Copy of 17 P8 79.G10_030719222W	272	159
Copy of 17 P8 8.H01_030719222X	0	0
Copy of 17 P8 80.H10_030719222Y	323	33
Copy of 17 P8 81.A11_030719222Y	255	247
Copy of 17 P8 82.B11_030719222Z	0	0
Copy of 17 P8 83.C11_0307192230	0	0
Copy of 17 P8 84.D11_0307192230	319	96
Copy of 17 P8 85.E11_0307192232	0	0
Copy of 17 P8 86.F11_0307192232	266	257
Copy of 17 P8 87.G11_0307192233	0	0
Copy of 17 P8 88.H11_0307192234	274	74
Copy of 17 P8 89.A12_0307192235	293	9
Copy of 17 P8 9.A02_0307192236	256	242
Copy of 17 P8 90.B12_0307192237	271	257
Copy of 17 P8 91.C12_0307192238	225	1
Copy of 17 P8 92.D12_0307192238	202	1
Copy of 17 P8 93.E12_0307192239	182	1
Copy of 17 P8 94.F12_0307192239	139	3

Tab. 5: Sequenzanalyse und „Quality based Trimming“ der Probe 1994-17 (P8)

Durch das Trimmen sind von 93 analysierten Klonen letztlich 64 Klone für die Mutationsanalyse verblieben. Diese Sequenzen wurden in das Programm Sequencher

importiert und ein multiples Alignment erstellt. Da die Klonierung der Fragmente ungerichtet ist, wird im Alignment ein Teil der Sequenzen revers komplementär dargestellt.

Im folgenden ist ein Ausschnitt aus diesem multiplen Alignment gezeigt. Die Mutation in diesem Ausschnitt ist eine Basensubstitution von A nach G. Das Alignment wurde hier revers komplementär zu der in Abb. 11 gezeigten Sequenz erstellt. Das Programm nimmt die häufiger vorkommende Sequenz als „Mastersequenz“. Diese Mutation entspricht somit einem T nach C Austausch an Position 80.

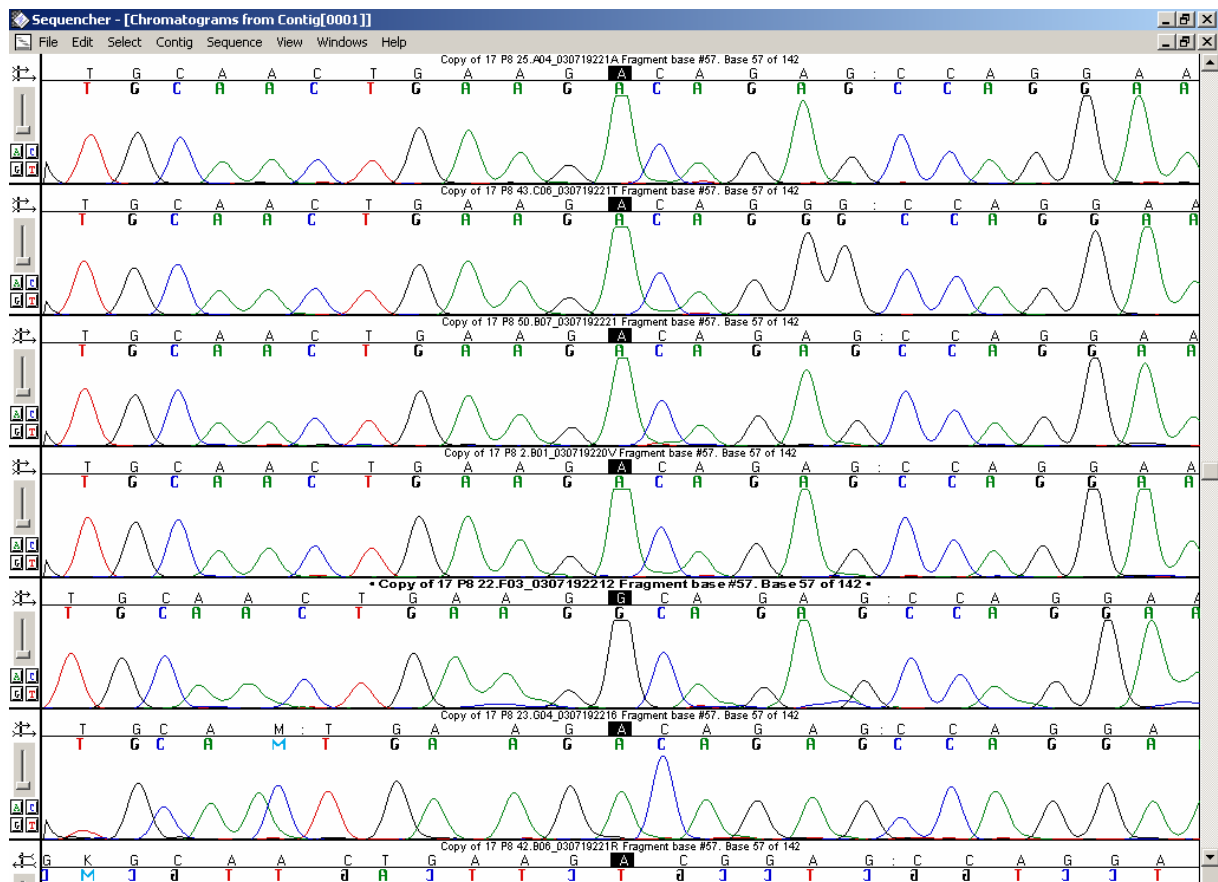


Abb. 12: Ausschnitt aus dem multiplen Alignment der Probe 1994-17 (P8) mit dem Programm Sequencher.

In Tabelle 6 sind alle in der DNA 17 (P8) gefundenen Mutationen gezeigt. Die Basensubstitutionen T nach C und A nach G sind schattiert (siehe Diskussion).

Position	Basenaustausch
58	C nach T
67	G nach A
76	T nach C
78	T nach C
80	T nach C
84	C nach T
88	T nach C
91	A nach G
104	G nach A
106	T nach C
112	A nach G

Tabelle 6: Sequenzanalyse der Zelllinie 1994-17 (P8); die gefundenen Mutationen und Position dieser Mutationen in dem analysierten DNA-Fragment sind angegeben.

In Abbildung 13 ist ein Sequenzbeispiel gezeigt. Die Sequenz von Klon 2 der Probe 1994-17 (P8) weist in diesem Fall keine Mutation auf. Die gezeigte Sequenz ist revers komplementär zu der in der Datenbank unter der Kenn-Nummer Z 83073 zu findenden Sequenz. Über dem Elektropherogramm der Sequenz sind nur die 134 Basen, die der amplifizierten Sequenz entsprechen, mit Buchstaben gekennzeichnet. Die vollständige Identität dieser Sequenz mit der Datenbanksequenz verdeutlicht das in Abbildung 14 gezeigte Alignment mit der Sequenz des betreffenden Genomabschnittes.

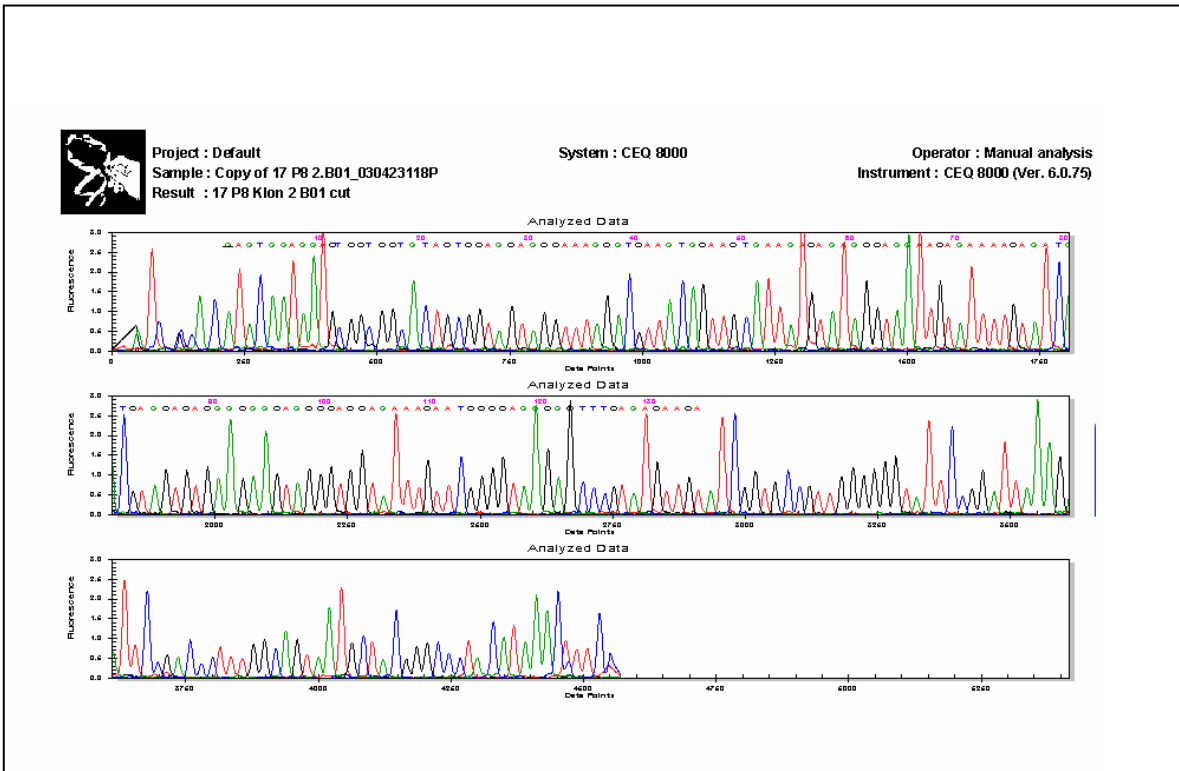


Abb. 13: Sequenz des Klons 2 der DNA-Probe 1994-17 (P8).

H.sapiens Fanconi anaemia group A gene, exons 9 and 10; Length = 770
 Score = 266 bits (134), Expect = 8e-69 Identities = 134/134 (100%) ; Strand = Plus / Minus

```

Query: 1  gagtggaggactcctcctgtactccagcagccaaagcgtcaagtgcaactgaagacagag 60
      |||
Sbjct: 688 gagtggaggactcctcctgtactccagcagccaaagcgtcaagtgcaactgaagacagag 629

Query: 61  ccaggaacagaaaacagatgtcagcacacggcggcagcccaccagaaacaatccccaggc 120
      |||
Sbjct: 628 ccaggaacagaaaacagatgtcagcacacggcggcagcccaccagaaacaatccccaggc 569

Query: 121 gctttcagacaaca 134
      |||
Sbjct: 568 gctttcagacaaca 555
  
```

Abb. 14: Alignment des Klons 2 der DNA-Probe 1994-17 (P8) mit der genomischen Sequenz Z83073.

3. 4. 3. 2. Mutationen in der Fanconi-Zelllinie 1994-38, Passage 9

In der Zelllinie 1994-38, P9 sind von 158 Klonen Kolonie-PCRs durchgeführt worden. Nach dem Trimmen sind 129 Sequenzen als auswertbar verblieben.

Position	Basen- austausch	Insertion / Deletion
1	T nach C (2x)	
4	T nach C	
10	A nach G	
12	A nach G	
18	T nach A	
	T nach C	
19		del G
33	G nach A (2x)	
35	G nach A (2x)	del G
41	C nach T	
56	A nach G	
57	T nach C (2x)	
59	T nach C	
72	T nach C	
76	T nach C	
80	T nach C	
85	A nach G	
94	T nach C	
nach 95		ins T
98	G nach A	
112	A nach G	
120	A nach G	
127	C nach T	
128	T nach C	
133	T nach C	

Tabelle 7: Sequenzanalyse der Zelllinie 1994-38, P9; die gefundenen Mutationen und Position dieser Mutationen in dem analysierten DNA-Fragment sind angegeben.

In diesen 129 Sequenzen konnten 30 Mutationen gefunden werden (Tab. 7). Dabei waren 2 Deletionen von G und eine Insertion von T aufgetreten. Die weiteren Mutationen waren Basensubstitutionen: 13x mal T nach C, 6 mal A nach G (diese sind schattiert, siehe Diskussion), 5 mal G nach A, 2 mal C nach T und 1 mal T nach A.

In Tabelle 7 sind alle Mutationen mit ihren Positionen aufgelistet.

3. 4. 3. 3. Mutationen in der Kontroll-Zelllinie 1994-17, mit MMC kultiviert

In der Zelllinie 1994-17 konnten nach Kultivierung mit MMC 24 Klone ausgewertet werden. Hier sind durch das Trimmen mehr als 2/3 von ursprünglich 90 Kolonie-PCR Produkten der Klone als nicht auswertbar ausgeschlossen worden. Die Sequenzen zeigten in diesen Fällen über die gesamte Länge Überlagerungen. Bei den verbleibenden 24 Klonen wies ein Klon eine Sequenzabweichung zu der genomischen Sequenz auf. Hier lag ein Basenaustausch von T nach A an Position 72 vor.

3. 4. 3. 4. Mutationen in der Fanconi-Zelllinie 1994-38, mit MMC kultiviert

Bei der Analyse der Klone der Zelllinie 1994-38, kultiviert mit MMC, konnten von 112 Klonen 56 ausgewertet werden. Es konnten in diesem DNA-Pool nur 2 Mutationen gefunden werden: Eine Basensubstitution von A nach G an Position 91 und eine Insertion von G an Position 86.

3. 4. 3. 5. Mutationen in der Fanconi-Zelllinie 1994-38 (T0)

Aus diesem DNA-Pool wurden 80 Kolonie-PCR Produkte generiert. Nach dem Trimmen verblieben 59 analysierbare Klone. In Tabelle 8 sind die gefundenen 12 Mutationen gezeigt.

Position	Basen- austausch	Insertion / Deletion
12	A nach G	
24	T nach C	
31	T nach C	
35	G nach A	
52	T nach C	
69	T nach C	
83	T nach C	
91	A nach G (2x)	
109	T nach G	
110		del G
133	T nach C	

Tabelle 8: Sequenzanalyse der Zelllinie 1994-38, P0; die gefundenen Mutationen und Position dieser Mutationen in dem analysierten DNA-Fragment sind angegeben.

Auch für diesen DNA-Pool ist exemplarisch ein Ausschnitt aus dem multiplen Alignment im Programm Sequencher gezeigt (Abb.15). Hier ist die Basensubstitution G nach A an Position 35 dargestellt. Das Ausgangsprodukt der DNA-Sequenzierung war das von Klon 63 erhaltene PCR-Fragment.

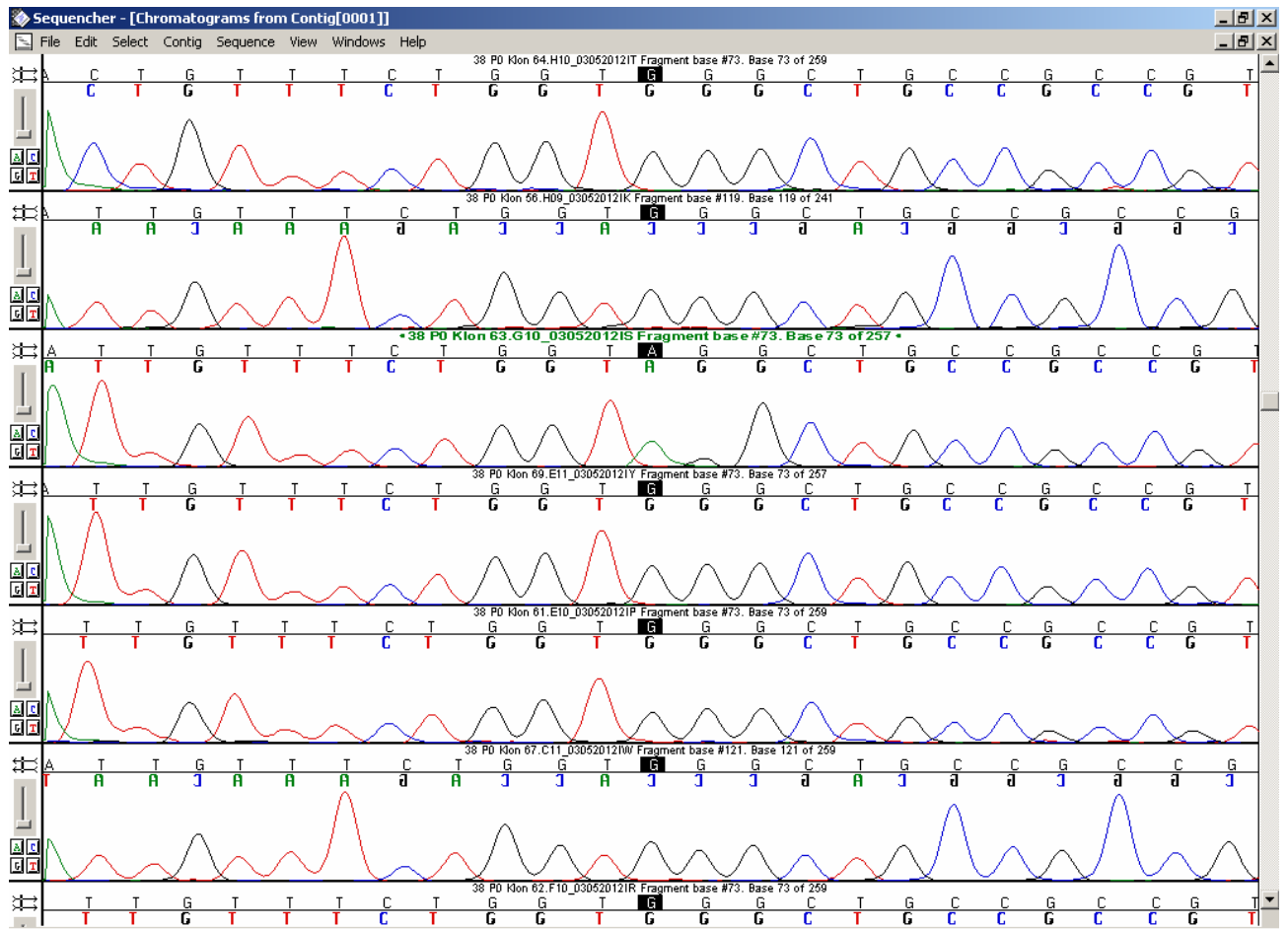


Abb. 14: Ausschnitt aus dem multiplen Alignment der Probe 1994-38 (P0) mit dem Programm Sequencher.

4. Diskussion

Die in dieser Arbeit durchgeführte Zellkultivierung der Zelllinien 1994-17 und 1994-38 zeigten phänotypisch das bei der Zellalterung zu erwartende Ergebnis: Mit Zunahme der Zellpassagen verlängerte sich die für eine Zellteilung benötigte Zeit.

Das Zellwachstum der Linie 1994-17 zeigte bei der ersten Passage eine drastische Verringerung der Zellzahl (siehe Abb. 1). Auch in der Wachstumskurve der Zelllinie 1994-38 ist der Verlauf nicht stetig absinkend (siehe Abb. 2).

Die Ursache dafür könnte in einer nicht vollständigen Homogenisierung der Zellen bei der Passagierung sein. Dennoch zeigen beide Wachstumskurven den erwarteten Verlauf einer stetigen Verringerung der Zellen/Flasche. Dies zeigt, dass die Alterung der Zellen erfolgreich war.

Die Behandlung der Zellen mit der alkylierenden Substanz MMC führte auch zu dem erwarteten Ergebnis: Die Zellverdopplungszahl beider Zelllinien war deutlich niedriger als die der unbehandelten Zellen, die Zelllinie 1994-38 (Fanconi-Zelllinie) ließ sich nur einmal passagieren, die Zellverdopplungszahlen unterschieden sich hier deutlich: 2,9 für die FA-Zelllinie und 8,1 für die Zelllinie 1994-17.

Damit stand das geeignete Ausgangsmaterial für die sich anschließende Mutationsanalyse zur Verfügung. DNA wurde aus den so kultivierten Zellen gewonnen und ein spezifischer Ausschnitt aus dem FANCA Gen wurde amplifiziert. Dieser Genomabschnitt sollte dann auf Mutationen analysiert werden, die durch den Alterungsprozeß in den Zellen verursacht wurden. Ausgewählt wurde dabei ein Genomabschnitt um das Exon 10 des FANCA Gens. Hier finden sich repetitive Sequenzbereiche und weitere „hot-spots“ für die Mutationsentstehung (Gross, 2003). Sowohl krankheitsverursachende Mutationen als auch Reversionen dieser Mutationen sind für diesen Abschnitt des FANCA Gens beschrieben (Gross et al., 2002).

Die „Mutationstheorie“ des Alterns stützt sich auf die These, dass die Akkumulierung somatischer Mutationen mit zunehmender Anzahl an Zellteilungen als Ursache des Alterns

anzusehen ist (Rubin, 2002). Solche Mutationen sind „ungerichtet“ und sollten sich vor allem an den sgn. „hot-spots“ häufen.

FA zeichnet sich durch eine erhöhte genomische Instabilität aus. Unabhängig davon, ob dies ein primärer Effekt des in FA mutierten Gens oder ein sekundärer Effekt dieser Erkrankung ist, kommt es vermehrt zu Mutationen. Dies bedingt dann aber auch, dass die Möglichkeit der Entstehung einer Reversion durch den Mechanismus der Rückmutation erhöht wird. Da solche Mutationen jedoch prinzipiell ungerichtet sind, sollte sich diese Mutabilität auch mit anderen Methoden zeigen lassen.

In dieser Arbeit sollten klonale Fragmente des FANCA Gens auf Mutationen untersucht werden, und ein möglicher Zusammenhang mit der Anzahl an Zellteilungen gefunden werden.

Dafür wurden 6 DNA-Populationen isoliert:

Zu Beginn der Passagierung wurde DNA aus den Fibroblasten isoliert und als 1994-17-(P0) bzw. 1994-38-(P0) bezeichnet. Nach der 8. (P8) bzw. 9. (P9) Passage wurde wieder DNA isoliert. Diese DNAs entsprachen dem „gealterten“ DNA-Pool.

Weiterhin wurden beide Zelllinien unter Zusatz von MMC kultiviert und daran anschließend die DNA gewonnen (1994-17 MMC bzw. 1994-38 MMC).

Diese DNA diente als Matrize für die selektive Amplifizierung eines FANCA-Abschnittes, der dann in den Vektor pTOPO kloniert wurde (siehe 2. 2. 2., verwendete Kits). Die erhaltenen Klone dienten als Matrize für die Kolonie-PCR.

Die Kolonie-PCR führte in mehr als 95% aller Ansätze zu einem im Agarosegel homogenen PCR-Produkt der gewünschten Größe. Dennoch konnten von den so erhaltenen PCR-Produkten nur ein Teil erfolgreich sequenziert werden. Tabelle 9 zeigt dafür einen Überblick:

Template-DNA	Kolonie-PCR-Ansätze	Auswertbare Sequenzierreaktionen
1994-38 P0	80	59
1994-17 P8	94	64
1994-38 P9	158	129
1994-17 +MMC	90	24
1994-38 +MMC	112	59

Tabelle 9: Anzahl an Kolonie-PCRs und auswertbaren Sequenzierreaktionen

Der Grund dafür lag in den für die Kolonie-PCR verwendeten Agarplatten mit den Klonen der entsprechenden Klonierungsansätze: Teilweise waren die Klone auf der Platte nicht gut separiert, die PCR wurde so mit einem „Mischklon“ durchgeführt, was in der sich anschließenden Sequenzierreaktion zu Sequenzüberlagerungen führte. Diese Sequenzreaktionen sind nicht in die Mutationsanalysen eingegangen. Die automatische Auswertung unter der Option „Quality Based Trimming“ der Stufe „High“ führt in diesen Fällen zu nur geringen Sequenzbereichen mit hinreichend hoher Qualität oder sogar zur völligen Verhinderung der Sequenzauswertung durch das Programm (siehe dazu Tabelle 5). Diese schlechte Trennung der Einzelklone war vor allem in den Klonierungsansätzen unter Verwendung der nach MMC Behandlung isolierten DNAs als Template für die PCR zu beobachten.

Zahlreiche Mutationen wurden gefunden (siehe dazu Tabellen 6, 7 und 8). Auffallend dabei war eine Überräpresentation der Basensubstitution T nach C (oder revers komplementär A nach G). Solche Mutationen sind in den Tabellen zur Verdeutlichung schattiert. Bei dieser Art der Mutation handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um einen Fehler, der durch die Amplifizierung mit der *Taq*-Polymerase eingeführt wurde. Für diese Polymerase ist bekannt, dass ein C-T Mismatch am 3'-Ende der DNA mit viel höherer Effizienz verlängert wird als jede andere Mismatch-Kombination (Huang et al., 1992), diese Art der Mutation tritt damit bei der DNA-Amplifizierung gehäuft auf. Von Yoshida und Mitarbeitern (2001) konnte gezeigt werden, dass ein Aminosäureaustausch in der *Taq*-Polymerase (Arg660Ser) diese Tendenz der Polymerase, C-T Mismatches zu verlängern, drastisch reduziert.

Darüber hinaus zeichnet sich die *Taq*-Polymerase durch eine höhere Fehlerrate als andere, aus thermophilen Organismen gewonnenen, Polymerasen aus (Koehavong und Thilly, 1989, Cline et al., 1996).

Eine vergleichende Mutationsanalyse viraler DNA führte bei der Verwendung der *Taq*-Polymerase zu deutlich mehr „Mutationen“, als ein vergleichbarer Ansatz unter Verwendung der *Pfu*-Polymerase. Die Fehlerrate unter Verwendung der *Taq*-Polymerase war dabei etwa 10 mal höher als die unter Verwendung der *Pfu*-Polymerase (Bracho et al., 1998).

Die Eignung der *Taq*-Polymerase für eine Mutationsanalyse ist nur dann gegeben, wenn eine hinreichende hohe Mutationsrate vorliegt, denn erst dann, wenn die zu detektierende Mutationsrate deutlich über der Fehlerrate der Polymerase liegt, sind signifikante Aussagen möglich. Die *Taq*-Polymerase ist hinsichtlich der Anforderungen an die Reaktionsbedingungen einfacher zu handhaben als die *Pfu*-Polymerase, daher wurde in der vorliegenden Arbeit die *Taq*-Polymerase eingesetzt. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen jedoch, dass die Mutationsraten deutlich geringer als die Fehlerrate der *Taq*-Polymerase sind, und daher eine Polymerase mit höherer Genauigkeit eingesetzt werden muß.

Dies kann unter Verwendung der in dieser Arbeit hergestellten DNA-Pools erfolgen.

Das Ausgangsmaterial und ein geeignetes Schema der Sequenzauswertung sind in dieser Arbeit erstellt worden. Von Clark und Whittam (1992) wird auch die große Bedeutung der Sequenzier-Qualität auf die zu treffenden Aussagen hervorgehoben. In dieser Arbeit konnte ein Schema entworfen werden, das sehr robust Sequenzierfehler eliminieren kann: Die Analyse unter Verwendung der Option „Quality based Trimming“ erlaubt die automatische Identifizierung „schlechter“ Sequenzen und den Ausschluß dieser Sequenzen von der weiteren Auswertung.

Weiterführende Arbeiten könnten unter Verwendung der vorliegenden DNA-Pools und des Auswerte-Schemas unter Verwendung der *Pfu*-Polymerase als Enzym für die Amplifizierung die Frage der somatischen Stabilität in „jungen“ und „alten“ Zellen und in FA-Zellen im Vergleich zu Kontroll-Zellen klären.

5. Zusammenfassung

Fanconi-Anämie gehört zu den sgn. Chromosomenbruch-Syndromen und zeichnet sich durch eine genomische Instabilität aus.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob durch einen Alterungsprozeß im Exon 10 des FANCA-Gens Mutationen entstehen. Dieser Abschnitt des Gens wurde herausgesucht, da dieser Genabschnitt als hypermutabler Bereich in der Literatur beschrieben ist.

Im Zuge der Zellalterung konnte gezeigt werden, dass sich die Wachstumsrate verringerte (siehe Tbl. 1 und 2 / Abb. 1 und 2).

Die Zellen, die mit MMC behandelt wurden, stellten das Wachstum nach 1-2 Zellpassagen ein.

Der Sequenzabschnitt aus FANCA wurde aus isolierter DNA der Zellen amplifiziert und im PCR-TOPO TA kloniert. Die erhaltenen Klone wurden sequenziert. Die Sequenzanalysen ergaben als häufigste Basensubstitution einen T nach C Austausch oder revers komplementär einen Austausch von A nach G. Dies kann als PCR-Artefakt gesehen werden, der begründet liegt in einem Fehler der Taq-Polymerase. Tendenziell konnten Unterschiede der detektierten Mutation in verschiedenen Zelllinien entdeckt werden. Die hohe Fehlerrate der Taq-Polymerase bedingt, dass die erhaltenen Unterschiede nicht signifikant sind.

Für die Amplifizierung des Genomabschnittes aus dem FANCA-Gen sollte eine Polymerase verwendet werden, die eine höhere Genauigkeit als die Taq-Polymerase aufweist, wie z. B. die Pfu-Polymerase. Hierfür liegen die isolierten DNAs der unterschiedlichen Zelllinien zu unterschiedlichen Zeiten der Zellalterung vor.

Literaturverzeichnis:

Ahmad S. I., Hanaoka F., Kirk S. H.; **Molecular biology of Fanconi anaemia--an old problem, a new insight.** *BioEssay* 24: 439-448 (2002).

Bracho, M., Moya, A., Barrio, E.; **Contribution of Taq polymerase-induced errors to the estimation of RNA virus diversity.** *Journal of General Virology*, 79: 2921-28 (1998).

Clark, A. G., Whittam, T. S.; **Sequencing errors and molecular evolutionary analysis.** *Molecular Biology and Evolution*, 9: 744-752 (1992).

Cline, J., Braman, J. C., Hogrefe, H. H.; **PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases.** *Nucleic Acids Research*, 24: 3546-51 (1996).

Digweed M., Sperling K.; **Molecular analysis of Fanconi anaemia.** *Bioessays*. 18:579-85. (1996).

Gregory JJ Jr, Wagner JE, Verlander PC, Levran O, Batish SD, Eide CR, Steffenhagen A, Hirsch B, Auerbach AD. **Somatic mosaicism in Fanconi anemia: evidence of genotypic reversion in lymphohematopoietic stem cells.** *Proceedings of the National Academy of Science U S A.* 27; 98:2532-7. (2001).

Gross, M.; Fanconi Anämie, **Mutationsanalyse in den Fanconi Anämie-Genen unter besonderer Berücksichtigung von FANCA.** *Medizinische Genetik*, 2: 64-72 (2003).

Gross M.; Dissertation am Institut für Humangenetik der Universität Würzburg (2002a).

Gross M., Hanenberg H., Lobitz S., Friedl R., Herterich S., Dietrich R., Gruhn B., Schindler D., Hoehn H.; **Reverse mosaicism in Fanconi anemia: natural gene therapy via molecular self-correction.** *Cytogenetic and Genome Res.*; 98:126-35 (2002b).

Huang, M. M., Arnheim, N., Goodman, M. F.; **Extension of base mispairs by Taq DNA polymerase: implications for single nucleotide discrimination in PCR.** *Nucleic Acids Research*, 20: 4567-73 (1992).

Jung T.; Dissertation am Institut für Humangenetik der Universität Würzburg (2001).

Kalb R., Höhn H.; **Caretaker-Gene: Schutz vor exogener und endogener DNA-Schädigung.** Medizinische Genetik, 2: 11-16 (2003).

Kutler D. I., Singh B., Satagopan J., Batish S. D., Berwick M., Giampietro P. F., Hanenberg H., Auerbach A. D.; **A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR).** Blood, 101: 1249-56; (2002).

Koehavong P., Thilly, W. G.; **Fidelity of DNA polymerases in DNA amplification.** Proceedings of the National Academy of Science U S A, 86: 9253-7 (1989).

Liebetrau W., Runger T.M., Mehling B.E., Poot M., Hoehn H.; **Mutagenic activity of ambient oxygen and mitomycin C in Fanconi's anaemia cells.** Mutagenesis. Mar;12(2):69-77 (1997).

Murken J., Murken H.; **Humangenetik**, Ferdinand Enke Verlag Stuttgart (1996)

Pagano G.; **Mitomycin C and diepoxybutane action mechanisms and FANCC protein functions: further insights into the role for oxidative stress in Fanconi's anaemia phenotype.** Carcinogenesis 21:1067-8 (2000).

Passarge E.; **Taschenatlas der Genetik.** Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York (1994)

Rubin, H.; **The disparity between human cell senescence in vitro and lifelong replication in vivo.** Nature Biotechnology, 20, 775-81 (2002)

Schindler D., Friedl, R., Güthle, G., Gross, M., Kalb, R., Sobeck, A., Ebell, W., Schneider, H., Hanenberg, H., Höhn, H.; **Zellzyklus-Diagnostik bei Fanconi-Anämie.** Medizinische Genetik, 2: 45-54 (2003)

Tischkowitz M. D. , Hodgson S.V. ; **Fanconi anaemia.** Journal of Medical Genetics 40:1-10. (2003)

Waisfisz Q., Morgan N.V., Savino M., de Winter J.P., van Berkel C.G., Hoatlin M.E., Ianzano L., Gibson R.A., Arwert F., Savoia A., Mathew C.G., Pronk J.C., Joenje H.; **Spontaneous functional correction of homozygous fanconi anaemia alleles reveals novel mechanistic basis for reverse mosaicism.** *Nature Genetics*, 22:379-83 (1999).

Yoshida, K., Tosaka, A., Kamiya, H., Murate, T., Kasai, H., Nimura, Y., Ogawa, M., Yoshida, S., Suzuki, M; **Arg660Ser mutation in *Thermus aquaticus* DNA polymerase I suppresses T-->C transitions: implication of wobble base pair formation at the nucleotide incorporation step.** *Nucleic Acids Research*, 29: 4206-14 (2001).

Youssoufian H., Pyeritz R. E.; **Mechanisms and consequences of somatic mosaicism in humans.** *Nature Reviews*, 3: 748-58 (2002).

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. H. Höhn für die Überlassung des Themas, sein großes Interesse am Fortgang der Arbeit und seine steten Ermutigungen.

Ich danke Prof. Dr. T. Grimm für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Priv.-Doz. Dr. D. Schindler danke ich für die Überlassung der Fibroblasten (1994-17: fragiles X-Syndrom und 1994-38: Fanconi Anämie, Komplementationsgruppe FA-G)

Ganz besonders herzlich danken möchte ich Frau Dr. S. Herterich für die engagierte Betreuung dieser Arbeit, ihrer Hilfsbereitschaft in allen Fragen und ihrer tatkräftigen Unterstützung. Außerdem danke ich ihr für die Nutzung des CEQ-Sequenzierers.

Bedanken möchte ich mich auch besonders bei Frau A. Hörning für die Anleitung der Kultivierung der Fibroblasten und ihre Ermunterungen.

In den vielen Labors, in denen ich arbeitete, danke ich den Leuten für die angenehme Zusammenarbeit.

Meinem Bruder Kilian danke ich für die Korrekturlesung und seine Unterstützung.

LEBENS LAUF

Name: Cornelia F a c h

Anschrift: Quellenweg 3
83071 Stephanskirchen
Tel: 08036/1573

Geburtsdatum: 22.06.1976

Geburtsort: München

Eltern: Dr. med. Eva-Maria Fach,
geb. Schneider,
Diabetologin DDG

Dr. med. Aldo Fach
Internist mit
Schwerpunkt Gastroenterologie

Schulbildung:

1983 bis 1987 Grundschole in Stephanskirchen

1987 bis 1996 Ignaz-Günther Gymnasium in
Rosenheim, Abschluß mit Abitur

Hochschulbildung:

Mai 1997 bis Juni 2002 Studium der Zahnmedizin an der
Universität Würzburg,
Abschluß mit dem Examen

Berufstätigkeit:

seit Juni 2003 Kinderzahnheilpraxis in München-Pasing
als Vorbereitungsassistentin

Würzburg, 23.02.2004

Cornelia Fach