Anreicherung und Charakterisierung von Sequenzvariationen in niedriger Konzentration am Beispiel der dritten variablen Region im gp120-Gen des humanen Immundefizienz-Virus

 $I\!\!N \texttt{A} \texttt{U} \texttt{G} \texttt{U} \texttt{R} \texttt{A} \texttt{L} \text{-} D\!\!I \texttt{S} \texttt{S} \texttt{E} \texttt{R} \texttt{T} \texttt{A} \texttt{T} \texttt{I} \texttt{O} \texttt{N}$

zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

> vorgelegt von Michael Wulfert aus Düsseldorf

> > Düsseldorf 2001

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent:

Prof. Dr. rer. nat. Detlev Riesner

Korreferentin: Prof. Dr. med. Gabriele Arendt

Tag der mündlichen Prüfung:30. November 2001

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Detlev Riesner, unter dessen Leitung diese Arbeit angefertigt wurde. Seine stete Diskussionsbereitschaft, seine vielfältigen Anregungen und seine Geduld haben sehr zum Gelingen beigetragen.

Ebenso möchte ich Frau Prof. Dr. Gabriele Arendt für die Ermöglichung dieser Arbeit danken. Durch ihre Kooperation wurde mir ein interessanter Einblick in die klinische Bedeutung der Grundlagenforschung möglich.

Herrn Beckmann und der Werkstatt der Biologie danke ich für die Unterstützung beim Bau der kleinen TGGE-Anlage.

Dr. Ulrich Wiese und Dr. Andreas Fels danke ich für die vielfältigen Diskussionen und Hilfestellungen im Laboralltag, die manche "Durststrecke" überwinden halfen.

Herrn Bernd Esters danke ich für die Klonierung der Plasmide pMWE-1 bis pMWE-60 sowie für viele praktische Tips.

Herrn Dr. Gerhard Steger und allen anderen Rechner-Leuten danke ich für ihre stetige Unterstützung und Hilfe bei der Nutzung diverser Computer.

Allen interessierten Mitgliedern des Institutes für Physikalische Biologie möchte ich für viele anregende Diskussionen danken.

Meinem Patenonkel, Reiner W. Wulfert, danke ich für die abschließende kritische Durchsicht des Manuskriptes. Ihm ist es zu verdanken, wenn Orthographie und Stil dieser Arbeit der deutschen Sprache nahekommen.

Schließlich gilt mein Dank meiner ehemaligen Biologielehrerin, Frau U. Eisel. Ihr hervorragender Unterricht hat mein Interesse an biologischen Fragestellungen geweckt und mich veranlaßt, über den Horizont der Physik hinaus zu blicken.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Die Desoxyribonukleinsäure (DNA)	9
1.1.1	Aufbau der DNA	9
1.1.2	Die Bedeutung von Mutationsanalysen in Biologie und Medizin	10
1.2	Die Temperaturgradienten-Gelelektrophorese (TGGE)	11
1.3	Untersuchungen von DNA in der TGGE	12
1.4	Mutationsscreening mit PCR und TGGE	13
1.4.1	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	13
1.4.2	Mutationsscreening mit der TGGE	14
1.4.5	Mutationen in geringen Kongentrationen	10
1.5 1.5 1	Vorkommen von Mutationen in geringen Konzentrationen	10
1.5.1	Analyse von Mutationen in geringen Konzentrationen	10
1.6	Genetische Variabilität von HIV	18
1.7	Problemstellung	20
1.7.1	Biologisches Fragestellung	20
1.7.2	Instrumentelle Anforderungen	20
2	Materialien	21
2.1	Chemikalien	21
2.2	Enzyme	22
2.2.1	DNA-Polymerasen	22
2.2.2	Restriktionsenzyme	22
2.2.3	Weitere Enzyme	22
2.3	Lösungen	22
2.3.1	Putter TELT	22
2.3.1.1	TELI Tris-HCl	22
2.3.1.2	TE	23
2.3.1.4	TES	23
2.3.1.5	TAE	23
2.3.1.6	Na-TAE	23
2.3.1.7	RNA-Elutionspuffer	24
2.3.2	Gellosungen A omlandid Piez omlandid (20:1)	24
2.3.2.1	Gellösungen	24 24
2.3.3	Sonstige	24
2.3.3.1	LB-Medium	24
2.4	Nukleinsäuren	25
2.4.1	Primer	25
2.4.2	Plasmide	28
2.4.2.1	Marker-DNA	28

 2.5 TGGEs 2.6 Computeralgorithmen 3 Methoden 3.1 Sicherheitsvorkehrungen 3.1 Ligation 3.2 Transformation 3.2 Transformation 3.3 Anzucht von Escherichia coli 3.4 Aufreinigung von Nukleinsäuren 3.1.1 Schnellpräparation von Plasmiden 3.1.2 Aufreinigung von Plasmiden 3.3.1.3 Schnellpräparation von Plasmiden 3.3.1.4 Mufreinigung von Plasmiden 3.3.1.5 Aufreinigung von Plasmiden 3.3.1.4 Varieningung von Plasmiden 3.3.1.5 Aufreinigung von Plasmiden 3.3.2 Aufreinigung von DNA nach enzymatischen Reaktionen 3.3.2.1 Phenol-Chloroform-Extraktion 3.3.2.2 Aufreinigung von DNA über Silikagel-Säulchen 3.3.2.3 Ethanolfällung von DNA 3.3.4 Isopropanolfällung von DNA 3.3.5 Gewinnung von HIV-RNA aus Serum und Liquor 3.4 DNA-Oligonukleotide 	30 30 31 31
 2.6 Computeralgorithmen 3 Methoden 3.1 Sicherheitsvorkehrungen 3.2 Klonierung von PCR-Produkten 3.2 Ligation 3.2.1 Ligation 3.2.2 Transformation 3.2.3 Anzucht von Escherichia coli 3.3 Aufreinigung von Nukleinsäuren 3.3.1 Aufreinigung von Plasmiden 3.3.1.1 Schnellpräparation von Plasmiden 3.3.2 Aufreinigung von DNA nach enzymatischen Reaktionen 3.3.2 Aufreinigung von DNA nach enzymatischen Reaktionen 3.3.2 Aufreinigung von DNA nach enzymatischen Reaktionen 3.3.2 Aufreinigung von DNA über Silikagel-Säulchen 3.3.2 Ethanolfällung von DNA 3.3.3 Gewinnung von HIV-RNA aus Serum und Liquor 3.4 DNA-Oligonukleotide 	30 31 31
 Methoden Sicherheitsvorkehrungen Klonierung von PCR-Produkten Ligation Transformation Transformation Anzucht von Escherichia coli Aufreinigung von Nukleinsäuren Aufreinigung von Plasmiden Aufreinigung von Plasmiden Schnellpräparation von Plasmiden Aufreinigung von DNA nach enzymatischen Reaktionen Aufreinigung von DNA über Silikagel-Säulen Aufreinigung von DNA über Silikagel-Säulchen Ethanolfällung von DNA Gewinnung von HIV-RNA aus Serum und Liquor DNA- Oligonukleotide 	31 31
3.1Sicherheitsvorkehrungen3.2Klonierung von PCR-Produkten3.2.1Ligation3.2.2Transformation3.2.3Anzucht von Escherichia coli3.3Aufreinigung von Nukleinsäuren3.3.1Aufreinigung von Plasmiden3.3.1.1Schnellpräparation von Plasmiden3.3.2Aufreinigung von Plasmiden über Silikagel-Säulen3.3.2.1Phenol-Chloroform-Extraktion3.3.2.2Aufreinigung von DNA nach enzymatischen Reaktionen3.3.2.3Ethanolfällung von DNA3.3.2.4Isopropanolfällung von DNA3.3.3Gewinnung von HIV-RNA aus Serum und Liquor3.4DNA- Oligonukleotide	31
3.2Klonierung von PCR-Produkten3.2.1Ligation3.2.2Transformation3.2.3Anzucht von Escherichia coli3.3Aufreinigung von Nukleinsäuren3.3.1Aufreinigung von Plasmiden3.3.1.1Schnellpräparation von Plasmiden3.3.2Aufreinigung von Plasmiden über Silikagel-Säulen3.3.2Aufreinigung von DNA nach enzymatischen Reaktionen3.3.2.1Phenol-Chloroform-Extraktion3.3.2.2Aufreinigung von DNA über Silikagel-Säulchen3.3.2.3Ethanolfällung von DNA3.3.2.4Isopropanolfällung von DNA3.3.3Gewinnung von HIV-RNA aus Serum und Liquor3.4DNA- Oligonukleotide	
 3.2.1 Ligation 3.2.2 Transformation 3.2.3 Anzucht von Escherichia coli 3.3 Aufreinigung von Nukleinsäuren 3.3.1 Aufreinigung von Plasmiden 3.3.1.1 Schnellpräparation von Plasmiden 3.3.1.2 Aufreinigung von Plasmiden über Silikagel-Säulen 3.3.2 Aufreinigung von DNA nach enzymatischen Reaktionen 3.3.2.1 Phenol-Chloroform-Extraktion 3.3.2.2 Aufreinigung von DNA über Silikagel-Säulchen 3.3.2.3 Ethanolfällung von DNA 3.3.2.4 Isopropanolfällung von DNA 3.3.3 Gewinnung von HIV-RNA aus Serum und Liquor 3.4 DNA- Oligonukleotide 	31
 3.2.2 Transformation 3.2.3 Anzucht von Escherichia coli 3.3 Aufreinigung von Nukleinsäuren 3.3.1 Aufreinigung von Plasmiden 3.3.1.1 Schnellpräparation von Plasmiden 3.3.1.2 Aufreinigung von Plasmiden über Silikagel-Säulen 3.3.2 Aufreinigung von DNA nach enzymatischen Reaktionen 3.3.2.1 Phenol-Chloroform-Extraktion 3.3.2.2 Aufreinigung von DNA über Silikagel-Säulchen 3.3.2.3 Ethanolfällung von DNA 3.3.2.4 Isopropanolfällung von DNA 3.3.3 Gewinnung von HIV-RNA aus Serum und Liquor 3.4 DNA- Oligonukleotide 	31
 3.2.3 Anzucht von Escherichia coli 3.3 Aufreinigung von Nukleinsäuren 3.3.1 Aufreinigung von Plasmiden 3.3.1.1 Schnellpräparation von Plasmiden 3.3.1.2 Aufreinigung von Plasmiden über Silikagel-Säulen 3.3.2 Aufreinigung von DNA nach enzymatischen Reaktionen 3.3.2.1 Phenol-Chloroform-Extraktion 3.3.2.2 Aufreinigung von DNA über Silikagel-Säulchen 3.3.2.3 Ethanolfällung von DNA 3.3.4 Isopropanolfällung von DNA 3.4 DNA- Oligonukleotide 	32
 3.3 Aufreinigung von Nukleinsäuren 3.3.1 Aufreinigung von Plasmiden 3.3.1.1 Schnellpräparation von Plasmiden 3.3.1.2 Aufreinigung von Plasmiden über Silikagel-Säulen 3.3.2 Aufreinigung von DNA nach enzymatischen Reaktionen 3.3.2.1 Phenol-Chloroform-Extraktion 3.3.2.2 Aufreinigung von DNA über Silikagel-Säulchen 3.3.2.3 Ethanolfällung von DNA 3.3.4 Isopropanolfällung von DNA 3.3 3.3 3.4 DNA- Oligonukleotide 	32
 3.3.1 Aufreinigung von Plasmiden 3.3.1.1 Schnellpräparation von Plasmiden 3.3.1.2 Aufreinigung von Plasmiden über Silikagel-Säulen 3.3.2 Aufreinigung von DNA nach enzymatischen Reaktionen 3.3.2.1 Phenol-Chloroform-Extraktion 3.3.2.2 Aufreinigung von DNA über Silikagel-Säulchen 3.3.2.3 Ethanolfällung von DNA 3.3.2.4 Isopropanolfällung von DNA 3.3.3 Gewinnung von HIV-RNA aus Serum und Liquor 3.4 DNA- Oligonukleotide 	32
 3.3.1.1 Schnellpräparation von Plasmiden 3.3.1.2 Aufreinigung von Plasmiden über Silikagel-Säulen 3.3.2 Aufreinigung von DNA nach enzymatischen Reaktionen 3.3.2.1 Phenol-Chloroform-Extraktion 3.3.2.2 Aufreinigung von DNA über Silikagel-Säulchen 3.3.2.3 Ethanolfällung von DNA 3.3.2.4 Isopropanolfällung von DNA 3.3.3 Gewinnung von HIV-RNA aus Serum und Liquor 3.4 DNA- Oligonukleotide 	32
 3.3.1.2 Aufreinigung von Plasmiden über Stilkägel-Säulen 3.3.2 Aufreinigung von DNA nach enzymatischen Reaktionen 3.3.2.1 Phenol-Chloroform-Extraktion 3.3.2.2 Aufreinigung von DNA über Silikagel-Säulchen 3.3.2.3 Ethanolfällung von DNA 3.3.2.4 Isopropanolfällung von DNA 3.3.3 Gewinnung von HIV-RNA aus Serum und Liquor 3.4 DNA- Oligonukleotide 	32
 3.3.2 Autreningung von DNA nach enzymätischen Keaktionen 3.3.2.1 Phenol-Chloroform-Extraktion 3.3.2.2 Aufreinigung von DNA über Silikagel-Säulchen 3.3.2.3 Ethanolfällung von DNA 3.3.2.4 Isopropanolfällung von DNA 3.3.3 Gewinnung von HIV-RNA aus Serum und Liquor 3.4 DNA- Oligonukleotide 	33
 3.3.2.2 Aufreinigung von DNA über Silikagel-Säulchen 3.3.2.3 Ethanolfällung von DNA 3.3.2.4 Isopropanolfällung von DNA 3.3.3 Gewinnung von HIV-RNA aus Serum und Liquor 3.4 DNA- Oligonukleotide 	34
 3.3.2.3 Ethanolfällung von DNA 3.3.2.4 Isopropanolfällung von DNA 3.3.3 Gewinnung von HIV-RNA aus Serum und Liquor 3.4 DNA- Oligonukleotide 	35
 3.3.2.4 Isopropanolfällung von DNA 3.3.3 Gewinnung von HIV-RNA aus Serum und Liquor 3.4 DNA- Oligonukleotide 	35
3.3.3 Gewinnung von HIV-RNA aus Serum und Liquor3.4 DNA- Oligonukleotide	35
3.4 DNA- Oligonukleotide	36
	36
3.5 Enzymatische Reaktionen	37
3.5.1 Restriktionsendonuklease-Verdauung von DNA	37
3.5.2 In-vitro Transkription	37
3.5.3 Reverse Transkription (RT) und alkalische Hydrolyse	38
3.5.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	38
3.5.4.1 PCR mit Taq-Polymerase	40
3.5.4.2 PCR mit Pwo-Polymerase	40
3.5.4.3 geschachtelte PCK	41
3.5.4.5 DNA-Einzelstrang-Synthese	41
3.6 Physikalische Methoden	41
3.6.1 Hybridisierung von PCR-Produkten	41
3.6.2 UV-Bestrahlung von PCR-Produkten mit Psoralen-Primern	42
3.6.2.1 UV-Bestrahlung zur Verknüpfung von DNA-Strängen	42
3.6.2.2 Lösen der Psoralen-Verknüpfung	42
3.7 Gelelektrophoresen	43
3.7.1 Agarose-Gelelektrophoresen	43
3.7.2 Polyacrylamid-Gelelektrophoresen	43
3.7.2.1 Native Gelelektrophoresen	
3.7.2.2 Denaturierende Gelelektrophoresen	45

3.7.2.3	Temperaturgradienten-Gelelektrophoresen	46
3.7.2.4	D/R-TGGEs	46
3.7.2.5	Zeitliche TGGEs	46
3.7.3	Nachweis von Nukleinsäuren in Gelen	48
3.7.3.1	Ethidiumbromid-Färbung	48
3.7.3.2		48
3.8	Gelelutionen	49
3.8.1	Gelelution aus Agarosegelen durch Agaroseverdau	49
3.8.2	Gelelution aus Polyacrylamid-Gelen	49
3.8.2.1	Gelaufreinigung von RIVA-I ranskripten	50
3.8.2.2	Gelaufreinigung von DNA-Oligonukleotiden	50
3.0.2.3 2.0		51
3.9	Sequenzierungen	51
3.10	Computeralgorithmen	51
4	Ergebnisse	53
4.1	Entwicklung einer kleinen mit Peltier-Modulen betriebenen TGGE	53
4.1.1	Überlegungen zur Größe der neuen Gradientenplatte	53
4.1.2	Konstruktion der neuen TGGE-Anlage	55
4.1.3	Erster Einsatz der neuen TGGE-Anlage	57
4.2	Anreicherung von Mutationen in geringer Konzentration	59
4.2.1	Herstellung eines Sequenzstandards	59
4.2.2	Primer für die TGGE	61
4.2.2.1	Auswahl der Primer V3P1 und V3M1 für die TGGE-Analysen	61
4.2.2.2	Auswahl der Primer V3P4 und V3M4 für geschachtelte PCRs	61
4.2.2.3	Auswahl weiterer Primerpaare für größere Spezifität und Klonierungen	62
4.2.3	Berechnung der Nachweisbarkeit von Fehlpaarungen in der TGGE	62
4.2.3.1	Poland-Programm	62
4.2.3.2	Mismatch-Programm	64
4.2.4	G-C-Klammer oder Psoralen-Primer?	66
4.2.4.1	G-C-Klammer	66
4.2.4.2	Psoralen-Primer	00
4.2.4.5	Psoralen-Primer als chemische Markierung der Sonde	00 67
4.2.4.4	Auswani des Psordienprimers VSMIP	07 68
4.2.4.5	Herstellung einer Einzelstrang Sonde	60 60
4.2.5	TGGE mit denaturierendem Vorlauf (D/R-TGGE)	09 70
4261	Sonkrochte D/R-TGGF	70
4262	Parallele D/R-TGGE	73
4263	Zeitliche TGGE (tTGGE)	73
4.2.6.4	Vergleich der Auflösung von tTGGE und D/R-TGGE	75
4.2.6.5	Minimal nachweisbare Mutation: Mut180	76
4.2.7	PCR mit wenigen Ausgangsmolekülen ohne Verunreinigungen	77
4.2.8	Etablierung der Reamplifikation niedrig konzentrierter Mutationen	78
4.2.8.1	Variation einiger Parameter zur Optimierung der Reamplifikation	80
4.2.8.2	PCR mit Pwo-Polymerase	82

4.2.9	Replikationsgenauigkeit in der PCR	83
4.2.9.1	Berechnung der Replikationsgenauigkeit	84
4.2.9.2	Nanerungsjormein Bedeutung der PCR Fehler für den Hintergrund in der TGGF	07 88
4 2 10	Weitere Ontimierungen	88
4.2.10.1	Asymmetrische Hybridisierung	88
4.2.10.2	Lösen der kovalenten Verknüpfungen der Einzelstränge	91
4.2.10.3	Vermeidung der Sonden-Reamplifikation	93
4.2.11	Zusammenfassung der Methode	96
4.3	Untersuchung des Neurotropismus bei HIV	98
4.3.1	Probenauswahl (DNA oder RNA)	98
4.3.2	Etablierung der Probengewinnung	98
4.3.2.1	In-vitro-Transkripte zur Optimierung	99
4.3.2.2	Reverse Transkription	99
4.3.2.3	Aufreinigung von HIV-RNA aus Serum und Liquor	101
4.3.2.4	Alkalische Hydrolyse	101
4.3.2.5	Uberprüfung der gesamten Probenaufarbeitung	102
4.3.3	Autarbeitung und Untersuchung der ersten HIV-Proben	105
4.5.4	Vioniarung und Sequenziarungen	109
4.3.4.1	Reamplifikation and TGGE-Analysen	110
435	Sequenzvergleiche und Auswertung der Sequenzen	115
4351	Sequenzen von Patient 13498	115
4.3.5.2	Sequenzen von Patient 13751	117
5	Diskussion	119
5.1	Vorteile einer kleinen TGGE-Anlage	119
5.2	Die Analyse von Mutationen in geringer Konzentration	120
	v 88	120
5.2.1	Sequenzstandard	120
5.2.1 5.2.2	Sequenzstandard Die Etablierung der verschachtelten PCR	120 121 121
5.2.1 5.2.2 5.2.3	Sequenzstandard Die Etablierung der verschachtelten PCR G-C-Klammer versus Psoralenprimer	121 121 121 122
5.2.1 5.2.2 5.2.3 5.2.4	Sequenzstandard Die Etablierung der verschachtelten PCR G-C-Klammer versus Psoralenprimer Entwicklung der D/R-TGGE	120 121 121 122 123
5.2.1 5.2.2 5.2.3 5.2.4 5.2.5	Sequenzstandard Die Etablierung der verschachtelten PCR G-C-Klammer versus Psoralenprimer Entwicklung der D/R-TGGE Replikationsgenauigkeit der PCR	120 121 121 122 123 124
5.2.1 5.2.2 5.2.3 5.2.4 5.2.5 5.2.6	Sequenzstandard Die Etablierung der verschachtelten PCR G-C-Klammer versus Psoralenprimer Entwicklung der D/R-TGGE Replikationsgenauigkeit der PCR Verbesserungen der Reamplifikation	120 121 121 122 123 124 126
5.2.1 5.2.2 5.2.3 5.2.4 5.2.5 5.2.6 5.2.7	Sequenzstandard Die Etablierung der verschachtelten PCR G-C-Klammer versus Psoralenprimer Entwicklung der D/R-TGGE Replikationsgenauigkeit der PCR Verbesserungen der Reamplifikation Vergleich mit anderen Arbeiten und Techniken	120 121 121 122 123 124 126 127
5.2.1 5.2.2 5.2.3 5.2.4 5.2.5 5.2.6 5.2.7 5.3	Sequenzstandard Die Etablierung der verschachtelten PCR G-C-Klammer versus Psoralenprimer Entwicklung der D/R-TGGE Replikationsgenauigkeit der PCR Verbesserungen der Reamplifikation Vergleich mit anderen Arbeiten und Techniken Untersuchung des Sequenzspektrums im V3-Loop des HIV	120 121 121 122 123 124 126 127 128
5.2.1 5.2.2 5.2.3 5.2.4 5.2.5 5.2.6 5.2.7 5.3 5.3.1	Sequenzstandard Die Etablierung der verschachtelten PCR G-C-Klammer versus Psoralenprimer Entwicklung der D/R-TGGE Replikationsgenauigkeit der PCR Verbesserungen der Reamplifikation Vergleich mit anderen Arbeiten und Techniken Untersuchung des Sequenzspektrums im V3-Loop des HIV Eine ungewöhnliche Standardsequenz als Sonde	120 121 121 122 123 124 126 127 128 128
5.2.1 5.2.2 5.2.3 5.2.4 5.2.5 5.2.6 5.2.7 5.3 5.3.1 5.3.2	Sequenzstandard Die Etablierung der verschachtelten PCR G-C-Klammer versus Psoralenprimer Entwicklung der D/R-TGGE Replikationsgenauigkeit der PCR Verbesserungen der Reamplifikation Vergleich mit anderen Arbeiten und Techniken Untersuchung des Sequenzspektrums im V3-Loop des HIV Eine ungewöhnliche Standardsequenz als Sonde Sequenzanreicherung in der D/R-TGGE	120 121 121 122 123 124 126 127 128 128 128 128
5.2.1 5.2.2 5.2.3 5.2.4 5.2.5 5.2.6 5.2.7 5.3 5.3.1 5.3.2 5.3.3	Sequenzstandard Die Etablierung der verschachtelten PCR G-C-Klammer versus Psoralenprimer Entwicklung der D/R-TGGE Replikationsgenauigkeit der PCR Verbesserungen der Reamplifikation Vergleich mit anderen Arbeiten und Techniken Untersuchung des Sequenzspektrums im V3-Loop des HIV Eine ungewöhnliche Standardsequenz als Sonde Sequenzanreicherung in der D/R-TGGE Klonierung und Sequenzierung	120 121 121 122 123 124 126 127 128 128 128 128 129
5.2.1 5.2.2 5.2.3 5.2.4 5.2.5 5.2.6 5.2.7 5.3 5.3.1 5.3.2 5.3.3 5.3.4 5.3.2	Sequenzstandard Die Etablierung der verschachtelten PCR G-C-Klammer versus Psoralenprimer Entwicklung der D/R-TGGE Replikationsgenauigkeit der PCR Verbesserungen der Reamplifikation Vergleich mit anderen Arbeiten und Techniken Untersuchung des Sequenzspektrums im V3-Loop des HIV Eine ungewöhnliche Standardsequenz als Sonde Sequenzanreicherung in der D/R-TGGE Klonierung und Sequenzierung Liquor als Probenquelle für HIV-Neurotropismusuntersuchungen	120 121 121 122 123 124 126 127 128 128 128 128 129 129 129
5.2.1 5.2.2 5.2.3 5.2.4 5.2.5 5.2.6 5.2.7 5.3 5.3.1 5.3.2 5.3.3 5.3.4 5.3.5	Sequenzstandard Die Etablierung der verschachtelten PCR G-C-Klammer versus Psoralenprimer Entwicklung der D/R-TGGE Replikationsgenauigkeit der PCR Verbesserungen der Reamplifikation Vergleich mit anderen Arbeiten und Techniken Untersuchung des Sequenzspektrums im V3-Loop des HIV Eine ungewöhnliche Standardsequenz als Sonde Sequenzanreicherung in der D/R-TGGE Klonierung und Sequenzierung Liquor als Probenquelle für HIV-Neurotropismusuntersuchungen Ausblick: Untersuchung von Resistenzmutationen bei HIV	120 121 121 122 123 124 126 127 128 128 128 128 128 129 129 130
5.2.1 5.2.2 5.2.3 5.2.4 5.2.5 5.2.6 5.2.7 5.3 5.3.1 5.3.2 5.3.3 5.3.4 5.3.5 6	Sequenzstandard Die Etablierung der verschachtelten PCR G-C-Klammer versus Psoralenprimer Entwicklung der D/R-TGGE Replikationsgenauigkeit der PCR Verbesserungen der Reamplifikation Vergleich mit anderen Arbeiten und Techniken Untersuchung des Sequenzspektrums im V3-Loop des HIV Eine ungewöhnliche Standardsequenz als Sonde Sequenzanreicherung in der D/R-TGGE Klonierung und Sequenzierung Liquor als Probenquelle für HIV-Neurotropismusuntersuchungen Ausblick: Untersuchung von Resistenzmutationen bei HIV	120 121 121 122 123 124 126 127 128 128 128 129 129 130 132
5.2.1 5.2.2 5.2.3 5.2.4 5.2.5 5.2.6 5.2.7 5.3 5.3.1 5.3.2 5.3.3 5.3.4 5.3.5 6 7	Sequenzstandard Die Etablierung der verschachtelten PCR G-C-Klammer versus Psoralenprimer Entwicklung der D/R-TGGE Replikationsgenauigkeit der PCR Verbesserungen der Reamplifikation Vergleich mit anderen Arbeiten und Techniken Untersuchung des Sequenzspektrums im V3-Loop des HIV Eine ungewöhnliche Standardsequenz als Sonde Sequenzanreicherung in der D/R-TGGE Klonierung und Sequenzierung Liquor als Probenquelle für HIV-Neurotropismusuntersuchungen Ausblick: Untersuchung von Resistenzmutationen bei HIV Zusammenfassung Literatur	120 121 121 122 123 124 126 127 128 128 129 129 130 132 134

1 Einleitung

1.1 Die Desoxyribonukleinsäure (DNA)

1.1.1 Aufbau der DNA

Träger der genetischen Information ist die Desoxyribonukleinsäure (DNA), die in jeder Zelle enthalten ist. Sie besteht aus einem Rückgrat, in dem abwechselnd eine Phosphatgruppe an die 5'- und 3'-C-Atome einer Zuckergruppe (Desoxyribose) gekoppelt ist. Am 1'-C des Zuckers hängt eine der vier Basen Thymin (T), Cytosin (C), Adenin (A) oder Guanin (G). Diese Basen stellen die "Buchstaben" des genetischen Codes dar, ihre Abfolge bzw. Sequenz (Primärstruktur) enthält die genetische Information. Veränderungen dieser Sequenz werden als Mutationen bezeichnet. Es können Basen fehlen (Deletion), zusätzlich eingefügt (Insertion) oder ausgetauscht sein. Die geringstmögliche Abweichung ist der Austausch einer Base durch eine andere, eine Punktmutation.

Jeweils zwei Basen der DNA sind komplementär zueinander: A zu T bzw. G zu C. Komplementäre Basen bilden jeweils ein Basenpaar mit 2 bzw. 3 Wasserstoffbrückenbindungen. Zwei solcher DNA-(Einzel-)Stränge mit zueinander komplementärer Sequenz und gegenläufiger Strangrichtung lagern sich zu einem antiparallelen DNA-Doppelstrang zusammen (Sekundärstruktur). In diesem Doppelstrang sind die planaren, aromatischen Basen übereinander gestapelt (Abb. 1.1). Die dadurch ermöglichten dipolinduzierten Dipolwechselwirkungen (Stapelwechselwirkungen) begründen zusammen mit den Wasserstoffbrücken die Stabilität des DNA-Doppelstranges. G-C-Basenpaare erzeugen dabei eine stärkere Wechselwirkung mit den benachbarten Basenpaaren als A-T-Basenpaare. Daher hängt die Stabilität eines DNA-Doppelstranges von seinem G-C-Gehalt ab.



Abb. 1.1: Primärstruktur (links) und Sekundärstruktur (rechts) der DNA. T: Thymin, C: Cytosin, A: Adenin, G, Guanin, P: Phosphatgruppe, d: Desoxyribose, ...: Wasserstoffbrückenbindungen (aus: Beyer, 1984).

1.1.2 Die Bedeutung von Mutationsanalysen in Biologie und Medizin

Seit der Entschlüsselung der molekularen Struktur der DNA in ihrer Funktion als Trägerin der Erbinformation (Watson und Crick, 1953) und der damit einsetzenden Entwicklung der molekularen Genetik ist die Analyse genetischer Sequenzen in Biologie und Medizin von zunehmender Wichtigkeit. Insbesondere der Nachweis von Variationen eines Gens zwischen verschiedenen Individuen hat eine große Bedeutung in Forschung und Diagnostik gewonnen und wird in Zukunft wahrscheinlich auch für die Anpassung individueller Therapien eingesetzt werden.

Nachdem ein Gen und seine Bedeutung für einen Organismus identifiziert worden ist, stellt sich die Frage nach den Auswirkungen von Mutationen in diesem Gen, denn minimale genetische Unterschiede können in manchen Fällen den Phänotyp eines Individuums verändern.

Viele Mutationen haben überhaupt keine phänotypischen Auswirkungen, andere Mutationen machen sich nur unter bestimmten Voraussetzungen bemerkbar, wie z.B. in der Unverträglichkeit eines Medikamentes. Für eine Reihe von genetischen Variationen wird angenommen, daß sie die Disposition für eine Erkrankung beeinflussen können, während sich andere Mutationen in Form einer Erbkrankheit mit höherer Inzidenz manifestieren (Grompe, 1993). Um hier in Diagnose und Prävention weitere Fortschritte machen zu können ist das Aufspüren von Mutationen ein ständig wachsender Bereich in der biomedizinischen Forschung. Auch für zukünftig mögliche Gentherapien ist es unabdingbar, zunächst die zugehörigen Mutationen in den entsprechenden Genen herauszufinden.

In der gentechnologischen Produktion, z.B. von Medikamenten, ist es für die Sicherheit der Produkte von entscheidender Bedeutung, daß das Auftreten von Mutationen in den produzierenden Mikroorganismen sicher erkannt wird, um diese dann ersetzen zu können.

Ist ein DNA-Abschnitt für ein Gen identifiziert worden, kann die Sequenz dieses Gens bestimmt werden. Sequenzierungsmethoden gehören heute in dem meisten Laboratorien zur Routine. Auf diese Weise lassen sich dann auch Unterschiede in der Gensequenz zwischen verschiedenen Individuen bestimmen. Da diese Sequenzierung jedoch eine sehr aufwendige und demnach teure Methode ist, eignet sie sich nicht, um ein Gen bei einer größeren Zahl von Individuen auf mögliche Unterschiede zu untersuchen. Dazu werden andere Verfahren eingesetzt, mit denen sich die Lage von Mutationen auf Sequenzbereiche von einigen hundert Basen bei einzelnen Individuen eingrenzen lassen. Diese Sequenzbereiche werden anschließend zur genauen Analyse der Mutationen sequenziert. Als Beispiele seien hier genannt (Grompe, 1993; Cotton *et al.*, 1998):

Der Nachweis von Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP), bei denen durch eine Mutation eine spezifische Erkennungssequenz für eine Restriktionsendonuklease gebildet oder zerstört wird. Einzelstrang-Konformationspolymorphismen (*single strand conformational polymorphisms*, SSCP) werden gelelektrophoretisch nachgewiesen.

Weitere Verfahren beruhen auf der Hybridisierung der Proben-DNA mit einer Vergleichs-DNA. Sequenzunterschiede zwischen beiden führen zu Fehlpaarungen im DNA-Doppelstrang. In speziellen Gelsystemen können diese zu Laufunterschieden führen (Heteroduplexanalyse, HA). An solchen Fehlpaarungen kann die DNA auch chemisch (*chemical cleavage of mismatches*, CCM) oder enzymatisch (*Enzyme mismatch cleavage*, EMC) geschnitten und die Längen der erhaltenen Bruchstücke analysiert werden. Die durch solche Fehlpaarungen verursachten thermodynamischen Unterschiede führen bei geeignet gewählter Temperatur zu einer unterschiedlichen Stabilität der Hybride.

In der Denaturierungsgradienten-Gelelektrophorese (DGGE), zu der auch die in dieser Arbeit verwendete Temperaturgradienten-Gelelektrophorese (TGGE) gehört, werden solche thermodynamischen Unterschiede in einem denaturierenden Gradienten während der Gelelektrophorese aufgelöst.

1.2 Die Temperaturgradienten-Gelelektrophorese (TGGE)

Polyacrylamid-Gelelektrophoresen sind ein gebräuchliches Verfahren zur Auftrennung und Analyse biologischer Makromoleküle. Dabei werden die Moleküle von einem elektrischen Feld durch eine poröse Matrix aus Polyacrylamid bewegt, wobei ihre Geschwindigkeit unter anderem von ihrer Ladung, Größe, Form und Beweglichkeit im gewählten Puffersystem abhängt. Reicht dies zur Trennung bestimmter Makromoleküle nicht aus, so können weitere Parameter herangezogen werden. Dies können unterschiedliche Affinitäten zu weiteren zugesetzten Makromolekülen sein wie bei der Verzögerungs-Gelelektrophorese, denaturierende Substanzen wie Harnstoff oder Formamid oder die Anlagerung von SDS (Natrium-Dodecylsulfat) an das Aminosäurerückgrat von Proteinen, wodurch diese eine zu ihrer Länge proportionale zusätzliche negative Ladung erhalten (kurze Übersicht in Riesner *et al.*, 1991).

Thermodynamische Eigenschaften sind ein wichtiger Parameter zur Charakterisierung biologischer Makromoleküle. Unterscheiden sich zwei Molekülspezies in ihren thermodynamischen Eigenschaften, dann können sie sich bei einer entsprechenden Temperatur in ihren Konformationen unterscheiden. Führen diese Konformationsunterschiede zu unterschiedlichen Mobilitäten in der Gelelektrophorese, lassen sich diese Molekülspezies in geeigneten Gelsystemen voneinander trennen. Da solche Unterschiede oft weniger als 1 K ausmachen und die Übergangstemperaturen zudem noch von weiteren Parametern, wie z.B. der Salzkonzentration des Puffers, abhängen, ist es schwierig, diese Bedingungen genau zu treffen. Daher ist die Verwendung eines denaturierenden Gradienten im Gel, der einen großen Bereich erfaßt, zur Trennung am geeignetsten. Es können chemische Gradienten von denaturierenden Zusätzen wie Harnstoff und Formamid verwendet werden (DGGE, Denaturierungsgradienten-Gelelektrophorese), oder aber im Gel wird ein Temperaturgradient etabliert (TGGE, Temperaturgradienten-Gelelektrophorese). Zur Erzeugung eines Temperaturgradientens in einem Polyacrylamidgel gibt es verschiedene Ansätze (z.B. Thatcher und Hodson, 1981; Rosenbaum und Riesner, 1987; Wartell *et al.* 1990).

Bei der TGGE werden zwei prinzipielle Anwendungen unterschieden: Bei der senkrechten TGGE liegt das elektrische Feld senkrecht zum Temperaturgradienten an. Eine Probe wird über die gesamte Breite des Temperaturgradientens aufgetragen. Ein Probenmolekül läuft dann, entsprechend seiner Position in der Probenauftragstasche, während der Gelelektrophorese bei gleichbleibender Temperatur und damit konstanter Geschwindigkeit, die der Konformation bei dieser Temperatur entspricht. Damit lassen sich auf einfache Weise temperaturabhängige Konformationsübergänge einer Probe untersuchen. Bei der parallelen TGGE können mehrere Proben nebeneinander aufgetragen werden. Sie wandern in Richtung ansteigender Temperatur und werden dann, entsprechend ihrer thermodynamischen Eigenschaften, bei zunehmender Temperatur verzögert. Die Laufunterschiede zwischen zwei Proben hängen hierbei jedoch nicht nur vom angelegten Temperaturgradienten, sondern auch empfindlich von der Laufzeit der Elektrophorese ab (siehe auch Abb. 1.4).

Eine horizontale TGGE-Anlage war für einige Jahre kommerziell erhältlich (Qiagen, Hilden). Bei dieser wurde der Temperaturgradient in einer Aluminiumplatte über zwei thermostatisierte Wasserkreisläufe eingestellt (Rosenbaum, 1986; Rosenbaum und Riesner, 1987, Riesner *et al.*, 1991). Bei dieser horizontalen Gelelektrophorese können beliebige Anordnungen der Probenauftragstaschen gewählt werden und die Elektrophorese läßt sich während des Laufes optisch gut kontrollieren, da nahezu das gesamte Gel sichtbar ist. Die Temperaturgradienten sind in einem weiten Bereich variierbar, nur begrenzt durch die Leistungsfähigkeit der thermostatisierten Wasserbäder.

Eine weitere Entwicklung war die Verwendung von Peltier-Modulen zur Temperierung der Gradientenplatte anstelle von Wasserbädern (Wulfert, 1992). Diese auf Halbleiterbasis aufgebauten elektrischen Wärmepumpen konnten nahe der Gradientenplatte eingesetzt werden und ermöglichten durch die geringere Wärmekapazität des Gesamtsystems eine weitaus schnellere Temperatureinstellung, als dies mit Wasserbädern realisierbar war. So konnte ein Temperaturgradient von 25 bis 55°C innerhalb von 5 min anstatt von 30 min eingestellt werden. Daß dabei die Stromversorgungen der Peltier-Module über nahezu beliebig lange Kabel entfernt von der eigentlichen Gradientenplatte aufgestellt werden konnten, während die Wasserbäder über möglichst kurze und wärmeisolierte Schlauchverbindungen angeschlossen werden mußten, war ein weiterer Vorteil. Dies kam dem meist begrenzten Platz auf einem Labortisch zugute.

Mit der TGGE sind viele verschiedene Anwendungen möglich: Neben Mutationsanalysen an Desoxyribonukleinsäuren (DNA), wie auch im Rahmen dieser Arbeit beschrieben, können verschiedene Untersuchungen an Ribonukleinsäuren (RNA) durchgeführt (z.B. Riesner *et al.*, 1988; Riesner *et al.*, 1992; Schröder *et al.*, 1998) sowie temperaturabhängiger Konformationsübergänge von Proteinen (z.B. Sättler und Riesner, 1993) und Protein-RNA-Wechselwirkungen (z.B. Klaff *et al.*, 1997) analysiert werden.

Eine Alternative zur parallelen TGGE mit einem räumlichen Temperaturgradienten ist die Anwendung eines zeitlichen Temperaturgradientens (tTGGE, Wiese *et al.*, 1995). Dieser kann auch in einer Kapillar-Gelelektrophorese etabliert werden (tTGCE, Gelfi *et al.*, 1994; Schell *et al.*, 1999).

1.3 Untersuchungen von DNA in der TGGE

Die Denaturierung einer doppelsträngigen DNA, also die Dissoziation in ihre Einzelstränge, geschieht bei steigender Temperatur nicht kontinuierlich von Base zu Base, sondern es existieren kooperative Bereiche von etwa 50 bis 300 Basenpaaren, die sich jeweils in einem einzigen Schritt trennen. Bei dieser Dissoziation ändert sich auch die Beweglichkeit eines DNA-Stückes in der Gelelektrophorese. Ein DNA-Fragment läuft als Doppelstrang am schnellsten und wird bei Teildenaturierung stark verzögert. Die Einzelstränge laufen nach vollständiger Dissoziation dazwischen.

Gibt es in einem DNA-Fragment zwei kooperative Bereiche, die bei verschiedenen Temperaturen denaturieren, so erhält man eine für die senkrechte TGGE typische Übergangskurve (Abb. 1.2). Die Dissoziation des ersten kooperativen Bereiches, der Übergang vom vollständig basengepaarten Doppelstrang zum teildenaturierten Molekül, findet in einem schmalen Temperaturbereich statt. Dabei ist im Gel nicht von einer zeitlich konstanten Trennung der beiden Stränge auszugehen, sondern vielmehr von einem dynamischen Gleichgewicht zwischen nativer und teildenaturierter Form. Mit zunehmender Temperatur liegt das Gleichgewicht dieser Reaktion immer weiter auf der Seite der Teildenaturierung, wodurch sich eine zunehmende Verzögerung der Moleküle im Gel ergibt. Die mittlere Temperatur dieses Übergangs wird in Analogie zu Schmelzkurven als T_m-Wert dieses Übergangs bezeichnet.

Die Dissoziation in Einzelstränge ist im Gel eine irreversible Reaktion, da der erste Schritt der Rückreaktion, die Bildung des ersten Basenpaares, als Reaktion 2. Ordnung durch die Gelporen und das elektrische Feld stark gehemmt ist. Die Temperaturgrenzen dieses Überganges sind in der senkrechten TGGE nicht eindeutig bestimmbar, deshalb kann hier keine mittlere Temperatur T_m des Übergangs angegeben werden. Der Punkt des Bandenabbruchs hängt unter anderem von der verwendeten Konzentration ab und ist deshalb auch kein geeigneter Parameter zur Charakterisierung dieses Übergangs. Die Einzelstrangbildung findet bei zunehmender Temperatur immer schneller statt, was in diesem Bereich zu einer entsprechenden Verteilung der Proben in der TGGE führt.

Bei der parallelen TGGE laufen die DNA-Doppelstränge in Richtung ansteigender Temperatur (Abb. 1.4, rechts). Erreichen die Moleküle den T_m -Wert eines reversiblen Überganges, so verringern sich die Laufgeschwindigkeiten ihrem Denaturierungsgrad entsprechend. Liegen in einer Probe Mo-

leküle mit verschiedenen T_m -Werten vor, so werden sie an unterschiedlichen Positionen im Gel verzögert und dadurch voneinander getrennt. So können mehrere Proben nebeneinander in einem Gel untersucht werden. Erreichen die Moleküle jedoch eine Temperatur, bei der sie anfangen vollständig zu dissoziieren, verschmieren sie und bleiben nicht mehr in einer scharfen Bande. Daher ist es bei der parallelen TGGE entscheidend, die Elektrophorese rechtzeitig zu stoppen.



Abb. 1.2: Prinzip der DNA-Analyse mit der senkrechten TGGE. Es ist eine typische Übergangskurve eines DNA-Doppelstrangs mit zwei kooperativ denaturierenden Bereichen gezeigt und darunter die zugehörigen Molekülformen. Der erste Übergang vom Doppelstrang zum teildenaturierten Doppelstrang ist eine reversible Reaktion, dem eine mittlere Übergangstemperatur T_m zugeordnet werden kann. Der zweite Übergang ist eine im Gel irreversible Dissoziation in Einzelstränge. Diesem kann kein T_m -Wert zugeordnet werden. Rechts ist in den seitlichen Probenauftragstaschen des Gels ein Plasmidverdau als Längenstandard M aufgetragen worden, das Gel ist verkleinert dargestellt.

1.4 Mutationsscreening mit PCR und TGGE

1.4.1 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) lassen sich auf einfache Weise gezielt einzelne DNA-Abschnitte vervielfältigen (Mullis, 1985; Mullis, 1990; Newton und Graham, 1994). Dabei werden zwei kurze, chemisch synthetisierte, einzelsträngige Oligonukleotide (Primer) eingesetzt, deren Sequenzen den Grenzen des zu amplifizierenden Bereiches entsprechen. Diese Amplifikate können bis zu einigen tausend Basenpaaren lang sein, effektive Amplifikationen sind bei Längen bis zu einigen hundert Basenpaaren möglich. Der Auswahl der Primer und damit der zu vervielfältigenden Sequenzbereiche sind nur geringe Grenzen gesetzt: Ihre Sequenzen dürfen nicht zueinander oder selbstkomplementär sein, und sie können in repetitiven Sequenzbereichen das Amplifikat nicht eindeutig begrenzen. Eine ausreichende Spezifität und zueinander passende T_m-Werte der beiden Primer eines Paares können meist durch geeignete Wahl der Primerlängen erreicht werden.

Über die Primer können die amplifizierten Fragmente auch noch an den Enden modifiziert werden. So können damit Restriktionssequenzen an ein Fragment angehängt werden, über die eine spätere Klonierung vereinfacht wird. Auch die Stabilität eines Fragmentes kann beeinflußt werden, indem über einen Primer A-T- oder G-C-reiche Sequenzen angehängt werden (Wu *et al.*, 1998). Schließlich gibt es Primer, die an ihren äußeren (3'-)Enden zusätzliche Gruppen tragen, wie z.B. Fluorophore oder ein Psoralen-Derivat zur photochemischen Verknüpfung der Einzelstränge.

Als Produkt einer PCR erhält man üblicherweise bis zu 1 µg DNA an Kopien des gewählten DNA-Abschnitts. Mit der PCR lassen sich daher besonders gut die für die TGGE geeigneten DNA-Fragmente von 200 bis 500 Basenpaaren Länge in ausreichender Menge gewinnen. In einem silbergefärbten Polyacrylamidgel können Banden ab 1 ng DNA sicher nachgewiesen werden, für eine senkrechte TGGE werden mindestens 20 ng pro Bande benötigt.

1.4.2 Mutationsscreening mit der TGGE

Unterschiede zweier DNA-Fragmente, die sich nur durch eine Punktmutation unterscheiden, lassen sich in der TGGE besonders gut nachweisen, wenn man Hybride aus beiden bildet: Dazu gibt man die beiden Proben zusammen und denaturiert sie durch Erhitzen in ihre Einzelstränge. Beim anschließenden Abkühlen können sich dann wieder Doppelstränge bilden, wobei auch Stränge von ursprünglich verschiedenen Molekülen miteinander hybridisieren können, wenn ihre Sequenzen nicht zu verschieden sind. Unterscheiden sich zwei miteinander hybridisierte Einzelstränge in einer Position, dann kann sich dort kein Basenpaar bilden, und es entsteht eine destabilisierende Fehlpaarung (Abb. 1.3). Diese unterschiedlichen Hybride könne in der senkrechten und parallelen TGGE voneinander getrennt werden (Abb. 1.4).



Abb. 1.3: Bildung von Heteroduplex-Molekülen zum leichteren Nachweis von Mutationen in der TGGE. Werden zwei DNA-Fragmente (Probe und Standard) gemeinsam denaturiert und anschließend rehybridisiert, so bilden sich neben den beiden Homoduplexmolekülen auch Heteroduplexmoleküle als Mischung aus Sonde und Probe. Unterscheidet sich die Probe an mindestens einer Position von der Sonde, so bilden sich destabilisierende Fehlpaarungen.

Gibt es in einem DNA-Fragment mehr als zwei kooperativ denaturierende Bereiche, so führt die Denaturierung des ersten kooperativen Bereiches schon zu einer erheblichen Verzögerung der Probe im Gel, auch wenn dieser Bereich deutlich kleiner ist als die folgenden kooperativen Bereiche. In der parallelen TGGE führt das dazu, daß die Proben durch die Dissoziation dieses ersten Bereiches schon stark verzögert werden und mögliche Mutationen im nächsten Bereich nur bei einer sehr langen Elektrophoresezeit nachgewiesen werden können. Deshalb sollten die Fragmente für die TGGE so gewählt werden, daß der Sequenzabschnitt, der auf Mutationen hin untersucht werden soll, im ersten kooperativ denaturierenden Bereich liegt.



Abb. 1.4: Aufgrund der unterschiedlichen thermodynamischen Stabilitäten können die hybridisierten DNA-Fragmente sowohl in der senkrechten TGGE (links) als auch in der parallelen TGGE (rechts) voneinander getrennt werden. $T_1 < T_2$

Die TGGE eines DNA-Fragmentes läßt sich theoretisch vorhersagen (Steger, 1994) und damit die Nachweisbarkeit einer Mutation simulieren (Wiese *et al.*, 1995). Durch geeignete Wahl von DNA-Fragmenten läßt sich so sicherstellen, daß man alle möglichen Mutationen in einem Gen finden kann. Dazu wählt man überlappende Sequenzbereiche aus, die gegebenenfalls mit einer G-C-Klammer ergänzt oder mit einer Psoralen-Verknüpfung (Abb. 1.5) versehen werden müssen, um einen reversiblen Übergang im Gel zu erzeugen.



Abb. 1.5: Psoralenprimer zur kovalenten Verknüpfung von PCR-Produkten. Durch Verwendung eines Primers, der an seinem 5'-Ende ein Psoralen-Derivat enthält, können PCR-Produkte an einem Ende kovalent verknüpft werden. Da diese Reaktion photochemisch induziert wird, können unterschiedliche Proben zuvor miteinander hybridisiert werden. Das Psoralen interkaliert zwischen die endständigen Basenpaare und kann bei Aktivierung durch UV-Licht von 365 nm mit den Thyminresten eine kovalente Bindung eingehen.

1.4.3 Durchführung eines Mutationsscreening mit der TGGE

Um ein Gen in vielen Individuen auf mögliche Mutationen zu untersuchen, benötigt man eine Standardsequenz als Sonde. Diese Sequenz wird mit Hilfe der Computersimulation der TGGE in geeignete Fragmente eingeteilt, so daß Mutationen in allen interessierenden Bereichen nachgewiesen werden können. Amplifikate der Sonde werden dann mit entsprechenden Amplifikaten der Proben hybridisiert und mit der TGGE auf Sequenzunterschiede hin analysiert. Zeigt eine TGGE eine Heteroduplexbildung, kann das entsprechende Fragment sequenziert und damit die Mutation genauer bestimmt werden.

Zur Etablierung einer TGGE zum Mutationsnachweis wird zuerst eine senkrechte TGGE mit einer Probe durchgeführt. Aus dieser lassen sich die Laufweiten und Übergangstemperaturen des DNA-Fragmentes ablesen, mit denen man dann die Bedingungen für die parallele TGGE festlegen kann. In der parallelen TGGE können dann jeweils mehrere Proben in einem Gel untersucht werden.

1.5 Mutationen in geringen Konzentrationen

Bei der Untersuchung chromosomaler Gene auf Mutationen gibt es in der Regel, d.h. mit Ausnahme der Geschlechtschromosomen bei männlichen Individuen, zwei Allele. Häufig trägt nur ein Allel die Mutation; mit PCR und TGGE lassen sich Mutationen in diesem 1:1-Verhältnis hervorragend nachweisen. Tragen beide Allele die gleiche Mutation, wie es z.B. bei phänotypischen Individuen rezessiver Erbgänge der Fall ist, kann durch Hybridisierung mit einer entsprechenden Sonde im Verhältnis 1:1 die Mutation nachgewiesen werden.

Viele Pflanzen haben mehr als zwei Chromosomensätze. Sind diese alloploid, so liegt eine Mutation in einem Allel bei tetraploiden Genomen im Verhältnis 1:3, bei hexaploiden Formen nur noch im Verhältnis 1:5 vor. Mutationen in diesem Verhältnis lassen sich mit der TGGE auch noch sicher nachweisen.

1.5.1 Vorkommen von Mutationen in geringen Konzentrationen

Bei einer Reihe von Fragestellungen treten Mutationen in noch geringeren Konzentrationen auf: Von manchen Genen in einem Organismus existieren mehrere Kopien, wie z.B. von ribosomalen Genen. Häufig unterscheiden sich die Sequenzen in solchen *multi-copy*-Genen soweit, daß mit der PCR gezielt Abschnitte einzelner Genkopien amplifiziert werden können. Ist dies nicht möglich, so haben unterschiedliche Sequenzen und Mutationen in diesen Genen nach einer PCR eine geringere Konzentration als bei *single-copy*-Genen.

Bei einer Reihe von Tumoren ist es für die Prognose entscheidend, ob es in einzelnen Zellen schon Mutationen gegeben hat, die zu bösartigem Zellwachstum führen können. Die zu untersuchenden Gewebeproben enthalten normalerweise eine große Anzahl an Zellen. Dabei sollten nach Möglichkeit auch solche bösartigen Mutationen nachgewiesen werden können, die nur in wenigen Zellen einer Gewebeprobe enthalten sind (Zuh *et al.*, 1997).

In eukaryotischen Zellen haben einige Zellorganellen, nämlich die für die Energieversorgung notwendigen Mitochondrien (und bei Pflanzen auch noch die für die Photosynthese verantwortlichen Plastiden) ein eigenes Genom, was zudem in jeder Organelle in bis zu mehreren hundert Kopien vorliegt. Bei einer Mutation in einem dieser Genome liegt in der Zelle, in Abhängigkeit von der Zahl der Organellen, diese Mutation nur in sehr geringer Konzentration vor (Gattermann und Hofhaus, 1999; Graff *et al.*, 1999).

Bei bakteriellen Plasmiden kann es zu Mutationen in einzelnen Bakterien einer Kolonie kommen. Da es z.B. bei der gentechnischen Herstellung von Medikamenten dadurch zu veränderten Produkten kommen kann, ist hier eine frühzeitige Detektion solcher Abweichungen wichtig.

Werden Viren in einem Organismus vermehrt, so treten dabei regelmäßig Veränderungen im viralen Genom auf. Daher wurde für Viren der Begriff "Quasispezies" geprägt (Eigen *et al.*, 1988; Eigen 1992), da nur noch eine "Durchschnittssequenz" der Viren angegeben werden kann und nahezu jedes Virus seine eigene Sequenzvariante hat. Insbesondere bei RNA-Viren liegt die Mutationsrate bei der Replikation nahe der Grenze, über der die Weitergabe der genetischen Information nicht mehr gesichert ist, weil zu wenige replikationsfähige Viren entstehen (Pezo und Wain-Hobson, 1997). Die hohe Mutationsrate führt dazu, daß es in einer Viruspopulation leicht einige Viren gibt, die auch bei geänderten Umweltbedingungen, wie z.B. der Reaktion des Immunsystems oder antiviralen Substanzen, schon soweit verändert sind, daß sie "überleben" können. Während diese speziellen Umweltbedingungen für die meisten Viren "tödlich" sind, bleiben die Viren übrig, die aufgrund entsprechenden Mutationen dagegen resistent sind. Sie bilden dann die Grundlage einer resistenten Virenpopulation.

Schließlich treten auch bei der Amplifikation von DNA-Fragmenten in der PCR Fehler auf. Dabei machen Fehler an spezifischen Stellen immer nur einen kleinen Anteil an der Gesamtmenge der amplifizierten DNA aus, in der Summe können die fehlerhaft kopierten Moleküle jedoch einen erheblichen Anteil am Gesamtprodukt erreichen.

Homozygote Mutationen (100 %)
Heterozygote Mutationen (50 %)
Heterozygote Mutationen bei polyploiden Pflanzen (≤ 25 %)
Mutation an einem Genort eines multi-copy-Gens (< 50%)
Heteroplasmie in Mitochondrien (0-100%)
Untergruppen in viralen Quasispezies (0-100%)
PCR-Fehler (bis zu 0,5% je Position)
Plasmidmutationen in biotechnologischen Produktionsanlagen
Einzelne Tumorzellen in einer Gewebeprobe (möglichst geringe Nachweisgrenze)

Tab. 1.1: Konzentrationen verschiedener Mutationen im Vergleich

1.5.2 Analyse von Mutationen in geringen Konzentrationen

Der Nachweis von Mutationen, die nur in geringer Konzentration vorhanden sind, stellt eine besondere Schwierigkeit dar. Ist der Ort einer Mutation bekannt und führt diese zur Zerstörung einer Restriktionsschnittstelle, so kann die Probe zuerst mit dem entsprechenden Restriktionsenzym verdaut werden. Dabei werden über 99 % der intakten Sequenzen zerschnitten. Diese können dann in einer anschließenden PCR nicht mehr amplifiziert werden. Mit wiederholtem spezifischen Verdauen, PCR und einem anschließenden Verfahren zur Anreicherung der Mutationen können diese noch in einem Verhältnis von 10⁻⁴:1 bis 10⁻⁵:1 nachgewiesen werden (Zuh *et al.*, 1997).

Unbekannte Mutationen lassen sich auf diese Weise jedoch nicht finden. Hierzu muß ein Verfahren weiterentwickelt werden, mit dem sich solche Mutationen in geringer Konzentration nachweisen und so weit anreichern lassen, das eine Analyse der Mutationen möglich ist. In der parallelen TGGE bestehen die Heteroduplexbanden jeweils aus einem Strang der Sonden-DNA und aus einem Strang der Probe mit einer Mutation. Nach Elution einer Heteroduplexbande aus einer TGGE sollten in einer anschließende Reamplifikation beide Sequenzen jeweils zur Hälfte vorliegen. Dies reicht zur Sequenzierung aus.

1.6 Genetische Variabilität von HIV

In dieser Arbeit soll die Sequenzvariabilität des humanen Immundefizienz-Virus (HIV) an einem Abschnitt seines Genoms untersucht werden. Das HIV ist ein Retrovirus, welches T-Lymphozyten und Makrophagen des Immunsystems befällt. Weltweit verbreitet ist das humane Immundefizienz-Virus Typ 1 (HIV-1), der seltenere Typ 2 (HIV-2) kommt hauptsächlich in Westafrika vor. Eine Infektion mit HIV führt zu einer zunehmenden Schwächung des Immunsystems, so daß nach einer symptomlosen Zeit, die viele Jahre betragen kann, schließlich das erworbene Immunschwäche-Syndrom (acquired immunodeficiency syndrom, AIDS) ausbricht. Bei einem Teil der Erkrankten treten dabei auch neurologische Störungen auf, die unter dem Begriff AIDS-assoziierter Demenz-Komplex (AIDS associated dementia complex, ADC) zusammengefaßt werden. Sie werden durch die Infektion des Zentralnervensystems mit HIV und nicht durch opportunistische Infektionen verursacht (Navia *et al.*, 1986; Price, 1999).

Bei einer infizierten Person findet ein hoher Umsatz an Viren und infizierten Immunzellen statt. HI-Viren und die befallenen Immunzellen haben im Menschen eine Halbwertszeit von etwa 2 Tagen (Ho *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 1995). Da zudem bei jedem Replikationszyklus des Virus im Mittel eine Mutation auftritt (Eigen, 1992; Pezo und Wain-Hobson, 1997), ist eine rasante Veränderung des Virusgenoms möglich. Dadurch entstehen zum einen immer wieder Viren, die der Reaktion des Immunsystems gegen die Infektion entkommen, zum anderen bilden sich auch schnell Mutanten, die gegen einzelne virushemmende Substanzen resistent sind.

Die hohe Mutationsrate des HIV beruht auf der Replikationsform der Retroviren: Diese einzelsträngigen RNA-Viren übersetzen ihre genetische Information zunächst in DNA, wofür eine im Virus enthaltene RNA-abhängige DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) zuständig ist. Die in einem komplizierten Zyklus vervollständigte DNA (Goff, 1992) wird in das Genom der Wirtszelle eingeschleust (Provirus) und kann von dort aus die Synthese neuer Viren steuern. Die reverse Transkription ist dabei sehr fehleranfällig, was zu der hohen Mutationsrate bei Retroviren führt.

Das HI-Virus (Abb. 1.6) trägt auf seiner Oberfläche Tri- oder Tetramere (Lu *et al.*, 1995; Kwong *et al.*, 1998) eines glykolysierten Proteins von 120 kDalton (gp120). Dieses für die Bindung an die Zellen verantwortlich ist, welche infiziert werden. Der für das gp120 kodierende Abschnitt im *env*-Gen des HIV enthält neben sechs konservierten Sequenzbereichen fünf hypervariable Regionen (Willey *et al.*, 1986; Starcich *et al.*, 1986; Modrow *et al.*, 1987). Diese hypervariablen Regionen auf der Virusoberfläche werden für das fortwährende Entkommen der Viren aus der Immunabwehr verantwortlich gemacht. Die dritte hypervariable Region, flankiert von zwei konservierten Cysteinen, kodiert für eine auf der

Proteinoberfläche lokalisierte Aminosäureschleife und wird deshalb als V3-Loop bezeichnet. Dieser V3-Loop ist verantwortlich für die Spezifität des HIV für Makrophagen bzw. T-Lymphozyten (Hwang *et al.*, 1991; Chesebro *et al.*, 1992). Eine solche Spezifität wird als Tropismus bezeichnet und konnte auf die Verwendung von spezifischer Chemokinrezeptoren als Corezeptoren bei der Infektion der Zellen zurückgeführt werden. Makrophagen-tropische Viren benutzen den Rezeptor CCR5, während T-tropische Viren den Rezeptor CXCR4 verwenden (Spec *et al.*, 1997). In einem Individuum kann es im Krankheitsverlauf zu einem nahezu kompletten Wechsel in der Korezeptornutzung kommen (Verschiebung von CCR5 zu CXCR4), was neuerdings mit der Progression der erworbenen Immunschwäche AIDS in Verbindung gebracht wird.



Abb. 1.6: Schematischer Aufbau des humanen Immundefizienz-Virus (HIV). SU, Oberflächenproteine, Tri- oder Tetramere aus gp120; TM, Tramsmembranproteine, Tri- oder Tetramere aus gp41, in eine Membran-Doppelschicht (*Membrane Bilayer*) der Herkunftszelle eingelagert, die auch noch wirtseigene Proteine (*host cell proteins*) enthält; MA, Matrixproteine; CA, Capsid; NC, Nukleocapsidproteine; Pr, Virale Protease; RT, Reverse Transkriptase; In, Virale Integrase; tRNALys, Lysin-tRNA. Die beiden viralen RNA-Moleküle sind als schwarze Schleifen dargestellt. (aus: Morrow et al., 1994).

Bei verschiedenen tierpathogenen Viren gibt es neurotrope Varianten, denen eine Infektion des Nervensystems möglich ist. Bei einer Variante des *Moloney murine Leukemia Virus TB* ist z.B. ein einzelner Aminosäureaustausch im *env*-Gen für Neurovirulenz verantwortlich (Szurek *et al.*, 1990). Entsprechende neurotrope Variationen im V3-Loop des HIV wurden vermutet (Power *et al.*, 1994; Ball *et al.*, 1994), konnten bislang aber noch nicht eindeutig definiert werden.

1.7 Problemstellung

1.7.1 Biologisches Fragestellung

Die bisherigen Nachweisverfahren reichen nicht aus, um unbekannte Mutationen nachzuweisen und zu charakterisieren, die nur in geringer Konzentration vorliegen. Insbesondere in der zur Charakterisierung notwendigen Sequenzierung eines DNA-Fragmentes lassen sich Sequenzen, die weniger als 30% Anteil haben, nicht mehr eindeutig vom Hintergrund unterscheiden (Siguroardottir *et. al,* 2000; Nikkerson *et al.* 1997). Sollen Sequenzvariationen charakterisiert werden, die in kleineren Konzentrationen vorliegen, so müssen dazu bislang die DNA-Fragmente kloniert und eine ausreichend große Anzahl an Klonen sequenziert werden.

In der TGGE lassen sich noch Heteroduplexbanden erkennen, die weniger als 1% der eingesetzten DNA enthalten. Sollte die zugrunde liegende Sequenzvariation durch Klonieren und Sequenzieren bestimmt werden, so wären im Mittel 100 Klone notwendig, um diese Variante in einem Klon nachweisen zu können. Um die Sequenzvariante von möglichen Artefakten unterscheiden zu können, sollte sie mehrfach bestimmt werden, was mindestens das zwei- bis dreifache an Klonen erfordert.

Eine Heteroduplexbande in der TGGE besteht jeweils zur Hälfte aus zwei verschiedenen Sequenzen. Kann die DNA einer solchen Heteroduplexbande reamplifiziert werden, so sollten die beiden Sequenzen darin angereichert sein und in einer Sequenzierung nachgewiesen werden können. Ein solches TGGE-Verfahren zur Anreicherung von Mutationen, die nur in geringer Konzentration vorhanden sind, soll im Rahmen dieser Arbeit etabliert werden.

Gibt es beim HI-Virus neurotrope Varianten, die bevorzugt im Gehirn repliziert werden, so könnten diese bei HIV-infizierten Patienten mit ADC im Bereich des Gehirns in höherer Konzentration vorkommen als im Blut. Da bei Lebenden kein Hirngewebe entnommen werden kann, steht dabei für die Probengewinnung der Liquor cerebrospinalis (Nervenwasser) zur Verfügung, der mit dem Gehirn durch die Blut-Hirn-Schranke vom Blutkreislauf abgegrenzt wird. In dieser Arbeit sollen die Sequenzvarianten der HI-Viren aus Blut und Liquor einiger Patienten ermittelt und miteinander verglichen werden. Es soll gezeigt werden, ob sich auf diese Weise neurotrope Sequenzmotive bestimmen lassen.

1.7.2 Instrumentelle Anforderungen

Für die in dieser Arbeit anstehenden TGGE-Untersuchungen soll zunächst eine verkleinerte Version einer TGGE-Anlage entwickelt werden, die aufgrund einer kleineren Trennstrecke kürzere Laufzeiten der Gele sowie schnellere Temperaturwechsel ermöglicht. Diese sind sogar notwendig, wenn vor der eigentlichen TGGE ein denaturierender Vorlauf vorgesehen ist, wie er bei der Analyse von Psoralen-verknüpften PCR-Produkten notwendig ist (Wiese *et al.*, 1995). Inwieweit die verringerte Größe der Gradientenplatte zu einer geringeren Auflösung der Proben in der TGGE führt, muß dabei experimentell bestimmt werden. Die Erfahrungen mit einer Peltier-TGGE-Apparatur zeigten (Wulfert, 1992), daß sich diese Technik für eine Verkleinerung der Anlage anbietet. Im Rahmen dieser Arbeit soll darauf aufbauend zunächst eine kleine Peltier-TGGE-Anlage entwickelt werden.

2 Materialien

2.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel besaßen, soweit erforderlich und erhältlich, die Reinheitsstufe *pro analysii*. Die Lösungen wurden mit hochreinem Milli-Q-Wasser (Umkehrosmose-Hausanlage mit nachgeschaltetem Milli-Q Reagent-grade water-System ZD20 230 74, Millipore GmbH, Neu Isenburg, im Folgenden nur als H₂O bezeichnet) hergestellt und, wenn nötig, für 20 min bei 120 °C autoklaviert.

Phenol wurde mit 100 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA pH 8,0, gesättigt und mit 0,1 % Hydroxychinolin versetzt (Sambrook *et al.*, 1989). Chloroform war mit 1/24 Vol Isoamylalkohol versetzt, um aufschäumen zu vermeiden (Sambrook *et al.*, 1989).

- Acrylamid
- Agarose (low-melting)
- Amberlite MB3
- Ammoniumazetat
- Ampicillin
- Azeton
- Bacto-Tryptone
- Bacto-Yeast-Extrakt
- β -Merkaptoethanol
- Bromphenolblau
- Chloroform
- Dimethylformamid
- DTT [1,4-Dithiothreitol]
- EDTA [Ethylendiamintetraacetat]
- Eisessig
- Ethanol
- Ethidiumbromid
- Formaldehydlösung
- Glyzerin
- Harnstoff
- Hydroxychinolin
- Isoamylalkohol
- Kaliumacetat
- MOPS [3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure]
- Natriumacetat
- Natriumborhydrid
- Natriumcarbonat
- Natriumchlorid
- Natriumhydroxid
- N,N'-Methylenbisacrylamid
- Phenol
- SDS [Natriumdodecylsulfat]
- Tris [Tris(Hydroxymethyl)aminomethan]
- tRNA
- X-Gal [5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid]
- Xylencyanol

2.2 Enzyme

2.2.1 DNA-Polymerasen

•	Taq	Promega, Madison, USA
•	Pwo	Boehringer Mannheim
•	Reverse Transkriptase: SUPERSKRIPT TM II	Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe

2.2.2 Restriktionsenzyme

• Bam H I	Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe
• Eco R I	Promega, Madison, USA
• Hae III	Boehringer Mannheim; Amersham, Freiburg;
	Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe

2.2.3 Weitere Enzyme

•	Agarase	Boehringer Mannheim
•	Ligase	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
•	RNase A	Boehringer Mannheim

2.3 Lösungen

2.3.1 Puffer

2.3.1.1 TELT

TELT:	2,5 M	LiCl
	50 mM	Tris pH 8,0
	4 %	Triton-X 100
	2,5 mM	EDTA

2.3.1.2 Tris-HCI

Tris/HCl: 10 mM Tris

Es wurde jeweils 1000 ml 10 mM Tris angesetzt, mit HCl auf pH 7,5 eingestellt und in Aliquots zu 100 ml autoklaviert. Zur Elution von Nukleinsäuren von QIAquick Säulchen wurde Tris/HCl auf pH 8,5 eingestellt und autoklaviert.

2.3.1.3 TE

1 x TE:	10 mM	Tris/HCl pH 8,0
	1 mM	EDTA

1000 ml 1 x TE wurde mit HCl auf pH 8 eingestellt und in Aliquots von etwa 100 ml autoklaviert.

2.3.1.4 TES

1 x TES:	100 mM	NaCl
	10 mM	Tris/HCl pH 8,0
	1 mM	EDTA

TES wurde in kleinen Mengen aus TE durch Zugabe von 1/20 Vol 2 M NaCl hergestellt.

2.3.1.5 TAE

1 x TAE:	40 mM	Tris
	20 mM	Eisessig
	1 mM	EDTA

Es wurden jeweils 2500 ml 10 x TAE angesetzt und autoklaviert, der pH-Wert betrug etwa 8,4.

2.3.1.6 Na-TAE

0,2 x Na-TAE:	8 mM	Tris
	20 mM	Natriumacetat
	0,2 mM	EDTA

Es wurde jeweils 1000 ml 10 x Na-TAE angesetzt, mit Eisessig auf pH 8,4 eingestellt und autoklaviert.

2.3.1.7 RNA-Elutionspuffer

Elutionspuffer:	2 mM	EDTA
-	0,1 %	SDS
	0,3 M	Natriumacetat

2.3.2 Gellösungen

2.3.2.1 Acrylamid:Bisacrylamid (30:1)

60 g Acrylamid und 2 g N,N'-Methylenbisacrylamid wurden unter einem Abzug abgewogen und in 200 ml H₂O gelöst. Die Lösung wurde zur Entfernung von Acrylsäuren mit dem Ionenaustauscher Amberlite MB3 versetzt, 1 h langsam gerührt und dann mittels Faltenfilter abfiltriert.

2.3.2.2 Gellösungen

Gellösungen für die großen Gele der zeitlichen TGGE wurden jedesmal nach Bedarf frisch angesetzt und entgast.

Für kleine Gele, die jeweils nur 2,5-3,5 ml enthalten, wurden 100 ml Gellösung angesetzt und vor jeder Benutzung entgast:

Gellösung:	8 M	Harnstoff
	2 %	Glyzerin
	0,2 x	Na-TAE
	8 %	Acrylamid:Bisacrylamid (30:1)

2.3.3 Sonstige

2.3.3.1 LB-Medium

5 g	Bacto-Tryptone
2,5 g	Bacto-Yeast-Extrakt
5 g	NaCl
ad 500 ml	H_2O

Es wurden jeweils 500 ml LB-Medium angesetzt und autoklaviert.

2.4 Nukleinsäuren

2.4.1 Primer

Die meisten für die PCR und die Reverse Transkription benötigten Primer stammen von Interactiva Biotechnologie GmbH, Ulm oder Eurogentec Deutschland GmbH, Köln. Diese wurden HPLC-aufgereinigt und lyophilisiert geliefert. Die Angaben zu T_m -Werten stammen von den Herstellern.

Ein Teil der Primer wurde mit einem DNA-Synthesizer (Modell 381A, Applied Biosystems, Weiterstadt) nach der Festphasenmethode von Bernd Esters in Eigensynthese hergestellt. Die T_m -Werte wurden nach folgender Formel berechnet (aus Newton und Graham, 1994):

 $T_{m'} C = 81,5 + 16,6 \log_{10} [J^+]/mol l^{-1} + 41 (\#G + \#C)/l - 600/l$

wobei $[J^+] = 50 \text{ mM}$ die Konzentration monovalenter Kationen, #G + #C die Anzahl der Guanosinund Cytidinreste im Primer und I dessen Länge ist.

Die Bezeichnung der Primer folgt folgendem Schema: Zunächst V3 für Primer um den V3-Loop des HIV folgend P oder M für Plus- oder Minusstrang-Primer. Darauf folgt eine Ziffer zur Unterscheidung. Am Ende kann noch ein weiterer Buchstabe für verschiedene Modifikationen am 5'-Ende stehen:

A = AA am 5'-Ende, entspricht Psoralen-Primer ohne Psoralen. B = Bam H I-Schnittstelle L = Verlängerung, die nicht der Sequenz entspricht<math>P = AA+Psoralen, zur kovalenten Verknüpfung

Die Klonierungsprimer Bam-401b und Bam-504 entsprechen nicht diesem Schema, sondern den Primern 401 und 504 (aus Ball *et al.*, 1994), verlängert um eine Bam H I-Schnittstelle am 5'-Ende.

Zu den Matrizen nicht komplementäre Basen sind klein dargestellt, Sequenzen von Restriktionsschnittstellen für Bam H I unterstrichen. Die Aufzählung entspricht der Lage der Primer auf dem HIV-Genom, die Positionsangaben beziehen sich auf die Positionen komplementären Basen der HIV-Sequenz im Plasmid pNL4-3 (Adachi *et al.*, 1986).

Primer: Bam-401-b	(ähnlich Ball <i>et al.</i> , 1994)
Bezugsquelle:	Eigensynthese
Sequenz $(5' \rightarrow 3')$:	ccg <u>ggg atc c</u> GA GGA TAT AAT CAG TTT ATG
Position:	6536-6555
G+C/Länge (in nt.):	14/30
T _m -Wert:	59,0 °C
Primer: V3P8 Bezugsquelle: Sequenz $(5' \rightarrow 3')$: Position: G+C/Länge (in nt.): T _m -Wert:	Eigensynthese GGA CCA TGT ACA AAT GTC AGC ACA GTA CAA 6923-6952 13/30 57,5 °C

2 Materialien

Primer: V3P4B

Bezugsquelle:InteractivaSequenz (5' \rightarrow 3'):gga cgg ATc cAC AAA TGT CAG CAC AGT ACA APosition:6923-6952G+C/Länge (in nt.):15/31Tm-Wert:67,8 °C

Primer: V3P4

Primer: V3P1L

Primer: V3P1 $_{II}$

Bezugsquelle:	Eurogentec
Sequenz $(5' \rightarrow 3')$:	GTA GTA TCA ACT CAA CTG CT
Position:	6974-6993
G+C/Länge (in nt.):	8/20
T _m -Wert:	42,5° C

59,9° C

*

Primer: V3P5

Bezugsquelle:EuSequenz $(5' \rightarrow 3')$:TAPosition:69G+C/Länge (in nt.):11 T_m -Wert:52

* Eurogentec TAG TAT CAA CTC AAC TGC TGT TAA ATG GCA 6975-7004 11/30 52,4° C

Primer: V3P180

Bezugsquelle: Sequenz $(5' \rightarrow 3')$: Position: G+C/Länge (in nt.): T_m-Wert:

zum Einfügen einer Mutation Interactiva AGA GGG GAC CCg GGA GAG CAT 7143-7163 14/21

Primer: V3M5

Bezugsquelle:	Eurogentec
Sequenz $(5' \rightarrow 3')$:	aaT AGC TAT CTG TTT TAA AGT GGC ATT CCA
Position:	7253-7226
G+C/Länge (in nt.):	10/30
T _m -Wert:	51,1° C

Primer: V3M1 Bezugsquelle: Sequenz $(5' \rightarrow 3')$: Position: G+C/Länge (in nt.): T _m -Wert:	* Eigensynthese GCT AGC TAT CTG TTT TAA AGT 7255-7235 7/21 45,0° C
Primer: V3M1A _{IV} Bezugsquelle: Sequenz $(5' \rightarrow 3')$: Position: G+C/Länge (in nt.): T _m -Wert:	(drei Eigensynthesen haben zuvor nicht ausreichend funktioniert) Eurogentec aAG CTA GCT ATC TGT TTT AAA GT 7252-7235 7/23 43 °C
Primer: V3M1P Bezugsquelle: Sequenz $(5' \rightarrow 3')$: Position: G+C/Länge (in nt.): T _m -Wert:	Eurogentec Psoralen-aaG CTA GCT ATC TGT TTT AAA GT 7255-7235 7/23 43° C
Primer: V3M8 Bezugsquelle: Sequenz $(5' \rightarrow 3')$: Position: G+C/Länge (in nt.): T _m -Wert:	Eigensynthese CCT GAG GAT TGC TTA AAG ATT ATT GTT TTA 7311-7279 9/30 52,2 °C
Primer: V3M4 Bezugsquelle: Sequenz $(5' \rightarrow 3')$: Position: G+C/Länge (in nt.): T _m -Wert:	Eigensynthese TGA GGA TTG CTT AAA GAT TA 7309-7290 6/20 42,2 °C
Primer: V3M4B Bezugsquelle: Sequenz $(5' \rightarrow 3')$: Position: G+C/Länge (in nt.): T _m -Wert:	Interactiva GGT C <u>gg aTC C</u> TG AGG ATT GCT TAA AGA TTA 7319-7290 13/30 57,7 °C
Primer: Bam-504 Bezugsquelle: Sequenz $(5' \rightarrow 3')$: Position: G+C/Länge (in nt.): T _m -Wert:	(nach Ball <i>et al.</i> , 1994) Eigensynthese tag a <u>GG Atc c</u> AT AGT GCT TCC TGC TGC T 7805-7786 14/28 59,0 °C

Die Primer V3M8 und Bam-504 wurden auch in der Reversen Transkription eingesetzt.

* Diese Primer wurden im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert, aber nicht weiter verwendet.

2.4.2 Plasmide

2.4.2.1 Marker-DNA

Zur Kontrolle von Gelelektrophoresen und Gelfärbungen wurde ein mit den Restriktionsendonukleasen Hinf I bzw. Hae III verdautes Plasmid pBR 322 verwendet. Von den dabei entstandenen Mischungen unterschiedlich langer Fragmente doppelsträngiger DNA wurden in der Regel 10 ng in einer Gelspur als Marker M bzw. M' aufgetragen. Die Fragmentlängen sind in Abb. 2.1 angegeben.



Abb. 2.1: Verwendete DNA-Längenstandards in einem 8%-Polyacrylamidgel: Das Plasmid pBR 322 (P) wurde mit den Restriktionsendonukleasen Hinf I (M) oder Hae III (M') verdaut. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden in einem 8%-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Längen der DNA-Fragmente sind in Basenpaaren angegeben. Bei M' konnten die kürzesten vier Fragmente (21 bp, 18 bp, 11 bp, 7 bp) nicht mehr dargestellt werden. Das Gel ist vergrößert abgebildet.

Zur Kontrolle der Länge von PCR-Produkten in nativen Gelen wurde, soweit möglich, zusätzlich das Produkt einer vorhergehenden PCR mit den gleichen Primern verwendet. In den TGGEs sind die Marker nicht zur Längenkontrolle geeignet, da jedes ihrer Fragmente ein anderes Denaturierungsverhalten zeigt. Sie wurden jedoch teilweise zur Kontrolle der Gelfärbung mit aufgetragen.

2.4.2.2 Sonde

Das Plasmid pNLA1 (Strebel *et al.*, 1987; Schaal *et al.*, 1993) wurde freundlicherweise von PD Dr. Heinrich Schaal, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie der Heinrich-Heine-Universität zur Verfügung gestellt und als Ausgangsmaterial für PCRs verwendet.

2.4.2.3 pMW1

PCR-Produkte des Plasmids pNLA1 mit den Primern Bam-401-b und Bam-504 wurden über die Bam H I-Schnittstelle in den Vektor pBS II KS+ (Short *et al*, 1988) einkloniert und damit *E. coli* INV α F' (Invitrogen, 1993) transformiert. Die erhaltenen Klone pMW1/9, pMW1/10 und pMW1/12 sind im Kapitel 4.2 näher beschrieben. Die Plasmide wurden an der Eco R I-Restriktionsschnittstelle linearisiert und als Matrize für Sonden-PCRs verwendet.

2.4.2.4 PMWE1-01 bis pMWE2-60

PCR-Produkte mit den Primern V3P4B und V3M4B der HIV-Proben +E1, +E2, +F1, +F2, +G1, +G2 und +H1 wurden über die Bam H I-Schnittstelle in den Vektor pUC 18 (Norrander *et al.*, 1983)) einkloniert und damit *E. coli* DH5 α F' (Hanahan, 1985) transformiert. Die erhaltenen Klone sind im Kapitel 4.3 näher beschrieben.

2.4.3 Proben

Eingefrorene Blutseren und Liquor cerebrospinalis von Patienten wurden von Prof. Dr. med. Gabriele Arendt von der Neurologischen Ambulanz der MNR-Klinik der Universitätskliniken Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Die Proben waren bei diagnostischen Routineentnahmen gewonnen worden und wurden nicht mehr für mögliche Nachbestimmungen benötigt. **Tab. 2.1:** Liste der verwendeten Proben und ihre Bezeichnung in dieser Arbeit. Die Nummern bezeichnen jeweils die verwendeten Aliquots. Die Aliquots +D2 und +H2 konnte nicht amplifiziert werden und steht deshalb in Klammern. Die Patienten der Seren –A und –B sind nicht mit HIV infiziert, diese Seren wurden als Negativkontrolle verwendet.

Patient	Serum	Liquor
15369	-A	
14370	-B	
14346	+C1, +C2	
14464	+D1, (+D2)	
13498	+E1, +E2	+G1, +G2
13751	+F1, +F2	+H1,(+H2)

2.5 TGGEs

Für parallele und senkrechte TGGEs wurde zunächst die in Kapitel 4.1 beschriebene TGGE-Anlage benutzt. Aluminiumteile und Gehäuse dieser Anlage wurden von den Werkstätten des Fachbereiches Biologie der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, angefertigt. Die Peltier-Module wurden von AMS (München) geliefert, die Netz- und Regelgeräte für die Peltier-Module wurden von der Firma Peltron (Nürnberg) bezogen. Später wurde ein dieser Anlage entsprechender Prototyp des TGGE-Systems von Whatman Biometra (Göttingen) verwendet. Zeitliche TGGEs wurden mit einer thermostatisierbaren vertikalen Gelkammer (Hoefer SE6000, Serva, Heidelberg) durchgeführt.

Alle Gele in dieser Arbeit sind, soweit nicht anders angegeben, auf DIN A5-Seiten in Originalgröße abgebildet.

2.6 Computeralgorithmen

Für die Simulation des Schmelzverhaltens der DNA und der Vorhersage der Nachweisbarkeit von Mutationen mittels TGGE wurden die Programme POLAND (Steger, 1994) und MISMATCH (Wulfert, 1992; Wiese et al, 1995) verwendet.

Das POLAND-Programm steht interaktiv im Internet zur Verfügung: http://www.biophys.uni-dues-seldorf.de/POLAND/poland.html. Versionen für MS-DOS-Rechner beider Programme sind erhält-lich unterftp://ftp.biophys.uni-duesseldorf.de/pub/molbio/poland/poland.zipbzw.ftp://ftp.biophys.uni-duesseldorf.de/pub/molbio/poland/mismatch.zip.

3 Methoden

3.1 Sicherheitsvorkehrungen

Das hier bearbeitete humane Immundefizienz-Virus (HIV) ist der Erreger des *Acquired Immunode-ficiency Syndromes* (AIDS). Eine Infektion mit diesem Virus ist zur Zeit noch nicht heilbar und führt zum Tod. Da es keine Schutzimpfung gegen HIV gibt, mußte jede Infektionsgefahr sorgfältig ausgeschlossen werden.

Der Umgang mit infektiösem Material konnte nicht vermieden werden, da zu den geplanten Untersuchungen weitgehend intakte HIV-RNA benötigt wurde. Der Umgang mit infektiösem Material konnte jedoch auf ein Minimum reduziert werden und bestand nur in der Zugabe von HIV-haltigem Blutserum bzw. Liquor cerebrospinalis zum Lysispuffer AVL bei der Aufreinigung der HIV-RNA. In diesem stark denaturierenden Puffer werden die Viren um die RNA freizusetzen zerstört und damit wird auch jede weitere Infektionsmöglichkeit eliminiert.

Diese Aufreinigung wurde in einem speziellen Kliniklabor durchgeführt. Als Sicherheitsmaßnahmen wurden ein Mundschutz und doppelte Latexhandschuhe getragen, der Umgang mit scharfen oder zerbrechlichen Gegenständen wurde vermieden. Alle notwendigen Maßnahmen zur Infektionsprophylaxe für den Fall eines direkten Kontaktes mit infektiösem Material wurden zuvor sowohl mit dem Betriebsärztlichen Dienst als auch mit Frau Prof. Dr. med. G. Arendt, die die Proben zur Verfügung stellte, geklärt.

Die bei der Aufreinigung gewonnene HIV-RNA, die potentiell Vollängen-RNA war, wurde sobald wie möglich, also unmittelbar nach der Reversen Transkription, durch alkalische Hydrolyse zerstört. Der in der Reversen Transkription gewonnenen cDNA fehlt der hintere LTR des HIV-Genoms, und es ist sehr unwahrscheinlich, daß unter den gewählten Bedingungen die Reverse Transkription bis zum vorderen LTR möglich war. Die gewonnenen PCR-Produkte und die folgenden Klone enthalten nur einen Teil des *env*-Gens, der für das gp120-Protein kodiert. Dieser Abschnitt des Virusgenoms ist alleine nicht replikationsfähig, daher geht von ihm keine Gefahr mehr aus.

Zusätzlich zur üblichen Sorgfalt und Hygiene bei Laborarbeiten wurden gestopfte Pipettenspitzen verwendet (hauptsächlich, um Querkontaminationen der Proben zu vermeiden) und alle benutzten Materialien, mit Ausnahme der silbergefärbten Gele, rückautoklaviert.

3.2 Klonierung von PCR-Produkten

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten aus einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden Primer verwendet, die an ihren 3'-Enden eine Bam H I-Restriktionssequenz haben. Die PCR-Produkte wurden ebenso wie die Vektoren (pBS II KS+ und pUC 18) Bam H I verdaut und anschließend Phenol/Chloroform-extrahiert und gefällt.

3.2.1 Ligation

Zur Ligation wurden die Sedimente von verdautem Plasmid (ca. 2 μ g) und verdautem PCR-Produkt (max. 1 μ g) nacheinander in 8,5 μ l H₂O gelöst, 1 μ l Ligationspuffer und 0,5 μ l Ligase (2,5 U) hinzugegeben und über Nacht bei 12 °C ligiert.

3.2.2 Transformation

Zur Transformation von Zellen mit dem pBS II KS+-Vektor wurde das TA Kloning Kit (Invitrogen Corp., Carlsbad CA, USA) benutzt:

Kompetente Zellen (Inv α F') und β -Merkaptoethanol wurden auf Eis aufgetaut. 2 µl β -Merkaptoethanol wurde zu den kompetenten Zellen gegeben und vorsichtig verrührt, um eine Zerstörung der Zellen durch das Pipettieren zu vermeiden. Dazu wurden 2 µl des Ligationsansatzes gegeben und wieder vorsichtig gerührt. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis gelagert, für 45 s in einem Wasserbad bei 42 °C inkubiert und anschließend wieder für 2 min auf Eis gegeben. Schließlich wurden 450 µl auf 37 °C vortemperiertes SOC-Medium dazugegeben und 1 h bei 225 min⁻¹ und 37 °C geschüttelt.

200 µl kompetente Zellen wurden zu den Plasmiden gegeben, 1 h auf Eis gelagert, dann für 90 s in einem Wasserbad bei 42 °C inkubiert und anschließend für 1 min auf Eiswasser gegeben. Dazu wurden 800 µl auf 37 °C vortemperiertes SOC-Medium gegeben und 1 h bei 225 min⁻¹ und 37 °C geschüttelt. Der Vektor pUC 18 wurde mit RbCl transformiert (Hanahan, 1983).

3.2.3 Anzucht von Escherichia coli

2 LB-Platten wurden mit je 40 μ l X-Gal (2% in Dimethylformamid) ausgestrichen. Dieser Farbstoff kann nur von den Bakterienkolonien zersetzt werden, in deren Plasmide kein Fragment einkloniert wurde. Darauf wurden 50 μ l bzw. 160 μ l der kompetenten Zellen gleichmäßig ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C angezogen. Von den erhaltenen Kolonien wurden 12 weiße ausgesucht und in jeweils 3 ml LB-Medium über Nacht bei 37 °C in einem Schüttler bei 225 min⁻¹ angezogen. Von diesen Kolonien wurde jeweils eine Plasmid-Schnellpräparation durchgeführt, mit der Restriktionsendonuklease Bam H I verdaut und in einem Polyacrylamidgel überprüft, ob einklonierte Fragmente vorhanden sind.

Zum Abbau der RNA wurde 50 μ g RNase A pro Milliliter Plasmidlösung zugefügt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben Phenol/Chloroform-extrahiert, gefällt und sequenziert. Zur endgültigen Anzucht der Plasmide wurden jeweils 25 ml LB-Medium mit Ampicillin auf 75 μ g/ml eingestellt, mit 200 ml Bakterienkultur versetzt und über Nacht bei 37 °C und 225 min⁻¹ inkubiert. Durch Einstellung von je 500 μ l Zellsuspension mit 500 μ l 50 % igem Glyzerin auf 25 % Glyzerin konnten die Bakterien als Dauerkultur bei –70 °C gelagert werden.

3.3 Aufreinigung von Nukleinsäuren

3.3.1 Aufreinigung von Plasmiden

3.3.1.1 Schnellpräparation von Plasmiden

Die Bakterien aus 1 ml Kultur wurde in einem Eppendorf-Gefäß 30 min bei 13000 min-1 (ca. 15000 g) abzentrifugiert und das überstehende LB-Medium weitgehend entfernt. Das Sediment wur-

de in 100 µl TELT-Puffer (2,5 M LiCl, 50 mM Tris pH 8,0 , 4 % Triton-X 100, 2,5 mM EDTA) mittels Vortexer resuspendiert. Ein Volumen Phenol/Chloroform (1:1) wurden dazugegeben, 15 s auf einem Vortexer gemischt und 1 min bei 13000 min⁻¹ (ca. 15000 g) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit 2 Volumen Ethanol gefällt und in 30 µl TE gelöst (nach He *et al.*, 1989).

3.3.1.2 Aufreinigung von Plasmiden über Silikagel-Säulen

Zur Aufreinigung größerer Plasmidmengen wurde das QIAGEN Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben (QIAGEN Plasmid Mini Handbook, March 1997, Qiagen GmbH) verwendet, welches auf der Methode der optimierten alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) basiert:

Dabei wurden Bakterien aus 25 ml Kulturmedium bei 6000 min⁻¹ (ca. 3500 g) und 4 °C für 15 min in einer Untertisch-Zentrifuge (Hermle Z 320 K) abzentrifugiert, die Überstände vollständig entfernt und die sedimentierten Bakterien in je 4 ml Resuspensionspuffer P1 aufgenommen:

Puffer P1:	50 mM	Tris/HCl pH 8,0
	10 mM	EDTA
	100 µg/ml	RNase A

Jeweils 4 ml Lysispuffer P2 wurden hinzugegeben und sofort gründlich aber vorsichtig gemischt, um eine Scherung der genomischen DNA zu vermeiden:

Puffer P2:	200 mM	NaOH
	1 %	SDS

SDS zerstört dabei die Zellmembranen, während NaOH die DNA und die Proteine denaturiert. Durch die Begrenzung auf 5 min wird dabei nur die plastidäre DNA freigesetzt, da die genomische DNA an Bestandteilen der Zellwand gebunden ist. Die RNA wird durch die RNase A aus Puffer P1 abgebaut.

Anschließend werden 4 ml kalter Neutralisationspuffer P3 dazugegeben, vorsichtig gründlich gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert:

Puffer P3: 3,0 M Kaliumacetat pH 5,5

Dabei fällt das SDS aus und damit auch alle Zellbestandteile außer der plastidären DNA. Die Lösungen wurden anschließend 30 min bei 4 °C und 30000 g zentrifugiert.

Währenddessen wurden die Säulen mit je 4 ml Puffer QBT equilibriert:

Puffer QBT:	750 mM	NaCl
	50 mM	MOPS pH 7,0
	15 %	Isopropanol
	0,15 %	Triton X-100

Nach der Zentrifugation wurden die Überstände abgenommen, je 250 µl für eine spätere Kontrolle der Aufreinigung entnommen und der Rest über mit Glaswolle verstopfte Spritzen filtriert auf die

Säule gegeben. Dabei bindet die DNA selektiv an das Säulenmaterial. Von den Durchflüssen wurden jeweils 250 µl zur späteren Analyse aufbewahrt.

Anschließend wurden die Säulen jeweils zweimal mit je 10 ml Wasch-Puffer QC gewaschen, jeweils 500 µl der Durchflüsse wurden zu Analyse aufbewahrt:

Puffer QC:	1,0 mM	NaCl
	50 mM	MOPS pH 7,0
	15 %	Isopropanol

Dadurch wurden alle noch verbliebenen Verunreinigungen entfernt, während die DNA bei diesen Salzbedingungen noch an der Säule gebunden blieb.

Schließlich wurde die DNA mit jeweils 5 ml Elutionspuffer QF von den Säulen eluiert:

Puffer QF:	1,25 M	NaCl
	50 mM	MOPS pH 8,5
	15 %	Isopropanol

Die Eluate wurden mit jeweils 3,5 ml (0,7 Volumen) Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt und anschließend bei 13000 min⁻¹ (15000 g) und 4 °C 30 min zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Sedimente mit je 5 ml 70 %igem Ethanol gewaschen, um überschüssige Fällsalze zu entfernen, und getrocknet. Danach wurden sie in je 100 μ l TE gelöst und die Konzentration der Plasmid-DNA spektralphotometrisch bei 260 nm bestimmt.

Die Plasmide wurden in Aliquots zu je 10 µl aufbewahrt.

Die während der Aufreinigung genommenen Zwischenproben wurden mit 0,7 Vol Isopropanol gefällt, in je 10 µl TE gelöst und auf einem Agarosegel kontrolliert.

3.3.2 Aufreinigung von DNA nach enzymatischen Reaktionen

Nach Restriktionsverdauungen wurden die Proben entweder Phenol/Chloroform-extrahiert oder über eine Agarose-Gelelution aufgereinigt.

Nach einer PCR mit Pwo-Polymerase war eine Entfernung der Polymerase wegen ihrer Exonukleaseaktivität nötig, dies geschah in der Regel über QIAquick Säulchen nach Herstellerangaben (Qiagen, Hilden).

Nach einer PCR mit Taq-Polymerase konnten die Produkte direkt für Gelelektrophoresen verwendet werden, bei Bedarf wurden sie mit QIAquick Säulchen nach Herstellerangaben (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

Wurde eine Puffer- oder Volumenverringerung benötigt, wurden Proben mit Ethanol oder Isopropanol gefällt.

3.3.2.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Jeder PCR-Ansatz von 100 μ l wurde mit dem gleichen Volumen TE versetzt. 300 μ l Phenol/Chloroform-Gemisch (1:1) wurden dazugegeben, gut gemischt und 2 min in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde abgenommen und mit 300 μ l Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) vermischt. Nach einer weiteren Zentrifugation konnte die wäßrige Phase abgenommen und weiterverwendet werden.

3.3.2.2 Aufreinigung von DNA über Silikagel-Säulchen

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten wurden QIAquick Säulchen (Qiagen, Hilden) mit einer Silikagel-Membran nach Herstellerangaben (QlAquick Spin Handbook, July 1997, Qiagen GmbH) verwendet, die genaue Zusammensetzung der Puffer PB und PE wird vom Hersteller nicht angegeben.

Dazu wurden die PCR-Produkte aus den PCR-Reaktionsgefäßen in Mikroreaktionsgefäße überführt, wobei eine sorgfältige Trennung vom überschichtenden Mineralöl nicht nötig war. Das fünffache Volumen des Bindepuffers PB wurde dazugegeben, sorgfältig vermischt und auf die Säulchen gegeben. Durch eine kurze Zentrifugation wurden die Lösungen durch die Silikagel-Membran getrieben, wobei die DNA wegen der im Puffer PB enthaltenen chaotropen Salze an die Silikagel-Membran band.

Danach wurden jeweils 750 μ l Waschpuffer PE auf die Säulchen gegeben, kurz zentrifugiert und nach Entfernung des Durchflusses noch einmal für 1 min zentrifugiert, um alle Reste des Ethanolhaltigen Puffers PE zu entfernen.

Schließlich wurde die DNA mit 50 μ l Tris/HCl, pH 8,4, eluiert. Sollten die Eluate in einer möglichst hohen Konzentration vorliegen, wurde das Elutionsvolumen auf 30 μ l verringert, die Elutionslösung sorgfältig auf die Silikagel-Membranen der Säulchen aufgetragen und eine Inkubationszeit von 1 min vor der Zentrifugation abgewartet, um die Ausbeute zu optimieren. War eine möglichst große Ausbeute notwendig oder sollte das Eluat gefällt werden, dann wurde das Elutionsvolumen auf 100 μ l erhöht. Damit ließ sich die Ausbeute etwa von 90 % auf 99 % steigern.

3.3.2.3 Ethanolfällung von DNA

DNA-Lösungen wurden, falls notwendig, mit 1/10 Vol 2 M NaCl auf ca. 200 mM Na⁺ eingestellt und 3 Volumen Ethanol (-20 °C) hinzugegeben. Die Mischungen wurden für mindestens 30 min bei -20 °C gelagert, konnten so jedoch auch längere Zeit aufbewahrt werden. Danach wurde die DNA für mindestens 30 min, normalerweise 1 h, bei 4 °C und 13000 min⁻¹ (ca. 15000 g) abzentrifugiert, die Überstände dekantiert oder mit einer Pipette abgenommen und die Sedimente getrocknet. Diese konnten dann in mindestens 10 µl Wasser oder Puffer gelöst werden.

3.3.2.4 Isopropanolfällung von DNA

Bei großen Volumina wurden die Fällungen mit 0,6 Vol Isopropanol bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.3.3 Gewinnung von HIV-RNA aus Serum und Liquor

Zur Gewinnung von HIV-RNA aus Serum bzw. Liquor von Patienten wurde das QIAamp Viral RNA Min Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben (QlAamp Viral RNA Mini Kit Handbook, January 1999) verwendet. Dabei wurde die jeweils maximal mögliche Probenmenge von 560 µl verwendet, um eine hohe Ausbeute zu erhalten. Zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen wurde sorgfältig darauf geachtet, daß niemals mehr als ein Probengefäß bzw. Silikagel-Säulchen geöffnet war.

Zunächst wurden die benötigten Puffer nach Herstellerangaben vorbereitet: Zu 31 ml Puffer AVL wurden 310 µg Poly-(A)-RNA als Schutz-RNA hinzugegeben. 19 ml Puffer AW1 wurden mit 25 ml Ethanol, 13 ml Puffer AW2 mit 30 ml Ethanol ergänzt. Alle Puffer wurden vor der Anwendung auf diese Weise frisch fertiggestellt, die genaue Zusammensetzung der verwendeten Puffer wird vom Hersteller nicht angegeben.

Für jede Probe wurde in einem Greiner-Röhrchen 2250 µl Puffer AVL^{+tRNA} vorgelegt. Dann wurden jeweils 560 µl Serum bzw. Liquor hinzugefügt und für 15 s auf einem Vortexer gemischt. Diese Mischungen wurden für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wurden die Viren durch die im Puffer AVL^{+tRNA} enthaltenen chaotropen Salze denaturiert und dadurch auch inaktiviert.

Nach 10 min wurde jeweils 2250 μ l (3 x 750 μ l) Ethanol hinzugefügt und erneut auf einem Vortexer gemischt.

Jeweils 630 μ l dieser Lösungen wurden auf Säulchen gegeben, in einer Tischzentrifuge 1 min bei 8000 min⁻¹ (ca. 6000 g) zentrifugiert, so daß die Lösungen durch die Silikagel-Membranen der Säulchen getrieben wurden, die Säulchen auf neue 2 ml-Sammelgefäße gegeben und die gebrauchten Sammelgefäße mit dem Durchfluß entsorgt. Dies wurde noch sieben mal wiederholt, bis daß die Proben vollständig über die Säulchen gelaufen waren.

Zum Waschen der Proben wurde zunächst jeweils 500 μ l Puffer AW1 (enthält chaotrope Salze und Ethanol) auf die Säulchen gegeben und diese 1 min bei 8000 min⁻¹ (ca. 6000 g) zentrifugiert. Anschließend wurden die Säulchen auf neuen Sammelgefäßen mit jeweils 500 μ l Puffer AW2 (enthält Natriumazid und Ethanol) befüllt und für 3 min bei 13000 min⁻¹ (ca. 15000 g) zentrifugiert.

Schließlich wurden die Säulchen auf 1,5 ml-Mikroreaktionsgefäße gegeben und zweimal mit je 40 μ l Puffer AVE (H₂O mit 0,04 % Natriumazid) gefüllt, 1 min inkubiert und für 1 min bei 8000 min⁻¹ (6000 g) eluiert. Zu den Eluaten von jeweils 80 μ l wurden 40 μ l (½ Vol) 7,5 M NH₃Ac dazugegeben, gemischt und mit je 320 μ l Ethanol bei –20 °C gefällt.

3.4 DNA- Oligonukleotide

DNA-Oligonukleotide als Primer für PCR und Reverse Transkription wurden meist von verschiedenen Herstellern in lyophilisierter Form bezogen, nach Herstellerangaben in TE gelöst und die Konzentrationen spektralphotometrisch mit den von den Herstellern angegebenen Extinktionskoeffizienten überprüft.

Ein Teil der Primer wurde mit einem DNA-Synthesizer (Modell 381A, Applied Biosystems, Weiterstadt) nach der Phosphoamidit-Festphasen-Methode hergestellt. Diese wurden nach der Synthese für 1½ h bei 70 °C zur Abspaltung der Schutzgruppen inkubiert und anschließend über NAPTM-25 Säulchen (Pharmacia, Freiburg) aufgereinigt:
Dazu wurden diese Säulchen zuerst mit 25 ml Tris/HCl pH 7,8 equilibriert, anschließend die Primerlösung (1,5 ml) auf die Säule gegeben und nach deren Durchlauf nochmals 1 ml Tris/HCl-Puffer zur Ergänzung des Ladevolumens nachgefüllt. Eluiert wurden die Primer dann mit jeweils 3,5 ml Tris/HCl, wobei die Eluate in jeweils 10 Aliquots zu 8 Tropfen aufgefangen wurden.

Die Primerkonzentrationen in den Eluaten wurde in einer 1:30-Verdünnung spektralphotometrisch bestimmt und die Eluate mit Primern in einem Speed Vac Concentrator (Savant) 2 h lyophilisiert und zur späteren Verwendung bei –20 °C gelagert.

Zum Gebrauch wurde ein Lyophilisat in 100 μ l Tris/HCl gelöst und die Primerkonzentration spektralphotometrisch bestimmt. Der Extinktionskoeffizient ϵ_{260} wurde dabei nach folgender Formel aus der Anzahl der verwendeten Basen (#T, #A, #G, #C) berechnet (Newton und Graham, 1994, Seite 43):

 $\epsilon_{260} = (8400 \ \text{#T} + 15200 \ \text{#A} + 12010 \ \text{#G} + 7050 \ \text{#C}) \ 1 \ \cdot \text{mol}^{-1} \ \cdot \text{cm}^{-1}$

3.5 Enzymatische Reaktionen

3.5.1 Restriktionsendonuklease-Verdauung von DNA

Die restriktionsendonukleolytischen Verdauungen wurden in 20 µl Volumen durchgeführt:

Restriktionsansatz: 1 x	Restriktionspuffer (10 x)
ca. 1 µg	DNA
10 U	Restriktionsenzym (10 U/µl)

Falls die DNA als Sediment vorlag, wurden 17 μ l H₂O mit 2 μ l Restriktionspuffer gemischt und das Sediment darin gelöst. Nach Zugabe von 1 μ l Restriktionsenzym wurde die Lösung bei 37 °C über Nacht inkubiert.

3.5.2 In-vitro Transkription

Um die Aufreinigung der HIV-RNA und die anschließende Reverse Transkription zu etablieren, wurden vom Plasmid pMW1-10 (wt) *in-vitro*-Transkripte angefertigt (nach Chamberlin *et al.*, 1983).

Ein Transkriptionsansatz von 100 µl bestand aus:

Transkriptionsansatz:	1 x	IVT A (20 mM NaP pH 7,7 + 10 mM DTT)
-	1 x	IVT B (8 mM MgCl ₂ , 4 mM Spermidin-HCl, pH 7,7)
	1,5 mM	je rNTP
	0,5 µg	Plasmid (ca. 50 ng Insert)
	40 U	RNasin $(1 \mu l)$
	266 U	T7-Polymerase (1 µl)

Die *in-vitro*-Transkription wurde im Wärmeblock für 1 h bei 37 °C durchgeführt. Die Reaktion wurde durch 20 min Aufheizen auf 60 °C gestoppt. Die Transkripte wurden über eine Phenol/Chloroform-Extraktion und zweimalige Chloroformextraktion (damit die folgenden enzymatischen Reaktionen nicht durch Phenolreste inhibiert werden) aufgereinigt, und mit ½ Volumen 3 M NH₃Ac und 3 Volumen Ethanol-gefällt.

Die Transkripte von pMW1-10 (wt) wurden gelaufgereinigt, die Konzentration spektralphotometrisch bestimmt (1 OD = 40 ng/µl) und eine Verdünnungsreihe mit 10⁹ bis 10⁻¹ Matrizen/µl in TE mit 50 ng/µl tRNA als Schutz-RNA angefertigt.

3.5.3 Reverse Transkription (RT) und alkalische Hydrolyse

Zur Synthese von cDNA wurde die SUPERSKRIPTTM II RNase H⁻ Reverse Transkriptase (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe) verwendet. Sie besteht aus einer rekombinanten Form des Moloney Murine Leukemia Virus, enthält aber keine RNase H-Aktivität mehr.

Die als Matrizen verwendeten HIV-RNA-Aufreinigungen wurden zuvor gefällt, um eine möglichst große Ausbeute zu erzielen. Die RNA-Sedimente wurden dann in 12 μ l H₂O mit 10 pmol Primer (V3P8) gelöst. Diese Lösungen wurden für 5 min auf 95 °C erhitzt und dann auf Eis abgeschreckt, um stabile Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen. Dann wurden die Lösungen mit je 7 μ l Puffermischung auf

RT-Ansatz :	1 x	First Strand Buffer
		(50 mM Tris/HCl pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM NaCl)
	10 mM	DTT
	0,5 mM	je dNTP

eingestellt, auf 42 °C temperiert und schließlich je 1 μ l SUPERSKRIPTTM II (200 U) durch vorsichtiges auf- und abpipettieren gemischt. Die Reverse Transkription wurde für 50 min bei 42 °C in einem Thermocycler durchgeführt und anschließend durch 5 min erhitzen auf 99 °C gestoppt. Danach wurden die Ansätze auf Eis abgekühlt und die an den Deckeln der Mikroreaktionsgefäße kondensierte Feuchtigkeit kurz abzentrifugiert.

Zum Abbau der RNA durch alkalische Hydrolyse wurden die Ansätze anschließend mit jeweils 2,25 μ l 1 N NaOH auf pH 13 eingestellt und für 10 min bei 90 °C inkubiert. Danach wurden die Ansätze auf Eis abgekühlt, mit 2,5 μ l 3 M NaAc neutralisiert, 1 μ l mit 50 ng tRNA als Fällhilfe dazugegeben und mit 70 μ l Ethanol bei –20 °C gefällt.

3.5.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können gezielt einzelne Sequenzbereiche bis zu einigen tausend Basenpaaren amplifiziert werden (Mullis, 1985; Mullis, 1990; Newton und Graham, 1994).

Dazu wird die DNA zunächst bei 94 °C in ihre Einzelstränge denaturiert. Dann wird die Temperatur auf 40-60 °C gesenkt, so daß passende Oligonukleotide (Primer) mit einer Länge von 15-50 Basen an die ihnen komplementären Sequenzbereiche anlagern können. Die dazu optimale Temperatur hängt dabei von der Länge und der Zusammensetzung der Oligonukleotide ab. 20 Basen lange Pri-

mer sind im Allgemeinen ausreichend stabil und spezifisch. Sollen über diese Primer noch Restriktionsschnittstellen, G-C-Klammern oder andere Modifikationen angehangen werden, können sie mit abnehmender Ausbeute auch länger synthetisiert werden.

Eine DNA-abhängige DNA-Polymerase verlängert die Primer dann entsprechend der Sequenzen der komplementären Stränge. Die dazu verwendeten thermostabilen Polymerasen haben ein Temperaturoptimum von 72 °C.

Bei einem solchen Zyklus aus Denaturierung, Anlagerung und Verlängerung (Elongation) kann der von den Primern begrenzte DNA-Abschnitt maximal verdoppelt werden. Während der wiederholten Anwendung eines solchen Temperaturzyklusses steigt die synthetisierte DNA-Menge exponentiell an. Durch die Verwendung thermostabiler Polymerasen können die Zyklen ohne ständige Zugabe von Enzymen in entsprechenden Geräten (Thermocycler) automatisiert werden.

Begrenzt wird die Synthese hauptsächlich durch die mit zunehmender DNA-Konzentration ebenfalls zunehmende Rehybridisierung der Einzelstränge, so daß der Anteil an Hybriden mit Primern, die verlängert werden, immer weiter abnimmt (Plateaueffekt). Ein weiterer, im wesentlichen die mögliche Länge der Amplifikate begrenzender Effekt besteht darin, daß die Polymerase nach dem erratischen Einbau einer nicht-komplementären Base die Synthese abbricht und eine Strangverlängerung unwahrscheinlich ist. Dies geschieht gelegentlich und führt zu Produktanteilen mit geringfügig abweichenden DNA-Sequenzen, was im Ergebnisteil (Kapitel 4.2.9) ausführlich dargestellt wird.

Wegen der Empfindlichkeit der PCR, welche eine Amplifikation selbst einzelner Ausgangsmoleküle erlaubt, war ein absolut kontaminationsfreies Arbeiten unerläßlich. Sämtliche Lösungen für die PCR wurden daher in einem anderen Labor mit PCR-Pipettenspitzen in kleinen Aliquots angefertigt. Die PCRs selber wurden in einer UV-sterilisierbaren Arbeitskammer mit laminarem, sterilgefiltertem Luftstrom (Gemini, Biohit, Köln-Wesseling) vorbereitet. Dabei wurden ausschließlich PCR-Pipettenspitzen und ein gesonderter Pipettensatz verwendet. Kontaminationsfreiheit wurde durch Nullkontrollen überprüft. Bei Verdacht auf eine Kontamination wurden *alle* verwendeten Aliquots verworfen.

Es wurden zwei verschiedene thermostabile Polymerasen verwendet: Eine rekombinante Polymerase aus *Thermus aquatikus* (Taq), die gebräuchlich und einfach zu handhaben ist, sowie eine rekombinante Polymerase aus *Pyrococcus woesei* (Pwo) mit einer 3'-5'-Exonukleaseaktivität, welche fehlerhaft eingebaute Basen wieder entfernen kann ("*proof-reading*"). Dies führt zu einer deutlich erhöhten Replikationsgenauigkeit.

Für die PCR standen zwei Thermocycler zur Verfügung: Ein Thermocycler Varius TCV 5×9 (Landgraf, Langenhagen), in dem maximal 9 PCR-Mikroreaktionsgefäße mit einem Volumen von je 0,5 ml in einem Block eingesetzt werden können, sowie ein Thermocycler Varius V 80 (Landgraf, Langenhagen) für 16 PCR-Mikroreaktionsgefäßen je Block mit einem Volumen von je 0,2 ml. Beide Thermocycler haben fünf Blöcke, die jeweils voneinander unabhängig betrieben werden können.

3.5.4.1 PCR mit Taq-Polymerase

In einer PCR mit Taq-Polymerase wurden Ansätze von 50 oder 100 μ l verwendet, Ein Ansatz mit 50 μ l hatte folgende Zusammensetzung:

Cl,
ei 25 °C)

Bei Ansätzen mit 100 µl wurden jeweils die doppelten Mengen verwendet.

Die Ansätze wurden in PCR-Mikroreaktionsgefäße gegeben, mit 50 µl Paraffinöl überschichtet um Konzentrationsverschiebungen durch Kondensationen an den Gefäßdeckeln zu vermeiden, und in einem Thermocycler inkubiert.

3.5.4.2 PCR mit Pwo-Polymerase

In einer PCR mit Pwo-Polymerase wurden hauptsächlich Ansätze von 50 μ l verwendet. Dabei wurde in Abweichung zu Taq-Ansätzen die dreifache Menge Primer verwendet, um eine mögliche Degradation der Primer durch die Exonukleaseaktivität der Pwo-Polymerase auszugleichen sowie MgSO₄ statt MgCl₂ eingesetzt. Außerdem wurden die Ansätze in zwei Teilen pipettiert, die erst unmittelbar vor der PCR auf Eis zusammengegeben wurden, um DNA-Degradation durch die Exonukleaseaktivität der Pwo-Polymerase zu vermeiden.

Die Ansätze für 50 µl hatte folgende Zusammensetzung:

Pwo-Mix 1 (30 µl): 0,6 µM	+Primer (30 pmol für 50 μl)
0,6 µM	-Primer (30 pmol für 50 µl)
0,2 mM	je dNTP
ca. 15 pg	Matrizen (Plasmid-Insert)
Pwo-Mix 2 (20 μ l): 1 x	Pwo-Puffer (10 mM Tris/HCl, 25 mM KCl,
	5 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ pH 885 bei 20 °C)
2,0 mM	MgSO ₄
1,25 U	Pwo-Polymerase

Bei Ansätzen mit 100 µl wurden jeweils die doppelten Mengen verwendet.

Die Ansätze wurden in PCR-Mikroreaktionsgefäße gegeben, mit 50 µl Paraffinöl überschichtet um Konzentrationsverschiebungen durch Kondensationen an den Gefäßdeckeln zu vermeiden, und in einem Thermocycler inkubiert.

3.5.4.3 geschachtelte PCR

PCR-Amplifikationen mit einer sehr geringen Anzahl an Ausgangsmolekülen waren in einer Amplifikation bei entsprechend hoher Zykluszahl nicht reproduzierbar. Deshalb wurden solche Amplifikationen in zwei Schritten durchgeführt.

In einer ersten Amplifikation mit 25 Zyklen wurde ein äußeres Primerpaar (V3P8/V3M8) eingesetzt. Die aufgereinigten Produkte dieser Amplifikationen wurden in einer zweiten PCR mit einem oder zwei innerhalb dieses Fragmentes liegenden Primern durchgeführt (V3P1/V3P4: teilgeschachtelte PCR; V3P1/V3M1A: geschachtelte PCR). Auf diese Weise konnten auch Amplifikationen aus weniger als 10 Matrizen-Molekülen reproduzierbar durchgeführt werden (Newton und Graham, 1994).

3.5.4.4 Mutagenese

Um nachzuweisen, daß im PCR-Fragment mit den Primern V3P1/V3M1P alle Mutationen in der TGGE nachgewiesen werden können, wurde eine Mutation ausgewählt, bei der die Heteroduplices in der zeitlichen TGGE nur einen minimalen Laufunterschied aufweisen. Diese Mutation wurde mittels PCR nach einem Verfahren von Sarkar und Sommer (1990) eingefügt (Silver *et al.*, 1995):

Es wurde ein Primer (V3P180) mit 21 Nukleotiden synthetisiert, der in der Mitte den gewünschten Basenaustausch enthält. Mit diesem Primer und einem Gegenprimer (V3M4) wurde eine erste PCR durchgeführt. Diese PCR wurde mittels QIAquick Säulchen (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und gefällt. Die Amplifikate dieser PCR wurden als "Megaprimer" in einer zweiten PCR mit dem Primer V3P4 eingesetzt. Deren Produkte von ca. 344 bp Länge wurden verdünnt als Matrizen für weitere PCRs verwendet. Das Vorgehen ist im Ergebnisteil in Kapitel 4.2.6.5 ausführlich beschrieben.

3.5.4.5 DNA-Einzelstrang-Synthese

Zur ausschließlichen Synthese von Minus-Einzelsträngen wurde ein PCR-ähnlicher Ansatz mit nur einem Minusprimer verwendet. Da hierbei keine exponentielle, sondern nur eine lineare Amplifikation möglich ist, wurden 90 µg Plasmid je Ansatz eingesetzt. Eine ausreichend gute Hybridisierung ergab sich mit einem 500-fachen molaren Überschuß des Primers bei 50 Zyklen. Das Plasmid war mit dem Restriktionsenzym Hae III so verdaut worden, daß die entstandenen "*run-off*"-Transkripte einer PCR mit dem Plusprimer V3P1 entsprechen. Diese Verfahren waren nur mit Taq-Polymerase erfolgreich, bei Verwendung von Pwo-Polymerase mit 3'-5'-Exonukleaseaktivität wurde das eingesetzte Plasmid abgebaut.

3.6 Physikalische Methoden

3.6.1 Hybridisierung von PCR-Produkten

Zur Bildung von Heteroduplices zwischen Produkten verschiedener PCR-Ansätze wurden diese zusammengegeben und hybridisiert. Dazu wurden die PCR-Produkte entweder im Taq-Puffer belassen oder mit 1/10 Volumen 2 M NaCl auf ca. 200 mM Na⁺ eingestellt. Die Hybridisierungen wurden in einem Thermocycler durchgeführt. Dort wurden die Proben zuerst für 5 min bei 99 °C denaturiert und anschließend in 10 min gleichmäßig auf 29 °C abgekühlt (7 K/min). Dabei wurden die Proben *nicht* mit Paraffinöl abgedeckt, da das sich bildende Kondensat an den Deckeln der Mikroreaktionsgefäße nur Wasser und keine DNA enthält und eine Volumenverringerung und damit Konzentrationserhöhung die Hybridbildung fördert. Das gleichmäßige Abkühlen stellte sicher, daß ein geeigneter Temperaturbereich für die Hybridisierung durchlaufen wurde, eine langsamere Abkühlung könnte die selektive Bildung von Homoduplices bevorzugen.

Die Produkte von PCR-Ansätzen, in die verschiedene DNA-Fragmente als Matrizen zusammen eingesetzt wurden, mußten nicht mehr hybridisiert werden, da die Rehybridisierung in den letzten Zyklen einer PCR die vorherrschende Reaktion ist.

3.6.2 UV-Bestrahlung von PCR-Produkten mit Psoralen-Primern

3.6.2.1 UV-Bestrahlung zur Verknüpfung von DNA-Strängen

Um in der TGGE bei hohen Temperaturen eine irreversible Denaturierung zu vermeiden, wurden Primer mit einem Psoralen-Derivat am 5'-Ende verwendet, welches eine durch UV-Licht induzierbare kovalente Verknüpfung der beiden DNA-Stränge ermöglicht (Fernandez *et al.*, 1993).

Psoralen interkaliert zwischen die Basenstapel der DNA und kann UV-induziert mit Thyminen reagieren. Deshalb enthielt der Psoralen-Primer V3M1P am 5'-Ende zwei zusätzliche Adenine vor dem Psoralen, so daß die Photoreaktion mit den dazu komplementären Thyminen im Gegenstrang möglich ist. Das Psoralen-Molekül selbst ist über einen C₆-Linker mit dem 5'-Ende des Primers gekoppelt, ein C₂-Linker wäre auch möglich gewesen.

Zur Verknüpfung wurden die hybridisierten PCR-Produkte in Volumina von 30-100 μ l auf Kuhlenobjektträgern in einem UV Stratalinker 180 (Stratagene, Heidelberg) für 30 min mit 365 nm bestrahlt. Um zu verhindern, daß die von den Leuchtstoffröhren im Stratalinker erzeugte Wärme ein Teil des Volumens verdampfte, wurde bei kleinen Volumina zusätzlich ein Kühlakku mit hineingegeben, um die Proben zu kühlen. Die Effizienz der kovalenten Verknüpfung war begrenzt und lag bei ca. 50-80% der Doppelstränge.

3.6.2.2 Lösen der Psoralen-Verknüpfung

Um mit Psoralen verknüpfte DNA-Doppelstränge reamplifizieren zu können, mußte die kovalente Bindung wieder aufgehoben werden, da es sonst während der Primeranlagerungsphase in der PCR nur zur Rehybridisierung der verknüpften Stränge kommt (Reaktion 1. Ordnung).

Da diese Reamplifikationen nur bei gelelektrophoretisch aufgetrennten Proben interessierte, konnte die Lösung der Psoralen-Verknüpfungen im Gel durchgeführt werden. Das entsprechende Gel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt und auf einem UV-Leuchttisch für 3 min bei 302 nm bestrahlt. Dabei wurden zwar nur etwa 20 % der Verknüpfungen gelöst, bei längerer Bestrahlung oder Verwendung von 254 nm (Kanne *et al.*, 1982) nahmen jedoch die UV-induzierten Schäden an der DNA soweit zu, daß keine effiziente Reamplifikation mehr möglich war.

3.7 Gelelektrophoresen

3.7.1 Agarose-Gelelektrophoresen

Zur Kontrolle und Elution von Plasmid-Verdauungen wurden 1% ige Agarose-Gele verwendet:

Agarosegel:	1 %	Low-melting-Agarose
	1 x	TAE
	0,5 µg/ml	Ethidiumbromid

0,3 g Agarose wurden in einen kleinen Erlenmeyerkolben zu 30 ml Pufferlösung gegeben und mehrfach in der Mikrowelle aufgekocht, bis sie schlierenfrei gelöst war. Vor Zugabe des Ethidiumbromids wurde die Lösung unter fließendem kalten Wasser auf unter 60 °C abgekühlt, um eine Zersetzung des Ethidiumbromids zu vermeiden. Die Lösung wurde dann in eine Agarosegel-Gießform gegeben und ein Auftragstaschenformer aufgesetzt. Nachdem das Agarosegel durch Abkühlen erstarrt war, wurde es in eine Agarosegelkammer (HE 33, Hoefer, San Francisco, USA) überführt. Es wurde soviel Puffer dazugegeben, daß das Gel gerade bedeckt war. Dann wurde der Auftragstaschenformer vorsichtig entfernt, so daß sich die Auftragstaschen mit Laufpuffer füllten. Die Proben wurden in die Auftragstaschen gegeben und die Elektrophorese bei 50 V und ca. 50 mA für etwa 1 h durchgeführt. Zur Detektion wurde das Gel aus der Kammer herausgenommen, auf einem Transilluminator (UVT 2035, Herolab, Leon-Rot) mit UV-Licht (302 nm) beleuchtet und mit einer Polaroid-Kamera mit Orangefilter fotografiert.

3.7.2 Polyacrylamid-Gelelektrophoresen

Zeitliche TGGEs und präparative Primergele wurden in einer Hoefer SE 600 Elektrophorese-Einheit (Pharmacia, Freiburg) durchgeführt (siehe Kapitel 3.7.2.5).

Für TGGEs wurde im Rahmen dieser Arbeit eine kleine TGGE-Apparatur entwickelt, sowie eine daraus hervorgegangenes, kommerziell erhältliches TGGE-System (Biometra, Göttingen) eingesetzt. Diese TGGE-Systeme eigneten sich nicht nur für Temperaturgradienten-Gelelektrophoresen, sondern wurden auch für native und denaturierende, sowie teilweise für präparative Gelelektrophoresen eingesetzt.

Die Gele haben eine Größe von 7,4 cm x 8,0 cm. Für native und denaturierende Gelelektrophoresen bzw. parallele TGGEs wurden, je nach Anwendung, Gele mit 8 Probenauftragstaschen à 5 μ l, 12 Probenauftragstaschen à 3 μ l oder 18 Probenauftragstaschen à 2 μ l verwendet. Für senkrechte TGGEs und präparative Gelelektrophoresen konnten Gele mit einer großen, 40 mm langen Probenauftragstasche mit 40 μ l Volumen und zwei rechts und links daneben liegende kleine Probenauftragstaschen mit je etwa 5 μ l hergestellt werden.

Gießformen für die Gele wurden zunächst hergestellt, indem zwei Lagen Dymoband (Esselte) auf Glasplatten von 7 cm x 10 cm geklebt wurden, später standen Platten mit aufgeklebten Abstandhalter und Probenauftragstaschenformern aus Glas (Biometra, Göttingen) zur Verfügung. Die Platten wurden regelmäßig silanisierter um das Herauslösen der Gele zu vereinfachen Die Gele wurden auf einer hydrophilen Gelbondfolie hergestellt, die die Handhabung der nur 0,5 mm dicken Gele erst ermöglicht. Dazu wurde auf eine Gegenplatte aus Glas von 9 cm x 9 cm eine Gelbondfolie (Biozym, Hess. Oldendorf) mit der hydrophilen Seite nach oben aufgepreßt, die gewünschte Gegenplatte mit Probenauftragstaschenformern angelegt und beide mit 3 großen Buchbinderklammern an den Abstandhaltern aneinander gedrückt. Für die Gele wurden 100 ml folgender Gellösung angesetzt, im Kühlschrank aufbewahrt und vor jeder Verwendung entgast:

Gellösung:	8 M	Harnstoff
_	2 %	Glyzerin
	0,2 x	Na-TAE
	8 %	Acrylamid:Bisacrylamid (30:1)

Es wurden jeweils zwei Gele gegossen und dafür, je nach Art, 5-7 ml Gellösung benötigt. Diese wurde in einen 10 ml-Standzylinder gegeben, als

Starter:	0,2 %	TEMED	und
	0,07 %	APS	

dazugegeben, der Standzylinder mit einem Stück Parafilm abgedichtet und die Substanzen durch fünfmaliges Umdrehen vermischt. Mit einer Pasteur-Pipette wurden dann zwei Gele gegossen, wobei sorgfältig darauf geachtet wurde, daß keine Luftblasen im Gel zurückblieben, was insbesondere unter den langen Probenauftragstaschen für die senkrechte TGGE leicht passieren konnte. Zum polymerisieren wurden die Gele waagerecht hingelegt. Damit konnte ein Auslaufen der Gele an den Abstandhaltern verhindert werden, wobei durch die Oberflächenspannung auch keine Flüssigkeit aus der Gießöffnung austrat. Die Gele mußten für native Gelelektrophoresen mindestens 45 min, für TGGEs möglichst 90 min polymerisieren.

Zur Verwendung der Gele wurden die Buchbinderklammern gelöst und ein Spatel vorsichtig zwischen Gelbondfolie und Gegenplatte eingeführt. Dann konnte die Gegenplatte abgenommen werden, und das Gel unter leichter Biegung von der Gelplatte mit Probenauftragstaschenformern gelöst werden.

Um einen guten Wärmekontakt zwischen TGGE-Platte und Gel zu gewährleisten, wurde als Kontaktflüssigkeit ca. 300 μ l 50 % iges Glyzerin, später 0,1 % iges Triton X-100 in einer Reihe von Punkten in der Mitte der TGGE-Platte aufgetragen und das Gel dann unter einer leichten Biegung blasenfrei aufgelegt. Die Gelbondfolien wurde in einer Größe von 8,95 cm x 8,95 cm einen halben Millimeter kleiner als die Aussparung in der TGGE-Platte geschnitten, damit sie dort sicher hineinpaßten.

Für den Kontakt zwischen Pufferbädern und Gel wurde ein handelsübliches Spültuch gut ausgewaschen, in etwa 8 cm x 8 cm große Stücke geschnitten und ausgekocht oder autoklaviert. Diese Kontakttücher konnten beliebig oft verwendet werden und wurden daher so markiert, daß sie nicht zwischen Anode und Kathode verwechselt werden konnten. Geschah dies doch einmal, dann gelangten störende Ionen aus den Kontakttüchern, in die sie aufgrund der konstanten Polung nur hinein wandern sollten, ins Gel und wurden als dunkle Streifen angefärbt. Alternativ dazu konnte Whatman-Papier (Biometra, Göttingen) zur einmaligen Anwendung benutzt werden.

Die Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit Probenauftragspuffer AP gemischt:

AP:	8 M	Harnstoff
	0,2 x	Na-TAE
	0,01 %	Bromphenolblau
	0,01 %	Xylencyanol
	0,1 %	Triton X-100

Durch die 1:1-Verdünnung des Auftragspuffers mit der Probe ergab sich bei Proben in schwachen Puffern wie TE eine nur halb so große Salzkonzentration in der Probenauftragstasche wie im Gel. Dies bewirkte darin einen größeren Widerstand und somit ein höheres elektrisches Feld, wodurch die Proben als schärfere Bande ins Gel einliefen.

Die Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol wurden zur Kontrolle der Elektrophorese während des Laufes eingesetzt, das Detergens Triton X-100 verringert die Oberflächenspannung der Probe und erleichtert somit das Auftragen in die kleinen Probenauftragstaschen. Harnstoff wurde in der größtmöglichen Konzentration eingesetzt, um die Diffusion des Harnstoffs aus dem Gel in die Probenauftragstaschen und daraus folgende Laufartefakte zu verringern.

3.7.2.1 Native Gelelektrophoresen

Native Gelelektrophoresen, wie z.B. zur Überprüfung von PCR-Produkten, wurden bei 20 °C, 300 V und 20-30 mA über einen Zeitraum von 15 min durchgeführt. Wurde eine größere Auflösung benötigt, wie z. B. bei präparativen Gelen, wurde die Zeit auf 45-60 min verlängert. Eine typische native Gelelektrophorese hatte folgenden Ablauf:

nativ: 300 V 15 min, 20 °C native Elektrophorese

3.7.2.2 Denaturierende Gelelektrophoresen

Denaturierende Gelelektrophoresen wurden bei 60 °C durchgeführt. Bei so hohen Temperaturen muß das Gel abgedeckt werden, da es sonst schnell austrocknet. Dazu wurden zunächst die Proben auf das Gel aufgetragen und dann für 2 min bei 20 °C elektrophoretisiert, um die Nukleinsäuren ins Gel einlaufen zu lassen. Anschließend wurde die Elektrophorese unterbrochen, die Kontakttücher abgenommen, die Probenauftragstaschen mit ca. 1 ml Laufpuffer gut ausgespült und das Gel mit einer 7 cm x 7 cm großen, temperaturbeständigen Kunststoffolie (z.B. Kopierfolie oder Gelbondfolie, *hydrophobe* Seite zum Gel) luftblasenfrei abgedeckt. Die Kontakttücher wurden so aufgelegt, daß sie die Kanten der Abdeckfolie gerade überlappten. Um ein Aufbiegen des Gels bei hohen Temperaturen zu vermeiden, wurden die Kontakttücher mit eine kleinen Glasplatte (ca. 10 cm x 10 cm) beschwert. Nach Temperaturvorgabe erfolgte die Temperatureinstellung mit den hier verwendeten kleinen TGGE-Apparaturen mit Peltier-Technik innerhalb von 1 min. Die Gelelektrophorese wurde ca. 40 min durchgeführt. Eine typische denaturierende Gelelektrophorese hatte folgenden Ablauf:

denaturierend:	300 V	2 min, 20 °C	Einlauf der Proben
	0 V	2 min	Abdecken, Einstellen auf 60 °C
	300 V	40 min, 60 °C	denaturierender Lauf

3.7.2.3 Temperaturgradienten-Gelelektrophoresen

Die Richtung der Temperaturgradienten-Gelelektrophoresen (TGGEs), parallel oder senkrecht zum Gradienten, konnte einfach durch die Positionierung der Pufferbäder und entsprechende Auflage des Gels bestimmt werden. TGGEs wurden wie denaturierende Gele gefahren, es wurden dabei nur unterschiedliche Temperaturen an den beiden Seiten des Temperaturgradienten eingestellt. Bei der Abdeckung wurde zusätzlich ein Stück Noppenfolie (Verpackungsmaterial) auf die Abdeckfolie gelegt und mit der kleinen Glasplatte beschwert. Durch die luftgefüllten isolierenden Noppen wurde dabei eine Temperaturverschiebung im Gradienten vermieden. Mit Temperaturgradienten von bis zu 40 K wurden die Gelelektrophoresen bei 300 V und 20-25 mA für 15-45 min durchgeführt. Eine typische TGGE hatte folgenden Ablauf:

TGGE:	300 V	2 min, 20 °C	Einlauf der Proben
	0 V	2 min	Abdecken, Einstellen des Gradienten
	300 V	15 min, 40+60 °C	TGGE

3.7.2.4 D/R-TGGEs

Eine Erweiterung der Methode der TGGE stellt die denaturierend/renaturierende TGGE (D/R-TGGE) dar: Hierbei wurde vor der eigentlichen TGGE ein denaturierender Vorlauf vorgeschaltet, um die Psoralen-verknüpften Doppelstränge von den nicht verknüpften Molekülen abzutrennen. Darauf folgte eine kurzen Renaturierungsphase, in der die Temperatureinstellung abgestellt wurde und das Gel bis etwa zur unteren gewünschten Temperatur der TGGE abkühlte. Anschließend folgte eine normale TGGE. Eine typische D/R-TGGE hatte folgenden Ablauf:

D/R-TGGE:	300 V	2 min, 20 °C	Einlauf der Proben
	0 V	2 min	Abdecken, Einstellen von 60 °C
	300 V	40 min, 60 °C	denaturierender Vorlauf
	0 V	4 min	Abkühlung der TGGE auf ca. 40 °C
	0 V	2 min,	Einstellung des TempGradientens
	300 V	15 min, 40+60 °C	TGGE

3.7.2.5 Zeitliche TGGEs

Für zeitliche TGGEs (Wiese *et al.*, 1995; Wiese, 1996) und für große präparative Gele wurde eine Hoefer SE 600 Elektrophorese-Einheit (Pharmacia, Freiburg) verwendet. Bei dieser hängt das Gel zwischen zwei Glasplatten vollständig im unteren Pufferbad, wodurch eine besonders gleichmäßige Temperierung des Gels während der Elektrophorese möglich ist. Das untere Pufferbad wurde über einen Wärmetauscher mit einem thermostatisierten Wasserbad (Julabo Wärmetechnik, Seelbach) temperiert. Die Gele für die zeitlichen TGGEs bestanden aus:

tTGGE-Gele:	8 M 8 % 0,5 x	Harnstoff Acrylamid:Bisacrylamid (30:1) TAE
Starter:	0,1 % 0,07 %	TEMED APS

5½ l Puffer wurde während der Polymerisation des Gels in der Elektrophorese-Einheit auf 50 °C vorgeheizt. Zum Auftragen der Proben wurde die obere Pufferkammer auf dem Gel befestigt und mit vorgeheiztem Puffer gefüllt. Die Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit Auftragspuffer AP* gemischt und in die Probenauftragstaschen gegeben. Der Auftragspuffer AP* unterscheidet sich vom Auftragspuffer AP in der Zugabe von Glyzerin anstelle von Triton X-100, da er für eine vertikale Gelelektrophorese verwendet wird, sowie im verwendeten Puffer.

8 M	Harnstoff
0,2 x	TAE
0,01 %	Bromphenolblau
0,01 %	Xylencyanol
50 %	Glyzerin
	8 M 0,2 x 0,01 % 0,01 % 50 %

Das Gel mit den Proben wurde dann in die Elektrophorese-Einheit mit dem vorgeheizten Puffer gehängt und die Elektrophorese sofort gestartet, da die Proben sonst durch die Erwärmung in das obere Pufferbad diffundiert wären.

Die Elektrophorese wurde bei 300 V und 50-40 mA zunächst für 1 h bei weiterer Temperierung auf 50 °C durchgeführt. Bei dieser Temperatur sind die Proben im Gel denaturiert, und die Psoralenverknüpften Doppelstränge laufen als Einzelstränge doppelter Länge und werden so von den nicht verknüpften Molekülen getrennt.

Nach 1 h wurde die Temperierung abgestellt und die Elektrophorese für weitere $2\frac{1}{2}$ h bei 300 V und ca. 40-20 mA fortgesetzt. Dabei sank die Temperatur im Gel um etwa 10 K. Diese Abkühlung folgt einer Exponentialfunktion, ist aber näherungsweise linear, wenn die Raumtemperatur niedrig genug ist. Deshalb lief während einer zeitlichen TGGE die Raumkühlung, um die Raumtemperatur bei etwa 20 °C zu halten. Die Psoralen-verknüpften DNA-Moleküle renaturierten dann im Bereich ihrer Übergangstemperatur T_m (Reaktion 1. Ordnung) und liefen als Doppelstränge schneller weiter. Auf diese Weise konnten Moleküle mit unterschiedlichen T_m-Werten voneinander getrennt werden.

Zur Kontrolle wurde ein Pt-100-Sensor in das temperierte Pufferbad gehängt und der Temperaturverlauf über ein Thermometer (Omnitherm Pt-100) mit einem Y-t-Schreiber (LKB 2210, Kipp & Zonen, Delft, NL) protokolliert. Dabei waren die Temperaturen im Pufferbad um etwa 1 °C niedriger als im Thermostaten.

Die Temperaturen und Laufzeiten für diese zeitliche TGGE mußten für das zu analysierende Fragment sorgfältig ausgewählt werden. Die Temperatur für den denaturierenden Vorlauf muß so gewählt sein, daß die Proben im verwendeten Puffer gerade denaturiert sind. Bei einer zu niedrigen Temperatur kommt es nicht zur Denaturierung, bei einer zu hohen Temperatur werden im anschließenden zeitlichen Gradienten nicht mehr die Renaturierungstemperaturen aller Moleküle erreicht. Der denaturierende Vorlauf in der zeitlichen TGGE muß so lange sein, daß ein ausreichender Abstand zwischen Psoralen-verknüpften und nicht verknüpften Molekülen geschaffen wird. Im Anschließenden Gradienten dürfen die zuerst renaturierenden Homoduplices die nicht verknüpften Einzelstränge nicht überholen, da sonst das Ergebnis des Gels nicht mehr sicher interpretiert werden kann. Die nicht verknüpften Einzelstränge können im Gel nicht renaturieren (Reaktion 2. Ordnung). Die Abkühlungsgeschwindigkeit konnte etwas verringert werden, indem eine Seite der Elektrophorese-Einheit mit Styropor abgedeckt wurde.

Um die Verarmung des Puffers während der Elektrophorese zu verringern, wurde dieser mittels einer kleinen Aquarienpumpe aus dem unteren Pufferbad in das obere Pufferbad umgepumpt und konnte durch eine kleine Öffnung im oberen Pufferbad wieder ins untere Pufferbad zurücklaufen. Da beides nur tropfenweise geschah, wurde der Elektrophoresestrom dadurch nur unwesentlich beeinflußt. Wegen der Verarmung des Puffers konnte auch kein 0,2 x Na-TAE Puffer wie bei den anderen Gelelektrophoresen verwendet werden.

3.7.3 Nachweis von Nukleinsäuren in Gelen

3.7.3.1 Ethidiumbromid-Färbung

Ethidiumbromid fluoresziert stärker, wenn es zwischen die Basenstapel von Nukleinsäuren interkaliert ist. Damit können Nukleinsäuren in ethidiumbromidgefärbten Gelen unter UV-Licht nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze liegt bei etwa 10 ng doppelsträngiger DNA. In der Ethidiumbromid-Färbung werden die Nukleinsäuren nicht zerstört und können nach einer Gelelution weiterverwendet werden.

Bei Agarosegelen wurden 0,5 μ g/ml Ethidiumbromid schon zum Gießen hinzugefügt, Polyacrylamid-Gele wurden 5 min in einer Ethidiumbromid-Lösung von 2 μ g/ml geschwenkt und anschließend kurz gewässert. Die Gele wurden dann auf einem UV-Leuchttisch (UVT 2035, Herolab, Leon-Rot) mit UV-Licht von 302 nm beleuchtet und die fluoreszierenden Nukleinsäurebanden mit einer Polaroid-Kamera mit Orangefilter dokumentiert.

3.7.3.2 Silberfärbung

Für Polyacrylamid-Gele wurde eine ursprünglich für Proteingele entwickelte (Sammons *et al.*, 1981) und für Nukleinsäuren modifizierte (Schumacher *et al.*, 1986) Silberfärbemethode verwendet. Mit dieser Methode konnten unter optimalen Bedingungen noch Nukleinsäurebanden von 30 pg nachgewiesen werden. Damit ist diese Methode deutlich empfindlicher als die Ethidiumbromid-Färbung. Zudem können die Gele gefärbt gelagert werden. Die Zeiten für die einzelnen Inkubationsschritte konnten bei den kleinen Gelen deutlich verkürzt werden.

Die Silberfärbung besteht aus sechs Schritten:

Fixieren: 5 min	in 10 % Eth	hanol, 0,5 % Essigsäure Ethanol verringert die Porengröße des Gels, so daß die Nuklein- säuren nicht mehr diffundieren können. Nach der Fixierung war auch eine effektive Gelelution nicht mehr möglich.				
Färben: 10 min	in 1,9 g/l A	gNO ₃ Die positiv geladenen Silberionen lagern sich an das negativ ge- ladene Rückgrat der Nukleinsäuren an. Die Silbernitratlösung wurde mehrfach verwendet, mit einem Liter konnten über 100 kleine Gele gefärbt werden.				
Waschen: 3 mal 10 s	in H ₂ O	Überschüssiges Silber wird ausgewaschen.				
Entwickeln: 10 min	in 15 g/l Na	aOH, 80 mg/l NaBH ₄ , 4 ml/l Formaldehydlösung (mind. 36,5 %) Formaldehyd reagiert unter der Katalyse von Natriumborhydrid im basischen Bereich zu Ameisensäure und Methanol, Methanol reduziert die Silberionen zu elementarem Silber:				
$2 H_2CO + H_2O \rightarrow HCOOH + H_3COH$, mit H ⁻ aus NaBH ₄ als Katalysator						
$H_3COH + 2 A$	$g^{+} + 2 \text{ OH}^{-}$ -	$\rightarrow 2 \text{ Ag}^0 + 2 \text{ H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{CO}$				
		Der Entwickler wurde meist frisch angesetzt und höchstens zwei Tage benutzt oder mit Formaldehyd aufgefrischt.				
Stoppen: 5 min	in 7,5 g/l N	a ₂ CO ₃ Senkt den pH-Wert im Gel, damit stoppt die Entwicklung.				
Wässern: 5 min	in H ₂ O					

3.8 Gelelutionen

3.8.1 Gelelution aus Agarosegelen durch Agaroseverdau

Zur Gewinnung von DNA aus Agarosegelen wurden unter UV-Licht mit einem Skalpell die gewünschten, im Ethidiumbromid fluoreszierenden Banden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und auf einer Feinwaage gewogen. 4% (w/vol) Agarasepuffer wurden dazugegeben und auf 45 °C erwärmt. Nach Zugabe von 3 μ l Agarase (ca. 0,6 - 3 U für 60 - 300 mg Agarose) wurde die *low-melting*-Agarose für 3 h verdaut. Anschließend wurde 1/10 Volumen 3 M NaAc als Fällsalz hinzugegeben, für 15 min auf Eis gekühlt und durch 15-minütiges zentrifugieren in einer Tischzentrifuge die nicht verdaute Agarose abgetrennt. Der Überstand wurde mit 3 Volumen Ethanol gefällt.

3.8.2 Gelelution aus Polyacrylamid-Gelen

Polyacrylamid-Gele erlauben eine feinere Auflösung von Nukleinsäuren als Agarosegele, sind jedoch etwas schwieriger zu eluieren.

3.8.2.1 Gelaufreinigung von RNA-Transkripten

RNA-Transkripte wurden in einem Polyacrylamid-Gel mit einer großen Probenauftragstasche (wie für senkrechte TGGEs) mit der TGGE-Apparatur aufgetrennt, ethidiumbromidgefärbt, die Hauptbande auf der Rückseite der Gelbondfolie auf einem UV-Leuchttisch markiert, danach in kleinen Stücken ausgeschnitten und in 200 μ l RNA-Elutionspuffer über Nacht bei 4 °C in einem Mikroreaktionsgefäß-Schüttler eluiert.

RNA-Elutionspuffer: 2 mM	EDTA
0,1 %	SDS
0,3 M	NaAc

Die Gelstückchen wurden dann abzentrifugiert, die Elutionsflüssigkeit abgenommen und mit 3 Volumen Ethanol gefällt.

3.8.2.2 Gelaufreinigung von DNA-Oligonukleotiden

Die gekauften Primer wurden HPLC-gereinigt geliefert und waren ohne weitere Aufreinigung verwendbar. Für die in Eigensynthese hergestellten Primer war die Aufreinigung über NAPTM-25 Säulchen (Pharmacia, Freiburg) ausreichend.

Von den Primern V3P1, V3M1A und V3M1P wurden jeweils ein Aliquot zusätzlich gelaufgereinigt, um zu überprüfen, ob dies in der PCR zu weniger fehlerhaften Produkten führt. Dazu wurden die Primer-Aliquots in einer Speed-Vac (Savant) lyophilisiert, da eine Fällung von so kurzen Oligonukleotiden mit Ethanol quantitativ nicht möglich ist, und in je 100 µl 90 % Formamid gelöst.

Zur Aufreinigung wurde folgendes Polyacrylamid-Gel mit einer präparativen Probenauftragstasche von 10 cm Länge verwendet:

Oligo-Gel:	26 % 0,5 x	Acrylamid : Bisacrylamid (19:1) TAE		
Starter:	0,1 % 0,07 %	TEMED APS		

Das Gel konnte 1½ h bei 50 °C polymerisieren und wurde anschließend für 30 min bei 300 V vorelektrophoretisiert. Dann wurde der Primer in 90 % Formamid gelöst in die präparative Probenauftragstasche gegeben und bei 50 °C mit 220 V und ca. 50 mA für 90 min elektrophoretisiert.

Das Gel wurde 10 min in einer Lösung von 1 μ g/ml Ethidiumbromid gefärbt und die Hauptbande auf einem UV-Leuchttisch ausgeschnitten. Bei der Gelelution des Psoralenprimers V3M1P wurde das Gel auf eine Maske gelegt, die nur einige Streifen UV-Licht durchließ, um photochemische Reaktionen des Psoralens möglichst zu vermeiden.

Ein anderes Verfahren besteht darin, das Gel auf eine mit einer Polyethylenfolie geschützten, im UV-Licht fluoreszierenden Kieselgelplatte zu legen und mit einer UV-Handlampe mit 260 nm zu beleuchten. Durch die UV-Absorption der Nukleinsäuren entsteht dabei ein Fluoreszenz-Schatten, über dem das Gel ausgeschnitten werden kann.

Der ausgeschnittene Gelstreifen wurde zerkleinert in ein 12 ml Greinerröhrchen gegeben, 6 ml TE mit 800 mM LiCl dazugegeben und 3 h bei 60 °C inkubiert, wobei die Greinerröhrchen alle 15 min geschüttelt wurden. Danach wurde der Überstand abgenommen, mittels einer mit silanisierter Glaswolle verstopften Spritze mögliche Gelstückchen abfiltriert und mit 4 Volumen Ethanol/Azeton (3:1) bei –20 °C über Nacht gefällt. Die verbliebenen Gelstückchen wurden auf die gleiche Weise noch einmal nacheluiert.

Die Fällungen wurden 30 min bei 4 °C mit 5000 min⁻¹ (ca. 2500 g) in einer Zentrifuge Z 320 K (Hermle GmbH & Co., Gosheim) zentrifugiert, die Überstände abgegossen, die Sedimente getrocknet und in je 100 μ l TE gelöst. Möglicherweise noch vorhandene Gelreste wurden abzentrifugiert, die Überstände in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und die Konzentrationen spektralphotometrisch bestimmt.

3.8.2.3 Gelelution von PCR-Produkten

Zur Klonierung vorgesehene, an den Enden mit Bam H I restritionsverdaute PCR-Produkte wurden in einem 5 %-Polyacrylamid-Gel in einer Bioradkammer bei 220 V und ca. 45 mA für 45 min bei Raumtemperatur elektrophoretisiert, 5 min in $2 \mu g/\mu l$ Ethidiumbromid gefärbt, auf einem UV-Leuchttisch ausgeschnitten und die Gelstückchen über Nacht in je 50 μl TE bei Raumtemperatur eluiert. Die Eluate wurden dann mit Ethanol gefällt und ihre Qualität in einem Polyacrylamid-Gel überprüft.

Zur gezielten Reamplifikation von Mutationen wurden psoralenvernetzte Hybride in der parallelen D/R-TGGE aufgetrennt, diese dann mit Ethidiumbromid gefärbt, die Einzelstrangbanden auf der Rückseite der Gelbondfolie angezeichnet und das Gel zur Lösung der Psoralen-Bindungen 3 min auf dem 302 nm-UV-Tisch belassen. Oberhalb der Einzelstrangbanden wurden auf Millimeterpapier jeweils ca. 30 Gelstückchen von 2 mm Breite und etwa 0,5 mm Höhe ausgeschnitten und in je 20 μ l TE über Nacht bei Raumtemperatur eluiert. Davon wurden für die Reamplifikationen jeweils 2 μ l ohne weitere Vorbehandlung als Matrize in der PCR eingesetzt.

3.9 Sequenzierungen

Sequenzierungen von PCR-Produkten oder in Plasmide einklonierte DNA-Fragmente wurden vom Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit einem ABI 373A-Sequenzierautomaten (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt. Dazu wurden die Proben zuvor mit QIAquick Säulchen (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

3.10 Computeralgorithmen

Für die Bearbeitung von Sequenzdaten stand das GCG-Programmpaket (Devereux *et al.*, 1984), Version 7,0 auf einer Alpha-VAX (DEC) zur Verfügung. Hiervon wurden die Programme PILEUP zum Vergleich mehrerer Sequenzen und PRETTY zur Darstellung der von PILEUP erzeugten Sequenzvergleiche verwendet. Primer wurden mit dem Programm BESTFIT auf Selbstkomplementarität, auf Komplementarität zum Gegenprimer und auf mögliche zusätzliche komplementäre Bereiche in den verwendeten Plasmiden untersucht. In der Regel bestand die Komplementarität der Primer nur im Bereich von Restriktionssequenzen mit der Länge von 6 Nukleotiden, was die PCR nicht negativ beeinflußt.

Zur Berechnung der thermodynamischen Stabilitäten und Denaturierungskurven von DNA-Doppelsträngen stand das POLAND-Programm (Steger, 1994; http://www.biophys.uni-duesseldorf.de/PO-LAND/poland.html) mit einem Algorithmus von D. Poland (Poland, 1974) zur Verfügung, welches mit einer semiempirischen Formel für die Gelmobilität (Lerman *et al.*, 1984) auch die Simulierung einer senkrechten TGGE erlaubt. Basierend auf diesem Programm wurde das Programm MISMATCH entwickelt, welches Aussagen über die Nachweisbarkeit von Punktmutationen in senkrechter, zeitlicher und paralleler TGGE erlaubt (Wulfert, 1992; Wiese *et al.*, 1995).

Zur Berechnung wurden mit dem Programm POLAND zunächst ein geeigneter Temperaturbereich ausgewählt, mit der höchsten Temperatur etwas oberhalb der Dissoziationstemperatur der DNA in die Einzelstränge. Diese Parameter wurden dann in die Parameterdatei mismatch.cmd des MIS-MATCH-Programms eingegeben und dieses aufgrund der langen Rechenzeiten im Hintergrund gestartet. Für die Ausgabe stehen verschiedene Optionen zur Verfügung, unter anderem ein Listenformat (GLE=y), welches mit einem entsprechenden Programm vom GLE-Grafik-Interface (ftp://ftp.rz.uni-duesseldorf.de/pub/graphics/gle/) dargestellt werden kann.

Für die Berechnungen mit POLAND und MISMATCH wurden folgende Parameter verwendet:

Input	=	[]	Name der Datei mit der zu berechnenden Sequenz
Output	=	[]	Name der Datei für die Ergebnisse
Begin	=	0	Anfang der zu berechnenden Teilsequenz
End	=	0	Ende der zu berechnenden Teilsequenz
first	=	127	Position des ersten Codons in der Sequenz, z.B. Beginn des ORF
Mismatch	=	-1	Default-Parameter für "kein Mismatch"
Steps= 0,	Ο,	1	Schrittweite, "0" ist Default-Parameter für "Anfang" und "Ende"

Die Angaben Begin, End und first beziehen sich auf die absolute Position in der Eingangssequenz, die Angaben für Mismatch und Steps beziehen sich auf die Positionen relativ zu der durch Begin und End bezeichneten Teilsequenz.

batch	=	Y Rechnen im Hintergrund, Kontrolle über Datei MISMATCH.PRT			
GLE	=	y zusätzliche Ausgaben in Formaten, die GLE lesen kann			
3DPlot	=	Ausgabe der Daten für den 3D-Plot (erzeugt große Dateien)			
GelPlot	=	y Ausgabe der berechneten Gelmobilitäten			
MeltPlot	=	n Ausgabe der berechneten Schmelzkurven bei 260 nm und 280 nm			
TempPlot	=	y Ausgabe der mittleren Schmelztemperatur für jedes Basenpaar			
MisPlot	=	y $n = nur POLAND$,			
		Y = Berechnung der Nachweisbarkeit von Mutationen			
Temperatu	re	= 50.0, 70.0, 0.5 von, bis, Schrittweite			
algorithm	=	f schneller Algorithmus (nach Fixman und Freire, 1977)			
Thermo	=	G Parameter für DNA in 19 mM NaCl (nach Gotoh <i>et al.,</i> 1983)			
DScorr	=	1.0, 1.0, 1.0 Korrektur der Δ S-Werte			
Sigma	=	1E-3			
C0	=	1.e-8 Konzentration der Einzelstränge			
Beta	=	1.e-3 Dissoziationskonstante für Strangtrennung			
Loop	=	p Berechnung interner Loops (nach Poland, 1974)			
Lr = 40, 90),	200 Normierungsfaktoren für die Berechnung der Gelmobilitäten			
Crosslink	=	3 Angabe für kovalente Verknüpfung der Stränge mit Psoralen			

4 Ergebnisse

4.1 Entwicklung einer kleinen mit Peltier-Modulen betriebenen TGGE

Zur Erzeugung eines Temperaturgradienten für die Temperaturgradienten-Gelelektrophorese (TGGE) wird eine Metallplatte an zwei gegenüberliegenden Kanten temperiert. Zunächst wurden dafür thermostatisierte Wasserkreisläufe verwendet, die wegen ihrer hohen Wärmekapazität nur langsame Temperaturwechsel zuließen und zudem viel Platz im Labor benötigten. Zur Minimierung von Wärmeverlusten und damit verbundenen Ungenauigkeiten in der Temperatureinstellung mußten dabei die Schlauchverbindungen zwischen Temperaturgradientenplatte und thermostatisierten Wasserbädern möglichst kurz und gegen Wärmeverluste isoliert sein.

Als Alternative wurden erfolgreich Peltier-Module zur Temperierung eingesetzt, wodurch die TGGE-Anlage flexibler wurde, da die Temperaturgradientenplatte über lange Kabel mit den Stromversorgungen verbunden werden konnten (Wulfert, 1992). Die benötigten Netzgeräte für eine Temperaturgradientenplatte von 15 cm x 15 cm waren jedoch nicht kleiner als die zuvor benötigten Wasserbäder. Zudem wurden an jeder Kante fünf Peltier-Module benötigt, deren Abgleich aufwendig war. Die Erfahrungen mit dieser Peltier-TGGE legten die Entwicklung einer kleineren TGGE-Apparatur mit einem Temperaturgradienten auf ca. 5 cm nahe.

4.1.1 Überlegungen zur Größe der neuen Gradientenplatte

Wird eine rechteckige Platte an gegenüberliegenden Kanten auf verschiedene Temperaturen gebracht, so stellt sich dazwischen ein linearer Temperaturverlauf ein (Rosenbaum und Riesner, 1987). Bei der TGGE wird dieser konstante Temperaturgradient durch die im Gel entstehende Joule'sche Wärme verformt. Die maximale Abweichung der Temperatur vom linearen Temperaturverlauf ist dabei ein Maß für die Qualität des Temperaturgradientens. Diese sollte nicht schlechter sein als bei den bisherigen Temperaturgradientenplatten.

Die Wärmestromdichte j(x) in einer Dimension ist proportional zum Temperaturgradienten $\frac{dT}{dx}$:

$$j(x) = -\lambda \frac{dT}{dx}$$

Dabei ist λ die spezifische Wärmeleitfähigkeit des verwendeten Materials. Während der Gelelektrophorese entsteht im Gel durch den Stromfluß Wärme. Unter Berücksichtigung der an der wärmeren Kante bei x = s zugeführten thermischen Leistung P₂ und der gleichmäßig über den Gradientenbereich als Wärme zugeführten elektrischen Verlustleistung P_{el} ergibt sich bei einem Plattenquerschnitt von A und einer Länge des Temperaturgradientens von s die Wärmestromdichte j(x) zu:

$$j(x) = -\frac{P_2}{A} - \frac{P_{el}}{A}(1-\frac{x}{s}) = -\lambda \frac{dT}{dx}$$

Durch Integration erhält man den Temperaturverlauf T(x):

$$T(x) = T(0) + \frac{P_2}{A\lambda}x + \frac{P_{el}}{A\lambda}(x - \frac{x^2}{2s})$$

Mit Randtemperaturen von $T(0) = T_1$ und $T(s) = T_2$ erhält man einen Temperaturunterschied von $\Delta T = T_2 - T_1$, damit ergibt sich für den mittleren Wärmefluß P_m:

$$P_m = A\lambda \frac{\Delta T}{s}$$

Die auf der kälteren Plattenkante abzuführende Wärmemenge P_1 und die an der wärmeren Kante der Platte benötigte Heizleistung P_2 berechnet sich zu:

$$P_1 = P_m + P_{el}/2$$
 $P_2 = P_m - P_{el}/2$

Der Term $P_{el} x^2/2A\lambda s$ beschreibt die Abweichung vom linearen Temperaturverlauf, sie ist bei x = s/2 maximal und beträgt dort:

$$T_{ab,max} = \frac{P_{el}s}{8A\lambda} = \frac{\Delta T P_{el}}{8P_m}$$

Für die Gelelektrophorese ist die elektrische Feldstärke E = U/s entscheidend, sie ist der Quotient aus der im Bereich des Temperaturgradienten abfallenden Spannung U und der Länge s dieses Gradientens. Bei gleichbleibender elektrischer Feldstärke ist dann die über der Gradientenplatte entstehende Joule'sche Wärme P_{el} proportional zur Fläche b·s der Gradientenplatte. Dabei ergibt sich für die pro Flächeneinheit entstehende Wärme P' = P_{el} / b s. Mit der Dicke d der Gradientenplatte ergibt sich ihr Querschnitt A zu A = b d und damit gilt:

$$T_{ab,max} = \frac{P' s^2}{8 d \lambda}$$

Eine geringe Abweichung vom linearen Temperaturverlauf kann also am besten durch die Verkleinerung der Länge s des Gradientens und damit der effektiven Trennstrecke erreicht werden. Diese sollte jedoch nicht zu klein werden, damit die Handhabbarkeit der TGGE-Anlage gewährleistet bleibt. Die weiteren Faktoren d und λ beeinflussen den durch die Platte fließenden Wärmestrom. Ein möglichst großer Wärmestrom verbessert die Genauigkeit des Temperaturgradientens, jedoch ist die auf der kalten Seite der Gradientenplatte abführbare Wärmemenge durch die Leistungsfähigkeit der verwendeten Peltiermodule beschränkt.

Geeignete Peltiermodule (CP1.4-35-045L, AMS, München) haben bei einer Größe von 15 mm x 30 mm eine maximale Leistungsfähigkeit von 19,0 W. Dabei wird eine maximalen Versorgungsspannung von $U_{max} = 4,24$ V und einem Maximalstrom von $I_{max} = 8,5$ A benötigt. Jeweils zwei dieser Peltiermodule in Serienschaltung können mit einer Steuer- und Versorgungseinheit (H 022 RPK 04, Peltron, Nürnberg) betrieben werden. Die Temperaturmessung erfolgt dabei über einen PT 100-Widerstände mit Vierleiteranschluß. Diese konnten unter der Gradientenplatte im Abstand s an den Grenzen des linearen Temperaturbereiches angebracht werden.

Bei einer Breite des Gradientens von b = 60 mm und einer Länge von s = 40 mm konnte für die Gradientenplatte eine Aluminiumplatte ($\lambda = 230 \text{ W/mK}$) mit einer Dicke von d = 1,5 mm gewählt werden. Bei einer im Gel entstehenden Joule'schen Wärme von P' = 0,06 W/cm² ergeben sich dann folgende Werte (Tabelle 4.1):

	<i>Kupferplatte</i> (Rosenbaum und Riesner, 1987)	<i>Aluminiumplatte</i> (Qiagen, Hilden)	<i>groβe Peltier- TGGE</i> (Wulfert, 1992)	Kleine Peltier- TGGE
Länge des Gradientens s	130 mm	100 mm	100 mm	40 mm
Plattenbreite b	210 mm	210 mm	150 mm	60 mm
Plattendicke d	5 mm	10 mm	5 mm	1,5 mm
Spezifische Wärmeleitfähigkeit λ	385 W/mK (Kupfer)	230 W/mK (Aluminium)	230 W/mK (Aluminium)	230 W/mK (Aluminium)
mittlerer Wärmefluß P_m bei $\Delta T = 40 \text{ K}$	92 W	193 W	69 W	20,7 W
maximale Temperatur- abweichung $T_{ab,max}$	0,66 K	0,33 K	0,65 K	0,7 K
Maximale Kühlleistung P _{max}	Wasserbäder, ca. 250 W	Wasserbäder, ca. 250 W	Peltiermodule, 192,5 W	Peltiermodule, 38 W

Tab. 4.1: Vergleich der Parameter der verschiedenen Temperaturgradienten-Platten für die TGGE

4.1.2 Konstruktion der neuen TGGE-Anlage

Nach Festlegung der geometrischen Parameter konnte die kleine TGGE-Anlage konstruiert werden. Unter zwei Kanten der Gradientenplatte mit einer Gesamtgröße von 6 cm x 6 cm wurden Aluminiumstege geschraubt, über die der Wärmefluß von und zu den Peltiermodulen gewährleistet wird. Der eigentliche Gradientenbereich behält dabei eine Länge von 44 mm, im Abstand von 40 mm wurden unter der Gradientenplatte Pt-100-Temperatursensoren angebracht. Damit kann der Temperaturgradient auf 4 cm exakt eingestellt werden. Unter den Peltiermodulen befindet sich ein großer Kühlkörper aus Aluminium, dessen Kühlleistung durch einen Ventilator erhöht wird und der an zwei Seiten Aussparungen für die Zuleitungen zu den Peltiermodulen und den Temperatursensoren hat (Abb. 4.1). Das ganze ist in ein Polyacrylglasgehäuse eingepaßt, dessen Oberfläche bündig mit der Gradientenplatte abschließt. Die Gradientenplatte wird mittels einer selbstklebende Teflonfolie (PTFE Klebefolie Typ 3-15, Von der Brüggen, Köln) elektrisch vom Gel isoliert.

Die Pufferbäder haben jeweils ein Volumen von 0,2 l, was in Relation zur Gelgröße den 1,2 l der herkömmlichen Geräte entspricht. Durch den quadratischen Aufbau des Gradientenblocks ist durch Umsetzen der Pufferbäder ein einfachen Wechsel zwischen paralleler und senkrechter TGGE möglich (Abb. 4.2).

Die elektrische Verbindung zwischen der Gradientenplatte und den Steuergeräten wurde über eine flexible, 27-polige Steuerleitung und einen 15-poligen AMP-Steckverbinder hergestellt. Um die großen Ströme von bis zu 8,5 A der Peltier-Module verlustarm leiten zu können wurden für deren Anschlüsse jeweils 4 Adern parallel geschaltet.



Abb. 4.1: Aufbau des Gradientenblocks der kleinen TGGE-Anlage. Die Gradientenplatte ist auf Stege geschraubt, die den Wärmeübergang von den Plattenkanten zu den Peltier-Modulen (grau) erlauben. Darunter befindet sich ein großer Kühlkörper aus Aluminium zur Ableitung der Abwärme, die in den Peltier-Module als elektrische Verlustwärme entsteht. Diese Wärmeabfuhr wird durch einen Lüfter erhöht. Der Kühlblock enthält seitliche Aussparungen zur Aufnahme der Kabel für die Peltier-Module und die Temperatursensoren. Alle Metallteile sind geerdet.

Der Gradientenblock ist in ein quadratisches Polyacrylglasgehäuse eingepaßt, welches unten und seitlich um 90° versetzte Öffnungen für den Kühl-Luftstrom hat. Die Oberfläche schließt plan mit der Gradientenplatte ab und ist durch eine aufgeklebte temperaturbeständige Teflonfolie elektrisch vom Gel isoliert.



Abb. 4.2: Pufferbehälter für die TGGE aus Polyacrylglas. Die seitlichen Öffnungen sowie die abgeschrägten Pufferkammern ermöglichen den Kühlluftstrom in Abhängigkeit von der Richtung der TGGE (parallel oder senkrecht). Dazu wird der Pufferbehälter entsprechend um den quadratische Gradientenblock positioniert. Die Elektrophoresespannung wird über Kontakte im Deckel (nicht dargestellt) hergestellt; der Maßstab ist hier nur halb so groß wie in Abb. 4.1.



Abb. 4.3: Übersicht über die kleine TGGE-Anlage. Im Hintergrund zwei Temperaturregelgeräte für die Temperatureinstellung an der Gradientenplatte. Im Vordergrund der Gradientenblock im Pufferbehälter.

4.1.3 Erster Einsatz der neuen TGGE-Anlage

Die Durchführung einer TGGE wurde auf die verkleinerten Maße der Anlage angepaßt: Es wurden Gele mit einer auf 0,5 mm verringerten Dicke verwendet, für den Kontakt zwischen den Laufpuffern und dem Gel wurden anstelle von Schwammtücher aus einem deutlich dünneren saugfähigen Fliestuch Stücke von 8 cm x 8 cm herausgeschnitten und vor der ersten Verwendung autoklaviert.

Bei der Planung der Plattengröße war eine gleich große elektrische Feldstärke wie in den großen TGGE-Anlagen vorausgesetzt worden, was etwa einer Elektrophoresespannung von 100 V entspricht. Die Elektrophoresen wurden dann jedoch von Anfang an erfolgreich mit 300 V durchgeführt, was die Laufzeit der Gelelektrophoresen noch einmal deutlich verkürzte, ohne die Qualität des Temperaturgradienten merklich zu verschlechtern. Dies war möglich, da die kleinen Gele deutlich dünner sind als die großen Gele. Damit sind auch die im Gel fließenden Ströme kleiner, wo-durch wiederum die entstehende Verlustleistung P_{el} kleiner ist als zuvor angenommen.

Ursprünglich war angenommen worden, daß bei gleichbleibender Auflösung der Gele die kleine TGGE nur jeweils einen entsprechenden Ausschnitt der großen TGGEs darstellen kann. Dies hätte eine sorgfältigere Auswahl der verwendeten Temperaturbereiche erfordert. Es hat sich jedoch gezeigt, daß die Banden in der TGGE durch die geringere Geldicke schärfer sind und die Auflösung mit der einer großen TGGE vergleichbar ist.

Die erste senkrechte TGGE mit der neuen, kleinen TGGE-Anlage zeigt Abb. 4.4. Hier ist als Beispiel ein 138 bp-PCR-Produkt des humanen PrP-Gens aufgetragen, bei der neben dem Wildtyp eine Mutation im Codon 102 vorliegt. (Primer 1+ und 5-, Plasmide JC-5 und JB-10, Wiese, 1996).



Abb. 4.4: Erste senkrechte TGGE mit der kleinen Anlage. Der Temperaturgradient wurde auf Randtemperaturen von 35 °C und 75 °C eingestellt, die TGGE wurde bei 300 V für 15 min durchgeführt. Rechts und links ist jeweils Marker M aufgetragen.

Die kleinen Dimensionen der neuen TGGE-Anlage ermöglichten kürzere Laufzeiten sowie die Verwendung geringerer Probenmengen im Vergleich zu herkömmlichen Gelelektrophoresen. Daher wurde sie im folgenden standardmäßig auch für Gelelektrophoresen verwendet, die keinen Temperaturgradienten benötigen, wie z.B. der gelelektrophoretische Überprüfung von PCR-Produkten.

Weitere Anwendungen sind in den nachfolgenden Kapiteln dieser Arbeit beschrieben.

4.2 Anreicherung von Mutationen in geringer Konzentration

Mutationen im Genom des HIV liegen teilweise nur in geringen Konzentrationen in der viralen Nukleinsäure vor. Es sollte ein PCR/TGGE-System entwickelt werden, mit dem sich solche Mutationen im V3-Loop nachweisen und soweit anreichern lassen, daß sie durch Sequenzierung charakterisierbar sind.

4.2.1 Herstellung eines Sequenzstandards

Zum Nachweis von Mutationen mit der TGGE wird eine Standardsequenz als Sonde benötigt. Hierfür stand zunächst das Plasmid pNLA1 (Strebel *et al.*, 1987; Schaal *et al.*, 1993) zur Verfügung. Dieses Plasmid enthält einen Teil der HIV-Sequenz des Plasmides pNL4-3 (Adachi *et al.*, 1986), jedoch ohne die Gene für *gag* und *pol*. Da beide LTRs (*long terminal repeats*) vorhanden sind, sind transgene Organismen mit diesem Plasmid laut Gentechnikgesetz der Sicherheitsstufe S2 zuzuordnen.



Abb. 4.5: Struktur der Inserts der zur Verfügung stehenden HIV-Plasmide: Das Plasmid pNLA1 enthält nach dem 5'LTR nur noch den 3'-Teil des HIV-Genoms. Das Plasmid pMW1 enthält nur einen Teil des *env*-Gens mit den hypervariablen Bereichen, die als schwarze Kästchen eingezeichnet sind, der V3-Loop ist mit V3 bezeichnet. Bezeichnung der HIV-Gene (nach Morrow *et al.*, 1994): 5'LTR, 5' *long terminal repeat*, gag, *group-specific antigen*; pol,

polymerase; vif, virion infectivity factor; vpr, viral protein R; vpu, viral protein U; tat, transactivator of transcription; rev, regulator of virion protein; env, envelope; nef, negative regulatory factor; 3'LTR, 3' long terminal repeat.

Von diesem Plasmid wurde ein Abschnitt des *env*-Gens mittels PCR amplifiziert, der die fünf hypervariablen Bereiche des gp120-Moleküls enthält. Die dazu verwendeten Primer Bam-401b und Bam-504 wurden der Literatur entnommen (Ball *et al.*, 1994) und je um eine Bam H I-Restriktionsschnittstelle an ihren 5'-Enden erweitert. Die PCR-Produkte vom Plasmid pNLA1 mit diesen Primern haben eine Länge von 1288 bp, davon wurden 1274 bp über die Bam H I-Restriktionsschnittstelle in den Vektor pBS II KS+ einkloniert(Abb. 4.6). Die damit transformierten Bakterien entsprechen der Sicherheitsstufe S1.

Es wurden drei Klone gewonnen, von denen die Bereiche um den V3-Loop mit den Primern V3P4 und V3M4 (siehe Kap. 4.2.2) sequenziert wurden. Durch Verdau mit der Restriktionsendonuklease Hae III konnte die Klonierungsrichtung bestimmt werden (Abb. 4.6 und 4.7): Die Fragmente, in de-

nen die Ligationspunkte (Bam H I-Restriktionsschnittstellen) liegen, enthalten jeweils einen Teil des Vektors (60 bzw. 19 Basenpaare) sowie einen Teil des einklonierten Fragmentes (836 bzw. 292 Basenpaare). Dadurch ergeben sich Fragmentlängen von (60+836=) 896 Basenpaaren und (19+292=) 311 Basenpaaren bei pMW1-10 und pMW1-9 sowie (60+292=) 352 Basenpaaren und (19+836=) 855 Basenpaaren bei pMW1-12.



Abb. 4.6: Struktur der für die Sondenherstellung erzeugten Plasmide. In den Plasmiden pMW1-9 und pMW1-10 liegt der Plusstrang des Abschnittes des HIV-env-Gens (breite Kreisbögen) mit den fünf variablen Bereichen (schwarze Kästchen) hinter dem T7-Promotor des Vektors, beim Plasmid pMW1-12 wurde das Fragment anders herum einkloniert. Die Sequenz des einklonierten Fragmentes entspricht bei pMW1-10 der Ausgangssequenz, bei pMW1-9 gibt es durch PCR-Fehler zwei Basenaustausche (*). Hae III-Restriktionsschnittstellen wurden durch kleine Striche gekennzeichnet. Durch die unterschiedliche Klonierungsrichtung sind nach Verdau dieser Plasmide mit der Restriktionsendonuklease Hae II die Fragmente, die die Ligationspunkte enthalten, unterschiedlich lang.



Abb. 4.7: Bestimmung der Klonierungsrichtung der Plasmide pMW1-9, pMW1-10 und pMW1-12 durch Verdau mit der Restriktionsendonuklease Hae III. Als Marker M' wurde Hae III-verdautes pBR 322 verwendet. Es sind die Längen der Fragmente in Basenpaaren (bp) angegeben. pMW1-9 und pMW1-10 enthalten Fragmente mit 896 bp und 311 bp, pMW1-12 enthält statt dessen Fragmente mit 855 bp und 352 bp. Diese Längenunterschiede ergeben sich durch die unterschiedlichen Längen der ligierten Teilfragmente von 60 bzw. 19 Basenpaaren des Vektors und 836 bzw. 292 Basenpaaren des einklonierten Fragmentes.

pMW1-10 hat die Sequenz des Ursprungplasmids, sein HIV-Plusstrang liegt hinter dem T7-Promotor des Vektors. Dieses Plasmid wird im Folgenden als *wt* für Wildtyp bezeichnet. pMW1-9 enthält durch Fehler in der PCR vor der Klonierung C statt T an Position 7036 und G statt A an Position 7058 im Vergleich zum Ursprungsplasmid pNL4-3. Auf dessen Sequenz bezieht sich auch die Numerierung. Der Plus-Strang der HIV-Sequenz liegt ebenfalls hinter dem T7-Promotor des Vektors. Dieses Plasmid wird im Folgenden als *mut* für Mutation bezeichnet.

pMW1-12 enthält die HIV-Sequenz in umgekehrter Klonierungsrichtung, hier liegt der Minusstrang hinter dem T7-Promotor des Vektors. Dieses Plasmid wurde nicht weiter verwendet.

Von den Plasmiden pMW1-10 (*wt*) und pMW1-9 (*mut*) wurden Aliquots mit Eco R I linearisiert und davon 1:10-Verdünnungsreihen angefertigt. Als Matrize für PCRs wurde in der Regel eine Verdünnung von 8 pg/µl verwendet, das sind etwa 1,6·10⁶ Moleküle pro µl. Damit konnte die Anreicherung von Mutationen mittels PCR und TGGE etabliert werden.

4.2.2 Primer für die TGGE

4.2.2.1 Auswahl der Primer V3P1 und V3M1 für die TGGE-Analysen

Die Primer für die PCR mußten so gewählt werden, daß sich in den PCR-Produkten bei der TGGE alle möglichen Mutationen im V3-Loop nachweisen lassen. Dazu wurde zunächst je ein Primer vor und hinter dem V3-Loop ausgewählt, so daß diese noch nicht in den nächsten hypervariablen Bereichen liegen und keine störenden Komplementaritäten haben. Dies sind die Primer V3P1 und V3M1.

4.2.2.2 Auswahl der Primer V3P4 und V3M4 für geschachtelte PCRs

Die Amplifizierung der DNA muß an die in natürlichen Proben zu erwartenden Nukleinsäuremengen angepaßt werden. In einem Milliliter Blutplasma sind, je nach Viruslast des Patienten, bis zu 200 000 HI-Viren enthalten. Die untere Nachweisgrenze gebräuchlicher Messverfahren liegt derzeit bei 20 Viren/ml Plasma, wobei jedes Virus zwei RNA-Kopien enthält. Nach Aufreinigung der viralen RNA und reverser Transkription stehen entsprechend wenige Matrizen-Moleküle für die PCR zur Verfügung.

Da HIV ein Retrovirus ist, welches sein Genom ins Wirtsgenom integriert, ist es auch möglich, die DNA von infizierten Zellen als Ausgangssubstanz zu verwenden. Ein Milliliter Blut enthält beim gesunden Menschen über 500 000 CD4+ T-Lymphozyten. Im Verlauf der Infektion kann diese Zahl auf unter 200 000 Zellen/ml sinken, wobei nur ein Teil dieser Zellen das HIV-Genom integriert hat. Cerebrospinalflüssigkeit (Liquor) enthält normalerweise nahezu keine Zellen. In einem Milliliter sind hier unter Umständen nur einzelne integrierte HIV-Genome zu finden, und mehr als 10 ml Liquor können nicht ohne Probleme für den Patienten entnommen werden.

Aus diesen Gründen war von einer sehr geringen Zahl an Ausgangsmolekülen auszugehen. Solch geringe Mengen lassen sich in einer einzelnen PCR nicht reproduzierbar amplifizieren. Deshalb wurde hierfür eine geschachtelte PCR (*nested PCR*, Newton und Graham, 1994, Seite 59) etabliert. Hierbei wird zunächst eine PCR mit einem äußeren Primerpaar durchgeführt, deren Produkte werden dann in einer zweiten PCR mit einem innerhalb dieser äußeren Primer liegenden Primerpaar weiter amplifiziert. Auf diese Weise sind Amplifikationen von einzelnen Ausgangsmolekülen möglich. Da die Produktmenge der PCR mit den äußeren Primern als Ausgangsmaterial für mehrere PCRs mit

inneren Primern ausreichend ist, ist die erreichbare Gesamtmenge zu dem größer als bei einer einzelnen PCR. Als äußeres Primerpaar wurden zunächst die Primer V3P4 und V3M4 konstruiert (Abb. 4.8).



Abb. 4.8: Lage der verwendeten Primer um den V3-Loop. Die fünf hypervariablen Bereiche des env-Gens sind als schwarze Blöcke dargestellt, die Primer als Pfeile mit Spitze am 3'-Ende, nicht komplementäre Bereiche der Primer sind schräg dargestellt und eine 3'-Psoralengruppe beim Primer V3M1P als Punkt.

4.2.2.3 Auswahl weiterer Primerpaare für größere Spezifität und Klonierungen

Um eine Amplifikation des V3-Loops auch dann zu ermöglichen, wenn die vorhandenen Primer wegen möglicher Sequenzvariationen nicht mehr optimal passen, wurde zwei weitere Primerpaare entworfen, die jeweils 10 Nukleotide länger sind und damit eine geringere Spezifität zulassen.

Eine Verlängerung der Primer V3P1/V3M1 nach innen ergab die Primer V3P5 und V3M5. Diese erzielten in der PCR aber schlechtere Resultate als die ursprünglichen Primer. Deshalb wurden die Primer V3P5 und V3M5 nicht weiter verwendet. Eine Verlängerung der Primer V3P4 und V3M4 nach außen gab die Primer V3P8 und V3M8. Diese wurden erfolgreich in der PCR eingesetzt.

Schließlich entstanden die Primer V3P4B und V3M4B aus den Primern V3P4 und V3M4 durch Anhängen einer Bam H I-Restriktionserkennungssequenz an den 5'-Enden. Mit diesem Primerpaar war eine spätere Klonierung der PCR-Produkte möglich. Eine Übersicht über die Primer zeigt Abbildung 4.8. Dabei sind die Primer und die hypervariablen Regionen des HIV-*env*-Gens maßstabsgerecht eingezeichnet.

4.2.3 Berechnung der Nachweisbarkeit von Fehlpaarungen in der TGGE

4.2.3.1 Poland-Programm

Die temperaturabhängige Denaturierung von doppelsträngigen Nukleinsäuren läßt sich mit dem Programm POLAND von G. Steger berechnen (Steger, 1994). Dabei wird ein Algorithmus von D. Poland (Poland, 1974) verwendet sowie eine Näherungsformel (Fixman und Freire, 1977), mit der die Berechnung beschleunigt wird.

Mit diesem Programm wird zunächst der Denaturierungsgrad jeder Base eines vorgegebenen Doppelstranges in Abhängigkeit von der Temperatur berechnet. Das Ergebnis läßt sich in einem 3D-Plot darstellen: Auf der x-Achse sind die Positionen der Basenpaare im Doppelstrang angegeben und auf der z-Achse der Dissoziationsgrad jeder Base für eine Temperatur. Auf der y-Achse sind diese Graphen für verschiedene Temperaturen hintereinander aufgetragen (Abb. 4.9, links). Bei dieser Darstellung ist noch nicht die Irreversibilität der Denaturierung der Moleküle in Einzelstränge im Gel berücksichtigt.

Eine Vereinfachung dieser Darstellung besteht darin, die Temperaturen anzugeben, bei der jedes Basenpaar jeweils mit 50 % iger Wahrscheinlichkeit denaturiert ist (Abb. 4.9, rechts). Dies entspricht einem horizontalen Schnitt durch die Mitte des 3D-Plots. In der unteren Kurve ist dabei zusätzlich berücksichtigt worden, daß die Dissoziation in Einzelstränge im Gel ein irreversibler Prozeß ist. Hier wird deutlich, daß das PCR-Fragment V3P1/V3M1 im Gel nur einen kooperativ denaturierenden Bereich hat.



Abb. 4.9: Darstellung des Schmelzverhaltens des PCR-Fragments V3P1/V3M1.

Links ist über der Position der Basenpaare im PCR-Fragment ihr Dissoziationsgrad p für verschiedene Temperaturen T aufgetragen. Man erkennt zwei verschiedene kooperativ denaturierende Bereiche, die durch eine kleine G-C-Klammer von etwa 25 Basenpaaren getrennt sind. Der V3-Loop entspricht den Basenpaaren 126-237.

Rechts ist über der Position der Basenpaare die Temperatur in °C angegeben, bei der jedes Basenpaar mit 50 %iger Wahrscheinlichkeit denaturiert vorliegt. Das entspricht einem horizontalen Schnitt durch die Mitte des linken Graphens. In der unteren Kurve ist die irreversible Dissoziation im Gel berücksichtigt. Das PCR-Fragment V3P1/V3M1 hat im Gel also nur einen kooperativ denaturierenden Bereich.

Aus dem Denaturierungsgrad eines DNA-Fragmentes, wie er im 3D-Plot dargestellt werden kann, läßt sich mit einer semiempirischen Formel (Lerman *et al.*, 1984) die relative Mobilität μ/μ_0 dieses Fragmentes im Gel berechnen:

$$\frac{\mu}{\mu_0} = \exp\left(\frac{-1}{L_r}\sum_n p_n(T)\right)$$

Dabei ist $p_n(T)$ die Dissoziationswahrscheinlichkeit des Basenpaares n bei der Temperatur T und L_r ein Normierungsfaktor, der die Länge einer flexiblen Einheit der Nukleinsäure im Gel angibt. Für die Berechnungen in dieser Arbeit ist $L_r = 90$ gesetzt worden. Durch die Auftragung von $1-\mu/\mu_0$ über der Temperatur erhält man eine Kurve, die der üblichen Orientierung der senkrechten TGGE mit einer Laufrichtung von oben nach unten und einem Temperaturanstieg von links nach rechts entspricht (Abb. 4.10).

4.2.3.2 Mismatch-Programm

Im POLAND-Programm können als Parameter auch Fehlpaarungen eingegeben werden. Dann wird das Denaturierungsverhalten der eingegebenen Sequenz mit Fehlpaarungen berechnet. Die Berechnung einer Gelkurve für ein Fragment mit einer Fehlpaarung kann mit der Berechnung für das Fragment ohne Fehlpaarungen verglichen und damit Aussagen über die Nachweisbarkeit dieser Fehlpaarung in der TGGE gemacht werden. Dies geschieht im Programm MISMATCH (Wulfert, 1992; Wiese *et al.*, 1995), welches eine Weiterentwicklung des POLAND-Programmes ist. Für die senkrechte TGGE ist der geeignetste Parameter zur Auswertung der maximale Laufunterschied zwischen den Gelkurven (punktierte Linie in Abb. 4.10). Dieser liegt, wie die relativen Gelmobilitäten, zwischen 0 und 1. Eine Fehlpaarung sollte sicher nachweisbar sein, wenn dieser relative Laufunterschied mindestens 0,2 beträgt.



Abb. 4.10: Darstellung der Gelmobilitäten zweier DNA-Fragmente. Die untere Kurve entspricht einem Fragment ohne Fehlpaarungen (wt), die obere einem Fragment mit einer Fehlpaarung. Der maximale Mobilitätsunterschied zwischen beiden Kurven ist durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet, er ist ein Maß für die Nachweisbarkeit dieser Fehlpaarung in der senkrechten TGGE. Die schraffierten Flächen sind proportional zur Laufweite der Fragmente in einer zeitlichen TGGE, die den berechneten Temperaturbereich durchläuft. Ihre Verhältnis zueinander ist ein Maß für die Nachweisbarkeit dieser Fehlpaarung in der zeitlichen TGGE.

Der Parameter für die zeitliche TGGE ergibt sich aus folgender Überlegung: Die im Gel zurückgelegte Strecke eines DNA-Moleküls ist das Integral seiner konformations- und damit temperaturabhängigen Geschwindigkeit v(T) über die Zeit t. Die Geschwindigkeit v(T) ist proportional zur relativen Gelmobilität μ/μ_0 Die Zeit kann durch die Temperatur substituiert werden, wenn die Temperaturänderung über die Zeit konstant ist, dT/dt = const. Damit ergibt sich:

$$s = \int_{t1}^{t2} v(t) dt \propto \int_{T(t1)}^{T(t2)} \frac{\mu}{\mu_0} dT$$

Die Laufweite eines Fragmentes in der zeitlichen TGGE ist somit proportional zur schraffierten Fläche in Abb. 4.10. Die Differenz zwischen der Laufweite s' eines Fragmentes mit Fehlpaarung und der Laufweite s des Wildtyps, geteilt durch die Laufweite des Wildtyps, gibt den relativen Laufunterschied $\Delta s = (s-s')/s$. Ein relativer Laufunterschied von 10 % sollte sicher nachweisbar sein.

Im Programm MISMATCH (Wulfert, 1992; Wiese *et al.*, 1995), wird nacheinander jedes Basenpaar der eingegebenen Sequenz durch eine Fehlpaarung ersetzt, die Gelkurve berechnet und mit der Gelkurve des Fragmentes ohne Fehlpaarung verglichen. Die Ergebnisse können in zwei Diagrammen dargestellt werden, aus denen sich die Nachweisbarkeit von Mutationen im berechneten Fragment in der senkrechten bzw. zeitlichen TGGE ablesen läßt. An Positionen, an denen die erhaltenen Kurven über der Nachweisgrenze von 0,2 für die senkrechte TGGE bzw. 0,1 für die zeitliche TGGE liegen, können Mutationen im entsprechenden Fragment sicher nachgewiesen werden. Für das PCR-Fragment V3P1/V3M1 ist das Ergebnis in Abb. 4.11 dargestellt:



Abb. 4.11: Berechnung der Nachweisbarkeit von Mutationen im PCR-Fragment V3P1/V3M1. **Links:** Nachweisbarkeit in der senkrechten TGGE. Über der jeweiligen Mutationsposition ist der maximale relative Laufunterschied in der senkrechten TGGE angegeben. Bei einem relativen Laufunterschied von mindestens 0,2 sollte eine Mutation sicher nachweisbar sein. In diesem Beispiel gilt das im wesentlichen für Mutationen, die im Bereich von 180 bis 270 liegen. **Rechts:** Nachweisbarkeit in der zeitlichen TGGE. Hier sind anstelle der Nukleotidpositionen die Codonpositionen des V3-Loops auf der x-Achse aufgetragen. Auf der Y-Achse kann der relative Laufunterschied zwischen Homoduplex- und Heteroduplexbande abgelesen werden. Ein relativer Laufunteschied von etwa 0,1 sollte zum sicheren Nachweis einer Mutation ausreichend sein. Hier sind im wesentlichen Mutationen in den Codons 20 bis 50 nachweisbar.

Aussagen über die Nachweisbarkeit von Mutationen in der parallelen TGGE zu machen, ist weitaus schwieriger, da hierbei die Temperatur die Gelmobilität der DNA und diese wiederum die erreichte Temperatur bestimmt. Damit hängen die möglichen Laufunterschiede nicht nur vom Temperaturgradienten, sondern auch von der Laufzeit ab. Dies kann in einem iterativen Verfahren berücksichtigt werden, bei dem für feste Zeitschritte jeweils die erreichte Temperatur in Abhängigkeit der Mobilität von der im vorhergehenden Schritt erreichten Temperatur bestimmt wird. Als Ergebnis erhält man für jede Base und jeden Zeitschritt eine Angabe über die Unterschiede der erreichten Temperaturen von Molekülen mit und ohne Fehlpaarung an dieser Stelle (Wulfert, 1992). Das Ergebnis in dreidimensionaler Darstellung ist unübersichtlich und unterscheidet sich qualitativ nicht von den Berechnungen für die senkrechte und zeitliche TGGE. Deshalb wurde auf eine zusätzliche Berechnung der Nachweisbarkeit von Mutationen in der parallelen TGGE verzichtet.

4.2.4 G-C-Klammer oder Psoralen-Primer?

Wie die Berechnungen mit dem POLAND-Programm zeigt, hat das PCR-Fragment V3P1/V3M1 nur einen kooperativen Bereich (siehe Abb. 4.9 rechts) und damit auch nur einen irreversiblen Übergang im Gel. Um Fehlpaarungen im V3-Loop nachweisen zu können, muß also entweder mit einer G-C-Klammer ein weiterer, stabilerer kooperativ denaturierender Bereich angehängt oder die beiden Stränge der DNA über einen Psoralenprimer kovalent miteinander verknüpft werden.

4.2.4.1 G-C-Klammer

Eine G-C-Klammer mit 25 bis 40 Nukleotiden ergänzt das PCR-Fragment V3P1/V3M1 um einen zweiten, stabileren kooperativen Bereich. Mit einem einfachen Denaturierungs-Renaturierungszyklus lassen sich damit auch Proben mit einer entsprechenden Sonde hybridisieren. Nachteile einer G-C-Klammer ist die notwendige Länge des Primers, die die Synthese verteuert und ihre Ausbeute verringert sowie dessen hohen T_m -Werte in der PCR. Bei entsprechend hohen Temperaturen denaturiert auch eine G-C-Klammer in der TGGE, sie muß also so lang sein, daß der Abstand der T_m -Werte der beiden kooperativen Bereiche auch für eine parallele TGGE groß genug ist.

4.2.4.2 Psoralen-Primer

Mit einem Psoralenprimer lassen sich die beiden Stränge eines PCR-Fragmentes durch UV-Bestrahlung gezielt kovalent verknüpfen. Diese Verknüpfung löst sich in der TGGE nicht mehr, so daß es auch bei hohen Temperaturen zu keinem irreversiblen Übergang kommen kann. Andererseits sind Psoralenprimer teuer, die kovalente Verknüpfung erfordert nach der Hybridisierung einen weiteren Arbeitsschritt, und diese Verknüpfung geschieht nicht quantitativ, sondern nur zu etwa 50-80 %. Vor einer Reamplifikation kovalent verknüpfter PCR-Produkte muß diese Verbindung in einem weiteren Arbeitsschritt wieder gelöst werden, dies ist ebenfalls nicht quantitativ möglich (siehe Kapitel 4.2.10.2).

4.2.4.3 Psoralen-Primer als chemische Markierung der Sonde

Ein entscheidender Vorteil von Psoralenprimern gegenüber G-C-Klammern liegt darin, daß das Psoralen als chemische Markierung der Sonde genutzt werden kann. Wird nur die Sonde mit einem Psoralenprimer amplifiziert, die Probe dagegen mit einem entsprechenden Primer ohne Psoralen, so können bei der Hybridisierung beider Amplifikate miteinander nur die Hybride verknüpft werden, die einen Sondenstrang mit Psoralengruppe tragen. Bei n Sequenzvariationen gibt es n² verschiedene Hybridiserungsmöglichkeiten, aber nur n verschiedene Hybride können kovalent verknüpft werden. Dabei ist jede Sequenzvariation genau einmal vertreten (Abb. 4.12). Die Konzentrationsverteilung dieser Hybride entspricht dabei der Konzentrationsverteilung der Sequenzvariationen. In der D/R-TGGE können diese verknüpften Hybride von den anderen Molekülen getrennt werden.

Bei der Untersuchung der Sequenzspektren von HIV sind viele verschiedene Sequenzen zu erwarten, eine Reduktion der möglichen Heteroduplexbanden in der TGGE ist daher sinnvoll. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit Psoralenprimer verwendet.



Abb. 4.12: Vielfalt der Hybridiserungsmöglichkeiten bei vier Sequenzvariationen. Wenn nur für die Sonden-Amplifikation ein Psoralenprimer verwendet wird, dann können auch nur vier der 16 möglichen Hybride kovalent verknüpft werden (schwarze Punkte, zweite Zeile). Werden diese in einer D/R-TGGE abgetrennt, vereinfacht sich die Analyse entsprechend. Die Einzelstränge der Sonde sind jeweils in der ersten Zeile bzw. Spalte dargestellt, Homoduplices liegen auf der Diagonalen.

4.2.4.4 Auswahl des Psoralenprimers V3M1P

Berechnungen mit dem MISMATCH-Programm (Wulfert, 1992; Wiese *et al.*,1995) zeigen, daß sich für das PCR-Fragment V3P1/V3M1 mit dem V3-Loop bei einer kovalenten Verknüpfung am 3'-Ende des PCR-Fragmentes die deutlichsten Laufunterschiede in der TGGE zur Detektion von Mutationen ergeben (Abb. 4.13). Deshalb wurde der Minusprimer V3M1P konstruiert. Dieser basiert auf dem Primer V3M1, enthält an seinem 5'-Ende (entspricht dem 3'-Ende des Plusstranges) zusätzlich zwei Adenine und eine Psoralengruppe und wird für die Amplifikationen der Sonde verwendet. Die Psoralengruppe kann bei UV-Bestrahlung mit den im Gegenstrang synthetisierten Thyminen eine kovalente Bindung eingehen. Der Primer V3M1A entspricht dem Primer V3M1P, trägt aber keine Psoralengruppe und ist für die Amplifikationen der Proben vorgesehen. Die optimale Anlagerungstemperatur in der PCR liegt bei 50-55 °C.

Zur Etablierung der Methoden stehen mit den Plasmiden pMW1-10 (*wt*) und pMW1-9 (*mut*) zwei Standards zur Verfügung, die sich innerhalb des PCR-Fragmentes V3P1/V3M1P durch zwei Fehlpaarungen unterscheiden. Die PCR-Fragmente mit den Primern V3P1 und V3M1P bzw. V3M1A haben eine Länge von 284 Basenpaaren, *mut* hat an Position 63 dieses Fragmentes C statt T und an Position 85 G statt A. Im Folgenden werden Amplifikate dieser Plasmide unterstrichen, wenn sie mit Psoralenprimern amplifiziert wurden, Hybride aus zwei Amplifikationen durch ein x verbunden. Ein Hybrid aus pMW1-10 (*wt*) mit V3P1/V3M1P amplifiziert und pMW1-9 (*mut*) mit V3P1/V3M1A amplifiziert wird also als <u>*wt*</u> x *mut* bezeichnet. Die Doppelmutation von *mut* führt dazu, daß die beiden Heteroduplices aus <u>wt</u> und <u>mut</u> nahezu die gleiche thermodynamische Stabilität haben, da jedes Heteroduplexmolekül sowohl eine G:T- als auch eine A:C-Fehlpaarung enthält. In der TGGE können die beiden Heteroduplices deshalb nicht voneinander unterschieden werden und liegen in einer Bande.

Nachweisbarkeit bei senkrechter TGGE:



Abb. 4.13: Berechnung der Nachweisbarkeit von Mutationen im V3-Loop des HIV im PCR-Fragment V3P1/V3M1. Links mit kovalenter Verknüpfung des Doppelstranges am 5'-Ende des Plusstranges, in der Mitte ohne Verknüpfung und rechts mir kovalenter Verknüpfung am 3'-Ende des Plusstranges.

Oben jeweils die Nachweisbarkeit von Mutationen in der senkrechten TGGE als maximaler Laufunterschied, aufgetragen über die Nukleotidpositionen der Mutationen im PCR-Produkt. Der V3-Loop entspricht den Nukleotiden 128-234.

Unten die Nachweisbarkeit von Mutationen in der zeitlichen TGGE als relativer Laufunterschied, der V3-Loop entspricht den Codons 1-35.

Die Darstellungen sind in Abb. 4.11 erklärt. Mit einer kovalenten Verknüpfung am 3'-Ende des Fragmentes lassen sich Mutationen am besten nachweisen.

4.2.4.5 Optimierung der Bestrahlungszeit für PCR-Produkte mit Psoralenprimern

Zur Bestimmung der optimalen Zeiten für die kovalente Verknüpfung von PCR-Produkten mit Psoralenprimern wurde eine Zeitreihe bei der UV-Bestrahlung mit 15, 30, 45 und 60 min durchgeführt (Abb. 4.14). 15 Minuten UV-Bestrahlung bei 365 nm sind ausreichend, eine längere Bestrahlunszeit schadet jedoch nicht. Die kovalente Verknüpfung der Einzelstränge ist zu keinem Zeitpunkt komplett, sie liegt zu allen Zeiten bei etwa 50 %.



Abb. 4.14: Zeitreihe zur Bestimmung der optimalen UV-Bestrahlungszeit für kovalente Verknüpfungen von PCR-Produkten. Das gezeigte Gel wurde 15 Minuten denaturierend elektrophoretisiert, dabei laufen die kovalent verknüpften Stränge als Einzelstränge doppelter Länge weniger weit als die nicht verknüpften Einzelstränge. 15 Minuten Bestrahlung sind ausreichend, eine längere Bestrahlungszeit erhöht die Ausbeute an verknüpften Molekülen nicht. Bei 60 min war die Probe eingetrocknet, wodurch sich dort die Gesamtmenge geändert hat. M ist ein DNA-Längenstandard, bei N ist ein höher konzentriertes PCR-Produkt ohne UV-Bestrahlung aufgetragen.

4.2.5 Herstellung einer Einzelstrang-Sonde

Bei der Verwendung eines Psoralenprimers als Markierung der Sonde reduziert sich die Zahl der verknüpften Hybride auf die Anzahl der vorhandenen Sequenzvariationen. Werden gleiche Mengen an Sonde und Probe eingesetzt, sind jedoch die Hälfte der verknüpften Moleküle Sonden-Homoduplices. Da diese Sonden-Homoduplices für die Analyse der Sequenzvariationen nicht gebraucht werden und bei möglichen PCR-Fehlern nur zu unerwünschten Heteroduplices führen, wurde versucht, eine einzelsträngige Sonde mit einer Psoralengruppe herzustellen. Eine getrennte Elution der beiden Einzelstränge einer Sonden-PCR war nicht möglich. Deshalb wurde in einem modifizierten PCR-Ansatz mit nur einem Primer eine Einzelstrangsynthese durchgeführt.

Bei einer "PCR" mit nur einem Primer entfällt die Begrenzung des Produktes durch den zweiten Primer sowie der exponentielle Anstieg der Produktmenge, da die Produkte eines Primers nicht selbst wieder als Matrize dienen. Hierbei handelt es sich nicht mehr um eine Polymerase-*Ketten*-Re-aktion, aufgrund der Ähnlichkeit mit einer PCR kann diese Reaktion jedoch als *Einzelstrang*-PCR (esPCR) bezeichnet werden. Da dabei jeder synthetisierte Einzelstrang direkt vom Plasmid kopiert wird, ist die Fehlerrate der Produkte entsprechend kleiner als bei einer normalen PCR.

Es wurden Sondenstränge mit dem Psoralen-(Minus-)Primer V3M1P benötigt, im esPCR-Ansatz entfiel also der begrenzende Plusprimer. Deshalb mußte das als Matrize dienende Plasmid geeignet linearisiert werden. Dazu bot sich eine Hae III-Restriktionsschnittstelle an, mit der die Plasmide pMW1-9 und pMW1-10 drei Nukleotide vor der Sequenz des Plusprimers V3P1 geschnitten werden konnten. Damit ergab sich für die aus einer esPCR gewonnenen Sondenstränge dann eine Länge von 287 statt 284 Nukleotiden, was die Hybridisierung mit den Probenamplifikaten und die anschließenden TGGEs jedoch nicht negativ beeinflussen sollte.

Da die Produkte einer esPCR nicht selbst wieder als Matrizen dienen, muß zur Erhöhung der Ausbeute die Anzahl der Zyklen erhöht werden. Andererseits haben Polymerasen unter PCR-Bedingungen nur eine begrenzte Lebensdauer, so daß die esPCRs mit 50 Zyklen durchgeführt wurden.

Um mit 50 Zyklen bei optimaler Ausnutzung der Matrizen eine PCR-übliche Produktmenge von etwa 500 ng Einzelsträngen (entspricht ca. 1 µg doppelsträngiger DNA) zu erhalten, müssen etwa 10 ng Matrizen (Einzelstränge mit 287 Nukleotiden) vorhanden sein, das entspricht etwa 300 ng bzw. 0,1 pmol der verwendeten Plasmide mit 4235 bp. Werden unter optimalen Bedingungen in 50 Zyklen jeweils 0,1 pmol an Primern verbraucht, so sind dies insgesamt 5 pmol Primer. Damit auch im letzten Zyklus die Primeranlagerung noch deutlich häufiger als die Rehybridisierung der Plasmidfragmente mit den im Überschuß vorhandenen synthetisierten Einzelsträngen geschieht, muß ein entsprechender Primerüberschuß vorhanden sein.

Unterschiedliche Mengen an Primern und Hae III-verdautem Plasmid wurden in esPCRs mit *Taq*-Polymerase verwendet, dabei gaben bei 50 Zyklen 150 ng Plasmid und 90 pmol Primer eine optimale Ausbeute an Einzelsträngen. Bei Verwendung der *Taq*-Polymerase war bei diesem Fragment eine Fehlerrate von etwa 5% zu erwarten. Bei Verwendung von *Pwo*-Polymerase läge die Fehlerrate theoretisch bei 0,5%, es war jedoch keine esPCR möglich, da das verwendete Plasmid aufgrund der Exonukleaseaktivität der *Pwo*-Polymerase abgebaut wurde. Die Fehlerraten in der PCR werden in Kapitel 4.2.9 berechnet.

Im Ansatz einer esPCR sind neben den gewünschten Sonden-Einzelsträngen auch noch die Plasmidfragmente in etwa gleicher Menge vorhanden. Da diese nicht vollständig miteinander hybridisieren, ergibt sich im Gel ein reichhaltiges Bandenmuster. Nach Hybridisierung einer esPCR mit einer Proben-PCR lassen sich in einer D/R-TGGE keine spezifischen Heteroduplices der Probe mit der Einzelstrangsonde mehr identifizieren. Deshalb wäre es notwendig, die Einzelstrangsonde vor der Hybridisierung mit einer Proben-PCR in einer Gelelution von den Plasmidfragmenten zu trennen. Damit wäre der Aufwand zur Gewinnung einer Einzelstrangsonde jedoch so groß, daß er das damit erreichte Fehlen der Sonden-Homoduplices wieder aufwiegt. Da für die esPCR keine hochgenaue Polymerase verwendet werden kann und die Fehlerrate der Einzelstrangsonde mit *Taq*-Polymerase genau so groß wie die Fehlerrate einer doppelsträngigen Sonde aus einer normalen PCR mit *Pwo*-Polymerase ist, hat die esPCR keine Vorteile gegenüber der herkömmlichen PCR zur Sondengewinnung. Aus diesem Grunde ist der Ansatz nicht weiter verfolgt worden.

4.2.6 TGGE mit denaturierendem Vorlauf (D/R-TGGE)

Die kovalente Verknüpfung von PCR-Produkten mit Psoralenprimern geschieht nicht vollständig, sondern nur etwa die Hälfte der Doppelstränge wird bei UV-Bestrahlung miteinander gekoppelt. Dies kann in der TGGE dazu führen, daß der irreversible Übergang der nicht verknüpften Moleküle dem reversiblen Übergang der kovalent verknüpften Moleküle überlagert ist. Um dies zu vermeiden, könnten die kovalent verknüpften Proben nach einer denaturierenden Gelelektrophorese geleluiert oder aus dem Gel ausgeschnitten und die Gelstücke in ein weiteres Gel für die TGGE einpolymerisiert werden. Dieses Verfahren wäre jedoch recht aufwendig und fehleranfällig, da möglichst genau die Bande der kovalent verknüpften Einzelstränge ausgeschnitten werden müßte.

Alternativ kann eine derartige denaturierende Elektrophorese als denaturierender Vorlauf vor der eigentlichen TGGE im selben Gel durchgeführt werden. Dies geschieht bei der zeitlichen TGGE (Wiese *et al,* 1995; Wiese, 1996). In einem denaturierenden Vorlauf laufen die verknüpften Moleküle als Einzelstränge doppelter Länge langsamer als die nicht verknüpften Moleküle. Der dabei erreichte Laufunterschied kann in der anschließenden Gradientenphase der TGGE zur Auftrennung der verknüpften Moleküle genutzt werden.

Entsprechend wird bei senkrechten und parallelen D/R-TGGEs mit einem denaturierenden Vorlauf angefangen (Abb. 4.15). Anschließend werden Temperatursteuerung und Elektrophoresespannung für einige Minuten abgestellt. In dieser Zeit kühlt die Gradientenplatte ab, und die kovalent verknüpften Moleküle können im Gel renaturieren. Die nicht verknüpften Einzelstränge können in dieser Phase zum Teil ebenfalls renaturieren. Darauf folgt die eigentliche TGGE.



Abb. 4.15: Prinzip der D/R-TGGE, jeweils links für die senkrechte und rechts für die parallele D/R-TGGE.

A): Lage der DNA-Stränge nach dem denaturierenden Vorlauf. Die kovalent verknüpften Moleküle (schwarz) laufen unter denaturierenden Bedingungen ähnlich Einzelsträngen doppelter Länge nur etwa halb so weit wie die nicht verknüpften Moleküle (grau).

B): Nach dem denaturierenden Vorlauf wird die Temperatur soweit gesenkt, daß die verknüpften Moleküle wieder zu Doppelsträngen renaturieren können. Anschließend wird der eigentliche Temperaturgradient angelegt und die Moleküle entsprechend ihren thermodynamischen Eigenschaften aufgetrennt. Die Doppelstränge laufen dann schneller als die im denaturierenden Vorlauf abgetrennten nicht verknüpften Einzelstränge und könnten diese bei langer Laufzeit der Elektrophorese wieder einholen.

Bei der zeitlichen TGGE sind die Verhältnisse ähnlich der parallelen D/R-TGGE (rechts), jedoch mit einem zeitlichen Gradienten von $T_{denat.}$ bis T_1 , der sich direkt an einen kürzeren denaturierenden Vorlauf anschließt. Die kovalent verknüpften Moleküle renaturieren dabei während der Gelelektrophorese.

Da die renaturierten Moleküle im Gel schneller laufen als die vorausgelaufenen Einzelstränge, muß der im denaturierenden Vorlauf erreichte Laufunterschied zwischen kovalent verknüpften und nicht verknüpften Molekülen so groß sein, daß die renaturierten Moleküle die Einzelstränge in der eigentlichen TGGE nicht mehr erreichen.

Da Einzelstränge in einer Gelelektrophorese nur etwa halb so schnell laufen wie Doppelstänge und die kovalent verknüpften Moleküle noch langsamer laufen, benötigt der denaturierende Vorlauf etwa die zwei- bis dreifache Zeit wie die nachfolgende eigentliche TGGE. Die kürzeren Laufzeiten und die Möglichkeit der schnellen Temperatureinstellung der kleinen TGGE im Vergleich zur klassischen großen TGGE mit Wasserbädern sind besonders vorteilhaft und kamen daher im folgenden zum Einsatz.

4.2.6.1 Senkrechte D/R-TGGE

Abb. 4.16 zeigt ein Beispiel für eine senkrechte D/R-TGGE mit PCR-Produkten von den Plasmide pMW1-10 (*wt*) und pMW1-9 (*mut*) mit dem Primerpaar V3P1/V3M1P nach Hybridisierung und kovalenter Verknüpfung der Einzelstränge. Aufgrund unterschiedlicher Mengen an Ausgangsmolekülen in der PCR ist der *wt*-Homoduplex deutlich stärker als der *mut*-Homoduplex und die in einer Bande liegenden Heteroduplices.

In den kleinen Probenauftragstaschen links und rechts wurde ein DNA-Längenstandard aufgetragen. Die Elektrophorese wurde für 2 min bei 20 °C und 300 V zum Einlauf der Proben begonnen, daran schloß sich die Denaturierungsphase bei 60 °C und 300 V für 40 min an, und nach einer Renaturierungszeit von 4 min ohne Spannung folgte die eigentliche Temperaturgradienten-Gelelektrophorese mit einem Gradienten von 40 °C bis 60 °C bei 300 V für 15 min.



Abb. 4.16: Senkrechte D/R-TGGE mit <u>wt x mut</u>. Die Randtemperaturen des senkrechten Temperaturgradienten sind angegeben. Der *wt*-Homoduplex ist stärker konzentriert als der *mut*-Homoduplex und die sehr schwache Heteroduplexbande. Die beiden Heteroduplexmoleküle liegen hier im selben Übergang, da sich beide aufgrund der Doppelmutation thermodynamisch kaum voneinander unterscheiden (siehe auch Kap. 4.2.4.4).
4.2.6.2 Parallele D/R-TGGE

Ein Beispiel für eine parallele D/R-TGGE zeigt Abb. 4.17. Hierbei wird gleichzeitig die Verwendung des Psoralens zur Markierung der Sonde demonstriert. Amplifikationen mit Psoralenprimer sind unterstrichen, miteinander hybridisierte Sequenzen sind mit x gekennzeichnet. Die Elektrophorese erfolgte bei 300 V für 2 min bei 20 °C zum Einlaufen der Proben, 40 min bei 60 °C als denaturierender Vorlauf, anschließend Abkühlung auf ca. 40 °C in 5 min und schließlich mit parallelem Temperaturgradienten von 30 °C bis 50 °C für 10 min. Die nicht verknüpften Moleküle sind weit genug vorausgelaufen und liegen als Einzelstrangbande unterhalb der aufgetrennten kovalent verknüpften Doppelstränge.

Bei <u>wt</u> und <u>mut</u> ist jeweils eine Homoduplexbande zu sehen, beim Hybrid aus <u>wt</u> x <u>mut</u> zwei Homoduplexbanden sowie eine Heteroduplexbande, die beide Heteroduplices enthält. Bei <u>wt</u> x mut ist nur das wt-Fragment als Sonde mit Psoralenprimer amplifiziert worden. Entsprechend sind nur die Banden zu sehen, in denen der Minusstrang (mit Psoralengruppe) vorhanden ist, der <u>wt</u>-Homoduplex und ein Heteroduplex. Bei wt x <u>mut</u> sind die Verhältnisse komplementär.



Abb. 4.17: Beispiel für eine parallele D/R-TGGE und die Verwendung des Psoralenprimers als Markierung der Sonde. Hier sind die Randtemperaturen des parallelen Temperaturgradienten angegeben. Unterstrichene Sequenzen sind mit Psoralenprimer amplifiziert worden, nicht unterstrichene Sequenzen ohne Psoralenprimer. Die beiden Heteroduplices bei <u>wt x mut</u> liegen auch hier in einer Bande. M ist ein DNA-Längenstandard.

4.2.6.3 Zeitliche TGGE (tTGGE)

Neben parallelen D/R-TGGEs wurden auch zeitliche TGGEs (tTGGE, nach Wiese *et al*, 1995) verwendet. Diese Elektrophoresen wurden in einer Hoefer SE 600 Elektrophorese-Einheit (Pharmacia, Freiburg) durchgeführt. Nach einem denaturierenden Vorlauf zur Trennung der kovalent verknüpften Doppelstränge von den nicht verknüpften Molekülen wurde die externe Temperierung der Elektrophorese-Einheit abgestellt und der zeitliche Temperaturgradient durch allmähliches Abkühlen der Elektrophorese-Einheit erreicht. Dabei renaturierten die verknüpften DNA-Stränge beim erreichen ihrer T_m -Werte, wurden beschleunigt und auf diese Weise entsprechend ihrer thermodynamischen Stabilität voneinander getrennt. Diese Abkühlung folgt einer Exponentialfunktion mit der Raumtemperatur als Asymptote, kann aber für einen beschränkten Temperaturbereich als näherungsweise linear betrachtet werden

Die Parameter für die zeitliche TGGE müssen sorgfältig gewählt werden. Die Temperatur für den denaturierenden Vorlauf muß so hoch sein, daß alle zu trennenden DNA-Fragmente denaturiert vorliegen. In der anschließenden Renaturierungsphase muß die Temperatur so weit absinken, daß alle kovalent verknüpften Fragmente renaturieren können. Fragmente, deren T_m nicht wieder erreicht würde, würden sonst nicht voneinander getrennt. Das Verhältnis von Vorlaufzeit zu Renaturierungszeit muß so bemessen sein, daß die zuerst renaturierten Doppelstränge die vorausgelaufenen Einzelstränge noch nicht wieder eingeholt haben. Schließlich ist die Gesamtlaufzeit der Elektrophorese durch die Kapazität des Puffers beschränkt.

Die optimalen Temperaturen für die zeitliche TGGE wurden zuvor mit einer senkrechten TGGE unter gleichen Gelbedingungen (0,5 x TAE, 8% Polyacrylamid) ermittelt. Die zeitlichen TGGEs wurden zunächst für 1 h denaturierend durchgeführt, dabei betrug die Temperatur in der Elektrophorese-Einheit etwa 48 °C. Anschließend wurde die externe Temperierung abgestellt und im weiteren Lauf der Elektrophorese kühlte die Elektrophorese-Einheit in 2½ h auf etwa 38 °C ab. Einen Ausschnitt aus einer zeitlichen TGGE mit dem kovalent verknüpften PCR-Fragment V3P1/V3M1P zeigt Abb. 4.18.



Abb. 4.18: Ausschnitt aus einer zeitlichen TGGE mit dem PCR-Fragment V3P1/V3M1P nach Hybridisierung und kovalenter Verknüpfung der Einzelstränge. Die renaturierten <u>mut</u>-Homoduplices haben die vorausgelaufenen Einzelstränge fast wieder eingeholt. Der in der zeitlichen TGGE durchlaufene Temperaturbereich ist angegeben.

Die Parameter des zeitlichen Temperaturgradientens lassen sich nicht so leicht variieren wie bei der parallelen TGGE, da die Abkühlungsrate im wesentlichen durch die Differenz zur Raumtemperatur vorgegeben ist. Die mögliche Elektrophoresezeit wird durch die Kapazität des oberen Pufferbades begrenzt, 3½ h bei 300 V sind bei einem 0,5 x TAE-Puffer maximal möglich; dabei zeigen sich schon erste Verarmungseffekte des Puffers.

Zur Verbesserung der Auflösung in der zeitlichen TGGE wurde zunächst die Elektrophoresespannung erhöht, um einen schnelleren Lauf der Nukleinsäuren im Gel zu erreichen. Dadurch erhöhte sich jedoch auch die Wärmeentwicklung im Gel und entsprechend verringerte sich die Abkühlung, so daß schließlich die Pufferkapazität nicht ausreichte, um die Elektrophorese ausreichend lange durchzuführen und alle Proben zu renaturieren. Eine Änderung der Gelzusammensetzung auf 5% Polyacrylamid oder Hinzufügen von 10% Glyzerin erbrachte ebenfalls keine bessere Auflösung.

Diese wurde dadurch erreicht, daß eine Seite der Elektrophorese-Einheit mit einer ca. 2 cm dicken Styroporplatte abgedeckt und die Temperatur des denaturierenden Vorlaufs auf 46 °C gesenkt wurde. Dadurch konnte die Abkühlung geringfügig verlangsamt werden, so daß die im denaturierenden Vorlauf erreichte Laufdifferenz zwischen kovalent verknüpften und nicht verknüpften Molekülen optimal ausgenutzt werden konnte.

4.2.6.4 Vergleich der Auflösung von tTGGE und D/R-TGGE

Die zeitliche TGGE hat in der hier verwendeten Version eine größere Trennstrecke als die parallele TGGE, aufgrund des dickeren Gels aber auch breitere Banden. Hinzu kommen Unterschiede in der Bandenschärfe durch die Elektrophoresebedingungen: Die Banden sind um so schärfer, je langsamer die Proben im Gel laufen. In der parallelen TGGE laufen die Proben am Schluß denaturiert, also langsam und scharf, während sie bei der zeitlichen TGGE mit abfallendem Temperaturgradienten am Ende nativ vorliegen, also schneller laufen und weniger scharfe Banden bilden.

Die Breite und der Abstand der Homo- und Heteroduplexbanden wurde bei einigen TGGEs gemessen und verglichen (Tab. 4.2 und 4.3). Bei den zeitlichen TGGEs in der Hoefer-Elektrophorese-Einheit ist die Trennstrecke zwischen Homo- und Heteroduplices etwa dreimal so groß wie bei der parallelen D/R-TGGE auf der Peltier-Anlage, die Banden sind aber auch etwa viermal so breit. Insgesamt hat die parallele D/R-TGGE eine geringfügig bessere Auflösung. Andererseits sind bei ihr die Trennstrecke und die Probenvolumina, die aufgetragen werden können, geringer. Auch aufgrund der deutlich kürzeren Laufzeiten von etwa 1 h gegenüber 3½ h wurde für die meisten Experimente die parallele D/R-TGGE verwendet.

Gel:	A426	A434	A450	A490	A526
Heteroduplex/mm	2	2	2	1,5	2
Abstand/mm	10	11	10	11	13
wt-Homoduplex/mm	1	1,5	1,5	1	
Abstand/mm	3		3	3	
mut-Homoduplex/mm	1		1,5	1,5	2
Breite Heteroduplex Abstand zu <i>wt</i>	20%	16%	18%	11%	(15%)
Breite wt Abst. wt-mut	33%		50%	42%	

Tab. 4.2: Vergleich der Auflösung einiger tTGGEs. Angegeben sind Bandenbreite, *Abstand* der Banden und das Verhältnis zwischen beiden für verschiedene Gele.

Gel:	A505	A514	A542	A544'	A544"
Heteroduplex/mm	0,6	0,5	0,7	~0,2	0,5
Abstand/mm	4,3	3	3,5	2,5	3,5
wt-Homoduplex/mm	0,4	0,3	0,5	0,5	0,7
Abstand/mm	1,1	1	1	0,5	1
mut-Homoduplex/mm	0,4	0,3	0,5	0,3	0,8
Breite Heteroduplex Abstand zu <i>wt</i>	12%	13%	17%	14%	17%
Breite wt Abst. wt-mut	36%	30%	50%	80%	75%

Tab. 4.3: Vergleich der Auflösung einiger paralleler D/R-TGGEs. Die Bandenbreiten konnten nur abgeschätzt werden.

4.2.6.5 Minimal nachweisbare Mutation: Mut180

Ein Heteroduplex an der Position 180 des PCR-Fragmentes V3P1/V3M1P (entspricht Pos. 7153 im HIV-Genom) ist nach Berechnung des MISMATCH-Programms in der zeitlichen TGGE am schlechtesten nachzuweisen. Der Nachweis dieser Mutation in der TGGE ist damit der Beweis, daß alle möglichen Mutationen im V3-Loop mit dem PCR-Fragment V3P1/V3M1P nachgewiesen werden können.

Um dies zu überprüfen, wurde mittels PCR-Mutagenese mit der "Megaprimer"-Methode (Sarkar und Sommer, 1990; Zhao *et al.*,1993) ein entsprechendes PCR-Fragment mit einem C statt einem A an dieser Position erzeugt. Dazu wurde zunächst der Primer V3P180 synthetisiert, der aus 21 Nukleotiden besteht und genau in der Mitte ein C anstelle des im Plasmid pMW1-10 vorhandenen A enthält, und in einer PCR mit dem Primer V3M4 als Gegenprimer eingesetzt. Die Produkte wurden über Silikagel-Säulchen aufgereinigt und als "Megaprimer" mit dem Primer V3P4 als Gegenprimer in einer zweiten PCR eingesetzt (Abb. 4.19). Das Produkt dieser PCR wurden dann in einer 1:1000-Verdünnung als Matrize für PCRs mit dem Primer V3P1 und V3M1P verwendet.



"Mega"-Primer aus 1. PCR

Abb. 4.19: Prinzip der PCR-Mutagenese mit der "Megaprimer"-Methode. In einer ersten PCR wurde mit einem Mutagenese-Primer, der in seiner Mitte die gewünschte Punktmutation enthielt, ein PCR-Produkt mit dieser Mutation erzeugt. Dieses Amplifikat wurde dann in einer zweiten PCR als Primer verwendet, um Produkte mit der gewünschten Punktmutation zu erhalten (nach Sarkar und Sommer, 1990; Zhao *et al.*,1993).

Diese PCR-Produkte wurden mit <u>wt</u>-Produkten hybridisiert, kovalent verknüpft in verschiedenen TGGEs analysiert (Abb. 4.20). Bedingt durch die insgesamt drei aufeinanderfolgenden PCRs und die dadurch aufsummierten Fehlprodukte gibt es einen starken Hintergrund an nicht spezifischen Banden. Dennoch konnte diese Mutation jedesmal sicher nachgewiesen werden. Damit ist gezeigt worden, daß das Primerpaar V3P1/V3M1P geeignet ist, alle Mutationen im V3-Loop des HIV-Genoms zu detektieren.



 $48 \ ^{\circ}C \rightarrow 38 \ ^{\circ}C$

Abb. 4.20: Der Heteroduplex Mut180 mit dem geringsten Laufunterschied im PCR-Fragment V3P1/V3M1P ist in der TGGE nachweisbar. Die Nebenbanden sind eine Folge der "Megaprimer"-PCR, beeinflussen jedoch das Ergebnis nicht. <u>wt</u> x <u>mut</u> ist ein Hybrid aus den PCR-Produkten V3P1/V3M1P der Plasmide pMW1-10 (*wt*) und pMW1-9 (*mut*); <u>wt x z</u> ist ein Hybrid aus den PCR-Produkten V3P1/V3M1P des Plasmids pMW1-10 (*wt*) und des Fragments mit der minimal nachweisbaren Mutation an Position 180 (z). M ist ein DNA-Längenstandard.

Links: D/R-II TGGE mit einem Gradienten von 39 °C bis 51 °C.

Mitte: tTGGE mit einem zeitlichen Gradienten von 48 °C bis 38 °C.

Rechts: senkrechte TGGE mit einem Gradienten von 44 °C bis 56 °C.

4.2.7 PCR mit wenigen Ausgangsmolekülen ohne Verunreinigungen

Mit der geschachtelten PCR ist es möglich, einzelne Ausgangsmoleküle zu amplifizieren. Dadurch können auch minimale Verunreinigungen amplifiziert werden, die z.B. aus dem Produkt einer vorhergehenden PCR stammen. Eine geschachtelte PCR mit geringen Ausgangsmengen erfordert daher besondere Maßnahmen, um solche Kreuzkontaminationen zu vermeiden.

Stammlösungen von Primern und dNTPs wurden in kleinen Aliquots in einem anderen Laborraum angesetzt. Autoklaviertes Wasser wurde mindestens einmal pro Woche ersetzt. Polymerase und Puffer wurden ebenfalls in kleinen Mengen aliquotiert, wenn sie nicht in kleinen Aliquots geliefert wurden. Bei Verdacht auf Kontamination wurden *alle* verwendeten Aliquots verworfen.

Die PCRs wurden unter einer Sterilbank (Gemini, Biohit, Köln) angesetzt, in der mögliche DNA-Kontamination durch UV-Beleuchtung über Nacht eliminiert werden konnten. Dafür wurde ein eigener Pipettensatz verwendet.

PCR-Produkte wurden ausschließlich an einem anderen Labortisch mit einem dafür vorgesehenen Pipettensatz verarbeitet. Dies gilt auch für das Pipettieren der Matrizen für die zweite PCR einer geschachtelten PCR.

In allen Bereichen wurden gestopfte Pipettenspitzen verwendet, mit denen eine Kontamination der Pipettenschäfte durch Aerosolbildung verhindert werden sollte. Auf diese Weise konnten auch mit minimalen Probenmengen geschachtelte PCRs durchgeführt werden, bei denen die Nullkontrollen kein Produkt enthielten.

4.2.8 Etablierung der Reamplifikation niedrig konzentrierter Mutationen

In der Heteroduplexbande einer TGGE unterscheiden sich die Sequenzen beider Stränge. Wird eine solche Heteroduplexbande aus der TGGE ausgeschnitten, geleluiert und das Eluat als Ausgangsmaterial in einer PCR eingesetzt, so sollten dabei beide Sequenzen in etwa gleichen Mengen reamplifiziert werden können. Im Idealfall ist es dabei unerheblich, welchen Anteil die Heteroduplexbande an der Gesamtmenge der aufgetrennten Probe hat. Auf diese Weise sollten sich nach der Hybridisierung einer Probe mit einer Sonde auch Sequenzen anreichern lassen, die nur einen geringen Anteil an der Gesamtmenge ausmachen.

Das Prinzip zeigt Abb. 4.21. Eine Probe enthält neben der Wildtypsequenz eine Mutation I zu 45% und eine andere Mutation II zu 5%. In einer direkten Sequenzierung dieser Probe wäre möglicherweise eine Mischung der Sequenzen von Wildtyp und Mutation I erkennbar, die Sequenz der Mutation II wäre jedoch nicht vom Hintergrund zu unterscheiden.

Wird die Probe ohne Psoralenprimer amplifiziert und mit einer Sonde mit Psoralenprimer hybridisiert und die Hybride kovalent verknüpft, so sollte sich in einer zeitlichen oder parallelen D/R-TGGE ein Bandenmuster wie in Abb. 4.21 Mitte ergeben. Oberhalb der nicht verknüpften Einzelstränge und der Homoduplexstränge des Wildtyps (Sonde) wären für jede Mutation eine Heteroduplexbande in einer Intensität vorhanden, die ihrer Konzentrationsverteilung entsprechen würde.

Eine Heteroduplexbande enthält dabei einen Strang der Sonde mit einer Psoralengruppe am Ende sowie einen Strang mit einer Mutation. Wird eine solche Heteroduplexbande ausgeschnitten, die DNA geleluiert und in einer weiteren PCR reamplifiziert, sollte sich also ein 1:1-Verhältnis der Sequenzen von Sonde und Mutation ergeben. Bei einer Sequenzierung dieses Reamplifikates sollte sich so die Sequenz der Mutation ermitteln lassen.

Mit den Plasmiden pMW1-10 und pMW1-9 als Testsequenzen für *wt* und *mut* sowie mit den verschiedenen TGGE-Verfahren konnte nun die Anreicherung niedrig konzentrierter Mutationen etabliert werden. Dazu wurden zunächst die Testsequenzen *wt* und *mut* in verschiedenen Konzentrationen gemischt, amplifiziert, kovalent verknüpft und mit der TGGE wieder getrennt. Die Heteroduplexbanden wurden ausgeschnitten, geleluiert und reamplifiziert. Dabei konnte jedoch zunächst keine Anreicherung der im Unterschuß enthaltenen Sequenz erreicht werden, die Reamplifikationen zeigten nahezu die gleiche Verteilung zwischen *wt* und *mut* wie die Ausgangsproben.

PCR der Probe

PCR der Sonde

ohne Psoraler	nprimer	mit Psoralenprimer				
Wildtyp		50%	Wildtyp			
Mutation I		45%				
Mutation II		5%				

Hybridisierung und kovalente Verknüpfung, 1. TGGE



streifenweise Gelelution und Reamplifikation, 2. TGGE



Abb. 4.21: Prinzip der gezielten Reamplifikation von Mutationen. Schematisch dargestellt ist die Analyse einer Probe, in der eine Mutation deutlich stärker konzentriert ist als eine zweite. Diese Probe wird ohne Psoralenprimer amplifiziert und mit einer Sonde mit Psoralenprimer hybridisiert und die Doppelstränge durch UV-Bestrahlung kovalent verknüpft. Die Hybride werden in einer ersten TGGE aufgetrennt (\downarrow) und anschließend streifenweise ausgeschnitten und geleluiert. Jedes Eluat wird einzeln reamplifiziert und in einer zweiten TGGE analysiert. Die Reamplifikation der Homoduplexbande ergibt wieder eine Homoduplexbande (Spur 2), Reamplifikationen der Heteroduplexbanden sollten jeweils wieder Heteroduplexbanden ergeben (Spuren 8 und 13). Dabei sollten Mutationen, die nur in geringer Konzentration vorliegen, auch in einem 1:1-Verhältnis von Sonde und Mutation reamplifiziert werden. Die untersten Banden stellen jeweils die nicht verknüpften Einzelstränge dar. Aus Eluaten ohne sichtbaren Banden wird als Hintergrund im wesentliche der Wildtyp reamplifiziert (graue Banden). Die Originalhybridisierung ist mit \downarrow gekennzeichnet.

Abbildung 4.22 zeigt eine mögliche Ursache. Neben den zu erwartenden Banden in einer senkrechten D/R-TGGE, eine Heteroduplex- und zwei Homoduplexbanden, gibt es eine große Anzahl an Nebenbanden. Diese sind auch bei parallelen TGGEs als Hintergrund zu erkennen (z.B. in Abb. 4.17 in der <u>wt</u>-Spur). Mögliche Ursachen können unspezifische PCR-Produkte sein, auch Laufartefakte im Gel können nicht ausgeschlossen werden.



Abb. 4.22: Senkrechte D/R-TGGE mit <u>wt</u> x <u>mut</u>. Zwei gesamte PCR-Ansätze sind auf das Gel aufgetragen worden. Durch die hohe Konzentration an Nukleinsäuren werden die zusätzlichen Nebenbanden deutlich sichtbar.

4.2.8.1 Variation einiger Parameter zur Optimierung der Reamplifikation

Zur Klärung der genannten Vermutungen wurden für die PCR gelaufgereinigte Primer verwendet, um synthesebedingte Primerinhomogenitäten ausschließen zu können, ohne jedoch eine Verbesserung zu erreichen. Daraufhin wurden die Anlagerungstemperaturen in der PCR heraufgesetzt, um mögliche unspezifische PCR-Produkte zu vermeiden. Die höchste mögliche Anlagerungstemperatur für das Primerpaar V3P1/V3M1P lag bei etwa 61 °C. Dabei war die Gesamtausbeute der PCR zwar etwas geringer und damit auch die Menge des Hintergrundes, das Verhältnis zwischen beiden konnte jedoch nicht erkennbar verbessert werden. Zudem läßt diese höchstmögliche Anlagerungstemperatur keine sicher funktionierenden PCR-Amplifikationen zu. Deshalb wurden die folgenden PCRs wieder mit deutlich niedrigeren Anlagerungstemperaturen durchgeführt.

Schließlich wurde an der zeitlichen TGGE untersucht, wie groß die Trennunschärfe der Polyacrylamidgele ist. Dazu wurde eine hochkonzentrierte Probe zunächst in einer zeitlichen TGGE aufgetrennt, diese Spur dann aus dem Gel ausgeschnitten und senkrecht zur Laufrichtung in ein weiteres Gel einpolymerisiert und eine zweite zeitliche TGGE durchgeführt. Es ergab sich eine diagonal über das Gel verlaufende Spur, die durch die Trennunschärfe des Gelsystems verbreitert sein kann. Abb. 4.23 zeigt das Ergebnis. Die Banden werden bei der Elektrophorese etwas verbreitert, jedoch nicht in einem Maße, das der Hintergrund damit erklärt werden könnte. Theoretisch betrachtet liegen die Moleküle einer Bande im Gel etwa in einer Gaußverteilung vor. Bedingt durch die kontrastverstärkende Verarbeitung der optischen Information in der Netzhaut erscheinen die Wendepunkte dieser Gaußverteilung als Kanten der Banden (pers. Mitteilung von Dr. Christoph Krüll). Innerhalb dieses Bereiches (σ) liegen dann 68% der Moleküle. Innerhalb der dreifachen Breite (3σ) schon 99,7%. Dies ist nicht so viel, daß damit der Gelhintergrund ausreichend erklärt werden kann.



 $47 \ ^{\circ}C \rightarrow 37 \ ^{\circ}C$

 $47 \ ^{\circ}C \rightarrow 37 \ ^{\circ}C$

Abb. 4.23 : Zweidimensionale zeitliche TGGE zur Ermittlung der Trennunschärfe des Gelsystems. Hochkonzentrierte, kovalent verknüpfte PCR-Produkte mit einer Mischung aus <u>wt x mut</u> m Verhältnis 1:1 und 1: 0,1 wurden in einer ersten zeitlichen TGGE aufgetrennt, jeweils etwa eine Spur ausgeschnitten und senkrecht zur ursprünglichen Laufrichtung in ein weiteres Gel einpolymerisiert und in einer zweiten zeitlichen TGGE aufgetrennt. Die Verbreiterung der Banden in der zweiten tTGGE beruht im Wesentlichen darauf, daß in der ersten tTGGE die Spuren nicht korrekt ausgeschnitten wurden. Die Gele zeigen hier keine Trennunschärfe, auf die die Nebenbanden in den TGGEs zurückgeführt werden können. Die Abbildung stellt die Gele verkleinert dar.

Schließlich wurden mögliche Kopierfehler der Polymerase in der PCR in Betracht gezogen. Eine PCR mit reduzierter MgCl₂-Konzentration und verkürzten Elongationszeiten, die die Replikationsgenauigkeit der Polymerase erhöhen sollten, zeigte in einer TGGE deutlich weniger Hintergrund und nach Elution und Reamplifikation zum erstenmal eine Anreicherung der im Verhältnis 0,1: 2 im Unterschuß eingesetzten Sequenz (Abb. 4.24). Da die Reamplifikations-PCR noch nicht ihre Sättigung erreicht hatte und auf eine anschließende gesonderte Hybridisierung verzichtet wurde, liegen hier kaum Heteroduplices vor.

Die Fehlerrate der Polymerasen in der PCR muß also bei den hier verwandten Methoden besonders beachtet werden. Neben der Taq-Polymerase wurde deshalb auch Pwo-Polymerase verwendet. Diese hat eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, mit der falsch eingebaute Nukleotide wieder entfernt werden können.



Abb. 4.24: Links: tTGGE von PCR-Produkten einer Mischung aus <u>wt</u> und <u>mut</u> im Verhältnis 0,1: 2 unter verschiedenen PCR-Parametern. Eine Reduktion der MgCl₂-Konzentration in der PCR führt neben einer Reduzierung der Ausbeute zu einer erheblichen Verringerung des Hintergrundes, die Verkürzung der Elongationszeiten zeigt dagegen keinen Effekt. Die Spur mit einer Elongationszeit von 40 s und 1,5 mM MgCl₂ wurde in kleinen Streifen ausgeschnitten und geleluiert. Rechts eine parallele D/R-TGGE mit der Reamplifikation der Eluate 06 und 07 auf der Höhe der Heteroduplexbande. Die reamplifizierten Homoduplices von <u>wt</u> und <u>mut</u> liegen nun in etwa gleichen Konzentrationen vor.

4.2.8.2 PCR mit Pwo-Polymerase

Zur Verringerung der Fehlerrate wurde daraufhin die PCR mit *Pwo*-Polymerase von Boehringer Mannheim etabliert. Dieses Enzym besitzt neben der 5'-3'-Polymeraseaktivität auch eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität. Damit werden falsch eingebaute Nukleotide wieder entfernt und so die Fehlerrate der PCR auf etwa ein Zehntel gesenkt.

Die Exonukleaseaktivität der *Pwo*-Polymerase erforderte dabei geringfügige Änderungen der PCR-Bedingungen: Die Primer wurden in der dreifachen Konzentration eingesetzt, um einen möglichen Abbau durch die Pwo-Polymerase auszugleichen, die für dieses Enzym optimale Mg²⁺-Konzentration von 2 mM wurde mit MgSO₄ eingestellt. Durch die Verwendung der *Pwo*-Polymerase konnte der PCR-Hintergrund deutlich gesenkt werden (Abb. 4.25).



Abb. 4.25: Vergleich des von PCR-Fehlern verursachten Hintergrunds bei *Pwo-* und *Taq-*Polymerase in einer tTGGE. Aufgetragen ist jeweils eine $\sqrt{10}$ -Verdünnungsreihe, angegeben ist der Exponent der Verdünnung zur Basis 10, die Ausgangskonzentrationen (-0) entsprechen je 18 µl eines PCR-Ansatzes. Die Verdünnung 10^{-1,5} der *Pwo-*PCR enthält etwa soviel Produkt wie die Verdünnung 10⁻¹ der *Taq-*PCR und soviel Hintergrund wie die Verdünnung 10⁻² *Taq-*Polymerase. Der auf PCR-Fehlern beruhende Hintergrund in der TGGE macht bei Verwendung von *Pwo-*Polymerase also nur etwa 1/10 des Hintergrundes der *Taq-*Polymerase aus. In der Mitte (x) ist zum Vergleich das Produkt einer andere PCR aufgetragen. Die unteren Banden sind die nicht kovalent verknüpften Einzelstränge.

4.2.9 Replikationsgenauigkeit in der PCR

Die Strangverlängerung in der PCR durch die Polymerase geschieht nicht fehlerfrei. Gelegentlich wird ein falsches, d.h. zum Gegenstrang nicht komplementäres Nukleotid eingebaut. Hier bricht die Synthese ab. Daher nimmt die Amplifikationseffizienz in der PCR mit zunehmender Fragmentlänge ab. Vereinzelt wird jedoch auch nach einem falsch eingebauten Nukleotid die Synthese fortgesetzt. Das ergibt einen DNA-Strang mit einer an einer Position von der Ursprungssequenz abweichenden Sequenz. Diese wird dann in den folgenden Zyklen ebenfalls amplifiziert. Der Falscheinbau eines Nukleotides mit anschließender Strangverlängerung führt also zur Synthese und Amplifikation von DNA-Fragmenten, die nicht der ursprünglichen Sequenz entsprechen. Die Wahrscheinlichkeit, mit der dies geschieht, wird als Fehlerrate f der Polymerase bezeichnet.

Für die Fehlerrate f_{Taq} der in der PCR verwendeten *Taq*-Polymerase gibt es in der Literatur verschiedene Angaben. Sie reichen von $f_{Taq} = 2,1\cdot10^{-4}$ (Keohavong und Thilly, 1989) über $f_{Taq} = 2,0\cdot10^{-5}$ (Lundberg *et al.*, 1991) bis zu $f_{Taq} = 8,0\cdot10^{-6}$ (Cline et al.,1996). Die erheblichen Unterschiede in den Angaben sind durch die verschiedenen Testverfahren erklärbar. Die Autoren mit den niedrigeren Angaben messen die Fehlerrate der Polymerasen mit einem *lacIOZa*-Assay, bei dem ein *lacIOZa*-Gen amplifiziert und kloniert und anschließend in einem Farbassay ausgezählt wird, in welchem Anteil der Klone das Genprodukt nicht mehr korrekt funktioniert. Bei diesem Testverfahren kann es jedoch zur Unterschätzung der Fehlerraten kommen, u.a. weil sich möglicherweise manche Mutationen nicht klonieren lassen (Lundberg *et al.*, 1991). Barnes (Barnes, 1992) erhält mit einem ähnlichen Testverfahren Fehlerraten von etwa $f_{Taq} = 1\cdot10^{-4}$.

Keohavong und Thilly (Keohavong und Thilly, 1989) haben dagegen ein DGGE-Verfahren zur Bestimmung der Fehlerraten entwickelt. Sie haben radioaktiv markierte PCR-Produkte in einer DGGE aufgetrennt und dann das Verhältnis der Radioaktivität einer Gelspur außerhalb der Homoduplexbande durch die Gesamtradioaktivität geteilt. Nach Abzug der gelbedingten Hintergrundradioaktivität kamen sie auf einen Fehleranteil von 43% nach einer 10⁶-fachen Amplifikation eines Fragmentes mit 104 Basenpaaren im ersten kooperativ denaturierenden Bereich. Da diese Meßmethode den in dieser Arbeit verwendeten Experimenten entspricht, wird im weiteren von einer Fehlerrate von $f_{Taq} = 2 \cdot 10^{-4}$ für die *Taq*-Polymerase ausgegangen. Die Fehlerrate der *Pwo*-Polymerase beträgt nach Herstellerangaben nur ein Zehntel der Fehlerrate der *Taq*-Polymerase. Für die *Pwo*-Polymerase wird deshalb eine Fehlerrate von $f_{Pwo} = 2 \cdot 10^{-5}$ angenommen.

4.2.9.1 Berechnung der Replikationsgenauigkeit

Die in der PCR in einem Zyklus entstandenen Produkte dienen in den nächsten Zyklen selbst wieder als Matrizen und damit werden auch die in einzelnen Strängen entstandenen Replikationsfehler vervielfältigt, zudem kommen in jedem Zyklus neue Fehler hinzu. Dies erfordert eine genauere Betrachtung der Fehlerrate in der PCR.

In der PCR erhält man nicht in jedem Zyklus eine Verdoppelung der DNA-Moleküle. Daher wird für die Berechnung nicht die Anzahl der tatsächlich durchgeführten PCR-Zyklen verwendet, sondern nur die Anzahl der Strangverdoppelungen z, was auch als "effektive Zykluszahl" bezeichnet werden kann. Wird die Substanzmenge in der PCR um den Faktor a amplifiziert, so ist $z = \log_2 a = \log a / \log 2$. Für eine typische 10⁶-fache Amplifikation gilt also $z \approx 20$. Eine Berechnung für eine reale PCR unter Berücksichtigung der tatsächlichen Amplifikationsrate in jedem Zy-

klus würde die Angabe von Effizienzfaktoren benötigen, die in jedem Zyklus anders sind. Aus der Wahrscheinlichkeit f, daß ein Nukleotid falsch eingebaut und der Strang anschließend doch verlängert wird, ergibt sich die Wahrscheinlichkeit r einer korrekten Strangverlängerung um ein Nu-

$$r = 1 - f$$

kleotid zu

Die Wahrscheinlichkeit r_m , daß m Nukleotide nacheinander richtig eingebaut werden, ist das Produkt der Einzelwahrscheinlichkeiten:

$$r_m = r^m = (1-f)^m$$

Sind im i-ten Zyklus M_i korrekte Moleküle vorhanden, so sind diese auch im nächsten Zyklus vorhanden, zusätzlich kommen $M_i(1-f)^m$ korrekte Kopien hinzu:

$$M_{i+1} = M_i + M_i (1-f)^m = M_i [1+(1-f)^m]$$

Die Anzahl der korrekten Moleküle läßt sich also mit dem Faktor $1+(1-f)^m$ berechnen. Mit einer Ausgangszahl von M₀ korrekten Molekülen erhält man nach z Zyklen, also nach z-facher Amplifikation, M_z korrekte Moleküle:

$$M_{z} = M_{0} [1 + (1 - f)^{m}]^{z}$$

Da in jedem der z effektiven Zyklen die Anzahl der Moleküle verdoppelt wurde, gibt es nach z Zyklen $M_0 2^z$ Moleküle, der relative Anteil R_z korrekter Moleküle an der Gesamtzahl beträgt demnach:

$$R_{z} = \frac{M_{z}}{M_{0}2^{z}} = \frac{M_{0}[1+(1-f)^{m}]^{z}}{M_{0}2^{z}} = \frac{[1+(1-f)^{m}]^{z}}{2^{z}}$$

Nicht alle diese Moleküle haben die durch die Primer vorgegebene Länge. Die eingesetzten M₀ Ausgangsmoleküle (*Templates*) T gehen in der Regel an beiden Enden über die Primer hinaus, wenn es sich dabei um genomische oder plastidäre DNA handelt oder diese aus einer vorhergehenden PCR mit weiter außen liegenden Primern stammt. Nur wenn die Ausgangsmoleküle aus einer vorhergehenden PCR mit den gleichen Primern stammt, sind alle Moleküle gleich lang. In dem Fall entspricht der Anteil korrekter PCR-Produkte P der Gesamtzahl korrekter Moleküle G.

Die von den M_0 Ausgangsmolekülen direkt kopierten F1-Produkte beginnen an einem Primer, gehen jedoch auf der anderen Seite über die Position des Gegenprimers hinaus, bis daß die Synthese irgendwo abbricht oder das Ende des Ausgangsmoleküls erreicht (Abb. 4.26).



Abb. 4.26: Art und Aufbau der Produkte in einer PCR. Die Ausgangsmoleküle sind meist viel länger als die eigentlichen PCR-Produkte, die durch die Primer begrenzt werden. Die jeweils erste Kopie der Ausgangsmoleküle, hier als F1-Moleküle bezeichnet, fängt jeweils an einer Seite mit dem Primer an, geht jedoch über den zum Gegenprimer komplementären Sequenzbereich hinaus. Die Primer sind als dunkle Pfeile dargestellt, die dazu komplementären Sequenzen als helle Pfeile. Der Plusprimer hat die Länge b, der Minusprimer die Länge q, dazwischen liegen m Nukleotide.

Von diesen werden in jedem effektiven Zyklus M_0 Moleküle synthetisiert, insgesamt in z Zyklen also $M_0 z$ F1-Moleküle. Da bei der Synthese der F1-Moleküle definitionsgemäß die korrekten Matrizen kopiert werden, beträgt die Anzahl der in jedem Zyklus dazukommenden korrekt kopierten F1-Moleküle M_0 (1-f)^m, in z Zyklen sind das insgesamt:

$$M_0 z (1-f)^m$$

Die Anzahl und der Anteil p_z der (korrekten) PCR-Produkte P nach z Zyklen, die an beiden Enden mit den Primern aufhören und die vorgegebene Länge haben, ergibt sich als Differenz der Gesamtmoleküle abzüglich der Matrizen und F1-Produkte nach folgender Tabelle 4.4:

	Moleküle	Anzahl	davon korrekt	Anteil korrekter Moleküle
G	Gesamt	$M_0 2^z$	$M_0 [1+(1-f)^m]^z$	$[1+(1-f)^{m}]^{z}/2^{z}$
Т	Matrizen	M_0	M ₀	1
F1	F1-Moleküle	M ₀ z	$M_0 z (1-f)^m$	(1-z) ^m
Р	PCR-Produkte = G - F1 - T	$M_0 (2^z-z-1)$	$\mathbf{M}_0 \left\{ [1 + (1 - f)^m]^z - z \ (1 - f)^m - 1 \right\}$	$\frac{[1+(1-f)^m]^z - z(1-f)^m - 1}{2^z - z - 1}$

Tab. 4.4: Übersicht über die in einer PCR erhaltenen Moleküle und ihrem Fehleranteil

Diese Betrachtung gilt nur für die m Nukleotide, die zwischen den Primern liegen. Nur diese Nukleotide werden von anderen PCR-Produkten als Matrize kopiert. In jedem Strang liegt 5` davon der Primer, der mit der Wahrscheinlichkeit p_+ bzw. p. korrekt hergestellt wurde. 3` davon dient (außer bei den F1-Molekülen) der jeweilige Gegenprimer als Matrize. Bei einer Länge des Plusprimers b und des Minusprimers q ergibt sich also für diese Bereiche ein Anteil von $(1-f)^b$ für den Minusstrang bzw. $(1-f)^q$ für den Plusstrang an korrekten Sequenzen. Fehler in diesem Bereich werden nicht weiter kopiert, da hier in den nächsten Zyklen wieder der (korrekte) Gegenprimer anlagert. Einzelne Fehlbasen, die nicht direkt am 3'-Ende eines Primers liegen, verschlechtern das Anlagern des Primers und die Elongation nur geringfügig, so daß diese hier nicht weiter zu beachten sind.

Die Wahrscheinlichkeit R_p , daß ein Plusstrang nach z Zyklen korrekt ist, ergibt sich also als Produkt aus den Wahrscheinlichkeiten, daß der Plusprimer korrekt ist, p_+ , daß die folgenden m Nukleotide bis zum Minusprimer korrekt sind, p_z , daß der Bereich des Minusprimers korrekt kopiert wurde, $(1-f)^q$, und daß der dabei als Matrize dienende Minusprimer korrekt war, p.:

$$R_{p} = p_{+}p_{z}(1-f)^{q}p_{-} = p_{+}\frac{[1+(1-f)^{m}]^{z}-z(1-f)^{m}-1}{2^{z}-z-1}(1-f)^{q}p_{-}$$

Entsprechend beträgt der Anteil R_m korrekter Minusstränge nach z Zyklen:

$$R_{m} = p_{-}p_{z}(1-f)^{b}p_{+} = p_{+}\frac{[1+(1-f)^{m}]^{z}-z(1-f)^{m}-1}{2^{z}-z-1}(1-f)^{b}p_{-}$$

Werden im letzten, z-ten Abschlußzyklus aus den Einzelsträngen jeweils wieder Doppelstränge synthetisiert, so ergibt sich die Wahrscheinlichkeit R_d , daß diese Doppelstränge korrekt sind aus der Wahrscheinlichkeit $R_{p,z-1}$, daß der als Matrize verwendete Plusstrang nach z-1 Zyklen korrekt ist, multipliziert mit den Wahrscheinlichkeiten, daß der anlagernde Minusprimer korrekt ist, p., sowie die restlichen m+q Basen korrekt eingebaut werden, $(1-f)^{m+q}$:

$$R_{d} = R_{p,z-1} p_{-} (1-f)^{m+b} = p_{+} \frac{\left[1 + (1-f)^{m}\right]^{z-1} - (z-1)(1-f)^{m} - 1}{2^{z-1} - (z-1) - 1} (1-f)^{n} p_{-}^{2}$$

wobei n = b + m + q die Gesamtlänge des Produktes ist. Für einen korrekten Doppelstrang mit Minusstrang als Matrize im letzten Zyklus gilt entsprechendes.

Die in einer PCR erzielbare Produktmenge ist im wesentlichen dadurch begrenzt, daß bei einer hohen Produktkonzentration die Rehybridisierung der Doppelstränge wahrscheinlicher ist als die Primeranlagerung (Plateaueffekt). Dabei können sich auch Heteroduplexmoleküle mit fehlerhaft amplifizierten Molekülen bilden. Bei der Mutationssuche in getrennt amplifizierten Proben folgt nach der Mischung noch ein Denaturierungs/Rehybridisierungzyklus zur Heteroduplexbildung.

Nach einem derartigen Zyklus ist die Wahrscheinlichkeit R_h , einen fehlerfreien Doppelstrang zu haben, der kein Mismatch enthält, das Produkt der Anteile korrekter Plus und Minusstränge:

$$R_{h} = R_{p}R_{m} = p_{+}^{2}\left\{\frac{\left[1+(1-f)^{m}\right]^{z}-z(1-f)^{m}-1}{2^{z}-z-1}\right\}^{2}(1-f)^{b+q}p_{-}^{2}$$

Der Anteil korrekter Amplifikate in Abhängigkeit von ihrer Länge für unterschiedliche Polymerasen zeigt Abb. 4.27. Dabei wurden typische PCR-Parameter verwendet: Eine a = 10^{6} -fache Amplifikation, also z = 19,93 effektive Zyklen, sowie zwei Primer mit einer Länge von b = q = 20 nt. Bei Verwendung der Taq-Polymerase mit einer Fehlerrate von $f_{Taq} = 2 \cdot 10^{-4}$ nimmt der Anteil der fehlerfrei amplifizierten Doppelstränge mit zunehmender Länge deutlich ab, mit der Pwo-Polymerase (f = $2 \cdot 10^{-5}$) sind die meisten Produkte fehlerfrei.



Abb. 4.27: Anteil korrekter Amplifikate in Abhängigkeit von der Produktlänge von 40 bis 620 bp für verschiedene Fehlerraten der Polymerase. Es wurden zwei Primer von je 20 nt ohne Fehler, eine 10^6 -fache Amplifikation sowie eine abschließende Rehybridisierung der Produkte vorausgesetzt. Die untere Linie entspricht f= $2 \cdot 10^{-4}$ (*Taq*), die nächste f= $2 \cdot 10^{-5}$ (*Pwo*), die obere Linie entspricht f= $0.8 \cdot 10^{-5}$ (*Taq* nach Cline et al.,1996).

4.2.9.2 Näherungsformeln

In der Literatur werden als Angabe zur Berechnung der Gesamtfehler einer PCR aus der Fehlerrate der Polymerase häufig vereinfachende Formeln angegeben, z.B. F = 1-R = f m z (bei Lundberg *et al.*, 1991; Keohavong und Thilly, 1989). Die Multiplikation der Einzelfehlerrate f mit der Anzahl der Nukleotide im interessanten Bereich m und der effektiven Zykluszahl z ist als Näherungsformel für kleine m, z.B. bei der Berechnung der Fehlerrate in einer Restriktionserkennungssequenz, durchaus brauchbar, ergibt jedoch für durchschnittliche PCR-Produkte mit einigen hundert Basenpaaren zu große Werte. W. Barnes (Barnes, 1992) berechnet die Fehlerrate für einen Strang mit der Poisson-Statistik zu e^{-f m} und damit die Gesamtfehlerrate F unter Vernachlässigung des letzten Zyklusses, ähnlich wie in dieser Arbeit, zu:

$$F = R - 1 = \left[\frac{1 + e^{-fm}}{2}\right]^{z - 1}$$

Die Näherung $(1-f)^m \approx (e^{-f})^m = e^{-f \cdot m}$ ist dabei für kleine f durchaus gerechtfertigt, denn 1-f ist die Näherung 1. Ordnung von e^{-f} .

4.2.9.3 Bedeutung der PCR-Fehler für den Hintergrund in der TGGE

Bei Elution und Reamplifikation des durch die PCR-Fehler verursachten Hintergrunds in einer TGGE erhält man neben den unspezifischen Fehlern wieder die eingesetzte Probe, da korrekt amplifizierte Moleküle mit fehlerhaft kopierten Molekülen Heteroduplices gebildet haben. Die Reamplifikation der fehlerhaften Moleküle ergibt dabei keine spezifischen Banden, da viele verschiedene Fehler im Hintergrund vorliegen. Damit kann erklärt werden, daß bei der Reamplifikation des Hintergrundes im Wesentlichen die eingesetzte Probe reamplifiziert wird und keine Heteroduplexbanden angereichert werden. Durch eine Verringerung des Hintergrundes in der TGGE durch eine weniger fehlerhafte PCR kann dieser Effekt verringert werden.

Für das PCR-Fragment V3P1/V3M1P mit einer Länge von n = 284 Nukleotiden, Primer V3P1 mit einer Länge von b = 20 Nukleotiden, Primer V3M1P mit q = 23 Nukleotiden und einer a = 10^{6} -fachen Amplifikation ergibt sich bei Vernachlässigung möglicher Primerfehler (p₊ = p₋ = 1) folgende Anteile an Molekülen mit fehlerfrei kopierter Sequenz:

$$R(f_{Taq} = 2.10^{-4}) = 38\%,$$
 $R(f_{Pwo} = 2.10^{-5}) = 91\%$

Nach einer Amplifikation mit *Taq*-Polymerase ist also nur noch ein geringer Anteil der Doppelstränge eine korrekte Kopie der Ursprungssequenz. Ein erheblicher Teil der Moleküle enthält mindestens einen Fehler. Diese fehlerhaften Moleküle bilden Heteroduplices und sind für den Hintergrund in der TGGE verantwortlich. Mit *Pwo*-Polymerase ist dieses Verhältnis deutlich besser.

4.2.10 Weitere Optimierungen

4.2.10.1 Asymmetrische Hybridisierung

Ursprünglich war vorgesehen, die Reamplifikation einer Heteroduplexbande, in der Sondensequenz und abweichende Probensequenz in etwa gleichen Verhältnissen vorliegen sollten, direkt zu sequenzieren. Dies sollte an den abweichenden Nukleotidpositionen zu zweideutigen Sequenzen führen, von denen eine Möglichkeit der Sonde, die andere dann der Probensequenz entsprechen sollte.

Diese Zuordnung war so jedoch nicht immer eindeutig möglich. Ein PCR-Produkt, bei der die beiden Plasmide *wt* und *mut* in etwa gleichen Konzentrationen als Ausgangsmoleküle eingesetzt wurden, wurde in beide Richtungen sequenziert. Die Sequenzierung einer Richtung ergab ein klares Ergebnis: an den beiden Positionen, wo sich die Matrizen unterschieden, gaben beide Sequenzen etwa gleich starke Signale. In der Sequenzierung in die andere Richtung waren die beiden Sequenzen dagegen unterschiedlich stark vertreten und der Hintergrund höher; eine Zuordnung der Sequenzen wäre nicht mehr eindeutig möglich gewesen.

Bei der Sequenzierung der Reamplifikation einer eluierten TGGE-Bande konnten zwar die Sequenzen von Sonde und Probe den Signalen zugeordnet werden. Umgekehrt wäre jedoch eine sichere Bestimmung der Probensequenz durch "Subtraktion" der Sondensequenz wegen des stärkeren Hintergrundes nicht möglich gewesen. Es war daher eine Modifikation des Verfahrens notwendig, mit der gezielt die Probe reamplifiziert werden konnte.

Sonde und Probe wurde dazu mit unterschiedlichen Primern amplifiziert, so daß die Probenamplifikate an der Seite ohne Psoralenprimer länger als die Sondenamplifikate waren (Abb. 4.28).



Abb. 4.28: Prinzip der asymmetrischen Hybridisierung zur gezielten Reamplifikation der Probensequenz aus Heteroduplexbanden. Pfeile stellen die Primersequenzen dar, hohle Pfeile die Orte der nicht vorhandenen Primersequenzen. Die Sonde ist schwarz und die Probensequenz grau dargestellt.

Die Sonde ist mit einem Psoralenprimer (schwarzer Punkt) amplifiziert worden. Die Probe ist mit dem entsprechenden Primer ohne Psoralen amplifiziert worden, als Gegenprimer dient ein Primer, der außerhalb des Sondenamplifikates liegt. Werden nach einer D/R-TGGE die kovalent verknüpften Moleküle eluiert (untere Zeile), so sollte nur der Probenstrang des Hybrides mit dem äußeren Primerpaar reamplifiziert werden können (unten rechts), der Sonden-Homoduplex ist dazu zu kurz (unten Mitte). Die Hybride mit dem Probenstrang ohne Psoralen (obere Zeile) sind beim denaturierenden Vorlauf abgetrennt worden.

Dabei wurden für die Sonde weiterhin die Primer V3P1 und V3M1P verwendet, die Probe wurde dagegen mit den Primern V3P8 und V3M1A amplifiziert. Hybridisierung, kovalente Verknüpfung und TGGE funktionieren damit problemlos, wie Abb. 4.29 zeigt.

Im folgenden wird folgende Notation verwendet: Mit dem asymmetrischen Primerpaar V3P8/V3M1A amplifizierte Sequenzen werden mit Großbuchstaben bezeichnet, mit dem Psoralenprimer V3M1P amplifizierte Sequenzen werden unterstrichen, x bedeutet Hybridisierung: *WT* x <u>mut</u> ist also ein Hybrid aus PCR-Produkten von den Plasmiden pMW1-10 (*wt*) mit den Primern V3P8/V3M1A und pMW1-9 (*mut*) mit den Primern V3P1/V3M1P.

Erste Reamplifikationsversuche mit dieser Methode zeigten jedoch wider Erwarten einen großen Anteil an reamplifizierter Sondensequenz. Ursache hierfür waren die kovalenten Verknüpfungen (Abb. 4.30). In der PCR ist die Rehybridisierung der verknüpften Einzelstränge eine Reaktion 1. Ordnung, während die Primeranlagerung eine Reaktion zweiter Ordnung ist. Die Rehybridisierung ist deshalb trotz einer hohen Primerkonzentration die bevorzugte Reaktion. In einem rehybridisierten Molekül aus Probe und Sonde wirkt der Sondeneinzelstrang als Primer und der Probeneinzelstrang als Matrize. Die Polymerase verlängert den Sondenstrang, und im nächsten Zyklus kann der entsprechende Primer an die verlängerte Sonde anlagern und diese kopieren. Zwar ist auch hier die Primeranlagerung als Reaktion 2. Ordnung gegenüber der direkten Rehybridisierung erschwert, da an diesem Ende des Doppelstrangs aber keine kovalente Bindung vorliegt, können sich hier die randständigen Basen trennen und so gelegentlich eine Primeranlagerung ermöglichen. Dadurch wird dann die Sonde reamplifiziert.



Abb. 4.29: Senkrechte D/R-TGGE mit asymmetrisch hybridisierten PCR-Produkten. Eine Probe mit einer Mischung der Sequenzen *WT* und *MUT* ist mit den Primern V3P8/V3M1A amplifiziert worden und mit einer <u>wt</u>-Sonde, amplifiziert mit den Primern V3P1/V3M1P, hybridisiert und kovalent verknüpft worden. Die obere Bande zeigt die Aufspaltung der *PROBE* x <u>Sonde</u> -Hybride. *WT* und *MUT* sind deutlich zu unterscheiden. Die Bande darunter zeigt den Übergang der verknüpften Sonde alleine. Darunter liegen die Einzelstrangbanden, die etwas längere Probe über der kürzeren Sonde. Die unterste Bande besteht aus nicht kovalent verknüpften Sondenmolekülen, die in der Renaturierungsphase im Gel renaturieren konnten. Diese Bande bricht beim Erreichen des Temperaturbereiches der Strangtrennung ab. In den kleinen Auftragstaschen rechts und links (x) sind kovalent verknüpfte PCR-Produkte mit den Sondenprimern V3P1/V3M1P zum Vergleich aufgetragen.



Abb. 4.30: Konkurrenzreaktion zur Primeranlagerung bei kovalent verknüpften DNA-Strängen. Die Rehybridisierung der kovalent verknüpften Einzelstränge ist als Reaktion 1. Ordnung gegenüber der Primeranlagerung als Reaktion 2. Ordnung bevorzugt. Rehybridisierte Sonden werden dann von der Polymerase verlängert, dadurch können sie im nächsten Zyklus amplifiziert werden. Die Sonde ist schwarz, die Probensequenz grau dargestellt. Primer sind als kleine Pfeile, die Psoralen-Verknüpfung als schwarzer Punkt dargestellt.

4.2.10.2 Lösen der kovalenten Verknüpfungen der Einzelstränge

Um die Proben nach der Gelelution reamplifizieren zu können, mußten die kovalenten Psoralen-Verknüpfungen der DNA-Stränge wieder gelöst werden. Nach Literaturangaben (Kanne *et al.*, 1982; Pieles und Englisch; 1989) sollte dies durch eine Bestrahlung mit UV-Licht von 254 nm möglich sein. Dies wurde durch Bestrahlungszeitreihen sowohl im Gel als auch in wäßrigen Lösungen der Eluate erprobt.

Bei einer Bestrahlung der Proben im Gel ist die Effektivität der Photoreaktion am deutlichsten nachweisbar. Dazu wurden kovalent verknüpfte PCR-Produkte für 20 min denaturierend in Gel aufgetrennt, um die kovalent verknüpften von den nicht verknüpften Molekülen abzutrennen. Danach wurde das Gel mit den Proben in einem Stratalinker (Stratagene) mit UV-Licht von 254 nm bestrahlt, wobei die einzelnen Gelspuren, der gewünschten Bestrahlungszeit entsprechend, zeitweise abgedeckt wurden. Anschließend wurde die denaturierende Elektrophorese für weitere 20 min fortgesetzt, um die durch die Bestrahlung gelösten Verknüpfungen nachweisen zu können. Drei Banden waren zu erwarten: Am weitesten sollten die nicht verknüpften Moleküle im Gel laufen, am langsamsten die verknüpften Moleküle, die bei der Bestrahlung nicht gelöst wurden. Dazwischen sollten die Moleküle liegen, die zunächst kovalent verknüpft waren und deren Verknüpfung dann bei der Bestrahlung mit 254 nm gelöst wurde. Das Verhältnis dieser Bande zu der Bande der verknüpften Moleküle gibt dann die Effektivität der Lösung der Verknüpfung an.

Abb. 4.31 zeigt das Ergebnis: Mit zunehmender Bestrahlungszeit steigt der Anteil der gelösten Verknüpfungen. Gleichzeitig erscheint eine weitere Bande oberhalb der Bande mit den kovalent verknüpften Molekülen. Diese beruht möglicherweise auf eine Zerstörung der DNA durch das UV-Licht, zumal DNA ein Absorptionsmaximum nahe 254 nm und daher eine große Empfindlichkeit in diesem spektralen Bereich hat. Eine entsprechende Bande gab es auch bei einer Probe, die keinen Psoralenprimer enthielt (Spur A in Abb. 4.31).



Abb. 4.31: Zeitreihe zum Lösen der kovalenten Verknüpfung der DNA-Stränge bei 254 nm. Zunächst wurde für 20 min eine denaturierende Elektrophorese durchgeführt, dann bei zeitweiser Abdeckung einzelner Gelspuren mit UV-Licht von 254 nm bestrahlt und die Gelelektrophorese anschließend für weitere 20 min fortgesetzt. Die Menge der Moleküle, bei denen die Verknüpfung gelöst wurde, nimmt mit der Zeit deutlich zu, die der kovalent verknüpften Moleküle nimmt ent-sprechend ab. Die Verknüpfungen lassen sich jedoch nicht vollständig lösen, und mit zunehmender Bestrahlungszeit gibt es auch eine Bande mit Molekülen, die in der Elektrophorese nicht weiter gelaufen sind. In Spur A wurde ein PCR-Produkt in hoher Konzentration aufgetragen, welches keinen Psoralenprimer enthält, sondern den Primer V3M1A. Auch hier bleibt nach 32 min UV-Bestrahlung bei 254 nm ein Teil der Moleküle im Gel zurück.

Wurden kovalent verknüpfte PCR-Produkte vor der Elektrophorese in TE-Puffer bestrahlt, konnte eine vergleichbare Reduktion verknüpfter Moleküle erhalten werden. Zusätzlich gab es einen mit der Bestrahlungszeit zunehmenden Schmier, der kaum in ein Gel einlief. Bei der Reamplifikation dieser Proben zeigte sich, daß mit zunehmender Bestrahlungszeit die Produktmenge in der PCR deutlich abnahm. Bereits nach 7 min UV-Bestrahlung bei 254 nm, bei der erst ein geringer Teil der kovalenten Verknüpfungen gelöst war, konnte kaum noch PCR-Produkt detektiert werden.

Eine UV-Bestrahlung bei 254 nm löst also nicht nur die kovalente Psoralenverknüpfung der Einzelstränge auf, sondern zerstört auch die DNA soweit, daß sie nicht mehr reamplifiziert werden kann. Ein möglicher Mechanismus ist die UV-induzierte Dimerisierung benachbarter Thymine. Es mußte also eine andere Methode zum Lösen der Verknüpfungen gefunden werden.

In der Literatur (Shi *et al.*, 1988; Yeung *et al.*, 1988) ist beschrieben, daß Psoralen-Verknüpfungen von DNA-Strängen auch bei erhöhter Temperatur und alkalischem pH-Wert gelöst werden können. Daher wurde in einem Versuch ein kovalent verknüpftes PCR-Produkt mit 1/10 Volumen 1 M NaOH auf pH 13 eingestellt und bei 90 °C inkubiert. Zum Stoppen der Reaktionen wurden die Proben mit 1/9 Volumen 3 M NaAc neutralisiert und anschließend mit Ethanol gefällt. Das Ergebnis zeigt Abb. 4.32: Im denaturierenden Gel nimmt die Konzentration der verknüpften Doppelstränge bis 15 min Bestrahlungsdauer nicht wesentlich ab, nach 30 min ist dagegen kaum noch Probe vorhanden. Diese deutliche Abnahme der Probenmenge ist möglicherweise auf ein intensiveres Mischen der Probe mit der Neutralisationslösung zurückzuführen. Von weiteren Experimenten mit alkalischer Lösung der kovalenten Verknüpfungen wurde abgesehen.



Abb. 4.32: Versuch der chemischen Trennung von Psoralen-vernetzten DNA-Doppelsträngen in 0,1 M NaOH und Inkubation bei 90 °C für die angegebene Zeit. Orig. bezeichnet eine Kontrolle mit der verwendete Probe ohne Zugabe von NaOH und NaAc und ohne Inkubation bei 90 °C

Da eine Bestrahlung von 254 nm zum Lösen der kovalenten Psoralen-Verknüpfungen nicht geeignet war, wurde nach einer Lichtquelle mit einer Wellenlänge zwischen 365 nm (zur Induzierung der kovalenten Verknüpfungen) und 254 nm (bei der die DNA zerstört wird) gesucht. In diesem Wellenlängenbereich stand ein Leuchttisch mit 302 nm zur Verfügung. Auf diesem wurde, wie oben beschrieben, eine Bestrahlungs-Zeitreihe mit einem denaturierenden Gel durchgeführt. Das Gel wurde dabei mit der Gelbondfolie nach oben auf den Leuchttisch gelegt, da die Folie kaum UV-durchlässig ist. Das Ergebnis zeigt Abb. 4.33: Die kovalenten Verknüpfungen werden mit zunehmender Bestrahlungszeit wieder gelöst (mittlere Banden), zudem treten keine verzögerten Banden auf, die auf eine Zerstörung der DNA hinweisen würden.

Um zu überprüfen, ob sich diese bei 302 nm bestrahlte Proben reamplifizieren lassen, wurde eine D/R-TGGE mit einer Probe aus *WT* und *MUT* im Verhältnis 1: 0,1 in einer Zeitreihe mit 302 nm bestrahlt, die Spuren streifenweise geleluiert und anschließend reamplifiziert. Das Ergebnis zeigt Abb. 4.34: Nach 3 min Bestrahlungszeit sinkt die Ausbeute an reamplifiziertem Heteroduplex (oberste Bande).



Abb. 4.33: Zeitreihe zum Lösen der kovalenten Verknüpfung der DNA-Stränge, jetzt bei 302 nm auf einem UV-Schirm. Das Gel wurde zunächst 20 min denaturierend elektrophoretisiert, dann mit einer Wellenlänge von 302 nm UV-bestrahlt, wobei die Gelspuren zeitweise abgedeckt wurden, anschließend wurde noch einmal für 20 min elektrophoretisiert. Die Menge der Moleküle, bei denen die Verknüpfung gelöst wurde, nimmt mit der Zeit leicht zu, die der kovalent verknüpften Moleküle nimmt entsprechend ab. Die Verknüpfungen lassen sich jedoch nicht quantitativ lösen. Es treten keine Zusatzbanden auf, die auf eine Zerstörung der DNA hinweisen, wie bei einer Bestrahlung mit 254 nm. Die Probenauftragstasche, in deren Spur die Proben 10' bestrahlt wurden, war beschädigt, wodurch die Banden verformt sind; das Ergebnis wurde jedoch nicht beeinflußt.





Abb. 4.34: Reamplifikation nach Lösung der kovalenten Verknüpfungen bei 302 nm in einer Zeitreihe. Aus der für 1 min bestrahlten Spur wurden vier im Gel nebeneinander liegende Eluate reamplifiziert, aus den anderen Spuren jeweils das Eluat in Höhe der Heteroduplexbande. x ist eine Kontrollprobe.

4.2.10.3 Vermeidung der Sonden-Reamplifikation

Da sich die kovalenten Verknüpfungen der DNA-Stränge nicht quantitativ lösen lassen, mußte ein weiteres Verfahren gefunden werden, um die zuvor beschriebene Verlängerung der Sondenstränge in der PCR zu vermeiden. Dazu wurde der Sondenprimer V3P1 an seinem 5'-Ende um 6 Nukleotide verlängert, die komplementär zur Zielsequenz sind und somit keinen Doppelstrang bilden können. Mit diesem modifizierten Primer V3P1L amplifizierte Sondenmoleküle kann die *Taq*-Polymerase nicht mehr verlängern, wenn sie mit einem längeren Probenstrang hybridisiert sind (Abb. 4.35). Ei-

ne Verwendung von *Pwo*-Polymerase für die Reamplifikation ist dagegen nicht möglich, denn diese würde mittels ihrer 3'-5'-Exonukleaseaktivität den einzelsträngigen Überhang abdauen. Bei einer späteren Sequenzierung stört die höhere Fehlerrate der *Taq*-Polymerase jedoch nicht.



Abb. 4.35: Verwendung eines modifizierten Sondenprimers zur Vermeidung der Reamplifikation der Sonde. Das kovalent verknüpfte Hybrid aus PROBEN-Strang (grau) und modifiziertem Sondenstrang (schwarz) kann von der *Taq*-Polymerase nicht mehr verlängert werden (X), da sein Ende nicht doppelsträngig ist (rechts unten). Damit läßt sich die Reamplifikation der Sondensequenz weiter verringern.

Pfeile stellen die Primersequenzen in den Nukleinsäuresträngen dar, hohle Pfeile die Orte der nicht vorhandenen Primersequenzen. Die Sonde ist schwarz und die Probensequenz grau dargestellt. Schräge Striche bezeichnen nicht zur Ursprungssequenz komplementäre Bereiche.

Eine senkrechte D/R-TGGE mit einem Hybrid aus einer Mischung aus WT und MUT als Probe und <u>wt-L</u> als modifizierte Sonde zeigt, daß die Trennung zwischen Homo- und Heteroduplices immer noch ausreichend ist (Abb. 4.36).



Abb. 4.36: Senkrechte D/R-TGGE mit der verlängerten Sonde. Der Laufunterschied zwischen nativen und denaturierten Hybriden aus Probe und Sonde ist kleiner geworden, reicht zur Analyse aber immer noch aus.

Um die Leistungsfähigkeit dieses Systems zu überprüfen, wurde eine Verdünnungsreihe mit unterschiedlichen Verhältnissen von *WT* und *MUT* amplifiziert, mit der modifizierten Sonde hybridisiert, in einer parallelen D/R-TGGE aufgetrennt, die Heteroduplexbanden geleluiert und nachfolgend reamplifiziert. Das Ergebnis zeigt Abb. 4.37. Aus einem 1: 0,1-Verhältnis von *WT* und *MUT* konnte die *MUT*-Sequenz in deutlichem Überschuß zur *WT*-Sequenz reamplifiziert werden, aus einem 1: 0,01-Verhältnis konnte noch etwa eine Reamplifikation im Verhältnis 1: 1 erreicht werden.



Abb. 4.37: Elution (A) und Reamplifikationen (B,C) aus einer parallelen D/R-TGGE mit modifizierter Sonde. Der Temperaturgradient in den D/R-II-TGGEs betrug jeweils 40 °C bis 64 °C; bei B und C ist nur ein Ausschnitt dargestellt. A: Verschiedene Verhältnisse von WT:MUT sind in einer parallelen D/R-TGGE aufgetrennt und die kovalenten Verknüpfungen mit UV-Licht von 302 nm gelöst worden. Anschließend sind von jedem Verhältnis aus einer Spur 11 Gelstreifen ausgeschnitten und geleluiert worden.

B: Jeweils die Eluate um die Heteroduplexbande sind reamplifiziert und nach Hybridisierung mit einer <u>wt-L</u>-Sonde in einer weiteren D/R-TGGE analysiert worden. Aus dem Verhältnis 1: 10^{-1} konnte *MUT* in deutlichem Überschuß reamplifiziert werden (Eluate 3 und 4 zeigen die *WT*-Bande kaum), aus dem Verhältnis 1: 10^{-2} konnte *MUT* etwa gleich stark wie *WT* reamplifiziert werden (Eluat 5). Die weiteren Mischungsverhältnisse zeigen nur noch eine geringe Reamplifikation der *MUT*.

C: Die Reamplifikation aus den Eluaten des Verhältnisses 1: 10^{-2} zeigt die *MUT*-Bande hauptsächlich im Eluat 5, andere Eluate reamplifizieren schwach andere Banden. X ist in allen Fällen eine 1:1-Mischung aus *WT* und *MUT*, hybridisiert mit <u>wt-L</u> als Sonde zum Vergleich.

Eine Sequenzvariation, die nur zu 1% in einer Probe enthalten ist, kann auf diese Weise nicht nur detektiert, sondern auch charakterisiert werden. Damit sollte das System ausreichend empfindlich sein, um das Sequenzspektrum vom HIV analysieren zu können.

4.2.11 Zusammenfassung der Methode

Zur selektiven Anreicherung von Mutationen in geringer Konzentration (Abb. 4.38) wird die Probe mit einem Primerpaar ohne Psoralen amplifiziert (V3P8 und V3M1A). Die verwendete Sonde wird mit einem modifizierten Primerpaar amplifiziert: ein Psoralen(minus)primer (V3M1P) sowie ein Plusprimer, der innerhalb des Probenfragments liegt und dessen 5'-Ende nicht komplementär zur Probe ist (V3P1L). Zur Minimierung des PCR-fehlerbedingten Hintergrundes sollte für diese Amplifikationen eine fehlerarm replizierende Polymerase mit 3'-5'-Exonukleaseaktivität verwendet werden.

Die Produkte der Amplifikationen von Probe und Sonde werden miteinander gemischt und durch Aufheizen und anschließendes Abkühlen miteinander hybridisiert. Durch nachfolgende Bestrahlung mit UV-Licht von 365 nm wird ein Teil der Doppelstränge durch die Psoralengruppe an einem Ende kovalent miteinander verknüpft. In einer weiteren D/R-TGGE werden die nicht verknüpften Mole-küle von diesen getrennt.

Da nur der Minusprimer der Sondenmoleküle eine Psoralengruppe hat, liegen auf diese Weise lediglich die Moleküle als Doppelstränge im Gel vor, die als Minusstrang einen Sondenstrang haben. Alle anderen Moleküle finden sich in den Einzelstrangbanden wieder. In der Gradientenphase der D/R-TGGE werden dann die Probenmoleküle mit einer Mutation als instabilere Heteroduplexmoleküle von den Homoduplices der Probenmoleküle ohne Mutation und den rehybridisierten Sondenhomoduplices getrennt.

Durch Bestrahlen des Gels mit UV-Licht von 302 nm wird ein Teil der kovalenten Verknüpfungen der Doppelstränge wieder gelöst. Das Gel wird oberhalb der Homoduplexbanden streifenweise ausgeschnitten und die darin enthaltenen Heteroduplexmoleküle werden eluiert.

Zur Reamplifikation der Eluate werden wieder die Probenprimer (V3P8/V3M1A) verwendet. Mit einem Probenstrang rehybridisierte Sondenstränge können nicht bis zum Plusprimer (V3P8) ergänzt werden, da ihr Ende nicht komplementär zur Probensequenz ist. Dabei darf in dieser PCR jedoch keine fehlerarm arbeitende Polymerase mit 3'-5'-Exonukleaseaktivität verwendet werden, da dies die überstehenden Nukleotide abbauen könnte. Die Sondenmoleküle bleiben so zu kurz für eine Amplifikation mit dem Gegenprimer (V3P8) und nur die Probenmoleküle können amplifiziert werden.

Zur Überprüfung der Reamplifikation kann diese wieder mit einer Sonden-PCR gemischt, hybridisiert, verknüpft und in einer weiteren D/R-TGGE analysiert werden.

Eine Mutation, die nur in 1% der Probe enthalten ist, kann auf diese Weise auf 50% angereichert werden. Dies reicht aus, um eine Mutation in so geringer Ausgangskonzentration in einer Sequenzierung sicher ermitteln zu können.

PCR der Probe

PCR der Sonde

Primer V3P8 und V3M1A							
Wildtyp	→	+	99%				
Mutation	→	+	1%				

Primer V3	P1L und V3M1P
Wildtyp	

Hybridisierung und kovalente Verknüpfung, D/R-TGGE:



Gelelution, (teilweises) Lösen der Verknüpfung



PCR-Produkt:

+

Mutation amplifiziert

Abb. 4.38: Zusammenfassung der Vorgehensweise zur Anreicherung gering konzentrierter Mutationen: Durch die Verwendung eines modifizierten Gegenprimers für die Sonden-PCR (V3P1L) läßt sich nach Mischung mit der Probe, Hybridisierung, kovalenter Verknüpfung und Auftrennung der Moleküle in einer D/R-TGGE eine Reamplifikation der Sondenstränge vermeiden, so daß nur die ausgeschnittene Mutation amplifiziert wird.

4.3 Untersuchung des Neurotropismus bei HIV

4.3.1 Probenauswahl (DNA oder RNA)

Im Vermehrungszyklus des HIV kommt die genetische Information sowohl als RNA als auch als DNA vor. Die HI-Viren enthalten ein RNA-Genom, in einer infizierten Zelle wird die RNA in DNA umgeschrieben und ins Genom der Wirtszelle integriert. Von dort wird wieder RNA für die nächste Virengeneration transkribiert. Die Untersuchung und Bestimmung der Sequenzvariabilität bei HIV ist also sowohl auf DNA als auch auf RNA-Ebene möglich.

Zelluläre DNA aus Blut kann leicht gewonnen und ohne reverse Transkription in die PCR eingesetzt werden. Allerdings liefert die Untersuchung von HIV-DNA nur einen Ausschnitt aus dem vorhandenen Sequenzspektrum, denn jede HIV-DNA kann durch die Fehler der reversen Transkription vor der Integration in der Zelle einzigartig sein. Dadurch können ein Teil der infizierten Zellen soweit veränderte HIV-Gene enthalten, daß diese Zellen keine Viren produzieren können und dadurch langfristig erhalten bleiben (Cofin, 1995).

Als hirnnahes Körperkompartiment steht bei lebenden Patienten nur die Rückenmarksflüssigkeit zur Probengewinnung zur Verfügung. Dieser sogenannte Liquor ist ein weitgehend zellfreies Medium, so daß bei Patienten ohne pathologischen Liquorbefund bloß 0-200 Zellen/ml Liquor zu erwarten sind. Davon werden nur wenige ein HIV-Genom integriert haben, so daß entsprechend hohe Ansprüche an die Kontaminationsfreiheit der PCR zu stellen sind. Zu erwarten sind auch hier nur wenige Sequenzen, die bloß ein Teilspektrum des gesamten Sequenzspektrums abdecken.

Bei der Gewinnung viraler RNA sind hingegen andere Vor- und Nachteile zu beachten. Es handelt sich um potentiell infektiöses Material. Des weiteren ist vor der PCR eine reverse Transkription durchzuführen, die eine höhere Fehlerrate als die PCR aufweist und somit das Sequenzspektrum zusätzlich verfälschen kann. Andererseits läßt sich die virale RNA meist in größeren Mengen gewinnen, aus 200 bis 200 000 HIV-Partikeln pro ml Blut können leicht etwa 10² bis 10⁵ RNA-Kopien einer Probe gewonnen werden. Die Viruslast im Liquor kann ähnliche Werte erreichen (Eggers *et al.*, 1999). Zudem kann die virale RNA aus 0,5 ml Blut eher das gesamte Sequenzspektrum der vorhandenen Viren repräsentieren als die DNA, da aus einer infizierten Zelle bis zu 10⁵ Viruspartikel freigesetzt werden (Dimitrov und Martin, 1995). Aus diesen Gründen wurde in dieser Arbeit die virale RNA analysiert.

4.3.2 Etablierung der Probengewinnung

Die virale RNA konnte mit dem QIAamp viral RNA mini Kit (Qiagen, Hilden) aus Serum und Liquor gewonnen werden. Um eine möglichst hohe Ausbeute an viraler RNA zu erhalten, wurde jeder Schritt optimiert und die Proben nach Aufreinigung und reverser Transkription jeweils gefällt und komplett in der PCR eingesetzt. Auf diese Weise sollten die PCR-Produkte nach der reversen Transkription möglichst verlustarm die Sequenzspektren der Ausgangsproben widerspiegeln.

Nachdem die geschachtelte PCR schon etabliert war (Kapitel 4.2.2.2), wurden zunächst *in-vitro* -Transkripte hergestellt. Damit wurde die reverse Transkription und die Aufreinigung der Transkripte etabliert und schließlich die alkalische Hydrolyse zum RNA-Abbau nach der reversen Transkription optimiert.

4.3.2.1 In-vitro-Transkripte zur Optimierung

Zur Etablierung der Aufreinigung und reversen Transkription wurden in-vitro-Transkripte vom Plasmid pMW1-10 (wt) benötigt. Dazu wurde das Plasmid zunächst mit der Restriktionsendonuklease Eco R I linearisiert und anschließend die enthaltene HIV-Sequenz mit T7-Polymerase transkribiert. Das erhaltene Transkript von 1355 Nukleotiden wurde aus einem 4%-igem Polyacrylamidgel geleluiert, gefällt, in TE-Puffer gelöst und seine Konzentration spektralphotometrisch bestimmt.

Anschließend wurde eine Faktor-10-Verdünnungsreihe hergestellt, mit RNA-Mengen von 10^{0} bis 10^{9} Transkripten/µl. Für die Verdünnungen wurde TE-Puffer mit etwa 50 µg/µl tRNA als Schutz-RNA verwendet. Für die Etablierung und Kontrolle der Aufreinigung der HIV-RNA wurden 200 bis 200000 HIV-Transkripte pro ml PBS eingesetzt. Dies entspricht in etwa den nachweisbaren Konzentrationen von HIV im Blut.

4.3.2.2 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription wurde das Enzym SUPERSKRIPTTM II von Gibco BRL verwendet. Dies ist eine rekombinante Form der RNA-abhängigen DNA-Polymerase aus dem Moloney-Mäuse-Leukämievirus ohne RNase H-Aktivität mit einer hohen Ausbeute an cDNA.

Zunächst wurde ermittelt, welcher Primer für die reverse Transkription am geeignetsten ist. Mit dem Primer V3M8 war nach der folgenden PCR eine höhere Ausbeute nachweisbar als mit dem Primer Bam-504, auch wenn damit in der anschließenden PCR der gleiche Primer wie in der reversen Transkription verwendet wurde.

Daraufhin wurde in einer Verdünnungsreihe mit unterschiedlichen Transkriptmengen die Empfindlichkeit der Methode überprüft. Dazu wurden aus einer Verdünnungsreihe etwa 0,6 bis $6,4\cdot10^5$ HIV-Transkripte pro Reaktionsansatz eingesetzt und die erhaltene cDNA anschließend in einer geschachtelten PCR amplifiziert. Dabei wurde auch die Menge der zur Reamplifikation verwendeten DNA variiert. Die Verdünnungsreihe der HIV-Transkripte ist durch die sequentielle Verdünnung mit abnehmenden Konzentrationen mit einem zunehmenden Fehler behaftet, die Angaben der Mengen an Ausgangstranskripten gelten insoweit nur ungefähr.

Abb. 4.39 links zeigt das Ergebnis der ersten Amplifikation mit dem äußeren Primerpaar der geschachtelten PCR, V3P8/V3M8. Wurden 2 μ l einer reversen Transkription als Ausgangsmaterial in die PCR eingesetzt, so ist ab etwa 6·10⁴ RNA-Molekülen ein Produkt sicher nachweisbar (Spur 4), bei 1/10 der RNA-Menge ist eine Bande im Gel gerade noch erkennbar (Spur 3).

Die Reamplifikation der ersten PCR mit dem Primerpaar V3P1/V3M1A zeigt Abb. 4.39 rechts: alle Transkripte konnten reamplifiziert werden, die Produktmenge nimmt mit zunehmender Ausgangsmenge zu (Spuren –1 bis 5) und alle Nullkontrollen sind negativ (Spuren Z, R, N, T). Bei hohen Ausgangskonzentrationen gibt es jedoch auch einen starken Hintergrund. Daß dabei auch aus theoretischen 0,6 Molekülen noch eine Amplifikation möglich war, beruht auf Verdünnungsfehlern und läßt vermuten, daß die tatsächlichen Mengen größer sind.

Um eine gute Übersicht über das Sequenzspektrum von HIV zu bekommen, sollten möglichst viele Moleküle der HIV-RNA untersucht werden können. Deshalb war es wichtig, jeweils den gesamten Ansatz einer reversen Transkription in der nachfolgenden PCR als Matrize einsetzen zu können. 18 µl eines Ansatzes einer reversen Transkription direkt in einem PCR-Ansatz amplifiziert ergab jedoch kein Produkt (Abb. 4.39 links, Spuren 4[#] und 5[#]). Möglicherweise sind im Ansatz der reversen

Transkription Stoffe enthalten, die in zu großer Konzentration die Polymerase in der anschließenden PCR inhibieren. Die restlichen Mengen der in Abb. 4.39 analysierten reversen Transkriptionen sind deshalb gefällt worden und die Sedimente jeweils komplett in einem Ansatz einer PCR eingesetzt worden. Hier lag also etwa die 10-fache Probenmenge vor (18 µl oder 90% eines Ansatzes einer reverse Transkription), dabei ließ sich schon ab etwa 60 RNA-Molekülen in der reversen Transkription, also etwa 1/100 der eingesetzten Ursprungsmenge, ein Produkt nachweisen (Abb. 4.41, Spur 1 bzw. 2 im Vergleich mit Abb. 4.39, Spur 3 bzw. 4).



Abb. 4.39: Überprüfung der Parameter für die Reverse Transkription. Etwa $6 \cdot 10^{-1}$ bis $6 \cdot 10^{5}$ HIV-Transkripte wurden in einer reversen Transkription eingesetzt und die entstandene cDNA ist reamplifiziert worden.

Links: Nach der ersten PCR sind bei Verwendung von 2 μ l (10%) des Ansatzes der reversen Transkription in der PCR schon bei 6000 Ausgangstranskripten ein schwaches Produkt zu erkennen (Spur 3), 6·10⁴ Ausgangstranskripte geben ein deutliches Signal (Spur 4). Die Verwendung von 18 μ l (90%) eines Ansatzes einer reversen Transkription ergeben dagegen kein Produkt mehr (Spuren 4[#] und 5[#]), die Polymerase wurde inhibiert.

Rechts: Eine Reamplifikation der ersten PCR zeigt, daß alle Ansätze der reversen Transkription amplifiziert werden konnten (Spuren –1 bis 5).

Bezeichnungen: -1 bis 5: Etwa $6 \cdot 10^{-1}$ bis $6 \cdot 10^{5}$ Ausgangstranskripte in der reversen Transkription, je 2 µl (10%) der reversen Transkription in der PCR eingesetzt. 4[#] und 5[#]: $6 \cdot 10^{4}$ und $6 \cdot 10^{5}$ Moleküle eines reversen Transkriptionsansatzes (90%) in jeweils 18 µl in der PCR eingesetzt. +: Positivkontrolle der PCRs (ca. $3 \cdot 10^{6}$ DNA-Moleküle); [8] und [1]: Produkte anderer PCRs mit den gleichen Primern zu Längenvergleich. Z: Nullkontrolle der zweiten PCR; R: Nullkontrolle der ersten PCR, reamplifiziert. 1', 2', 3': Etwa 3, 30, 300 DNA-Moleküle als Positivkontrolle in der ersten PCR. N: Nullkontrolle der reversen Transkription; T: Nullkontrolle der als Schutz-RNA verwendeten tRNA; M: DNA-Längenstandard

1. PCR



Abb. 4.40: Amplifikation der Produkte einer reversen Transkription nach Fällung. Es sind jeweils ca. 90% eines RT-Ansatzes nach Fällung in der PCR eingesetzt worden. Hier ist schon ein Produkt ab etwa 60 Ausgangstranskripten in der reversen Transkription nachweisbar (Spur 1). Im Vergleich zu Abb. 4.39 links ist hier zwar etwa die 10-fache Menge an Ausgangssubstanz in der PCR eingesetzt worden, die Produktmenge ist bei gleichen PCR-Parametern jedoch 100 mal so groß. Die Bezeichnungen entsprechen Abb. 4.39.

4.3.2.3 Aufreinigung von HIV-RNA aus Serum und Liquor

Die HIV-RNA wurde mit dem QIAamp viral RNA mini Kit (Qiagen, Hilden) aus Serum bzw. Liquor gewonnen. Dabei wird ein Puffer verwendet, der etwa 10 μ g/ml Poly-(A)-RNA als Schutz-RNA enthält. Es können Probenvolumina von 140 μ l bis zu 560 μ l pro Silikagel-Säulchen eingesetzt werden.

Zur Etablierung der Aufreinigung wurden 4 Ansätze verwendet:

140 μl PBS ohne HIV-RNA 140 μl PBS mit ca. 28000 HIV-Transkripten 280 μl PBS mit ca. 56000 HIV-Transkripten 560 μl PBS mit ca 112000 HIV-Transkripten

Die Aufreinigung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben. Nach Fällung, reverser Transkription, erneuter Fällung und geschachtelter PCR zeigte sich, daß die Aufreinigung von HIV-RNA auf diese Weise möglich ist und die dabei eingesetzte Schutz-RNA nicht stört. Nach der ersten PCR war jedoch noch so viel Schutz-RNA in den Proben vorhanden, daß ein zusätzlicher Abbau der RNA nach der reversen Transkription eingefügt wurde.

4.3.2.4 Alkalische Hydrolyse

Die HIV-RNA sollte nach der reversen Transkription abgebaut werden, da die Proben unter Umständen noch RNA-Moleküle mit dem gesamten HIV-Genom enthalten könnten. Von einem RNase H-Verdau wurde abgesehen, da dieser nur RNA aus DNA-RNA-Hybriden abbauen kann, nach der reversen Transkription aber nicht alle RNA-Moleküle in Form solcher Hybride vorliegen.

Statt dessen wurde eine alkalische Hydrolyse durchgeführt. Wurden dazu einem Standardverfahren entsprechend nach der reversen Transkription in 20 μ l 1/9 Volumen 1 M NaOH dazugegeben und die Transkripte dann 1 h bei 90 °C inkubiert und anschließend mit 1 M HCl neutralisiert (Fels, 1997), war keine cDNA mehr detektierbar. Deshalb mußte dieses Protokoll modifiziert werden.

Da bei der Neutralisation der alkalischen Lösung mit einer starken Säure wie 1 M HCl schon eine Ungenauigkeit von 1% des Volumens oder der Konzentrationen den pH-Wert erheblich nach oben oder unten verschieben kann, also statt pH 7 möglicherweise pH 3 oder auch pH 11 eingestellt wird, wurde zunächst 3 M NaAc zur Neutralisierung verwendet. Zur Ermittlung des notwendigen Volumens zur Neutralisierung wurde ein Puffer angesetzt, der dem in der reversen Transkription verwendeten entsprach, jedoch keine Primer, Nukleotide und kein Enzym enthielt. Zu jeweils 20 µl dieses Puffers wurden 2,25 µl 1 N NaOH und unterschiedliche Mengen 3 M NaAc (pH 5,2) gegeben. Anschließend wurde der pH-Wert mit Indikatorpapier bestimmt. Hierbei zeigte sich, daß die Zugabe von 1/10 Volumen, also 2,25 µl 3 M NaAc zu jedem Ansatz, nach der alkalischen Hydrolyse zur Neutralisierung ausreichend ist. Die hohe Konzentration an Na⁺ kann dabei gleichzeitig als Fällsalz für die folgende Fällung dienen.

Auch bei der Neutralisierung mit NaAc konnte nach einer reversen Transkription keine cDNA mehr nachgewiesen werden. Daraufhin wurde die für die alkalische Hydrolyse benötigte Zeit in einer Zeitreihe bestimmt. Dazu wurden der reversen Transkription entsprechende Ansätze ohne Enzym mit jeweils ca. 50 µg tRNA und ca. 10 ng eines PCR-Produktes sowie 1/9 Volumen 1 M NaOH versetzt, für 0 bis 90 min bei 90 °C inkubiert, anschließend mit NaAc neutralisiert, gefällt und auf ein

Gel aufgetragen. Das Ergebnis zeigt Abb. 4.41: Schon nach 5 min bleiben von der tRNA nur noch Bruchstücke übrig. Nach 45 min nimmt sogar die Menge der zugesetzten doppelsträngigen DNA ab, nach 75 min ist diese nicht mehr detektierbar. Daher ist eine 10-minütige Inkubation bei 90 °C voll-kommen ausreichend zur Zerstörung der HIV-RNA nach der reversen Transkription.



Abb. 4.41: Zeitreihe zum Überprüfen der Effektivität der alkalischen Hydrolyse. Jede Spur enthielt ursprünglich etwa 10 μ g tRNA und 1 ng DNA, diese sind bei der Inkubation bei 90 °C in pH 13 teilweise abgebaut worden. Die RNA ist schon nach wenigen Minuten abgebaut worden, die DNA war für ca. 30 min stabil.

4.3.2.5 Überprüfung der gesamten Probenaufarbeitung

Das Schema der Probenaufarbeitung mit Aufreinigung der HIV-RNA, reverser Transkription, alkalischer Hydrolyse und Amplifikation zeigt Abb. 4.42.

Nach Etablierung der Einzelschritte wurde der gesamte Ablauf der Probenpräparation noch einmal mit unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen an *in-vitro*-Transkripten der HIV-RNA getestet: dazu wurden Ausgangsmengen von etwa 0,1 bis 151200 HIV-Transkripten sowie Kontrollproben ohne HIV-RNA verwendet. In jedem Schritt wurden weitere Kontrollen hinzugefügt. Dabei wurde immer in Richtung aufsteigender Probenmengen pipettiert, um die Auswirkungen möglicher Kreuz-kontaminationen der Proben gering zu halten. Um solche nachweisen zu können, wurde als letzte Probe wieder eine Nullkontrolle (-E) pipettiert. Diese wurde ab der 2. PCR nach den anderen Nullkontrollen eingereiht, um Kreuzkontaminationen in diesem letzten Schritt zu vermeiden. Das Schema und die verwendeten Probenmengen zeigt Tab. 4.5. Die einzelnen Arbeitsschritte sind in Kapitel 3.3.3 beschrieben. Die Aufreinigung mit Säulchen wurde laut Herstellerangaben für 420 µl Probenvolumen durchgeführt, für die Reamplifikation in der zweiten PCR wurden jeweils 10 µl des Produktes der ersten PCR eingesetzt.

Das Ergebnis zeigt Abb. 4.43. Alle Kontrollen und Proben sind in der Reihenfolge ihrer Verarbeitung aufgetragen. Die Proben 0 bis 6 zeigen eine zunehmende Produktmenge, dabei nehmen auch die Nebenbanden zu. Die meisten Kontrollen entsprechen den Erwartungen. Die Endkontrolle (-E) zeigt eine leichte Bande, Kreuzkontaminationen in so geringem Umfang beeinflussen das Gesamtergebnis jedoch nicht. Die Nullkontrolle der Säulchen-Aufreinigung (-V) ist deutlich positiv. Dies kann jedoch nicht an einer Kontamination der Ausgangsmaterialien für die Säulchen-Aufreinigung liegen, da die anderen Spuren zum Teil deutlich geringere Produktmengen enthalten. Damit ist gezeigt worden, daß die Probenaufarbeitung der HIV-RNA zur Analyse mittels TGGE funktioniert.

Aufarbeitung:



TGGEs

Abb. 4.42: Schema der Probenaufarbeitung und Amplifikation.

Tab. 4.5: Schema der Überprüfung der Probenaufarbeitung. Die Proben wurden jeweils in der angegebenen Reihenfolge mit aufsteigender Probenmenge (von oben nach unten) pipettiert. Nullkontrollen sind mit "-" gekennzeichnet, Positiv-kontrollen mit "+". Die Verdünnungsreihe mit den HIV-Transkripten ist mit 0 bis 6 bezeichnet.

Abkürzungen: X: Probe eingesetzt; \rightarrow , \checkmark : Probe weiterverarbeitet;. *: Die End-Nullkontrolle –E wurde für die zweite PCR hinter die anderen Nullkontrollen eingereiht. vQS: Säulchen-Aufreinigung mit QIAamp viral RNA mini KIT (Qiagen, Hilden); RT: reverse Transkription; aH: alkalische Hydrolyse; 1. PCR: Erste PCR der geschachtelten PCR mit Primern V3P8 und V3M8; 2. PCR: zweite PCR der geschachtelten PCR mit Primern V3P8 und V3M1A.

vQS	RT	aH	1. PCR	2. PCR	Gel	Verwendete Proben		
Х	\rightarrow	\rightarrow	\rightarrow	\rightarrow	-V	Nullkontrolle für die Aufreinigung, 420 µl PBS		
	Х	\rightarrow	\rightarrow	\rightarrow	-T	Nullkontrolle für die reverse Transkription		
		Х	\rightarrow	\rightarrow	-F	Nullkontrolle für die alkalische Hydrolyse		
			Х		-1	Nullkontrolle für die erste PCR		
			$\not b$	\rightarrow	-R	Reamplifikation der Nullkontrolle der ersten PCR		
				Х	-2	Nullkontrolle für die zweite PCR		
				*→	-E	Endkontrolle nach zweiter PCR		
Х	\rightarrow	\rightarrow	\rightarrow	\rightarrow	0	~ 0,1 HIV-Transkripte in 420 μl PBS		
Х	\rightarrow	\rightarrow	\rightarrow	\rightarrow	1	~ 1,1 HIV-Transkripte in 420 μl PBS		
Х	\rightarrow	\rightarrow	\rightarrow	\rightarrow	2	~ 11,5 HIV-Transkripte in 420 μl PBS		
Х	\rightarrow	\rightarrow	\rightarrow	\rightarrow	3	~ 126 HIV-Transkripte in 420 μl PBS		
	Х	\rightarrow	\rightarrow	\rightarrow	+H	Positivkontrolle für die RT mit etwa 112 HIV-Transkripten		
			Х	\rightarrow	+1	Positivkontr. für die gesch. PCR, ca. 115 DNA-Moleküle		
Х	\rightarrow	\rightarrow	\rightarrow	\rightarrow	4	~ 1388 HIV-Transkripte in 420 μl PBS		
Х	\rightarrow	\rightarrow	\rightarrow	\rightarrow	5	~ 15273 HIV-Transkripte in 420 µl PBS		
Х	\rightarrow	\rightarrow	\rightarrow	\rightarrow	6	~ 151200 HIV-Transkripte in 420 µl PBS		
Х	\rightarrow	\rightarrow	\rightarrow	£∕*	-E	Nullkontrolle als Endkontrolle		
			Х		P1	Positivkontrolle der ersten PCR, ca. 10 ⁶ DNA-Moleküle		
				Х	P2	Positivkontrolle der zweiten PCR, ca. 10 ⁵ DNA-Moleküle		

-V -T -F -1 -R -2 -E 0 1 2 3 +H +1 4 5 6 P1 P2



Abb. 4.43: Ergebnis des Testlaufes von RNA-Aufreinigung, reverser Transkription und geschachtelter PCR. Bis auf zwei Ausnahmen (-V und -E) sind alle Nullkontrollen negativ sowie bis auf +H alle Positivkontrollen positiv. Die Proben 0 bis 6 zeigen mit zunehmender Ausgangsmenge eine zunehmende Produktmenge. Die Nebenbanden nehmen ebenfalls zu. Die Positivkontrolle P1 der ersten PCR ist länger als die Produkte der 2. PCR (geschachtelte PCR). Die Bezeichnungen entsprechen der Tab. 4.5

4.3.3 Aufarbeitung und Untersuchung der ersten HIV-Proben

Am Anfang wurden vier Blutseren aufgetaut und aufgearbeitet, Seren von zwei Probanden ohne HIV-Infektion als Negativkontrollen (-A, -B) sowie Seren von zwei Patienten mit einer hohen Viruslast (+C, +D). Als Kontrollen wurde PBS-Puffer mit etwa 20 000 HIV-Transkripten pro ml (+V) sowie ohne HIV-RNA (-E) aufgereinigt. Von den HIV-Seren wurden jeweils zwei Aliquots aufgearbeitet (+C1, +C2 bzw. +D1, +D2).

Das Ergebnis der Aufarbeitung des jeweils ersten Aliquots zeigt Abb. 4.44: Alle Nullkontrollen (-) sind negativ, die positiven Proben (+C1, +D1) zeigen ein schwaches Signal. Bei den Positivkontrollen zeigt nur die Kontrolle der reversen Transkription mit etwa 110 Ausgangstranskripten (+T) kein Signal. Als weitere Kontrollen für die nachfolgende Analyse niedrig konzentrierter Mutationen wurden auch drei Plasmidmischungen von <u>wt</u> und <u>mut</u> in den Verhältnissen 1:10⁻¹, 1:10⁻² und 1:10⁻³ amplifiziert. Bei der Aufarbeitung der zweiten Aliquots zeigte +D2 kein Produkt, sondern nur +C2 (Daten nicht abgebildet).



Abb. 4.44: Kontrollgel der ersten Probenaufreinigung nach der geschachtelten PCR. Die Reamplifikate der HIV-Probe +C1 und +D1 zeigen ein schwaches Produkt. [1], Produkt einer anderen PCR mit gleichen Primern zum Längenvergleich; M, DNA-Längenstandard; -A, -B, negative Seren; -T, Nullkontrolle der reversen Transkription; -R, Reamplifikation der Nullkontrolle der ersten PCR; -Z, Nullkontrolle der zweiten PCR; $1:10^{-3}$, $1:10^{-2}$, $1:10^{-1}$, Amplifikate von Plasmidmischungen <u>wt</u> : <u>mut</u> in den angegebenen Verhältnissen; +C1, +D1: Seren von Personen mit hoher Viruslast; +V: Positivkontrolle der Aufreinigung (ca. 10 000 Transkripte); +T, Positivkontrolle der reversen Transkription mit ca 110 Transkripten; +P2, Positivkontrolle der zweiten PCR.

Es wurde mehrfach erfolglos versucht, die Sequenzspektren der Proben mit der D/R-TGGE zu analysieren. Ein Beispiel ist im Folgenden gezeigt: Abb. 4.45 A zeigt die PCR-Produkte. Die Proben wurden mit den Primern V3P1 und V3M1A amplifiziert worden, die Sonde (*wt*) mit dem Primerpaar V3P1/V3M1P. Eine asymmetrische Hybridisierung ist hier noch nicht durchgeführt worden. Nach Hybridisierung der Proben mit der Sonde und kovalenter Verknüpfung durch UV-Bestrahlung bei 365 nm sind die Proben noch einmal in jeweils zwei Konzentrationen auf einem nativen Gel aufgetragen worden (Abb. 4.45 B). In beiden Fällen zeigen die Proben C1 und C2 viele Nebenbanden, in C1 ist zusätzlich eine Bande unterhalb der Hauptbande bei einer Länge von etwa 100 bp vorhanden.

In einem denaturierenden Gel (Abb. 4.46 A) zeigen die Proben C1 und C2 jedoch im Vergleich zu den anderen Spuren keine auffallenden Nebenbanden. Nur die untere Bande (\rightarrow) mit etwa 100 bp ist bei C1 auch im denaturierenden Gel vorhanden, in der D/R-TGGE ist diese Bande wahrscheinlich aus dem Gel herausgelaufen. Die Nebenbanden in den nativen Gelen lassen sich also nicht auf Längenheterogenitäten der PCR-Produkte zurückführen, deshalb sollten hier Heteroduplexmoleküle analysiert werden können. Die parallele D/R-TGGE (Abb. 4.46 B) zeigt über der Homoduplexbande (V) der Sonde allerdings nur wenige mögliche Heteroduplexbanden in geringer Intensität.



Abb. 4.45: Native Gelelektrophoresen der Proben für die Analyse der Sequenzspektren mit der TGGE.

A: Natives Gel direkt nach der PCR, es sind jeweils etwa 0,5 µl der PCR-Produkte aufgetragen

B: Natives Gel nach Hybridisierung und kovalenter Verknüpfung der Doppelstränge. Es sind jeweils 1,6 µl der PCR sowie eine 1:100-Verdünnung davon links und rechts nebeneinander aufgetragen.

Neben den durch Pfeilen markierten Hauptbanden zeigen die Proben +C1 und +C2 in beiden Gelen viele Nebenbanden. Auffällig ist eine zusätzliche Bande (z) bei C1, die unterhalb der Hauptbande bei etwa 100 bp liegt.

Bezeichnungen: M, DNA-Längenstandard; wt x mut, Hybrid aus wt und mut mit Psoralenprimern als Kontrollspur;

C1 und C2, Amplifikationen beider Aliquots der Aufreinigung eines Serums mit hoher HIV-Last; D1, Amplifikation der Aufreinigung eines anderen Serums mit hoher HIV-Last (die zweite Aufreinigung dieses Serums zeigte keine Amplifikationsprodukte); $1:10^{-1}$, $1:10^{-2}$, Amplifikate einer Plasmidmischung von *wt* und *mut* im angegebenen Verhältnis; <u>wt</u>, Amplifikation des *wt*-Plasmids mit Psoralenprimer als Sonde; E, Einzelstränge.



Abb. 4.46: Denaturierendes Gel (**A**) bei 55 °C und parallele D/R-TGGE (**B**) mit einem Temperaturgradienten von 38 °C bis 62 °C der Proben aus Abb. 4.45. Hier sind (außer der kurzen Zusatzbande z bei C1) keine Nebenbanden mehr zu erkennen, diese beruhen also nicht auf Längenheterogenitäten der PCR-Produkte. In Höhe V liegen die verknüpften Moleküle, bei E die nicht verknüpften Einzelstränge. Weitere Bezeichnungen wie in Abb. 4.45. Diese Gele sind verkleinert abgebildet.

Einen Hinweis auf die Ursache der kaum vorhandenen Heteroduplexbanden in den Proben C1 und C2 zeigt Abb. 4.47: Hier ist das Hybrid C2 x <u>wt</u> in einer senkrechten D/R-TGGE aufgetragen worden. Neben einer deutlichen Bande der <u>wt</u>-Sonde gibt es eine starke Einzelstrangbande, aber keine Heteroduplexbanden. Dafür gibt es einige Banden mit einem ungewöhnlichen Laufverhalten, die auf der nativen Seite des Gels bei 22 °C zum Teil langsamer laufen (?->) als die denaturierten verknüpften Einzelstränge auf der denaturierenden Seite des Gels bei 58 °C.



Nicht verknüpfte Einzelstränge \rightarrow und Sonden-Homoduplices

Abb. 4.47: Senkrechte D/R-TGGE des Hybrides C2 x <u>*wt*</u> aus einer Serumprobe und der Sonde. Außer dem Übergang der Sondenmoleküle sind nur einige schwache Banden mit untypischem Verlauf zu erkennen (z.B.: ? \rightarrow), jedoch keine Heteroduplexübergänge.

Schließlich sind die vorhandenen Amplifikate der Serumproben sequenziert worden. Die Sequenzen der Proben C1 und C2, sequenziert mit den Primern V3P1 (+) und V3M1P (-), unterscheiden sich stark von der Sondensequenz. Die Sequenz der Probe D1 entsprach der Sondensequenz. Da aus der Probe D2 keine HIV-Sequenz amplifiziert werden konnte und die Sequenzierung der Probe D1 nahezu keinen Hintergrund aufweist, ist anzunehmen, daß hier keine HIV-RNA gewonnen werden konnte, sondern bei der Probe D1 eine Kontamination mit Sonden-Nukleinsäure amplifiziert wurde.

In Tabelle 4.6 sind unter der Sequenz der Sonde die Sequenzen der Proben C1 und C2, jeweils mit Plus- und Minusstrang (+,-) dargestellt. Darunter ist als Quasispeziessequenz die Consensussequenz angegeben, die an jeder Position das Nukleotid enthält, das die darüberliegenden Sequenzen an dieser Stelle am häufigsten haben. Zur besseren Übersichtlichkeit sind von den eigentlichen Sequenzen nur die Nukleotide dargestellt, die sich von der Consensussequenz unterscheiden. n bedeutet, die Sequenzierung ist hier nicht eindeutig, ein Punkt steht für eine nicht vorhandene Base. Die Positionen der Primer und des V3-Loops (~~~) sind unter der Consensussequenz markiert.

Die Sequenzen der Proben sind nicht immer eindeutig, in den graphischen Darstellungen der Sequenzierungen ist ein starker Hintergrund bei vielen Nukleotiden zu erkennen, der für eine entsprechende Sequenzvielfalt spricht.

4 Ergebnisse

Tab. 4.6: Sequenzvergleich der Plus- und Minusstränge Proben C1 und C2 sowie der verwendeten Sonde. Es sind jeweils nur die Abweichungen von der häufigsten Base an jeder Position (Konsensussequenz) dargestellt. Die Abweichungen der Sonde von der Konsensussequenz im Bereich des V3-Loops sind kursiv gedruckt. Punkte kennzeichnen fehlende Nukleotide in einer Sequenz, n nicht eindeutig bestimmte Nukleotide. Diese kommen insbesondere direkt hinter den Sequenzierprimern (--->, <---) vor. Der V3-Loop ist grau unterlegt und durch ~~~ zwischen seinen flankierenden Cystein-Codons (Cys) unterhalb der Konsensussequenz gekennzeichnet. Im Bereich des V3-Loops enthält die Sondensequenz im Vergleich zur Konsensussequenz zunächst sechs Nukleotide mehr (°°° °°°), später fehlen drei Nukleotide (%%%). Bei der Hybridisierung führt das zu zwei einseitigen, nicht gepaarten Schleifen im Doppelstrang. Der Bereich zwischen diesen Abweichungen wird durch die dort vorhandenen Fehlpaarungen möglicherweise sogar soweit destabilisiert, daß sich dort eine große internen Schleife bildet.

	1							60
Sonde						g .	t	
C1, +			?	> nnnnnnnn	in nnnnnnn	n g		
C1, -		n	n	n				
C2, +			;	> nnnnnnnn	in nnnn			
$C_2, -$	C = X = C = X = C	~~~~~		ጦ ሮሞሞአአአሞሮሮ				አሞሞአሮአ
+Primer	Pr	imer N	/3P1`	>	C AGICIAG	LAG AAGAACI	AGGI AGIA	AIIAGA
I I I I I I I I I I I I I I I I I I I		INCI (
	61							120
Sonde	С			C			са	
C1, +	n		ממ מ			n		
C_{1}^{-}	11		11 1111			11		
C2, -								
Consensus	TCTGACA	ATT TO	CACAGACA	A TGCTAAAAG	C ATAATAG	TAC AGCTGA	ATGC ATCT	GTAGAA
	101							100
Sonde						t cca	cca dado	10U r
C1. +						n n		n n
C1, -	n		n		n	n nn n		n
C2, +						g		
C2, -		nc	gc no	ccn.	n nn	g		
Consensus	ATTAATT	GTA C <i>P</i>	AGACCCA	A CAACAATAC	CA AGAAAAA	GGA TGACTA	T P	GGACCA
V3-Loop	C	ys~ ~^	~~~~~~	~ ~~~~~~~~	~ ~~~~~~	~~~ ~~~~~~	~ 0 0 0 0 0 0 0 ~	~~~~~~
	181							240
Sonde	g g	С	gt	t é	a a	g		
C1, +	nn		n n n					n
C1, -	n g	n	g	n				n
C2, +	a							
C2, -	а	השי היי	ישאשאטאט					
V3-Loop	~~~~~~	~~~ ~~		~ ~~~ <u>&</u> & <u>&</u> ~~~	~ ~~~~~~	~~~ ~~~~~	AAGC ACAI	CVS
1000				000			_	CYD
	241					28	7	
Sonde	a	g	~	C T	~ ~	a	a	
C1, +	11	n a	11 0	J 11 D DDDD/				
C2. +		9 n					t.	
C2, -	nnnnnn	nnn nr	nnnnnnn	n nnnn<			-	
Consensus	CTTAGTA	GAG CA	AAATGGA	A TGACACTTI	A AAACAGA	TAG CTAGCT	_	
-Primer				<	- Primer V	V3M1At	t	

Auffällig ist, daß die Sondensequenz, die aus dem Plasmid pNL4-3 stammt, um Pos. 170 sechs Nukleotide (zwei Aminosäuren) enthält, die in den Probensequenzen nicht vorhanden sind (°°° °°°); diese wiederum um Pos. 205 drei Nukleotide (eine Aminosäure) enthalten, die in der Sondensequenz fehlen (%%%). An diesen Stellen können die Proben mit der Sonde nur unter Bildung sehr instabiler einseitiger Schleifen hybridisieren. Zusammen mit vielen weiteren Fehlpaarungen im Be-
reich des V3-Loops führt das dazu, daß sich nur wenige, instabile Hybride von Probenmolekülen mit Sondenmolekülen bilden.

Mit diesem Effekt läßt sich das Bandenmuster in Abb. 4.47 erklären: Während der Hybridisierung der Probe mit der Sonde haben sich hauptsächlich stabile (Sonden-)Homoduplices gebildet, während die deutlich instabileren Heteroduplices zwischen Proben- und Sondeneinzelsträngen bei dieser Reaktion thermodynamisch benachteiligt waren. Die wenigen Heteroduplices, die sich gebildet haben, liegen nicht als durchgehender Doppelstrang vor, sondern bilden Moleküle mit nur teilweise doppelsträngigen Bereichen, deren Laufverhalten nicht vorhersagbar ist. Diese laufen wahrscheinlich oberhalb der Bande der denaturierten verknüpften Einzelstränge. Homo- und Heteroduplexmoleküle der Probe werden sich ebenso häufig wie die Sondenhomoduplices gebildet haben, sind im Gel aber nicht nachweisbar, da sie ohne Psoralenprimer nicht kovalent verknüpft werden konnten.

Diese Annahme wird von der in Abb. 4.48 dargestellten senkrechten D/R-TGGE erhärtet: Eine "Heteroduplexbande" aus einer parallelen D/R-TGGE von C1 x <u>wt</u> wurde reamplifiziert, noch einmal in einer D/R-TGGE aufgetrennt, geleluiert und ein weiteres mal re-reamplifiziert, diesmal mit den Sondenprimern V3P1 und V3M1P; und es wurde keine Sonde zur Hybridisierung zugefügt. In Abb. 4.48 sind mehrere Übergänge in der TGGE erkennbar, die wahrscheinlich auf Homo- und Heteroduplices aus Probenamplifikaten beruhen, sowie die schon früher vorhandene Bande aus Probe/Sonde-Heteroduplices (?--), die sich bei ihrem Übergang in die denaturierten kovalent verbundenen Einzelstränge in mehrere Banden aufteilt. Die Probe C1 enthält also mehrere Sequenzen, die jedoch wegen deutlicher Sequenzunterschiede mit der verwendeten Sondensequenz nicht richtig hybridisieren und sich daher auch nicht in der TGGE wie vorgesehen analysieren lassen.



Abb. 4.48: Senkrechte D/R-TGGE der Re-Reamplifikation einer "Heteroduplexbande" aus einer D/R-TGGE von C1 x <u>wt</u>. Es wurden dazu die Primer V3P1/V3M1P verwendet und keine Sonde mehr hinzugefügt. Die Vielzahl der Übergänge weist auf eine entsprechende Sequenzvielfalt in der Probe hin. Die durch ? \rightarrow gekennzeichnete Bande besteht wahrscheinlich aus Hybriden zwischen Sonde und Probe, welche zwei einseitige interne Schleifen bilden und dadurch nur eine sehr geringe Gelmobilität haben.

4.3.4 Untersuchung weiterer HIV-Proben

Eine Alternative zur Verwendung einer Standardsonde ist die Verwendung einer Sonde, die direkt aus der zu untersuchenden Probe stammt. Da von den Proben C1 und C2 nach vielen Experimenten

nicht mehr ausreichend Material zur Verfügung stand, wurden weitere Patientenproben aufgearbeitet. Es wurden von zwei anderen HIV-infizierten Patienten HIV-RNA sowohl aus Serum als auch aus Liquor gewonnen, um die Sequenzspektren beider Flüssigkeiten miteinander vergleichen zu können. Von allen Proben wurden wieder zwei Aliquots, wie zuvor beschrieben, aufgearbeitet. Die Bezeichnung der Proben zeigt Tab. 4.7, vom Liquor der Patient Nr. 13751 (+H2) standen für die zweite Aufreinigung nur noch etwa 400 µl statt 560 µl zur Verfügung.

Tab. 4.7: Bezeichnung der Proben.

Patient	Serum	Liquor
13498 (männl.)	+E1, +E2	+G1, +G2
13751 (weibl.)	+F1, +F2	+H1,(+H2)

4.3.4.1 Klonierung und Sequenzierungen

Nach Aufreinigung, reverser Transkription und erster Amplifikation der Proben mit den Primern V3P8/V3M8 wurden diese mit den Primern V3P4B/V3M4B reamplifiziert. Diese Primer entsprechen den Primern V3P4/V3M4 und enthalten an ihren 5'-Enden zusätzlich eine Bam H I-Restriktionsschnittstelle. Über diese Schnittstelle wurden die gelaufgereinigten PCR-Produkte in den Vektor pUC 18 einkloniert. Die Probe +H2 konnte mit diesen Primern nicht reamplifiziert werden, deshalb konnten von ihr keine Klone erzeugt werden.

Die erhaltenen Klone wurde mit dem Restriktionsenzym Bam H I verdaut und sequenziert. Es wurden Sequenzen von folgenden Klonen erhalten (Tab. 4.8):

Patient 1349	98			Patient 13751								
Serum		Liquor		Serum		Liquor						
1. Aliquot	2. Aliquot	1. Aliquot	2. Aliquot	1. Aliquot	2. Aliquot	1. Aliquot	2. Aliquot					
pMWE-1 pMWE-2 pMWE-3 pMWE-4 pMWE-6	pMWE-7 pMWE-8 pMWE-51 pMWE-52 pMWE-55 pMWE-56	pMWG-23 pMWG-25 pMWG-26 pMWG-27 pMWG-18	pMWG-29 pMWG-32 pMWG-33 pMWG-34	pMWF-12 <u>pMWF-14</u> pMWF-15 pMWF-16 pMWF-17	pMWF-18 pMWF-19 pMWF-20 pMWF-21 pMWF-22	pMWH-35 pMWH-36 pMWH-38 pMWH-39 pMWH-40	keine Sequenzen vorhanden					
pMWE-41 pMWE-47 <u>pMWE-49</u> pMWE-50	pMWE-57 pMWE-58 pMWE-59 pMWE-60											

Tab. 4.8: Vorhandene Sequenzen von HIV-Klonen. Die unterstrichenen Klone wurden in den folgenden Analysen als Sonden verwendet.

Zunächst wurde von jedem Aliquot der Probe nur ein Klon sequenziert und daraus die Klone pMWE-49 und pMWF-14 ausgewählt und angezogen. Die enthaltenen Plasmide wurden präpariert, Bam H I-verdaut und als Sonden für die folgenden TGGE-Analysen verwendet. Da die Sequenzen von Serum und Liquor bei den beiden Patienten jeweils keine großen Unterschiede aufwiesen, reichte ein Klon pro Patient als Sonde aus.

4.3.4.2 Reamplifikation und TGGE-Analysen

Die Patientenproben wurden mit den Primern V3P8/V3M1A reamplifiziert, die Zykluszahlen der PCRs wurden dabei nach Auswertung der vorhergehenden PCRs so angepaßt, daß alle Amplifikationen etwa gleiche Ausbeuten zeigten (Abb. 4.49 B). Die Sondenplasmide pMWE-49 und pMWF-14 wurden mit den Primern V3P1L und V3M1P amplifiziert und die Amplifikate mit den Probenamplifikaten hybridisiert (asymmetrische Hybridisierung, s. Kap. 4.2.10), kovalent verknüpft und in einer D/R-II-TGGE aufgetrennt (Abb. 4.49 C).



Abb. 4.49: HIV-Proben zur weiteren Analyse.

A: PCR-Testgel der Probenamplifikate einer 25-Zyklen-PCR mit dem Primerpaar V3P8/V3M1A.

B: Testgel zur Kontrolle der schließlich eingesetzen Mengen. Angegeben sind jeweils die Anzahl der PCR-Zyklen. **C:** D/R-II-TGGE von 40 °C bis 64 °C mit den asymmetrischen Hybriden aus Probenamplifikaten und den zugehörigen Sondenamplifikaten mit den Primern V3P1L/V3M1P. x ist ein Hybrid aus <u>wt x mut</u> zur Kontrolle der TGGE. Bezeichnungen: -V und –1 sind Nullkontrollen; +V: Positivkontrolle der RNA-Aufreinigung mit etwa 11200 Ausgangstranskripten; +T: Positivkontrolle der reversen Transkription mit ca. 112 Ausgangstranskripten; +R Positivkontrolle der geschachtelten PCR mit ca. 1700 Ausgangsmolekülen; +2: Positivkontrolle der 2. PCR. M und M' sind DNA-Längenstandards. Bei Patient 13498 (Serum: +E1, +E2; Liquor: +G1, +G2) zeigen alle Proben nur geringfügige Unterschiede, die Liquorprobe +G2 weicht am deutlichsten von den anderen Proben dieses Patienten ab. Hier sind die Proben +E1 und +G2 für die weiteren Analysen ausgewählt worden. Beim Patienten 13751 (Serum: +F1,+F2; Liquor: +H1, +H2) zeigen sich schon deutliche Unterschiede zwischen den beiden Serumproben und der Liquorprobe +H1. Hier wurden die Proben +F1 und +H1 weiter analysiert. Die Probe +H2 zeigt im PCR-Testgel viele Nebenbanden, diese sind in der D/R-II-TGGE nicht von Heteroduplexbanden zu unterscheiden. Diese Probe wurde daher nicht weiter untersucht.

Die ausgewählten Proben wurden in weiteren D/R-II-TGGEs noch einmal aufgetrennt und die kovalenten Verknüpfungen durch 3-minütige Bestrahlung mit UV-Licht von 302 nm gelöst. Von jeder Probe wurden aus einer Spur 30 Streifen ausgeschnitten (s. Abb. 4.50), geleluiert und mit den Primern V3P8/V3M1A und *Taq*-Polymerase reamplifiziert. Von den Reamplifikaten wurde jeweils eine Hälfte zur späteren Sequenzierung aufbewahrt, die andere Hälfte mit den zugehörigen Sondenamplifikaten (Primerpaar V3P1L/V3M1P) hybridisiert, kovalent verknüpft und in weiteren D/R-II-TGGEs analysiert (Abb. 4.51 und 4.52).



Abb. 4.50: D/R-II-TGGEs zur Elution und Reamplifikation der Heteroduplexbanden. Markiert sind jeweils die Positionen und die Numerierung der zur nachfolgenden Elution ausgeschnittenen Gelstückchen

Die Analyse der Reamplifikate der Proben des Patienten 13498 zeigt Abb. 4.51. Die mit dem Primerpaar V3P8/V3M1A reamplifizierten Eluate wurden mit Amplifikaten des Plasmids pMWE-49 mit den Primern V3P1L und V3M1P als Sonde hybridisiert, kovalent verknüpft und in zwei parallelen D/R-TGGEs analysiert. Neben einer Reihe von Nebenbanden, die in jedem Reamplifikat auftreten, gibt es in den Reamplifikationen der oberen Eluate einige spezifisch reamplifizierte Banden, die sich jeweils nur in wenigen benachbarten Eluaten vorhanden sind. Dies zeigt, daß es gelungen ist, einzelne Banden anzureichern. Obwohl es in jeder Gelspur außer den reamplifizierten Banden weitere Nebenbanden gab, wurde versucht, die Sequenzen der Reamplifikate zu bestimmen. Dafür wurde jeweils das Reamplifikat mit der deutlichsten Heteroduplexbande und den wenigsten Nebenbanden ausgewählt. Für die Analyse der Serumprobe +E1 waren das die Reamplifikate der Eluate 13, 17, 20, 24 und 27. Für die Liquoranalyse der Probe +G2 wurden die Reamplifikate der Eluate 15, 18, 23 und 26 ausgewählt.

Serum



Liquor



Abb. 4.51: Analyse der reamplifizierten Proben von Patient 13498 in D/R-II-TGGEs. Von links nach rechts sind die mit dem Primerpaar V3P8/V3M1A reamplifizierten Eluate, hybridisiert und kovalent verknüpft mit der mit dem Primerpaar V3P1L/V3M1P amplifizierten Sonde aufgetragen. S, Sonden-Einzelstränge; P, Einzelstränge der Reamplifikate; H, Ho-moduplices; die Banden darüber sind Heteroduplexbanden. Die entscheidenden Banden sind durch Kästchen gekennzeichnet, Orig. ist jeweils die im Elutionsgel verwendete Ausgangsprobe zum Vergleich.

Oben: Bei den oberen Eluaten (rechts) der Serumprobe +E1 sind deutlich reamplifizierte Banden in spezifischer Höhe zu erkennen. Die Reamplifikate 13, 17, 20, 24 und 27 wurden zur Sequenzierung ausgewählt. Das Reamplifikat aus Eluat 15 enthielt kein Produkt, hier ist also nur die Sonde zu sehen.

Unten: Bei den Reamplifikaten der Liquorprobe +G2 liegen ebenfalls im oberen Bereich der Elutionen spezifisch reamplifizierte Banden vor. Hier wurden Reamplifikate 15, 18, 23 und 26 sequenziert.

Für die Proben des Patienten 13751 zeigt Abb. 4.52 die D/R-II-TGGEs der mit Sondenamplifikaten verknüpften Reamplifikate der Eluate. Zunächst wurde jeweils der mittlere Elutionsbereich untersucht, dann der obere Bereich. Bei der Serumprobe +F1 wurden die Reamplifikate aus den Eluaten 10, 12, 14, 19, 22, 24 und 28 sequenziert, von der Liquorprobe +H1 die Eluate 14, 15, 18 und 26.



Abb. 4.52: Analyse der reamplifizierten Proben von Patient 13751 in D/R-II-TGGEs. Aufgetragen wurden die mit dem Primerpaar V3P8/V3M1A reamplifizierten Eluate nach Hybridisierung und kovalenter Verknüpfung der mit dem Primerpaar V3P1L/V3M1P amplifizierten Sonde. S, Sonden-Einzelstränge; P, Einzelstränge der Reamplifikate; H, Homoduplices; die Banden darüber sind Heteroduplexbanden. Die entscheidenden Banden sind durch Kästchen gekennzeichnet, Orig. ist jeweils die im Elutionsgel verwendete Ausgangsprobe zum Vergleich.

Oben: Bei den Reamplifikaten der Serumprobe +F1 sind spezifische reamplifizierte Banden in den Eluaten 10, 12, 14, 19, 22, 24 und 28 zu erkennen (Durch Kästchen gekennzeichnet). Diese Reamplifikate wurden sequenziert. **Unten:** Von den Eluaten der Liquorprobe +H1 wurden die Reamplifikate 14, 15, 18 und 26 sequenziert.

4.3.5 Sequenzvergleiche und Auswertung der Sequenzen

Die Quasispeziessequenzen der untersuchten Proben wurden ermittelt, in dem die für die Klonierungen verwendeten PCR-Produkte mit den Primern V3P4B und V3M4B in beiden Richtungen sequenziert wurden. Die ermittelten Sequenzen sind an einigen Positionen nicht eindeutig, was auf etwa gleiche Mengen an Sequenzvariationen an den entsprechenden Positionen hinweist.

Von allen gewonnenen Klonen wurden mit dem Primer V3P4B jeweils der Plusstrang sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen der Klone waren erwartungsgemäß weitgehend eindeutig, daher konnte hier auf die zusätzliche Sequenzierung in Gegenrichtung verzichtet werden.

Von den aus den TGGEs ausgeschnittenen und reamplifizierten Heteroduplexbanden wurden jeweils Sequenzierungen beider Stränge mit den Primern V3P8 und V3M1A durchgeführt. Die dabei erhaltenen Sequenzen enthielten zum Teil einen erheblichen Hintergrund. Um vorhandene Sequenzvariationen von unspezifischen Störungen zu unterscheiden, wurden die beiden Sequenzen eines Reamplifikates mit allen vorhandenen Mehrdeutigkeiten unter die Quasispeziessequenz geschrieben und Variationen, die in beiden Sequenzierrichtungen übereinstimmten und über dem Hintergrundrauschen lagen, als vorhandene Sequenzvariation gewertet. Dabei wurde unterschieden, ob die Sequenzabweichung eindeutig war oder neben der Sondensequenz vorlag.

Die erhaltenen Sequenzvariationen sind in den folgenden Tabellen (Tab. 4.9 für Patient 13498 und Tab. 4.10 für Patient 13751) aufgelistet. Zur Klonierung sind reamplifizierte PCR-Produkte verwendet worden, von denen etwa 10% PCR-bedingte Sequenzabweichungen enthalten. Daher wurden Sequenzvariationen, die nur in einem einzelnen Klon auftraten, in Klammern aufgeführt. Insgesamt enthalten 20-30% der Klone einzelne Sequenzabweichungen, so daß diese zum Teil auf Sequenzvariationen in der Probe zurückzuführen sind. Bei Sequenzvariationen, die in mehreren Klonen vorkommen, sind PCR-Fehler als Ursache unwahrscheinlich.

4.3.5.1 Sequenzen von Patient 13498

Die aus Klonen gewonnenen Sequenzen des Patienten 13498 sollten, bis auf mögliche PCR-Fehler, einzelnen im Patienten vorhandenen HIV-Sequenzen entsprechen. Die erhaltenen Sequenzen lassen sich grob in drei Klassen einteilen: Fünf Klone haben, wie die verwendete Sonde, ein A an Position 196, vier Klone zeichnen sich u.a. durch CC an Position 169-170. aus, die restlichen 19 Klone haben G und C an den Positionen 161 und 176 . Innerhalb dieser Klassen gibt es noch eine große Anzahl an Variationen, und nur wenige Klone haben jeweils die gleiche Sequenz. Auffällig ist, daß sich Variationen am Anfang der Sequenzen (G an Position 10) und am Ende der Sequenzen (G bzw. A statt C an Position 260) in allen Klassen vorkommen und nicht mit anderen Variationen korreliert sind. Dies ist möglicherweise auf die PCR zurückzuführen: DNA-Stränge, die in einem PCR-Zyklus nicht vervollständigt wurden oder deren 3'-Enden durch die 3'-5'-Exonukleaseaktivität der *Pwo*-Po-lymerase entfernt wurden, könnten in einem folgenden Zyklus mit einem Strang mit anderer Sequenz hybridisieren und dann vervollständigt werden. Damit wären solche "Rekombinationsereignisse" besonders an den Molekülenden zu erwarten.

Die Quasispeziessequenzen von Serum und Liquor stimmten miteinander überein, auch die Variationen lagen bei beiden Proben an den gleichen Positionen vor. Bei den Klonen lassen sich ebenfalls keine liquorspezifischen Sequenzen finden. Die im Liquor gefundenen Sequenzen verteilen sich über das gesamte Sequenzspektrum. Daß in der ersten Sequenzklasse (A an Pos. 196) überwiegend Liquorsequenzen vorliegen, ist bei der begrenzten Zahl an Klonen nicht signifikant.

4 Ergebnisse

Tab. 4.9: Auswertung der Sequenzen von Patient 13498.

Die Positionsangaben in der Mitte der Tabelle beziehen sich hier auf das 5'-Ende des Primers V3P1L. Es sind nur Positionen aufgeführt, an denen Sequenzvariationen gefunden wurden. Die Quasispeziessequenz (Quasiseq.) ist aus der direkten Sequenzierung der Proben gewonnen worden, hier kommen an den Positionen 124, 161, 176 und 260 jeweils zwei mögliche Basen vor. Bei den anderen Sequenzen sind nur Abweichungen hiervon aufgeführt. Die Sequenzen aus den Klonen stehen oben in der Tabelle, der in den TGGEs als Sonde verwendete Klon ist unterstrichen. Die Sequenzen aus den ausgeschnittenen und reamplifizierten TGGEs stehen am Tabellenende. Sequenzen aus Liquorproben sind *kursiv* dargestellt. Klone mit gleicher Sequenz sind durch \parallel gekennzeichnet. Mutationen, die in den Klonen nur einmal vorkommen und möglicherweise auf PCR-Fehlern beruhen, sind eingeklammert. Bei den Sequenzen der Reamplifikationen sind eindeutige Abweichungen groß, abweichende Sequenzen, die neben der Quasispeziessequenz vorkommen, in Kleinbuchstaben dargestellt.

<u>pMWE1-49</u> pMWE2-55 <i>pMWG2-29</i> <i>pMWG1-26</i> <i>pMWG1-27</i>	G G G	4	C C	<u>A</u>																			(C	A A A A A	<u>\</u> \ 1 1 1		(.	A)	G	G
<i>pMWG1-28</i> pMWE1-01 pMWE2-52 pMWE1-02	G G G	G G G		A	C (A C C) C C C	G G	A A A		A A A A		C C C						<i>C</i> C C C C	С С С С						<i>G</i> G G G	<i>Т</i> Т Т Т				G G G G
pMWE2-51 pMWE1-03 pMWE2-58 <i>pMWG1-23</i> pMWE1-47	G	(C							A A A A A	С			С С С С	G G G G G					С С С С С С С										
pMWE2-07 pMWE2-60 <i>pMWG2-32</i>											С С <i>С</i>			С С <i>С</i>	G G <i>G</i>					C C <i>C</i>									G	A
pMWE2-08 pMWE2-57 <i>pMWG2-33</i> <i>pMWG2-34</i> <i>pMW</i> E1-41 pMWE1-06	(C)									(A)	000000		(T)	I	6 6 6 6 6 6 6 6 6					$\bigcirc \bigcirc $						((G)	(T)	G	А
<i>pMWG1-25</i> pMWE1-50 pMWE1-04	G	(С												G G G					C C C							()	C)	G	A
pMWE2-56 pMWE2-59									T T						G G					C C	T T								G G	A A
Quasiseq.	A(T)	A (G.	С	T(G) A	А	G	С	G(T)	G/C	Т	(C)	Т	G/A	Т	A	А	A	C/G	С	G	C(I	') <u>C</u>	<u>5</u> C	A (2	A ()	G)A	.) A	С
Position	10 39	4 0 0	22	68 9	90 92	71	81	82	96	111 120	124	135	150	153	161	165 165	168	169	170	176	183	185	188	א ע ס ת	0 Q 7 Q 7 Q	207	211	248	2 4 0 4 0 4	260
ReE1-27 ReE1-24 ReE1-20 ReE1-17 ReE1-13	G G G G G	G			С	С	g	a		a	C C	С				G	G		С			A a	Т	a A A A	1 A 1 A					a a a a
ReG2-26 ReG2-23 ReG2-18 ReG2-15	G G	(С	a							С				g					c c				A a A	1 1 1				G	a a

Aus den Sequenzen der reamplifizierten Heteroduplices lassen sich keine eindeutigen Aussagen entnehmen: Keine Heteroduplexbande konnte alleine, ohne weitere Nebenbanden, reamplifiziert werden, und bei einigen Sequenzen liegen die möglichen Variationen nur neben der Sondensequenz und nicht alleine vor. Keine der reamplifizierten Sequenzen stimmt mit einer der klonierten Sequenzen überein, aber nahezu alle Variationen kommen auch in einigen Klonen vor. Schließlich fällt auf, daß alle bis auf eine der reamplifizierten Sequenzen an Position 10 ein G haben, was dem verwendeten *Sonden*-Primer entspricht, aber nicht der Sequenz der Quasispezies. Insgesamt scheint hier die Sequenzvielfalt der HI-Viren des Patienten 13498 so groß zu sein, daß diese Sequenzvariationen trotz Verwendung einer entsprechenden Sonde in der TGGE nicht mehr aufgelöst werden können.

4.3.5.2 Sequenzen von Patient 13751

Bei Patient 13751 ist das Sequenzspektrum deutlich kleiner als bei Patient 13498 und die vorhandenen Sequenzen weichen weniger voneinander ab. Bei den Klonen lassen sich zwei Sequenzklassen einteilen: Mit A/G oder C/T an den Positionen 157/159. Hier haben alle aus Liquor gewonnenen Klone die gleiche Sequenz, die aber auch in Serumklonen zu finden ist.

Die aus Heteroduplexbanden reamplifizierten Sequenzen finden sich zum Teil in den Klonen wieder. Bei einigen Reamplifikationen reicht die Auflösung der TGGE nicht aus: Das Reamplifikat ReF1-12 enthält neben einer schwachen Heteroduplexbande hauptsächlich die Banden von ReF1-10 (Sondensequenz) und ReF1-14. Nur letztere Sequenz konnte nachgewiesen werden. Die aus den Liquorproben nach der TGGE reamplifizierten Sequenzen weichen deutlich von allen anderen Sequenzen ab, die Variation C/T an Position 157/159 kommt hier nicht vor.

4 Ergebnisse

Tab. 4.10: Auswertung der Sequenzen von Patient 13751.

Die Positionsangaben in der Mitte der Tabelle beziehen sich hier auf das 5'-Ende des Primers V3P1L. Es sind nur Positionen aufgeführt, an denen Sequenzvariationen gefunden wurden. Die Quasispeziessequenz (Quasiseq.) ist aus der direkten Sequenzierung der Proben gewonnen worden, hier kommen an den Positionen 157 und 159 jeweils zwei mögliche Basen vor. Bei den anderen Sequenzen sind nur Abweichungen hiervon aufgeführt. Die Sequenzen aus den Klonen stehen oben in der Tabelle, der in den TGGEs als Sonde verwendete Klon ist unterstrichen. Die Sequenzen aus den ausgeschnittenen und reamplifizierten TGGEs stehen am Tabellenende. Sequenzen aus Liquorproben sind *kursiv* dargestellt. Klone mit gleicher Sequenz sind durch || gekennzeichnet. Mutationen, die in den Klonen nur einmal vorkommen und möglicherweise auf PCR-Fehlern beruhen, sind eingeklammert. Bei den Sequenzen der Reamplifikationen sind eindeutige Abweichungen groß, abweichende Sequenzen, die neben der Quasispeziessequenz vorkommen, in Kleinbuchstaben dargestellt. Die Sequenzierungen der Reamplifikation ReH1-18 haben einen sehr großen Hintergrund, deshalb sind die erhaltenen Abweichungen äußerst unsicher.

<u>pMWF1-14</u> pMWF2-22 pMWF1-12 pMWF1-12	G G G				((G)	((T)					A A	T T		
pMWF2-18 pMWF2-19 <i>pMWH1-35</i> <i>pMWH1-36</i> <i>pMWH1-38</i> <i>pMWH1-39</i> <i>pMWH1-40</i> pMWF1-16 pMWF2-15 pMWF2-22 pMWF2-20		(A)					A A				C C C C C C C C C C C	T T <i>T T T T T</i> T T T T				T T T
Quasiseq	. A	G	G	G	А	А	G	А	А	A	A/C	G/T	С	G	G	A
Position.	12	43	50	5 2	71	73	81	91	112	139	157	159	172	181	184	251
ReF1-28 ReF1-24 ReF1-22 ReF1-19 ReF1-14 ReF1-12 ReF1-10	99999999		a	a			a		G	C C C	C C C	T T a		t T T		
	-															

5 Diskussion

Im Rahmen diese Arbeit wurde zunächst eine verkleinerte Version einer Anlage für die Temperaturgradienten-Gelelektrophorese entwickelt, welche mit Peltier-Modulen temperiert wird. Diese kleine TGGE-Anlage benötigt weniger Zeit und Probenmaterial als die herkömmlichen Techniken, ermöglichte neue Variationen der TGGE-Anwendung und konnte im Folgenden erfolgreich im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt werden.

Mit dieser TGGE-Anlage wurde eine Methode zur Mutationsanreicherung etabliert. Damit können Mutationen mit einem Anteil von weniger als 1% soweit angereichert werden, daß sie durch Sequenzierung charakterisiert werden können. Es wurde versucht, mit dieser Methode das Sequenzspektrum im V3-Loop des *env*-Gens des humanen Immundefizienz-Virus (HIV) zu bestimmen, um mögliche neurotrope Sequenzmuster ermitteln zu können.

5.1 Vorteile einer kleinen TGGE-Anlage

Die Temperaturgradienten-Gelelektrophorese (TGGE) ist eine etablierte Technik, die sich jedoch sowohl in apparativer als auch in methodischer Hinsicht noch weiterentwickeln ließ. Vorhergehende Arbeiten zeigten, daß Peltier-Module zur Erzeugung des Temperaturgradientens geeignet sind, dafür jedoch eine Verkleinerung der Gradientenfläche sinnvoll ist (Wulfert, 1992). Dies ist zum Beginn dieser Arbeit ausgeführt worden. Die Dimensionen wurden so gewählt, daß die Qualität des Temperaturgradienten gleich blieb, wobei die selbe maximale Temperaturabweichung vom linearen Temperaturverlauf zugelassen wurde, wie sie bei den bisherigen Anlagen gegeben war.

Die Temperatursensoren wurden so positioniert, daß sich die Temperaturen über eine Distanz von 4 cm im linearen Bereich exakt einstellen lassen. Gehäuse und Pufferkammer wurden so konstruiert, daß ein Wechsel zwischen senkrechter und paralleler TGGE ohne Aufwand möglich ist.

Bei der Entwicklung wurde zunächst davon ausgegangen, daß die kleine TGGE-Anlage mit der gleichen elektrischen Feldstärke im Gel betrieben wird wie die bisherigen TGGE-Anlagen. Ebenso wurde eine vergleichbare Auflösung der Banden im Gel erwartet, so daß aufgrund der reduzierten Gelgröße eine sorgfältigere Wahl der Laufparameter notwendig gewesen wäre. In der Praxis hat sich gezeigt, daß durch die geringere Geldicke die Auflösung im kleinen Gel deutlich besser ist, so daß günstigerweise große und kleine TGGE in dieser Hinsicht als äquivalent zu betrachten sind.

Durch die kürzere Trennstrecke sollten sich die Laufzeiten der Elektrophoresen bei gleicher elektrischer Feldstärke entsprechend verringern lassen. Tatsächlich konnte bei der kleinen TGGE problemlos die gleiche Elektrophoresespannung angelegt werden wie bei einer großen TGGE. Die dadurch höhere elektrische Feldstärke führte zu eine weiteren Verkürzung der Laufzeiten.

Die als elektrische Wärmepumpen dienenden Peltiermodule wurden direkt unterhalb der Gradientenplatte angebracht, so daß die sonst zur Temperierung verwendeten Wasserbäder mit ihren hohen Wärmekapazitäten entfielen. Auf diese Weise sind weitaus schnellere Temperaturwechsel möglich.

Ergebnis dieser Veränderungen ist eine Temperaturgradienten-Gelelektrophorese, die in etwa 15 min durchgeführt werden kann. Im Vergleich dazu wurden mit bisheriger Technik mindestens zwei Stunden benötigte. Diese deutliche Verkürzung des Zeitbedarfs bei Standardanwendungen ermöglichte auch die Entwicklung der D/R-TGGE, welche im nächsten Unterkapitel diskutiert wird.

Durch die geringeren Abmessungen reichen für eine kleine TGGE etwa 20% der Probenmenge, die für eine große TGGE benötigt würde. Dies kann, besonders bei teuren Proben, ein erheblicher Vorteil sein. Dabei erfordern die kleineren Gele jedoch eine größere Sorgfalt bei der Durchführung einer TGGE. So muß insbesondere beim Auflegen des Gels auf die Gradientenplatte auf einen guten und gleichmäßigen Wärmekontakt geachtet werden. Die TGGE bleibt gerade in ihrer verkleinerten Form eine Labormethode, welche für den erfolgreichen Einsatz Sorgfalt und Erfahrung erfordert.

Die kleine TGGE-Anlage hat sich im Rahmen dieser Arbeit auch in der Praxis bewährt. Sie wurde dabei nicht nur für verschiedene Formen der Temperaturgradienten-Gelelektrophorese eingesetzt, sondern es wurden, soweit möglich, auch alle anderen Polyacrylamid-Gelelektrophoresen, insbesondere PCR-Testgele, auf der kleinen TGGE-Anlage durchgeführt.

Das TGGE-System der Firma Biometra in Göttingen basiert auf der in dieser Arbeit entwickelten kleinen TGGE und wird inzwischen sehr erfolgreich verkauft. Dies ist ein Beweis für die Relevanz und Praxistauglichkeit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten kleinen TGGE-Anlage. Ein Teil der Gelelektrophoresen in dieser Arbeit wurde auf einem Prototyp des Biometra-TGGE-Systems durchgeführt.

5.2 Die Analyse von Mutationen in geringer Konzentration

Die Erkennung von genetischen Veränderungen hat eine zunehmende Bedeutung in der biomedizinischen Forschung. Dabei werden die Methoden immer feiner. Angefangen mit der zytogenetischen Untersuchung von mikroskopisch nachweisbaren chromosomalen Veränderungen über die Ermittlung von Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP) bis zum Nachweis einzelner Basenaustausche im Genom können immer kleinere Abweichungen detektiert werden. Ein Meilenstein dafür ist auch die kürzlich weitgehend abgeschlossene Sequenzierung des menschlichen Genoms (The Genome International Sequencing Consortium, 2001; Venter *et al.*, 2001). Dabei sind die heute üblichen Sequenzierungsmethoden dafür ausgelegt, Sequenzen weitgehend automatisiert zu ermitteln.

Eine Punktmutation in einem Allel eines diploiden Genoms, wie sie z.B. bei einer autosomal dominant vererbten Erkrankung ursächlich sein kann, führt zu einem Sequenzgemisch, in dem normale und veränderte Sequenzen zu jeweils 50% vorliegen. Wird eine solche Mischung sequenziert, können daraus bei sorgfältiger Analyse einer hintergrundarmen Sequenzierung beide Sequenzen ermittelt werden.

Beträgt der Anteil einer Sequenzvariation weniger als 30%, ist diese Sequenz aus der Sequenzierung nicht mehr sicher bestimmbar. Die Ermittlung und der Nachweis solcher Mutationen werden jedoch immer bedeutender. Ein nur geringer Anteil an veränderter DNA kann z.B. in einem Gewebe vorliegen, wenn dieses erst einzelne entartete Zellen enthält. Hier ist der Nachweis solcher Mutationen zur frühen Entdeckung oder auch für die Prognose von bösartigen Erkrankungen wichtig (Zuh *et al.*, 1997). Bei Mutationen im extrachromosomalen Genom von Mitochondrien (oder Plastiden) führt die replikative Segregation meist wieder zu einer Homogenisierung des Genoms (Wallace, 1994), es sind jedoch auch stabile Heteroplasmiebefunde möglich, welche z.B. bei der Pathogenese von myelodysplastischen Syndromen diskutiert werden (Gattermann und Hofhaus, 1999; Graff et al., 1999). Bei viralen Genomen treten innerhalb einer Population regelmäßig Sequenzvariationen auf, für die der Begriff "Quasispezies" geprägt wurde (Eigen *et al.*, 1988; Eigen 1992). Darin können einzelne Sequenzen in verschiedensten Konzentrationen auftreten.

Mutationen zu charakterisieren, die nur in geringer Konzentration in einer Probe vorliegen, war das Anliegen dieser Arbeit. Es wurden zunächst durch Erhitzen und anschließendes Abkühlen Mischmoleküle aus Wildtyp- und mutierter Sequenz gebildet. Ein solcher Heteroduplex-Doppelstrang besteht aus zwei Einzelsträngen mit unterschiedlicher Sequenz. Werden in einer TGGE solche Heteroduplexmoleküle von anderen Doppelsträngen abgetrennt und eluiert, so sollten sich beide Sequenzen in einer PCR gemeinsam zu jeweils 50% Anteil amplifizieren lassen (Wiese *et al.*, 1995; Wiese, 1996). Dieser Ansatz ist in der vorliegenden Arbeit aufgegriffen worden. Weitergehend wurde die Auswirkung von PCR-Fehlern auf die TGGE berücksichtigt, Probleme psoralen-verknüpfter Doppelstränge gelöst sowie die selektive Reamplifikation eines der beiden Heteroduplex-Einzelstränge etabliert.

5.2.1 Sequenzstandard

Es wurde ein Abschnitt aus dem *env*-Gen des HI-Virus untersucht, der für das gp120-Molekül kodiert. Variationen in diesem Gen bedingen u.a. die Spezifität des HIV für Makrophagen oder T-Lymphozyten sowie möglicherweise auch für die Infektion der Mikrogliazellen im Gehirn (Ball *et al.*, 1994; Power *et al.*, 1994). Es wurde ein Teil des *env*-Gens amplifiziert und diese PCR-Produkte in einen Vektor einkloniert. Die gewonnenen Klone wurden sequenziert und es wurden zwei Plasmide als Sequenzstandards ausgewählt, die sich an zwei Positionen unterschieden. Diese Unterschiede sind auf Polymerasefehler während der PCR zurückzuführen. Mit diesen Plasmiden als Ausgangsmaterial wurde dann die Anreicherung von Mutationen geringer Konzentration etabliert.

Bedingt durch die Sequenzunterschiede an zwei Positionen haben die beiden Heteroduplexmoleküle dieser Standards im verwendeten PCR-Fragment V3P1/V3M1P nahezu die gleiche thermodynamische Stabilität. Daher konnten die beiden Heteroduplices in der TGGE nicht voneinander getrennt werden. Dies war zunächst jedoch vorteilhaft, da so in der Heteroduplexbande die doppelte Menge an DNA vorliegt.

5.2.2 Die Etablierung der verschachtelten PCR

Mit der TGGE können in geeigneten PCR-Fragmenten minimale Sequenzunterschiede nachgewiesen werden. Dazu kann z.B. eine DNA-Probe amplifiziert und das Produkt mit einem entsprechenden DNA-Fragment bekannter Sequenz als Standard gemischt werden. Die Mischung wird zunächst erhitzt, so daß die Doppelstränge in Einzelstränge zerfallen (Denaturierung). Beim anschließenden Abkühlen bilden sich wieder Doppelstränge (Renaturierung), wobei sich auch Mischmoleküle bilden, bei denen jeweils ein Einzelstrang von der Probe und der andere vom Standard stammt. Bei Sequenzunterschieden zwischen Probe und Standard sind diese Heteroduplexmoleküle weniger stabil als die vollständig doppelsträngigen Homoduplices. Dieser Stabilitätsunterschied wird bei der TGGE nachgewiesen.

Der Nachweis solcher Stabilitätsunterschiede für alle möglichen Mutationen ist nicht mit jedem beliebigen PCR-Produkt möglich. Die Auswahl eines für die TGGE-Analysen geeigneten Fragmentes erfolgte mit dem MISMATCH-Programm (Wulfert, 1992; Wiese *et al.*,1995). Es wurden zwei Primerpaare konstruiert (V3P1/V3M1 und V3P5/V3M5), die beide den V3-Loop umschließen. Das zweite Primerpaar hat längere Primer und sollte für Probenmaterial mit geringfügig abweichender Sequenz besser geeignet sein. In der Praxis hat sich jedoch das erste Primerpaar als geeigneter erwiesen und wurde daher, um eine Psoralengruppe erweitert, eingesetzt.

Zur Überprüfung der Eignung dieses PCR-Fragmentes für den Nachweis von Mutationen im V3-Loop wurde mittels PCR-Mutagenese eine Punktmutation an Position 180 in diesem Fragment erzeugt. Diese Position wurde so gewählt, da sich nach Berechnungen des MISMATCH-Programms eine Punktmutation an dieser Position in der zeitlichen TGGE am schlechtesten nachweisen läßt. Diese Mutation konnte dann sowohl in der zeitlichen als auch in der parallelen und der senkrechten TGGE detektiert werden. Damit wurde die Eignung der gewählten Primer zum sensitiven Mutationsnachweis bestätigt.

Zur Amplifikation sehr geringer Probenmengen wurde zwei weitere Primerpaare konstruiert (V3P4/V3M4 und V3P8/V3M8), welche das erste Primerpaar umschließen. Auf diese Weise ist eine geschachtelte PCR möglich, bei der zunächst das größere Fragment mit wenig Ausgangsmaterial amplifiziert wird. Dabei kann zugunsten einer hohen Sensitivität auch eine geringere Spezifität in Kauf genommen werden. Dieses Produkt kann dann mit dem inneren Primerpaar mit hoher Spezifität weiter vervielfältigt werden. Erfahrungsgemäß ist die Verwendung solcher geschachtelter Primer effektiver als die weitere Vervielfältigung eines PCR-Produkts mit den gleichen Primern. Hier wurde als äußeres Primerpaar überwiegend das Primerpaar V3P8/V3M8 eingesetzt.

In einem 50 µl-PCR-Ansatz zur Amplifikation der Sonde wurden etwa $1,6\cdot10^6$ Ausgangsmoleküle eingesetzt. Dies ergab bis zu 0,5 µg Produkt, was bei einer Produktlänge von 284 bp $1,6\cdot10^{12}$ Doppelsträngen entspricht, also einer Vervielfältigung um den Faktor 10^6 . Bei der geschachtelten PCR ist in der ersten PCR eine noch größere Vervielfältigung zu erwarten, da es bei einer geringeren Produktmenge hier noch nicht zur Begrenzung der Amplifikation durch überwiegende Rehybridisierung der Einzelstränge in den letzten Zyklen kommt (Plateau-Effekt). Dies ergibt für eine geschachtelte PCR einen theoretischen Amplifikationsfator von über 10^{12} . Hiermit lassen sich also minimalste Probenmengen amplifizieren, theoretisch reicht ein Einzelstrang als Ausgangsmolekül aus.

Die Verwendung geschachtelter Primer erwies sich in dieser Arbeit auch noch aus anderen Gründen als vorteilhaft: Mit dem Produkt einer ersten PCR mit dem äußeren Primerpaar konnten mehrere PCRs mit dem inneren Primerpaar durchgeführt werden. So reichte das Probenmaterial trotz geringer Nukleinsäuremengen für eine Vielzahl von Versuchen. Später wurde mit diesen Primerpaaren auch die asymmetrische Hybridisierung etabliert.

Bei dem weiteren Umgang mit PCR-Produkten kommt es leicht zu Kontaminationen anderer Lösungen mit PCR-Produkten. Dies geschieht z.B. durch unsichtbar kleine Aerosole, die sich beim Pipettieren bilden können. Zur Überprüfung auf Kontaminationen wurde einzelnen PCR-Ansätzen keine DNA hinzugefügt. Hier konnten dann nur mögliche Kontaminationen amplifiziert werden. Kontaminationen mit weniger als etwa 10⁴ Molekülen pro Ansatz lassen sich bei einer einfachen PCR nicht mehr nachweisen, solche Kontaminationen sind durch laborübliche Sorgfalt leicht vermeidbar. Bei einer geschachtelten PCR führen jedoch auch weitaus geringere DNA-Mengen zu einem positiven Kontaminationsnachweis. Dies verursachte zunächst große Probleme, da es innerhalb der Arbeitsgruppe noch keine Erfahrungen im Umgang mit derart empfindlichen PCR-Methoden gab. Erst nach räumlicher Trennung einzelner Arbeitsschritte und Anschaffung einer kleinen Sterilbank konnten geschachtelte PCRs reproduzierbar ohne Kontaminationen durchgeführt werden. Dazu wurden Stammlösungen von Primern und Nukleotiden in einem anderen Laborraum hergestellt und die PCRs unter der Sterilbank angesetzt. Fertige PCR-Produkte wurden ausschließlich an einem eigenen Arbeitsplatz mit einem dafür reservierten Pipettensatz benutzt. Bei allen Arbeiten wurden gestopfte Pipettenspitzen verwendet, um eine mögliche Aerosolbildung zu minimieren.

5.2.3 G-C-Klammer versus Psoralenprimer

Da das ausgewählte PCR-Fragment V3P1/V3M1 nur einen einzigen kooperativ denaturierenden Bereich hat, war die Verwendung einer G-C-Klammer oder eines Primers mit Psoralengruppe zur Stabilisierung notwendig. Hier wurde der Psoralenprimer gewählt, denn damit konnte das Psoralen gleichzeitig zur chemischen Markierung der Sequenzstandards dienen. Wird ein so markierter Sequenzstandard als Sonde verwendet und mit einem Probenamplifikat ohne Psoralenprimer hybridisiert, so können nur solche Hybride kovalent verknüpft werden, die den Sondenstrang mit Psoralengruppe enthalten. Damit reduziert sich die Zahl der verknüpften Hybride erheblich, sie nimmt nur noch linear mit der Anzahl der Sequenzvariationen zu und nicht mehr quadratisch. Bei einer größeren Zahl an Sequenzvariationen, wie sie in den Proben erwartet wurden, wären sonst möglicherweise keine einzelnen Banden mehr voneinander zu unterscheiden.

Die kovalente Verknüpfung der Doppelstränge mittels Psoralenklammern ist nicht quantitativ möglich; ebenso können auch nicht mehr alle Verknüpfungen ohne Zerstörung der DNA gelöst werden. Diese Nachteile der Psoralenklammern konnten durch die Entwicklung der D/R-TGGE sowie einer speziellen Primerkonstruktion für die Sondenamplifikation ausgeglichen werden.

Ein anderer Nachteil hat sich erst im Laufe der Arbeit bemerkbar gemacht. Nach der getrennten PCR von Sonde (mit Psoralenprimer) und Probe (ohne Psoralen) müssen diese gemischt und in einem Denaturierungs-Renaturierungszyklus miteinander hybridisiert werden. Dies geschah durch Erhitzen und gleichmäßiges Abkühlen der Mischung. Beim Abkühlen bilden sich jedoch bevorzugt Homoduplexmoleküle, da diese einen höheren T_m-Wert haben und daher zuerst renaturieren können. So kann es zu einer ungleichmäßigen Hybridisierung kommen, bei der weniger Heteroduplexmoleküle als erwartet entstehen. Dieser Effekt läßt sich durch eine schnellere Abkühlung verringern (U. Wiese, pers. Mitteilung), dabei bleiben dann jedoch vermehrt Einzelstränge übrig. Würde bei der Hybridisierung eine feste Hybridisierungstemperatur gewählt, würden sich die Unterschiede in den T_m-Werten zwischen Homo- und Heteroduplexsträngen ebenfalls bemerkbar machen.

Bei Verwendung einer G-C-Klammer tritt dieser Effekt nicht auf, da zunächst die G-C-reichen Molekülabschnitte aneinander binden. Ist der Unterschied in den T_m -Werten zwischen der G-C-Klammer und dem nachfolgenden kooperativen Bereich groß genug, so beeinflußt der T_m -Wert des nachfolgenden Bereichs diese Anfangshybridisierung nicht. Bei weiterer Temperatursenkung renaturieren diese teilrenaturierten Moleküle dann vollständig. So können sich die Heteroduplexmoleküle entsprechend ihren Anteilen an den Sequenzvariationen der Einzelstränge ohne Beeinflussung durch ihre niedrigeren T_m -Werte bilden. Durch ausreichende Erhitzung können auch wieder alle Hybride gelöst werden.

Kann auf eine Markierung der Sonde verzichtet werden, so wären G-C-Klammern daher den Psoralenklammern vorzuziehen. Wird eine chemische Markierung benötigt, die eine Trennung verschiedener Moleküle im Gel zuläßt, so bleibt die Verwendung einer Psoralenklammer eine sinnvolle Methode. Zur Vermeidung der Hybridisierungsnachteile sollte diese aber gegebenenfalls mit einer G-C-Klammer kombiniert werden.

5.2.4 Entwicklung der D/R-TGGE

Werden in einer PCR Psoralenprimer verwendet, so lassen sich die entstehenden DNA-Doppelstränge nur etwa zur Hälfte kovalent verknüpfen. Dies führt in einer TGGE dazu, daß sich die Banden von verknüpften und nicht verknüpften Molekülen überlagern. Um dies zu vermeiden, müssen die nicht verknüpften Doppelstränge von den verknüpften abgetrennt werden dazu wurde die zeitliche TGGE (tTGGE) entwickelt (Wiese *et al,* 1995; Wiese, 1996). Bei der tTGGE wird die Gelelektrophorese bei einer Temperatur gestartet, bei der die Doppelstränge denaturieren. Die verknüpften Moleküle laufen dabei wie Einzelstränge doppelter Länge langsamer als die Einzelstränge der nicht verknüpften Moleküle. So werden die verknüpften von den nicht verknüpften Molekülen getrennt. Anschließend wird die Temperatur in der Gelelektrophorese langsam gesenkt, beim Erreichen ihrer jeweiligen T_m -Werte renaturieren die verknüpften Moleküle und laufen als Doppelstränge schneller als die Einzelstränge. So können unterschiedliche Doppelstränge voneinander getrennt werden.

Dieses Prinzip wurde hier auf die parallele und senkrechte TGGE übertragen. In einem denaturierenden Vorlauf werden die kovalent verknüpften Moleküle von den nicht verknüpften Strängen soweit getrennt, daß diese im anschließenden Gradientenlauf nicht mehr eingeholt werden. Nach anschließender Renaturierung können mittels Psoralen verknüpfte DNA-Fragmente in der TGGE analysiert werden, ohne daß sich die Banden von nicht verknüpften Molekülen überlagern. Damit sind alle TGGE-Anwendungen auch mit Psoralen-verknüpften PCR-Produkten durchführbar. Die Temperaturgradienten sind in der parallelen TGGE freier wählbar als bei der herkömmlichen zeitlichen TGGE. In der senkrechten TGGE können nur so die kovalent verknüpften Doppelstränge ohne Beeinflussung durch die nicht verknüpften Moleküle analysiert werden.

Im denaturierenden Vorlauf bewegen sich die als Einzelstränge (teilweise doppelter Länge) vorliegenden Moleküle weitaus langsamer im Gel als Doppelstränge. Deswegen benötigt der denaturierende Vorlauf die zwei- bis dreifache Zeit der eigentlichen TGGE. Hier hat sich die Entwicklung der kleinen TGGE mit ihren kurzen Laufzeiten als besonders günstig erwiesen. So benötigt eine D/R-TGGE auf der kleinen TGGE-Anlage eine Stunde. Auf einer großen TGGE-Anlage würden dafür theoretisch etwa acht Stunden benötigt: In dieser Zeit müßten die Laufpuffer mehrfach ausgewechselt werden, damit diese nicht verarmen, und die Gelelektrophorese müßte dabei mindestens sechs Stunden bei denaturierenden Temperaturen durchgeführt werden, ohne daß das Gel bei den dabei notwendigen hohen Temperaturen austrocknet. Da letzteres der Erfahrung nach häufig unvermeidbar ist, wurde es bislang nicht versucht.

Das Verfahren des denaturierenden Vorlaufs ist prinzipiell auch für Gradientengele mit chemischen denaturierenden Gradienten (DGGE) anwendbar. Dazu müßte entweder das Gradientengel mit einem denaturierenden Gel überschichtet, oder es müßte ein denaturierender Vorlauf bei einer erhöhten Temperatur durchgeführt werden. Beides würde die Methode der DGGE noch weiter komplizieren und die Laufzeiten, wie bei der TGGE, erheblich verlängern.

5.2.5 Replikationsgenauigkeit der PCR

In *vivo* wird die DNA in Abhängigkeit von der Größe des Genoms sehr genau repliziert. Die dafür zuständigen Enzymkomplexe können unter physiologischen Bedingungen optimal arbeiten und haben zudem eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität zur Fehlerkorrektur. In vielen Organismen gibt es darüber hinaus Reparatursysteme, die DNA-Abschnitte mit Fehlpaarungen korrigieren können. Daher wird bei der Replikation eines Genoms häufig höchstens ein Fehler gemacht (Pezo und Wain-Hobson, 1997). Die DNA-Vervielfältigung *in vitro* ist dagegen weitaus fehleranfälliger.

Zur Abschätzung der Fehlerrate einer PCR-Reaktion waren in der Literatur bislang nur Näherungsformeln zu finden (Lundberg *et al.*, 1991; Keohavong und Thilly, 1989) die für kleine Gesamtfehler zwar brauchbar sind, größere jedoch überschätzen. In dieser Arbeit wurde erstmals eine genaue Formel zur Berechnung der PCR-Fehler hergeleitet. Damit wurden die Auswirkungen von Polymerasefehlern in der PCR auf die TGGE berechnet. Ein Falscheinbau geschieht mit einfachen thermostabilen Polymerasen höchstens etwa alle 5000 Nukleotide einmal. Aufgrund der exponentiellen Vervielfachung der Sequenzen in der PCR führt das jedoch dazu, daß fast zwei Drittel der Produkte geringfügig von der Ausgangssequenz abweichen können. Die Fehler verteilen sich auf fast alle Nukleotide eines PCR-Fragmentes, wobei an jeder Position die Ursprungssequenz am häufigsten vertreten bleibt. Daher fallen die Abweichungen bei vielen Anwendungen nicht ins Gewicht. Dazu zählen alle Methoden, bei denen es nur auf die Gesamtheit aller Moleküle ankommt, z.B. der Nachweis viraler Sequenzen, chromosomaler Veränderungen oder klonaler Proliferation mittels PCR sowie spezifische Hybridisierung mit einer Sonde nach *in situ* PCR.

Werden PCR-Produkte mit Restriktionsendonukleasen verdaut, kommt es nur auf die Restriktionssequenzen an. Diese umfassen jedoch häufig nur vier bis acht Basenpaare, Fehler in so kurzen Sequenzabschnitten sind entsprechend seltener als in der Gesamtsequenz. In einer vier Basenpaare umfassenden Restriktionssequenz finden sich nach 20 effektiven PCR-Zyklen mit *Taq*-Polymerase nur in drei Prozent der Produkte Sequenzfehler. Hier sind die Polymerase-induzierten Sequenzabweichungen in vielen Fällen zu vernachlässigen.

Wichtig werden die PCR-Fehler bei allen Methoden, bei denen es auf einzelne DNA-Moleküle ankommt. Hierzu zählt die Klonierung von PCR-Produkten, bei der die Plasmide einer Bakterienkolonie von einem einzelnen DNA-Molekül ausgehen. Erfahrungsgemäß haben aus PCR-Produkten gewonnene Klone nicht alle die gleiche Sequenz. Deswegen werden immer mehrere Klone eines Klonierungsansatzes präpariert und sequenziert, um einen Klon mit der gewünschten DNA-Sequenz zu erhalten.

Bei Mutationsanalysen machen sich PCR-Produkte mit abweichender Sequenz als Hintergrund im TGGE-Gel bemerkbar, da sie zu Heteroduplexmolekülen unterschiedlicher Stabilitäten führen. Je geringer dieser Hintergrund ist, desto geringer ist auch der Anteil spezifischer Heteroduplexmoleküle an der Gesamtmenge der Substanz, der noch in einer Bande nachgewiesen werden kann. Daher wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit eine PCR-Polymerase verwendet, die aufgrund ihrer 5'-3'-Exonukleaseaktivität in der Lage ist, falsch eingebaute Nukleotide wieder zu entfernen. Nach Einsatz dieser fehlerarm replizierenden Polymerase waren weniger als 10% der PCR-Produkte fehlerhaft.

Es wurde auch versucht, durch ein modifiziertes PCR-Verfahren mit nur einem Primer gezielt einen Einzelstrang herzustellen. Da dabei jedem Produkt direkt das eingesetzte Plasmid als Matrize dient, werden die Polymerasefehler nicht weiter amplifiziert. Allerdings war hierfür die fehlerarm replizierende Polymerase nicht geeignet, da diese sowohl die Einzelstränge, die im Überschuß entstehen sollten, als auch die Ausgangsmoleküle abgebaut hat. Mit einer einfachen Polymerase wäre dagegen die Fehlerrate nicht wesentlich besser als bei einer herkömmlichen PCR mit genauer Polymerase gewesen. Zudem hätten die Produkte auch noch aufwendig vom Ausgangsplasmid, welches hier in sehr hoher Konzentration eingesetzt wurde, gereinigt werden müssen. Daher wurde diese Ansatz nicht weiter verfolgt.

Eine andere Variante wäre die asymmetrische PCR, bei der ein Primer in deutlich verminderter Konzentration eingesetzt wird (Newton und Graham, 1994, S. 105). Dies führt dazu, daß das Produkt überwiegend aus den Einzelsträngen besteht, die den in größerer Konzentration vorhandenen Primer enthalten. Dieses würden jedoch aus den oben genannten Gründen ebenfalls nur mit einer einfachen Polymerase ohne 5'-3'-Exonukleaseaktivität funktionieren, so daß hierin kein Vorteil bestehen würde.

In der Praxis sinkt die Amplifikationsrate mit zunehmender Produktmenge. Deshalb geht in die Berechnung der PCR-Fehler nur die Anzahl effektiver PCR-Zyklen ein. Mit Effizienzfaktoren, die die Amplifikationsrate für jeden Zyklus angeben, könnte die Berechnung noch genauer erfolgen. Diese Faktoren könnten z.B. mit einem "LightCycler" (Roche, Mannheim) gewonnen werden; in diesem wird die Anzahl der Doppelstränge in jedem Zyklus über den Förster-Transfer fluoreszenzmarkierter Oligonukleotide bestimmt.

5.2.6 Verbesserungen der Reamplifikation

Die Reamplifikation geleluierter Heteroduplexmoleküle zur Anreicherung von mutierten Sequenzen konnte in dieser Arbeit in einigen Punkten entscheidend verbessert werden.

Im Laufe der Arbeit hat sich herausgestellt, daß sich mit Psoralenprimern kovalent verknüpfte DNA-Moleküle nur schlecht reamplifizieren lassen. Dies läßt sich durch die Reaktionsordnungen konkurrierender Reaktionen erklären. Die Rehybridisierung der Einzelstränge bei kovalent verknüpften Strängen ist eine Reaktion erster Ordnung. Diese kann bei den PCR-üblichen Konzentrationen weitaus häufiger stattfinden als die Primeranlagerung, die eine Reaktion zweiter Ordnung ist.

Zudem werden bevorzugt die Stränge der verknüpften DNA-Moleküle amplifiziert, die den Psoralenprimer enthalten (Abb. 5.1). "Offene" Enden eines DNA-Doppelstranges sind relativ instabil, so daß es dort gelegentlich zu einer teilweisen Dissoziation kommen kann. Hier kann sich dann ein Primer anlagern und der Strang kopiert werden, der am anderen Ende einen Psoralenprimer enthält. Die kovalente Verknüpfung durch die Psoralengruppe stabilisiert dieses andere Ende des Doppelstrangs, so daß dort eine Strangtrennung unmöglich ist und sich deshalb kein Primer anlagern kann. Deswegen werden bevorzugt die Einzelstränge reamplifiziert, die den Psoralenprimer enthalten.

Wird, wie hier beschrieben, nur der Sequenzstandard mit Psoralenprimern amplifiziert, wird bei der Reamplifikation also bevorzugt wieder die Standardsequenz reamplifiziert. Würde statt dessen die Probe mit Psoralenprimern amplifiziert, könnten auch Probenmoleküle unterschiedlicher Sequenz kovalent miteinander verknüpft werden; die Psoralenprimer würden also nicht mehr als chemische Markierung des Standards genutzt. Dies könnte allenfalls durch einen sehr hohen Überschuß an (psoralenfreien) Amplifikaten des Sequenzstandards in der Hybridisierung ausgeglichen werden.



Abb. 5.1: Bevorzugte Reamplifikation des Sondenstranges bei psoralenverknüpften Doppelsträngen. Das Ende eines DNA-Doppelstranges ist instabil, so daß die beiden Einzelstränge dort dissoziieren können. Das ermöglicht die Anlagerung eines Primers als ersten Schritt der Amplifikation in der PCR (linkes Ende des dargestellten Dop-

pelstranges). So kann der untere Strang vervielfältigt werden. Eine Psoralenverknüpfung verhindert die Dissoziation des DNA-Endes (rechtes Ende des dargestellten Doppelstranges). Damit ist dort keine Primeranlagerung und keine Vervielfältigung des oberen Stranges möglich. Enthält, wie in dieser Arbeit beschrieben, nur der Sequenzsstandard (schwarz) die Psoralengruppe (dicker Punkt), so wird nur dieser reamplifiziert, nicht jedoch die Probensequenz (grau).

Sollen, wie beschrieben, die Psoralenprimer als chemische Markierung des Sequenzstandards genutzt werden, müssen die kovalenten Verknüpfungen vor der Reamplifikation der Hybride aus Probe und Standard wenigstens teilweise wieder gelöst werden. Nach Literaturangaben sollte dafür eine Bestrahlung mit UV-Licht von 254 nm geeignet sein (Kanne *et al.*, 1982; Pieles und Englisch; 1989). Dies führt zwar zu einer teilweisen Lösung der kovalenten Verknüpfungen, aber auch zur Zerstörung der DNA, so daß eine Reamplifikation nicht mehr möglich ist. DNA hat ihr Absorptionsmaximum bei 254 nm, und schon eine UV-induzierte chemische Veränderung in einem Strang kann dazu führen, daß dieser nicht mehr als Matrize in der PCR kopiert werden kann.

Es wurde daher nach anderen Möglichkeiten gesucht, die kovalente Verknüpfung der Heteroduplexstränge zu lösen. Hierfür erwies sich ein UV-Leuchttisch mit einer Wellenlänge von 302 nm als geeignet. Damit konnten die Psoralenverknüpfungen zwar nur teilweise gelöst werden, jedoch blieb die DNA soweit intakt, daß eine effektive Reamplifikation möglich war.

Eine zu weniger als 50% vorhandene Punktmutation läßt sich bei starken Hintergrundsignalen in einer Sequenzierung nicht mehr sicher erkennen. Gerade bei reamplifizierten PCR-Proben führen die mitamplifizierten PCR-Fehler aber zu erhöhten Hintergrundsignalen. Deshalb wurde das PCR-Verfahren der asymmetrischen Hybridisierung entwickelt, mit dem es möglich ist, gezielt die Probenstränge aus den Probe-Sonde-Hybriden zu amplifizieren. Hierzu wurden Probenamplifikate eingesetzt, die um mindestens eine Primerlänge länger sind als die verwendeten Sondenamplifikate. Die entsprechenden Primer finden damit keine passende Sequenz in den Sondensträngen. Dies funktioniert jedoch nur, wenn verhindert wird, daß die Sondenstränge um die fehlende Sequenz verlängert werden können. Einige nichtkomplementäre Nukleotide am 5'-Ende der Sonde reichen dazu aus. (Abb. 5.2). So konnten Mutationen, die nur 1% der Gesamtmenge ausmachten, soweit angereichert werden, daß sie nach der Reamplifikation zu mindestens 50% vorlagen.



Abb. 5.2: Prinzip der asymmetrischen Hybridisierung zur gezielten Reamplifikation der Proben. Die Probenstränge (grau) sind an einem Ende länger als die Amplifikate des Sequenzstandards (schwarz). Werden die gleichen Primer wie in der Probenamplifikation verwendet, so können gezielt die Probenstränge der Doppelstränge reamplifiziert werden, deren Psoralenverknüpfung (rechtes Ende) zuvor gelöst wurde. Wegen einiger nicht-komplementärer Basen am anderen Ende können die Gegenstränge nicht von der Polymerase verlängert werden (linkes Ende).

5.2.7 Vergleich mit anderen Arbeiten und Techniken

In dieser Arbeit konnten zwei Punktmutationen in einem 284 bp langen PCR-Fragment von einem Anteil von 1:10⁻² auf 1:1 angereichert werden, und ließen sich noch in einem Verhältnis von 1:10⁻⁴ nachweisen. In einer vorhergehenden Arbeit (Wiese, 1996) wurden durch Ausschneiden und Reamplifizieren psoralenverknüpfter Heteroduplexbanden einer Länge von 220 bp aus einem silbergefärbten Gel ebenfalls Heteroduplices in einer Verdünnung von 1:10⁻⁴ nachgewiesen, wobei die Heteroduplexmoleküle jedoch nur geringfügig angereichert wurden (Wiese, 1996: Abb. 33). Die Reamplifikation hat dort hauptsächlich zu einer so starken Amplifikation geführt, daß auch schwache Heteroduplexmoleküle im Gel noch nachweisbar waren.

P. Keohavong und D. Zuh (Zuh *et al.*, 1997; Keohavong *et al.*, 1997) haben Mutationen im Codon 12 des K-*ras*-Gens noch im Verhältnis 1:10⁻⁴ bis 1:10⁻⁵ in der Denaturierungs-Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) nachweisen können, indem sie die Wildtyp-DNA nach den PCR-Schritten einer geschachtelten PCR jeweils mittels Restriktionsendonukleasen spezifisch verdaut haben.

K. Khrapko (K. Khrapko *et al.*, 1994;K. Khrapko *et al.*, 1997; X. Li-Sucholeiki *et al.*, 1999) berichtet von einer Identifizierung von Mutationen in einem 100 bp-Abschnitt des humanen mitochondrialen Genoms bis zu einem Anteil von nur 1:10⁻⁶. Dabei werden nach einer Verdauung mit einem Restriktionsenzym in einem ersten Schritt in einem denaturierenden Gel Homoduplexstränge angereichert, die einen anderen T_m-Wert als der Wildtyp haben. Veränderte Sequenzen mit dem gleichen T_m-Wert wie der Wildtyp können so also nicht ermittelt werden. Die abgetrennten Homoduplexmoleküle werden dann erst PCR-amplifiziert und die dabei entstandenen Heteroduplices werden in einer *constant denaturant capillary electrophoresis* (CDCE) um den Faktor 30 angereichert. Nach Reamplifikation werden die Mutationen dann in einer hochauflösenden CDCE durch Vergleich der Retentionszeiten bekannter Mutationen bestimmt.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Punktmutationen von einem Anteil von 1:10⁻² auf 1:1 angereichert. Der Ansatz von Khrapko, die Mutationen *vor* einer fehlerbehafteten PCR-Amplifikation anzureichern, zeigt einen Weg, wie diese Grenzen noch verschoben werden könnten: Lassen sich geeignete Fragmente enzymatisch herausschneiden und mit entsprechenden Fragmenten mit Psoralengruppe hybridisieren und kovalent verknüpfen, so sollten sie auch in sehr geringen Konzentrationen in der TGGE abgetrennt und nach Elution amplifiziert werden können. Da dazu bei geringen Probenmengen auch keine großen Sondenmengen benötigt werden, kann die Sonde mit Psoralengruppe z.B. in einer PCR mit wenigen Zyklen unter fehleroptimierten Bedingungen erzeugt werden.

5.3 Untersuchung des Sequenzspektrums im V3-Loop des HIV

5.3.1 Eine ungewöhnliche Standardsequenz als Sonde

Für die Suche nach bislang unbekannten Mutationen in einem Gen ist die Verwendung einer bekannten Standardsequenz als Sonde zunächst sinnvoll. Die hier für den V3-Loop des HIV-env-Gens verwendete Sondensequenz leitet sich vom Plasmid pNL4-3 ab, welches jedoch im V3-Loop eine ungewöhnliche Sequenz aufweist (Chesebro et al., 1992). Damit können die deutlichen Sequenzunterschiede zwischen der Sonde und den zuerst untersuchten Proben +C1 und +C2 erklärt werden. Sie zeigen sich zum einen an dem geringen Anteil an Hybriden zwischen Proben- und Sondensträngen, zum anderen in einem ungewöhnlichen Laufverhalten der Hybride (s. Abb. 4.47). Diese laufen im "nativen" Zustand im Gel ungewöhnlich langsam, zum Teil sogar langsamer als im denaturierten Zustand. Da die Sequenzen von Sonde und Proben insbesondere im mittleren Abschnitt stark voneinander abweichen, ist gerade dieser Bereich besonders instabil. Möglicherweise liegt daher ein Teil der Heteroduplexmoleküle schon bei niedrigen Temperaturen in einem Zustand vor, bei dem der mittlere Abschnitt des Doppelstrangs denaturiert ist und eine große interne Schleife bildet. Eine derartige große interne Schleife aus einzelsträngiger DNA sollte, wie der "open circle" eines Viroids, in der Gelelektrophorese nur eine sehr geringe Mobilität haben. Auch die Heteroduplices, die weitgehend als Doppelstrang vorliegen enthalten mindestens zwei interne Schleifen, die ihre Mobilität im Gel verringern.

Die Wahl der Primer war darauf ausgelegt, mit der TGGE schon minimale Sequenzunterschiede nachweisen zu können. Diese Nachweisbarkeit wurde auch am Beispiel der Mut180 gezeigt, die nach theoretischen Vorhersagen den geringsten Laufunterschied im Gel verursacht. Die erheblichen Sequenzunterschiede zwischen Sonde und Probe ließen sich damit auch nachweisen; für eine Unterscheidung der Sequenzvarianten in den Proben ist diese Sondensequenz wegen ihrer erheblichen Sequenzunterschiede gegenüber den Proben jedoch nicht geeignet.

5.3.2 Sequenzanreicherung in der D/R-TGGE

Um Sequenzstandards als Sonden zu erhalten, die den Sequenzen der zu untersuchenden Proben möglichst ähnlich sind, wurden daraufhin PCR-Produkte von weiteren Proben kloniert und jeweils ein Klon als Sonde für diese Proben verwendet. Die Sequenzen dieser Sonden entsprachen daher Sequenzen, die in den Proben vorkamen. Mögliche PCR-Fehler wurden durch Verwendung der *Pwo*-Polymerase mit geringer Fehlerrate reduziert.

Mit diesen Sonden konnten in der parallelen D/R-TGGE eine Reihe unterschiedlich starker Heteroduplexbanden dargestellt werden (Abb. 4.49 C). Es war auch möglich, diese Heteroduplices durch Ausschneiden, Geleluieren und Reamplifizieren anzureichern; dabei blieb jedoch ein erheblicher Hintergrund erhalten. Aus den Sequenzierungen der Reamplifikate konnten deshalb trotz aufwändiger Auswertung die Sequenzen der entsprechenden Heteroduplexmoleküle nicht sicher ermittelt werden.

5.3.3 Klonierung und Sequenzierung

Da es nicht möglich war, mit Hilfe der TGGE-Reamplifikationen die Sequenzspektren zu bestimmen, wurden Aussagen dazu mit der klassischen Methode durch die Sequenzierung vieler Klone gewonnen. In den klonierten Proben vom Patienten 13751 wurde im Liquor nur eine Sequenzvariante gefunden, welche neben einer weiteren Sequenzklasse auch in ihrem Serum (+F) vorkam.

Diese klonierten Proben von Patient 13498 zeigen eine erhebliche Variation der Sequenzen im Bereich des V3-Loops. Es können grob drei Sequenzklassen unterschieden werden, von denen die Klasse mit den meisten Klonen (mit G bzw. C an den Positionen 161 bzw. 176) auch die meisten Variationen enthält. Die Sequenzen in Serum und Liquor zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede untereinander, alle Sequenzmotive der Liquorklone finden sich auch bei Klonen aus dem Serum. Die vorhandenen Unterschiede sind wahrscheinlich PCR-bedingt.

In dieser Arbeit wurden keine Unterschiede zwischen den Sequenzen des V3-Loops des HIV-*env*-Gens aus Serum und Liquor gefunden. Das etwas kleinere Sequenzspektrum der Liquorklone liegt möglicherweise an der geringeren Zahl sequenzierter Klone, kann aber auch durch eine geringere Sequenzvariabilität im Liquor bedingt sein. Ein Anzeichen für spezifische neurotrope Sequenzvariationen ist dies jedoch nicht.

5.3.4 Liquor als Probenquelle für HIV-Neurotropismusuntersuchungen

Als dem Hirn zuzuordnendes Körperkompartiment wurde die Cerebrospinalflüssigkeit (Liquor) analysiert, da Hirngewebe von lebenden Patienten in der Regel nicht zur Verfügung steht. Verschiedene Untersuchungen zeigen intraindividuelle Unterschiede in den viralen Sequenzen von Serum und Liquor im HIV-*env*-Gen im Bereich des V3-Loops (Ball *et al.*, 1994; Power *et al.*, 1994; Kuiken *et al.*, 1995; Brengel-Pesce, 1996; van't Wout *et al.*, 1997). Ebenso werden in den Genen für die virale Protease und reverse Transkriptase intraindividuelle virale Sequenzunterschiede festgestellt (Venturi *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2000, Cunningham *et al.*, 2000; Stingele *et al.*, 2001). Dies legt nahe, daß der Liquor zu einem Körperkompartiment mit eigenem Viruspool gehört. In diesem finden sich täglich 10⁴ bis 10⁶ neue Viren, die zumindest zum Teil nicht aus dem Blutplasma stammen können (Haas *et al.*, 2000). Ungeklärt bleibt, ob diese Unterschiede auf neurotropen Subpopulationen des HIV beruhen oder nur durch die Entwicklung in getrennten Körperkompartimenten zustande kommen.

Bei AIDS-Patienten scheint ein Zusammenhang zwischen AIDS-assoziiertem Demenzkomplex (ADC) und der Viruskonzentration im Liquor zu bestehen (Krivine *et al.*, 1999, Coutellier *et al.*, 1999; Tam-

bussi *et al.*, 2000). Dabei stammen mit zunehmender Viruslast des Liquors die Viren überwiegend aus dem Zentralnervensystem (Ellis *et al.*, 2000). Dies weist darauf hin, daß bei fortgeschrittenem ADC der Liquor eine geeignete Probenquelle zur Untersuchung cerebraler HI-Viren sein kann. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß diese vom Blut getrennte Viruspopulation nicht aus dem Nervengewebe selber stammt, sondern in anderen Teilen des ZNS, wie z.B. den Hirnhäuten und dem Plexus Choriodeus gebildet wird (Eggers *et al.*, 1999). Auch die Existenz zweier Gewebekompartimente innerhalb des ZNS mit eigenen viralen Populationen wird diskutiert (Ellis *et al.*, 2000). Dann müßten zur Ermittlung neurotroper Sequenzvarianten die HIV-Sequenzen aus Gehirngewebe untersucht werden.

Da das HIV ein Retrovirus ist, welches sein Genom in das Wirtsgenom integriert, kann als Ausgangsmaterial für die Sequenzanalysen DNA aus infizierten Zellen verwendet werden. Dies hat den Vorteil, daß die Proben leichter zu handhaben sind, da DNA stabiler ist als RNA. Außerdem ist im weiteren Verlauf keine reverse Transkription notwendig. Die Cerebrospinalflüssigkeit (Liquor) als hirnnahes Körperkompartiment enthält jedoch normalerweise kaum Zellen, so daß hier von geringsten DNA-Mengen ausgegangen werden mußte. Hierfür wurde eine geschachtelte PCR etabliert, mit der sogar einzelne Ausgangsmoleküle amplifiziert werden konnten.

Schließlich wurde jedoch virale RNA als Ausgangsmaterial verwendet. Diese liegt sowohl im Serum als auch im Liquor in höheren Konzentrationen als DNA vor. Zudem ist anzunehmen, daß die Sequenzen der viralen RNA in besserer "Durchmischung" vorliegen, da jede infizierte Zelle bis zu 10.000 Virionen freisetzen kann (Dimitrov und Martin, 1995). In 0,5 ml Probenmaterial spiegelt sich daher das insgesamt vorhandene Sequenzspektrum eher in der viralen RNA als in der integrierten DNA wieder. Die geschachtelte PCR konnte auch dafür verwendet werden; so stand von den Proben mehr Material für die Experimente zur Verfügung.

In dieser Arbeit konnten keine entscheidenden Unterschiede in den Sequenzen aus Liquor und Serum von HIV-Infizierten gefunden werden. In der Literatur gibt es einander widersprechende Angaben zu möglichen neurotropen Sequenzvariationen (Keys *et al.*, 1993; Ball *et al.*, 1994; Power *et al.*, 1995; Kuiken *et al.*, 1995; Simmonds, 1996; Brengel-Pesce, 1996 van't Wout *et al.*, 1997; Ghorpade *et al.*, 1998). Einzige Gemeinsamkeit aller bisherigen Veröffentlichung ist neben dem Makrophagentropismus der im ZNS gefundenen Sequenzen eine große intraindividuelle Ähnlichkeit dieser Sequenzen mit im Blut nachgewiesenen Sequenzen derselben Individuen im Vergleich zu den interindividuellen Sequenzunterschieden verschiedener Infizierter. Inzwischen scheint es immer unwahrscheinlicher zu sein, daß Sequenzmotive im V3-Loop alleine für den Neurotropismus des HIV verantwortlich sind.

Für den ADC könnten auch eine Reihe anderer Faktoren verantwortlich sein, wie z.B. andere Anteile des HIV-Genoms, der genetische Hintergrund des Wirts, der Zustand des Immunsystems sowie Umwelteinflüsse, wie z.B. vorausgegangene Infektionen mit opportunistischen Erregern.

5.3.5 Ausblick: Untersuchung von Resistenzmutationen bei HIV

Die in dieser Arbeit entwickelten Methoden sind geeignet, minimale Sequenzunterschiede anzureichern und zu charakterisieren, die nur in geringer Konzentration vorhanden sind. Es hat sich herausgestellt, daß die Sequenzvariabilität im V3-Loop des HIV zu groß ist um die Sequenzspektren mit der TGGE analysieren zu können. Durch Klonierung und Sequenzierung einzelner Sequenzen konnte diese Sequenzvielfalt bestätigt werden, es wurden jedoch keine signifikanten Sequenzunterschiede zwischen Serum und Liquor gefunden, die auf eine neurotrope Subpopulation des Virus hinweisen. Andere, weniger variable Gene des HIV eignen sich besser zur Untersuchung mit den hier entwickelten Methoden:

Die Gene für die reverse Transkriptase und die Polymerase des HIV sind weniger variabel als das *env*-Gen und daher besser mittels TGGE analysierbar. An diesen Enzymen setzen die gegenwärtig erfolgreichsten Behandlungsstrategien gegen AIDS an. Durch die Einnahme von spezifischen Hemmstoffen gegen die reverse Transkriptase und die virale Protease kann bei vielen HIV-Infizierten für längere Zeit die Viruslast im Blut unter die übliche Nachweisgrenze von 20 Kopien viraler RNA pro Milliliter Blut gesenkt werden. Dabei werden die Überlebenszeit und die Lebensqualität der Betroffenen erheblich verbessert.

Eingeschränkt wird die Wirksamkeit der antiretroviralen Medikamente durch die Entstehung von Resistenzmutationen. Dabei reicht häufig der Austausch einer oder weniger Aminosäuren an bestimmten Positionen aus, um die Reverse Transkriptase (RT) oder die virale Protease gegen eine Substanz resistent zu machen. Diese Mutationen sind bei einem täglichen Umsatz von 10⁸ bis 10⁹ Viren pro Tag mit 10⁶ bis 10⁸ unterschiedlichen Virusgenomen in einem Infizierten (Wain-Hobson, 1995) möglicherweise schon vorhanden. So wächst nach anfänglicher deutlicher Reduktion der Viruslast schnell wieder eine Population resistenter Viren heran. Durch die Kombination mehrerer antiretroviraler Medikamente, in der Regel zweier oder dreier RT-Hemmer und eines oder zweier Proteasehemmer, wird das Auftreten resistenter Viren verzögert.

Durch die zunehmende Behandlung mit antiretroviralen Mitteln steigt jedoch auch die Zahl der Patienten, deren Viren gegen einige Medikamente resistent sind. Zum Teil findet man solche Resistenzen schon bei Neuinfizierten, die von einem Träger resistenter Viren infiziert wurden. Neuere Ansätze versuchen, durch genetische Untersuchung der Viruspopulation eines Patienten mögliche vorhandene Resistenzen schnell zu entdecken und die Auswahl der Medikamente darauf abzustimmen (Durant *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 2000). Hier bieten die in dieser Arbeit entwickelten Methoden die Möglichkeit, derartige Resistenz-bedingende Mutationen schnell und sicher zu ermitteln.

Es könnten auch solche Resistenzmutationen detektiert werden, die nur in einem sehr geringen Anteil der vorhandenen Viren eines Patienten vorhanden sind, und die mit den bisherigen Methoden noch nicht nachgewiesen werden können. Damit ließe sich vermeiden, ein Medikament einzusetzen, gegen das schon resistente Viren vorhanden sind, auch wenn diese erst einen kleinen Teil der Viruspopulation ausmachen.

Bleibt es bei einer überschaubaren Anzahl an möglichen Resistenzmutationen, könnten diese ggf. sogar direkt über ihre Laufeigenschaften in der D/R-TGGE identifiziert werden. Aufwändige Gelelutionen, Reamplifikationen und Sequenzierungen könnten dann auf noch unbekannte Mutationen beschränkt werden. Hier zeichnen sich weitergehende, vielversprechende Anwendungen der Methoden dieser Arbeit ab, welche über die Ergebnisse der Grundlagenforschung hinaus den infizierten Menschen direkt zugute kommen könnten.

6 Zusammenfassung

Genetische Untersuchungen sind ein wichtiger Bestandteil biologischer und medizinischer Forschung. Während von immer mehr Organismen die Sequenz des kompletten Genoms bestimmt wird, gewinnt die Detektion individueller genetischer Variationen zunehmend Bedeutung. Diese können zu unterschiedlichen, auch medizinisch relevanten Phänotypen führen.

Der kleinstmögliche genetische Unterschied ist die Veränderung eines Buchstabens im genetischen Code, was biochemisch der Austausch eines Basenpaares in der DNA entspricht. Für den Nachweis solcher Punktmutationen in PCR-Produkten ist die Temperaturgradienten-Gelelektrophorese (TGGE) eine etablierte Methode. Die Verwendung eines Primers mit einer Psoralengruppe an seinem 5'-Ende ermöglicht dabei die UV-induzierte, kovalente Verknüpfung der beiden Einzelstränge eines PCR-Fragmentes. Durch diese Verknüpfung wird in der TGGE die irreversible Trennung der Einzelstränge bei denaturierenden Temperaturen verhindert und damit die Analyse solcher PCR-Produkte ermöglicht, die keinen natürlichen oder künstlichen stabilisierenden Bereich enthalten.

Zur Suche nach Mutationen wurden PCR-Amplifikate von Plasmidklonen bekannter Sequenz als Sonde verwendet und mit PCR-Amplifikaten der Proben hybridisiert. Sequenzunterschiede zwischen Probe und Sonde führen zu destabilisierenden Fehlpaarungen in den Heteroduplexmolekülen, welche sich in einem veränderten Laufverhalten in der TGGE bemerkbar machen.

Von zunehmendem Interesse sind solche Mutationen, die nur in einem kleinen Teil einer Probe vorhanden sind. Das können z.B. einige entartete Zellen einer Gewebeprobe sein, oder auch eine Teilpopulation einer viralen Quasispezies. Solche Mutationen, die nur in niedriger Konzentration vorliegen, konnten mit den bisherigen Methoden nur unter großem Aufwand charakterisiert werden. In dieser Arbeit wurde ein TGGE-Verfahren zur Anreicherung solcher Mutationen etabliert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst eine kleine TGGE-Anlage entwickelt, die mit Peltier-Modulen temperiert wird. Diese Technik ermöglicht eine schnelle Temperatureinstellung und geringe Abmessungen der Gele. So konnten die Laufzeiten für Standardanwendungen der TGGE deutlich verkürzt und die "D/R-TGGE" eingeführt werden. Bei dieser neuen TGGE-Methode werden in einem langen, denaturierenden Vorlauf zunächst die Psoralen-verknüpften Doppelstränge von den nicht verknüpften getrennt, so daß diese das Ergebnis der anschließenden TGGE nicht beeinflussen.

Indem nur in der Sonden-PCR ein Psoralenprimer verwendet wurde, konnte die Psoralengruppe als chemische Markierung der Sonde verwendet werden. So wurde die Anzahl möglicher psoralenverknüpfter Heteroduplices um eine Potenz verringert. Diese Heteroduplices wurden anschließend ausgeschnitten, geleluiert und reamplifiziert. Es wurden spezielle Gegenprimer entwickelt, mit denen bevorzugt die Probenstränge der Heteroduplices reamplifiziert werden konnten.

Eine mathematische Analyse der Auswirkungen von Polymerasefehlern auf die PCR-Produkte zeigte, daß mit einfachen thermostabilen Polymerasen nicht einmal die Hälfte der PCR-Produkte den Ausgangssequenzen entsprach. Dies führt zu einem erheblichen Hintergrund in der TGGE, welcher die Empfindlichkeit des Anreicherungsverfahrens beschränkt. Durch die Verwendung einer fehlerarm replizierenden Polymerase konnte schließlich eine Mutation, die nur zu einem Prozent in der Ausgangs-DNA vorlag, auf 50% angereichert werden. Dies reicht aus, um die Mutation in einer Sequenzierung eindeutig charakterisieren zu können.

Schließlich wurde versucht, mit diesem Verfahren das Sequenzspektrum der dritten variablen Region des gp120-Gens des humanen Immundefizienz-Virus Typ 1 zu bestimmen. Dieser hochvariable Abschnitt des *env*-Gens kodiert für eine Aminosäureschleife auf der Oberfläche des HIV-1, welche den Tropismus des Virus für T-Zellen bzw. Makrophagen bestimmt und auch für neurotrope Eigenschaften dieses Virus verantwortlich gemacht wird. Es hat sich jedoch herausgestellt, daß die Sequenzvariabilität innerhalb dieses V3-Loops so groß ist, daß sich die unterschiedlichen Sequenzen in der TGGE nicht mehr voneinander unterscheiden lassen. Vermutungen zur Existenz von Sequenzvariationen im V3-Loop, die für den AIDS-assoziierten Demenz-Komplex verantwortlich sind, konnten in dieser Arbeit auch mit anderen Methoden nicht bestätigt werden.

7 Literatur

- A. Adachi, H. E. Gendelman, S. Koenig, T. Folks, R. Willey, A. Rabson, M. A. Martin (1986): Production of Acquired Immunodeficiency Syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone, *J. Virol.* 59, 284-291
- J. K. Ball, E. C. Holmes, H. Withwell, U. Desselberger (1994): Genomic variation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1): molecular analyses of HI-1 in sequential blood samples and various organs obtained at autopsy, *J. Gen. Virol.* **75**, 867-879
- W. M. Barnes (1992): The fidelity of *Taq* polymerase catalyzing PCR is improved by an N-terminal deletion, *Gene* **112**, 29-35
- H. Beyer (1984): Lehrbuch der organischen Chemie, S. Hirzel Verlag, Stuttgart
- H. C. Birnboim und J. Doly (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucl. Acids Res.* **7**, 1513-1522
- K. Brengel-Pesce, P. Morand, P. Innocenti-Francillard, B. Chanzy, M.-J Bourgeat, P. Leclercq, M. Micoud, J.-M. Seigneurin (1996): Genetic and biological analysis of variants derived from the cerebrospinal fluid of HIV Type 1 subtype B- and D- infected patients with and without AIDS Dementia Complex, *AIDS research and human retroviruses*, **12**, 1643-1645
- M. Chamberlin, R. Kingston, M. Gilman, J. Wiggs, A. deVera (1983): Isolation of bacterial and bacteriophage RNA polymerases and their use in synthesis of RNA *in vitro*, *Methods Enzymol.* 101, 540-568
- B. Chesebro, K. Wehrly, J. Nishio, S. Perryman (1992): Macrophage-tropic human immunodeficiency virus isolates from different patients exhibit unusual V3 envelope sequence homogeneity in comparison with T-cell tropic isolates: Definition of critical amino acids involved in cell tropism, *J. Virol.* 66, 6547-6554
- J. Cline, J. C. Braman, H. H. Hogrefe (1996): PCR fidelity of *Pfu* DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases, *Nucl. Acids Res.* **24**, 3546-3551
- J. M. Coffin (1995): HIV population dynamics in vivo: Implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy, *Science* **267**, 483-489
- R. G. H. Cotton, E. Edkins, S. Forest (1998): Mutation Detection, A Practical Approach, *Oxford University Press*, Oxford
- P. H. Cunningham, D. G. Smith, C. Satchell, D. A. Cooper, B. Brew (2000): Evidence for independent development of resistance to HIV-1 reverse transcriptase inhibitors in the cerebrospinal fluid, AIDS, 14, 1949 - 1954
- J. Devereux, P. Haeberli, O. Smithies (1984): A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX, *Nucl. Acids Res.* **12**, 387-395
- D. S. Dimitrov und M. A. Martin (1995): CD4⁺ cell turnover, Nature 375, 194-195
- J. Durant, P. Clevenbergh, P. Halfon, P. Delgiudice, S. Porsin, P. Simonet, N. Montagne, C. A. B. Boucher, J. M Schapiro, P. Dellamonica (1999): Drug-resistance genotyping in HIV-1 therapy: the VIRAD APT randomised controlled trial, *Lancet*, **353**,2195-2199
- C. C. Eggers, J. van Lunzen, T. Buhk, H.-J. Stellbrink (1999): HIV infection of the central nervous system is characterized by rapid turnover of viral RNA in cerebrospinal fluid, *J. Acquir Immune Defic Syndr* **20**, 259-264
- M. Eigen, J. McCaskill, P. Schuster (1988): Molecular quasi-species, J. Phys. Chem. 92, 6881-6891

- M. Eigen (1992): Virus-Quasispezies oder die Büchse der Pandora, Spektrum der Wissenschaft, 12/1992, 42-55
- R. J. Ellis, A: C. Gamst, E. Capparelli, S. A. Spector, K. Hsia, T. Wolfson, I. Abramson, I. Grant, J. A. McCutchan (2000): Cerebrospinal fluid HIV RNA originates from both local CNS and systemic sources, *Neurology*, 54, 927-936
- A. Fels (1997): Startstellen der Viroid-Replikation im Kernextrakt, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- E. Fernandez, T. Bienvenu, F. D. Arramond, K. Beldjord, J. C. Kaplan, C. Beldjord (1993): Use of chemical clamps in denaturing gradient gel electrophoresis: Application in the detection of the most frequent mediterranean β -thalassemic mutations, PCR *Meth. Appl.* **3**, 122-124
- M. Fixman und J. J. Freire (1977): Theory of DNA melting curves, Biopolymers 16, 2693-2704
- N. Gattermann, G. Hofhaus (1999): Mitochondria harbouring mutant mtDNA a cuckoo in the nest?, *Biol. Chem.* **380**, 871-877
- C. Gelfi, P. G. Righetti, L. Cremonesi, M. Ferrari (1994): Detection of point mutations by capillary electrophoresis in liquid polymers in temporal thermal gradients, *Electrophoresis* **15**, 1506-1511
- A. Ghorpade, A. Nukuna, M. Che, S. Haggerty, Y. Persidsky, E. Carter, L. Carhart, L. Shafer, H. E. Gendelman (1998): Human immunodeficiency Virus Neurotropism: an analysis of viral replication and cytopathicity for divergent strains in monocytes and microglia, *J. Virol.*, **72**, 3340-3350
- S. P. Goff (1992): Genetics of retroviral integration, Annu. Rev. Genet. 26, 527-544
- O. Gotoh (1983): Prediction of melting profiles and local helix stability for sequenced DNA, *Adv. Biophys.* **16**, 1-52
- C. Graff, D. A: Clayton, N. G. Larsson (1999): Mitochondrial medicine recent advances, J. Int. Med. 246, 11-23
- M. Grompe (1993): The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids, *nature genetics* 5, 111-117
- D. W. Haas, L. A. Clough, B. W: Johnson, V. L Harris, P. Spearman, G. R: Wilkinson, C. V. Fletcher, S. Fiscus, S. Raffanti, R. Donlon, J. McKinsey, J. Nicotera, D. Schmidt, R. E: Shoup, R. E. Kates, R. M. Lloyd, B. Larder: Evidence for a source of HIV type 1 within the central nervous system by ultraintensive sampling of cerebrospinal fluid and plasma, *AIDS research and human retroviruses*, **16**, 1491-1502
- D. Hanahan (1983): Studies on transformation of *Escherischia coli* with plasmids, *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580
- D. Hanahan (1985): Techniques for transformation of *Escherischia coli*. In: D. M. Glover (ed.): *DNA cloning, Vol. I, A practical approach*, IRL Press Oxford, Washington D.C.
- M. He, A. Wilde, M. A. Kaderbhai (1989): A simple single-step procedure for small-scale preparation of *Escherischia coli* plasmids, *Nucl. Acids Res.* **18**, 1660
- D. D. Ho, A. U. Neumann, A. S. Perelson, W. Chen, J. M. Leonard, M. Markowitz (1995): Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection, *Nature* **373**, 123-126
- S. S. Hwang, T. J. Boyle, H. K. Lyerly, B. R. Cullen (1991): Identification of the envelope V3 Loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1, *Science* **253**, 71-74

Invitrogen (1993): Anleitung zum TA-Cloning-Kit, Version 2.2, Leek, NL

- D. Kanne, K. Straub, J. E. Hearst, H. Rapoport (1982): Isolation and characterization of pyrimidinepsoralen-pyrimidine photodiadducts from DNA, *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 6754-6764
- P. Keohavong und W. G. Thilly (1989): Fidelity of DNA polymerases in DNA amplification, *PNAS* 86, 9253-9257
- P. Keohavong, D. Zuh, A. C. Melacrinos, M. A. A. DeMichele, R. J. Weyant, J. D. Luketich, J. R. Testa, M. Fedder, J. M. Siegfried (1997): Detection of low-fraction K-*ras* Mutations in primary lung tumors using a sensitive method, *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)* 74, 162-170
- B. Keys, J. Karis, B. Fadeel, A. Valentin, G. Norkrans, L. Hagberg, F. Chiodi (1993): V3 sequences of paired HIV-1 isolates from blood and cerebrospinal fluid cluster according to host and show variation related to the clinical stage of disease, *Virology*, **196**, 475-483
- K. Khrapko, J. S. Hanekamp, W. G. Thilly, A. Belenkii, F. Foret, B. L. Karger (1994): Constant denaturant capillary electrophoresis (CDCE): A high resolution approach to mutational analysis, *Nucl. Acids Res.* **22**, 364-369
- K. Khrapko, H. Coller, P. André, X.-C- Li, F. Foret, A. A. Belenky, B. L. Karger, W. G. Thilly (1997): Mutational spectrometry without phenotypic selection: human mitochondrial DNA, *Nucl. Acids Res.*, 25, 685-693
- P. Klaff, S. M. Mundt, G. Steger (1997): Complex formation of the spinach chloroplast *psbA* mRNA 5' untranslated region with proteins is dependent on the RNA structure, *RNA* **3**, 1468-1479
- H. Kollegger, L. Deecke (1988): Neuro-AIDS, Wiener klinische Wochenschrift, 100, 665-667
- A. Krivine, G. Force, J. Servan, A. Cabee, F. Rozenberg, L. Dighiero, F. Marguet, P. Lebon (1999): Measuring HIV-1 RNA and interferon-alpha in the cerebrospinal fluid of AIDS patients: insights into the pathogenesis of AIDS dementia complex, *J. Neurovirol.*, 5, 500-506
- C. L. Kuiken, J. Goudsmit, G. F. Weiller, J. S. Armstrong, S. Hartman, P. Portegies, J. Dekker, M. Cornelissen (1995): Differences in human immunodeficiency virus type 1 V3 sequences from patients with and without AIDS dementia complex, *J. Gen. Virol.*, **76**, 175-180
- P. D. Kwong, R. Wyatt, J. Robinson, R. W. Sweet, J. Sodroski, W. A. Hendricson (1998): Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody, *Nature* **393**, 648-659
- L. S. Lerman, S. G. Fischer, I. Hurley, K. Silverstein, N. Lumelsky (1984): Sequence-determined DNA-separations, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **13**, 399-423
- M. Lu, S. C. Blacklow, Ü. S. Kim(1995): A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein, *Nature Struct. Biol.* **2**, 1075-1082
- K. S. Lundberg, D. D. Shoemaker, M. W. W. Adams, J. M. Short, J. A. Sorge, E. J. Mathur (1991): High-Fidelity amplification using a thermostable DNA Polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*, *Gene* **108**, 1-6
- S. Modrow, B. H. Hahn, G. M. Shaw, R. C. Gallo, F. Wong-Staal, H. Wolf (1987): Computer-assisted analysis of envelope protein sequences of seven human immunodeficiency virus isolates: Prediction of antigenic epitopes in conserved and variable regions, *J. Virol.* **61**, 570-578
- C. D. Morrow, J Park, J. K. Wakefield (1994): Viral gene products and replication of the human immunodeficiency type 1 virus, *Am. J. Physiol.* **266**, C1135-C1156

- K. B. Mullis (1990): Eine Nachtfahrt und die Polymerase-Kettenreaktion, Spektrum der Wissenschaft, 6/1990, 60-67
- B. A. Navia, B. D. Jordan, R. W. Price (1986): The AIDS dementia complex. I. Clinical features, *Ann. Neurol.*, **19**, 517-524
- B. A. Navia, E.-S. Cho, C. K. Petito, R. W. Price (1986): The AIDS dementia complex. II. Neuropathology, *Ann. Neurol.*, **19**, 525-535
- C. R. Newton und A. Graham (1994): PCR, Spektrum, Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg
- D. A. Nickerson, V. O. Tobe, S. L. Taylor (1997): PolyPhred: automating the detection and genotyping of single nucleotide substitutions using fluorescence-based resequencing, *Nucl. Acids Res.* 22, 2745-2751
- J. Norrander, T. Kempe, J. Messing (1983): Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis, *Gene* 26, 101-106
- V. Pezo und S. Wain-Hobson (1997): HIV-genetic variation: Life at the edge, J. Inf. 34, 201-203
- U. Pieles und U. Englisch (1989): Psoralen covalently linked to oligodeoxyribonucleotides: synthesis, sequence specific recognition of DNA and photo-crosslinking to pyrimidine residues of DNA, *Nucleic Acids Res.* **17**, 285-299
- D. Poland (1974): Recursion relation generation of probability profiles for specific-sequence macromolecules with long-range correlations, *Biopolymers* **13**, 1859-1871
- C. Power, J. C. McArthur, R. T. Johnson, D. E. Griffin, J. D. Glass, S. Perryman, B. Chesebro (1994): Demented and nondemented patients with AIDS differ in brain-derived Human Immunodeficiency Virus Type 1 envelope sequences, J. Virol., 68, 4643-4649
- C. Power, J. C. McArthur, R. T. Johnson, D. E. Griffin, J. D. Glass, R. Dewey, B. Chesebro (1995): Distinct HIV-1 *env* sequences are associated with neurotropism and neurovirulence, *Current Topics in Mircrobiol. and Immunol.*, **202**, 89-104
- R. W. Price (1999): AIDS dementia complex, *The AIDS Knowledge Base, Third Edition*, Hrsg.: P. T. Cohen, M. A. Sande, P. A. Volberding; Lippincott Williams und Wilkins, Philadelphia
- QIAamp Viral RNA Mini Kit Handbook, January 1999, Qiagen, Hilden
- QIAGEN Plasmid Mini Handbook, March 1997, Qiagen GmbH, Hilden
- QIAquick Spin Handbook, July 1997, Qiagen GmbH, Hilden
- D. Riesner, R. Hecker, G. Steger (1988): Structure of viroid replication intermediates as studied by thermodynamics and temperature-gradient gel electrophoresis, *Structure & Expression, Volume 1: From Proteins to Ribosomes,* Hrsg.: R. H. Sarma, M. H. Sarma; Adenine Press
- D. Riesner, K. Henco, G. Steger (1991): Temperature-gradient gel electrophoresis: A method for the analysis of conformational transitions and mutations in nucleic acids and proteins. In *Advances in Electrophoresis, Vol 4*, Hrsg.: A. Chrambach, M. J. Dunn, B. J. Radola; VCH Weinheim
- D. Riesner, T. Baumstark, F. Qu, T. Klahn, P. Loss, V. Rosenbaum, M. Schmitz, G. Steger (1992): Physical basis and biological examples of metastable RNA structures, *Structural Tools for the Analysis of Protein-Nucleic Acids Complexes*. Advances in Life Sciences, Birkhäuser, Basel
- V. Rosenbaum (1986): Spektralphotometrischer und gelelektrophoretischer Nachweis von Konformationsübergängen in Viroiden, *Diplomarbeit, Universität Düsseldorf*

- V. Rosenbaum und D. Riesner (1987): Temperature-gradient gel electrophoresis. Thermodynamic analysis of nucleic acids and proteins in purified form and in cellular extracts, *Biophys. Chem.* 26, 235-246
- D. W. Sammons, L. D. Adams, E. E: Nishizawa (1981): Ultrasensitive silver- based color staining of polypeptides in polyacrylamide gels, *Electrophoresis* **2**,135-1441
- F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson (1977): DNA sequencing with chain terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467
- G. Sarkar und S. S. Sommer (1990): The "megaprimer" method of site-directed mutagenesis, *Bio-Techniques* **8**, 404-407
- A. Sättler und D. Riesner (1993): Temperature-gradient gel electrophoresis for analysis and screening of thermostable proteases, *Electrophoresis* 14, 782-788
- H. Schaal, P. Pfeiffer, M. Klein, P. Gehrmann, A. Scheid (1993): Use of DNA end joining activity of a *Xenopus laevis* egg extract for construction of deletions and expression vectors for HIV-1 tat and rev proteins, *Gene* **124**, 275-280
- J. Schell, M. Wulfert, D. Riesner (1999): Detection of point mutations by capillary electrophoresis with temporal temperature gradients, *Electrophoresis* **20**, 2864-2869
- A. R. W. Schröder, T. Baumstark, D. Riesner (1998): Chemical mapping of co-existing RNA structures, *Nucl. Acids Res.* **26** (14), 3449-3450
- J. Schumacher, N. Meyer, D. Riesner, H. L. Weidemann (1986): Diagnostic procedure for detection of viroids and viruses with circular RNAs by "Return"-gel electrophoresis, *J. Phytopathology*, **115**, 332-343
- Yun-bo Shi, H. P. Spielmann, J. E. Hearst (1988): Base catalyzed reversal of a psoralen-DNA crosslink, *Biochemistry* 27, 5174-5178
- J. M. Short, J. M. Fernandez, J. A. Worge, W. D. Huse (1988): λ ZAP: A bacteriophage λ expression vector with *in vivo* excision properties, *Nucl. Acids Res.* 16 (14), 7580-7600
- S. Siguroardottir, A. Helgason, J. R. Gulcher, K. Stefansson, P. Donnelly (2000): The mutation rate in the human mtDNA control region, *Am. J. Hum. Genet.* **66**, 1599-1609
- J. Silver, T. Limjoco, S. Feinstone: Site-specific mutagenesis using the polymerase chain reaction, 179-188 in: M. A. Innis (Hrsg.): PCR Strategies, *Acad. Press*, San Diego, 1995
- P. Simmonds, Neurotropism of HIV Type 1?, AIDS research and human retroviruses, 12, 469-471
- R. F. Speck, K. Wehrly, E. J. Platt, R. E. Atchinson, I. G. Charo, D. Kabat, B. Chesebro, M. A. Goldsmith (1997): Selective employment of chemokine receptors as human immunodeficiency virus type 1 coreceptors determined by individual amino acids within the envelope V3 loop, *J. Virol.* **71**, 7136-7139
- B. Stankoff, V. Calvez, S. Suarez, P. Bossi, O. Rosenblum, L. Conquy, E. Turell, T. Dubard, A. Coutellier, L. Baril, F. Bricaire, L. Lacomblez, C. Lubetzki (1999): Plasma and cerebrospinal fluid human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) RNA levels in HIV-related cognitive impairment, *Eur. J. Neurol.*, 6, 669-675
- B. R. Starcich, B. H. Hahn, G. M. Shaw, P. D. McNeely, S. Modrow, H. Wolf, E. S. Parks, W. P. Parks, S. F. Josephs, R. C. Gallo, F. Wong-Staal (1986): Identifikation and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS, *Cell* 45, 637-648

- G. Steger (1994): Thermal denaturation of double-stranded nucleic acids: Prediction of temperatures critical for gradient gel electrophoresis and polymerase chain reaction, *Nucl. Acids Res.* **22**, 2760-2768
- K. Stingele, J. Haas, T. Zimmermann, R. Stingele, C. Muller-Hubsch, M. Freitag, B. Storch-Hagenlocher, M. Hartmann, B. Wildemann: Independent HIV replication in paired CSF and blood viral isolates during antiretroviral therapy, *Neurology*, 56, 335-361
- K. Strebel, D. Daugherty, K. Clouse, D. Cohen, T. Folks, M. A. Martin (1987): The HIV 'A' (*sor*) gene product is essential for virus infectivity, *Nature* **328**, 728-730
- K. Sugano, N. Fukayama, H. Ohkura, Y. Shimosato, Y. Yamada, T. Inoue, T, Sekiya, K. Hayashi (1995): Single-strand conformation polymorphism analysis by perpendicular temperature-gradient gel electrophoresis, *Electrophoresis* **16**, 8-10
- P. F. Szurek, E. Floyd, P. H. Yuen, P. K. Y. Wong (1990): Site-directed mutagenesis of the codon for Ile-25 in gPr80^{env} alters the neurovirulence of *ts* 1, a mutant of Moloney Murine Leukemia Virus TB, J. Virol. 64, 5241-5249
- G. Tambussi, A. Gori, B: Capiluppi, C. Balotta, L. Papagno, B. Morandini, M. Di Pietro, D. Ciuffreda, A. Saracco, A. Lazzarin (2000): Neurological symptoms during primary human immunodeficiency virus (HIV) infection correlate with high levels of HIV RNA in cerebrospinal fluid, *Clinical Infectious Diseases*, **30**, 962-965
- Y. W. Tang, J. T. J. Huong, R. M. Lloyd, P. Spearman, D. W. Haas: Comparison of human immunodeficiency virus type 1 RNA sequence heterogeneity in cerebrospinal fluid and plasma, *Journal of clinical microbiology*, 38, 4637 - 4639
- D. R. Thatcher und B. Hodson: Denaturation of proteins and nucleic acids by thermal-gradient electrophoresis, *Biochem. J.* 197, 105-109
- The Genome International Sequencing Consortium (2001): Initial sequencing and analysis of the human genome, *Nature*, **409**, 860-921
- J. C. Venter et al. (2001): The sequence of the human genome, Science, 291, 1304-1351
- G. Venturi, M. Catucci, L. Romano, P. Corsi, F. Leoncini, P. E. Valensin, M. Zazzi: Antiretroviral resistance mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and protease from paired cerebrospinal fluid and plasma samples, *J. Infect. Dis.*, **181**, 740-745
- S. Wain-Hobson (1995): Virological mayhem, Nature, 373, 102
- R. M. Wartell, S. H. Hosseini, C. P. Moran jr. (1990): Detecting base pair substitutions in DNA fragments by temperature-gradient gel electrophoresis, *Nucl. Acids Res.* **18**, 2699-2705
- A. B. van't Wout, L. J. Ran, C. L Kuiken, N. A. Kootstra, S. T. Pals, H. Schuitemaker (1997): Analysis of the temporal relationship between Human Immunodeficiency Virus Type 1 quasispecies in sequential blood samples and various organs obtained at autopsy, *J. Virol.*, **72**, 488-496
- D. C. Wallace (1994): Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **91**, 8739-8746
- J. D. Watson und F. H. C. Crick (1953): Genetical implications of the structure of Deoxyribonucleic Acid, *Nature* **171**, 964-967
- X. Wei, S. K. Ghosh, M. E. Taylor, V. A. Johnson, W. A. Emini, P. Deutsch, J. D. Lifson, S. Bonhoeffer, M. A. Nowak, B. H. Hahn, M. S. Saag, G. M Shaw (1995): Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection, *Nature* 373, 117-122

- U. Wiese, M. Wulfert, S. B. Prusiner, D. Riesner (1995): Scanning for mutations in the human prion protein open reading frame by temporal temperature gradient gel electrophoresis, *Electrophoresis* 16, 1851-1860
- U. Wiese (1996): Untersuchungen zur Sequenzvariabilität der Messenger-Ribonukleinsäure von Prion-Proteinen, *Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf*
- R. L. Willey, R. A. Rutledge, S. Dias, T. Folks, T. Theodore, C. E. Buckler, M. A. Martin (1986): Identification of conserved and divergent domains within the envelope gene of the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 5083-5042
- Y. Wu, V. M. Hayes, J. Osinga, I. M. Mulder, M. W. G. Looman, S. H. C. M. Buys, R. M. W. Hofstra (1998): Improvement of fragment and primer selection for mutation detection by denaturing gradient gel electrophoresis, *Nucl. Acids Res.*, 26, 5432-5440
- M. Wulfert (1992): Aufbau und Anwendung eines mit Elektroheizung eingestellten Temperaturgradienten für die Gelelektrophorese, *Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf*
- A. T. Yeung, W. J. Dinehart, B. K. Jones (1988): Alkali reversal of psoralen cross-link for the targeted delivery of psoralen monoadduct lesion, *Biochemistry* 27, 6332-6338
- L.-J. Zhao, Q. X. Zhang, R. Padmanabhan (1993): Polymerase Chain Reaction-based point mutagenesis protocol, *Methods Enzymol.* 217, 218-227
- D. Zuh, P. Keohavong, S. D. Finkelstein, P. Swalsky, A. Bakker, J. Weissfeld, S. Srivastava, T. L. Whiteside (1997): K-ras mutaions in normal colorectal tissues from K-ras mutation-positive colorectal cancer patients, J. Cancer Res. 57, 2485-2492

Wichtige Abkürzungen:

ADC	AIDS-assoziierter Demenzkomplex (AIDS associated dementia complex)
AIDS	Erworbenes Immunschwäche-Syndrom (acquired immunodeficiency syndrome)
bp	Basenpaare
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
TGGE	Temperaturgradienten-Gelelektrophorese
T _m	mittlere Temperatur eines Temperaturüberganges
tTGGE	zeitliche Temperaturgradienten-Gelelektrophorese
ZNS	Zentralnervensystem