

3. Patientenproben, Material und Methoden

3.1 Patientenkollektiv

In dieser Dissertation wurden Proben von 287 Kindern mit Erstrezidiv einer ALL untersucht, die entsprechend der Therapieoptimierungsstudien von 1985-1999 der Berlin-Frankfurt-Münster ALL-Rezidiv-Studiengruppe (ALL-REZ-BFM, Charité, Berlin) behandelt wurden. Neunundsiebzig Proben von gesunden Personen (gesunde Blut- und Knochenmarkspender, Kinder mit akuten Atemwegsinfektionen) und 75 Kinder mit ALL-Ersterkrankung, die ebenfalls nach der Berlin-Frankfurt-Münster Studie für Ersterkrankungen behandelt wurden (ALL-BFM Studie ², diagnostiziert 1997-2000), dienten als Kontrollgruppen.

Die Studien ALL-BFM und die ALL-REZ-BFM wurden jeweils durch das Votum der Ethikkommissionen der Medizinischen Hochschule Hannover, Hannover, und der Charité Universitätsmedizin, Berlin, anerkannt.

Alle Kinder waren jünger als 18 Jahre. Schriftliche Einverständniserklärungen aller Kinder und ihrer gesetzlichen Vertreter lagen vor. Die Patientenproben wurden zum Zeitpunkt der Diagnosestellung der ALL-Ersterkrankung und des ALL-Rezidivs gewonnen.

Tab.3: Zusammensetzung des untersuchten ALL-Patientenkollektivs, aufgeteilt nach Immunphänotyp und Erst- bzw. Rezidivmanifestation der Erkrankung, sowie der gesunden Kontrollen

	Rezidivpatienten	Ersterkrkg.	Gesunde
B-Vorläuferzell-ALL ¹⁾	199	49	
T-Zell-ALL ²⁾	43	13	
andere ³⁾	45	13	
Summe	287	75	79

1) prä-prä-B-ALL, prä-B-ALL, common-ALL

2) prä-T-ALL, T-ALL

3) ALL, AHL, bzw. alle ohne spezifische Immunphänotypisierung

3.2 Materialien

3.2.1 Chemikalien

FMC BioProducts, Rockland, ME, USA

MDE, Gel Solution

NuSieve GTG Agarose

SeaKem GTG Agarose

Gibco BRL Life Technologies, Paisley, Schottland

Acrylamid

MgCl₂

Sigma, Deisenhofen, Germany

BSA

3.2.2 Nukleinsäuren

Boehringer Mannheim GmbH, Heidelberg:

Deoxynucleoside Triphosphate Set

BRL Life Technologies, Inc., Gaithersburg, USA:

1 kB DNA Ladder

X174 RF DNA/Hae III Fragments

TIB Molbiol, Berlin:

Oligonukleotide (Primer und Sonden)

3.2.3 Enzyme

Perkin Elmer, Branchburg, NJ, USA

AmpliTaq® DNA-Polymerase

Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Germany

Platinum Taq DNA-Polymerase

New England BioLabs Inc., USA

MspI, BstNI, HinfI

3.2.4 Filme

Polaroid Co., Cambridge, Mass, USA:

Land Pack Filme Typ 667 (36DIN)

3.2.5 Quiagensäule zur Isolierung von DNA

Quiagen Inc., Chatsworth, CA, USA

QIAquick, DNA Purification System

3.2.6 Kit zur Reinigung der PCR-Produkte

QIAquick, PCR Purification Kit

3.2.7 Puffer und Lösungen

Tris-Puffer:

1M Tris/HCl, pH 7,5

3.2.7.1 Lösungen zur Isolierung von DNA

Erythrozytenlysepuffer: 155 mM NH₄Cl

10 mM KHCO₃

10x TEN-Puffer: 200 mM Tris, pH 7,5

25 mM EDTA

300 mM NaCl

Proteinase K: 20 mg/ml

Phenol: 1 kg kristallines Phenol wird mit ca. 100 ml Aqua dest. bei 37°C gelöst, zur Einstellung des pH mit 0,1 M TrisCl (pH 7,8) ausgeschüttelt und mit Hydroxychinolin (1:1000, v/v) versetzt.

Chloroform/Isoamylalkohol: 24:1 (v/v)

3.2.7.2 Lösungen für die Elektrophorese

Elektrophorese-Puffer:

1x TBE, pH 8,0

90 mM Tris

90 mM Borsäure

2,5 mM EDTA

1x TAE, pH 8,0

24,2 g Tris Base (TRIZMA® Base 99,9%)

5,71 ml Eisessig (100%)

10 ml 0,5M EDTA

Aqua dest. ad 5000 ml

1x Gelladepuffer (OrangeG):

20% Ficoll

10mM Tris (pH 7,5)

1 mg/ml OrangeG

3.2.7.3 Puffer für die PCR

Perkin Elmer, Branchburg, NJ, USA

Gene Amp® 10x PCR-Buffer

USB, Cleveland, Ohio, USA

10x PCR-Reaction Buffer

Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Germany

10x PCR Buffer

3.2.8 Geräte

Roche Diagnostics, Mannheim, Germany

LightCycler TM

Eppendorf GmbH, Hamburg

Centrifuge 5415 C

MJ Research Inc., Watertown, MA, USA

Peltier Thermal Cycler, Model PTC-200

Polaroid Co., Cambridge, Mass., USA

CU-5 Nahaufnahme-Kamera

Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA

Wide Mini Sub Cell (Agarosegelelektrophoresekammer)

Perkin Elmer Life Sciences, Foster City, CA, USA

Sequencer ABI Prism 377

3.3 Methodik

3.3.1 Molekularbiologische Arbeitstechniken

3.3.1.1 DNA-Isolierung

Die Isolierung mononukleärer Zellen aus den Knochenmark-Proben von Kindern mit ALL erfolgt durch Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation (Boyum 1968, 1976). Entsprechend der Zellzahl im nativen Knochenmark/Blut wird dieses mit RPMI verdünnt (meist 1:3; teilbar durch 5), je 5 ml mit 4 ml Ficoll unter- oder überschichtet und dann zentrifugiert bei 2000 U/min., 18 min. (ohne Bremse). Anschließend werden die mononukleären Zellen vorsichtig abgenommen, mit 10 ml RPMI aufgefüllt und 10 min. bei 1500 U/min zentrifugiert; der Überstand wird abgekippt und das Zellpellet aufgewirbelt. Dieser Schritt wird zweimal wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift werden die Zellen nur aufgenommen, in 1 ml gelöst und anschließend gezählt. Die Zellen werden in fetalem Kälberserum mit DMSO (1:10) bei -80°C eingefroren und später in Flüssigstickstoff umgelagert. Etwa 1×10^7 Zellen, aus denen DNA isoliert werden soll, werden sofort nach der Separation mit Lysepuffer versetzt.

Die Aufarbeitung der DNA vor 1993 erfolgte nach der konventionellen Phenol-Chloroform-Extraktion (Sambrook et al. 1989). Zur selektiven Lyse der Erythrozyten werden 3-5 ml Knochenmark mit dem 3-fachen Volumen Erythrozytenlysepuffer gemischt. Nach vollständiger Erythrozytenlyse werden die Leukozyten 30 Minuten bei $g = 265$ zentrifugiert (1200 rpm). Das sedimentierte Leukozytenpellet wird in 10 ml TEN-Puffer resuspendiert und die Probe nach Zugabe von Proteinase K (Endkonzentration: $10 \mu\text{g/ml}$) und 1/10 Vol 20% SDS bei 37°C für ca. 12 Stunden auf dem Roller-Mixer inkubiert. Dabei lösen sich die Kern- und Zellmembranen der Leukozyten auf und die DNA wird freigesetzt. Die Reinigung der DNA von den Zellproteinen erfolgt durch Extraktionen mit Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol; hierzu wird die Probe mit 1/2 Vol Phenol und 1/2 Vol Chloroform/Isoamylalkohol versetzt und 10 Minuten gemischt, dann 15 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß dekantiert. Diese Prozedur wird wiederholt, bis die Interphase frei von Proteinen ist. Reste von Phenol in der Probe werden durch Extraktion mit 1/2 Vol Chloroform/Isoamylalkohol entfernt. Die DNA wird in 3 Vol absolutem Ethanol und 1/10 Vol 2M Natriumacetat präzipitiert und in 70%igem Ethanol gewaschen. Die gewonnene DNA wird je nach Menge in 300-2000 μl Tris-Puffer gelöst.

Diese Methode wurde von der DNA-Isolation mit einem Säulensystem von Qiagen (QIAamp, Blood Kit Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA) nach der Beschreibung des Herstellers abgelöst. Im April 1999 schließlich wurde eine weitere DNA-Extraktionsmethode etabliert (Puregene™ DNA-Isolierungskit Biozym Diagnostic GmbH, Oldendorf), die auch bei geringeren Zellzahlen (8×10^5 - 5×10^6) die geforderte Ausbeute bringt. Diese Methode beruht auf einer modifizierten Salzpräzipitation. Sie wurde nach der Beschreibung des Herstellers durchgeführt. Ein wichtiger Optimierungsschritt im Aufarbeitungsprozess besteht darin, dass die Zellen sofort in Lysepuffer überführt werden.

Die Ausbeute und Güte (Reinheit) der DNA wurde sowohl durch Bestimmung der optischen Dichte mit einem Photometer (Eppendorf Biophotometer, Hamburg) bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorptionsmaximum von DNA) und 280 nm (Verunreinigung durch Proteine und aromatische Substanzen), als auch durch elektrophoretisches Auftrennen eines Aliquots der DNA auf einem 1%igen Agarosegel beurteilt.

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt: Verdünnungsfaktor (in der Regel 1:40) x 50 µg/ml [1 OD (Optische Dichte) von ds (doppelsträngiger) DNA = 50 µg/ml H₂O] x OD der gemessenen Probe (Einheit: µg/ml).

3.3.1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ermöglicht es, eine spezifische DNA-Sequenz aus einem DNA-Gemisch in wenigen Stunden millionenfach zu vermehren, indem der Prozess der *in vivo* DNA-Replikation nachgeahmt wird^{97, 98}.

Zur Amplifikation von DNA in der Polymerasekettenreaktion bedarf es folgender Komponenten: einsträngige DNA, Primer (Oligonukleotide mit 20 - 25 Basen, die komplementär zu den Enden der definierten DNA-Sequenz sind, die amplifiziert werden soll), dNTPs (Desoxyribonukleotidtriphosphate als Bausteine der zu synthetisierenden DNA) und einer DNA-Polymerase. Das Prinzip der Polymerasekettenreaktion ist eine vielfache Hintereinanderreihung dreier Reaktionen, die sich nur in ihrer Inkubationstemperatur unterscheiden:

- 1 Im ersten Schritt wird die DNA denaturiert, d.h. durch Erwärmen auf 92 - 94°C werden die Wasserstoffbrücken zwischen den Nukleotiden der doppelsträngigen DNA aufgebrochen,

so dass Einzelstränge vorliegen. Die Einzelstränge können sich beim Abkühlen mit jeder Einzelstrang-DNA zusammenlagern, die eine komplementäre Nukleotidsequenz aufweist.

- 2 Der zweite Schritt läuft bei gesenkter Temperatur ab, hierbei lagern sich die zugegebenen Oligonukleotide (Primer) an die komplementären DNA-Sequenzen an. Die zwischen den Primern liegende DNA-Sequenz wird amplifiziert, wobei der eine Primer am kodierenden (*sense*), der andere am nicht-kodierenden (*anti-sense*) Strang ansetzt.
- 3 Der dritte und letzte Schritt im Zyklus der PCR ist die Synthese eines komplementären DNA-Stranges durch die DNA-Polymerase. Das Enzym synthetisiert vom 3'-Ende der angelagerten Primer ausgehend einen zur Ursprungs-DNA komplementären DNA-Strang.

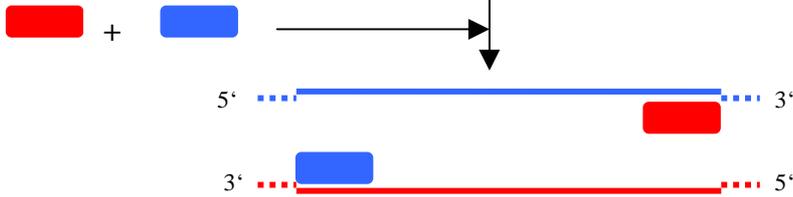
In jedem weiteren Zyklus dienen die an der Ursprungs-DNA synthetisierten DNA-Stränge wiederum als Matrize zur weiteren Amplifikation von DNA durch die Polymerase. So kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung des zwischen den Primern gelegenen DNA-Abschnittes. Durch die Verwendung der hitzestabilen Polymerase aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* ist die Automatisierung der Temperaturzyklen möglich, da nicht bei jeder Hitzedenaturierung der DNA das Enzym zerstört wird und anschließend neu hinzugefügt werden muss.

PCR-Schema

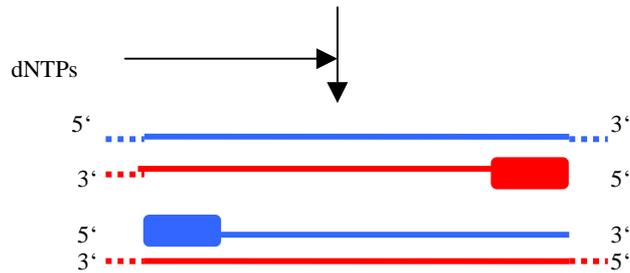
1) Original doppelsträngige DNA



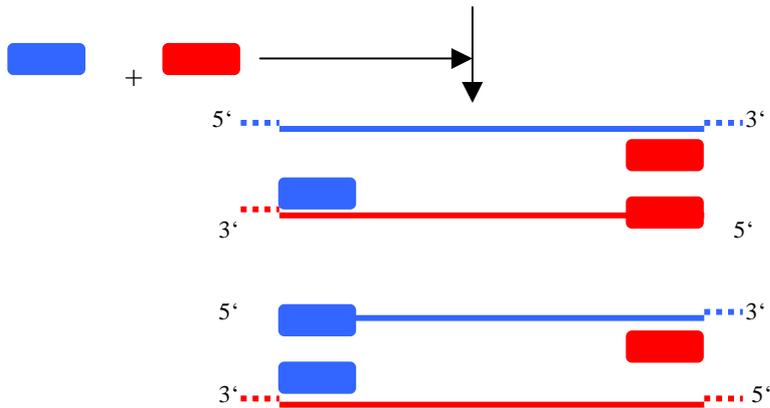
2) Denaturierung der DNA, Kühlung und Anlagerung der Primer



3) Verlängerung der DNA durch DNA-Polymerase



4) erneute Denaturierung durch Hitze, Kühlen und Anlagerung weiterer Primer



5) Verlängerung der Primer durch DNA-Polymerase

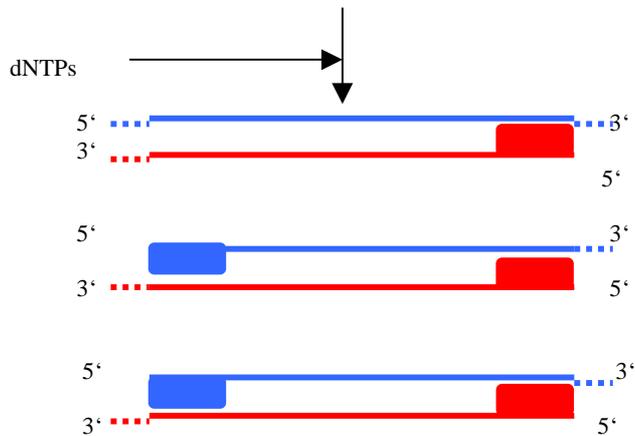
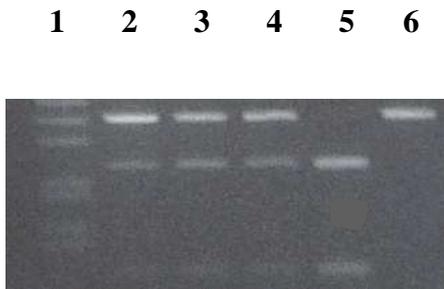


Abb.4: Schematische Darstellung der DNA-Amplifikation in der Polymerasekettenreaktion

3.3.1.3 Agarosegelelektrophorese

Die Produkte aus der konventionellen PCR wurden entweder direkt oder nach dem Verdau mit Restriktionsenzymen mit 1/3 Volumen eines Gelladepuffers (Organe G) versetzt und in die Taschen eines Agarosegels einpipettiert. Parallel dazu wird ein DNA-Längenstandard aufgetragen (1 kb DNA *ladder*), der die Größenordnung der im Gel aufgetrennten DNA-Fragmente erlaubt.

Bei der Agarosegelelektrophorese wandern DNA-Moleküle entsprechend ihrer Größe und Ladung in einem konstanten elektrischen Feld. Die Auftrennung erfolgt in einem 3- oder 4%igen mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel bei 50-80 Volt über einen Zeitraum von ca. 60 Minuten. Anschließend werden die im Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmente auf dem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und die Ergebnisse durch eine Polaroidkamera dokumentiert.



*Abb.5: Agarosegelelektrophorese mit unterschiedlichen DNA-Fragmenten und DNA-Längenstandard in Bande 1 von Amplifikaten der PCR Cyp 2D6*4 (354 bp); Verdau durch Restriktionsenzym MspI (Spaltung der Wildtyp-DNA in zwei DNA-Stücke mit 107 bp und 247 bp, kein Verdau bei mutierter DNA).*

(Bande 1: DNA-Längenmarker, Bande 2-4: heterozygote DNA, Bande 5: Wildtyp-DNA, Bande 6: homozygot mutierte DNA)

3.3.1.4 Echtzeit-PCR am LightCycler

Das Prinzip der PCR wird auch im LightCycler angewandt, allerdings sind die einzelnen Schritte der Reaktion verkürzt und werden mit Hilfe von Fluoreszenz-Farbstoffen visualisiert und digital erfasst.

Die einzelnen Temperaturschritte im LightCycler werden durch Luftherhitzung und Abkühlung erreicht und zwar mit einer Präzision von $0,3^{\circ}\text{C}$ und ultraschnell in Schritten von bis zu 20°C pro Sekunde. Die Reaktionsgefäße sind spezielle Borosilikatglas-Kapillaren, die ein ideales Oberfläche-Volumen-Verhältnis darstellen, so dass ein einziger Temperaturzyklus innerhalb von 30 Sekunden abgeschlossen ist. Außerdem ist Borosilikatglas geeignet als Kuvette für Fluoreszenzmessungen, die von der Spitze der Kapillare durch die optische Einheit des LightCycler detektiert werden.

Die optische Einheit des LightCycler hat drei Kanäle, die emittiertes Licht in drei verschiedenen Wellenlängen messen (530 nm, 640 nm und 710 nm) und eine Licht aussendende Diode (LED) als Lichtquelle.

Das hier verwendete Verfahren, das DNA-Detektion, Quantifizierung und maximale Produktidentifizierung erlaubt, beruht auf der Verwendung von sequenzspezifischen Oligonukleotiden, die mit verschiedenen fluoreszierenden Farbstoffen markiert sind. Diese *hybridization probes*, d.h. Hybridisierungs sonden, müssen in unmittelbarer Nachbarschaft an die Zielsequenz des amplifizierten DNA-Fragments passen, so dass ihre farbstoffmarkierten Enden nah zusammen liegen. Die erste mit Fluoreszein am 3'-Ende markierte Hybridisierungs sonde wird von der blauen Lichtquelle angeregt und emittiert grüne Fluoreszenz, welche den Farbstoff LightCycler-Red 640 (LC Red 640) am 5'-Ende der nebenliegenden Hybridisierungs sonde ebenfalls anregt und rote Fluoreszenz einer Wellenlänge von 640 nm aussendet. Dieser Energietransfer zwischen den Hybridisierungs sonden wird *fluorescence resonance energy transfer* (FRET) genannt und funktioniert nur sicher, wenn zwischen den beiden Oligonukleotide der Abstand kleiner als 5 Nukleotide ist.

Die Intensität der emittierten Fluoreszenz wird in der optischen Einheit des LightCycler am Ende jedes *annealing*-Schrittes gemessen und ist ein direktes Maß für die Menge an amplifizierter DNA. Während des nun folgenden Elongationsvorgangs werden die Hybridisierungs sonden abgespalten und können nicht an die Doppelstrang-DNA binden.

Die Messung des emittierten Lichtsignals beträgt für jede Kapillare etwa 20 Millisekunden und ist für 32 Kapillaren möglich. Die gewonnen Daten erscheinen sofort auf dem

Computerbildschirm und erlauben ein Echtzeit-*online*-Monitoring der PCR. Außerdem werden alle Daten automatisch gespeichert und stehen für die nachfolgende Bearbeitung mit der LightCycler Software zur Verfügung.

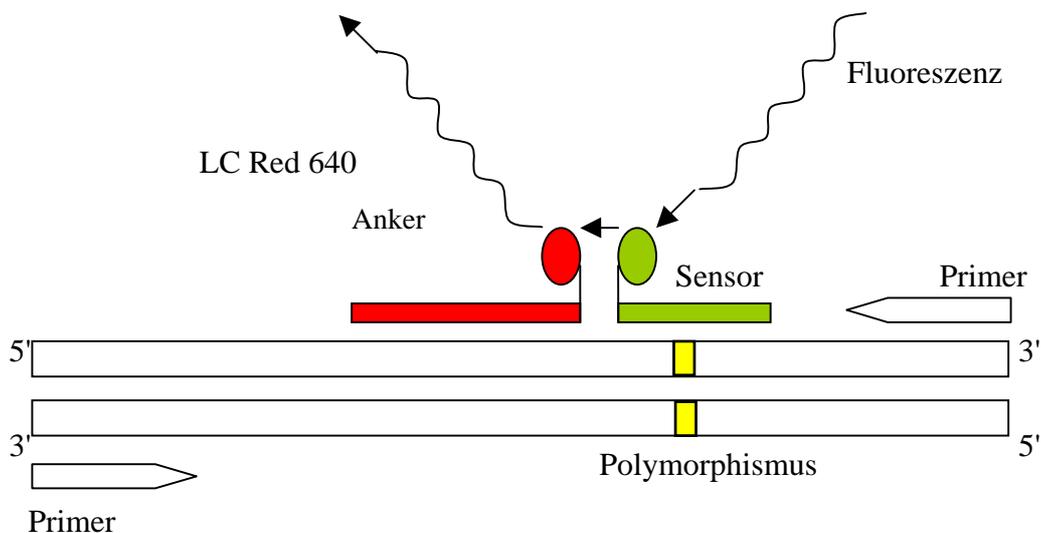


Abb.6: Schema des Energietransfers zwischen den Hybridisierungssonden, fluorescence resonance energy transfer (FRET).

3.3.1.5 Schmelzkurvenanalyse am LightCycler

In einem an die PCR anschließenden Schritt erfolgt im LightCycler die Identifizierung der Amplikons durch die Schmelzkurvenanalyse. Jede DNA-Sequenz hat eine spezifische Schmelztemperatur T_m , die den Zeitpunkt bezeichnet, an dem je 50% der DNA einsträngig bzw. doppelsträngig vorliegen. Entscheidend für den individuellen Schmelzpunkt sind Länge der DNA und der Gehalt an Guanin- und Cytosin-Basen und kann daher die Identifizierung eines Fragments per Restriktionslängenunterschied in der Gelelektrophorese ersetzen. Da der Schmelzpunkt aber auch noch vom Grad der Homologie zweier DNA-Stücke abhängig ist, eignet sich die Schmelzkurvenanalyse hervorragend dafür, Punktmutationen zu untersuchen.

Fluoreszierende Hybridisierungssonden, die homolog zur Ziel-DNA sind, schmelzen bei höheren Temperaturen ab, als solche, die durch Mutationen des DNA-Stranges in ihrer Bindungsstärke geschwächt werden.

Nach dem letzten PCR-Zyklus werden die Amplikons in den Kapillaren bei 95°C denaturiert, dann bei 55°C die Hybridisierungssonden angelagert und anschließend in Schritten von 0,2°C wieder auf 95°C erhitzt. Der nach der *annealing*-Phase auftretende FRET zwischen den Hybridisierungssonden wird dabei kontinuierlich gemessen und zeigt bei steigender Temperatur die Dissoziation der Oligonukleotide durch eine Abnahme des Fluoreszenzsignals an. Eine Mutation der Ziel-DNA destabilisiert die Hybridisierungssonden, so dass der Fluoreszenzabfall schon bei niedrigeren Temperaturen erfolgen wird (siehe Abb.7).

Die erste negative Ableitung der Fluoreszenzänderung über die Temperatur zeigt den individuellen Fluoreszenzabfall am Schmelzpunkt T_m der Ziel-DNA als *peak*, d.h. Spitze, in der Darstellung am Bildschirm. Enthält eine Kapillare sowohl mutierte, als auch Wildtyp-DNA, werden zwei *peaks* an exakt denselben Schmelztemperaturen der jeweiligen homozygoten Proben erscheinen.

So zeigt also die Schmelzkurvenanalyse nicht nur die Identität der PCR-Produkte, sondern kann auch zum Nachweis von Punktmutationen (*single-nucleotid-polymorphisms*, SNPs) eingesetzt werden (Beispiel von NQO1 464 in Abb.7).

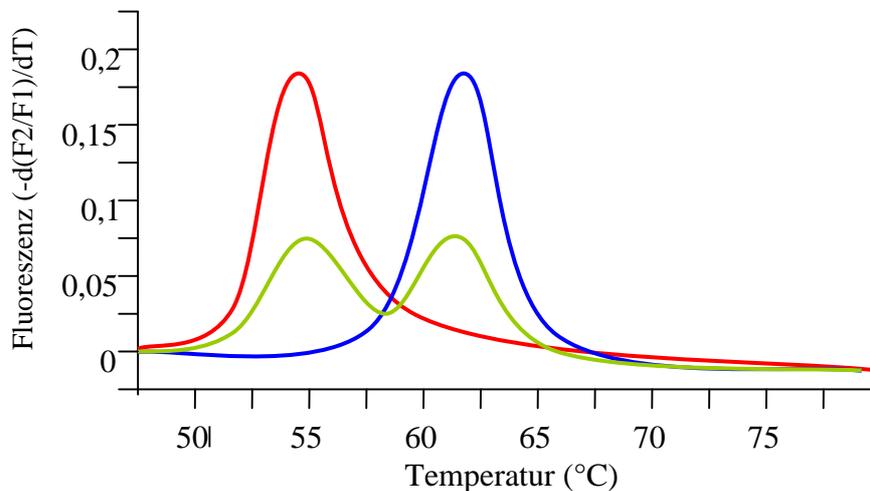


Abb.7: Schmelzkurvenanalyse zum Unterschied Homo-/Heterozygotie von NQO1 464; rote Kurve: homozygot mutierte DNA mit Fluoreszenzpeak bei niedriger Temperatur, blaue Kurve: Wildtyp-DNA mit Fluoreszenzpeak bei hoher Temperatur, grüne Kurve: heterozygot mutierte DNA mit Fluoreszenzpeaks sowohl bei hoher, als auch bei niedriger Temperatur.

3.3.2 Datenanalyse

Die statistische Analyse wurde mit der Windows-Software SPSS, Version 9.0 durchgeführt (SPSS Inc., Chicago, Il., USA). Es wurden der Pearson-Korrelationstest (Chi-Quadrat), der *non-parametric* Mann-Whitney-U-Test, sowie die Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier durchgeführt. Die Signifikanzschwelle wurde auf 0,05 festgelegt. Das ereignisfreie Intervall (*event-free survival*, EFS) wurde definiert als der Zeitraum zwischen Remissionsdatum und letztem Datum in vollständiger Remission bzw. dem Datum einer Komplikation. Für den Fall des Nicht-Ansprechens auf Therapie oder Tod in der Induktionsphase wurde das EFS auf 0 gesetzt. Das EFS wurde im Falle einer Knochenmarkstransplantation (*bone marrow transplant*, BMT) am entsprechenden Datum zensiert.

4. Durchführung

Im ersten Schritt wurden für alle Polymorphismen konventionelle PCR etabliert. Danach konnte für alle Polymorphismen außer Cyp 2D6*4 und Cyp 2D6*3 eine zuverlässige *real-time* PCR mit neuentwickelten Sonden, bzw. Primern am LightCycler etabliert werden. Zur Validierung der Ergebnisse wurde der Verdau mit Restriktionsenzymen, sowie die Sequenzierung ausgewählter DNA-Fragmente herangezogen.

4.1 Konventionelle PCR

Da für die konventionelle PCR schon in vorhergehenden Arbeiten Primer und Temperaturprofile entwickelt wurden⁴³, verwandten wir diese für die PCR von Cyp 3A4, NQO1 609 und Cyp 2D6*3 und konnten zuverlässige Ergebnisse reproduzieren. Zum Nachweis von NQO1 464 und Cyp 2D6*4 entwickelten wir nach dem in Abschnitt 3.3.1.2 dargestellten Konzept (*siehe Abschnitt 3.3.1.2*) neue Primer und optimierten, wie im Folgenden beschrieben, auch hier die Bedingungen zur Durchführung einer PCR.

4.1.1 Primerdesign

Die DNA-Sequenzen der verschiedenen Genabschnitte für die 5 Polymorphismen wurden aus der Datenbank der GenBank (National Laboratory, Los Alamos, USA) entnommen. Die Primersequenzen wurden anhand der Literatur³³ und der vorliegenden Gensequenzen bestimmt.

Die Primersequenzen wurden nach den folgenden Kriterien ausgewählt:

- Primerlänge 20 - 30 bp,
- 35 - 50% Guanin und Cytosin,
- möglichst ähnliche, berechnete optimale Anlagerungstemperatur (*annealing-temperatur*).

Die Bestimmung der optimalen *annealing-temperatur* (T_p) erfolgte nach Wallace anhand der Formel:

$$T_p = 2 \text{ °C} \times (A + T) + 4 \text{ °C} \times (C + G).$$

4.1.2 Optimierungsstrategien

Zu Beginn jeder Optimierung wurden bei einer mittleren berechneten Anlagerungstemperatur die günstigsten Konzentrationen von Primern, dNTPs und DNA im Reaktionsansatz durch systematische Variation eingestellt. Anschließend wurde die Anlagerungstemperatur schrittweise erhöht, um die Spezifität der Amplifikation zu steigern.

4.1.3 Nachweisbare Polymorphismen

Die Nukleotidsequenz der DNA-Abschnitte, die Anlagerungsstellen (*annealing site*) der Primer und die in der PCR amplifizierte DNA-Abschnitte in ihrer vollen Nukleotidsequenz sind im Anhang dargestellt (Anhang, Tafel 1).

4.1.4 Amplifikationsbedingungen

Jeder PCR-Versuchsansatz enthielt eine Positivkontrolle mit Buffy-coat-DNA (Wildtyp-DNA), sowie eine Negativkontrolle ohne DNA. Die Reihenfolge der Reagenzien in der Tabelle entspricht der eingehaltenen Reihenfolge des Pipettierens:

22,35 µl H₂O

3 µl Taq-Puffer

3 µl dNTP

0,5 µl Primer up (10 µM)

0,5 µl Primer down (10 µM)

0,15 µl AmpliTaq-Polymerase

0,5 µl DNA

Gesamtvolumen 30 µl

Temperaturprofil für die PCR von NQO1, Cyp 3A4, Cyp 2D6*4 und Cyp 2D6*3:

NQO1:

initiale Denaturierung: 94°C 5 Minuten
Annealing: 60°C 1 Minute
Elongation: 72°C 1 Minute
Denaturierung: 94°C 1 Minute
letzte Elongation: 72°C 7 Minuten

Die Amplifikation erfolgt in 35 Zyklen.

Cyp 3A4:

initiale Denaturierung: 94°C 5 Minuten
Annealing: 60°C 40 Sekunden
Elongation: 72°C 40 Sekunden
Denaturierung: 94°C 30 Sekunden
letzte Elongation: 72°C 7 Minuten

Die Amplifikation erfolgt in 25 Zyklen.

Cyp 2D6*4:

initiale Denaturierung: 94°C 5 Minuten
Annealing: 60°C 1 Minute
Elongation: 72°C 45 Sekunden
Denaturierung: 94°C 30 Sekunden
letzte Elongation: 72°C 7 Minuten

Die Amplifikation erfolgt in 35 Zyklen.

Cyp 2D6*3:

initiale Denaturierung: 94°C 5 Minuten
Annealing: 56°C 45 Sekunden
Elongation: 72°C 45 Sekunden
Denaturierung: 94°C 30 Sekunden
letzte Elongation: 72°C 7 Minuten

Die Amplifikation erfolgt in 35 Zyklen.

4.2 Restriktionsenzymverdau

Um die mutierten DNA-Fragmente von der Wildtyp-DNA zu trennen, wurde im Anschluss an die PCR ein Verdau mit Restriktionsenzymen durchgeführt. Diese Enzyme wurden so ausgewählt, dass ihre Erkennungssequenz (*recognition site*) an der Stelle der Mutation lag und so zu einer klaren Unterscheidung der mutierten und nicht-mutierten Amplifikate führte.

Zum Nachweis der Polymorphismen wurden folgende Restriktionsenzyme eingesetzt: MspI (Erkennungssequenz: C[^]CGG, ®New England BioLabs), BstNI (Erkennungssequenz: CC[^]AGG, ®New England BioLabs) und HinfI (Erkennungssequenz: G[^]ATTC, ®Boehringer Mannheim Biochemical).

Dadurch ergaben sich beim Verdau folgende Möglichkeiten, abhängig vom Vorliegen von Wildtyp (*wildtype*, wt)- oder mutierter (*variant*, vt) DNA:

-Cyp 2D6*4 (354 bp): MspI → wt: 107 bp + 247 bp
→ vt: 354 bp (kein Verdau)

-Cyp 2D6*3 (294 bp): BstNI → wt: 189 bp + 105 bp
→ vt: 22 bp + 167 bp + 105 bp

-NQO1 464 (210 bp): MspI → wt: 147 bp + 63 bp
→ vt: 210 bp (kein Verdau)

-NQO1 609 (298 bp): HinfI → wt: 215 bp + 83 bp
→ vt: 65 bp + 150 bp + 83 bp

Somit ergibt sich für jeden der Polymorphismen durch den Verdau eine eindeutige Unterscheidung in verschieden lange DNA-Fragmente, die mit Hilfe einer definierten DNA-Leiter in der Agarosegelelektrophorese zugeordnet werden können (siehe Abb. 6).

4.3 Sequenzierung

Da sich zum Nachweis des Polymorphismus im Cyp 3A4-Genlocus kein passendes Restriktionsenzym finden ließ, wurde die Überprüfung des Polymorphismus mit Hilfe der standardisierten DNA-Sequenzierung durchgeführt. Aufgrund der sehr zuverlässigen Ergebnisse aus der LightCycler-PCR zu Cyp 3A4 wurden einige Proben zur Überprüfung der PCR sequenziert. Der größte Teil der Untersuchung für Cyp 3A4 wurde nur am LightCycler durchgeführt werden. Ungenaue Befunde wurden ebenfalls per Sequenzierung kontrolliert. Hierzu erfolgte primär eine PCR zur Herstellung der Amplifikate mit folgendem Protokoll:

1µl DNA
2µl Sequencing Premix
0,5µl Primer (10 pmol/µl)
H₂O ad 10 µl

Temperaturprofil:

Denaturierung	96°C	1 Minute	
Annealing	56°C	20 Sekunden	
Elongation	60°C	4 Minuten	
Denaturierung	95°C	30 Sekunden	
letzte Elongation	60°C	4 Minuten	Die Amplifikation erfolgt in 28 Zyklen.

Das Produkt aus der PCR wird auf die Sephadexsäule geladen und 2 Minuten bei 2000 U/min. zur Abtrennung der DNA zentrifugiert. Anschließend werden die Proben für 30 Minuten bis zur vollständigen Trocknung lyophilisiert.

Sequenziergel:

21 g Harnstoff,
8,4 ml 30% Acrylamidlösung,
6,0 ml 10x TBE,
20 ml H₂O bidest.
350 µl 10% APPS und
15 µl TEMED

Das beladene Gel wird mit den üblichen Puffern im Sequenzierer anhand der Standardprogramme analysiert (Sequencer ABI Prism 377, Perkin Elmer Life Sciences, Foster City, CA, USA).

4.4 LightCycler-PCR

Die schon in Abschnitt 3.3.1.5 beschriebene Echtzeit-PCR am LightCycler ermöglicht nicht nur die Zusammenfassung und Beschleunigung der DNA-Amplifikation, sondern auch die anschließende Analyse hinsichtlich SNPs mit gleichzeitiger digitaler Erfassung der Ergebnisse.

4.4.1 Konzeption der LightCycler-PCR

Ziel war es, eine PCR für möglichst alle zu untersuchenden Mutationsorte auf dem LightCycler zu etablieren. Hierzu existierten zum Zeitpunkt der Untersuchung keine veröffentlichten Daten. Allerdings gehören die betreffenden Genloci zu den wichtigsten Polymorphismen Arzneimittel-verstoffwechselnder Enzymsysteme, so dass eine Ökonomisierung mit Hilfe des LightCycler sinnvoll erschien. Außerdem war die konventionelle PCR zur Verifizierung der Ergebnisse für alle fünf Genorte etabliert.

4.4.1.1 Primerdesign

Mit Hilfe der schon bekannten DNA-Sequenzen wurden für jeden Polymorphismus ein Primerpaar, sowie als Hybridisierungs sonden jeweils mindestens ein Anker (*anchor*) und ein Sensor (*sensor*) entwickelt, bzw. auf bereits vorhandene Primer zurückgegriffen. Der Anker ist am 3'-Ende mit Fluorescein (3FL) markiert, der Sensor terminal am 5'-Ende mit LC Red der Wellenlänge 640 nm. Die 3'-Hydroxyl-Gruppe des Sensors ist mit einer Phosphatgruppe gegen die nicht erwünschte Extension durch die Polymerase blockiert. Beide Sonden sind so gewählt, dass ein Abstand von bis zu 5 Basen entsteht (4 bis 25 Å Abstand), um einen optimalen FRET zu gewährleisten.

Für die Polymorphismus NQO1 609 existierte schon ein Assay, der einen Sensor für die mutierte Sequenz verwendet, weil der Wildtyp-Sensor schlecht zwischen C und T differenziert.

Die Mutation für Cyp 3A4 ließ eine relativ geringe Abweichung im Schmelzpunkt erwarten, so dass im Gegenstrang mittels Einbau von dInosin anstelle von Guanosin die Sensitivität für den Polymorphismus erhöht werden konnte.

Für alle Sondenpaare wurden auch die korrespondierenden Gegenstränge synthetisiert, um die Sonden überprüfen zu können.

4.4.1.2 Optimierungsstrategien

Zu Beginn jeder Optimierung wurden bei einer mittleren berechneten Anlagerungs-Temperatur die günstigsten Konzentrationen von Primern, dNTPs und DNA im Reaktionsansatz durch systematische Variation eingestellt. Anschließend wurde die Anlagerungs-Temperatur schrittweise erhöht, um eine spezifische Amplifikation der DNA-Sequenz zu sichern. Zunächst wurde jedes Primerpaar mit *buffy coat* (BC)-DNA erprobt, jeweils mit PCR und Schmelzkurvenanalyse. Mit Hilfe des Enzymverdau und der Gelelektrophorese wurden diese Ergebnisse validiert. Danach erfolgte eine Messreihe mit Zugabe der Anker- und Sensor-Sonden in unterschiedlicher Reihenfolge nacheinander und gleichzeitig, um unspezifische Amplifikate auszuschließen.

Für einige Sondenpaare wurden auch mutierte Sensoren von TIB MOLBIOL synthetisiert, die wir ebenfalls systematisch prüften. Allerdings ergab sich hieraus nur für NQO1 609 eine Verbesserung der Ergebnisse, so dass für Cyp 3A4 und NQO1 464 weiterhin die Wildtyp-Sonden verwendet wurden. Trotz ausführlicher Optimierungsversuche konnte jedoch für die Mutationen Cyp 2D6*3 und Cyp 2D6*4 keine verlässliche PCR und Schmelzkurvenanalyse gefunden werden. Einige DNA-Proben zeigten vermutlich aufgrund schlechter Qualität auch bei mehrfacher Wiederholung der Versuche kein Ergebnis. Diese Proben stammten vor allem von schon länger konservierter DNA und wurden nicht in die Auswertung miteinbezogen. Da die Untersuchung retrospektiv angelegt ist, konnten alternativ DNA-Proben besserer Qualität (meist jüngeren Datums) verwendet werden.

4.4.2 Nachweisbare Polymorphismen

Die folgenden Polymorphismen Arzneimittel-verstoffwechselnder Enzymsysteme konnten durch die neu etablierte PCR und Schmelzkurvenanalyse am LightCycler nachgewiesen werden:

Cyp 3A4, NQO1 464, NQO1 609.

Die Nukleotidsequenz der Genabschnitte, die genauen Ansatzstellen (*annealing sites*) der Primer, der Sonden und somit die in der PCR amplifizierten DNA-Abschnitte in ihrer vollen Nukleotidsequenz sind im Anhang dargestellt.

4.4.2.1 Differenzierung der einzelnen Polymorphismen am LightCycler

Die Unterscheidung zwischen mutierter und Wildtyp-DNA am LightCycler erfolgt über die Schmelzkurvenanalyse. Die erste negative Ableitung der Fluoreszenzänderung über die Temperatur zeigt den individuellen Fluoreszenzabfall am Schmelzpunkt T_m der Ziel-DNA als Peak, bei heterozygoten Proben als Doppelpeak (siehe Abb.8).

Für die untersuchten DNA-Abschnitte ergaben sich folgende Schmelztemperaturen mit einer Schwankung von $\pm 0,5^\circ\text{C}$:

Cyp 3A4: wt-DNA $66,5^\circ\text{C}$,
vt-DNA $60,5^\circ\text{C}$

NQO1 609: wt-DNA $61,8^\circ\text{C}$,
vt-DNA $66,5^\circ\text{C}$ (mutierte Sonde, deshalb höherer T_m)

NQO1 464: wt-DNA 67°C ,
vt-DNA $59,2^\circ\text{C}$.

Die Erklärung für den höheren Schmelzpunkt einer mutierten Sonde (bei NQO1 609) besteht darin, dass sie bei Vorliegen des Polymorphismus optimaler anlagert und deshalb auch erst bei einem höheren Schmelzpunkt freigesetzt wird.

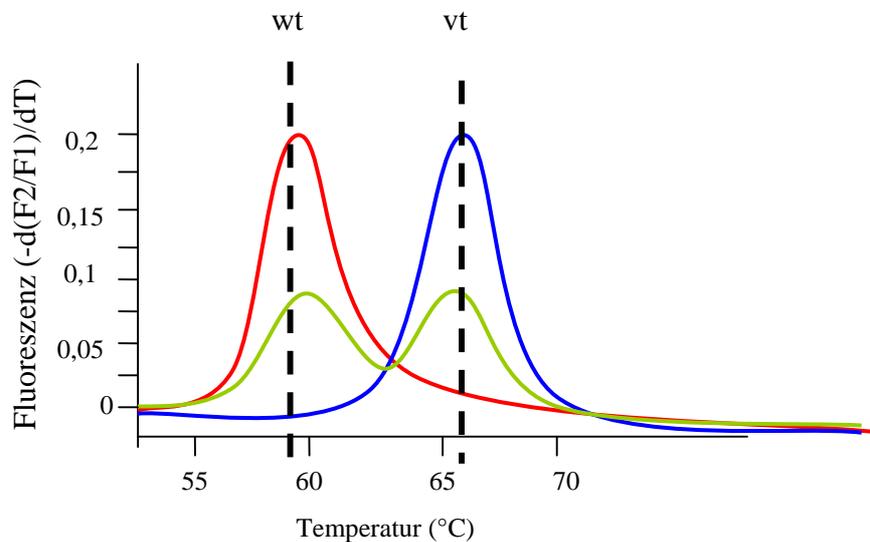


Abb.8: Schmelzkurvenanalyse für NQO1 464 mit peaks bei 59,2°C (wt) und 67°C (vt).

4.4.3 LightCycler-PCR: Amplifikationsbedingungen zum Nachweis der Polymorphismen

Die Versuchsreihen zur Optimierung führten zu den im Folgenden dargestellten optimalen Konzentrations- und Temperaturbedingungen. Jeder PCR-Ansatz enthielt eine Positivkontrolle mit wt-DNA, sowie eine Negativkontrolle ohne DNA. Die Reihenfolge der Reagenzien in der Tabelle entspricht der eingehaltenen Reihenfolge des Pipettierens. Das Endvolumen des LightCycler PCR-Ansatzes betrug 20 μ l.

12,7 μ l H₂O
 1,5 μ l MgCl₂
 2 μ l Puffer GIBCO
 2 μ l dNTP
 0,2 μ l Primer up (10 μ M)
 0,2 μ l Primer do (10 μ M)
 0,15 μ l ANCHOR-Sonde (10 μ M)
 0,15 μ l SENSOR-Sonde (10 μ M)
 0,1 μ l TaqPolymerase PLATINUM GIBCO
 0,5 μ l BSA (10 μ g/ μ l)

0,5 µl DNA

Gesamtvolumen 20 µl

Temperaturprofil für die LightCycler-PCR (Cyp 3A4, NQO1 464, NQO1 609):

Vordenaturierung: 95°C für 3 min.

Denaturierung: 94°C für 10 sec.

Annealing: 60°C für 15 sec.

Elongation: 72°C für 5 sec.

Die Amplifikation erfolgt in 35 Zyklen.

Schmelzkurvenanalyse:

Vordenaturierung: 95°C für 20sec.

Cooling mit Annealing der Hybridisierungssonden: 40°C für 30 sec.

Temperaturanstieg: 0,1°C/sec

Zieltemperatur: 95°C

Kühlung: 40°C für 30 sec