

## 4 Ergebnisse

### 4.1 DHPLC-Etablierung

Da das Schmelzverhalten der verschiedenen PCR-Produkte unterschiedlich ist, ist es erforderlich, die Analysebedingungen für jeden Abschnitt separat zu etablieren. Die Analyse gelingt am besten, wenn die DNA gerade zu denaturieren beginnt. Als optimal hat sich im Allgemeinen die Temperatur herausgestellt, bei der eine erste deutliche Linksverschiebung des DNA-Signals auftritt. Zur Etablierung wird daher zunächst die Analyse bei 50°C sowie bei 9 oder 10 anderen Temperaturen, die sich aus den Schmelzkurven ergeben, durchgeführt. Da das Schmelzverhalten auch innerhalb eines PCR-Produktes verschieden sein kann, ist es meistens erforderlich, mehrere Temperaturen zu wählen. Verwendet wird Wildtyp-DNA (hier von einem Labormitarbeiter) und, soweit vorhanden, DNA mit bekannten Mutationen. Abb. 19 und 20 veranschaulichen dieses Prinzip anhand von Abschnitt 5.

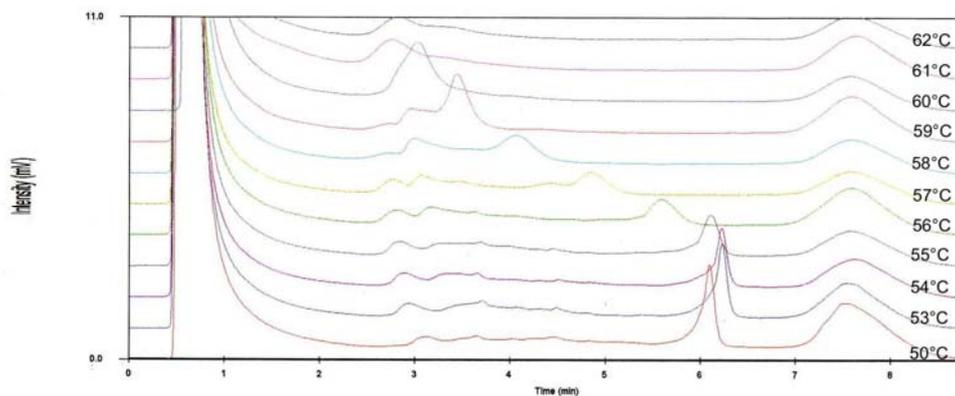


Abb. 19: DHPLC-Analyse von *DNA-Ligase IV*, Abschnitt 5. Wildtyp über 11 Temperaturen. Bei 56°C rückt das DNA-Signal deutlich nach links.

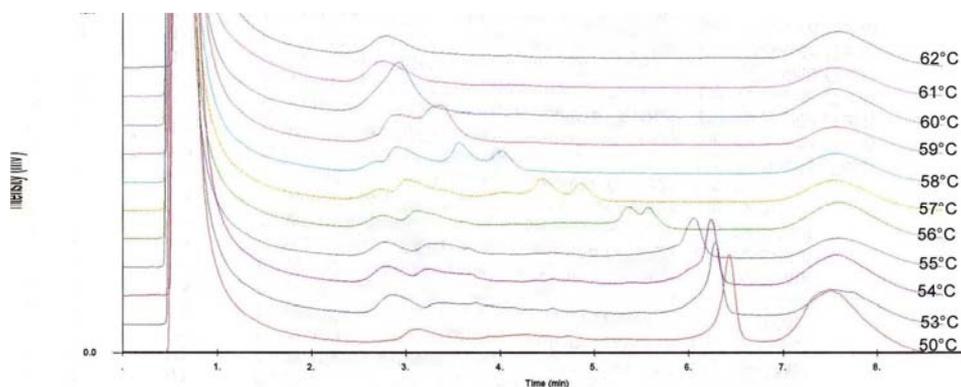


Abb. 20: DHPLC-Analyse von *DNA-Ligase IV*, Abschnitt 5. Mutationen über 11 Temperaturen. Bei 56°C ist die Mutation erstmals deutlich erkennbar.

In den folgenden Abbildungen wird das Schmelzprofil für alle 11 Abschnitte dargestellt. Die jeweils erste Kurve zeigt den Anteil doppelsträngiger DNA bei ansteigender Temperatur. Die anderen Kurven zeigen das Schmelzverhalten entlang des DNA-Fragments bei einzelnen Temperaturen:

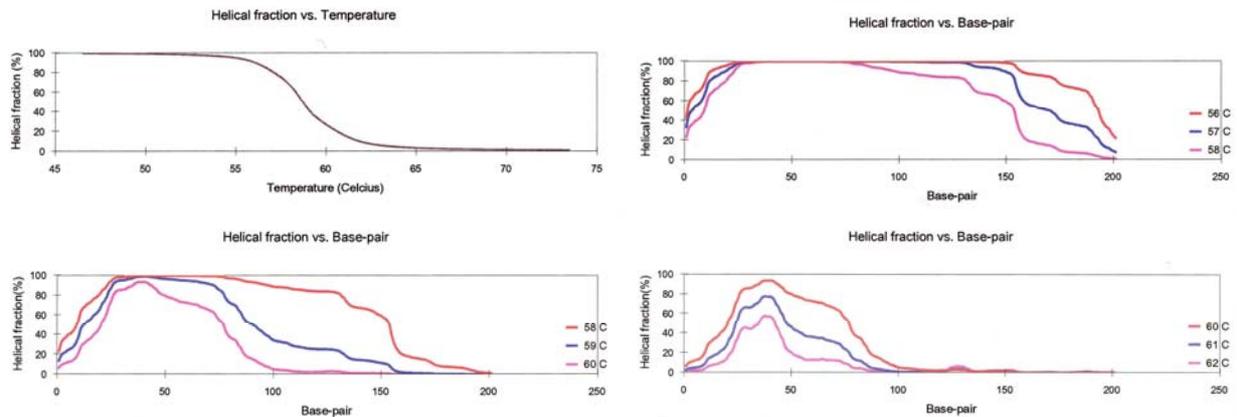


Abb. 21: DNA-Ligase IV, Abschnitt 1a, Schmelzverhalten der DNA bei verschiedenen Temperaturen

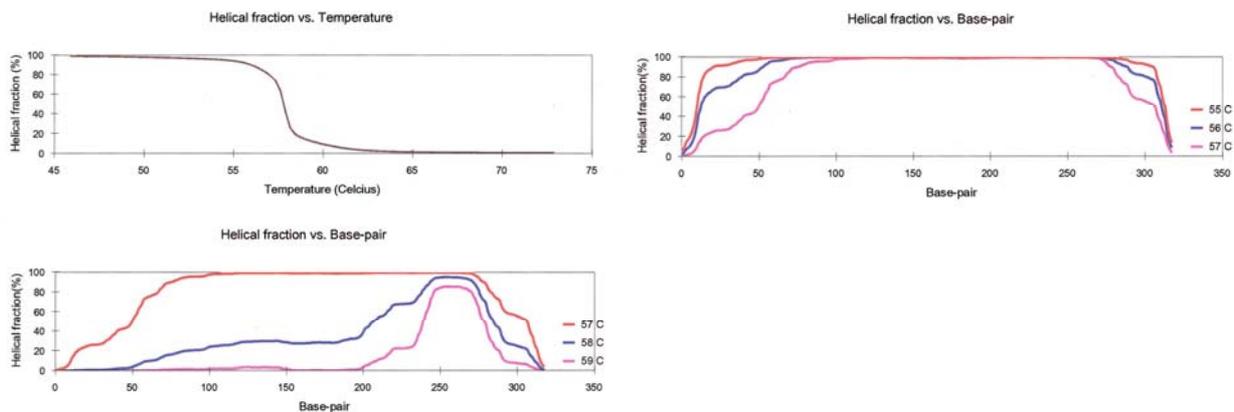


Abb. 22: DNA-Ligase IV, Abschnitt 1, Schmelzverhalten der DNA bei verschiedenen Temperaturen

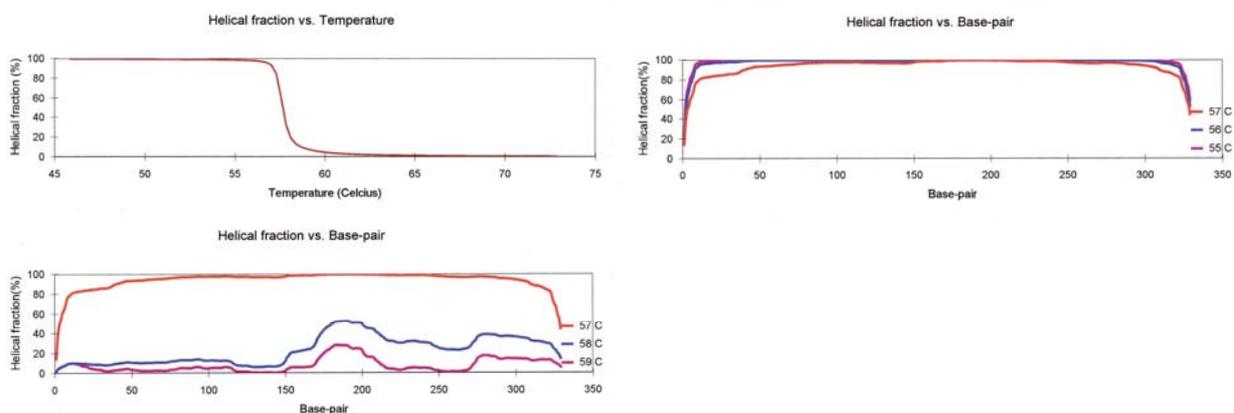


Abb. 23: DNA-Ligase IV, Abschnitt 2, Schmelzverhalten der DNA bei verschiedenen Temperaturen

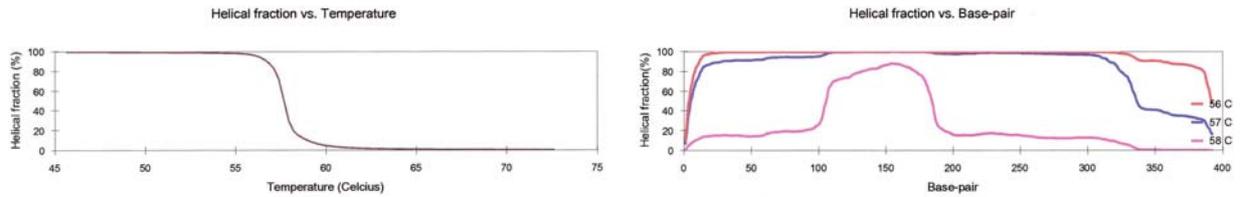


Abb. 24: DNA-Ligase IV, Abschnitt 3, Schmelzverhalten der DNA bei verschiedenen Temperaturen

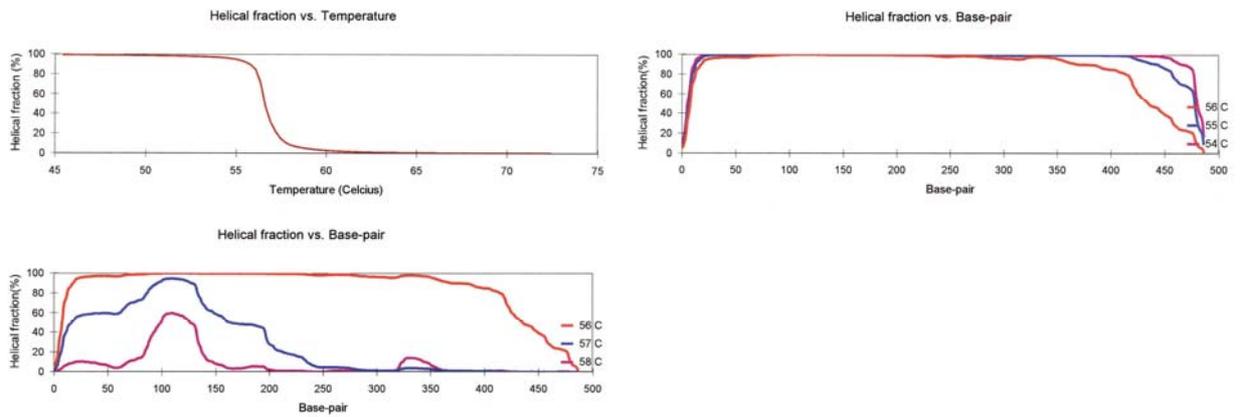


Abb. 25: DNA-Ligase IV, Abschnitt 4, Schmelzverhalten der DNA bei verschiedenen Temperaturen

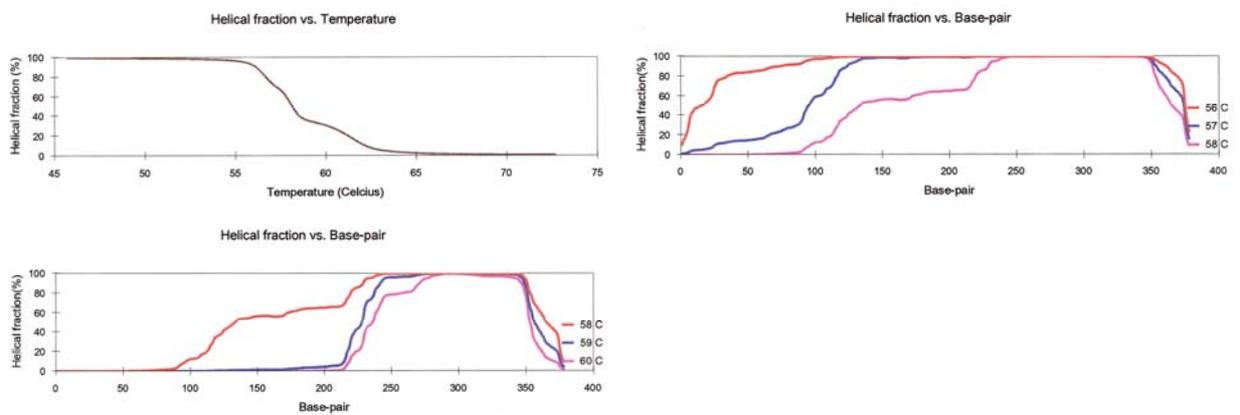


Abb. 26: DNA-Ligase IV, Abschnitt 5, Schmelzverhalten der DNA bei verschiedenen Temperaturen

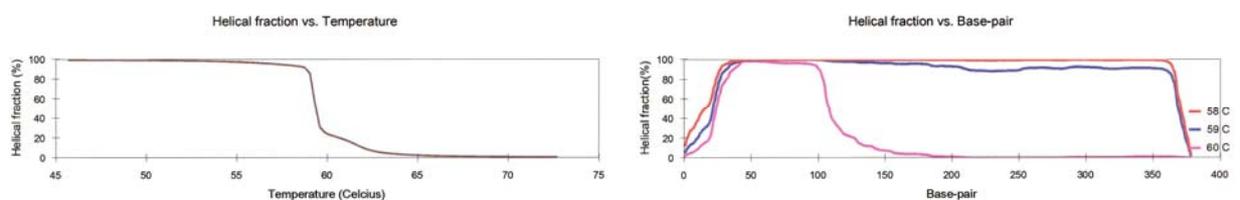


Abb. 27: DNA-Ligase IV, Abschnitt 6, Schmelzverhalten der DNA bei verschiedenen Temperaturen

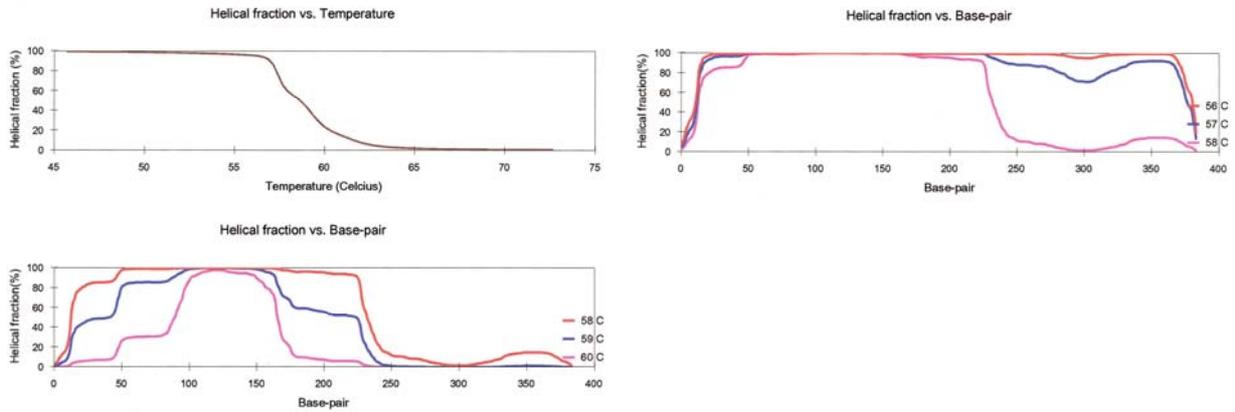


Abb. 28: DNA-Ligase IV, Abschnitt 7, Schmelzverhalten der DNA bei verschiedenen Temperaturen

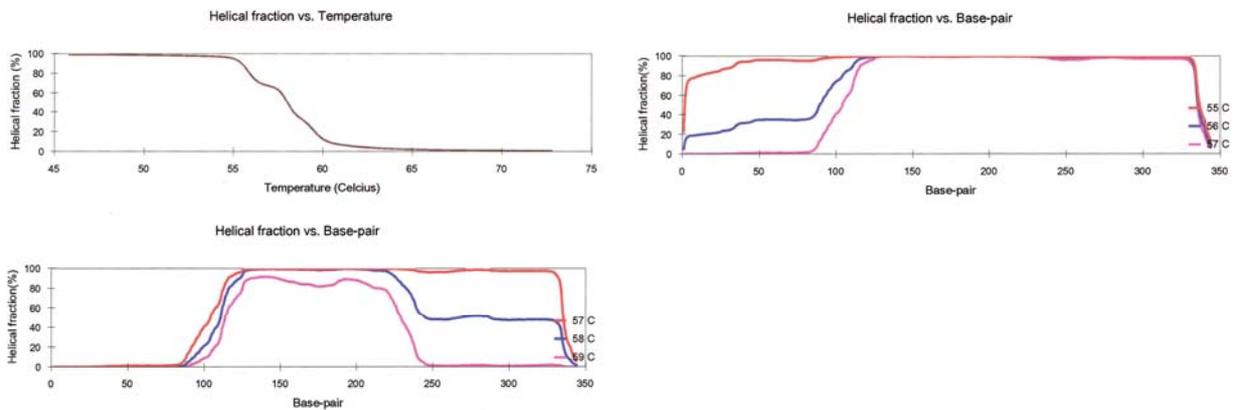


Abb. 29: DNA-Ligase IV, Abschnitt 8, Schmelzverhalten der DNA bei verschiedenen Temperaturen

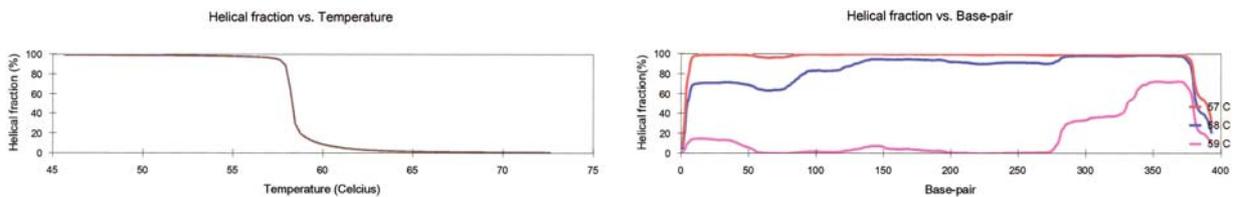


Abb. 30: DNA-Ligase IV, Abschnitt 9, Schmelzverhalten der DNA bei verschiedenen Temperaturen

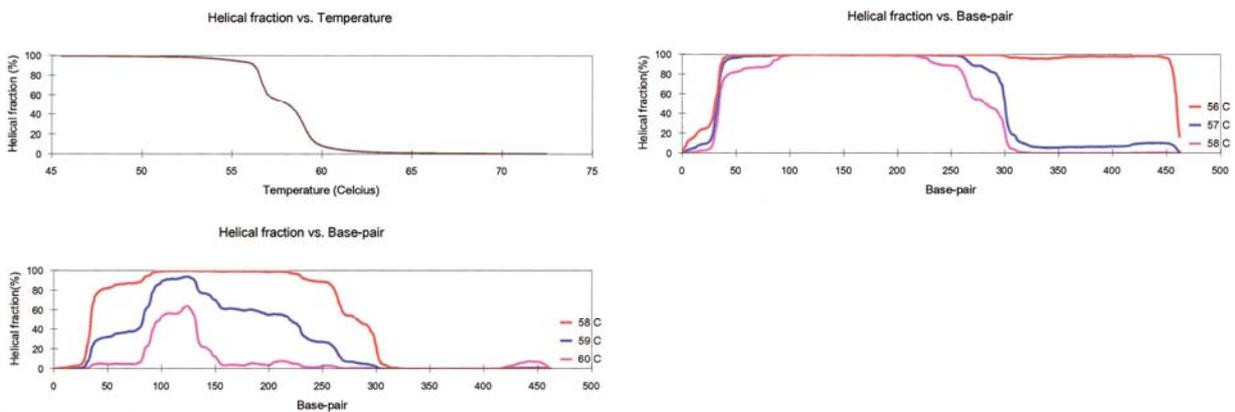


Abb. 31: DNA-Ligase IV, Abschnitt 10, Schmelzverhalten der DNA bei verschiedenen Temperaturen

Anhand der Schmelzkurven und der Ergebnisse der einzelnen Läufe wurden für die verschiedenen Abschnitte folgende Temperaturen ausgewählt:

**Tabelle 2: DHPLC-Analysetemperaturen für die verschiedenen Abschnitte des *DNA-Ligase IV-Gens***

Abschnitt	Analysetemperaturen in °C			
1a	57	58	59	-
1	55	56	57	58
2	55	56	57	-
3	56	57	58	-
4	55	56	57	-
5	56	57	59	-
6	58	59	-	-
7	56	57	59	-
8	55	56	58	59
9	57	58	59	-
10	56	57	58	59

## 4.2 Ergebnisse von DHPLC und Sequenzierung

Zunächst wurden 27 ALL-Proben durch DHPLC analysiert. Dabei wurden nur in den Abschnitten 1a und 6 Polymorphismen gefunden, die bereits vorher beschrieben worden waren. Da die Polymorphismen in Abschnitt 1a bei verschiedenen Läufen unterschiedlich deutlich erkennbar waren, war es erforderlich, diesen Abschnitt bei allen Proben zusätzlich zu sequenzieren. Um ein eventuelles Übersehen nur geringfügig auffälliger Proben zu vermeiden, wurden auch in den anderen Abschnitten zahlreiche Proben, die in der DHPLC-Analyse etwas von der Wildtypkontrolle abwichen, zusätzlich sequenziert, ohne dass hierbei jedoch neue Mutationen oder Polymorphismen entdeckt wurden. Es zeigte sich, dass eine gewisse Unsicherheit nur im Abschnitt 1a bestand. Ein möglicher Grund hierfür liegt darin, dass die beiden hier vorkommenden Polymorphismen sehr dicht beieinander liegen. Da sich die DHPLC-Bedingungen hierfür jedoch nicht weiter optimieren ließen und bei den weiteren Proben überwiegend nur sehr wenig DNA zur Verfügung stand, wurden weitere 30 ALL-Proben ohne vorherige DHPLC-Analyse in allen Abschnitten sequenziert. Abgesehen von dem

erwähnten Polymorphismus in Abschnitt 6, der nicht zu einem Aminosäureaustausch führt, fanden sich auch hierbei lediglich in Abschnitt 1a die bereits bekannten Polymorphismen.

Bei weiteren 50 ALL-Proben wurde daher nur der Abschnitt 1a sequenziert. Die Ergebnisse der DHPLC-Analyse und der Sequenzierung werden im Folgenden dargestellt.

### Abschnitt 1a

Abschnitt 1a wurde, wie in Tabelle 2 dargestellt, bei 57, 58 und 59°C analysiert. Dargestellt werden hier nur die Läufe ohne vorherige Mischung mit Wildtyp-DNA. Abb. 32 zeigt die Ergebnisse bei 57°C:

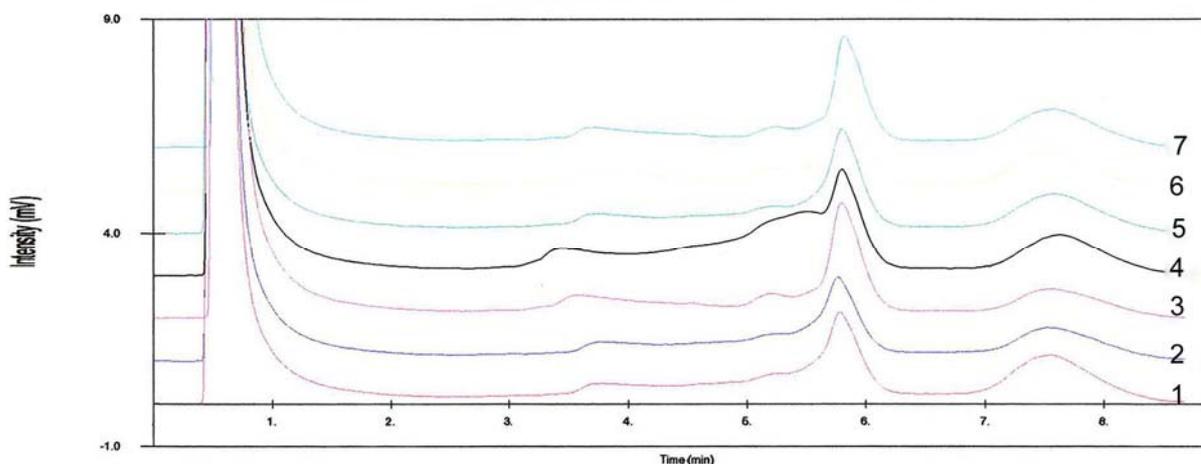


Abb. 32: DHPLC-Ergebnis von *DNA-Ligase IV*, Abschnitt 1a bei 57°C, 7 verschiedene Proben

Die Proben 1 und 2 (gleicher Proband) sowie 4 und 5 unterscheiden sich von den anderen Proben, wobei sich Probe 4 wiederum von den Proben 1, 2 und 5 unterscheidet. Diese Unterschiede sind bei 58°C und 59°C, wie in den Abb. 33 und 34 dargestellt, wesentlich deutlicher, ohne dass jedoch ein typisches Doppelsignal erkennbar wird.

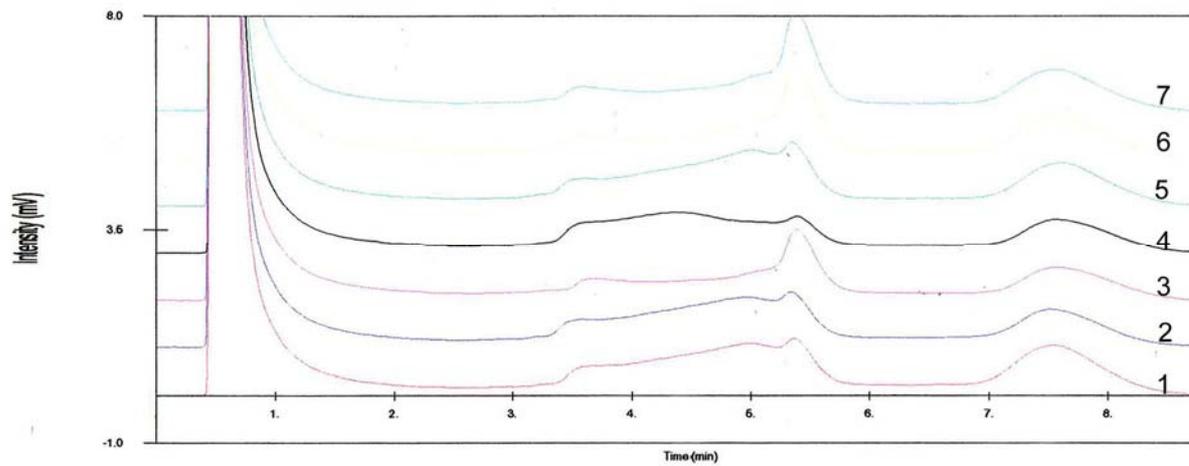


Abb. 33: DHPLC-Ergebnis von *DNA-Ligase IV*, Abschnitt 1a bei 58°C, 7 verschiedene Proben

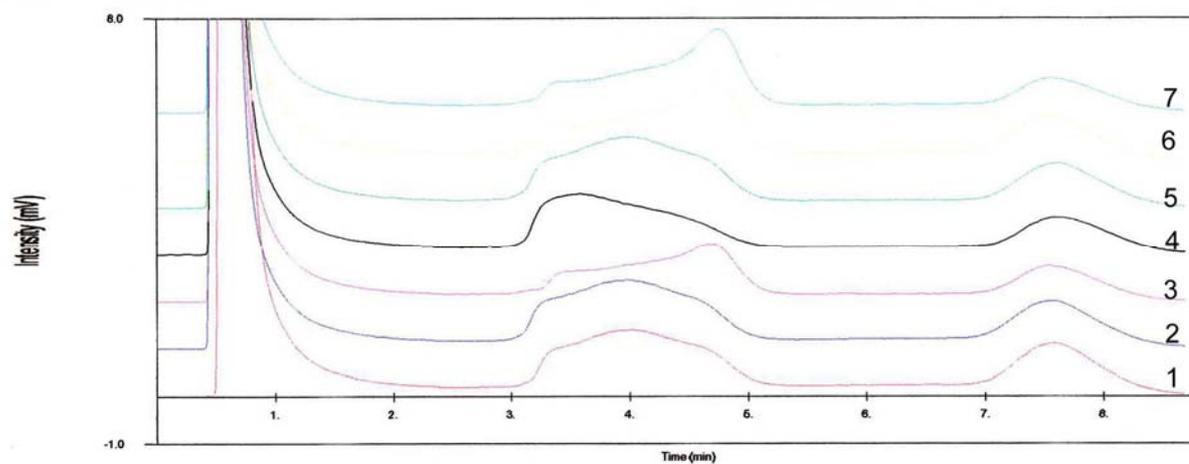


Abb. 34: DHPLC-Ergebnis von *DNA-Ligase IV*, Abschnitt 1a bei 59°C, 7 verschiedene Proben

Die anschließende Sequenzierung bestätigte dieses Ergebnis. Die Proben 1, 2 und 5 zeigten in Position 26 einen Basenaustausch C→T in einem Allel, was zum Polymorphismus T9I führt. Bei Probe 4 liegt zusätzlich in Position 8 ein Basenaustausch C→T in einem Allel vor. Die Probe wird dadurch heterozygot (het.) für die beiden Polymorphismen A3V und T9I. Proben 3, 6 und 7 zeigten eine Wildtyp-Sequenz (WT). Letztere ist in Abb. 35 vorwärts sequenziert dargestellt:

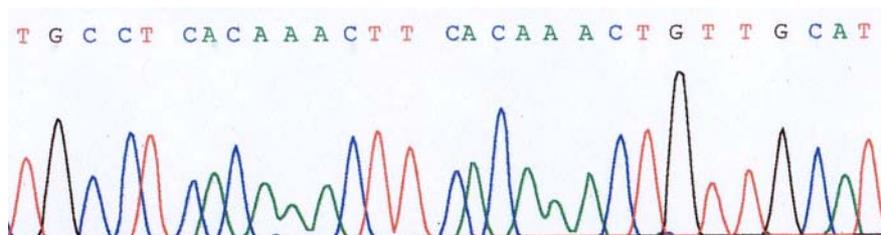


Abb. 35: Wildtyp-Sequenz der *DNA-Ligase IV*, Abschnitt 1a vorwärts

Abb. 36 zeigt dieselbe Stelle mit dem Basenaustausch C→T in den Positionen 8 und 26, ebenfalls vorwärts sequenziert:

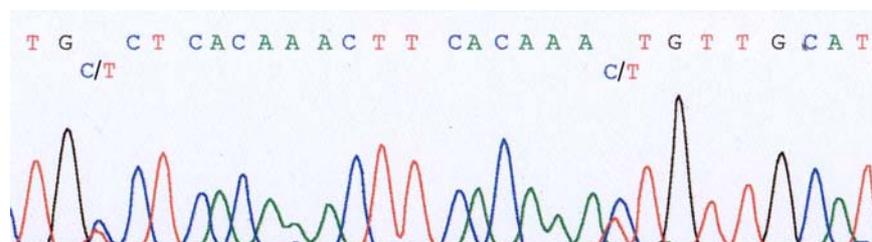


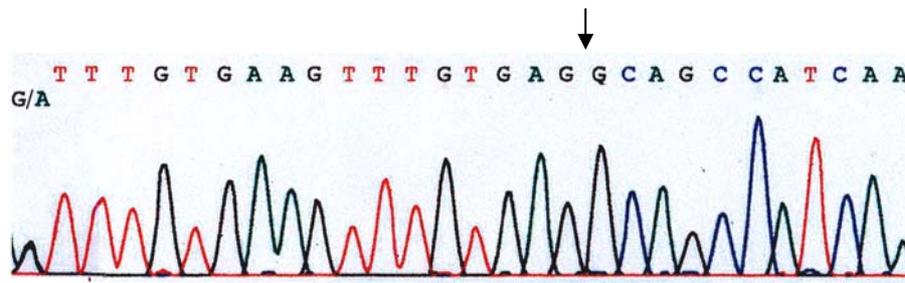
Abb. 36: Vorwärtssequenz der *DNA-Ligase IV*, Abschnitt 1a. Deutlich erkennbar sind die beiden Basenaustausche C→T in den Positionen 8 und 26.

In der Rückwärtssequenzierung stellt sich der Basenaustausch C→T als G →A dar. Abb. 37 zeigt Wildtypsequenz und Polymorphismen rückwärts sequenziert:



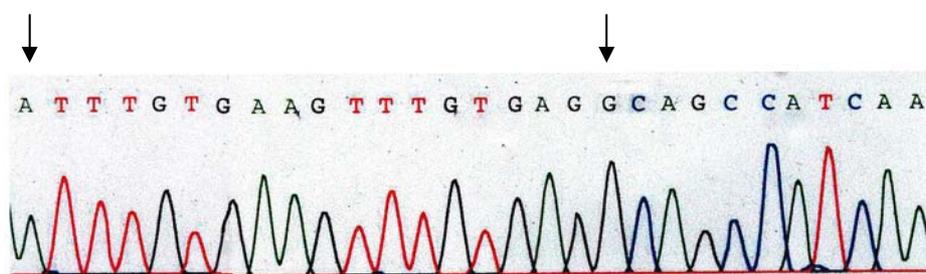
Abb. 37: *DNA-Ligase IV*, Abschnitt 1a rückwärts sequenziert: Die obere Sequenzierung zeigt eine Wildtyp-Sequenz. Unten sind die beiden Basenaustausche C→T in den Positionen 8 und 26 zu erkennen, die sich in der Rückwärtssequenz als G →A darstellen.

Da der erste Basenaustausch sehr dicht am Vorwärtsprimer liegt, und die Sequenz daher nicht immer sicher erkennbar war, wird im Folgenden nur die Rückwärtssequenz dargestellt. Abb. 38 zeigt den Basenaustausch C→T in Position 26, wie er in den Proben 1, 2 und 5 vorliegt und zum Polymorphismus T9I führt:

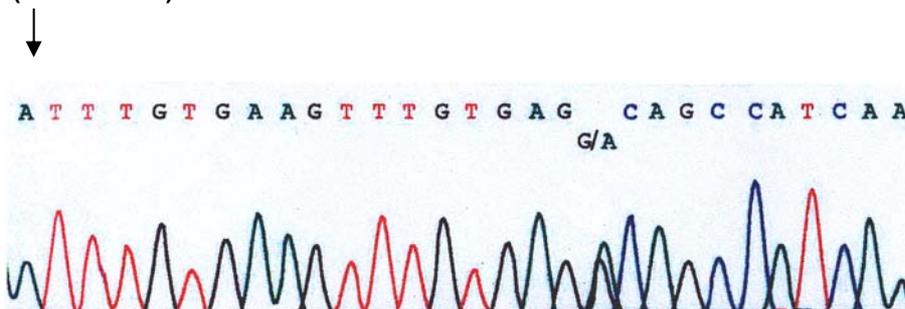


**Abb. 38:** Rückwärtssequenz der *DNA-Ligase IV*, Abschnitt 1a. Der Basenaustausch G→A in Position 26 entspricht dem Austausch C→T in der Vorwärtssequenz. Position 8 ist unverändert (Pfeil).

In der anschließenden Sequenzierung weiterer Proben ohne vorherige DHPLC-Analyse wurden auch Proben mit homozygotem Basenaustausch in Position 26 gefunden. Diese traten bei zwei Proben in Kombination mit dem heterozygoten Basenaustausch in Position 8 auf. Letzterer trat alleine jedoch nie auf. Beide Varianten sind in den Abb. 39 und 40 dargestellt:



**Abb. 39:** Rückwärtssequenz der *DNA-Ligase IV*, Abschnitt 1a. Homozygoter Basenaustausch in Position 26 (Pfeil links), Wildtypsequenz in Position 8 (Pfeil rechts).



**Abb. 40:** Rückwärtssequenz der *DNA-Ligase IV*, Abschnitt 1a. Homozygoter Basenaustausch in Position 26 (Pfeil), heterozygoter Basenaustausch in Position 8.

Die Sequenzierung von Teil 1a bei allen 107 ALL-Proben, auch bei denen, die zuvor durch DHPLC analysiert worden waren, sowie von 104 Kontrollproben führte zu folgendem Ergebnis:

**Tabelle 3: Ergebnisse der Sequenzierung von 107 ALL- und 104 Kontrollproben, DNA-Ligase IV, Abschnitt 1a**

	<b>ALL (n = 107)</b>	<b>Kontrollen (n = 104)</b>
<b>Wildtyp</b>	<b>85 (79,44%)</b>	<b>68 (65,38%)</b>
<b>Polymorphismus</b>	<b>22 (20,56%)</b>	<b>36 (34,62%)</b>
T9I heterozygot	11 (10,28%)	21 (20,19%)
T9I homozygot	1 (0,93%)	1 (0,96%)
A3V heterozygot/T9I heterozygot	8 (7,48%)	12 (11,54%)
A3V heterozygot/T9I homozygot	2 (1,87%)	2 (1,92%)

Tabelle 4 stellt die Häufigkeit der einzelnen Allelkombinationen dar:

**Tabelle 4: Häufigkeit der verschiedenen Allele im Abschnitt 1a bei ALL- und Kontrollproben**

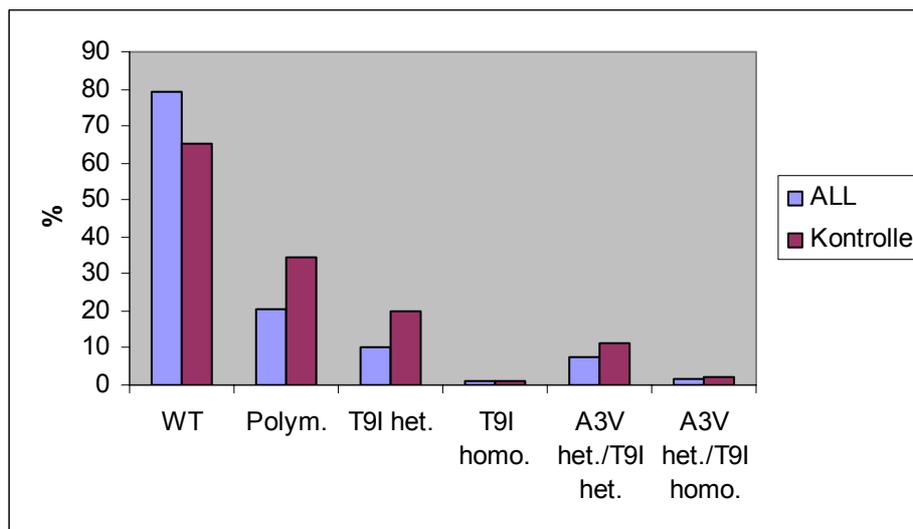
<b>A3V</b>	<b>T9I</b>	<b>ALL n = 107</b>	<b>Kontrollen n = 104</b>
CC	CC	85 (79,44%)	68 (65,38%)
CC	CT	11 (10,28%)	21 (20,19%)
CC	TT	1 (0,93%)	1 (0,96%)
CT	CT	8 (7,48%)	12 (11,54%)
CT	TT	2 (1,87%)	2 (1,92%)
CT	CC	0	0
TT	CC	0	0
TT	CT	0	0
TT	TT	0	0

Die unterschiedliche Häufigkeit der beschriebenen Polymorphismen bei ALL-Patienten und Kontrollpersonen ist statistisch signifikant. Im  $\chi^2$ -Test ergibt sich bei einem  $\chi^2$ -Wert von 5,2266 ein p-Wert von  $< 0,025$ . Entscheidend ist hierbei die unterschiedliche Häufigkeit der für den Polymorphismus T9I heterozygoten Proben. Ein Vergleich dieser Proben sowohl gegenüber WT-Proben als auch gegenüber allen anderen Proben ergibt

einen etwas höheren  $\chi^2$ -Wert bei gleichem Signifikanzniveau. Die unterschiedliche Verteilung des Polymorphismus A3V hingegen ist statistisch nicht signifikant ( $p > 0,1$ ).

Die Genotypen liegen bei Patienten und Kontrollpersonen weitgehend im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Die Abweichungen hiervon sind statistisch nicht signifikant ( $p > 0,1$ ).

Abbildung 41 stellt die unterschiedliche Häufigkeit der Polymorphismen bei ALL- und Kontrollproben dar:



**Abb. 41: Häufigkeit von Wildtyp und Polymorphismen bei ALL- und Kontrollproben im Gen für DNA-Ligase IV. ALL: n = 107; Kontrollen: n = 104. (WT = Wildtyp; Polym. = Polymorphismus; homo. = homozygot; het. = heterozygot)**

Von 12 Patienten mit nachgewiesenem Polymorphismus standen Kontrollproben mit einem Blastenanteil von unter 2% bereit. Bei der Sequenzierung dieser Proben fanden sich bei allen 12 Patienten die gleichen Polymorphismen wie im blastenreichen Material, sodass es sich offensichtlich um Keimbahnveränderungen handelt.

Von 107 Patienten waren 59 (55,1%) Jungen, 48 (44,9%) waren Mädchen. Unter den Patienten mit Polymorphismus lag der Anteil der Jungen bei 54,6%, während 45,5% Mädchen waren.

Im mittleren Beobachtungszeitraum von 5 Jahren und 5,5 Monaten verstarben 6 Patienten. Die beschriebenen Polymorphismen kamen bei ihnen nicht vor. Der mittlere Beobachtungszeitraum betrug für Patienten mit Polymorphismus 5 Jahre und 2,7 Monate, ohne Polymorphismus 5 Jahre und 5,2 Monate.

Das Durchschnittsalter der Patienten betrug bei Diagnose 6,13 Jahre. Bei Patienten mit einem der genannten Polymorphismen lag es bei 5,73 Jahren, bei den anderen

Patienten bei 6,24 Jahren. Säuglingsleukämien kamen nicht vor, da entsprechende DNA-Proben nicht zur Verfügung standen.

12 Patienten erlitten nach durchschnittlich 26,8 Monaten ein Rezidiv. Davon zeigten 2 Patienten den Polymorphismus A3V(het.)/T9I(het.). Die Dauer bis zum Rezidiv betrug durchschnittlich 23,0 Monate. Die Rezidivrate lag damit bei Patienten mit Polymorphismus bei 9,1% verglichen mit 11,2% bei allen Patienten. Bezüglich Geschlecht, Erkrankungsalter, Rezidivhäufigkeit und Dauer bis zum Rezidiv zeigten sich bei der Analyse mittels Fischer- bzw. Wilcoxon-Test keine statistisch signifikanten Unterschiede ( $p > 0,1$ ). Tabelle 5 fasst die beschriebenen Daten zusammen:

**Tabelle 5: Zwischen den klinischen Parametern und dem Vorhandensein eines Polymorphismus im Abschnitt 1a der DNA-Ligase IV besteht keine statistisch signifikante Korrelation.**

	<b>Gesamt (n = 107)</b>	<b>Polymorphismus (n = 22)</b>	<b>Wildtyp (n = 85)</b>
<b>Geschlecht</b>	m: 55,1% w: 44,9%	m: 54,6% w: 45,5%	55,29% 44,71%
<b>Alter bei Diagnose (Jahre)</b>	6,13 Jahre	5,73 Jahre	6,24 Jahre
<b>Beobachtungszeitraum (Monate)</b>	65,5	62,7	65,2
<b>Verstorben</b>	5,6%	0%	7,1%
<b>Rezidive</b>	12 (11,2%)	2 (9,1%)	10 (11,8%)
<b>Dauer bis zum Rezidiv (Mittelwert in Monaten)</b>	26,8	23,0	27,6

Aufgrund von Differenzierungsantigenen werden ALL in B- und T-Zelllinien mit jeweils verschiedenen Subtypen unterteilt. Tabelle 6 zeigt die Verteilung der Subtypen auf Patienten mit und ohne Vorhandensein der Polymorphismen A3V und T9I:

Tabelle 6: Verteilung der verschiedenen Subtypen der akuten lymphoblastischen Leukämie auf Patienten mit und ohne Vorhandensein der Polymorphismen A3V und T9I im Gen für DNA-Ligase IV, Abschnitt 1a

Subtyp	Wildtyp (n = 85) Anteil in %	Polymorphismus (n = 22) Anteil in %
B I: Pro-B-ALL	9,4	9,1
B II: Common-ALL	50,6	54,6
B III: Prä-B-ALL	25,9	18,2
B IV: Reife B-ALL	1,2	0
T I: Pro-T-ALL	1,2	4,6
T II: Prä-T-ALL	0%	0%
T III: Kortikale T-ALL	1,2	0%
T IV: Reife T-ALL	10,6	13,7
T-ALL gesamt	12,9	18,2

Die Unterschiede sind statistisch nicht signifikant.

## Abschnitt 6

Auch in Abschnitt 6 fanden sich Auffälligkeiten in der DHPLC-Analyse. Die Abbildungen 42 und 43 zeigen die DHPLC-Ergebnisse bei 58 und 59°C ohne vorheriges Mischen mit Wildtyp-DNA:

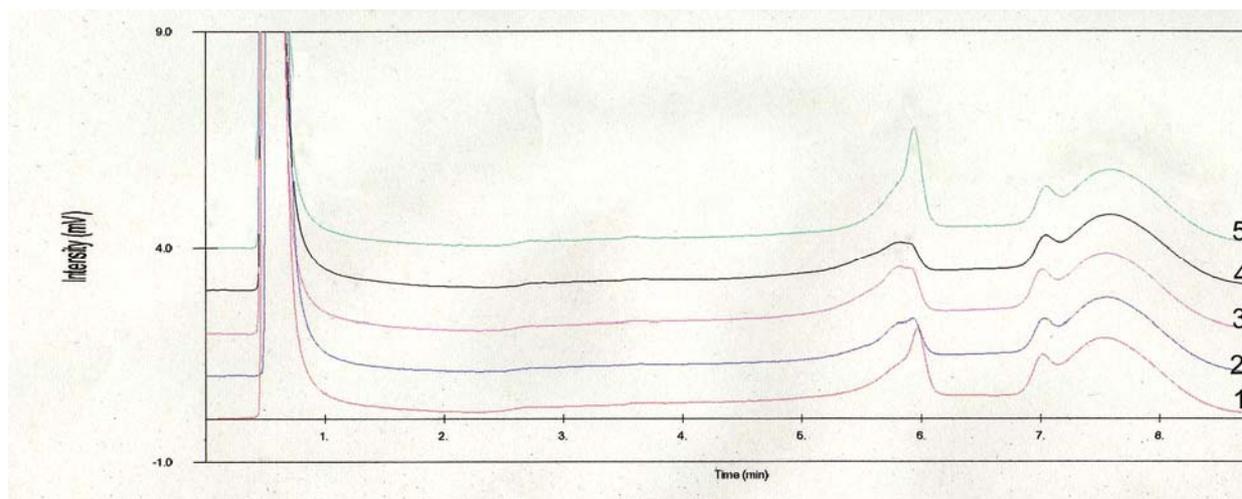


Abb. 42: DHPLC-Ergebnis von *DNA-Ligase IV*, Abschnitt 6 bei 58°C ohne vorheriges Mischen mit Wildtyp-DNA, 5 verschiedene Proben

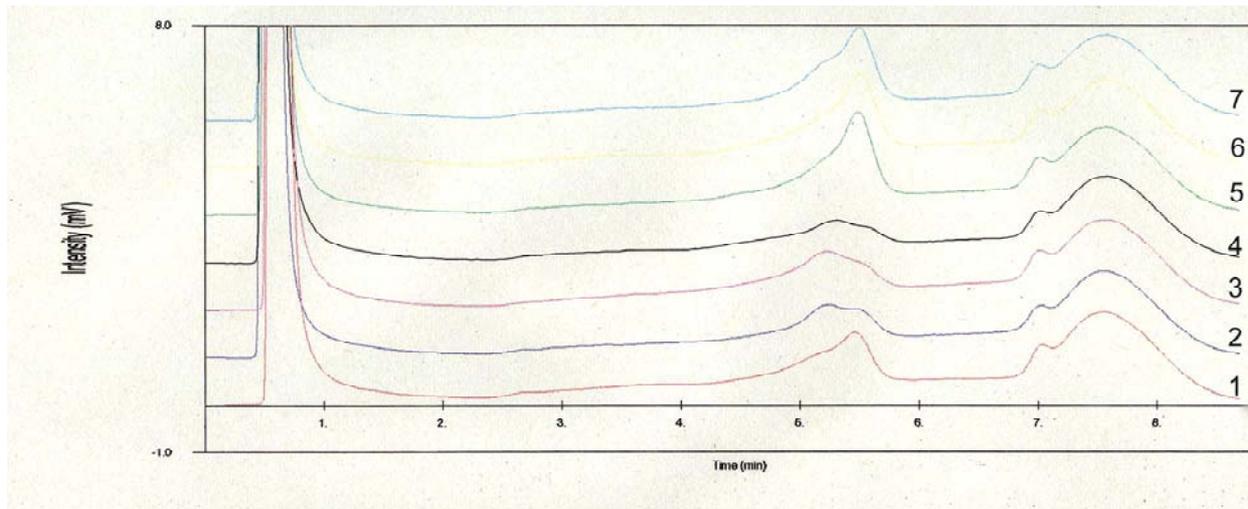


Abb. 43: DHPLC-Ergebnis von *DNA-Ligase IV*, Abschnitt 6 bei 59°C ohne vorheriges Mischen mit Wildtyp-DNA, 7 verschiedene Proben

Bei beiden Temperaturen dient Probe 1 als Negativkontrolle und Probe 2 als heterozygote Positivkontrolle für den bekannten Polymorphismus T→C in Position 1977. Es ist deutlich erkennbar, dass die Proben 3 und 4 bei beiden Temperaturen das gleiche Signal geben wie die Positivkontrolle. Die anschließende Sequenzierung bestätigte das Ergebnis. Abb. 44 zeigt die Wildtypsequenz des entscheidenden Abschnittes:

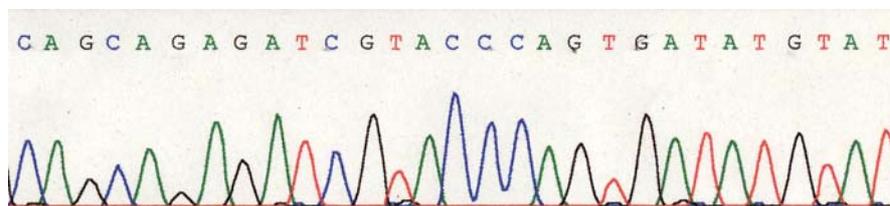


Abb. 44: Wildtypsequenz der *DNA-Ligase IV*, Abschnitt 6 (vorwärts)

Abb. 45 hingegen zeigt den Polymorphismus T→C in Position 1977 in heterozygoter Form, wie er in den Proben 3 und 4 vorliegt:



Abb. 45: *DNA-Ligase IV*, Abschnitt 6. Heterozygoter Basenaustausch in Position 1977

Dieser führt nicht zu einem Aminosäureaustausch. Insgesamt fanden sich bei den 57 *ALL-Proben*, die in allen Abschnitten untersucht wurden, 16 *Proben* mit dem beschriebenen Polymorphismus. Davon waren 13 *heterozygot* und 3 *homozygot* (nicht dargestellt). Andere Mutationen oder Polymorphismen wurden nicht gefunden. Zusätzlich wurden 66 DNA-Proben von Kontrollpersonen untersucht. Hier waren 16 Proben *heterozygot* und 3 *homozygot*. Damit lag der Anteil der Proben mit Polymorphismus bei den ALL-Patienten bei 28,07 % vs. 27,27% in der Kontrollgruppe. Die Unterschiede sind statistisch nicht signifikant.

### **Abschnitt 7**

Die für Abschnitt 6 verwendete Positivkontrolle konnte auch für den Abschnitt 7 verwendet werden, da der Polymorphismus in dem Bereich liegt, wo sich beide Abschnitte überlappen. Neue Mutationen oder Polymorphismen wurden in Abschnitt 7 nicht gefunden. Die DHPLC-Ergebnisse stimmten folglich für die Abschnitte 6 und 7 überein.

### **Abschnitte 9 und 10**

Für die Abschnitte 9 und 10 stand eine Positivkontrolle zur Verfügung, die in dem Bereich, in dem sich beide Abschnitte überlappen, eine Punktmutation (C→T, *heterozygot*) aufweist. Diese führt zur trunkierenden Mutation R814X. Die Abbildungen 46-48 zeigen die DHPLC-Ergebnisse für Abschnitt 9 bei verschiedenen Temperaturen ohne vorheriges Mischen mit Wildtyp-DNA. Probe 1 diente jeweils als Negativkontrolle und Probe 2 als Positivkontrolle.

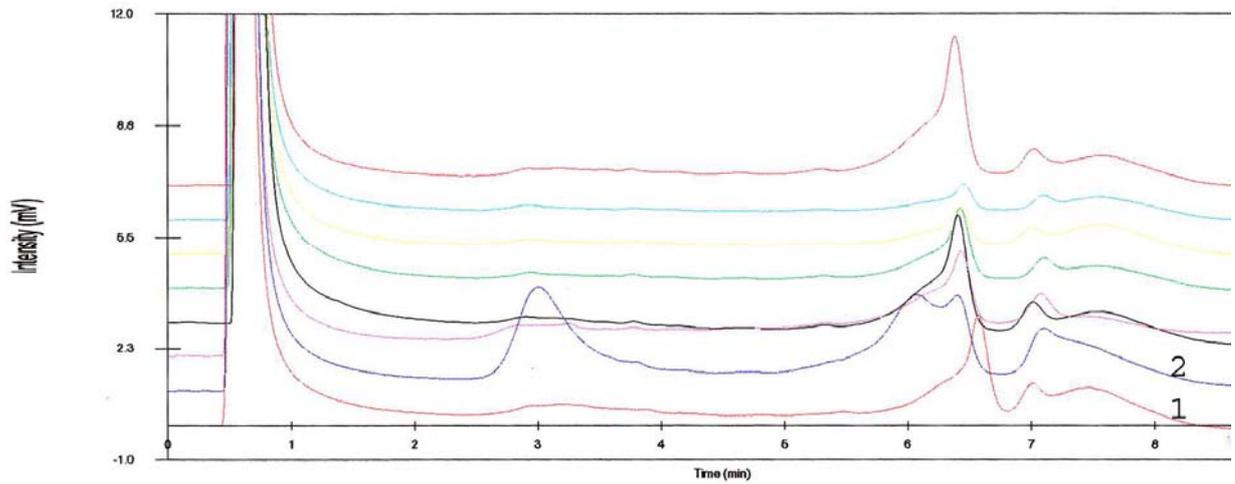


Abb. 46: DHPLC-Ergebnis von *DNA-Ligase IV*, Abschnitt 9 bei 57°C ohne vorheriges Mischen mit Wildtyp-DNA, 8 verschiedene Proben, Probe 1 dient als Negativkontrolle, Probe 2 als Positivkontrolle.

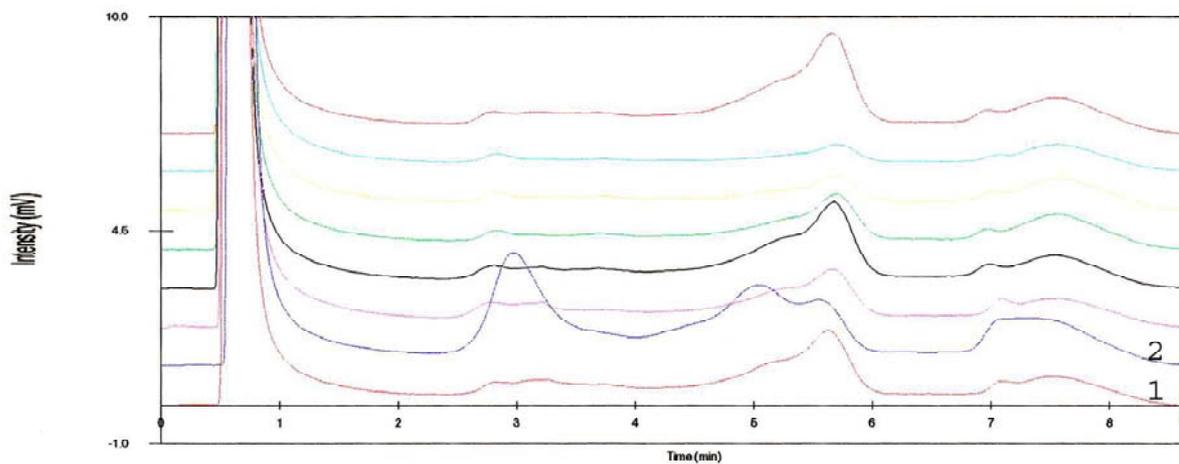


Abb. 47: DHPLC-Ergebnis von *DNA-Ligase IV*, Abschnitt 9 bei 58°C ohne vorheriges Mischen mit Wildtyp-DNA, 8 verschiedene Proben, Probe 1 dient als Negativkontrolle, Probe 2 als Positivkontrolle.

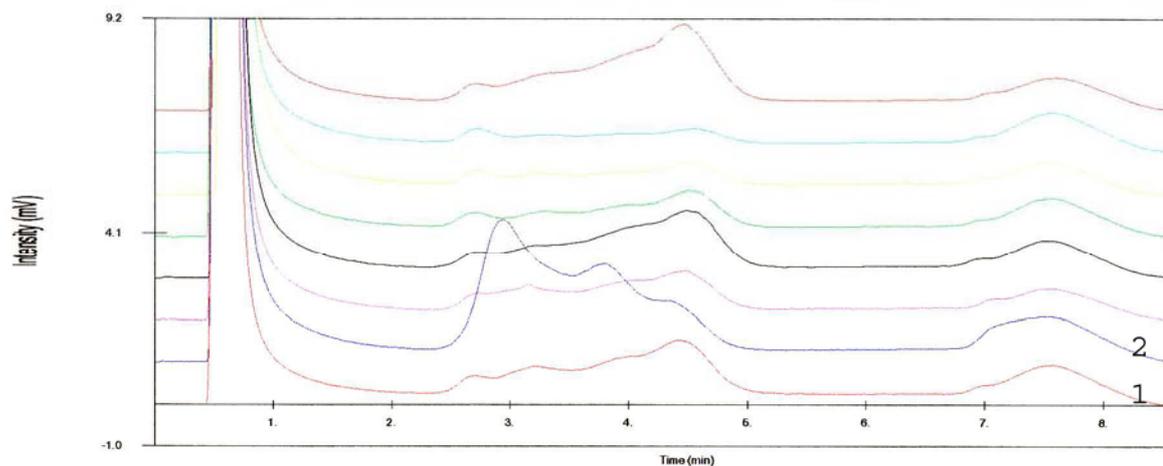


Abb. 48: DHPLC-Ergebnis *DNA-Ligase IV*, Abschnitt 9 bei 59°C ohne vorheriges Mischen mit Wildtyp-DNA, 8 verschiedene Proben, Probe 1 dient als Negativkontrolle, Probe 2 als Positivkontrolle.

Bei allen drei Temperaturen ist die Positivkontrolle durch ein Doppelsignal deutlich von der Negativkontrolle unterscheidbar. Bei den Patientenproben wurden keine Mutationen oder Polymorphismen gefunden. Auch in Abschnitt 10 war die Positivkontrolle von der Negativkontrolle unterscheidbar (Ergebnisse nicht dargestellt). Mutationen oder Polymorphismen bei Patienten wurden auch hier nicht gefunden.

### **Abschnitt 5**

Für Abschnitt 5 stand ebenfalls eine Positivkontrolle mit einer Punktmutation (G→A, heterozygot) zur Verfügung. Diese führt zum Aminosäureaustausch G469E. Die Ergebnisse wurden in den Abbildungen 17 und 18 dargestellt. Bei den Patientenproben wurden keine DNA-Veränderungen gefunden.

### **Abschnitte 1, 2, 3, 4, 8**

Für diese Abschnitte standen keine Positivkontrollen zur Verfügung. Bei den Patientenproben wurden keine Mutationen oder Polymorphismen gefunden.

## **4.3 Single-Strand-Conformation Polymorphism (SSCP)**

SSCP-Analyse ist ein weiteres Verfahren, DNA auf Mutationen oder Polymorphismen zu untersuchen. Da die Änderung der Sekundärstruktur und damit des Laufverhaltens nicht vorhersehbar ist, ist es bei der Suche nach bereits bekannten Veränderungen erforderlich, die optimalen Laufbedingungen zu ermitteln. Zur Darstellung der Polymorphismen T9I(het.) und A3V(het.)/T9I(het.) wurde eine SSCP-Analyse mit Gelen verschiedener Konzentration bei unterschiedlichen Temperaturen und Laufzeiten durchgeführt. Lediglich bei Verwendung eines 10%igen Gels und einer Laufzeit von zwei Stunden bei 20°C waren verschiedene Proben unterscheidbar. Proben mit dem Polymorphismus A3V(het.)/T9I(het.) unterschieden sich deutlich von den anderen Proben. Proben mit dem Polymorphismus T9I(het.) waren vom Wildtyp jedoch nicht sicher zu unterscheiden. Damit schied die SSCP-Analyse als alternatives Verfahren zur Suche von Polymorphismen aus. Abb. 49 zeigt die Ergebnisse unter den genannten Bedingungen:

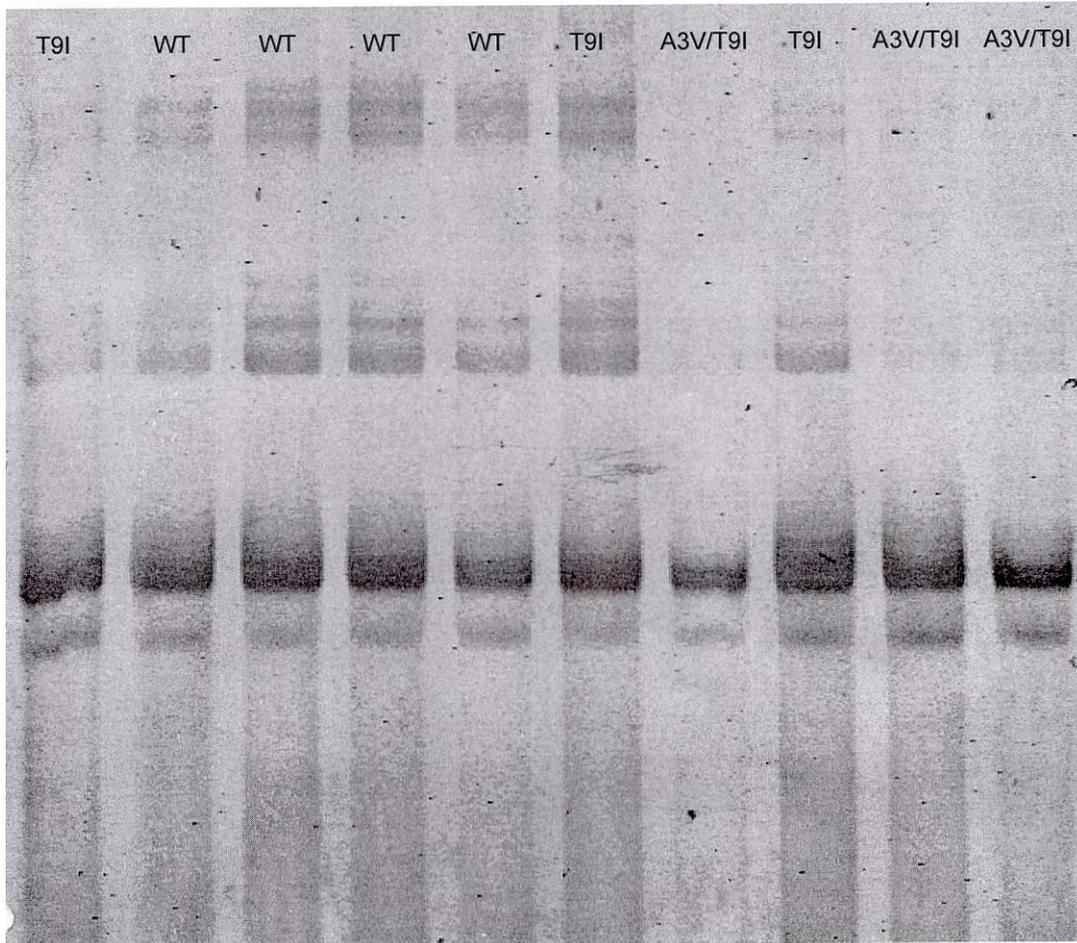
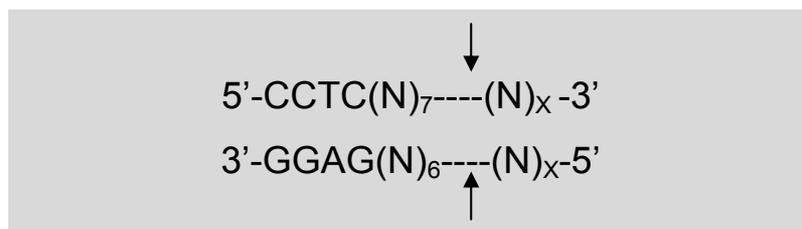


Abb. 49: *DNA-Ligase IV*, Abschnitt 1a. SSCP-Analyse mit einem 10%igen Gel; Temperatur: 20°C; Laufzeit 2h

#### 4.4 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)

Eine weitere Methode zur Suche bereits bekannter Basenaustausche ist die RFLP-Analyse. Durch den Polymorphismus A3V wird eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *MnII* zerstört. Erkennungssequenz und Schnittstelle für *MnII* lauten:



Wildtyp-DNA sowie DNA-Proben, die für die Polymorphismen T9I bzw. A3V/T9I heterozygot waren, wurden wie folgt mit MnlI inkubiert:

2µl Puffer 2                      Inkubation für 2,5h bei 37°C  
 2µl BSA (1:10)  
 1µl Enzym  
 5µl H<sub>2</sub>O  
 10µl PCR-Produkt

Abb. 50 zeigt die anschließend auf ein Gel aufgetragenen Proben. Das durch MnlI abgespaltene Fragment ist mit 51 Basenpaaren auf dem Gel nicht sichtbar. Das entsprechend verkürzte Hauptfragment ist jedoch erkennbar kleiner als das ungeschnittene PCR-Produkt (A3V/T9I). Unterhalb des ungeschnittenen Fragmentes ist ebenfalls eine Bande erkennbar, da die Probe heterozygot war, die Hälfte der DNA also geschnitten wurde. Die obere kleine Bande der Wildtypproben zeigt kleine Reste ungeschnittener DNA:



**Abb. 50: RFLP-Analyse *DNA-Ligase IV*, Abschnitt 1a. Der Polymorphismus A3V zerstört die Schnittstelle für das Restriktionsenzym MnlI. In beiden Reihen befindet sich links von der ersten Probe der Basenpaarmarker (kb-Leiter). WT = Proben mit Wildtypsequenz. Mit A3V und T9I bezeichnete Proben enthalten den entsprechenden Polymorphismus**

Der Polymorphismus A3V lässt sich mittels RFLP-Analyse schnell und einfach feststellen. Da der häufige Polymorphismus T9I jedoch keine Restriktionsschnittstellen zerstört oder schafft, ist auch diese Methode als Alternative zu DHPLC oder Sequenzierung nicht geeignet.