

## I. INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>I</b>
<b>II.</b>	<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>VI</b>
<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Einzelbasenpolymorphismen (SNPs)</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Sequenzpolymorphismen und Krankheitsdisposition</b>	<b>2</b>
<b>1.3</b>	<b>Methoden zum Nachweis von Einzelbasenpolymorphismen</b>	<b>3</b>
<b>1.4</b>	<b>Methoden, welche nicht auf DNS-Chips basieren</b>	<b>4</b>
1.4.1	Nachweis von SNPs aufgrund unterschiedlichen elektrophoretischen Laufverhaltens von DNS-Molekülen	4
1.4.2	Pyrosequenzierung	4
1.4.3	Detektion von SNPs über Einzelbasenfehlpaarungen in DNS-Doppelsträngen	6
1.4.4	Methoden, die auf einer enzymatischen Diskriminierung von Basenfehlpaarungen in Doppelstrang-DNS beruhen	8
<b>1.5</b>	<b>Bestimmung von SNPs mit Hilfe von Oligonukleotid-Chips</b>	<b>10</b>
1.5.1	Chiptechnologie	10
1.5.2	SNP Nachweis mit Hilfe von Oligonukleotid-Chips durch einfache Hybridisierung	11
1.5.3	SNP Nachweis mit Hilfe von Oligonukleotid-Chips durch enzymatische Methoden	12
1.5.4	Detektion von SNPs mit Hilfe von DNS-Ligase	12
1.5.5	Detektion von SNPs mit Hilfe von reverser Transkriptase	14
1.5.6	Detektion von SNPs mit Hilfe von DNS-Polymerasen	14
<b>1.6</b>	<b>Mitochondriale DNS als Modellsystem zur Detektion von SNPs</b>	<b>15</b>
<b>1.7</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>18</b>

<b>2.</b>	<b>MATERIALIEN</b>	<b>19</b>
2.1	Hersteller und Lieferfirmen	19
2.2	Chemikalien	20
2.3	Enzyme	21
2.4	Synthetische Oligonukleotide (Primer)	22
2.5	Lösungen und Puffer	34
2.6	Kits	35
2.7	Glas-Objektträger	36
2.8	Geräte	36
2.9	Sonstige Materialien	37
2.10	Computerprogramme	37
<b>3.</b>	<b>METHODEN</b>	<b>38</b>
3.1	Herstellung von Oligonukleotid-Chips	38
3.1.1	Silanisierung von Glas-Objektträgern	38
3.1.2	Aktivierung von Aminosilan-Glas-Objektträgern	39
3.1.3	Lösen und Anordnen der Oligonukleotide in Mikrotiterplatten	42
3.1.4	Vorbereiten von Oligonukleotidlösungen	43
3.1.5	Aufbringen der Oligonukleotide auf aktivierte Objektträger	44
3.1.6	Deaktivieren der Objektträger-Oberfläche	45
3.1.7	Prähybridisierung von DNS-Chips	46
3.2	Präparation gesamt-genomischer DNS aus Vollblut	46
3.3	Bestimmung der DNS-Konzentration	48
3.4	Prinzip der PCR	48
3.5	Amplifikation von Sequenzabschnitten mitochondrialer DNS mittels PCR	50
3.6	Amplifikation von langen PCR-Produkten mit Hilfe des “Expand Long Template PCR Systems”	52

---

<b>3.7</b>	<b>Herstellung einzelsträngiger DNS-Sequenzen</b>	56
3.7.1	Synthetische 50mer Oligonukleotid-Targets	56
3.7.2	Herstellung von asymmetrischen-PCR-Produkten	56
3.7.3	Herstellung von asymmetrischen-multiplex-PCR-Produkten	57
3.7.4	Herstellung von asymmetrischen-multiplex-PCR-Produkten ausgehend von langen Doppelstrang-PCR-Matrizen	58
3.7.5	Exonuklease-Verdau von PTO-modifizierten PCR-Produkten	59
3.7.6	In-vitro-Transkription	61
<b>3.8</b>	<b>Aufreinigung von PCR-Produkten</b>	61
<b>3.9</b>	<b>Ethanol-fällung zur Aufreinigung von PCR-Produkten</b>	62
<b>3.10</b>	<b>Agarose-Gel-Elektrophorese</b>	63
<b>3.11</b>	<b>Allel-spezifische Primer-Elongationsreaktion</b>	63
3.11.1	Prinzip der Primer-Elongationsreaktion in Lösung	63
3.11.2	Prinzip der Primer-Elongationsreaktion auf einer festen Phase	64
3.11.3	Durchführung der Primer-Elongationsreaktion	65
3.11.4	Waschen der Objektträger	66
3.11.5	Messung der Fluoreszenzintensitäten mittels Laser-Scanner	66
3.11.6	Bildanalyse mit IP Lab Spectrum	67
<b>3.12</b>	<b>Sequenzierung</b>	67
<b>3.13</b>	<b>Inter-Alu SNP-Projekt</b>	68
3.13.1	Herstellen von Inter-Alu PCR-Produkten	68
3.13.2	Ligation von Inter-Alu PCR-Produkten	69
3.13.3	Transformation von Top 10 F <sup>-</sup> kompetenten Zellen	71
3.13.4	Überprüfung der Klone mittels PCR	71
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	73
<b>4.1</b>	<b>Primer-Elongation in Lösung</b>	75
<b>4.2</b>	<b>Auswahl von Oligonukleotiden zur Detektion von Polymorphismen in mitochondrialer DNS</b>	75

---

<b>4.3</b>	<b>Herstellung von geeigneten Oligonukleotid-Chips</b> _____	77
<b>4.4</b>	<b>Falsch-positive Signale ohne Zusatz einer DNS-Matrize</b> _____	78
<b>4.5</b>	<b>Das Aufbringen von Oligonukleotiden auf aktivierte Objektträger</b> ____	80
<b>4.6</b>	<b>Verwendung von verschiedenen Oligonukleotiden</b> _____	82
<b>4.7</b>	<b>Primer-Elongationsreaktion mit synthetischen 50mer Oligonukleotiden als Zielsequenz</b> _____	84
<b>4.8</b>	<b>Optimierung der Primer-Elongationsreaktion</b> _____	86
4.8.1	Testen verschiedener DNS-Polymerasen _____	86
4.8.2	Optimierung des Thermoprofils _____	86
4.8.3	Weitere Zusätze zur Optimierung der Allel-spezifischen Primer- Elongationsreaktion _____	87
<b>4.9</b>	<b>Herstellung geeigneter einzelsträngiger Zielsequenzen</b> _____	87
4.9.1	Synthetische Oligonukleotide _____	87
4.9.2	Allel-spezifische Primer-Elongationsreaktion mit asymmetrischen und asymmetrischen-multiplex-PCR-Produkten _____	88
<b>4.10</b>	<b>Allel-spezifische Primer-Elongationsreaktion mit asymmetrischen multiplex-PCR-Produkten</b> _____	92
<b>4.11</b>	<b>Allel-spezifische Primer-Elongationsreaktion mit RNS als Matrize</b> ____	94
<b>4.12</b>	<b>Allel-spezifische Primer-Elongationsreaktion mit einzelsträngigen PTO-modifizierten Matrizen-DNS</b> _____	94
<b>4.13</b>	<b>Anwendung dieser Verfahren zur genomweiten Typisierung von SNPs</b> _____	100
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b> _____	103
5.1	<b>SNPs als Marker für Kopplungs- und Assoziationsstudien: Anforderungen und Schwierigkeiten</b> _____	103
<b>5.2</b>	<b>Prinzip der Allel-spezifischen Primer-Elongationsreaktion auf Oligonukleotid-Mikrorastern</b> _____	105
<b>5.3</b>	<b>Ermittlung geeigneter Allel-spezifischer Oligonukleotide</b> _____	107

---

<b>5.4</b>	<b>Entwicklung einer geeigneten Chip-Oberfläche</b>	<b>108</b>
<b>5.5</b>	<b>Falsch-positive Signale unter verschiedenen experimentellen Bedingungen</b>	<b>109</b>
<b>5.6</b>	<b>Ermittlung geeigneter Targets</b>	<b>110</b>
5.6.1	Typisierung von Einzelbasenaustauschen mit synthetischen Oligonukleotid-Targets	111
5.6.2	Detektion von Einzelbasenpolymorphismen mittels einzelsträngigen asymmetrischen-PCR-Produkten als Target	112
5.6.3	Einsatz von Exonuklease-behandelten PTO-modifizierten PCR-Produkten als Target	114
<b>5.7</b>	<b>Protokoll zur Typisierung möglicherweise aller mitochondrialer SNPs durch nur 5 Primer-Elongationsreaktionen</b>	<b>115</b>
<b>5.8</b>	<b>Abschließende Beurteilung der entwickelten Methode</b>	<b>117</b>
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>121</b>
<b>7.</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>122</b>
<b>8.</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>123</b>
<b>9.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>139</b>
<b>9.1</b>	<b>Danksagung</b>	<b>139</b>
<b>9.2</b>	<b>Publikationen</b>	<b>140</b>
<b>9.3</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>141</b>