

# 1. Einleitung

## 1.1 Einzelbasenpolymorphismen (SNPs)

Die Sequenzierung des menschlichen Genoms durch zwei Institutionen, das internationale "Genome Sequencing Consortium" und die Firma "Celera Genomics", stellt einen Meilenstein der biomedizinischen Forschung dar. Eine Rohfassung der menschlichen DNS-Sequenz wurde im Februar 2001 von beiden Einrichtungen veröffentlicht (The Genome Sequencing Consortium, 2001; Venter et al., 2001); die vollständige und weitgehend fehlerfreie Sequenz wird jedoch voraussichtlich erst in einigen Jahren vorliegen. Die Analyse genomischer DNS erbrachte die Erkenntnis, dass sich verschiedene Individuen sich im wesentlichen durch Austausch einzelner Basen (Einzelbasenpolymorphismen, „single nucleotide polymorphisms“ SNP) unterscheiden. SNPs stellen die häufigsten Sequenzvarianten im Genom dar und kommen durchschnittlich alle 1000 – 2000 Nukleotide vor (Cooper et al., 1985; Wang et al., 1998; Landegren et al., 1998). Bislang wurden im menschlichen Genom 1,42 Millionen SNPs durch das Humane Genomprojekt, und 1,22 Millionen durch die Firma Celera Genomics (Venter et al., 2001) identifiziert. Fast ausnahmslos handelt es sich dabei um biallelische Polymorphismen.

Basensubstitutionen werden in Transition und Transversion unterteilt: Werden jeweils Purine (Adenin (A), Guanin (G)) oder Pyrimidine (Cytosin (C), Thymin (T)) ausgetauscht, so spricht man von Transition (A zu G, G zu A, C zu T, T zu C). Findet ein Austausch zwischen Purin-Basen und Pyrimidin-Basen statt, so spricht man von Transversion (G zu T, C zu A, G zu C, C zu G, A zu C, T zu G, A zu T und T zu A). Die Häufigkeit dieser Basenaustausche im humanen Genom ist unterschiedlich. Bei etwa  $\frac{2}{3}$  der SNPs handelt es sich um Transitionen (Brookes, 1999). Der hohe Anteil von C  $\Leftrightarrow$  T (G  $\Leftrightarrow$  A) SNPs hängt vermutlich mit der 5-Methylcytosin-Desaminierungsreaktion zusammen. Ein nicht methyliertes Cytosin kann spontan zu Uracil desaminiert werden. Das gebildete Uracil, welches normalerweise in der DNS

nicht vorkommt, wird mit Hilfe des Reparaturenzyms Uracil-DNS-Glykosylase erkannt, herausgeschnitten und durch ein Cytosin ersetzt. Bei einer spontanen Desaminierung von 5'-Methylcytosin dagegen entsteht Thymin, eine Base, die ein normaler Bestandteil der DNS ist, so dass aus einem GC-Paar ein AT-Paar entsteht. Dies betrifft besonders CpG-Dinukleotide, bei denen Cytosin häufig eine Methylgruppe trägt (Holliday, 1993). Nach Savatier et al. (1985), treten etwa 25% der humanen SNPs an CpG-Dinukleotidpositionen auf.

SNPs, die innerhalb von kodierenden Genabschnitten liegen, werden als cSNPs bezeichnet. Eine grosse Zahl an cSNPs wurde durch Sequenzvergleich von kurzen cDNS Abschnitten, sogenannten "ESTs" (expressed sequence tags), identifiziert (Irizarry et al. 2000).

## 1.2 Sequenzpolymorphismen und Krankheitsprädisposition

SNPs können als Marker für Kopplungsanalysen eingesetzt werden, d.h. in Familien werden Kopplungsungleichgewichte zwischen einem Krankheitslocus und benachbarten Polymorphismen untersucht (Kruglyak, 1997). Hier haben SNPs als Marker keinen funktionellen Bezug zum klinischen Merkmal. Bei besonders enger Kopplung oder bei Mutationen, die selten in der Bevölkerung auftreten, findet man bei Betroffenen bevorzugt eine bestimmte allelische Kombination benachbarter Marker (Haplotyp).

Für Kopplungsanalysen stellen biallelische SNPs aufgrund ihrer Häufigkeit im Genom, ihrer niedrigen Mutationsrate und der Möglichkeit zum automatisierten Nachweis die Marker der Wahl dar (Kruglyak, 1999; Landegren et al., 1988; Wu et al. 1989; Syvänen et al., 1990; Nickerson et al., 1990; Livak et al., 1995; Cronin et al., 1996).

Eine andere Ursache für eine Assoziation von SNPs mit einer bestimmten Erkrankung ist ein direkter funktioneller Zusammenhang zwischen Gen-Polymorphismus und Krankheit. Polymorphismen in kodierenden Gensequenzen werden als prädisponierende

genetische Faktoren für häufige Krankheiten angenommen (Zaho et al., 1998; Cargill et al., 1999; Halushka et al., 1999).

Beispiele für funktionelle Assoziationen sind die ApoE-4 Variante, welche in Zusammenhang mit der Alzheimer-Krankheit steht (Maury, 1995), sowie das "peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) Gen, das eine relevante Rolle in der Pathogenese des Typ-2-Diabetes spielt. Es wurden bisher 3 Polymorphismen im PPAR- $\gamma$ -Gen gefunden. Während 2 dieser Polymorphismen nicht signifikant (sehr selten) sind, ist der so genannte Pro12Ala-Polymorphismus (C/T Austausch) in der Liganden-unabhängigen Bindungsregion der PPAR- $\gamma$ -Isoform weit verbreitet. Eine Analyse der skandinavischen Prädiabetes-Population hat gezeigt, dass die Trägerschaft des Pro12Ala-Polymorphismus tatsächlich mit einem verminderten Risiko der Entwicklung eines Typ-2-Diabetes assoziiert ist (Altshuler et al., 2000).

Das ApoE-Gen liegt auf Chromosomen 19 und kann in 4 verschiedenen Varianten vorliegen. Die Assoziation ApoE-4 Variante mit der Alzheimer-Krankheit wurde in einer grossen Studie durch Kopplung von SNPs nachgewiesen. Zu beiden Seiten des Genortes ApoE wurde eine hochauflösende SNP-Karte angefertigt und diese SNPs in Alzheimer-Patienten sowie gesunden Kontrollgruppen untersucht (Roses, 2000).

### **1.3 Methoden zum Nachweis von Einzelbasenpolymorphismen**

Zur Bestimmung von Einzelbasenpolymorphismen innerhalb definierter Genomsequenzen werden heutzutage verschiedene Methoden angewendet (Schafer, 1998). Diese unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Sensitivität, Spezifität, Kosten, Durchsatz und Automatisierbarkeit. Im folgenden werden gängige Methoden dargestellt, welche nicht auf DNS-Chips basieren, und anschliessend bereits publizierte Protokolle zur SNP-Typisierung mittels DNS-Chips beschrieben.

## 1.4 Methoden, welche nicht auf DNS-Chips basieren

### 1.4.1 Nachweis von SNPs aufgrund unterschiedlichen elektrophoretischen Laufverhaltens von DNS-Molekülen

Zu den Methoden, welche auf der elektrophoretischen Trennung von DNS-Fragmenten beruhen, zählen die Analyse von Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen („restriction fragment length polymorphisms, RFLP“, Botstein et al., 1980), die Temperaturgradienten-Gelelektrophorese („temperature gradient gel electrophoresis, TGGE“, Riesner et al., 1992), die Denaturierende-Gradienten-Gel-Elektrophorese („denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE“, Myers et al., 1985), die Analyse von Einzelstrang-Konformations-Polymorphismen („single strand conformation polymorphisms, SSCP“, Hayashi, 1991) sowie Heteroduplex-Analysen (HD, Keen et al., 1991; Grompe, 1993).

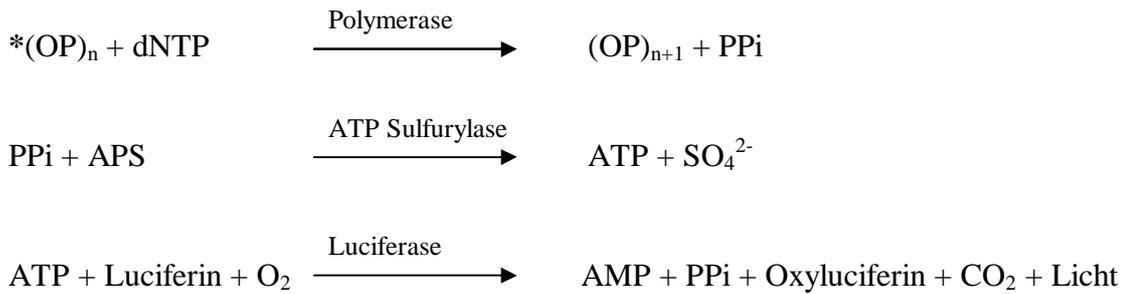
Diese Protokolle erlauben zwar den Rückschluss auf das Vorhandensein eines Polymorphismus, nicht aber eine genaue Typisierung. In der Regel schliesst sich deshalb die Sequenzierung auffälliger DNS-Moleküle an.

Der direkten DNS-Sequenzierung (Sanger et al., 1977) nach der Didesoxynukleotid-Methode liegt ebenfalls die elektrophoretische Auftrennung von DNS-Moleküle zugrunde.

### 1.4.2 Pyrosequenzierung

Die Pyrosequenzierung beruht im wesentlichen auf der Elongation eines Startermoleküls entlang des Matrizen-DNS-Strangs durch eine DNS-Polymerase. In jedem Schritt wird eines der vier Desoxynukleotidtriphosphate der Reaktion zugegeben, dessen Einbau über anschliessende weitere enzymatische Reaktionen

ermittelt wird, welche indirekt die Freisetzung von Pyrophosphat (PP<sub>i</sub>) messen (Ronaghi et al., 1998; Ronaghi et al., 2001; Ahmadian et al., 2000).



\* *Oligonukleotid-Primer*

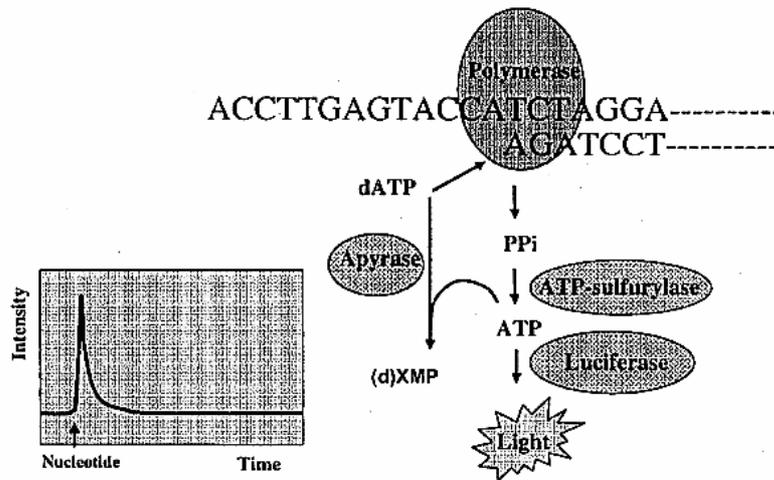


Abb.1.1: Schematische Darstellung einer Pyrosequenzierung in Lösung (nach Ronaghi et al., 2001).

### 1.4.3 Detektion von SNPs über Einzelbasenfehlpaarungen in DNS-Doppelsträngen

Eine weitere Methode zur Detektion von Mutationen basiert auf sogenannten "Molecular beacons". "Molecular beacons" sind Oligonukleotide, die aus einer einzelsträngigen DNS-Sonde bestehen, welche Homologie zur DNS-Matrize aufweist und, neben einem "Quencher-Molekül" am 3'-Ende, einen Fluoreszenzfarbstoff am 5'Ende trägt. Die räumliche Nähe der beiden Termini bedingt eine Hemmung des Fluoreszenzfarbstoffes. Im Falle einer Hybridisierung der Sondensequenz mit einer komplementären Matrize erfolgt eine Entfaltung und somit räumliche Trennung des 3' und 5' Endes, wodurch nach Anregung eine Lichtemission des Fluoreszenzfarbstoffes möglich wird. Bei Vorliegen einer Basenfehlpaarung, z.B. eines Einzelbasenpolymorphismus, zwischen der Sonden- und Matrizensequenz kann unter stringenten Bedingungen keine Hybridisierung erfolgen und folglich kein Fluoreszenzsignal gemessen werden (Tyagi, 1996; Tyagi et al., 1998).

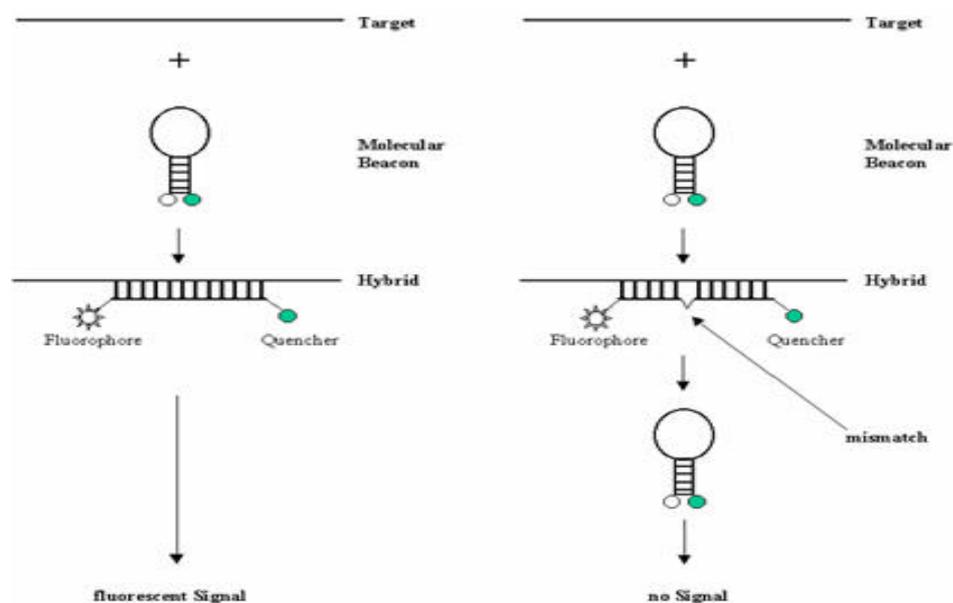


Abb.1.2: Schematische Darstellung der SNP-Typisierung durch "Molecular beacons" (nach Tyagi et al., 1996).

Die “Dynamic Allele Specific Hybridisation“ (DASH) ist eine Methode zur Typisierung von SNPs (Howell et al., 1999), welche mit Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatten durchgeführt wird. Als Erstes wird ein PCR-Fragment mit Hilfe von zwei Oligonukleotiden amplifiziert, welches den zu untersuchenden SNP enthält. Eines der beiden Oligonukleotide ist am 5`-Ende Biotin-markiert. Das ungereinigte PCR-Produkt wird anschließend auf die mit Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatten gegeben. Der eine Biotin-markierte Strang wird von Streptavidin gebunden, der ungebundene Strang wird durch Waschen entfernt. Anschließend wird ein spezifisches Oligonukleotid zur Einzelstrang-DNS hinzugefügt, um eine Hybridisierung mit der komplementären Sequenz zu erhalten. Durch das Hybridisieren bilden sich Doppelstränge, die mit Hilfe von interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen nachgewiesen werden können. Diese Schritte können automatisiert und auch durch den Einsatz verschiedener Oligonukleotide wiederholt werden.

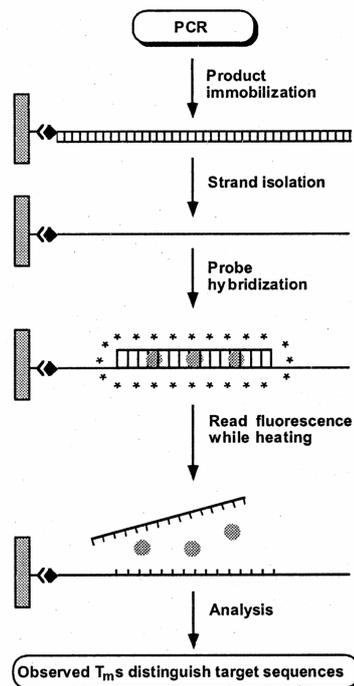
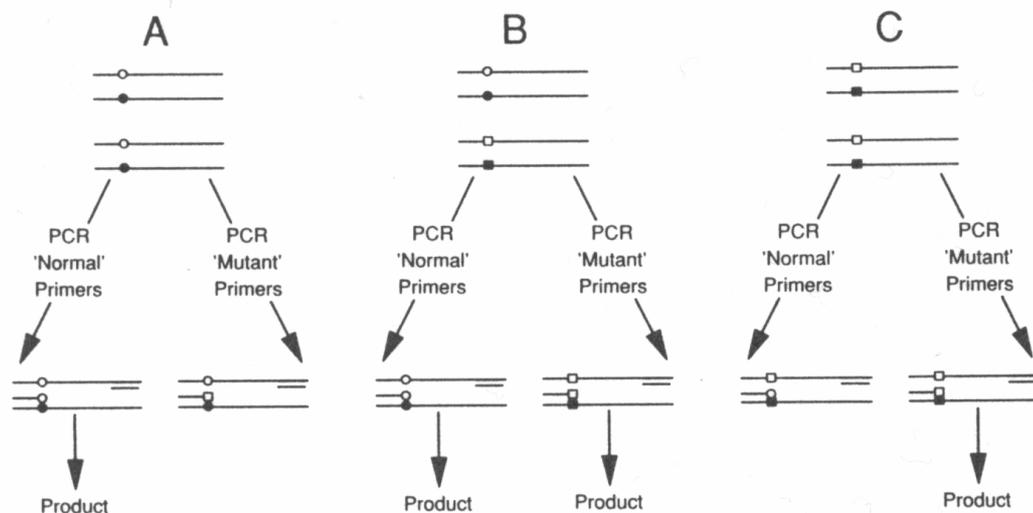


Abb.1.3: Schematische Darstellung der SNP-Typisierung durch “Dynamic Allele Specific Hybridisation“ (nach Howell et al., 1999).

### 1.4.4 Methoden, die auf einer enzymatischen Diskriminierung von Basenfehlpaarungen in Doppelstrang-DNS beruhen

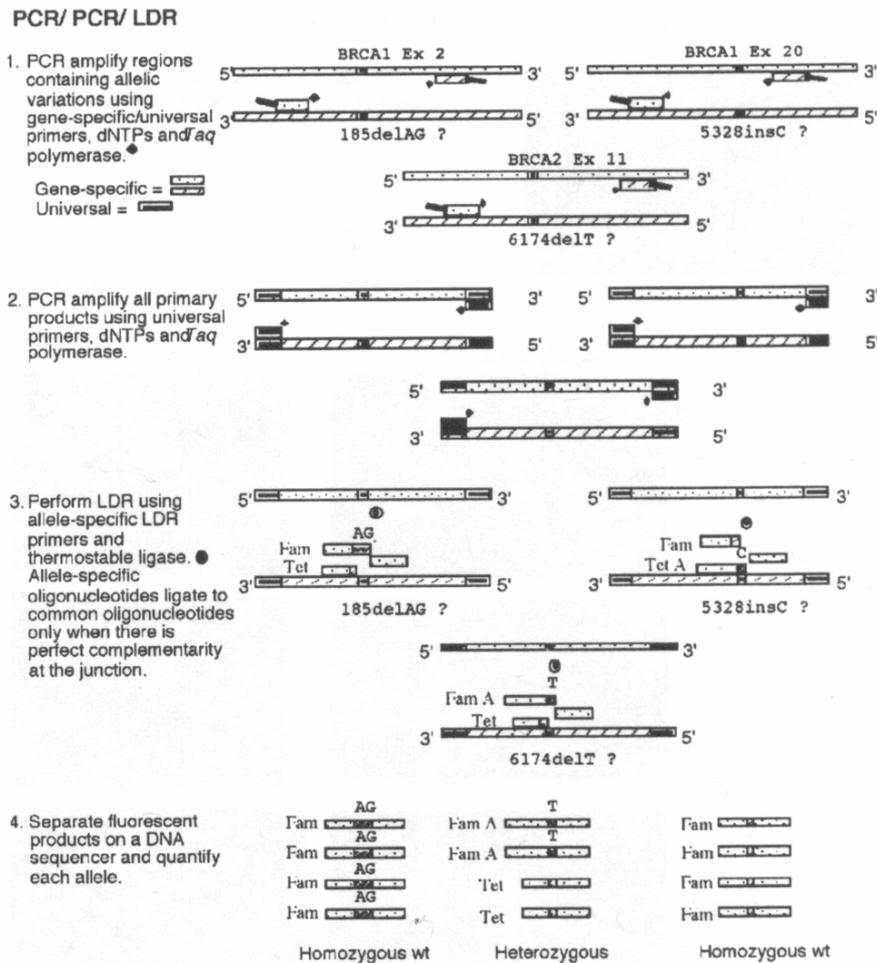
Die Allel-spezifische PCR (ASP) wird auch als "PCR-Amplifikation von spezifischen Allelen" (PASA) oder ARMS-Reaktion (amplification refractory mutation system, System der amplifizierungsresistenten Mutationen) bezeichnet. Ähnlich einer konventionellen PCR werden hier zwei Primer eingesetzt, von denen der eine am freien 3' Ende eine Base trägt, die dem Allelzustand eines dort lokalisierten SNPs trägt. In zwei parallelen PCR Ansätzen werden jeweils ein solcher Allel-spezifischer Primer und ein identischer zweiter Primer eingesetzt. Eine nicht 3'-5'korrekturlesende DNS Polymerase verlängert den Allel-spezifischen Primer nur dann, wenn seine Sequenz derjenigen der Matrizen-DNS komplementär ist, insbesondere derer am 3'-Ende (Newton et al., 1989; Sommers et al., 1989; Liu et al. 1997). Eine Amplifikation zeigt somit den Allelzustand des SNPs in der Matrizen-DNS an und wird entweder durch ein elektrophoretisch aufgetrenntes PCR Produkt oder der "Taq Man" Methode als Fluoreszenzsignal nachgewiesen.



**Abb.1.4:** Schematische Darstellung der SNP-Typisierung durch ARMS-Reaktion

(nach Newton et al., 1989).

Eine weitere Alternative zum parallelen Nachweis mehrerer SNPs beruht auf der von Favis et al. entwickelten PCR/PCR/LDR ("ligase detection reaction") Methode. Dabei wurden gleichzeitig mehrere interessierende Genabschnitte durch spezifische Primer in einer multiplex-PCR-Reaktion amplifiziert. Die PCR-Produkte werden anschließend in einer zweiten Reaktion unter Verwendung universeller Primer amplifiziert, was eine weitgehend verzerrungsfreie Amplifikation dieser Sequenzen ermöglicht. Im Anschluß daran werden die SNPs mit verschiedenen Fluoreszenz-markierten Oligonukleotiden ligiert und mithilfe eines automatischen DNS-Sequenzers getrennt. Die Unterscheidung der Allele erfolgt durch Verwendung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe.



**Abb.1.5:** Schematische Darstellung der PCR/PCR/LDR Methode zur Typisierung von SNPs (nach Favis et al., 2000).

## 1.5 Bestimmung von SNPs mit Hilfe von Oligonukleotid-Chips

### 1.5.1 Chiptechnologie

Methodische Entwicklungen zur gleichzeitigen Bestimmung vieler SNPs in einem Experiment sind Gegenstand aktueller Forschung (Landegren et al. 1998). Am weitesten vorangeschritten ist hier sicherlich die Chip-Technologie, bei der an Glasobjektträger gebundene Allel-spezifische Oligonukleotide zur SNP-Typisierung eingesetzt werden (Guo et al., 1994; Hacia et al., 1996; Hacia et al., 1999; Winzeler et al., 1998; Wang et al., 1998).

Die Herstellung von geordneten, kleinformatigen DNS-Klonrastern auf festen Oberflächen, sogenannten "Microarrays", ist im Begriff, viele Bereiche der genetischen Forschung zu revolutionieren, z.B. die Kopplungsanalyse (Risch et al., 1996; Schork et al., 1998; Reich et al., 2001;) die Suche nach unbalancierten Chromosomenaberrationen (Solinas-Toldo et al., 1997; Lucito et al., 2000; Snijders et al., 2001; Wessendorf et al., 2002; Veltman et al., 2002) und die Aufklärung der Funktion von Genen durch systematische Erfassung gewebs- und entwicklungspezifischer Genexpressionsprofile (Johnston et al., 1998; Ramsay et al., 1998; Marshall et al., 1998; Brown et al. 1999; Duggan et al., 1999)

Die vielfältigen Möglichkeiten, welche aus der Einführung von DNS-Chips ergeben, sind in zahlreichen Übersichtsartikeln beschrieben (Johnston et al. 1998; Ramsay et al., 1998; Marshall, 1998). Basierend auf Nylon- oder Nitrozellulosefilter, die Klone in sehr hoher Dichte enthalten (>10.000 Klone je 20cmx20cm, Lehrach et al. 1990; Maier et al. 1994), wurden verschiedene Methoden entwickelt, um kleine Volumina von DNS-haltigen Lösungen in hoher Dichte auf festen Oberflächen aufzubringen, wobei als Träger meist Glas verwendet wird. Dabei unterscheidet man zwischen dem Aufbringen vorab synthetisierter DNS-Sonden und der Synthese von Oligonukleotide *in situ* mit Hilfe von photolithographischer Methoden (Southern et al. 1992, Pease et al. 1994; Lipshutz, et al., 1999). Bei der auf Chips fixierten DNS, in der vorliegenden Arbeit als Sonde bezeichnet, handelt es sich je nach Fragestellung um Oligonukleotide, PCR

Produkte, Plasmide, oder artifizielle Chromosomen (BAC, PAC Klone). Die Hybridisierung erfolgt mit radioaktiv- oder Fluoreszenz-markierten Zielsequenzen (Targets), wobei sich die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen durchzusetzen scheint. Für die nachfolgende Analyse der Hybridisierungen ist ein Lesegerät (Laser-Scanner, CCD-Kamera oder Phosphorimager) erforderlich. Je nach Konzentrationsverhältnis und Komplexität der Proben ist ein Nachweis im attomolaren Bereich möglich.

### 1.5.2 SNP Nachweis mit Hilfe von Oligonukleotid-Chips durch einfache Hybridisierung

Die Typisierung von SNPs mit Oligonukleotid-Chips wurde entscheidend durch die Firma Affymetrix (Santa Clara, Kalifornien) vorangetrieben.

Das Verfahren beruht auf der Hybridisierung von Fluoreszenz-markierten SNP-enthaltenden DNS-Targets, welche mit auf Chips immobilisierten Oligonukleotid-Sonden DNS-Doppelstränge ausbilden.

Unter stringenten Hybridisierungs- und Waschbedingungen führen Basenautausche ("mismatches") in DNS-Doppelsträngen zu einer geringeren Bindung und resultieren in einer deutlich reduzierten Intensität des Hybridisierungssignals. Der Einfluß von Einzelbasenunterschieden zwischen der Sonde und Target auf die Ausbildung von DNS-Doppelsträngen ist von der Position des Basenunterschiedes in der Sequenz und in der Sondensequenz allgemein abhängig. Interne Einzelbasenunterschiede hemmen die Ausbildung von DNS-Doppelsträngen stärker als terminale Einzelbasenunterschiede. Aufgrund der Sequenzabhängigkeit der Hybridisierung bei dieser Technik für jeden SNP-Allel, werden typischerweise 25 überlappende Oligonukleotid-Sonden von 25 bp Länge eingesetzt; für zwei verschiedene Allele werden also 50 verschiedene Oligonukleotid-Sonden benötigt. Fluoreszenzsignale aller 25 Oligonukleotide des einen Allels werden in einem Computerprogramm integriert und mit den Signalintensitäten der 25 Oligonukleotide des anderen Allels verglichen (Hacia 1999). Diese Technik

erfordert daher eine sehr hohe Dichte von Oligonukleotiden auf dem DNS-Chip, die nur durch *in situ* Synthese erreicht werden kann (Pease et al. 1994).

Das Auftrennungsvermögen dieser Methode läßt sich mit Hilfe von Mikrochips verbessern, wobei der Nachweis von Basenfehlpaarungen durch Anlegen eines variablen elektrischen Feldes erleichtert wird (Sosnowski et al., 1997; Gilles et al., 1999). Ausserdem kann durch die Verwendung von modifizierten Nukleotiden und chaotropischen Agentien der Allel-spezifischen Hybridisierung eine verbesserte Diskriminierung erreicht werden (Nguyen et al., 1999).

### 1.5.3 SNP Nachweis mit Hilfe von Oligonukleotid-Chips durch enzymatische Methoden

Neben der einfachen Allel-spezifischen Hybridisierung lassen sich enzymatische Methoden mit der DNS-Chip-Technologie zur Typisierung von Basenaustauschen kombinieren. Dabei wird die Fähigkeit von DNS-Ligasen, reversen Transkriptasen und DNS-Polymerasen ausgenutzt, terminale Basenfehlpaarungen in DNS-DNS- oder DNS-RNS- Doppelsträngen zu unterscheiden.

### 1.5.4 Detektion von SNPs mit Hilfe von DNS-Ligase

SNPs können durch Oligonukleotid-Chips in Kombination mit DNS-Ligase-Reaktionen analysiert werden. Nach der räumlichen Annäherung einer Oligonukleotid-Sonde und der zu untersuchenden SNP-enthaltenden Zielsequenz, die beide komplementär zu einer DNS-Matrize sind, können diese im Fall einer korrekten Basenpaarung am freien Allel-spezifischen 3' Ende mittels einer DNS-Ligase verknüpft werden. Der Allelzustand wird nach einem Waschschrift über die Detektion des ligierten Fluoreszenz-markierten

Targets wiedergeben (Landegren et al., 1988; Wu et al. 1989; Parik et al., 1993; Samiotaki et al., 1994; Grossman et al., 1994; Day et al., 1995; Lou et al., 1996; Gunderson et al., 1998;).

Gunderson et al., entwickelten eine auf diesem Prinzip beruhende Chip-basierte Methode, mit deren Hilfe Sequenzvarianten analysiert werden können. Diese beruht auf einer Ligation von zu unterscheidenden DNS-Sequenzen auf dichten Oligonukleotid-Mikrorastern (siehe Abb.1.6). Es wurde mit spezifischen 9-mer Oligonukleotidsequenzen gezeigt, dass eine DNS Zielsequenz von 1.2 kb vollständig und mit einer Genauigkeit > 99,9% analysiert werden kann.

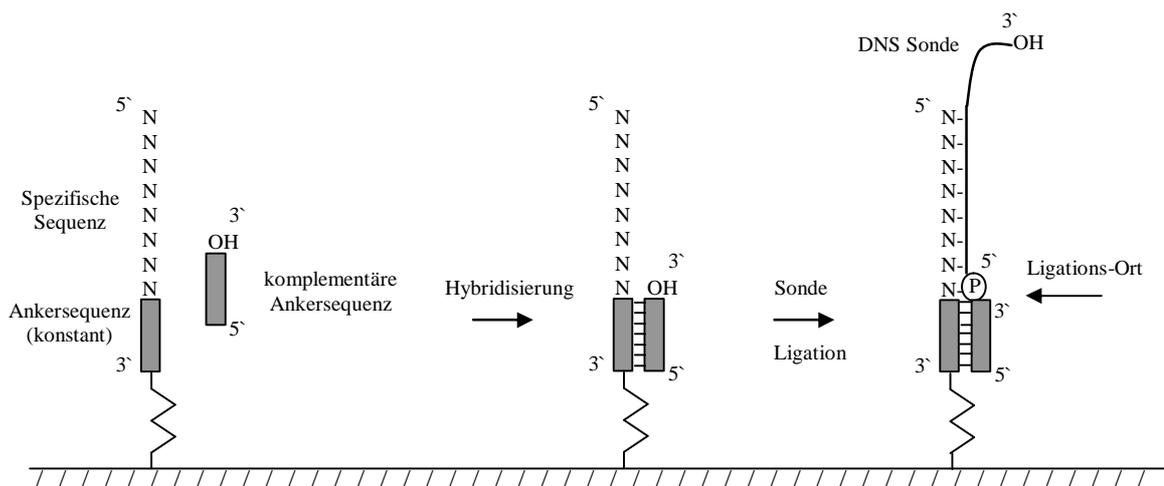


Abb.1.6: Schematische Darstellung der Allel-spezifischen Ligrationsreaktion auf Oligonukleotid-Chips (nach Gunderson et al., 1998).

### 1.5.5 Detektion von SNPs mit Hilfe von reverser Transkriptase

Kürzlich wurde ein Allel-spezifisches Primer-Elongationssystem beschrieben (Pastinen et al., 2000), welches eine RNS-Matrize anstelle einer DNS-Matrize verwendet, die mittels einer reversen Transkriptionsreaktion hergestellt wurde. Zur Typisierung des Allelzustandes wurden je nach Zielsetzung ein oder zwei Fluoreszenzfarbstoffe in die Reaktion eingesetzt. Eine DNS-Polymerase verlängert bei diesem System das Oligonukleotid durch Einbau eines Fluoreszenzfarbstoffes nur dann, wenn das Target zum 3'-Ende des Oligonukleotides komplementär ist. Das Oligonukleotid ist nach der Extension Fluoreszenz-markiert und kann mit Hilfe eines Laser-Scanners detektiert werden. (Pastinen et al., 2000).

### 1.5.6 Nachweis von SNPs mit Hilfe von DNS-Polymerasen

Für die Typisierung von SNPs mit Hilfe von Mikrorastern und DNS-Polymerasen gibt es zwei eingeführte Methoden.

Bei der Kettenabbruchreaktion auf Chips, auch als Minisequenzierung bezeichnet, werden Oligonukleotide mit ihrem 5'-Ende an die Chipoberfläche gebunden (Syvänen et al. 1990). Für die SNP-Typisierung werden zwei Oligonukleotide ausgewählt, die sich nur in ihrer letzten Base am 3'-Ende unterscheiden, und dort den beiden SNP-Allelen entsprechen. In vier getrennten Reaktionen wird jeweils radioaktiv markiertes ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP zugegeben oder mit 2-4 unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte ddNTPs in der gleichen Reaktion eingesetzt. Eine DNS-Polymerase verlängert das Oligonukleotid nur dann, wenn sich während der Hybridisierung des Targets der entsprechende DNS-Strang anlagern konnte und das zur Sequenz komplementäre ddNTP im Reaktionsansatz vorhanden ist. Das Oligonukleotid ist nach Extension um die entsprechende Base radioaktiv oder Fluoreszenz-markiert und kann detektiert werden. Auf diese Weise erhält man sehr viel bessere Signal-

Hintergrund-Verhältnisse (die Werte liegen um 50) und eine um 10-fach bessere Diskriminierung als durch die Allel-spezifische Hybridisierung (Pastinen et al., 1997).

Eine ähnlich hohe Allel-Spezifität wurde bei einer modifizierten Minisequenzierungs-Methode zur Detektion von SNPs erhalten, bei denen die Oligonukleotid-Sonden auf Objektträger immobilisiert wurden, die eine Polyacrylamid-Gel-Oberfläche enthielt (Dubiley et al., 1999).

## **1.6 Mitochondriale DNS als Modellsystem zur Detektion von SNPs**

Mitochondrien sind semiautonome Kraftwerke der Zelle, in denen wichtige Stoffwechselwege wie die  $\beta$ -Oxidation, der Carnitin-abhängige transmembranäre Transport von Fettsäuren, der Krebszyklus und die Atmungskette ablaufen. Sie dienen der Energiegewinnung und sind somit essentiell für jede Zelle. Mitochondrien besitzen ein eigenes ringförmiges, doppelsträngiges Genom (mtDNS), das an die innere Membran gebunden ist und in mehreren tausend identischen Kopien pro Zelle vorliegt. MtDNS macht rund 0,5% der gesamten DNS einer Zelle aus. Die mtDNS Sequenz besteht aus 16569 bp und wurde erstmals von Anderson et al. (1981) vollständig sequenziert. Das mitochondriale Genom kodiert 37 Gene, von denen 28 auf dem H(heavy)-Strang und neun Gene auf dem L(light)-Strang liegen. Die Bezeichnung H-Strang und L-Strang leiten sich aus dem unterschiedlichen spezifischen Gewicht im CsCl-Gradienten ab, welches auf einem unterschiedlichen G/C Gehalt beruht. Die meisten Gene liegen auf dem H-Strang, je ein Gen für die 12S und die 16S-rRNS, 14 Gene für tRNSs und 12 Protein-kodierende Gene. Auf dem L-Strang des Menschen liegen 8 tRNS-Gene und ein Protein-kodierendes Gen (Anderson et al., 1981; Wallace et al., 1995). Im Bereich des D-Loops liegen zwei Promotoren, je einer für die Transkription des H- und des L-Strangs, was bedeutet, dass die Transkription dieses Abschnitts des mitochondrialen Genoms ausnahmsweise symmetrisch abläuft. Die von

der mitochondrialen DNS kodierten Proteine werden auch mitochondrial transkribiert und translatiert. Zusätzliche in Mitochondrien lokalisierte Proteine werden von der Kern-DNS kodiert, durch zytoplasmatische Ribosomen translatiert und schließlich in die Mitochondrien eingeschleust. Ein wichtiger Unterschied zwischen der Kern-DNS und der mtDNS besteht in ihren Vererbungsmustern. Die mtDNS wird maternal vererbt, d.h. sowohl Söhne als auch Töchter erhalten ihre Mitochondrien ausschließlich von der Mutter (Giles et al., 1980). Mitochondriale DNS kann aus Zellen der meisten Gewebe, einschließlich Speichel, Knochen (Kurosaki et al., 1993), Haaren (Hopgood et al. 1992) und Zähnen (Ginther et al., 1992) isoliert werden. Da in einer einzelnen Zelle bis zu mehrere hundert Mitochondrien enthalten sein können (Bogehagen, 1974; King, 1989), benötigt man im Gegensatz zur Kern-DNS für die Untersuchung von mtDNS nur wenig Gewebematerial. Die Mutationsrate der mtDNS ist sehr viel höher als die Kern-DNS, da die mitochondriale DNS weder durch Histone geschützt ist, noch einen so hoch effizienten DNS-Reparatur-Mechanismus besitzt, wie es im Kern der Fall ist (Croteau et al., 1997; Wallace et al., 1994). Unter Homoplasmie versteht man das Vorliegen identischer mtDNS Moleküle in einer Zelle. Wenn in einer Zelle eine Mutation in einer der vielen mtDNS Moleküle auftritt, folgt daraus, daß in dieser Zelle eine Mischung von mutierten und Wildtyp-Molekülen vorliegt. Dieser Zustand wird als Heteroplasmie bezeichnet. Während der Teilung einer heteroplasmischen Zelle werden die Mutanten und Wildtyp-mtDNS-Moleküle zufällig auf die Tochterzellen weitergegeben. Das Ergebnis vieler Zellteilungen über mehrere Generationen kann zur Trennung in Zellen mit reiner Mutanten-mtDNS oder reiner Wildtyp-mtDNS (Homoplasmie) führen. Dieser Prozess wird als replikative Segregation bezeichnet (Wallace et al., 1992). Es gibt eine große Zahl von Krankheiten, welche durch Defekte in mitochondrial kodierten Genen bedingt sind. Bisher wurden 122 krankheitsassoziierte Mutationen der mtDNS nachgewiesen, welche u.a. in Zusammenhang mit neuromuskulären Erkrankungen, Diabetes, Taubheit und Augenkrankheiten stehen (Hofmann et al., 1997; Wallace, 1999; Liang, 1998).

Da die mtDNS einem maternalen Erbgang folgt, bleibt das Genom in der mütterlichen Linie konstant und kann für anthropologische Fragestellungen, anwendungsbezogene

Probleme bei der Stammbaumanalyse, populationsgenetische Studien und zur Identifizierung menschlicher Überreste herangezogen werden. Neuere Untersuchungen belegen, dass Veränderungen der mtDNS bei weitaus häufiger an der Entstehung von Krankheiten beteiligt sind, als bisher angenommen (Hofmann et al., 1997; Nielsen, 2000).

Im Rahmen forensischer Untersuchungen werden die hypervariablen Regionen 1 und 2 typisiert, da diese Regionen durch eine hohe Sequenzvariabilität charakterisiert sind. Typischerweise werden dafür einige hundert Basenpaare der beiden hypervariablen Regionen PCR amplifiziert (Vigilant et al., 1989; Butler et al., 1998) und anschließend sequenziert (Sullivan et al., 1992; Hopgood et al., 1992). Es wird geschätzt, dass die Sequenz der hypervariablen Regionen bei nichtverwandten Individuen in 1-3% der DNS-Bausteine unterscheiden (Piercy et al., 1993).

Aufgrund seiner Kleinheit und der großen Zahl polymorpher und krankheitsassoziierter Basenaustausche (siehe <http://www.gen.emory.edu/mitomap.html>) eignet sich das mitochondriale Genom in besonderer Weise als Modellsystem für die Entwicklung von Verfahren zur SNP-Typisierung.

## 1.7 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zur Detektion von SNPs mittels DNS-Chips zu entwickeln. Das Verfahren sollte einfach durchführbar sein und einen hohen Sondendurchsatz erlauben. Weitere Anforderungen waren eine hohe Sensitivität (Signal- Hintergrund-Verhältnis) und Spezifität, d.h. die zuverlässige Diskriminierung allelischer SNP-Marker. Zu Beginn der Arbeit waren DNS-Chip basierende Verfahren zur Detektion von SNPs beschrieben, die auf einer Allel-spezifischen Hybridisierung oder einer enzymatischen Reaktion durch eine DNS-Polymerase in der "Minisequenzierungsreaktion" beruhten. In dieser Arbeit sollte ein neues Prinzip basierend auf einer Allel-spezifischen Elongationsreaktion mit Hilfe einer DNS-Polymerase auf DNS-Chips entwickelt werden. Ein solches Verfahren war davor nur in Lösung, nicht aber auf DNS-Chips beschrieben worden.