

3. Methodik

3.1 Kopplungsanalyse

Unter Kopplung versteht man die Eigenschaft von Genen oder allgemein von DNA-Sequenzen, aufgrund ihrer räumlichen Nähe auf einem Chromosom zusammen vererbt zu werden (Strachan and Read 1996, Glossar, S.717). Die Wahrscheinlichkeit einer Kopplung steigt, je näher sich die Genorte sind. Umgekehrt steigt die Wahrscheinlichkeit der zufälligen Trennung zweier Loci, je weiter sie voneinander entfernt liegen. Die Trennung erfolgt beim crossing over während der Meiose, bei der homologe Chromosomenabschnitte rekombiniert und somit ausgetauscht werden. Im Ergebnis können die vererbten elterlichen Gameten rekombinant oder nicht-rekombinant in Bezug auf das Verhältnis zweier Genloci zueinander sein. Bei der Kopplungsanalyse werden Mikrosatellitenmarker oder andere polymorphe Sequenzen untersucht, die über das gesamte Genom verteilt vorkommen. Es sollen diejenigen Marker identifiziert werden, die mit dem genetischen Defekt gekoppelt sind, d.h. auf dem Genom in seiner Nähe liegen und folglich mit ihm gemeinsam vererbt werden. Die Bewertung von Kopplungsanalysen erfolgt statistisch in dem man die Wahrscheinlichkeit dafür, dass die Loci gekoppelt sind, zu der Wahrscheinlichkeit, dass sie nicht gekoppelt sind, ins Verhältnis setzt. Dieses Verhältnis als Logarithmus mit der Basis 10 ausgedrückt, wird als LOD-Score bezeichnet. Eine Kopplung wird als signifikant betrachtet, wenn der LOD-Score über 3,0 liegt.

3.2 PCR und Sequenzanalyse

Für Sequenzanalysen werden größere Mengen der entsprechenden DNA benötigt. Daher wird der Sequenzanalyse meist eine Vervielfältigung des zu untersuchenden DNA-Fragments durch eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vorgeschaltet. Die PCR-Methode wurde 1985 von Saiki et al. erstmals beschrieben. Es handelt sich bei der Polymerasekettenreaktion um eine Methode der enzymatischen in vitro-Replikation einer durch spezifische „primer“ genau definierten Zielsequenz. Durch den Einsatz der DNA-Polymerase konnte die Technik der PCR automatisiert werden. Durch PCR wurde eine höhere Ausbeute an spezifischen Amplifikationsprodukten erreicht und die Möglichkeit geschaffen, auch größere Ausgangssequenzen von bis zu mehreren 1000bp zu amplifizieren.

Die Sequenzierung ermöglicht die Darstellung der genauen Basenfolge von zu untersuchenden DNA-Abschnitten. Sie ist somit das genaueste Verfahren zum Nachweis von Punktmutationen. Die DNA-Sequenzierung wurde nach dem Prinzip der

Kettenabbruchmethode von Sanger durchgeführt (Sanger, Nicklen et al. 1977). Mit Hilfe eines Primers und geeigneter Nukleotide kann eine DNA-Polymerase den komplementären Strang von einzelsträngiger Matrizen-DNA synthetisieren. Die Sequenzierung erfolgt, indem 2'-Desoxynucleosid-Triphosphate (dNTPs) und 2'-3'-Dideoxynucleosid-5'-Triphosphate (ddNTPs), denen eine 3'-Hydroxylgruppe fehlt, als Substrat für die DNA-Polymerase eingesetzt werden. Die DNA-Polymerase baut bei der Synthese am freien 3'-Hydroxylende dNTPs ein. Wenn ddNTPs eingebaut werden, kommt es zu einem Kettenabbruch. Statistisch kann dies an jedem Nukleotid geschehen, so dass ein Gemisch von DNA-Strängen mit identischem 5'-Ende, aber variablem 3'-Ende entsteht (Sambrook et al. 1989). Die ddNTPs sind mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. In dieser Arbeit wurden fluoreszent markierte ddNTPs eingesetzt (ddATP = grün, ddTTP = rot, ddCTP = blau, ddGTP = schwarz). Dies erlaubt später zwischen den vier verschiedenen Basen aufgrund der unterschiedlichen spektralen Eigenschaften (Anregungs- und Emissionsspektrum) dieser Farbstoffe zu unterscheiden. Die Reaktionsprodukte werden anschließend im elektrischen Feld in einer Matrix getrennt. Durch die Farbmarkierung werden die DNA-Segmente bei der Gelelektrophorese im Sequenziergerät erkannt. Zur Ermittlung der DNA-Sequenzen in der vorliegenden Arbeit wurde das ABI Prosm Sequencing System verwendet.

3.3 FISH

Das Prinzip der FISH-Methode besteht darin, eine DNA-Sequenz, die spezifisch für ein bestimmtes Chromosom oder Gen ist, als Sonde zu verwenden und mit den Metaphasechromosomen einer zu prüfenden Probe zu hybridisieren. Dabei muss zunächst sowohl die DNA der Sonde als auch der Chromosomenprobe durch Denaturieren in eine einzelsträngige Form überführt werden. Dann erfolgt für die *in situ* Hybridisierung die Zugabe der Sonden-DNA zu den Chromosomen. Bei Vorliegen komplementärer Stränge in Sonde und Chromosomenprobe bilden sich in den Chromosomen DNA-Doppelstränge (Hybridstränge) aus Sonden- und Proben-DNA. Zum Zweck der Markierung wird die Sonden-DNA mit fluoreszierenden Substanzen markiert. Im Fluoreszenzmikroskop fluoreszieren dann diejenigen Chromosomen oder chromosomale Regionen, an welchen die Sonde hybridisiert hat. Dadurch lassen sich Chromosomenaberrationen nachweisen, die mit einer konventionellen Chromosomenanalyse nicht zu erfassen sind, z.B. Mikrodeletion, die unterhalb des Auflösungsvermögens der konventionellen Analyse liegen.