

2 Patienten und Methoden

2.1 Patienten und methodisches Vorgehen

2.1.1 Untersuchung deutscher Neugeborener auf Mutationen im *NBS1*-Gen

Zur Abschätzung der Frequenz heterozygoter Merkmalsträger der häufigsten Mutation 657del5 und weiterer Mutationen im *NBS1*-Gen innerhalb der deutschen Bevölkerung wurden insgesamt 2146 auf Guthrie-Cards fixierte Blutproben von Neugeborenen untersucht. Hierbei handelte es sich zum einen um 990 Blutproben aus dem Neugeborenen-Screening-Programm der Charité – Universitätsmedizin Berlin (Campus Virchow-Klinikum), die in den Jahren 1998-2000 bei in Berlin geborenen Kindern entnommen worden waren. Zum anderen stammten 1056 auf Guthrie-Cards fixierte Blutproben von Neugeborenen, die in das Modellprojekt „Neugeborenen-Screening im Bundesland Bayern“ aufgenommen worden waren. Unter der Koordination des Landesuntersuchungsamtes für das Gesundheitswesen Südbayern wurden hierbei Guthrie-Cards von Neugeborenen berücksichtigt, bei denen die Postleitzahl der Einsender mit der Zahl 95 (Raum Bayreuth) begann. Die Proben wurden in den Monaten Oktober und November 2000 zusammengetragen. Für die Untersuchung der Proben lagen die Zustimmung der Ethikkommission der Charité bzw. des Bayerischen Landesbeauftragten für den Datenschutz vor.

Die aus den Guthrie-Cards gewonnenen DNA-Proben aller Neugeborenen wurden unter Verwendung der Methoden der Polymerase-Kettenreaktion, der Agarose- und SSCP-Gel-Elektrophorese sowie schließlich der DNA-Sequenzierung auf eventuell vorhandene Mutationen im *NBS1*-Gen gescreent.

2.1.2 Untersuchung polnischer Tumorpatienten

Neben der Untersuchung von Neugeborenen-Blutproben aus den zwei deutschen Studienzentren wurden darüber hinaus Blutproben von insgesamt 589 polnischen Patienten untersucht, in deren Krankengeschichte zuvor ein maligner Tumor diagnostiziert worden war. Es handelte sich hierbei um Patienten, die zur Behandlung ihres Tumorleidens in den Jahren 2000-2001 an das M. Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center und Institut für Onkologie der Universitätsklinik Warschau überwiesen und dort therapiert worden waren. Alle Patienten stammten aus der Woiwodschaft Masowien, einem in Zentralpolen gelegenen Verwaltungsbezirk, der auch die Stadt Warschau mit einbezieht. Die Studie wurde von der Ethikkommission des M. Skłodowska-Curie

Memorial Cancer Center genehmigt, die teilnehmenden Patienten gaben ihr Einverständnis zur Untersuchung der Materialien.

Entsprechend ihrer zuvor diagnostizierten Tumorerkrankung wurden die 589 Patienten zunächst verschiedenen Gruppen zugeordnet (siehe Tabelle 6). Einige Tumorarten, beispielsweise Pankreas- und Magenkarzinome oder Leber- und Hirntumoren, waren unter den einbezogenen Patienten lediglich bei einer sehr geringen Patientenanzahl nachgewiesen worden. Tumorgruppen mit weniger als 15 Patienten wurden deshalb zu einer Gruppe zusammengefasst. Die Patientenstruktur stellte sich insgesamt wie folgt dar:

Tumorart	Anzahl der untersuchten Patienten
Kolorektales Karzinom	123
Mammakarzinom	103
Hodentumor	100
Weichteilsarkom	64
Malignes Melanom	43
Osteosarkom	39
Bronchialkarzinom	27
Non-Hodgkin-Lymphom	24
Hodgkin-Lymphom	16
Weitere Tumorarten mit jeweils <15 Patienten	50
Summe	589

Tabelle 6: 589 polnische Patienten und deren Tumorerkrankungen.

Die aus Guthrie-Cards gewonnenen DNA-Proben aller Patienten wurden auf im *NBS1*-Gen eventuell vorhandene Mutationen gescreent. Hierbei wurden, wie schon bei den untersuchten Blutproben der Neugeborenen aus Berlin und der Region Bayreuth, die Methoden der PCR, Agarose- und SSCP-Gel-Elektrophorese sowie die DNA-Sequenzierung verwendet.

Um auf der Grundlage der gewonnenen Ergebnisse eine Bewertung vornehmen zu können, ist auch die Frequenz verschiedener Mutationen im *NBS1*-Gen innerhalb einer Kontrollgruppe zu

berücksichtigen. Die vorgenommenen Untersuchungen an den Blutproben der polnischen Tumorpatienten waren Teil einer sehr breit angelegten Studie von Steffen et al. (2004), im Rahmen derer die Prävalenzen verschiedener *NBS1*-Genmutationen innerhalb von Patientengruppen mit Tumoren unterschiedlicher Entitäten in ihrer Vorgeschichte evaluiert werden sollten. Da es schwierig war, eine Kontrollgruppe bestehend aus Individuen mit vergleichbaren Merkmalen wie dem Alter, dem Geschlecht und der Herkunft äquivalent zu denjenigen der Tumorpatienten zu finden, wurde eine Kontrollgruppe bestehend aus 1620 Individuen des Neugeborenen-Screening-Programms der Woiwodschaft Masowien festgelegt. Für den statistischen Vergleich der Anzahl heterozygoter Merkmalsträger unter den Patienten mit einer bestimmten Tumorart mit der Anzahl solcher heterozygoter Merkmalsträger innerhalb der Kontrollgruppe wurde „Fishers exakter Test“ verwendet.

Um einen Zusammenhang zwischen dem Verlust an intakten *NBS1*-Wildtyp-Allelen und einer malignen Entartung zu evaluieren, wurden schließlich, soweit verfügbar, von allen identifizierten 657del5-Heterozygoten DNA-Proben des peripheren Blutes und der Tumorgewebe auf die enthaltenen Anteile an Wildtyp- und 657del5-Allelen untersucht. Hierzu wurde die Methode der „real time PCR“ verwendet.

2.2 Molekulargenetische Methoden

2.2.1 Geräte und Materialien

Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Elektrophoresekammer	SUNRISE 96	Life Technologies
	HORIZON 1114	Gibco BRL
Fluoreszenzmessgerät	FluorImager SI mit Image-Quant Software	Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA
Mikrowelle		Robert Bosch GmbH, Deutschland
Pipetten		Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Real-time PCR-Gerät	ABI 7500 Real Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, USA
Sequenziergerät	ABI PRISM 310 Genetic Analyser mit Software Sequencing Analysis 3.4.1	Applied Biosystems, Foster City, USA

Spektralphotometer	GeneQuant II	Pharmacia Biotech, Freiburg
SSCP-Gelelektrophorese-Gerät (vertikale Elektrophoresekammer)		BioRad, Hercules, CA, USA
Thermocycler	GeneAmp PCR System 9600	Perkin Elmer, Boston, USA
Videokamera (Agarose-Gel-Auswertung) mit EASY Plus Software		Herolab GmbH, Wiesloch, Deutschland
Waage	BP 3100 S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

Chemikalien und Biochemikalien

Substanzen	Hersteller
Acrylamid	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
APS (Ammoniumpersulfat)	BioRad, München, Deutschland
Big Dye [®] Terminator Mix	Applied Biosystems, Foster City, USA
Bisacrylamid	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Borsäure	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DNTP-Set	Invitak GmbH, Berlin, Deutschland
DdNTP-Set	Invitak GmbH, Berlin, Deutschland
EDTA (Ethylendiamin-Tetraessigsäure)	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Boehringer Mannheim GmbH, Deutschland
Oligonukleotid-Primer	MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
Orange G (Laufpuffer)	Merck, Darmstadt, Deutschland
SYBRgreen Fluoreszenzfarbstoff	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Taq-Polymerase (5 U/l)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
TaqMan [®] 2x Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, USA
TEMED (Ethylendiamin-Tetraessigsäure)	BioRad, München, Deutschland
Tris (2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol)-Base	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
1-kb-DNA-Marker	Gibco BRL

Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
MinElute PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
PCR-Tubes ultradünn (0,2 ml)	Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
96-Well-Platten	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate und Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems, Foster City, USA

2.2.2 DNA-Amplifikation mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Vervielfältigung des zu untersuchenden Genabschnitts im Exon 6 des *NBS1*-Gens wurde die Methode der Polymerasekettenreaktion (abgekürzt PCR = engl. polymerase chain reaction) verwendet (Saiki et al. 1985 und 1988). Das Reaktionsprinzip der PCR entspricht der Replikation (Verdopplung) der DNA in der Zelle: Eine DNA-Polymerase, also ein spezielles DNA-vervielfältigendes Enzym, synthetisiert neue DNA entlang einer vorhandenen Nukleinsäure-Matrize. In der Zelle benötigt das Enzym dazu einen sogenannten RNA-Primer, ein Nukleinsäuremolekül, das mit dem Matrizenstrang hybridisiert und von der DNA-Polymerase als Startmolekül verwendet wird. Im Reagenzglas werden hierzu künstlich synthetisierte Oligonukleotidprimer verwendet. Dabei handelt es sich um kurze, einzelsträngige DNA-Moleküle, die komplementär zu den definierten Enden einer DNA-Sequenzvorlage sind. Diese Startmoleküle flankieren ein gewünschtes, zwischen ihnen liegendes Fragment, das amplifiziert werden soll. Für eine Polymerasekettenreaktion werden also eine DNA-Matrize, eine DNA-Polymerase, Desoxynukleotide, zwei Oligonukleotide als Primer sowie ein geeignetes Puffersystem benötigt.

Die gesamte Reaktion basiert auf drei Teilschritten, die bei unterschiedlichen Temperaturen ablaufen und mehrfach wiederholt werden. Grundvoraussetzung für eine PCR ist zunächst, dass die DNA in ihren Einzelsträngen vorliegt. In einem ersten Schritt, Denaturierung genannt, wird hierzu der DNA-Doppelstrang bei einer Temperatur von etwa 95° C in Einzelstränge aufgespalten. Diese Trennung wird vollzogen, da sich die Wasserstoffbrücken zwischen den komplementären Nukleotidpaaren lösen. Während des zweiten Schrittes, dem sogenannten Annealing, hybridisieren die Oligonukleotidprimer bei einer Temperatur von etwa 53° C mit den beiden DNA-

Matrizensträngen. Sie dienen damit im dritten Schritt (Polymerisation bei ca. 72° C) der DNA-Polymerase als Startmoleküle des Polymerisationsvorgangs entlang des Matrizenstrangs. Das Enzym DNA-Polymerase verlängert in Gegenwart von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) die Primer entlang der einzelsträngigen denaturierten DNA-Matrize (White et al. 1989, Volkenandt et al. 1990, Erlich et al. 1992).

Die drei Teilschritte werden vielfach wiederholt. Hierbei verdoppelt sich in jedem Zyklus die Menge des von den Primern flankierten gewünschten DNA-Abschnitts. Nach einem Durchlaufen von 25 Zyklen können somit etwa 100.000 Kopien des gewünschten DNA-Fragments hergestellt werden. Diese exponentielle Vermehrung einer gewünschten DNA-Sequenz läuft allerdings nicht beliebig weiter, nach etwa 25 durchlaufenden Zyklen ist aufgrund einer sinkenden Effizienz eine nur noch lineare Zunahme an Kopien zu beobachten. Zwei Parameter haben Einfluss auf die Effizienz: die sinkende Primerkonzentration und eine nachlassende Aktivität der DNA-Polymerase. Zu Beginn der PCR liegen die Primer in einem etwa 10^6 -fachen Überschuss vor, sodass sich die Primer in der Annealing-Phase sehr schnell an die DNA-Matrize anlagern. In späteren Zyklen nimmt die Primerkonzentration allerdings ab und eine unerwünschte Renaturierung der amplifizierten Matrizen wird somit wahrscheinlicher. Der zweite Parameter, der mit steigender Zykluszahl an Bedeutung gewinnt, ist die sinkende Aktivität der DNA-Polymerase. Ihre Konzentration reicht in späten Zyklen nicht mehr zur Amplifikation aller vorhandenen Matrizen aus.

Ursprünglich nutzte man für die Durchführung einer PCR die DNA-Polymerase des Bakteriums *Escherichia coli*. Dieses Enzym ist jedoch hitzeempfindlich und denaturiert bei den hohen Temperaturen, die zur Trennung der doppelsträngigen DNA benötigt werden, sodass nach jedem Amplifikationsdurchlauf neue Polymerase zugesetzt werden musste. Ein wichtiger methodischer Fortschritt war in diesem Zusammenhang die Entdeckung hitzeunempfindlicher DNA-Polymerasen. Das Bakterium *Thermus aquaticus* wurde aus einem heißen Geysir im Yellowstone-Nationalpark in den USA isoliert (Chien et al. 1976, Innis et al. 1988, Tindall et al. 1988). Seine Polymerase (Taq-Polymerase) besitzt ihr Temperaturoptimum bei 72° C. Bei dieser Temperatur vermag die Taq-Polymerase eine DNA-Synthese mit einer Geschwindigkeit von etwa 150 Nukleotiden pro Sekunde zu gewährleisten. Da diese jedoch auch noch bei 94° C, der für die Denaturierung benötigten Temperatur, stabil ist, muss die Taq-Polymerase nur einmal zu Beginn der PCR zugegeben werden und bleibt dann während aller durchgeführten Zyklen aktiv. Die Taq-Polymerase ermöglicht damit die Automatisierung der PCR-Zyklen. Zudem verbessert sie die Spezifität der PCR-Methode, da sich die Oligonukleotidprimer bei den verwendeten hohen

Temperaturen nur sehr selten an unerwünschte Stellen anheften (Tindall et al. 1988, Watson et al. 1993).

Aus jeder zu untersuchenden Guthrie-Card der Neugeborenen aus den beiden deutschen Regionen sowie der polnischen Tumorkranken wurde mit Hilfe eines speziellen Stanzgerätes ein kreisrundes Stück mit einem Durchmesser von 2 Millimetern herausgeschnitten. Jede dieser Stanzproben wurde in ein Cup (PCR tubes ultradünn 0,2 ml, Biozym Diagnostik GmbH, Hesse Oldendorf, Deutschland) gegeben. Eine Mischung aus folgenden Reagenzien wurde jeweils hinzupipettiert:

- 3,0 µl PCR-Pufferlösung (10x)
- 1,5 µl Oligonukleotidprimer (forward)
- 1,5 µl Oligonukleotidprimer (reverse)
- 0,3 µl dNTPs (1mmol/l)
- 23,5 µl aqua dest.

Hierbei wurden folgende für das Exon 6 im *NBS1*-Gen spezifische Oligonukleotid-Primer (MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland) verwendet:

5'- CAG ATA GTC ACT CCG TTT ACA-3' (forward Primer)

5'- ATG AAT AGG CCA GTT ATC ACA-3' (reverse Primer)

Zunächst erfolgte ein Erhitzen dieser Ansätze in einem Thermocycler (PCR System 9600, GeneAmp, Perkin Elmer, Boston, USA) für 60 Minuten auf 98° C. Hiermit wurde die auf den Guthrie-Card-Proben vorhandene DNA ausgekocht und die DNA-Doppelstränge wurden initial denaturiert. Anschließend wurde in jedes Cup 0,2 µl Taq-Polymerase (5 U/µl) hinzugegeben, insgesamt entstand somit ein Ansatzvolumen von 30 µl je Cup.

Nun erfolgte die Polymerase-Kettenreaktion in den folgenden Schritten:

Denaturierung 95° C 5 Minuten



Denaturierung	95° C	15 Sekunden	} 35 Zyklen
Annealing	53° C	30 Sekunden	
Extension	72° C	40 Sekunden	



Finale Extension 72° C 10 Minuten



Abkühlung auf 12° C

Die bei der PCR entstandenen Produkte wurden zunächst auf 12° C heruntergekühlt und anschließend bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -16° C aufbewahrt.

2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Das Ergebnis einer PCR kann auf unterschiedliche Weise analysiert werden, in den meisten Fällen wird eine Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Die Gelelektrophorese ist ein Verfahren zur Trennung geladener Substanzgemische im elektrischen Feld. Die nach der PCR in der Probe enthaltenen DNA-Moleküle wandern in dem angelegten elektrischen Feld von der Kathode zur positiv geladenen Anode, da es zur elektrostatischen Anziehung zwischen den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA und der Anode kommt (siehe Abbildung 10).

Den Agarose-Gelen ist der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid zugesetzt. Das Ethidiumbromid zwängt sich zwischen die Basenpaare der DNA, es „interkaliert“. Damit wird die farbstoffmarkierte DNA unter einer UV-Licht-Bestrahlung als Bande auf dem Gel sichtbar. Der Nachweis einer Bande weist auf das Vorhandensein eines spezifischen, bei der PCR entstandenen Produkts hin, dieses kann photographisch dokumentiert werden. Sind hingegen auf dem Gel unter einer Bestrahlung mit UV-Licht keine Banden sichtbar, so liegt kein Produkt vor, was als Hinweis darauf gilt, dass die PCR nicht einwandfrei funktioniert hat.

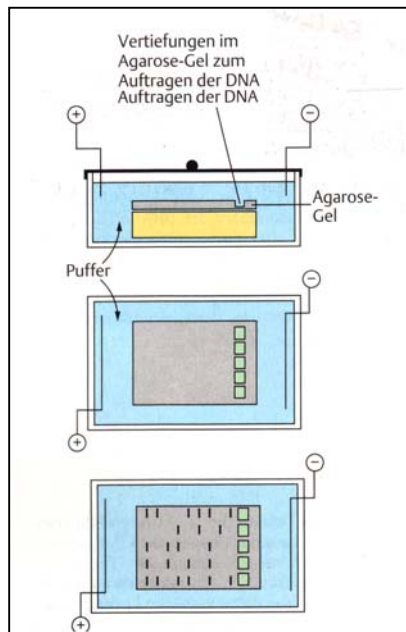


Abbildung 10: Prinzip der Agarose-Gelelektrophorese: Ein Agarose-Gel wird vollständig in ein mit Pufferlösung befülltes Elektrophoresebecken eingetaucht. Die zu untersuchenden Proben werden sodann in die Vertiefungen am Startpunkt einer Gelbahn eingebracht. Beim Anlegen eines elektrischen Feldes wandert die negativ geladene DNA auf den positiven Pol zu. Nach Beendigung der Elektrophorese können die Banden unter einer UV-Lampe sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert werden (aus: Knippers 2001).

Um die erfolgreiche Amplifizierung des gewünschten – durch die Oligonukleotid-Primer determinierten – DNA-Abschnitts während der Polymerase-Kettenreaktion zu überprüfen, wurde im Anschluss an die PCR eine Gelelektrophorese jeder zu untersuchenden Probe vorgenommen. Bei der Herstellung von 100 ml eines 1,5 %igen Agarose-Elektrophorese-Gels fanden folgende Substanzen Verwendung:

- 1,5 g Agarose
- 100 ml 1 x TBE-Puffer
- 10 µl Ethidiumbromid

Der TBE (Tris-Borate EDTA)- Puffer wirkt als leitendes Medium in der Elektrophorese-Kammer. Für seine Herstellung wurden

- 10,8 g Tris (2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol)-Base,
- 5,5 g Borsäure und
- 4 ml 0,5 M EDTA (Ethyldiamin-Tetraessigsäure), pH = 8,0

in ein Reagenzgefäß gegeben, anschließend wurde mit destilliertem Wasser auf einen Liter aufgefüllt.

Die Agarose-Lösung wurde zunächst in einer Mikrowelle aufgeköcht, nach Abkühlung auf etwa 40° C in eine Gelträgerform mit Vertiefungseinsatz („Kamm“) gegossen. Nach dem Erstarren der Lösung zum Gel wurde der Vertiefungseinsatz vorsichtig entnommen und der Gelträger mit dem Gel in die Laufpufferlösung (1x TBE) des Gelelektrophorese-Apparats eingebracht.

In jede der nach Entfernung des „Kamms“ entstandenen Vertiefungen (engl. slots) wurde mit einer Pipette ein Teilvolumen von 5 µl des PCR-Produkts sowie 5µl eines „Laufpuffers“ (Orange G, Merck), eingebracht. Der Laufpuffer war als orangefarbene Bande bereits während des Elektrophorese-Vorgangs sichtbar und gab einen Anhaltspunkt für die bereits zurückgelegte Wanderungsstrecke der PCR-Produkte.

In die erste Vertiefung des Gels wurde zudem ein Marker aufgetragen, der mehrere DNA-Fragmente unterschiedlicher, jedoch genau definierter Länge enthielt. Die Fragmente des Markers wanderten genauso wie die zu untersuchenden PCR-Produkte durch das Gel und dienten somit als „DNA-Meßlatte“ (siehe Abbildung 11).

Für eine Dauer von 20 Minuten wurde sodann eine Gelelektrophorese bei einer Spannung von 120 mV durchgeführt, das Gel anschließend unter einer UV-Lampe betrachtet. Die DNA des PCR-Produkts war hierbei durch das in die DNA interkalierende Ethidiumbromid sichtbar. Das Ergebnis konnte anschließend photographisch dokumentiert werden (vgl. Abbildung 11).

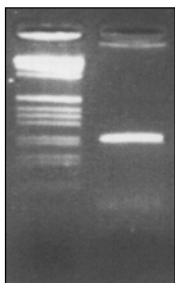


Abbildung 11: Agarose-Gelelektrophorese: rechts: Nachweis eines PCR-Produkts auf dem Agarose-Gel; links: Gelbahn mit „DNA-Meßlatte“.

2.2.4 SSCP-Gelelektrophorese

Der Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus (SSCP = engl. single strand conformation polymorphism) stellt eine Methode zum Nachweis von Genmutationen dar, ohne dass zunächst eine genaue Sequenzanalyse durchgeführt werden muss. Das Verfahren beruht auf dem Nachweis von DNA-Sequenz-Polymorphismen, also der Existenz verschiedener Allele an homologen Genabschnitten.

Im Rahmen der SSCP-Analyse wird geprüft, ob sich homologe DNA-Abschnitte, die als denaturierte Einzelstränge vorliegen, während einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese in ihrer Laufgeschwindigkeit unterscheiden (siehe Abbildung 12). Bedeutsam ist, dass bereits einzelne Punktmutationen oder kurze Deletionen innerhalb eines Gens ausreichen, um die Tertiärstruktur der Einzelstränge zu verändern. Diese Einzelstränge zeigen dann während der SSCP-Gelelektrophorese im Vergleich zu Wildtyp-Einzelsträngen veränderte Wanderungsgeschwindigkeiten. Das hierbei entstehende Gel-Bandenmuster weicht von dem charakteristischen Wildtyp-Muster ab.

Bei einem für die Mutation 657del5 heterozygoten Individuum liegen beispielsweise zwei verschiedene Allele im Exon 6 des *NBS1*-Gens vor. Nach der Amplifikation eines beide Genvarianten einbeziehenden Abschnitts des *NBS1*-Gens erhält man somit zwei leicht verschiedene Produkte, die sich als denaturierte Einzelstränge in ihrer räumlichen Konformation geringfügig unterscheiden. Beim Durchlaufen des SSCP-Gels zeigen diese beiden Produkte einen Mobilitätsunterschied (Orita et al. 1989), sodass eine mögliche 657del5-Mutation in einem der Allele als ein vom Wildtyp abweichendes Elektrophorese-Bandenmuster sichtbar gemacht werden kann. Zur genaueren Untersuchung wird sodann eine Sequenzanalyse durchgeführt (siehe Abbildung 12).

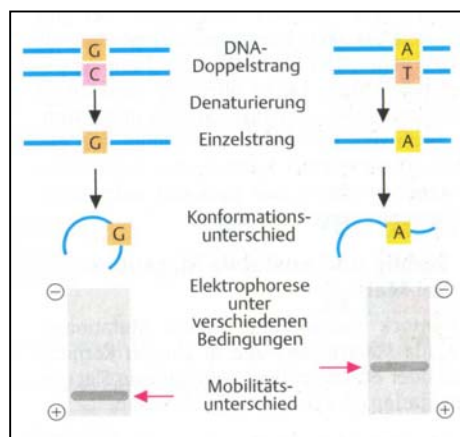


Abbildung 12: Prinzip der SSCP-Gelelektrophorese: Die DNA-Einzelstränge weisen aufgrund einer Mutation in einem der homologen Genabschnitte eine unterschiedliche Konformation und somit Mobilitätsunterschiede während des Elektrophoresevorgangs auf. Es besteht somit der Verdacht auf das Vorliegen einer Mutation, die Probe wird zur weiteren Abklärung einer genauen Sequenzanalyse durchgeführt (aus: Passarge 2004).

Zur Anfertigung der verwendeten 12 %igen SSCP-Gele wurden jeweils 100 ml einer Acrylamidlösung hergestellt, folgende Substanzen wurden dabei verwendet (Savov et al. 1992):

- 40 ml einer 30 %igen Acrylamid-Lösung
- 10 ml 10 x TBE
- 48 ml aqua dest.
- 2 ml 10 % APS (Ammoniumpersulfat), (BioRad, München, Deutschland)
- 30 µl TEMED (Tetramethylethylendiamin), (BioRad, München)

Ein Liter der 30 %igen Acrylamidlösung war zuvor aus 290 g Acrylamid und 10 g Bisacrylamid, gelöst in 1000 ml aqua dest., hergestellt worden.

Diese Gel-Lösung wurde zügig zwischen zwei vorbereitete plane Glasplatten mit einer seitlichen und unteren Gummiabdichtung und dazwischen liegenden Abstandhaltern (3 mm) gegossen, die Gelkassette sodann vertikal in den Gießstand eines vertikalen Elektrophoresegerätes eingespannt. Während der Verfestigung des Gels war an der Oberkante der Gelkassette ein Vertiefungseinsatz eingespannt, der nach seiner Entfernung Geltaschen an der Oberkante des Gels entstehen ließ.

In jede dieser Geltaschen wurden nun 15 µl einer Mischung eingebracht, die aus 5 µl des ursprünglichen PCR-Produkts und 10 µl eines denaturierenden Formamid-Puffers bestand. Zur Denaturierung des Produkt-Doppelstrangs in seine Einzelstränge war diese Mischung zuvor für 5 Minuten auf 95° C erhitzt und sofort danach auf einem vorbereiteten Eiswasserbad gelagert worden, um weiterhin einen denaturierten Zustand zu gewährleisten.

Unter Kühlung der Gelkassette im Wasserbad bei 4° C wurde sodann für vier Stunden eine Spannung von 500 mV angelegt. Nach Beendigung der Elektrophorese erfolgte zur Visualisierung der durch das Gel gewanderten Produkte eine Anfärbung des Gels mit dem 10.000fach verdünntem Fluoreszenzfarbstoff SYBRgreen (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland). Nach Ablösung einer der beiden das Gel begrenzenden Glasplatten wurde dieser direkt auf das Gel aufgetragen, anschließend erfolgte eine automatische Auslesung der Fluoreszenzsignale auf dem Gel im FluorImager SI der Firma Molecular Dynamics (Sunnyvale, USA, siehe Abbildung 13).

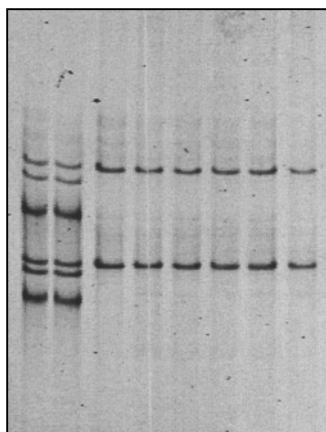


Abbildung 13: Beispiel eines SSCP-Gelelektrophorese-Gels: In den ersten beiden Gel-Bahnen wurden Kontrollen von bekanntermaßen heterozygoten Merkmalsträgern der Mutation 657del15 eingebracht. Alle weiteren Bahnen rechts der beiden Kontrollen enthalten amplifizierte DNA-Proben verschiedener Probanden.

2.2.5 DNA-Sequenzanalyse

Ziel der Sequenzanalyse ist die Bestimmung der genauen Basenabfolge innerhalb eines untersuchten Genabschnitts. Als Grundlage für das inzwischen automatisierte Verfahren dient die von Sanger entwickelte enzymatische Kettenabbruchmethode (Sanger et al. 1975). Diese Methode beruht auf einer enzymatischen DNA-Synthese, die an einem modifizierten Nukleotid abbricht. Ähnlich dem Prinzip des Annealings bei der Polymerase-Kettenreaktion wird bei der Sequenzanalyse einer der beiden vorliegenden Einzelstränge der zu untersuchenden DNA-Sequenz an seinem 3'-Ende mit einem geeigneten Oligonukleotid-Primer hybridisiert. Mit Hilfe einer DNA-Polymerase wird ein zum zu sequenzierenden DNA-Abschnitt komplementärer Strang synthetisiert. Hierbei werden im Gegensatz zur herkömmlichen PCR neben den Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) auch spezielle dNTPs verwendet, denen an der 3'-Position ihrer Desoxyribose die Hydroxylgruppe, die für eine Verlängerung des DNA-Stranges notwendig ist, fehlt. Diese modifizierten dNTPs, die in einer Adenin-, Thymin- sowie Cytosin- und Guanin-Form verfügbar sind, werden deshalb als *Didesoxyribonukleosidtriphosphate* (*ddNTPs*) bezeichnet. Werden diese Nukleotide anstelle des herkömmlichen Nukleotids in die wachsende Polynukleotidkette eingebaut, so bricht das Kettenwachstum ab, da an den ddNTPs keine freie 3'-OH-Gruppe für eine weitere Polymerisierung vorhanden ist. Es entsteht somit ein ganzer Satz unterschiedlich langer Ketten, wobei sich am Ende einer Kette jeweils ein ddNTP befindet. Als Sequenzierreaktion kommt eine Variation der Polymerase-Kettenreaktion zum Einsatz, bei der allerdings lediglich ein Primer verwendet wird, sodass die DNA nur linear amplifiziert wird.

In der Vergangenheit wurden bei der Durchführung der Kettenabbruchmethode jeweils vier Ansätze verwendet, wobei jedem Ansatz eines der vier verschiedenen radioaktiv markierten ddNTPs zugesetzt war. Im Rahmen der Amplifikation entstanden hierbei DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die in jedem Ansatz stets mit dem gleichen ddNTP endeten. Es erfolgte dann die elektrophoretische Auftrennung der vier Ansätze nebeneinander in einem Acrylamidgel. Durch Auflegen eines Röntgenfilms konnte anschließend die Sequenz abgelesen werden.

Im Folgenden wurden modifizierte Methoden entwickelt, die nun auch eine automatisierte DNA-Sequenzierung erlauben. Seit Anfang der 1990er Jahre wird vor allem ein Verfahren mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Didesoxyribonukleotiden verwendet. Jedes der vier ddNTPs ist dabei mit einem unterschiedlichen Farbstoff gekoppelt. Diese Modifikation erlaubt es, alle vier Didesoxyribonukleotide in ein einziges Reaktionsgefäß zu geben, eine Aufspaltung in vier separate Ansätze und die Verwendung von Radioisotopen kann somit entfallen. Die entstehenden Kettenabbruchprodukte werden mittels einer Kapillar-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch

eine Laserlichtbestrahlung zur Fluoreszenz angeregt. Die vier verschiedenen ddNTPs am Ende jedes DNA-Fragments emittieren dabei ein Fluoreszenzsignal von unterschiedlicher Wellenlänge und können von einem speziellen Photodetektor erkannt werden. Die Abfolge der Farbsignale repräsentiert unter Berücksichtigung der zurückgelegten Gel-Wanderungsstrecke der Fragmente die Basensequenz des untersuchten DNA-Abschnitts (siehe Abbildung 14).

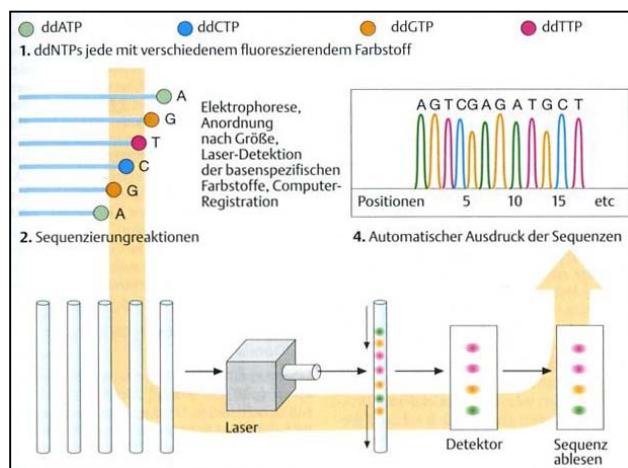


Abbildung 14: Prinzip der automatisierten DNA-Sequenzierung: Im Rahmen einer der PCR ähnlichen Sequenzier-Reaktion werden in einem einzigen Ansatz vier mit verschiedenartigen Fluoreszenz-Farbstoffen markierte Didesoxyribonukleotide verwendet. In der Extensionsphase entstehen dabei unterschiedlich lange Kettenabbruchprodukte, die an einem Ende jeweils ein markiertes

ddNTP-Molekül aufweisen. Mit einem Laser werden diese Moleküle zur Fluoreszenz angeregt und können von einem Detektor erkannt und sodann unter Berücksichtigung der größenabhängigen Wanderungsstrecke in der Gel-Kapillare in die DNA-Sequenz übersetzt werden (aus: Passarge 2004).

Die bei der SSCP-Gelelektrophorese für das Vorliegen einer Mutation identifizierten verdächtigen Proben wurden zu ihrer genaueren Beurteilung einer Sequenzanalyse unterzogen. Dazu erfolgte zunächst eine Aufreinigung von 5 µl des ursprünglich vorhandenen 30 µl PCR-Produkts jeder Probe mit Hilfe eines industriell gefertigten Aufreinigungs-Kit (MinElute PCR Purification Kit Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland). Hierdurch konnten nicht erwünschte restliche Primer und Nukleotide aus dem ursprünglichen PCR-Produkt entfernt werden.

5 µl der gereinigten Probe wurden dann mit 1 µl eines spezifischen „reverse“ Primers (5'-TACCGAACTATAACACAGCA-3') – dieser war für eine Basensequenz des Exons 5 spezifisch und erlaubte wegen der von ihm ausgehenden rückwärtsgerichteten Extension auch eine Analyse der Basensequenz im Exon 6 des *NBS1*-Gens –, 2 µl aqua dest. und 2 µl eines vorgefertigten „reaction mix“ (BigDye[®] Terminator mix, Applied Biosystems, Foster City, USA) vermischt. Dieser enthielt neben den vier dNTPs auch die vier mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten ddNTPs sowie eine DNA-Polymerase.

Anschließend erfolgte eine der PCR-Methode ähnliche Amplifizierung. Hierbei wurden folgende Schritte im Thermocycler (PCR System 9600, GeneAmp, Perkin Elmer, Boston, USA) durchlaufen:

96° C	10 Sekunden	} 27 Zyklen
53° C	15 Sekunden	
60° C	4 Minuten	



Herunterkühlung auf 4° C

Nach einer erneuten Reinigung des erhaltenen Amplifikationsproduktes konnte nun eine direkte DNA-Sequenzierung im ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, USA) erfolgen (siehe Beispielsequenz in Abbildung 15).

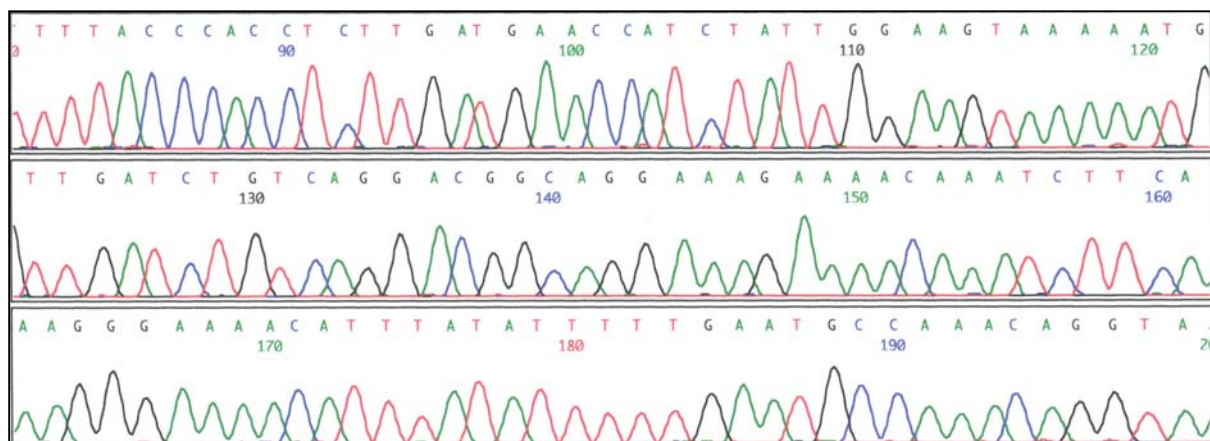


Abbildung 15: Beispiel einer DNA-Sequenz im Exon 6 des *NBS1*-Gens.

2.2.6 Quantitative real-time PCR

Eine Weiterentwicklung der Vervielfältigung von Nukleinsäuren mittels der PCR stellt die „real time“ quantitative PCR (RT-PCR) dar. Diese basiert auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, ermöglicht jedoch zusätzlich eine Quantifizierung der PCR-Produkte mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen bereits während der PCR-Zyklen. Die Fluoreszenz nimmt dabei proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Hierbei wird der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer ausgenutzt. Eine sequenzspezifische Sonde (TaqMan[®]-Sonde) wird verwendet, die an einem Ende

mit einem Akzeptor-Fluorochrom (Quencher), an ihrem anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenz-Farbstoff (z. B. FAM) markiert ist. Wird dieser Reporter-Farbstoff durch eine Lichtquelle angeregt, so gibt dieser einen Teil der aufgenommenen Energie an den Quencher ab, allerdings nur dann, wenn sich dieser in einer ausreichenden Nähe zum Reporter befindet.

Zu Beginn eines PCR-Zyklus erfolgt zunächst eine Auftrennung der Doppelstränge zu Einzelsträngen und eine Anlagerung der TaqMan[®]-Sonden an die komplementären Stränge. Dabei wird zunächst noch die Fluoreszenz des Reporter-Fluoreszenz-Farbstoffs vom Quencher durch eine strahlungsfreie Energieübertragung unterdrückt. Während des PCR-Zyklus trennt die Taq-Polymerase dann jedoch das Reporter-Fluorophor am 5'-Ende der Sonde ab. Hierdurch erhöht sich der Abstand zwischen Reporter und Quencher. Entsprechend wird die Unterdrückung des Reporters durch den Quencher verringert, sodass eine steigende Reporter-Fluoreszenz gemessen werden kann. Diese nimmt proportional mit den PCR-Zyklen bzw. dem PCR-Produkt zu.

Die RT-PCR wurde verwendet, um in DNA-Proben des Blutes und aus den Tumorgeweben der ursprünglich als heterozygote 657del5-Merkmalsträger identifizierten Tumorpatienten das Verhältnis von Wildtyp- und 657del5-Allelen zu bestimmen. Die zu untersuchende DNA stammte dabei zum einen aus Guthrie-Cards der zuvor als heterozygote 657del5-Merkmalsträger identifizierten Tumorpatienten, zum anderen aus Tumorgewebe dieser Probanden, welches bei 4 der insgesamt 5 Tumorpatienten verfügbar war. Bei der RT-PCR wurde eine Mischung aus folgenden Reagenzien für jede Probe verwendet:

- 15 µl TaqMan[®] 2x Universal PCR Master Mix (enthält dNTPs, Taq Polymerase sowie Puffer)
- 9 µl aqua dest.
- 1 µl forward primer 5' – CCA CCT CTT GAT GAA CCA TCT ATT G – 3'
- 1 µl reverse primer 5' – ACA TAA TTA CCT GTT TGG CAT TCA AA – 3'
- 1 µl FAM-markierte Wildtyp-Sonde
(5' – 6FAM – AGG ACG GCA GGA AAG AAA ACA AAT CT – 3')
- 1 µl YAK-markierte 657del5-Sonde
(5' – YAK – TGT CAG GAC GGC AGG AAA GAA ATC TTC – 3')

Von diesem Ansatz wurden je 28 µl in die einzelnen Vertiefungen der Reaktionsplatte (Micro-Amp[®] Optical 96-Well) gegeben und jeweils 2 µl der DNA-Proben hinzupipettiert. Die RT-PCR wurde anschließend mit dem ABI 7500 Real Time PCR System in folgenden Schritten durchgeführt:

95° C	10 Minuten	
95° C	15 Sekunden	} 45 Zyklen
60° C	60 Sekunden	

Die CT-Werte jeder Probe wurden im Rahmen der real time PCR jeweils zweifach bestimmt und die CT-Wert-Differenz zwischen den Wildtyp-Allelen und den Allelen mit der Mutation 657del5 als Mittelwerte der Differenzen ermittelt.

Zur Umrechnung dieser CT-Wert-Differenzen in die Anteile der Wildtyp- und der 657del5-Allele in den einzelnen Proben wurde eine Verdünnungsreihe aus einer bekannten Wildtyp- und einer homozygoten 657del5-Probe verwendet. Die Konzentrationsbestimmungen der DNA in diesen Ausgangsproben war mit Hilfe eines Spektralphotometers (GeneQuant II, Pharmacia Biotech) bei einer Wellenlänge von 280 nm vorgenommen worden. Die Verdünnungsreihe wurde erstellt, indem ausgehend von einem 10 %igen Anteil an Wildtyp-DNA deren Anteil in 10 %-Schritten erhöht und gleichzeitig der Anteil an 657del5-DNA verringert wurde. Die CT-Werte dieser Proben wurden mittels einer RT-PCR zweifach bestimmt und die Mittelwerte der CT-Wert-Differenzen gegen den jeweiligen Anteil an Wildtyp-DNA als Standardkurve in einem Graphen aufgetragen. Aus dieser Kurve konnten nun auch die Anteile an Wildtyp- und 657del5-Allelen in den Blut- und Tumorgewebeproben der 4 Probanden abgeleitet werden.

Die DNA aus den Tumorgewebeproben wurden darüber hinaus einer Sequenzbestimmung des Exons 6 im *NBS1*-Gens unterzogen. Hierzu wurde die oben erläuterten Arbeitsschritte der Standard-PCR, Produktüberprüfung mittels Agarose-Gel sowie schließlich die Sequenzierungsreaktion verwendet.

2.2.7 Strategien zur Vermeidung von Kontaminationen der DNA-Proben

Die Möglichkeit, mittels der PCR gewünschte Sequenzen aus nur wenigen vorhandenen DNA-Ausgangsmolekülen millionenfach zu vervielfältigen, kann bei der geringsten Kontamination der Proben zum Verhängnis werden.

Um eine unerwünschte Kontamination in den verwendeten Materialien zu entdecken bzw. auszuschließen, wurde in jedem Amplifikationsansatz eine sogenannte „Blind“-PCR-Probe mit allen Reagenzien außer einer auf einer Guthrie-Card fixierten DNA-Probe mitgeführt. Wies die dieser Probe entsprechende Gelbahn bei der anschließend zur Beurteilung des Vorliegens von PCR-Produkten durchgeführten Gelelektrophorese keine Bande auf, so konnte dies als weitgehende Bestätigung dafür gelten, dass es während der Handhabung der Proben zu keiner Verunreinigung gekommen war.

Mit dem Ziel, Kontaminationen gar nicht erst auftreten zu lassen, wurden bei der Handhabung aller Proben folgende generelle Vorsichtsmaßnahmen eingehalten:

- Arbeiten in möglichst steriler Umgebung,
- räumliche Trennung von anderen DNA-Analysen,
- häufiges Wechseln der verwendeten Handschuhe, z. B. nach dem Öffnen von DNA-Proben,
- Verwendung von Einmal-Pipettenspitzen.