

3. Methoden

3.1 RNA-Isolierung

Aus 250µl EDTA-Blut wurde die RNA isoliert. Dazu wurde der QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen KatNr. 52304) verwendet. Das Blut wurde mit 300 µl EL-Puffer versetzt und 15 Minuten auf Eis gestellt, um die Erythrozyten zur Lyse zu bringen. Nach vollständiger Lyse wurde das Röhrchen zehn Minuten lang mit 500rpm (400g) bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Auf das vorhandene Pellet wurde 500µl EL-Puffer gegeben. Durch kurzes Vortexen wurden die Zellen wieder resuspendiert. Erneut wurde zehn Minuten lang mit 500rpm (400g) bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Auf das Pellet wurden 350µl RLT-Puffer (RLT aus dem Kit versetzt mit 10µl beta-Mercaptoethanol) gegeben und mit einer Pipette durchmischt. Das Lysat wurde in einen Quiashredder überführt und zwei Minuten lang mit 13000rpm zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde 350µl Lysat mit 350µl 70% Ethanol versetzt und mit der Pipette durchgemischt. Das Gemisch wurde auf eine Extraktionssäule gegeben und 15 Sekunden bei 10000rpm (8000g) zentrifugiert. Die RNA absorbierte an der Matrix der Extraktionssäule. Das Eluat konnte verworfen werden. Durch das zweimalige Waschen der RNA mit jeweils 500µl RPE-Puffer konnte reine RNA gewonnen werden. Im letzten Schritt wurde die RNA mit 50µl RNase freiem Wasser aus der Matrix herausgelöst. Bis zur weiteren Verarbeitung besteht die Möglichkeit der Dauerlagerung bei -80°C.

3.2 RT-Polymerasekettenreaktion

Bei der RT-Polymerasekettenreaktion wird die RNA zunächst in cDNA umgeschrieben und dann vervielfältigt. Die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgt mit dem Enzym reverse Transkriptase. Dies ist eine RNA abhängige DNA-Polymerase und kann sowohl RNA als auch DNA Matrizen verwenden. Die reverse Transkriptase beginnt mit einer Thymin-oligonucleotid-anhybridisierung am Poly-A-Ende. Diese wird als Matrize verwendet für die weitere Kettenverlängerung. Dazu werden Desoxyribonukleosidtriphosphate (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) benötigt. Die reverse Transkriptase arbeitet bei 50°C. Durch die anschließende Erhitzung auf 95°C wird die reverse Transkriptase inaktiviert und die DNA Polymerase aktiviert. So kann in einem weiteren Schritt aus dem Einzelstrang eine Doppelstrang-DNA werden. Dann kommt es zur Vervielfältigung der cDNA.

Sie erfolgt in drei Schritten:

1. Denaturierung
2. Annealing
3. Amplifikation

Im ersten Schritt kommt es durch Erhitzen auf 94°C zur Aufspaltung der Doppelstrang-DNA in die beiden Einzelstränge (Denaturierung). An den 5'-Enden des kodierenden und des komplementären DNA-Stranges lagern sich jeweils ein Oligonukleotid-Primer an (Annealing). Dies geschieht bei einer Temperatur von 66°C. Mit Hilfe einer thermostabilen Taq-Polymerase kommt es, ausgehend von den Primern, zur Bildung von Doppelsträngen (Amplifikation) bei 72°C. Der Vorgang wird 40-mal wiederholt.

Für die RT-PCR wurde der One Step RT-PCR Kit (Qiagen KatNr. 210210) verwendet. Die Serie enthält dNTP Mix, 5x QIAgen One Step RT-PCR Puffer, QIAgen One Step Enzym Mix und Q-Solution. Hinzu kommen die zwei Primer Human G3, ein Antisense Primer für IgG Transkripte und VH-Mix, ein Sense Primer. Die Reaktionsmischung enthielt 8,5µl RNA freies Wasser, 10µl 5x QIAgen One Step RT-PCR Puffer, 10µl Q Solution, 2 µl dNTP Mix, 2µl QIAgen One Step Enzym Mix, 7,1µl Human G3 (Primer A, 30 pmol/40µl) und 0,33µl VH Mix (Primer B, 30pmol/40µl). In einen Ansatz wurde 5µl RNA gegeben, in einen zweiten Ansatz 5µl Aqua dest. Die Negativkontrolle diente als Qualitätskontrolle. Das Reaktionsgefäß wurde in den auf 50°C vorgeheizten Thermocycler PCT 100 (Firma MJ Research Inc Watertown, Mass) gestellt und das Programm G3 gestartet (1. 30 Min bei 50°C, 2. 15 Minuten bei 95°C, 3. eine Minute bei 94°C, 4. eine Minute bei 66°C, 5. eine Minute bei 72°C, 40-mal 3.-5. wiederholen, zehn Minuten 72°C, Lagerung über Nacht bei 4°C).

Es wurden folgende Primer verwendet: 1. HumG3 bindet in Exon CH1, nahe dem 3'Ende. Diese Stelle ist für alle 4 IgG Subklassen identisch, 2. eine Mischung aus 5 VH-Familien spezifischen Primern für einen konservierten Abschnitt der FR1-Region.

3.3 Extraktion des DNA-Amplifikates

Durch die Gelelektrophorese werden die DNA-Amplikate der Größe nach getrennt. Die kürzeren Amplikate wandern schneller von der Anode zur Kathode als die längeren. Die Gelplatten wurden aus Agarose hergestellt. Es wurden 100ml 2% NuSieve-Agarosegel in der Mikrowelle

erhitzt und in ein Geltablett gegossen. Nachdem das Gel abgekühlt war, wurde 4µl der Probe und 4µl der Negativkontrolle mit jeweils 3µl Loading Puffer (mit Farbstoff) vermischt und auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich wurde 10µl DNA-Marker (GBCO 1 KB) aufgetragen, so konnte die jeweilige Größe der Amplifikate ermittelt werden. Die Laufzeit betrug eine Stunde bei 100V. Das Gel wurde dann unter UV-Licht betrachtet und fotografiert. Die Amplifikate der schweren Ketten haben eine Länge von 585 bis 636 bp. Die Bande mit dieser Größe wurde mit einem Skalpell herausgeschnitten und das Gel noch einmal zur Kontrolle unter UV-Licht fotografiert. Die cDNA wurde mit einem Gelextraktionskit (Qiagen MinElute KatNr. 28604) eluiert. Das herausgeschnittene Gelstück wurde in ein Eppendorf Gefäß gegeben, 300µl QG Puffer hinzugefügt und gut durchmischt. Das Gefäß wurde für zehn Minuten in ein 50°C heißes Wasserbad gestellt, bis eine homogene, klare, gelbe Lösung entstand. Zu der Lösung wurde 100µl Isopropanol dazugegeben und gemischt. Der Inhalt des Eppendorf Gefäßes wurde in die Säule (2ml collection Tube) überführt und für eine Minute bei 13000rpm zentrifugiert. Die Flüssigkeit konnte verworfen werden. Die DNA befand sich auf der Säule und wurde 2 mal mit jeweils 750µl Puffer PE gewaschen. Im Anschluss wurde die DNA aus der Säule eluiert. Die Säule wurde auf ein neues Eppendorf Gefäß gesetzt und 10µl Puffer EB gegeben und nach ein bis zwei Minuten, eine Minute lang bei 13000rpm zentrifugiert. Die DNA befand sich in der filtrierten Flüssigkeit.

3.4 Klonierung

Bei der Klonierung wurden aus dem polyklonalen Amplifikatgemisch 20 bis 30 Amplifikate in Bakterien weitervermehrt. Hierzu wurde das PCR-Amplifikat zunächst in ein Plasmid eingebaut (Ligation). Dieses Plasmid wurde von E. Coli-Bakterien aufgenommen und in ihre DNA eingebaut (Transformation). Die E. Coli-Bakterien vermehrten sich auf einer Agarplatte. Jede Bakterie einer Kolonie enthielt dieselbe DNA-Sequenz eines einzelnen Amplifikats. Die DNA wurde aus der Kolonie extrahiert (Minipräparation) und durch den Insertkontrollverdau wurde überprüft, ob das Plasmid das Amplifikat enthielt. War dies der Fall, wurde die DNA mit zwei Enzymen geschnitten (Linearisierung) und anschließend sequenziert.

3.4.1 Ligation

Bei der Ligation wurde das PCR-Produkt in ein Plasmid eingebaut. Dazu verwendeten wir den TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, KatNr. 45-0640). Es wurden 4µl eluiertes, frisches PCR-Ampfikat, 1µl Salt Solution, 2µl steriles Wasser und 1µl PCR-TOPOVector benötigt. Die Substanzen wurden gemischt und anschließend mindestens 30 Sekunden und maximal 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Inkubationszeit wurde die DNA in das Plasmid eingebaut, das als Vektor fungiert.

3.4.2 Transformation

Während der Transformation nahmen die E. coli-Bakterien das Plasmid auf. Zu den kompetenten E. coli-Zellen wurden 2µl von dem Ligationsansatz hinzugegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurde der Ansatz genau 30 Sekunden in ein 42°C warmes Wasserbad gestellt. Durch die Wärme wurden die Bakterienwände permeabel und die Plasmide konnten in die Bakterien eindringen. Danach wurde der Ansatz für zwei Minuten auf Eis gestellt. Nun wurde zu dem Ansatz 250µl SOC-Medium gegeben und eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien vermehrten sich. Anschließend wurden jeweils 25µl, 50µl und 75µl des SCO-Medium mit den Bakterien auf mit Ampicillin versetzte Agarplatten gegeben. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank bebrütet. Über Nacht waren Bakterienkolonien gewachsen. Es zeigten sich blaue und weiße Kolonien. Die weißen Bakterienkolonien hatten den Vektor aufgenommen. Da das Plasmid ein Gen für eine Resistenz gegen Ampicillin enthielt, sind diese Kolonien resistent gegen Ampicillin. Es wurden 32 weiße Klone zufällig mit einer Pipetenspitze gepickt und in ein Flakonröhrchen gegeben. Die Röhrchen waren mit 2ml LB-Medium gefüllt, welches ebenfalls mit Ampicillin (Sigma KatNr. A-9518) versetzt war. Für die Herstellung des LB-Mediums wurden 10g LB Borth Base (Sigma KatNr. L-3022) mit 500ml Aqua dest aufgefüllt und autoklaviert. Über Nacht wurden die 32 Röhrchen bei 37°C im Inkubationsschüttler inkubiert. Die Bakterien vermehrten sich in dieser Zeit.

3.4.3 Minipräparation

Für die Extraktion der DNA aus den E. coli-Bakterien wurde der Quantrum Prep.Plasmid Miniprep Kit (BIORAD, KatNr: 732-6100) verwendet.

1,5 ml der Kultur wurde in ein Eppendorf Gefäß überführt. Durch die Zentrifugation von einer Minute bei 13000rpm bei Raumtemperatur setzten sich die Bakterien am Boden ab. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit 200µl Cell Resuspensionlösung resuspendiert.

Um die Zellen zu lysieren, wurde eine 250µl Cell Lysis Solution dazugegeben und danach 250µl Neutralisation Solution. Dann wurde fünf Minuten bei 13000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die DNA befand sich im Überstand. Auf ein Eppendorf safe lock Gefäß wurde eine Extraktionssäule gestellt und 200µl Quantum Prep Matrix pipetiert. Es wurden 500µl Probenüberstand auf die Extraktionssäule gegeben und anschließend 30 Sekunden bei 13000rpm bei 10°C zentrifugiert. Die DNA blieb an der Matrix haften. Zweimal wurde sie mit 500µl Waschpuffer gewaschen. Im letzten Schritt wurde die DNA mit 50µl sterilem Wasser aus dem Filter gelöst.

3.4.4 Insertkontrollverdau

Mit Hilfe des Insertkontrollverdaues wurde überprüft, ob das Plasmid das richtige Stück DNA aufgenommen hatte. Es wurde jeweils 4µl DNA, 1µl EcoRI Restriktionsenzym (Boehringer, KatNr. 1175084), 2µl 10x Puffer H (Boehringer, KatNr. 84371721-43) und 13µl Aqua dest gemischt. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 37°C, in der durch das Restriktionsenzym das Amplifikat herausgetrennt wurde, wurden Amplifikat und Plasmid-DNA durch eine Gelelektrophorese aufgetrennt. Zunächst wurde in jedes Eppendorf Gefäß 2µl Loading Puffer gegeben und die Proben wurden auf ein 2% Agarosegel aufgetragen. Die Laufzeit betrug 30 Minuten bei einer Spannung von 100V in der Elektrophoresekammer Agagel Maxi (Biometra KatNr. 20-300). Zusätzlich wurden 10µl von einem DNA-Marker (GibcoBRL, KatNr. 15615-024) auf das Gel aufgetragen. Dadurch konnten die Länge der DNA bestimmt werden. Die Länge des Ampflikat betrug 605 bis 656 bp (RNA IgG/VHMix 585 bis 636 bp + 20 bp Plasmid).

3.4.5 Linearisierung

Die DNA des Plasmids wurde mit Hilfe von zwei Restriktionsenzymen Hind III (Boehringer KatNr. 656321) und Xho I (Boehringer, KatNr. 899194) geschnitten. Es wurden jeweils zwei Ansätze hergestellt: 2µl Puffer B (Boehringer, KatNr. 84684421-33), 11µl destilliertes Wasser und 1µl Restriktionsenzym Hind III und 2µl Puffer H (Boehringer 8471721-43), 11µl Aqua dest und 1µl Restriktionsenzym Xho I in den zweiten Ansatz. Diese Ansätze wurden zu jeweils 6µl Plasmid-DNA gegeben. Es folgte eine Inkubationszeit von drei Stunden bei 37°C. In dieser Zeit wurde die DNA von den jeweiligen Enzymen einmal am 5`-Ende und einmal am 3`-Ende geschnitten. Danach wurde die DNA mit 2µl 3M NaAc pH 4,8 und 48µl Ethanol präzipitiert und mit destilliertem Wasser resuspendiert. Zur Kontrolle, ob DNA vorhanden ist,

wurden 2µl DNA mit 4µl blauem Loading-Puffer versetzt und auf ein 1% Agarose-Gel aufgetragen. Die Laufzeit betrug 30 Minuten bei 100V.

3.5 Sequenzreaktion

Die Sequenzierung wurde nach der Kettenabbruchmethode, modifiziert nach Sanger durchgeführt. Neben den vier Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTP) wurden vier Dideoxyribonukleotidtriphosphate (ddNTP) benötigt. Sie waren mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert. Jede Base mit einer anderen Farbe (T = rot, A = grün, C = blau, G = schwarz). Wurde bei der Synthese des DNA-Stranges eines der ddNTPs eingebaut, kam es zum Abbruch der Reaktion, da kein 3'-OH-Ende frei und eine Polymerisierung nicht mehr möglich war. Das Kettenende war nun mit einem Farbstoff gekennzeichnet, der eine bestimmte Base repräsentiert. Es entstanden verschieden lange DNA-Ketten, die von einer Base bis zu mehrere hundert Basen lang sein konnten. Die Amplifikate wurden nach der Länge aufgetrennt und mit einem spezifischen Laser-Photometer, das die vier Fluoreszenzfarbstoffe erkennen kann, abgelesen.

Für die Sequenzreaktion wurde der Big Dye RR Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems KatNr. 43003150) verwendet. Dieser enthielt drei Komponenten Terminator Premix, Kontrolle pGEM und primer M13. Es wurden jeweils 8µl der Plasmid DNA, die mit Hind III, und 8µl Plasmid DNA, die mit Xho I geschnitten wurde, mit 8 µl Terminator Premix, 1µl Primer T7 bzw. 1µl Primer Sp6 und 1µl Aqua dest. zusammen gemischt. Die Sequenzreaktion wurde im Thermocycler PCT 100 (Firma MJ Research Inc Watertown, Mass) durchgeführt. Nach der Denaturierung für zwei Minuten wurden 25 Zyklen durchgeführt: Denaturierung bei 96°C für 15 Minuten, Annaeling bei 45°C für 15 Minuten und Amplifikation bei 60°C für vier Minuten Für die Präzipitation der Proben wurde ein Reaktionsgemisch (für 34 Proben) aus 3,2ml Aqua dest, 120µl Bluedextran (Pharmacia Biotech KatNr. 17-0360-01), 10ml abs. Ethanol und 400µl 3MNaAC pH 4,8 (Fulka KatNr. 71183) vorbereitet. 340µl des Reaktionsgemisches wurden jeweils in die Eppendorf Gefäß pipettiert und gevortext. Im Anschluss wurde das Gefäß 15 Minuten mit 13000rpm bei 10°C zentrifugiert und der Überstand mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Dann wurde das Pellet mit 50µl 70-prozentigen Ethanol gewaschen, fünf Minuten bei 13000rpm bei 10°C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und 20 Minuten unter dem Abzug in der Dunkelkammer getrocknet. Die trockenen Pellets waren sechs Wochen bei -20°C haltbar.

Durch die hochauflösende Acrylamid-Gelelektrophorese (Sequencer 373 A, Applied Biosystems) wurden die Amplifikate der Länge nach aufgetrennt und die Fluoreszenzfarbstoffe durch Laserlicht angeregt. Durch das in unterschiedlichen Farben emittierte Licht konnte die Basenabfolge ermittelt werden. Vor dem Auftragen auf das Sequenzgel wurde jedes Pellet mit 6µl Resuspendierungsgemisch (200µl Formamid + 50µl EDTA) resuspendiert.

Von jedem Amplifikat gab es einen Strang und einen Gegenstrang. Beide enthielten die klon-spezifische Vh-N-Dh-N-Jh-Sequenz. Beide Stränge waren komplementär zu einander.

3.6 Computergestützte Sequenzauswertung

3.6.1 Consensus-Sequenzbildung

Mit dem Computerprogramm Sequenzenavigator (Applied Biosystems Weiterstadt, Deutschland) wurden die einzelnen Basen in vier verschiedenen Farben dargestellt.

Zunächst wurde festgelegt, welcher der beiden Stränge der kodierende Strang war. Der kodierende Strang enthielt die Basenabfolge TATTACTGT, die das Ende von FR3 ist, und die Basenabfolge TGGGGCCAA, die den Beginn von FR4 anzeigt. Der andere Strang wurde revers komplementiert. Beide Stränge verliefen nun in 5`-3` Richtung. Nach der Kontrolle, ob der IgG-Primer vorhanden war, wurden die Enden verworfen: am 5`-Ende ca. 200bp vor der Basenabfolge TATTACTGT und am 3`-Ende ca. 80bp nach der Basenabfolge TGGGGCCAA. Anschließend wurden beide Stränge miteinander abgeglichen. Gab es in beiden Strängen uneindeutige Basenabfolgen, so wurde die Sequenz verworfen.

```

CDR2      V4-39
[ { AGT ATC TAT TAT AGT GGG AGC ACC TAC TAC AAC CCG TCC CTC
   FR3
AAG AG { T CGA GTC ACC ATA TCC GTA GAC ACG TCC AAG AAC CAG

TTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT GTG ACC GCC GCA GAC ACG GCT GTG
   CDR3      D7-27                               JH3
TAT TAC TGT { GTG CAC [ CTG GGG A ] TC GGG GGA AA [ T GAT GCT TTT
   FR4
GAT ATC { TGG GGC CAA GGG ACA ATG GTC ACC

```

Abb. 3.1: Beispielsequenz

3.6.2 Zuordnung und Analyse des V-Segmentes

Zunächst wurde die Sequenzdatei in HUSAR (<http://genius.embert.dkfz-heidelberg.de>) in das international gängige GCG-Format umformatiert. Die Sequenz wurde dann mit den bisher publizierten V_h-Keimbahnsequenzen verglichen (VBASE Sequence Directory; Tomlinson 1998), um das verwendete V_h-Segment zu identifizieren. In der Sequenz wurden Beginn und Ende von CDR2 und FR3 eingetragen sowie der Beginn der CDR3-Region, der nach der Basenabfolge TATTACTGT lag. Außerdem wurde nach Palindrom-Nukleotiden gesucht. Palindrom-Nukleotide sind dort zu finden, wo die komplette Keimbahn als Vorlage benutzt wurde, d.h. dort wo keine Nukleotide am 5'- oder 3'-Ende abgeschnitten wurden. Hört das V_h-Segment mit „GTT“ auf, so lautet die Sequenz nach Hinzufügen der P-Nukleotide „GTTAAC“. Als Mechanismus für die Entstehung der P-Nukleotide wird die Bildung einer Haarnadelstruktur, während der Umlagerung der Segmente, vermutet. Gab es Abweichungen gegenüber der Keimbahnsequenz, wurden diese analysiert und gezählt.

3.6.3 Zuordnung und Analyse der NDN-Region

Die NDN-Region liegt zwischen dem V-Segment und dem J-Segment. Dieses Stück der Sequenz wurde in der Vbase Datenbank mit den publizierten D-Segmenten verglichen und das verwendete D-Segment identifiziert. Ein D galt als auswertbar, wenn es mindestens aus 6 Nukleotiden oder aus 7 Nukleotiden und einer Mutation bestand. Jedem der 27 Vbase Ds konnte ein Genlocus nach Tomlinson (Cobett 1997) zugeordnet und die dazugehörige Gruppe bestimmt werden. Die Anzahl der Nukleotide, die bei den Genumlagerungen am 5'-Ende bzw. am 3'-Ende von der Keimbahnsequenz abgeschnitten wurden, wurde notiert. Bei Nicht-übereinstimmungen wurde die Mutation dahingehend analysiert, ob es sich um eine silente oder um eine replacement Mutation handelte und gezählt. Ebenfalls bestimmt wurde der Lese-rahmen, in welchem das D codiert wurde. Die Nukleotide zwischen dem V und dem D sowie zwischen dem D und dem J wurden gezählt und als N1 bzw. als N2 bezeichnet. Die P-Nukleotide wurden nicht zu N1 oder zu N2 gezählt, jedoch wurden sie bei der Gesamtlänge von der NDN-Region berücksichtigt.

3.6.4 Zuordnung und Analyse des J-Segmentes

Die Sequenz wurde ebenfalls mit den J_h-Keimbahnsequenzen in der Vbase-Datenbank verglichen, um das verwendete J_h-Segment zu identifizieren. Die Nukleotide, die am 5'-Ende bei der Genumlagerung abgeschnitten waren, wurden gezählt. Das Ende der CDR3-Region und der Beginn von FR4 wurden bestimmt. FR4 beginnt mit der Basenabfolge TGGGGCCAA.

Zum Schluss wurden die Mutationen im analysierten Anteil des J_h -Segments analysiert, ob sie zu einer Veränderung der Aminosäure führten.

3.6.5 Auswertung der Mutationen

Gab es Nichtübereinstimmungen zwischen einer Sequenz und der Keimbahn im CDR2- und FR3-Bereich, wurden diese Nukleotidaustausche analysiert und gezählt. Wichtig war, ob die Mutation im Triplet bei der Übersetzung mit dem genetischen Code zu einer anderen Aminosäure führt (replacement Mutation), oder ob das veränderte Triplet für die gleiche Aminosäure codierte (silente Mutation). Die Mutationsrate (Anzahl der Mutationen pro 100 Nukleotide) wurde folgenderweise berechnet: Anzahl der Mutationen multipliziert mit 100, dividiert durch die Anzahl der Nukleotide im CDR2- und FR3-Bereich. Außerdem wurde das Verhältnis von replacement zu silenten Mutationen im CDR2- und FR3-Bereich berechnet.

3.6.6 Kontaminationausschluss

Zum Abschluss der Auswertung wurde eine Kontamination ausgeschlossen. Die einzelnen Sequenzen wurden mit allen in unserer Arbeitsgruppe erhobenen RNA-Sequenzen verglichen. Zunächst wurden die Sequenzen, die das gleiche V-, D- und J-Segment sowie die identische Länge der CDR3-Region, herausgesucht. Diese Sequenzen wurden in Husar miteinander abgeglichen. Hatte die Sequenz eine unterschiedliche Abfolge der Basen, war sie noch nicht sequenziert worden und sie war einzigartig.

3.6.7 Auswertung und Statistik

Die Auswertung der Daten wurde mit dem Statistik-Programm SPSS durchgeführt.