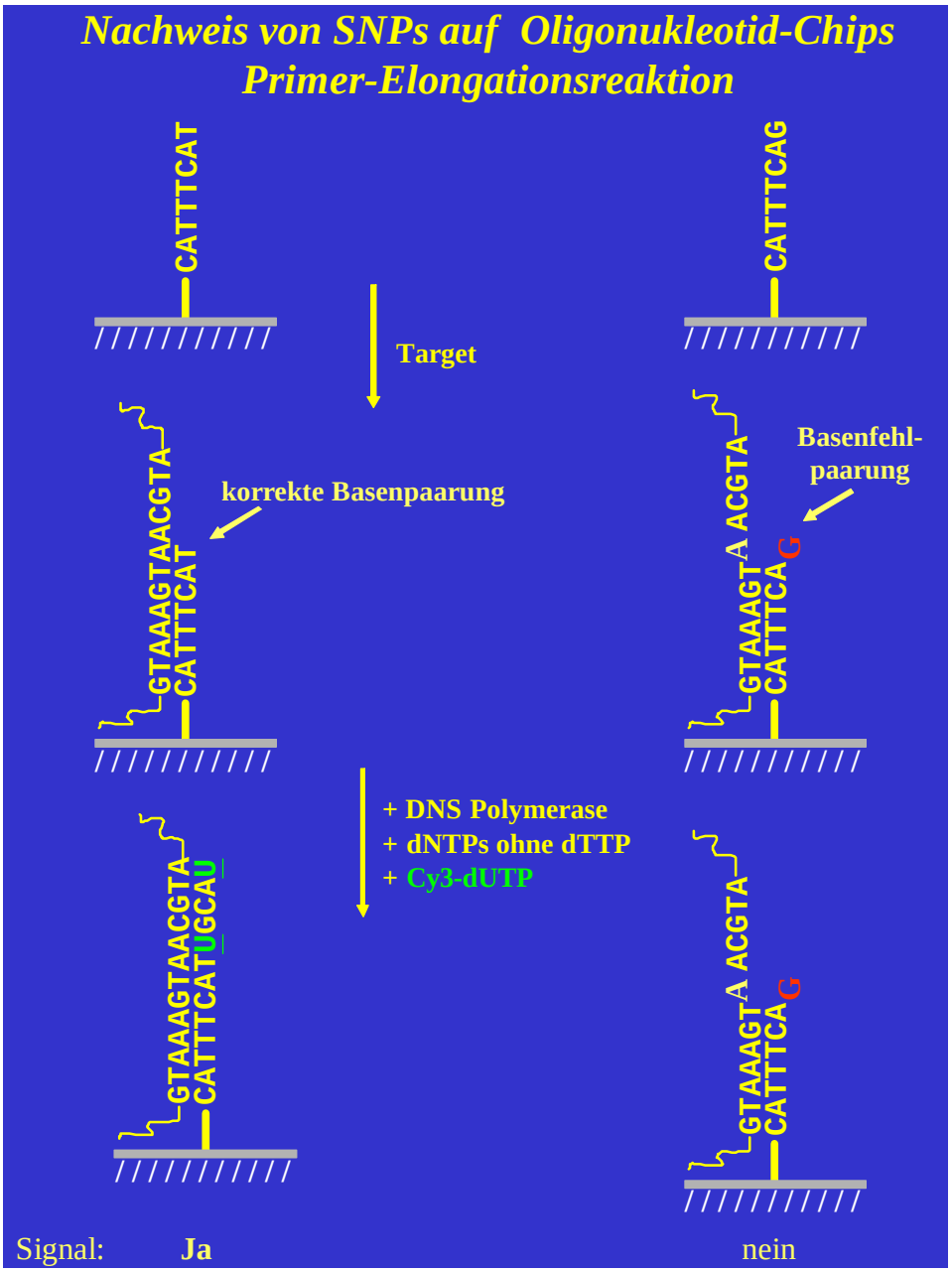
4 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde eine Methode zur Detektion von SNPs (single nucleotide polymorphisms) mittels einer Allel-spezifischen Primer-Elelongationsreaktion auf DNS-Chips entwickelt. 5´-aminomodifizierte Oligonukleotide wurden auf aktivierten Glas-Objektträgern immobilisiert. Das 5`-Ende des Oligonukleotide ist somit fest auf der Oberfläche fixiert und das 3´-Ende liegt frei beweglich vor. Die anfangs benutzten Oligonukleotide enthielten einen "Abstandshalter" von 15 T-Nukleotiden am 5´-Ende und eine spezifische Sequenz von 25 Nukleotiden. Später wurden Oligonukleotide verwendet, die keinen Abstandshalter mehr enthielten, sondern nur eine spezifische Sequenz von 50 Nukleotiden. Zum Nachweis von Basenaustauschen in der DNS wurden jeweils zwei 5´-aminomodifizierte Oligonukleotide auf Glas-Objektträgern immobilisiert (siehe Abb. 3.2). Diese Oligonukleotide sind in ihrer Sequenz bis auf die Allel-spezifische Base am freien 3`-Ende vollkommen identisch. Diese beiden unterschiedlichen Oligonukleotide sollen nach der Allel-spezifischen Primer-Elelongationsreaktion den Allelzustand anzeigen. Zur Detektion von SNPs wurden geeignete Einzelstrang-DNS-Targets hergestellt (siehe Abschnitt 3.7). Der Reaktionsansatz der Primer-Elongation enthielt alle vier Desoxyribonukleinsäuren (anstelle von dTTP wurde Cy3-dUTP verwendet), eine Einzelstrang-DNS-Zielsequenz als Matrize, welche einen zu den auf der Oberfläche immobilisierten Oligonukleotiden komplementären Bereich aufwies, sowie eine DNS-Polymerase. Die verwendete DNS-Polymerase sollte keine 3`->5` Exonuklease-Aktivität enthalten, um eine unerwünschte Korrektur von Basenfehlpaarungen zu verhindern. Ausserdem sollte das Enzym zwischen einer korrekten Einzelbasenpaarung (match) und einer Basenfehlpaarung (mismatch) am 3`Ende unterscheiden, und nur bei Vorliegen einer korrekten Basenpaarung Fluoreszenz-markierte Nukleotide einbauen. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde die Reaktion in einem Thermocycler über 15 Zyklen durchgeführt, d.h. die einzelnen Schritte der Denaturierung, des "Annealings" und der Elongation wurden fünfzehn Mal wiederholt. Das Ergebnis der Allel-spezifischen Primer-Elongationsreaktion, d.h. die

Verlängerung des entsprechenden immobilisierten Oligonukleotids unter Einbau von Fluoreszenz-markiertem dUTP, wurde mit Hilfe eines Laser-Scanners nachgewiesen und am Computer mit Hilfe von geeigneten Programmen ausgewertet.

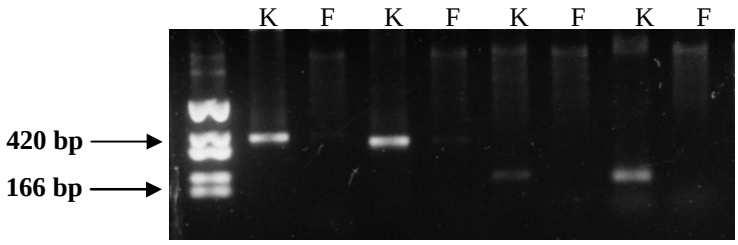
Abb. 4.1: Schematische Darstellung einer Allel-spezifischen Primer-Elongationsreaktion



4.1 Primer-Elongation in Lösung

Bevor eine Allel-spezifische Primer-Elongationsreaktion auf fester Phase entwickelt wurde, sollten Vorversuche einer Allel-spezifischen PCR in Lösung durchgeführt werden. Hierzu wurden parallel zwei PCR Reaktionen angesetzt, bei denen die beiden Primer am 3´-Ende Allel-spezifische Basen trugen. Nach Hybridisierung dieser Primer mit einer geeigneten DNS-Matrize wurde nur bei korrekter Basenpaarung zwischen Sonden- und Target-Sequenzen PCR-Produkte erhalten. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe der Primer-Elongationsmethode, Unterschiede von SNP-Allelen möglich ist (siehe Abb. 4.2).

Abb. 4.2: Gelelektrophoretische Auftrennung von Produkten einer Allel-spezischen PCR in Lösung



K = korrekte 3`-Einzelbasenpaarung des Primers
F = 3´-Basenfehlpaarung des Primers

4.2 Auswahl von Oligonukleotiden zur Detektion von Polymorphismen in mitochondrialer DNS

Zur gleichzeitigen Typisierung mehrerer Polymorphismen wurde die mitochondriale DNS (mtDNS), welche insgesamt 16,5 kb umfaßt, als Modell gewählt. In den kodierenden

Sequenzen sind 599 Polymorphismen (MITOMAP) und krankheitsassoziierte Mutationen beschrieben. Eine Gesamtanalyse der mitochondrialen Sequenzvariation erschien daher unter medizinischen Gesichtspunkt wünschenswert. Weitere ca. 400 Polymorphismen sind in den beiden hypervariablen Bereichen der mtDNS-Sequenz enthalten.

Zur Etablierung der Methode wurden 47 mtDNS-spezifische SNPs, die über die gesamte mtDNS verteilt sind, ausgewählt; sie sind in Tabelle 4.1 aufgelistet.

Tab. 4.1: Sequenzpositionen von 47 untersuchten mitochondrialen Polymorphismen

Position in mtDNS	Polymorphismus		Position in mtDNS	Polymorphismus	
3196	**g**	a	11332	**c**	t
3243	**a**	g	11467	**a**	g
3252	**a**	g	11778	**g**	a
3290	**t**	c	12246	**g**	c
3302	**a**	g	12308	**a**	g
3394	**t**	c	12311	**t**	c
3397	**a**	g	12372	**g**	a
3447	**a**	g	12612	**a**	g
3460	**g**	a	12634	**a**	t
4136	**a**	g	12705	**c**	t
4160	**t**	c	13368	**g**	a
4216	**t**	c	13708	**g**	a
4317	**a**	g	14233	**a**	g
4336	**t**	c	14484	**t**	c
4529	**a**	t	14709	**t**	g
4646	**t**	c	14905	**g**	a
4917	**a**	g	15043	**g**	a
7028	**c**	t	15205	**c**	t
8344	**a**	g	15257	**g**	a
8851	**t**	c	15326	**a**	g
8933	**t**	a, c, g	15452	**c**	a
10398	**a**	g	15607	**a**	g
10463	**t**	c	15924	**g**	a
11251	**a**	g			

4.3 Herstellung von geeigneten Oligonukleotid-Chips

Die Beschaffenheit der Objektträger erwies sich für die Allel-spezifische Primer-Elongationsreaktion auf DNS-Chips als sehr wichtig. Zum einen ist eine stabile Bindung der Allel-spezifischen Oligonukleotide erforderlich, zum anderen zeigte sich auch, daß die Spezifität der Reaktion von der Oberfläche beeinflußt wird. Es wurden verschiedene Silanisierungsprozeduren sowie verschiedene Protokolle zur Aktivierung getestet.

Die Haftung der Oligonukleotide erfolgte über eine kovalente Bindung an die freien Isothiocyanat-Gruppen, welche durch Inkubieren der silanisierten Objekttäger in der Aktivisierungslösung (enthält das bifunktionelle Molekül PDITC) hergestellt wurde (siehe auch Methodenteil, Abschnitt 3.1.2).

Die kommerziell erhältlichen Aminosilan-Objektträger der Firma Sigma und In situ PCR Glas-Objektträger von Perkin Elmer lagen bereits silanisiert vor. Konventionelle unbehandelte Objektträger wurden von der Firma Menzel-Gläser bezogen und selbst silanisiert. Die Silanisierung und die anschließende Aktivierung wurden mit einigen Veränderungen nach der von Guo et al. beschriebenen Prozedur durchgeführt. Hierzu wurden Objektträger mit einer Lösung von 1%, 2% oder 3% Aminopropyltriethoxysilan behandelt. Auf diese Weise behandelte Objektträger wurden anschließend zur Immobilisierung von Oligonukleotiden verwendet (siehe Abschnitt 3.1.1). Nach dem Aufbringen der Oligonukleotide mit Hilfe eines Roboters wurde die Oberfläche der Objektträger deaktiviert und diese in Primer-Elongationsreaktionen eingesetzt. Die Bedingungen der Primer-Elongationsreaktion sind dem Abschnitt 3.11.3 zu entnehmen.

Dabei ergaben die selbst hergestellten Objektträger die besten Ergebnisse bezüglich der Diskriminierung, Signal-Hintergrund-Verhältnis und Stabilität. Bei Verwendung von 1% Aminopropyltriethoxysilan zur Beschichtung der Objektträger wurden bessere Ergebnisse ermittelt, als bei höheren Aminopropyltriethoxysilan-Konzentrationen. Zu Beginn dieser Arbeit wurden mit beschichteten Glas-Objektträgern der Firma Perkin Elmer gute Ergebnisse erreicht, jedoch waren die Ergebnisse mit späteren Chargen dieser Firma sehr

viel schlechter. Im folgenden wurden deshalb alle Primer-Elongationsreaktionen mit selbst hergestellten Aminopropyltriethoxysilan beschichteten Objektträgern durchgeführt.

4.4 Falsch-positive Signale ohne Zusatz einer DNS-Matrize

Bei einigen Primer-Elongationsreaktionen zeigten sich falsch-positive Signale, d.h. Fluoreszenzsignale, welche auch bei Abwesenheit einer DNS-Matrize auftraten.
Solche falsch-positiven Signale lassen sich theoretisch durch Rückfaltungen einzelsträngiger Oligonukleotid-Moleküle oder durch die Hybridisierung benachbart immobilisierter Oligonukleotide erklären. 5 von 6 solcher falsch-positiven Signale gingen anscheinend tatsächlich auf die Bildung solcher Dimere zurück, wie die Sequenzanalyse der betreffenden Sonden ergab (siehe Abb. 4.3).

Abb. 4.3: Sequenzen, von immobilisierten Sonden, bei denen falsch-positive Signale beobachtet wurden

1 **T**AC**A**ACTA**C**G**C**AA**AGG**CC**CC**A**AC**GTT**GT**A**GG**CC**CCT**AC**GG**G**CTAC**T**AC**A**A
AA**C**AT**C**ATC**GG**G**C**A**TCC**CC**GGA**TG**TTG**CA**A**CC**CC**GGA**AA**C**G**C**ATCA**A**CA**T**

3 ATGTCGAAGCCCCCATCGCTGGGT**CAA**T**AGTACT**TGCCGC**AGTACT**C**TTG**
GTTC**TCATGA**CGCCGT**TCATGA**T**AAC**TGGGTCGCTACCCCCGAAGCTGTA

4 **ACAT**CTG**TA**CCCAC**GCC**T**T**CTTC**AA**A**GC**CATAC**TA**TTT**ATGT**GCTCCGGA
AGGCCTCG**TGTA**TTT**AT**CATAC**CG**A**AA**CTTC**TT**C**CG**CACCC**AT**GTC**TACA**

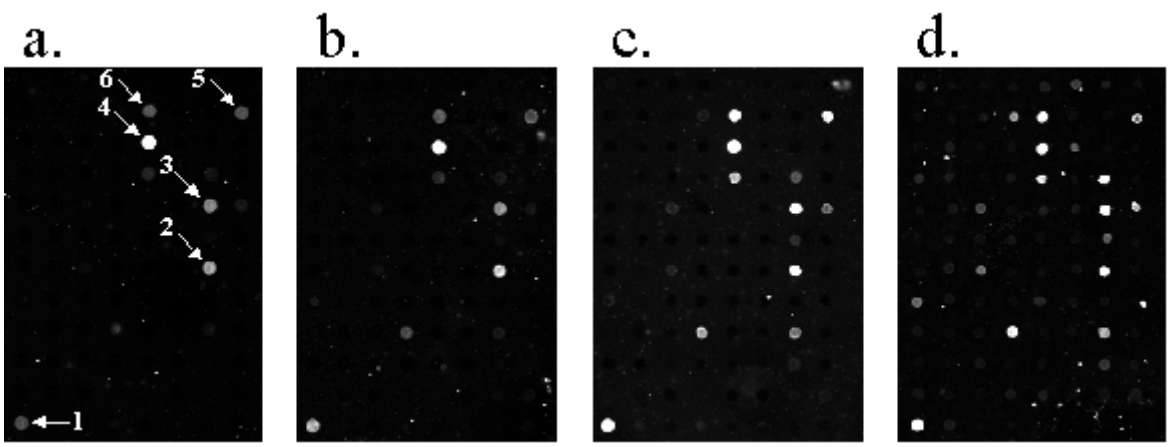
5 **TT**G**G**CGCCTG**CCTG**ATCCTCCAAATCACCA**CAGG**ACTATT**CC**T**A**GCCATG
GTACCG**A**T**CC**TTATCA**GGAC**ACCACTAAACCTCCTA**GTCC**GTCCGC**GGT**T

6 ATACATTGGGACAGAC**CTA**G**T**TCAAT**G**AA**TC**TGAG**GA**GG**C**TACTC**A**G**TAG**
GATG**A**CTCAT**C**GG**AG**GAGT**CT**AA**G**TAACT**T**G**ATC**CAGACAGGGTTACATA

Weitere Experimente zeigten, daß falsch-positive Signale durch den Silanisierunggrad der Objektträger (siehe Abschnitt 3.1.1) beeinflusst werden können.

Eine Zunahme der Aminopropyl-triethoxysilan-Konzentration, führte zwar zu einer Zunahme der Signalintensitäten, gleichzeitig stieg jedoch auch die Zahl der falsch- positiven Signalen (siehe Abb. 4.4a-c). Die größte Anzahl falsch-positiver Signale wurde bei Verwendung fertig silanisierter Glas-Objektträger von Perkin Elmer festgestellt (siehe Abb. 4.4d).

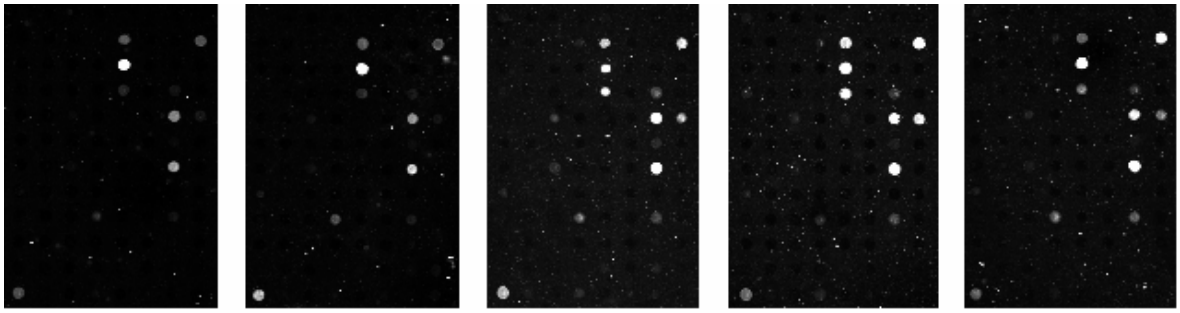
Abb. 4.4: Falsch-positive Signale bei Verwendung unterschiedlich silanisierter Glas-Objektträger



1% 2% 3% 2% PE

Ausserdem konnte gezeigt werden, dass verschiedene Parameter des Primer-Elongationsprotokolls (Standardbedingungen: siehe Abschnitt 3.11.3) das Auftreten falsch-positiver Signale beeinflussen. Die Erhöhung der Zyklenzahl von 15 auf 25, die Änderung der Annealing-Temperatur von 56°C auf 48°C, aber auch eine Verdoppelung der Annealing-Zeit und der Elongationszeit führte zur Zunahme von falsch-positiven Signalen (siehe Abb. 4.5).

Abb. 4.5: Einfluss verschiedener Reaktionsparameter auf das Auftreten falsch-positiver Signale



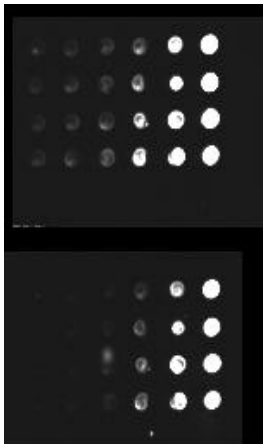
15 Zyklen | 25 Zyklen | 48°C annealing | doppelte annealing Zeit | doppelte Elongationszeit

4.5 Das Aufbringen von Oligonukleotiden auf aktivierte Objektträger

Das Aufbringen von aminomodifizierten Oligonukleotiden auf Objektträger geschah mit Hilfe eines Roboters (Beecher Instruments). Die Oligonukleotide wurden in verschiedenen Lösungen (H_2O oder in 400 mM Na_2CO_3) aufgenommen. Bessere Ergebnisse (höhere Signalintensitäten bei gleich guter Diskriminierung) wurden mit 400mM Natriumkarbonat-Puffer pH 9,0 erhalten (siehe Abb. 4.7). Die stabile Bindung der Oligonukleotide an Objektträger ist für die nachfolgende Primer-Elongationsreaktion von großer Bedeutung. Um zu prüfen, ob die immobilisierten Oligonukleotide auch tatsächlich an der Glasoberfläche binden, wurde ein Oligonukleotid eingesetzt, welches am 3`-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Cy3-dUTP) markiert war. Dieses Fluoreszenz-markierte Oligonukleotid wurde auf aktivierten Objektträger immobilisiert und einer stringenten Waschung unterworfen. Vor und nach dem Waschen wurden die Objektträger mit Hilfe eines Laser-Scanners untersucht. Das Ergebnis bestätigte die Erwartung, daß die Oligonukleotide kovalent an der Glasoberfläche gebunden sind: sogar bei diesen hoch-stringenten Bedingungen konnten sie nicht abgelöst werden. Da die Objektträger bei der Primer-Elongationsreaktion bei jedem Zyklus auf 90°C (Denaturierungs-Schritt) erhitzt

werden müssen, stellte dieses Ergebnis eine wichtige Voraussetzung dar für die Verwendung der Chips in Primer-Elongationsreaktionen.

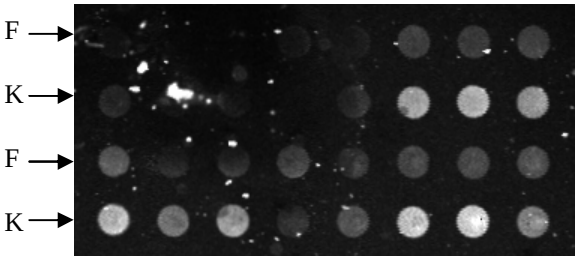
Abb. 4.6: Nachweis der kovalenten Bindung von Oligonukleotiden auf Glas-Objektträgern



Chip vor dem Waschen

Chip nach dem Waschen bei 95°C

Abb.4.7: Lösen der Allel-spezifischen Oligonukleotide in verschiedenen Lösungen (H_2O und in Na_2CO_3)



Oligonukleotide gelöst in H_2O

Oligonukleotide gelöst in 400 mM Na_2CO_3

K = korrekte 3`-Einzelbasenpaarung des Primers
F = 3´-Basenfehlpaarung des Primers

4.6 Verwendung von verschiedenen Oligonukleotiden

Für die erfolgreiche Untersuchung von Einzelbasenaustauschen in der DNS war es notwendig, festzustellen, welche Art von Oligonukleotidsequenzen sich am besten für die Allel-spezifische Primer-Elongationsreaktion eignen würden. Hierzu wurden folgende Arten von aminomodifizierten Oligonukleotiden verwendet (siehe Tabelle 4.2).

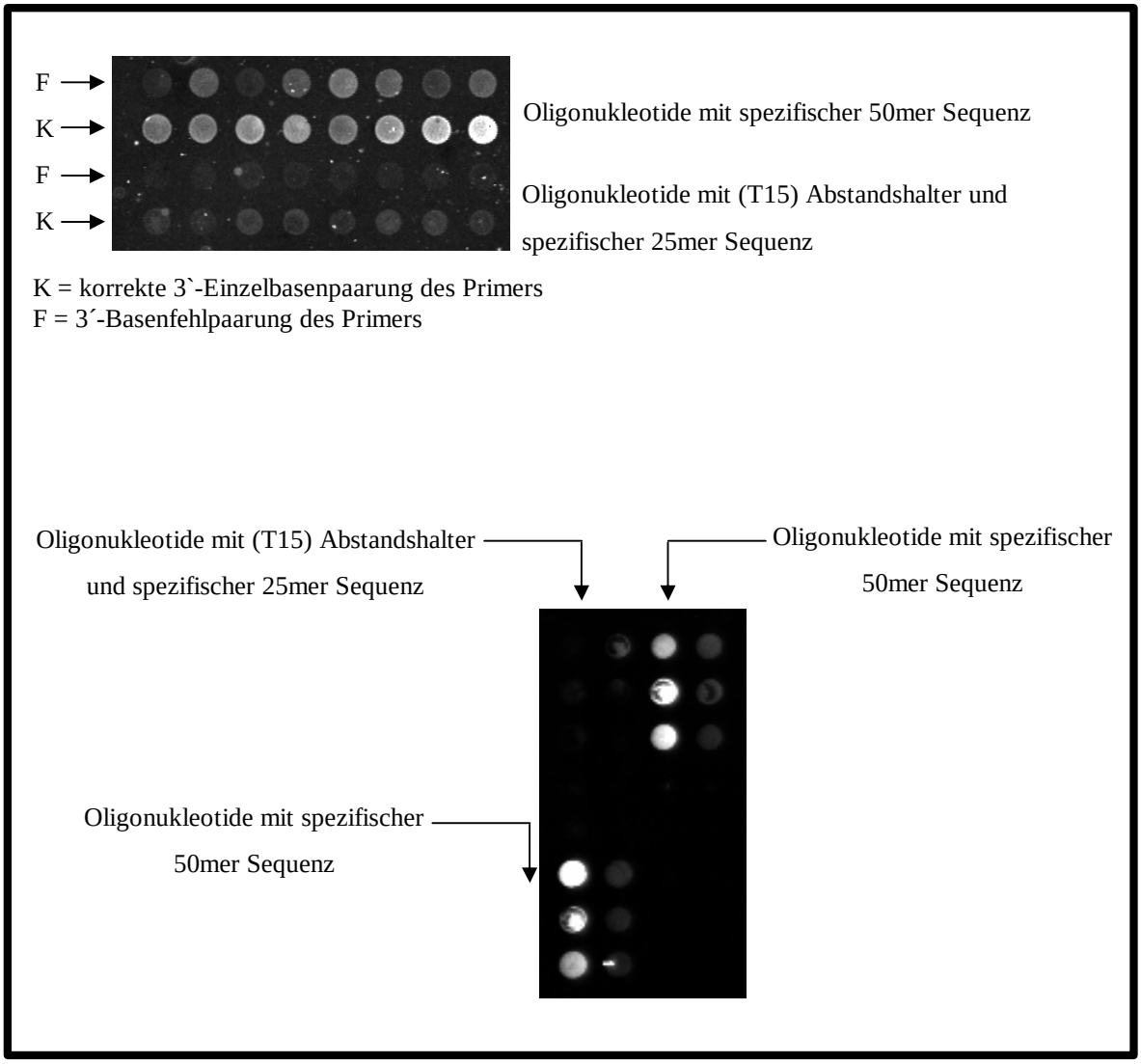
Tab. 4.2: Unterschiedliche Typen Allel-spezifischer Oligonukleotide

	Name	5` ⟶ 3`
I	Amino-3196 g	NH_2- *atgatatcatctcaactta**g***
II	Amino-T_{15}-3196 g	NH_2- TTTTTTTTTTTTTTT*atgatatcatctcaactta**g***
III	Amino-3196 g 50mer	NH_2-gcctacttcacaaagcgccttcccccgtaa*atgatatcatctcaactta**g***

Die drei Oligonukleotide entsprechen sich in der spezifischen Endsequenz zur Detektion von Basenaustauschen, sind aber unterschiedlich lang. Es wurden Oligonukleotide getestet, die nur aus 20bp der spezifischen Sequenz bestehen (I), außerdem solche (II) benutzt, die am 5`Terminus einen Abstandshalter (15 T) enthalten, sowie Oligonukleotide (III), die spezifische Sequenz einer Länge von 50 Nukleotiden enthielten. Diese drei verschiedenen Arten von Oligonukleotiden wurden auf aktivierten Objektträgern immobilisiert und einer Allel-spezifischen Primer-Elongationsreaktion unterworfen. Die erhaltenen Ergebnisse zeigten, daß 20mer Oligonukleotide für die Diskriminierung von Basenaustauschen nicht geeignet sind. Der Einsatz von Oligonukleotiden, die einen zusätzlichen Abstandshalter von 15 T-Nukleotiden trugen, zeigte, dass die Zugänglichkeit des DNS-Targets zu den

Oligonukleotiden verbessert wird. Noch bessere Ergebnisse wurden mit Oligonukleotiden einer Länge von 50 Nukleotiden spezifischer Sequenz erhalten.

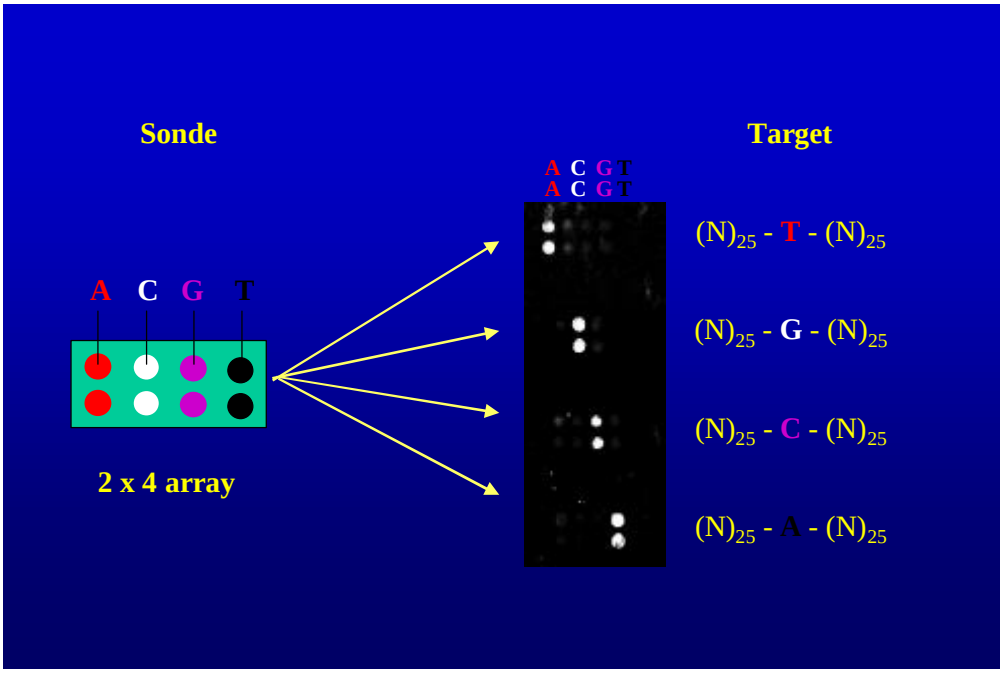
Abb. 4.8: Einsatz verschiedener Allel-spezifischer Oligonukleotid-Typen



4.7 Primer-Elongationsreaktion mit synthetischen 50mer Oligonukleotiden als Zielsequenz

Als ersten und einfachsten Test für das Gelingen der Allel-spezifischen Primer-Elongationsreaktion wurden synthetische 50mer-Oligonukleotide als Zielsequenz (Target) eingesetzt. Diese haben den Vorteil, dass sie die einfachste Einzelstrang-Matrize und das beste Modell zum Testen der Methode darstellen. Hierzu wurden vier 50mer Oligonukleotide benutzt, bei denen das 25. Nukleotid jeweils einem der 4 Desoxynukleotide A, C, G oder T entsprach, ansonsten war die Sequenz der Positionen 1-24 und 26-50 identisch. Die ersten 25 Nukleotide waren komplementär zu den auf der Glasoberfläche immobilisierten Oligonukleotiden. Auf aktivierte Objektträger immobilisierte Oligonukleotide sind in Tabelle 3.5 dargestellt und unterscheiden sich nur in der Base am freien 3´-Ende. Es wurden vier Primer-Elongationsreaktionen parallel durchgeführt, bei denen jeweils eines der vier 50mer Oligonukleotide als Target eingesetzt wurden. Die Ergebnisse zeigten, daß 50mer-Oligonukleotid-Targets eine gute Diskriminierung allelischen Basenaustauschen erlauben.

Abb. 4.9: Nachweis von SNPs mit synthetischen Oligonukleotid-Targets



Tab. 4.3: Fluoreszenzsignale der Primer-Elongationsreaktion unter Verwendung von synthetischen 50mer Oligonukleotiden als Target

Sonde (3´-Base)	Target (50mere)	Signal-Intensität	Verhältnis
A	25-T-25	20481,55	33,5
A		22476,50	
C		1169,88	
C		946,62	
G		461,12	
G		447,14	
T		415,26	
T		399,71	
A	25-G-25	1501,95	
A		718,98	
C		18343,03	15
C		21113,88	
G		2141,53	
G		2044,26	
T		627,39	
T		806,76	
A	25-C-25	2175,64	
A		758,45	
C		671,80	
C		506,70	
G		23585,77	24
G		23714,25	
T		932,08	
T		886,03	
A	25-A-25	1099,05	
A		487,05	
C		402,19	
C		348,05	
G		498,90	
G		235,19	
T		11749,07	20
T		7965,02	

4.8 Optimierung der Primer-Elongationsreaktion

4.8.1 Testen verschiedener DNS-Polymerasen

Der erste Schritt zur Optimierung der Reaktionsbedingungen bestand in der Ermittlung von geeigneten DNS-Polymerasen, die auf folgende Kriterien hin überprüft wurden:

- Maximale Verlängerung (Elongation),
- Einbau des Farbstoffes,
- Sensitivität (Signal-Hintergrund-Verhältnis) und Diskriminierung (Signalunterschied korrekte Basenpaarung zu Basenfehlpaarung)

Es wurden mehrere DNS-Polymerasen getestet, die laut Hersteller keine 3`-> 5` Exonuklease-Aktivität besaßen. Mit diesen verschiedenen DNS-Polymerasen wurden Primer-Elongationsreaktionen durchgeführt. Die Red-Taq-DNS-Polymerase von Sigma erfüllte die oben aufgezählten Kriterien am besten. Gleichzeitig wurde das Themoprofil für die Primer-Elongationsreaktion optimiert.

4.8.2 Optimierung des Thermoprofils

Für die Optimierung von PCR-Reaktionen spielt das Thermoprofil (Temperaturen und Zeiten der einzelnen Zyklusschritte) eine entscheidende Rolle. Somit war zu erwarten, dass diese Parameter auch bei der Allel-spezifischen Primer-Elongationsreaktion auf Glasoberflächen von Bedeutung sind. Es wurden verschiedene Allel-spezifische Primer-Elongationsreaktionen mit unterschiedlichen Targets durchgeführt, und anhand dieser Ergebnisse wurde ein optimales Thermoprofil ermittelt. Dabei wurde die Temperatur, die Zeitdauer und die Anzahl der Zyklen verändert. Das optimierte Thermoprofil für die Allel-spezifische Primer-Elongationsreaktion ist in Abschnitt 3.11.3 dargestellt.

4.8.3 Weitere Zusätze zur Optimierung der Allel-spezifischen Primer-Elongationsreaktion

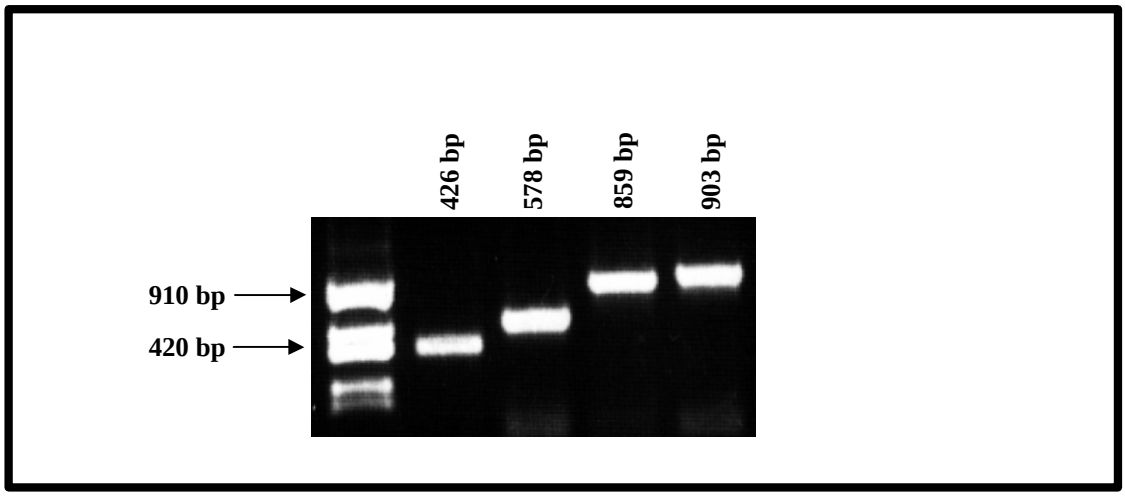
Entscheidend für eine genaue Typisierung von SNPs ist eine gute Unterscheidung der benachbarten Allele. Zu ihrer Optimierung wurden verschiedene Zusätze der Primer-Elongationsreaktion getestet. DMSO, humane Cot1-DNS, Tetramethylammonimchlorid (TMA-Chlorid), BSA und ein kommerziell erhältlicher ”Perfect Match Enhancer“ wurden als Komponenten zur Optimierung der Primer-Elongationsreaktion hinzugefügt. Dabei ergaben TMA-Chlorid und die Kombination von TMA-Chlorid und BSA die besten Ergebnisse.

4.9 Herstellung geeigneter einzelsträngiger Zielsequenzen

4.9.1 Synthetische Oligonukleotide

Die Herstellung von geeigneten einzelsträngigen Matrizen wurde im Methodenteil ausführlich beschrieben und stellte sich als ein kritischer Faktor der Allel-spezifischen Primer-Elongationsreaktion heraus. Die Ergebnisse der Primer-Elongationsreaktion zeigten eine deutliche Abhängigkeit von der Art der Matrizen. Als einfachste Zielsequenz wurden zunächst (einzelsträngige) synthetische Oligonukleotide eingesetzt (siehe Abschnitt 4.7), die sich als gut geeignet herausstellten.

Abb. 4.10: Elektrophoretische Auftrennung von PCR Produkten aus mtDNA



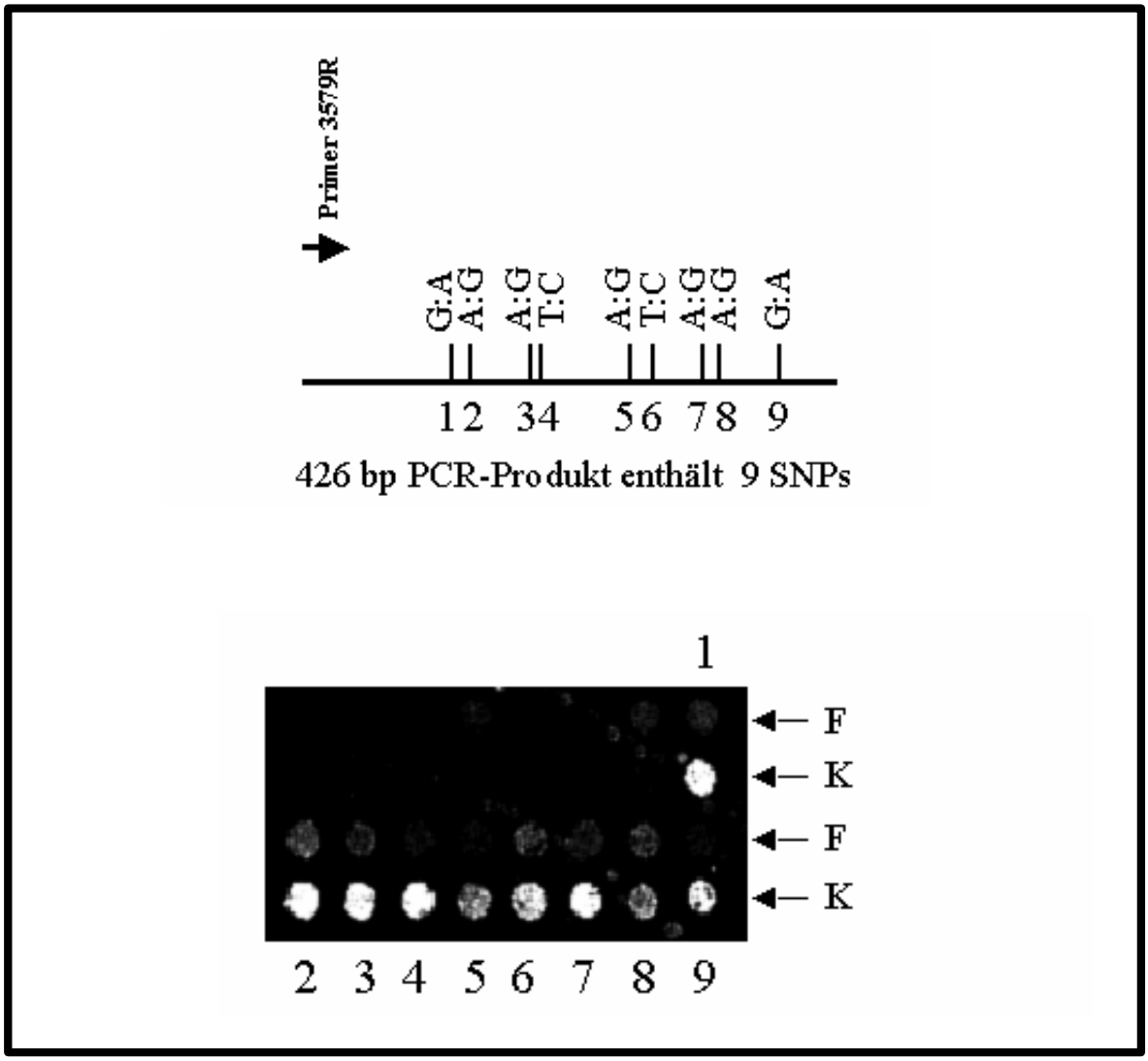
4.9.2 Allel-spezifische Primer-Elongationsreaktion mit asymmetrischen und asymmetrischen-multiplex-PCR-Produkten

Um SNPs in mitochondrialer DNS nachzuweisen, mussten die entsprechenden DNS-Abschnitte amplifiziert werden. Derartige amplifizierten DNS-Abschnitte werden in der vorliegenden Arbeit als Targets bezeichnet. Bei Verwendung konventioneller Doppelstrang-PCR-Produkte als Targets wurden im Vergleich zu den Versuchen mit synthetischen Oligonukleotiden nur sehr schwache Signale erhalten. Deshalb wurden verschiedene Verfahren zur Herstellung von Einzelstrang- Targets getestet. Eine dieser Methoden war die asymmetrische PCR-Reaktion.

Die Herstellung von asymmetrischen Targets ist im Methodenteil beschrieben. Ein erstes Produkt wurde in einer asymmetrischen Reaktion ausgehend von einer doppelsträngigen 426bp Matrize hergestellt. Zunächst wurde ein einzelner Primer “oberstrom“(=5`) von 9 SNPs dieser 426bp Sequenz, für die asymmetrische PCR verwendet (siehe Abb. 4.11). Dieses asymmetrische PCR-Produkt wurde in einer Primer-Elongationsreaktion mit einem

mtDNS Chip eingesetzt, welcher 96 Allel-spezifische Oligonukleotide enthielt. Sämtliche Allele dieser 9 SNPs konnten in diesem Experiment korrekt nachgewiesen werden. Die relativen Signalintensitäten der korrekten Basenpaarungen und der Basenfehlpaarungen sind in Tabelle 4.4 aufgeführt.

Abb. 4.11: Fluoreszenzsignale der Primer-Elongationsreaktion unter Verwendung von Targets, welche in einem asymmetrischen PCR-Ansatz mit einem Primer hergestellt wurden

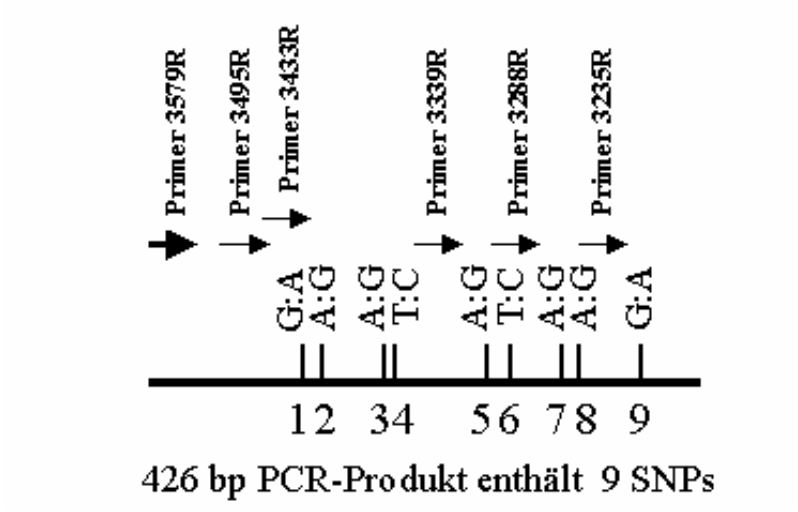


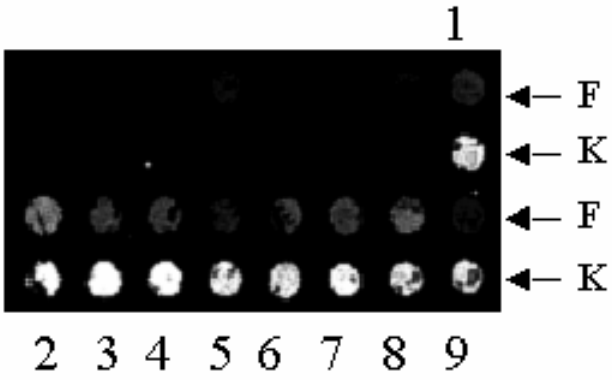
Tab. 4.4: In der Tabelle sind die Positionen der SNPs in der mtDNS, die Anordnung in der Mikrotiterplatte und die Durchschnittsintensitäten (Hintergrund abgezogen) sowie das Verhältnis von Basenpaarungen zu Basenfehlpaarungen nach der Primer-Elongationsreaktion dargestellt. Als Target wurde ein asymmetrisches PCR-Produkt verwendet (siehe Abbildung. 4.11)

Nr.	SNP	Position in MTP	Durchschnittsintensität	Signal-Verhältnis
1	3460g	Platte-1A3	23007,0	4,0
	3460a	Platte-1A4	5714,0	
2	3447a	Platte-1H1	21696,0	2,4
	3447g	Platte-1H2	9006,0	
3	3397a	Platte-1G1	20633,0	3,1
	3397g	Platte-1G2	6576,0	
4	3394t	Platte-1F1	26094,0	6,3
	3394c	Platte-1F2	4154,0	
5	3302a	Platte-1E1	10550,0	3,0
	3302g	Platte-1E2	3530,0	
6	3290t	Platte-1D1	15078,0	2,2
	3290c	Platte-1D2	6948,0	
7	3252a	Platte-1C1	20608,0	4,2
	3252g	Platte-1C2	4908,0	
8	3243a	Platte-1B1	10998,0	1,7
	3243g	Platte-1B2	6598,0	
9	3196g	Platte-1A1	17290,0	5,5
	3196a	Platte-1A2	3139,0	

Unter Verwendung des gleichen 426 bp Produkts wurde anschließend eine asymmetrische multiplex-PCR mit sechs verschiedenen Primern (R-3235, R-3288, R-3339, R-3433, R-3495 und I3579H), durchgeführt. Das Produkt dieser Reaktion wurde dann ebenfalls als Matrize für die Allel-spezifische Primer-Elongationsreaktion auf dem mtDNS Chip herangezogen. Bei diesem Experiment konnten ebenfalls alle 9 SNPs zuverlässig nachgewiesen werden. Die Signalverhältnisse (Diskriminierung) sind in Tabelle 4.5 aufgeführt.

Abb. 4.12: Fluoreszenzsignale der Primer-Elongationsreaktion unter Verwendung von Targets, welche in einer asymmetrischen Multiplex-PCR mit 6 Primern hergestellt wurden





Tab. 4.5: In der Tabelle sind die Positionen der SNPs in der mtDNS, die Anordnung in der Mikrotiterplatte und die Durchschnittsintensitäten (Hintergrund abgezogen)sowie das Verhältnis von Basenpaarungen zu Basenfehlpaarungen nach der Primer-Elongationsreaktion dargestellt. Als Target wurde ein asymmetrisches multiplex PCR-Produkt verwendet (siehe Abbildung. 4.12)

Nr.	SNP	Position in MTP	Durchschnittsintensität	Signal-Verhältnis
1	3460g	Platte-1A3	13317,0	2,4
	3460a	Platte-1A4	5480,0	
2	3447a	Platte-1H1	15880,0	1,6
	3447g	Platte-1H2	9904,0	
3	3397a	Platte-1G1	21578,0	3,3
	3397g	Platte-1G2	6491,0	
4	3394t	Platte-1F1	25141,0	3,8
	3394c	Platte-1F2	6580,0	
5	3302a	Platte-1E1	14275,0	3,4
	3302g	Platte-1E2	4189,0	
6	3290t	Platte-1D1	14163,0	2,8
	3290c	Platte-1D2	5131,0	
7	3252a	Platte-1C1	17954,0	2,6
	3252g	Platte-1C2	6987,0	
8	3243a	Platte-1B1	1330,0	
	3243g	Platte-1B2	7976,0	6,0
9	3196g	Platte-1A1	11741,0	3,2
	3196a	Platte-1A2	3674,0	

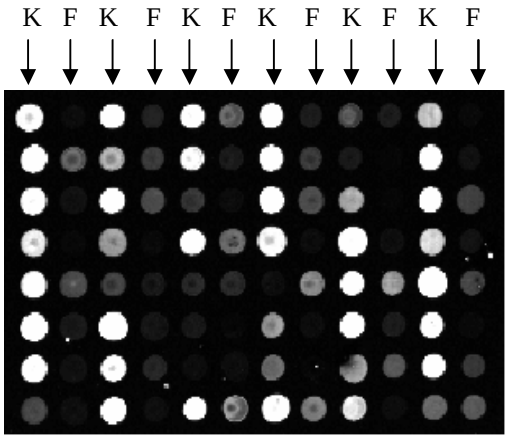
4.10 Allel-spezifische Primer-Elongationsreaktion mit asymmetrischen multiplex-PCR-Produkten

Um alle 47 Polymorphismen auf dem mtDNS Oligonukleotid-Chip zu detektieren, wurden drei lange PCR Produkte hergestellt und als Matrize für eine asymmetrische multiplex PCR eingesetzt, wie im Methodenteil beschrieben (siehe Tab. 3.3).

Für die Herstellung von asymmetrischen multiplex PCR-Produkten wurden insgesamt 48 Primer verwendet. Die Produkte der drei asymmetrischen multiplex PCR-Ansätze wurden gereinigt, vereinigt und in einer Primer-Elongationsreaktion eingesetzt. Insgesamt konnten

45 der 47 SNPs nachgewiesen werden. Der Nachweis zweier SNP gelang nicht, in einem Fall aufgrund der nicht hinreichend verschiedenen Signalintensitäten für die beiden Allele (SNP 29, siehe Abb. 4.13), im anderen Fall aufgrund zu schwacher Signalintensitäten (SNP 26, Abb. 4.13).

Abb. 4.13: Fluoreszenzsignale der Primer-Elongationsreaktion unter Verwendung von Targets, welche in drei multiplex asymmetrischen PCR-Ansätzen mit insgesamt 48 Primern hergestellt wurden.



K = korrekte 3`-Einzelbasenpaarung des Primers
F = 3´-Basenfehlpaarung des Primers

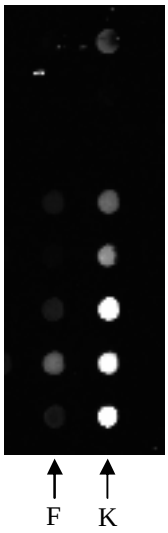
Tab. 4.6: In der Tabelle sind die Positionen der SNPs in der mtDNS, die Anordnung in der Mikrotiterplatte und das Verhältnis von Basenpaarungen zu Basenfehlpaarungen nach der Primer-Elongationsreaktion dargestellt.

3196**g**	3196**a**	23,2	3460**g**	3460**a**	11,2	4917**a**	4917**g**	3,0	11332**c**	11332**t**	11,2	12612**a**	12612**g**	2,8	14960**g**	14960**a**	22,5
3243**a**	3243**g**	3,4	4136**a**	4136**g**	2,6	7028**c**	7028**t**	9,1	11467**a**	11467**g**	6,1	12634**a**	12634**t**	4,1	15043**g**	15043**a**	19,8
3252**a**	3252**g**	15,6	4160**t**	4160**c**	4,7	8344**a**	8344**g**	5,3	11778**g**	11778**a**	6,8	12705**c**	12705**t**	5,0	15205**c**	15205**t**	6,2
3290**t**	3290**c**	30,7	4216**t**	4216**c**	18,1	8851**t**	8851**c**	3,3	12246**g**	12246**c**	22,6	13368**g**	13368**a**	23,0	15326**g**	15326**a**	10,7
3302**a**	3302**g**	3,2	4317**a**	4317**g**	2,8	8993**a**	8993**c**		8993**g**	8993**t**	3,2	13708**g**	13708**a**	1,9	15452**c**	15452**a**	6,7
3394**t**	3394**c**	11,2	4336**t**	4336**c**	21,7	10398**a**	10398**g**	3,3	12308**a**	12308**g**	12,5	14233**a**	14233**g**	19,5	15607**a**	15607**g**	34,0
3397**a**	3397**g**	18,8	4529**a**	4529**t**	6,5	10463**t**	10463**c**	0,9	12311**t**	12311**c**	16,2	14484**t**	14484**c**	1,6	15924**g**	15924**a**	5,4
3447**a**	3447**g**	5,8	4646**t**	4646**c**	29,4	11251**a**	11251**g**	3,2	12372**g**	12372**a**	2,3	14709**t**	14709**g**	19,6	15257**g**	15257**a**	1,2

4.11 Allel-spezifische Primer-Elongationsreaktion mit RNS als Matrize

Wie im Methodenteil (Abschnitt 3.7.6) beschrieben, wurde eine 186bp lange RNS-Sequenz hergestellt und als Matrize in einer Allel-spezifischen Primer-Elongationsreaktion eingesetzt. Die Reaktion wurde unter Standardbedingungen durchgeführt.
Auch auf diesem Wege war es möglich, 8 SNP-Allele mit Hilfe des Oligonukleotid-Chips spezifisch nachzuweisen.

Abb. 4.14: Fluoreszenzsignale der Primer-Elongationsreaktion unter Verwendung eines Targets, welche in einer In vitro-Transkriptionsreaktion hergestellt wurde.



K = korrekte 3`-Einzelbasenpaarung des Primers
F = 3´-Basenfehlpaarung des Primers

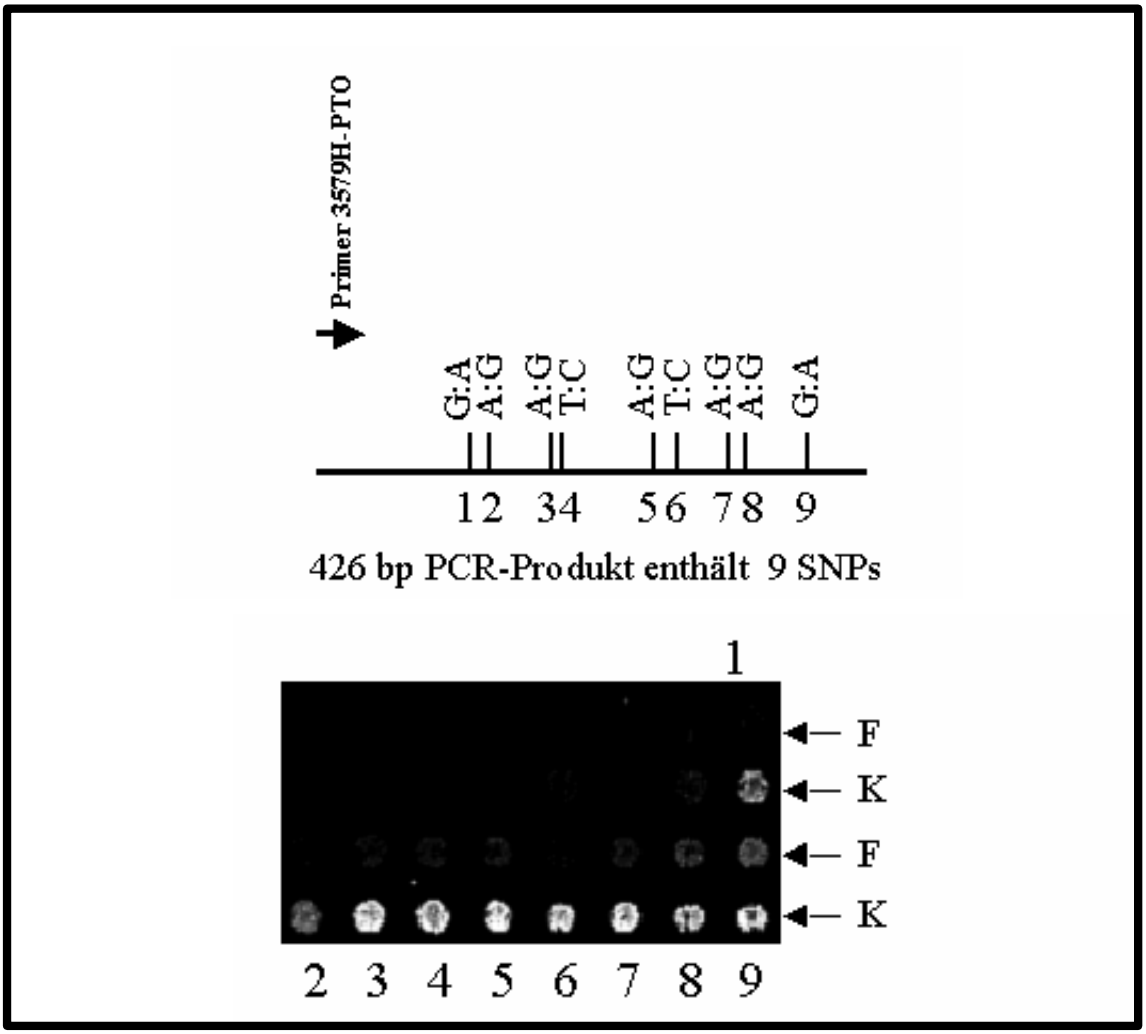
4.12 Allel-spezifische Primer-Elongationsreaktion mit einzelsträngiger PTO-modifizierter Matrizen-DNS

Als weitere Methode zur Herstellung von Einzelstrang-Matrizen wurde eine konventionelle PCR durchgeführt, bei der einer der beiden Primer an den ersten drei 5`-Basen PTO-modifiziert war (siehe auch Methodenteil Abschnitt 3.7.5). So hergestellte PCR-Produkte sind vor einem Abbau durch eine 5´->3´Exonuklease geschützt. Sie wurden anschließend

mit Exonuklease behandelt, um den unmodifizierten Strang zu verdauen und somit Einzelstrang-DNS zu erhalten.

Da innerhalb der mtDNS viele relevante SNPs eng benachbart sind, kann man mehrere SNPs mit Hilfe einer einzigen einzelsträngigen Matrize typisieren, und selbst die Untersuchung aller SNPs im mt-Genom erfordert nur eine begrenzte Zahl solcher Matrizen. Zunächst wurde ein PTO-modifizierter Einzelstrang für die bereits zuvor eingesetzten 426 bp Sequenz hergestellt, welche 9 SNPs enthielt. Damit konnten alle 9 SNPs nachgewiesen werden. Die relativen Signalintensitäten der beiden Allele sind in Tabelle 4.7 aufgeführt.

Abb. 4.15: Fluoreszenzsignale der Primer-Elongationsreaktion unter Verwendung von PTO-modifizierten Einzelstrang-DNS-Targets.

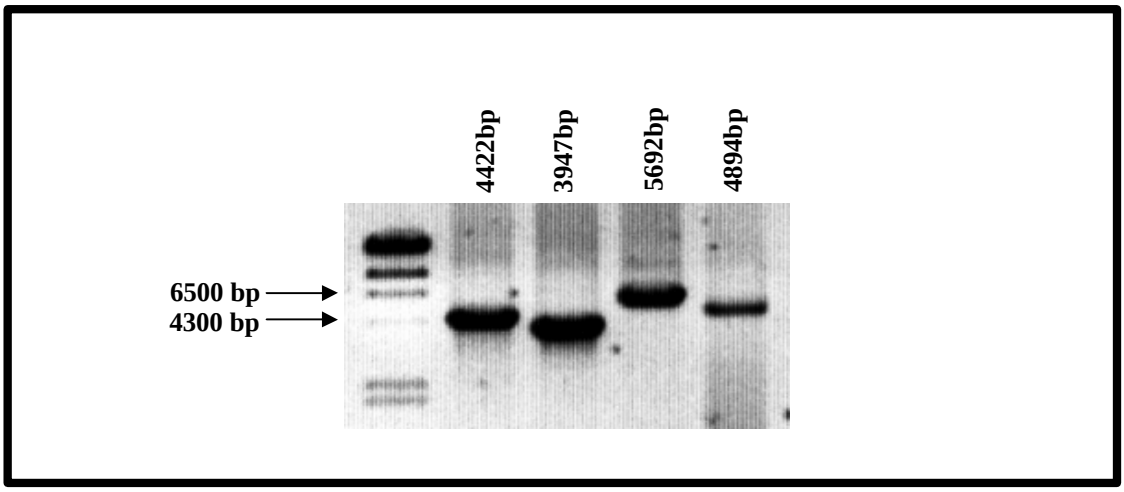


Tab. 4.7: In der Tabelle sind die Positionen der SNPs in der mtDNS, die Anordnung in der Mikrotiterplatte und die Durchschnittsintensitäten (Hintergrund abgezogen) sowie das Verhältnis von Basenpaarungen zu Basenfehlpaarungen nach der Primer-Elongationsreaktion dargestellt. Als Target wurde ein PTO-modifiziertes Einzelstrang-DNS-Produkt verwendet (siehe Abbildung. 4.15)

Nr.	SNP	Position in MTP	Durchschnittsintensität	Signal-Verhältnis
1	3460g	Platte-1A3	12899,0	4,6
	3460a	Platte-1A4	2784,0	
2	3447a	Platte-1H1	12727,0	4,4
	3447g	Platte-1H2	2868,0	
3	3397a	Platte-1G1	21559,0	4,9
	3397g	Platte-1G2	4375,0	
4	3394t	Platte-1F1	20653,0	3,9
	3394c	Platte-1F2	5332,0	
5	3302a	Platte-1E1	21648,0	4,1
	3302g	Platte-1E2	5265,0	
6	3290t	Platte-1D1	18151,0	8,2
	3290c	Platte-1D2	2212,0	
7	3252a	Platte-1C1	21087,0	3,9
	3252g	Platte-1C2	5389,0	
8	3243a	Platte-1B1	18411,0	2,3
	3243g	Platte-1B2	8001,0	
9	3196g	Platte-1A1	20563,0	1,9
	3196a	Platte-1A2	10870,0	

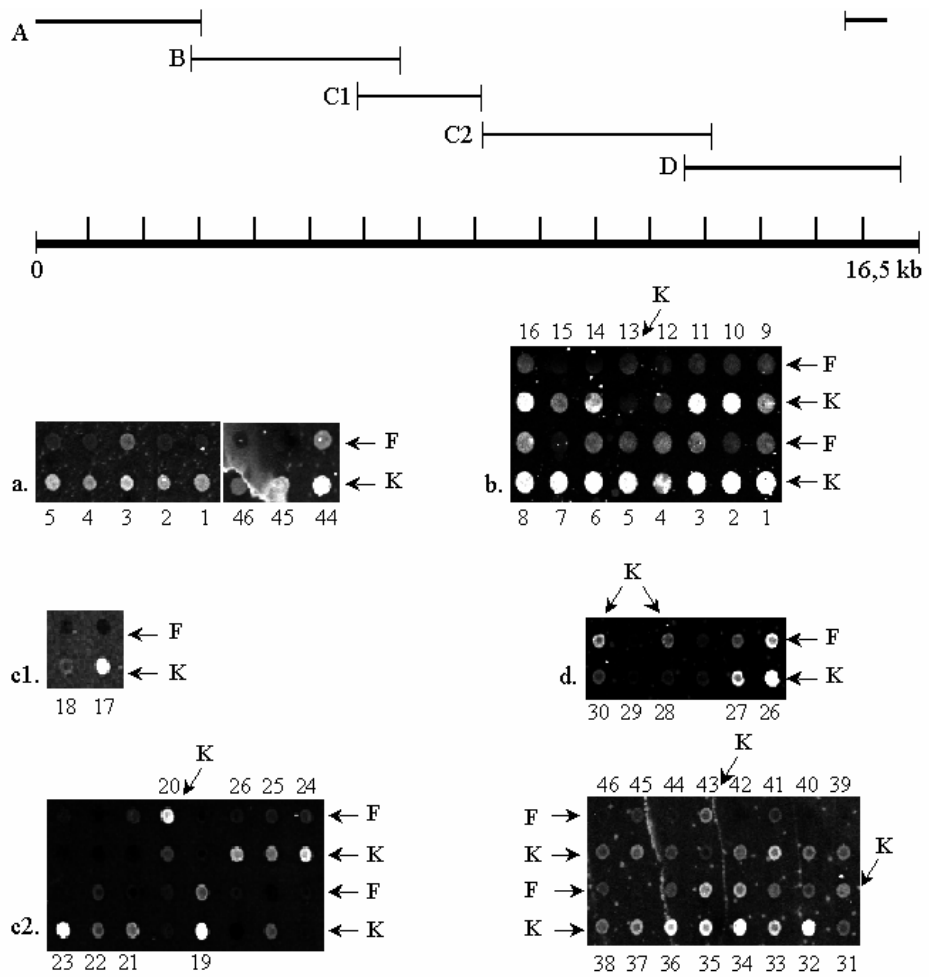
Anschließend wurden 10 Oligonukleotide (5 davon PTO-modifiziert) zur Amplifikation von 5 langen, ca. 4 kb PCR-Produkten eingesetzt (siehe Tabelle 3.4).

Abb. 4.16: Gelelektrophoretische Auftrennung von langen PCR-Produkten der mtDNS



Die gewünschten Produkte wurden erhalten, aufgereinigt, einem Exonuklease-Verdau unterworfen und für die Allel-spezifische Primer-Elongationsreaktion herangezogen. Mit einem 5,7 kb langen PCR-Produkt konnte auf diese Weise anscheinend keine brauchbare Einzelstrang-Matrize hergestellt werden; jedenfalls wurden keine Signale erhalten. Aus diesem Grund wurde dieser große Bereich (C) durch zwei PCR-Produkte (C1 und C2) abgedeckt; Die längste Einzelstrang-Matrize, mit der SNPs nachgewiesen werden konnten, lag bei 4,4 kb. Von 46 SNPs konnten 44 SNPs in solchen Matrizen nachgewiesen werden. SNP 29 konnte nicht nachgewiesen werden, da keine Reaktion stattgefunden hatte. SNP 26 konnte nicht ausgewertet werden, da sich die beiden Allele im Hinblick auf ihre Signalintensitäten nicht genügend unterschieden.

Abb. 4.17: Fluoreszenzsignale der Primer-Elongationsreaktion unter Verwendung von langen PTO- modifizierten Einzelstrang-DNS-Targets.



K = korrekte 3`-Einzelbasenpaarung des Primers
F = 3´-Basenfehlpaarung des Primers

Tab. 4.8: In der Tabelle sind die Positionen der SNPs in der mtDNS, die Anordnung in der Mikrotiterplatte und die Durchschnittsintensitäten (Hintergrund abgezogen) sowie das Verhältnis von Basenpaarungen zu Basenfehlpaarungen nach der Primer-Elongationsreaktion dargestellt. Als Target wurden fünf lange PTO-modifizierte Einzelstrang-DNS-Produkte verwendet (siehe Abbildung. 4.17)

SNP Nr.	SNP	Intensität	Verhältnis	SNP Nr.	SNP	Intensität	Verhältnis
1	3196g	50972,63	2,88	24	11332c	19864.65	3.27
	3196a	17668,44			11332t	6070.08	
2	3243a	14704.26	6.57	25	11467a	13599.68	3.12
	3243g	2238.48			11467g	4363.66	
3	3252a	48923,03	2,60	26	11778g	16859.71	5.62
	3252g	18784,37			11778a	2999.71	
4	3290t	11581.45	4.63	27	12246c	41910.67	1.45
	3290c	2500.00			12246g	28841.01	
5	3302a	14902.14	4.97	28	12308a	12859.08	
	3302g	2997.19			12308g	29852.27	2.32
6	3394t	44561,45	2,53	29	12311t	6256.81	1.19
	3394c	17610,14			12311c	5238.55	
7	3397a	37602,43	5,90	30	12372g	24087.72	0.61
	3397g	6369,70			12372a	39491.08	
8	3447a	35885,86	1,47	31	12612a	10499.59	0.64
	3447g	24422,75			12612g	16372.17	
9	3460g	23478,68	1,72	32	12634a	44577.30	4.51
	3460a	13669,16			12634t	9894.15	
10	4136a	42129,40	3,83	33	12705c	27386.27	2.24
	4136g	11009,16			12705t	12200.86	
11	4160t	37343,15	3,40	34	13368g	47290.41	2.25
	4160c	10997,19			13368a	21041.35	
12	4216t	13582,72	1,92	35	13708g	35370.21	1.39
	4216c	7085,95			13708a	25420.37	
13	4317a	6810,02	1,62	36	14233a	38809.47	3.12
	4317g	11014,34			14233g	12456.79	
14	4336t	27227,79	4,37	37	14484t	20465.95	5.85
	4336c	6232,33			14484c	3500.00	
15	4529a	19199,22	3,57	38	14709t	14680.28	1.89
	4529t	5377,46			14709g	7786.59	
16	4646t	35626,42	2,29	39	14960g	13334.77	3.81
	4646c	15560,97			14960a	3500.00	
17	7028c	20238.82	5.78	40	15043g	14250.51	4.07
	7028t	3500.00			15043a	3500.00	
18	8344a	3146.22	2,09	41	15205c	23278.69	4.10
	8344g	1500.00			15205t	5683.09	
19	8851t	30041.65	2.46	42	15257g	14680.57	4.19
	8851c	12218.56			15257a	3500.00	

SNP Nr.	SNP	Intensität	Verhältnis
20	8993a	2412.37	
	8993c	2839.16	
	8993g	7334.99	2.87
	8993t	21052.04	
21	10398a	13685.90	3.91
	10398g	3500.00	
22	10463t	10652.91	2.10
	10463c	5062.61	
23	11251a	28919.88	6.43
	11251g	4500.00	

SNP Nr.	SNP	Intensität	Verhältnis
43	15326g	3500.00	
	15326a	15857.77	4.53
44	15452c	46311.23	3.08
	15452a	15050.44	
45	15607a	24820.60	5.52
	15607g	4500.00	
46	15924a	14975.23	1.88
	15924g	7983.04	

4.13 Anwendung dieser Verfahren zur genomweiten Typisierung von SNPs

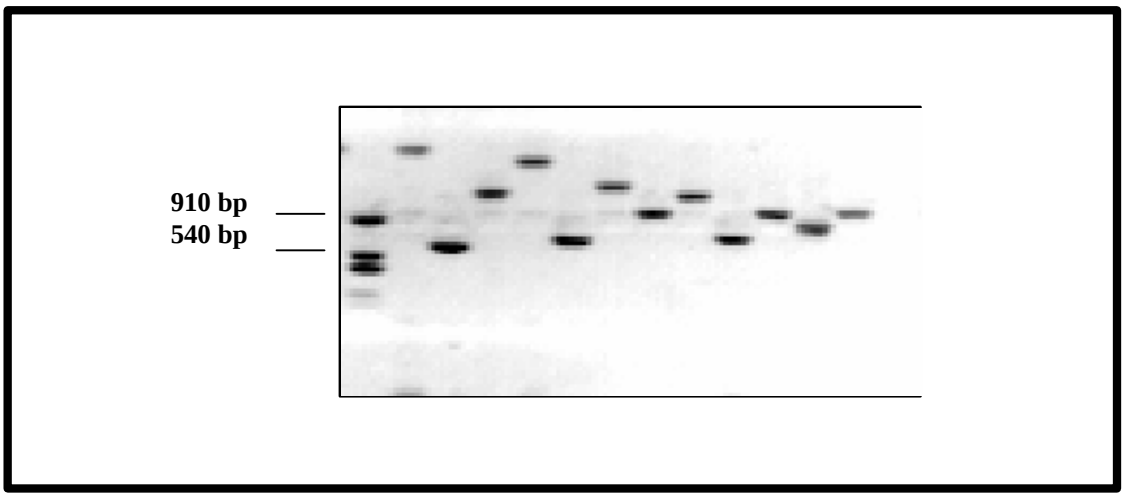
Nach der erfolgreichen Typisierung einer Vielzahl von SNPs im mitochondrialem Genom wurde versucht, die dafür entwickelten Chip-Verfahren auf die Typisierung von Kern-kodierenden SNPs zu übertragen. Aufgrund der im Vergleich zur mtDNA etwa 200.000 x höheren Komplexität des menschlichen Genoms, mußte zunächst nach Wegen gesucht werden, um das menschliche Genom zu vereinfachen, wie unten aufgeführt (siehe Diskussion Abschnitt 5.6)

Neben einigen anderen Verfahren wurde in diesem Zusammenhang die sogenannte Inter-Alu-PCR (Deininger et al. 1988; Batzer et al. 1991) herangezogen, um die Komplexität des menschlichenGenoms drastisch zu reduzieren. Modellversuche zur Brauchbarkeit der oben beschriebenen Methoden für die Typisierung genomischer SNPs wurden an Inter-Alu-Fragmenten menschlicher Mega-YAC-Klone (Nizetic et al., 1994) durchgeführt, welche im Rahmen eines anderen Forschungsprojektes charakterisiert worden waren (Kooperation mit MetaGen GmbH).

Die in diesen Mega-YACs enthaltenen Inter-Alu-Sequenzen wurden mit Hilfe von Alu-spezifischen Oligonukleotiden amplifiziert. Die Inter-Alu-PCR von Mega-YACs lieferte im Mittel ca. 5 bis 10 Banden der Größe zwischen 500 und 2500 bp. Die PCR-Produkte

wurden kloniert, und pro YAC wurden 12 Klone zur Analyse verwendet. Ausgewählte Inter-Alu-Klone wurden anschließend mittels Kolonie-PCR überprüft (siehe Tabelle 4.9).

Abb. 4.18: Auftrennung von Inter-Alu PCR Produkten eines YAC Klon



Von 12 untersuchten Klonen wurden zwei bis vier verschiedene Inter-Alu-Fragmente pro YAC zur Sequenzierung ausgewählt. Ihre Länge betrug etwa 500 bis 1000 bp. Anhand der Sequenzen wurden spezifische Oigonukleotide entworfen, welche als Primer für die Amplifikation spezifischer Inter-Alu-Fragmente aus YACs verwendet wurden.

Tab. 4.9: Ergebnisse der Suche nach SNPs in Inter-Alu-Fragmenten von menschlichen Chromosomen

Chromosom:	X	1	2	6	7	13	22
Anzahl der verfügbaren YACs	351	213	232			184	
Anzahl der analysierten YACs	154	98	216			166	
Anzahl der analysierten Inter-Alu PCR Produkte	430	363	608			410	
Anzahl der spezifischen PCR Produkte	46	30	130			70	
Anzahl der identifizierten SNPs	18	16	65	113	6	53	58

Parallel dazu wurden diese Primer dafür verwendet, um in der DNS von 6 nicht verwandten Probanden nach polymorphen Basenaustauschen zu suchen. Durch Sequenzierung dieser klonierten PCR-Produkte konnten über 300 SNPs in Inter-Alu-Fragmenten identifiziert werden (s. Tab. 4.9) und der Nachweis erbracht werden, daß die Gesamtzahl aller auf diese Weise nachweisbaren SNP-Marker ausreicht, um damit eine enge genetische Karte aller menschlichen Chromosomen zu erstellen.

Inter Alu-PCR-Produkte von YACs und von genomischer DNS (siehe Methodenteil, Abschnitt 3.13.1) wurden zur Herstellung einzelstrangiger DNS verwendet, die DNS als Matrize für die Primer-Elongationsreaktion eingesetzt wurde. In den meisten Fällen gelang es jedoch nicht, verwertbare Signale zu erhalten. Analoge Experimente mit mRNA als einzelsträngige Matrize zum Nachweis von SNPs in kodierenden Abschnitten von Genen waren ebenfalls nur in einigen sehr kleinen Teil aller untersuchten Gene erfolgreich.