

6 Zusammenfassung

Die funktionelle Genomanalyse untersucht den Zusammenhang zwischen der im Genom codierten Information und deren Ausprägung im Organismus. Dabei nehmen die Genexpressionsanalyse und die Genotypisierung von 'Single Nucleotide Polymorphismen' (SNP) als häufigste Form genetischer Variabilität eine zentrale Stellung ein. Durch die Komplexität des Genoms werden für die umfassende Analyse leistungsfähige Methoden benötigt, die hoch parallel arbeiten oder im Hochdurchsatz durchgeführt werden können. Vorhandene Methoden wie zum Beispiel die Microarray Technologie sind dabei oft durch geringe Sensitivität oder wenig Flexibilität in der Versuchsgestaltung begrenzt.

Ziel dieser Arbeit war es, eine miniaturisierte Plattform für die Anwendung von flüssigen PCR-basierten Methoden zu entwickeln. Damit sollten die Vorteile einer sehr dichten Anordnung von Reaktionsgefäßen mit den Stärken PCR-basierter Methoden kombiniert werden. Mit dem aus Polypropylen hergestellten μ PCR Chip wurde ein kosteneffektives Substrat für die hochgradig parallelisierte Analyse mit PCR-basierten Methoden entwickelt. Die verschiedenen Formate des μ PCR Chip ermöglichen erfolgreiche PCR-Amplifikationen in Volumina zwischen 200 und 18 nl.

Für die Genexpressionsanalyse wurde der 5'-Exonuklease Assay (TaqMan) als die geeignetste Methode identifiziert, mit der die zuverlässige Quantifizierung bis zu einem Volumen von 50 nl erreicht wurde. Zur Durchführung der Analyse wurde leistungsfähiges Nanoliter-Handling, eine effektive Lösung zum Schließen der Reaktionsgefäße, Einrichtungen für die präzise thermische Prozessierung und eine leistungsfähige Detektion mit anschließender Datenanalyse entwickelt. Neben einer guten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zeigte die Plattform eine hohe Sensitivität bis zu einzelnen Molekülen. In einer Validierungsstudie über gewebsspezifische Genexpression in Maus konnten mit 200 nl Reaktionen konsistente Ergebnisse zu den Ergebnissen in 10 l gezeigt werden.

Die erfolgreiche SNP Genotypisierung wurde ebenfalls mit dem 5'-Exonuklease Assay durchgeführt. Für die entwickelte Detektionsplattform wurde ein robuster Algorithmus zur Identifizierung der Allel-Information erarbeitet, der eine Reduktion des Reaktionsvolumens bis auf 100 nl ermöglichte. Durch die hohe Sensitivität der Plattform konnte bis zu einer Anfangsmenge von 5 DNA Molekülen genotypisiert werden. In einer Validierungsstudie mit 60 Patientenproben und 16 SNPs pro μ PCR Chip wurde eine hohe Übereinstimmung zu den Ergebnissen aus konventionellen Reaktionsvolumina gezeigt.

Mit der neu entwickelten μ PCR Chip Plattform wurde eine leistungsfähige Technologie für miniaturisierte PCR-basierte Methoden in der funktionellen Genomanalyse entwickelt. Durch die Reduktion des Reaktionsvolumens auf wenige Nanoliter werden großangelegte Genexpressionsstudien oder SNP Genotypisierungsstudien bei moderater Inanspruchnahme biologischer und finanzieller Ressourcen ermöglicht.