

Analyse von Single Nucleotide Polymorphisms an Glas-Oberflächen

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

in der Wissenschaftsdisziplin Analytische Biochemie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von
Susanne Schwonbeck

Potsdam
28. Juni 2004

*„Eine Zwischenbilanz: Vor uns der Stein des Sisyphus, über uns das Schwert des Damokles,
hinter uns der Stall des Augias, aber in gereinigtem Zustand.“*

Prof. Dr. h.c. Manfred Rommel, Stuttgarter Oberbürgermeister von 1974 bis 1996

gewidmet Ute und meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	iii
1 Einleitung	1
1.1 Single Nucleotide Polymorphisms	1
1.1.1 SNPs als genetisches Werkzeug	2
1.1.2 SNP-Datenbanken	5
1.1.3 Screening nach unbekanntem SNPs	6
1.1.4 Methoden zur Genotypisierung von SNPs	10
1.1.5 Beispiele für SNP-Genotypisierungsmethoden	10
1.2 Mikroarrays	20
1.2.1 Herstellung von Mikroarrays	20
1.2.2 Photolithografische Verfahren	20
1.2.3 Chemische Kopplung von DNA an Oberflächen	22
1.2.4 SNP-Analyse mit Mikroarrays	25
1.2.5 Fluoreszenz-Detektion	29
1.3 Sulfotransferase SULT1A1	31
1.4 Der Adiponectin-Promotor	32
1.5 SNP-Analyse mit Hilfe kinetischer Parameter	34
1.5.1 Prinzip der Methode	34
1.5.2 Kinetische Analyse	36
1.5.3 Heterozygotenproblematik	37
1.5.4 Analyse der Fluoreszenzintensität	38
1.5.5 Konsequenzen und Planung	38
2 Material und Methoden	40

2.1	Material	40
2.1.1	Chemikalien	40
2.1.2	Patientenproben	45
2.1.3	Kits	45
2.1.4	Glasträger und Glasfasern	45
2.1.5	Geräte und Zubehör	46
2.1.6	Faseroptischer Affinitätssensor	47
2.1.7	Durchfluss-Biochip-Scanner	48
2.2	Methoden	51
2.2.1	DNA-Extraktion	51
2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	51
2.2.3	Gel-Elektrophorese	52
2.2.4	Reinigung von PCR-Produkten	52
2.2.5	Photometrische Konzentrationsbestimmung	53
2.2.6	Probenvorbereitung für das Spotten	53
2.2.7	Modifikation der Glas-Oberflächen	53
2.2.8	Spotten auf Glas-Oberflächen	55
2.2.9	Blocking und Hybridisierung	55
2.2.10	Auswertung der kinetischen Daten	56
2.2.11	Auswertung der Fluoreszenzintensität	56
2.2.12	Referenzverfahren RFLP	57
3	Ergebnisse	58
3.1	Vorversuche	58
3.1.1	Hybridisierungsversuche am faseroptischen Affinitätssensor	58
3.2	Etablierung und Optimierung des SNP-Chips	61
3.2.1	Optimierung der Hybridlänge	62
3.2.2	Affine und kovalente Kopplung von PCR-Produkten	64
3.2.3	Spotting-Puffer	65
3.2.4	Konzentration der PCR-Produkte	67
3.2.5	Temperatur-Abhängigkeit	69
3.2.6	Zusammenfassung der Optimierung	70

3.3	Ergebnisse der SNP-Analyse von Patientenproben	72
3.3.1	SULT1A1-Gruppe	72
3.3.2	Adiponectin-Promotor-Gruppe	77
4	Diskussion	86
4.1	Stabilität von DNA-Hybriden an Oberflächen	86
4.2	Der SNP-Chip	89
4.2.1	Optimierung der Reaktionsparameter	89
4.3	Analyse von Patientengruppen	93
4.3.1	SULT1A1	93
4.3.2	Adiponectin-Promotor	94
4.3.3	Fazit	96
5	Zusammenfassung	97
	Abbildungsverzeichnis	I
	Tabellenverzeichnis	III
	Literaturverzeichnis	V
A	Anhang	XXII
A.1	Sulfotransferase SULT1A1	XXII
A.1.1	Sequenzen der PCR-Produkte	XXII
A.1.2	SULT1A1-Patientengruppe	XXIII
A.2	Adiponectin-Promotor	XXIV
A.2.1	Sequenzen der PCR-Produkte	XXIV
A.2.2	Bezeichnung der Adiponectin-Patientenproben	XXV
A.2.3	Ergebnisse der MFOLD-Analyse	XXVI
	Danksagung	XXXVIII
	Erklärung	XXXIX

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Acrp30	Adiponectin, ein von adipösem Geweben exprimiertes Protein
AFM	Rasterkraftmikroskopie (engl.: atomic force microscopy oder auch SFM - scanning force microscopy)
APM1	humanes Gen, das das Protein Adiponectin kodiert
APEX	SNP-Analysenmethode (engl.: arrayed primer extension)
ASO	allel-spezifisches Oligonukleotid (engl.: allele specific oligonucleotide)
BLAST	Online-Datenbank zur Sequenzsuche (engl.: basic local alignment search tool)
Bp	Basenpaare
c	Masse-Konzentration in ng/ μ l oder g/l
CCM	chemische Spaltung von fehlgepaarten DNA-Hybriden (engl.: chemical cleavage of mismatches)
Cy5, Cy3	Fluoreszenz-Farbstoffe
DASH	dynamische allel-spezifische Hybridisierung (engl.: dynamic allele specific hybridisation)
dbSNP	öffentliche SNP-Datenbank des NCBI
ddNTPs	2',3'-Didesoxyribonucleosidtriphosphate
dHPLC	denaturierende Hochleistungs-Flüssigchromatographie (engl.: denaturing high performance liquid chromatography)
DGGE	denaturierende Gradienten-Gel-Elektrophorese (engl.: denaturing gradient gel electrophoresis)
DNA	Desoxyribonucleinsäure (engl.: desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphate
EDC	1-Ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]carboimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FI	Fluoreszenzintensität
FITC	Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (engl.: fluorescence resonance energy transfer)

gDNA	genomische DNA
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie (engl.: high performance liquid chromatography)
k_D	Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante
λ	Wellenlänge Lambda in nm
LD	Linkage Disequilibrium
LED	lichtemittierende Diode (engl.: light emitting diode)
MALDI-TOF MS	Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisations-Massenspektrometrie-Flugzeit-Massenspektrometrie (engl.: Matrix assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry)
MG	Molekulargewicht (g/mol)
mtDNA	mitochondriale DNA
n.b.	nicht bestimmbar
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nt	Nukleotide
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat
PI	isoelektrischer Punkt
PMT	Photomultiplier
RT	Raumtemperatur (T = 25°C)
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (engl.: single nucleotide polymorphism)
SSCP	Einzelstrang-Konformationspolymorphismus (engl.: single strand conformational polymorphism)
STRs	Mikrosatelliten (engl.: short tandem repeats)
SULT	Sulfotransferase
SULT1A1	humanes Protein, phenolische Sulfotransferase
T	Temperatur (in °C)
Tab.	Tabelle
TPE	Zwei-Photonen-Fluoreszenzanregung (engl.: two-photon fluorescence excitation)
UV-VIS	ultraviolett/visuell: Messbereiche bei Photometern

Kapitel 1

Einleitung

Die Mikroarray-Technologie ist eine viel versprechende Möglichkeit, die Analyse einer großen Anzahl von Proben simultan durchzuführen. Durch die Miniaturisierung und den parallelen Ansatz führt die Einsparung von Arbeitszeit und Chemikalien zu einem geringeren Zeit- und Kostenaufwand je Probe. Wie man diese Vorteile sinnvoll nutzen kann, wird in der vorliegenden Arbeit am Beispiel der Methodenentwicklung zur Analyse von Einzelpunktmutationen (Single Nucleotide Polymorphisms - SNPs) gezeigt. In einem einzigen Hybridisierungsexperiment wurden mehrere Patientenproben ohne Einsatz von Enzymen parallel mit Hilfe eines DNA-Biochips genotypisiert.

Aufgrund der Vielfalt der derzeit verfügbaren SNP-Genotypisierungsansätze stellt sich allerdings die Frage, ob eine weitere Methode überhaupt sinnvoll ist. Im folgenden wird man jedoch sehen, dass das erarbeitete Methode durchaus Vorteile gegenüber vergleichbaren Verfahren hat. Die existierenden Methoden sind für bestimmte Analyseanforderungen teilweise zu groß dimensioniert, zu geräte- und kostenintensiv, zu arbeitsaufwändig oder bedürfen des zusätzlichen Einsatzes von Enzymen oder anderen Chemikalien. Für jedes SNP-Genotypisierungsexperiment ist also abzuwägen, welche Methode die geeignete ist. Einen universellen Ansatz, der auf jede Mutations-Analyse anwendbar ist, gibt es bisher nicht. Das in dieser Arbeit vorgestellte Verfahren ist einfach in der Handhabung, schnell und mit wenig Kostenaufwand durchzuführen.

Auf den folgenden Seiten wird ein Überblick über Einzelpunktmutationen in Hinblick auf ihre Rolle in der Krankheitsätiologie sowie über SNP-Genotypisierungsmethoden gegeben. Abschließend wird die entwickelte SNP-Analysenmethode näher vorgestellt.

1.1 Single Nucleotide Polymorphisms

Das Vorhandensein von Single Nucleotide Polymorphisms ist die wohl häufigste Variation im Genom. Mit einem Basenaustausch pro 1000 Basen [Sachidanandam et al., 2001] liegt die Anzahl der SNPs rein rechnerisch bei $3 \cdot 10^6$, bezogen auf die Gesamtzahl an Basen im menschlichen Genom. Zur Zeit sind jedoch in der größten frei zugänglichen Datenbank dbSNP des amerikanischen National Center for Biotechnology Information (NCBI) mehr als neun Millionen humane SNPs eingetragen, von denen mehr als vier

Millionen validiert sind [dbSNP, 2004].

Die Verteilung der SNPs über das Genom ist nicht zufällig, da Polymorphismen vererbt werden. Außerdem haben Einzelpunktmutationen eine niedrige Mutationsrate [Sachidanandam et al., 2001]. Nach Nebert [2000] lassen sich die Polymorphismen gemäß ihres Auftretens in Klassen einteilen: Coding SNPs (cSNPs) findet man in den kodierenden Regionen eines Gens. Ein SNP zwischen zwei Genen wird als „intergenetic“ (iSNP), SNPs in nichtkodierenden Sequenzen werden als „perigenic“ (pSNP) bezeichnet. cSNPs unterscheidet man weiter in synonyme und nonsynonyme SNPs. Mutationen in kodierenden Gensequenzen, die zum Aminosäureaustausch führen, werden synonyme oder stille SNPs genannt. Die, die zu keinem Austausch führen, nennt man nonsynonym oder missense SNPs [Lindroos, 2002]. Missense SNPs werden als neutral eingeschätzt. Sie können jedoch weitere „splicing sites“ schaffen, also Stellen, an denen Introns und Exons auf der mRNA getrennt werden, die dann in neuen genetische Fehlfunktionen resultieren können [Richard and Beckmann, 1995]. So berichtete Akli et al. [1990], dass eine synonyme Mutation bei Tay-Sachs-Patienten zum Verlust der Splicing-Effizienz führte.

1.1.1 SNPs als genetisches Werkzeug

Es gibt vier große Forschungsfelder, für die SNPs relevant sein können:

- SNPs als Krankheitsmarker
- Pharmakogenetik
- Evolutions- und Populations-Studien
- Forensik

SNPs als Krankheitsmarker

Genetische Faktoren tragen praktisch zu jeder menschlichen Krankheit bei: Sowohl zur Anfälligkeit als auch zur Resistenz gegen Krankheiten. Ebenso beeinflussen sie die Wirkung von Umweltfaktoren. Viele Forschungsprojekte haben die Hoffnung, durch ein besseres Verständnis der genetischen Wirkung auf Krankheiten Diagnose, Behandlung und Vorsorge positiv zu beeinflussen. Die Rolle, die genetische Faktoren bei Krankheiten spielen, soll auch Aufschluss über nichtgenetische Umwelteinflüsse geben [Collins et al., 1997]. Wenn ein zur Krankheit beitragender genetischer Faktor identifiziert ist, hat man den Ausgangspunkt eines pathophysiologischen Prozesses entdeckt. Von hier aus lässt sich die Biologie der Erkrankung schrittweise entschlüsseln und verstehen. SNPs als häufig vorkommende Form genetischer Variation im Genom bieten sich als solche Krankheitsmarker an.

Zwei Möglichkeiten ergeben sich: Einerseits können SNPs in kodierenden Sequenzen direkten Einfluss auf die Primärstruktur von Aminosäuren und damit beispielsweise auf die Enzymaktivität haben; sie können auch zum völligen Verlust der Enzymfunktion führen. Andererseits liegt die Vermutung nahe, dass allein durch die enorme Anzahl an Polymorphismen in nichtkodierenden Sequenzen ein Einfluss dieser Mutationen durchaus

wahrscheinlich ist. Man hofft, diese SNPs als Marker für komplexe Krankheiten, deren Ursache nicht nur in einem Gen oder Faktor liegt, verwenden zu können [Risch and Merikangas, 1996].

Für die Untersuchung der ersten Möglichkeit können Assoziationsstudien durchgeführt werden. Man analysiert das Auftreten von cSNPs in bestimmten Gen-Abschnitten bei einer sehr großen Anzahl von Probanden. Danach versucht man, bestimmte Phänotypen oder Krankheitssymptome mit dem Auftreten des Einzelbasenaustausches zu korrelieren, z.B. einen SNP im Gen der Sulfotransferase *SULT1A1* mit verschiedenen Krebsarten [Tiemersma et al., 2004; Nowell et al., 2002; Wang et al., 2002; Wong et al., 2002; Wu et al., 2003; Zheng et al., 2003]. Ein wichtiger Indikator für die Relevanz einzelner Polymorphismen ist die Häufigkeit ihres Auftretens in einer Population (allele frequency).

Bei der zweiten Möglichkeit erstellt man so genannte SNP-Karten, die die Position von SNPs sowohl in kodierenden als auch in nichtkodierenden Bereichen angeben. Mit Hilfe dieser Karten kann eine bestimmte Anzahl SNPs mit dem Haplotyp erkrankter und gesunder Individuen „gemappt“ werden. Durch die Unterschiede hofft man, Hinweise auf benachbarte Gene zu erhalten, die unter Umständen für Resistenzen oder eine besondere Anfälligkeit für Krankheiten verantwortlich sind [Collins et al., 1997]. Diese Strategie beruht auf der Annahme, dass sich jede krankheitsauslösende Genomvariante von einem Individuum in der Vergangenheit ausgehend entwickelt haben muss. Wird nun im Laufe der Generationen das Gen verändert, so bleibt der spezielle SNP-Satz (Haplotyp) in der Nachbarschaft dennoch erhalten, da er zusammen mit dem Gen an die Nachkommen weiter vererbt wurde (siehe Abbildung 1.1).



Abbildung 1.1: A. Die direkte Studie detektiert eine erhöhte Prävalenz (Assoziation) einer funktionalen Variante (*). B. Die indirekte Studie hängt vom Linkage Disequilibrium (LD) ab und detektiert erhöhte Prävalenzen eines bestimmten Satzes (♦) von SNP-Allelen (modifiziert nach Collins et al. [1997]).

Umgekehrt wird das Vorhandensein eines solchen Ur-Haplotyps zum Indikator für krankheitsassoziierte Polymorphismen. Fraglich ist jedoch, wie viele SNPs in dem Bereich notwendig sind, mit dem die Marker im so genannten Kopplungsungleichgewicht (Linkage Disequilibrium - LD) stehen, um ein erfolgreiches Mapping zu erreichen [Judson et al., 2002].

Frühe Annahmen gehen von Karten mit einer Dichte von 30.000 - 500.000 SNPs aus, mit der das menschliche Genom nach Haplotypen gescannt werden sollte [Kruglyak, 1999]. Neuere Quellen hingegen fordern dichtere SNP-Karten [Phillips et al., 2003]. Durch die Strukturierung des Genoms in so genannte Haplotyp-Blöcke [Daly et al., 2001; Patil et al., 2001; Reich et al., 2001] hofft man, die SNPs zu finden, die wirklich informativ sind [Tsuchihashi and Dracopoli, 2002], und damit die Anzahl der zu genotypisierenden SNPs zu verringern.

Für die beiden Ansätze stellen sich prinzipiell unterschiedliche Anforderungen an SNP-Genotypisierungsmethoden. Assoziationsstudien erfordern Methoden, die schnell und

kostengünstig viele verschiedene Individuen auf meist wenige, bereits bekannte SNPs untersuchen können. LD-Studien wiederum verlangen nach Verfahren, die die Analyse von tausenden Polymorphismen in verschiedenen Patienten erlauben. Idealerweise wäre das eine Analyse über das gesamte Genom (whole genome analysis WGA [Lovmar et al., 2003]), deren Ergebnisse sowohl für LD-Mapping als auch für Assoziationsstudien verwendet werden könnten [Collins et al., 1997].

Der Erfolg genomweiter Assoziationsstudien hängt vor allem von der exakten Bestimmung der unterschiedlichen Allel-Häufigkeiten einer Fallgruppe und einer Kontrollgruppe ab [Hinds et al., 2004]. Um bei diesen Analysen (large scale genotyping) Kosten, Arbeit und Zeit zu sparen, verwenden viele Forschungsgruppen gepoolte DNA, d.h. eine Mischung verschiedener DNA-Proben unterschiedlicher Patienten. Beispielsweise lassen sich Allel-Häufigkeiten von 500 Individuen und 500 Kontrollen zum einen durch die Analyse aller 1000 Proben bestimmen. Zum anderen können aber auch zwei gepoolten Proben von je 500 Individuen untersucht werden [Sham et al., 2002]. Obwohl die Verwendung von DNA-Mischungen für die Bestimmung von Allel-Häufigkeiten eine oft angewandte und validierte Methode ist [Kwok et al., 1994; Syvänen, 1999; Taillon-Miller et al., 1999; Germer et al., 2000; Olsson et al., 2000; Buetow et al., 2001; Phillips et al., 2003], ist sie doch nur eine grobe Annäherung an die genauen Allel-Häufigkeiten. Meist verhindern Unsicherheiten über die Art des Pooling oder Qualitätsprobleme beim Sequenzieren, dass geringe Allel-Häufigkeiten ($< 5\%$ in der vereinigten Probe) bestimmbar sind.

SNPs in der Pharmakogenetik

Polymorphismen in Genen, die an der Metabolisierung von Arzneimitteln beteiligte Enzyme, Rezeptoren oder Transporter kodieren, können die Wirkung von Arzneimitteln reduzieren oder komplett blocken. Die Kombination mehrerer Mutationen in diesen Genen führt zu einer hohen Variabilität in der Reaktion einzelner Individuen auf ein konkretes Medikament [Evans and Relling, 1999; Judson et al., 2002; Levo et al., 2003; Kurland et al., 2004]. So identifizieren Liljedahl et al. [2003] durch die Untersuchung von 74 SNPs in 96 Patienten vier SNP-Genotypen, die als potenzielle Marker für Blutdruckabsenkung nach einer Behandlung mit Antihypertensiva verwendet werden können.

Ein Beispiel aus der Krebsmedizin verdeutlicht die Relevanz pharmakogenetischer Analysen: Obwohl Krebs-Medikamente durchaus erfolgreich in der Krebsbehandlung eingesetzt werden, ist die Therapie doch meist durch die kumulative Dosis limitiert, die durch gerade noch verträgliche Nebenwirkungen gekennzeichnet ist. Bei Patienten mit einer genetischen Prädisposition für eine geringere Anfälligkeit für medikamenten-induzierte Nebenwirkungen wäre es möglich, höhere Dosen des Medikaments zu verabreichen und damit den Krebs effektiver bekämpfen zu können [Relling and Dervieux, 2001].

SNPs für Populationsstudien

Damit eine Mutation eine hohe Allel-Häufigkeit in einer Population erreicht, muss aufgrund der geringen Mutationsrate der SNPs ein bestimmtes Genom über sehr viele Generationen vererbt werden. Während dieses Entwicklungszeitraumes können sich die

Individuen jedoch von ihrem geografischen Ursprung entfernen. Daher sind die ältesten Mutationen auch am weitesten in allen Populationen verbreitet und haben die höchsten Allel-Häufigkeiten [Nickerson et al., 1998].

Da SNPs nicht nur in genomischer DNA sondern auch auf der nur mütterlicherseits vererbten mitochondrialen DNA (mtDNA) vorkommen, lassen sie sich ebenfalls für Evolutions- und Populationsstudien einsetzen. Um nicht nur die Geschichte der mütterlichen Linie zu untersuchen, sind zahlreiche Projekte zur SNP-Analyse auf dem Y-Chromosom durchgeführt worden [Underhill et al., 1997]. Zur Zeit sind mehr als 36.000 SNPs in der Ensembl Datenbank (siehe Tabelle 1.1, S. 7) eingetragen. Dies sollte für genealogische Studien durchaus ausreichend sein [Jobling and Taylor-Smith, 2003]. Als problematisch erweist sich nur, dass noch nicht bekannt ist, wieviele der in Datenbanken eingetragenen SNPs wirkliche Polymorphismen sind und bei wievielen es sich um Artefakte handelt, die keinerlei Aussagekraft hinsichtlich evolutionswissenschaftlichen Fragestellungen haben.

SNPs in der Forensik

Nachdem zahlreiche SNP-Karten des Y-Chromosoms veröffentlicht wurden [Underhill et al., 1997], rückten Mutationen in das Blickfeld von Forensikern. Durch den hohen Informationsgehalt der Mutationen in relativ kurzen Gen-Abschnitten, die auch aus zersetzten Proben gewonnen werden können, und der geringen Mutationsrate sind Polymorphismen als Marker in der Forensik geeignet [Sanchez et al., 2004]. Dank der geringen Mutationsrate kann die Analyse von SNPs auf dem Y-Chromosom dazu beitragen, die bei Vaterschaftstests übliche Analyse von Short-Tandem Repeats (STRs) zu ergänzen.

SNPs allein sind jedoch für forensische Tests nicht ausreichend, da eine Unterscheidung von eng verwandten Personen wie Vater, Sohn und Bruder aufgrund der niedrigen Mutationsrate nicht möglich ist. Lediglich STRs, die eine fünfmal höhere Mutationsrate aufweisen, erlauben diese Differenzierung [Jobling, 2001; Sanchez et al., 2004].

1.1.2 SNP-Datenbanken

Um Assoziations-Studien oder Linkage-Disequilibrium-Analysen durchzuführen, benötigt man Informationen über bereits bekannte SNPs. Für die Suche stehen mehrere frei zugängliche Quellen zur Verfügung. Die Datenbanken sind meist online verfügbar, einige Sites bieten auch die Möglichkeit, sich die kompletten Datensammlung herunterzuladen. In Tabelle 1.1 sind einige der derzeit verfügbaren Quellen aufgeführt. Darüber hinaus findet man unter <http://hgvsbase.cgb.ki.se> weitere Verweise auf Datenbanken, die auf spezielle Forschungsbereiche zugeschnittene SNP-Daten bereitstellen. Die aufgeführten Datenbanken erlauben die Suche nach SNPs über SNP-IDs oder nach dem Locus im Genom.

Bemerkenswert ist, dass dbSNP zwar die größte SNP-Sammlung (z.Zt. über 9,1 Millionen Einträge beim menschlichen Genom, build 120 [dbSNP, 2004]) ist, die Daten jedoch eine große Redundanz aufweisen. Am Beispiel von Sequenzdaten des Human-Genome-Projekts konnte Venter et al. [2001] zeigen, dass von 2.336.935 Mutationen der dbSNP-Datenbank nur 1.223.038 mit denen des Celera-Projekts übereinstimmten. Auch bei der

Auswahl von SNPs für forensische Tests zeigte sich, dass bis zu 10% von ihnen in Datenbanken sich als PSVs (paralogous sequence variants) erwiesen [Estivill et al., 2002]. Unter diesen Sequenzen, die durch segmentelle Duplizierung gebildet wurden, findet sich keine einzigartige Mutation, vielmehr handelt es sich um Vervielfältigungsfehler, die die Auswahl von aussagekräftigen SNPs erschweren [Hurles, 2002; Bailey and Eichler, 2002; Bailey et al., 2001].

Wenn für Populationsstudien ebenfalls Kandidaten-SNPs aus den frei zugänglichen Datenbanken verwendet werden, so kann die Chance, dass die ausgewählten SNPs in einer geringen Allel-Häufigkeit auftreten, nur 66-70% betragen [Marth et al., 2001].

1.1.3 Screening nach unbekanntem SNPs

Der erste Schritt vor der Suche nach unbekanntem SNPs ist die Abfrage einer der frei zugänglichen Datenbanken (siehe Tabelle 1.1). Für weitergehende Screenings stehen mehrere Analysemethoden zur Verfügung. Neben der denaturierenden Gradienten-Gel-Elektrophorese (denaturing gradient gel electrophoresis DGGE [Myers et al., 1978]) und dem Schneiden von fehlgepaarten DNA-Hybriden mit Chemikalien (chemical cleavage of mismatch CCM [Cotton, 1999]) oder Enzymen werden zusätzlich auch noch andere Methoden wie die Sequenzierung bestimmter Genabschnitte und dem Vergleich der Daten verschiedener Individuen auch die Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse sowie die dynamische HPLC eingesetzt. Die drei letztgenannten Verfahren werden im folgenden näher erläutert.

Sequenzierung

Die Standardmethode zur Aufklärung von SNPs ist die Sequenzierung, d.h die Aufklärung der Primärstruktur der DNA. Das Prinzip der DNA-Sequenzierung ist seit fast 40 Jahren [Sanger et al., 1977] bekannt und erfolgt heute meist mit Polyacrylamid-Gelen oder mit Kapillarelektrophorese. Bei modernen Sequenziermethoden wird meist das „dye terminator“-Prinzip angewendet [Kwok et al., 1994; Nickerson et al., 1997]. Dazu werden dNTPs und vier mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte ddNTPs, den dye-Terminatoren, im PCR-Ansatz im Verhältnis 100:1 gemischt. Nach dem Start einer PCR mit einem sequenzspezifischen Primer werden sowohl dNTPs als auch ddNTPs eingebaut, bei den ddNTPs erfolgt jedoch ein Abbruch der Reaktion. Man erhält somit viele PCR-Produkte unterschiedlicher Länge, die je nach der letzten Base mit verschiedenen Farbstoffen markiert sind. Beim Auftrennen der Mischung durch die Gel-Elektrophorese oder Kapillarelektrophorese (CE) erhält man je nach Größe der Produkte unterschiedlich markierte Banden oder Peaks, aus denen sich die DNA-Sequenz ablesen lässt.

Neben dem Vorteil der Kenntnis über die genaue Lage einer Mutation birgt die Methode jedoch einige Nachteile. Zum einen liefert sie für die reine SNP-Analyse „überflüssige“ Informationen über die flankierenden Sequenzen. Darüber hinaus ist sie enorm zeit- und kostenaufwändig. So konnte die Aufklärung der Primärstruktur des gesamten menschlichen Genoms durch Sequenzierung nur durch die jahrelange Arbeit zweier sehr großer Arbeitsgruppen bewältigt werden [Venter et al., 2001; International Human Genome Sequencing Consortium, 2001].

Name	Internet-Adresse (URL)	Bemerkungen
Allgemeine SNP-Datenbanken		
The SNP Consortium LTD	http://snp.cshl.org/	Non-profit-Projekt mehrerer Unternehmen, stellt freie Informationen über bis zu 300.000 SNPs bereit [Thorisson and Stein, 2003]
dbSNP	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/index.html	Datenbank des NCBI, anonymer Download aller Daten per FTP möglich [Sherry et al., 2001]
Ensembl	http://www.ensembl.org/	Gemeinsames Projekt zwischen EMBL-EBI und dem Sanger Centre zur Entwicklung einer Software, die automatische Einträge über eukaryotische Genome produziert und pflegt [Hubbard et al., 2002]
HUGO Mutation Database Initiative	http://www2.ebi.ac.uk/mutations/cotton/	SNP-Datenbank des Human Genome Project (HUGO)
Human SNP Database	http://www-genome.wi.mit.edu/SNP/human/index.html	SNP-Datenbank des Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research
Human Gene Mutation Database	http://www.hgmd.org/	SNP-Datenbank des Institute of Medical Genetics in Cardiff
SNP-Datenbanken zu bestimmten Forschungsgebieten		
Cystic Fibrosis Mutation Database	http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/	Sammlung über SNPs im CFTR-Gen
SNP500Cancer Database	http://snp500cancer.nci.nih.gov/	Das Projekt will 102 Referenzproben resequenzieren, um bereits bekannte und neu entdeckte SNPs zu finden, die eine potentielle Bedeutung für epidemiologische Krebsstudien haben. Zentrale Quelle für die Verifizierung von SNPs
Human Chromosome 21 cSNP Database	http://c SNP.unige.ch/	Vergleichende cSNP-Datenbank and -karte. Gemeinschaftsprojekt der Abt. Medizinische Genetik der Medical School der Universität und dem Schweizer Institut für Bioinformatik
Human Ornithine Transcarbamylase Database	http://63.75.201.100/otc/	Datenbank über SNPs, die die humane Ornithin-Transcarbamylase (OTCase) betreffen

Tabelle 1.1: Übersicht über ausgewählte SNP-Datenbanken im Internet

Zur Zeit sind Sequenzer mit bis zu 96 parallelen Kapillaren verfügbar, die zusätzlich mit Temperaturgradienten betrieben werden können (temperature gradient capillary electrophoresis TGCE [Gao and Yeung, 2000; Li et al., 2002]). Durch Kombination mit anderen Diskriminierungsmethoden wie der Einzelbasenverlängerung [Vreeland et al., 2002] ist die Sequenzierung auch für SNP-Genotypisierung geeignet (siehe Tabelle 1.3, S. 19).

Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse (SSCP)

Da die Sequenzierung vieler Proben teuer und zeitaufwändig ist, wurde nach weiteren, schnelleren Methoden zur Mutationsanalyse gesucht. Orita et al. [1989] entwickelte die „single-strand conformational polymorphism“-Analyse (SSCP), mit der man unbekannte Einzelbasenaustausche detektieren kann. Der Methode liegt die Beobachtung zugrunde, dass einzelsträngige DNA unterschiedlicher Sequenz verschiedene Konformationen einnehmen können. Selbst einzelne Mutationen können zu einer verringerten oder erhöhten Mobilität der Moleküle bei der Gel-Elektrophorese führen. Man denaturiert DNA-Fragmente und trägt sie auf ein nicht-denaturierendes Polyacrylamid-Gel auf. Die isolierten Einzelstränge bilden eine individuelle Konformation aus, die in den meisten Fällen auch ein unterschiedliches Laufverhalten aufweist. Da die Auftrennung jedoch nur nach unterschiedlicher Struktur und nicht nach Sequenz erfolgt, kann die SSCP-Analyse lediglich Hinweise auf Mutationen in bestimmten Regionen geben. Die Sequenz der potenziell SNP-haltigen Genabschnitte muss anschließend noch aufgeklärt werden, z.B. durch Sequenzierung.

Obwohl die Technik bereits seit 1989 bekannt ist, wird sie auch noch heute sehr häufig angewendet. So beschreibt Doi et al. [2004] eine SSCP-Analyse kombiniert mit automatisierter Kapillarelektrophorese (CE-SSCP) und Fluoreszenz-Detektion für die Suche nach unbekanntem und bekannten SNPs. Vorteilhaft ist außerdem der geringe technische Aufwand der Methode und die Tatsache, dass die untersuchte DNA aus dem Gel extrahiert und für nachfolgende Versuche verwendet werden kann. Allerdings ist ihre Anwendung auf Fragmente von mindestens 300 Basenpaaren Länge beschränkt [Kwok and Chen, 2003].

Denaturierende Hochleistungs-Flüssigchromatografie (dHPLC)

Mit der denaturierenden HPLC (dHPLC) steht ein weiteres SNP-Scanning-Verfahren zu Verfügung [Underhill et al., 1997; Kuklin et al., 1999; Chen and Tan, 2004]. Durch die Verwendung chromatografischer Säulen kann man einerseits ein vergleichsweise kostengünstiges SNP-Screening durchführen. Andererseits gibt die Methode nur Aufschluss auf das Vorhandensein von Mutationen, jedoch nicht über die Sequenz oder den konkreten Basenaustausch. Das führt u.a. zur Kopplung der Methode mit anderen Genotypisierungsverfahren wie z.B. mit der Sequenzierung [Roux et al., 2004] oder Massenspektrometrie [Oberacher et al., 2002].

Das Prinzip beruht auf der Bildung von Heteroduplexen (Sequenzen mit SNPs), die ein anderes Laufverhalten in chromatografischen Säulen zeigen als Homoduplexen (keine Mutationen). In Abbildung 1.2 sind die Einzelschritte dargestellt.

Das kommerziell verfügbare WAVE[®] HS System von Transgenomic (Omaha, NE, USA) ermöglicht das Screening nach unbekanntem SNPs von 170 bis 380 Patienten pro Tag [van den Bosch et al., 2000]. Bei genauer Kenntnis der Sequenz der DNA-Fragmente kann die dHPLC aber auch zur Genotypisierung bekannter SNPs eingesetzt werden [Devaney et al., 2001].

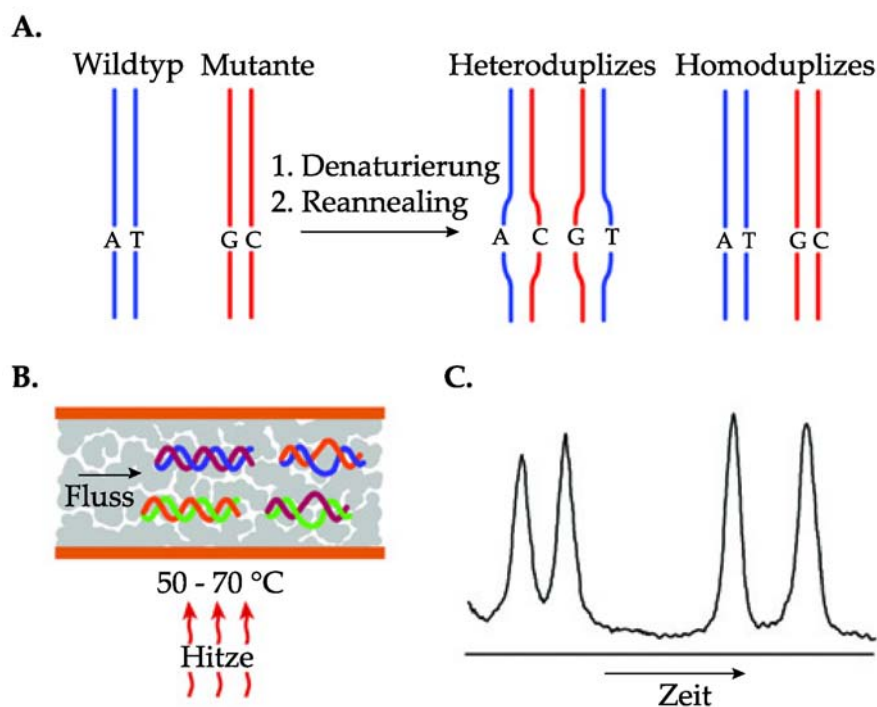


Abbildung 1.2: Prinzip der denaturierenden HPLC. **A.** Vor der dHPLC werden 200 - 1000 Bp lange Fragmente durch PCR aus template-DNA mit mindestens 2 Chromosomen amplifiziert. Danach werden sie bei 95°C für 3 min denaturiert, bevor sich die Einzelstränge nach Abkühlen (95 auf 65°C über 30 min) wieder zu Doppelsträngen anlagern. Liegt eine Mutation vor, werden nicht nur die ursprünglichen Homo-, sondern auch Heteroduplexe gebildet. **B.** Je nach GC-Gehalt der zu vergleichenden DNA-Doppelstränge, wird mit einer Säulentemperatur von 50-70°C gearbeitet, um eine teilweise Denaturierung zu erreichen. Die thermisch weniger stabilen Heteroduplexe denaturieren schneller und passieren die Säule in kürzerer Zeit. **C.** Abhängig von vielen Faktoren einschließlich der Größe der Fragmente, Einfluss des direkt benachbarten Strangs erhält man gut oder weniger gut aufgetrennte Fraktionen (modifiziert nach Premstaller and Oefner [2003]).

1.1.4 Methoden zur Genotypisierung von SNPs

Prinzipiell lassen sich alle Methoden zur Analyse bereits bekannter SNPs in verschiedene Kategorien einteilen: Beispielsweise nach Notwendigkeit der Amplifikation durch PCR, nach Detektions- oder Diskriminierungsmethoden. Am sinnvollsten erscheint die Klassifikation nach Kwok [2001], die nach dem Prinzip der Diskriminierungsreaktion unterscheidet (siehe Tabelle 1.2). Andere Quellen wiederum verweisen auf einen modularen Aufbau von einzelnen Genotypisierungsmethoden [Svänäen, 2001]. In Abbildung 1.3 sind die vielfältigen Kombinationen von einigen gängigen Methoden aufgeführt.

Idealerweise sollte eine SNP-Analyse einfach, verlässlich, robust, kostengünstig und automatisierbar sein sowie leicht analysierbare Daten liefern [Kwok and Chen, 2003]. Einige ausgewählte Diskriminierungsprinzipien, Reaktionsformate und Detektionsmethoden, die bisher in der Literatur beschrieben wurden sind in Tabelle 1.2 aufgeführt.

Diskriminierungsprinzipien	Reaktionsformate	Detektionsmethoden
1. Hybridisierung	1. Homogene Formate	1. Lumineszenz
2. Einzelnukleotid-Einbau bzw. Primer-Verlängerung	2. Feste Oberflächen (Mikrotiterplatten, Beads oder Mikroarrays)	2. Fluoreszenz
3. Ligation		3. Zeitaufgelöste Fluoreszenz
4. Schneiden mit Enzymen		4. FRET
		5. Fluoreszenz-Polarisation
		6. Massenspektrometrie
		7. Elektrische Detektion

Tabelle 1.2: Übersicht über Diskriminierungsprinzipien, Reaktionsformate und Detektionsmethoden. Die vorgestellten Module lassen sich meist frei kombinieren (siehe auch Abbildung 1.3).

1.1.5 Beispiele für SNP-Genotypisierungsmethoden

Aus der Vielzahl an vorhandenen SNP-Analyse-Methoden wird im folgenden eine kleine Auswahl verbreiteter Verfahren näher erläutert: Restriktionsschnittstellen-Analyse (RFLP); Minisequencing; Pyrosequencing; Primer Extension mit Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS); TaqMan Assay; DASH; Invader Assay; Mikroarrays.

Restriktionsschnittstellen-Analyse (PCR-RFLP)

Liegen Mutationen in der Erkennungssequenz von Restriktionsendonukleasen vor, so kann dies bei der Restriktionsschnittstellen-Analyse ausgenutzt werden. Voraussetzung für die Anwendung ist jedoch, dass es ein entsprechendes Enzym verfügbar ist und dass keine ähnliche Schnittstelle in den benachbarten Regionen liegt.

Formal gesehen (siehe Tabelle 1.2) handelt es sich bei dieser Methode um die Kombination des Schneidens von Enzymen im homogenen Format mit Detektion durch Gel-Elektrophorese. Für die Analyse werden PCR-Produkte, die den entsprechenden Locus umfassen mit einer Endonuklease verdaut, anschließend wird das Schnittmuster von

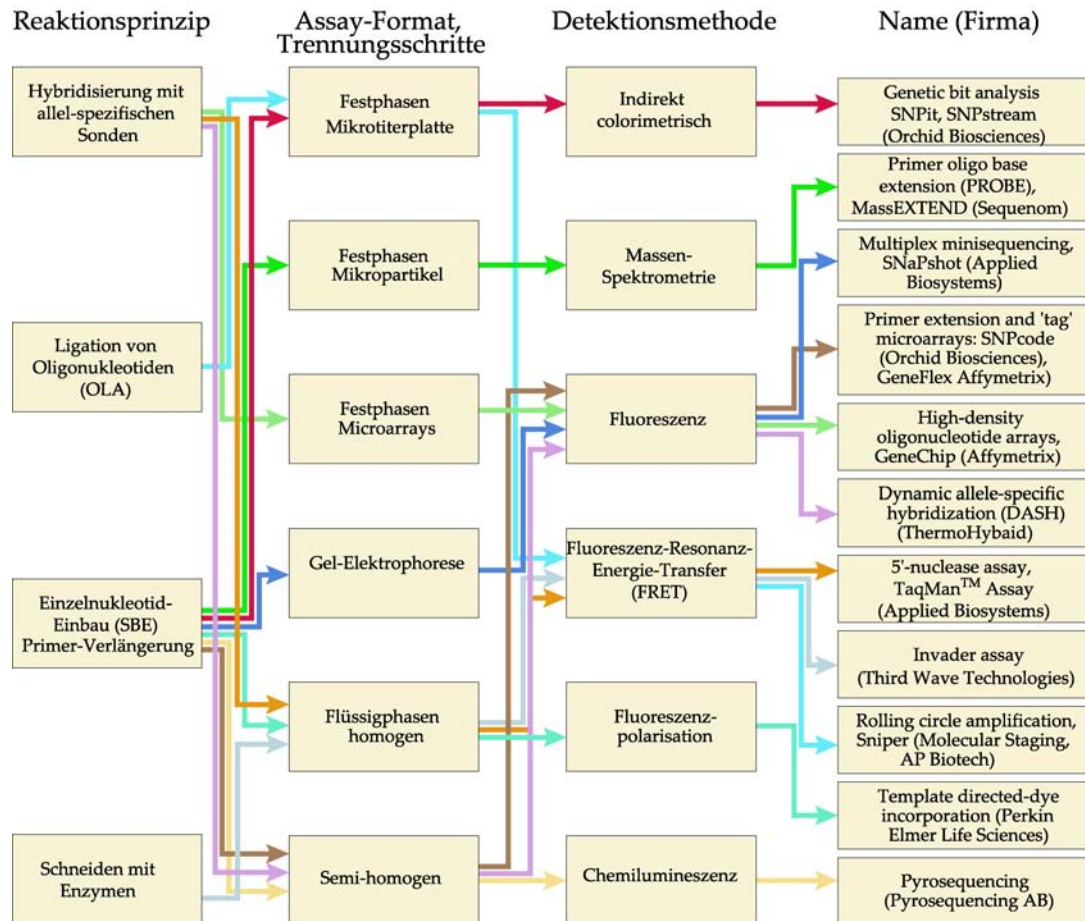


Abbildung 1.3: Modulares Design einiger SNP-Genotypisierungs-Assays. Farbige Pfeile zeigen das Reaktionsprinzip, das Assay-Format und die Detektionsmethode eines bestimmten Verfahrens an. Der TaqMan™ Assay beispielsweise vereinigt Hybridisierung mit allel-spezifischen Oligonukleotiden als Festphasen-Assay mit der Detektion durch Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer. Das Schema veranschaulicht den Aufbau verschiedener Assaydesigns, wenngleich die Assayliste nicht vollständig ist (modifiziert nach Syvänen [2001])

Wildtyp und Mutante mit der Gel-Elektrophorese verglichen (Abbildung 1.4). Liegt eine Mutation in der Schnittstelle vor, wird das Produkt nicht verdaut. Bei heterocygoter DNA liegen sowohl geschnittene als auch ungeschnittene PCR-Produkte vor. Um diese Fehlerquelle zu umgehen, müssen parallel immer Negativ- und Positivkontrolle mitgeführt werden.

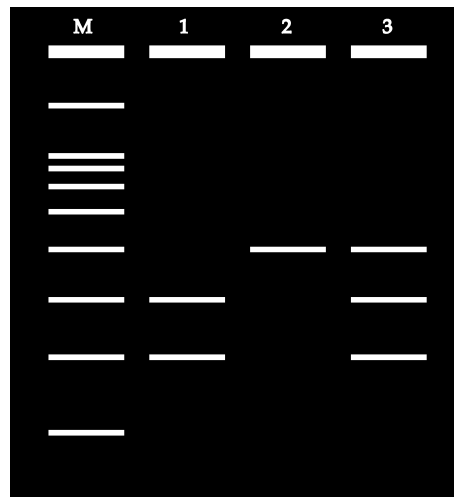


Abbildung 1.4: Muster des Restriktionsverdaus von drei Genotypen: 1 Wildtyp, 2 Mutante, 3 Heterocygote. Als Größenmarker M werden DNA-Lösungen bekannter Fragmente verwendet.

Der Vorteil dieser SNP-Analysenmethode liegt in der einfachen Durchführung, die mit der in mikrobiologischen Labors üblichen Ausstattung auskommt (Thermocycler, Gel-Elektrophoresekammern) und relativ wenig Kosten verursacht. Aus diesem Grund wird die PCR-RFLP relativ häufig für die Analyse einzelner SNPs eingesetzt [Lowe and Galley, 2001; Tsai et al., 2003; Campos et al., 2004]. Allerdings lässt sich dieses Verfahren nur schwer automatisieren. Zudem verhindert der serielle Ansatz einen hohen Probendurchsatz [Kwok, 2001; Syvänen, 2001; Kwok and Chen, 2003].

Minisequencing bzw. Primerverlängerung

Minisequencing ist eine sehr häufig angewendete SNP-Diskriminierungsmethode so z.B. beim Pyrosequencing oder in Kombination mit MALDI-TOF-MS [Fei and Smith, 2000] bzw. Kapillarelektrophorese [Matyas et al., 2002]. Das Prinzip der Diskriminierung beruht auf der Hybridisierung eines spezifischen Primers, der vor dem SNP-Locus endet. Nach der Zugabe einer Polymerase und Einbau des passenden ddNTP am 3'-Ende des Primers erfolgt der Reaktionsabbruch. Wenn vier unterschiedliche ddNTPs mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, kann man so das vorhandene Allel identifizieren [Syvänen et al., 1993]. Bisher ist dieses Verfahren unter mehreren Bezeichnungen in der Literatur bekannt: single nucleotide base extension (SNBE), single base extension (SBE), single nucleotide primer extension (SNuPE), minisequencing, primer extension.

Pyrosequencing

Bei dieser Methode wird der SNP-Nachweis an einem PCR-Produkt über eine Enzym-signalkette geführt (siehe Abbildung 1.5). Beteiligt sind folgende Enzyme: DNA Polymerase, Apyrase, ATPsulfurylase und Luciferase. Die Grundlagen der Methode wurden erstmals 1987 von Nyren et al. [1993] unter dem Namen ELIDA vorgestellt, danach wurde das Verfahren evaluiert (Validierung gegen TaqMan-Assay [Nordfors et al., 2002]) und kontinuierlich weiterentwickelt [Kwiatkowski et al., 1999; Ahmadian et al., 2000, 2002]). Das Prinzip des Pyrosequencing wird aus Abbildung 1.5 (A.) deutlich. An template-DNA wird ein Primer gebunden, an den eine DNA-Polymerase ansetzt. Beim Einbau der komplementären dNTPs (hier dCTP) durch das Enzym wird genau ein Molekül Pyrophosphat frei, mit dem ATP-sulfurylase ein Molekül ATP erzeugt. Dieses wandelt Luciferase in ein Lichtsignal bestimmter Intensität um. Überschüssige dNTPs (dCTP) werden durch Apyrase zu dCMP und AMP abgebaut.

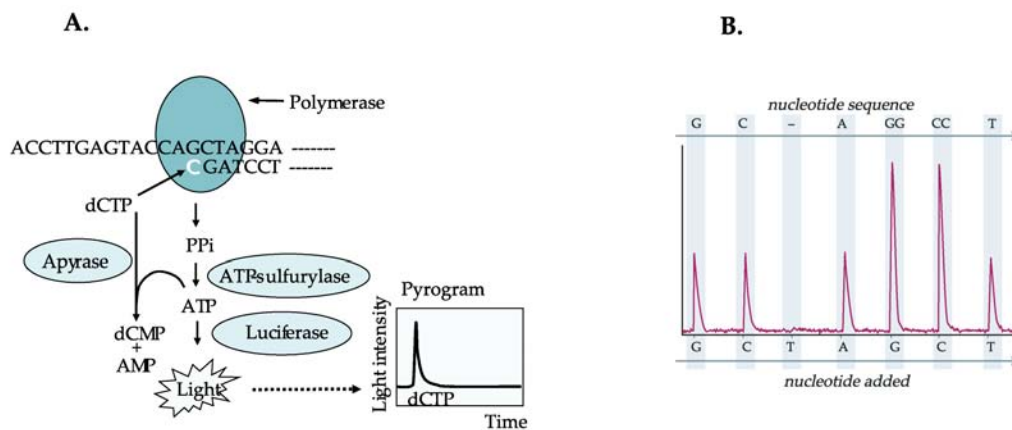


Abbildung 1.5: A. Schematische Darstellung des Prinzips des Pyrosequencing [Berg et al., 2002]. B. Pyrogramm der Sequenz GCAGGCCT (www.pyrosequencing.com)

Durch weitere Zugabe von dNTPs kann man also die template-DNA sequenzieren (max. 100 Bp). Abbildung 1.5, B. zeigt ein typisches „Pyrogramm“. Die Höhe eines Peaks korreliert mit der Anzahl der eingebauten Nucleotide.

Vorteilhaft gegenüber anderen Sequenzierverfahren ist die Möglichkeit der Automatisierung und der schnellen Sequenzierung ohne Elektrophorese. Neben der Sequenzierung von maximal 100 Basen können auch SNP-Analysen durchgeführt werden. Das zur Zeit kommerziell verfügbare PSQ HS 96A System mit Roboter (Biotage, früher Pyrosequencing, Uppsala, Schweden) erlaubt durch den Einsatz von Mikrotiterplatten die Genotypisierung von bis zu 10.000 PCR-Produkten pro Tag (siehe Tabelle 1.3, S. 19). Folgt man der Logik der Tabelle 1.2 (siehe S. 10), ist das Pyrosequencing als Primerverlängerung im homogenen Format mit Fluoreszenz-Detektion einzuordnen.

Primerverlängerung mit Detektion durch Massenspektrometrie

Primer Extension ist die am weitesten verbreitete Methode, bei der die Allel-Diskriminierung mit der MALDI-TOF (Matrix-unterstützte Laserdesorptions-Flugzeit)-Massenspektrometrie detektiert wird. Im Gegensatz zu Hybridisierungsmethoden generiert man hier relativ kleine DNA-Fragmente, was für die MALDI-Analyse durchaus von Vorteil ist. Zwei weit verbreitete Methoden sind der PROBE und der PinPoint Assay [Haff and Smirnov, 1997], die beide nach derselben Prozedur ablaufen: An ein gereinigtes PCR-Produkt hybridisiert ein spezifischer Primer, der durch eine Polymerase um genau eine Base (ddNTPs) verlängert wird. Es folgt der Abbruch, die Folge ist eine lineare Amplifikation. Danach muss das Produkt von ddNTPs, Enzym sowie Primern gereinigt werden. Anhand der unterschiedlich großen Masse der eingebauten ddNTPs lassen sich die SNPs detektieren [Pusch et al., 2002]. Tang et al. [1999] zeigte erstmals eine Möglichkeit, den PROBE Assay zu automatisieren. Der Assay wird unter dem Namen „MassArray“ kommerziell vertrieben (siehe Tabelle 1.3). Um größere Massenunterschiede der verschiedenen Allele zu generieren - bei PROBE Assay liegt der Unterschied lediglich bei 40 bis 9 Dalton - werden beim Very Short Extension (VSET) Assay [Sun et al., 2000] sowohl ddNTPs als auch dNTPs eingesetzt. Durch die Kombination unterscheiden sich die Fragmente dann um bis zu 300 Dalton. Allerdings lässt sich der Assay aufgrund der Ethanolreinigung der Produkte nicht gut automatisieren.

Einen anderen Ansatz verfolgen Berlin and Gut [1999]: Um der Adduktbildung durch das mehrfach negativ geladene DNA-Rückgrat vorzubeugen, alkylieren sie bereits phosphorthiolierte DNA mit Hilfe von Methylidid („charge tagging“). Durch diese Neutralisation der negativen Ladungen kann eine 100fach empfindlichere Messung erreicht werden. Kombiniert mit alkalischer Phosphatase-Verdau, Primer Extension und Phosphordiesterase-Verdau ergibt die Alkylierung den so genannten GOOD-Assay. Die Reinigung wird durch einfache Verdünnung ersetzt [Sauer et al., 2000a,b].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Einsatz der MALDI-TOF-MS als Detektionsgerät nur bei hohem Probendurchsatz sinnvoll ist, da die Apparatur einerseits kostenintensiv ist, die Analysen sich andererseits aber gut automatisieren lassen. Bisher stehen für die SNP-Analytik mehrere Ansätze zur Verfügung, die sowohl mit PCR-Produkten als auch mit genomischer DNA arbeiten. Kommerzielle Komplettsysteme sind ebenfalls erhältlich (siehe Tabelle 1.3).

TaqMan-Assay

Bereits 1991 stellten Holland et al. [1991] fest, dass Taq DNA-Polymerase bei der Verlängerung des Vorwärts-Primers eventuell gebundene oder nicht vollständig denaturierte DNA-Fragmente verdaut. Diese 5'-Exonuklease-Aktivität der Taq Polymerase wird beim TaqMan-Assay ausgenutzt, um eine quantitative PCR durchzuführen.

Für diese Art von PCR benötigt man neben der Polymerase eine doppelt gelabelte Sonde mit Reporter- (Fluoreszenz-Farbstoff) und Quencher-Farbstoff (minor groove binder). Wenn beide Fluoreszenz-Farbstoffe an die Sonde gebunden sind, wird die Emission des Reporter-Farbstoffes gequencht (FRET-Prinzip). Während jeder Verlängerungsphase spaltet die DNA-Polymerase den Farbstoff von der Sonde ab, woraufhin der Farbstoff

sofort eine charakteristische Fluoreszenz emittiert, deren Intensität überdies proportional zur Menge amplifizierter DNA ist. Essentiell ist hierbei, dass das Enzym die Sonde nur dann spaltet, wenn sie spezifisch an die template-DNA hybridisiert.

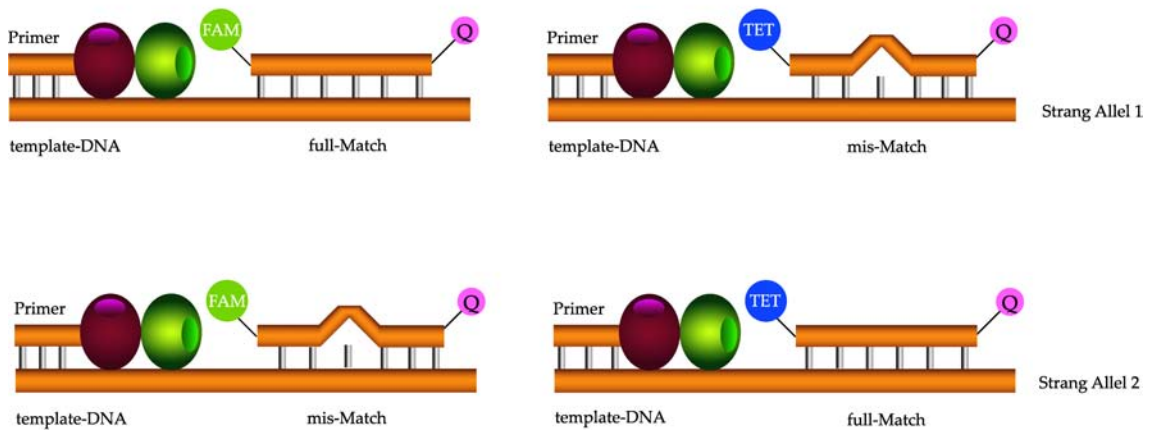


Abbildung 1.6: Allel-Diskriminierung beim TaqMan-Assay

Außer bei der quantitativen PCR lässt sich der TaqMan-Assay auch für die erstmals von Livak [1999] vorgestellten SNP-Analyse verwenden. Dabei werden zwei unterschiedliche Reporter-Farbstoffe (FAM, TET) eingesetzt, die an zwei allel-spezifische Sonden gebunden sind. In Abbildung 1.6 ist das Assay-Design beispielhaft dargestellt. FAM bildet einen full-Match mit Allel 1 und TET mit Allel 2. Durch den mis-Match spaltet die Polymerase weniger Sonde und man erhält ein deutlich geringeres Fluoreszenzsignal als beim full-Match.

Da die Fluoreszenz während der PCR online (Real time) verfolgt wird, entfällt die bei anderen SNP-Analysen notwendige Reinigung sowie die Detektion durch elektrophoretische Trennung. Andere Detektionsmethoden erübrigen sich ebenfalls. Nachteilig sind jedoch hohe Investitionskosten für die TaqMan-Maschine sowie Folgekosten, etwa für TaqMan-Sonden und anderes Verbrauchsmaterial, das beispielsweise bei der PCR-RFLP-Analyse nicht notwendig ist.

Dynamische allel-spezifische Hybridisierung (DASH)

Das Prinzip von DASH beruht auf der Hybridisierung einer allel-spezifischen Sonde an eine DNA-Sequenz. Dazu ist wie beim Pyrosequencing eine PCR erforderlich. Die Methode ist in Abbildung 1.7 schematisch wiedergegeben. Zuerst wird durch PCR ein DNA-Fragment (45-65 Bp) erzeugt und gleichzeitig mit Hilfe eines biotinylierten Primers modifiziert (siehe Abbildung 1.7 Schritt 1). Anschließend verankert man das Amplifikat an Streptavidin-beschichtete Wells einer Mikrotiterplatte und entfernt die verbleibenden PCR-Komponenten (Primer, dNTPs, Taq, Salze etc.).

Durch die Zugabe von Natronlauge wird der nicht-biotinylierte vom immobilisierten Strang des Fragments entfernt (siehe Abbildung 1.7 Schritt 2). Anschließend hybridisiert man eine allel-spezifische Sonde (15-17 Bp) an den Einzelstrang bei niedriger Temperatur

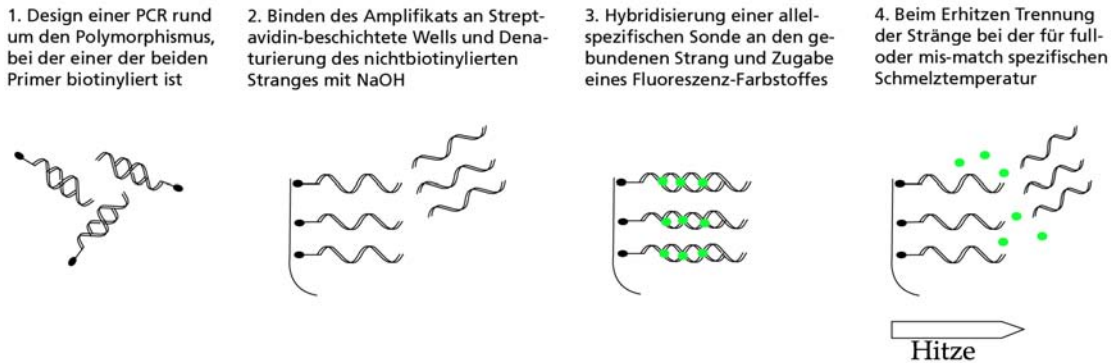


Abbildung 1.7: Prinzip der Dynamischen allel-spezifischen Hybridisierung (DASH) (modifiziert nach Prince and Brookes [2001])

und setzt einen Fluoreszenz-Farbstoff zu, der in den Doppelstrang interkaliert (siehe Abbildung 1.7 Schritt 3). Die Sonde ist komplementär zum immobilisierten PCR-Produkt und unterscheidet sich lediglich durch eine Base von polymorphischen Sequenzen. Es entstehen also perfekt passende, stabile (full-Match) und fehlgepaarte (mis-Match), d.h. weniger stabile Hybride. Nach Anregung emittiert der Farbstoff, messbares Licht solange er im Duplex interkaliert. Bei Erhöhung der Temperatur über den Schmelzpunkt der Hybride hinaus erreicht man die Denaturierung des Duplex', woraufhin der Farbstoff frei wird (siehe Abbildung 1.7 Schritt 4). Dadurch verringert sich die Intensität der emittierten Fluoreszenz. Trägt man die Fluoreszenzintensität gegen die Temperatur auf, erhält man sigmoide Kurven des Abfalls der Fluoreszenz (Abbildung 1.8 A.). Zur besseren Auswertung wird jedoch die negative erste Ableitung der Fluoreszenz nach der Temperatur gegen die Temperatur aufgetragen (Abbildung 1.8 B.). Full-Match und mis-Match können also durch ihre unterschiedlich hohe Schmelztemperatur diskriminiert werden.

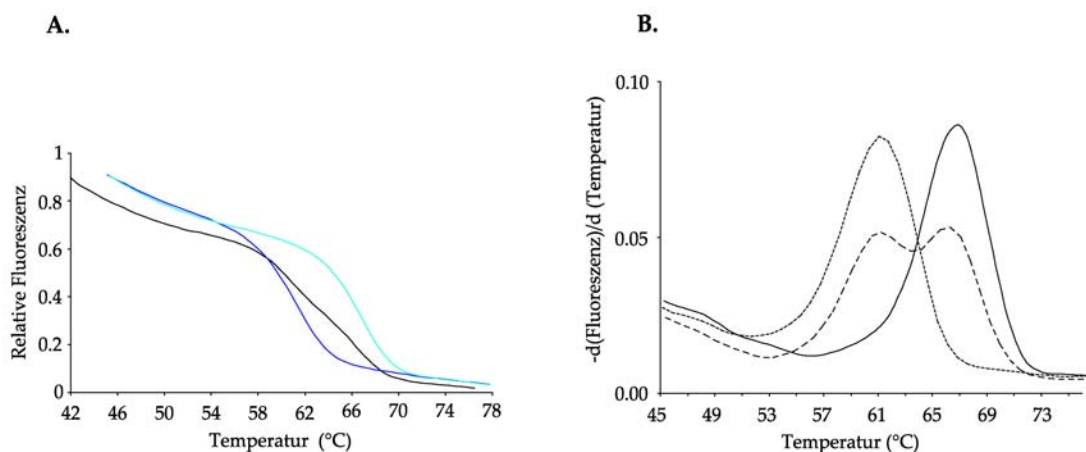


Abbildung 1.8: Beispiel einer DASH-Analyse dreier Individuen. A. FI-T-Diagramm. B. $d(FI)/dT$ -Diagramm. Homozygote Proben ergeben Einzelpeaks, heterozygote Doppelpeaks (modifiziert nach Prince and Brookes [2001])

In ihrer Veröffentlichung zum DASH-Prinzip beschreiben Howell et al. [2002], dass der interkalierende Farbstoff durch ein so genanntes iFRET-System ersetzt werden kann. Dadurch erhöht sich die Fluoreszenzintensität gegenüber gewöhnlichen Interkalatoren wie SybrGreen I. Durch den Einsatz von Mikrotiterplatten können jeweils 96, 384 oder mehr Proben parallel analysiert werden.

Invader Assay

Die bisher vorgestellten Methoden benötigen für die SNP-Analyse stets einen Amplifikationsschritt, der die PCR eines bestimmten DNA-Abschnittes umfasst. Zumeist liegt nicht genügend DNA für die Analyse vor oder zu viele SNPs liegen auf zu weit voneinander entfernten Loci. Zusätzlich erhöht die Amplifikation das Signal im Vergleich zum Hintergrundrauschen und steigert so die Zuverlässigkeit der Methode. Obwohl die PCR weit verbreitet und effizient ist, ist sie doch auch zeitaufwändig und kostenintensiv. Obgleich die parallele Amplifikation bereits oft beschrieben wurde, ist die PCR von mehr als 10 Fragmenten sehr schwierig und muss meist umfassend optimiert werden.

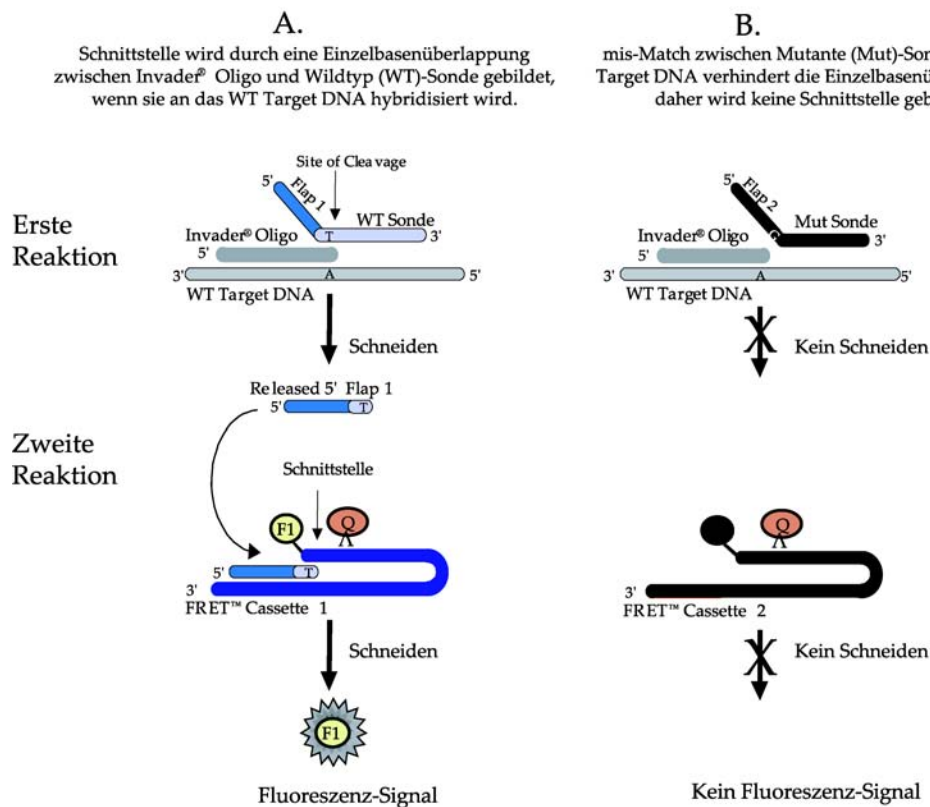


Abbildung 1.9: Prinzip des Invader Assays. **A.** zeigt den Fall eines full-Matches, **B.** den eines mis-Matches (modifiziert nach www.twt.com)

Eine Alternative stellen Lyamichev et al. [1993] vor. Sie zeigten, dass 5'-Exonucleasen bestimmter eubakterieller DNA-Polymerasen auch als struktur-spezifische Endonucleasen wirken können. Diese so genannten FLAP-Endonucleasen (FENs) [Lyamichev et al.,

1999] erkennen und schneiden eine Struktur, wenn zwei überlappende Oligonukleotide an eine Ziel-DNA hybridisieren. Im Invader AssayTM wird dieses Prinzip verwendet und für den Nachweis von SNPs kommerziell vertrieben (siehe Tabelle 1.3). In Abbildung 1.9 ist das Prinzip des Invader Assays dargestellt. Man kann die Analyse direkt mit genomischer DNA durchführen.

Im Falle eines full-Match (Abbildung 1.9, A.) hybridisieren zwei Oligonukleotide (Invader Oligo und diskriminierende Sonde mit FLAP 1-Ende) so an der Ziel-DNA, dass es zu einer überlappenden Struktur kommt. Das 5'-Ende der Sonde hybridisiert nicht an der Ziel-DNA. Das 3'-Ende des Invader-Oligos überlappt mit der Sonde, hybridisiert jedoch nicht am Strang. Die zugesetzte „Cleavase[®]“ - eine FEN - erkennt diese überlappende Struktur und schneidet den nicht gepaarten FLAP-Strang. Die Sonde ist außerdem so gewählt, dass ihre Schmelztemperatur nahe der Reaktionstemperatur liegt. Dadurch kann der Assay mehrere Zyklen durchlaufen und man erhält mehr FLAP-Moleküle. Danach hybridisiert der FLAP-Strang an eine FRET-Cassette und das erneute Schneiden der Cleavase, das Quencher und Donor trennt, führt zu einem detektierbaren Fluoreszenzsignal.

Wie schon beim DASH und Pyrosequencing wird der Invader Assay in Mikrotiterplatten durchgeführt, was einen hohen Probedurchsatz ermöglicht. Bei Mein et al. [2000] wurde untersucht, ob sich der Invader Assay für Genotyping einsetzen lässt und ob die Methode automatisierbar ist. Dabei wurden 384 Individuen auf 36 verschiedene SNPs untersucht. Allerdings gingen die Autoren von entsprechenden PCR-Produkten aus. Mit der Methode konnten SNPs zu 99,2% richtig analysiert werden. Es wird eine Fehlerrate von 2-3% angegeben (zum Vergleich TaqMan Assays: 5 - 15%).

Ausgehend von der Überlegung, dass pro SNP 100 ng genomische DNA nötig sind, um eine Analyse per Invader Assay durchzuführen, kann man mit 100 μ g genomischer DNA (entspricht 5 - 10 ml Blut) lediglich 1000 SNPs untersuchen. Dieses Dilemma versuchte Ohnishi et al. [2001] zu umgehen, indem er eine multiplex-PCR mit dem Invader Assay kombinierte. So konnten aus 40 ng genomischer DNA jeweils 100 SNPs analysiert werden, bei denen man eine 100%ige Übereinstimmung bei einer Kontrollsequenzierung von 24 SNP-Loci feststellte. Der Invader Assay ist nicht nur in Mikrotiterplatten durchführbar, auch andere Formate stehen zur Verfügung (Elektrophorese, ELISA und MALDI-TOF-MS [Griffin et al., 1999]). Die so genannte SISAR (serial invasive signal amplification reaction) [Hall et al., 2000] soll den Nachweis von Ziel-DNA im zeptomol-Bereich erlauben (10^{-21} mol). Weitere Neuentwicklungen stellte Wilkins Stevens et al. [2001] vor. Dort wird gezeigt, dass der Invader Assay auch an festen Phasen durchführbar ist. Ziel war es, durch Bindung an festen Phasen oder Chips die Mengen benötigter DNA zu verringern und so eine parallele SNP-Analyse zu ermöglichen. Als feste Phase wurden hierbei Streptavidin-beschichtete Latex-Mikropartikel verwendet, an denen die biotinylierte Ziel-DNA gebunden war.

Firmenübersicht

In Tabelle 1.3 sind einige gängige SNP-Analysemethoden, nach täglichem Probedurchsatz geordnet, aufgeführt.

Firma	Produktname	verwendete Methode	maximaler Durchsatz (Genotypen/Tag)
Applied Biosystems, Foster City, CA, USA	SNIPlex™ Genotyping System	allel-spezifische Ligation an gDNA, Amplifikation, Detektion von Fluoreszenz-Sonden mit Kapillarelektrophorese	400.000 - 3.000.000
Illumina, San Diego, CA, USA	BeadLab 1000/2000	BeadArray™: Minisequencing an gDNA, Ligation, Amplifizierung, Detektion von Fluoreszenz-Sonden	600.000 - 2.000.000
Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA	GenomeLab™ SNPstream® Genotyping System	Minisequencing mit gelabelten ddNTPs, anschließend Detektion auf Mikroarrays	800.000
Sequenom, San Diego, CA, USA	MassARRAY™ 200K System	Minisequencing mit ddNTPs, Detektion unterschiedlicher MG mit MALDI-TOF-MS	200.000
Affymetrix, Santa Clara, CA, USA	GeneChip® Human Mapping 10k Array	Hybridisierung von PCR-Produkten an immobilisierten Oligonukleotiden auf Microarrays	50.000
Amersham Biosciences Europe GmbH	MegaBACE™ 4000	Minisequencing mit gelabelten ddNTPs, Detektion mit Kapillarelektrophorese	27.000
Roche	LightTyper	Schmelzkurvenanalytik von PCR-Produkten, Mikrotiterplatten-Format	18.000
Biotage, Uppsala, Schweden	PSQ™HS 96A System	Minisequencing mit anschließender Enzymsignalkette, Mikrotiterplatten-Format, Fluoreszenz-Detektion	10.000
ThermoHybaid	DASH	Schmelzkurvenanalytik, Mikrotiterplatten-Format, Fluoreszenz-Detektion	3.000
Third Wave Molecular Diagnostics, Madison, WI, USA	Invader® Platform	Schneiden mit Enzymen bei Vorliegen von mis-Match-Hybridriden, Fluoreszenz-Detektion	3.000
Roche	LightCycler	Real-time PCR, Detektion mit Schmelzkurvenanalytik oder TaqMan-Sonden	128

Tabelle 1.3: Übersicht über kommerziell verfügbare Geräte zur Analyse bekannter SNPs, geordnet nach täglichem Probendurchsatz

1.2 Mikroarrays

Da in der vorliegenden Arbeit ebenfalls Mikroarrays verwendet werden, wird in diesem Punkt auf die Herstellung von DNA-Chips und ihre Anwendungen sowie auf einige ausgewählte Beispiele zur SNP-Analyse näher eingegangen.

Generell gilt, dass parallele Methoden bei einer hohen Anzahl an Proben eine schnellere Analyse erlauben als serielle oder kontinuierliche Verfahren. Mikroarrays, auf denen hunderte oder tausende Analyten gleichzeitig untersucht werden können, sind im besonderen Maße geeignet. Mit Hilfe solcher Arrays werden beispielsweise Gen-Expressionsstudien oder eben auch SNP-Analysen durchgeführt.

1.2.1 Herstellung von Mikroarrays

Prinzipiell gibt es drei Ansätze, um DNA-Mikroarrays herzustellen: Erstens die Synthese von Oligonukleotiden direkt auf der Oberfläche (Photolithografie [Fodor, 1991; Southern et al., 1992]), zweitens das Absetzen von DNA-Lösungen auf der Oberfläche (Kontaktverfahren) und drittens das Betropfen der Chips, ohne dass es zu einem Kontakt mit dem Chips kommt (kontaktloses Verfahren [Heise, 2004]). Außerdem besteht auch die Möglichkeit, DNA auf Mikroarrays durch elektrischen Strom zu lokalisieren (siehe NanoChip[®] Electronic Microarray, S. 29). In der Abbildung 1.10 sind die Methoden schematisch dargestellt.

1.2.2 Photolithografische Verfahren

Das photolithografische Verfahren unter Einsatz von UV-Licht, das durch Chrom-Glas-Masken fällt [Fodor, 1991], bringt einige grundlegende Vorteile mit sich. Da die DNA-Sequenzen direkt auf dem Chip synthetisiert werden, entfallen Verwaltung und Bereitstellung der Proben sowie Fehler durch die Probenhandhabung. Außerdem treten weniger Chip-zu-Chip-Abweichungen auf. Nachteilig sind jedoch mögliche Fehler beim Einbau der Basen [McGall et al., 1997; Pirrung et al., 1998] sowie die kosten- und zeintensive Herstellung der Photomasken [Schna et al., 1998]. Da für jede Base eine neue Maske benötigt wird (siehe Abbildung 1.10) ergeben sich rein rechnerisch bei Nmeren Oligonukleotiden $4 \times N$ Masken. Für einen Chip mit 25meren benötigt man demzufolge 100 verschiedene Masken [Singh-Gasson et al., 1999]. Durch die Verwendung von großen Glas-Wafern bei der Synthese lassen sich Kosten sparen, da man aus ihnen durch Zerteilen des Wafers mehrere Chips herstellen kann.

Einen Ansatz, der keine Chrom-Glas-Masken benötigt, stellen Singh-Gasson et al. [1999] vor. Durch die Verwendung von Computer-erzeugten, virtuellen Masken eines PC-Bilddarstellungs- und eines optischen Projektionssystems wird hier die Deprotektion durch UV-Licht gesteuert (siehe Abbildung 1.11). Der „maskless array synthesizer“ (MAS) ermöglicht dadurch eine wesentlich preiswertere Oligonukleotid-Synthese als die unter Verwendung von Photomasken. Kostenlimitierend sind hier nur die Chemikalien (ca. 60 \$/Chip). Die so erzeugten Arrays können 24mere in 195.000 verschiedenen Positionen bei Abmessungen von 13,1 x 17,4 mm umfassen [Nuwaysir et al., 2002].

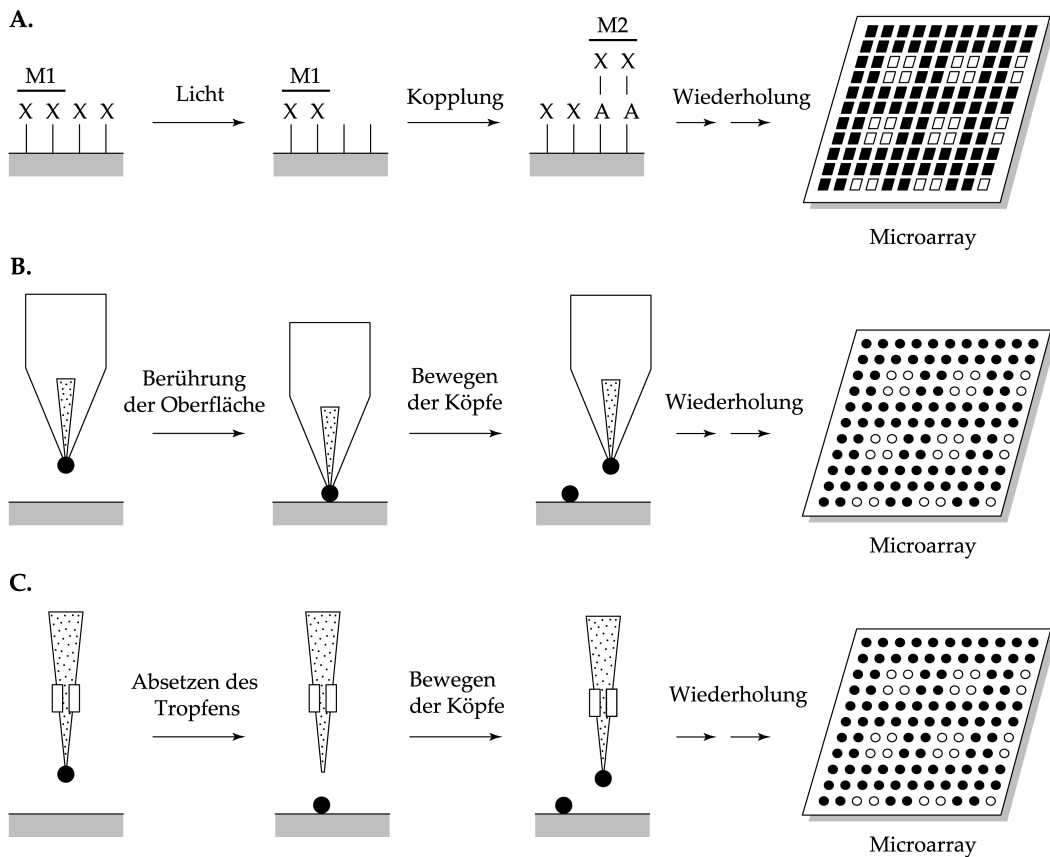


Abbildung 1.10: Übersicht über Mikroarraytechnologien mit drei unterschiedlichen Ansätzen. **A.** Photolithografie: Ein mit photolabilen Schutzgruppen (X) modifizierter Glaswafer wird durch Licht, das durch eine Photomaske (M1) fällt, selektiv für die DNA-Synthese aktiviert. Danach wird mit einer photogeschützten DNA-Base (A-X) überspült, was zur orts aufgelösten Bindung der Base führt. Eine zweite Photomaske wird für die Deprotektion der definierter Regionen verwendet. Wiederholte Deprotektions- und Bindungs-Zyklen ermöglichen die Synthese von Oligonukleotiden in sehr hoher Dichte. **B.** Mechanisches Mikrospotting: Man lädt eine biochemische Probe durch Kapillarkräfte in eine Nadel mit Kavität (Pin-Tool) und setzt ein kleines Volumen durch Berührung der Oberfläche mit dem Pin ab. Danach wäscht man den Pin und man kann eine zweite Proben laden. **C.** Kontaktloses Verfahren: Eine biochemische Probe wird in eine Kapillare geladen und durch einen Impuls (Piezo- oder InkJet) in Richtung Oberfläche abgegeben. Danach wird die Kapillare gewaschen und eine zweite Probe kann aufgenommen und auf die Oberfläche gespottet werden (modifiziert nach Schena et al. [1998]).

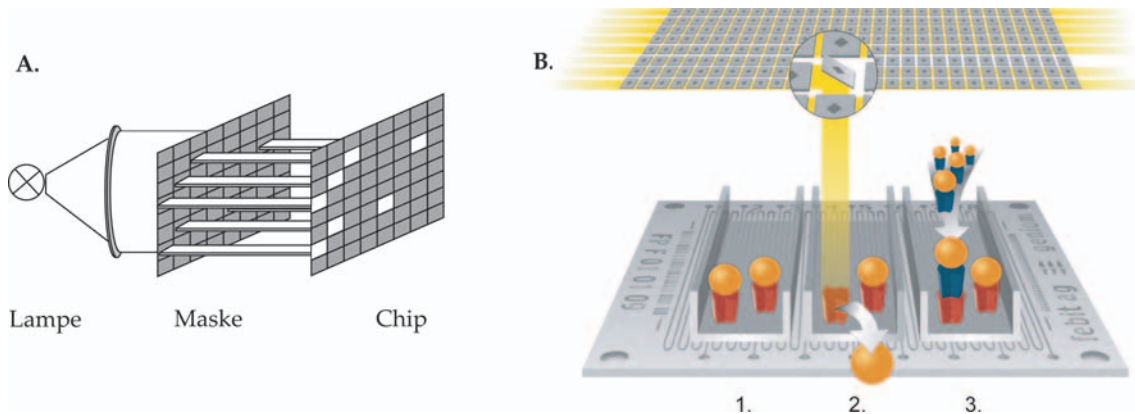


Abbildung 1.11: Übersicht über photolithografische Verfahren zur Synthese von Oligonukleotiden auf Chips. **A.** Photolithografisches Verfahren mit Photomasken (modifiziert nach Lipshutz et al. [1999]) **B.** Photolithografie mit virtueller Maske am Beispiel der Febit-Technologie. Die Deprotektion (B. 2) erfolgt durch UV-Licht, das durch computergesteuerte Spiegel umgelenkt wird (mit freundlicher Genehmigung der Febit AG, Mannheim).

Dasselbe optische Projektionssystem verwendet die Mannheimer Firma Febit [Baum et al., 2003]. Allerdings sind hier Projektion, Chip und Fließsystem bereits im Gerät (Geniom[®] One) integriert, sodass sowohl die Synthese der Oligonukleotide, als auch alle Waschstschritte, die Hybridisierung und die spätere Analyse im Gerät ablaufen. Der Anwender kommt mit dem Chip nicht mehr in Berührung, deshalb werden zusätzliche Geräte wie Waschstationen oder Mikroarray-Scanner überflüssig (siehe auch Abbildung 1.11, B.).

Erwähnenswert ist, dass die per Photolithografie hergestellten Oligonukleotide immer mit dem 3'-Ende an die Oberfläche gekoppelt sind. Dadurch können bestimmte SNP-Analyseverfahren nicht durchgeführt werden, wie z.B. das Minisequencing an immobilisierten Primern (siehe S. 27) oder die allel-spezifische Primerverlängerung. Eine umgekehrte Synthese in 5'→3'-Richtung ist zwar möglich, allerdings mit geringerer Oligonukleotidausbeute, da ein weniger effizienter Mechanismus eingesetzt wird [Kwiatkowski et al., 1999].

1.2.3 Chemische Kopplung von DNA an Oberflächen

Durch die patentrechtliche Situation ist die photolithografische Herstellung von Mikroarrays mit sehr hoher Spotdichte stark limitiert. Infolgedessen wurden alternative Spotting-Techniken entwickelt. Ein Beispiel für Geräte, die mit dem Kontaktverfahren arbeiten, kann der FLEXARRAYER (Sciencion, Berlin) genannt werden. Das kontaktlose Spotten wird beispielsweise vom TopSpot /M (HSG IMIT/IMTEK, Freiburg) eingesetzt. Darüber hinaus sind weitere Geräte kommerziell verfügbar [Heise, 2004; Schena et al., 1998].

Um DNA chemisch an Oberflächen zu binden, sind derzeit verschiedene Verfahren bekannt [Heise, 2004]. Zum einen werden nicht nur Glasoberflächen verwendet, sondern u.a. auch Nylonmembranen [Saiki et al., 1989], Polyacrylamid [Mitra and Church, 1999] oder Polysteren [Nikiforov and Rogers, 1995]. Glas hat jedoch einige Vorteile gegenüber

anderen Materialien, die seinen Einsatz attraktiv machen: Es ist undurchlässig für Flüssigkeiten, es verhält sich stabil gegenüber vielen Chemikalien und hohen Temperaturen, es hat eine geringe Eigenfluoreszenz und ist relativ preiswert. Die Glasoberfläche lässt sich für Kopplungsreaktionen einfach modifizieren. Prinzipiell kann man zwischen Methoden unterscheiden, bei denen die zu bindenden Moleküle modifiziert werden oder bei denen die Oberfläche aktiviert wird (siehe auch Tabelle 1.4).

Die DNA-Kopplung an Oberflächen ist sowohl kovalent als auch affin möglich. Als Beispiel für eine kovalente Bindung ist in Abbildung 1.12 der Reaktionsablauf von 1-Ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimid (EDC) und Methylimidazol dargestellt. Dabei werden die Phosphatgruppen der DNA mit EDC aktiviert, um an eine aminosilanisierte Oberfläche binden zu können. Die Anwendung von Carbodiimiden zur Aktivierung ist bereits länger bekannt [Livnah et al., 1982; Ghosh and Musso, 1987] und wird vorwiegend zur Immobilisierung von Oligonukleotiden verwendet [Adessi et al., 2000].

Die Avidin-Biotin-Bindung ist eine stärksten bekannten affinen Bindungen (K_D von 10^{-15} mol/l [Lottspeich and Zorbas, 1998]). Dank dieser hohen Bindungskonstanten kann man biotinylierte DNA an mit Avidin beschichtete Flächen binden. Avidin ist ein 66.000 Dalton großes Glykoprotein, das aus Hühnereiweiß gewonnen wird und einen isoelektrischen Punkt (IP) von 10,5 aufweist [Livnah et al., 1993]. Durch diese positive Ladung und die Oligonukleotidreste kann es jedoch bei der Immobilisierung von negativ geladener DNA häufig zu unspezifischen Hintergrundsignalen kommen. Das deglykolierte Streptavidin, das aus Bakterien gewonnen wird, hat hingegen einen fast neutralen IP und zeigt deswegen weniger unspezifische Bindung als Avidin. Allerdings dissoziiert Streptavidin bis zu 30mal schneller von Biotin als Avidin [Piran and Riordan, 1990]. NeutrAvidin ist wie Streptavidin nicht glykolisiert und weist einen IP von 6,3 auf. Alle drei Proteine haben jeweils vier Bindungsstellen für Biotin. Zur Kopplung markiert man DNA mit Biotin und tropft sie beispielsweise eine mit Avidin beschichtete Oberfläche.

Um die Effizienz von Bindungen zu erhöhen und sterische Hinderungen zu vermeiden, kann die Oberfläche beispielsweise durch den Einsatz von Linker-Molekülen [Southern et al., 1999] und die Schaffung dreidimensionaler Strukturen modifiziert werden. U.a. werden Poly-T- oder Polyglykolketten verwendet; Benters et al. [2002] nutzen die Eigenschaft von Polyamidoamin (PAMAM), dendrimerische Strukturen auszubilden und so weitere freie Bindungsstellen zu schaffen. Einen anderen Ansatz zur besseren DNA-Kopplung verfolgen Sosnowski et al. [1997]: Durch Anlegen elektrischer Spannung wird das negativ geladene Molekül DNA an den Ort der Bindung transportiert und dort angereichert. Das beschleunigt die Biotin/Streptavidin-Kopplung.

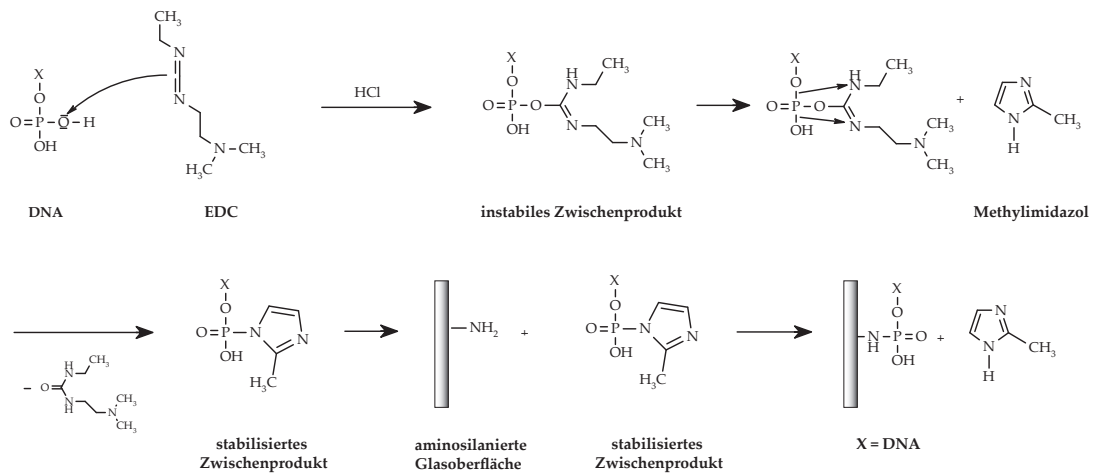


Abbildung 1.12: Ein Verfahren zur kovalenten Kopplung von aktivierter DNA an Glasoberflächen. EDC-Methylimidazol-Reaktion: Beim ersten Schritt erfolgt ein elektrophiler Angriff des EDC auf die Hydroxylgruppe des DNA-Phosphatrests. Das entstehende instabile Zwischenprodukt hydrolysiert leicht und wird durch Zugabe von Methylimidazol stabilisiert. Anschließend kann man die so aktivierte DNA spotten. Es findet eine kovalente Bindung an Aminogruppen der silanisierten Glasoberfläche statt, die in einer festen Phosphoramidbindung resultiert (modifiziert nach Heise [2004]).

Funktionelle Gruppe auf dem Chip	Funktionelle Gruppe am Oligonukleotid	Referenz oder Firma
primäres Amin	keine	ArrayIt™, TeleChem Int., Inc.
primäres Amin	Carbonsäure	Joos et al. [1997]
Aldehyd	Amino	ArrayIt™, w.o.
Epoxid	Amino	Maskos and Southern [1992]; Lamture et al. [1994]
Isothiocyanat	Amino	Guo et al. [1994]
N-Hydroxysuccinimidyl-Ester	Amino	Beier and Hoheisel [1999]
Imidoester	Amino	Beier and Hoheisel [1999]
Thiol	Disulfid	Kumar et al. [2000]
Ohne Aktivierung	Silan	Rogers et al. [1999]
Diazonium-Ion	Ohne	Dolan et al. [2001]
reaktives Amin, 3D ¹	Amino	Motorola Life Sciences
Thiol, 3D ¹	Acrylamid	EZ-RAYS™

Tabelle 1.4: Übersicht über einige kovalente Kopplungsmethoden an Glasoberflächen. ¹ Nach Angaben des Herstellers weist die Glasoberfläche dreidimensionale Strukturen auf, um mehr Bindungsstellen für die Oligonukleotide zu schaffen. Genauere Informationen über die Oberflächenchemie ist nicht verfügbar.

1.2.4 SNP-Analyse mit Mikroarrays

Folgt man der Logik des modularen Aufbaus von SNP-Analysenmethoden, so sind Mikroarrays lediglich ein Format, auf dem die Analyse durchgeführt wird. Demzufolge gibt es zahlreiche Ansätze, bei denen mit Hilfe von DNA-Chips Polymorphismen untersucht werden.

Mikroarrays im high-density-Format

Das vorgestellte photolithografische Verfahren von Fodor [1991] wird schon seit einigen Jahren zur Herstellung von high-density SNP-Mikroarrays verwendet [Lipshutz et al., 1999]. Direkt auf den Chips werden ca. 20 Nukleotiden lange Oligonukleotide synthetisiert. Pro SNP befinden sich mehrere Sonden auf dem Array, die sich nur in der relevanten Base unterscheiden, die sie an zentraler Stelle tragen. An die Sonden werden in einem langen, statischen Prozess fluoreszenzmarkierte PCR-Produkte hybridisiert. Die auftretenden Allele können durch anschließenden Vergleich der Fluoreszenzsignalstärke analysiert werden. Durch die hohe Dichte der einzelnen Oligonukleotide auf dem Chip - mehrere hunderttausend sind möglich - erhält man spezifische Hybridisierungsmuster, die die parallele Analyse mehrerer tausend SNPs erlauben [Matsuzaki et al., 2004; Kennedy et al., 2003; Fan et al., 2002; Schubert et al., 2002; Cutler et al., 2001; Lindblad-Toh et al., 2000; Cargill et al., 1999; Hacia et al., 1999; Wang et al., 1998]. Allerdings handelt es sich dabei um ein relativ statisches System, da die zu untersuchenden Polymorphismen bereits festgelegt sind. Um die Durchführung tausender PCRs zu vermeiden, um spezifische Produkte für die Hybridisierung zu gewinnen, verwenden viele GeneChip-Anwender den „whole genome sampling analysis“ (WGSA)-Ansatz von Affymetrix. Matsuzaki et al. [2004] und Kennedy et al. [2003] berichteten über diese Methode: Ca. 20 μg genomische DNA wird durch ein Restriktionsenzym (*Xba*I, *Eco*RI oder *Bgl*II) verdaut. Anschließend werden spezifische Adaptoren an die sticky-ends ligiert, die später als Annealing-Sequenz für PCR-Primer dienen. Nach der PCR wird die Mischung auf dem GeneChip an Oligonukleotiden hybridisiert. Damit können zwar mehr als 11.000 SNPs pro Chip analysiert werden, allerdings nur vom Genom eines Patienten.

Eine weitere Methode, um hochdichte Oligonukleotid-Mikroarrays herzustellen, wurde an der Tufts University (Medford, MA, USA) entwickelt [Epstein et al., 2003b; Epstein and Walt, 2003; Epstein et al., 2003a]. Das Methodenprinzip unterscheidet sich vor allem in der Herstellung der Mikroarrays. Vorsynthetisierte Oligonukleotide, die an Beads gebunden sind, werden mit Hilfe eines Faserbündels aus einer Mischung „heraus gefischt“. Das Faserbündel enthält bis zu 5 Millionen Fasern, die zusammengeklebt sind und deren Enden angeätzt sind. Die Beads ordnen sich in den Vertiefungen der einzelnen Fasern an. Durch Beschichtung mit unterschiedlichen Oligonukleotiden entsteht ein dichtes Array am Ende des Faserbündels. Werden mehrere solcher Bündel auf Plastik im Mikrotiterplattenformat angeordnet oder als Strukturen auf geätzten Oberflächen von Mikroskop-Glasträgern angeboten, erhält man einen „Array of Arrays“

Die zufällige Verteilung der an den Beads gebundenen Oligonukleotide kann durch mehrere, nacheinander durchgeführte Kontrollhybridisierungen mit fluoreszenzmarkierten Sonden aufgeklärt werden [Epstein et al., 2003a]. Die eigentliche Diskriminierungsreaktion findet jedoch nicht am Faserbündel oder auf dem Mikroarray statt. Es wird eine

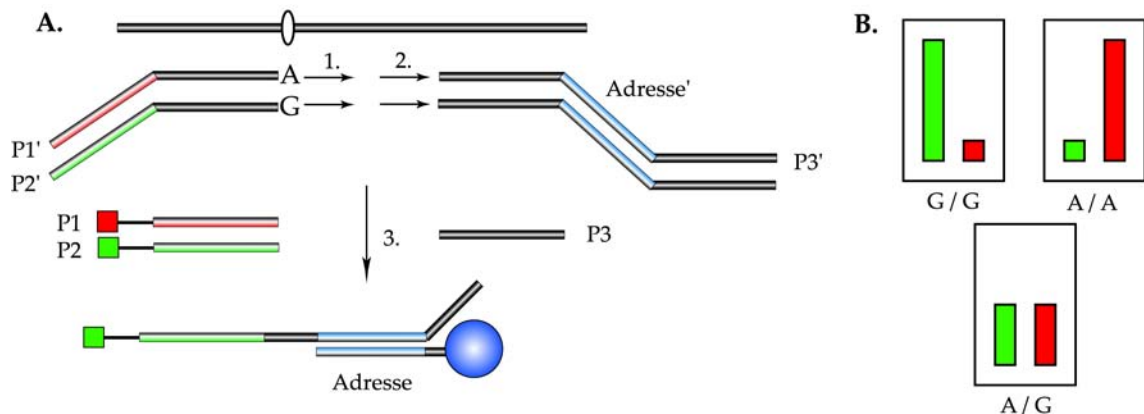


Abbildung 1.13: Überblick über die SNP-Analyse mit der BeadArray-Technologie. **A.** An genomischer DNA werden allel-spezifische Primer hybridisiert. Mit Hilfe einer Polymerase wird der Primer verlängert und danach das Produkt mit einem anderen, locus-spezifischen Primer ligiert, der ebenfalls komplementär zum Template-Strang ist und eine spezifische Adress-Sequenz trägt. Nach anschließender Amplifikation mit spezifischen Primern (fluoreszenzmarkiert P1, P2) und einem unspezifischen (P3) werden die Amplifikate an den Oligonukleotiden des BeadArray hybridisiert [Shen et al., 2003]. **B.** Auslesen des vorliegenden Genotyps.

spezifische Primerverlängerung an genomischer DNA, eine Ligation an universelle Adaptoren und eine Amplifikation der Fragmente durchgeführt [Shen et al., 2003; Oliphant et al., 2002]. Die Golden Gate Assay genannte Methode ist in Abbildung 1.13 dargestellt. Pro SNP werden drei Primer benötigt, die sowohl allel- bzw. locus-spezifische als auch universelle Sequenzen tragen. Sie werden mit der genomischen DNA gemischt, wobei die allel-spezifischen Primer nur bei Vorliegen eines full-Match-Hybrids verlängert werden. Die Verlängerung erfolgt bis zum 5'-Ende des locus-spezifischen Primers, mit dem anschließend die Ligation stattfindet. Nach Amplifikation werden die adressierten, fluoreszenzmarkierten Fragmente an den Oligonukleotid-Beads eines Arrays hybridisiert und mit einem hochauflösendem Scanner ausgelesen. Durch die Kenntnis der DNA-Sequenz an bestimmten Beads kann man das Signal einem SNP zuordnen und so den Genotyp bestimmen [Epstein et al., 2003a].

Ein sehr flexibles System für die Hochdurchsatz-SNP-Analyse bietet Illumina mit seinem BeadArray™-System an (siehe Tabelle 1.3, S. 19).

Minisequencing auf Mikroarrays

Das Minisequencing im Mikroarray-Format kombiniert mit Fluoreszenzdetektion wird in der Literatur in verschiedenen Ansätzen beschrieben [Syvänen, 1999]. Zum einen kann sowohl das eigentliche Minisequencing als auch die Detektion an Oberflächen ablaufen (Arrayed Primer Extension - APEX). Andererseits ist es möglich, das Minisequencing in Lösung durchzuführen und anschließend die SNPs auf einem Oligonukleotid-Chip zu analysieren (Tag-Array). Eine dritte Variante ist die Hybridisierung eines Primers und dessen Verlängerung, wobei mehr als eine Base eingebaut wird (allel-specific primer extension).

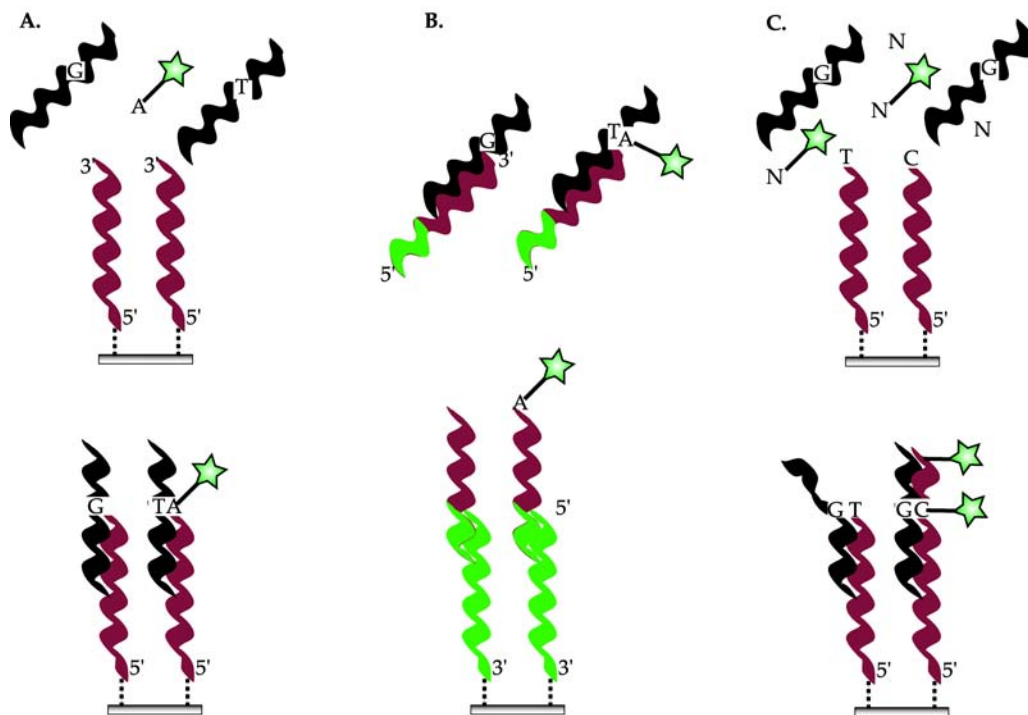


Abbildung 1.14: Minisequencing auf Mikroarrays A. Minisequencing an immobilisierten Oligonukleotiden (APEX) B. Minisequencing an Tag-Arrays C. Allel-spezifische Primerverlängerung um mehr als eine Base. Modifiziert nach Lindroos [2002]

In Abbildung 1.14 ist die erste Minisequencing-Variante unter A. schematisch dargestellt. Oligonukleotide werden auf Mikroarrays immobilisiert, deren Sequenz exakt bis zu einem Polymorphismus reicht. An ihnen hybridisieren PCR-Produkte, sodass sich in direkter Nachbarschaft des 3'-Endes des Oligonukleotids der SNP befindet. Anschließend wird der Primer um genau ein Nukleotid verlängert, da man markierte ddNTPs verwendet. Durch den eingebauten Farbstoff erhält man die entsprechende Sequenzinformation (APEX [Shumaker et al., 1996]). Vorteilhaft ist, dass im Gegensatz zu Hybridisierungsansätzen hier nur jeweils ein Oligonukleotid nötig ist, um SNPs zu genotypisieren. Zusätzlich haben direkte Vergleiche beider Methoden gezeigt, dass das Minisequencing bis zu zehnmal genauer Polymorphismen analysieren kann [Pastinen et al., 1997]. Problematisch sind jedoch Hairpin-Strukturen oder Loops der Oligonukleotide, die zu falsch positiven Signalen führen können, indem sie gleichzeitig als Primer und als template-

DNA fungieren. Zusätzlich kann die 5'-Nucleaseaktivität der Polymerase zur Entfernung der Endbasen des Primers und somit zum Einbau falscher Nukleotide führen [Nikiforov et al., 1994].

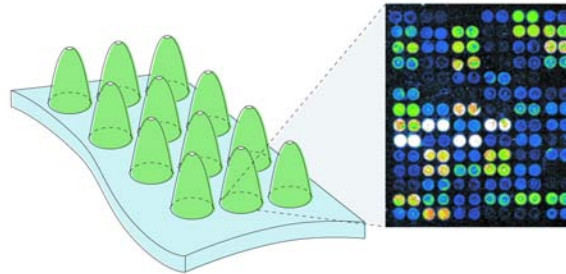


Abbildung 1.15: Mini-Kompartimente auf einem Glas-Chip. Die konisch zulaufenden Kompartimente erlauben die Hybridisierung von Proben unterschiedlicher Patienten oder Herkunft auf einem Chip. Jeder kleine Array beinhaltet ein Primerset für die SNP-Analyse. Bis zu 80 Arrays finden auf einen Glaträger Platz. (modifiziert nach Syvänen [2001]).

Bei der zweiten, weitaus flexibleren Minisequencing-Methode werden so genannte Tag-Oligonukleotide an Oberflächen gekoppelt; die eigentliche Minisequencing-Reaktion wird jedoch extern, d.h. nicht auf dem Mikroarray durchgeführt (Abbildung 1.14, B.). Mehrere Minisequencing-Reaktionen werden parallel in einem Ansatz verarbeitet, anschließend werden die Produkte an dem immobilisierten „Fänger“-Oligonukleotid hybridisiert. Da die zu verlängernden Primer an ihrem 5'-Ende eine universelle Tag-Sequenz tragen, die komplementär zu einem „anti-tag“ des Oligonukleotids ist, sind die jeweiligen SNPs eindeutig adressierbar [Fan et al., 2000; Hirschhorn et al., 2000]. Außerdem sind die immobilisierten Oligonukleotide für viele verschiedene SNP-Analysen verwendbar, da die Tag-Sequenz unabhängig von der SNP-Sequenz ist.

Bei der dritten Methode des Minisequencing an Oberflächen werden zwei am 5'-Ende immobilisierte Primer verwendet (siehe Abbildung 1.14, C.). Die Oligonukleotidsequenz ist so ausgewählt, dass bei Hybridisierung von PCR-Produkten die Primer direkt im SNP enden. Die ebenfalls zugegebene Polymerase verlängert nur dann den Strang, wenn ein full-Match vorliegt. Vorteilhaft ist hier, dass die Reaktion mit markierten ddNTPs gleicher Konzentration [Dubiley et al., 1999] oder mit einem gelabelten ddNTP und drei nicht markierten Nukleotiden [Erdogan et al., 2001] durchgeführt werden kann.

Durch die Verwendung von Mini-Kompartimenten ist die parallele Bestimmung mehrerer PCR-Produkte oder PCR-Produkte unterschiedlicher Patienten möglich. Dazu wird die Rückseite einer Mikrotiterplatte mit Silikon ausgegossen. Das ausgehärtete Silikon kann so auf einen Glaträger aufgesetzt werden, dass sich die Öffnung genau über einem Array befindet (siehe Abbildung 1.15). Auf diese Weise kann in jedem der bis zu 80 Arrays eines Glaträgers beispielsweise ein Patient auf mehrere SNPs hin untersucht werden („Array of array“ [Pastinen et al., 2000], persönliche Kommunikation). Beispielsweise untersuchten Liljedahl et al. [2003] 74 SNPs für die Erstellung eines pharmakogenetischen Profils von 97 Patienten. Ähnlich gestaltete „Arrays of arrays“ sind auch als kommerzielles Produkt SNPstream[®] von Beckman Coulter verfügbar (siehe Firmenübersicht, Tabelle 1.3, S. 19).

NanoChip[®] Electronic Microarray

Ein Nachteil von Oligonukleotid-Chips wie die von Illumina und Affymetrix ist, dass fluoreszenzmarkierte DNA nur in passiver Art und Weise an immobilisierte Oligonukleotide hybridisiert wird. Es werden zwar optimierte Puffersysteme und Temperaturprogramme verwendet, die Hybridisierung erfolgt jedoch in einem statischen System, da keine Durchmischung der Lösungen stattfindet. Damit ist die Bindungsgeschwindigkeit abhängig vom langsamen Diffusionsprozess; die Hybridisierungseffizienz ist dementsprechend gering [Edman et al., 1997].

Die Nanochip[™] Molecular Biology Workstation (Nanogen[™], Dänemark) löst dieses Problem zum einen durch die gezielte elektronische Adressierung der zu immobilisierenden Oligonukleotide sowie die Steuerung der anschließenden Hybridisierung durch ein elektrisches Feld. Ein Silizium-Mikrochip, dessen Oberfläche durch einzeln steuerbare Platin-Elektroden strukturiert ist und mit Streptavidin beschichtet wurde, ist in eine Kartusche eingebaut. Dadurch kann die Oberfläche mit Oligonukleotid- oder Puffer-Lösungen überspült werden. Zur Steuerung der DNA-Immobilisierung schaltet man die Elektroden negativ oder positiv. So können negativ geladene Moleküle wie DNA präzise an bestimmten Punkten, den Elektroden, lokalisiert werden. Wird die entsprechende Elektrode neutral geschaltet, binden biotinylierte Moleküle an die Streptavidinschicht. Alle anderen Moleküle können danach restlos entfernt werden. Auf diese Art lassen sich DNA-Arrays an der Chipoberfläche aufbauen [Sosnowski et al., 1997]. Anschließend wird einzelsträngige DNA über den Array gespült, die an den immobilisierten, komplementären Strängen hybridisiert. Die Diskriminierung von full- und mis-Match-Hybriden wird durch Anlegen eines gepulsten elektrischen Feldes erreicht, parallel dazu wird mit einem zwitterionischem Puffer mit geringer Ionenstärke [Edman et al., 1997] gespült. Dadurch dissoziiert das mis-Match-Hybrid sehr viel schneller als das full-Match-Hybrid. Innerhalb von knapp 60 Sekunden ist die Diskriminierung abgeschlossen. Zum Vergleich: Ein Hybridisierungsversuch an Affymetrix-Chips wird meist über mehrere Stunden durchgeführt.

Neben der Genotypisierung von SNPs [Sethi et al., 2004] lässt sich der Chip auch für das Screening nach unbekanntem Polymorphismen einsetzen. Behrens et al. [2002] berichten über die Verwendung von Cy5-markiertem mutS-Enzym, das spezifisch an mis-Match-Doppelstränge bindet und so Einzelpunktmutationen detektiert.

1.2.5 Fluoreszenz-Detektion

Eine der wohl am häufigsten verwendeten Detektionsmethoden bei SNP-Analysen ist die Fluoreszenzdetektion. Sie hat die früher häufig verwendete und auch heute noch gebräuchliche Radioisotopen-Markierung [Southern et al., 1992] größtenteils abgelöst. Vor allem aber kann man bei ihr die Verwendung von radioaktiven Substanzen vermeiden.

Fluoreszenz ist eine Form der Lumineszenz von gasförmigen, flüssigen oder festen anorganischen sowie organischen Verbindungen. Charakteristisch ist, dass fluoreszierende Moleküle innerhalb von 10^{-10} bis 10^{-7} Sekunden nach der Anregung (durch Einwirkung von sichtbarem oder ultraviolettem Licht bzw. Röntgen- oder Elektronenstrahlen) die absorbierte Energie in Form von Strahlung gleicher (Resonanz-Fluoreszenz), längerer

(Stokessche Regel) oder kürzerer Wellenlänge wieder abgeben. Eine schematische Darstellung der Übergänge zwischen Grund-, Singulett- u. Triplett-Zustand anhand eines sogenannten Jablonski-Termschemas findet sich in Abbildung 1.16. Liegt die emittierte Strahlung im oder nahe dem sichtbaren Bereich des Spektrums, so spricht man von optischen Fluoreszenz zum Unterschied zur UV- oder Röntgenfluoreszenz [Falbe and Regitz, 1996].

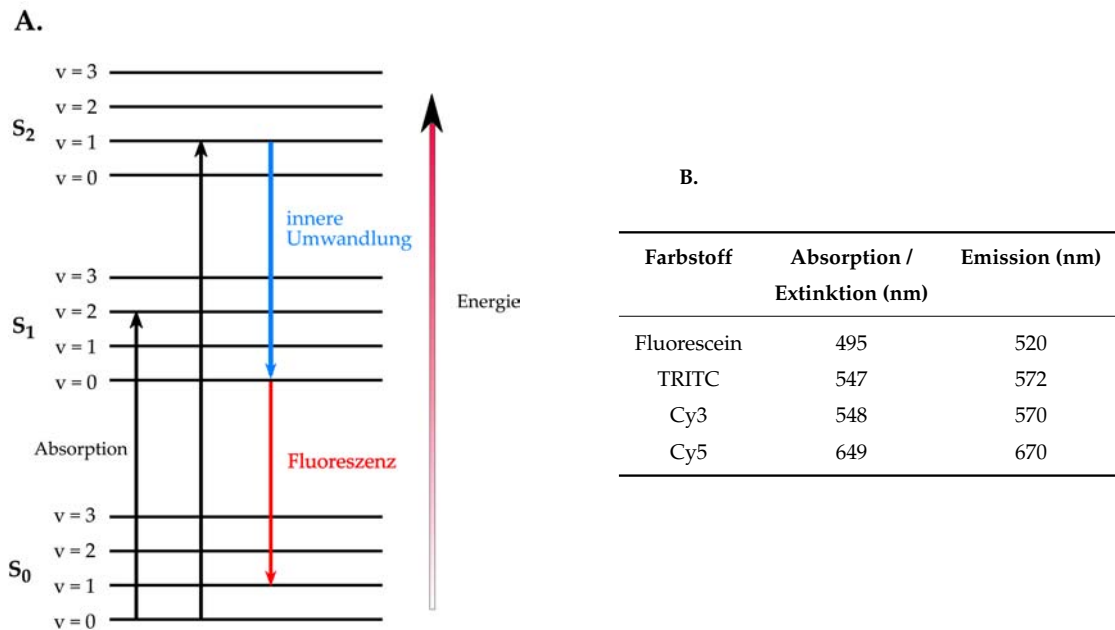


Abbildung 1.16: A. Termschema eines Moleküls mit möglichen Übergängen (Jablonski-Diagramm). S_0 Singulett-Grundzustand, S_1 erster angeregter Singulettzustand, S_2 zweiter angeregter Singulettzustand, v Schwingungsniveaus. B. Übersicht über einige gängige Fluoreszenzfarbstoffe und deren Absorptions- bzw. Emissionswellenlängen.

Für die SNP-Analyse können beispielsweise interkalierende Fluoreszenz-Farbstoffe (SybrGreenI, Ethidiumbromid) zur Detektion von DNA-Doppelsträngen verwendet werden. Ebenso ist die direkte Markierung von DNA durch kovalente Bindung an das 5'- oder 3'-Ende eines Einzelstranges möglich, die bei Hybridisierungs-Experimenten verwendet wird. Man kann die optische Fluoreszenz mit Hilfe von spektroskopischen Geräten messen. Will man die Fluoreszenzintensität von auf Mikroarrays gekoppelten Molekülen messen, kann man als anregende Lichtquelle Laser mit entsprechenden Wellenlängen oder Weißlichtquellen mit Filtersätzen verwenden. Neuere Mikroarray-Scanner verfügen beispielsweise über Laser mit vier verschiedenen Wellenlängen oder mehreren Filtersätzen, die die parallele Detektion unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe erlauben. Häufig eingesetzte Fluoreszenzfarbstoffe sind z.B. Fluorescein, Cy5, Cy3 (siehe Abbildung 1.16, B.)

1.3 Sulfotransferase SULT1A1

Als Modellpolymorphismus für die Methodenentwicklung dieser Arbeit wurde ein SNP im Gen der humanen Sulfotransferase SULT1A1 ausgewählt. Das Gen des Enzyms liegt auf Chromosom 16 (GenMap Lokus 16p12.1-p11.2) und umfasst acht Exons [Raftogianis et al., 1997]. Der Nukleotidaustausch G638A im Exon 7 des kodierenden Gens der SULT1A1 führt zu einem Aminosäureaustausch von Arginin₂₁₃ zu Histidin₂₁₃. Die Nomenklatur der im SULT1A1-Gen auftretenden Variationen ist in Tabelle 1.5 aufgeführt. Im nachfolgenden Text werden die verwendeten Varianten SULT1A1*1 als Wildtyp und SULT1A1*2 als Mutante bezeichnet. Es stellt sich die Frage, welche Konsequenzen dieser Austausch nach sich zieht und welche Rolle dieser Polymorphismus hinsichtlich der Anfälligkeit für bestimmte Krankheiten spielt.

Isoform	Allozym	Nucleotid-austausch	Aminosäure-austausch	Allel-Häufigkeit
SULT1A1	*1	G638	-	0,674 ^{a,b}
	*2	G638→A638	Arg ₂₁₃ His	0,313 ^{a,b}
	*3	A667→G667	Met ₂₂₃ Val	0,010 ^a
	*4	G110→A100	Arg ₃₇ Gln	0,003 ^a

Tabelle 1.5: Allozyme der humanen Sulfotransferase SULT1A1 [Coughtrie, 2002] (Allel-Häufigkeit bei Kauasiern:

^a nach Sequenzierung von 150 zufällig ausgewählten Blutspendern [Raftogianis et al., 1999],

^b nach PCR-RFLP [Coughtrie et al., 1999])

Die humane cytosolische, phenolische Sulfotransferase SULT1A1 gehört zur Superfamilie der SULTs [Coughtrie, 2002] und gehört zu den wohl am besten studierten polymorphen Sulfotransferasen. Diese Enzyme katalysieren die Sulfonierung durch den Transport einer elektrophilen Sulfatgruppe von einer biologisch aktiven, anorganischen Sulfatform, 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat (PAPS) auf nucleophile Substrate [Coughtrie and Johnston, 2001; Gamage et al., 2003]. In Abbildung 1.17, A. ist beispielhaft dargestellt, wie aktiviertes Sulfat durch Sulfotransferasen auf ein phenolisches Substrat, hier Paracetamol, übertragen wird.

SULT1A1 hat aufgrund seiner breiten Substratspezifität, seines Vorkommens in vielen Geweben und seiner Rolle bei der Phase II Metabolisierung und Detoxifikation vieler Arzneimittel und anderer Xenobiotika als auch bei der Bioaktivierung von Prokarzinogenen aus Nahrungsmitteln und aus der Umwelt [Glatt et al., 2000, 2001] eine große Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass das Auftreten eines Polymorphismus die thermische Stabilität des Enzyms beeinflusst [van Loon and Weinshilboum, 1984], da schon leichte Änderungen in der Aminosäuresequenz zu Unterschieden führen. Raftogianis et al. [1997] konnten bestätigen, dass die Enzymaktivität und die thermische Stabilität des Enzyms mit dem Genotyp assoziiert ist [Raftogianis et al., 1999]. Allerdings steht der direkte Beweis noch aus, wie der Aminosäureaustausch (Arg₂₁₃His) der Variante SULT1A1*2 zu einer geringeren Enzymaktivität, Proteinexpression und thermischen Stabilität im Vergleich mit der SULT1A1*1-Variante führen kann [Coughtrie, 2002]. Sicher scheint jedoch, dass SULT1A1 wichtig ist für die Detoxifikation von Xenobiotika,

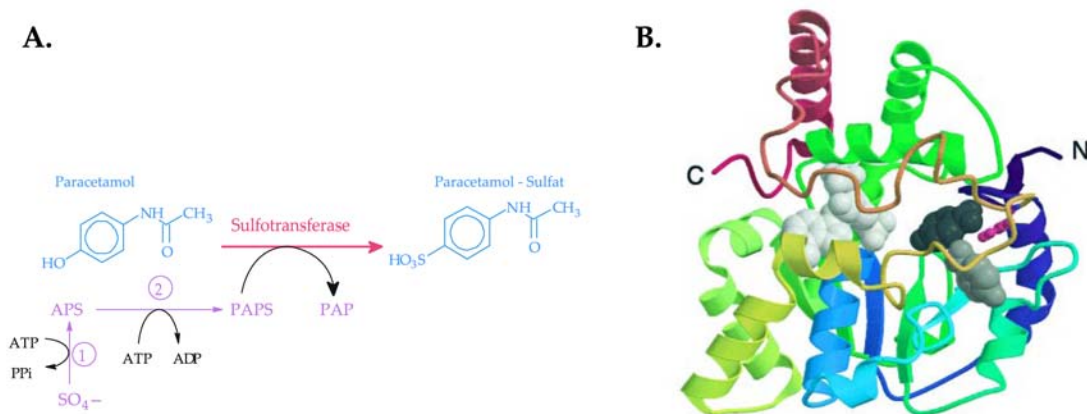


Abbildung 1.17: A. Sulfotransferasereaktion am Beispiel von Paracetamol und Cosubstrat-Synthese. Die Sulfotransferasereaktion hängt vom Cosubstrat PAPS als Schwefellieferant ab. PAPS wird aus anorganischem Sulfat und zwei Molekülen ATP gebildet (modifiziert nach Coughtrie [2002]). B. Kristallstruktur von SULT1A1 (modifiziert nach Gamage et al. [2003]).

für den Thyroid-Hormon Metabolismus [Kester et al., 1999] und die Bioaktivierung von Prokarzinogenen [Glatt et al., 2000]. Außerdem wurden die im Gen auftretenden Polymorphismen im Zusammenhang mit unterschiedlichen Krebserkrankungen untersucht wie z.B. mit Blasenkrebs [Zheng et al., 2003], colorektaler Adenomas bei älteren Australiern [Wong et al., 2002] und Rauchern [Tiemersma et al., 2004], dem esophagenalen Krebs bei Männern [Wu et al., 2003], Brustkrebs [Nowell et al., 2002] oder Lungenkrebs [Wang et al., 2002]. Bemerkenswert ist die Abhängigkeit des SULT1A1-Genotyps vom Alter. So zeigten Coughtrie et al. [1999], dass mit zunehmenden Alter der Anteil an *1-Variante zunimmt und der *2-Genotyp abnimmt. In ihrer Studie stellten Bamber et al. [2001] fest, dass Patienten mit dem SULT1A1*1-Genotyp unter Berücksichtigung des Alters ein reduziertes Risiko haben, an colorektalem Krebs zu erkranken.

Für jede bisherige Untersuchung des SULT1A1-Genotyps wurden die Restriktionschnittstellen-Analyse (PCR-RFLP-Assay) eingesetzt [Coughtrie et al., 1999; Ozawa et al., 1999; Engelke et al., 2000; Bamber et al., 2001; Carlini et al., 2001; Wong et al., 2002; Nowell et al., 2002; Wang et al., 2002; Zheng et al., 2003; Wu et al., 2003; Tiemersma et al., 2004], lediglich zur Aufklärung unbekannter SNPs wurde sequenziert [Raftogianis et al., 1997, 1999; Ozawa et al., 1998]. Dies zeigt, dass bisher ein serieller Analysenansatz verfolgt wurde. Für die Untersuchung von Allel-Häufigkeiten ist jedoch die schnellere Analyse von vielen Patienten auf nur einen Polymorphismus wünschenswert, um Zeit und Kosten zu sparen und somit größere Gruppen als bisher untersuchen zu können.

1.4 Der Adiponectin-Promotor

An einer zweiten, größeren Patientengruppe soll der Polymorphismus 11391 (siehe Tabelle 1.6) im Gen des humanen Adiponectin-Promotors untersucht werden.

Adiponectin (Acrp30) ist ein ausschließlich in adipösem Gewebe exprimiertes, sekretori-

sches Protein, das durch das Gen APM1 kodiert ist [Scherer et al., 1995]. Adipöses Gewebe spielt eine wichtige Rolle sowohl bei Lipidstoffwechsel und -speicherung als auch bei der Glukose-Homöostase. Neben Adiponectin exprimieren Adipocyten auch viele anderen Proteine wie Fettsäuren-bindende Proteine, Lipoproteinproteasen oder Fettsäuresynthetasen [Das et al., 2001]. Außerdem werden in diesem Gewebe auch Moleküle mit immunologischen Funktionen wie der Tumor Necrosis Faktor alpha (TNF α) [Hotamisligil et al., 1993] und Zytokine [Fried et al., 1998] sowie Polypeptide wie Resistin oder Leptin [Zhang et al., 1994] synthetisiert und ausgeschüttet. Das Auftreten dieser Verbindungen beeinflusst die Entwicklung einer Insulinresistenz, was wiederum das Risiko erhöht, an Diabetes-Typ-II zu erkranken [Vasseur et al., 2002].

Bisher weiß man wenig über die mutmaßlichen adipocyten-spezifischen, sekretorischen Proteine, die fettleibige Patienten vor einer frühen Entwicklung von Diabetes Typ II schützen können. Dass dies möglich ist, legen Tierversuche nahe: Bei fettleibigen Mäusen konnte eine verringerte Adiponectin-Expression mit einer Insulinresistenz korreliert werden. In einem anschließenden Versuch behandelte man die Mäuse mit rekombinatem ACRP30, wodurch eine vorbestehende Insulinresistenz gebessert werden konnte. [Yamauchi et al., 2001]. Spranger et al. [2003] fanden eine niedrigere Adiponectin-Konzentration in Plasma von späteren Diabetes-Typ-II-Patienten als in einer Kontrollgruppe. Sie schlossen daraus, dass erhöhte Adiponectin-Konzentrationen stark und unabhängig mit einem reduziertem Risiko für gesunde Patienten assoziiert ist, an Diabetes-Typ-II zu erkranken.

APM1 befindet sich auf dem Chromosom 3q27 [Kissebah et al., 2000]. Bisher sind zahlreiche Polymorphismen in diesem Gen gefunden worden. Hara et al. [2002] beschrieben 10 SNPs, von denen man zwei mit einem erhöhtem Risiko assoziierte, an Diabetes Typ II zu erkranken. In einer Studie mit mehr als 1300 Patienten genotypisierten Vasseur et al. [2002] 10 SNPs im APM1-Gen. Die dort ermittelten Allel- und Genotyp-Häufigkeiten von drei der 10 Polymorphismen sind in Tabelle 1.6 aufgeführt. Man erkennt deutliche Unterschiede zwischen Diabetes-Typ- II-Patienten und der Kontrollgruppe, was einen Einfluss der Polymorphismen vermuten lässt.

Polymorphismus	Genotypen			Allele	
	AA	AG	GG	A	G
11426					
T2D	83,7	15,8	0,5	91,6	8,4
NDM	85,4	13,9	0,7	92,3	7,7
11391					
T2D	80,6	17,9	1,5	89,6	10,4
NDM	83,9	15,4	0,7	91,6	8,4
11377					
T2D	48,4	44,2	7,4	70,5	29,5
NDM	55,3	38,2	6,5	74,4	25,6

Tabelle 1.6: Prozentuale Verteilung der Genotypen und Allele von drei SNPs im APM1-Gen bei Diabetes Typ II-Patienten (T2D) und einer Kontrollgruppe (NDM) [Vasseur et al., 2002].

1.5 SNP-Analyse mit Hilfe kinetischer Parameter

Die Fülle unterschiedlicher SNP-Genotypisierungsverfahren zeigt, dass es keine universelle bzw. ideale Methode gibt, die jedem Analysenproblem gerecht wird. Das beste oder optimale Verfahren gibt es nicht oder es wurde bisher noch nicht entwickelt. Einige häufig verwendete Methoden sowie ihre Vor- und Nachteile wurden in den vorhergehenden Abschnitten detailliert vorgestellt. Besonders Mikroarray-Technologien verfolgen einen parallelen Ansatz, allerdings sind die meisten Verfahren auf die Analyse von vielen Polymorphismen eines Patienten mit Hilfe von Oligonukleotid-Chips (Affymetrix, Febit, Illumina, NanoChip) beschränkt.

1.5.1 Prinzip der Methode

In dieser Arbeit wird nun eine alternative Methode vorgestellt, die in einer Patientengruppe die Analyse eines Polymorphismus mit bekannter Sequenz und Lage erlaubt. Dabei liegt das Augenmerk der Anwendung nicht auf einem hohem Probendurchsatz sondern vielmehr auf der Analyse von Gruppen mit 20 bis 100 Patienten. Dadurch unterscheidet sie sich von bereits bekannten Verfahren, die meist für einen höheren Durchsatz konzipiert sind (siehe Tabelle 1.3, S. 19). Der explizite Einsatz von auf Mikroarrays immobilisierten PCR-Produkten für die SNP-Analyse wurde bisher noch nicht beschrieben bzw. liegen keine Veröffentlichungen darüber vor.

Das Prinzip der Methode ist schematisch in Abbildung 1.18 dargestellt. Das für die Analyse eingesetzte Verfahren der Dissoziation von DNA-DNA-Hybriden findet an Glas-Oberflächen, also Mikroarrays statt. Ein Reaktionspartner ist immobilisiert, der andere frei beweglich. Dazu spottet man Arrays mit PCR-Produkten mehrerer Patienten auf Glasoberflächen. Die Analyse findet in einem Fließsystem statt, sodass während der gesamten Messung Puffer oder andere Flüssigkeiten über die gebundenen Analyten fließen können. Nachdem man den nicht gebundenen Strang des Fragments mit Natriumhydroxidlösung entfernt hat, wird eine Fluoreszenzfarbstoff-markierte Sonde zugegeben, die an der betreffenden Sequenz hybridisiert. Die Sequenz der Sonde ist so gewählt, dass sie nur am zu analysierenden Abschnitt des PCR-Produkts binden kann. Danach wird wieder mit Puffer gespült, sodass die Sonden langsam vom gebundenen Strang dissoziieren.

Um die Analyse mit Fluoreszenzfarbstoffen auf Chip-Oberflächen durchzuführen, werden am Fraunhofer Institut IBMT entwickelte Durchfluss-Biochip-Scanner verwendet.

Vorversuche zur Hybridstabilität sollen mit dem faseroptischen Affinitätssensor durchgeführt werden. Das von Frank Kleinjung etablierte Gerät wurde bereits für die Untersuchung der Immobilisierung von Oligonukleotiden und die Hybridisierung von komplementären Sonden verwendet [Kleinjung et al., 1997]. Er konnte zeigen, dass dieser Sensor sehr geringe Mengen hybridisierte DNA bis in den atto-Mol-Bereich detektieren kann und die Detektion von mis-Match-Hybriden möglich ist.

Der Aufbau und die Funktionsweise der Geräte sind ausführlich in Kapitel 2.1.6, S. 47 sowie 2.1.7, S. 48 beschrieben. Das eingesetzte Fließsystem ermöglicht es, die Fluoreszenzintensität während des gesamten Experiments online zu verfolgen, was eine kinetische Analyse des Reaktionsverlaufs zulässt.

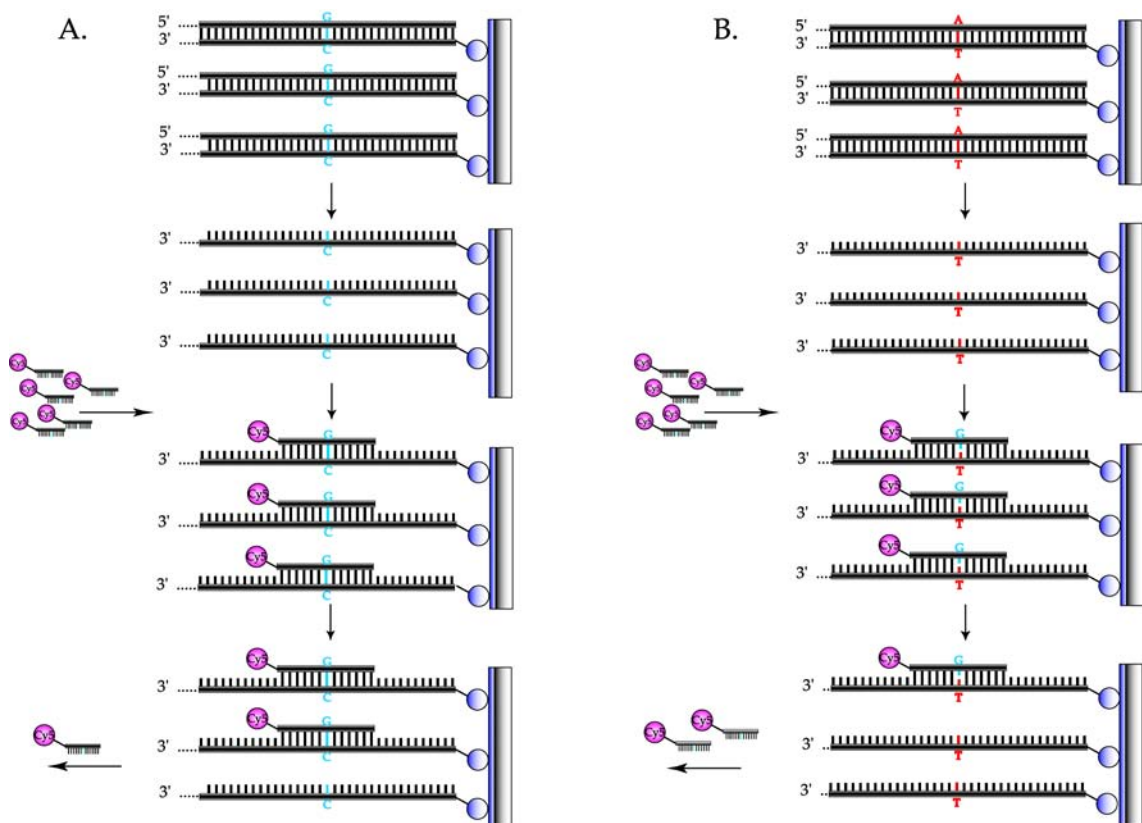
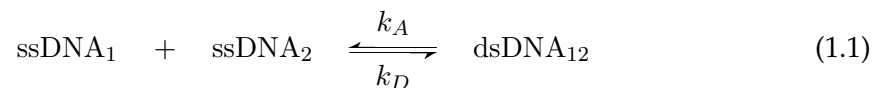


Abbildung 1.18: Prinzip der entwickelten Analysenmethode. Da die Analyse in einem Fließsystem stattfindet, kann sowohl die Hybridisierung von Fluoreszenz-Sonden als auch die anschließende Dissoziation online beobachtet werden. Bei einem fehlgepaarten Hybrid (B., mis-Match) erfolgt die Dissoziation schneller als bei einem perfekt passendem Paar (A., full-Match).

1.5.2 Kinetische Analyse

Um nun ein full-Match-Hybrid von einem mis-Match-Hybrid unterscheiden zu können, wird die Stabilität der an der Oberfläche gebildeten Hybride untersucht. Durch eine fehlgepaarte Base, bei der keine Wasserstoffbrückenbindung zwischen den Nukleotiden vorliegt, weist das Hybrid zwangsläufig eine deutlich geringere Stabilität auf als ein perfekt passendes Basenpaar. Daraus resultiert eine schnellere Dissoziation der nicht passenden Sonde vom immobilisierten DNA-Strang. Da der Biochip-Scanner die Fluoreszenzintensität jedes Spots getrennt aufnimmt, kann der Dissoziationsverlauf der gebildeten Hybride ausgewertet und miteinander verglichen werden.

Bei der Hybridisierung (Assoziation) bzw. Denaturierung (Dissoziation) von DNA ist die Konstante der Assoziation k_A und die der Dissoziation k_D ein Maß für die Geschwindigkeit der jeweiligen Reaktion (siehe Gleichung 1.1).



Üblicherweise folgt die Dissoziation eines DNA-Stranges vom anderen einer Reaktionskinetik erster Ordnung, da die Reaktionsgeschwindigkeit nur durch die Konzentration der DNA-DNA-Hybride beeinflusst wird. Dies gilt, wenn es keinerlei Beeinflussung der Dissoziation sowie des Abtransports der Einzelstränge gibt [Kleinjung, 1998]. Die Berechnung der Geschwindigkeitskonstante k_D erfolgt also über:

$$y(t) = t_0 + e^{-k_D t} \quad (1.2)$$

wobei $y(t)$ das zeitabhängige Messsignal und t die Zeit ist. Die Annahme, dass die Dissoziation von an Oberflächen gebundenen DNA-DNA-Hybriden nicht nur den einfachen Abtransport der dissoziierten Moleküle durch überströmenden Puffer umfasst, führt jedoch zu folgenden Überlegungen:

- Während der Dissoziation kann es zur Wiederbindung der Sonden an benachbarte Moleküle kommen. Aus diesem Grund kann eine einfache exponentielle Formel den Prozess der Dissoziation nur unzureichend beschreiben.
- Durch die Bindung von negativ geladener DNA an den immobilisierten Molekülen ändert sich auch die Ladung der Oberfläche. Da sich die negativ geladenen Moleküle gegenseitig abstoßen, kann die Hybridisierung der DNA durch eine hohe negative Ladung an der Oberfläche behindert werden.

Um den Einfluss dieser beiden störenden Vorgänge auf die Dissoziation zu berücksichtigen, führte Kleinjung [1998] die Wiederbindungskonstante β ein. Er definierte sie als die Wahrscheinlichkeit, mit der ein bereits dissoziiertes Molekül wieder an immobilisierte DNA zurückbindet.

Nach den Ableitungen von Kleinjung [1998] ergibt sich für die Berechnung der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_D folgende Gleichung:

$$y(t) = \frac{1 - \beta}{(1 + \beta)e^{k_D(1-\beta)(t-t_0)} - \beta} \quad (1.3)$$

Man kann zwei Extremfälle betrachten, da $0 \leq \beta < 1$ gilt. Bei der maximalen Wiederbindung der dissoziierten Moleküle an die immobilisierte DNA nähert sich β dem Wert 1. Also ergibt sich:

$$\lim_{\beta \rightarrow 1} y(t) = \frac{1}{\frac{1}{y_{max}} + k_D t} \quad (1.4)$$

Im anderen Fall mit $\beta = 0$ findet keine Wiederbindung statt und man erhält Gleichung 1.2.

Die Wiederbindungskonstante ist umso größer, je dichter die Oberflächenbelegung mit immobilisierter „Fänger-DNA“ (Oligonukleotide oder PCR-Produkte) ist. Demnach kann die Kurvenanpassung nach diesem Modell jeweils bei hoher oder niedriger Belegungsdichte erfolgen. Das ebenfalls von Frank Kleinjung entwickelte Programm für die Kurvenanpassung „xfit“ gibt in seiner Ergebnisdatei die k_D -Werte für eine exponentielle Anpassung, sowie eine Anpassung nach dem Wiederbindungsmodell mit hoher ($\beta = 0,9$) und niedriger ($\beta = 0,1$) Belegungsdichte aus.

Da die Oberflächenbelegung mit immobilisierter DNA je nach Oberfläche, Modifikationen und anderen Parametern bestimmten Schwankungen unterliegt, kann es zu Abweichungen in den k_D -Werten von identischen Experimenten kommen (Chip-zu-Chip-Abweichung). Vergleicht man jedoch Werte von Spots eines einzigen Mikroarrays, sollten die Abweichungen der Spot-Werte gering sein (Spot-zu-Spot-Abweichung).

1.5.3 Heterocygotenproblematik

Bei der kinetischen Auswertung muss beachtet werden, dass eine Mutation nicht immer auf beiden Allelen eines diploiden DNA-Satzes gleichzeitig auftritt (homocygote DNA). Je nach Allelhäufigkeit kann ein Polymorphismus auf nur einem Allel (heterocygote DNA) vorkommen.

Bei der PCR werden beide Allele gleichermaßen amplifiziert. Im Amplifikat heterocygoter Ursprungs-DNA liegt also eine 1:1-Mischung aus Wildtyp- und Mutanten-DNA vor. Für die Dissoziation einer Sonde von einer solchen Hybridmischung ergibt sich demnach eine Überlagerung zweier Reaktionen mit unterschiedlichen k_D -Werten:

$$\begin{aligned} \text{Dissoziation full-Match-Hybrid} &\rightarrow k_{D(fm)} \\ \text{Dissoziation mis-Match-Hybrid} &\rightarrow k_{D(mm)} \end{aligned}$$

Da das von Kleinjung entwickelte Wiederbindungsmodell die Dissoziation nur eines Bindungspaares beschreibt, wird das Modell im Heterocygotenfall versagen und zu größeren systematischen Abweichungen führen, da sich zwei unterschiedliche Bindungsereignisse überlagern. Man muss sehen, ob die mit dem Modell ermittelten Werte für den heterocygoten Fall aussagekräftig genug sind, um sie für die Genotypisierung verwenden zu können.

1.5.4 Analyse der Fluoreszenzintensität

Zusätzlich zur kinetischen Auswertung soll auch die Fluoreszenzintensität der Analyse von full- und mis-Match-Hybriden herangezogen werden.

Da solche Fluoreszenz-markierte DNA-Sonden verwendet werden, die jeweils ein Molekül Farbstoff tragen, ist die Fluoreszenzintensität eines Spots auf einem Array ein Maß für die Menge an hybridisierter DNA. Voraussetzung für eine derartige Analyse ist jedoch, dass die Konzentration der gespotteten DNA stets gleich ist und die Oberfläche homogen ist.

1.5.5 Konsequenzen und Planung

Ziel der Arbeit ist es, eine SNP-Genotypisierungsmethode im Chipformat zu entwickeln. Prinzipiell sind zwei Ansätze möglich: Zum einen können Oligonukleotide auf Chips immobilisiert werden, an denen Patienten-spezifische fluoreszenzmarkierte PCR-Produkte hybridisiert werden (Oligonukleotid-Chip). Zum anderen kann man auch PCR-Produkte an Oberflächen koppeln und daran markierte Oligonukleotide hybridisieren (PCR-Produkte-Chip). In beiden Fällen soll die Analyse der Dissoziationskurve und die Ermittlung kinetischer Parameter zur Diskriminierung von Wildtyp und Mutante führen.

Oligonukleotid-Chips erlauben je nach Dichte der gespotteten Oligonukleotide die parallele Analyse von vielen Polymorphismen. Denkbare Ansätze wären die Hybridisierung von PCR-Produkten, die durch multiplex-PCR hergestellt wurden, oder das Mischen vieler unterschiedlicher Amplifikate, deren anschließende Dissoziation und kinetische Analyse. Dadurch könnten viele Polymorphismen eines Patienten untersucht werden, jedoch nicht ein SNP vieler Patienten. Letzteres ist jedoch mit dem reversen Ansatz der gekoppelten PCR-Produkte möglich.

Z.Zt. werden Oligonukleotid-Chips für die SNP-Analyse mittels Hybridisierung von PCR-Produkten verwendet, z.B. Affymetrix-Chips [Matsuzaki et al., 2004; Kennedy et al., 2003]. Im Gegensatz dazu ist die SNP-Analyse mit immobilisierten PCR-Produkten bisher noch nicht beschrieben worden.

Für die Methodenentwicklung ergibt sich aufbauend auf den Arbeiten von Kleinjung et al. [1997] zum faseroptischen Affinitätssensor und von Bier et al. [1997] zur Hybridisierung von Oligonukleotiden in Fließsystemen folgender Arbeitsplan:

1. In Vorversuchen soll das Hybridisierungs- und Dissoziationsverhalten von Oligonukleotiden an immobilisierten Oligonukleotiden am faseroptischen Affinitätssensor untersucht werden. Dazu wird das von Kleinjung [1998] entwickelte Wiederbindungsmodell für die Kurvenanpassung angewendet. Daneben soll auch die Hybridisierung von PCR-Produkten an immobilisierten Oligonukleotiden getestet werden. Entscheidend ist dabei, die Annahme zu bestätigen, dass sich full- und mis-Match-Hybride in ihrer Dissoziation so unterscheiden, dass die Kurvenanpassung mit dem Wiederbindungsmodell eine Diskriminierung der beiden zulässt.
2. Anschließend soll der Ansatz von der Glasfaser auf das Chipformat übertragen werden. Dieser Schritt umfasst den Test geeigneter Fluoreszenzsonden, verschie-

dener Methoden zur Kopplung der PCR-Produkte, deren Konzentration, den Test verschiedener Puffersysteme auf das Spotting sowie die Optimierung der Reaktionstemperatur. Alle Tests werden am Durchfluss-Biochip-Scanner durchgeführt, was die kinetische Auswertung des Einflusses der optimierten Parameter auf Hybridisierung und Dissoziation erlaubt.

3. Die optimierte Analysenmethode soll auf ihre Anwendbarkeit, Reproduzierbarkeit sowie Handhabbarkeit bei größeren Patientengruppen getestet werden.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Material

Für die Versuche wurden die hier aufgeführten Materialien verwendet. Soweit bei der Herkunft der Materialien kein Land angegeben ist, befindet sich der Sitz des Lieferanten in Deutschland.

2.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Spezifikationen	Hersteller / Lieferant
Aceton	technisch	AppliChem, Darmstadt
Agarose	NuSieve GTG	FMC, Philadelphia, PA, USA
	Agarose SMG	AppliChem, Darmstadt
Aminopropyltriethoxysilan (APTES)	>98 % (GC)	Fluka, Seelze
Avidin	aus Hühnereiweiß, Lot 434512/1	Fluka, Seelze
Betain Monohydrat	Biochemika, > 99%, Lot 439473/1 43902117	Fluka, Seelze
D(+)-Biotin	Biochemika	AppliChem, Darmstadt
Borsäure	BioChemica	AppliChem, Darmstadt
Citronensäure Monohydrat	Biochemika	AppliChem, Darmstadt
DNA-Leiter	für die Molekularbiologie, GenRuler 50 Bp	Fermentas, St.Leon-Roth
	pUC19 DNA/ <i>Msp</i> I (<i>Hpa</i> II) Marker, 23	Fermentas, St.Leon-Roth
DNA Natriumsalz aus Kalbsthymus	Lot 90K7063	Sigma, Steinheim

Chemikalie	Spezifikationen	Hersteller / Lieferant
dNTPs	dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 100 mM	Bioline, Luckenwalde
N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimid (EDC)	Lot 4148501/24601	Fluka, Seelze
Ethylendinitrolotetraessigsäure - Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	p.A.	AppliChem, Darmstadt
Ethanol	absolut, 100%	AppliChem, Darmstadt
Ethidiumbromid	powder grade for molecular biology	Sigma, Steinheim
2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazinyl]-ethansulfonsäure (HEPES)	analytical grade, Lot 15036	Serva, Heidelberg
Isopropanol	>98%	AppliChem, Darmstadt
Lade-Puffer	für die Gel-Elektrophorese, 6x Loading Dye Solution	Fermentas, St.Leon-Roth
Lithiumchlorid	99%, Lot 34947-061	Aldrich, Taufkirchen
1-Methylimidazol	>99 %	Fluka, Seelze
Natriumchlorid	für die Molekularbiologie	AppliChem, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	reinst	AppliChem, Darmstadt
Natriumhydroxid-Plätzchen	reinst Ph. Eur., USP	AppliChem, Darmstadt
Natriumlaurylsulfat (SDS)	99%, Lot 129H0002	Sigma, Steinheim
NeutrAvidin	Biotin Binding Protein, Lot # EF63378	Perbio Science, Bonn
Kaliumchlorid	p.A.	Merck, Darmstadt
Oligonukleotide	HPLC-gereinigt	Carl Roth, Karlsruhe
	HPLC-gereinigt, Biotin- und Phosphat-Markierung	Carl Roth, Karlsruhe
	HPLC-gereinigt, Cy5-Markierung	Operon, Hilden
	HPLC-gereinigt, FITC-Markierung	BioTeZ, Berlin
Salzsäure	32%, reinst	AppliChem, Darmstadt
Schwefelsäure	95 - 97%, reinst	AppliChem, Darmstadt
Streptavidin	aus Streptomyces avidinii, Lot424533/1	Fluka, Seelze
Tris(hydroxymethyl)-amino-methan (Tris-Base)	für die Molekularbiologie	AppliChem, Darmstadt
Trinatriumcitrat Dihydrat	p.A., Rotipuran	Roth, Karlsruhe

Chemikalie	Spezifikationen	Hersteller / Lieferant
Wasser	DEPC-behandelt, für die Molekularbiologie	AppliChem, Darmstadt
Wasserstoffperoxid	30%, technisch	AppliChem, Darmstadt

Tabelle 2.1: Liste der verwendeten Chemikalien

Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide

Bei Oligonukleotiden, die endständig Biotin- bzw. Phosphatgruppen tragen, befindet sich zwischen DNA und Markierung jeweils ein $(\text{CH}_2)_{18}$ - bzw. $(\text{CH}_2)_7$ -Spacer. Die Hersteller bzw. Lieferanten sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Markierung
Oligonukleotide für SULT1A1-Versuche		
sPRM	GGTTGAGGAG TTGGCTCTGC	keine
rPRM	ATGAACTCCT GGGGGACGGT	keine
ps_PRM	GGTTGAGGAG TTGGCTCTGC	5'-Phosphat
PRM5b	TGAACGACGT GTGCTGAACC	5'-Biotin
3	TGGGGCGCTC CCT	5'-Biotin
p3	TGGGGCGCTC CCT	5'-Phosphat
4	TGGGGCACTC CCT	5'-Biotin
p4	TGGGGCACTC CCT	5'-Phosphat
5	GTGGGGCGCT CCCTG	5'-Biotin
6	GTGGGGCACT CCCTG	5'-Biotin
7	TGTGGGGCGC TCCCTGC	5'-Biotin
8	TGTGGGGCAC TCCCTGC	5'-Biotin
12	GGTCCACGGT CTCCTCTGGC AGGGAGTGCC CCACA	keine
b12_3	GCAGGGAGCG CCCACAAAC TCCAGGATCT TTTGA	5'-Biotin
b12_4	GCAGGGAGTG CCCACAAAC TCCAGGATCT TTTGA	5'-Biotin
p12_3	GCAGGGAGCG CCCACAAAC TCCAGGATCT TTTGA	5'-Phosphat
p12_4	GCAGGGAGTG CCCACAAAC TCCAGGATCT TTTGA	5'-Phosphat
9	GCAGGGAGCG CCCACA	5'-FITC
10	GCAGGGAGTG CCCACA	5'-FITC
FITC-rPRM	ATGAACTCCT GGGGGACGGT	5'-FITC

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Markierung
11	CAGAGGAGAC CGTGGAC	3'-FITC
CH1	ACCTTAGTGT ATTACAG	3'-Biotin, 5'-Cy5
CH3	ACCTTAGTGT ATTACAG	3'-Phosphat, 5'-Cy5
Cy5_01	TCAAAAGATC CTGGAGT	5'-Cy5
Cy5_02	TGGGGCACTC CCT	5'-Cy5
Cy5_03	TGGGGCGCTC CCT	5'-Cy5
Cy5_04	GCAGGGAGCG CCCCACA	5'-Cy5
Cy5_05	GCAGGGAGCG TCCCACA	5'-Cy5
Cy5_06	AGGGAGCG CCCCA	5'-Cy5
Cy5_07	AGGGAGCG TCCCA	5'-Cy5
Oligonukleotide für Adiponectin-Versuche		
AB_sPRM	GATGTCTTGT TGAAGTTGGT GC	5'-Biotin
AP_sPRM	GATGTCTTGT TGAAGTTGGT GC	5'-Phosphat
AB_rPRM	GAAAGTTTAG GCTTGAAGTG GC	5'-Biotin
AP_rPRM	GAAAGTTTAG GCTTGAAGTG GC	5'-Phosphat
d11426a	TGGGGTCGTA ATTTAATTC AT	5'-Biotin
d11426g	TGGGGTCGTA GTTTAATTC AT	5'-Biotin
d11391g	TGCAAGAACC GGCTCAGAT CC	5'-Biotin
d11391a	TGCAAGAACC AGCTCAGAT CC	5'-Biotin
d11377g	CAGATCCTGC GCTTCAAAA AC	5'-Biotin
d11377c	CAGATCCTGC CCTTCAAAA AC	5'-Biotin
rSonde11426a	GAATTAAAT ACGACCC	5'-Cy5
rSonde11426g	GAATTAAACT ACGACCC	5'-Cy5
rSonde11391g	TCTGAGCCGG TTCTT	5'-Cy5
rSonde11391a	TCTGAGCTGG TTCTT	5'-Cy5
rSonde11377g	TTTGAAGCGC AGGAT	5'-Cy5
rSonde11377c	TTTGAAGGGC AGGAT	5'-Cy5

Tabelle 2.2: Liste der verwendeten Oligonukleotide (Hersteller siehe Tabelle 2.1).

Enzyme

Enzym	Spezifikation	Hersteller / Lieferant
DNA Polymerase:		
Hot Star Taq	Lot 11560711	Qiagen, Hilden
Restriktionsendonukleasen:		
<i>Bsp</i> 143II	Lot 1311	Fermentas, St.Leon-Roth
<i>Tas</i> I	Lot 0332	Fermentas, St.Leon-Roth
<i>Hin</i> 6I	Lot 1313	Fermentas, St.Leon-Roth
<i>Msp</i> I	Lot 2226	Fermentas, St.Leon-Roth

Tabelle 2.3: Liste der verwendeten Enzyme

Puffer und Lösungen

Alle Puffer wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt und, soweit nicht anders angegeben, autoklaviert und auf einen Liter aufgefüllt.

- APTES-Lösung nach Bilitewski et al. [1998]: 10 %, wässrig, pH 3,45
- Biotin-Lösung, 10 mM: 24,4 mg Biotin werden in 10 ml Tris-Base (0,2 M) gelöst.
- Blocking-Lösung nach Diehl et al. [2001]:
1 g Bernsteinsäureanhydrid wird in 200 ml Dichlorethan gelöst und 2,5 ml Methylimidazol dazu gegeben.
- 1-Methylimidazol-Lösung, 50 mM: wässrig, pH 6
- HEN-Puffer nach Jobs et al. [2002]:
100 mM HEPES, 10 mM EDTA, 50 mM NaCl, wässrig, pH 8, steril filtrieren, nicht autoklavieren
- Piranha-Lösung:
10 % Wasserstoffperoxid in Schwefelsäure (96 %)
- Phosphate buffered Saline (PBS) nach Sambrook and Russell [2001]:
137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, wässrig, pH 7,4
- SDS-Lösung, 10%: wässrig
- 20× SSC, Stammlösung nach Sambrook and Russell [2001]:
300 mM Natriumcitrat, 3 M NaCl, wässrig, pH 7,4
- 3× SSC mit 1,5 M Betain nach Diehl et al. [2001]:
45mM Natriumcitrat, 45 mM NaCl
- Tris-borat-EDTA-Puffer (TBE), 5× Stammlösung nach Sambrook and Russell [2001]:
445 mM Tris-Base, 445 mM Borsäure, 10 mM EDTA, wässrig

- Tris-azetat-EDTA-Puffer (TAE), 50× Stammlösung nach Sambrook and Russell [2001]:
2 M Tris-Base, 2 M Essigsäure 100% (Eisessig), 50 mM EDTA, wässrig
- Tris Base, 0,2 M
- Tris-HCl, 1 M: wässrig, pH 8

2.1.2 Patientenproben

Proben für Vorversuche: Es wurden Blutproben anonymen Spender verwendet.

DifE-Projekt SULT1A1: 24 Patientenproben humaner genomischer DNA wurden bereitgestellt von Dr. Meinel und Prof. Glatt (Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Abt. Ernährungstoxikologie, Nuthetal). Es handelt sich ausschließlich um homozygote Patientenproben: 12× mutante DNA (GG → AA), 12× Wildtyp-DNA (GG).

DifE-Projekt Adiponectin-Promotor: 44 Patientenproben humaner genomischer DNA aus dem BioProfile-Projekt MGP „Metabolisch-genetische Profile“ wurden von Dr. Spranger und Prof. Pfeiffer bereitgestellt (Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Abt. Klinische Ernährung, Nuthetal).

2.1.3 Kits

- QIAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden)
- E.Z.N.A. Blood DNA Mini Kit (Peqlab, Erlangen)
- QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden)

2.1.4 Glasträger und Glasfasern

Für Experimente an Oberflächen wurden Objektträger und Deckgläschen sowie Glasfasern (HPCS Fibers) verwendet. Die Spezifikationen der Glasträger sind in Tabelle 2.4 aufgeführt.

Die Oberfläche der Objektträger und Deckgläschen kann sofort modifiziert werden (siehe 2.2.7); Glasfasern hingegen müssen vor der Behandlung vom Cladding, einem Polymer-Schutzmantel, befreit werden. Man brennt den Schutzmantel mit einem Feuerzeug ab, ohne den Kern zu beschädigen. Danach lässt sich die Faser silanisieren.

Glasträger	Spezifikation	Bestellnummer	Hersteller / Lieferant
Glasfasern (Hard Plastic Clad Silica Fibers)	Ø Core 400 µm, Ø Clad 430µm, Ø Jacket 730 µm, Aperture 0,37	HPCS400UVT	FibreTech, Berlin
Objektträger	Mattrand, 90° geschliffen, 76×26 mm, Kalk-Natron-Glas	H870	Roth, Karlsruhe
Deckgläschen	Dicke 0,2 mm, 20 × 20 mm, Borosilikat-Glas	OT9705B	VWR, Darmstadt

Tabelle 2.4: Übersicht über die verwendeten Glasträger

2.1.5 Geräte und Zubehör

Gerät	Bezeichnung	Hersteller / Lieferant
Biochip-Scanner	ArrayWoRx e	Applied Precision, Issaquah, WA, USA
Biochip-Spotter	TopSpot /M	IMTEK, Freiburg; HSG-IMIT, Villingen-Schwenningen
	Nanoplotter	Gesim, Großerkmannsdorf
	Probot	BAI, Bensheim
Zentrifugen	Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
	Centrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Vakuumentrifuge	Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Vakuumpumpe	CVC 2000II	Vacuubrand, Wertheim
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Photometer	Specord 200	Analytik Jena, Jena
	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Platten-Reader	Polarstar Galaxy	BMG, Offenburg
Thermocycler	DNA Engine (PTC-200)	MJ Research, Waltham, MA, USA
Mixer	Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Gel-Elektrophorese	Power Supply Model 250 EX	Life Technologies, USA
	Gel-Kammer Horizon 58	Life Technologies, USA
	Auswerte-Einheit Gel-System	Biostep, Jahnsdorf
	Steuersoftware Phoretix Grabber	Nonlinear Dynamics, Newcastle, UK
	Auswertesoftware Phoretix TotalLab	Nonlinear Dynamics, Newcastle, UK
Rührer	IKAMAG RH	IKA-Werke, Stauffen
Wasserbad	IKA TS 2	IKA-Werke, Stauffen
Ultraschall-Bad	Sonorex RK100H	Bandelin electronic, Berlin
Mikroliter-Pipetten	Referenz	Eppendorf, Hamburg
Pipetten-Spitzen	Filtertips ohne Filter	Eppendorf, Hamburg Roth, Karlsruhe

Tabelle 2.5: Liste der eingesetzten Geräte

2.1.6 Faseroptischer Affinitätssensor

Für Vorversuche zur Untersuchung der Stabilität von DNA-DNA-Hybriden an Oberflächen wurde der faseroptische Affinitätssensor eingesetzt. In Abbildung 2.1 ist der Aufbau des Geräts wiedergegeben.

Das Gerät ist ein faseroptischer Biosensor, dessen Prinzip Frank Kleinjung [Kleinjung, 1998; Kleinjung et al., 1997] etablierte und das später am Fraunhofer IBMT weiterentwickelt wurde. Bei diesem Sensor werden Glasfasern eingesetzt, auf denen die Immobilisierung der DNA stattfindet. Das Messprinzip beruht auf der Detektion von Fluoreszenzlicht, das von den angeregten Moleküle ausgesandt wird. Diese wiederum sind an den immobilisierten Molekülen hybridisiert.

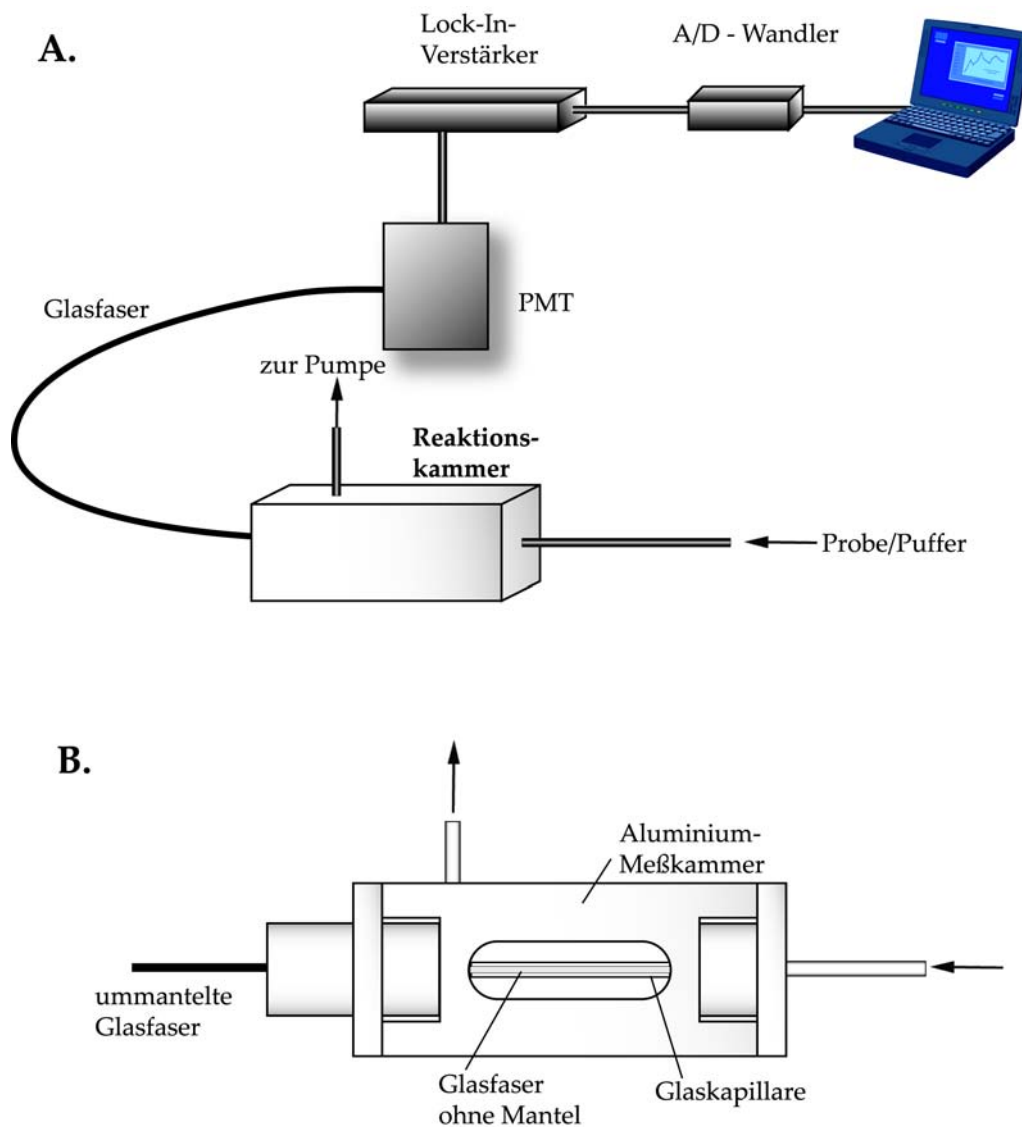


Abbildung 2.1: A. Schematischer Geräteaufbau des faseroptischen Affinitätssensors. B. zeigt einen vertikalen Schnitt durch die Reaktionskammer.

Der Sensor funktioniert wie folgt: Das Anregungslicht einer getakteten Leuchtdiode wird durch einen Bandpassfilter (475 ± 40 nm) auf die Faser gestrahlt. Das von hybridisierten Fluoreszenzmolekülen emittierte Licht koppelt in die Glasfaser ein und wird über einen Emissionsfilter (Kantenfilter, 510 nm) zum Detektor (Photomultiplier) weitergeleitet. Danach wird das Signal durch den ebenfalls getakteten Lock-In-Verstärker amplifiziert und über eine A/D-Wandlerkarte im Messcomputer als ASCII-Datei gespeichert. Während der gesamten Messung wird die Faser kontinuierlich mit Flüssigkeit überströmt, die von einer peristaltischen Pumpe angesaugt wird.

Vor der Messung wird die präparierte Faser (siehe Kapitel 2.2.7) in die Messzelle eingeführt und das System mit Puffer luftblasenfrei gespült. Der Ablauf einer typischen Messung ist in Tabelle 2.6 dargestellt. Nach dem Start wird mit PBS-Puffer gespült, anschließend die Fluoreszenz-Sonde 9 bzw. 10 hinzugegeben (Sequenzen siehe 2.2, S. 43) und nach Ende der Hybridisierung erneut mit Puffer gespült. Nach ca. 90 Minuten Dissoziation ist die Messung beendet.

Zeit (sec)	Aktion	Bemerkung
0	Start der Messung	PBS-Puffer (Fließgeschwindigkeit $20 \mu\text{l}/\text{min}$)
900	Zugabe FITC-Sonde	$100 \mu\text{l}$, 500 nM in PBS-Puffer
2700	Spülen	PBS-Puffer
8400	Ende der Messung	Ende der Datenaufzeichnung

Tabelle 2.6: Zeitplan eines typischen SNP-Faser-Experiments an gespotteten Oligonukleotiden

2.1.7 Durchfluss-Biochip-Scanner

Mit Hilfe des Durchfluss-Biochip-Scanners wurden Messungen durchgeführt, die kinetische Daten der Dissoziation von immobilisierten DNA-DNA-Hybriden lieferten. Oberflächenvorgänge wie die Hybridisierung mit Fluoreszenz-Sonden sowie deren Dissoziation lassen sich durch die Kombination von optischem Teil und Fließsystem zeitgleich beobachten.

Das Messprinzip beruht wie beim faseroptischen Affinitätssensor auf der Detektion von emittiertem Licht, das von hybridisierten Molekülen ausgesendet wird. Allerdings erfolgt die Weiterleitung des Fluoreszenzlichts nicht durch ein evaneszentes Feld, sondern durch ein bewegliches Objektiv. Der am Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik entwickelte Biochip-Scanner besteht aus zwei Teilen: einem unbeweglichen optischen Teil und dem in x-y-z-Richtung beweglichen Fließsystem (siehe Abbildung 2.2).

Das Fließsystem setzt sich zusammen aus Isolierblock, Fließzelle, zu- und ableitendem Schlauchsystem und zwei Stahlkapillaren mit Verbindung zu einer Vakuumpumpe. Die Fließzelle besteht aus Silikon; die Entwicklung des Designs und die Herstellung erfolgte ebenfalls am IBMT. Das Zellen-Design wurde so optimiert, dass ein gleichmäßiges Befüllen der Fließzelle gewährleistet ist. Für das Schlauchsystem wurden ausschließlich Teflonschläuche verwendet, um die Bildung von Luftblasen im System zu vermeiden.

Der nicht bewegliche Teil des Scanners umfasst Objektiv, Laserdiode, Filtersätze, den dichroitischen Spiegel sowie den Photomultiplier PMT (siehe Abbildung 2.4). Da mit Cy5-

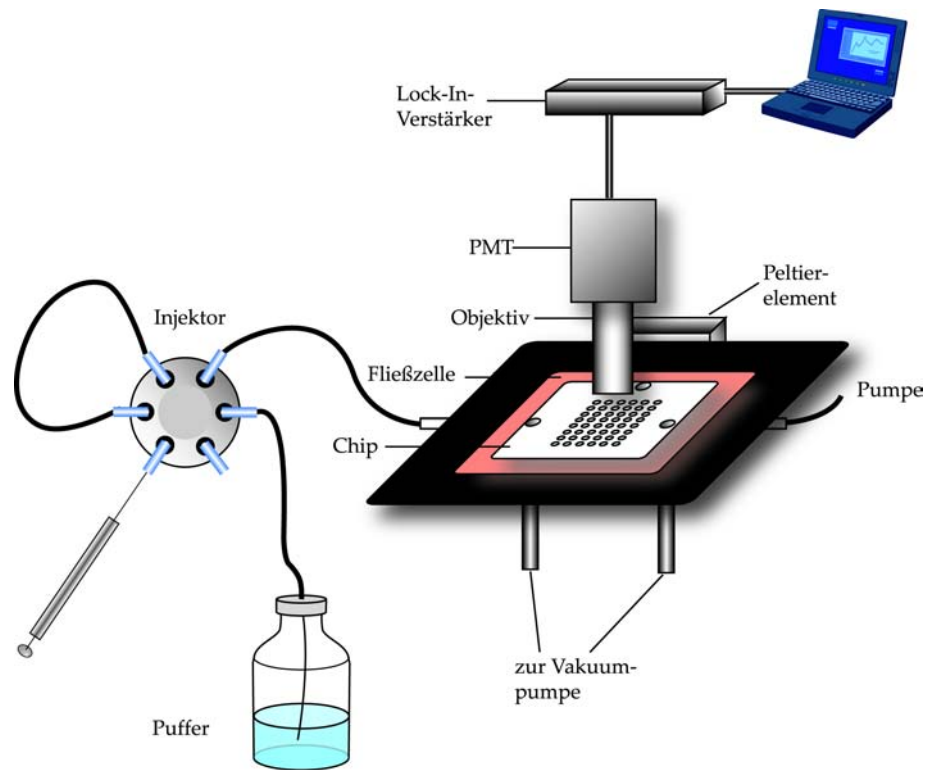


Abbildung 2.2: Schematischer Geräteaufbau des Durchfluss-Biochip-Scanners

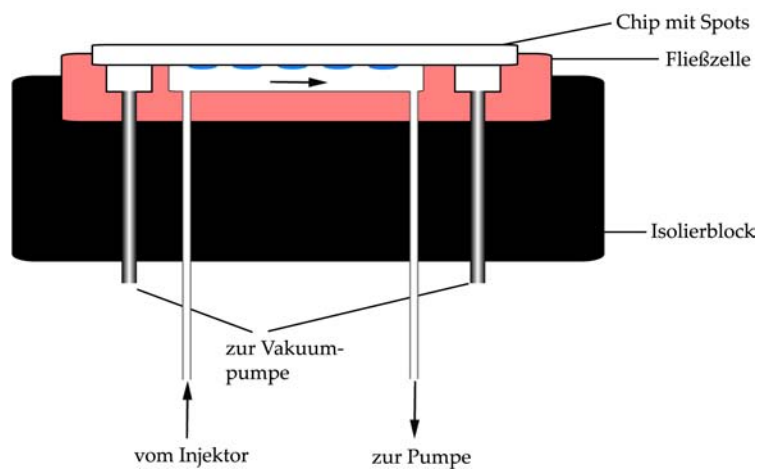


Abbildung 2.3: Schematische Abbildung der Fließzelle mit Isolierblock und Chip

markierten Sonden gearbeitet wird, kommt ein Anregungsfilter der Wellenlänge 630 nm und ein Emissionsfilter von 695 nm zum Einsatz.

Das Licht einer getakteten Laserdiode wird durch einen Anregungsfilter (630 ± 25 nm), den dichroitischen Spiegel (650 nm, Bandbreite < 10 nm) und das Objektiv auf die Chip-Oberfläche und somit auf die dort in Spots immobilisierte DNA und daran hybridisierte Cy5-Sonden geleitet. Der Farbstoff emittiert das Licht, das durch das Objektiv und den Spiegel über einen Emissionsfilter ($695 \text{ nm} \pm 27$ nm) in den PMT geleitet wird.

Durch den Einsatz eines Schrittmotors kann das Fließsystem unter der Optik bewegt und so das Fluoreszenzsignal jedes Spots gemessen werden. Die Kontrolle über die Schrittmotoren und die Aufnahme der Daten erfolgt über PC-Steuerung mit dem am IBMT entwickelten Programm „Scanner Software“. Darüber hinaus kann die Temperatur in der Fließzelle im Bereich von 20°C bis 95°C mit Hilfe von zwei Peltier-Elementen geregelt werden.

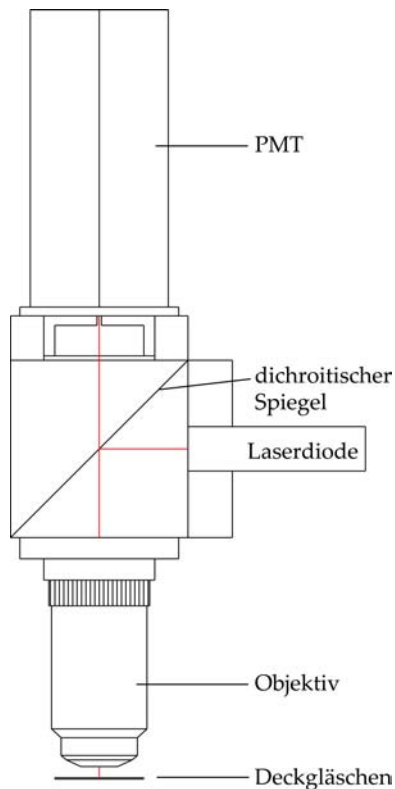


Abbildung 2.4: Schema der Scanner-Optik. Die rote Linie kennzeichnet den Strahlenverlauf.

Vor der Messung muss die Zelle fünf Minuten im Ultraschallbad in einer 70%igen Isopropanol-Lösung quellen. Nach gründlichem Spülen mit Wasser wird sie in die Vertiefung des Isolierblocks eingepasst und mit der Vakuumpumpe angesaugt. Danach kann der Chip auf die Zelle gelegt und ebenfalls durch das Vakuum angesaugt werden. Dadurch ist gewährleistet, dass Chip und Zelle dicht abschließen und die Zelle mit zugeführtem Puffer befüllt werden kann. Das Befüllen erfolgt durch eine peristaltische Pumpe, die am Ende des Fließsystems Flüssigkeiten ansaugt. Ist der Reaktionsraum luftblasenfrei, kann die Messung starten.

Der Ablauf einer typischen Messung ist in Tabelle 2.7 aufgeführt. Die Zugabe von Natronlauge zum Entfernen des Doppelstranges bei PCR-Produkten und Cy5-Sonden (Sequenzen siehe 2.2, S. 43) erfolgt über die Injektion von $100 \mu\text{l}$ durch das Rheodyne. Die Messungen wurden bei einer Fließgeschwindigkeit von ca. $20 \mu\text{l}/\text{min}$ durchgeführt. Alle verwendeten Puffer und Lösungen wurden autoklaviert, vor jeder Messung filtriert und anschließend im Vakuum entgast. Die Messdaten wurden bei jedem Experiment in einer Datei abgelegt und standen somit für die Datenauswertung zur Verfügung.

Zeit (sec)	Aktion	Bemerkung
0	Start der Messung	HEN-Puffer (Fließgeschwindigkeit 15 $\mu\text{l}/\text{min}$)
900	Injektion NaOH	100 μl , 100 mM
960	Spülen	HEN-Puffer
1300	Injektion Cy5-Sonde	100 μl , 500 nM
3100	Spülen	HEN-Puffer
5900	Ende der Messung	Ende der Datenaufzeichnung

Tabelle 2.7: Zeitplan eines typischen SNP-Biochip-Experiments an gespotteten PCR-Produkten

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Extraktion

Zwei Kits zur Extraktion von DNA aus menschlichem Blut kamen zum Einsatz: das QIAmp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Hilden) und das E.Z.N.A. Blood Kit (Peqlab, Erlangen). Es wurden ausschließlich Blutproben verwendet, die in Heparin-, EDTA- oder Citratkartuschen gelagert wurden. Die Extraktion wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für alle Versuche wurden ausschließlich sterile, autoklavierte Gefäße und sterile, autoklavierte Pipettenspitzen eingesetzt.

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine zyklisch wiederholte Reaktion, mit der eine fast exponentielle Amplifikation bestimmter DNA-Fragmente möglich ist [Mullis and Fallona, 1987]. Die Abschnitte der Reaktion unterteilen sich in DNA-Denaturierung, Primer-Anlagerung (Annealing) und -Verlängerung (Extension). Die Phasen erfordern unterschiedliche Temperaturen. Im ersten Zyklus wird DNA denaturiert und Vorwärts- sowie Rückwärts-Primer hybridisieren. Anschließend werden durch die Taq DNA Polymerase dNTPs an die 3'-Enden der Primer eingebaut. Nach der Elongation wird die DNA im zweiten Zyklus erneut denaturiert, die Stränge werden nach Primerhybridisierung verlängert. So entstehen auch kürzere Produkte, deren Sequenz durch die Primer eingeschlossen ist. Die Zyklen werden meist 30mal wiederholt.

Pipettierschema für die Amplifikation eines Abschnitts im Gen der Sulfotransferase *SULT1A1*. Es wurde genomische DNA verwendet; der PCR-Ansatz umfasste jeweils 100 μl .

Konzentration	Komponente	Volumen (μl)
10 \times	PCR Puffer	10
10 mM	dNTPs	2
10 μM	sPRM	2
10 μM	rPRM	2
	DEPC-Wasser	81,6
5U/ μl	Hot Star Taq	0,4
ca. 50 ng/ μl	genomische DNA	2

Temperaturprogramm

Aktivierung des Enzyms	12 min	95°C	} 30×
Schmelzen	30 sec	94°C	
Annealing	45 sec	63°C	
Extension	2 min	72°C	
	10 min	72°C	
	∞	4°C	

Pipettierschema für die Amplifikation eines Abschnitts im Gen des Adiponectin-Promotors: Der PCR-Ansatz umfasste jeweils 100 μ l. Es wurde die von Dr. Spranger bereitgestellte genomische DNA verwendet (siehe S. 45).

Konzentration	Komponente	Volumen (μ l)
10×	PCR Puffer	10
25 mM	MgCl ₂	1,56
25 mM	dNTPs	2
10 μ M	AB_sPRM	2,5
10 μ M	AP_rPRM	2,5
	DEPC-Wasser	78,44
5 U/ μ l	Hot Star Taq	1
ca. 50 ng/ μ l	genomische DNA	2

Temperaturprogramm

Aktivierung des Enzyms	12 min	95°C	} 40×
Schmelzen	40 sec	95°C	
Annealing	40 sec	60°C	
Extension	40 sec	72°C	
	10 min	72°C	
	∞	4°C	

2.2.3 Gel-Elektrophorese

Für PCR-Produkte wurden 3%ige, für genomische DNA 0,7%ige Agarose-Gele mit 1× Tris-Azetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) oder 1× Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) verwendet. Bei jedem Gel wurden DNA-Marker (GenRuler 50 Bp; pUC19 DNA/*MspI* (*HpaII*) Marker, 23) als Längenstandard neben den PCR-Produkten aufgetragen. Alle Proben wurden mit je 1 μ l Loading Dye gemischt. Es wurde mit einer Spannung von 5-6 V/cm Gel gearbeitet.

2.2.4 Reinigung von PCR-Produkten

Es wurden folgende Methoden zur Reinigung von PCR-Produkten angewandt:

Ethanol/LiCl-Fällung

Dem PCR-Produkt wurde das 2,5fache Volumen Ethanol (96%) und das 0,1fache Volumen LiCl-Lösung (5 M) zugefügt und die DNA mindestens 15 Minuten bei -80°C gefällt. Danach wurde 20 min bei 4°C und 16.000× g zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend mit 70 %igem Ethanol gewaschen, aber nicht resuspendiert. Die Mischung

wurde 10 min bei 4°C und 16.000× g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und verworfen. Danach wurde die gefällte DNA in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Die gereinigte DNA wurde mit DEPC-Wasser aufgenommen.

QIAquick PCR Purification Kit

Die Reinigung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von genomischer DNA und den gereinigten PCR-Produkten erfolgte photometrisch nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz. Die Absorption der doppelsträngigen DNA wurde bei 260 nm entweder am Eppendorf BioPhotometer absolut gegen Wasser, oder am Polarstar Galaxy Plattenreader gegen eine externe Standardreihe (siehe Tabelle 2.8) aus wässrigen Lösungen von Calf Thymus DNA gemessen.

Name	Verdünnungsmuster	Verdünnungsfaktor	Konzentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
ST100	E 1000 50 500	10	100
ST75	E 1000 37,5 500	13,3	75
ST50	E 1000 25 500	20	50
ST25	E 1000 12,5 500	40	25
ST10	E 1000 5 500	100	10
ST5	E 1000 2,5 500	200	5
ST1	E 1000 0,5 500	1000	1

Tabelle 2.8: Verdünnungsmuster der DNA-Standardreihe für die Konzentrationsbestimmung mit dem Platten-Reader.

2.2.6 Probenvorbereitung für das Spotten

Von den gereinigten, in DEPC-Wasser gelösten PCR-Produkten wurde jeweils soviel Volumen abgenommen, dass man nach dem Trocknen in der Vakuumzentrifuge und anschließender Aufnahme mit dem Spotting-Puffer eine bestimmte Konzentration erhielt. Die Lösungen wurden danach für 30 Minuten bei 37°C im Thermomixer geschüttelt, um eine gleichmäßige Verteilung des PCR-Produkts zu gewährleisten.

Ein Verdünnungsmuster für PCR-Produkte aus zwei Lösungen mit der Konzentration 495,8 ng/ μl und 473,1 ng/ μl ist beispielhaft in Tabelle 2.9 wiedergegeben.

2.2.7 Modifikation der Glas-Oberflächen

Zur Immobilisierung von Nukleinsäuren auf Glas ist eine Modifikation der Oberfläche notwendig. Aus diesem Grund wurde die Oberfläche von den verwendeten Glasfasern oder Glas-Chips mit APTES silanisiert.

Ausgangs- c(ng/μl)	DNA-V (μl)	Masse (μg)	Aufnahme-V (μl)	End-c (ng/μl)	End-c (μM)	Name
495,8	5,04	2,5	100	25	0,1675	M25
495,8	10,08	5	100	50	0,335	M50
495,8	10,08	5	50	100	0,67	M100
495,8	20,16	10	40	250	1,675	M250
495,8	20,16	10	20	500	3,35	M500
495,8	40,32	20	20	1000	6,7	M1000
473,1	5,29	2,5	100	25	0,1675	W25
473,1	10,57	5	100	50	0,335	W50
473,1	10,57	5	50	100	0,67	W100
473,1	21,14	10	40	250	1,675	W250
473,1	21,14	10	20	500	3,35	W500
473,1	42,28	20	20	1000	6,7	W1000

Tabelle 2.9: Verdünnungsmuster für DNA-Lösungen mit einer Endkonzentration von 25 bis 1000 ng/μl (M = Mutanten-DNA; W = Wildtyp-DNA)

Silanisierung

Für die Reinigung der Oberflächen wurden die Glasträger für ca. 40 sec in Piranha-Lösung getaucht und gründlich mit Wasser gespült [Bilitewski et al., 1998]. Anschließend wurde das Glas durch mindestens zweistündiges Behandeln mit 10 M NaOH aktiviert. Es wurde mit Wasser abgespült und sofort weitergearbeitet. Das Glas wurde in die APTES-Lösung gegeben und für zwei Stunden ins 80°C warme Wasserbad gestellt. Danach wurde mit reichlich dest. Wasser gewaschen und kurz mit Aceton gespült. Zur Kondensation der Silanole wurde das Glas bei 115°C für mindestens 60 Minuten im Trockenschrank gebacken. Nach der Silanisierung wurden die Glasträger entweder für die kovalente oder für die affine Kopplung von DNA an die Oberfläche verwendet. Gelagert wurden sie bei Raumtemperatur, staubfrei und dunkel in einer Box.

Kovalente Kopplung

Für die kovalente Kopplung mit Hilfe von EDC/Methylimidazol wurden die silanisier-ten Oberflächen lediglich mit aktivierter DNA bespottet. Die Aktivierung erfolgte durch die Aufnahme der DNA in einer 50 mM Methylimidazol-Lösung (pH 6). Anschließend wurde EDC dazugegeben (Endkonzentration in der Lösung 5-10 mg/ml). Danach werden die Lösungen auf Glasträger aufgetragen.

Affine Kopplung

Die Glasoberflächen wurden entweder mit Avidin-, NeutrAvidin- oder Streptavidin-Lösungen (0,2 mg/ml) beschichtet. Dazu wurden wässrige Lösungen dieser Substanzen auf die silanierte Oberfläche aufgebracht.

In Halterungen wurden Chips arretiert und mindestes zwei Stunden in die entsprechen-

de Lösung getaucht. Für das Beschichten von Glasfasern wurde die Lösung in eine zugeschmolzene Pasteurpipette gefüllt, die Fasern eingeführt und mindestens eine Stunde inkubiert. Danach wurden die Glasträger mit Wasser gespült. Zum Trocknen wurden die Chips für 10 Minuten bei 500 U/min zentrifugiert, die Fasern trockneten an der Luft. Die Chips wurden bei Raumtemperatur staubfrei und dunkel in einer Box gelagert, die Fasern in einer zugeschmolzenen Pasteurpipette.

2.2.8 Spotten auf Glas-Oberflächen

Um Nukleinsäuren auf Glas-Oberflächen aufzutragen, kamen die Biochip-Spotter Nanoplotter und TopSpot /M zum Einsatz. In der Tabelle 2.10 sind die Eigenschaften der Geräte näher spezifiziert. Beide Spotter verwenden das gleiche Tropfverfahren und liegen bei Tropfengröße und -abstand sowie appliziertem Volumen im gleichen Größenbereich.

Spotter	Tropfverfahren	Tropfenvolumen	Tropfenradius	Positioniergenauigkeit	Vorteile
Nanoplotter	Ink-Jet (Piezo-Tip)	10 - 1000 pl	50 - 250 μm	15 - 20 μm	bis zu 20 Slides parallel, hohe Anfahrgeschwindigkeit
TopSpot	Ink-Jet	500 - 800 pl	200 - 250 μm	keine Angaben	bis zu 40 Slides parallel, Simultanübertragung ganzer Titerplatten, Qualitätskontrolle durch Kamera

Tabelle 2.10: Übersicht über eingesetzte Mikroarray-Spotter [Heise, 2004].

2.2.9 Blocking und Hybridisierung

Sofern die Hybridisierung und Dissoziation nicht im Biochip-Scanner erfolgte, wurden Objektträger und Deckgläschen folgendermaßen behandelt:

Blocking

Chips mit affin gekoppelter DNA (siehe 2.2.7) wurden mit 10 mM Biotin-Lösung besprüht, 2 Minuten lang in Wasser gespült und im Stickstoff-Strom getrocknet.

Chips mit kovalent gekoppelter DNA (EDC-Methode, siehe 2.2.7) wurden mit Bernstein säureanhydrid-Dichlorethan-Lösung nach Diehl et al. [2001] geblockt. Die Chips wurden für 1 Stunde mit der Lösung inkubiert, mit 200 ml frischem Dichlorethan gespült und für 2 Minuten in siedendes Wasser gestellt. Nach kurzem Spülen mit 95%igem Ethanol trockneten die Chips an der Luft.

Hybridisierung

Für die Hybridisierung mit Fluoreszenzsonden wurde der Array mit einer 500 nM wässrigen Sonden-Lösung für mindestens 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Chips für 2 Minuten in einer Lösung aus $2 \times$ SSC und 0,1% SDS, dann 2 Minuten lang mit $1 \times$ SSC-Lösung gewaschen und anschließend kurz mit 0,2% SSC-Lösung gespült [Diehl et al., 2001]. Die Chips wurden unter Stickstoffstrom getrocknet.

2.2.10 Auswertung der kinetischen Daten

Für die Ermittlung der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_D der Hybridisierungsversuche auf Glasfasern und Deckgläschen kam das Programm „xfit“ von Frank Kleinjung [Kleinjung, 1998] zum Einsatz. Es wurde stets der k_D -Wert für „sec-order (high)“ für die Auswertung verwendet, da man von einer hohen Belegungsdichte auf den Oberflächen ausgehen kann.

Der Startpunkt für den Offset wurde durch den Beginn der Dissoziation festgelegt, welcher stets kurz nach dem Ende der Schnellspülphase lag (Zeitachse y). Als Start für x wurde die Grundlinie nach der Zugabe der Natronlauge fixiert.

2.2.11 Auswertung der Fluoreszenzintensität

Bilder von Arrays auf Deckgläschen und Objektträgern wurden routinemäßig vor und nach Hybridisierungs- und Dissoziationsexperimenten mit dem Mikroarray-Scanner ArrayWoRx e aufgenommen. Die Scan-Parameter sind in Tabelle 2.11 aufgeführt. Die generierten stc-Dateien wurden in tif-Dateien im Graustufenmodus mit 16-Bit-Farbtiefe umgewandelt.

Parameter	Spezifikation
Auflösung	97.560 (Kantenlänge eines Pixels $9,756 \mu\text{m}$)
Belichtungszeit	0,3 s
Empfindlichkeit	High SNR

Tabelle 2.11: Übersicht über Scan-Parameter am ArrayWoRx e

Die Spot-Fluoreszenzintensität wurde mit dem Programm „ArrayWoRx Analysis Software“ ermittelt. Nach Festlegung von Lage und Größe aller Spots eines Arrays, errechnete die Software die Fluoreszenzintensität der jeweiligen Spots durch die Bildung des Mittelwerts über alle Pixel eines Spots.

2.2.12 Referenzverfahren RFLP

Für die Bestimmung des SNP im Gen der humanen Sulfotransferase *SULT1A1* wurde die Restriktionsendonuclease *Bsp143II* verwendet. Das Enzym schneidet nur dann, wenn die Erkennungssequenz unverändert vorliegt. Ist sie durch einen Basenaustausch verändert, schneidet es nicht. Nach dem Restriktionsverdau wird durch Gel-Elektrophorese (siehe 2.2.3) die Größe der Fragmente überprüft. Bei einem Wildtyp-PCR-Produkt von 281 Bp Länge entstehen beim Schneiden Fragmente von 177 Bp und 104 Bp Länge (zwei Banden). Bei Auftreten des SNP liegt die Bande bei 281 Bp unverändert vor; heterozygote DNA zeigt ein Restriktionsmuster von drei Banden (281, 177 und 104 Bp).

Pipettierschema

Konzentration	Komponente	Volumen (μ l)
	DEPC-Wasser	7,5
10×	Y ⁺ Puffer	2
5 U/ μ l	<i>Bsp143II</i>	0,5
	PCR-Produkt	10

Temperaturprogramm

3 h	37 °C
10 min	65 °C
∞	4 °C

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Vorversuche

3.1.1 Hybridisierungsversuche am faseroptischen Affinitätssensor

Durch die Hybridisierung von Fluoreszenz-Sonden an immobilisierten Oligonukleotiden entstehen DNA-DNA-Hybride an der Glasoberfläche. Diese können - soweit sie eine komplementäre Basensequenz tragen - einen perfekt passenden Doppelstrang bilden. Ist die Sequenz jedoch nicht hundertprozentig komplementär, wenn es z.B. eine nicht bindende Base gibt, weist das resultierende mis-Match-Hybrid eine geringere Stabilität auf als das full-Match-Hybrid. Aufbauend auf Untersuchungen des Hybridisierungsverhaltens von Oligonukleotiden an immobilisierten Oligonukleotiden von Kleinjung et al. [1997] wurden Vorversuche durchgeführt. Am Beispiel des SNPs im SULT1A1-Gen [Engelke et al., 2000] sollte geklärt werden, ob sich solche Stabilitätsunterschiede an der Oberfläche durch eine kinetische Auswertung detektieren lassen und ob sie geeignet sind, Einzelbasenpaar-mis-Matche auch bei PCR-Produkten zu analysieren.

Oligonukleotide als Analyt

Mit Hilfe des faseroptischen Affinitätssensors wurden Hybridisierungsversuche von fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden an immobilisierten Oligonukleotiden durchgeführt. Getestet wurde das Oligonukleotid 4 (Biotin-5'-TTG GGC ACT CCC T, siehe S. 43), das an einer Streptavidin-beschichteten Faser immobilisiert wurde. Für die Hybridisierung kamen in PBS-Puffer gelöste, FITC-markierte Oligonukleotide (9, 10, Negativkontrolle FITC-rPRM) zum Einsatz. An der Oberfläche entsteht durch Hybridisierung somit bei den Sonden 9 bzw. 10 ein Hybrid (13mer), an der Negativkontrolle sollte keine Bindung der FITC-Sonde stattfinden. Nach der Dissoziation wurde eine Kurvenanpassung der Dissoziationskurven mit dem Programm „xfit“ durchgeführt. In Abbildung 3.1 ist die Hybridbildung schematisch dargestellt, in Abbildung 3.2 sind die Kurven der Experimente sowie deren k_D -Werte aufgeführt.

Die Kurven der Hybride in Abbildung 3.2 unterscheiden sich deutlich sowohl in ihrer Fluoreszenzintensität während der Dissoziationphase als auch im Kurvenabfall, was sich

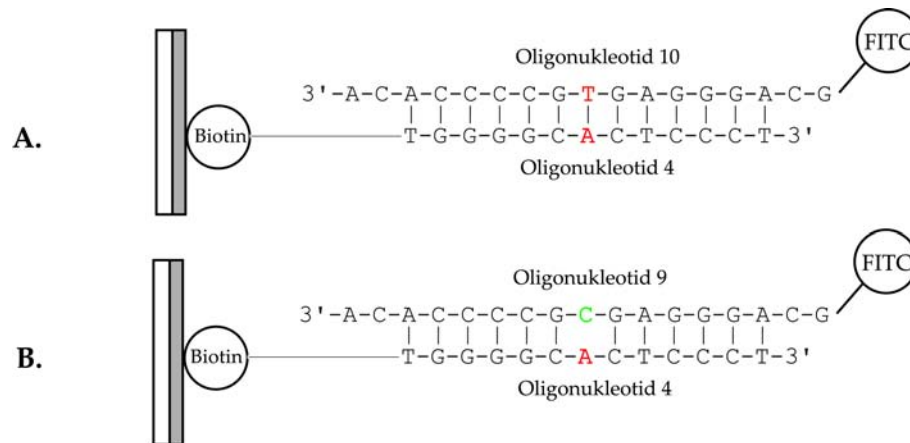


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung eines full-Match (A.) und eines mis-Match-Hybrids (B.) an der Glasfaser. Die rot bzw. grün markierten Basen zeigen die Position des SNP an.

in unterschiedlichen k_D -Werten zeigt. Die Kurve der Negativkontrolle weist nach der Hybridisierungsphase keine nennenswerte Fluoreszenzintensität auf. Sie fällt sofort nach Entfernen der überschüssigen Sonde auf den Ausgangswert zurück. Außerdem ließ sich k_D nicht bestimmen.

Weitere Experimente an verschiedenen Fasern zeigten, dass die Ergebnisse der Kurvenanpassung reproduzierbar sind, da sich mis- von full-Match-Werten stets signifikant unterscheiden (siehe Tabelle 3.1). Des weiteren ist aus Abbildung 3.3 und den k_D -Werten aus Tabelle 3.1 ersichtlich, dass auch eine Regeneration der Faseroberfläche möglich ist, sodass mehrere Hybridisierungsexperimente nacheinander an ein und derselben Faser durchgeführt werden können.

Der Verlauf der in Abbildung 3.2 dargestellten Kurven und die ermittelten k_D -Werte erwiesen sich als typisch für die Dissoziation von Oligonukleotid-Hybriden an Oberflächen.

Hybrid	Länge des Hybrids (Bp)	immobilisiertes Oligonukleotid	Sonde	k_D (10^{-4}s^{-1})		$\frac{k_D(mm)}{k_D(fm)}$
				Einzelwerte	Mittelwert	
separate Faser:						
mis-Match	13	4	9	2,4		3,4
full-Match	13	4	10	0,7		
einzelne Faser (Oberfläche regeneriert):						
mis-Match	13	4	9	4,3		2,0
				4,2	4,4	
				4,6		
full-Match	13	4	10	2,3		
				2,2	2,2	
				2,2		

Tabelle 3.1: Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten von Glasfaserexperimenten; mit hoher Belegungsdichte, gefittet nach Kleinjung [1998]

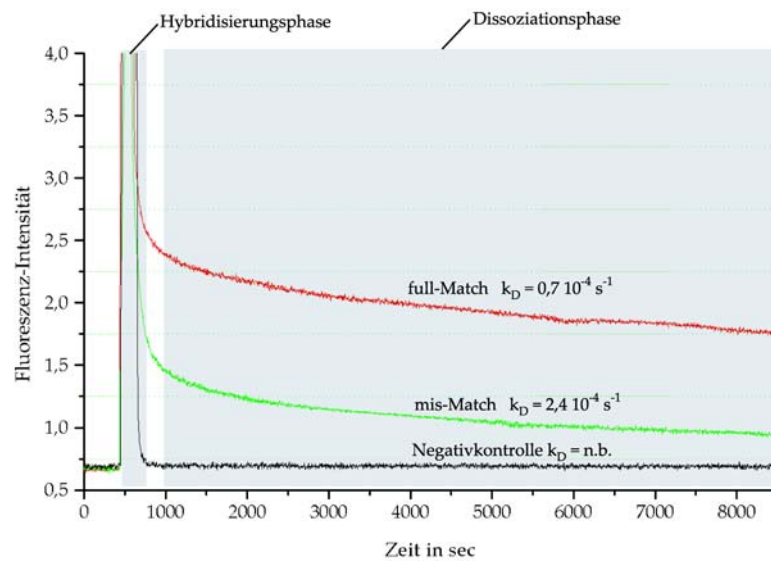


Abbildung 3.2: Hybridisierungsexperimente mit Oligonukleotiden am Affinitätssensor: Zeit-Fluoreszenzintensität-Kurven von Hybridisierungsexperimenten mit Oligonukleotiden. Rot kennzeichnet die Dissoziationskurve des full-Match-Hybrids, grün die eines mis-Match-Hybrids und schwarz die der Negativkontrolle.

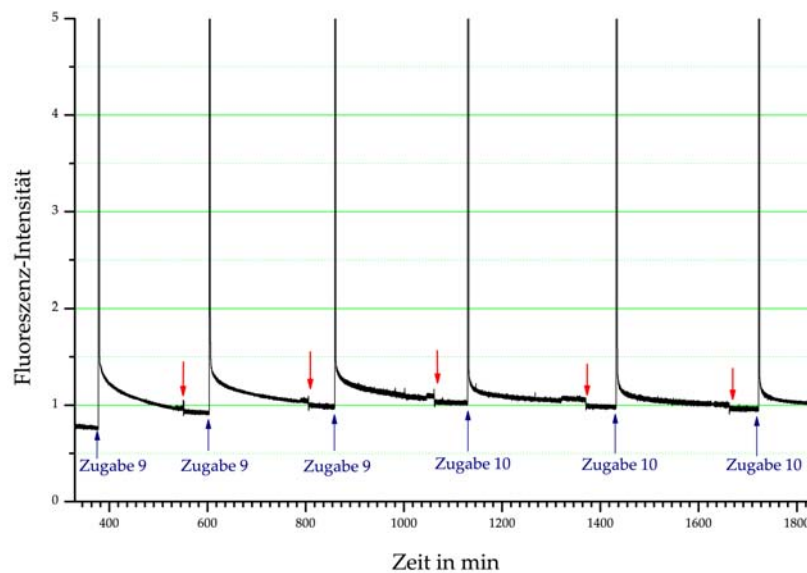


Abbildung 3.3: Zeit-Fluoreszenzintensität-Kurven mehrerer Hybridisierungen von Oligonukleotiden am Affinitätssensor. Die FITC-Sonden 9 und 10 wurden nacheinander über eine Streptavidin-Faser geleitet. Rote Pfeile zeigen die Zugabe von 90°C heißem PBS-Puffer an, mit dem 60 s gespült wurde. Anschließend wurde wieder auf Puffer mit Raumtemperatur umgestellt. Blaue Pfeile weisen auf die Zugabe der jeweiligen Sonde hin.

Zusammenfassend kann man sagen, dass mis-Match- und full-Match-Hybride an Oberflächen ein unterschiedliches Dissoziationsverhalten zeigen. Die geringere Stabilität des mis-Match-Hybrids im Vergleich zum full-Match-Hybrid drückt sich in einer signifikant höheren Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_D aus. Da die Dissoziation temperaturabhängig ist, wurden die Versuche bei stabiler Temperatur durchgeführt.

PCR-Produkte als Analyt

Nach den Vorversuchen zur Hybridisierung von Oligonukleotiden sollten nun PCR-Produkte bekannter Genotypen am immobilisierten Oligonukleotid 4 (13 Basen, Sequenz siehe 2.2, S. 43) hybridisiert werden. Dazu trennte man die PCR-Produkte durch Erhitzen auf 95°C in die Einzelstränge, kühlte mit Eis und mischte das Ganze mit einem FITC-Oligonukleotid (11, Sequenz siehe 2.2, S. 43). Anschließend wurde die Mischung über die mit Fänger-Oligonukleotid 4 beschichtete Faser gegeben. Oligonukleotid 11 hybridisierte ebenfalls am PCR-Produkt, jedoch zwei Basen entfernt vom Hybrid (siehe Abbildung 3.4). Es diente der Fluoreszenzmarkierung des hybridisierten PCR-Einzelstranges.

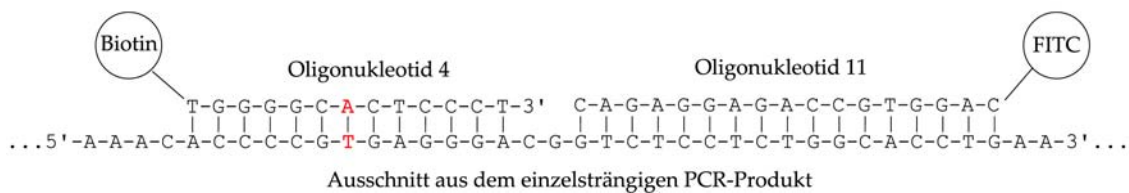


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der Hybridisierung der Oligonukleotide 4 (immobilisiert) und 11 (FITC-markiert) mit einem einzelsträngigen PCR-Produkt. Die rot markierten Basen zeigen die Position des SNP an.

Nach der Kurvenanpassung der Fluoreszenzintensität–Zeit–Kurven wurden die in Abbildung 3.5 aufgeführten k_D -Werte bestimmt, die wie bei der Hybridisierung der Oligonukleotide deutliche Unterschiede zwischen full- und mis-Match-Hybrid zeigen ($k_{D(mm)}/k_{D(fm)} = 4,4$).

3.2 Etablierung und Optimierung des SNP-Chips

Nach den erfolgreichen Versuchen am Affinitätssensor sollte der Versuchsablauf von der Faser auf die Chip-Oberfläche transferiert werden. Zunächst wurden Oligonukleotide auf Oberflächen gespottet, an denen Hybridisierungsexperimente mit Fluoreszenzsonden durchgeführt wurden. Für die Versuche kam der Durchfluss-Biochip-Scanner zum Einsatz. Anschließend wurde der experimentelle Ansatz auf PCR-Produkte übertragen. D.h. PCR-Produkte wurden an die Oberfläche gekoppelt, der ungebundene Gegenstrang entfernt und danach eine Fluoreszenzsonde hybridisiert. Ziel war es, mit Hilfe der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante mis-Match- und full-Match-Hybride zu detektieren.

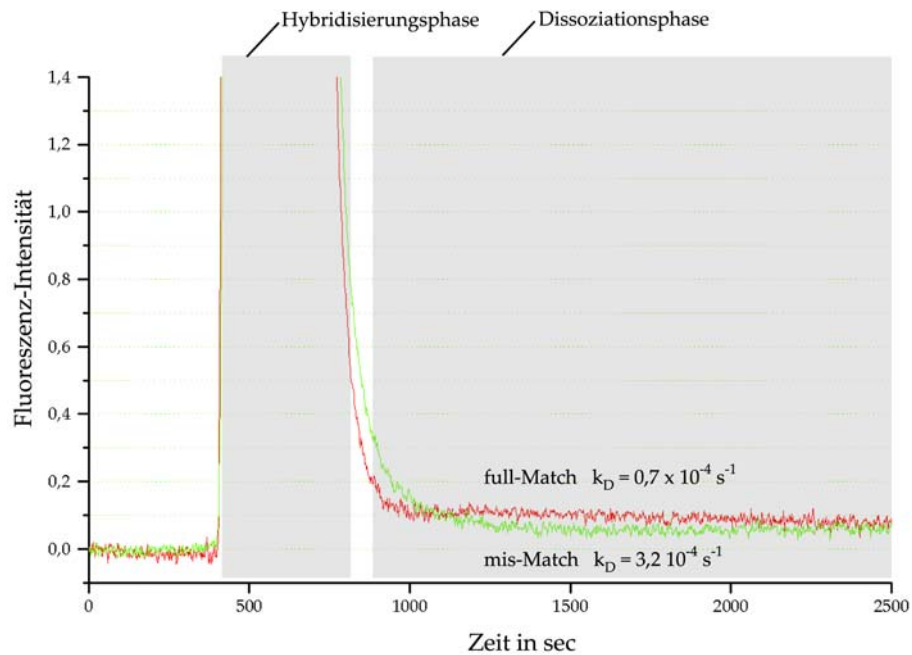


Abbildung 3.5: Hybridisierungsexperiment mit PCR-Produkten am faseroptischen Affinitäts-sensor. Zeit-Fluoreszenzintensität-Kurven von Hybridisierungsexperimenten mit PCR-Produkten. Rot kennzeichnet die Dissoziationskurve des full-Match-, grün die eines mis-Match-Hybrids.

Die Optimierung des Versuchsansatzes umfasste die Sondenlänge, die Spotting-Puffer, die Oberflächenmodifizierung, die Reaktionstemperatur sowie die Auswertung der Fluoreszenz-Intensität bzw. der kinetischen Daten.

3.2.1 Optimierung der Hybridlänge

Da die Stabilität der an der Oberfläche gebildeten full- bzw. mis-Match-Hybride untersucht werden soll, muss die für die Diskriminierung geeignete Hybridlänge ermittelt werden. Üblicherweise wird für die Optimierung die Länge der Fluoreszenzsonde variiert. In den durchgeführten Experimenten wurde allerdings die Länge der gespotteten Oligonukleotide verändert und stets die gleiche Fluoreszenzsonde verwendet. Die Versuchsergebnisse können jedoch auf die Sondenlänge übertragen werden, da das entstehende Hybrid an der Oberfläche und dessen Dissoziation von Interesse ist und nicht die Sonde selbst.

Um nun festzustellen, wie viele bindende Basenpaare ein Hybrid haben muss, um eine Diskriminierung zwischen full-Match und mis-Match zu erlauben, wurde folgendes Experiment durchgeführt: Man spottete Oligonukleotide mit jeweils 13, 15 und 17 Basenpaaren Länge (3, 4, 5, 6, 7, 8; Sequenz siehe 2.2, S. 43) auf einen Avidin-Chip und führte ein Hybridisierungsexperiment mit der Fluoreszenz-Sonde Cy5_04 am Durchfluss-Biochip-Scanner durch.

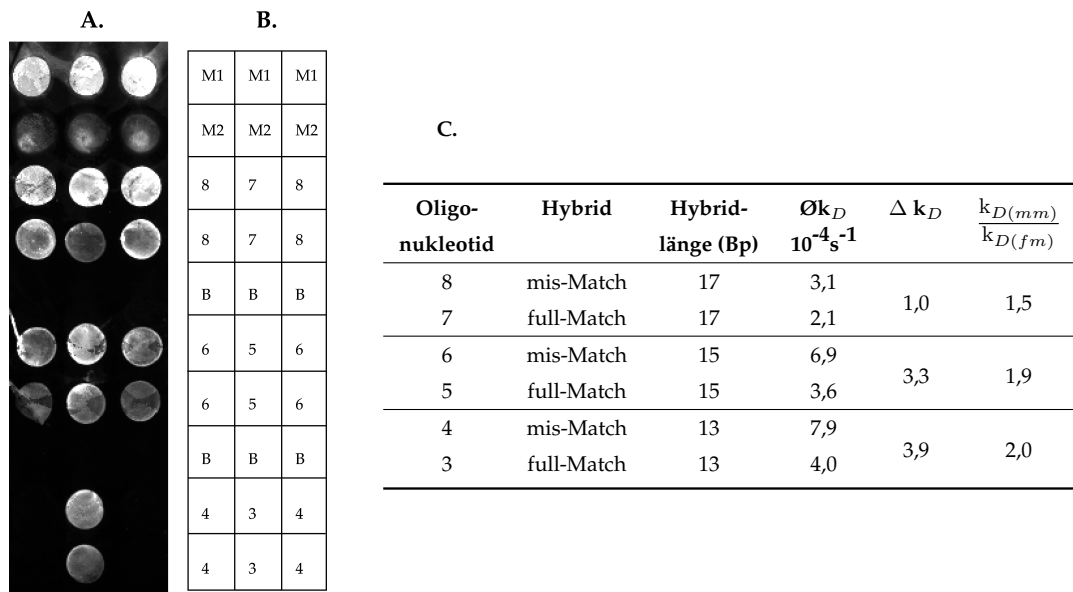


Abbildung 3.6: Optimierung der Hybridlänge. **A.** ArrayWoRx-Bild eines Oligonukleotid-Arrays auf einem Avidin-Chip, aufgenommen nach Hybridisierung mit Cy5_4 und Dissoziation am Durchfluss-Biochip-Scanner. **B.** Spottingmuster: 3-8 biotinylierte Oligonukleotide ($1 \mu M$); M1/M2 5'-Cy5-markiertes und 3'-biotinyliertes Markeroligonukleotid (M1 = $1 \mu M$, M2 = 500 nM); B Negativkontrolle (PRM5b, $1 \mu M$). **C.** Tabellarische Übersicht über den Mittelwert der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten der Spots aus A.

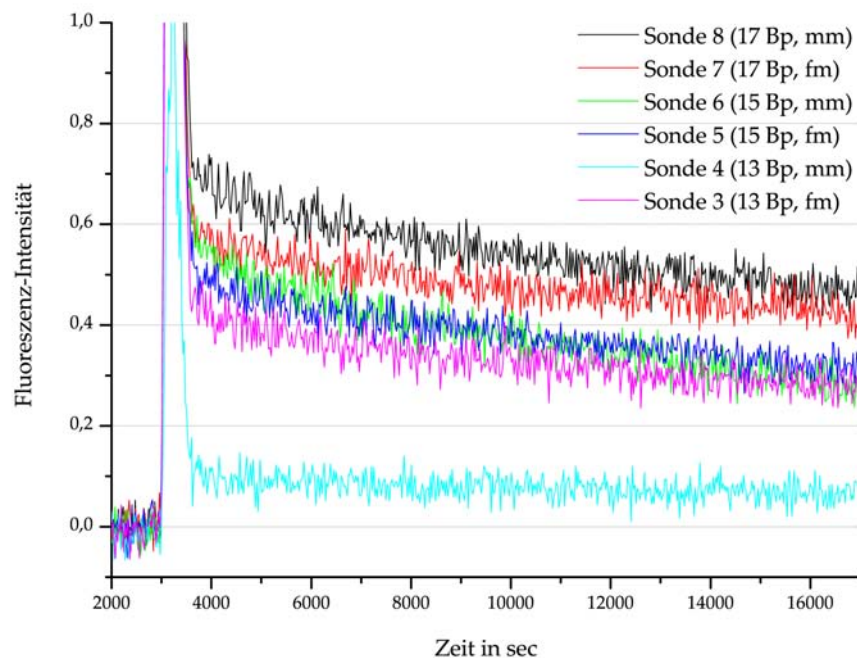


Abbildung 3.7: Fluoreszenzintensität-Zeit-Kurven der DNA-Hybride aus Abbildung 3.6.

In Abbildung 3.6 ist ein Bild des Arrays nach Versuchsende, das Spottingmuster sowie eine Übersicht über die ermittelten k_D -Werte dargestellt. Wie schon bei den Vorversuchen am Affinitätssensor zeigen sich auch hier signifikante Unterschiede in den k_D -Werten von full- und mis-Match-Hybriden. Weiterhin ist erkennbar, dass mit abnehmender Länge der Sonden die k_D des mis- und full-Matches größer wird. Dieser Zusammenhang ist plausibel, da die Stabilität des Hybrids abnimmt, je geringer die Anzahl der bindenden Basenpaare ist. Somit muss k_D größer werden, je geringer die Länge der Sonde ist, d.h. je weniger Basen binden können.

Ziel ist es, ein möglichst großes Verhältnis bzw. Quotienten von den k_D -Werten des full-Match und mis-Match zu erreichen. Beim Vergleich der k_D -Werte in Abbildung 3.6 C. zeigt sich, dass das bei den Sonden 3 und 4 mit 13 Nukleotiden der Fall ist. Des weiteren fällt bei der visuellen Auswertung des Arrays in Abbildung 3.6 bzw. der Kurven in Abbildung 3.7 auf, dass die verbliebene Fluoreszenzintensität bei Spots der Sonde 4 (mis-Match, 13mer) im Vergleich zu Sonde 6 (mis-Match, 15mer) sehr gering ist. Bei der Verwendung von 13meren als Sonden ist es also möglich, sowohl eine kinetische Auswertung des Kurvenverlaufs der full- und mis-Match-Hybride, als auch eine Auswertung der Fluoreszenzintensität der beiden Fälle durchzuführen. Daher wurde mit Hybridisierungssonden von 13 Basen Länge weiter gearbeitet.

3.2.2 Affine und kovalente Kopplung von PCR-Produkten

Für die Kopplung der PCR-Produkte an Glas-Oberflächen wurden sowohl affine als auch kovalente Kopplungsmethoden auf ihre Eignung für spätere Hybridisierungsexperimente getestet. Gekoppelt wurden PCR-Produkte aus dem SULT1A1-Gen (226 Bp), die durch einen biotinylierten Vorwärts- und phosphorylierten Rückwärts-Primers markiert wurden.

Zum Einsatz kamen Avidin-, Streptavidin- und NeutrAvidin-beschichtete Oberflächen. Die Avidin-Biotin-Bindung ist eine der stärksten bekannten affinen Bindungen (K_D von 10^{-15} mol/l [Lottspeich and Zorbas, 1998]). Dank dieser hohen Bindungskonstanten kann man biotinylierte DNA an mit Avidin beschichtete Flächen binden. Da Avidin jedoch positiv geladen ist - der isoelektrische Punkt liegt bei 10,5 - kann es durch unspezifische Wechselwirkungen zu einem verstärkten Hintergrundsignal kommen. Deshalb wurden die weniger geladenen Avidinanaloga Streptavidin und NeutrAvidin ebenfalls eingesetzt.

Auf Streptavidin-, Avidin- oder NeutrAvidin beschichteten Chips wurden biotinylierte PCR-Produkte unterschiedlicher Konzentration (siehe Tabelle 2.9, S. 54), eine Positivkontrolle für ein full-Match-Hybrid und für ein mis-Match-Hybrid immobilisiert (Muster siehe Tabelle 3.2). Als Negativkontrolle kam der biotinylierte Primer PRM5b (Position a3) und als Positionsmarker CH1 in der Reihe 1 zum Einsatz. Nach kurzem Waschen mit HEN-Puffer wurden die Chips in den Durchfluss-Biochip-Scanner eingelegt und mit der Fluoreszenz-Sonde Cy5_3 hybridisiert (Zeitplan und Ablauf der Messung siehe Tabelle 2.7, S. 51). In Abbildung 3.8 sind ArrayWoRx-Bilder der Chips dargestellt.

Zusätzlich wurde die kovalente Immobilisierungsmethode mit EDC/Methylimidazol (siehe 2.2.7, S. 54) getestet. Dabei wird die endständige Phosphatgruppe der PCR-Produkte durch EDC aktiviert. Methylimidazol stabilisiert die reaktiven Zwischenpro-

dukte. Anschließend tropfte man die aktivierte DNA auf Chip-Oberflächen. Für den Test der kovalenten Kopplung wurden auf silanisierte Chips die mit EDC/ Methylimidazol aktivierten PCR-Produkte, Hybridisierungskontrollen sowie Marker (CH3) im gleichen Muster wie bei der affinen Kopplung gespottet (siehe Tabelle 3.2). Nach Blocken der Oberfläche mit Bernsteinsäureanhydrid und Dichlorethan [Diehl et al., 2001] wurden ebenfalls am Durchfluss-Biochip-Scanner die gespotteten PCR-Produkte mit der Sonde Cy5_6 hybridisiert und 90 Minuten dissoziiert.

M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
M25	W25	M50	W50	M100	W100	M250	W250	M500	W500	M1000	W1000
B	W25	FM	W50	M100	W100	M250	W250	M500	MM	M1000	W1000
M25	W25	M50	W50	M100	W100	M250	W350	M500	W500	M1000	W1000

Tabelle 3.2: Spotting-Muster für die Optimierung der Oberflächenmodifikation. M kennzeichnet einen Positionsmarker (CH1, CH3), B eine Negativkontrolle, FM ist die Hybridisierungskontrolle für das full-Match-Hybrid (b12_3,p12_3), MM für das mis-Match-Hybrid (b12_4, p12_4). Alle anderen Spots (W25-W1000, M25-W1000) sind gereinigte PCR-Produkte. Gespottet wurde mit dem TopSpot /M.

Alle Chips weisen detektierbare Spots nach Hybridisierung und Dissoziation auf. Beim Vergleich der in Abbildung 3.8 aufgeführten Arrays wird jedoch deutlich, dass es große Unterschiede in der Homogenität der Spots sowie im Signal-Rausch-Verhältnis gibt.

Auch die kovalent gekoppelten PCR-Produkte ergeben erkennbare Spots nach Hybridisierung und Dissoziation, jedoch nur bei sehr hohen Konzentrationen an PCR-Produkt (D., Spalte k und l).

Rein visuell hinterlässt der mit NeutrAvidin beschichteten Chip den besten Eindruck. Die Spots zeichnen sich durch eine gleichmäßige Verteilung der DNA über die gesamte Spotfläche aus. Überdies ist das Hintergrundrauschen im Vergleich zu den anderen Chips sehr gering. Full-Match-Hybride können bereits durch ihre größere Fluoreszenzintensität von mis-Match-Hybriden unterschieden werden (vgl. Abb. 3.8 C, Spalte g: mis-Match und h: full-Match).

Aus diesem Grund kam bei weiteren Versuchen NeutrAvidin als Oberflächenmodifikation zum Einsatz.

3.2.3 Spotting-Puffer

Für eine gleichmäßige Verteilung von PCR-Produkten an Oberflächen ist es notwendig, den für das Betropfen der Chips erforderlichen Spotting-Puffer zu optimieren. Um die negative Ladung des DNA-Rückgrats auszugleichen, werden meist Puffer mit stabilisierenden Salzen verwendet. Setzt man einen ungeeigneten Spottingpuffer ein, kann das zu „Doughnut“-Effekten, deformierten Spots oder anderen Artefakten führen.

Für das Spotten von Nukleinsäurelösungen auf Proteinoberflächen (NeutrAvidin) wurden folgende Lösungen getestet: HEN-Puffer (0,1 M HEPES, 10 mM EDTA, 50 mM NaCl nach Jobs et al. [2002]), 3× SSC-Puffer, 3× SSC-Puffer mit 1,5 M Betain [Diehl et al., 2001] und Wasser. Es wurden PCR-Produkte, Hybridisierungskontrollen (b12_3, b12_4), Nega-

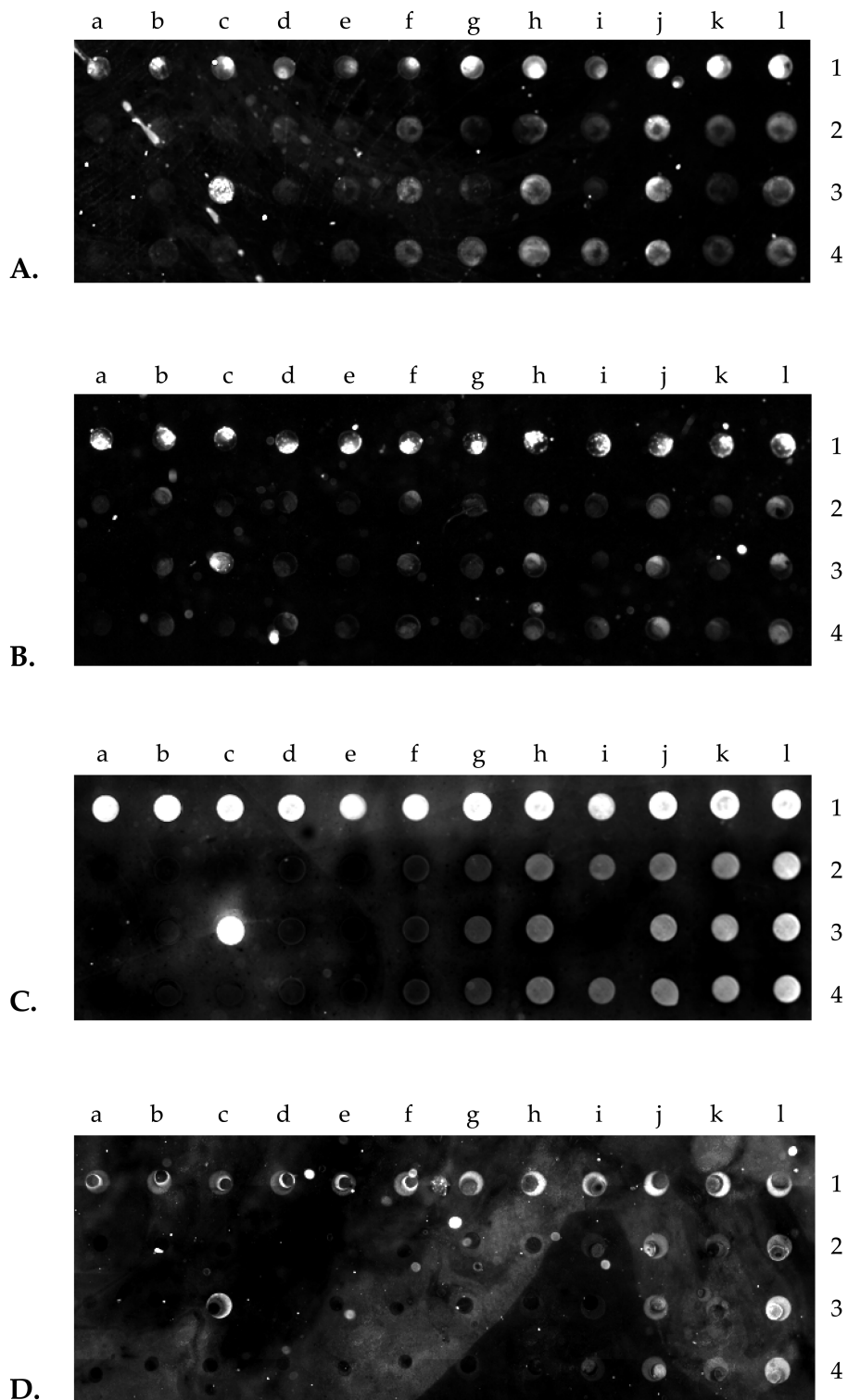


Abbildung 3.8: Test verschiedener Oberflächenmodifikationen für Hybridisierungsexperimente an PCR-Produkten. ArrayWoRx-Bild von Chips mit unterschiedlicher Kopplung nach Hybridisierung und Dissoziation am Durchfluss-Biochip-Scanner: Gereinigte PCR-Produkte unterschiedlicher Konzentration ($25\text{-}1000\text{ ng}/\mu\text{l}$) wurden mit dem TopsSpot /M gespottet. **A.** Avidin **B.** Streptavidin **C.** Neutravidin **D.** EDC/Methylimidazol

tivkontrollen (PRM5b) sowie das Lösungsmittel selbst gespottet.

Wie aus Abbildung 3.9 ersichtlich ist, führt der Einsatz der Lösungsmittel zu großen Unterschieden in Spotform, -homogenität und -Fluoreszenzintensität. Fehlen die stabilisierenden Salze (Lösungsmittel Wasser), ist die Verteilung der DNA in einem Ring um die eigentlichen Spots zu beobachten. In diesem Extremfall ist die Auswertung der Fluoreszenzintensität nicht möglich. Bei der Verwendung von 3× SSC bilden sich verstärkt Kristalle. Wird dieser Lösung jedoch Betain zugesetzt, zeigen sich keine Kristalle mehr. Eine ebenfalls gleichmäßige Verteilung der DNA kann man bei Spots beobachten, die mit HEN-Puffer gespottet wurden. In Abbildung 3.10 wurde die Fluoreszenzintensität der Spots gemittelt und gegeneinander aufgetragen. Da die Konzentration der PCR-Produkte in jedem Spot gleich war, lässt sich ihre Fluoreszenzintensität direkt vergleichen.

Man kann erkennen, dass bei allen Spots trotz unterschiedlicher Homogenität das full-Match-Hybrid stets eine größere Fluoreszenzintensität aufweist als das mis-Match-Hybrid. Beim HEN-Puffer und SSC mit Betain zeigt sich jedoch, dass die Differenz wesentlich größer ist als bei den beiden anderen Lösungsmitteln. Da der HEN-Puffer die größte Fluoreszenzintensität bei sehr guter Spothomogenität aufweist, wurde mit diesem Puffer weiter gearbeitet.

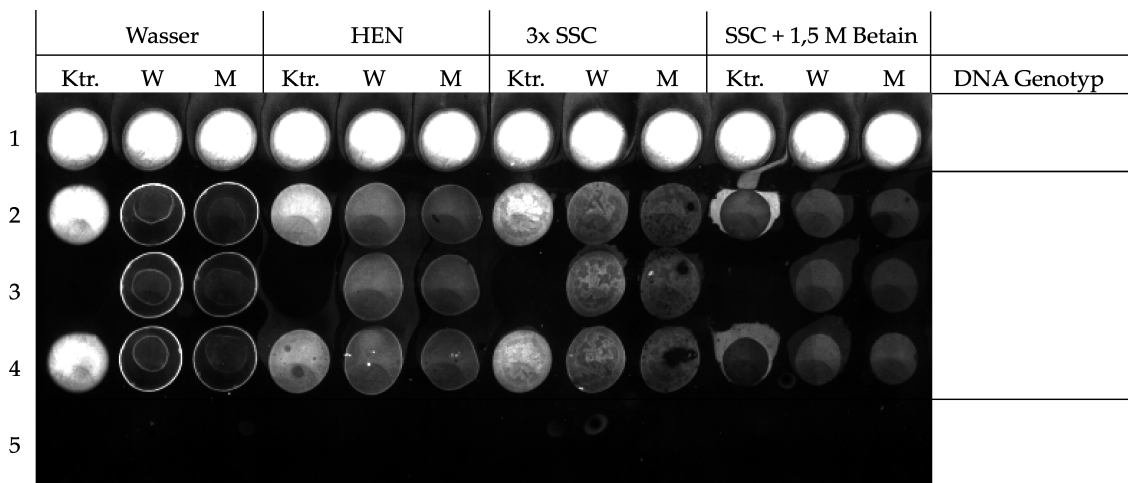


Abbildung 3.9: ArrayWoRx-Bild des Tests verschiedener Lösungsmittel als Spottingpuffer für PCR-Produkte. Gereinigte PCR-Produkte (250 ng/ μ l) wurden mit dem Nanoplotter gespottet.

3.2.4 Konzentration der PCR-Produkte

Hier sollte die optimale Spotting-Konzentration der zu immobilisierenden PCR-Produkte ermittelt werden. Ziel war es, möglichst wenig DNA einzusetzen, um Materialverbrauch sowie Arbeitszeitbedarf und somit die Analysekosten gering zu halten.

Es wurden NeutrAvidin-Chips mit Lösungen von 25 bis 1000 ng/ μ l biotinyliertem PCR-Produkt (siehe Tabelle 2.9, S. 54) nach dem in Tabelle 3.2 aufgeführtem Muster bespottet. Nach kurzem Waschen mit HEN-Puffer wurde der Chip in den Durchfluss-Biochip-Scanner gelegt, kurz mit 0,1 M NaOH gespült, mit der Fluoreszenz-Sonde Cy5_3 hybridisiert und dissoziiert.

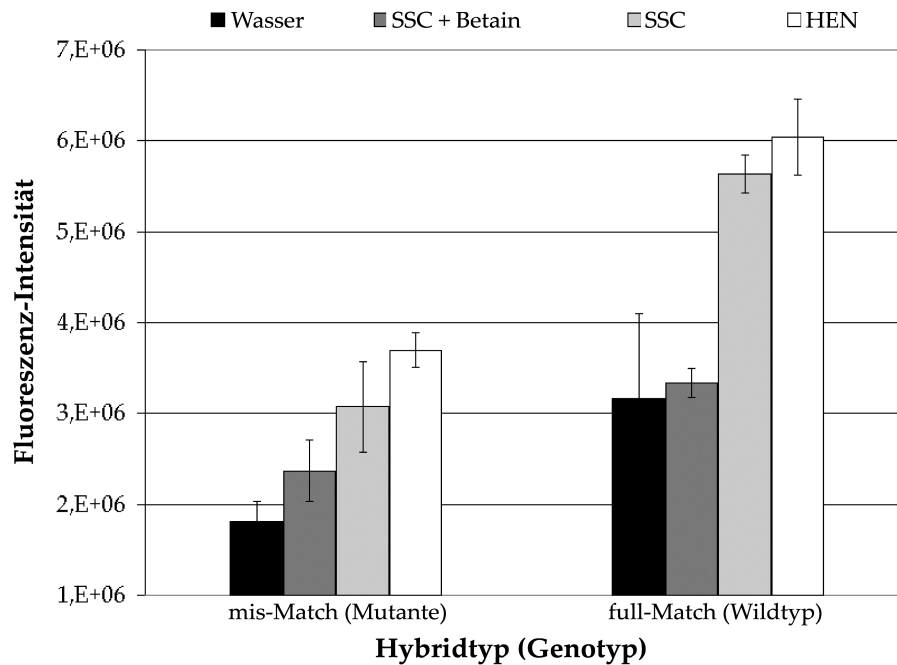


Abbildung 3.10: Diagramm der gemittelten Fluoreszenzintensität der Spots verschiedener Spotting-Puffer. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung der gemittelten Spot-Intensität.

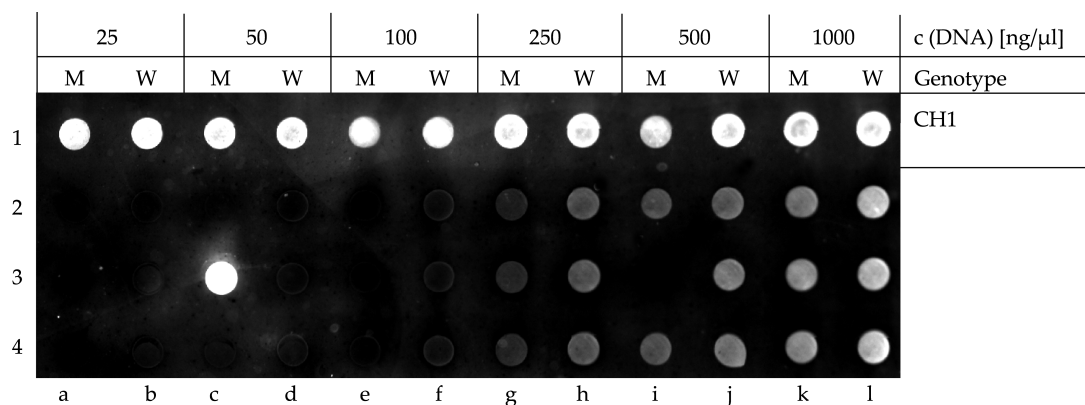


Abbildung 3.11: Optimierung der Spotting-Konzentration von PCR-Produkten. ArrayWoRx-Bild nach Hybridisierung und Dissoziation am Biochip-Scanner. In Reihe 1 wurden Cy5-Markeroligonukleotide (CH1) getropft, in a3 eine Negativkontrolle (PRM5b), in c3 die Positivkontrolle für das Full-Match-Hybrid (b12_3), in i3 für den mis-Match (b12_4).

Aus Abbildung 3.11 wird deutlich, dass bei einer Konzentration von 250 ng/ μ l eine Differenzierung von full- und mis-Match-Hybriden bereits visuell möglich ist. Tatsächlich zeigte sich sowohl bei der Fluoreszenzintensitäts-Auswertung als auch beim Vergleich der k_D -Werte (siehe Abbildung 3.12, B.), dass diese Konzentration des PCR-Produktes für die angestrebte Diskriminierung hinreichend optimal ist. Das Verhältnis $k_{D(mm)} / k_{D(fm)}$ wird mit zunehmender Konzentration größer.

Spots geringerer Konzentration weisen eine geringere Fluoreszenzintensität und geringere Unterschiede der k_D -Werte auf. Gegenüber Spots größerer Konzentration, die zwar auch gut unterscheidbare Geschwindigkeitskonstanten und Fluoreszenzintensitätswerte lieferten, jedoch eine größere Menge DNA erfordern - bis zu 1000 ng/ μ l -, kann bis zu 75 % des PCR-Produktes eingespart werden. Für weitere Versuche kamen also PCR-Produkt-Lösungen mit jeweils 250 ng/ μ l zum Einsatz.

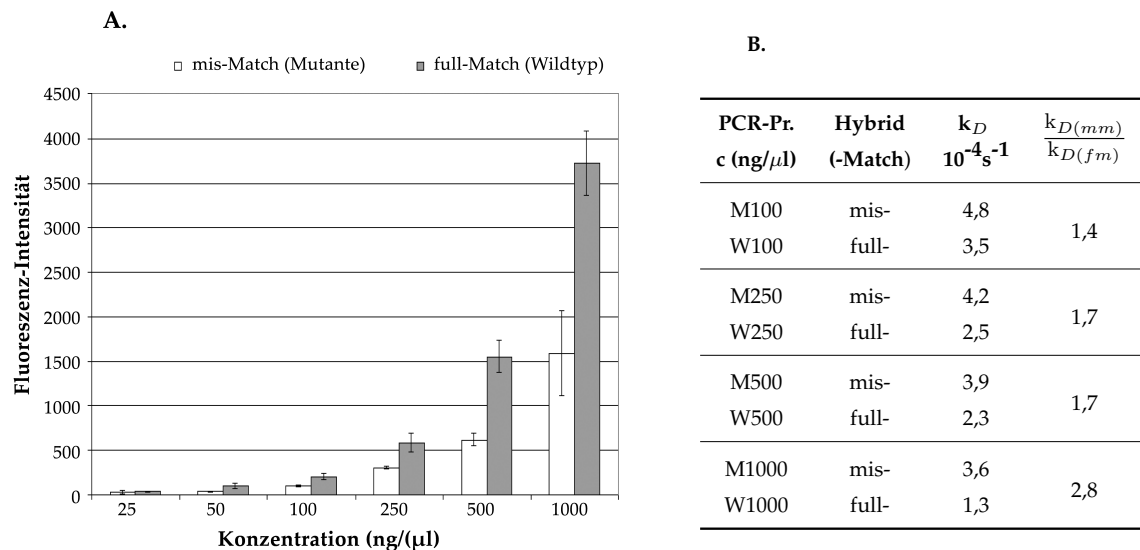


Abbildung 3.12: **A.** Konzentration–Fluoreszenzintensitäts–Diagramm zur Optimierung der Spotting-Konzentration von PCR-Produkten. Die Balken sind Mittelwerte der Fluoreszenzintensität von Spots gleicher Konzentration und gleichen Genotyps. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung vom Mittelwert dar. **B.** Übersicht über Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten der Spots von Reihe 4 aus Abbildung 3.11. Die Werte für W25, M25, W50 und M50 waren nicht bestimmbar.

3.2.5 Temperatur-Abhängigkeit

In den bisherigen Versuchen wurde ausschließlich mit homozygoter Wildtyp- bzw. Mutanten-DNA gearbeitet. Da bei einer Analyse realer Proben rein statistisch mit einem höheren Anteil an Patienten mit heterozygotem Genotyp zu rechnen ist als mit homozygotem mutanten Genotyp, wurde die Methode an diesen Fall angepasst. Ziel der Versuche war es, durch die Erhöhung der Reaktionstemperatur die Dissoziation der DNA-DNA-Hybride zu beschleunigen. Die Differenz zwischen den k_D -Werten der mis- und full-Match-Hybride sollte größer werden, da sich durch die erhöhte Temperatur eine Einzelbasenfehlpaarung stärker auf die Geschwindigkeitskonstante auswirkt als bei niedriger Temperatur.

Für die Versuche wurden die 500 nM Lösungen der Oligonukleotide b12_3 und b12_4 sowie eine Mischung der beiden im Verhältnis 1:1 (v/v) auf NeutrAvidin®-Chips gespottet. Die Mischung sollte die DNA eines heterocygoten Patienten simulieren. Der betroffene Chip wurde kurz mit HEN-Puffer gespült und am Biochip-Scanner mit der Fluoreszenz-Sonde Cy5_3 jeweils bei 25, 30 und 35 °C hybridisiert und dissoziiert. Anschließend wurden die k_D -Werte ermittelt.

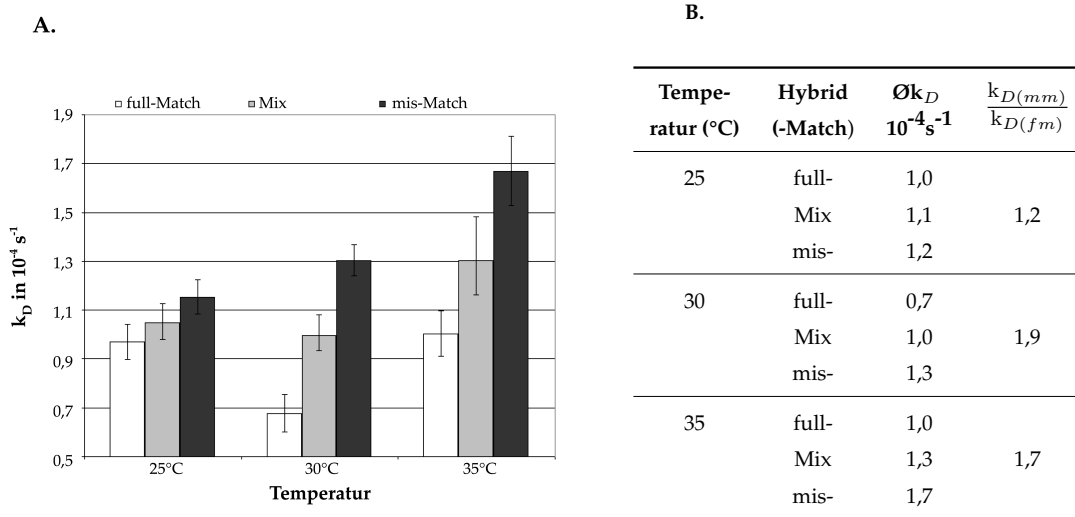


Abbildung 3.13: Übersicht über die Temperatur-Abhängigkeit der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante. **A.** Die Balken stellen jeweils den Mittelwert der Konstanten von neun Spots dar. Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung vom Mittelwert. **B.** Tabellarische Übersicht über die Konstanten des full-, mis-Match und Mix sowie das Verhältnis der Konstanten der full- und mis-Matche.

In Abbildung 3.13 sind die gemittelten k_D -Werte der Hybride aufgeführt. Es wurden jeweils die Werte von neun Spots gemittelt. Wie man aus dem Diagramm erkennen kann, nimmt die Differenz zwischen den Werten des full- und mis-Match-Hybrids bei erhöhter Temperatur zu. Der k_D -Quotient zwischen full- und mis-Match ist bei 30°C am größten.

In den folgenden Versuchen wird bei 30°C gearbeitet.

3.2.6 Zusammenfassung der Optimierung

In Abbildung 3.14 ist der Ablauf einer optimierten SNP-Analyse schematisch zusammengefasst. Aus genomischer DNA werden PCR-Produkte hergestellt, mit Ethanol/LiCl gefällt und in Wasser gelöst. Nach der Konzentrationsbestimmung wird ein bestimmtes Volumen der PCR-Produkt-Lösung abgenommen und das Lösungsmittel vollständig entfernt. Das getrocknete Produkt wird in soviel HEN-Puffer aufgenommen, dass man Lösungen mit einer Konzentration von jeweils 250 ng/ μ l erhält. Diese Lösungen werden zusammen mit Hybridisierungskontrollen sowie Negativkontrollen auf NeutrAvidin-Chips gespottet. Nach kurzem Waschen mit HEN-Puffer wird der entsprechende Chip in den Durchfluss-Biochip-Scanner eingelegt und die Hybridisierung sowie Dissoziation bei 30°C durchgeführt.

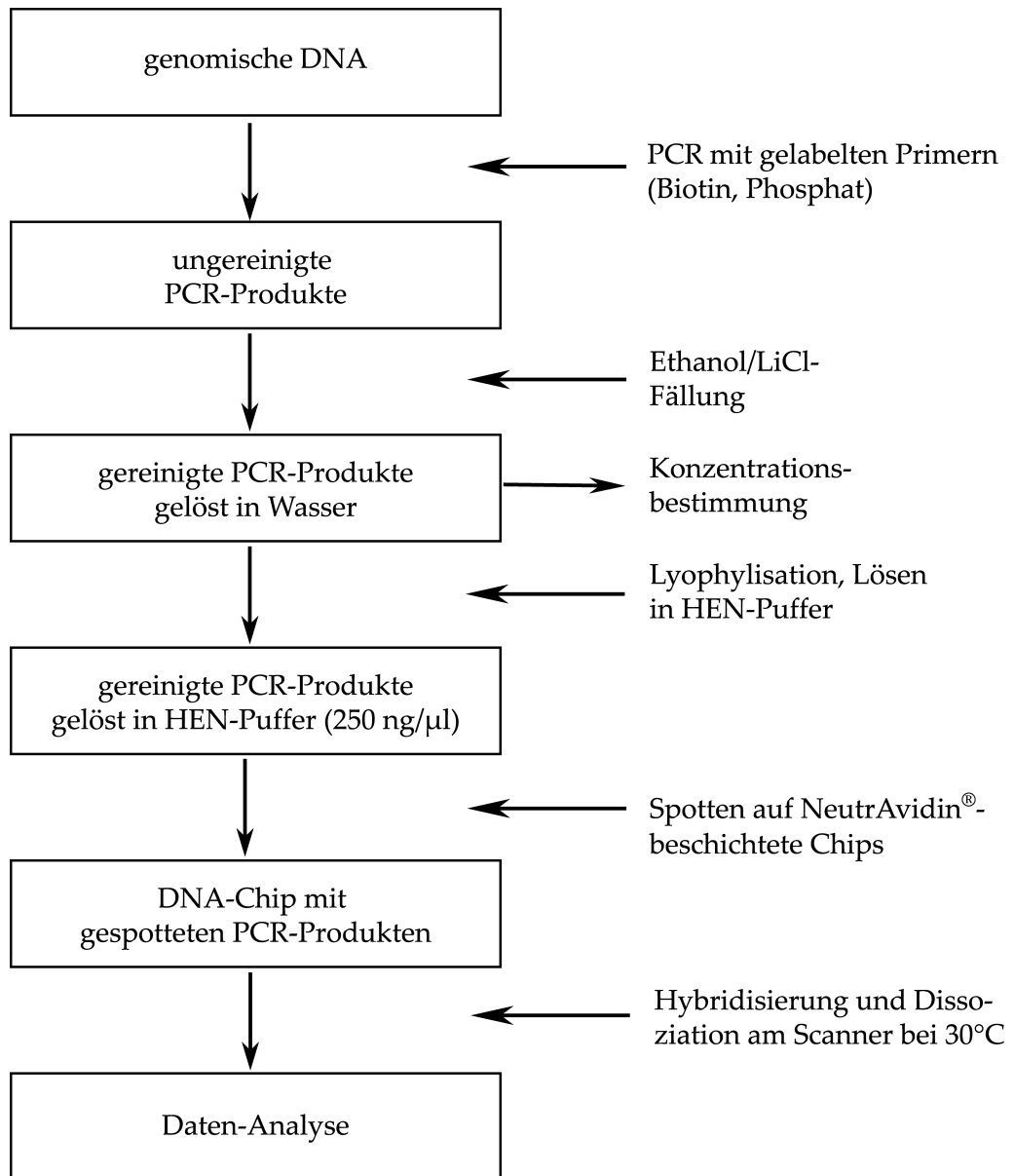


Abbildung 3.14: Schema der optimierten SNP-Analyse mit dem Durchfluss-Biochip-Scanner.

3.3 Ergebnisse der SNP-Analyse von Patientenproben

Nach der Optimierung der Parameter für die Analyse von SNPs auf DNA-Chips sollte die Methode nun auf Gruppen realer Patienten angewendet werden. Die erste Gruppe umfasste 24 homocygote Patientenproben, die auf einen SNP im SULT1A1-Gen untersucht werden sollten. Bei der zweiten sollten 92 Patienten auf drei SNPs in der Region des Adiponection-Promotors getestet werden.

3.3.1 SULT1A1-Gruppe

Ziel der Analyse war es, mit einem einzelnen DNA-Chip-Experiment 24 Proben genomischer DNA auf den Polymorphismus mit der dbSNP-ID rs1042028 (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/) im Gen der humanen Sulfotransferase SULT1A1 zu untersuchen. Bei den vorliegenden Proben handelte es sich ausschließlich um homocygote Wildtyp-DNA mit dem Genotyp GG oder Mutanten-DNA mit dem Genotyp AA. Heterocygote DNA wurde nicht untersucht.

Die Analyse wurde nach dem in Abbildung 3.14 aufgeführten Schema bei 25°C durchgeführt, da keine heterocygote DNA untersucht werden sollte. Beim Spotten der biotinylierten PCR-Produkte auf NeutrAvidin-Chips kam das in Tabelle 3.3 dargestellte Muster zum Einsatz. Jedes PCR-Produkt wurde mehrmals in verschiedenen Spots aufgetragen (je vier Spots bei 19 PCR-Produkten, je zwei Spots bei den restlichen 5 Patientenproben).

M	E01	E02	V02	O32	M	M	E01	E02	V02	O32	M
SU9	SU10	SU12	SU15	SU17	SU21	SU9	SU10	SU12	SU15	SU17	SU21
SU29	SU32	O30	SU11	SU19	SU22	SU29	SU32	O30	SU11	SU19	SU22
SU23	SU25	SU30	SU35	SU5	E03	SU23	SU25	SU30	SU35	SU5	E03
E04	103	B	b12_3	b12_4	E01	E04	103	B	b12_3	b12_4	E01
E02	V02	O32	SU9	SU10	SU12	E02	V02	O32	SU9	SU10	SU12
SU15	SU17	SU21	SU29	SU32	O30	SU15	SU17	SU21	SU29	SU32	O30
SU30	SU35	SU5	E03	E04	103	SU30	SU35	SU5	E03	E04	103

Tabelle 3.3: Spotting-Muster für den SULT1A1-Chip. Gespottet wurde mit dem TopSpot /M auf einen NeutrAvidin-Chip. M kennzeichnet einen Positionsmarker (CH1), B eine Negativkontrolle, b12_3 ist die Hybridisierungskontrolle für das full-Match-Hybrid, b12_4 für das mis-Match-Hybrid. Alle anderen Spots sind gereinigte PCR-Produkte der SULT1A1-Patientengruppe.

Nach Beendigung des Hybridisierungs- und Dissoziationsexperiments mit der Sonde Cy5_03 am Durchfluss-Biochip-Scanner wurden die trockenen DNA-Chips mit Hilfe des Biochip-Scanners ArrayWoRx gescannt. In Abbildung 3.15 ist das ArrayWoRx-Bild eines Chips nach der Hybridisierung und anschließender Dissoziation dargestellt.

Zur Analyse der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_D wurde eine Kurvenanpassung der Zeit-Fluoreszenzintensität-Kurven mit dem Programm „xfit“ durchgeführt. In Abbildung 3.16 ist eine Übersicht über diese Kurven aller 96 Spots des SULT1A1-Chips nach Beendigung des Experiments dargestellt.

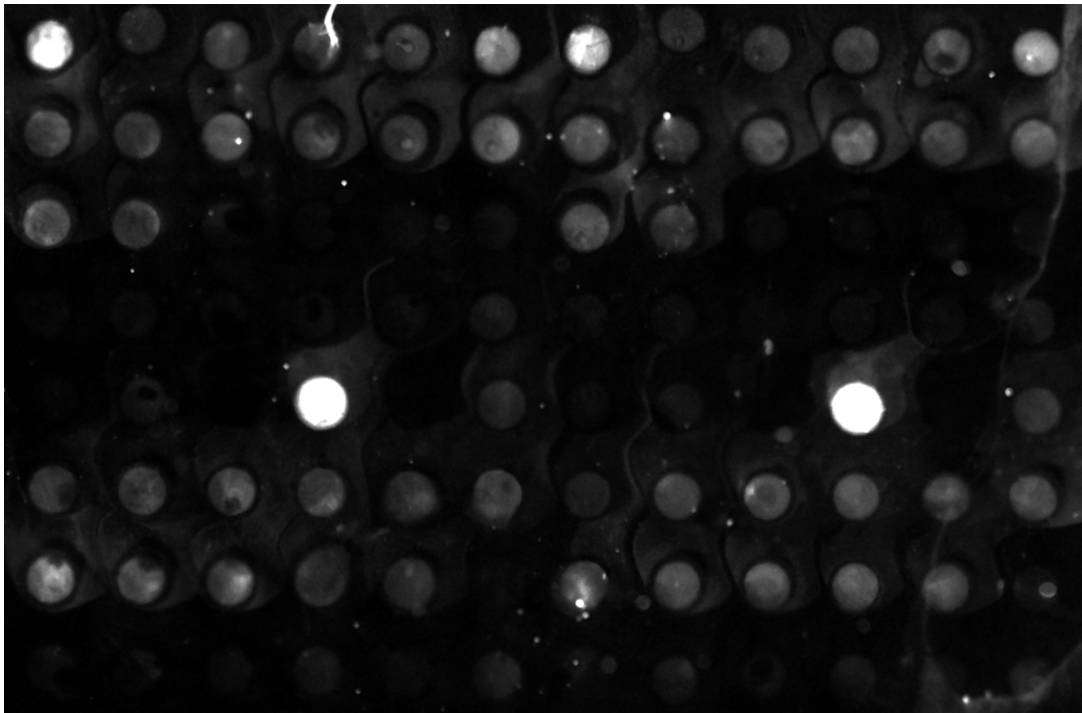


Abbildung 3.15: ArrayWorX-Bild nach Beendigung eines Hybridisierungs- und Dissoziationsexperiments eines DNA-Chips mit 24 Patientenproben. Es wurde das in der Abbildung 3.3 angegebene Spottingmuster verwendet.

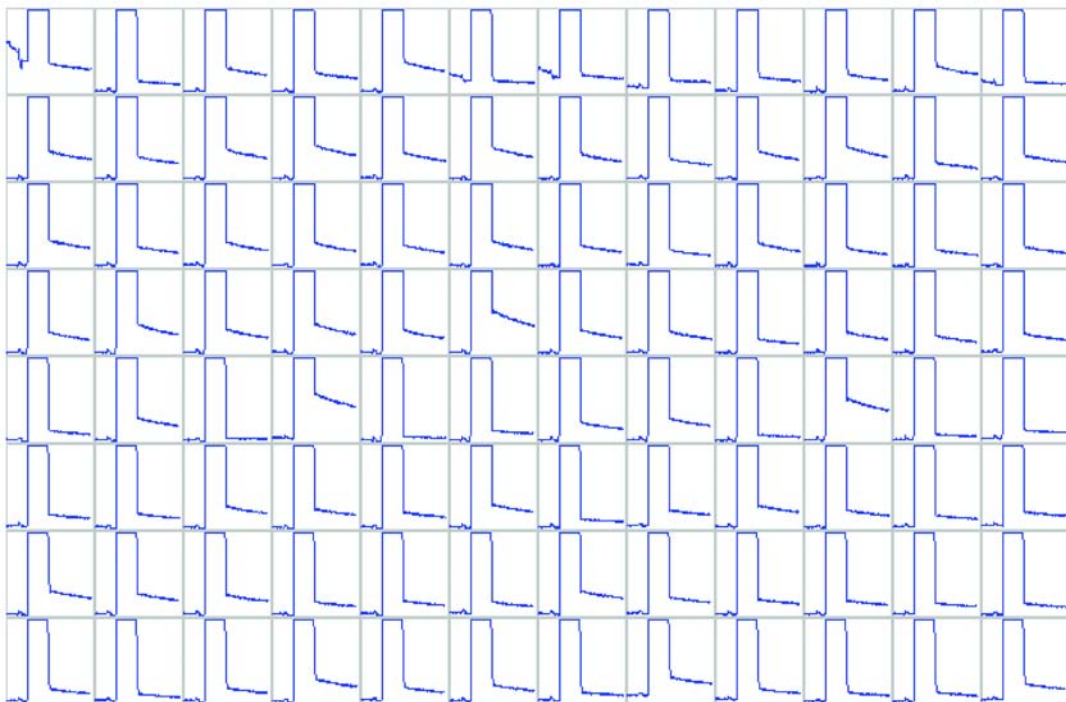


Abbildung 3.16: Übersicht über alle Zeit-Fluoreszenzintensität-Kurven eines SULT1A1-Chips im 8×12 -Format nach beendetem SNP-Hybridisierungsexperiment.

Durch den Einsatz eines Referenzverfahrens (Restriktionsverdau mit *Bsp143II*) war es möglich, die Ergebnisse der Biochip-Analyse zu verifizieren. Die Ergebnisse der Referenzanalyse sind zusammen mit den Ergebnissen der kinetischen Analyse und der Fluoreszenzintensitäts-Analyse in Tabelle 3.4, S. 76 aufgeführt. Die Restriktionsmuster von fünf Proben sind in Abbildung 3.17 beispielhaft dargestellt.

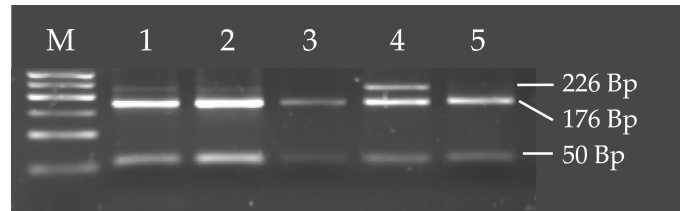


Abbildung 3.17: Restriktionsmuster von Proben im SULT1A1-Gen. M Marker mit DNA-Fragmenten bekannter Länge (GeneRuler 50 Bp DNA Ladder), 1 E01 → Wildtyp, 2 E02 → Wildtyp, 3 V02 → Wildtyp, 4 O32 → heterozygote Mutante, 5 SU9 → Wildtyp.

In Abbildung 3.18 sind die aufgeführten Mittelwerte der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten farblich nach full- (Wildtyp, weiße Balken) und mis-Match-Hybrid (Mutante, graue Balken) getrennt. Die eingetragenen Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der gemittelten k_D -Werte eines PCR-Produkts dar.

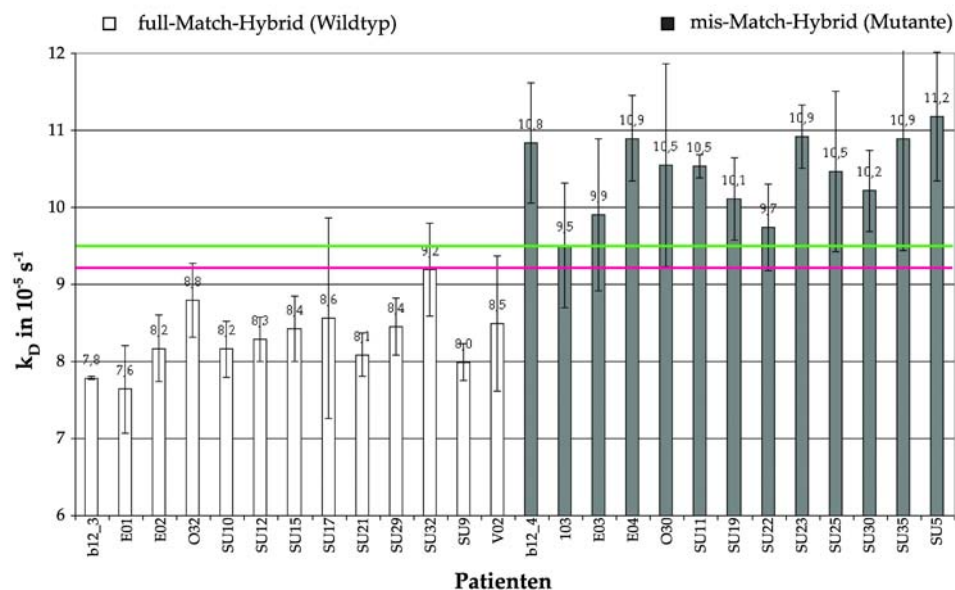


Abbildung 3.18: Übersicht über die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten des SULT1A1-Chips. Aufgetragen sind neben den Werten der Patienten auch die Hybridisierungskontrollen b12_3 und b12_4. Die eingetragenen Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung der gemittelten Konstanten. Die rote Linie zeigt die größte Fluoreszenzintensität der full-Match-Hybride, die grüne Linie die niedrigste der mis-Match-Hybride.

Die k_D -Werte der full-Match-Hybride unterscheiden sich deutlich von denen der mis-Match-Hybride. Die Analyse des Genotyps bei immobilisierten PCR-Produkten ist also mit Hilfe des Durchfluss-Biochip-Scanners möglich. Allerdings kommt es durch die Ab-

weichung vom Mittelwert zu Überschneidungen der Standardabweichungen (siehe Fehlerbalken und farbige Linien).

Zusätzlich wurde eine Analyse der Fluoreszenzintensität der einzelnen Spots mit Hilfe des Programms „ArrayWoRx Analysis Software“ durchgeführt. Die gemittelten Spot-Fluoreszenzintensität-Werte sind in Abbildung 3.19 aufgeführt. Hier wurden die full-Match-Hybride (weiße Balken) wie in Abbildung 3.18 farblich von den mis-Match-Hybriden (graue Balken) getrennt. Man kann erkennen, dass es hier nicht zu einer Überlappung der Standardabweichung kommt. Somit ist eine deutliche Unterscheidung zwischen den homocygoten Genotypen durch Fluoreszenzintensitäts-Analyse möglich.

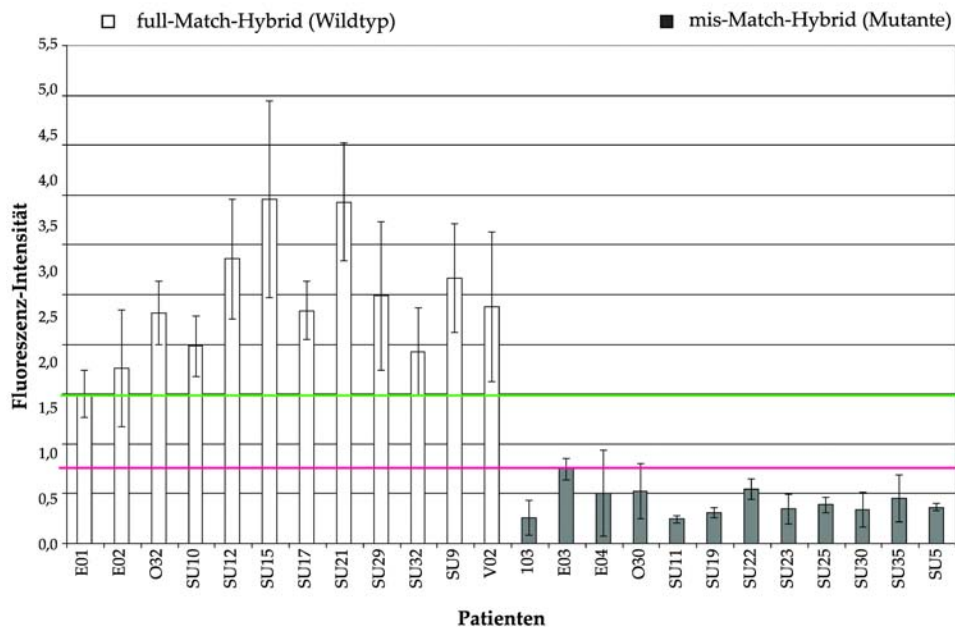


Abbildung 3.19: Übersicht über die ermittelte Fluoreszenzintensität der Spots des SULT1A1-Chips. Die eingetragenen Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung der gemittelten Konstanten. Die rote Linie zeigt den größten Wert der full-Match-Hybride an, die grüne Linie den unteren Wert der mis-Match-Hybride.

In Tabelle 3.4 sind die Resultate der Analyse der Patientengruppe zusammengefasst. Neben den Ergebnissen der Biochip-Experimente mit kinetischer und Fluoreszenzintensitäts-Analyse wurden auch die der Referenzmethode aufgeführt. Lediglich bei Probe O32 weicht der mit der Referenzmethode ermittelte Genotyp von dem ab, den man durch Biochip-Experimente erhielt. Bis auf einen Patienten (O32) konnten alle Ergebnisse aus den Biochip-Experimenten durch das Referenzverfahren bestätigt werden.

Nr.	Bezeichnung	Genotyp nach		
		kinetischer Analyse	Fluoreszenzintensitäts-Analyse	Referenzmethode RFLP
1	E01	GG	GG	GG
2	E02	GG	GG	GG
3	V02	GG	GG	GG
4	O32	GG	GG	GA
5	SU9	GG	GG	GG
6	SU10	GG	GG	GG
7	SU12	GG	GG	GG
8	SU15	GG	GG	GG
9	SU17	GG	GG	GG
10	SU21	GG	GG	GG
11	SU29	GG	GG	GG
12	SU32	GG	GG	GG
13	O30	AA	AA	AA
14	SU11	AA	AA	AA
15	SU19	AA	AA	AA
16	SU22	AA	AA	AA
17	SU23	AA	AA	AA
18	SU25	AA	AA	AA
19	SU30	AA	AA	AA
20	SU35	AA	AA	AA
21	SU5	AA	AA	AA
22	E003	AA	AA	AA
23	E004	AA	AA	AA
24	103	AA	AA	AA

Tabelle 3.4: Zusammenfassung der Ergebnisse für Analyse des SNP im SULT1A1-Gen bei 24 Patienten. Die kinetische und Fluoreszenzintensitäts-Analyse erfolgte durch Auswertung der Daten von Hybridisierungsexperimenten am Durchfluss-Biochip-Scanner. Bei der Referenzmethode handelte es sich um einen Restriktionsverdau mit der Endonuklease *Bsp143II*.

3.3.2 Adiponectin-Promotor-Gruppe

In Vorversuchen wurden die Polymorphismen 11426, 11391 und 11377 im Adiponectin-Gen auf ihre Analysierbarkeit mit der erarbeiteten SNP-Genotypisierungsmethode untersucht.

Sondenlänge

Als Fluoreszenzsonden wurden Cy5-gelabelte Oligonukleotide ausgewählt. Für die Länge der Sonde legte man die Schmelztemperatur der bei den SULT1A1-Versuchen erfolgreich getesteten Sonde Cy5_03 zugrunde. In Tabelle 3.5 sind die Sequenzen sowie die berechneten Schmelztemperaturen T_m (nach Sambrook and Russell [2001]) aufgeführt.

Bezeichnung	Sequenz	Länge (Bp)	T_m (°C)
rSonde 11426a	5'-GAA TTA AAT TAC GAC CC	17	46,0
rSonde 11426g	5'-GAA TTA AAC TAC GAC CC	17	48,0
rSonde 11391g	5'-ACT GAG CCG GTT CTT	15	46,0
rSonde 11391a	5'-ACT GAG CTG GTT CTT	15	44,0
rSonde 11377g	5'-TTT GAA GCG CAG GAC	15	46,0
rSonde 11377c	5'-TTT GAA GGG CAG GAC	15	46,0
SULT1A1-Sonde Cy5_3	5'-TGG GGC GCT CCC T	13	46,0

Tabelle 3.5: Übersicht über Schmelztemperatur verschiedener Hybridisierungssonden. Der jeweilige SNP-Locus ist fett markiert.

Temperaturoptimierung

An immobilisierten Oligonukleotiden (Spottingmuster siehe Abbildung 3.6, Sequenzen siehe S. 43) wurde die optimale Temperatur für die Genotypisierung der drei SNPs im Adiponectin-Gen in Hinblick auf die Diskriminierung von heterocytoten Proben ermittelt. Dazu wurden mit Hilfe von Hybridisierungs- und Dissoziationsexperimenten am Durchfluss-Biochip-Scanner bei unterschiedlichen Reaktionstemperaturen (25 und 30°C) mit drei Sonden (r11426a, r11391g und r11377g) getestet. Anschließend wertete man die Kurven mit „xfit“ aus.

In Abbildung 3.20 sind die k_D -Werte für die Sonde r11391g bei 25 und 30°C dargestellt. Es ist deutlich erkennbar, dass ebenso wie beim SNP im SULT1A1-Gen eine Temperaturerhöhung zu einer stärkeren Differenzierung zwischen full-Match-, mis-Match- und Heterocytotenfall führt: Das Verhältnis $k_{D(mm)}/k_{D(fm)}$ ist bei 30°C wesentlich größer als bei 25°C.

Anschließend wurden Experimente mit einer Sondenmischung aus r11426a, r11391g und r11377g mit einer Konzentration von jeweils 1 μ M (siehe Tabelle 3.5) bei 30°C durchgeführt. Aus Abbildung 3.21 geht hervor, dass bei 30°C die Kurvenanpassung der Dissoziationskurven der Sonden r11426a und r11377g keine Differenzierung zwischen den

M	M	M	M	M	M	M	M	M
d11426a	d11426g	d11426Mix	d11391g	d11391a	d11391Mix	d11377g	d11377c	d11377Mix
d11426a	d11426g	d11426Mix	d11391g	d11391a	d11391Mix	d11377g	d11377c	d11377Mix
d11426a	d11426g	d11426Mix	d11391g	d11391a	d11391Mix	d11377g	d11377c	d11377Mix
d11426a	d11426g	d11426Mix	d11391g	d11391a	d11391Mix	d11377g	d11377c	d11377Mix
d11426a	d11426g	d11426Mix	d11391g	d11391a	d11391Mix	d11377g	d11377c	d11377Mix
HEN	HEN	HEN	HEN	HEN	B	B	B	B
d11426a	d11426g	d11426Mix	d11391g	d11391a	d11391Mix	d11377g	d11377c	d11377Mix
d11426a	d11426g	d11426Mix	d11391g	d11391a	d11391Mix	d11377g	d11377c	d11377Mix
d11426a	d11426g	d11426Mix	d11391g	d11391a	d11391Mix	d11377g	d11377c	d11377Mix
d11426a	d11426g	d11426Mix	d11391g	d11391a	d11391Mix	d11377g	d11377c	d11377Mix
d11426a	d11426g	d11426Mix	d11391g	d11391a	d11391Mix	d11377g	d11377c	d11377Mix

Tabelle 3.6: Spotting-Muster für Oligonukleotid-Chips im Adiponectin-Gen. Gespottet wurde mit dem Nanoplotter auf einen NeutrAvidin-Chip. M kennzeichnet einen Positionsmarker (CH1), B eine Negativkontrolle (PRM5b), HEN den Spottingpuffer. Alle weiteren Spots sind zu den Adiponectin-Sonden komplementäre Oligonukleotide. Um den Heterocytotenfall zu simulieren, wurden jeweils full-Match- und mis-Match-Oligonukleotide 1:1 gemischt und als Mix gespottet.

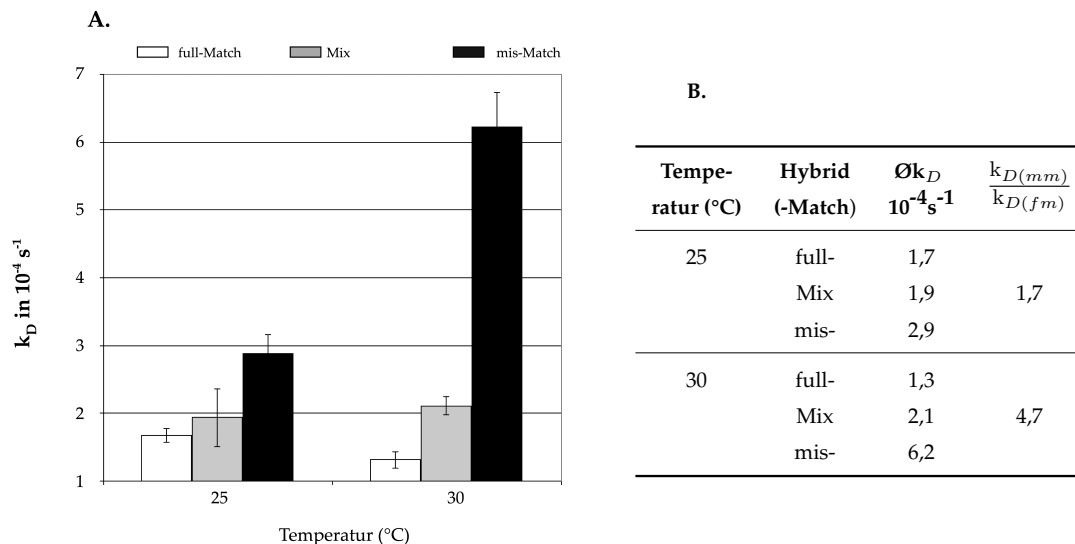


Abbildung 3.20: Temperaturabhängigkeit der Dissoziation bei Sonde r11391g. Angegeben sind die k_D -Werte von drei verschiedenen Chips, die bei 25 und 30°C gemessen wurden. Weiße Balken stehen für full-Match-, graue für den Heterocytotenfall, schwarze für den mis-Match-Fall. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung vom k_D -Mittelwert (n= 9).

Hybriden erlaubt. Der Unterschied zwischen den k_D -Werten dieser Sonden ist zu gering, um full- vom mis-Match bzw. vom Heterocygoten zu diskriminieren. Bei höheren Temperaturen wurde jedoch bei der Hybridisierung eine für eine Kurvenanpassung unzureichende Fluoreszenzintensität gemessen. Für weitere Versuche wurde deshalb nur die Sonde r11391g bei 30°C eingesetzt.

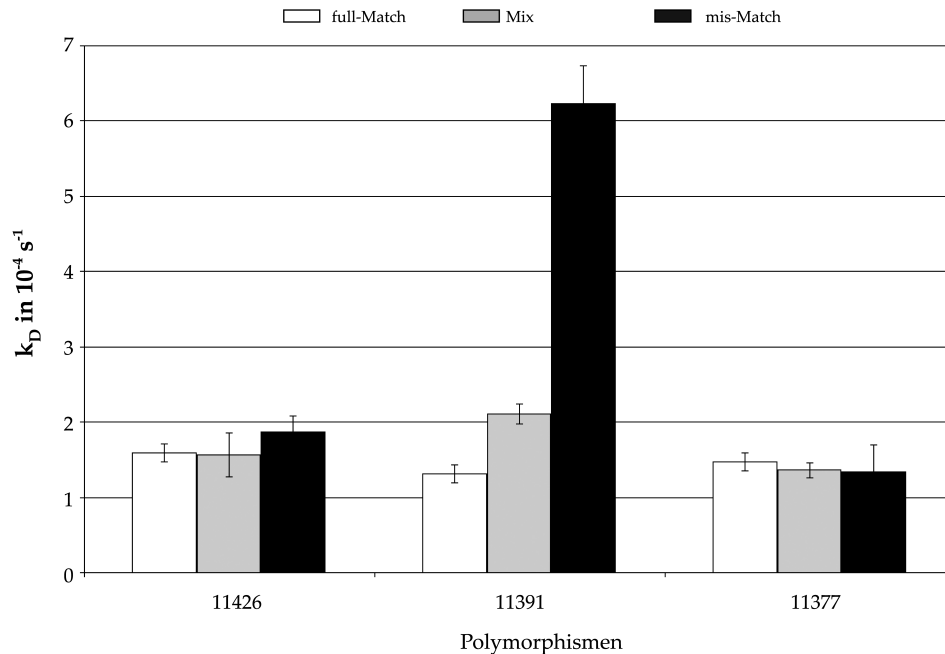


Abbildung 3.21: Vergleich des Dissoziationsverhaltens unterschiedlicher Fluoreszenz-Sonden (r11426a, r11391g, 11377g) im Adiponectin-Gen bei 30 °C.

Genotypisierung der Patientengruppe

Eine Gruppe von 44 Patientenproben wurde mit Hilfe der Fluoreszenz-Sonde r11391g auf den SNP 11391 untersucht. Für die PCR des entsprechenden Abschnitts aus der Adiponectin-Promotor-Region wurden 5'-biotinylierte und phosphorylierte Primer getestet. In Abbildung 3.22 sind die PCR-Produkte von zwei verschiedenen Primerkombinationen dargestellt. Der biotinylierte Vorwärts-Primer in Kombination mit dem phosphorylierten Rückwärts-Primer erbringt das gewünschte Produkt ohne unspezifische Nebenprodukte. Dadurch konnte die Markierung der PCR-Produkte für die spätere affine Kopplung an NeutrAvidin gewährleistet werden.

Das Genotypisierungsexperiment des SNPs 11391 folgte dem in Abbildung 3.14 vorgestellten Schema (250 ng/ μ l PCR-Produkt auf NeutrAvidin-Oberflächen in HEN-Puffer, Laufpuffer HEN, T = 30°C). Das verwendete Spottingmuster ist in Tabelle 3.7 aufgeführt.

Im Anschluss an das Experiment wurde eine Kurvenanpassung der Dissoziationskurven mit dem Programm „xfit“ durchgeführt, um die k_D -Werte zu bestimmen. In Abbildung 3.23 sind die gemittelten k_D -Werte von je vier Spots pro PCR-Produkt dargestellt. Abbildung 3.24 zeigt den für die kinetische Auswertung verwendeten Chip nach Hybridisierung und Dissoziation.

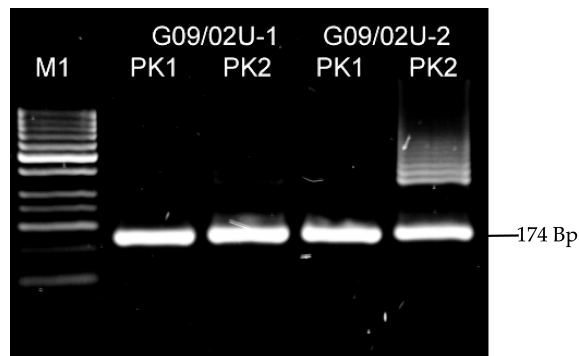


Abbildung 3.22: Agarose-Gel mit PCR-Produkten des Adiponectin-Gens. Es wurden zwei Primerkombinationen an zwei Proben der Adiponectin-Patientengruppe (A1 = G09/02U-1, B1 = G09/02U-2) getestet. Bei PK1 wurde biotinylierter Vorwärts- mit phosphoryliertem Rückwärts-Primer kombiniert, bei PK2 verwendete man einen phosphorylierten Vorwärts- und einen biotinylierten Rückwärts-Primer.

M	d11391g	d11391g	d11391a	d11391a	M	d11391Mix	d11391Mix	M	A1	A1	B1	B1	M
HEN	d11391g	d11391g	d11391a	d11391a	HEN	d11391Mix	d11391Mix	PRM5b	A1	A1	B1	B1	PRM5b
C1	C1	E1	E1	F1	F1	G1	G1	H1	H1	B2	B2	C2	C2
C1	C1	E1	E1	F1	F1	G1	G1	H1	H1	B2	B2	C2	C2
D2	D2	E2	E2	F2	F2	G2	G2	H2	H2	A3	A3	B3	B3
D2	D2	E2	E2	F2	F2	G2	G2	H2	H2	A3	A3	B3	B3
C3	C3	E3	E3	F3	F3	G3	G3	H3	H3	A4	A4	B4	B4
C3	C3	E3	E3	F3	F3	G3	G3	H3	H3	A4	A4	B4	B4
C4	C4	D4	D4	E4	E4	F4	F4	G4	G4	H4	H4	A5	A5
C4	C4	D4	D4	E4	E4	F4	F4	G4	G4	H4	H4	A5	A5
B5	B5	C5	C5	D5	D5	E5	E5	F5	F5	G5	G5	H5	H5
B5	B5	C5	C5	D5	D5	E5	E5	F5	F5	G5	G5	H5	H5
A6	A6	B6	B6	C6	C6	D6	D6	E6	E6	F6	F6	G6	G6
A6	A6	B6	B6	C6	C6	D6	D6	E6	E6	F6	F6	G6	G6

Tabelle 3.7: Spotting-Muster für den Adiponectin-Chip. Gespottet wurde mit dem Nanoplotter auf einen NeutrAvidin-Chip. M kennzeichnet einen Positionsmarker (CH1), B eine Negativkontrolle (PRM5b), HEN den Spottingpuffer, d11391g ist die Hybridisierungskontrolle für das full-Match-Hybrid, d11391a für das mis-Match-Hybrid, d11391Mix für den Heterocygotenfall. Alle anderen Spots sind gereinigte PCR-Produkte der Adiponectin-Patientengruppe, die jeweils in vier Spots getropft wurden. Die Bezeichnungen der Proben wurde der Übersichtlichkeit halber abgekürzt. Die Legende befindet sich im Anhang **XXV**.

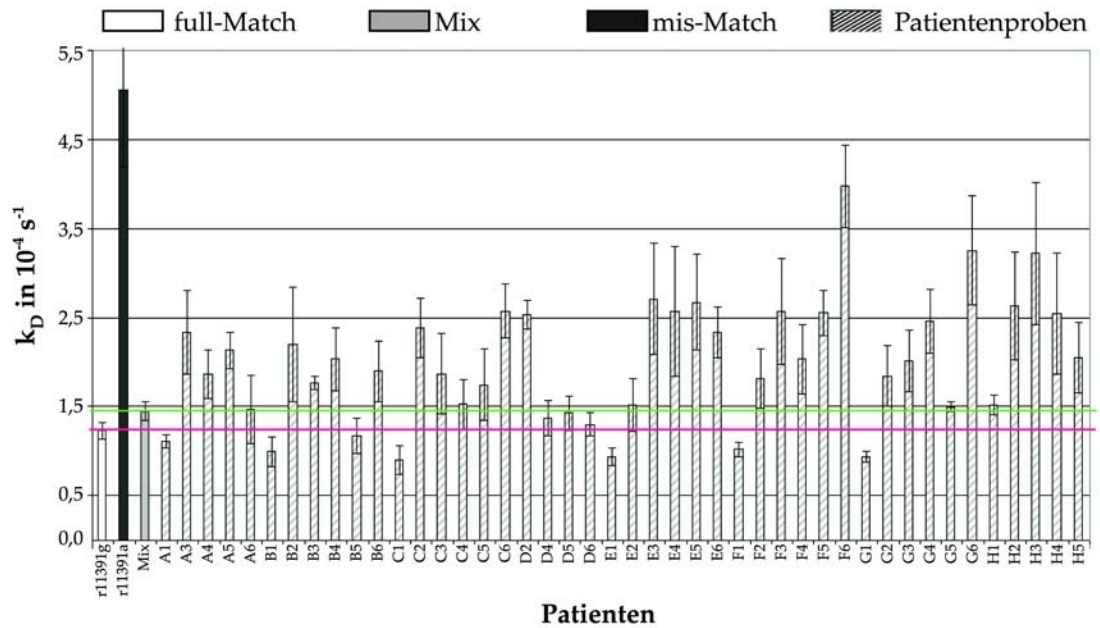


Abbildung 3.23: Übersicht über die gemittelten Geschwindigkeitskonstanten des Adiponectin-Chips. Aufgetragen sind die Hybridisierungskontrollen r11391g (weiß), r11391a (schwarz) sowie eine Mischung der beiden Oligonukleotide (graue Balken). Daneben sind die Werte der 44 Patienten aufgetragen (gestrichelte Balken). Die rote Linie zeigt den Schwellenwert für den full-Match (Wildtyp), die grüne Linie den für heterozygote DNA und die blaue den für mis-Match (Mutante) an.

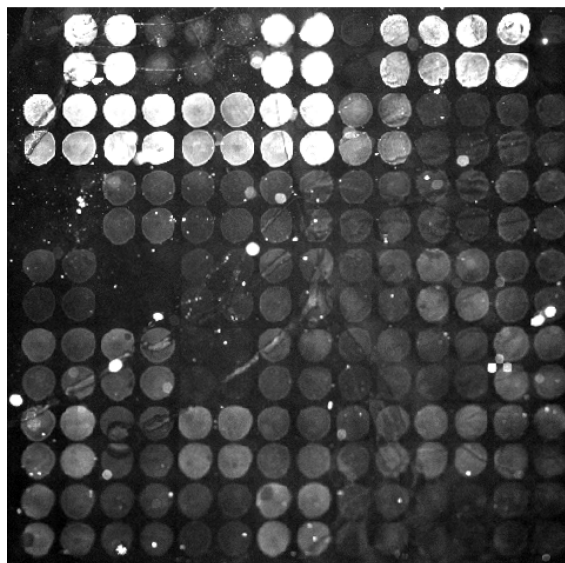


Abbildung 3.24: ArrayWoRx-Bild eines Adiponectin-Chips im 14×14 -Format.

Anhand des in Abbildung 3.23 eingetragenen Schwellenwertes wird den Patientenproben ein Genotyp zugewiesen. In der Tabelle ist den gemittelten k_D -Werten der jeweilige Genotyp zugeordnet. Alle Werte, die kleiner sind oder innerhalb der Fehlergrenzen der Kontrolle r11391g liegen, wurden als Wildtyp-DNA mit dem Genotyp GG identifiziert. Die, die einen größeren k_D -Wert aufwiesen als denjenigen der Kontrolle r11391g (mit Fehlergrenzen) und kleineren Wert als den der Kontrolle r11391a (mit Fehlergrenzen), wies man dem Genotyp GA zu. In der gesamten Gruppe wurde keine Mutanten-DNA mit Genotyp AA gefunden.

Auffällig ist, dass der k_D -Mittelwert der full-Matches-Kontrolle r11391g und der der Heterocygote-Kontrolle r11391g/11391a relativ dicht beieinander liegen, sich jedoch innerhalb ihrer Fehlergrenzen nicht überschneiden. Von 44 Patienten wurde der Genotyp GG siebenmal und der GA 37mal detektiert.

Nr.	Position	\bar{k}_D 10^{-4}s^{-1}	Genotyp nach kinetischer Analyse	Nr.	Position	\bar{k}_D 10^{-4}s^{-1}	Genotyp nach kinetischer Analyse
	r11391g	1,3	full-Match (GG)				
	r11391a	5,1	mis-Match (AA)				
	r11391g/a	1,5	heterocygot (GA)				
1	A1	1,1	GG	23	B4	2,0	GA
2	B1	1,0	GG	24	C4	1,5	GA
3	C1	0,9	GG	25	D4	1,4	GG
4	E1	0,9	GG	26	E4	2,6	GA
5	F1	1,0	GG	27	F4	2,0	GA
6	G1	0,9	GG	28	G4	2,5	GA
7	H1	1,5	GA	29	H4	2,5	GA
8	B2	2,2	GA	30	A5	2,1	GA
9	C2	2,4	GA	31	B5	1,2	GG
10	D2	2,5	GA	32	C5	1,7	GA
11	E2	1,5	GA	33	D5	1,4	GA
12	F2	1,8	GA	34	E5	2,7	GA
13	G2	1,8	GA	35	F5	2,6	GA
14	H2	2,6	GA	36	G5	1,5	GA
15	A3	2,3	GA	37	H5	2,1	GA
16	B3	1,8	GA	38	A6	1,5	GA
17	C3	1,9	GA	39	B6	1,9	GA
18	E3	2,7	GA	40	C6	2,6	GA
19	F3	2,6	GA	41	D6	1,3	GG
20	G3	2,0	GA	42	E6	2,3	GA
21	H3	3,2	GA	43	F6	4,0	GA
22	A4	1,9	GA	44	G6	3,3	GA

Tabelle 3.8: Übersicht über den Genotyp der Patienten der Adiponectin-Gruppe nach der kinetischen Analyse. Zum Vergleich wurden die Werte der Hybridisierungskontrollen r11391g, r11391a und r11391g/a mit aufgeführt.

Die Ergebnisse der kinetischen Analyse wurden mit denen der Referenzmethode SNuPE (Primerverlängerung mit fluoreszenzmarkierten ddNTPS und Kapillarelektrophorese) verglichen. Die Genotypisierung wurde von Dr. Spranger (DIfE) durchgeführt. In Tabelle 3.9 sind beide Resultate einander gegenübergestellt. Ein Vergleich ergibt, dass der Genotyp von 14 der 44 untersuchten Proben mit dem der Referenzverfahren übereinstimmt. Sowohl nach der kinetischen Analyse als auch nach der Referenz wurde keine homocygote Mutante (Genotyp AA) gefunden.

Bez.	Genotyp nach		Bez.	Genotyp nach	
	kinetischer Analyse	Referenzmethode		kinetischer Analyse	Referenzmethode
A1	GG	GG	B4	GA	GG
B1	GG	GG	C4	GA	GG
C1	GG	GG	D4	GG	GG
E1	GG	GG	E4	GA	GG
F1	GG	GG	F4	GA	GG
G1	GG	GG	G4	GA	GG
H1	GA	GG	H4	GA	GA
B2	GA	GG	A5	GA	GA
C2	GA	GG	B5	GG	GG
D2	GA	GG	C5	GA	GG
E2	GA	GG	D5	GA	GG
F2	GA	GG	E5	GA	GA
G2	GA	GG	F5	GA	GA
H2	GA	GG	G5	GA	GG
A3	GA	GG	H5	GA	GG
B3	GA	GG	A6	GA	GG
C3	GA	GG	B6	GA	GG
E3	GA	GA	C6	GA	GG
F3	GA	GG	D6	GG	GG
G3	GA	GG	E6	GA	GG
H3	GA	GG	F6	GA	GG
A4	GA	GG	G6	GA	GG

Tabelle 3.9: Tabellarischer Vergleich der Analysenergebnisse des Adiponectin-Chips mit den Ergebnissen der Referenzmethode SNuPE. Voneinander abweichende Ergebnisse sind rot markiert.

Vergleicht man die Fluoreszenzintensität der Proben, die deutlich unter dem k_D -Schwellenwert liegen (A1, B1, C1, E1, F1, G1), mit ihren jeweiligen Gegenstücken, die den Schwellenwert überschreiten (siehe Abbildung 3.25), so fällt auf: Die Fluoreszenzintensität von A1, B1, C1, E1, F1 und G1 ist deutlich größer als die Werte der anderen Patienten.

Das wurde bereits aus dem ArrayWoRx-Bild des analysierten Chips ersichtlich (siehe Abbildung 3.24). Somit hätten die anderen Wildtyp-Proben der Gruppe eine weitaus höhere Fluoreszenzintensität aufweisen müssen, da alle PCR-Produkte mit derselben Konzentration gespottet wurden. Da dieses Phänomen bei Wiederholungen des Experiments immer wieder auftrat, liegt die Vermutung nahe, dass die Hybridisierung der Sonde an den

immobilisierten PCR-Produkten gestört war. Da alle Störparameter wie eine abweichende Konzentration der PCR-Produkte, Spottingfehler sowie fehlerhafte Oberflächen durch weitere Experimente ausgeschlossen werden konnten, liegt die Ursache der abweichenden Ergebnisse möglicherweise in einem fehlerhaften Fließverhalten der zugegebenen Sonde.

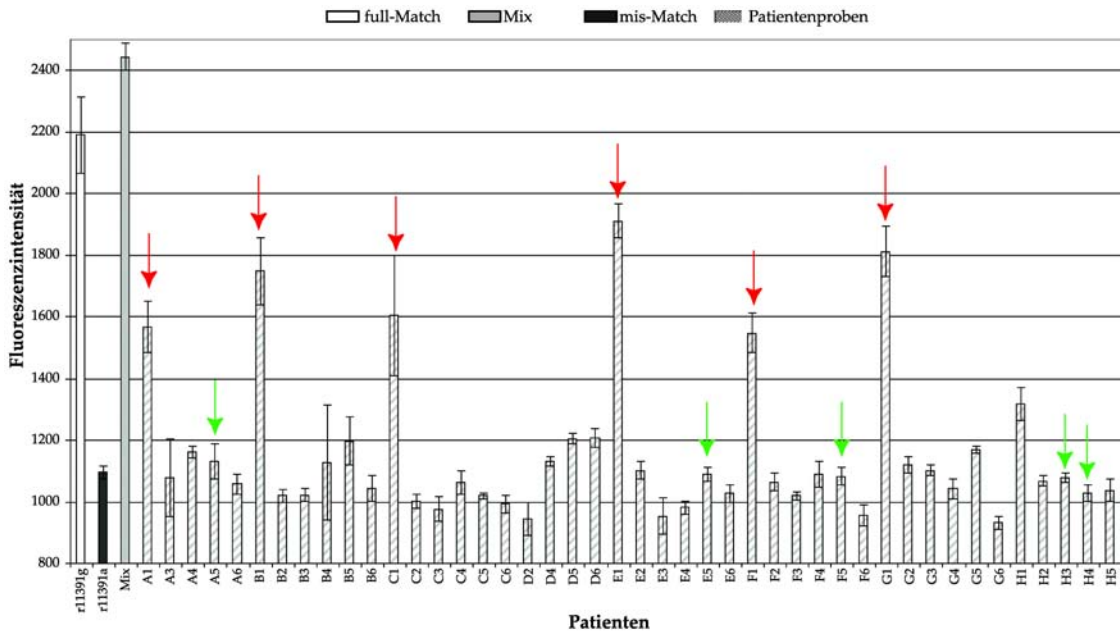


Abbildung 3.25: Übersicht über die gemittelten Fluoreszenzintensitätswerte des Adiponectin-Chips. Aufgetragen sind die Hybridisierungskontrollen r11391g (weiß), r11391a (schwarz) sowie eine Mischung der beiden Oligonukleotide (grauer Balken). Daneben sind die Werte der 44 Patienten aufgetragen (gestrichelte Balken). Die roten Pfeile kennzeichnen die Fluoreszenzintensitätswerte der Proben, bei denen die Genotypen (GG) mit denen in der Referenzmethode ermittelten übereinstimmen und Fluoreszenzintensität signifikant erhöht war. Die laut Referenz heterozygoten Genotypen sind mit grünen Pfeilen markiert.

Da die insgesamt geringe Fluoreszenzintensität durch die Ausbildung von möglichen Sekundärstrukturen des einzelsträngigen PCR-Produkts verursacht werden könnte, wurde eine Online-MFOLD-Analyse unter <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold> nach Zuker [2003] durchgeführt. In [Abbildung 3.26](#) sind beispielhaft drei Ergebnisse dargestellt. Weitere Sekundärstrukturen des PCR-Produkts finden sich im Anhang. Nach der MFOLD-Analyse wird gerade am SNP 11391 ein stem ausgebildet, der möglicherweise die Hybridisierung der Cy5-Sonde behindert.

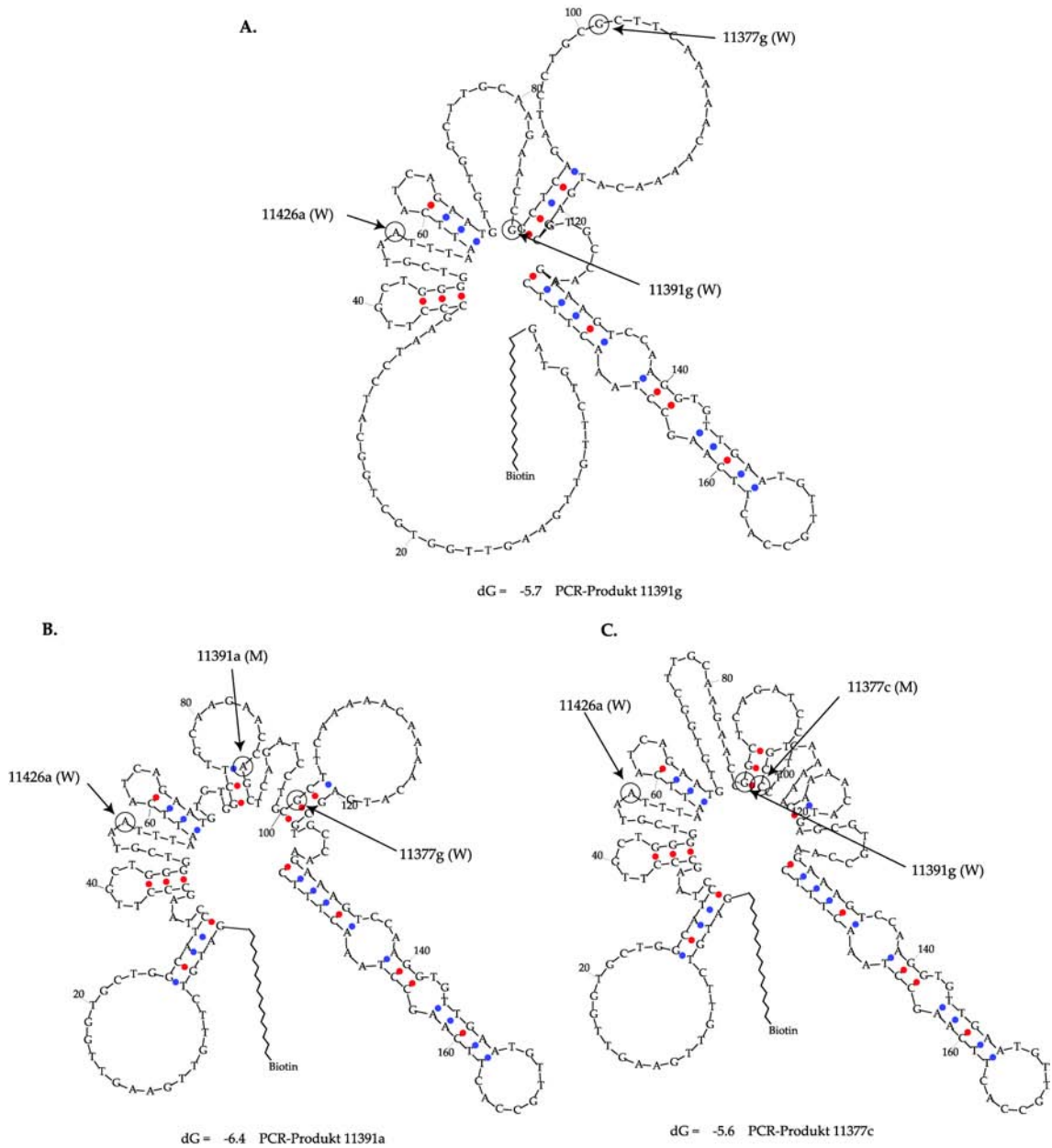


Abbildung 3.26: Ergebnis der MFOLD-Analyse dreier PCR-Produkte aus der Adiponectin-Promotor-Region nach Zuker [2003]. Am 5'-Ende des PCR-Produkts befindet sich ein C18-Spacer zwischen DNA und Biotin. Die Analyse wurde für die Hybridisierungsparameter durchgeführt (30°C, $c(\text{Na}^+) = 50 \text{ mM}$). Die Pfeile kennzeichnen die SNP-Loci. **A.** SNP-Locus 11391 mit G (Wildtyp). **B.** Mutante mit A in 11391. **C.** Eventuell auftretende SNPs (11377c) beeinflussen die Struktur des 11391g-Wildtyps ebenfalls.

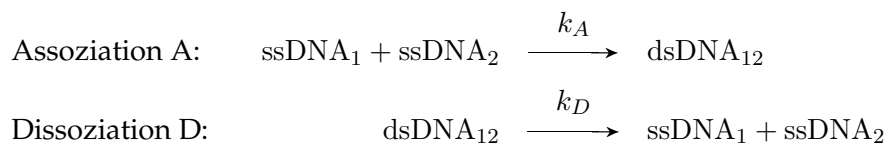
Kapitel 4

Diskussion

4.1 Stabilität von DNA-Hybriden an Oberflächen

An Glasoberflächen immobilisierte Oligonukleotide und daran hybridisierte Sonden dissoziieren in einem Fließsystem nach einem bestimmten Muster, was die Detektion von fehlgepaarten DNA-DNA-Hybriden erlaubt [Bier et al., 1997; Kleinjung et al., 1997; Kleinjung, 1998]. Anhand des SULT1A1-Modells sollte die Stabilität solcher Hybride an modifizierten Glasoberflächen (hier Glasfasern) mit Hilfe von Hybridisierungs- und Dissoziationsexperimenten mit fluoreszenzmarkierten Sonden untersucht werden. Es wurde eine Kurvenanpassung der aus den Experimenten resultierenden Fluoreszenzintensitäts-Zeit-Kurven mit einer modifizierten Gleichung nach dem Wiederbindungsmodell von Kleinjung [1998] durchgeführt (siehe 1.3, S. 37), um die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_D zu erhalten.

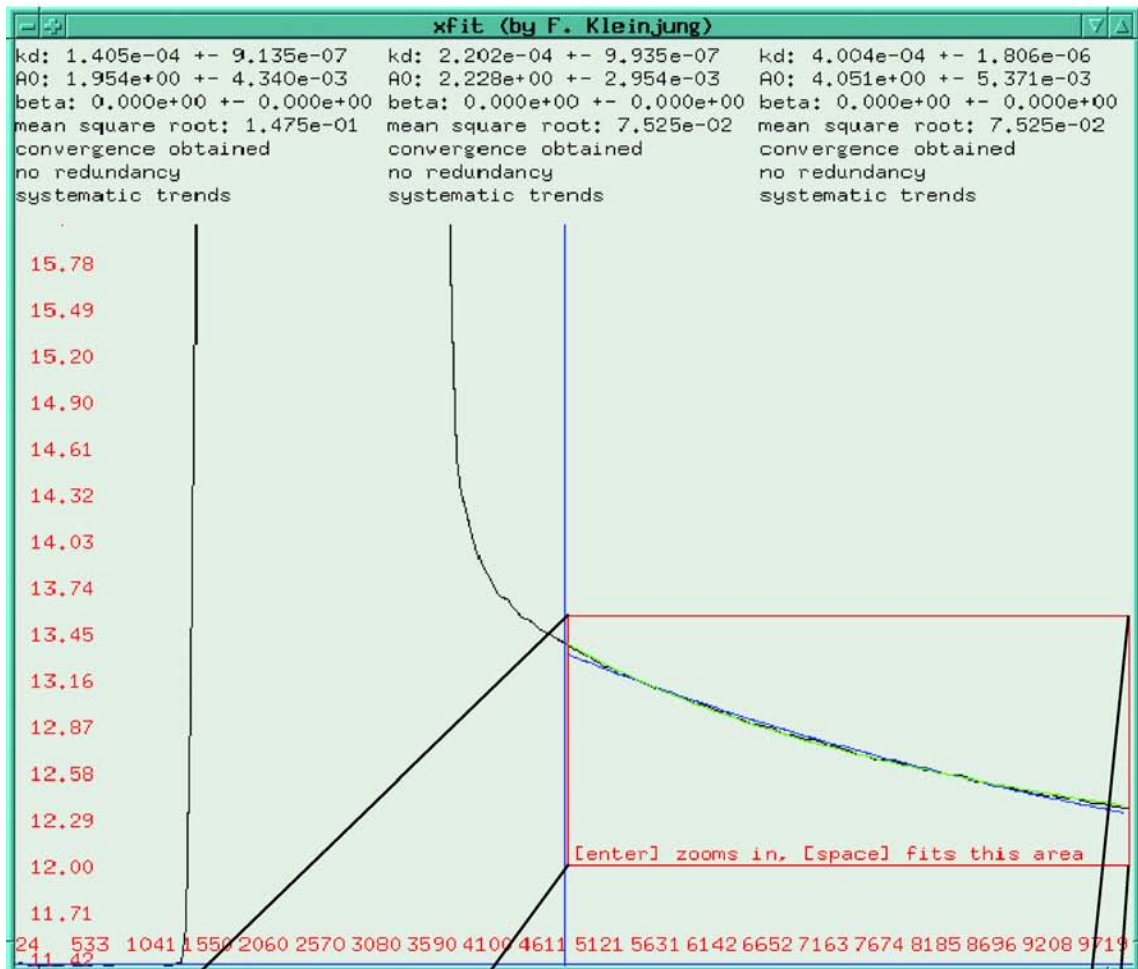
Die Geschwindigkeit einer unimolekularen Reaktion hängt von der Konzentration der Reaktanden - hier $c(\text{dsDNA}_{12})$ - und der Konstante k ab. Im Fall der Dissoziation spricht man von k_D , die unmittelbar mit der Reaktionsgeschwindigkeit V zusammenhängt (siehe Gleichung 4.1):



$$V = k_D \cdot c(\text{dsDNA})_{12} \quad (4.1)$$

k_D ist also eine Proportionalitätskonstante, die die Wahrscheinlichkeit ausdrückt, mit der die Reaktion unter gegebenen Bedingungen (pH, Temperatur etc.) abläuft. Demnach haben stabile perfekt passende Hybride bei gleichen Reaktionsbedingungen einen kleineren k_D -Wert als instabile fehlgepaarte Hybride. Zur Bestimmung von k_D wurde das Programm „xfit“ verwendet (Abbildung 4.1).

A.



B.

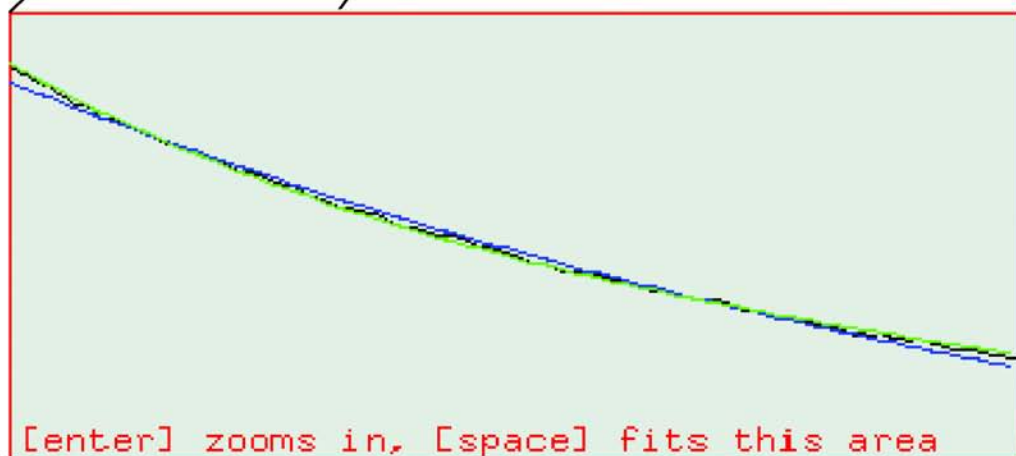


Abbildung 4.1: Screenshot des Programms „xfit“ (A.) und Ausschnittvergrößerung (B.). Die grüne Kurve repräsentiert den Fit nach dem Wiederbindungsmodell, die blaue zeigt einen exponentiellen Fit.

Modell	Bemerkung	k_D (10^{-4} s^{-1})	Abweichung (%)
exponentielles Modell	-	1,4	15
Wiederbindungsmodell	$\beta = 0,1$	2,2	7,5
Wiederbindungsmodell	$\beta = 0,9$	4,0	7,5

Tabelle 4.1: Vergleich der unterschiedlichen Fittingmodelle am Beispiel des Fits einer mis-Match-Dissoziationskurve.

Das praktische Beispiel zeigt, dass das Wiederbindungsmodell für die Kurvenanpassung besser geeignet ist als das exponentielle Standardmodell (Gleichung 1.2, S. 36). In Abbildung 4.1 ist ein Screenshot des Programms „xfit“ mit der gefitteten Dissoziationskurve eines mis-Match-Hybrids dargestellt. Es ist bereits visuell erkennbar, dass die Verwendung des Wiederbindungsmodells einen besseren Anpassung ergibt (grüne Kurve) als mit dem exponentiellen Standardfit (blaue Kurve). Maßgeblich sind hier die Abweichungen der Messkurve vom jeweiligen Modell (siehe Tabelle 4.1): Die Abweichung des exponentiellen Modells ist mit 15% größer als der des Wiederbindungsmodells (7,5%).

Der exponentielle Fit führt also zu einem falschen k_D -Wert. Demzufolge liefert das angeführte Beispiel für das exponentielle Modell in Tabelle 4.1 nur scheinbar einen kleineren Wert als das Wiederbindungsmodell. Tatsächlich ist das nicht möglich, da die Wiederbindung der dissoziierten Sonde an anderen immobilisierten Molekülen zu einer scheinbar langsameren Dissoziation führt und die Einführung der Wiederbindungskonstanten β diesen Zustand berücksichtigt, was zwangsläufig in kleineren k_D -Werten für das Wiederbindungsmodell resultiert.

Experimente mit Oligonukleotiden

Der Vergleich der k_D -Werte von full- mit denen von mis-Match-Hybriden zeigt, dass perfekt passende Hybride deutlich stabiler sind als Hybride mit einer Basenfehlpaarung (siehe Tabelle 3.1). Die Ergebnisse dieses Experiments, bei dem Hybridisierung und Dissoziation von Oligonukleotiden an immobilisierten Oligonukleotiden untersucht wurden, decken sich mit bereits bekannten Ergebnissen am faseroptischen Affinitätssensor [Kleinjung et al., 1997]. Kleinjung setzte jedoch statt einer sequenzspezifischen Fluoreszenzsonde den Interkalator PicoGreen und beschleunigte die Dissoziation durch Temperaturerhöhung. Bei den hier durchgeführten Experimenten wurden hingegen bei konstanter Temperatur gearbeitet. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass er die Fluoreszenzintensität auswertete, während in dieser Arbeit eine kinetische Analyse durchgeführt wird.

Die in den Experimenten erreichten k_D -Werte unterscheiden sich zumeist um den Faktor 2 bis 5. Dass es sich bei diesen Fluoreszenzmessungen nicht um unspezifische Wechselwirkungen handelt, zeigen Kontrollexperimente mit nicht komplementären Oligonukleotiden. Eine Bindung am immobilisierten Oligonukleotid findet nicht statt.

Auch wiederholt durchgeführte Experimente an einer einzelnen Glasfaser ließen die Diskriminierung von fehlgepaarter DNA nach kinetischer Analyse zu (siehe k_D -Werte in Tabelle 3.3). Die Regeneration wurde mit 90°C heißem PBS-Puffer durchgeführt. Dafür wurde bisher nur NaOH verwendet [Bier et al., 1997; Kleinjung et al., 1997].

Experimente mit PCR-Produkten

Die Ergebnisse der Oligonukleotidexperimente konnten für die Hybridisierung von PCR-Produkten an immobilisierten Oligonukleotiden bestätigt werden. Auch hier unterscheiden sich full- und mis-Match-Hybride in ihren k_D -Werten signifikant (siehe Abbildung 3.5, S. 62). Das Verhältnis von $k_{D(mm)}/k_{D(fm)}$ beträgt hier 4,4.

Allerdings ist die beobachtete Fluoreszenzintensität bei weitem nicht so hoch wie bei Hybridisierungsexperimenten mit Oligonukleotiden. Dies ist durch das deutlich längere PCR-Produkt (226 Basen anstatt 13 Basen beim Oligonukleotid) und den Versuchsaufbau zu erklären (siehe Abbildung 3.4). Zum einen ist das PCR-Produkt stärker negativ geladen als ein Oligonukleotid, was zur Abstoßung der Moleküle und damit zu einer geringeren Hybridisierungsausbeute führt. Zum anderen kann durch sterische Hinderung und ausgebildete Sekundärstrukturen des einzelsträngigen PCR-Produkts die Hybridisierung der Fluoreszenz-Sonde sowie die Hybridisierung am immobilisierten Oligonukleotid behindert werden.

4.2 Der SNP-Chip

Die erfolgreich durchgeführten Experimente am faseroptischen Affinitätssensor wurden nun auf das Chipformat übertragen. Ziel war vor allem die Parallelisierung der Analyse, deren Vorteil ein höherer Probendurchsatz und das Einsparen von Arbeitszeit und Materialkosten ist. Darüber hinaus schafft das Chipformat gleiche Reaktionsbedingungen für die Analyse.

4.2.1 Optimierung der Reaktionsparameter

Länge der Fluoreszenzsonde

Da die Schmelztemperatur T_m eines DNA-DNA-Hybrids neben der Sequenz unter anderem von der Anzahl der bindenden Nukleotide abhängt, hat die Länge der Sonde unmittelbaren Einfluss auf die Geschwindigkeit der Dissoziation und somit auch auf k_D . Es konnte bei Versuchen am Durchfluss-Biochip-Scanner gezeigt werden, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der Länge des Hybrids und k_D besteht. Dabei sollte sich die Fehlpaarung (SNP) am zentralen Basenpaar des Hybrids befinden [Kleinjung et al., 1997; Kleinjung, 2000; Kennedy et al., 2003; Matsuzaki et al., 2004], da so eine maximale Diskriminierung zwischen full- und mis-Match erreicht werden kann.

Aus Tabelle 3.6, C. auf S.63 geht hervor, dass bei zunehmender Länge des gebildeten Hybrids einerseits die Bindung stabiler wird und die Dissoziation langsamer abläuft (niedrige k_D). Andererseits verhalten sich full-Match- und mis-Match-Hybride zunehmend ähnlich, da der Einfluss der Einzelbasenfehlpaarung auf die Dissoziation abnimmt. Bei einer Sondenlänge von 13 Nukleotiden konnte jedoch das größte k_D -Verhältnis ($k_{D(mm)}/k_{D(fm)} = 2,0$) beobachtet werden.

Auffällig ist, dass die Fluoreszenzintensität mit abnehmender Hybridlänge geringer wird (Abbildung 3.7, S. 63). Der Zusammenhang liegt auf der Hand: Je größer die Anzahl der

bindenden Basen ist, desto stabiler ist das Hybrid, desto langsamer erfolgt auch die Dissoziation und desto höher ist schließlich die Fluoreszenzintensität des verbleibenden Doppelstrangs an der Oberfläche (Hybridisierungsausbeute).

Obwohl die Hybride mit 15 bindenden Basenpaaren ein vergleichbares k_D -Verhältnis wie die Hybride mit 13 Basenpaaren haben, ist der Unterschied in der Fluoreszenzintensität für eine Diskriminierung von full- und mis-Match nicht ausreichend. Die Sonden 3 und 4 mit 13 Basen hingegen ergeben neben dem größten k_D -Verhältnis auch den größten Unterschied in der Fluoreszenzintensität und erlauben somit sowohl die kinetische Analyse als auch die Auswertung der Fluoreszenzintensität.

Zwar wurde bei diesem Chip-Experiment nicht die Länge der Hybridisierungssonde variiert, sondern die der immobilisierten Oligonukleotide, gleichwohl lassen sich die Ergebnisse auf die Hybridisierungssonden übertragen. Da für die Dissoziation nur die Länge des gebildeten Hybrids auf dem Chip ausschlaggebend ist, wurde für weitere Versuche mit immobilisierten PCR-Produkten eine Hybridisierungssonde mit 13 Nukleotiden verwendet.

Affine und kovalente Kopplung von PCR-Produkten

Eine ideale Kopplung von DNA mittlerer Länge sollte folgende Anforderungen erfüllen: Zum einen ist es aus Kostengründen und Arbeitseffizienz erstrebenswert, nur so wenig DNA einzusetzen, wie für eine optimale Kopplung notwendig ist. Darüber hinaus ist eine kovalente Immobilisierung einer affinen Bindung vorzuziehen, da die DNA wesentlich stabiler an die Oberfläche gebunden ist und so eine Regeneration der verwendeten Chips möglich ist.

Viele Autoren berichten über die Immobilisierung von Nukleinsäuren an Oberflächen [Guo et al., 1994; Heise, 2004; Lamture et al., 1994; Kleinjung et al., 1997], allerdings beschränken sie sich meist auf Oligonukleotide, die selten länger als 50 Nukleotide sind. Solche für Oligonukleotide optimierte Methoden wie zum Beispiel die EDC/Methylimidazol-Methode sind für längere PCR-Produkte meist nicht geeignet oder sie erfordern eine zu große Menge an Amplifikaten. Einige Quellen beschreiben auch die Immobilisierung von cDNA [Taylor et al., 2003] mit Epoxy-modifizierten Oberflächen sowie von 500 Bp langen PCR-Produkten [Diehl et al., 2001, 2002] mit aminosilanisierten und Poly-L-Lysin-beschichteten Oberflächen.

Für den Test der verschiedenen Kopplungsmethoden (EDC-Methylimidazol, Avidin/Biotin, Streptavidin/Biotin, Neutravidin/Biotin) wurden PCR-Produkte verwendet, die durch biotinylierte Vorwärts- und phosphorylierte Rückwärts-Primer markiert waren. Zwischen Biotin bzw. Phosphat und DNA befinden sich $(\text{CH}_2)_{18}$ - bzw. $(\text{CH}_2)_7$ -Linker. Die Label sollen so besser zugänglich sein und eine effizientere Kopplung ermöglichen [Southern et al., 1999]. Nach der jeweiligen Kopplung der Amplifikate in unterschiedlicher Konzentration wurde der nichtgelabelte Strang durch Natronlauge entfernt, eine komplementäre Fluoreszenzsonde (13 nt) hybridisiert und danach dissoziiert. ArrayWoRx-Bilder der Chips sind in Abbildung 3.8 auf S. 66 dargestellt.

Die besten Ergebnisse bei Fluoreszenzintensität sowie Spotform und -homogenität wurden mit einer affinen Bindung der PCR-Produkte an NeutrAvidin erreicht. Vor allem die

Spots der EDC/Methylimidazol-Kopplung weisen eine schlechte Spothomogenität im Vergleich zu denen des NeutrAvidin-Chips auf. Außerdem ist ihre Fluoreszenzintensität geringer. Offensichtlich wird hier mehr DNA benötigt um eine vergleichbare Intensität wie beim NeutrAvidin-Chip zu erreichen. Aus diesem Grund wurden NeutrAvidin-Oberflächen bei weiteren Versuchen bevorzugt.

Bei allen Kopplungsmethoden weist die Hybridisierungskontrolle (c3) eine größere Fluoreszenzintensität auf als die Spots der PCR-Produkte. Das könnte mehrere Ursachen haben: Die verwendeten Oligonukleotide (35 Basen) sind wesentlich kürzer als das gespotete PCR-Produkt (226 Basenpaare). Wenn DNA auf Oberflächen appliziert wird, tritt durch das negativ geladene Rückgrat eine elektrostatische Abstoßung der Moleküle auf. Bei den Molekülen ist dieser Effekt umso größer, je höher die Basenanzahl wird. Somit ist die Kopplungseffizienz von PCR-Produkten per se schlechter als die von Oligonukleotiden. Da PCR-Produkte Doppelstränge ausbilden, wird die negative Ladung der Moleküle noch weiter erhöht. Kommt es also zu einer Bindung an der Oberfläche, so wird die Belegungsdichte von PCR-Produkten selbst bei Lösungen gleicher Konzentration oder applizierter DNA-Menge stets geringer sein als die von Oligonukleotiden.

Als weiterer limitierender Faktor kommt bei der EDC/Methylimidazolkopplung hinzu, dass nicht nur endständige Phosphatgruppen der DNA aktiviert werden können; auch Gruppen des Phosphatrückgrats können betroffen sein. Dadurch können PCR-Produkte an mehreren Stellen an die Oberfläche gekoppelt sein und so die Bindung weiterer Moleküle verhindern.

Pufferoptimierung

Das im vorhergehenden Absatz geschilderte Problem der negativen Ladung von langen DNA-Molekülen kann durch den Einsatz von ionischen Puffern abgeschwächt werden. Zusätzlich erfordert die Verwendung von Protein-beschichteten Chips die Optimierung des Spotting- und Reaktionspuffers. Getestet wurden folgende Lösungen: Wasser, HEN-Puffer (HEPES-haltig, siehe Abbildung 4.2), 3x SSC, und 3x SSC mit 1,5 M Betain.

Am deutlichsten wird die Notwendigkeit des Einsatzes von optimierten Spottingpuffer bei den mit Wasser-DNA-Lösungen gesetzten Spots (siehe Abbildung 3.9, S. 67). Durch Verdunstung verteilte sich das PCR-Produkt nicht über die Spotfläche, sondern konzentrierte sich fast ausschließlich im schmalen äußerem Bereich der Spots. Dadurch ist weder eine reproduzierbare Analyse der Fluoreszenzintensität noch von kinetischen Parametern möglich.

Diehl et al. [2001] beschrieben bereits die positive Wirkung von mit Betain supplementierten Puffern. Allerdings setzten sie den Puffer bei kovalenten Kopplungen mit Epoxy-modifizierten Oberflächen ein. Trotz der unterschiedlichen Oberflächenmodifikation (hier NeutrAvidin) zeigt der Vergleich von SSC-Puffer-Spots und SSC/Betain-Puffer-Spots, dass der Zusatz von Betain einerseits die Kristallbildung verhindert, andererseits aber auch zu einer geringeren Fluoreszenzintensität führt.

Die besten Ergebnisse in Bezug auf Spotform und -homogenität sowie Fluoreszenzintensität konnten mit dem HEN-Puffer erzielt werden. Die HEPES-haltige Lösung wurde bereits im Zusammenhang mit Arbeiten an Streptavidinoberflächen [Jobs et al., 2002] für

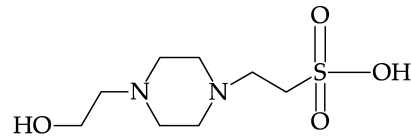


Abbildung 4.2: Chemische Formel von HEPES

die DASH-Analyse verwendet. Der stabilisierende Einfluß der zwitterionischen Verbindung auf Proteine und DNA wird bei vielen Anwendungen genutzt: So erhöht beispielsweise der Zusatz von HEPES zum Gel-Elektrophorese-Puffer TBE die Mobilität einzelsträngiger DNA [Sambrook and Russell, 2001]. Ein HEPES-haltiger Puffer anstatt eines anderen Bindungspuffers wurde für die Bindung von radioaktiv markierter DNA an immobilisierte Proteine beschrieben [Singh, 1993].

Der Puffer HEN wurde für die weiteren Versuche verwendet.

Konzentration der PCR-Produkte

Ziel dieses Versuches war es, die Konzentration an PCR-Produkt zu bestimmen, die bei geringster Menge optimale Analyseergebnisse erbringt. Es wurde eine Konzentrationsreihe (25 bis 1000 ng/ μ l) auf NeutrAvidin-Chips gespottet. Die Fluoreszenzintensität wurde analysiert und k_D bestimmt. In Abbildung 3.12 auf S. 69 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

Ab einer Konzentration von 100 ng/ μ l ließ sich eine Kurvenanpassung durchführen. Bei geringeren Konzentrationen war das nicht mehr möglich, da die Fluoreszenzintensität zu gering war. Ein Vergleich der Ergebnisse zeigt, dass die Fluoreszenzintensität mit zunehmender Konzentration zunimmt. Ebenso steigt die Abweichung (Standardabweichung) der Spot-Intensität untereinander, was auf ein höheres Signal/Rausch-Verhältnis zurückzuführen ist. Bei 250 ng/ μ l kann man eine deutliche Differenzierung sowohl durch Fluoreszenzintensitäts-Analyse als auch durch den Vergleich der kinetischen Werte erkennen. Bei geringerer Konzentration ist der Unterschied zwischen full- und mis-Match- k_D geringer. Somit liefert die Konzentration von 250 ng/ μ l PCR-Produkt eine für die angestrebte Anwendung ausreichende Diskriminierung. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der kovalenten Kopplung von 500 Bp langen PCR-Produkten an aminosilanisierten Oberflächen von Diehl et al. [2001].

In Tabelle 3.12, B. ist das Verhältnis $k_{D(mm)}/k_{D(fm)}$ der verschiedenen Konzentrationen aufgeführt. Bei der höchsten Konzentration an PCR-Produkt tritt auch das größte Verhältnis auf. Das zeigt, dass bei einer höheren Belegungsdichte eine bessere Diskriminierung erreicht werden kann. Es ist jedoch unwirtschaftlich in Hinblick auf Kosten und Arbeitsaufwand, eine so hohe DNA-Konzentration wie 1000 ng/ μ l für das Spotting zu verwenden. Da bei 250 ebenso wie bei 500 ng/ μ l ein Faktor von 1,7 erreicht wird, werden PCR-Produkte mit 250 ng/ μ l auf Chips gespottet.

Temperaturoptimierung

Um nicht nur eine Differenzierung von full- und mis-Match-Hybriden durch kinetische Analyse zu erreichen, sondern auch heterocygote Proben analysieren zu können, wurde die Reaktionstemperatur variiert. Dazu wurde das Dissoziationsverhalten von Cy5-Sonden an immobilisierten Oligonukleotiden bei 25, 30 und 35°C untersucht. Zum einen tropfte man DNA, die mit der Sonde einen full- bzw. einen mis-Match ergab. Zum anderen wurde eine 1:1-Mischung dieser beiden Oligonukleotide gekoppelt, um heterocygote DNA zu simulieren.

Anhand der k_D -Werte zeigt sich, dass die Differenz zwischen full- und mis-Match mit steigender Temperatur zunimmt (Abbildung 3.13, S. 70). Während die Fehlerbalken bei 25°C noch überlappen, sind sie bei 30°C bereits deutlich getrennt. Bei 35°C wird die Abweichung vom Mittelwert zwar größer, die Abweichung der Werte nimmt jedoch auch zu (Standardabweichung).

Es wird bei 30 °C gearbeitet, da bereits bei dieser Temperatur eine Differenzierung zwischen homocygoter und heterocygoter DNA möglich ist. Eine weitere Erhöhung der Temperatur auf 35°C würde allerdings zu einer geringeren Hybridisierungsausbeute führen, da sich die Reaktionstemperatur der Schmelztemperatur des Hybrids zu weit annähert. Das ist hinsichtlich der geringeren Hybridisierungseffizienz und der daraus resultierenden niedrigeren Fluoreszenzintensität unerwünscht für die Analyse.

4.3 Analyse von Patientengruppen

Die Versuche mit SNP-Chips wurden mit den optimierten Parametern nach dem in Abbildung 3.14 dargestellten Schema durchgeführt.

4.3.1 SULT1A1

In diesem Versuch sollten 24 Patientenproben untersucht werden. Die Experimente wurden mit den optimierten Parametern durchgeführt. Da bei der Analyse des SNP im SULT1A1-Gen nur homocygote Proben genotypisiert werden sollten, wurden die PCR-Produkte bei 25°C im Durchfluss-Biochip-Scanner vermessen.

In den Abbildungen 3.18 und 3.19 sind die Ergebnisse der Fluoreszenzintensitäts- und der kinetischen Analyse dargestellt. Für die Entscheidung über den Genotyp wurden die angegebenen Schwellenwerte (rote bzw. grüne Linie in den Abbildungen) herangezogen. Zusätzlich wurde die Referenzmethode RFLP angewendet, um die Analyseergebnisse zu verifizieren. In Tabelle 3.4 sind alle Ergebnisse zusammengefasst.

Die RFLP-Analyse ergab, dass die Probe O32 heterocygot ist. Aufgrund der Reaktionstemperatur von 25°C war es allerdings nicht möglich, zwischen hetero- und homocygoten Proben zu unterscheiden. Bis auf diese Ausnahme (O32) konnte jeder Genotyp der 24 Patienten korrekt bestimmt werden [Schwonbeck et al., 2004].

Durch die relativ hohen Abweichungen der k_D -Werte (Standardabweichung) wird deutlich, dass mehrere Spots vermessen werden müssen, um diese zu kompensieren. Bei den

SULT1A1-Chips wurden jedoch bei fünf PCR-Produkten nur zwei bzw. bei 15 Proben vier Spots gesetzt. Zusätzlich zeigten die Temperaturversuche mit Oligonukleotiden, dass eine höhere Reaktionstemperatur zu einer besseren Diskriminierung von homo- und heterozygoten Proben führt.

4.3.2 Adiponectin-Promotor

Es wurde eine Gruppe von 44 Patienten mit SNP-Chips untersucht. Anhand der von Dr. Spranger zur Verfügung gestellten Genotypinformation, die mit der Referenzmethode SNUPE ermittelt wurde, konnten die Chip-Ergebnisse evaluiert werden. In Tabelle 3.9 sind die Ergebnisse beider Methoden gegenübergestellt.

Ein Vergleich der Ergebnisse ergibt, dass der Genotyp von 14 der untersuchten 44 Proben mit dem der Referenzmethode übereinstimmt, was einer Genauigkeit von 32 % entspricht. Übereinstimmend mit der Referenzmethode wurde festgestellt, dass keine der untersuchten Proben den Genotyp AA besitzt.

Offensichtlich können homocygote Proben - also Wildtyp (GG) und Mutante (AA) - gut voneinander unterschieden werden. Die Differenz der k_D -Werte ist ausreichend groß (siehe Werte der Kontrollen r11391g und r11391a in Tabelle 3.8 und Abbildung 3.23). Es ist jedoch problematisch, homocygote Wildtyp-DNA (GG) von heterocygoter DNA (GA) anhand der kinetischen Analyse zu unterscheiden. Nur wenige nach der Referenzmethode bestimmte Wildtypen liegen unter dem k_D -Schwellenwert.

Wie aus Abbildung 3.25 (S. 84) hervorgeht, führte die kinetische Analyse der Kurven von Spots, die eine höhere Fluoreszenzintensität aufwiesen als die anderen des Arrays, zu Genotypen, die ebenfalls mit der Referenzmethode bestätigt werden konnten. Somit war auch eine Genotypisierung der Patientengruppe durch Fluoreszenzintensitäts-Analyse nur im Falle der Proben A1, B1, C1, E1, F1 und G1 möglich. Die Spots der anderen Proben wiesen eine zu geringe Fluoreszenzintensität auf, um durch Vergleich mit der Fluoreszenzintensität der Kontrollen einen Genotyp zuzuweisen. Dass Spots mit gleichem Genotyp und gleicher Spottingkonzentration eine unterschiedlich hohe Fluoreszenzintensität aufweisen, kann nur mit einer mechanischen Behinderung der Hybridisierung durch eine fehlerhafte Fließzelle erklärt werden. Die Fluidik über den Chip wird außer durch Fließgeschwindigkeit, Puffer und Chipoberfläche auch durch die eingesetzte Fließzelle beeinflusst. Bei einer Beeinträchtigung der Zellenfunktion könnte es somit zu einem unerwünschtem Fließverhalten kommen. Denkbar ist hier z.B., dass die Zelle die Oberfläche an bestimmten Stellen berührt und so die Hybridisierung der Sonde behindert. Ebenso wäre es möglich, dass die Oberfläche durch undichte Stellen im Zellsilikon nur ungleichmäßig überströmt würde. Die verwendete Fließzelle wurde zur Überprüfung der Integrität und Funktionalität an den Hersteller gesandt.

Die insgesamt sehr geringe Intensität der Spots nach der Dissoziation ist auf eine unzureichende Hybridisierung von Fluoreszenzsonden zurückzuführen. Dafür kann es mehrere Ursachen geben. Möglicherweise ist die Länge der ausgewählten Sonden nicht ausreichend für die Hybridisierung. Die Sonden wurden mit der Maßgabe ausgewählt, eine möglichst große Differenz bzw. ein großes Verhältnis zwischen den k_D -Werten aus mis- und full-Match zu erhalten (siehe Kapitel Sondenlänge S. 89 und 62). Um das zu erreichen, wurde im Falle des SULT1A1-SNPs eine 13 Basen lange Sonde gegenüber länge-

ren Sonden (15, 17 Basen), die höhere Hybridisierungsausbeuten lieferten, bevorzugt. Da sich die Auswahl der Adiponectin-Sonden an der Schmelztemperatur der SULT1A1-Sonde orientierte, könnte eine zu geringe Sondenlänge Grund für die nicht ausreichende Hybridisierung sein.

Eine weitere Ursache für die geringe Fluoreszenzintensität aller PCR-Produkte-Spots könnte in der Ausbildung von Sekundärstrukturen an der Oberfläche liegen. Das zeigt die durchgeführte MFOLD-Analyse dreier PCR-Produkte (siehe Abbildung 3.26, S. 85). Möglicherweise sind diese Strukturen auch die Ursache für die unzureichende Diskriminierung bei den SNPs 11426 und 11377 (siehe Abbildung 3.21, S. 79).

Das für die kinetische Analyse der Dissoziation entwickelte Wiederbindungsmodell bzw. die eingesetzte Kurvenanpassung von Frank Kleinjung [Kleinjung, 1998] ist für eine Reaktion an der Oberfläche konzipiert. Bei heterocygoter DNA muss das Modell zwangsläufig versagen, da sich die Dissoziationskurven von mis- und full-Match-Hybriden überlagern. Die errechneten k_D -Werte bei heterocygoten Proben sind demnach mit einer größeren Abweichung behaftet als bei homocygoten Proben. Aus diesem Grund wurden die Abweichungen der Kurvenanpassung mit „xfit“ für die drei möglichen Fälle homocygoter Wildtyp (full-Match), homocygote Mutante (mis-Match) und Heterocygote (Mix) verglichen.

Oligonukleotid	Hybrid	k_D in 10^{-4} s^{-1}	Abweichung (%)	Mittelwert der Abweichung (%)
r11391g	full-Match	1,4	16,8	15,7
		1,4	14,1	
		1,6	17,1	
		1,4	15,7	
r11391a	mis-Match	15,4	26,3	24,0
		15,8	22,8	
		13,2	23,9	
		12,0	23,2	
r11391g/r11391a	Mix	2,3	37,3	36,5
		2,0	38,7	
		2,2	36,6	
		2,3	33,5	

Tabelle 4.2: Abweichungen der Kurvenanpassung bei der Analyse des SNP 11391.

Anhand der in Tabelle 4.2 aufgeführten k_D -Werte und Abweichungen zeigt sich, dass die Abweichung beim Mix höher ist als die der Homocygoten. Dies könnte neben den gerätespezifischen Fehlerquellen ebenfalls zu einer fehlerbehafteten Analyse von heterocygoter DNA führen, die wiederum die Diskriminierung von Wildtyp und Heterocygote erschwert.

4.3.3 Fazit

Die Genotypisierung des SNP im SULT1A1-Gen in 24 homocytoten Patientenproben konnte durch kinetische Analyse und Auswertung der Fluoreszenzintensität mit einer Genauigkeit von 96% durchgeführt werden. Bei der Probe, deren Genotyp nicht richtig bestimmt werden konnte, handelte es sich um einen Heterocytoten. Versuche mit gemischten Oligonukleotiden zeigten jedoch, dass durch eine höhere Reaktionstemperatur die Diskriminierung von heterocytoter und homocytoter DNA möglich ist.

Bei der Analyse des SNP 11391 im Adiponectin-Gen wurde eine Genauigkeit von 32% erreicht. Dieses Ergebnis erfordert neben der Neugestaltung der Reaktionsparameter eine Überprüfung des Fließsystems, um eventuelle mechanische Schäden der Fließzelle als Ursache für eine ungleichmäßige Hybridisierung auszuschließen.

Im Hinblick auf eine für die kinetische Analyse zu geringe Fluoreszenzintensität ist zum einen eine weitere Optimierung der Fluoreszenz-Sondenlänge notwendig. Eine längere Sonde soll eine bessere Hybridisierungsausbeute ergeben, da durch mehr bindende Basenpaare eine höhere Intensität erreicht wird. Dabei ist jedoch zu beachten, dass trotz der verlangsamten Dissoziation immer noch die Analyse durch k_D -Werte sowie durch Fluoreszenzintensitätsauswertung möglich ist.

Zum anderen soll die Einführung eines Temperaturgradienten während der Hybridisierungsphase zu einer höheren Hybridisierungsausbeute führen, da mögliche Sekundärstrukturen des immobilisierten, einzelsträngigen PCR-Produkts denaturiert werden. Die Bindung der Fluoreszenzsonde würde dadurch erleichtert. Die Dissoziation kann hingegen bei der optimierten Temperatur durchgeführt werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Genotypisierung von homocytoten Wildtyp- bzw. Mutantenproben durch kinetische und Fluoreszenzintensitätsauswertung erfolgreich war. Bisher durchgeführte Versuche zur Heterocytotendiskriminierung zeigten, dass diese Analyse prinzipiell möglich ist. Die Diskriminierung heterocytoter von homocytoten PCR-Produkten war aufgrund der geringen Fluoreszenzintensität jedoch nur im Einzelfall möglich, da das geringe Signal/Rausch-Verhältnis der Mehrzahl der Spots die richtige Genotypisierung nicht zuließ. Neben der weiteren Optimierung der Reaktionsparameter ist es somit unerlässlich, die bislang eingesetzte Hardware in Hinblick auf ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis weiter zu entwickeln. So zeigt beispielsweise die von Duveneck et al. [2003] veröffentlichte Arbeit zur Zwei-Photonen-Fluoreszenzanregung (two-photon fluorescence excitation - TPE) einen Weg zur besseren Unterscheidung eines schwachen Fluoreszenzsignals vom Hintergrundrauschen. Das dort beschriebene TPE-Prinzip an planaren Dünnschicht-Wellenleiterstrukturen erreicht ein bis zu sechs Größenordnungen höheres Signal, verglichen mit Signalen aus der konfokalen Mikroskopie. Die Integration eines solchen Systems in den Durchfluss-Biochip-Scanner könnte durchaus zu einer Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses führen, war jedoch aufgrund des enormen apparativen Aufwandes in der vorliegenden Arbeit nicht möglich.

Kapitel 5

Zusammenfassung

Einzelpunktmutationen sind die am häufigsten auftretende Variation im Genom und spielen als Krankheitsmarker eine große Rolle. Des Weiteren sind sie in der Pharmakogenetik, in Evolutions- und Populations-Studien sowie in der forensischen Analytik von großer Bedeutung. So kann beispielsweise das Auftreten von Polymorphismen mit einer Prädisposition für bestimmte Krankheiten assoziiert werden. Für die SNP-Analyse sind somit Methoden erforderlich, mit denen Polymorphismen bei vielen Patienten analysiert werden können.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer SNP-Genotypisierungsmethode mit auf Mikroarrays immobilisierten PCR-Produkten. Für die Analyse wurde ein faseroptischer Affinitätssensor bzw. ein Durchfluss-Biochip-Scanner mit integrierter Fluoreszenzdetektion verwendet. An den immobilisierten Analyten (PCR-Produkten) wurde eine Fluoreszenzoligonukleotidsonde hybridisiert und anschließend die Dissoziation der Sonde im Fluss verfolgt. Die Diskriminierung von Wildtyp- und Mutanten-DNA erfolgte durch die kinetische Auswertung der Dissoziationskurven sowie durch die Analyse der Fluoreszenzintensität.

Die Versuche am faseroptischen Affinitätssensor zeigten, dass DNA-DNA-Hybride sowohl von Oligonukleotiden als auch von PCR-Produkten ein typisches Dissoziationsverhalten aufweisen, wobei fehlgepaarte Hybride eine signifikant schnellere Dissoziation zeigen als perfekt passende Hybride. Dieser Geschwindigkeitsunterschied lässt sich durch den Vergleich der jeweiligen kinetischen Geschwindigkeitskonstanten k_D quantitativ erfassen.

Da die Kopplung des Analyten an der Chipoberfläche sowie die Hybridisierungs- und Dissoziationsparameter essentiell für die Methodenentwicklung war, wurden die Parameter für ein optimales Spotting und die Immobilisierung von PCR-Produkten ermittelt. Getestet wurden die affine Kopplung von biotinylierten PCR-Produkten an Streptavidin-, Avidin- und NeutrAvidin-Oberflächen sowie die kovalente Bindung von phosphorylierten Amplifikaten mit der EDC/Methylimidazol-Methode. Die besten Ergebnisse sowohl in Spotform und -homogenität als auch im Signal/Rausch-Verhältnis wurden an NeutrAvidin-Oberflächen erreicht.

Für die Etablierung der Mikroarray-Genotypisierungsmethode durch kinetische Analyse nach einem Hybridisierungsexperiment wurden Sondenlänge, Puffersystem, Spotting-

Konzentration des Analyten sowie Temperatur optimiert. Das Analysensystem erlaubte es, PCR-Produkte mit einer Konzentration von 250 ng/ μ l in einem HEPES-EDTA-NaCl-Puffer auf mit NeutrAvidin beschichtete Glasträger zu spotten. In den anschließenden Hybridisierungs- und Dissoziationsexperimenten bei 30 °C konnte die Diskriminierung von homocygoter Wildtyp- und homocygoter Mutanten- sowie heterocygoter DNA am Beispiel von Oligonukleotid-Hybriden erreicht werden.

In einer Gruppe von 24 homocygoten Patienten wurde ein Polymorphismus im SULT1A1-Gen analysiert. Sowohl durch kinetische Auswertung als auch mit der Analyse der Fluoreszenzintensität wurde der Genotyp der Proben identifiziert. Die Ergebnisse wurden mit dem Referenzverfahren, der Restriktionschnittstellenanalyse (PCR-RFLP) validiert. Lediglich ein Genotyp wurde falsch bestimmt, die Genauigkeit lag bei 96%.

In einer Gruppe von 44 Patienten wurde der Genotyp eines SNP in der Adiponectin-Promotor-Region untersucht. Nach Vergleich der Analysenergebnisse mit denen eines Referenzverfahrens (SNuPE) konnten lediglich 14 der untersuchten 44 Genotypen bestätigt werden. Ursache für die unzureichende Genauigkeit der Methode war vor allem das schlechte Signal/Rausch-Verhältnis.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das in dieser Arbeit entwickelte Analysensystem für die Genotypisierung von Einzelpunktmutationen geeignet ist, homocygote Patientenproben zuverlässig zu analysieren. Prinzipiell ist das auch bei heterocygoter DNA möglich. Da nach aktuellem Kenntnisstand eine SNP-Analysemethode an immobilisierten PCR-Produkten noch nicht veröffentlicht wurde, stellt das hier entwickelte Verfahren eine Alternative zu bisher bekannten Mikroarray-Verfahren dar. Als besonders vorteilhaft erweist sich der reverse Ansatz der entwickelten Methode: Andere Chip-Anwendungen konzentrieren sich darauf, eine große Anzahl Oligonukleotide auf Arrays zu immobilisieren. Somit können viele Polymorphismen eines einzigen Patienten genotypisiert werden. Man benötigt jedoch pro Patient einen Chip.

Der PCR-Produkte-Chip hingegen erlaubt die parallele Analyse vieler Patienten mit nur einem Chip. Der hier vorgestellte Ansatz ist demnach eine kostengünstigere und weniger hoch dimensionierte Lösung für Fragestellungen beispielsweise in der Ernährungswissenschaft, bei denen meist eine mittlere Anzahl Patienten auf nur einige wenige SNPs zu untersuchen ist. Wenn es gelingt, durch die Weiterentwicklung der Hardware bzw. weiterer Optimierung eine Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses und damit die Diskriminierung von heterocygoter DNA zu erreichen, kann diese Methode zukünftig bei der Analyse von mittelgroßen Patientengruppen alternativ zu anderen Genotypisierungsmethoden verwendet werden.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Das ganze Genom umfassende Assoziationsstudien	3
1.2	Prinzip der denaturierenden HPLC	9
1.3	Modulares Design einiger SNP-Genotypisierungs-Assays	11
1.4	SNP-Analyse durch Restriktionsschnittstellenanalyse	12
1.5	Schematische Darstellung des Prinzips des Pyrosequencing	13
1.6	Allel-Diskriminierung beim TaqMan-Assay	15
1.7	Prinzip der Dynamischen allel-spezifischen Hybridisierung (DASH)	16
1.8	Beispiel einer DASH-Analyse	16
1.9	Prinzip des Invader Assays	17
1.10	Übersicht über Mikroarraytechniken	21
1.11	Übersicht über photolithografische Verfahren zur Synthese von Oligonukleotiden auf Chips	22
1.12	Ein Verfahren zur kovalenten Kopplung von aktivierter DNA an Glasoberflächen	24
1.13	Überblick über die SNP-Analyse mit der BeadArray-Technologie	26
1.14	Minisequencing auf Mikroarrays	27
1.15	Mini-Kompartimente auf einem Glas-Chip	28
1.16	Jablonski-Diagramm und Übersicht über Fluoreszenzfarbstoffe	30
1.17	Sulfotransferasereaktion am Beispiel von Paracetamol und Cosubstrat-Synthese. Kristallstruktur von SULT1A1.	32
1.18	Prinzip der entwickelten Analysenmethode	35
2.1	Schematischer Geräteaufbau des faseroptischen Affinitätssensors.	47
2.2	Schematischer Geräteaufbau des Durchfluss-Biochip-Scanners	49
2.3	Schematische Abbildung der Fließzelle mit Isolierblock und Chip	49

2.4	Schema der Scanner-Optik	50
3.1	Schematische Darstellung zweier Hybride an der Glasfaser	59
3.2	Hybridisierungsexperimente mit Oligonukleotiden am Affinitätssensor	60
3.3	Regenerierbarkeit von Streptavidin-Fasern	60
3.4	Schematische Darstellung der Hybridisierung von Oligonukleotiden an einem einzelsträngigen PCR-Produkt	61
3.5	Hybridisierungsexperiment mit PCR-Produkten am Affinitätssensor	62
3.6	Optimierung der Hybridlänge	63
3.7	FI-Zeit-Kurven von DNA-Hybriden unterschiedlicher Länge auf einem Avidin-Chip	63
3.8	Test verschiedener Oberflächenmodifikationen für Hybridisierungsexperimente an PCR-Produkten	66
3.9	Test verschiedener Lösungsmittel als Spottingpuffer für PCR-Produkte	67
3.10	Diagramm über die Fluoreszenzintensität bei verschiedenen Puffersystemen	68
3.11	Optimierung der Spotting-Konzentration von PCR-Produkten	68
3.12	Diagramm und Tabelle zur Optimierung der Spotting-Konzentration von PCR-Produkten	69
3.13	Übersicht über die Temperatur-Abhängigkeit der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante	70
3.14	Schema der optimierten SNP-Analyse mit dem Durchfluss-Biochip-Scanner.	71
3.15	ArrayWorX-Bild nach Beendigung eines Hybridisierungs- und Dissoziationsexperimentes eines DNA-Chips mit 24 Patientenproben	73
3.16	Übersicht über alle Zeit-Fluoreszenzintensität-Kurven eines SULT1A1-Chips im 8 × 12-Format	73
3.17	Restriktionsmuster von Proben im SULT1A1-Gen	74
3.18	Übersicht über die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten des SULT1A1-Chips	74
3.19	Übersicht über die ermittelten Fluoreszenzintensität des SULT1A1-Chips.	75
3.20	Temperaturabhängigkeit der Dissoziation bei Sonde r11391g	78
3.21	Vergleich des Dissoziationsverhaltens unterschiedlicher Sonden im Adiponectin-Gen	79
3.22	Agarose-Gel mit PCR-Produkten des Adiponectin-Gens	80
3.23	Übersicht über die gemittelten Geschwindigkeitskonstanten des Adiponectin-Chips	81

3.24	ArrayWoRx-Bild eines Adiponectin-Chips	81
3.25	Übersicht über die gemittelten Fluoreszenzintensitätswerte des Adiponectin-Chips	84
3.26	Ergebnisse der MFOLD-Analyse des PCR-Produkts aus der Adiponectin-Promotor-Region	85
4.1	Screenshot des Programms „xfit“	87
4.2	Chemische Formel von HEPES	92
A.1	MFOLD-Ergebnisse des Wildtyps 11377c: Struktur 1 und 2	XXVI
A.2	MFOLD-Ergebnisse des Wildtyps 11377c: Struktur 3 bis 5	XXVII
A.3	MFOLD-Ergebnisse des Wildtyps 11377g: Struktur 1 und 2	XXVIII
A.4	MFOLD-Ergebnisse des Wildtyps 11377g: Struktur 3 bis 5	XXIX
A.5	MFOLD-Ergebnisse des Wildtyps 11391g: Struktur 1 und 2	XXX
A.6	MFOLD-Ergebnisse des Wildtyps 11391g: Struktur 3 und 4	XXXI
A.7	MFOLD-Ergebnisse des Wildtyps 11391a: Struktur 1 und 2	XXXII
A.8	MFOLD-Ergebnisse des Wildtyps 11391a: Struktur 3 und 4	XXXIII
A.9	MFOLD-Ergebnisse des Wildtyps 11426a: Struktur 1 und 2	XXXIV
A.10	MFOLD-Ergebnisse des Wildtyps 11426a: Struktur 3 und 4	XXXV
A.11	MFOLD-Ergebnisse des Wildtyps 11426g: Struktur 1 und 2	XXXVI
A.12	MFOLD-Ergebnisse des Wildtyps 11426g: Struktur 3 und 4	XXXVII

Tabellenverzeichnis

1.1	Übersicht über ausgewählte SNP-Datenbanken im Internet	7
1.2	Übersicht über Diskriminierungsprinzipien, Reaktionsformate und Detektionsmethoden	10
1.3	Übersicht über kommerziell verfügbare Geräte zur Analyse bekannter SNPs	19
1.4	Übersicht über einige kovalente Kopplungsmethoden an Glasoberflächen	24
1.5	Allozyme der humanen Sulforttransferase SULT1A1	31
1.6	Verteilung der Genotypen und Allele von drei SNPs im APM1-Gen bei Diabetes Typ II-Patienten und einer Kontrollgruppe	33
2.1	Liste der verwendeten Chemikalien	42
2.2	Liste der verwendeten Oligonukleotide	43
2.3	Liste der verwendeten Enzyme	44
2.4	Übersicht über die verwendeten Glaträger	46
2.5	Liste der eingesetzten Geräte	46
2.6	Zeitplan eines typischen SNP-Faser-Experiments an gespotteten Oligonukleotiden	48
2.7	Zeitplan eines typischen SNP-Biochip-Experiments an gespotteten PCR-Produkten	51
2.8	Verdünnungsmuster der DNA-Standardreihe für die Konzentrationsbestimmung mit dem Platten-Reader.	53
2.9	Verdünnungsmuster für DNA-Lösungen mit einer Endkonzentration von 25 bis 1000 ng/ μ l (M = Mutanten-DNA; W = Wildtyp-DNA)	54
2.10	Übersicht über eingesetzte Mikroarray-Spotter	55
2.11	Übersicht über Scan-Parameter am ArrayWoRx e	56
3.1	Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten von Glasfaserexperimenten	59
3.2	Spotting-Muster für die Optimierung der Oberflächenmodifikation	65

3.3	Spotting-Muster für den SULT1A1-Chip	72
3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse für Analyse des SNP im SULT1A1-Gen	76
3.5	Übersicht über Schmelztemperatur verschiedener Hybridisierungssonden	77
3.6	Spotting-Muster für Oligonukleotid-Chips im Adiponectin-Gen	78
3.7	Spotting-Muster für den Adiponectin-Chip	80
3.8	Übersicht über den Genotyp der Patienten der Adiponectin-Gruppe nach der kinetischen Analyse	82
3.9	Tabellarischer Vergleich der Analysenergebnisse des Adiponectin-Chips mit Ergebnissen der Referenzmethode	83
4.1	Vergleich der unterschiedlichen Fittingmodelle	88
4.2	Abweichungen der Kurvenanpassung bei der Analyse des SNP 11391 . .	95
A.1	Übersicht über den untersuchten Polymorphismus im SULT1A1-Gen . .	XXII
A.2	Übersicht über Konzentration der gereinigten PCR-Produkte aus der SULT1A1-Gruppe.	XXIII
A.3	Übersicht über die Polymorphismen im PCR-Produkt aus der Adiponectin-Promotor-Gruppe	XXIV
A.4	Übersicht über die Bezeichnung der Patienten aus der Adiponectin-Gruppe	XXV

Literaturverzeichnis

- Adessi, C., Matton, G., Ayala, G., Turcatti, G., Mermod, J.-J., Mayer, P., and Kawashima, E. (2000). Solid phase DNA amplification: Characterisation of primer attachment and amplification mechanisms. *Nucleic Acid Research*, 28(20):e87. [1.2.3](#)
- Ahmadian, A., Gharizadeh, B., Gustafsson, A. C., Sterky, F., Nyren, P., Uhlen, M., and Lundeberg, J. (2000). Single-nucleotide polymorphism analysis by pyrosequencing. *Analytical Biochemistry*, 280:103–110. [1.1.5](#)
- Ahmadian, A., Russom, A., Andersson, H., Uhlén, M., Stemme, G., and Nilsson, P. (2002). SNP analysis by allele-specific extension in a micromachined filter chamber. *BioTechniques*, 32(4):748–754. [1.1.5](#)
- Akli, S., Chelly, J., Mezard, C., Gandy, S., Kahn, A., and Poenaru, L. (1990). A „G” to „A” mutation at position -1 of a 5’ splice site in a late infantile form of Tay-Sachs disease. *Journal of Biological Chemistry*, 265(13):7324–30. [1.1](#)
- Bailey, J. and Eichler, E. E. (2002). Are 100.000 „SNPs” useless? *Science*, 298(5598):1509. [1.1.2](#)
- Bailey, J. A., Yavor, A. M., Massa, H. F., Trask, B. J., and Eichler, E. E. (2001). Segmental duplications: organization and impact within the current human genome project assembly. *Genome Research*, 11:1005–1017. [1.1.2](#)
- Bamber, D. E., Fryer, A. A., Strange, R. C., Elder, J. B., Deakin, M., Rajagopal, R., Fawole, A., Gilissen, R. A., Campbell, F. C., and Coughtrie, M. W. (2001). Phenol sulfotransferase SULT1A1*1 genotype is associated with reduced risk of colorectal cancer. *Pharmacogenetics*, 11:679–85. [1.3](#)
- Baum, M., Bielau, S., Rittner, N., Schmid, K., Egelbusch, K., Dahms, M., Schlauersbach, A., Tahedl, H., Beier, M., Güimil, R., Scheffler, M., Hermann, C., Funk, J.-M., Wixmerten, A., Rebscher, H., Hönig, M., Andreae, C., Büchner, D., Moschel, E., Glathe, A., Jäger, E., Thom, M., Greil, A., Bestvater, F., Obermeier, F., Burgmaier, J., Thome, K., Weichert, S., Hein, S., Binnewies, T., Foitzik, V., Müller, M., Stähler, C. F., and Stähler, P. F. (2003). Validation of a novel, fully integrated and flexible microarray benchtop facility for gene expression profiling. *Nucleic Acid Research*, 31(23):e151. [1.2.2](#)
- Behrendorf, H. A., Pignot, M., Windhab, N., and Kappel, A. (2002). Rapid parallel mutation scanning of gene fragments using a microelectronic protein-DNA chip format. *Nucleic Acids Research*, 30(14):e64. [1.2.4](#)

- Beier, M. and Hoheisel, J. (1999). Versatile derivatisation of solid support media for covalent bonding on DNA-microchips. *Nucleic Acids Research*, 27(9):1970–7. 1.2.3
- Benters, R., Niemeyer, C. M., Drutschmann, D., Blohm, D., and Wöhrle, D. (2002). DNA microarrays with PAMAM dendritic linker systems. *Nucleic Acids Research*, 30(2):e10. 1.2.3
- Berg, L. M., Sanders, R., and Alderborn, A. (2002). Pyrosequencing technology and the need for versatile solutions in molecular clinical research. *Expert Rev.Mol.Diagn.*, 2(4):361–369. 1.5
- Berlin, K. and Gut, I. G. (1999). Analysis of negatively 'Charge tagged' DNA by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 13:1739–1743. 1.1.5
- Bier, F. F., Kleinjung, F., and Scheller, F. W. (1997). Real-time measurement of nucleic-acid hybridization using evanescent-wave sensors: steps toward the genosensor. *Sensors and Actuators B*, 38-39:78–82. 1.5.5, 4.1, 4.1
- Bilitewski, U., Bier, F., and Brandenburg, A. (1998). Immunosensors based on grating couplers. In Rogers, K. R. and Mulchandani, A., editors, *Affinity Biosensors - Techniques and Protocols*, Methods in Biotechnology. Humana Press, Totowa, New Jersey. 2.1.1, 2.2.7
- Buetow, K. H., Edmonson, M., MacDonald, R., Clifford, R., Yip, P., Kelley, J., Little, D. P., Strausberg, R., Koester, H., Cantor, C. R., and Braun, A. (2001). High-throughput development and characterization of a genomewide collection of gene-based single nucleotide polymorphism markers by chip-based matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98:581–584. 1.1.1
- Campos, M., dos Santos, M., Trevilatto, P., Scarel-Caminaga, R., Bezerra, F., and Line, S. (2004). Early failure of dental implants and TNF-alpha (G-308A) gene polymorphism. *Implant Dent.*, 13(1):95–101. 1.1.5
- Cargill, M., Altshuler, D., Ireland, J., Sklar, P., Ardlie, K., Patil, N., Lane, C. R., Lim, E. P., Kalyanaraman, N., Nemesh, J., Ziaugra, L., Friedland, L., Rolfe, A., Warrington, J., Lipschutz, R., Daley, G. Q., and Lander, E. S. (1999). Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nature Genetics*, 22:231–238. 1.2.4
- Carlini, E. J., Raftogianis, R. B., Wood, T. C., Jin, F., Zheng, W., Rebbeck, T. R., and Weinschlbaum, R. M. (2001). Sulfation pharmacogenetics: SULT1A1 und SULT1A2 allele frequencies in Caucasian, Chinese and African-American subjects. *Pharmacogenomics*, 11:57–68. 1.3
- Chen, Y. and Tan, E.-C. (2004). Identification of human Clock gene variants by denaturing high-performance liquid chromatography. *Journal of Human Genetics*, 49(4):209–14. 1.1.3
- Collins, F. S., Guyer, M. S., and Chakravarti, A. (1997). Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation. *Science*, 278:1580–1581. 1.1.1, 1.1, 1.1.1
- Cotton, R. G. (1999). Mutation detection by chemical cleavage. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering*, 14:165–168. 1.1.3

- Coughtrie, M. W. (2002). Sulfation through the looking glass-recent advances in sulfotransferase research for the curious. *The Pharmacogenomics Journal*, 2:297–308. **1.5, 1.3, 1.3, 1.17**
- Coughtrie, M. W., Gilissen, R. A., Shek, B., Strange, R. C., Fryer, A. A., Jones, P. W., and Bamber, D. E. (1999). Phenol sulphotransferase SULT1A1 polymorphism: molecular diagnosis and allele frequencies in Caucasian and African populations. *Biochemical Journal*, 337:45–49. **1.5, 1.3**
- Coughtrie, M. W. and Johnston, L. E. (2001). Interactions between dietary chemicals and human sulfotransferases-molecular mechanisms and clinical significance. *Drug Metabolism And Disposition*, 29:522–528. **1.3**
- Cutler, D. J., Zwick, M. E., Carrasquillo, M. M., Yohn, C. T., Tobin, K. P., Kashuk, C., Mathews, D. J., Shah, N. A., Eichler, E. E., Warrington, J. A., and Chakravarti, A. (2001). High-throughput variation detection and genotyping using microarrays. *Genome Research*, 11:1913–1925. **1.2.4**
- Daly, M. J., Rioux, J., Schaffner, S., Hudson, T. J., and Lander, E. S. (2001). High-resolution haplotype structure in the human genome. *Nature Genetics*, 29:229–232. **1.1.1**
- Das, K., Lin, Y., Widen, E., Zhang, Y., and Scherer, P. E. (2001). Chromosomal localization, expression pattern, and promoter analysis of the mouse gene encoding adipocyte-specific secretory protein Arcp30. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 280:1120–9. **1.4**
- dbSNP (2004). Reference SNP(refSNP) Cluster Report. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?type=rs&rs=1042028. 26.02.2004 18:17 Uhr. **1.1, 1.1.2**
- Devaney, J. M., Pettit, E. L., Kaler, S. G., Vallone, P. M., Butler, J. M., and Marino, M. A. (2001). Genotyping of two mutations in the HFE gene using single-base extension and high-performance liquid chromatography. *Anal. Chem.*, 73:620–624. **1.1.3**
- Diehl, F., Beckmann, B., Kellner, N., Hauser, N. C., Diehl, S., and Hoheisel, J. D. (2002). Manufacturing DNA microarrays from unpurified PCR products. *Nucleic Acids Research*, 30(16):e79. **4.2.1**
- Diehl, F., Grahlmann, S., Beier, M., and Hoheisel, J. D. (2001). Manufacturing DNA microarrays of high spot homogeneity and reduced background signal. *Nucleic Acids Research*, 29(7):e38. **2.1.1, 2.2.9, 2.2.9, 3.2.2, 3.2.3, 4.2.1, 4.2.1, 4.2.1**
- Doi, K., Doi, H., Noiri, E., Nakao, A., Fujita, T., and Tokunaga, K. (2004). High-throughput single nucleotide polymorphism typing by fluorescent single-strand conformation polymorphism analysis with capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 25:833–8. **1.1.3**
- Dolan, P. L., Wu, Y., Ista, L. K., Metzenberg, R. L., Nelson, M. A., and Lopez, G. P. (2001). Robust and efficient synthetic method for forming DNA microarrays. *Nucleic Acids Research*, 29(21):e107. **1.2.3**
- Dubiley, S., Kirillov, E., and Mirzabekov, A. D. (1999). Polymorphism analysis and gene detection by minisequencing on an array of gel-immobilized primers. *Nucleic Acids Research*, 27:e19. **1.2.4**

- Duveneck, G. L., Bopp, M., Ehrat, M., Balet, L., Haiml, M., Keller, U., Marowsky, G., and Soria, S. (2003). Two-photon fluorescence excitation of macroscopic areas on planar waveguides. *Biosensors and Bioelectronics*, 18:503–510. [4.3.3](#)
- Edman, C. F., Raymond, D. E., Wu, D. J., Tu, E., Sosnowski, R. G., Butler, W. F., Nerenberg, M., and Heller, M. J. (1997). Electric field directed nucleic acid hybridization on microchips. *Nucleic Acid Research*, 25(24):4907–14. [1.2.4](#)
- Engelke, C. E., Meinel, W., Boeing, H., and Glatt, H. (2000). Association between functional genetic polymorphisms of human sulfotransferases 1A1 and 1A2. *Pharmacogenomics*, 10:163–9. [1.3](#), [3.1.1](#)
- Epstein, J. R., Ferguson, J. A., Lee, K.-H., and Walt, D. R. (2003a). Combinatorial decoding: an approach for universal DNA array fabrication. *Journal of the American Chemical Society*, 125:13753–13759. [1.2.4](#), [1.2.4](#)
- Epstein, J. R., Leung, A. P., Lee, K.-H., and Walt, D. R. (2003b). High-density, microsphere-based fiber optic DNA microarrays. *Biosensors & Bioelectronics*, 18:541–546. [1.2.4](#)
- Epstein, J. R. and Walt, D. R. (2003). Fluorescence-based fibre optic arrays: a universal platform for sensing. *Chem. Soc. Rev.*, 32:203–214. [1.2.4](#)
- Erdogan, F., Kirchner, R., Mann, W., Ropers, H.-H., and Nuber, U. A. (2001). Detection of mitochondrial single nucleotide polymorphisms using a primer elongation reaction on oligonucleotide microarrays. *Nucleic Acids Research*, 29:e36. [1.2.4](#)
- Estivill, X., Cheung, J., Pujana, M. A., Nakabayashi, K., Scherer, S. W., and Tsui, L.-C. (2002). Chromosomal regions containing high-density and ambiguously mapped putative single nucleotide polymorphisms (snps) correlate with segmental duplications in the human genome. *Human Molecular Genetics*, 11(17):1987–1995. [1.1.2](#)
- Evans, W. E. and Relling, M. V. (1999). Pharmacogenomics: Translating functional genomics into rational therapeutics. *Science*, 286:487–491. [1.1.1](#)
- Falbe, J. and Regitz, M. (1996). *Römpp Lexikon Chemie*. Thieme Verlag, Stuttgart, 10th edition. [1.2.5](#)
- Fan, J.-B., Chen, X., Halushka, M. K., Berno, A., Huang, X., Ryder, T., Lipshutz, R., Lockhart, D. J., and Chakravarti, A. (2000). Parallel genotyping of human SNPs using generic high-density oligonucleotide Tag arrays. *Genome Research*, 10:853–860. [1.2.4](#)
- Fan, J.-B., Surti, U., Taillon-Miller, P., Hsie, L., Kennedy, G. C., Hoffner, L., Ryder, T., Mutch, D. G., and Kwok, P.-Y. (2002). Paternal origins of complete hydatidiform moles proven by whole genome single-nucleotide polymorphism haplotyping. *Genomics*, 79(1):58–62. [1.2.4](#)
- Fei, Z. and Smith, L. M. (2000). Analysis of single nucleotide polymorphisms by primer extension and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 14:950–959. [1.1.5](#)
- Fodor, S. a. (1991). Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science*, 251:767–73. [1.2.1](#), [1.2.2](#), [1.2.4](#)

- Fried, S. K., Bunkin, D. A., and Greenberg, A. S. (1998). Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83(3):3847–50. [1.4](#)
- Gamage, N. U., Duggleby, R. G., Barnett, A. C., Tresillian, M., Latham, C. F., Liyou, N. E., McManus, M. E., and Martin, J. L. (2003). Structure of a human carcinogen-converting enzyme, SULT1A1. Structural and kinetic implications of substrate inhibition. *The Journal of Biological Chemistry*, 278:7655–62. [1.3](#), [1.17](#)
- Gao, Q. and Yeung, E. S. (2000). High-throughput detection of unknown mutations by using multiplexed capillary electrophoresis with poly(vinylpyrrolidone) solution. *Anal. Chem.*, 72:2499–2506. [1.1.3](#)
- Germer, S., Holland, M. J., and Higuchi, R. (2000). High-throughput SNP allele-frequency determination in pooled DNA samples by kinetic PCR. *Genome Research*, 10:258–266. [1.1.1](#)
- Ghosh, S. S. and Musso, G. F. (1987). Covalent attachment of oligonucleotides to solid supports. *Nucleic Acid Research*, 15(13):5353–72. [1.2.3](#)
- Glatt, H., Boeing, H., Engelke, C. E., Ma, L., Kuhlow, A., Pabel, U., Pomplun, D., Teubner, W., and Meinel, W. (2001). Human cytosolic sulfotransferases: genetics, characteristics, toxicological aspects. *Mutation Research*, 482:27–40. [1.3](#)
- Glatt, H., Engelke, C. E., Pabel, U., Teubner, W., Jones, A. L., Coughtrie, M. W., Andrae, U., Falany, C. N., and Meinel, W. (2000). Sulfotransferases: Genetics and role in toxicology. *Toxicology Letters*, 112-113:314–348. [1.3](#)
- Griffin, T. J., Hall, J. G., Prudent, J. R., and Smith, L. M. (1999). Direct genetic analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:6301–6306. [1.1.5](#)
- Guo, Z., Guilfoyle, R. A., Thiel, A. J., Wang, R., and Smith, L. M. (1994). Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports. *Nucleic Acids Research*, 22(24):5456 – 5465. [1.2.3](#), [4.2.1](#)
- Hacia, J. G., Fan, J.-B., Ryder, O., Jin, L., Edgemon, K., Ghandour, G., Mayer, R. A., Sun, B., Hsie, L., Robbins, C. M., Brody, L. C., Wang, D., Lander, E. S., Lipshutz, R., Fodor, S. P., and Collins, F. S. (1999). Determination of ancestral alleles for human single-nucleotide polymorphisms using high-density oligonucleotide arrays. *nature genetics*, 22:164–167. [1.2.4](#)
- Haff, L. A. and Smirnov, I. P. (1997). Single-nucleotide polymorphism identification assays using a thermostable DNA polymerase and delayed extraction MALDI-TOF mass spectrometry. *Genome Research*, 7:378–388. [1.1.5](#)
- Hall, J. G., Eis, P. S., Law, S. M., Reynaldo, L. P., Prudent, J. R., Marshall, D. J., Allawi, H. T., Mast, A. L., Dahlberg, J. E., Kwiatkowski, R. W., de Arruda, M., Neri, B. P., and Lyamichev, V. I. (2000). Sensitive detection of DNA polymorphisms by the serial invasive signal amplification reaction. *PNAS*, 97(15):8272–8277. [1.1.5](#)

- Hara, K., Boutin, P., Mori, Y., Tobe, K., Dina, C., Yasuda, K., Yamauchi, T., Otabe, T., Okada, T., Eto, K., Kadowaki, H., Hagura, R., Akanuma, Y., Yasaki, Y., Nagai, R., Taniyama, M., Matsubara, K., Yoda, M., Nakano, Y., Kimura, S., Tomita, M., Kimura, S., Ito, C., Froguel, P., and Kadowaki, T. (2002). Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with an increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetes*, 51:536–40. [1.4](#)
- Heise, C. (2004). Strukturierte Immobilisierung auf Oberflächen für Biochip-Anwendungen. *Dissertation*, Universität Potsdam, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät. [1.2.1](#), [1.2.3](#), [1.12](#), [2.10](#), [4.2.1](#)
- Hinds, D. A., Stokowski, R. P., Patil, N., Konvicka, K., Kershnerobich, D., Cox, D. G., and Ballinger, D. (2004). Matching strategies for genetic association studies in structured populations. *Am. J. Hum. Genet.*, 74:317–325. [1.1.1](#)
- Hirschhorn, J. N., Sklar, P., Lindblad-Toh, K., Lim, Y.-M., Ruiz-Gutierrez, M., Bolk, S., Langhorst, B., Schaffner, S., Winchester, E., and Lander, E. S. (2000). SBE-TAGS: An array-based method for efficient single-nucleotide polymorphism genotyping. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:12164–12169. [1.2.4](#)
- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., and Gelfand, D. H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' → 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:7276–7280. [1.1.5](#)
- Hotamisligil, G., Shargill, N., and Spiegelman, B. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 259(5091):87–91. [1.4](#)
- Howell, W. M., Jobs, M., and Brookes, A. J. (2002). iFRET: an improved fluorescence system for DNA-melting analysis. *Genome Research*, 12:1401–1407. [1.1.5](#)
- Hubbard, T., Barker, D., Birney, E., Cameron, G., Chen, Y., Clark, L., Cox, T., Cuff, J., Curwen, V., Down, T., Durbin, R., Eyraas, E., Gilbert, J., Hammond, M., Huminiacki, L., Kasprzyk, A., Lehvaslaiho, H., Lijnzaad, P., Mellosoop, C., Mongin, E., Pettett, R., Pocock, M., Potter, S., Rust, A., Schmidt, E., Searle, S., Slater, G., Smith, J., Spooner, W., Stabenau, A., Stalker, J., Stupka, E., Ureta-Vidal, A., Vastrik, I., and Clamp, M. (2002). The ensembl genome database project. *Nucleic Acids Research*, 30(1):38–41. [1.1.2](#)
- Hurles, M. (2002). Are 100.000 „SNPs“ useless? *Science*, 298(5598):1509. [1.1.2](#)
- International Human Genome Sequencing Consortium (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409:860–921. [1.1.3](#)
- Jobling, M. A. (2001). Y-chromosomal SNP haplotype diversity in forensic analysis. *Forensic Science International*, 118:158–162. [1.1.1](#)
- Jobling, M. A. and Taylor-Smith, C. (2003). The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. *Nature Review Genetics*, 4:598–612. [1.1.1](#)
- Jobs, M., Frederiksson, S., Brookes, A., and Landegren, U. (2002). Effect of oligonucleotide truncation on single-nucleotide distinction by solid-phase hybridization. *Analytical Chemistry*, 74:199–202. [2.1.1](#), [3.2.3](#), [4.2.1](#)

- Joos, B., Kuster, H., and Cone, R. (1997). Covalent attachment of hybridizable oligonucleotides to glass supports. *Analytical Biochemistry*, 247:96–101. [1.2.3](#)
- Judson, R., Salisbury, B., Schneider, J., Windemuth, A., and Stephens, J. C. (2002). How many SNP's does a genome-wide haplotype map require? *Pharmacogenomics*, 3(3):379–391. [1.1.1](#), [1.1.1](#)
- Kennedy, G. C., Matsuzaki, H., Dong, S., Liu, W.-m., Huang, J., Liu, G., Su, X., Cao, M., Chen, W., Zhang, J., Liu, W., Yang, G., Di, X., Ryder, T., He, Z., Surti, U., Phillips, M. S., Boyce-Jacino, M. T., Fodor, S. P., and Jones, K. W. (2003). Large-scale genotyping of complex DNA. *Nature Biotechnology*, 21:1233–7. [1.2.4](#), [1.5.5](#), [4.2.1](#)
- Kester, M. H., Kaptein, E., Roest, T. J., van Dijk, C. H., Tibboel, D., Meinl, W., Glatt, H., Coughtrie, M. W., and Visser, T. J. (1999). Characterization of human iodothyronine sulfotransferases. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84:1357–1364. [1.3](#)
- Kissebah, A. H., Sonnenberg, G. E., Myklebust, J., Goldstein, M., Broman, K., James, R. G., Marks, J. A., Krakower, G. R., Jacob, H. J., Weber, J., Martin, L., Blangero, J., and Comuzzie, A. G. (2000). Quantitative trait loci on chromosomes 3 and 17 influence phenotypes of the metabolic syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(26):14478–14483. [1.4](#)
- Kleinjung, F. (1998). Sensorik und Kinetik biochemischer Nukleinsäure-Wechselwirkungen an Oberflächen. *Dissertation*, Universität Potsdam, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät. [1.5.2](#), [1.5.2](#), [1](#), [2.1.6](#), [2.2.10](#), [3.1](#), [4.1](#), [4.3.2](#)
- Kleinjung, F. (2000). Kinetische Messungen auf einem DNA-Chip. *medgen*, 12:307. [4.2.1](#)
- Kleinjung, F., Bier, F. F., Warsinke, A., and Scheller, F. W. (1997). Fibre-optic genosensor for specific determination of femtomolar DNA oligomers. *Analytical Chimica Acta*, 350:51–58. [1.5.1](#), [1.5.5](#), [2.1.6](#), [3.1.1](#), [4.1](#), [4.1](#), [4.2.1](#), [4.2.1](#)
- Kruglyak, L. (1999). Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes. *nature genetics*, 22:139–144. [1.1.1](#)
- Kuklin, A., Munson, K., Taylor, P., and Gjerde, D. (1999). Isolation and analysis of amplified cDNA fragments during detection of unknown polymorphisms with temperature modulated heteroduplex chromatography. *Molecular Biotechnology*, 11:257–261. [1.1.3](#)
- Kumar, A., Larsson, O., Parodi, D., and Liang, Z. (2000). Silanized nucleic acids: a general platform for DNA immobilization. *Nucleic Acids Research*, 28(14):1970–7. [1.2.3](#)
- Kurland, L., Liljedahl, U., Karlsson, J., Kahan, T., Malmquist, K., Melhus, H., Syvänen, A.-C., and Lind, L. (2004). Angiotensinogen gene polymorphisms: Relationship to blood pressure response to antihypertensive treatment. *American Journal of Hypertension*, 17:8–13. [1.1.1](#)
- Kwiatkowski, M., Frederiksson, S., Isaksson, A., Nilsson, M., and Landegren, U. (1999). Inversion of in situ synthesized oligonucleotides: Improved reagents for hybridization and primer extension in DNA microarrays. *Nucleic Acids Research*, 27(24):4710–4714. [1.1.5](#), [1.2.2](#)
- Kwok, P.-Y. (2001). Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 2:235–258. [1.1.4](#), [1.1.5](#)

- Kwok, P.-Y., Carlson, C., Yager, T., Ankener, W., and Nickerson, D. A. (1994). Comparative analysis of human DNA variations by fluorescence-based sequencing of PCR products. *Genomics*, 23:138–44. [1.1.1](#), [1.1.3](#)
- Kwok, P.-Y. and Chen, X. (2003). Detection of single nucleotide polymorphisms. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 5:43–60. [1.1.3](#), [1.1.4](#), [1.1.5](#)
- Lamtore, J. B., Beattie, K. L., Burke, B. E., Eggers, M. D., Ehrlich, D. J., Fowler, R., Hollis, M. A., Kosicki, B. B., Reich, R. K., Smith, S. R., Varma, R. S., and Hogan, M. E. (1994). Direct detection of nucleic acid hybridization on the surface of a charge coupled device. *Nucleic Acids Research*, 22(11):2121–5. [1.2.3](#), [4.2.1](#)
- Levo, A., Koski, A., Ojanperä, I., Vuori, E., and Sajantila, A. (2003). Post-mortem SNP analysis of CYP2D6 gene reveals correlation between genotype and opioid drug (tramadol) metabolite ratios in blood. *Forensic Science International*, 135:9–15. [1.1.1](#)
- Li, Q., Liu, Z., Monroe, H., and Cuiat, C. T. (2002). Integrated platform for detection of DNA sequence variants using capillary array electrophoresis. *Electrophoresis*, 23:1499–1511. [1.1.3](#)
- Liljedahl, U., Karlsson, J., Melhus, H., Kurland, L., Lindersson, M., Kahan, T., Nyström, F., Lind, L., and Syvänen, A.-C. (2003). A microarray minisequencing system for pharmacogenetic profiling of antihypertensive drug response. *Pharmacogenomics*, 13:7–17. [1.1.1](#), [1.2.4](#)
- Lindblad-Toh, K., Winchester, E., Daly, M. J., Wang, M. J., Hirschhorn, J. N., Laviolette, J.-P., Ardlie, K., Reich, D. E., Robinson, E., Sklar, P., Shah, N. A., Thomas, D., Fan, J.-B., Gingeras, T. R., Warrington, J. A., Patil, N., Hudson, T. J., and Lander, E. S. (2000). Large-scale discovery and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the mouse. *Nature Genetics*, 24:381–386. [1.2.4](#)
- Lindroos, K. (2002). *Assessing genetic variation by Microarray Technology*. PhD thesis, University Uppsala, Faculty of Medicine 1127, Sweden. [1.1](#), [1.14](#)
- Lipshutz, R., Fodor, S. P., Gingeras, T. R., and Lockhart, D. J. (1999). High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nature Genetics Supplement*, 21:20–24. [1.11](#), [1.2.4](#)
- Livak, K. J. (1999). Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5′ nuclease assay. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering*, 14:143–149. [1.1.5](#)
- Livnah, O., Bayer, E. A., Wilchek, M., and Sussman, J. L. (1982). Analysis and optimisation of methods using water-soluble carbodiimide for immobilisation of biochemicals to porous glass. *Biotechnology and Bioengineering*, 24:1069–80. [1.2.3](#)
- Livnah, O., Bayer, E. A., Wilchek, M., and Sussman, J. L. (1993). Three-dimensional structures of avidin and the avidin-biotin complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:5076–80. [1.2.3](#)
- Lottspeich, F. and Zorbas, H., editors (1998). *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin,, 1 edition. [1.2.3](#), [3.2.2](#)

- Lovmar, L., Fredriksson, M., Liljedahl, U., Sigurdsson, S., and Syvänen, A.-C. (2003). Quantitative evaluation by minisequencing and microarrays reveals accurate multiplexed SNP genotyping of whole genome amplified DNA. *Nucleic Acids Research*, 31(21):e129. [1.1.1](#)
- Lowe, P. and Galley, H. (2001). A novel PCR-RFLP assay for the detection of the single nucleotide polymorphism at position - 1082 in the human IL-10 gene promoter. *Journal of Immunogenetics*, 28:563–564. [1.1.5](#)
- Lyamichev, V., Brow, M. A. D., and Dahlberg, J. E. (1993). Structure-specific endonucleolytic cleavage of nucleic acids by eubacterial DNA polymerases. *Science*, 260:778–783. [1.1.5](#)
- Lyamichev, V., Brow, M. A. D., Varvel, V. E., and Dahlberg, J. E. (1999). Comparison of the 5' nuclease activities of Taq DNA polymerase and its isolated nuclease domain. *Proceedings Natl. Acad. Sci. USA*, 96:6143–6148. [1.1.5](#)
- Marth, G., Yeh, R., Minton, M., Donalson, R., Li, Q., Duan, S., Davenport, R., Miller, R. D., and Kwok, P.-Y. (2001). Single-nucleotide polymorphisms in the public domain: How useful are they? *Nature Genetics*, 27:371–372. [1.1.2](#)
- Maskos, U. and Southern, E. M. (1992). Oligonucleotide hybridisations on glass supports: a novel linker for oligonucleotide synthesis and hybridisation properties of oligonucleotides synthesised in situ. *Nucleic Acids Research*, 20(7):1679–1684. [1.2.3](#)
- Matsuzaki, H., Loi, H., Dong, S., Tsai, Y.-Y., Fang, J., Law, J., Di, X., Liu, W.-M., Yang, G., Liu, G., Juang, J., Kennedy, G. C., Ryder, T. B., Marcus, G. A., Walsh, P. S., Shriver, M. D., Puck, J. M., Jones, K. W., and Mei, R. (2004). Parallel genotyping of over 10,000 SNPs using a one-primer assay on a high-density oligonucleotide array. *Genome Research*, 14:414–425. [1.2.4](#), [1.5.5](#), [4.2.1](#)
- Matyas, G., Giunta, C., Steinmann, B., Hossle, J. P., and Hellwig, R. (2002). Quantification of single nucleotide polymorphisms: A novel method that combines primer extension assay and capillary electrophoresis. *Human Mutation*, 19(1):58–68. [1.1.5](#)
- McGall, G. H., Barone, A. D., Diggelmann, M., Fodor, S. P., Gentalen, E., and Ngo, N. (1997). The efficiency of light-directed synthesis of DNA arrays on glass substrates. *Journal of the American Chemical Society*, 119(22):5081–90. [1.2.2](#)
- Mein, C. A., Barratt, B. J., Dunn, M. G., Siegmund, T., Smith, A. N., Esposito, L., Nutland, S., Stevens, H. E., Wilson, A. J., Phillips, M. S., Jarvis, N., Law, S., de Arruda, M., and Todd, J. A. (2000). Evaluation of single nucleotide polymorphism typing with invader on PCR amplicons and its automation. *Genome Research*, 10:330–343. [1.1.5](#)
- Mitra, R. D. and Church, G. M. (1999). In situ localized amplification and contact replication of many individual DNA molecules. *Nucleic Acid Research*, 27(24):e34. [1.2.3](#)
- Mullis, K. B. and Fallona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155:335–350. [2.2.2](#)
- Myers, R. M., Maniatis, T., and Lerman, L. S. (1978). Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods in Enzymology*, 155:501–527. [1.1.3](#)

- Nebert, D. W. (2000). Suggestions for the nomenclature of human alleles: relevance to ecogenetics, pharmacogenetics and molecular epidemiology. *Pharmacogenomics*, 10:279–290. [1.1](#)
- Nickerson, D., Taylor, S., Weiss, K., Clark, A., Hutchinson, R., Stengard, J., Salomaa, V., Vartiainen, E., Boerwinkle, E., and Sing, C. (1998). DNA sequence diversity in a 9.7-kb region of the human lipoprotein lipase gene. *Nature Genetics*, 19(3):233–40. [1.1.1](#)
- Nickerson, D. A., Tobe, V. O., and Taylor, S. L. (1997). Polyphred: automating the detection and genotyping of single nucleotide substitutions using fluorescence-based resequencing. *Nucleic Acid Research*, 25:2745–51. [1.1.3](#)
- Nikiforov, T. T., Rendle, R. B., Goelet, P., Rogers, Y.-H., Kotewicz, M. L., Anderson, S., Trainor, G. L., and Knapp, M. R. (1994). Genetic bit analysis: a solid phase method for typing single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Research*, 22(20):4167–4175. [1.2.4](#)
- Nikiforov, T. T. and Rogers, Y.-H. (1995). The use of 96-well polystyrene plates for DNA hybridization-based assays: an evaluation of different approaches to oligonucleotide immobilization. *Analytical Biochemistry*, 227(1):201–9. [1.2.3](#)
- Nordfors, L., Jansson, M., Sandberg, G., Lavebratt, C., Sengul, S., Schalling, M., and Arner, P. (2002). Large-scale genotyping of single nucleotide polymorphisms by pyrosequencing and validation against the 5′nuclease (TaqMan) assay. *Human Mutation*, 19:395–401. [1.1.5](#)
- Nowell, S., Sweeney, C., Winters, M., Stone, A., Lang, N. P., Hutchins, L. F., Kadlubar, F. F., and Ambrosone, C. B. (2002). Association between sulfotransferase 1A1 genotype and survival breast cancer patients receiving Tamoxifen therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 94(12):1635–1640. [1.1.1](#), [1.3](#)
- Nuwaysir, E. F., Huang, W., Albert, T. J., Singh, J., Nuwaysir, K., Pitas, A., Richmond, T., Gorski, T., Berg, J. P., Ballin, J., McCormick, M., Norton, J., Pollock, T., Sumwalt, T., Butcher, L., Porter, D., Molla, M., Hall, C., Blattner, F., Sussman, M. R., Wallace, R. L., Cerrina, F., and Green, R. D. (2002). Gene expression analysis using oligonucleotide arrays produced by maskless photolithography. *Genome Research*, 12:1749–1755. [1.2.2](#)
- Nyren, P., Pettersson, B., and Uhlen, M. (1993). Solid phase DNA minisequencing by an enzymatic luminometric inorganic pyrophosphate detection assay. *Analytical Biochemistry*, 208:171–175. [1.1.5](#)
- Oberacher, H., Oefner, P. J., Hölzl, G., Premstaller, A., Davis, K., and Huber, C. (2002). Re-sequencing of multiple single nucleotide polymorphisms by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Nucleic Acids Research*, 30(14):e67. [1.1.3](#)
- Ohnishi, Y., Tanaka, T., Ozaki, K., Yamada, R., Suzuki, H., and Nakamura, Y. (2001). A high-throughput SNP typing system for genome-wide association studies. *Journal of Human Genetics*, 46:471–477. [1.1.5](#)
- Oliphant, A., Barker, D. L., Stuelpnagel, J. R., and Chee, M. S. (2002). BeadArray technology: Enabling an accurate, cost-effective approach to high-throughput genotyping. *Supplement of Biotechniques*, pages 56–8,60–1. [1.2.4](#)

- Olsson, C., Waldenström, E., Westermark, K., Landegren, U., and Syvänen, A.-C. (2000). Determination of the frequencies of ten allelic variants of the Wilson disease gene (ATP7B), in pooled DNA samples. *European Journal of Human Genetics*, 8:933–938. 1.1.1
- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., and Sekiya, T. (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:2766–2770. 1.1.3
- Ozawa, S., Shimizu, M., Katoh, T., Miyajima, A., and Ohno, Y. (1999). Sulfating activity and stability of cDNA-expressed allozymes of human phenol sulfotransferase, ST1A3*1 (213 Arg) and ST 1A3*2 (213 His), both of which exist in Japanese as well as Caucasians. *J. Biochem.*, 126:271–277. 1.3
- Ozawa, S., Tang, Y.-M., Yamazoe, Y., Kato, R., Lang, N. P., and Kadlubar, F. F. (1998). Genetic polymorphisms in human liver phenol sulfotransferases involved in the bioactivation of N-hydroxy derivatives of carcinogenic arylamines and heterocyclic amines. *Chemico-Biological Interactions*, 109:237–248. 1.3
- Pastinen, T., Kurg, A., Metspalu, A., Peltonen, L., and Syvänen, A.-C. (1997). Minisequencing: A specific tool for DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide arrays. *Genome Research*, 7:606–614. 1.2.4
- Pastinen, T., Raitio, M., Lindroos, K., Tainola, P., Leena, P., and Syvänen, A.-C. (2000). A system for specific, high-throughput genotyping by allele-specific primer extension on microarrays. *Genome Research*, 10:1031–1042. 1.2.4
- Patil, N., Berno, A. J., Hinds, D. A., Barrett, W. A., Doshi, J. M., Hacker, C. R., Kautzer, C. R., Lee, D. H., Marjoribanks, C., McDonough, D. P., Nguyen, B. T., Norris, M. C., Sheehan, J. B., Shen, N., Stern, D., Stokowski, R. P., Thomas, D. J., Trulson, M. O., Vyas, K. R., Frazer, K. A., Fodor, S. P., and Cox, D. R. (2001). Blocks of limited haplotype diversity revealed by high-resolution scanning of human chromosome 21. *Science*, 294:1719–1723. 1.1.1
- Phillips, M., Lawrence, R., Sachidanandam, R., Morris, A., Balding, D., Donaldson, M., Studebaker, J., Ankeney, W., Alfisi, S., Kuo, F., Camisa, A., Pazorov, V., Scott, K., Carey, B., Faith, J., Katari, G., Bhatti, H., Cyr, J., Derohannessian, V., Elosua, C., Forman, A., Grecco, N., Hock, C., Kuebler, J., Lathrop, J., Mockler, M., Nachtman, E., Restine, S., Varde, S., Hozza, M., Gelfand, C., Broxholme, J., Abecasis, G., Boyce-Jacino, M., and Cardon, L. (2003). Chromosome-wide distribution of haplotype blocks and the role of recombination hot spots. *Nature Genetics*, 3:382–7. 1.1.1
- Piran, U. and Riordan, W. (1990). Dissociation rate constant of the biotin-streptavidin complex. *Journal of Immunological Methods*, 133(1):141–3. 1.2.3
- Pirrung, M. C., Fallon, L., and McGall, G. H. (1998). Proofing of photolithographic DNA synthesis with 3',5'-Dimethoxybenzoinyl-oxycarbonyl-protected Deoxynucleoside phosphoramidites. *Journal of Organic Chemistry*, 63:241–6. 1.2.2
- Premstaller, A. and Oefner, P. F. (2003). Denaturing HPLC of Nucleic Acids. *PharmaGenomics*, 2:20–37. 1.2

- Prince, J. A. and Brookes, A. J. (2001). Towards high-throughput genotyping of SNPs by dynamic allele-specific hybridization. *Expert Rev.Mol.Diagn.*, 1(3):89–95. 1.7, 1.8
- Pusch, W., Wurmbach, J.-H., Thiele, H., and Kostrzewa, M. (2002). MALDI-TOF mass spectrometry-based SNP genotyping. *Pharmacogenomics*, 3(4):537–548. 1.1.5
- Raftogianis, R. B., Wood, T. C., Otterness, D. M., Van Loon, J. A., and Weinshilboum, R. M. (1997). Phenol sulfotransferase pharmacogenetics in humans: Association of common SULT1A1 alleles with TS PST phenotype. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 239:298–304. 1.3, 1.3
- Raftogianis, R. B., Wood, T. C., and Weinshilboum, R. M. (1999). Human phenol sulfotransferases SULT1A2 and SULT1A1. *Biochemical Pharmacology*, 58:605–616. 1.5, 1.3
- Reich, D. E., Cargill, M., Bolk, S., Ireland, J., Sabeti, P. C., Richter, D. J., Lavery, T., Kouyoumjian, R., Farhadian, S. F., Ward, R., and Lander, E. S. (2001). Linkage disequilibrium in the human genome. *Nature*, 411:199–204. 1.1.1
- Relling, M. V. and Dervieux, T. (2001). Pharmacogenetics and cancer therapy. *Nature*, 1:99–108. 1.1.1
- Richard, I. and Beckmann, J. S. (1995). How neutral are synonymous codon mutations? *Nature Genetics*, 10:259. 1.1
- Risch, N. J. and Merikangas, K. (1996). The future of genetic studies of complex human disease. *Science*, 273:1516–1517. 1.1.1
- Rogers, Y.-H., Jiang-Baucoma, P., Huanga, Z.-J., Bogdanova, V., Anderson, S., and Boyce-Jacino, M. T. (1999). Immobilization of oligonucleotides onto a glass support via disulfide bonds: A method for preparation of DNA microarrays. *Analytical Biochemistry*, 266(1):23–30. 1.2.3
- Roux, A.-F., Pallares-Ruiz, N., Vielle, A., Faugere, V., Templin, C., Leprevost, D., Artieres, F., Lina, G., Molinari, N., Blanchet, P., Mondain, M., and Claustres, M. (2004). Molecular epidemiology of DFNB1 deafness in France. *BMC Medical Genetics*, 5(5). 1.1.3
- Sachidanandam, R., Weissman, D., Schmidt, S., Kakol, J., and Stein, L. (2001). A map of human genome sequence variation containing 1,42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*, 409:928–933. 1.1
- Saiki, R. K., Walsh, P. S., Levenson, C. H., and Erlich, H. A. (1989). Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:6230–6234. 1.2.3
- Sambrook, J. and Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. ColdSpring Harbor Laboratory Press, 3rd labmn edition. 2.1.1, 3.3.2, 4.2.1
- Sanchez, J. J., Brion, M., Parson, W., Blanco-Verea, A. J., Borsting, C., Lareu, M., Niederstätter, H., Oberacher, H., Morling, N., and Carracedo, A. (2004). Duplications of the Y-chromosome specific loci p25 and 92r7 and forensic implications. *Forensic Science International*, 140:241–50. 1.1.1

- Sanger, F., Nicklen, S., and A.R., C. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74:5463–7. [1.1.3](#)
- Sauer, S., Lechner, D., Berlin, K., Lehrach, H., Escary, J.-L., Fox, N., and Gut, I. G. (2000a). A novel procedure for efficient genotyping of single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Research*, 28:e13 ii–viii. [1.1.5](#)
- Sauer, S., Lechner, D., Berlin, K., Plancon, C., Heuermann, A., Lehrach, H., and Gut, I. G. (2000b). Full flexibility genotyping of single nucleotide polymorphisms by the GOOD assay. *Nucleic Acid Research*, 28(23):e100. [1.1.5](#)
- Schena, M., Heller, R. A., Theriault, T. P., Konrad, K., Lachenmeier, E., and Davis, R. W. (1998). Microarrays: Biotechnology's discovery platform for functional genomics. *TIB-TECH*, 16. [1.2.2](#), [1.10](#), [1.2.3](#)
- Scherer, P. E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G., and Lodish, H. F. (1995). A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 270(45):26746–9. [1.4](#)
- Schubert, E. L., Hsu, L., Cousens, L. A., Glogovac, J., Self, S., Reid, B. J., Rabinovitch, P. S., and Porter, P. L. (2002). Single nucleotide polymorphism array analysis of flow-sorted epithelial cells from frozen versus fixed tissues for whole genome analysis of allelic loss in breast cancer. *American Journal of Pathology*, 160(1):73–79. [1.2.4](#)
- Schwonbeck, S., Krause-Griep, A., Gajovic-Eichelmann, N., Ehrentreich-Förster, E., Meinl, W., Glatt, H., and Bier, F. F. (2004). Cohort analysis of a single nucleotide polymorphism on DNA chips. *Biosensors and Bioelectronics*. In Druck. [4.3.1](#)
- Sethi, A. A., Tybjerg-Hansen, A., Andersen, R. V., and Nordestgaard, B. G. (2004). Nanogen microelectronic chip for large-scale genotyping. *Clinical Chemistry*, 50(2):443–5. [1.2.4](#)
- Sham, P., Bader, J. S., Craig, I., O'Donovan, M., and Owen, M. (2002). DNA pooling: A tool for large scale association studies. *Nature Review Genetics*, 3:862–871. [1.1.1](#)
- Shen, R. S., Rubano, T., Fan, J.-B., and Oliphant, A. (2003). High-multiplex SNP genotyping assay benefits from integration with a turnkey production system. *Genetic Engineering News*, 23(6). [1.13](#), [1.2.4](#)
- Sherry, S., Ward, M.-H., Kholodov, M., Baker, J., Phan, L., Smigielski, E., and Sirotkin, K. (2001). dbSNP: The NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Research*, 29(1):308–311. [1.1.2](#)
- Shumaker, J. M., Metspalu, A., and Caskey, C. T. (1996). Mutation detection by solid phase primer extension. *Human Mutation*, 7:346–354. [1.2.4](#)
- Singh, H. (1993). Specific recognition site probes for isolating genes encoding DNA-binding proteins. *Methods in Enzymology*, 218:551–67. [4.2.1](#)
- Singh-Gasson, S., Green, R. D., Yue, Y., Nelson, C., Blattner, F., Sussman, M. R., and Cerri-na, F. (1999). Maskless fabrication of light-directed oligonucleotide microarrays using a digital micromirror array. *Nature Biotechnology*, 17:974–978. [1.2.2](#)

- Sosnowski, R. G., Tu, E., Butler, W. F., O'Connell, J. P., and Heller, M. J. (1997). Rapid determination of single base mismatch mutations in DNA hybrids by direct electric field control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:1119–1123. [1.2.3](#), [1.2.4](#)
- Southern, E., Mir, K., and Shchepinov, M. (1999). Molecular interactions on microarrays. *Nature Genetics Supplement*, 21:5–9. [1.2.3](#), [4.2.1](#)
- Southern, E. M., Maskos, U., and Elder, J. K. (1992). Analyzing and comparing nucleic acid sequences by hybridization to arrays of oligonucleotides: Evaluation using experimental models. *Genomics*, 13:1008–1017. [1.2.1](#), [1.2.5](#)
- Spranger, J., Krokec, A., Möhliga, M., Bergmann, M. M., Ristowa, M., Boeing, H., and Pfeiffer, A. F. (2003). Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *The Lancet*, 361(9353):226–8. [1.4](#)
- Sun, X., Ding, H., Hung, K., and Guo, B. (2000). A new MALDI-TOF based mini-sequencing assay for genotyping of SNPs. *Nucleic Acids Research*, 28(12):e68. [1.1.5](#)
- Syvänen, A.-C. (1999). From gels to chips: „Minisequencing“ primer extension for analysis of point mutations and single nucleotide polymorphisms. *Human Mutation*, 13:1–10. [1.1.1](#), [1.2.4](#)
- Syvänen, A.-C. (2001). Accessing genetic variation: Genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nature*, 2:930–942. [1.1.4](#), [1.3](#), [1.1.5](#), [1.15](#)
- Syvänen, A.-C., Sajantila, A., and Lukka, M. (1993). Identification of individuals by analysis of biallelic DNA markers, using PCR and solid-phase minisequencing. *Am.J.Hum.Genet.*, 52:46–59. [1.1.5](#)
- Taillon-Miller, P., Piernot, E., and Kwok, P.-Y. (1999). Efficient approach to unique single-nucleotide polymorphism discovery. *Genome Research*, 9:499–505. [1.1.1](#)
- Tang, K., Fu, D.-J., Julien, D., Braun, A., Cantor, C. R., and Köster, H. (1999). Chip-based genotyping by mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:10016–10020. [1.1.5](#)
- Taylor, S., Smith, S., Windle, B., and Guiseppi-Elie, A. (2003). Impact of surface chemistry and blocking strategies on DNA microarrays. *Nucleic Acid Research*, 31(16):e87. [4.2.1](#)
- Thorisson, G. A. and Stein, L. D. (2003). The SNP consortium website: Past, present and future. *Nucleic Acids Research*, 31(1):124–127. [1.1.2](#)
- Tiemersma, E. W., Bunschoten, A., Kok, F. J., Glatt, H., de Boer, S. Y., and Kampman, E. (2004). Effect of SULT1A1 and NAT2 genetic polymorphism on the association between cigarette smoking and colorectal adenomas. *Int. J. Cancer*, 108:97–103. [1.1.1](#), [1.3](#)
- Tsai, F.-J., Wu, H.-C., Chen, H.-Y., Lu, H.-F., Hsu, C.-D., and Chen, W.-C. (2003). Association of E-Cadherin gene 3'-UTR C/T polymorphism with calcium oxalate stone disease. *Urologia Internationalis*, 70:278–281. [1.1.5](#)
- Tsuchihashi, Z. and Dracopoli, N. (2002). Progress in high throughput SNP genotyping methods. *The Pharmacogenomics Journal*, 2:103–110. [1.1.1](#)

- Underhill, P. A., Jin, L., Lin, A. A., Mehdi, S. Q., Jenkins, T., Vollrath, D., Davis, R. W., Cavalli-Sforza, L. L., and Oefner, P. J. (1997). Detection of numerous y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography. *Genome Research*, 7:996–1005. [1.1.1](#), [1.1.1](#), [1.1.3](#)
- van den Bosch, B. J., de Coo, R. F., Scholte, H. R., Nijland, J. G., van den Bogaard, R., de Visser, M., de Die-Smulders, C. E., and Smeets, H. J. (2000). Mutation analysis of the entire mitochondrial genome using denaturing high performance liquid chromatography. *Nucleic Acids Research*, 28(20):e89. [1.1.3](#)
- van Loon, J. and Weinshilboum, R. M. (1984). Human platelet phenol sulfotransferase: familial variation in thermal stability of the TS form. *Biochemical Genetics*, 22:997–1014. [1.3](#)
- Vasseur, F., Helbeque, N., Dina, C., Lobbens, S., Delannoy, V., Gaget, S., Boutin, P., Vaxillaire, M., Lepretre, F., Dupont, S., Hara, K., Clement, K., Bihain, B., Kadowaki, T., and Froguel, P. (2002). Single-nucleotide polymorphism haplotypes in the both proximal promoter and exon 3 of the APM1 gene modulate adipocyte-secreted adiponectin hormone levels and contribute to the risk for type 2 diabetes in French Caucasians. *Human Molecular Genetics*, 11(21):2607–14. [1.4](#), [1.6](#), [A.2.1](#)
- Venter, J., Adams, M., Myers, E., Li, P., et al. (2001). The sequence of the human genome. *Science*, 291(5507):1304–1351. [1.1.2](#), [1.1.3](#)
- Vreeland, W. N., Meagher, R. J., and Barron, A. E. (2002). Multiplexed, high-throughput genotyping by single-base extension and end-labeled free-solution electrophoresis. *Anal. Chem.*, 74:4328–4333. [1.1.3](#)
- Wang, D. G., Fan, J.-B., Siao, C.-J., Berno, A., Young, P., Sapolsky, R., Ghandour, G., Perkins, N., Winchester, E., Spencer, J., Kruglyak, L., Stein, L., Hsie, L., Topaloglou, T., Hubbel, E., Robinson, E., Mittmann, M., Morris, M. S., Shen, N., Kilburn, D., Rioux, J., Nusbaum, C., Rozen, S., Hudson, T. J., Lipshutz, R., Chee, M., and Lander, E. S. (1998). Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science*, 280:1077–1082. [1.2.4](#)
- Wang, Y., Spitz, M. R., Meng-Hsuan, A., Zhang, K., Makan, N., and Wu, X. (2002). Sulfotransferase (SULT) 1A1 polymorphisms as a predisposition factor for lung cancer: A case-control analysis. *Lung Cancer*, 35:137–142. [1.1.1](#), [1.3](#)
- Wilkins Stevens, P., Hall, J. G., Lyamichev, V., Neri, B., Lu, M., Wang, L., Smith, L. M., and Kelso, D. M. (2001). Analysis of single nucleotide polymorphisms with solid phase invasive cleavage reactions. *Nucleic Acids Research*, 29:e77. [1.1.5](#)
- Wong, C. F., Liyou, N., Leggett, B., Young, J., Johnson, A., and McManus, M. (2002). Association of the SULT1A1 R213H polymorphism with colorectal cancer. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 29:754–758. [1.1.1](#), [1.3](#)
- Wu, M.-T., Wang, Y.-T., Ho, C.-K., Wu, D.-C., Lee, Y.-C., Hsu, H.-K., Kao, E.-L., and Lee, J.-M. (2003). SULT1A1 polymorphism and esophageal cancer in males. *Int. J. Cancer*, 103:101–104. [1.1.1](#), [1.3](#)

- Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Terauchi, Y., Kubota, N., Hara, K., Mori, Y., Ide, T., Murakami, K., Tsuboyama-Kasaoka, N., Ezaki, O., Akanuma, Y., Gavrilova, O., Vinson, C., Reitman, M., Kagechika, H., Shudo, K., Yoda, M., Nakano, Y., Tobe, K., Nagai, R., Kimura, S., Tomita, M., Froguel, P., and Kadowaki, T. (2001). The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nature Medicine*, 8:941–6. [1.4](#)
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372(6505):425–32. [1.4](#)
- Zheng, L., Wang, Y., Schabath, M. B., Grossman, H. B., and Wu, X. (2003). Sulfotransferase 1A1 (SULT1A1) polymorphism and bladder cancer risk: A case-control study. *Cancer Letters*, 202:61–9. [1.1.1](#), [1.3](#)
- Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, 31(13):3406–3415. [3.3.2](#), [3.26](#)

Anhang A

Anhang

A.1 Sulfotransferase SULT1A1

A.1.1 Sequenzen der PCR-Produkte

Polymorphismus im Gen	Genotypen		
	Wildtyp	Heterocygote	Mutante
SULT1A1	GG	GA	AA

Tabelle A.1: Übersicht über den untersuchten Polymorphismus im SULT1A1-Gen

Der SNP-Locus ist rot markiert. Das Wildtyp-Allel enthält an dieser Stelle G, das Mutanten-Allel A.

Sequenz des Fragments mit 281 Bp 5' → 3'

```
1 GGTGAGGAG TTGGCTCTGC AGGTCTCTA GGAGAGGTGG CCAGATCGCC
51 TCTGAGGTTA GAGAAGGGGA CCCCTTTTAC TTTTCCTGAA TCAGCAATCC
101 GAGCCTCCAC TGAGGAGCCC TCTGCTGCTC AGAACCCCAA AAGGGAGATT
151 CAAAAGATCC TGGAGTTTGT GGGGC■CTCC CTGCCAGAGG AGACCGTGGA
201 CTTCATGGTT CAGCACACGT CGTTCAAGGA GATGAAGAAG AACCTATGA
251 CCAACTACAC CACCGTCCCC CAGGAGTTCA T
```

Sequenz des Fragments mit 226 Bp 5' → 3'

```
1 GGTGAGGAG TTGGCTCTGC AGGTCTCTA GGAGAGGTGG CCAGATCGCC
51 TCTGAGGTTA GAGAAGGGGA CCCCTTTTAC TTTTCCTGAA TCAGCAATCC
101 GAGCCTCCAC TGAGGAGCCC TCTGCTGCTC AGAACCCCAA AAGGGAGATT
151 CAAAAGATCC TGGAGTTTGT GGGGC■CTCC CTGCCAGAGG AGACCGTGGA
201 CTTCATGGTT CAGCACACGT CGTTCA
```

A.1.2 SULT1A1-Patientengruppe

Nr.	Bezeichnung
1	E01
2	E02
3	V02
4	O32
5	SU9
6	SU10
7	SU12
8	SU15
9	SU17
10	SU21
11	SU29
12	SU32
13	O30
14	SU11
15	SU19
16	SU22
17	SU23
18	SU25
19	SU30
20	SU35
21	SU5
22	E003
23	E004
24	103

Tabelle A.2: Übersicht über Konzentration der gereinigten PCR-Produkte aus der SULT1A1-Gruppe.

A.2 Adiponectin-Promotor

A.2.1 Sequenzen der PCR-Produkte

Die drei SNP-Loci sind farbig markiert [Vasseur et al., 2002].

Polymorphismus	Genotypen		
	Wildtyp	Heterocygote	Mutante
• 11426	AA	AG	GG
• 11391	GG	GA	AA
• 11377	CC	CG	GG

Tabelle A.3: Übersicht über die Polymorphismen im PCR-Produkt aus der Apidonectin-Promotor-Gruppe

Sequenz des Fragments mit 174 Bp 5' → 3'

1	GATGCTTGT	TGAAGTTGGT	GCTGGCATCC	TAAGCCCTTG	CTGGGGTCGT
51	A [•] TTTAATTC	ATCAGAATGT	GTGGCTTGCA	AGAACC [•] GCT	CAGATCCTGC
101	[•] CTTCAAAAA	CAAAACATGA	GCGTGCCAAG	AAAGTCCAAG	GTGTTGAATG
151	TTGCCACTTC	AAGCCTAAAC	TTTC		

A.2.2 Bezeichnung der Adiponectin-Patientenproben

Nr.	Position	Bezeichnung	Nr.	Position	Bezeichnung
1	A1	G09/02U-1	23	A4	G11/02U-25
2	B1	G09/02U-2	24	B4	G11/02U-26
3	C1	G09/02U-3	25	C4	G11/02U-27
4	E1	G09/02U-5	26	D4	G11/02U-28
5	F1	G09/02U-6	27	E4	G11/02U-29
6	G1	G09/02U-7	28	F4	G11/02U-30
7	H1	G09/02U-8	29	G4	G11/02U-31
8	B2	G10/02U-10	30	H4	G11/02U-32
9	C2	G10/02U-11	31	A5	G11/02U-33
10	D2	G10/02U-12	32	B5	G11/02U-34
11	E2	G10/02U-13	33	C5	G12/02U-35
12	F2	G10/02U-14	34	D5	G12/02U-36
13	G2	G10/02U-15	35	E5	G12/02U-37
14	H2	G10/02U-16	36	F5	G12/02U-38
15	A3	G10/02U-17	37	G5	G12/02U-39
16	B3	G10/02U-18	38	H5	G12/02U-40
17	C3	G10/02U-19	39	A6	G12/02U-41
18	D3	G11/02U-20	40	B6	G12/02U-42
19	E3	G11/02U-21	41	C6	G12/02U-43
20	F3	G11/02U-22	42	D6	G12/02U-44
21	G3	G11/02U-23	43	E6	G12/02U-45
22	H3	G11/02U-24	44	F6	G12/02U-46
			45	G6	G12/02U-47

Tabelle A.4: Übersicht über die Bezeichnung der Patienten aus der Adiponectin-Gruppe.

A.2.3 Ergebnisse der MFOLD-Analyse

Polymorphismus 11377

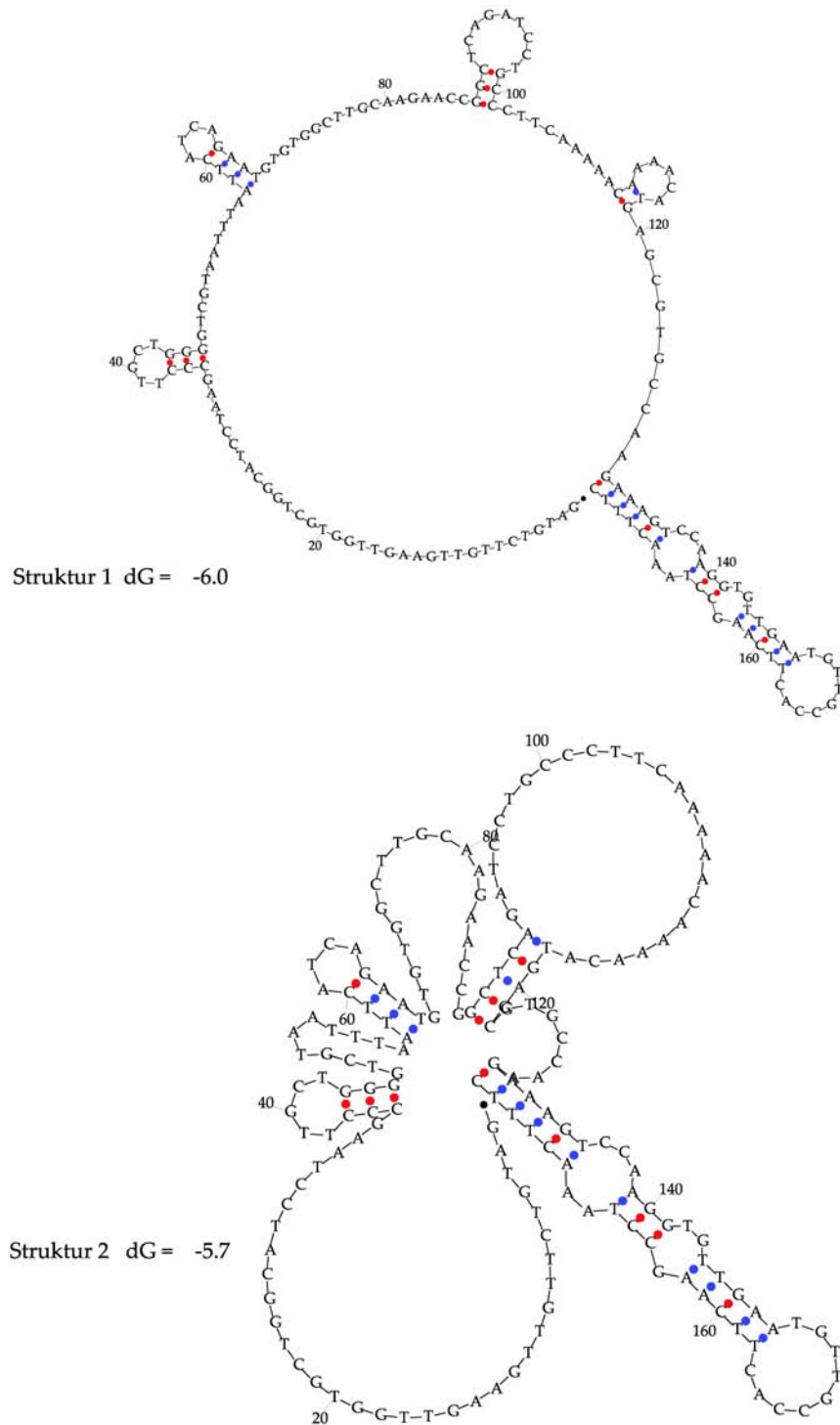


Abbildung A.1: MFOLD-Ergebnisse des Wildtyps 11377c: Struktur 1 und 2

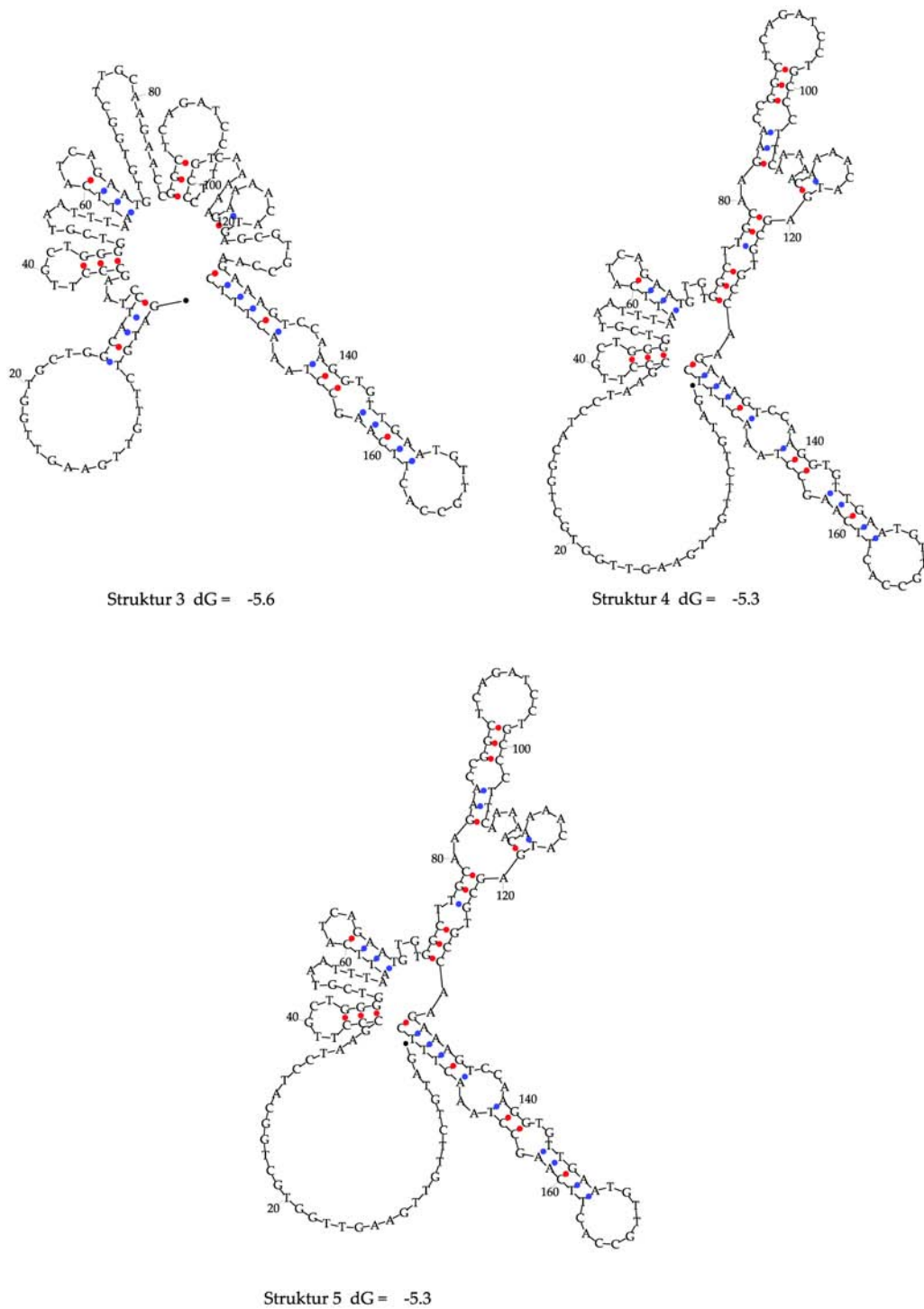
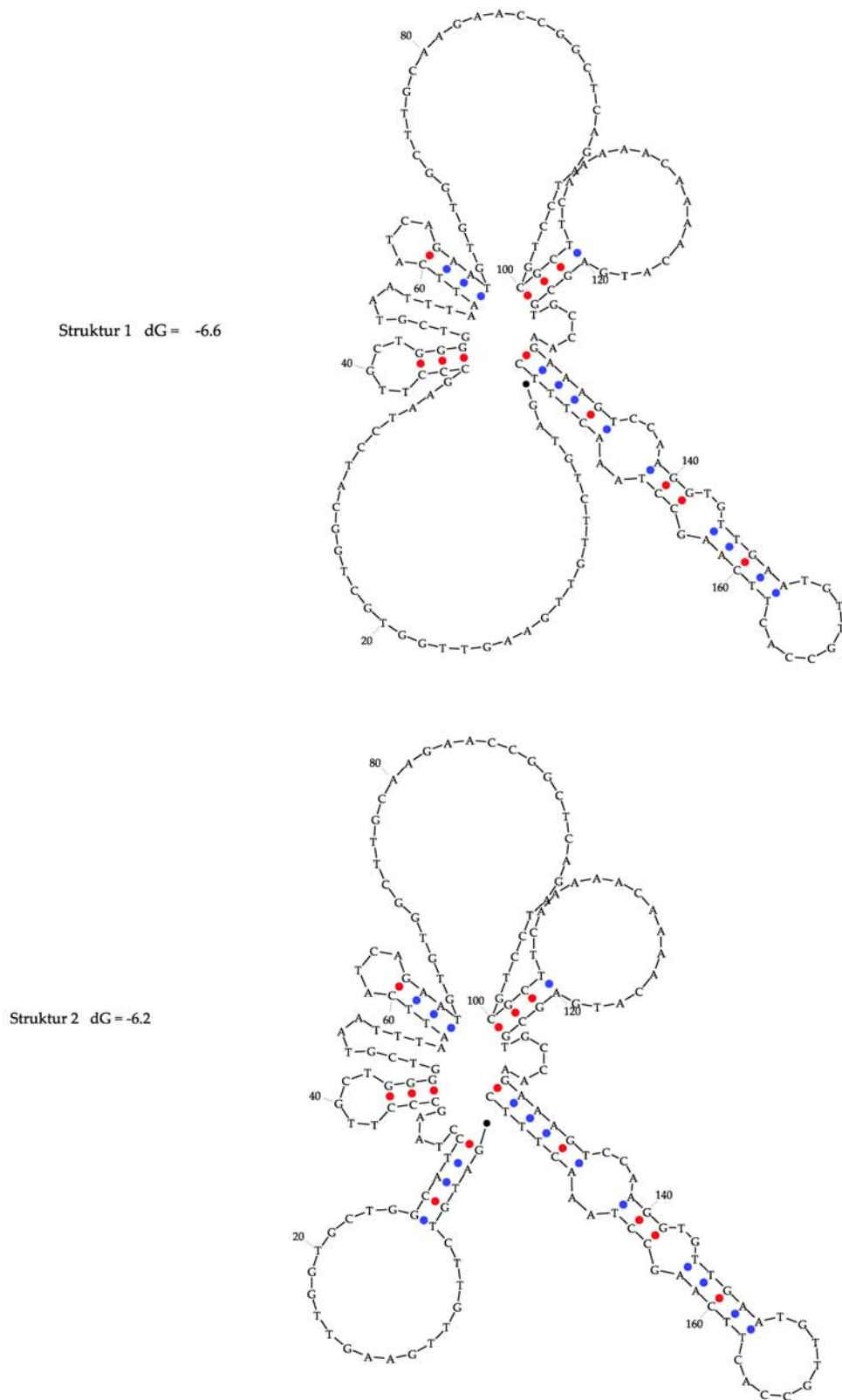


Abbildung A.2: MFOLD-Ergebnisse des Wildtyps 11377c: Struktur 3 bis 5



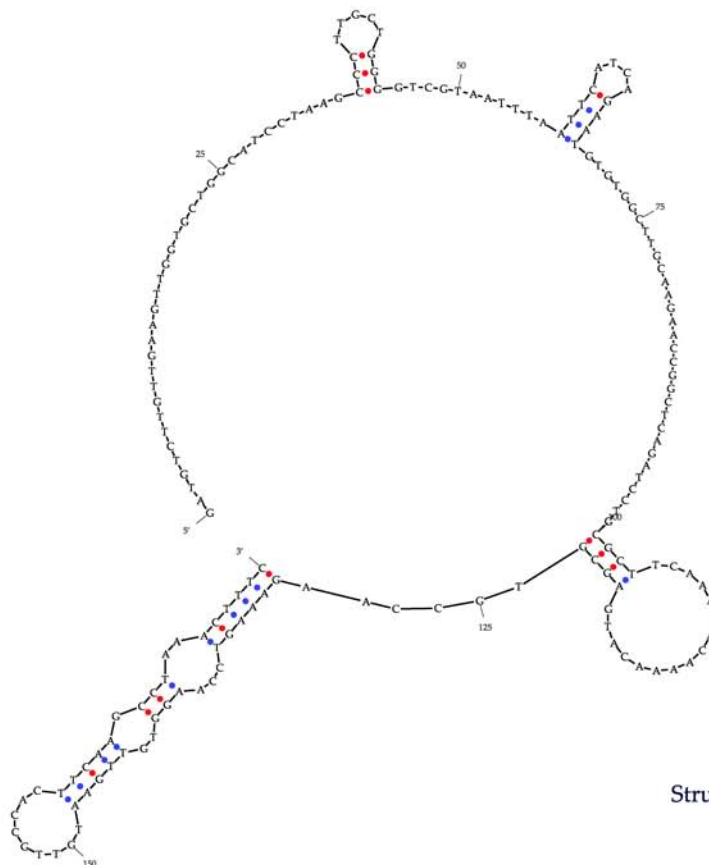
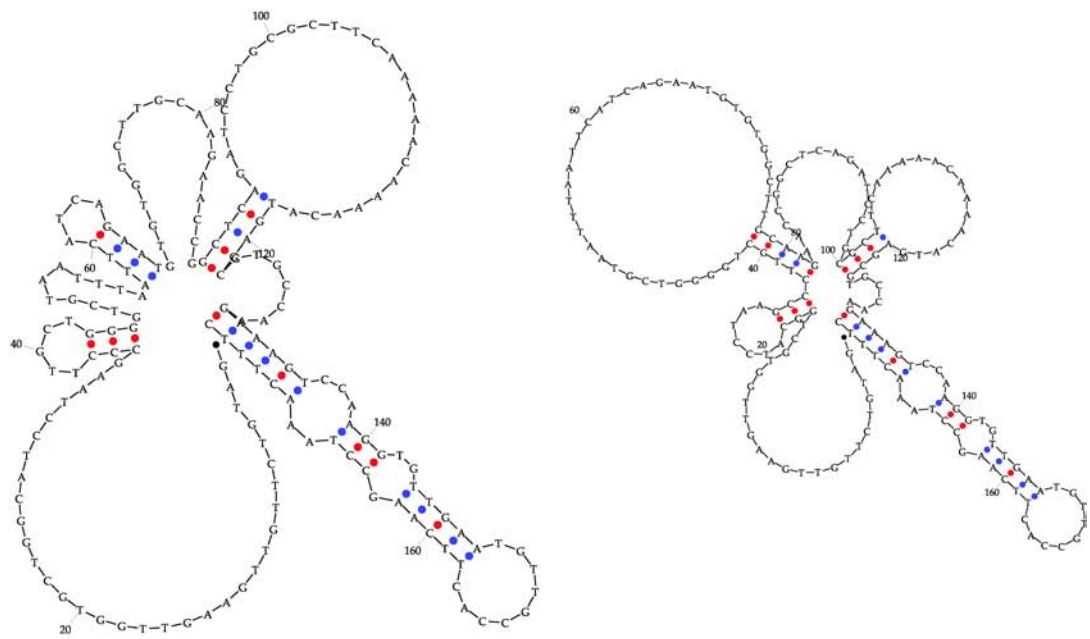


Abbildung A.4: MFOLD-Ergebnisse des Wildtyps 11377g: Struktur 3 bis 5

Polymorphismus 11391

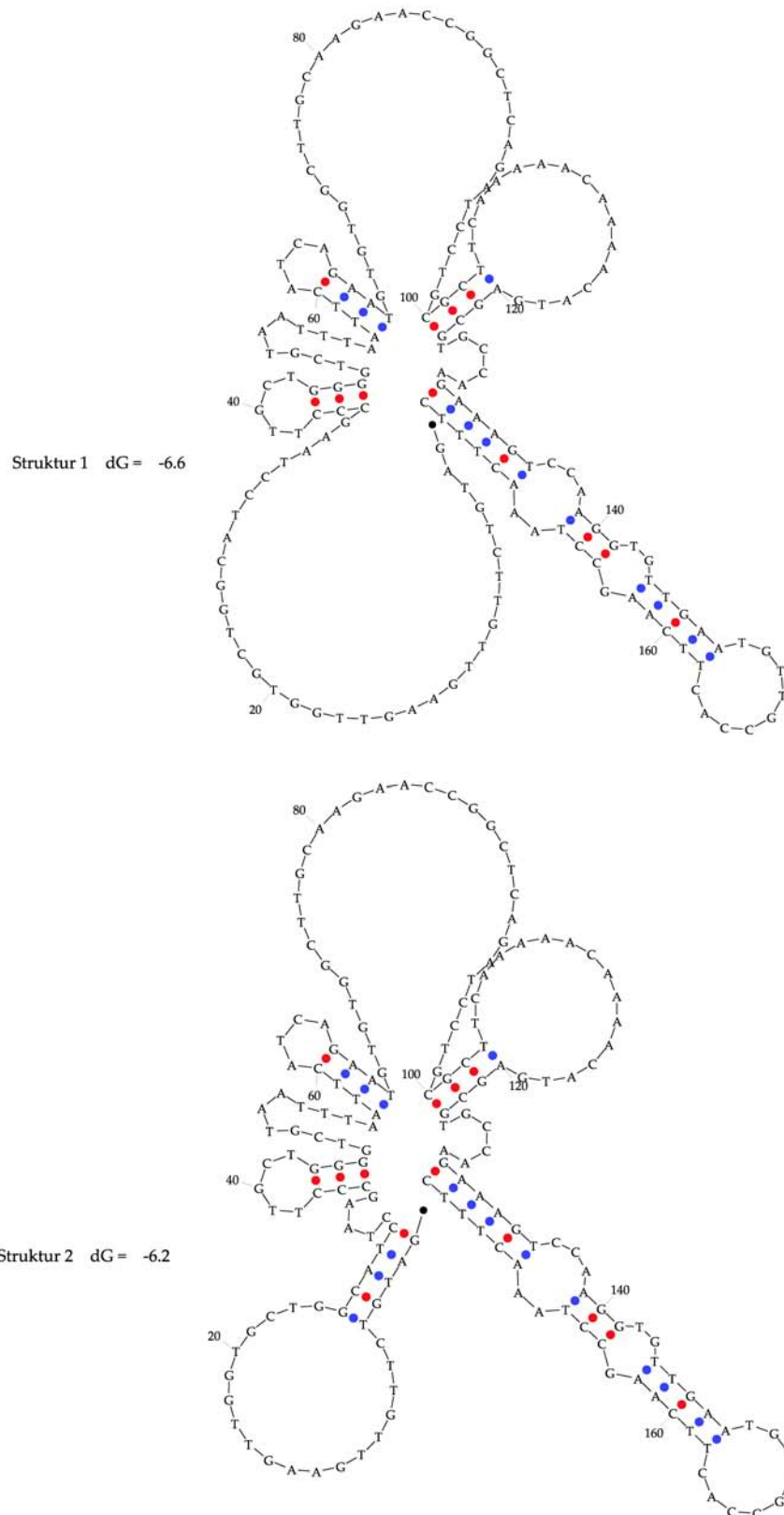
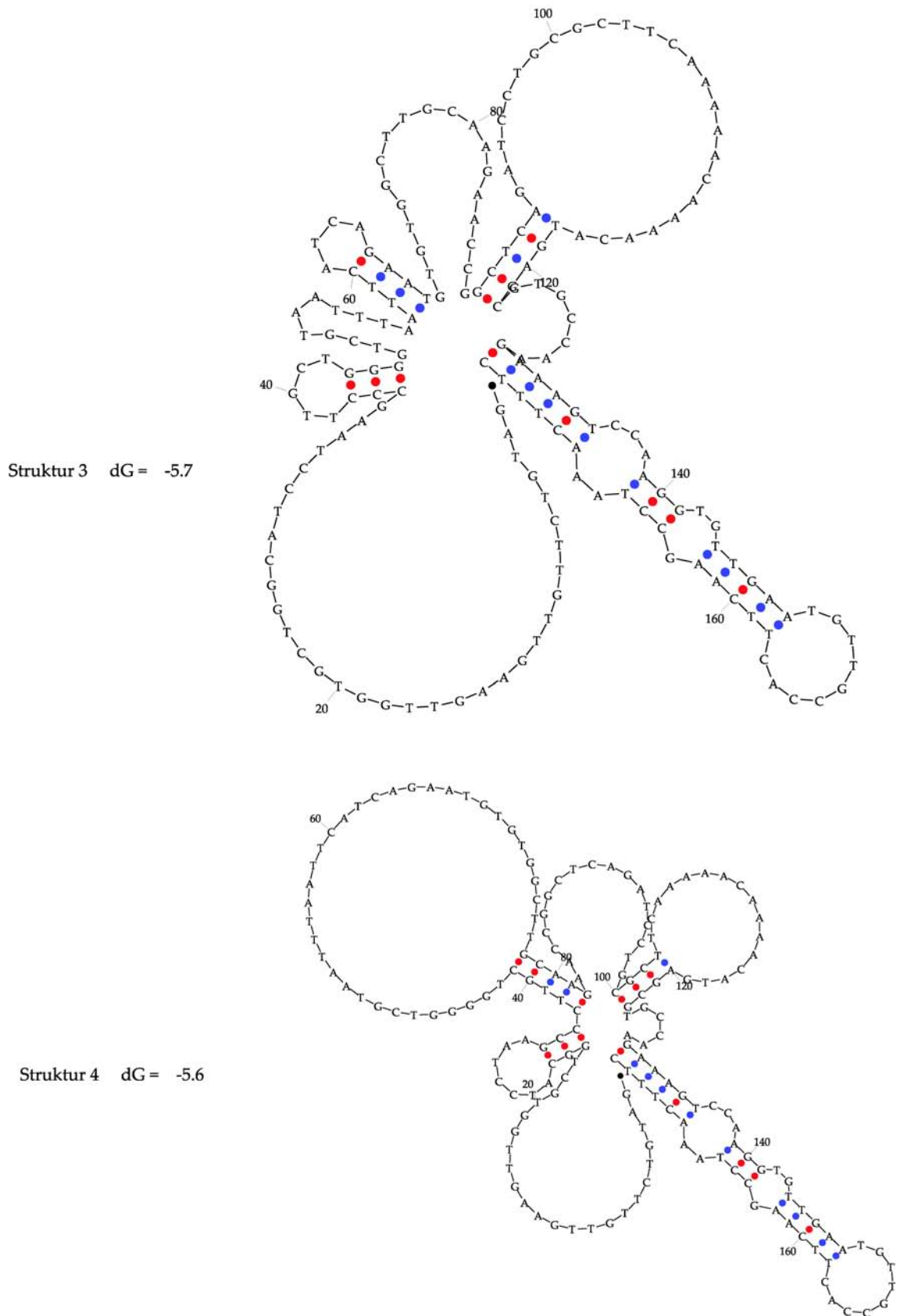


Abbildung A.5: MFOLD-Ergebnisse des Wildtyps 11391g: Struktur 1 und 2



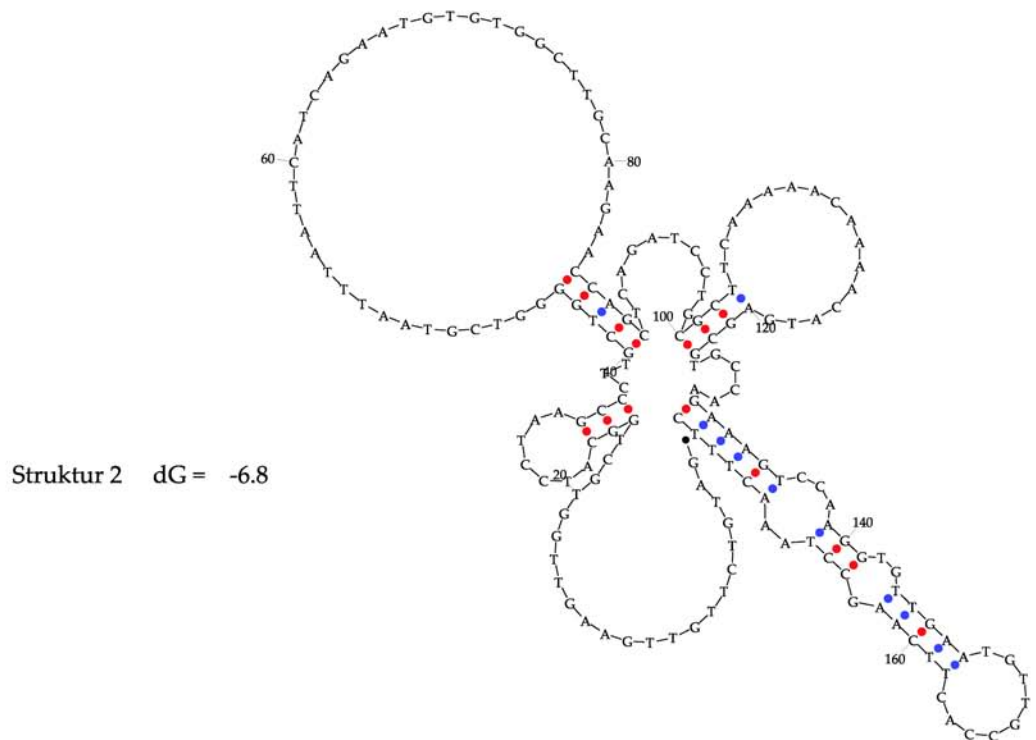
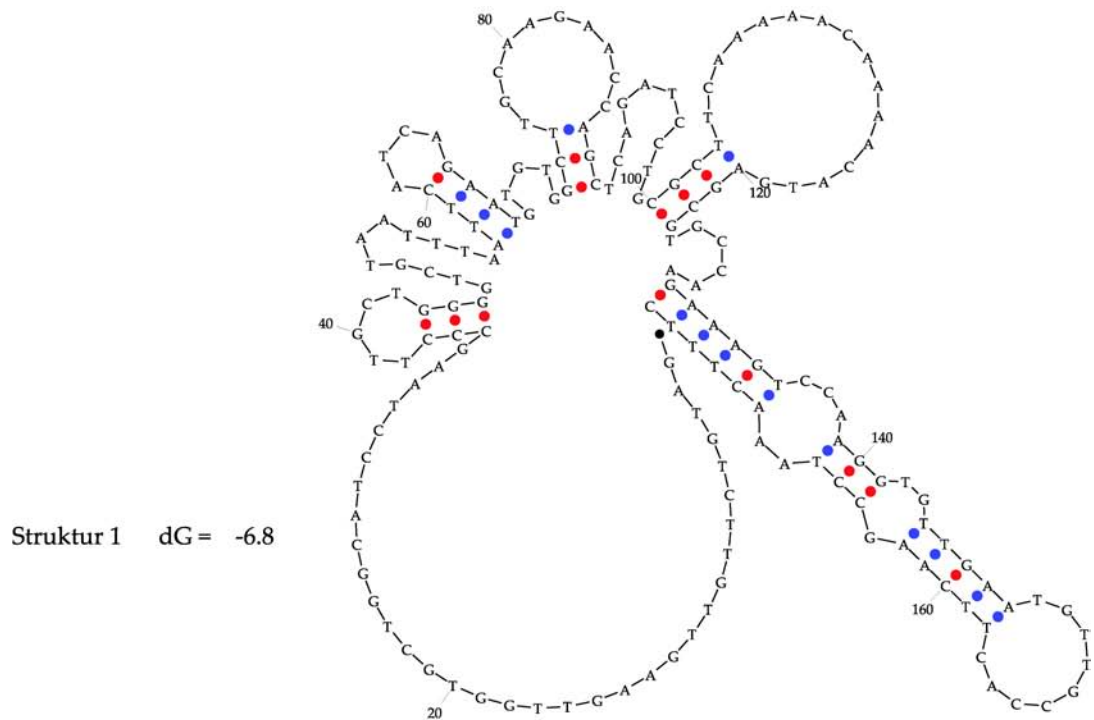


Abbildung A.7: MFOLD-Ergebnisse des Wildtyps 11391a: Struktur 1 und 2

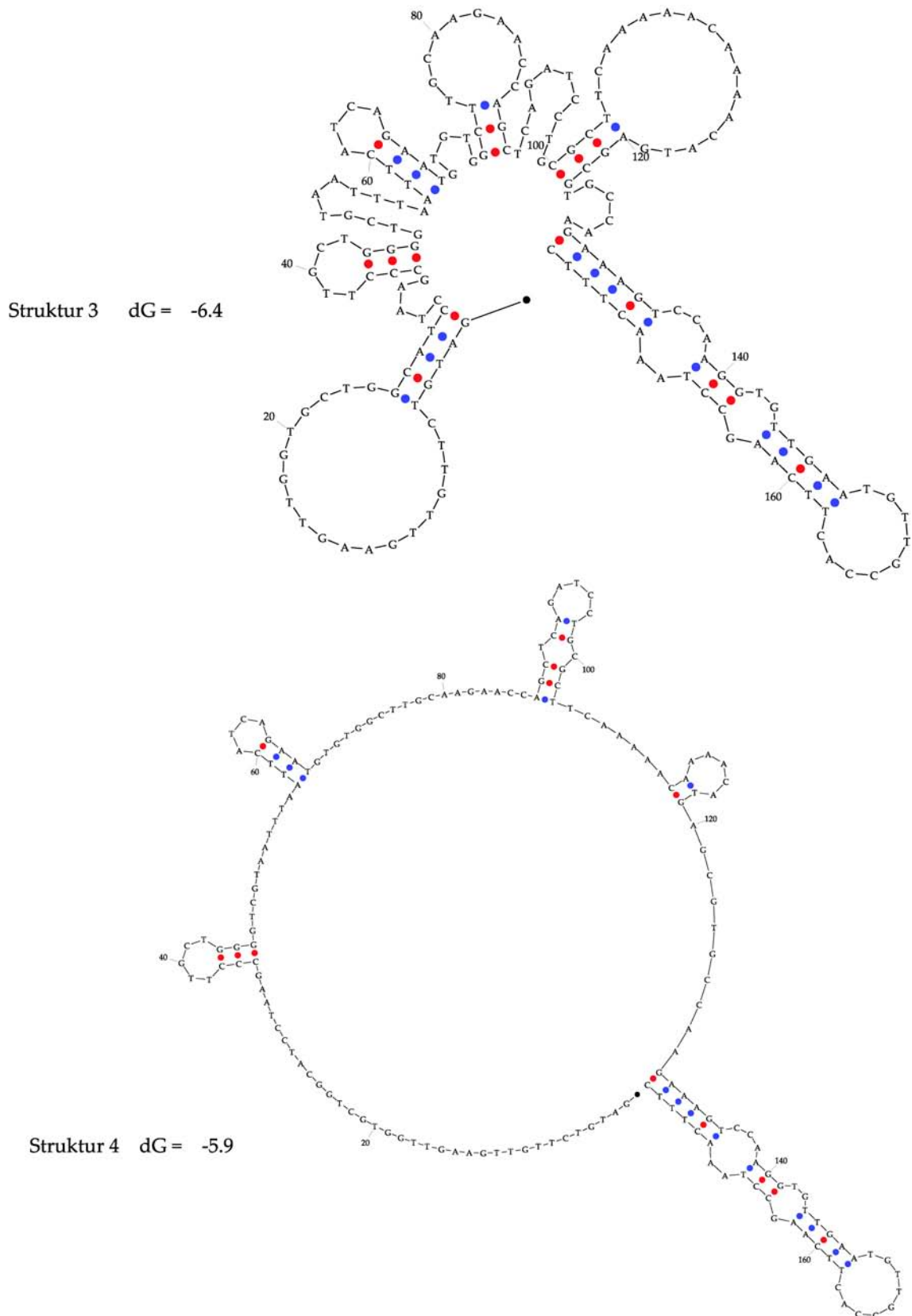


Abbildung A.8: MFOLD-Ergebnisse des Wildtyps 11391a: Struktur 3 und 4

Polymorphismus 11426

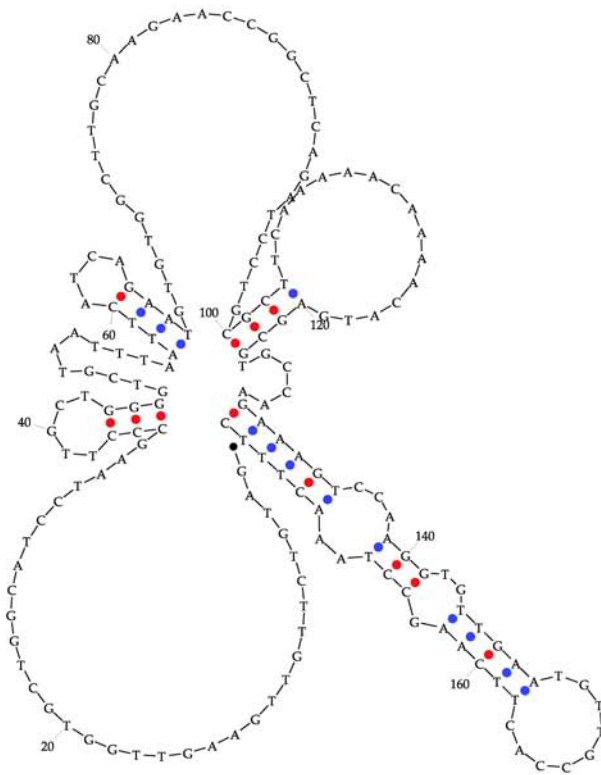
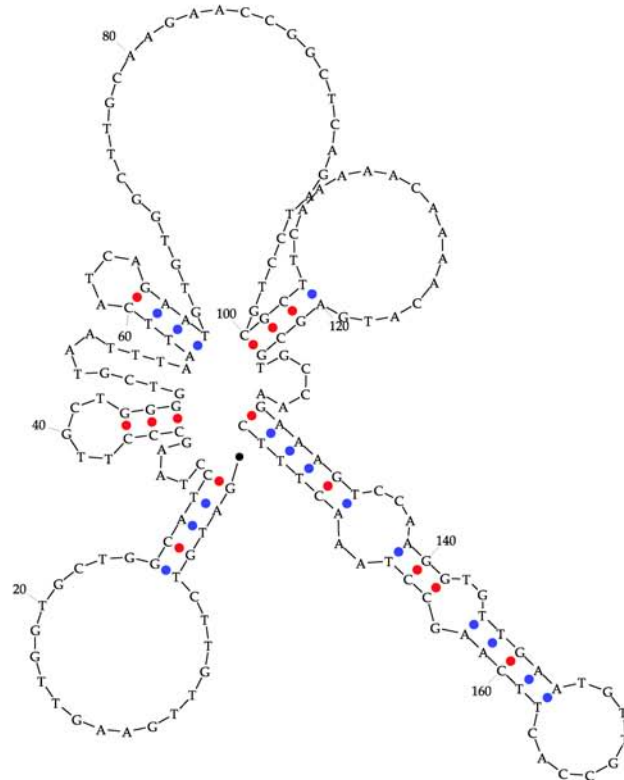
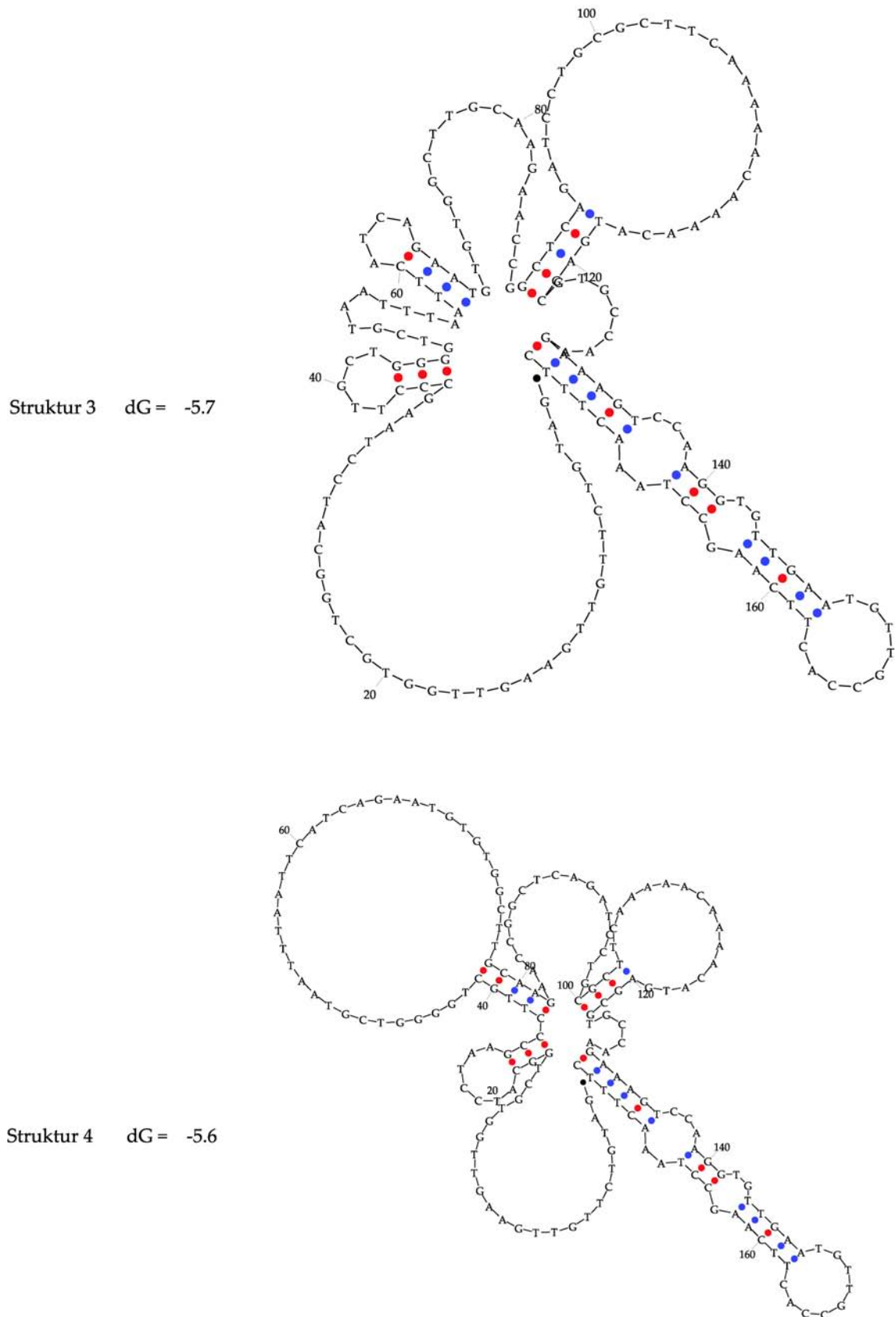
Struktur 1 $dG = -6.6$ Struktur 2 $dG = -6.2$ 

Abbildung A.9: MFOLD-Ergebnisse des Wildtyps 11426a: Struktur 1 und 2



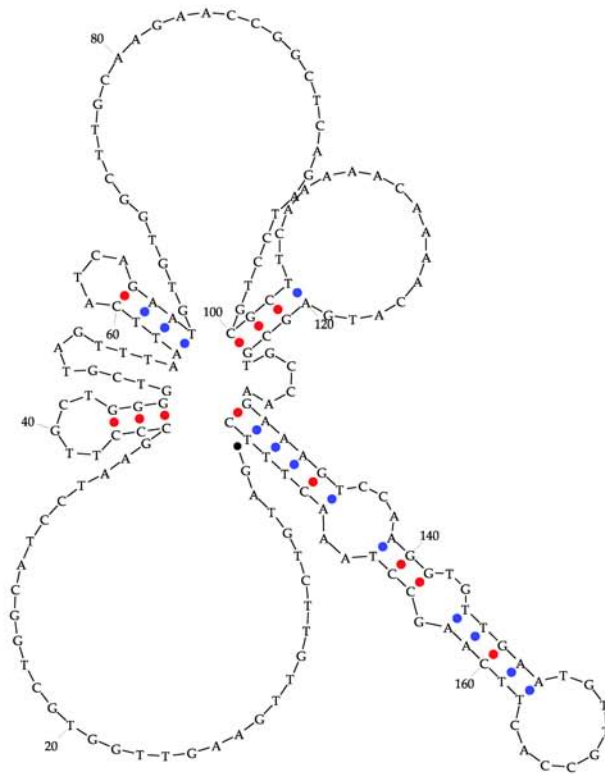
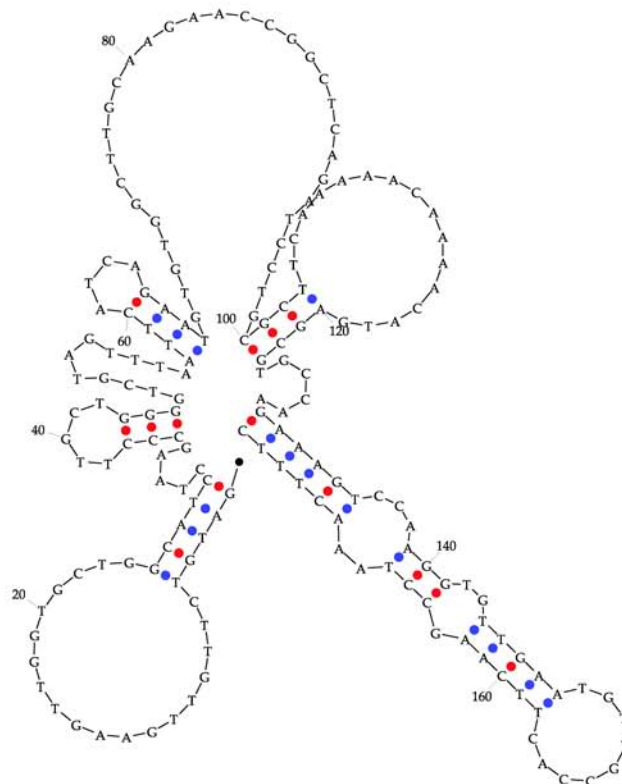
Struktur 1 $dG = -6.6$ Struktur 2 $dG = -6.2$ 

Abbildung A.11: MFOLD-Ergebnisse des Wildtyps 11426g: Struktur 1 und 2

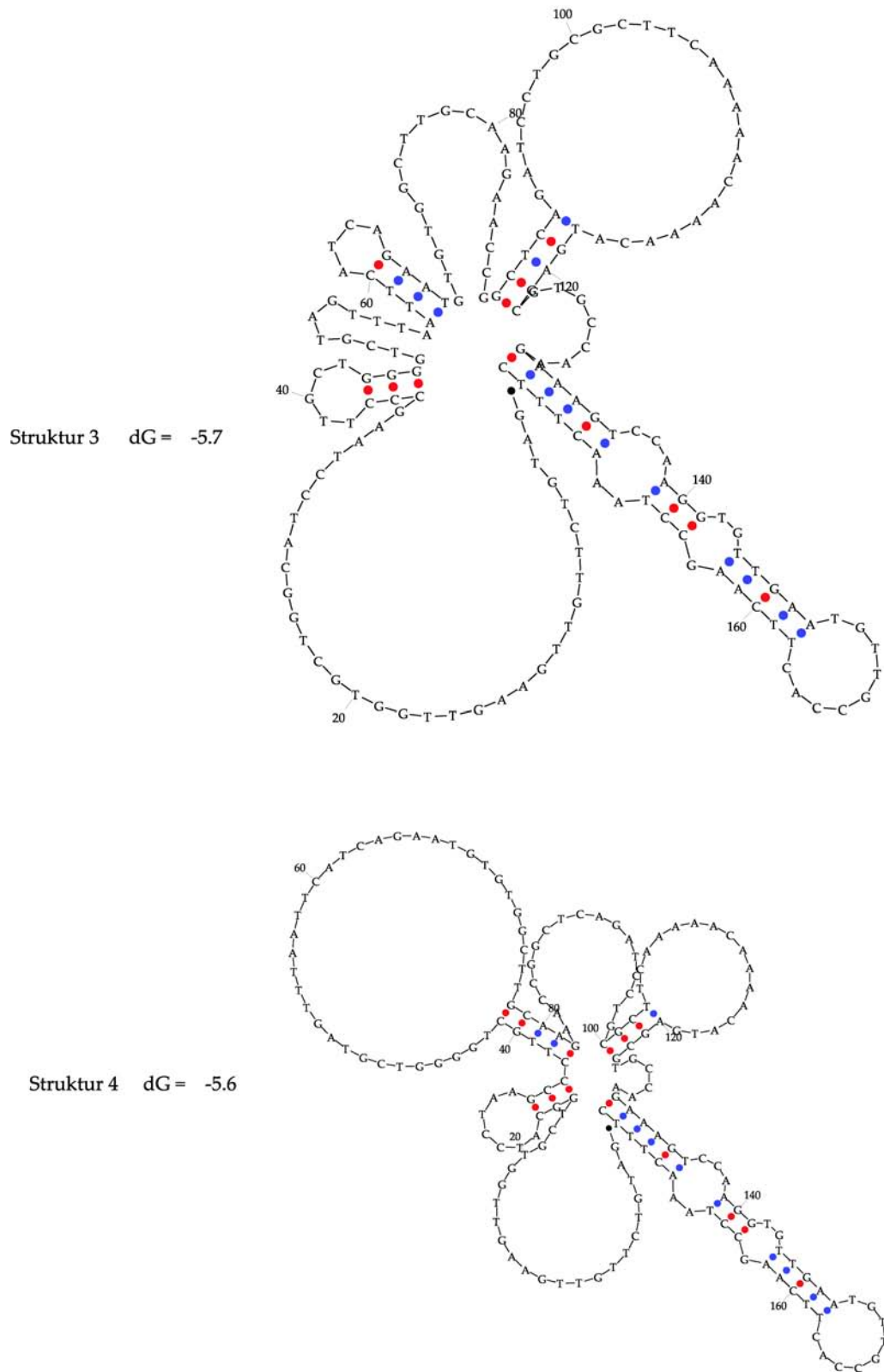


Abbildung A.12: MFOLD-Ergebnisse des Wildtyps 11426g: Struktur 3 und 4

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei folgenden Personen bedanken, ohne deren freundliche und tatkräftige Unterstützung diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre:

Prof. Dr. Frank Bier für seinen unerschütterlichen Optimismus, die hilfreichen Tipps, Diskussionen und sein Drängen nach regelmäßigen schriftlichen Berichten, die sich später als sehr nützlich erwiesen.

Dr. Eva Ehrentreich-Förster für ihre Unterstützung bei fast jedem Problem sowie ihr stets offenes Ohr für Klagen und Nörgeleien. Danke für deine Geduld und möge dein Fuß nie erlahmen!

Bei allen Kolleginnen und Kollegen des Fraunhofer Instituts für Biomedizinische Technik, die immer ein Quell der Freude und Ablenkung, aber auch der geistigen Inspiration waren, insbesondere Nenad, Kati, Andrea, Michaela, Rothin, Alexander, Bettina, Edda, Jörg, Dirk, Mandy, Dennie, Heiko, Xenia, Christian, Markus und Jenny.

Dr. Walter Meinel und Prof. Dr. Hansrüdi Glatt für die Bereitstellung von Patientenproben, nützliche Diskussionen und die freundliche Einführung in die Welt der Sulfotransferasen.

Dr. Spranger und Prof. Dr. Pfeiffer für die Bereitstellung von Patientenproben und Diskussionen über Adiponectin.

Meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben und ohne deren Großzügigkeit ich wohl keine Gelegenheit zum Krafttanken gehabt hätte.

Den Reudernern Irma und Gerhard für die freundliche Bereitstellung eines Arbeitsraumes während eines ereignisreichen Urlaubs in Baden-Württemberg.

Christian Kirsch für seine Hilfe bei allerlei Perl-Programmierungen und seine \LaTeX -Bücher, die ich mir ausleihen durfte. Britta für die Einführung in \LaTeX und ihre Hilfe bei den ersten Schritten. Andreas für den Anstupser in Richtung MikTex.

Allen „Wilden Säuen“, die für mich „geblutet“ haben und besonders Clau, die ihnen Blut abnahm und mich auch sonst mit diversen Proben aus Lichtenberg versorgte.

Marlene und Harshadrai für ihre Hilfe bei meinem Englisch.

Mein besonderer Dank gilt Ute Roos, die immer für mich da war und mich in allen Lebenslagen emotional unterstützt hat. Vielen Dank für deine Geduld, konstruktive Kritik und sprachlichen Anregungen.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Des weiteren bestätige ich, dass diese Arbeit bisher an keiner anderen Hochschule eingereicht wurde.

Susanne Schwonbeck, Potsdam, 28. Juni 2004