

Aus dem Institut für Humangenetik  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Professor Dr. med. H. Höhn

**Whole Genome Amplification von Plasma-DNA und Entwicklung  
eines Ausschlusskriteriums zur Verbesserung der  
Genotypisierungsqualität**

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Veit Schoenborn  
aus Starnberg

Würzburg, Juli 2008

Referent: Prof. Dr. med. H. Höhn  
Koreferent: Prof. Dr. med. F. Jakob  
Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 15.07.2009

Der Promovend ist Arzt

*Meiner Familie gewidmet*

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGEN</b> .....	<b>V</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Whole Genome Amplification</b> .....	<b>2</b>
1.1.1 PCR-basierende Methoden .....	2
1.1.1.1 Interspersed Repetive Sequence-PCR (IRS-PCR).....	2
1.1.1.2 Degenerate Oligonucleotide Primed-PCR (DOP-PCR) .....	3
1.1.1.3 Primer Extension Preamplification (PEP).....	4
1.1.1.4 Ligation Mediated-PCR (LMP) .....	5
1.1.2 Multiple Displacement-Amplification (MDA).....	5
<b>1.2 Genetische Marker</b> .....	<b>9</b>
1.2.1 Single Nucleotide Polymorphism (SNP) .....	9
1.2.2 Short Tandem Repeats.....	12
<b>1.3 Aufgabenstellung</b> .....	<b>14</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1 Material</b> .....	<b>15</b>
2.1.1 Arbeitsgeräte.....	15
2.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	18
2.1.3 Chemikalien .....	19
2.1.4 Puffer und Lösungen.....	20
2.1.4.1 Lösungen für die Vollblut-DNA Extraktion.....	20
2.1.4.2 PCR-Reagenzien .....	20
2.1.4.3 Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese .....	21
2.1.4.4 Lösungen für die PAGE Gelelektrophorese.....	21
2.1.4.5 Reagenzien für die STR-Analyse mittels Kapillarelektrophorese .....	21
2.1.4.6 Reagenzien, Lösungen und Puffer für MALDI-TOF .....	21
2.1.4.7 Reagenzien für die Real-Time PCR.....	22
2.1.5 Reaktionskits.....	22
2.1.5.1 DNA-Isolation aus Plasma .....	22

## Inhaltsverzeichnis

---

2.1.5.2	Whole Genome Amplification .....	22
2.1.5.3	DNA Konzentrationsbestimmung mittels Real-Time PCR .....	22
2.1.6	Enzyme .....	22
2.1.6.1	Polymerasen .....	22
2.1.6.2	Sonstige Enzyme .....	22
2.1.7	Oligonukleotide .....	23
2.1.7.1	Primer für die Kontroll-PCR.....	23
2.1.7.2	Primer für die STR-Analyse.....	23
2.1.7.3	Primer für die Maldi-TOF Massenspektrometrie .....	24
2.1.7.4	Primer für die Real-Time PCR .....	25
2.1.8	Software .....	26
2.1.8.1	Datenbanken aus dem Internet.....	26
2.1.8.2	Oligonucleotide und PCR Bedingungen.....	26
2.1.8.3	GenoM48 Robotic Workstation .....	26
2.1.8.4	Pipettierroboter.....	26
2.1.8.5	Genetic Analyzer .....	26
2.1.8.6	Maldi-TOF MS .....	27
2.1.8.7	Real-Time PCR .....	27
2.1.8.8	Statistikprogramme .....	27
<b>2.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>28</b>
2.2.1	Probenmaterial.....	28
2.2.2	Isolierung menschlicher genomischer DNA aus Vollblut .....	28
2.2.3	Isolierung genomischer DNA aus Plasma .....	29
2.2.4	Whole Genome Amplification mittels Phi29 Polymerase.....	31
2.2.5	Aufreinigung der WGA Produkte.....	32
2.2.6	Photometrische DNA-Konzentrationsmessung .....	33
2.2.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	33
2.2.8	Kontroll-PCR nach Whole Genome Amplification.....	34
2.2.9	Agarose-Gelelektrophorese .....	36
2.2.10	Genotypisierung mittels Maldi-TOF MS.....	37
2.2.10.1	hME-(homogenous-Mass-Extent)-Methode .....	39
2.2.10.2	PCR innerhalb der hME-Methode .....	42
2.2.10.3	SAP-Verdau-Reaktion innerhalb der hME-Methode .....	43
2.2.10.4	Primer-Extensions-Reaktion innerhalb der hME-Methode.....	44
2.2.10.5	Probenaufreinigung innerhalb der hME-Methode .....	45
2.2.10.6	Maldi-TOF Massenspektrometrie innerhalb der hME-Methode .....	46
2.2.11	Genotypisierung mittels Real-Time PCR.....	46
2.2.11.1	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) .....	47

## Inhaltsverzeichnis

---

2.2.11.2	Fluoreszenzfarbstoffe.....	48
2.2.11.3	TaqMan-Assay .....	50
2.2.11.4	Prinzip.....	50
2.2.11.5	Auswertung .....	53
2.2.11.6	Absolute Quantifizierung mittels Human Quantifiler .....	55
2.2.11.6.1	Reaktionsansatz .....	55
2.2.11.7	Allelische Diskriminierung .....	57
2.2.11.7.1	Reaktionsansatz .....	58
2.2.12	STR-Analyse.....	60
2.2.12.1	PCR innerhalb der STR-Analyse mittels hochauflösender Kapillarelektrophorese.....	63
2.2.12.2	STR-Analyse mittels hochauflösender Kapillarelektrophorese .....	65
2.2.12.3	PCR innerhalb der STR-Analyse mittels PAGE-Gel .....	66
2.2.12.4	STR-Analyse mittels PAGE-Gel.....	67
2.2.12.4.1	Gelvorbereitung .....	67
2.2.12.4.2	Elektrophorese .....	68
2.2.12.4.3	Auswertung.....	69
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>70</b>
<b>3.1</b>	<b>Plasma-DNA Konzentrationen und Erfolgskontrolle.....</b>	<b>70</b>
3.1.1	Plasma-DNA Konzentration vor WGA .....	70
3.1.2	Plasma-DNA-Konzentration nach WGA .....	71
3.1.3	Kontroll-PCR .....	72
<b>3.2</b>	<b>Evaluierungs-Probenset.....</b>	<b>74</b>
3.2.1	SNP-Analyse.....	74
3.2.1.1	SNP-Analyse mittels MALDI-TOF .....	74
3.2.1.2	SNP-Analyse mittels TaqMan .....	79
3.2.1.3	Zusammenfassung der SNP-Analyse .....	80
3.2.2	STR-Analyse .....	83
3.2.3	Algorithmusentwicklung zum zuverlässigen Ausschluss nicht geeigneter WGA- Plasma-DNA-Proben .....	87
<b>3.3</b>	<b>Validierungs-Probenset.....</b>	<b>88</b>
3.3.1	STR-Analyse.....	88
3.3.2	SNP-Analyse.....	90
3.3.2.1	SNP-Analyse mittels MALDI-TOF .....	90
3.3.2.2	SNP-Analyse mittels TaqMan .....	90

## Inhaltsverzeichnis

---

3.3.2.3	Zusammenfassung der SNP-Analyse .....	91
<b>3.4</b>	<b>Zusammenfassende Auswertung der Ergebnisse.....</b>	<b>93</b>
3.4.1	Einfluss der Plasma-DNA-Menge auf die Anzahl homozygoter STR-Marker .....	93
3.4.2	Abhängigkeit der Diskordanzrate von der Anzahl homozygoter STR-Marker.....	94
3.4.3	Abhängigkeit der Probenausschlussrate von der Anzahl homozygoter STR-Marker	96
3.4.4	Einfluss der Amplikongröße auf die Diskordanzrate.....	99
3.4.5	Eingesetzte DNA-Menge als Ausschlusskriterium.....	99
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>102</b>
4.1	Bedeutung des HWE .....	105
4.2	Bedeutung der eingesetzten DNA-Menge.....	107
4.3	Bedeutung der Qualität der eingesetzten DNA .....	109
4.4	Vergleich mit anderen Studien.....	110
4.5	Statistische Überlegungen .....	112
4.6	Fazit und Ausblick.....	114
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>115</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>116</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>133</b>
7.1	Abbildungsverzeichnis .....	133
7.2	Tabellenverzeichnis .....	137

## Abkürzungen

Φ	Phi
°C	Grad Celsius
μ	Mikro (10 <sup>-6</sup> )
A	Adenin
Å	Ångström
Abd.	Aqua bidestillata
ADO	Allelic Drop Out
APS	Ammonium Persulfat
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CAPD	Continuous ambulatory peritoneal dialysis
CCD	Charge-coupled Device
CGH	Komparative genomische Hybridisierung
Cl	Chlorid
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosin-5'-Triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-Triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-5'-Triphosphat
DOP-PCR	Degenerate Oligonucleotide Primed PCR
dTTP	Desoxythymidin-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylenditrioltetraessigsäure
FRET	Fluoreszenz bzw. Förster-Resonanz-Energie-Transfer
G	Guanin
g	Gramm
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCL	Chlorwasserstoff
hME	homogenous-Mass-Extent
HNF1α	Hepatocyte nuclear factor 1 alpha
HPA	Hydroxypicolinsäure
hTERT	Humane Telomerase reverse Transcriptase Gen
HWE	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht
IPC	interne PCR Kontrolle
I-PEP	improved Primer Extension Preamplification
IRS-PCR	Interspersed Repetive Sequence PCR
K	Kalium
Kb	Kilo-Basenpaare
KHK	Koronare Herzkrankheit
L	Liter
LMP	Ligation Mediated PCR



## Abkürzungen

---

m	Milli ( $10^{-3}$ )
M	Mol
MAF	minor allele frequency
MALDI-TOF MS	Matrixassisted Laser Desorption/Ionisation (MALDI); Time Of Flight (TOF); Massenspektrometrie (MS)
MDA	Multiple Displacement Amplification
Mg	Magnesium
MGB	Miner Groove Binder
Min	Minuten
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
n	Nano ( $10^{-9}$ )
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
Nm	Nanometer
OD	optische Dichte
o.g.	oben genannt
p	Piko ( $10^{-12}$ )
PAGE	Polyacrylamidgel
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEP	Primer Extension Preamplification
PROBE	Primer Oligo Base Extension Reaction
RBC	Red Blood Cell
RCA	rolling circle amplification
Rpm	rounds per minute
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SE	Natrium Chlorid/EDTA
Sec	Sekunde
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
Std	Stunde
STR	Short Tandem Repeat
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylenethylendiamin
Titriplex III	Dinatriumdihydrogenethylendiamintetraacetat
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
VNTR	Variable Nukleotid Repeats
WGA	Whole Genome Amplification
z.B.	zum Beispiel

# 1 Einleitung

In den letzten Jahren rückte die Untersuchung von genetischen Risikofaktoren für verschiedene Krankheiten in den Fokus der medizinischen Forschung. Die dabei auch verwendete Untersuchung von Single Nucleotid Polymorphismen (SNPs) in Kandidatengenen scheint ein probates Mittel zu sein, und die bisher gefundenen Ergebnisse tragen sehr eindrücklich zu unserem Verständnis von Krankheiten bei [1]. Die sich dabei zu Nutze gemachten Methoden benötigen große Mengen an genomischer DNA, welche üblicherweise aus Vollblut, Buffy Coat, Zelllinien, Wangenabstrichen oder biologischem Gewebe gewonnen wird [2].

Für epidemiologische Studien wurde schon seit Jahrzehnten eine große Anzahl an verschiedenen biologischen Proben gesammelt, einige Studien bestanden teilweise aus mehr als 10000 Individuen [3;4]. Neben der enormen Menge an Proben wurden zusätzlich unzählige Daten bezüglich Gesundheit, körperlichem Status, persönlicher und familiärer medizinischer Vorgeschichte, ausgesetzten Umwelteinflüssen usw. erhoben. Der unschätzbare Vorteil dieser Studien ist der sehr lange Beobachtungszeitraum, durch den Informationen über eingetretene Vorfälle wie z.B. einen Herzinfarkt erfasst werden und somit Verzerrungen der Ergebnisse, wie z.B. systematische Fehler bei der Überlebensrate, verhindert werden konnten. Ein Nachteil besteht jedoch darin, dass bei diesen historischen Sammlungen oft nur Plasma- oder Serumproben für die Analyse von Biomarkern abgenommen, analysiert und archiviert wurden und heute in Zeiten, in denen die genetische Untersuchung zunehmend an Bedeutung gewinnt, von diesen Probanden kein Vollblut oder Buffy Coat bzw. qualitativ gleichwertiges Material zur Gewinnung von genomischer DNA zur Verfügung steht. Somit entziehen sie sich jeglicher molekulargenetischer Analyse. In einigen dieser Studien (z.B. der Framingham Heart Study) konnte eine spätere Akquirierung von DNA während einer Nachuntersuchung dieses Manko verringern, nichtsdestotrotz starben einige Studienteilnehmer schon während der ersten Beobachtungsjahre. Speziell diese Personen könnten aber im höchsten Maße für genetische Untersuchungen, gerade in Bezug auf genetische Risikofaktoren

für frühzeitige kardiovaskuläre Erkrankungen, interessant sein. Es besteht aber leider keine Möglichkeit, von ihnen Proben zur DNA-Extraktion zu erhalten. Folglich sind wertvolle Informationen im wahrsten Sinne des Wortes auf dem Friedhof begraben. Um epidemiologische Informationen mit genetischen Daten zu komplettieren wäre es erstrebenswert, genomische DNA von Personen dieser Studien in ausreichender Menge und guter Qualität zu beschaffen. Whole Genome Amplification (WGA) könnte ein leistungsfähiges Hilfsmittel sein, um genomische DNA wiederzuerlangen, da diese in minimaler Menge in Plasma- und Serumproben vorhanden ist [5;6].

### **1.1 Whole Genome Amplification**

Für genetische Studien bildet die DNA in ausreichender Qualität und Quantität die Grundlage. Durch Entwicklung von Hochdurchsatzverfahren zur Analyse des Erbguts ist die vorhandene Menge an DNA mittlerweile aber zum limitierenden Faktor geworden. Ein wichtiges Ziel ist es, genug genomische DNA sowohl für diese ganze Reihe von Analyseverfahren, als auch für zukünftige Studien bereitzustellen. Überdies kann in der forensischen Medizin oder Archäologie die erhaltene Menge an DNA teilweise sehr gering sein. Zu diesem Zweck wurden eine Reihe neuer Methoden entwickelt, um aus den vorhandenen Quellen millionenfache Kopien der DNA herzustellen. Eine dieser Methoden, die das gesamte Genom eines Individuums vervielfältigt, wird Whole Genome Amplification (WGA) genannt. Dabei ist natürlich von entscheidender Bedeutung, dass das entstandene Produkt genau die gleiche Sequenz enthält wie die eingesetzte ursprüngliche DNA. Es gibt mittlerweile verschiedene methodische Ansätze, auf die im Folgenden eingegangen wird.

#### **1.1.1 PCR-basierende Methoden**

##### **1.1.1.1 Interspersed Repetive Sequence-PCR (IRS-PCR)**

Der erste Versuch einer auf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) basierenden WGA wurde im Jahr 1989 von Nelson et al. durchgeführt [7]. Dabei wurden

Primer verwendet, welche so konstruiert waren, dass sie an repetitiven Sequenzen der DNA, so genannten Alu Repeats, hybridisierten und als Startpunkt für die PCR dienten. Alu Repeats kommen zwar im gesamten Genom vor, die Problematik dieser Methode bestand jedoch darin, dass sie dazu tendieren, in unstablen Regionen der DNA [8] und den R-Banden der Chromosomen [9] vermehrt aufzutreten. Dadurch entstanden PCR-Produkte, welche nicht das gesamte Genom, sondern überwiegend nur diese Regionen widerspiegeln.

### **1.1.1.2 Degenerate Oligonucleotide Primed-PCR (DOP-PCR)**

Die erste erfolgreiche Methode zur WGA mittels DOP-PCR wurde 1992 publiziert [10]. Bei diesem Versuchsansatz werden teilweise degenerierte Oligonukleotide als Primer eingesetzt, die während einiger initialer PCR-Zyklen mit tiefen Annealingtemperaturen an vielen Bereichen, welche statistisch über das komplette Genom verteilt sind, binden. Das degenerierte Hexamer des Primers hybridisiert an beliebigen Stellen der Matrize, und somit können unterschiedlich lange, zum Teil sich selbst überlappende, Fragmente amplifiziert werden. Durch die Vielzahl möglicher Hexamere als Primer und die niedrige Annealingtemperatur wird eine "unspezifische" Primerbindung ermöglicht. Im zweiten Zyklus dienen die Amplifikate (mit anhängendem Primer) des ersten Zyklus wieder als Matrize. Hierbei werden auch für spätere spezifische Reaktionen komplementäre Primerbindungsstellen geschaffen. Erhöht man in den folgenden Zyklen langsam die Annealingtemperatur, wird eine spezifische Primerbindung erreicht, welche eine exponentielle Vermehrung der zuvor amplifizierten DNA-Fragmente ermöglicht.

Im Laufe der Jahre wurde diese Methode weiter modifiziert, um geringere Mengen an DNA einsetzen zu können [11], die Ausbeute [12], Genauigkeit und Fragmentlänge [13] zu vergrößern und um eine bessere Abdeckung des Genoms zu erreichen [14;15].

Die mittels DOP-PCR generierte DNA wurde inzwischen für viele Applikationen getestet wie komparative genomische Hybridisierung (CGH) [12;16-19], SNP-Genotypisierung [20;21] und Mikrosatellitenanalyse [13;22].

Dennoch hat die DOP-PCR ihre Einschränkungen. Vergleiche der Ergebnisse, die bei genetischen Analysen von DOP-PCR amplifizierter DNA und nicht amplifizierter DNA erhalten wurden, zeigten, dass die DOP-PCR unspezifische Artefakte [22] und kurze DNA-Fragmente (<3kb) [10] produziert, und sie zu einer unzureichenden Abdeckung aller Loci führt [23].

### **1.1.1.3 Primer Extension Preamplification (PEP)**

Das ursprüngliche Protokoll der PEP stammt auch aus dem Jahr 1992 und wurde von der Gruppe um Zhang entwickelt [24]. Dabei wird mit Hilfe einer Mischung aus 15 Basen langen Oligonukleotiden aller möglichen Basensequenzen („Random Primern“) eine PCR durchgeführt, bei der, nach der Denaturierung, tiefe Annealingtemperaturen gewählt und stringent schrittweise erhöht werden; sie enden bei einer Temperatur von 55°C, gefolgt von einem Extensionsschritt von vier Minuten Dauer. Dies wird in 50 Zyklen wiederholt. Die Verwendung der Random Primer wurde unter der Annahme ausgewählt, dass dadurch jedes entstandene Amplifikationsprodukt den Primern wiederum als Bindungsstelle dienen kann. Dadurch war es möglich, 78% des Genoms zu verdreißigfachen. Auch diese Methode unterlag weiteren Optimierungen, aus denen die improved PEP (I-PEP) hervorging [25], bei der eine Proofreading Taq und veränderte PCR-Bedingungen zum Einsatz kamen.

Wie auch bei der DOP-PCR wurden PEP und I-PEP mit mehreren Verfahren zur genetischen Analyse getestet, wobei sich die I-PEP als die effizienteste aller drei Methoden darstellte, speziell, wenn nur wenige Zellen oder spezielles Gewebe als Vorlage benutzt wurden [25-31].

Dennoch leidet auch diese Methode unter unbalancierter Amplifikation von Mikrosatelliten und SNPs sowie einer unzureichenden Abdeckung des ganzen Genoms und unzuverlässigen Daten bei der CGH [23;32;33].

### **1.1.1.4 Ligation Mediated-PCR (LMP)**

Die Methode der LMP wurde erstmals 1989 von Lüdecke et al. [34] vorgestellt und im Laufe der Jahre für eine Whole Genome Amplification kleiner Mengen genomischer DNA sowie einzelner Zellen adaptiert [35-37]. In verschiedenen Arbeitsschritten, die alle in demselben Reaktionsgefäß ausgeführt werden können, wird die genomische DNA zunächst mittels Endonucleasen bzw. chemisch gespalten. An beide Seiten der zufällig entstandenen ca. 500 – 2000 bp großen Fragmente wird nun eine Adaptersequenz, bestehend aus einem definierten Oligonucleotid, mittels Ligation angefügt, und die Fragmente können anschließend durch eine PCR mit universellen Primern amplifiziert werden. Rubicon Genomics präsentierte durch eine Weiterentwicklung der Methode 2002 einen kommerziellen Kit (Omniplex) [38], der einen sehr geringen Locusverlust in einer groß angelegten SNP Untersuchung zeigte [39]. Ein Nachteil ist jedoch die geringe Fragmentgröße der neu generierten DNA sowie eine möglicherweise schlechtere Genotypisierungsqualität im Vergleich zur MDA [40]. Bisher gibt es aber nur sehr wenige Studien, welche die Quantität der erhaltenen DNA sowie die Qualität der Genotypisierungen untersuchten, so dass es zunächst einer weiteren Evaluierung dieser Methode bedarf [39-41].

### **1.1.2 Multiple Displacement-Amplification (MDA)**

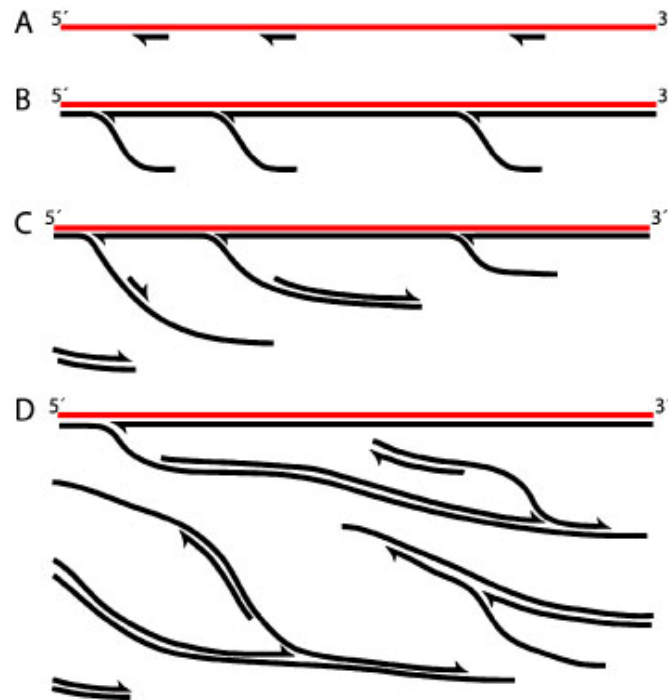
Die MDA beruht in einem hohen Maß auf der Prozessivität und Genauigkeit durch eine hervorragende strangersetzende („strand displacement“) Eigenschaft der verwendeten Phi29 ( $\Phi$ 29) DNA-Polymerase [42-44]. Unter Prozessivität versteht man die Tendenz des Proteins, auf einer einzelnen Matrize zu verbleiben, statt sich zu lösen. Je höher die Prozessivität, desto geringer das Auftreten von Leserasterverschiebungen.

Die Bakteriophage  $\Phi$ 29 des *Bacillus subtilis* enthält ein einfaches doppelsträngiges 19,285 bp langes DNA Genom [45]. Gen 2 dieser  $\Phi$ 29 Phage kodiert für die DNA-Polymerase, die mehrere für die Replikation nötige Enzymaktivitäten enthält [46]. Die Fehlerrate der  $\Phi$ 29 DNA Polymerase wird mit

weniger als  $3 \times 10^{-6}$  angegeben [43;47], ein weit geringerer Wert als die  $3 \times 10^{-3}$  bei der Taq-DNA-Polymerase [48;49].

Das Prinzip der MDA basiert auf der rolling circle amplification (RCA), einem Mechanismus, der von der Replikation zirkulärer DNA-Moleküle bei Plasmiden und Viren bekannt ist. Zunächst wurde MDA bei der Amplifikation zirkulärer DNA angewandt [50;51] und schließlich für genomische lineare DNA adaptiert [23].

Im Gegensatz zu PCR-basierenden WGA-Methoden ist es nicht notwendig, verschiedene Zyklen aus Denaturierung, Annealing und Extension durchzuführen, sondern die Reaktion besteht nach einer initialen Denaturierung aus einer isothermalen Reaktion bei 30°C über 2-18 h, die mit einem finalen Schritt von 65°C zu Deaktivierung des Enzyms endet. Mittels random hexamer Primern, die am 3'-Ende zum Schutz vor der Proofreading 3'-5' Exonukleaseaktivität der  $\Phi$ 29 Polymerase thiosulfatiert sind, kommt es zu einer sich weit verzweigenden Amplifikation („hyperbranched amplification“). Dabei binden zunächst die Primer in allen Bereichen der Ziel DNA und dienen der  $\Phi$ 29 Polymerase als Startpunkt für die Replikation. Sobald die Polymerase während der Neusynthese der DNA auf den nächsten, vor ihr liegenden Primer trifft, schiebt sie sich unter diesen und hebt den Strang von der Matrize ab, ohne dabei an Geschwindigkeit einzubüßen oder die Verlängerung des eigenen Strangs abubrechen. Der abgelöste Strang wiederum dient den nächsten random Primern als Bindungsstelle und infolgedessen als Startpunkt weiterer, durch die  $\Phi$ 29 Polymerase katalysierte, Replikationen. Dieser Mechanismus resultiert schließlich in einer weit verzweigten Amplifikation der Ursprungs-DNA und ermöglicht die Amplifikation großer Genome (Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der sich weit verzweigenden (=hyperbranching), DNA-Strang ablösenden Amplifikationsreaktion nach [52]. Genomische Einzelstrang-DNA (rote Linie) dient als Matrize zum Binden der Random Primer (schwarze Pfeile) (A). Die neu synthetisierten DNA-Einzelstränge werden durch die  $\Phi 29$  DNA-Polymerase mit ihrer Strang ablösenden Aktivität verlängert. Das 5'-Ende jedes Strangs wird durch den vorgelagerten Strang abgelöst, der in die gleiche Richtung verlängert wird (B). Abgelöste DNA Stränge, welche nun als Einzelstrang vorliegen, dienen weiteren Random Primern wiederum als Vorlage zum Binden und werden in die entgegengesetzte Richtung verlängert (C). Im Verlauf der Reaktion weitet sich dieses verzweigte Netzwerk aus, wobei Tausende bis Millionen von Kopien der Original-DNA generiert werden (D).

Ähnlich wie bei der DOP-PCR und PEP respektive I-PEP ist keine Kenntnis über die Sequenz der eingesetzten DNA notwendig.

Diese Methode ermöglicht es, aus wenigen ng DNA mehrere  $\mu\text{g}$  qualitativ hochwertiger DNA zu generieren, ein Multiplikationsfaktor von über 10000 [23;53-56]. Die erhaltene Menge an neu synthetisierter DNA ist im Gegensatz zu den auf PCR basierenden Methoden nicht so stark abhängig von der eingesetzten DNA-Menge, da sie mit der Zeit eine Plateauphase erreicht und sich die DNA-Konzentrationen in einem bestimmten Bereich normalisieren. Durch die MDA entstehen Fragmente mit einer Länge von über 10 kb [23].



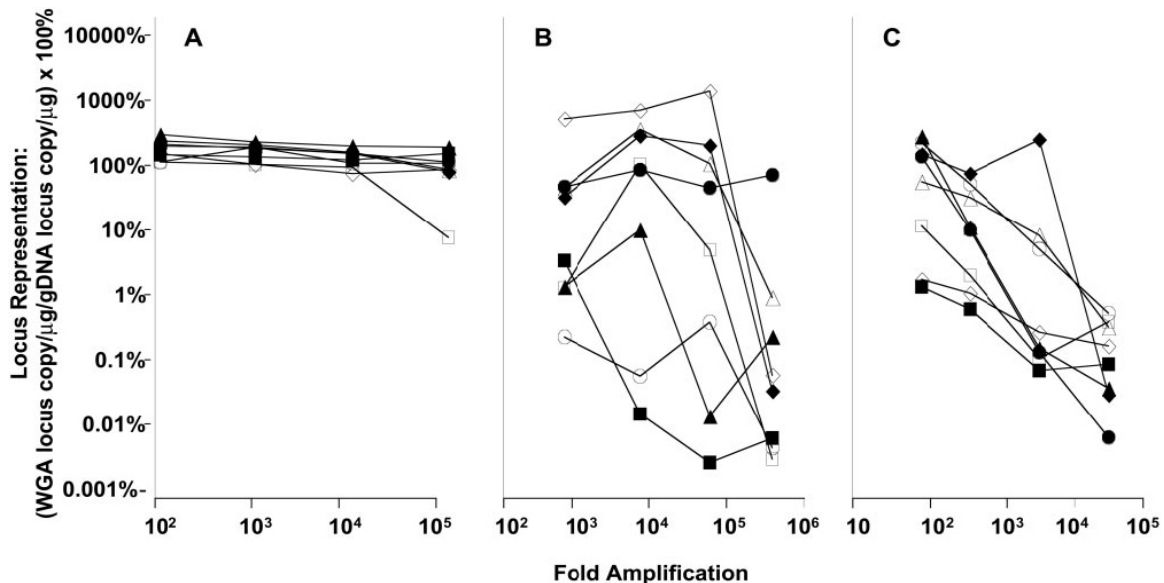
## 1. Einleitung

Ein Problem stellt hingegen DNA von ungenügender Qualität dar, da das Ergebnis der Reaktion z.B. bei degradiertem DNA schlechter wird [52].

Vergleiche zwischen eingesetzter DNA und MDA-amplifizierter DNA mittels verschiedener genetischer Untersuchungen von Mikrosatelliten, SNPs, sowie Sequenzierungen und CGH-Analysen zeigten eine sehr gute Übereinstimmung der Sequenzen [23;39;40;44;55;57-60].

Im Vergleich zu den PCR-basierenden WGA-Methoden zeigt sich eine bessere Abdeckung des Genoms, eine verringerte Verzerrung der Ergebnisse durch verminderte Über- bzw. Unterrepräsentierung verschiedener Loci, sowie eine bessere Ausbeute bezüglich der erhaltenen DNA-Menge (Abbildung 2).

Abstriche sind zu machen bei Proben, die eine sehr schlechte Qualität durch z.B. Degradierung aufweisen, dort liegt der Vorteil eher bei der DOP-PCR bzw. I-PEP [52;61].



**Abbildung 2:** Locus-Repräsentation bei unterschiedlichen WGA-Methoden. Nach Amplifikation mittels MDA (A), DOP-PCR (B) und PEP (C) wurde die Locus-Repräsentation acht verschiedener Loci quantitativ mittels Real-Time-PCR erfasst und mit nicht-amplifizierter DNA verglichen. Die Resultate der einzelnen Loci sind mit folgenden Symbolen dargestellt: cJun, ■; MKP1, □; CCR1, ▲; CCR7, ●; CCR6, ○; acidic ribosomal protein, ◆; CXCR5, ◇; Connexin40, △. Graphik entnommen aus Ref. [23].

### **1.2 Genetische Marker**

Zur Überprüfung, ob die Ergebnisse der Plasma-DNA nach der MDA-Amplifikation mit denen der Vollblut-DNA übereinstimmen, wurden verschiedene genetische Marker gewählt und bei beiden DNA-Quellen überprüft. Diese sind im Folgenden näher beschrieben.

#### **1.2.1 Single Nucleotide Polymorphism (SNP)**

Bei einem Single Nucleotide Polymorphism (SNP) handelt es sich der Definition nach um eine Variante im Erbgut in Form eines Einzelbasenaustauschs, bei der die minor allele frequency (MAF), eine Bezeichnung für die Häufigkeit des selteneren Allels eines SNPs, in einer Population größer als 1% ist [62]. SNPs mit einer MAF  $\geq 5\%$  werden als „common SNPs“ bezeichnet. Es wird angenommen, dass common SNPs für mehr als 90% der Variationen im humanen Genom verantwortlich sind und ca. alle 300 bp auftreten. Bei den übrigen Variationen handelt es sich um Mikrosatelliten, variablen Nukleotid-Repeats (VNTRs) und kompletten Kopien ganzer Gene oder ganzer Regionen eines Chromosoms. Vermutlich existieren über 7 Millionen SNPs mit einer MAF  $\geq 5\%$ , von denen 85%, eventuell mit unterschiedlichen MAFs, in verschiedenen Populationen auftreten. Weitere etwa 4 Millionen SNPs haben eine MAF zwischen 1% und 5% [63;64].

Ein SNP kann in bi-, tri- oder tetra-allelischer Form auftreten, die beiden letzten machen jedoch nur einen verschwindend geringen Anteil von ca. 0,1% aller humanen SNPs aus [65]. Demnach werden SNPs häufig als bi-allelische Marker bezeichnet. Zunehmend wird der Begriff „SNP“ auch für sehr seltene Variationen mit einer MAF  $< 1\%$  bzw. andere Variationen wie z.B. Insertions/Deletions-Polymorphismen verwendet, wie ein Blick in die NCBI dbSNP Datenbank zeigt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>).

Das in den letzten Jahren stark angewachsene Interesse an diesen Varianten rührt daher, dass man sich erhofft, mit ihrer Hilfe über Assoziations- oder Linkage-Studien neue Gene zu identifizieren bzw. Genvarianten zu entdecken, die mit Krankheiten assoziiert sind oder in Verdacht stehen, mit diesen assoziiert zu sein [63].

Generell gibt es 3 Klassen von SNPs:

- Jene mit einer starken funktionellen Komponente, die das Gen direkt stark beeinflussen und dadurch, z.B. durch Austausch einer Aminosäure, auch die Funktion des Genprodukts (die klassische Punktmutation).
- Jene mit geringen funktionellen Effekten, die Individuen zusammen mit weiteren genetischen Einflüssen bzw. Umweltfaktoren für bestimmte Krankheiten prädisponieren (funktionelle SNPs).
- Jene, die in Bezug auf die Funktion eines Gens keinen Einfluss haben (nicht-funktionelle SNPs).

Die Punktmutation kann einen Einfluss auf den Phänotyp haben und zu Krankheiten mit Mendelschem Erbgang führen. Funktionelle SNPs gelten als sehr interessant, gerade wenn ihre Frequenz in der Allgemeinbevölkerung hoch ist und sie im Verdacht stehen, durch ungünstige Kombinationen aus verschiedenen Faktoren mit Krankheiten assoziiert zu sein. Bei diesen multifaktoriellen, multigenetischen Krankheiten sind als Beispiele Diabetes, Übergewicht, KHK, Tumore oder neurologische Erkrankungen zu nennen [66-69]. Dabei fällt es manchmal schwer, die Grenze zwischen klassischer Punktmutation und funktionellem SNP klar zu ziehen. Diese ist möglicherweise über das Ausmaß der Penetranz zu bestimmen. Penetranz bezieht sich darauf, ob ein genetisches Merkmal exprimiert wird und ist abhängig von genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen. Klassische Punktmutationen haben eine hohe Penetranz, sind selten und direkt krankheitsverursachend, wohingegen funktionelle SNPs eine niedrigere Penetranz ausweisen und nur das individuelle Risiko für eine Krankheit erhöhen. Dieses Risiko kann sich durch die Summe mehrerer funktioneller SNPs im gesamten Erbgut erhöhen. Schlussendlich können SNPs aber auch ohne jeglichen funktionellen Einfluss sein. Sie finden als genetische Marker in Assoziationsanalysen, Linkage-Disequilibrium-Studien bei von Krankheit betroffenen und gesunden Personen oder klassischen Linkage-Analysen Anwendung, um Bereiche mit krankheitsauslösenden genetischen Faktoren zu lokalisieren [2;70-73].

Es ist schwierig, einem funktionellen SNP eine pathogenetische Rolle zuzuordnen, ihm muss erst ein funktioneller Einfluss auf Proteinebene

nachgewiesen werden. Oft liegt die Schwierigkeit darin, dass nicht synonyme kodierende SNPs fälschlicherweise als einziger beeinflussender Faktor in Bezug auf multigenetische Erkrankungen angesehen werden, gerade dann, wenn sie die strukturelle Eigenschaft des Proteins verändern. Es bedarf jedoch eines Nachweises sowohl *in vitro* als auch *in vivo* [74].

Funktionelle SNPs können sich zudem auch in regulatorischen nicht kodierenden Regionen wie z.B. Promotoren, Introns und Transkriptionsfaktorbindungsstellen befinden, in denen sie zu keinem Aminosäureaustausch führen, aber die Transkription, das Splicing und Transskriptstabilität beeinflussen. Auch sie können Auswirkungen auf den Phänotyp haben, jedoch sind diese Effekte schwierig nachzuweisen und bedürfen ausgiebiger Forschung [75].

Das enorme Interesse an SNPs aufgrund ihrer Bedeutung für die Medizin und Pharmakologie machte auch die Entwicklung neuer Technologien, um sie zu detektieren, notwendig [76;77]. Die Bedürfnisse der Forschung sind dabei fast so individuell wie das Genom an sich. Für die Analyse einzelner oder weniger funktioneller SNPs in Kandidatengenomen bedarf es flexibler Assays, die speziell für die einzelnen Varianten entworfen werden und sowohl in kleinen Kohorten als auch als Hochdurchsatz („high-throughput“) Verfahren bei großen Kohorten durchzuführen sind. Diese werden besonders bei Assoziations- bzw. Fall-Kontroll Studien durchgeführt. Bei Linkage-, aber auch Assoziationsstudien, bietet sich ein Ganz-Genom-Scan („whole genome scan“) an. Dabei werden momentan bis zu 1 Million SNPs gleichzeitig bestimmt. Es geht primär nicht darum, funktionelle SNPs zu entdecken, sondern um SNPs als genetische Marker, die Assoziationen zwischen einem Bereich des Erbguts mit einem krankheitserzeugenden funktionellen SNP oder einer Mutation anzeigen. In dieser Region findet anschließend ein Finemapping statt, um die krankheitsverursachende Variante genau zu bestimmen.

### 1.2.2 Short Tandem Repeats

Short tandem Repeat (STR)-Loci, auch Mikrosatelliten genannt, sind kurze repetitive Sequenzen (50-300 bp), die aus unterschiedlich häufigen Wiederholungen eines immer wiederkehrenden Sequenzmotivs bestehen, welches häufig als  $(CA)_n$ -Repeat, aber auch als repetitive Sequenz aus bis zu sechs Basenpaaren vorliegt [78-85]. Sie machen mehr als 1% der DNA aus, wobei ihre Verteilung über das gesamte Genom reicht, in dem sie ca. alle 20 kb als Di-, Tri-, Tetra- oder Pentanukleotidrepeats auftreten [86;87]. STR-Sequenzen sind sowohl in extragenetischen als auch genetischen Regionen zu finden, innerhalb derer sie in Introns, flankierenden Sequenzen und in kodierenden Abschnitten auftreten.

Ein Großteil der STR-Loci weisen Polymorphismen in der Anzahl ihrer Repeats auf, was sie als genetische Marker prädestiniert [88;89]. Der Grund für das hohe Auftreten von Polymorphismen ist darin zu finden, dass durch die Lage der STR-DNA in nicht-kodierenden Bereichen kein funktionelles Genprodukt resultiert und somit die Selektion hier nicht im gleichen Maß ansetzen kann. Sie wirken sich höchstens auf strukturelle Eigenschaften des Genoms aus [90]. Trinukleotid-Repeats sind jedoch in kodierenden Bereichen für genetische Erkrankungen verantwortlich [91-94]. Aufgrund ihrer Variabilität sind die Marker sehr informativ für eine Vielzahl von Anwendungsbereichen, exemplarisch seien die abstammungsgenetische Begutachtung und die forensische Medizin genannt [88;95-97].

Dabei ist es wichtig, Kenntnis von der genauen Sequenz der STR-Loci zu haben, da die Repeatstrukturen der STR-Allele in unterschiedlicher Weise variieren können. Es kommt dabei zu Differenzen in der Länge der Repeateinheit, in der Anzahl von Repeateinheiten und zu Unterschieden im Repeatmuster einzelner Allele [94;98-100]. *Simple* Repeats weisen Einheiten gleicher Länge und Sequenz auf, *compound* Repeats sind gekennzeichnet durch einen oder mehrere zusammengesetzte *simple* Repeats und *complex* Repeats bestehen aus unterschiedlichen Blöcken variabler Länge, die zusätzlich noch von mehr oder weniger variablen Sequenzen unterbrochen werden können [95;101].

Durch locuspezifische Primer können STR-Marker leicht mittels PCR amplifiziert werden, wobei, wenn sich die Zahl der Repeats in einem Locus in den zwei Allelen unterscheidet, zwei Amplikons unterschiedlicher Größe entstehen [102;103]. Diese können schlussendlich auf verschiedene Art und Weise detektiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden dazu zum einen die klassische Polyacrylamidgelelektrophorese als auch die hochauflösende Kapillarelektrophorese verwendet. Es werden dazu, abhängig von der Art der Detektionsmethode, unmodifizierte bzw. mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte Primer verwendet. Entsprechende Ausführungen zu diesen Methoden finden sich unter 2.2.12.

### **1.3 Aufgabenstellung**

Die grundlegende Hypothese dieser Arbeit beruht auf der Annahme, dass in Plasma- bzw. Serumproben genomische DNA vorhanden ist. Im Rahmen der vorliegenden Studie sollte diese in einer Serie von Plasmaproben, die zwischen 1990 und 1992 gesammelt wurden, extrahiert, nachgewiesen und quantifiziert werden. Darüber hinaus sollte diese DNA mittels WGA vervielfacht und in ausreichender Menge für weitere Applikationen verfügbar gemacht werden.

Weiterhin sollte anhand einer Genotypisierung von 25 SNPs und 9 hochpolymorphen STRs eine qualitative Aussage über die neu generierte DNA gemacht werden. Dazu wurden die von der WGA-Plasma-DNA erhaltenen Genotypisierungsergebnisse mit den Genotypen einer jeweils korrespondierenden, aus Vollblut extrahierten, DNA-Probe derselben Person verglichen. Die Vollblut-DNA repräsentierte in diesem Fall den „Gold-Standard“. Die 25 SNPs wurden mittels MALDI-TOF MS-Analyse (Matrixassisted Laser Desorption/Ionisation (MALDI); Time Of Flight (TOF); Massenspektrometrie (MS)) spezifischer Primer- Extensionsprodukte bzw. TaqMan Real-Time PCR genotypisiert und die 9 hochpolymorphen STRs mittels hochauflösender Kapillarelektrophorese und PAGE-Gel Analyse untersucht.

Nach einer dementsprechenden Charakterisierung der WGA-Plasma-DNA sollte im Falle von Diskordanzen zwischen den beiden unterschiedlich gewonnenen DNAs derselben Person ein Algorithmus entwickelt werden, anhand dessen Proben mit diskordanten und somit fehlerhaften Genotypen sicher ausgeschlossen werden können. Somit könnte das Ziel, bei fehlenden Vergleichsmöglichkeiten zwischen Plasma-DNA und Vollblut-DNA, Studien, in denen nur Plasmaproben vorhanden sind, für genetische Untersuchungen verfügbar zu machen, erreicht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Arbeitsgeräte

- DNA-Extraktion:
  - GenoM-48 Robotic Workstation (Genovision, West Chester, USA)
  
- Eismaschine:
  - AF-100 AS (Scotsman, Mailand, Italien)
  - AF- 30 (Scotsman, Mailand, Italien)
  
- Elektrophoresekammer  
Agarosegele:
  - Apollo, Horizontal Electrophoresis Gel Box (CLP Ltd, Northampton, GB)
  - Horizon 11.14 Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus (Whatman International Ltd, Kent, GB)
  - Sunrise Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus(GibcoBRL, Life Technologies, Karlsruhe, D)
  
- Elektrophoresekammer  
PAGE-Gele:
  - SE 600 Cooled Vertical Electrophoresis Unit (Hoefer Inc., San Francisco, USA)
  
- Gel-  
Dokumentationssystem:
  - E.A.S.Y 439K Standard CCD Kamera (Herolab, Wiesloch, D)
  - UV Transilluminator 2UV (Herolab, Wiesloch, D) UVT40 M Transilluminator (Herolab, Wiesloch, D)



## 2. Material und Methoden

---

- Kühlzentrifugen:
  - J2-HC Centrifuge (Beckman Coulter, Fullerton, USA)
  - Centrifuge 5804 / 5804 R (Eppendorf AG, Hamburg, D)
- Massenspektrometer:
  - MassARRAY (SEQUENOM GmbH, Hamburg, D)
- Mikrowelle:
  - Miele, D
  - Siemens, D
- PCR-Geräte:
  - T1 (Biometra GmbH, Göttingen, D)
  - TGradient (Biometra GmbH, Göttingen, D)
  - Hybaid PCR Cycler (Thermo Electron Corp, Waltham, USA)
  - PCR PTC 225 Tetrad, Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Boston, USA)
  - PCR PTC 200 Tetrad, Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Boston, USA)
- Magnetrührer:
  - IkaMag RCT (IKA, Staufen, D)
- PH-Meter:
  - Φ10 pH Meter (Beckman Coulter, Fullerton, USA)
- Photometer:
  - NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA)
- Pipetten:
  - Kappa
  - Gilson
  - Eppendorf
  - EDP-Plus Electronic Pipettes (Mettler-Toledo, Greifensee, CH)

## 2. Material und Methoden

---

- Pipettierroboter:
  - Freedom Evo (Tecan AG, Crailsheim, D)
  - Temo (Tecan AG, Crailsheim, D)
  - Genesis RSP 150 Work Station (Tecan AG, Crailsheim, D)
  - Multimek 96 Automated 96-Channel Pipettor (Beckman Coulter, Fullerton USA)
  - Biomek 2000 (Beckman Coulter, Fullerton, USA)
  
- Power Supply:
  - EPS600/ EPS3500 Electrophoresis Power Supply (GE Healthcare, München, D)
  - Bio-Rad Power Pac 300/3000 (Bio-Rad, München, D)
  - Consort E455 Power supply (CONSORT, Turnhout, B)
  
- Real-Time PCR Gerät:
  - ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems, Weiterstadt, D)
  - ABI Prism 7000 (Applied Biosystems, Weiterstadt, D)
  
- Spotter:
  - SpectroPoint Nanoliter Pipetting System (SEQUENOM GmbH, Hamburg, D)
  
- Sequenzierer:
  - Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Weiterstadt, D)
  
- Tischzentrifugen:
  - Iec Micromax Zentrifuge (Thermo Electron Corp, Waltham, USA)
  - Biofuge pico (Haereus, Osterode, D)
  - Centrifuge 5417R (Eppendorf AG, Hamburg, D)

## 2. Material und Methoden

---

- Thermomixer:
  - Thermomixer 5436 (Eppendorf AG, Hamburg, D)
  - Thermomixer Comfort (Eppendorf AG, Hamburg, D)
- Umlaufkühlung:
  - MultiTemp III Thermostatic Circulator (GE Healthcare, Buckinghamshire, GB)
- Vortex:
  - MS1 Minishaker (IKA, Staufen, D)
- Waage:
  - Mettler Model PM480 Deltarange (Mettler-Toledo, Greifensee, CH)
- Wasserbad:
  - Julabo SW - 20C – Schüttelwasserbad (Julabo, Seelbach, D)

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

- Safe-lock Reaktionsgefäße 0,5 und 1,5 ml Eppendorf
- THERMO-FAST 96-well Platten ABgene
- THERMO-FAST detection 96-well Platten ABgene
- 384-well PCR Microplates AxyGen
- MultiScreen-HV Plate Millipore
- Adhesive PCR Film ABgene
- Micro tubes 1.5 ml Sarstedt
- Pipettenspitzen 10µl, 20µl, 200µl, 1000µl CLP Ltd
- Pipettenspitzen 20µl mit Filter Eppendorf
- Pipet Tips, 20µl, Tecan Robotic Tips CLP Ltd
- BD Falcon Conical Centrifuge Tubes 15/50ml BDBioscience

### 2.1.3 Chemikalien

Die folgenden Chemikalien und Enzyme wurden in Analysequalität und höchstem Reinheitsgrad verwendet:

- 2-Propanol Merck
- Acrylamid 4K - Lösung (40 %) AppliChem GmbH
- Ammoniumchlorid Merck
- Ammonium Persulfat (APS) GE Healthcare
- Aqua bidestillata Mayerhofer
- Borsäure Merck
- Dodecylsulfat Natriumsalz Merck
- Ethanol 100% Merck
- Ethidiumbromid (0,625mg/ml) CLP Ltd
- Kaliumhydrogencarbonat Merck
- Natriumchlorid Merck
- Proteinase K Merck
- Pronase Roche
- SeaKem LE Agarose Biozym
- Sephadex G50 GE Healthcare
- TEMED (Tetramethylethyldiamin) AppliChem GmbH
- Titriplex III Merck
- Tris ultrapure AppliChem GmbH
- Tris HCL Merck

### 2.1.4 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit demineralisiertem Wasser zubereitet und falls nötig anschließend autoklaviert.

#### 2.1.4.1 Lösungen für die Vollblut-DNA Extraktion

- RBC-Lysis Puffer:
  - 155 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$
  - 20 mM  $\text{KHCO}_3$
  - 0,1 mM  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$

pH mit HCL/NaOH auf 7,4 einstellen; Autoklavieren mit anschließender pH Kontrolle und gegebenenfalls Korrektur

- SE-Puffer nach Maniatis:
  - 75 mM NaCl
  - 225 mM  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$

pH mit HCl/NaOH auf 8,0 einstellen

- TE- Puffer :
  - 1mM EDTA
  - 10mM Tris-HCL

- Proteinase K/Pronase Lösung: 20mg/ml
- SDS Lösung: 20%
- gesättigte NaCl Lösung: ca. 6 M

#### 2.1.4.2 PCR-Reagenzien

- 10x PCR Puffer (Tris-Cl, KCl,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 15 mM  $\text{MgCl}_2$ ; (pH 8,7)) (Qiagen, Hilden, D)
- 25 mM  $\text{MgCl}_2$  (Qiagen, Hilden, D)
- 5x Q-Solution (Qiagen, Hilden, D)
- dNTP-Mix (Sigma-Aldrich, Wien, A)

### 2.1.4.3 Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese

- SeaKem LE Agarose
- Loading DYE Solution
- Ethidiumbromid (0,625mg/ml)
- 1x TBE Laufpuffer: Dieser wurde hergestellt aus 1 zu 10 verdünntem 10 x TBE Puffer (pH=8,3): Tris 0,89 M, Borsäure 0,89 M, EDTA (0,25 M)
- GeneRuler 50 bp (Fermentas, St. Leon-Rot, D)

### 2.1.4.4 Lösungen für die PAGE Gelelektrophorese

- Acrylamid Stocklösung 4K 40% Acrylamid
- Aqua bd.
- 10x TBE Puffer (s.o.)
- 0,5x TBE Laufpuffer
- 10% APS
- TEMED
- Loading DYE Solution
- Anschließendes Anfärben in ca 0,5 l mit 120 µl Ethidiumbromid (0,625 mg/ml) versetztem deionisiertem Wasser

### 2.1.4.5 Reagenzien für die STR-Analyse mittels Kapillarelektrophorese

- POP-7 Polymer für 3130/3130xl Genetic Analyzers
- Hi-Di Formamide
- GeneScan-400HD [ROX]

### 2.1.4.6 Reagenzien, Lösungen und Puffer für MALDI-TOF

- hME MassEXTEND Nucleotide Tri-Mix Pack (SEQUENOM, Hamburg, D)
- 3-Punkt Kalibrant (SEQUENOM, Hamburg, D)
- hME Puffer (SEQUENOM, Hamburg, D)
- Spectro CLEAN (SEQUENOM, Hamburg, D)

### 2.1.4.7 Reagenzien für die Real-Time PCR

- TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Weiterstadt, D)
- Assay-by-Design (Applied Biosystems, Weiterstadt, D)
- T<sub>10</sub>E<sub>0,1</sub> Puffer (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,1 mM Na<sub>2</sub>EDTA)

### 2.1.5 Reaktionskits

#### 2.1.5.1 DNA-Isolation aus Plasma

- MagAttract DNA Blood Midi M96 Kit (Qiagen, Hilden, D)

#### 2.1.5.2 Whole Genome Amplification

- GenomiPhi DNA Amplification Kit (GE Healthcare, München, D)

#### 2.1.5.3 DNA Konzentrationsbestimmung mittels Real-Time PCR

- Quantifiler Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt, D)

### 2.1.6 Enzyme

#### 2.1.6.1 Polymerasen

- FirePol Taq DNA Polymerase (Solis Biodyne, Tartu, EST)
- Taq DNA Polymerase (Qiagen, Hilden, D)
- HotStar Taq DNA Polymerase (Qiagen, Hilden, D)
- Thermosequenase (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D)

#### 2.1.6.2 Sonstige Enzyme

- Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D)

### 2.1.7 Oligonukleotide

Sämtliche Primer für die WGA-Kontroll-PCR, die STR-Analyse und die Genotypisierung mit Hilfe von Maldi-TOF MS wurden von der Firma Metabion (Martinsried, D) synthetisiert. Für die Real-Time PCR fanden verschiedene Assays der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt, D) Verwendung. Die Sequenzen sind in den folgenden Abschnitten ersichtlich, die jeweiligen PCR-Bedingungen werden in den entsprechenden Kapiteln im Methodenteil abgehandelt.

#### 2.1.7.1 Primer für die Kontroll-PCR

Folgender Primer wurden für die Kontroll-PCR nach der WGA verwendet:

Marker		Primer	Allelgröße (bp)	Repeat Typ
D17S2224	1st	5'-GTGTCTTGTTCATTCTATCGTCTCAAA-3'	179-207	Tetra
	2nd	5'-AAGGCTACCATAAATCTTGT-3'		

**Tabelle 1:** WGA Kontroll-PCR Primer

#### 2.1.7.2 Primer für die STR-Analyse

Folgende Primer wurden zur Untersuchung der Mikrosatelliten verwendet:

Marker		Primer	Allelgröße (bp)	Repeat Typ
D1S495	1st	5'-FAM-ACCAAACCTTTGCAGAGGA-3'	138-164	Di
	2nd	5'-AACCCCTGGTATGCCATCA-3'		
D2S1338	1st	5'-FAM-CCAGTGGATTTGGAAACAGA-3'	165-205	Tetra
	2nd	5'-ACCTAGCATGGTACCTGCAG-3'		
D3S1314	1st	5'-HEX-AACTTACACATTTGGCCCTG-3'	144-170	Di
	2nd	5'-TCAATCTGTGGAGTCATTGG-3'		
D5S2498	1st	5'-FAM-AATGCTATGCTGTGTTAAGACA-3'	167-195	Tetra
	2nd	5'-AAAACGCAGATCTGCAAGAC-3'		
D8S1130	1st	5'-FAM-GAAGATTTGGCTCTGTTGGA-3'	132-156	Tetra
	2nd	5'-TGTCTTACTGCTATAGCTTTCATAA-3'		
D11S1983	1st	5'-HEX-ATTCTGTGTCTAAAAACAGAAAAGA-3'	208-255	Tetra
	2nd	5'-TTACCAGGAAAGAGGGAAT-3'		
D12S2078	1st	5'-FAM-ATTTACGTAAGTGGCAAGC-3'	251-287	Tetra
	2nd	5'-AAGGTCAGAATCCCTCATCC-3'		
D19S1167	1st	5'-FAM-CTGAGGGAACAGCAAGGTAA-3'	340-376	Tetra
	2nd	5'-AGAGCAAGACTCTGACTCTATAAAT-3'		
D20S481	1st	5'-FAM-TGGGTTATGAGTGACACACAG-3'	217-253	Tetra
	2nd	5'-AACAGCAAAAAGACACACAGC-3'		

**Tabelle 2:** Primer für die STR-Marker Analyse.



## 2. Material und Methoden

### 2.1.7.3 Primer für die MALDI-TOF Massenspektrometrie

Locus	rs ID	1st Primer	2nd Primer	Extension Primer	Stop Mix	Amplicon (bp)
<b>6-plex</b>						
2q37.3	<b>rs7607759</b>	ACGTTGGATGTGTCTTCTTGGCAGCGCCAT	ACGTTGGATGAAGAACCCCGTAGCTGCACG	CAGTGGCCAAGAACACC	ACT	120
2q37.3	<b>rs3792267</b>	ACGTTGGATGTTTCTGTGTGTGGCAGAGG	ACGTTGGATGAAGTCAAGGCTTAGCCTCAC	TTGCTGTGAAGTAAGGC	ACT	103
19q13.3	<b>rs13181</b>	ACGTTGGATGCACCAGGAACCGTTTATGGC	ACGTTGGATGAGCAGCTAGAATCAGAGGAG	CAATCTGCTCTATCCTCT	ACT	113
3q27	<b>rs2241766</b>	ACGTTGGATGAGTGCACATGTGGATTCCAG	ACGTTGGATGCCTTGAGTCGTGGTTTCTCG	CTGCTATTAGCTCTGCCCGG	ACT	119
17q12	<b>rs4252596</b>	ACGTTGGATGTTTCCCACCACATCCTCTAG	ACGTTGGATGATTCCAGAAGATATGCCCGG	TGTGTTGTGTTTACCTTGTG	ACT	119
19q13.3	<b>rs10250</b>	ACGTTGGATGACTCACAGCCATGTAGGAGC	ACGTTGGATGGATCAAGCTGTGTGACTTCG	GAAGGAGTTGGCCATGGAGTC	ACT	111
<b>6-plex</b>						
2q37.3	<b>rs2975762</b>	ACGTTGGATGTTGTTCTCAAGGGTGGTGTC	ACGTTGGATGTAGTGGAAAGGACTGGTCAG	GTTTGTGACCTTCCCCT	ACT	118
3q27	<b>rs1063539</b>	ACGTTGGATGGGCAGGGTTATTCCTTTGTG	ACGTTGGATGTTTCTCTCAGGCCTCTTTTGG	GGAACCAGAGGCACAGAGA	ACT	91
17q25.1	<b>rs8079197</b>	ACGTTGGATGAACAGGAGCAGGAAAAACCC	ACGTTGGATGTTTGGCAGCATTCTGTTTCC	CCACATTGCATTCTGGTCT	ACT	115
11p15.5	<b>rs2227994</b>	ACGTTGGATGATAGTGGGGTCGTATTCTGTC	ACGTTGGATGATATAAGCTGGTGGTGGTG	GGGGTCGTATTCTGCCACAAA	ACT	119
3q27	<b>rs822394</b>	ACGTTGGATGACTAATAGGTGCGATCAGCC	ACGTTGGATGAACTTCTGAGGCTCCTGTG	GAGGTGCCAAAAATACAAGAGTG	ACT	117
12q24.12	<b>rs11114071</b>	ACGTTGGATGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAG	ACGTTGGATGTGTTTCTGGGTGAAAACCC	GTTAGGTTCTGGCTTCA	ACT	119
<b>6-plex</b>						
13q33.2	<b>rs778285</b>	ACGTTGGATGGAATTGAAATGGCTGCTCTG	ACGTTGGATGTCTGCCTACCACATTGCATC	TGGCTGCTCTGACACAC	ACT	84
17q12	<b>rs1058808</b>	ACGTTGGATGAAAACGTCTTTGACGACCCC	ACGTTGGATGACCTGCTGGTGCCACTCTG	TGGGGAGAGAGTCTTGG	ACT	92
3q27	<b>rs17366743</b>	ACGTTGGATGGTAAGTCTCCAATCCCACAC	ACGTTGGATGAATCCAAGGCAGGAAAGGAG	CACTGAATGCTGAGCGGT	ACT	99
13q33.2	<b>k.a. #</b>	ACGTTGGATGCAGTCATCCATGCATGGAAG	ACGTTGGATGGATGTTTCTTCTATGCCTGG	GGCACAGACTGGCCCTTACC	ACT	97
13q33.2	<b>rs778331</b>	ACGTTGGATGAGGGTTGCCCTTGTAGCAAAGC	ACGTTGGATGAAAACAGCTGTGGCTGCATC	AAAATAGTCACAGGTGACAGC	ACT	110
13q33.2	<b>rs812382</b>	ACGTTGGATGAACAAGTGTGGATGGTGATG	ACGTTGGATGGCATTATCTGTAATCACTCC	AGATGATTTTGCTTATATGCTGAG	ACT	108
<b>4-plex</b>						
2q37.3	<b>rs2975766</b>	ACGTTGGATGGCCCCCATCTGTCTTTGCA	ACGTTGGATGGGCCACCCTGTTAGGTTTTC	TGTCTTTGCAGGTCTCC	ACT	81
2q37.3	<b>rs5030952</b>	ACGTTGGATGTTAGGAAGCTTCTGAGCCTG	ACGTTGGATGTTCACTCGGTGAGGCCCTA	ACAGACGCGGCCACCCCTC	ACT	118
3q27	<b>rs2036373</b>	ACGTTGGATGGATGGCTCAGGCAAACAAG	ACGTTGGATGAAGCAGACAACGAGAGACAC	AGGGCCAGGGGATATGT	ACT	87
3q27	<b>rs3774261</b>	ACGTTGGATGGTCAAACCTGAATGTGAACAAG	ACGTTGGATGCATTCTTCATCAGGTCCACG	AAGTATGGAGCATAGAGAAAAT	ACT	97

#Genaue Position: 13 dna: chromosome:NCBI36:13:104982394 (26-APR-2007)

**Tabelle 3:** Primer für die MALDI-TOF MS Analyse.

2.1.7.4 Primer für die Real-Time PCR

Gen	rs ID	1st Primer	2nd Primer	Sonde
<b>Apo-A-IV</b>	<b>rs675</b>	5'-GGCAGCTCAGCTCTCCAAA-3'	5'-CAGCACCTTCAAGGAGAAAGAGA-3'	5'-VIC-CAGGACAAG <u>A</u> CTCTCT-3' 5'-FAM-CAGGACAAG <u>T</u> CTCTCT-3'
<b>CD14</b>	<b>rs2569190</b>	5'-CTAGATGCCCTGCAGAATCCTT-3'	5'-CCCTTCCTTTCCTGGAAATATTGCA-3'	5'-VIC-CCTGTTACGG <u>T</u> CCCCCT-3' 5'-FAM-CTGTTACGG <u>C</u> CCCCCT-3'
<b>Cox2</b>	<b>rs20417</b>	5'-TGCTTAGGACCAGTATTATGAGGAGAA-3'	5'-CCCCCTCCTTGTTCCTTGAA-3'	5'-VIC-CCTTTCC <u>C</u> CCCTCTCT-3' 5'-FAM-CTTTCC <u>C</u> CCTCTCT-3'
<b>CAPN1</b>	<b>rs7607759</b>	k.A. <sup>†</sup>	k.A. <sup>†</sup>	5'-VIC-AGAACACC <u>A</u> CCCCCGG-3' 5'-FAM-AGAACACC <u>G</u> CCCCCGG-3'
<b>GRB2</b>	<b>rs8079197</b>	k.A. <sup>†</sup>	k.A. <sup>†</sup>	5'-VIC-CCTGGTCT <u>C</u> TGACTGG-3' 5'-FAM-CCTGGTCT <u>G</u> TGACTGG-3'

<sup>†</sup> k.A. = seitens des Herstellers gab es keine Angaben zur entsprechenden Sequenz

**Tabelle 4:** Primer für die Real-Time PCR SNP-Analyse. Die fett markierten und unterstrichenen Basen in der Spalte der Sonden kennzeichnen die Position des SNP

### 2.1.8 Software

#### 2.1.8.1 Datenbanken aus dem Internet

- National Center for Biotechnology <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Ensemble <http://www.ensembl.org/>
- The GDB Human Genome Database <http://www.gdb.org/>
- Cooperative Human Linkage Center <http://gai.nci.nih.gov/CHLC/>

#### 2.1.8.2 Oligonucleotide und PCR Bedingungen

- Vector NTI advance 9/10 <http://www.invitrogen.com>
- SpectroDesigner 2.1 SEQUENOM, Hamburg, D
- Assays by Design FILE BUILDER V2.0 <http://www.appliedbiosystems.com>

#### 2.1.8.3 GenoM48 Robotic Workstation

- QIAsoft M Operating System Genovision, West Chester, USA

#### 2.1.8.4 Pipettierroboter

- Bioworks Beckmann Coulter, Fullerton, USA
- Gemini 3.2 (Visual Basic Programme) Tecan AG, Crailsheim, D
- Freedom Evoware V. 1.0 Tecan AG, Crailsheim, D

#### 2.1.8.5 Genetic Analyzer

- 3130XL Data Collection Software V.3.0 <http://www.appliedbiosystems.com>
- Gene Mapper Software V.3.7 <http://www.appliedbiosystems.com>

### 2.1.8.6 Maldi-TOF MS

- SpectroTyper RT SEQUENOM, Hamburg, D
- Genotype Analyser Version 2.0.0.5 SEQUENOM, Hamburg, D
- SpectroREADER SEQUENOM, Hamburg, D
- Pintool Software SEQUENOM, Hamburg, D, RoboDesign USA
- SpectroACQUIRE 3.3.13 SEQUENOM, Hamburg, D
- MassARRAY AssayDesign 2.0 SEQUENOM, Hamburg, D
- SpectroDesigner 2.1 SEQUENOM, Hamburg, D

### 2.1.8.7 Real-Time PCR

- SNPbrowser V3.0 <http://www.appliedbiosystems.com>
- Assays by Design FILE BUILDER V2.0 <http://www.appliedbiosystems.com>
- ABI Prism 7000 SDS Software <http://www.appliedbiosystems.com>
- ABI Prism 7900HT SDS Software V2.1 <http://www.appliedbiosystems.com>

### 2.1.8.8 Statistikprogramme

- DeFinetti <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>
- Arlequin Software V.3.0 <http://lgb.unige.ch/arlequin/software/>
- SPSS 12.0 Chicago, IL

### **2.2 Methoden**

#### **2.2.1 Probenmaterial**

Die Plasma- und Vollblutproben stammten von 88 Hämodialyse- bzw. CAPD (continuous ambulatory peritoneal dialysis)- Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz aus einer großen österreichischen Multizenter Studie [104;105]. Die Plasmaproben wurden zwischen 1990 und 1992 abgenommen, aliquotiert und in 0,5 ml Probenröhrchen bei -80°C gelagert. Zur gleichen Zeit wurde ein Teil der Vollblutproben in 9 ml EDTA Monovetten abgenommen und bei -20°C gelagert. Ein anderer Teil der Vollblutproben wurde, bei noch lebenden Patienten, erneut abgenommen und bis zum Transport ins Labor auf Eis inkubiert bzw. eingefroren und im gefrorenen Zustand nach Innsbruck überführt. Von jedem Patienten wurde jeweils eine Plasmaprobe und eine Vollblutprobe verwendet und das so entstandene Pärchen in der gleichen Versuchsanordnung untersucht.

Die 88 Probenpärchen wurden in zwei verschiedene Gruppen aufgeteilt, wobei 41 in einem Evaluierungs-Probenset und die restlichen 47 in einem Validierungs-Probenset zusammengefasst wurden.

#### **2.2.2 Isolierung menschlicher genomischer DNA aus Vollblut**

Die seit teilweise über 10 Jahren bei -20°C in EDTA-haltigen Monovetten gelagerten Proben wurden unter Schwenken im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, bis nur noch ein winziger Eisrest zu sehen war. Die genomische DNA wurde anschließend nach der von Bettecken modifizierten „Aussalzmethode“ nach Miller et al. [106] isoliert.

Dazu wurden 5-10 ml Vollblut in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt, die Monovette mit eiskaltem RBC-Lysis-Puffer nachgespült und anschließend das Volumen mit demselben Puffer auf 40 ml aufgefüllt. Es folgte eine 15-minütige Inkubation auf Eis, wobei die Proben wiederholt kräftig geschüttelt wurden. Nach 10 min. Zentrifugation bei 4°C mit 2500 rpm wurde der Überstand dekantiert, das verbleibende Pellet in 10 ml RBC-Lysis-Puffer resuspendiert und nochmals

bei 4°C mit 2500 rpm 10 min. zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, bis das Pellet nahezu weiß war. Der Überstand wurde abermals verworfen und das Pellet zur Leukolyse nach Zugabe von 5 ml SE-Puffer, 125 µl Proteinase K bzw. Pronase (20mg/ml) und 250 µl SDS 20% vollständig resuspendiert und anschließend für mindestens 36 Std. bei 55°C inkubiert. Nachfolgend wurden 3 ml saturierte NaCl-Lösung zugegeben, mit der Probe gemischt und nach nochmaliger Inkubation bei 55°C für mindestens 10 min. wurde das Reaktionsgefäß für exakt 25 sec. auf höchster Stufe gevortext. Die ausgefallenen Proteinbestandteile wurden 15 min. mit 3500 rpm bei 40°C abzentrifugiert und, nachdem der DNA-haltige Überstand schaumfrei in ein neues Falcon-Röhrchen überführt wurde, verworfen. Die DNA in der verbleibenden Probe wurde nach Zugabe von zwei Volumina eiskaltem 100% Isopropanol (2-Propanol) und 50-fachem behutsamen Invertieren gefällt und verblieb nach 5 min. Zentrifugation mit 4500 rpm bei 4°C als Pellet, welches nach Dekantieren des Überstandes für 3 min. getrocknet wurde.

Anschließend wurde die DNA mit 10 ml eiskaltem 70% Ethanol gemischt und nochmals mit 4500 rpm bei 4°C für 5 min. abzentrifugiert. Der Überstand wurde abermals verworfen und das Pellet für mindestens 30 min. luftgetrocknet, bevor es je nach Größe in 0,8-1,2 ml TE-Puffer gelöst wurde.

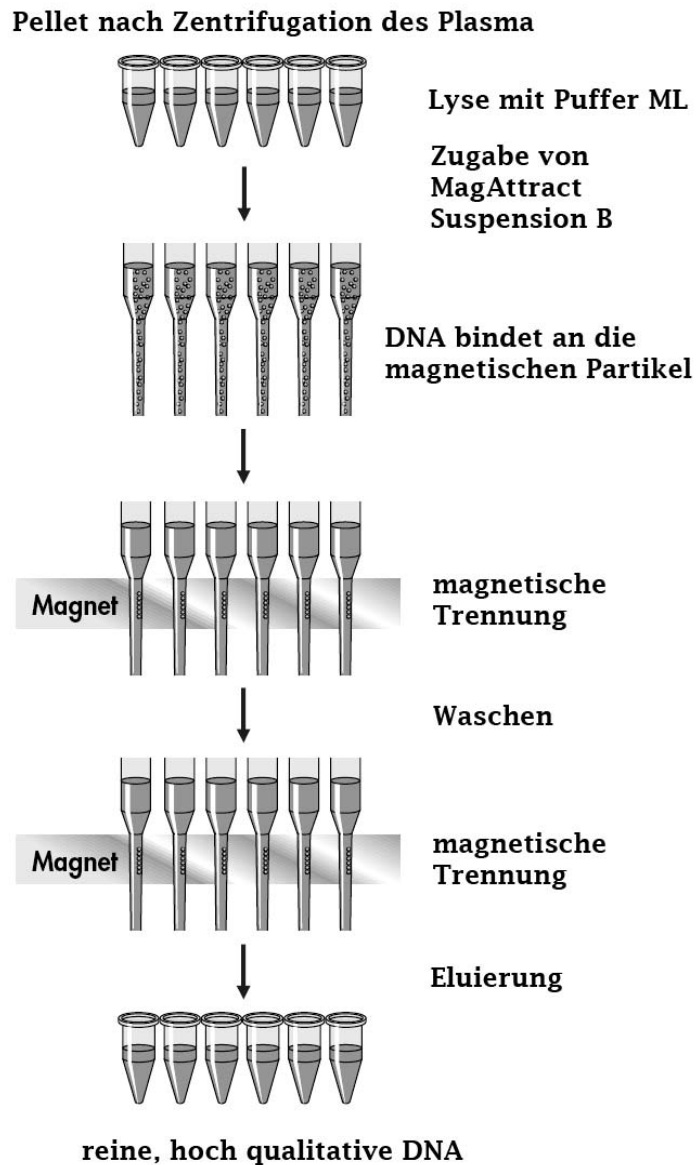
### **2.2.3 Isolierung genomischer DNA aus Plasma**

Die bei -70°C in 0,5 ml Röhrchen gelagerten Plasmaproben wurden über Nacht bei 4°C auf Eis lagernd aufgetaut. 200-300 µl jeder Probe wurden gevortext, in ein neues 1,5 ml Probenröhrchen überführt, anschließend bei 13000 rpm abzentrifugiert und das entstandene Pellet, nachdem der Überstand verworfen wurde, zur automatischen DNA-Extraktion in die GenoM-48 Robotic Workstation gegeben.

Die genomische DNA aus Plasma wurde mit Hilfe der GenoM-48 Robotic Workstation und dem MagAttract DNA Blood Midi M48 Kit (Qiagen, Hilden, D) extrahiert. Das Prinzip dieser DNA-Isolierung beruht darauf, dass nach der Lyse der vorhandenen Zellen durch Puffer ML die DNA in Gegenwart einer

## 2. Material und Methoden

chaotropen Lösung an die Silicatoberfläche von magnetischen Partikeln bindet. Die so gebundene DNA wird anschließend mit zwei Puffern (MW1 und MW2) gewaschen und mit destilliertem Wasser gespült, in 50 µl TE-Puffer eluiert und kann nachfolgend direkt in die WGA Reaktion eingesetzt werden (Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der DNA Extraktion und Aufreinigung von Plasma-DNA. Modifiziert nach [107].

### **2.2.4 Whole Genome Amplification mittels Phi29 Polymerase**

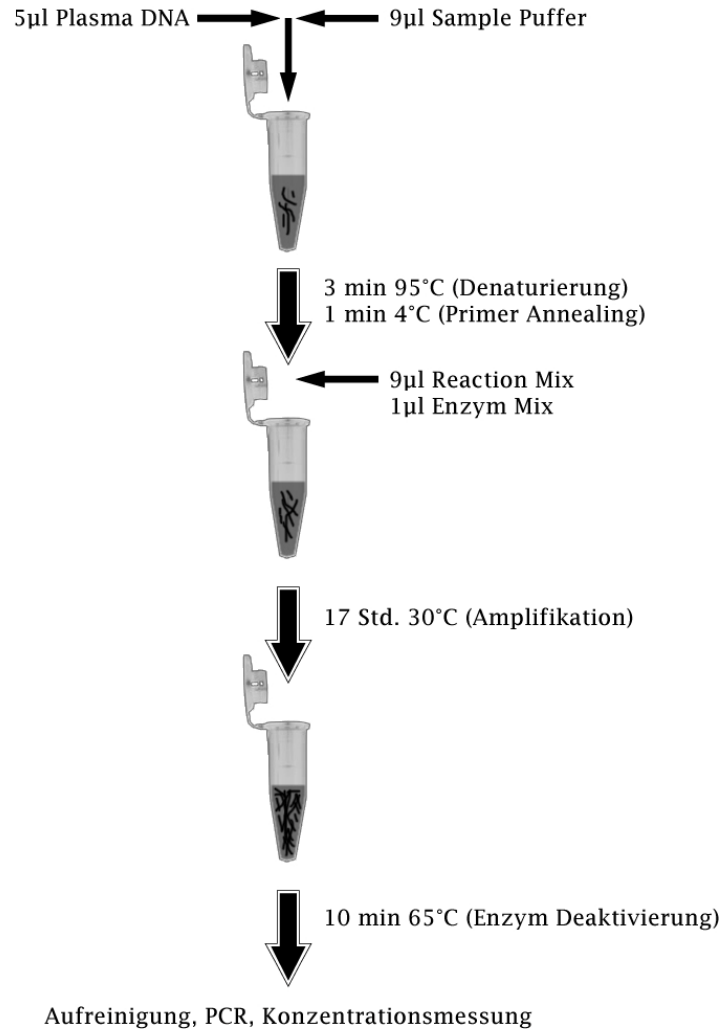
Unter Verwendung der WGA ist es möglich aus wenigen Nano- bzw. Picogramm DNA mehrere Mikrogramm DNA zu generieren. Dazu wurde der GenomiPhi DNA Amplification Kit (GE Healthcare, München, D) verwendet. Als Template DNA wurden 5 µl der mittels Genovision extrahierten Plasma-DNA verwendet. Diese wurden zu 9 µl vorgelegtem Sample Puffer pipettiert, das Gemisch für 3 min. bei 95°C inkubiert und anschließend 1 min. auf Eis gestellt. Nach Hinzufügen von 10 µl vorbereitetem Mastermix, bestehend aus 9 µl Reaction Puffer und 1 µl Enzym Mix, folgte eine Inkubation bei 30°C für 17 Std. im Thermozykler. Zur Inaktivierung der Polymerase erfolgte ein finaler Schritt bei 65°C für 10 min. Anschließend wurden die Proben bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C bzw., bei zeitlich größerem Abstand zwischen WGA Reaktion und Weiterverarbeitung, bei -20°C gelagert.

Um jegliche Kontamination zu vermeiden wurden alle Schritte mit Filterpipettenspitzen und autoklavierten Reaktionsgefäßen durchgeführt. Zusätzlich liefen bei allen Versuchen mindestens 2 Leerwerte, bei denen anstatt 5 µl DNA 5µl steriles Wasser in die Reaktion eingesetzt wurden, mit.



## 2. Material und Methoden

---



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der Whole Genome Amplifikation

### 2.2.5 Aufreinigung der WGA Produkte

Die sich anschließende Aufreinigung der WGA-Produkte erfolgte mit Hilfe von Sephadex G50 Säulen, die in Multiscreen-HV Platten der Firma Millipore (München, D) geladen wurden. Dazu wurden 45  $\mu$ g Sephadex G50 mittels des Millipore Column Loaders in jedes Well eingebracht, mit 300  $\mu$ l Abd. aufgefüllt und zum Quellen für mindestens 3 Std. bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend folgten eine Zentrifugation bei 2900 rpm und 2 Waschschrirte mit jeweils 150  $\mu$ l Abd.

20 µl Probe wurden in jedes Well pipettiert und mit 20 µl TE Puffer nachgespült, bevor sich eine nochmalige Zentrifugation bei 2900 rpm anschloss. Die gereinigte Probe wurde dabei in 96-well Mikrotiterplatten aufgefangen.

### **2.2.6 Photometrische DNA-Konzentrationsmessung**

Die exakte Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren ist für die Durchführung der meisten molekularbiologischen Analysen unabdingbar. Bei der Konzentrationsmessung macht man sich die Absorptionseigenschaft der DNA für UV-Licht zunutze. DNA absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 260 nm, so dass die gemessene optische Dichte bei dieser Wellenlänge nach dem Lambert-Beer-Gesetz zur Konzentrationsbestimmung herangezogen werden kann. Bei einer Extinktion von 1 hat doppelsträngige DNA eine Konzentration von 50 ng/µl. Zusätzlich wird die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen, um eventuell verunreinigende Proteine festzustellen, da bei dieser Wellenlänge die Seitenketten aromatischer Aminosäuren Licht absorbieren. Anhand des Quotienten aus OD 260 nm und OD 280 nm erhält man ein Maß für die Reinheit der DNA. Der Wert sollte bei einer sauberen DNA Probe zwischen 1,9 und 2 liegen.

Die Messungen wurden mit dem NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) durchgeführt.

### **2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Durch den Einsatz der PCR [108] ist es möglich, bestimmte Nukleinsäureabschnitte der DNA in millionenfacher Kopienzahl zu generieren. Dabei handelt es sich um einen zyklischen Prozess, bestehend aus einer Denaturierung, einem Anlagern der Primer (Annealing) und der eigentlichen DNA-Neusynthese, der Extensionsreaktion, welche durch die Taq-Polymerase vermittelt wird, einer ursprünglich aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* stammenden Polymerase.

Für diese Reaktion werden zwei verschiedene, ca. 15-25 bp lange Oligonukleotide, so genannte Primer, eingesetzt, deren Sequenz so gewählt ist, dass sich der „Sense“-Primer, dessen Sequenz komplementär zum Gegenstrang ist, als auch der „Antisense“-Primer, dessen Sequenz komplementär zum Sinnstrang ist, an einen bestimmten DNA Bereich anlagern und damit ein definiertes, zu amplifizierendes DNA-Fragment begrenzen. Die so ausgewählten Oligonukleotide werden auch als antiparallele Primer bezeichnet. Zunächst wird ein Mastermix angesetzt, der zumeist aus Puffer,  $MgCl_2$ , den Primern, dNTP's,  $H_2O$  sowie der Taq-Polymerase besteht und zusammen mit der DNA in ein Reaktionsgefäß gegeben wird, welches danach im Thermozykler folgende Schritte durchläuft:

Bei der zuerst stattfindenden Denaturierung bei  $95^\circ C$  kommt es zu einer Trennung der doppelsträngigen DNA in zwei einzelne Stränge. Anschließend wird das Reaktionsgemisch, je nach PCR unterschiedlich, auf  $50-70^\circ C$  abgekühlt. Es kommt daraufhin zum Annealing (Anlagern) der Primer an den komplementären Strang. Die Oligonukleotide stellen ihr freies 3'-OH Ende für die anschließende DNA-Neusynthese zur Verfügung, welche bei  $72^\circ C$  stattfindet und durch die Taq-Polymerase, die ihr Temperaturoptimum in diesem Bereich hat, katalysiert wird. Dieser Teil des Zyklus wird Extension genannt. Der zwischen den Oligonukleotiden liegende Bereich der DNA kann nun unter Verwendung von dNTP's vervielfältigt werden.

Die gesamte Amplifikationsreaktion besteht aus ca. 30-40 Zyklen mit den Teilreaktionen Denaturierung, Annealing und Extension. Die genauen Angaben zur Zusammensetzung des Mastermix und der Temperaturbereiche bzw. der Dauer der einzelnen Teilreaktionen finden sich in den entsprechenden Kapiteln.

### **2.2.8 Kontroll-PCR nach Whole Genome Amplification**

Nach jeder Whole Genome Amplification wurde eine Kontroll-PCR durchgeführt, einerseits um zu kontrollieren, ob und in welchem Ausmaß eine Amplifikation stattgefunden hat, andererseits, um eine Kontamination auszuschließen. Dazu wurde immer mindestens ein Leerwert durch den ganzen Prozess mitgeführt,

## 2. Material und Methoden

---

bei dem reines Wasser anstatt DNA in die Reaktionen eingesetzt wurde. Bei dieser Kontroll-PCR musste bei den WGA-Plasma-DNA-Proben als erstes Qualitätskriterium eine ausreichende Amplifikation stattgefunden haben, um sie in der Studie weiterhin einzuschließen, da sich zeigte, dass diejenigen Proben, bei denen dies nicht der Fall war, zu vermehrten Diskordanzen bei der Genotypisierung neigten. Die Menge der Amplifikation wurde anhand des verwendeten Längenstandards abgemessen und es wurde als unterster Wert 10 ng/ $\mu$ l PCR-Produkt festgelegt.

Die Kontroll PCR wurde mit folgendem Mastermix angesetzt:

Reagenzien	Volumen für Single-Reaktion
Q-Solution	5 $\mu$ l
10X Puffer	2,5 $\mu$ l
dNTP Mix (25x)	1 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	2,5 $\mu$ l
Primer Forw (100pmol)	0,25 $\mu$ l
Primer Rev (100pmol)	0,25 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	12,275 $\mu$ l
Taq (5U)	0,125 $\mu$ l
Template DNA	1 $\mu$ l

**Tabelle 5:** Mastermix für die Kontroll-PCR

Das Thermocycling wurde mit dem Hybaid PCR Cycler (Thermo Electron Corp, Waltham, USA) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

## 2. Material und Methoden

Temperatur	Zeit		Zyklenanzahl
96°C	5 min	Denaturierung	1 Zyklus
95°C	1 min	Denaturierung	} 3 Zyklen
65°C	1 min	Annealing	
72°C	1 min	Extension	
95°C	1 min	Denaturierung	} 5 Zyklen
60°C	1 min	Annealing	
72°C	1 min	Extension	
95°C	1 min	Denaturierung	} 25 Zyklen
55°C	1 min	Annealing	
72°C	1,5 min	Extension	
72°C	10 min	Extension	1 Zyklus
4°C	Unendlich		

**Tabelle 6:** Temperaturbedingungen für die Kontroll-PCR

### 2.2.9 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung einer erfolgreichen Amplifikation der PCR-Produkte wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierzu wurde je nach Größe der DNA-Fragmente ein 1,5-3 prozentiges (d.h. entsprechend 1,5-3 g LE Agarose) 100 ml 1xTBE-Gel gegossen, welches mit Ethidiumbromid (ca. 0,4 µg/ml Gel) versetzt wurde, um die DNA-Fragmente unter UV-Licht-Beleuchtung sichtbar zu machen. Nach dem Auftragen von ca. 10 µl Probe, bestehend aus 8 µl PCR-Produkt und 2 µl Loading-DYE, erfolgte die elektrophoretische Auftrennung bei einer Spannung von 100 V über eine Stunde in 1xTBE Laufpuffer. Anschließend wurde das Gel auf einem UV-Licht-Transilluminator bei 312 nm zur Dokumentation fotografiert.

### 2.2.10 Genotypisierung mittels Maldi-TOF MS

Mit diesem Verfahren wurden die Proben auf das Vorhandensein verschiedener SNPs untersucht. Mit Hilfe des Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight (Maldi-TOF) Verfahren ist es möglich, SNPs in der DNA sehr präzise, schnell und kostengünstig zu untersuchen. Es besteht die Möglichkeit, die Genotypen der SNPs in einem Multiplexverfahren zu bestimmen, d.h. in einem Lauf können bis zu 12 Genotypen einer Probe gleichzeitig untersucht werden [109;110]. Dadurch hat sich diese von Hillenkamp und Karas [111;112] sowie Tanaka [113] eingeführte Methode gerade in Hochdurchsatzlaboratorien etabliert.

Allgemein beruht die matrixunterstützte Laser Desorption/Ionisation (MALDI) auf dem Prinzip, dass die zu analysierende Probe mit einer im Überschuss vorhandenen Matrix co-kristallisiert und anschließend im Hochvakuum mit einem kurzen, im Nanosekundenbereich liegenden, starkem Laserimpuls „beschossen“ wird [111;114]. Dabei kommt der Matrix, welche in der DNA-Analytik aufgrund ihrer hervorragenden Ergebnisse aus 3-Hydroxypicolinsäure (3-HPA) [115-118], einer organischen Säure, besteht, eine wichtige Rolle zu, indem sie die eingestrahlte Laserenergie absorbiert und aufgrund ihres Überschusses die Analyt-Moleküle vor Zersetzung schützt. Sie wird selber elektronisch angeregt und kann den Analyt-Molekülen die zur Desorption notwendige Energie liefern. Zudem unterstützt bzw. induziert sie in einer Elektronen-Transferreaktion mit einem Matrix-Molekül-Radikal-Kation die Ionisation des Analyten und unterbindet Wechselwirkungen der Analyt-Moleküle untereinander und zwischen Analyt und Probenträger [119].

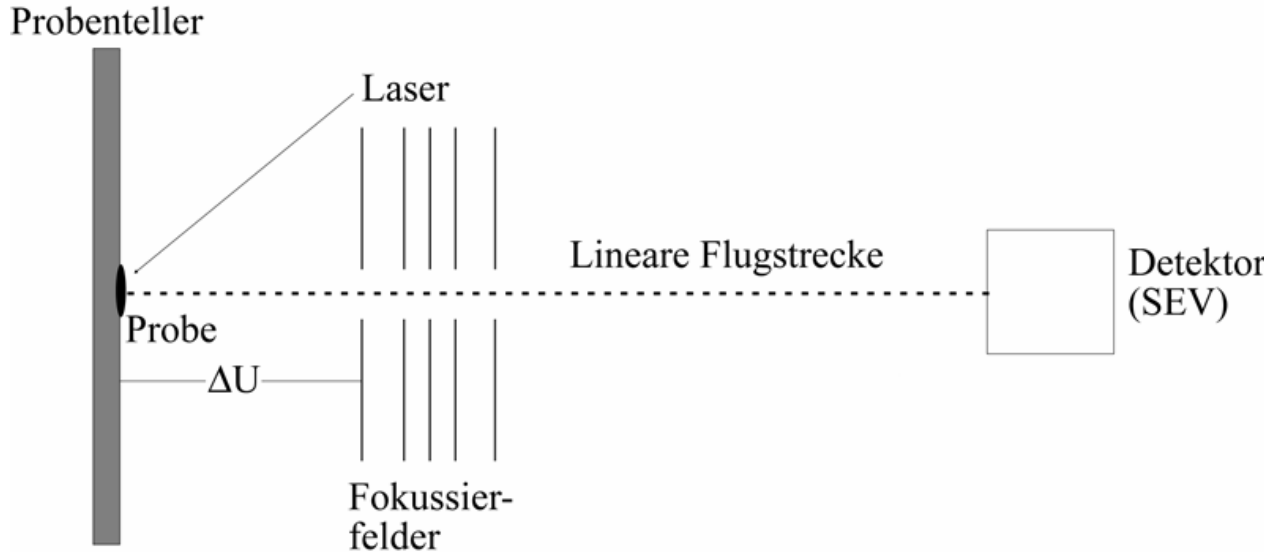
Es wird angenommen, dass es durch den Laserimpuls zu einem Energietransfer auf die in der Matrix liegenden Analyt-Moleküle kommt, sich diese dadurch explosionsartig zusammen mit Matrixmolekülen aus dem Festkörperverband lösen und dabei einfach geladene Molekülionen bilden, welche in eine Gasphase übertreten [119]. Diese gelangen nach Verlassen der Ionenquelle und Beschleunigung in einem elektrischen Feld auf dasselbe Potential in das Flugrohr, welches eine feldfreie Driftstrecke bildet und in dem die Auftrennung

abhängig von ihrem Masse/Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) stattfindet, bevor sie schließlich am Detektor nachgewiesen werden. Ionen mit niedrigen  $m/z$  Werten wandern dabei schneller als diejenigen mit hohen  $m/z$  Werten durch das Flugrohr und werden dementsprechend früher am Detektor erfasst. Dazu ist es nötig, dass der Flugzeitmassenspektrometer (Time-Of-Flight = TOF-Analysator) die elektronische Messung vom Start der Ionen in der Quelle bis zum Eintreffen am Detektor sehr präzise ausführen muss [120].

Mit dem MalDI-TOF Massenspektrometer steht ein Gerät zur Verfügung, mit dem DNA-Fragmente in einem Bereich von 3-30 bp (entsprechend ca. 1000-9000 Daltons) mit einer Genauigkeit von 99,9% bis 99,99% bestimmt werden können und somit eine SNP-Analyse mittels Primer-Extensionsprodukten ermöglicht [109;120-123].

Als besonders effizient hat sich in diesem Zusammenhang die Primer-Extensions-Reaktion bewährt. Dazu werden zunächst Amplikons von ca. 100 bp Größe, die den zu untersuchenden SNP einschließen, mittels PCR generiert. Diese werden nachfolgend als Template für die Primer-Extensions-Reaktion verwendet, bei der durch Verlängerung von Primern allelspezifische Extensionsprodukte entstehen, die sich wiederum aufgrund ihres unterschiedlichen Gewichts massenspektrometrisch charakterisieren lassen.

In dieser Arbeit wurde die hME-Methode (homogenous-Mass-Extent) verwendet, welche im 384-Well-Format durchgeführt wurde [124-126]. Sie unterscheidet sich von der PROBE-Methode (Primer Oligo Base Extension Reaction) überwiegend in der Art der Durchführung der PCR und der Reinigung der Extensionsprodukte [116].



$\Delta U$ : Beschleunigungsspannung  
SEV: Sekundärelektronenvervielfacher

**Abbildung 5:** Schematischer Aufbau eines Maldi-TOF Massenspektrometers nach [120]

### 2.2.10.1 hME-(homogenous-Mass-Extent)-Methode

Wie bereits beschrieben wird zunächst der genomische Bereich um den SNP mittels PCR amplifiziert. Die dabei verwendeten sequenzspezifischen „Sense“- und „Antisense“-Primer besitzen an ihrem 5' Ende ein zusätzliches Motiv, bestehend aus 10 Basen (ACGTTGGATG), dem so genannten „TAG“. Dieses bewirkt zum einen, dass bei mehreren PCR-Reaktionen in einem Gefäß (Multiplexverfahren) die Amplifikation gleichmäßiger verläuft und zum anderen, da überschüssige, in der PCR nicht verbrauchte Primer nicht entfernt werden, dass die Masse der Primer im Vergleich zu den Primer-Extensionsprodukten erhöht wird, sie dadurch bei der Maldi-Analyse außerhalb des Massenbereichs der Primer-Extensionsprodukte liegen und somit auch nicht im eingestellten Massenfenster erscheinen (Abbildung 6, 1.).

An die PCR anschließend ist es notwendig, nicht eingebaute Desoxynukleotide mittels des Enzyms SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) abzubauen, da durch diese Nukleotide unspezifische Produkte entstehen können und sie Probleme bei der SNP-Detektion verursachen würden (Abbildung 6, 2.).



Im nächsten Schritt wird das PCR Produkt als Template für die Primer-Extensions-Reaktion verwendet, bei der nun die Extensions-Primer zum Einsatz kommen. Sie sind so ausgewählt, dass sie mit dem 3'-Ende direkt vor dem interessierenden SNP zu liegen kommen und werden dann durch das MassExtend Enzym, einer speziellen DNA-Polymerase (Thermosequenase), gemäß der Basenabfolge auf dem Matrizenstrang verlängert. Unter Verwendung von einer bestimmten Mischung aus Desoxy- und Di-Desoxynukleotiden entstehen je nach Zustand des zu detektierenden Allels unterschiedliche Primer-Extensionsprodukte. Diese liegen nach anschließender Denaturierung gelöst im Überstand vor (Abbildung 6, 3.).

Nukleinsäuren zeigen eine hohe Affinität zu Alkali- und Erdalkalitionen und bei dieser Kationenanlagerung, z.B. ubiquitärer  $\text{Na}^+$  oder  $\text{K}^+$  Ionen, wird die Maldi-Messung durch separat entstehende Signale, die den eigentlich zu messenden Molekülonen vor- bzw. nachgelagert sind, empfindlich gestört. Um dies zu unterbinden und eine so verursachte Reduktion des Signalrauschverhältnisses zu vermeiden ist eine dementsprechende Probenvorbereitung der allelspezifischen Primer-Extensionsprodukte unabdingbar [127].

Deshalb werden diese im Rahmen der hME-Methode über ein Ionenaustauschharz (Spectro CLEAN, SEQUENOM, Hamburg, D) aufgereinigt, welches die Verunreinigungen effizient entfernt. Bevor die Extensionsprodukte nun massenspektrometrisch analysiert werden, müssen sie dementsprechend mit einem Ionenaustauschharz behandelt und aufgereinigt werden (Abbildung 6, 3. und 4.) [110;122].

## 2. Material und Methoden

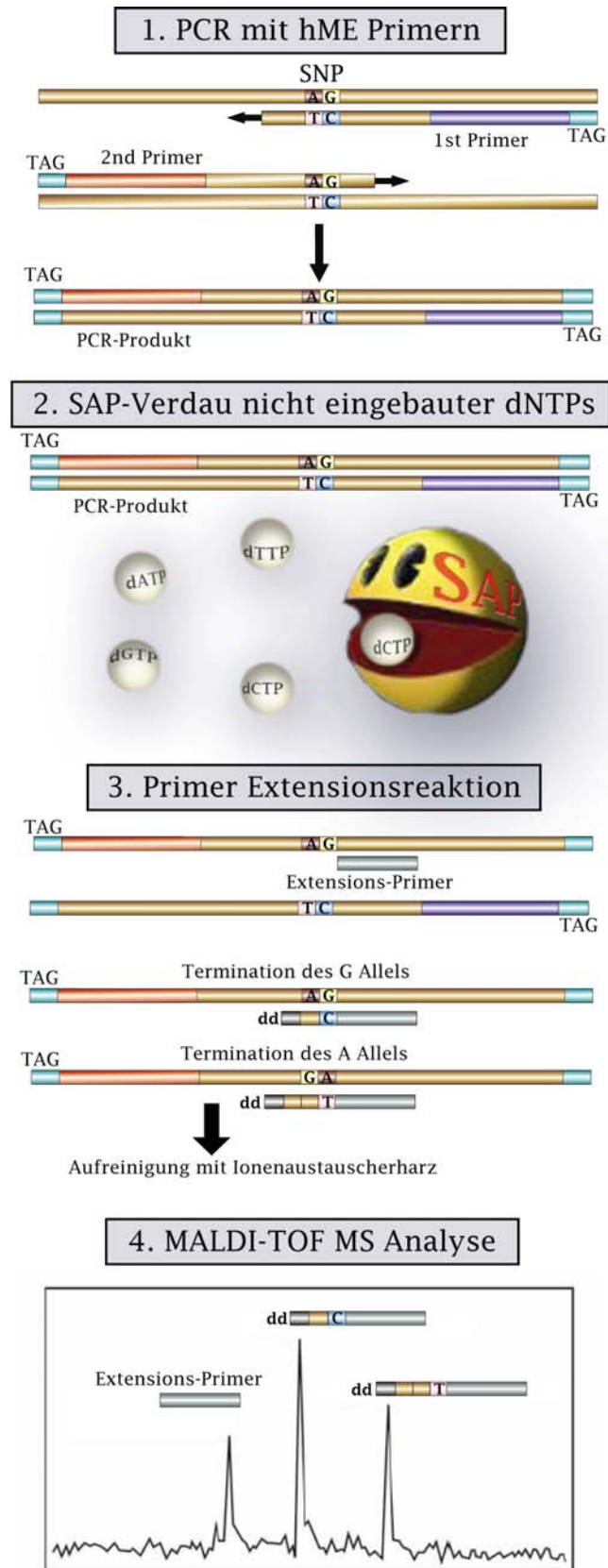


Abbildung 6: Schematischer Ablauf der hME-Methode

**2.2.10.2 PCR innerhalb der hME-Methode**

Alle PCR-Reaktionen, die im Rahmen der Genotypisierung mittels MALDI-TOF stattfanden, wurden in 384-well Mikrotiterplatten mit einem Reaktionsvolumen von 6 µl durchgeführt. Die DNA (ca. 5 ng) wurde am Tag zuvor mit Hilfe des Pipettierroboters Temo (Tecan AG, Crailsheim, D) aus 96-well Mikrotiterplatten in 384-well Mikrotiterplatten übertragen und über Nacht luftgetrocknet. Der im Folgenden beschriebene Mastermix wurde für 480 Proben angesetzt und durch die Pipettierstation Genesis RSP 150 Work Station (Tecan AG, Crailsheim, D) zu den einzelnen Wells hinzugefügt.

Reagenzien	Volumen für Single-Reaktion	Volumen für 384er-Platte
H <sub>2</sub> O	4,44 µl	
10x Puffer	0,6 µl	
dNTPs (2mM)	0,6 µl	
MgCl (25mM)	0,24 µl	
Primer forw (10pmol/µl)	0,01 µl	Je 4 verschiedene sense Primer
Primer rev(10pmol/µl)	0,01 µl	Je 4 verschiedene antisense Primer
HotStar Taq (5U/µl)	0,04 µl	
Gesamtvolumen	6 µl	

**Tabelle 7:** Mastermix für eine 4-plex PCR im 384-well Format

## 2. Material und Methoden

Reagenzien	Volumen für Single-Reaktion	Volumen für 384er-Platte
H <sub>2</sub> O	4,38 µl	
10x Puffer	0,6 µl	
dNTPs (2mM)	0,6 µl	
MgCl (25mM)	0,24 µl	
Primer forw (10pmol/µl)	0,01 µl	Je 6 verschiedene sense Primer
Primer rev (10pmol/µl)	0,01 µl	Je 6 verschiedene antisense Primer
HotStar Taq (5U/µl)	0,06 µl	
Gesamtvolumen	6 µl	

**Tabelle 8:** Mastermix für eine 6-plex PCR im 384-well Format

Das Thermocycling wurde mit dem PCR PTC 225 Tetrad, Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Boston, USA) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Temperatur	Zeit		Zyklusanzahl
95°C	15 min	Denaturierung	1 Zyklus
95°C	30 sec	Denaturierung	} 45 Zyklen
56°C	30 sec	Annealing	
72°C	1 min	Extension	
72°C	10 min	Extension	1 Zyklus
4°C	Unendlich		

**Tabelle 9:** Temperaturbedingungen für die PCR im Rahmen der hME-Methode

### 2.2.10.3 SAP-Verdau-Reaktion innerhalb der hME-Methode

Für den Abbau der aus der PCR-Reaktion übrig gebliebenen Desoxynukleotide wurden 2 µl SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) Enzym Solution mit Hilfe des Multimek 96 Automated 96-Channel Pipettor (Beckman Coulter, Fullerton USA) unter Verwendung von programmierten Standardabläufen zu jedem PCR Produkt in die 384-well Mikrotiterplatte hinzugefügt.

Folgender, vorher angesetzter Mastermix wurde verwendet:

## 2. Material und Methoden

---

Reagenzien	Volumen für Single-Reaktion	Volumen für 384er-Platte
H <sub>2</sub> O	1,53 µl	881,3 µl
hME-Puffer	0,17 µl	97,9 µl
Shrimp Alkaline Phosphatase	0,3 µl	172,8 µl
Total Volumen	2,0 µl	1152 µl

**Tabelle 10:** Mastermix für die SAP-Verdau-Reaktion im Rahmen der hME-Methode im 384-well Format

Das Thermocycling wurde mit dem PCR PTC 225 Tetrad, Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Boston, USA) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Temperatur	Zeit
37°C	20 min
85°C	10 min
20°C	1 sec

**Tabelle 11:** Temperaturprofil für die SAP-Verdau-Reaktion im Rahmen der hME-Methode

### 2.2.10.4 Primer-Extensions-Reaktion innerhalb der hME-Methode

Für die Primer-Extensions-Reaktion wurde folgender vorher angesetzte Mastermix mit Hilfe des Multimek 96 Automated 96-Channel Pipettor (Beckman Coulter, Fullerton USA) unter Verwendung von programmierten Standardabläufen in die einzelnen Wells pipettiert:

## 2. Material und Methoden

Reagenzien	Volumen für Single-Reaktion	Volumen für 384er-Platte	
		4-plex	6-plex
H <sub>2</sub> O	1,728 µl	829,84 µl	772,6 µl
hME Extend Mix Stop Mix ACT	0,2 µl	105,98 µl	105,98 µl
Extension Primer	0,054 µl	Je 28,62 µl	Je 28,62 µl
MassExtend Enzym (Thermosteasenase)	0,018 µl	9,54 µl	9,54 µl
Total Volumen	2 µl	1059,84 µl	

**Tabelle 12:** Mastermix für die Primer-Extensions-Reaktion innerhalb der hME-Methode im 384-well Format

Das Thermocycling wurde mit dem PCR PTC 225 Tetrad, Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Boston, USA) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Temperatur	Zeit		Zyklusanzahl
94°C	2 min	Denaturierung	1 Zyklus
94°C	5 sec	Denaturierung	} 55 Zyklen
52°C	5 sec	Annealing	
72°C	10 sec	Extension	
20°C	1 sec		

**Tabelle 13:** Temperaturprofil für die Primer-Extensions-Reaktion innerhalb der hME-Methode

### 2.2.10.5 Probenaufreinigung innerhalb der hME-Methode

Für die abschließende Aufreinigung der Proben wurden ca. 6 mg Ionenaustauschharz (Spectro CLEAN, SEQUENOM, Hamburg, D) zu jeder Probe gegeben. Nach einer Wasseraddition von 21 µl mittels des Multimek 96 Automated 96-Channel Pipettor (Beckman Coulter, Fullerton USA) unter

Verwendung von programmierten Standardabläufen wurde die Platte 10 min. im Rotator vorsichtig invertiert und anschließend abzentrifugiert.

### **2.2.10.6 Maldi-TOF Massenspektrometrie innerhalb der hME-Methode**

Nach erfolgter Probenaufbereitung wurden 1-2 nl des Probengemisches mit Hilfe des SpectroPoint Nanoliter Pipetting System der Fa. Sequenom (SEQUENOM GmbH, Hamburg, D) über Piezopipetten auf einen Siliziumchip (SpectroCHIP, SEQUENOM GmbH, Hamburg, D) transferiert. Der ca. die Größe einer 1-Euro-Münze aufweisende Chip ist mit 384 kristallinen Matrixspots (3-Hydroxypicolinsäure) für die Proben beladen und bietet mit zusätzlichen 10 Matrixspots Platz für einen Kalibranten. Dieser bestand aus einer Mischung von Oligonukleotiden bekannter Masse und diente der Kalibrierung des Analysesystems.

Nach Beladung des Chips wurde dieser auf einen metallischen Probenträger überführt und in die Vakuumschleuse des MassARRAY Massenspektrometers (SEQUENOM GmbH, Hamburg, D) eingeführt. Die Vermessung der Proben und deren Analyse sowie die Kalibrierung des Systems erfolgten automatisch nach Standardeinstellungen (Abbildung 6, 4.).

### **2.2.11 Genotypisierung mittels Real-Time PCR**

Die Real-Time PCR ist eine Technologie, die Anfang der 90er Jahre entwickelt wurde und seit einigen Jahren für den kommerziellen Markt verfügbar ist, wobei ihre Verbreitung in letzter Zeit enorm zugenommen hat, was sich an der steigenden Zahl der Veröffentlichungen ablesen lässt [128]. Sie basiert auf der Technik der klassischen PCR, jedoch ermöglicht sie durch Hinzufügen einer markierten Sonde die Detektion des amplifizierten Produkts vom Ansatz bis zur Auswertung in einem einzigen Reaktionsgefäß. Dadurch kann die PCR Reaktion „live“ beobachtet werden. Es entfallen zudem die Auswertung mittels eines Agarose Gels, was den Vorteil der Zeitersparnis, des verminderten

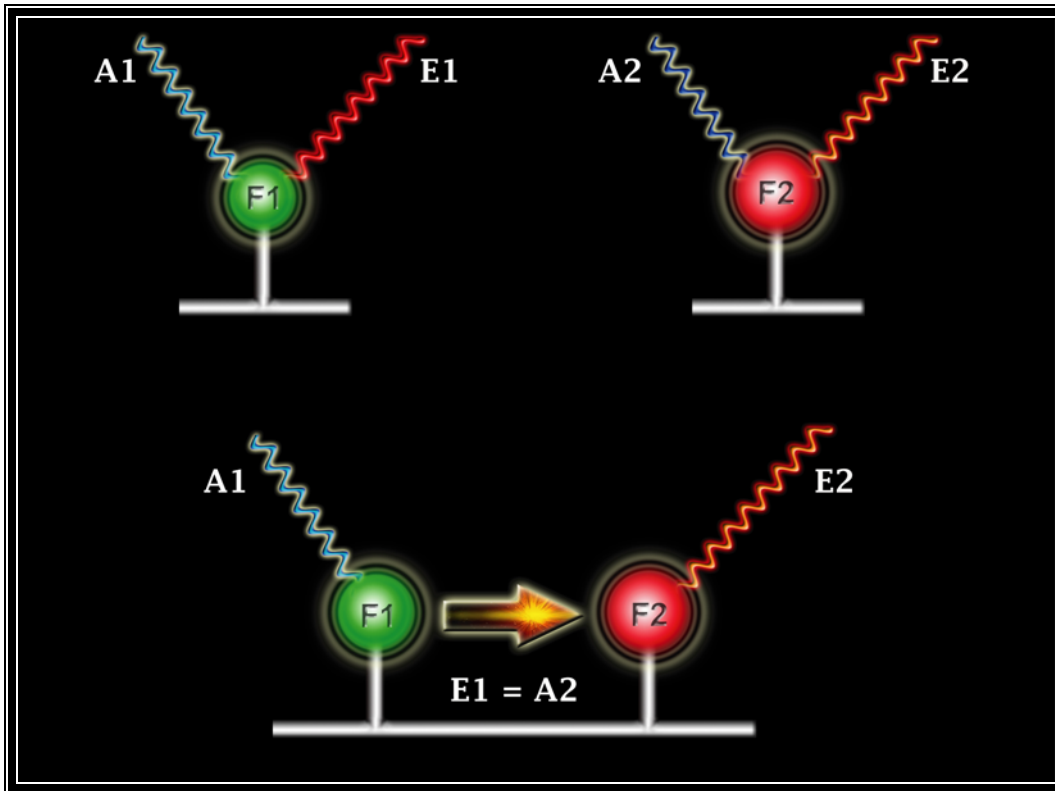
Kontaminationsrisikos und, in der heutigen Zeit sehr bedeutend, der geringeren Kosten mit sich bringt.

Die Erstbeschreibung des 5'-Nuclease Assays stammt aus dem Jahre 1991 [129], der sich dabei die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase zu Nutze machte, welche die hybridisierte Sonde enzymatisch spaltet und dadurch eine Aussage über die Menge der Amplifikate möglich machte. Damals waren die Sonden noch radioaktiv mit [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] markiert, was neben einem Gesundheitsrisiko auch ein aufwendiges Post-PCR-Processing zur Auswertung mittels Dünnschichtchromatographie nach sich zog. Kurz danach wurde die radioaktive Markierung durch Fluoreszenzfarbstoffe ersetzt [130], welche den Vorteil haben, dass sie ohne intensives Post-PCR-Processing direkt durch Messung der emittierten Fluoreszenz detektiert werden konnten. Dieses Prinzip hat sich bis heute gehalten und wird im Folgenden genauer erläutert.

### **2.2.11.1 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)**

Für das Prinzip der Real-Time PCR ist es wichtig, einen für sie entscheidenden Mechanismus, den Fluoreszenz- bzw. Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET), zu kennen. Fluorochrome F werden mittels Licht z.B. in Form eines Laserstrahls mit einer bestimmten, für jeden Farbstoff charakteristischen Wellenlänge A angeregt und strahlen die aufgenommene Energie in Form von Licht einer anderen, wiederum für jeden Farbstoff charakteristischen Wellenlänge E wieder ab. Liegen jedoch zwei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe (F1, F2) in geringem Abstand beieinander (10-100 Å bzw. 15-20 Basen) und das Anregungsspektrum A2 von F2 entspricht dem Emissionsspektrum E1 von F1, kommt es zu einem Energietransfer zwischen F1 und F2 [131], dem so genannten FRET [132] (Abbildung 7). Dabei wird die Energie von F1 direkt auf F2 übergeleitet, wobei Licht der Wellenlänge E2 entsteht, anstatt, dass Licht der Wellenlänge E1 emittiert wird. Somit kann durch Messung von E1 bzw. E2 eine Aussage über deren räumliche Beziehung getroffen werden [133].





**Abbildung 7:** Prinzip des *Fluoreszenz- Resonanz-Energie-Transfers* (FRET), modifiziert nach [134]. Das Fluorochrom F1 besitzt die Anregungswellenlänge A1 und die Emissionswellenlänge E1, hingegen hat das Fluorochrom F2 die Anregungswellenlänge A2 und die Emissionswellenlänge E2. Ist E1 nun gleich A2 und sind die Fluorochrome in räumlicher Nähe, so wird die von Fluorochrom F1 emittierte Energie E1 auf das Fluorochrom F2 übertragen, welches dann seinerseits diese als E2 emittiert.

### 2.2.11.2 Fluoreszenzfarbstoffe

In der Real-Time PCR wird F1 auch als Reporter und F2 als Quencher bezeichnet. Als Reporter stehen verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe zur Verfügung (Tabelle 14), jeder mit einem für ihn charakteristischen Absorptions- und Emissionswert. Dies ermöglicht es mittlerweile, Reaktionen im Multiplexverfahren durchzuführen, sprich mehrere PCRs in einer einzigen Reaktion.

## 2. Material und Methoden

---

Fluoreszenzfarbstoff	Absorption (nm)	Emission (nm)
FAM	492	515
TET	521	536
JOE	527	548
HEX	535	556
TAMRA	555	580
ROX	575	602
Cy3	552	565
Cy3.5	581	596
Cy5	651	674
Cy5.5	675	694
Cy7	743	767
R6G	518	543
Texas Red	583	603
VIC	528	546
Yakima Yellow	525	548
NED	546	575
Redmond Red	580	594

**Tabelle 14:** Darstellung der aktuellen Reporter Fluoreszenzfarbstoffe mit Angabe der jeweiligen Absorptions- und Emissionsspektren in nm.

Bei den Quenchern wurde zu Beginn dieser Technologie überwiegend TAMRA verwendet, welcher auch als Reporter eingesetzt werden kann. Zunehmend haben sich aber in den letzten Jahren so genannte non-fluorescent, black-hole oder dark Quencher durchgesetzt [135]. Dies führte zu einer Verringerung der Hintergrundfluoreszenz und damit zu einer Optimierung der Real-Time PCR, da diese Quencher selber kein Licht emittieren, sondern die übertragene Energie in Wärme umwandeln. Zudem wurden sie dahingehend optimiert, dass sie mit dem Emissionsspektrum des Reporters maximal überlappen.

Quencher	Absorption (nm)	Emission (nm)
TAMRA	555	580
DABSYL	466	N/A
DABCYL	453	N/A
ElleQuencher	600, 650	N/A
Eclipse Dark Quencher	522	N/A
Deep Dark Quencher I	410	N/A
Deep Dark Quencher II	630	N/A

**Tabelle 15:** Darstellung der aktuellen Quencher mit Angabe der jeweiligen Absorptions- und Emissionsspektren in nm. N/A bedeutet dabei, dass der Quencher Wärme anstatt Licht emittiert.

### 2.2.11.3 TaqMan-Assay

In dieser Arbeit wurden ausschließlich TaqMan-Assays der Firma Applied Biosystems verwendet. In diesen Assays werden forward- und reverse-Primer mit *double-dye*-Sonden (engl.: "probes") kombiniert, wobei die Sonden zwei Fluorochrome tragen, einen Reporterfarbstoff am 5'-Ende (FAM oder VIC) sowie einen non-fluorescent Quencher am 3'-Ende, welches zusätzlich noch mit einem Phosphatrest blockiert ist, damit die Sonde nicht als Primer dienen kann. Weiterhin trägt das 3'-Ende einen Minor Groove Binder (MGB), ein Indolderivat, welches die Sonde weiter optimiert. Dieses Molekül hat die Eigenschaft, sich nach exakter Bindung der Sonde wie ein Seitenarm in die Furchung der DNA zu legen und erhöht damit die Spezifität der Sonde, was gerade bei Punktmutationen sehr wichtig ist [136]. Zudem ist es möglich, die MGB-Sonden bei gleicher Annealingtemperatur kürzer zu designen [137;138]. Die Sequenz der Sonde muss wie die Primer speziell für jeden zu untersuchenden DNA Abschnitt gewählt werden, was den Assay doppelt spezifisch macht.

### 2.2.11.4 Prinzip

Die Real-Time PCR findet in dem ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System statt, welches ein klassisches PCR Gerät mit der Detektionseinheit im

384-well Format vereint. Die Anregung der Fluorochrome findet mittels eines Argon-Lasers statt, die Detektion wird über eine CCD-Kamera bewerkstelligt. Wie auch bei der PCR wird die Amplifikation durch zwei spezifisch bindende Primer initiiert, zudem hybridisiert die Sonde im Bereich zwischen den Primern auf der DNA. Der TaqMan-Assay macht sich dabei, basierend auf dem 5'-Nuclease Assay [129], die 5'-3'-Exonucleaseaktivität der AmpliTaq-DNA-Polymerase zu Nutze (Abbildung 8). Die Sonde wird nun mit einer Wellenlänge von 488 nm zur Fluoreszenz angeregt, da Reporter und Quencher aber noch in einer räumlichen Nähe liegen, kommt der FRET zum Tragen und das Signal des Reporters wird unterdrückt (Abbildung 8, 1.). Die Polymerase beginnt nun während der Extensionsphase, beginnend am 3'-Ende des Primers, einen neuen Strang zu bilden. Trifft sie auf das 5'-Ende der an die DNA gebundenen Sonde, beginnt sie die ersten Basen dieser zu verdrängen, wodurch eine Y-förmige Sekundärstruktur entsteht, womit wiederum die 5'-3'-Exonuclease-Aktivität der Taq-Polymerase aktiviert wird. Dadurch wird die Sonde in einzelne Basen oder kleine Fragmente geschnitten, was dazu führt, dass die räumliche Nähe des Reporters und Quenchers und damit auch der FRET unterbrochen wird (Abbildung 8, 2-4). Freie, nicht gebundene Sonde wird hingegen nicht hydrolysiert. Somit steigt das Fluoreszenzsignal der verschiedenen Reporter entsprechend der Akkumulation des PCR-Produkts mit jedem PCR-Zyklus an und wird Zyklus für Zyklus im geschlossenen Reaktionsgefäß mit Hilfe des Sequence-Detectors erfasst. Da nicht 100-prozentig gebundene Sonden noch vor Aktivierung der 5'-3'-Exonuclease-Aktivität der Taq-Polymerase verdrängt werden, ist das entstehende Signal strikt sequenzspezifisch.

## 2. Material und Methoden

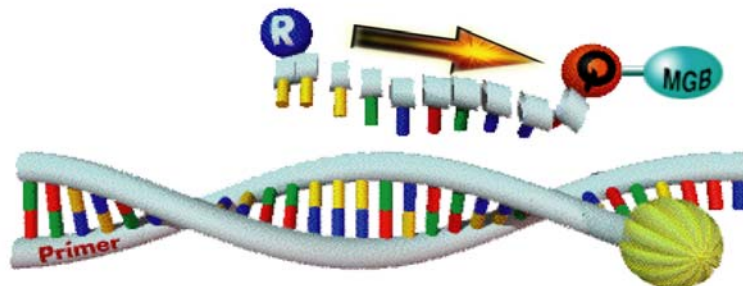
### 1. Sequenzspezifische Anlagerung der Sonde und der Primer



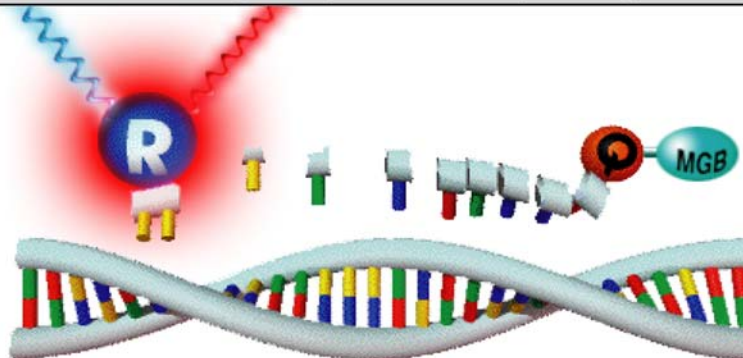
### 2. Primer-Extension und Sondenhydrolyse



### 3. Synthese des PCR Produkts, Trennung der Farbstoffe



### 4. Emittierung des spezifischen Reportersignals



**Abbildung 8:** Prinzip des TaqMan-Assays. Es ist der Einfluss der 5'-3'-Exonuklease Aktivität der DNA Polymerase auf eine Fluorogene Sonde während der Extensionsphase einer TaqMan PCR ersichtlich. Der Pfeil stellt den FRET vom Reporter auf den Quencher dar (2.2.11.1). R kennzeichnet den Reporter, Q den Quencher und MGB den Minor Groove Binder. Modifiziert nach [139].

### 2.2.11.5 Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit der SDS Software V2.1 von Applied Biosystems. Ihr liegt zugrunde, dass sich die gemessene emittierte Fluoreszenz linear proportional zum entstandenen PCR-Produkt verhält, womit sich über diese Verhältnismäßigkeit eine Aussage über die entstandene Menge machen lässt.

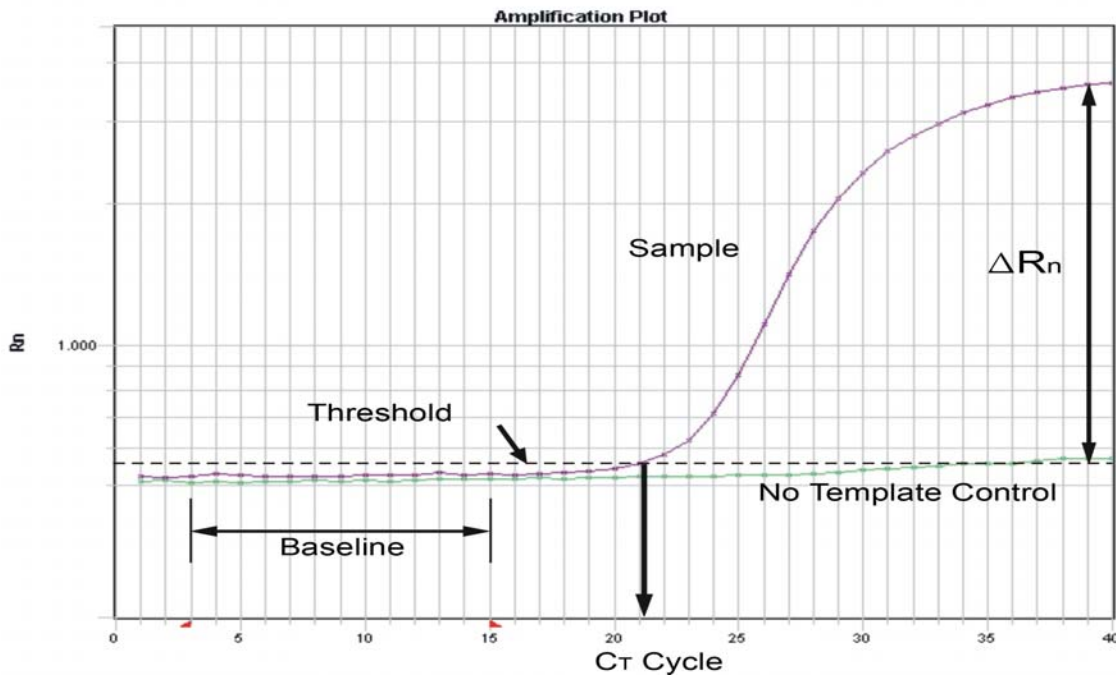
Es sind grundsätzlich zwei Auswertungen möglich. Zum Einen eine Endpunktmessung, welche bei der allelischen Diskriminierung angewendet wird und nur eine qualitative Aussage zulässt, ob es zu einem Anstieg der Fluoreszenz gekommen ist. Zum Anderen eine absolute Quantifizierung, bei der der Anstieg der Fluoreszenz in jedem Zyklus gemessen wird und so eine qualitative und quantitative Aussage über die Entwicklung des Anstiegs der Fluoreszenz während der PCR Reaktion möglich macht. Sie wird z.B. zur Konzentrationsmessung von DNA verwendet.

Von der Software wird anhand der gemessenen Daten eine Amplifikationsgrafik erstellt, welche die Basis der Auswertung darstellt. Dabei stellt die Abszisse die Anzahl der Zyklen und die Ordinate die gemessene Fluoreszenz dar (Abbildung 9). Um diese interpretieren zu können, ist wiederum die Kenntnis einiger verwendeter Begriffe von Nöten.

Jeder Fluoreszenzfarbstoff besitzt eine gewisse native Fluoreszenz  $R$ . Dieser Wert bedarf einer Normalisierung mittels eines Referenzfarbstoffs, um unspezifische Einflüsse wie unterschiedliche Volumina (Pipettierfehler) oder unterschiedliche Lichtemissionen durch das Reaktionsgefäßes auszugleichen. Bei den TaqMan-Assays wird als Referenzfarbstoff ROX verwendet, der in jedem Assay enthalten ist. Der Quotient aus Emissions-Intensität des Reporterfarbstoffs dividiert durch die Emissions-Intensität des Referenzfarbstoffs ergibt das normalisierte Reportersignal  $R_n$ .

Von diesem Wert wird zusätzlich noch der Wert der Basislinie abgezogen, die als der Bereich bezeichnet wird, in dem zu Beginn der Reaktion die Fluoreszenz unverändert bleibt und parallel zur X-Achse verläuft. Es findet zu diesem Zeitpunkt zwar schon eine Amplifikation statt, jedoch ist diese noch gering und bewirkt keine Zunahme der Fluoreszenz. Dieser Wert wird mit  $\Delta R_n$  bezeichnet.

Um die Hintergrundfluoreszenz von einer Amplifikation unterscheiden zu können, wird ein Schwellenwert (Threshold) definiert, bestehend aus der Standardabweichung der Hintergrundfluoreszenz, gemessen zwischen Zyklus 3 und 15, multipliziert mit dem Faktor 10. Basierend darauf lässt sich der Cycle-threshold ( $C_t$ ) bestimmen, welcher den Schnittpunkt von Fluoreszenz mit dem Schwellenwert angibt und den am niedrigsten messbaren Wert einer positiven Amplifikation markiert. Projiziert auf die Abszisse gibt der Wert die Anzahl der Zyklen wieder. Er stellt die Grundlage der Quantifizierung dar, d.h. ist dieser Wert hoch, steht eine geringe Ausgangsmenge DNA zur Verfügung, ist er niedrig, ist die eingesetzte DNA-Menge groß.



**Abbildung 9:** Darstellung einer Amplifikationsgrafik: Die gemessene Fluoreszenz (Ordinate) wird gegen die Zyklenzahl (Abszisse) aufgetragen. Dabei zeigt der Reaktionsansatz schon eine gewisse Grundfluoreszenz, bevor es zur Amplifikation gekommen ist. Aus der Standardabweichung der Fluoreszenz zwischen Zyklus 3 und 15 multipliziert mit dem Faktor zehn, wird ein Fluoreszenzwert errechnet, der zur Grundfluoreszenz der Proben addiert wird. So ergibt sich der Schwellenwert (*Threshold*). Der Schnittpunkt zwischen Amplifikationsgraph und Schwellenwert wird als *Cycle-threshold* ( $C_t$ ) bezeichnet. Er markiert einen Anstieg der Fluoreszenz über den Schwellenwert.

### **2.2.11.6 Absolute Quantifizierung mittels Human Quantifiler**

Der Human Quantifiler DNA Quantification Kit (HQ) wurde zur Bestimmung der DNA-Konzentration der Plasmaproben nach DNA-Extraktion mittels Genovision verwendet. Durch die sehr geringe Konzentration dieser Proben war es nicht möglich, diese photometrisch zu messen und die Messung mittels Real-Time PCR bietet eine elegante und sehr genaue Alternative. Der Kit kombiniert zwei 5'-Nuclease-Assays, einen humanen DNA-spezifischen Assay sowie eine interne PCR-Kontrolle (IPC). Erstgenannter besteht aus zwei spezifischen Primern und einer TaqMan-MGB-Sonde, welche für die Detektion mit FAM gelabelt ist und ist der eigentliche Assay zur Konzentrationsbestimmung. Mittels dieser Komponenten wird das Humane Telomerase reverse Transcriptase Gen (hTERT) auf Chromosom 5 im Bereich p15.33 amplifiziert, wobei ein Produkt mit 62 Basen entsteht. Um standardisierte DNA-Konzentrationsmessungen durchführen zu können, ist neben den eigentlichen Probenmessungen eine 8-Punkt-Eichgerade mit dem im Kit enthaltenen DNA-Standard zu bestimmen. Anhand der ermittelten Eichgerade wurde abschließend die Konzentration der genomischen DNA ermittelt.

Der IPC-Assay enthält eine IPC-template-DNA, eine künstlich hergestellte DNA-Sequenz, welche in dieser Form nicht in der Natur vorkommt. Darüber hinaus umfasst der Assay die entsprechenden Primer und eine VIC gelabelte TaqMan-MGB-Sonde, um diese künstliche DNA detektieren zu können.

Dies macht es möglich, fehlerhafte Resultate zu interpretieren. Kommt es zum Beispiel beim HQ zu keiner Amplifikation der genomischen DNA, jedoch bei der IPC, handelt es sich um ein wahres negatives Ergebnis. Zeigt hingegen die genomische DNA einen hohen Ct Wert und ein niedriges  $\Delta R_n$ , der IPC-Detektor jedoch keine Amplifikation, ist von einer Inhibierung der PCR auszugehen.

#### **2.2.11.6.1 Reaktionsansatz**

Zuerst wurde eine Verdünnungsreihe für 12 verschiedene Standardkonzentrationen durchgeführt, die sich in einem Bereich von 50 ng bis 1 pg befanden. Als Ausgangsmaterial wurde Quantifiler Human DNA Standard



## 2. Material und Methoden

---

mit einer Konzentration von 200 ng/μl verwendet, welches wiederum in einem T<sub>10</sub>E<sub>0,1</sub> Puffer, bestehend aus 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) und 0,1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, verdünnt wurde. Tabelle 16 zeigt das Verdünnungsschema und die genauen Konzentrationen.

Standard	Konzentration (ng/μl)	Eingesetzte Menge	Verdünnungsfaktor
Std.1	50,00	10 μL [200 ng/μL stock]+ 30 μL T <sub>10</sub> E <sub>0,1</sub> Puffer	4x
Std.2	16,7	10 μL [Std. 1] + 20 μL T <sub>10</sub> E <sub>0,1</sub> Puffer	3x
Std.3	5,56	10 μL [Std. 2] + 20 μL T <sub>10</sub> E <sub>0,1</sub> Puffer	3x
Std.4	1,85	10 μL [Std. 3] + 20 μL T <sub>10</sub> E <sub>0,1</sub> Puffer	3x
Std.5	0,62	10 μL [Std. 4] + 20 μL T <sub>10</sub> E <sub>0,1</sub> Puffer	3x
Std.6	0,21	10 μL [Std. 5] + 20 μL T <sub>10</sub> E <sub>0,1</sub> Puffer	3x
Std.7	0,068	10 μL [Std. 6] + 20 μL T <sub>10</sub> E <sub>0,1</sub> Puffer	3x
Std.8	0,023	10 μL [Std. 7] + 20 μL T <sub>10</sub> E <sub>0,1</sub> Puffer	3x
Std.9	0,0115	10 μL [Std. 8] + 10 μL T <sub>10</sub> E <sub>0,1</sub> Puffer	2x
Std.10	0,00575	10 μL [Std. 9] + 10 μL T <sub>10</sub> E <sub>0,1</sub> Puffer	2x
Std.11	0,0028	10 μL [Std. 10] + 10 μL T <sub>10</sub> E <sub>0,1</sub> Puffer	2x
Std.12	0,0014	10 μL [Std. 11] + 10 μL T <sub>10</sub> E <sub>0,1</sub> Puffer	2x

**Tabelle 16:** Verdünnungsschema für 12 verschiedene Standardkonzentrationen für die Erstellung einer Standardkurve im Rahmen der Konzentrationsmessung mittels Real time PCR

2 μl von jedem Standard wurden dreimal in eine 384-well Mikrotiterplatte übertragen. Ebenso wurde mit je zweimal 2 μl von den 88 Plasma-DNA Samples nach deren Extraktion mittels Genovision verfahren. Anschließend wurden sie bei Raumtemperatur eingetrocknet.

5 μl Mastermix wurden anschließend zu jeder Probe sowie in 4 Leerwerte pipettiert. Dieser setzte sich wie folgt zusammen:

## 2. Material und Methoden

Reagenzien	Volumen für Single-Reaktion	Volumen für 140 Reaktionen
H <sub>2</sub> O	2,5 µl	350 µl
Quantifiler PCR Reaction Mix	2,1 µl	294 µl
Quantifiler Human Primer Mix	0,4 µl	56 µl
Total Volumen	5,0 µl	700 µl

**Tabelle 17:** Mastermix für die absolute Quantifizierung mittels Real-Time PCR

Nach einer kurzen Zentrifugation bei 2900 rpm wurde die Platte in das ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System gegeben und die PCR unter folgenden Bedingungen durchgeführt.

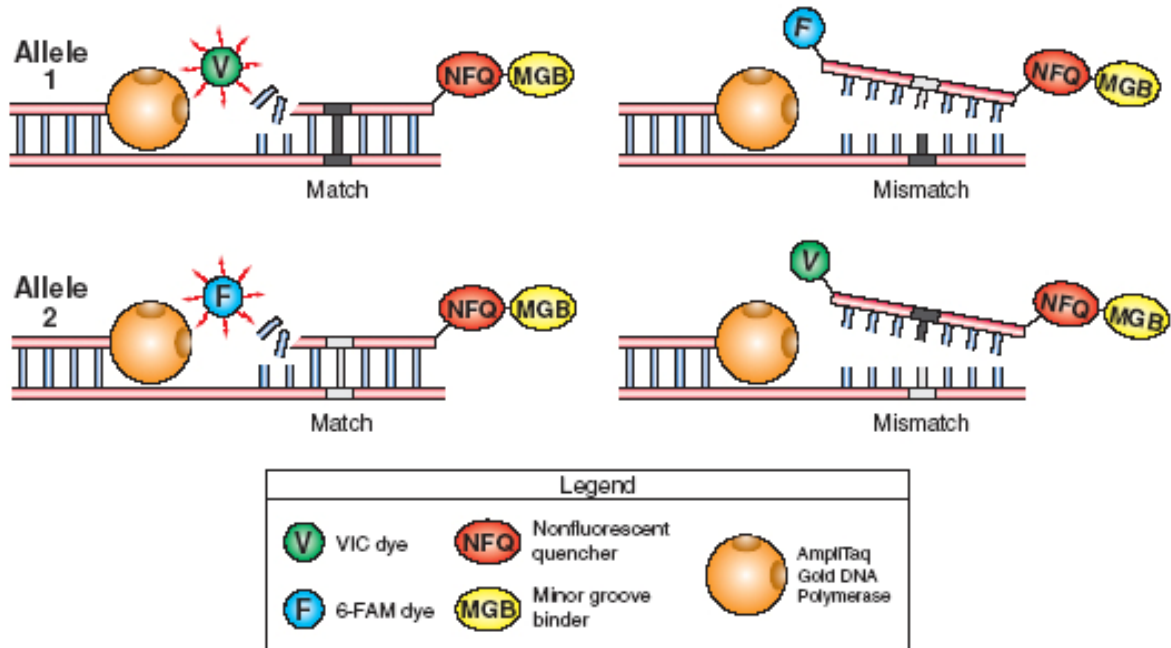
Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	10 min	
95°C	15s	}x50
60°C	1 min	

**Tabelle 18:** Temperaturprofil für die absolute Quantifizierung mittels Real-Time PCR

Die Messung der Proben in jedem Zyklus und deren Analyse erfolgten automatisch nach Standardeinstellungen mittels der SDS Software V2.1 von Applied Biosystems und wurden manuell kontrolliert.

### 2.2.11.7 Allelische Diskriminierung

TaqMan-Assays zur allelischen Diskriminierung werden verwendet, um SNPs zu untersuchen. Dabei kommen neben den spezifischen Primern zwei Sonden zum Einsatz, die sich an der Position des SNPs in der Sequenz unterscheiden. Trotz dieses geringen Unterschieds sind die Sonden spezifisch genug, so dass nur das entsprechende Signal generiert wird. Das Prinzip ist in Abbildung 10 graphisch dargestellt [140]. Dabei ist die Sonde des Allels 1 mit VIC, die des Allels 2 mit Fam markiert. Die jeweiligen Assays wurden mit der Software Assays-by-Design FILE BUILDER V2.0 von Applied Biosystems entworfen und anschließend vom Assays-by-Design Service derselben Firma synthetisiert.



**Abbildung 10:** Schematische Darstellung der Alleldifferenzierung mittels TaqMan-PCR nach <http://docs.appliedbiosystems.com/pebi/docs/04364015.pdf>

Es wurden 5 SNPs für den Vergleich zwischen den Vollblut- und WGA-Plasma-DNA-Proben ausgewählt, Gen und zugehörige Sequenzen der Primer und Sonden finden sich in Tabelle 4.

Bei diesem Versuch ist nur eine Endzeitpunktmessung der emittierten Fluoreszenz von Nöten, dass es sich um eine qualitative Aussage handelt. Durch Auswertung der allelspezifischen Fluoreszenzsignale erfolgt die Zuordnung zum jeweiligen Genotyp, wobei ein Anstieg nur eines Reporters einem homozygotem Genotyp, ein Anstieg beider Reporter einem heterozygotem Genotyp entspricht.

### 2.2.11.7.1 Reaktionsansatz

Alle PCR-Reaktionen, die im Rahmen der Genotypisierung mittels TaqMan stattfanden, wurden in 384-well-Mikrotiterplatten mit einem Reaktionsvolumen von 5 µl durchgeführt. Die DNA (ca. 5 ng) wurde am Tag zuvor mit Hilfe des Pipettierroboters Freedom Evo (Tecan AG, Crailsheim, D) aus 96-well-Mikrotiterplatten in 384-well-Mikrotiterplatten übertragen und über Nacht

## 2. Material und Methoden

---

luftgetrocknet. Der im Folgenden beschriebene Mastermix wurde für 240 Proben angesetzt, da neben den 176 Vergleichsproben und den 6 Leerwerten 20 Proben aus Qualitätssicherungsgründen doppelt aufgetragen wurden. Der Mastermix wurde ebenfalls mit Hilfe des Pipettierroboters Freedom Evo (Tecan AG, Crailsheim, D) zu den einzelnen Wells hinzugefügt:

Reagenzien	Volumen für Single-Reaktion	Volumen für 240 Reaktionen
H <sub>2</sub> O	2,375 µl	570 µl
TaqMan Universal PCR Master Mix	2,5 µl	600 µl
40X Assay Mix	0,125 µl	30 µl
Total Volumen	5,0 µl	1200 µl

**Tabelle 19:** Mastermix für 40x TaqMan-Assay

Reagenzien	Volumen für Single-Reaktion	Volumen für 240 Reaktionen
H <sub>2</sub> O	2,275 µl	546 µl
TaqMan Universal PCR Master Mix	2,5 µl	600 µl
20X Assay Mix	0,225 µl	54 µl
Total Volumen	5,0 µl	1200 µl

**Tabelle 20:** Mastermix für 20x TaqMan-Assay

Nach einer kurzen Zentrifugation wurde das Thermocycling mit dem T1 Thermocycler (Biometra GmbH, Göttingen, D) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	10 min	
92°C	15s	}x50
60°C	1 min	
4°C	Unendlich	

**Tabelle 21:** Temperaturprofil für den TaqMan-Assay

Anschließend wurde die Platte zum Auslesen in das ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System gegeben. Die Datenkollektion und Auswertung erfolgte automatisch nach Standarteinstellungen mit der SDS Software V2.1 von Applied Biosystems und wurde manuell kontrolliert.

### 2.2.12 STR-Analyse

Mit dieser Methode wurden die Proben auf das Vorhandensein von Polymorphismen innerhalb der STRs untersucht. Zunächst wird mittels PCR Reaktion der genomische Bereich um die STRs amplifiziert. Die Auftrennung der PCR-Produkte kann auf unterschiedliche Weise durchgeführt werden. Die „klassische“ Methode besteht in einer hochauflösenden, horizontalen, nativen Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE). Durch Kombination aus Acrylamid, Bisacrylamid und einem Katalysator polymerisiert das Gemisch zu einem Gel, dessen Vernetzungsgrad durch das Verhältnis Acrylamid/Bisacrylamid und dessen Dichte durch die Konzentration des Acrylamids bestimmt wird. Die aufgebrauchte DNA wandert aufgrund einer negativen Nettoladung, bedingt durch das Phosphodiester-Rückgrat der einzelnen Nukleotide, in einem elektrischen Feld, welches durch angelegte Spannung erzeugt wird, von der Kathode zur Anode. Sie trennt sich dabei aufgrund der Vernetzung des Gels der Fragmentgröße nach auf, wobei kleinere Fragmente schneller wandern und nach Beendigung der Elektrophorese näher an der Anode zu liegen kommen. Bei größeren Fragmenten verhält es sich dementsprechend umgekehrt. Die PCR-Produkte werden anschließend, wurden unmodifizierte Primer verwendet, mittels Ethidiumbromid- oder Silberfärbung sichtbar gemacht [141;142].

Eine andere Möglichkeit zur Auftrennung und Detektion von STR-Amplikons ist die hochauflösende Kapillarelektrophorese unter Verwendung eines Sequenzierers [143-147]. Dabei werden DNA-Fragmente mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Primern mittels PCR generiert und anschließend über eine mit einem viskösen Polymer als Geläquivalent gefüllte Kapillare aufgetrennt. Das auf Cellulosebasis beruhende eingesetzte Polymer ist je nach Anwendung unterschiedlich dicht und wird vor jeder Analyse in die Kapillare gepumpt. Die Kapillare wird kurz unter Anlegen einer Spannung in das jeweilige Probengefäß eingeführt, gewaschen und in den Kathodenpuffer getaucht. Wie bereits beschrieben, wandern die DNA Moleküle aufgrund ihrer negativen Ladung bei angelegter Betriebsspannung (im Falle des ABI Prism 3130XL Genetic Analyzer 15.000V) von der Kathode Richtung Anode, wobei größere Fragmente unter der Wirkung des Polymers verlangsamt werden und dadurch später als kleinere Fragmente das Detektionsfenster passieren. Dies ist ein durchsichtiges Teilstück am Ende der Kapillare.

Dort werden die Fluoreszenzfarbstoffe (2.2.11.2) der DNA Moleküle automatisch mittels eines Argon-Lasers optisch angeregt, die emittierte Wellenlänge der Fluorochrome wird über eine CCD-Kamera erfasst und in elektronische Signale umgewandelt, die wiederum von einem angeschlossenen Computer gesammelt und verarbeitet werden. Anhand eines jeder Probe zugegebenen Längenstandards kann die Größe der DNA-Fragmente bis zu einem Basenpaar genau bestimmt werden. Neben der Anwendung als Single-Plex besteht die Möglichkeit, die Genotypen der STRs auch in einem Multiplexverfahren zu bestimmen, d.h. in einem Lauf können bis zu 15 Genotypen einer Probe gleichzeitig untersucht werden. Hierbei erfolgt die Amplifikation mehrerer Genorte bzw. die Auftrennung in einem gemeinsamen Reaktionsgefäß. Weiterhin besteht durch Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenzfarbmarkierungen der Primer die Möglichkeit, Loci mit überlappenden Allelgrößen zusammen zu bestimmen [148-152]. Diese Methode hat in den letzten Jahren enorm an Bedeutung gewonnen, da sie neben einer immensen Zeit- und Kostenersparnis gegenüber der Polyacrylamidgelelektrophorese auch die Generierung elektronischer

Ergebnisse bietet, welche mit den entsprechenden Programmen effizient auszuwerten sind.

Neun verschiedene STR-Marker wurden für den Vergleich der 88 Probenpärchen untersucht. Sie wurden unter Verwendung der GDB Human Genome Database und der Datenbank des Cooperative Human Linkage Center ausgewählt. Es wurde dabei darauf geachtet, dass ihre Heterozygotenfrequenz möglichst hoch ist, sich der Locus möglichst in der Nähe der untersuchten SNPs befindet und sie auf neun verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind. Die verwendeten Marker (Tabelle 2) wurden sowohl mittels hochauflösender Kapillarelektrophorese als auch teilweise (D1S495, D2S1338, D3S1314, D5S2498 und D12S2078) mittels Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert.

Für die hochauflösende Kapillarelektrophorese wurden PCR-Produkte mit markierten Primern, an deren 5'-Ende ein Fluoreszenzfarbstoff angehängt war, generiert. Dadurch und durch ihre unterschiedliche Länge war es möglich, für sie ein Multiplexkonzept zu entwickeln und die neun Marker in drei unterschiedlichen 3-Plexen zu untersuchen (Tabelle 22).

Plex #	Marker
Plex 1	D1S495, D5S2498, D11S1983
Plex 2	D2S1338, D8S1130, D19S1167
Plex 3	D3S1314, D12S2078, D20S481

**Tabelle 22** : Übersicht über die verschiedenen Marker, die jeweils für die Multiplexanalyse zusammengefasst wurden.

Zur Auftrennung mittels Polyacrylamidelektrophorese wurden für die PCR unmodifizierte Primer eingesetzt. Die Marker mussten dadurch jeweils einzeln auf die Gele aufgetragen werden.

Es wurden beide Auftrennungsverfahren verwendet, um die Vergleichbarkeit beider Systeme zu untersuchen, so dass die Analyse auch in Laboratorien möglich ist, denen kein Sequenzierer zur Verfügung steht.

**2.2.12.1 PCR innerhalb der STR-Analyse mittels hochauflösender Kapillarelektrophorese**

Alle PCR-Reaktionen, die im Rahmen der STR-Analyse mittels Genetic Analyzer 3130XL stattfanden, wurden in 384-well-Mikrotiterplatten mit einem Reaktionsvolumen von 10 µl durchgeführt. 20 ng DNA wurden am Tag zuvor mit Hilfe des Pipettierroboters Freedom Evo (Tecan AG, Crailsheim, D) aus 96-well-Mikrotiterplatten in 384-well-Mikrotiterplatten übertragen und über Nacht luftgetrocknet. Für die Marker D3S1314, D11S1983 und D19S1167 wurde die PCR Reaktion als Single-Plex, für die anderen Marker als 2-plex durchgeführt (D1S495 und D5S2498, D2S1338 und D8S1130, D12S2078 und D20S481). Der folgende Mastermix wurde ebenso mit Hilfe desselben Pipettierroboters zu den einzelnen Wells hinzugefügt.

Reagenzien	Volumen für Single-Reaktion
H <sub>2</sub> O	5,3 µl
Q-Solution	2 µl
10x Puffer	1 µl
dNTPs (2mM)	0,4 µl
MgCl (25mM)	1 µl
Primer sense (10pmol/µl)	0,1 µl
Primer antisense(10pmol/µl)	0,1 µl
HotStar Taq (5U/µl)	0,1 µl
Total Volumen	10 µl

**Tabelle 23:** Mastermix für die Single-Plex PCR innerhalb der STR-Analyse (D3S1314, D11S1983, D19S1167)



## 2. Material und Methoden

---

Reagenzien	Volumen für Single-Reaktion
H <sub>2</sub> O	5,28 µl
Q-Solution	2 µl
10x Puffer	1 µl
dNTPs (2mM)	0,4 µl
MgCl (25mM)	1 µl
Primer sense (10pmol/µl)	0,1 µl (je Marker)
Primer antisense(10pmol/µl)	0,1 µl (je Marker)
HotStar Taq (5U/µl)	0,12 µl
Total Volumen	10 µl

**Tabelle 24:** Mastermix für die 2-plex PCR innerhalb der STR-Analyse (D1S495 und D5S2498)

Reagenzien	Volumen für Single-Reaktion
H <sub>2</sub> O	4,97 µl
Q-Solution	2 µl
10x Puffer	1 µl
dNTPs (2mM)	0,4 µl
MgCl (25mM)	1 µl
Primer sense (10pmol/µl)	0,12 µl (je Marker)
Primer antisense(10pmol/µl)	0,12 µl (je Marker)
HotStar Taq (5U/µl)	0,15 µl
Total Volumen	10 µl

**Tabelle 25:** Mastermix für die 2-plex PCR innerhalb der STR-Analyse (D2S1338 und D8S1130, D12S2078 und D20S481)

Das Thermocycling wurde mit dem T1 Thermocycler (Biometra GmbH, Göttingen, D) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

## 2. Material und Methoden

Temperatur	Zeit		Zyklenanzahl
95°C	15 min	Denaturierung	1 Zyklus
94°C	30 sec	Denaturierung	} 27-38 Zyklen
55°C	75 sec	Annealing	
72°C	30 sec	Extension	
72°C	10 min	Extension	1 Zyklus
4°C	Unendlich		

**Tabelle 26:** Temperaturprofil Mastermix für die PCR innerhalb der STR-Analyse

Marker	Zyklen
D3S1314	38
D11S1983	38
D19S1167	30
D1S495 und D5S2498	27
D2S1338 und D8S1130	27
D12S2078 und D20S481	30

**Tabelle 27:** Zyklenanzahl für die einzelnen Marker für die PCR innerhalb der STR-Analyse

### 2.2.12.2 STR-Analyse mittels hochauflösender Kapillarelektrophorese

Zur Kontrolle einer erfolgreichen Amplifikation wurden 2 µl PCR-Produkt mit 2 µl loading-DYE vermischt, auf einem 1,5% LE Agarosegel aufgetragen und für 45 min. bei 110 V elektrophoretisch aufgetrennt.

War diese Kontrolle positiv, wurde 1 µl PCR-Produkt zu 9 µl Mastermix, bestehend aus 8,5 µl Hi-Di-Formamid und 0,5 µl Längenstandard (GeneScan-400HD [ROX]), mit Hilfe des Pipettierroboters Freedom Evo (Tecan AG, Crailsheim, D) aus den 384-well-Mikrotiterplatten in eine 96-well-Detection-Plate pipettiert. Dabei wurden die PCR-Produkte von D1S495 und D5S2498 mit D11S1983, D2S1338 und D8S1130 mit D19S1167, D3S1314 und D12S2078 mit D20S481 für die drei entsprechenden 3-Plexe zusammengeführt.

Nach einer kurzen Zentrifugation wurden die Proben für 3 min. auf 95°C erhitzt um die doppelsträngige DNA zu denaturieren und damit die korrekte Größenzuordnung zu gewährleisten, anschließend ins Eiswasser gestellt und danach zur Analyse in den Sequenzierer gegeben. Die Daten wurden mit der 3130XL Data Collection Software V.3.0 gesammelt, anschließend mit der Gene Mapper Software V.3.7 mit den Standardeinstellungen automatisch ausgewertet und gegebenenfalls manuell nachkontrolliert.

### 2.2.12.3 PCR innerhalb der STR-Analyse mittels PAGE-Gel

Bei dieser Versuchsanordnung war es nicht möglich, ein Multiplexverfahren zu entwickeln, so dass jeder Marker in einer eigenen PCR amplifiziert wurde. Alle PCR-Reaktionen die im Rahmen der STR-Analyse mittels PAGE-Gel-Auftrennung stattfanden, wurden in 96-well-Mikrotiterplatten mit einem Reaktionsvolumen von 12,5 µl durchgeführt. Zuerst wurden 11,5 µl des folgenden Mastermix in 96-well-Mikrotiterplatten auf Eis vorgelegt:

Reagenzien	Volumen für Single-Reaktion
H <sub>2</sub> O	6,1875 µl
Q-Solution	2,5 µl
10x Puffer	1,25 µl
dNTPs (2mM)	0,5 µl
MgCl (25mM)	1,25 µl
Primer sense (10pmol/µl)	0,125 µl
Primer antisense(10pmol/µl)	0,125 µl
HotStar Taq (5U/µl)	0,0625 µl
Total Volumen	11,5 µl

**Tabelle 28: Mastermix für die PCR innerhalb der STR-Analyse mittels PAGE-Gel**

## 2. Material und Methoden

---

1 µl DNA (Konzentration 20 ng/µl) wurden aus 96-well-Mikrotiterplatten in die neuen 96-well-Mikrotiterplatten übertragen und diese anschließend in den T1 Thermocycler (Biometra GmbH, Göttingen, D) gegeben. Folgende PCR-Bedingungen wurden verwendet:

Temperatur	Zeit		
96°C	15 min	Denaturierung	1 Zyklus
94°C	30 sec	Denaturierung	} 28 Zyklen
55°C	45 sec	Annealing	
72°C	45 sec	Extension	
72°C	10 min	Extension	1 Zyklus
4°C	Unendlich		

**Tabelle 29:** Temperaturprofil für die PCR innerhalb der STR-Analyse mittels PAGE-Gel für die Marker D1S495 und D3S1314

Temperatur	Zeit		
95°C	15 min	Denaturierung	1 Zyklus
94°C	30 sec	Denaturierung	} 27 Zyklen
55°C	75 sec	Annealing	
72°C	15 sec	Extension	
72°C	10 min	Extension	1 Zyklus
4°C	Unendlich		

**Tabelle 30:** Temperaturprofil für die PCR innerhalb der STR-Analyse mittels PAGE-Gel für die Marker D2S1338, D5S2498 und D12S2078

### 2.2.12.4 STR-Analyse mittels PAGE-Gel

#### 2.2.12.4.1 Gelvorbereitung

Zwei 150 x 150 mm große Glasplatten wurden mit 70% Ethanol gereinigt und, nachdem zwei 5 mm dicke Platzhalter (Spacer) an den Seiten einer Platte angebracht worden waren, aufeinander gelegt. Anschließend wurden sie mit

zwei Zwingen durch Kompression in dieser Lage fixiert. Mit einer 20 ml Spritze wurde der frisch angesetzte Gel-Ansatz zwischen die Glasplatten gegeben. Dieser setzte sich für ein 8%-iges Acrylamidgel wie folgt zusammen:

Reagenzien	Volumen
H <sub>2</sub> O	27 ml
10x TBE Puffer	4 ml
Acrylamid/Bisacrylamidlösung	8 ml
APS	400 µl
TEMED	20 µl
Total Volumen	39,42 ml

**Tabelle 31:** Mastermix für ein 8% Polyacrylamidgel

Nach Einsetzen eines Kammes für die Probenaschen wurde das Gel zur Polymerisation für ca. eine Stunde bei Raumtemperatur gelagert und war anschließend für die Elektrophorese einsetzbar.

### **2.2.12.4.2 Elektrophorese**

Nach Entfernung des Kamms wurde auf das Gel eine Kammer montiert, in welcher sich die Kathode und der 0,5 x TBE Laufpuffer befanden. 8 µl Probe wurden mit 3 µl Loading Dye gemischt und davon wurden 10 µl in die Probenaschen aufgetragen, jeweils immer das Vollblut-Sample und die korrespondierende WGA-Plasma-DNA-Probe nebeneinander. Zusätzlich wurden in jedem Lauf zwei Mal der gleiche Längenstandard GeneRuler 50bp aufgetragen. Nach Anlegen einer Spannung von 600 V wurde die Elektrophorese in 0,5 x TBE Laufpuffer für eine Zeit zwischen 2,5 und 3,5 Std. bei 10°C durchgeführt.

### **2.2.12.4.3 Auswertung**

Nach abgeschlossener Auftrennung der Fragmente wurde das Gel aus den Glasplatten herausgelöst und für 15 min. in ca. 0,5 l, mit 120 µl Ethidiumbromid (0,625mg/ml) versetztem, deionisiertem Wasser angefärbt. Anschließend wurde das Gel auf einem UV-Licht-Transilluminator bei 312 nm zur Auswertung und Dokumentation fotografiert.

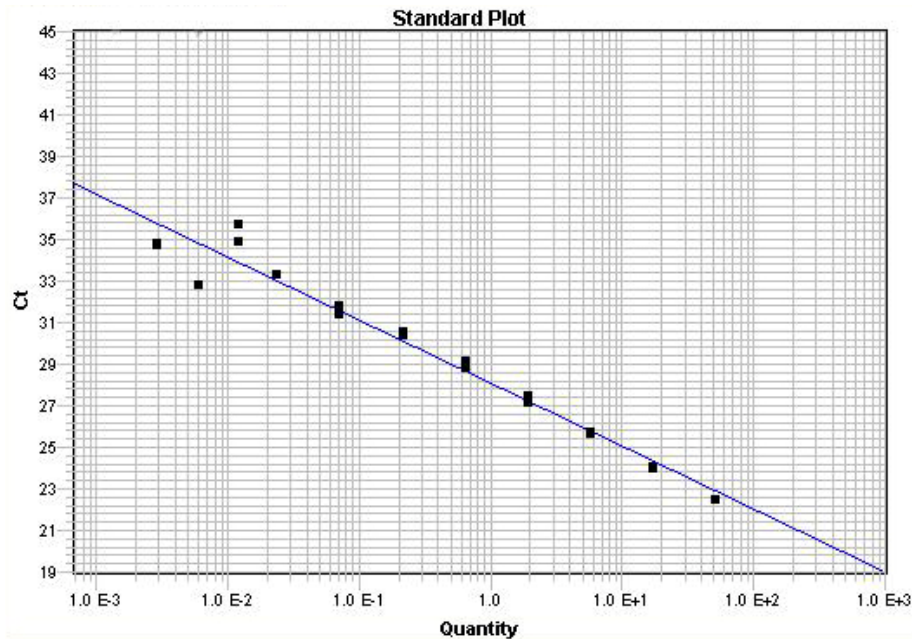
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Plasma-DNA Konzentrationen und Erfolgskontrolle

#### 3.1.1 Plasma-DNA Konzentration vor WGA

Zu Beginn der Methodenentwicklung stand zunächst die Überlegung, ob genügend DNA im Plasma vorhanden ist und diese extrahiert werden kann.

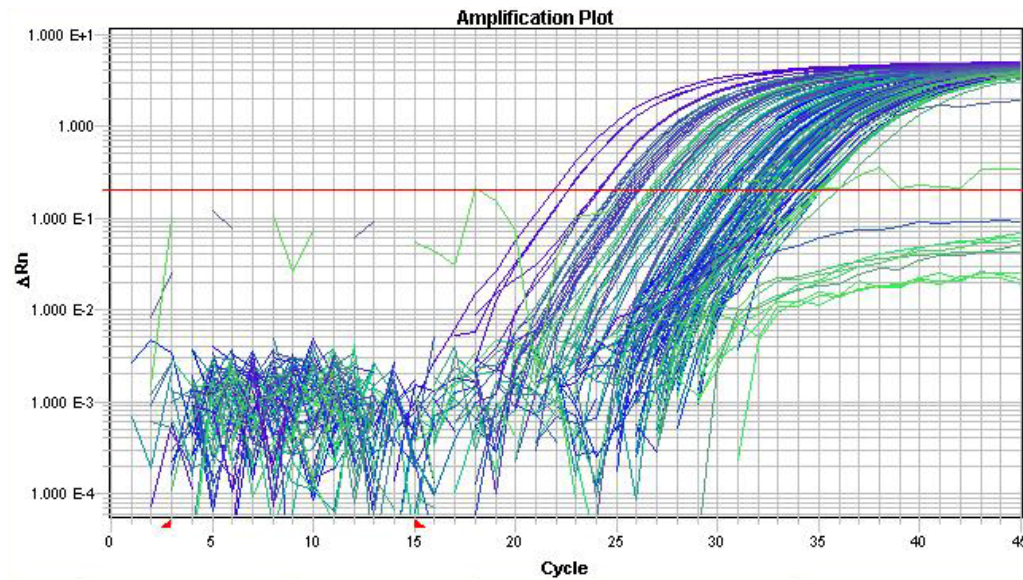
Aufgrund der geringen DNA-Menge nach der Extraktion, welche photometrisch nicht nachgewiesen werden konnte, wurde die Quantifizierung mittel Real-Time-PCR durchgeführt. Die erhaltenen Werte orientierten sich an einer Standardkurve (Abbildung 11) aus bekannten DNA-Mengen.



**Abbildung 11:** Standardkurve für die absolute Quantifizierung im Rahmen der Konzentrationsmessung mittels des Human Quantifiler Assay durch Real-Time-PCR.

Die DNA-Mengen erstreckten sich über einen Bereich von 250 pg bis 230 ng (Durchschnitt $\pm$ SD 10,5 $\pm$ 28 ng) mit einer Konzentration 5 pg/ $\mu$ l bis 4,6 ng/ $\mu$ l (Durchschnitt $\pm$ SD 213 $\pm$ 565 pg/ $\mu$ l).

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 12:** Darstellung des Amplifikations-Plots der DNA-Konzentrationsmessung mittels Human Quantifiler.

Zur Qualitätssicherung wurden zehn Proben mit bekannter Konzentration zusätzlich untersucht. Sie zeigten die erwarteten Konzentrationen.

Weiterhin zeigte die im Quantifizierungs Assay enthaltene interne PCR-Kontrolle (IPC) bei allen Proben keine Hemmung der PCR, so dass von einer sauberen DNA ausgegangen wurde.

#### 3.1.2 Plasma-DNA-Konzentration nach WGA

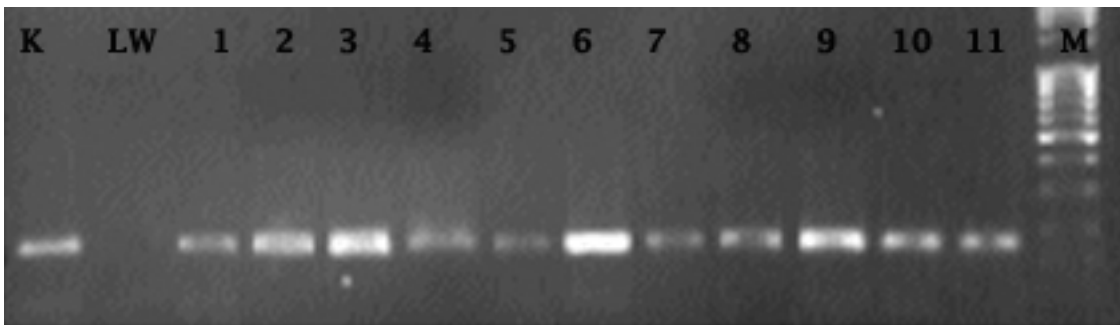
Die extrahierte DNA diente für die WGA als Template. Um die eingesetzte DNA-Menge zu erhöhen wurde das Protokoll dahingehend modifiziert, dass, anstatt der von Firmenseite empfohlenen 1  $\mu\text{l}$ , 5  $\mu\text{l}$  in die WGA-Reaktion eingesetzt wurden. Nach der WGA wurden die Proben zunächst mittels Sephadex G50 aufgereinigt und die DNA Konzentration anschließend gemessen. Dies geschah photometrisch mittels NanoDrop, da bei der Konzentrationsmessung mittels Real-Time-PCR ein Gen in der Telomerregion untersucht wird und diese Region durch die WGA nur unzureichend amplifiziert wird [23]. Die erhaltenen DNA-Mengen befanden sich in einem Bereich zwischen 1,1  $\mu\text{g}$  und 8,7  $\mu\text{g}$  (Durchschnitt  $\pm$  SD  $4,2 \pm 1,34 \mu\text{g}$ ) mit einer Konzentration von 45  $\text{ng}/\mu\text{l}$  bis 361  $\text{ng}/\mu\text{l}$  (Durchschnitt  $\pm$  SD  $156 \pm 54 \text{ng}/\mu\text{l}$ ). Die WGA führte somit zu einer 100- bis 67000-fachen (Durchschnitt



$\pm$  SD 13250  $\pm$  15400) Amplifikation der DNA im Vergleich zur eingesetzten DNA-Menge („input DNA“) (Abbildung 14)

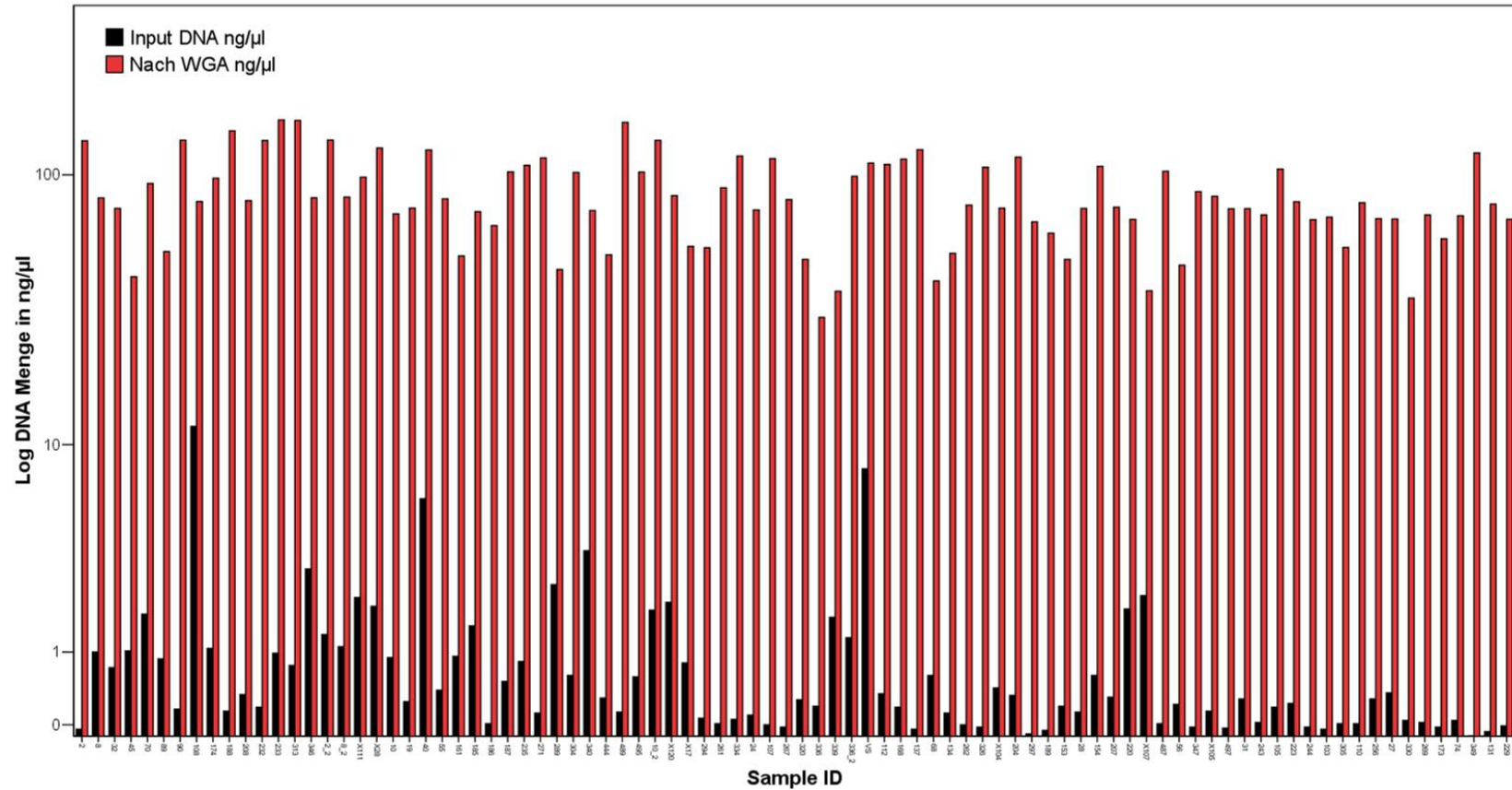
#### 3.1.3 Kontroll-PCR

Da sich auch in den Leerkontrollen geringe DNA-Konzentrationen zeigten, hervorgerufen durch unspezifische Amplifikationen, wurde zur Qualitätskontrolle eine Standard-PCR durchgeführt. Durch diese konnte zum einen eine Verunreinigung der Proben (Leerwert ohne Amplifikation), als auch eine erfolgreiche Amplifikation der Plasma-DNA-Proben nachgewiesen werden. Nach keinem der WGA-Amplifikationen zeigte sich eine Verunreinigung des Leerwertes. Bei zehn Proben kam es zu keiner erfolgreichen Amplifikation in der Kontroll-PCR. Bei diesen wurde, teilweise mehrmals, erneut DNA aus der gleichen oder einer neuen Plasmaprobe extrahiert, die WGA Reaktion wiederholt und eine erneute Kontroll-PCR durchgeführt, bis eine spezifische Amplifikation nachweisbar war.



**Abbildung 13:** Gel-Elektrophorese (2% TBE Agarose Gel) der Kontroll-PCR-Produkte nach Whole Genome Amplification der Plasma-DNA. K bezeichnet die interne Kontrolle, LW den Leerwert, 1-11 die Probanden, M den Größenstandard.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 14:** Darstellung der DNA-Mengen vor (schwarzer Balken) und nach der WGA Reaktion (roter Balken). Die DNA-Mengen auf der y-Achse sind logarithmisch aufgetragen.

### **3.2 Evaluierungs-Probenset**

Um zu überprüfen, ob die genomische Sequenz der Plasma-DNA nach der Whole Genome Amplifikation mit derjenigen der Vollblut-DNA übereinstimmte, genotypisierten wir bei 41 Probenpärchen, bestehend aus je einer Plasma-DNA-Probe nach Whole Genome Amplifikation und einer Vollblut-DNA-Probe von derselben Person, 22 SNPs mittels Maldi-TOF MS, 5 SNPs mittels TaqMan-Assays sowie 9 STRs. Letztere befanden sich auf 9 verschiedenen Chromosomen und soweit möglich, in enger räumlicher Beziehung zu den SNPs.

#### **3.2.1 SNP-Analyse**

##### **3.2.1.1 SNP-Analyse mittels MALDI-TOF**

Die ausgewählten SNPs hatten schon zuvor Einsatz in verschiedenen populationsbasierten Studien gefunden und mussten aus diesem Grund nicht neu auf ihr Vorhandensein in einer Population evaluiert werden [153-155]. Sie wurden in drei 6-plexen (Hexaplex) und einem 4-plex (Tetraplex) zusammengestellt. Die entsprechenden Reaktionsbedingungen und Primer wurden mit der SpectroDesigner Software berechnet, um sie anschließend mit Hilfe von Maldi-TOF MS analysieren zu können. Die berechneten PCR-Bedingungen waren so spezifiziert, dass sämtliche in dieser Arbeit im Rahmen der hME-Methode durchgeführten Amplifikationsreaktionen nicht mehr optimiert werden mussten und nach einem vereinheitlichten Pipettierprotokoll bzw. Temperaturprogramm ablaufen konnten. Beim Multiplexverfahren werden mehrere Ansätze gleichzeitig in einem Reaktionsgefäß analysiert. Diese Vorgehensweise bietet den Vorteil der Kosten- als auch Zeitersparnis.

Im ersten Schritt der Multiplexreaktion wurden mittels PCR vier bzw. sechs Amplikons gleichzeitig in einem Reaktionsgefäß gebildet und anschließend zur Erfolgskontrolle auf einem Agarosegel sichtbar gemacht.

Die folgende Primer-Extensions-Reaktion zum Nachweis des zu analysierenden SNPs fand anschließend im gleichen Reaktionsgefäß statt. Die Bedingungen

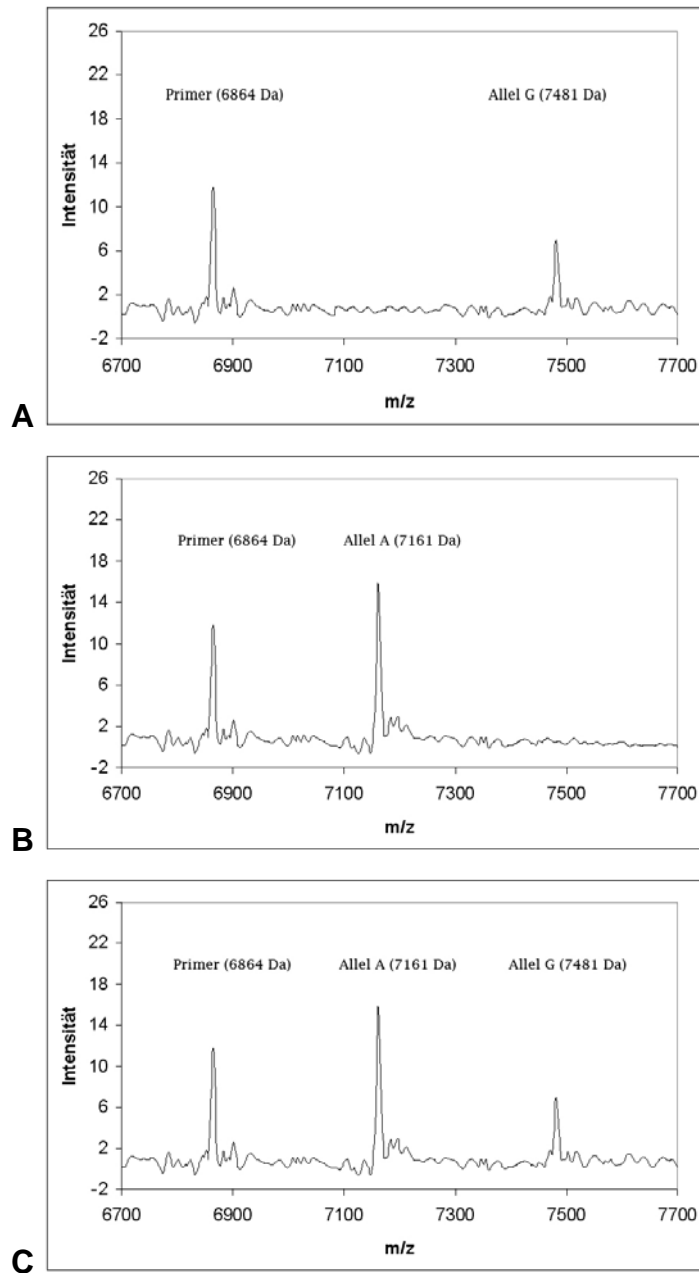
### 3. Ergebnisse

---

dieser Reaktion wurden durch die Berechnungen mit der SpektoDesigner Software optimiert, so dass auch für diese standardisierte Pipettierprotokolle und Temperaturprogramme verwendet wurden.

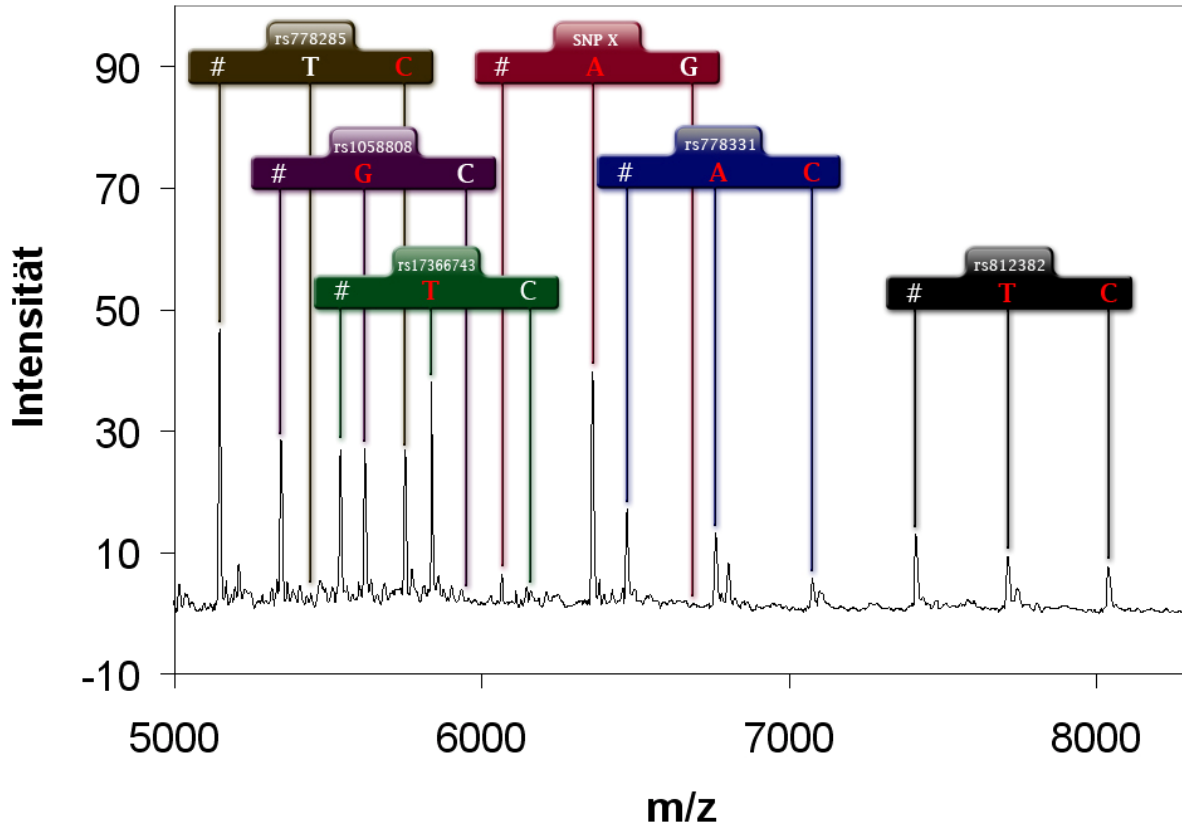
Die MALDI-TOF MS-Analyse einer Multiplex-Primer-Extensions-Reaktion ist im Gegensatz zur Analyse einer Uniplex-Primer-Extensions-Reaktion vielschichtiger, da während einer Multiplexreaktion Produkte über einem Massenbereich von etwa 3000 Dalton detektiert werden, anstatt dass, wie bei einer Uniplex-Reaktion Analyten in einem Massenbereich von nur etwa 700 Dalton erfasst werden. Die dazu notwendigen Berechnungen der Produkte zur Vermeidung von Überschneidungen von Analyten mit gleicher Masse wurden wiederum mit Hilfe der SpectroDesigner Software durchgeführt. Dadurch hatten die Massen der Primer bzw. der jeweiligen Extensionsprodukte im Massenspektrum mindestens einen Abstand von 50 Dalton. Um eine zuverlässige Genotypisierung zu gewährleisten, müssen die gemessenen Signale der allelspezifischen Extensionsprodukte deutlich über dem Grundrauschen messbar sein. Dies war bei den hier durchgeführten Untersuchungen durch bereits im Vorfeld abgeklärten Etablierungsversuchen der Fall und musste nicht neu evaluiert werden. Beispielhaft sind in Abbildung 15 und Abbildung 16 zum einen ein Massenspektrum wie es sich bei einer Uniplexreaktion und zum anderen wie es sich bei der Multiplexreaktion (Hexaplex) darstellt aufgezeigt.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 15:** MALDI-TOF Massenspektren des SNP rs3774261 [G/A]. A: zeigt den homozygoten Zustand des Allels G. B: zeigt den homozygoten Zustand des Allels A für den SNP. C: zeigt den heterozygoten Zustand für den SNP. Alle Abbildungen sind Auszüge aus dem Massenspektrum einer Multiplexreaktion.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 16:** MALDI-TOF Massenspektrum einer Multiplexreaktion zur Genotypisierung sechs biallelischer SNPs. Das Massenspektrum zeigt die Analyse der Primer-Extensions-Reaktion für die SNPs rs778285 [T/C], rs1058808 [G/C], rs17366743 [T/C], rs778331 [A/C], rs812382 [T/C] und eines SNPs (in der Abbildung als SNP X bezeichnet), an Position 104982394<sup>#</sup> des Chromosoms 13. Letzt genannter SNP hat noch keine rs Nummer nach offizieller Nomenklatur. Die rot markierten Buchstaben zeigen die Stellen im Massenspektrum, an denen die allelspezifischen Extensionsprodukte der durchgeführten Reaktionen detektiert werden konnten. Das Raute Zeichen (#) markiert den Massenbereich, in dem die jeweiligen nicht extendierten Primer detektiert werden konnten.

<sup>#</sup>Genaue Position: 13 dna: chromosome:NCBI36:13:104982394 (26-APR-2007)

### 3. Ergebnisse

SNP_ID	Amplikon Größe (bp)	Primer (Da)	Allel 1	Masse Allel 1 (Da)	Allel 2	Masse Allel 2 (Da)
rs778285	84	5146.4	T	5443.6	C	5748.7
rs1058808	92	5346.5	G	5619.7	C	5948.9
rs17366743	99	5539.6	T	5836.8	C	6157.0
Chr.13, Pos.104982394	97	6062.9	A	6360.2	G	6680.3
rs778331	110	6472.2	A	6760.4	C	7074.6
rs812382	108	7412.8	T	7710.0	C	8039.3

**Tabelle 32:** Liste der in Abbildung 16 dargestellten, mittels Maldi-TOF MS in einer Multiplexreaktion (Hexaplex) untersuchten, SNPs. Von links nach rechts: NCBI rs Nummer, Größe des Amplikons in der PCR (in bp), Masse des nicht extendierten Primers (in Dalton), Genotyp Allel 1, Masse Allel 1 (in Dalton), Genotyp des Allel 2, Masse Allel 2 (in Dalton)

Bei zwei SNPs (rs812382, rs2227994) konnten keine Genotypen aufgrund technischer Probleme akquiriert werden. Die Fehlerquelle war entweder während der Primer-Extensions-Reaktion oder aufgrund einer Assayinstabilität zu suchen, da nach der PCR keine Auffälligkeiten zu finden waren. Weiterhin wurde der SNP rs11114071 aufgrund einer niedrigen Call-Rate von 81,7% nicht in der Auswertung berücksichtigt. Somit wurden 19 SNPs, die mittels Maldi-TOF MS untersucht wurden, in die endgültige Analyse einbezogen.

Die Ergebnisse der Genotypisierung mittels Maldi-TOF MS sind in Tabelle 33 ersichtlich. Die durchschnittlichen Call-Rates waren 98,46% bzw. 98,33% für die Vollblut-DNA und die WGA-Plasma-DNA. Bis auf zwei (rs1058808, rs10250) waren alle SNPs im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE). Die Abweichung vom HWE trat aber sowohl bei der Vollblut-DNA als auch bei der WGA-Plasma-DNA auf (Tabelle 33).

Beim Vergleich der Vollblut- und WGA-Plasma-DNA-Genotypen der 41 Probenpärchen kam es zu 27 diskordanten Genotypen bei insgesamt 779 Genotyppaaren. Dies entspricht einer Discordanzrate von 3,47%. Die diskordanten Genotypen resultierten immer aus einem heterozygoten Genotyp der Vollblut-DNA und einem homozygoten Genotyp der WGA-Plasma-DNA, es kam also bei diesem Fehler immer zu einem Verlust eines Allels, einem so genannten Allelic Drop Out. Ein zusätzliches Allel, ein so genanntes Allelic Drop In, war bei diesem Vergleich nicht zu beobachten.

Die beobachteten Fehler traten nur bei 14 der 41 Probenpärchen auf, wobei manche Proben mehrere, bis zu fünf diskordante Genotypen aufwiesen.

#### **3.2.1.2 SNP-Analyse mittels TaqMan**

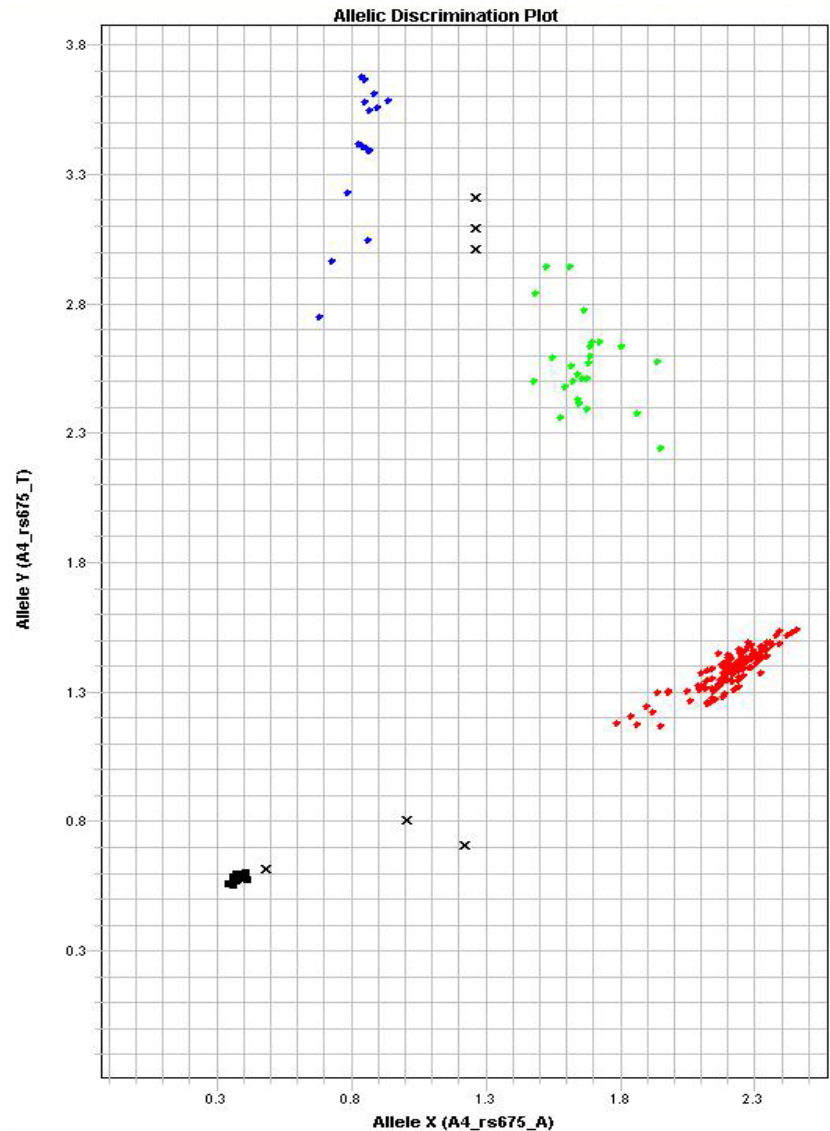
Zur Überprüfung der Maldi-TOF MS Ergebnisse wurden zunächst die SNPs rs7607759 und rs8079197 mittels TaqMan unter besonderer Beobachtung der Genotypdiskordanzen wiederholt. Dabei zeigten sich bei den 41 Probenpärchen dieselben Ergebnisse, so dass von einer gleichwertigen Methode und methodenunabhängigen Diskordanzen ausgegangen werden konnte.

Zusätzlich wurden anschließend 3 weitere SNPs zur Untersuchung der Genotypen zwischen der Vollblut-DNA und der WGA-Plasma-DNA der 41 Probenpärchen ausgewählt und genotypisiert (Abbildung 17). Die Ergebnisse der Genotypisierung sind in Tabelle 33 ersichtlich. Die Call-Rates waren mit 99,2% bzw. 95,9% für die Vollblut-DNA und die WGA-Plasma-DNA vergleichbar mit den Werten der Maldi-TOF MS Analyse. Der SNP rs675 verletzte als einziger das HWE, dies jedoch sowohl bei der Vollblut-DNA als auch bei der WGA-Plasma-DNA.

Zwischen den beiden unterschiedlichen DNAs desselben Probanden kam es bei diesen 3 SNPs zu 9 Diskordanzen. Dies bedeutet bei 123 Genotyppaaren eine Diskordanzrate von 7,3%. Die Diskordanzen traten auch hierbei in Form von neun Allelic Drop Outs bei acht verschiedenen Probanden auf.



### 3. Ergebnisse



**Abbildung 17:** Amplifikations-Plot des SNP rs675 [A/T]. Die für das Allel A homozygoten Proben sind rot markiert, die heterozygoten Proben grün und die für das Allel T homozygoten Proben blau. Die schwarzen Vierecke (■) bezeichnen die Leerwerte, die schwarzen Kreuze (x) sind Proben, deren Genotyp nicht eindeutig bestimmt werden konnte.

#### 3.2.1.3 Zusammenfassung der SNP-Analyse

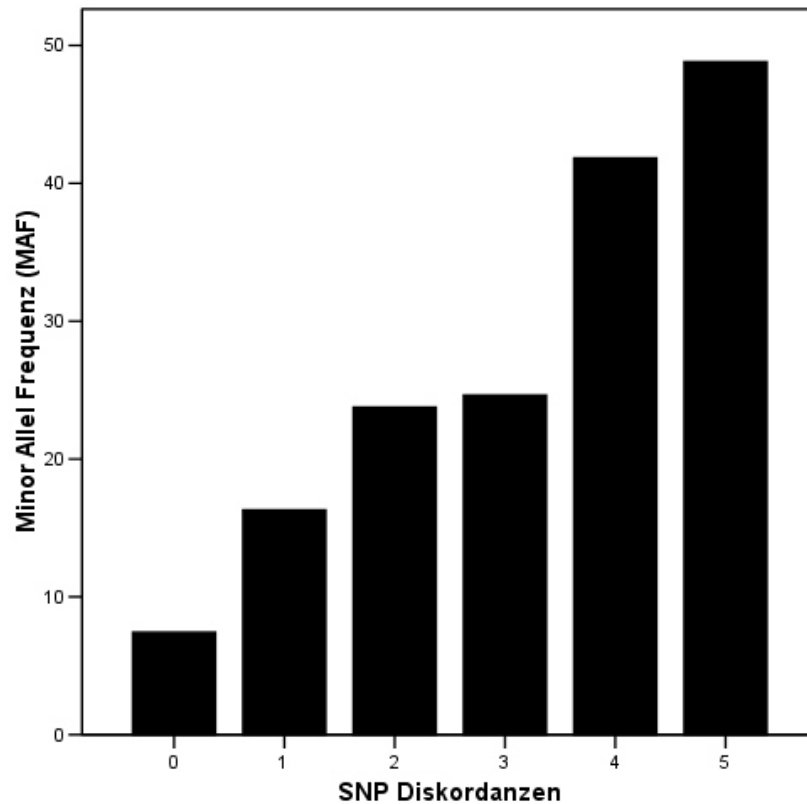
Beide SNP-Analyse-Methoden zusammengefasst zeigten ähnliche Resultate. Die Call-Rate war 98,6% bzw. 98% für die Vollblut-DNA respektive die WGA-Plasma-DNA. Bei drei SNPs kam es zu einer Verletzung des HWE, diese trat jedoch sowohl bei der Vollblut-DNA als auch der WGA-Plasma-DNA auf. Es zeigte sich bei letztgenannter bei allen drei SNPs ein deutlich signifikanterer

### 3. Ergebnisse

---

Wert (Tabelle 33). Insgesamt kam es bei 902 Genotyppärchen von 41 Probanden zu 36 Diskordanzen, dies entspricht einer Diskordanzrate von 4%. Diese Diskordanzen waren ausschließlich Allelic Drop Outs, welche bei einem heterozygoten Genotyp der Vollblut-DNA einen homozygoten Genotyp der WGA-Plasma-DNA zeigten. Von den 41 Proben waren nur 15 Proben von diesem Fehler betroffen, dabei zeigten einige Proben aber multiple, bei mehreren SNPs aufgetretene Diskordanzen.

Die Fehlerquote war über die SNPs der drei Hexaplexe, des Tetraplex und die mit TaqMan untersuchten SNPs gleichmäßig verteilt, zeigte sich aber mit steigender Minor Allel Frequenz (MAF) der SNPs erhöht (Abbildung 18).



**Abbildung 18:** Mittelwert der Minor-Allel-Frequenzen bezogen auf die jeweiligen SNPs, die die gleiche Anzahl von Diskordanzen aufweisen.

### 3. Ergebnisse

SNP	MAF (%)	Vollblut-DNA		WGA-Plasma-DNA		Diskordanzen zwischen VB-DNA und WGA-DNA		
		Call-Rate (%)	HWE	Call-Rate (%)	HWE	Vor Ausschluss	nach Ausschluss*	HWE nach Ausschluss*
<b>Maldi-TOF MS</b>								
rs778331	23.2	100.0	0.2919	95.1	0.5289	2	0	0.5894
rs778285	42.3	95.1	0.0505	100.0	0.1874	2	0	0.1099
Chr. 13, Pos. 104982394 <sup>#</sup>	8.5	100.0	0.5501	100.0	0.5500	0	0	0.7731
rs5030952	8.8	97.6	0.5442	95.1	0.5380	0	0	0.4694
rs3792267	33.3	95.1	0.0546	95.1	0.0997	1	0	0.3916
rs2975766	4.9	100.0	0.7426	100.0	0.8694	2	0	0.8501
rs7607759 <sup>§</sup>	16.3	97.6	0.9478	100.0	0.0896	4	1	0.2945
rs2975762	46.3	100.0	0.0781	100.0	0.3953	3	1	0.2245
rs1058808	31.7	100.0	<b>0.0379</b>	100.0	<b>0.0187</b>	1	0	<b>0.0115</b>
rs13181	32.9	97.6	0.7529	97.6	0.5923	3	0	0.6485
rs10250	46.3	97.6	<b>0.0047</b>	97.6	<b>0.0001</b>	3	1	<b>0.0196</b>
rs8079197 <sup>§</sup>	43.9	100.0	0.5671	100.0	0.9024	2	0	0.8756
rs4252596	12.2	100.0	0.5692	100.0	0.0896	1	0	0.2945
rs1063539	7.7	95.1	0.0827	90.2	0.0949	0	0	0.1939
rs2036373	11.0	100.0	0.4298	100.0	0.4887	1	0	0.5428
rs2241766	9.7	100.0	0.2794	100.0	0.2794	0	0	0.2945
rs17366743	2.4	100.0	0.8728	100.0	0.8230	0	0	- **
rs3774261	37.2	95.1	0.2699	97.6	0.0871	1	0	0.2189
rs822394	17.1	100.0	0.6624	100.0	0.5116	1	0	0.9918
<b>TaqMan</b>								
rs675	17.5	97.6	<b>0.0024</b>	97.6	<b>0.0001</b>	2	1	<b>0.0275</b>
rs20417	15.9	100.0	0.2277	95.1	0.3052	2	0	0.2376
rs2569190	48.8	100.0	0.2723	95.1	0.4233	5	1	0.2534
<b>Total</b>	<b>23.5</b>	<b>98.6</b>		<b>98.0</b>		<b>36 (4%)</b>	<b>5 (0.8%)</b>	

**Tabelle 33:** Vergleich der SNP-Genotypisierung von 41 Probenpärchen, bestehend aus je einer Vollblut-DNA-Probe und einer Whole Genome amplifizierten (WGA) Plasma-DNA, des Evaluations-Probensets. Neunzehn bzw. drei SNPs wurden mittel Maldi-TOF MS und TaqMan-Assays genotypisiert, daraus resultierten 902 Genotypen.

\* Diskordanzen und das HWE wurden nach Ausschluss von 12 Individuen mit 5 und mehr homozygoten STRs in den WGA-Plasma-Proben neu berechnet. Die STR-Marker sind aus Tabelle 34 ersichtlich.

\*\* Nach Ausschluss der Individuen mit 5 oder mehr homozygoten STR-Marker Loci waren alle Proben homozygot. Dadurch konnte kein HWE berechnet werden.

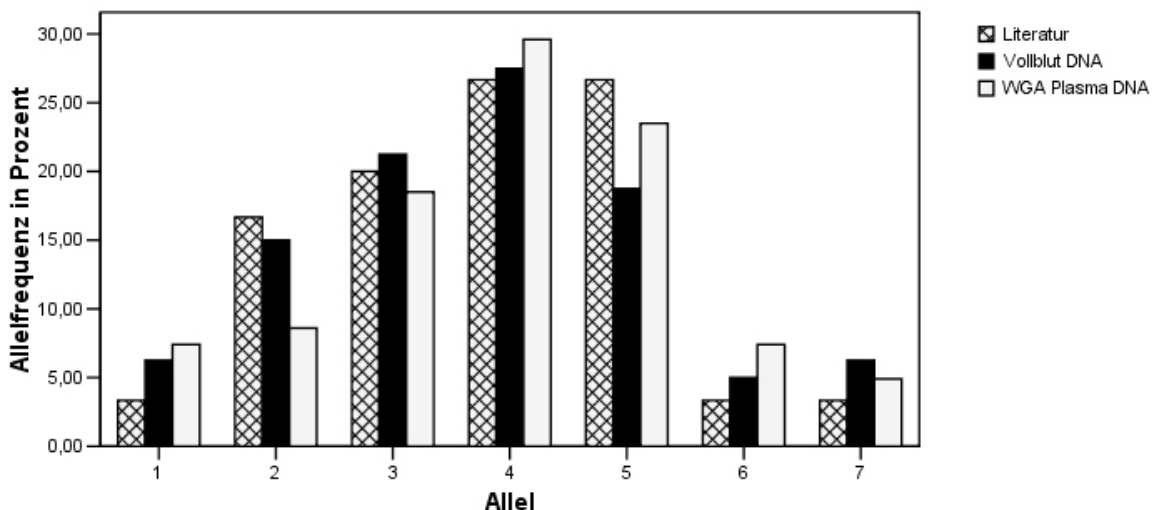
<sup>#</sup> Genaue Position: 13 dna: chromosome:NCBI36:13:104982394 (26-APR-2007)

<sup>§</sup> Diese beiden SNPs wurden sowohl mittels Maldi-TOF-MS als auch mittels TaqMan analysiert.

### 3.2.2 STR-Analyse

Mit neun Short Tandem Repeat (STR) Markern wurde zum einen untersucht, wie akkurat die WGA-Plasma-DNA im Vergleich zur Vollblut-DNA hochpolymorphe, repetitive DNA Bereiche reproduziert und zum anderen, ob auch dort Allelic Drop Outs, dem am häufigsten erwarteten Fehler bei der Whole Genome Amplification mittels  $\Phi$ 29 Polymerase [156], auftreten. Dazu wurde ein Panel von neun hochpolymorphen STR-Markern verwendet, die auf neun verschiedenen Chromosomen lokalisiert waren. Die Überlegung dahinter war, dass vorhandene Allelic Drop Outs, gerade bei SNPs mit niedriger MAF, möglicherweise übersehen werden könnten. Die STR-Marker wurden so ausgewählt, dass sie eine große Anzahl an möglichen Allelen mit ähnlicher Allelfrequenz besaßen um die Wahrscheinlichkeit eines homozygoten Genotyps gering zu halten (Tabelle 34). Sie wurden in 3 unterschiedlichen Triplexen analysiert (Abbildung 20).

Die Ergebnisse der Genotypisierung des Evaluationssets ist in Tabelle 34 angegeben. Die durchschnittlichen Call-Rates waren mit 98% und 98,4% für die Vollblut-DNA und die WGA-Plasma-DNA sehr ähnlich. Die Verteilung der Allele aller STRs war ähnlich wie in der Literatur angegeben (Abbildung 19).

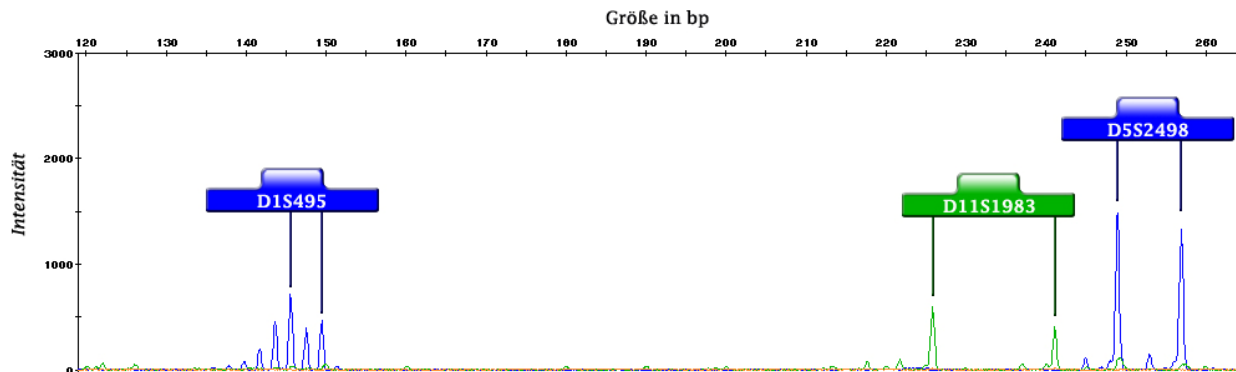


**Abbildung 19:** Graphische Darstellung der Allelverteilung des Markers D8S1130. Der karierte Balken stellt die Allele wie in der Literatur angegeben dar, der schwarze Balken die Allelverteilung der Vollblut-DNA (n=41), der weiße Balken die Allelverteilung der WGA-Plasma-DNA (n=41).

### 3. Ergebnisse

Die durchschnittliche Heterozygotenrate aller STRs der WGA-Plasma-DNA war mit 68% im Vergleich zur Vollblut-DNA mit 85,7% deutlich niedriger. Alle STR-Marker der Vollblut-DNA, mit Ausnahme von D12S2078 ( $p=0,0274$ ), waren im HWE, wohingegen fünf der neun genotypisierten STR-Marker der WGA-Plasma-DNA das Hardy-Weinberg Gleichgewicht verletzten (Tabelle 34).

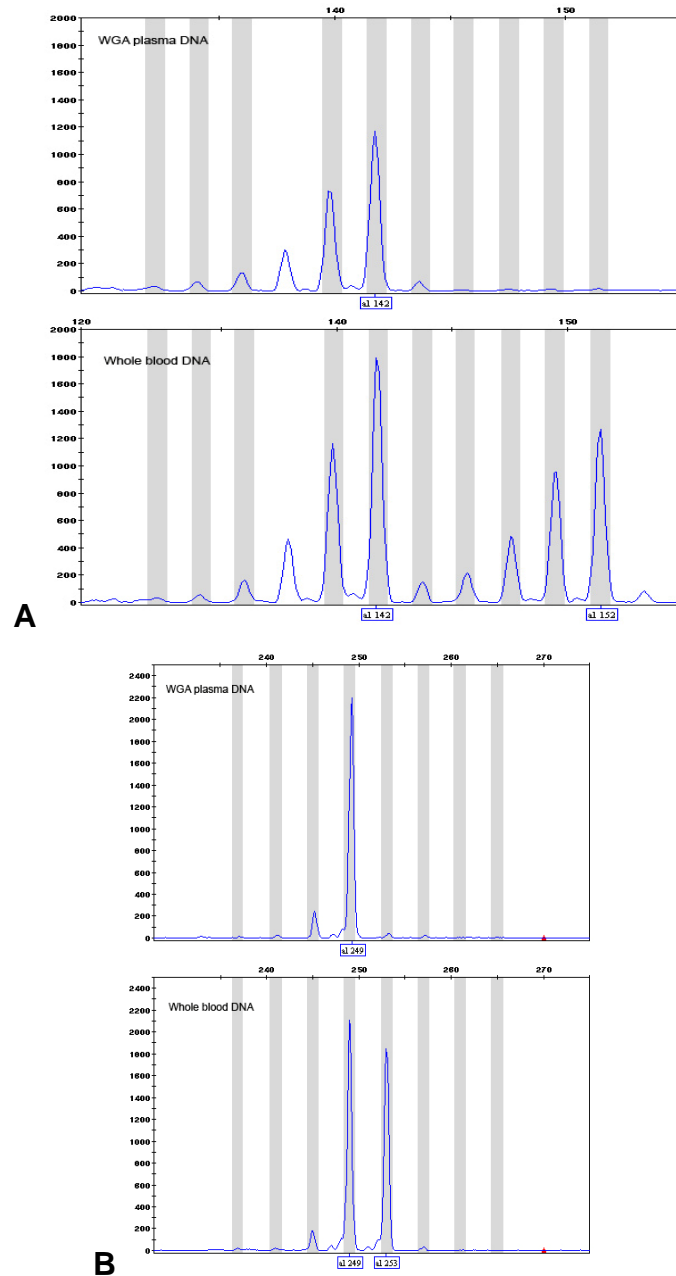
Des Weiteren waren 73 Diskordanzen der Genotypen (Diskordanzrate 19,8%) bei 18 der 41 Probenpärchen des Evaluierungs-Probensets zu beobachten. Der Großteil der fehlerhaften Genotypen, 67 von 73 (91,8%), trat besonders bei den 15 Proben auf, die schon während der SNP-Genotypisierung durch diskrepante Genotypen aufgefallen waren.



**Abbildung 20:** Darstellung einer Multiplexreaktion zur STR-Marker Analyse. Dargestellt sind die Marker D1S495, D11S1983 sowie D5S2498.

Wie schon bei den SNP-Untersuchungen zuvor stellten sich die Diskordanzen zwischen Vollblut-DNA und WGA-Plasma-DNA als Allelic Drop Outs seitens der WGA-Plasma-DNA dar, wie es in Abbildung 21, welche zwei verschiedene Loci vom gleichen Probanden darstellt, ersichtlich ist.

### 3. Ergebnisse

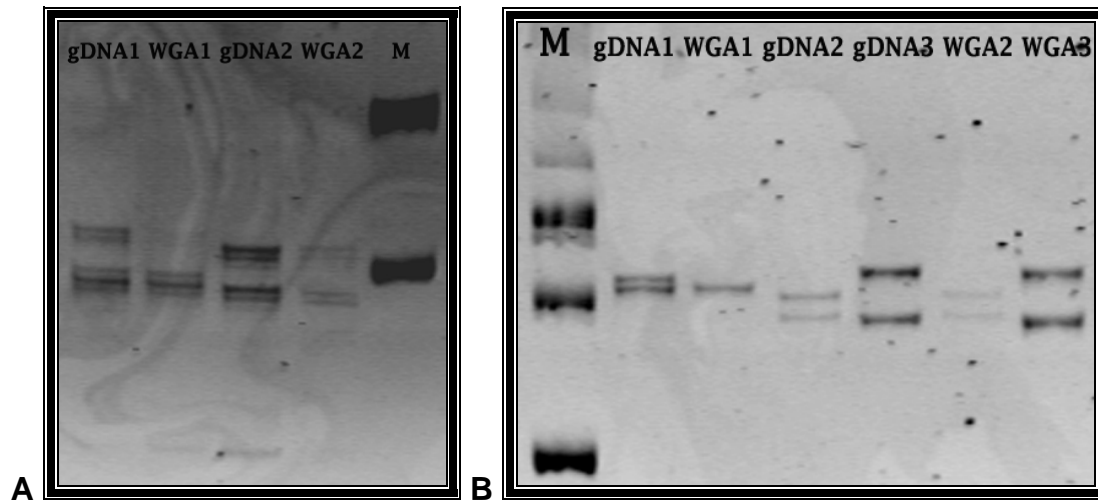


**Abbildung 21:** Vergleich zwischen WGA-Plasma-DNA und Vollblut-DNA der gleichen Person. A zeigt einen Allelverlust (Allelic Drop Out) der WGA-Plasma-DNA bei Locus D1S495 bzw. B bei Locus D5S2498. Die DNA-Proben wurden auf einem ABI Prism 3130XL Genetic Analyzer unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Primern analysiert.

Um methodenspezifische Artefakte auszuschließen und um die Methode auch für Laboratorien, denen kein Sequenzer mit einer hochauflösenden Kapillarelektrophorese zur Verfügung steht, nutzbar zu machen, wurden die Marker D1S495, D2S1338, D3S1314, D5S2498 and D12S2078 zusätzlich als

### 3. Ergebnisse

Uniplex auf einem 8% PAGE-Gel analysiert. Die Ergebnisse zeigten sich kongruent mit den mittels hochauflösender Kapillarelektrophorese gewonnenen Daten. Auch hier stellten sich die Allelic Drop Outs deutlich dar. Diese Methode ist jedoch bei weitem kostspieliger, aufgrund nicht programmierbarer Arbeitsabläufe fehleranfälliger und vor allem deutlich arbeitsaufwändiger.



**Abbildung 22:** Vergleich zwischen WGA-Plasma-DNA (WGA) und Vollblut-DNA (gDNA) der gleichen Person. A zeigt einen Allelverlust (Allelic Drop Out) der WGA-Plasma-DNA (WGA1) im Vergleich zur Vollblut-DNA (gDNA1) bei Locus D1S495. B zeigt einen Allelverlust (Allelic Drop Out) der WGA-Plasma-DNA (WGA1) im Vergleich zur Vollblut-DNA (gDNA1) bei Locus D5S2498. Die korrespondierenden Proben gDNA2 und WGA2 bzw. gDNA3 und WGA3 zeigen sich kongruent. Die DNA-Proben wurden auf einem 8% PAGE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. M kennzeichnet den Größenstandard.

### 3. Ergebnisse

STR	Vollblut-DNA			WGA-Plasma-DNA			Diskordanzen zwischen VB-DNA and WGA-DNA		Nach Ausschluss*	
	Call- Rate	Heterozy- gote (%)	HWE	Call- Rate	Heterozy- gote (%)	HWE	Vor Ausschluss	Nach Ausschluss*	Heterozy- gote (%)	HWE
	(%)			(%)						
D1S495	100.0	90.2	0.5291	97.6	70.0	<b>0.0000</b>	8	1	89.7	0.2777
D2S1338	100.0	82.3	0.6765	97.6	62.5	<b>0.0078</b>	8	1	79.3	0.6512
D3S1314	100.0	92.6	0.5307	100.0	70.7	0.1102	10	3	82.6	0.6708
D5S2498	100.0	95.1	0.8956	100.0	78.0	0.8817	6	0	86.2	0.7732
D8S1130	97.6	87.5	0.4649	100.0	70.7	0.1051	9	1	86.2	0.5136
D11S1983	100.0	85.3	0.4087	100.0	61.0	<b>0.0000</b>	11	1	79.3	0.3189
D12S2078	100.0	75.6	<b>0.0274</b>	95.1	69.2	<b>0.0157</b>	3	1	82.1	0.2329
D19S1167	95.1	87.2	0.4183	100.0	63.4	<b>0.0011</b>	12	1	79.3	0.0752
D20S481	90.2	75.6	0.6610	95.1	66.7	0.1088	6	1	78.6	0.2256
<b>Total</b>	<b>98.0</b>	<b>85.7</b>		<b>98.4</b>	<b>68.0</b>		<b>73 (19.8%)</b>	<b>10 (3.8%)</b>	<b>82.5</b>	

**Tabelle 34:** Vergleich der STR-Genotypisierung bei 41 Probenpärchen aus Vollblut-DNA und WGA-Plasma-DNA des Evaluierungs-Probensets. Insgesamt wurden 369 Genotypenpaare erhalten.

\* Die Diskordanzen, Heterozygotenfrequenz und das HWE wurden nach Ausschluss von 12 Individuen aufgrund des Ausschlusskriteriums (3.2.3) neu berechnet.

#### 3.2.3 Algorithmusentwicklung zum zuverlässigen Ausschluss nicht geeigneter WGA-Plasma-DNA-Proben

Aus den gewonnenen Daten berechneten wir, dass sich die Wahrscheinlichkeit für ein Individuum, einen homozygoten Wildtyp in fünf von neun Markern zu besitzen, weit unter 1% beläuft. Durch die gehäuft vorkommenden „allelischen Drop Outs“ resultierte bei den WGA-Plasma-DNA-Proben eine erniedrigte Heterozygotenfrequenz, was zur Folge hatte, dass auch die sehr seltene Konstellation mit fünf und mehr homozygoten Loci gehäuft auftrat. Weiterhin war zu beobachten, dass die meisten Diskordanzen zwischen Vollblut-DNA und WGA-Plasma-DNA bei denjenigen Probanden auftraten, bei denen fünf oder mehr homozygote Loci bei den neun STR-Markern in den WGA-Plasma-Proben vorkamen. Aus diesem Grund wurde ein Grenzwert von 5 oder mehr homozygoten Loci in diesem STR-Marker Set definiert, dem zufolge alle WGA-



Plasma-DNA-Proben ausgeschlossen wurden, die dieses Kriterium aufwiesen. Dies traf im Fall des Evaluierungs-Probensets bei 12 von 41 Proben zu.

Nach erneuter Analyse der bisher gewonnenen Daten bei den übrigen 29 Probenpärchen kam es dadurch zu einer Reduktion der diskordanten Genotypen bei den STR-Markern von 73 auf 10 und zu einer ausgeprägten Änderung der Diskordanzrate von 19,8% auf 3,8%. Gleichzeitig stieg die Heterozygotenfrequenz von 68% auf 82,5%, in einen Bereich, der vergleichbar war mit der Frequenz von 85,7% der Vollblut-DNA. Das HWE der untersuchten STRs zeigte sich nach Ausschluss der 12 Proben merklich verbessert, verglichen mit fünf Abweichungen vor Ausschluss dieser Proben (Tabelle 34).

Bei Vergleich der SNP-Genotypisierungs-Daten nach Anwendung des o.g. Kriteriums mit resultierendem Ausschluss der 12 Proben konnte eine deutliche Abnahme der Diskordanzrate von 4% auf 0,8% festgestellt werden (Tabelle 33, rechts).

### **3.3 Validierungs-Probenset**

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der aus den bisherigen Untersuchungen entwickelte Selektions-Algorithmus bei gleichem Versuchsaufbau bei 47 Probenpärchen, wiederum bestehend aus einer Vollblut-DNA und einer WGA-Plasma-Probe desselben Individuums, angewendet, um zu erforschen, ob sich die bisherigen Ergebnisse bestätigen ließen.

#### **3.3.1 STR-Analyse**

Die Ergebnisse der Genotypisierung des Validierungssets sind in Tabelle 35 angegeben. Die durchschnittlichen Call-Raten betragen 100% und 98,6% für die Vollblut-DNA bzw. die WGA-Plasma-DNA.

Vor Anwendung des Ausschlusskriteriums betrug die Heterozygotenfrequenz der WGA-Plasma-DNA durchschnittlich 74,4% und war damit deutlich niedriger als die der Vollblut-DNA mit 87,5%. Alle Marker der Vollblut-DNA, bis auf D12S2078, waren im HWE, wohingegen fünf Marker der WGA-Plasma-DNA

### 3. Ergebnisse

dieses verletzten. Die Diskordanzrate belief sich auf 12,8% bei 54 fehlerhaften Genotypen, alle in Form von Allelic Drop Outs auf Seiten der WGA-Plasma-DNA.

Acht der 47 WGA-Plasma-Proben wiesen fünf oder mehr homozygote Loci im STR-Marker-Set auf und wurden aufgrund des Selektions-Algorithmus (3.2.3) ausgeschlossen.

Nach nochmaliger Analyse der 39 verbliebenen Probenpärchen näherte sich die Heterozygotenfrequenz der WGA-Plasma-DNA-Proben mit 83,1% den Werten der Referenz-Vollblut-DNA an. Das HWE wurde nur noch an zwei Loci verletzt, wobei der Locus D12S2078 auch bei der Vollblut-DNA einen signifikanten Wert aufwies.

Die Diskordanzrate lag mit 3,9% bei 14 diskordanten Genotypen in einem deutlich niedrigeren Bereich (Tabelle 35).

STR	Vollblut-DNA			WGA-Plasma-DNA			Diskordanzen zwischen VB-DNA und WGA-DNA		Nach Ausschluss*	
	Call-Rate (%)	Heterozygote (%)	HWE	Call-Rate (%)	Heterozygote (%)	HWE	Vor Ausschluss	Nach Ausschluss *	Heterozygote (%)	HWE
D1S495	100.0	91.5	0.1537	100.0	78.7	<b>0.0485</b>	6	1	87.2	0.0704
D2S1338	100.0	87.0	0.2137	100.0	74.4	<b>0.0052</b>	7	2	82.1	<b>0.0177</b>
D3S1314	100.0	93.6	0.5259	100.0	82.9	0.1156	5	2	92.3	0.1126
D5S2498	100.0	93.6	0.8439	100.0	78.7	0.8088	7	1	92.3	0.9804
D8S1130	100.0	83.0	0.4848	97.9	73.9	0.1309	4	1	76.9	0.2007
D11S1983	100.0	97.9	0.3609	100.0	80.8	<b>0.0338</b>	9	3	92.3	0.2618
D12S2078	100.0	68.1	<b>0.0051</b>	97.9	56.5	<b>0.0108</b>	5	2	63.1	<b>0.0274</b>
D19S1167	100.0	91.5	0.9941	95.7	77.7	0.5163	5	0	89.7	0.9479
D20S481	100.0	83.0	0.3324	95.7	66.7	<b>0.0013</b>	6	2	72.2	0.1498
<b>Total</b>	<b>100.0</b>	<b>87.7</b>		<b>98.6</b>	<b>74.5</b>		<b>54 (12.8%)</b>	<b>14 (3.9%)</b>	<b>83.1</b>	

**Tabelle 35:** Vergleich der STR-Genotypisierung in 47 Probenpärchen aus Vollblut-DNA und WGA-Plasma-DNA des Validierungs-Probensets. Insgesamt wurden 423 Genotypenpaare erhalten.

\* Die Diskordanzen, Heterozygotenfrequenz und das HWE wurden nach Ausschluss von acht Individuen aufgrund des Ausschlusskriteriums (3.2.3) neu berechnet.

#### **3.3.2 SNP-Analyse**

##### **3.3.2.1 SNP-Analyse mittels MALDI-TOF**

Die SNP-Genotypisierung wurde in 3 Hexaplexen und einem Tetraplex ausgeführt. Bei vier der 22 SNPs (rs3792267, rs7607759, rs2227994, rs11114071) konnten keine Genotypen aufgrund technischer Probleme akquiriert werden. Die Fehlerquelle blieb auch diesmal unklar, da nach der PCR keine Auffälligkeiten zu finden waren. Somit wurden 18 SNPs, die mittels Maldi-TOF MS untersucht wurden, in die endgültige Analyse einbezogen.

Die Ergebnisse der Genotypisierung mittels Maldi-TOF MS sind aus Tabelle 36 ersichtlich. Die durchschnittlichen Call-Raten waren 99,6% bzw. 98,9% für die Vollblut-DNA und die WGA-Plasma-DNA. Alle SNPs der Vollblut-DNA waren im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE), im Gegensatz dazu traten bei der WGA-Plasma-DNA drei Verletzungen des HWE auf (Tabelle 36). Diese Abweichungen vom HWE waren nach Anlegen des Ausschlusskriteriums nicht mehr vorhanden.

Vor Anlegen des Kriteriums waren 31 der 846 (3,7%) Genotyppärchen diskordant, nach Ausschluss von 8 Individuen (Tabelle 36) nur mehr 3 von 703 Genotyppaaren. Dies entsprach einer Diskordanzrate von 0,4%.

Die als Qualitätskontrolle durchgeführte Doppelbestimmung der Genotypen zeigte zwischen der Vollblut-DNA jeweils eine Diskordanz, dies entsprach einer Diskordanzrate von 0,12%. Dasselbe Ergebnis zeigte sich auch bei der Doppelbestimmung der Genotypen zwischen den WGA-Plasma-Proben.

##### **3.3.2.2 SNP-Analyse mittels TaqMan**

Mittels TaqMan wurden drei weitere SNPs bei den 47 Probenpärchen untersucht. Die Ergebnisse der Genotypisierung sind in Tabelle 36 dargestellt. Die Call-Raten waren 97,8% bzw. 99,3% für die Vollblut-DNA und die WGA-Plasma-DNA.

Bei der Vollblut-DNA waren alle SNPs im HWE, rs675 verletzte bei der WGA-Plasma-DNA das HWE. Die Diskordanzrate betrug bei sechs Fehlern in 141 Genotyppaaren 4,3%.

Nach Ausschluss der acht Individuen (Tabelle 36) war die Verletzung des HWE seitens der WGA-Plasma-DNA wieder regredient, die Diskordanzrate verbesserte sich merklich auf 0,8%.

#### **3.3.2.3 Zusammenfassung der SNP-Analyse**

Zusammenfassend zeigen beide SNP-Analyse-Methoden ähnliche Ergebnisse. Insgesamt lag die Call-Rate bei 99,4% bzw. 99% für die Vollblut-DNA und die WGA-Plasma-DNA.

Vor Anwendung des Ausschlusskriteriums verletzten drei SNPs der WGA-Plasma-DNA das HWE, jedoch keiner der Vollblut-DNA. Die Diskordanzrate lag bei 3,7%. Nachdem die acht Individuen ausgeschlossen wurden, befanden sich alle WGA-Plasma-DNA-Proben im HWE, und es zeigte sich ein deutliches Absinken der Diskordanzrate auf 0,5% (Tabelle 36).

Somit konnten die unter 3.2 untersuchten Ergebnisse bestätigt und die Wirksamkeit des definierten Grenzwerts von fünf oder mehr homozygoten Loci für den Ausschluss fehlerhafter Proben im 9-STR-Marker Set in einem Validierungs-Probenaset aufgezeigt werden.

### 3. Ergebnisse

SNP	MAF (%)	<u>Vollblut-DNA</u>		<u>WGA-Plasma-DNA</u>		<u>Diskordanzen zwischen VB-DNA und WGA-DNA</u>		
		Call-Rate (%)	HWE	Call-Rate (%)	HWE	Vor Ausschluss	Nach Ausschluss *	HWE nach Ausschluss*
<b><u>Maldi-TOF MS</u></b>								
rs778331	21.3	100.0	0.9114	97.8	0.1618	3	0	0.4188
rs778285	29.8	100.0	0.9055	100.0	0.1374	4	0	0.4779
rs812382	12.8	100.0	0.3157	100.0	0.3157	0	0	0.3052
Chr.13, Pos.104982394 <sup>#</sup>	2.1	100.0	0.8815	97.8	<b>0.0000</b>	1	0	- **
rs5030952	12.8	100.0	0.3157	95.7	0.3020	0	0	0.2561
rs2975766	2.1	100.0	0.8815	97.8	<b>0.0010</b>	0	0	0.8694
rs2975762	46.8	100.0	0.2495	97.8	0.6764	2	0	0.2541
rs1058808	29.8	100.0	0.9055	100.0	0.5627	2	0	0.9962
rs13181	42.4	97.8	0.4445	97.8	0.7871	2	0	0.2313
rs10250	45.7	97.8	0.8061	97.8	0.0804	4	1	0.1645
rs8079197	30.9	100.0	0.5317	100.0	0.7682	3	1	0.7633
rs4252596	16.0	97.8	0.8097	97.8	0.9405	1	0	0.9234
rs1063539	14.9	100.0	0.2705	100.0	0.1777	1	0	0.1852
rs2036373	10.6	100.0	0.4144	100.0	0.6148	1	0	0.4754
rs2241766	16.0	100.0	0.3823	100.0	0.2705	1	0	0.1852
rs17366743	1.1	100.0	0.9412	100.0	0.9412	0	0	0.9353
rs3774261	44.3	100.0	0.4935	100.0	<b>0.0300</b>	5	1	0.1645
rs822394	9.6	100.0	0.4679	100.0	0.4726	1	0	0.4754
<b><u>TaqMan</u></b>								
rs675	16.3	97.8	0.0548	100.0	<b>0.0243</b>	1	0	0.1056
rs20417	21.7	97.8	0.8802	97.8	0.1796	3	1	0.5511
rs2569190	50.0	97.8	0.7681	100.0	0.4658	2	0	0.8727
<b>Total</b>	<b>22.7</b>	<b>99.4</b>		<b>99.0</b>		<b>37 (3.7%)</b>	<b>4 (0.5%)</b>	

**Tabelle 36:** Vergleich der SNP-Genotypisierung in 47 Probenpärchen bestehend aus einer Vollblut-DNA und einer mittels WGA amplifizierten Plasma-DNA derselben Person des Validierungs-Probensets. Achtzehn bzw. 3 SNPs wurden mittels Maldi-TOF-MS und TaqMan-Assays genotypisiert, daraus resultierten insgesamt 987 Genotyppaare.

\* Diskordanzen und das HWE wurden nach Ausschluss von acht Individuen mit fünf und mehr homozygoten STRs in den WGA-Plasma-Proben neu berechnet. Die STR-Marker sind aus Tabelle 35 ersichtlich.

\*\* Nach Ausschluss der Individuen mit 5 oder mehr homozygoten STR-Marker Loci waren alle Proben homozygot. Dadurch konnte kein HWE berechnet werden.

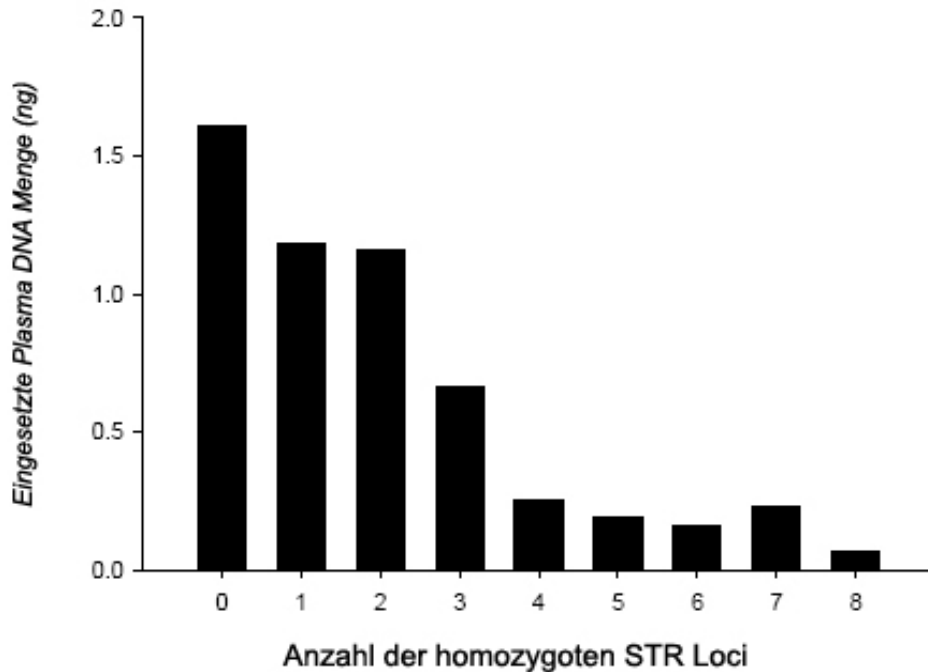
<sup>#</sup> Genaue Position: 13 dna: chromosome:NCBI36:13:104982394 (26-APR-2007)

#### **3.4 Zusammenfassende Auswertung der Ergebnisse**

Tabelle 37 und Abbildung 24 fassen die Resultate der Genotypisierung der 88 Probenpärchen aus Vollblut-DNA und WGA-Plasma-DNA zusammen. Daraus erschließen sich mehrere Gründe, alle WGA-Plasma-Proben, die homozygote Genotypen an fünf oder mehr Loci im 9-STR-Marker Set aufweisen, auszuschließen, jedoch könnte, wenn das Ausschlusskriterium stringenter behandelt werden sollte, die Grenze auch den Anforderungen entsprechend nach unten verschoben werden.

##### **3.4.1 Einfluss der Plasma-DNA-Menge auf die Anzahl homozygoter STR-Marker**

Betrachtet man den Einfluss der eingesetzten Plasma-DNA-Menge auf die Genotypisierung, so zeigt sich, dass mit sinkender extrahierter DNA-Menge und damit geringerer DNA-Menge als Template für die WGA-Reaktion ein Zusammenhang mit vermehrtem Auftreten von homozygoten Genotypen bei den untersuchten STR-Markern besteht (Abbildung 23 und Tabelle 37).



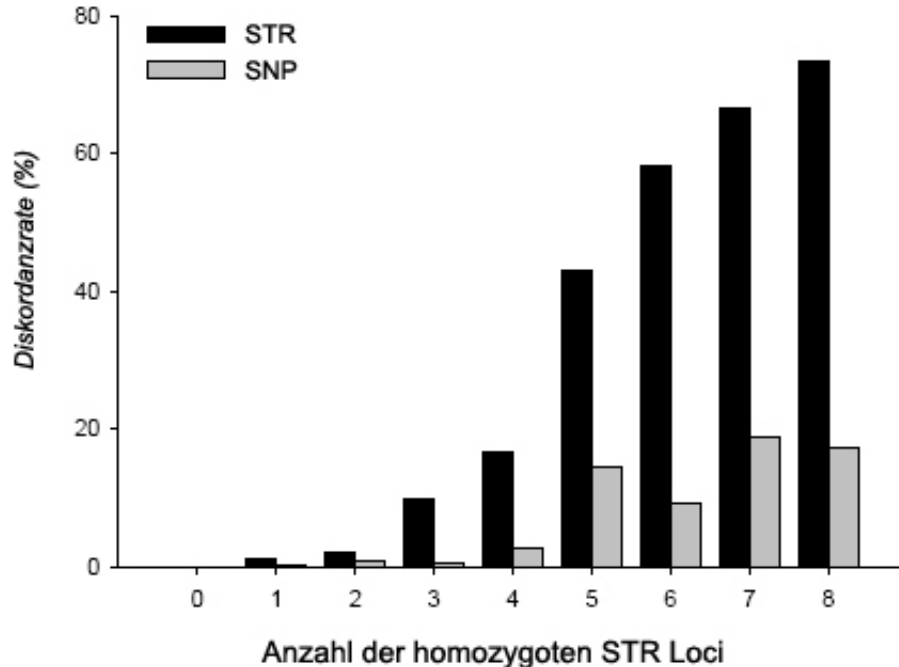
**Abbildung 23:** Einfluss der eingesetzten Plasma-DNA-Menge in die WGA-Reaktion auf die Anzahl der aufgetretenen homozygoten STR-Marker. Die steigende Anzahl homozygoter Loci korreliert mit einer geringeren in die WGA-Reaktion eingesetzten DNA-Menge.

#### 3.4.2 Abhängigkeit der Diskordanzrate von der Anzahl homozygoter STR-Marker

Bezüglich der Diskordanzrate für STRs bzw. SNPs zwischen Vollblut-DNA und WGA-Plasma-DNA zeigte sich ein deutlicher Anstieg der diskordanten Genotypen in Abhängigkeit von der Anzahl der homozygoten STR-Genotypen (Tabelle 37, Abbildung 24 und Abbildung 25).

Dabei wurden zwei unterschiedliche Betrachtungsweisen gewählt. Abbildung 24 zeigt die Diskordanzraten für SNPs und STRs zwischen Vollblut-DNA und WGA-Plasma-DNA in jeder Gruppe von Proben mit der entsprechenden Anzahl an homozygoten STRs, die in der WGA-Plasma-DNA gefunden wurden. Hier zeigt sich ein auffälliger Unterschied der Diskordanzraten von 2,89% für SNPs bzw. 16,67% für STRs bei vier homozygoten Loci und 14,6% für SNPs bzw. 43% für STRs bei fünf homozygoten Loci.

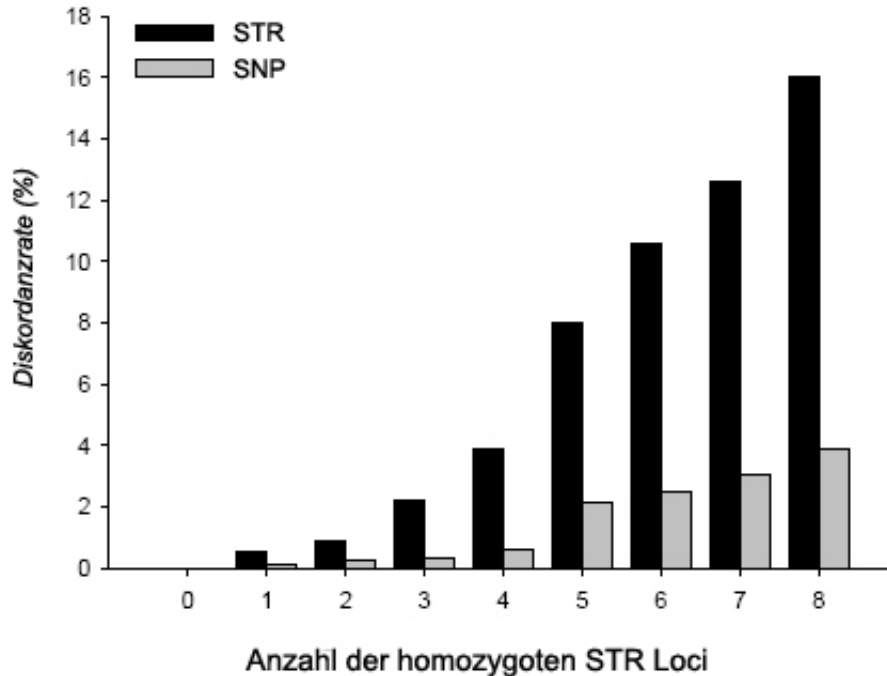
### 3. Ergebnisse



**Abbildung 24:** Diskordanzrate der WGA-Plasma-DNA-Proben im Vergleich zur Vollblut-DNA bezogen auf die jeweilige Gruppe an homozygoten WGA-Plasma-DNA-Proben im 9-STR-Marker Set. Die schwarzen Balken kennzeichnen die Diskordanzen der STRs, die grauen Balken die der SNPs.

Deutlich wird dies auch bei der anderen Betrachtungsweise. In Abbildung 25 bezieht sich die Diskordanzrate der SNPs und STRs zwischen Vollblut-DNA und WGA-Plasma-DNA auf die jeweilige Gesamtheit aller Genotypen derjenigen Proben, die bis zu der auf der x-Achse entsprechenden Anzahl an homozygoten STR-Loci eingeschlossen werden. Dort kommt es ab dem definierten Grenzwert (3.2.3) zu einem deutlichen Anstieg der Diskordanzrate von 0,63% für SNPs bzw. 3,92% für STRs bei vier homozygoten STR-Loci auf 2,12% für SNPs bzw. 8% für STRs bei fünf homozygoten STR-Loci. Damit wird gezeigt, dass die Diskordanzrate auf die angegebenen Werte minimiert werden kann, wenn alle Proben, die fünf oder mehr homozygote Loci in dem 9-STR-Marker Set aufweisen, ausgeschlossen werden.





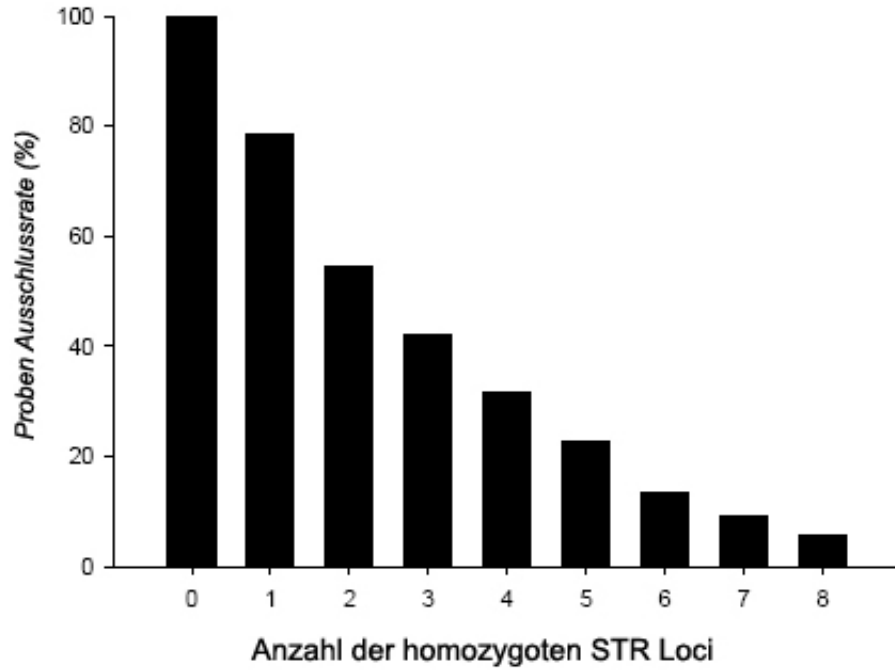
**Abbildung 25:** Diskordanzrate der WGA-Plasma-DNA-Proben im Vergleich zur Vollblut-DNA bezogen auf die jeweilige Gesamtheit aller Genotypen derjenigen Proben, die bis zu der auf der x-Achse entsprechenden Anzahl an homozygoten STR-Loci eingeschlossen wurden. Die schwarzen Balken kennzeichnen die Diskordanzen der STRs, die grauen Balken die der SNPs.

#### 3.4.3 Abhängigkeit der Probenausschlussrate von der Anzahl homozygoter STR-Marker

In Abbildung 26 wird die Ausschlussrate von WGA-Plasma-DNA-Proben in Abhängigkeit von der Anzahl aufgetretener homozygoter STR-Marker dargestellt. Sie zeigt den Kompromiss zwischen Genauigkeit der Genotypen und Ausschlussrate. Im Fall des in dieser Arbeit definierten Grenzwerts von fünf oder mehr homozygoten STR-Loci gehen 22,7% aller Proben verloren. Sollten die Genotypisierungsdaten jedoch präziser sein, wäre die Grenze bei weniger homozygoten STR-Markern zu ziehen, zum Preis einer erhöhten Ausschlussrate.

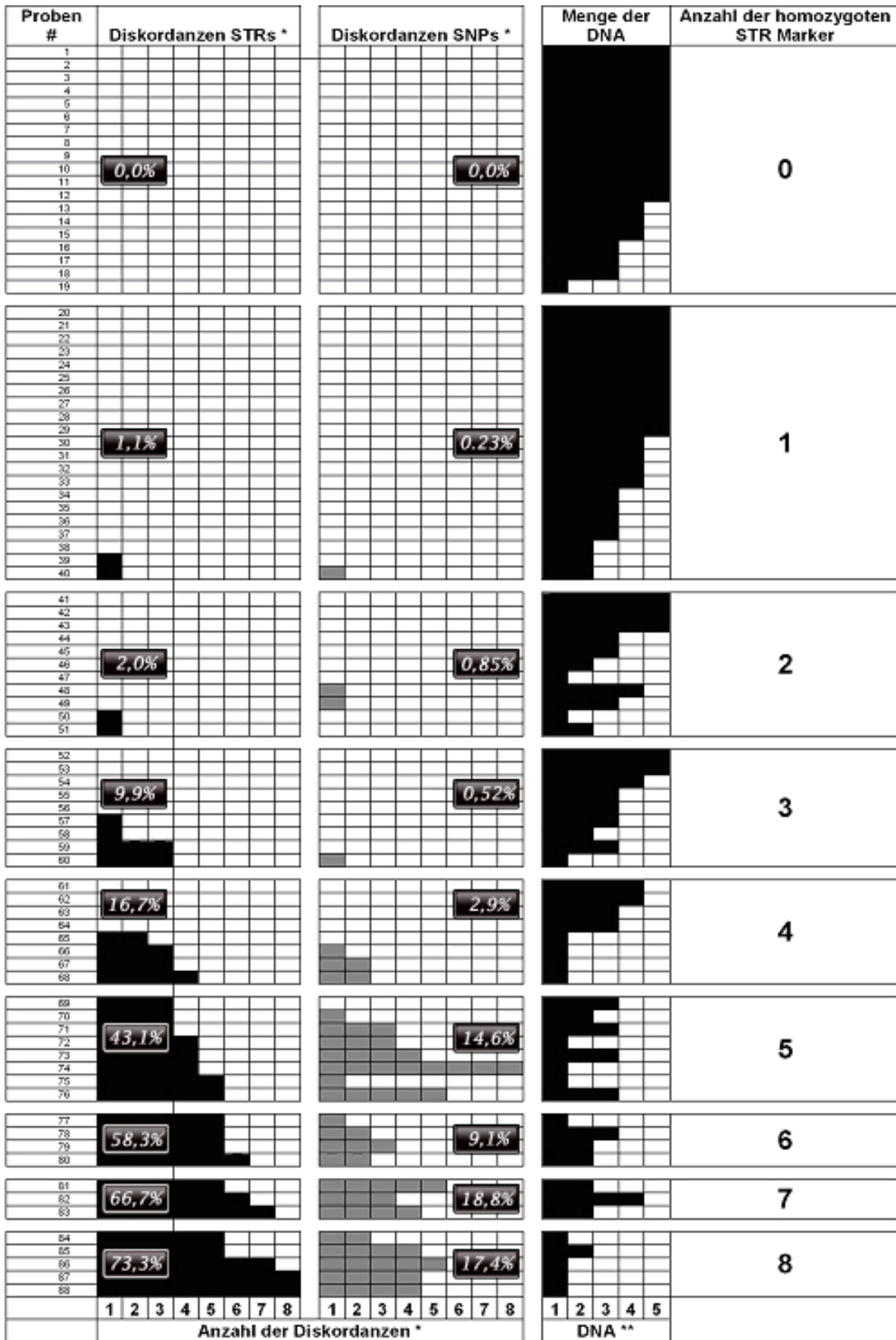
### 3. Ergebnisse

---



**Abbildung 26:** Ausschlussrate von Proben, wenn diejenigen Proben verworfen werden, die gleich viele bzw. mehr als die jeweilige Anzahl an homozygoten STR-Loci aufweisen.

### 3. Ergebnisse



**Tabelle 37:** Abhängigkeit der diskordanten Genotypen von der Anzahl der homozygoten STR-Marker und der Menge der in die WGA-Reaktion eingesetzten Plasma-DNA. Die Prozentzahlen zeigen die Diskordanzen für STRs und SNPs zwischen Vollblut-DNA und WGA-Plasma-DNA stratifiziert für die Anzahl der ermittelten Homozygoten bei den neun genotypisierten STR-Markern in der WGA-Plasma-DNA.

\* Die Balken kennzeichnen die Anzahl der Diskordanzen für STR-Marker (schwarz) und die SNPs (grau).

\*\* Menge der DNA in ng, welche in die WGA-Reaktion eingesetzt wurde, eingeteilt in Klassen: 1=  $\leq 0.1$  ng, 2= 0.11-0.20 ng, 3= 0.21-0.40 ng, 4= 0.41-0.80 ng, 5=  $> 0.80$  ng.

#### 3.4.4 Einfluss der Amplikongröße auf die Diskordanzrate

Es wurde auch untersucht, ob die Größe der DNA Amplikons einen Einfluss auf die Diskordanzrate der STR Marker hat und diese somit bei längeren Amplikons höher ausfällt. Wir beobachteten in jeder Gruppe der drei Amplikongrößen, eingeteilt in  $< 200$  bp (n=4), 200 – 250 bp (n=3) und  $> 250$  bp (n=2), ähnlich durchschnittliche Frequenzen der Diskordanzen von 8,75, 7,7 bzw. 7,5. Dies zeigt, daß die Amplikongröße in dem von uns amplifizierten Größenbereich keinen Einfluss auf die Diskordanzrate hat und die niedrigere Diskordanzrate der SNPs nicht durch die kleineren DNA-Amplikons, welche für deren Analyse benötigt werden, verursacht wird.

#### 3.4.5 Eingesetzte DNA-Menge als Ausschlusskriterium

Die bisherigen Ergebnisse zeigen einen eindeutigen Zusammenhang zwischen der Menge der eingesetzten Plasma-DNA in der WGA-Reaktion, der Anzahl der homozygot auftretenden Loci sowie dem Ausmaß der Diskordanzen. Je geringer die eingesetzte DNA-Menge war, umso häufiger kam es sowohl zum Auftreten homozygoter Genotypen bei den 9-STR-Markern, als auch einer erhöhten Diskordanzrate (Abbildung 23 und Tabelle 37).

Nichtsdestotrotz konnten einige Ausnahmen von dieser Regel beobachtet werden: Dies betraf Proben, die trotz einer eingesetzten DNA-Menge von mehr als 0,2 ng Diskordanzen in der STR- und SNP-Genotypisierung aufwiesen

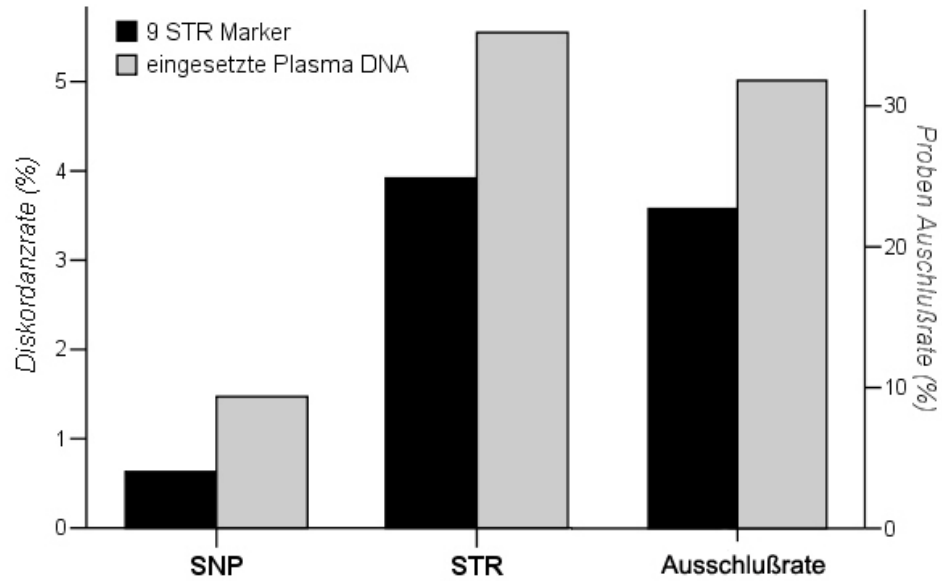
(Tabelle 37, Proben #48, 49, 69, 71, 73, 76, 78 and 82). Vier andere Proben hingegen zeigten keine Diskordanzen trotz einer eingesetzten DNA-Menge von unter 0,2 ng (Tabelle 37, Proben #19, 38, 46 and 47).

Würde man nun ein Ausschlusskriterium für nicht geeignete WGA-Plasma-DNA-Proben über die Menge der eingesetzten Plasma-DNA in die WGA-Reaktion definieren um sich den Schritt der STR-Analyse zu ersparen und die Ausschlussgrenze bei 0,2 ng eingesetzter Plasma-DNA ziehen, käme es im Vergleich zu dem unter 3.2.3 beschriebenen Algorithmus zu den im Folgenden beschriebenen Veränderungen.

Es würden 28 Probanden mit weniger als 0,2 ng eingesetzter Plasma-DNA von den insgesamt 88 Individuen ausgeschlossen. Dies bedeutet eine Probenausschlussrate von 31,81%, ein deutlicher Anstieg von 9,1% im Vergleich zu dem Ausschlusskriterium mittels 9-STR-Marker (22,7 % Ausschlussrate).

Die Diskordanzrate würde in den übrigen 60 Probenpärchen bei den STRs auf 5,55% und bei den SNPs auf 1,47% steigen, wiederum ein Anstieg von 1,63% (STRs) und 0,84% (SNPs) im Vergleich zum 9-STR-Marker-Algorithmus (Abbildung 27).

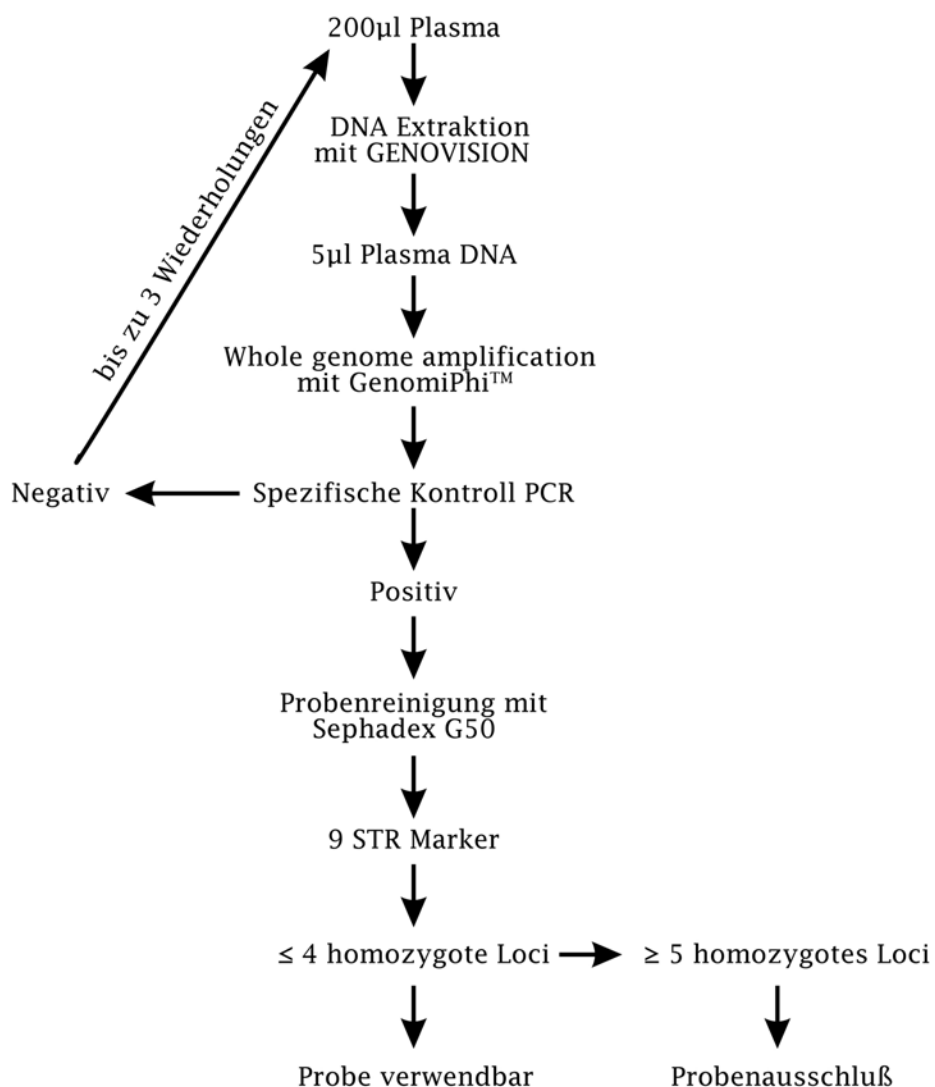
### 3. Ergebnisse



**Abbildung 27:** Darstellung der Unterschiede zwischen den beiden Ausschlußalgorithmen zum Ausschluss nicht geeigneter Plasma-DNA-Proben. Der 9-STR-Marker-Algorithmus ist schwarz gekennzeichnet, der Algorithmus über die eingesetzte Plasma-DNA-Menge grau. Betrachtet werden die Unterschiede in den Kategorien SNP- und STR-Diskordanzraten sowie der Probenausschlußrate.

### 4 Diskussion

Whole Genome Amplification (WGA) wurde in den letzten Jahren eine weit verbreitete und angesehene Methode, um DNA aus verschiedensten Quellen zu vervielfältigen und sie für unterschiedliche Anwendungen in ausreichender, fast unerschöpflicher Menge, verfügbar zu machen. Dazu werden gewöhnlich qualitativ hochwertige DNA-Stammlösungen verwendet, bei denen die einwandfreie Amplifikation mittels WGA ausführlich untersucht und nachgewiesen wurde. Allerdings stellt sie auch eine äußerst interessante Methode zur Vervielfältigung von sehr geringen Mengen DNA dar, wie sie in Plasma oder Serum vorkommen [157-160]. Dadurch eröffnen sich neue Möglichkeiten, insbesondere für genetische Studien bei Kohorten, deren Teilnehmer vor langer Zeit rekrutiert und bei denen, aufgrund der damals noch in den Kinderschuhen steckenden genetischen Untersuchungsmöglichkeiten bzw. der noch relativ geringen Bedeutung der Genetik, keine Vollblut-DNA, sondern nur Plasma- bzw. Serumproben gesammelt und archiviert wurden. Gleichwohl wurden in letzter Zeit bei Proben mit sehr geringen DNA-Mengen nach der WGA fehlerhafte Ergebnisse in Form von Allelausfällen (Allelic Drop Out) beschrieben [161]. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit eine Methode entwickelt, um aus Plasmaproben extrahierte DNA, welche anschließend mittels Whole Genome Amplification in ausreichender Menge verfügbar gemacht wurde, so auszuwählen, dass sie nachfolgend verlässlich genug ist, um für genetische Studien, welche SNP-Marker untersuchen, genutzt werden zu können. Dieser Methode liegt eine Kombination aus DNA-Extraktion, WGA und einer folgenden Genotypisierung mittels der hier verwendeten 9-STR-Marker zugrunde, in deren Anschluss diejenigen Proben mittels des entwickelten Selektionsalgorithmus ausgeschlossen werden, die an fünf oder mehr STR-Loci einen homozygoten Genotyp aufweisen (Abbildung 28).



**Abbildung 28:** Schematische Darstellung der Probenaufbereitung und Evaluation von geeigneten bzw. nicht geeigneten Proben.

Die DNA-Qualitätskriterien wurden bei 88 Probanden in Form eines Genotypenvergleichs zwischen einer WGA-Plasma-DNA und der korrespondierenden Vollblut-DNA desselben Individuums mittels zweier unterschiedlicher SNP-Genotypisierungsverfahren und neun hochpolymorphen STR-Markern untersucht. Aus etwa der Hälfte ( $n=41$ ) der Proben (Evaluierungs-Probenset) wurde ein Selektionsalgorithmus entwickelt, durch welchen, bezüglich Fehlerquote, nur unbedenkliche Plasma-DNA-Proben ausgewählt werden. Die Gültigkeit dieses Verfahrens konnte in der zweiten Hälfte ( $n=47$ ) der Proben (Validierungs-Probenset) nachgewiesen werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass dieser Algorithmus zur Trennung der „Spreu vom Weizen“



unabhängig von dem Vorhandensein einer Vollblut-DNA-Probe, zum Vergleich der spezifischen Sequenz, angewendet werden kann.

Durch die Verbindung aus spezieller DNA-Extraktion und hocheffektiver Whole Genome Amplification gelang es von allen Plasmaproben ausreichende Mengen DNA zu generieren, wenngleich bei einigen Individuen Wiederholungen dieser Arbeitsschritte mit verschiedenen Aliquots für den entsprechenden Erfolg vonnöten waren.

In der gesamten Studie mit den 88 Probenpärchen war eine hohe Diskordanzrate von 15,9% zwischen der WGA-Plasma-DNA und der Vollblut-DNA bei den 9-STR-Markern zu beobachten, wobei nur weniger als ein Viertel der Proben für diese Diskordanzen verantwortlich waren. Zwanzig Proben (22,7%), die an mindestens fünf der neun STR-Loci einen homozygoten Genotyp besaßen, wurden ausgeschlossen, so dass sich die Diskordanzrate für STR-Marker hierdurch auf 3,9% verringerte. Die erfolgreiche Anwendung des Algorithmus wurde zudem durch die Tatsache bestätigt, dass sich nicht nur die zuvor das HWE verletzenden STR-Marker nun wieder im Gleichgewicht befanden, sondern auch die Heterozygotenrate drastisch in einen ähnlich hohen Bereich wie die der Vollblut-DNA anstieg.

Bezüglich des Ausmaßes der Diskordanzen war ein deutlicher Zusammenhang zwischen den fehlerhaften Genotypen der STRs und denen der SNPs zu beobachten.

Dabei erwiesen sich die ausgewählten STR-Marker aufgrund ihrer wesentlich höheren Heterozygotenrate als deutlich fehleranfälliger und sensitiver für allelische Ausfälle als die SNP-Marker. Unterstützt wird dies durch frühere Beobachtungen, bei denen die Genotypisierungen von STRs mit geringen Mengen DNA, welche in die WGA-Reaktion eingesetzt wurden, häufiger mit Fehlern behaftet waren, als diejenigen Ergebnisse von SNP-Genotypisierungen [161]. Die Ursache dafür ist noch nicht geklärt, es besteht jedoch die Hypothese, dass dies in einem „replication slippage“ der DNA-Polymerase begründet sein könnte, einem Mechanismus, der bekannt ist für dynamische Deletionen bzw. Expansionen von STR-Sequenzen. Der WGA-Schritt, der zusätzlich zur PCR mehrere DNA-Replikationen bedeutet, bietet dadurch weitere Möglichkeiten für

STR-Deletionen/Expansionen durch DNA-Polymerase replication slippage. Darüber hinaus können zum Einen manche flankierende Sequenzen die WGA-Wirksamkeit beeinträchtigen, zum Anderen kann eine Allelverzerrung durch eine unausgewogene Primerbindung während einer exponentiellen Amplifikationsphase auftreten, was in beiden Fällen wiederum in einer Unterrepräsentierung von Loci resultiert [54;162;163].

Die Resultate dieser Arbeit demonstrieren klar, dass das vorgestellte 9-STR-Markerset eine sehr effektive Möglichkeit zum Abschätzen des Ausmaßes der Allelischen Drop Outs darstellt. Die Diskordanzrate der SNP-Genotypisierungen stieg deutlich, sobald eine Probe in dem 9-STR-Marker Set fünf oder mehr homozygote STR-Loci aufwies. Dies trat völlig unabhängig vom betreffenden Locus auf (Abbildung 25, Abbildung 24 und Tabelle 37). Folglich entwickelten wir diesen Ausschlussalgorithmus und wendeten ihn bei allen Individuen dieser Studie an, so dass 20 Proben (22,7%), die dieses Kriterium erfüllten, ausgeschlossen wurden. Eine Analyse der eingeschränkten Daten zeigte eine eindeutige Verbesserung aller Genotypisierungsergebnisse, die sich in einer steigenden Konkordanzrate für die SNP-Genotypen von ca. 96% auf 99,37% ausdrückte, ein Anstieg um 3,37%. Diese Diskordanzrate von 0,63% liegt in einem Fehlerbereich, wie er in vielen Laboratorien bei der Genotypisierung mit normaler Vollblut-DNA auftritt und kann in dieser Dimension akzeptiert werden [164].

### **4.1 Bedeutung des HWE**

Die p-Werte des HWE der SNPs der WGA-Plasma-DNA lagen nach Algorithmanwendung in einem sehr ähnlichen Bereich wie die Werte der SNPs der Vollblut-DNA. Deswegen könnte eine Abweichung vom HWE in den SNP-Genotypisierungsergebnissen auch als Hinweis auf eine hohe Diskordanzrate gedeutet werden. Allerdings muss auch bemerkt werden, dass ein SNP, das sich im HWE befindet, nicht unbedingt eine Garantie für das Auftreten von wenigen Genotypdiskordanzstellen sein kann, wie dies bei SNP rs2569190 im Proben-Evaluierungssatz mit einer Diskordanzrate von 12% bei

einem HWE-Wert von  $p=0,42$ , bzw. bei Analyse aller 88 Probenpärchen mit einer Diskordantenrate von 8% bei einem HWE-Wert von  $p=0,28$  der Fall war (Tabelle 33). Im Gegensatz dazu kam es bei SNP rs2975766 trotz keiner einzigen Diskordanz, nur aufgrund einer niedrigeren Call-Rate, zu einer Abweichung des HWE mit einem Wert von  $p=0,001$  (Tabelle 36). Dies zeigt, dass das HWE bei SNPs als Richtungsweiser für Diskordanzen mit Vorsicht zu betrachten ist.

Bei den STRs war eine Abweichung vom HWE etwas deutlicher mit dem gehäuften Auftreten von Diskordanzen assoziiert. Dies war besonders bei größeren Fallzahlen, wie bei der Analyse aller 88 Probenpärchen, eindrücklich zu beobachten (Tabelle 38). Vor Anwendung des Algorithmus zeigten acht von neun STR-Markern bei der WGA-Plasma-DNA eine Abweichung vom HWE, welche sich nach Ausschluss der 20 Proben wieder den Werten der Vollblut-DNA annäherten. Die Deutlichkeit dieser Abweichung bei den STRs ist womöglich durch die größere Anzahl der Diskordanzen im Vergleich zu denen der SNPs begründet (durchschnittliche Diskordanzrate pro Locus 14,1% bei den STRs, 3,3% bei den SNPs), als auch durch ihre hohe Heterozygotenfrequenz, sowie der Anzahl an unterschiedlichen auftretenden Allelen.

Zusätzlich war zu beobachten, dass der Marker D12S2078 auch bei der Vollblut-DNA eine starke Abweichung vom HWE aufwies. Dieser Marker liegt in der Nähe des HNF1 $\alpha$ -Gens (Hepatocyte nuclear factor 1 alpha), welches im Falle einer Mutation den Maturity Onset Diabetes of the Young Typ3 (MODY3) verursacht. Weiterhin steht das HNF1 $\alpha$ -Gen im Verdacht, eine Rolle bei Fehlbildungen der Niere zu spielen [165-169]. Dies könnte eine Erklärung dafür bieten, dass die Probanden dieser Studie, welche alle aus einer großen Studie von Nierenpatienten stammen, möglicherweise eine Assoziation mit diesem Locus aufweisen. Es war jedoch nicht Zielsetzung dieser Arbeit, dieses zu eruieren, es bietet dessen ungeachtet aber ein interessantes Ziel für weitere Nachforschungen.

## 4. Diskussion

STR	Vollblut-DNA			Plasma-WGA-DNA			Diskordanzen zwischen VB-DNA und WGA-DNA		Nach Ausschluss*	
	Call-Rate (%)	Heterozygote (%)	HWE	Call-Rate (%)	Heterozygote (%)	HWE	Vor Ausschluss	Nach Ausschluss*	Heterozygote (%)	HWE
D1S495	100.0	90.9	<b>0.0306</b>	98.9	74.6	<b>0.0000</b>	14	2	88.4	<b>0.0075</b>
D2S1338	100.0	84.8	0.5355	98.9	68.9	<b>0.0000</b>	15	3	80.8	0.1371
D3S1314	100.0	93.1	0.7737	100.0	77.2	<b>0.0993</b>	15	5	87.8	0.7658
D5S2498	100.0	94.3	0.6788	100.0	78.4	0.7865	13	1	89.5	0.8846
D8S1130	98.9	85.1	0.4700	98.9	72.4	<b>0.0422</b>	13	2	81.2	0.1573
D11S1983	100.0	92.0	0.4115	100.0	71.6	<b>0.0009</b>	20	4	86.2	0.4036
D12S2078	100.0	71.6	<b>0.0001</b>	96.6	62.4	<b>0.0000</b>	8	3	72.0	<b>0.0054</b>
D19S1167	97.7	89.5	0.8345	97.7	71.0	<b>0.0035</b>	17	1	84.9	0.4423
D20S481	96.6	79.6	0.1679	95.5	66.7	<b>0.0001</b>	12	3	75.2	<b>0.0239</b>
<b>Total</b>	<b>99.2</b>	<b>86.8</b>		<b>98.6</b>	<b>71.5</b>		<b>127 (16.0%)</b>	<b>24 (3.9%)</b>	<b>82.9</b>	

**Tabelle 38:** Vergleich der STR-Genotypisierung in allen 88 Probenpärchen aus Vollblut-DNA und WGA-Plasma-DNA. Insgesamt wurden 792 Genotypenpaare erhalten.

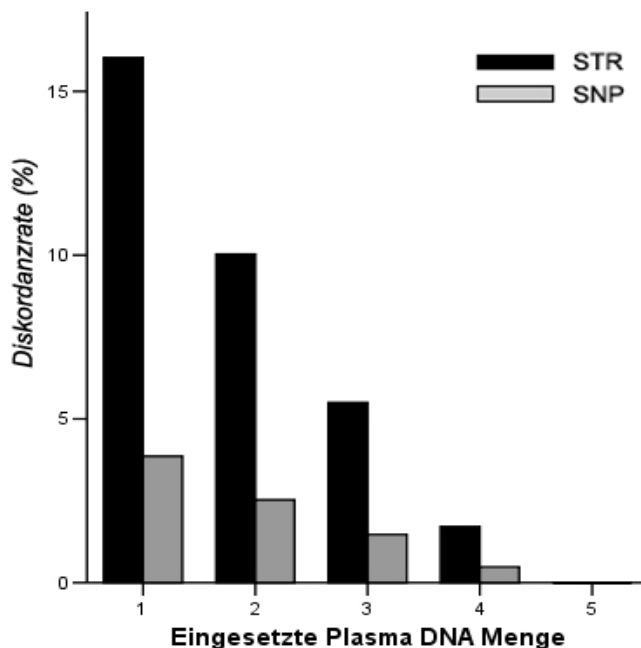
\* Die Diskordanzen, Heterozygotenfrequenz und das HWE wurden nach Ausschluss von 20 Individuen aufgrund des Ausschlusskriteriums (3.2.3) neu berechnet.

### 4.2 Bedeutung der eingesetzten DNA-Menge

Frühere Studien beschreiben einen Zusammenhang zwischen Menge der eingesetzten DNA in die WGA-Reaktion und der Güte der Genotypisierungsergebnisse [58;161]. Trotz ähnlicher Beobachtung in dieser Arbeit scheint ein auf der Menge der eingesetzten Plasma-DNA in die WGA-Reaktion basierender Ausschlussalgorithmus nicht die optimale Lösung zu sein. Auf der einen Seite zeigten einige Proben, obgleich sie eine ausreichend große Menge an eingesetzter DNA besaßen, ein hohes Maß an Diskordanzen, und auf der anderen Seite waren bei Proben mit sehr geringer eingesetzter DNA-Menge exakte Genotypisierungsergebnisse zu beobachten. Die von Bergen et al. empfohlene Mindestmenge von 10 ng eingesetzter DNA für SNP-Genotypisierungen bzw. 100 ng für STR-Genotypisierungen zum Ausschluss von Diskordanzen können bei dem Versuchsaufbau der hier vorgestellten Arbeit teilweise nicht erreicht werden. Bezüglich der SNPs erreichte die Diskordanzrate bei Bergen et al. aber nur einen Wert von maximal 0,12% bei vergleichbarem

Genotypisierungsablauf, so dass in seinem Aufsatz die Kriterien sehr streng gezogen wurden. Die STR-Diskordanzraten lagen in der Studie von Bergen et al. auch bei 100 ng eingesetzter DNA in die WGA-Reaktion mit 3,2% [161] in einem annähernd hohen Bereich wie bei der WGA-Plasma-DNA nach Anwendung des Ausschlusskriteriums mittels fünf oder mehr homozygoter Loci im 9-STR-Marker Set (3.2.3).

Aus Abbildung 29 wird ersichtlich, dass in unseren Versuchen schon ab mindestens 0,8 ng eingesetzter DNA-Menge sowohl bei den STR-Markern als auch bei den SNPs keine Diskordanzen mehr auftraten. Einen Ausschlussalgorithmus nur auf Basis der eingesetzten DNA-Menge anzuwenden würde dessen ungeachtet zu einer vergrößerten Probenausschlussrate und (bei 10% höherer Probenausschlussrate bei einem Algorithmusgrenzwert von 0,2 ng) im Fall der SNPs zu mehr als doppelt so großen Diskordanzraten im Vergleich zu dem vorgeschlagenen 9-STR-Marker Algorithmus führen. Dies zeigt erneut, dass der sich auf die STR-Analyse stützende Algorithmus den besten Kompromiss zwischen Probenausschlussrate und Diskordanzrate bietet.



**Abbildung 29:** Diskordanzrate der WGA-Plasma-DNA-Proben im Vergleich zur Vollblut-DNA bezogen auf die jeweilige Gesamtheit aller Genotypen derjenigen Proben, die bis zu der auf der x-Achse entsprechenden Menge\* an eingesetzter DNA in die WGA-Reaktion eingeschlossen wurden. Die schwarzen Balken kennzeichnen die Diskordanzen der STRs, die grauen Balken die der SNPs.

\*Menge der DNA, welche in die WGA-Reaktion eingesetzt wurde, eingeteilt in Klassen:

1=  $\leq 0.1$  ng, 2= 0.11-0.20 ng, 3= 0.21-0.40 ng, 4= 0.41-0.80 ng, 5=  $>0.80$  ng.

### 4.3 Bedeutung der Qualität der eingesetzten DNA

Es ist anzunehmen, dass nicht nur die Menge der eingesetzten DNA, sondern auch eine geringe Qualität der DNA-Stränge für eine induzierte Verzerrung der Allel amplifikation verantwortlich sein könnte. Dieser Fall für geringe Mengen an eingesetzter DNA wurde erst kürzlich von Pompanon et al. diskutiert [164]. Unlängst wurde festgestellt, dass degradierte DNA zu Allelausfällen führen kann [170]. Wenn diese nun als Startmaterial für die WGA-Reaktion dient, können vermehrt allelische Drop Outs beobachtet werden [41;171]. Da auch die Plasma-DNA durch die lange Lagerung eventuell degradiert sein könnte, wären Allelic Drop Outs zu erwarten. Ob nun ein Allelic Drop Out aber aufgrund einer degradierten DNA oder durch die Whole Genome Amplifikation aufgetreten ist,

lässt sich nicht nachvollziehen. Ein primär angedachter zusätzlicher Vergleich zwischen Vollblut-DNA, Plasma-DNA und WGA-Plasma-DNA scheiterte an der sehr niedrigen Call-Rate nach Kontroll-PCR von unter 20% der nicht hoch amplifizierten Plasma-DNA (Daten nicht gezeigt).

In unserem Vergleich zwischen Vollblut-DNA und WGA-Plasma-DNA werden beide mögliche Effekte berücksichtigt. Nach Anwendung des Ausschlusskriteriums mittels der 9-STR-Marker kann das Ausmaß der Allelausfälle, unabhängig von deren Ursache, abgeschätzt werden. Damit könnte dieser Algorithmus auch zur Beurteilung der Güte von genomischer Vollblut-DNA verwendet werden, welche zum Beispiel durch mehrmaliges Auftauen und Einfrieren degradiert sein könnte.

### **4.4 Vergleich mit anderen Studien**

Im Verlauf der Entstehung dieser Arbeit erschienen zwei Studien, die sich auch mit Whole Genome Amplification mittels  $\Phi$ 29-DNA-Polymerase aus Plasmaproben beschäftigten [157;159]. Tabelle 39 zeigt eine Übersicht zu den verwendeten Methoden und Ergebnissen.

Die Studien unterscheiden sich von unserer Methode in der DNA-Extraktionsmethode, in dem Design des DNA-Vergleichs, in der Anzahl der Untersuchung von genetischen Markern sowie im Ergebnis im Ausmaß der Diskordanzen. Beide verwenden als Vergleichs-DNA zur WGA-Plasma-DNA die in die WGA-Reaktion eingesetzte original Plasma-DNA. Dadurch kann in beiden Studien nur der Effekt der WGA-Reaktion auf etwaige Diskordanzen untersucht werden, was in vielen anderen Studien ausführlich gezeigt wurde [39;172;173]. Der entscheidende Vorteil unserer Arbeit hingegen ist, dass durch den Vergleich der WGA-Plasma-DNA mit der Vollblut-DNA, dem Goldstandard sozusagen, zusätzlich der Effekt einer Allelverzerrung aufgrund allelischem Drop Out bedingt durch eine mögliche Degradierung oder einer anderweitig schlechten Qualität der ursprünglichen Plasma-DNA bestimmt werden kann.

## 4. Diskussion

Dies wäre möglicherweise eine Erklärung für unser 24-fach bzw. 73-fach größeres Ausmaß an SNP-Diskordanzen, die allein durch die 5 mal bzw. 15 mal größere Genotypenanzahl nicht ausreichend begründet werden kann.

	<b>Studie</b>		
	Sjoholm et al.	Lu et al.	Schoenborn
Untersuchte Proben	31	528	88
DNA-Extraktion	QIAamp MinElute Virus Spin Kit	QIAamp DNA Blood Mini Kit	MagAttract DNA Blood Midi M96 Kit
WGA-Kit	GenomiPhi	Repli-g	GenomiPhi
Referenz-DNA	Prä-WGA-Plasma-DNA	Prä-WGA-Plasma-DNA	Vollblut-DNA
Vergleichs-DNA	Post-WGA-Plasma-DNA	Post-WGA-Plasma-DNA	Post-WGA-Plasma-DNA
Untersuchte SNP-Loci	4	8	22*/21**
Genotypen SNP	124	364	1889
Diskordanzen SNP	0	3	73
Untersuchte STR-Loci	0	0	9
Genotypen STR	0	0	792
Diskordanzen STR	0	0	127

**Tabelle 39:** Vergleich der Studien, die bisher zu WGA aus Plasma-DNA erschienen sind.

\* Evaluations-Probenstet; \*\*Validierungs-Probenstet

Ein Einfluss der verschiedenen DNA-Extraktionsmethoden kann an für sich ausgeschlossen werden, da es sich bei allen drei kommerziell erhältlichen Kits um etablierte Methoden [174] handelt und sich die erhaltenen DNA-Mengen in einem vergleichbaren Bereich bewegen. Ebenso ist der Repli-g Kit ein analoger WGA-Kit zu GenomiPhi und zeigt bis auf eine etwas erhöhte DNA-Ausbeute speziell in Bezug auf die Fehleranfälligkeit keine Unterschiede [175]. Da die Genotypisierung zum Teil ebenfalls mit der gleichen Methode (TaqMan) durchgeführt wurde, bleibt schlussendlich nur die eingesetzte DNA als unbekannter Faktor.



Zusammenfassend ist unsere Studie die bisher größte und bezüglich der STR-Marker erste, die sich mit WGA aus Plasma-DNA beschäftigt hat. Ferner empfehlen wir einen kritischen Umgang mit den gewonnenen Daten aus WGA-Plasma-DNA und das diese zunächst einer strengen Qualitätskontrolle in Form einer Überprüfung auf allelische Drop Outs bedürfen.

### **4.5 Statistische Überlegungen**

Unsere Daten unterstreichen den schwierigen Kompromiss zwischen Fehlerfreiheit der Genotypen und dem Verlust von Proben aufgrund eines Ausschlusses basierend auf dem 9-STR-Marker Set (3.4). Aus der statistischen Methodik ist bekannt, dass Genotypisierungsfehler verzerrte Assoziationsschätzungen und -annahmen verursachen können, welche meistens in einer Unterschätzung der Effekte resultieren [176]. In Anbetracht des enormen informativen Wertes der lang bestehenden longitudinalen Kohortenstudien, in denen von einem Teil bzw. allen Teilnehmern keine DNA akquiriert und gelagert wurde, ist eine Einschränkung auf Proben mit zuverlässiger WGA-Plasma-DNA zur Vermeidung falscher Assoziationen obligatorisch. Darüber hinaus können durch den Ausschluss fehlerbehafteter DNA in etwa einem Viertel der Proben die Kosten der Genotypisierung auf lange Sicht reduziert werden, insbesondere wenn viele SNPs in dieser Kohorte untersucht werden.

Die statistische Theorie sagt voraus, dass ein Genotypisierungsfehler, der sich nicht zwischen den Gesunden („Controls“) und den Erkrankten („Cases“) unterscheidet, das heißt ein nicht differenzierter Fehler, einen systematischen Fehler gegen Null verursacht. Anders ausgedrückt, eine wirklich existierende Assoziation mit einer Krankheit würde unterschätzt werden. Im Gegensatz dazu sollte ein differenzierter Genotypisierungsfehler, also ein Genotypisierungsfehler der zwischen Erkrankten und Gesunden unterschiedlich auftritt, unter allen Umständen vermieden werden, weil die Richtung der Verzerrung der Ergebnisse nicht vorausberechnet und dadurch sowohl eine falsche Assoziation als auch eine Verzerrung gegen Null verursacht werden kann.

Zur Veranschaulichung sei folgendes, diese Arbeit betreffendes Beispiel angedacht: Betrachtet man eine Kohortenstudie, in der eine Überlebensanalyse durchgeführt werden soll, wobei von allen Überlebenden eine Vollblut-DNA-Probe in einer Verlaufskontrolle abgenommen wurde, so stellen diese Probanden die Kontrollen dar. Bei den bereits verstorbenen Individuen (=Cases) konnte keine Vollblut-DNA mehr akquiriert werden und daher müsste ihre DNA via WGA-Reaktion aus Plasma generiert werden. Die in einigen Fällen schlechtere DNA-Qualität der WGA-Plasma-DNA könnte bei den Verstorbenen eventuell größere Genotypisierungsfehler im Vergleich zur Vollblut-DNA der Überlebenden verursachen und somit zu falsch positiven oder falsch negativen Assoziationen führen.

Dieser differenzierte Genotypisierungsfehler kann durch den von uns vorgeschlagenen Ausschlussalgorithmus deutlich abgeschwächt werden, da das Ausmaß der Genotypisierungsfehler sehr gering gehalten wird. Der Algorithmus funktioniert nicht nur unabhängig, falls keine Vollblut-DNA verfügbar ist, sondern bietet auch ein nützliches Hilfsmittel, um die Vergleichbarkeit von DNA-Genotypen einer Untergruppe, deren DNA aus einer WGA-Reaktion stammt, mit den Vollblut-DNA Genotypen des Rests zu sichern.

Schlussendlich sollte noch angemerkt werden, dass dieses Schema des Ausschlussalgorithmus mittels der 9 Marker nicht in Assoziationsstudien von Erkrankungen eingesetzt werden sollte, wenn einer der 9 STRs in Verdacht steht, mit der untersuchten Erkrankung assoziiert zu sein, da dies wiederum zu einer Verzerrung der Ergebnisse führen könnte. Dies wären nach heutigem Stand der Forschung familiäre Hypomagnesiämie mit Hyperkalziurie und Nephrokalzinose (FHHNC) bei Marker D3S1314 [177]; Maturity Onset Diabetes of the Young, Insulinresistenz, Myopie und Prostatakarzinome für Marker D8S1130 [178-181]; Osteoarthritis der Hand für Marker D11S1183 [182]; Maturity Onset Diabetes of the Young Typ 3, abdominale Fettspeicherung sowie Fehlbildungen der Niere, die im Zusammenhang mit dem HNF1 $\alpha$ -Gen stehen, für Marker D12S2078 [165-169;183]; Obesitas und genetisch bedingte Mikroalbuminämie für Marker D20S481 [184;185]. Eine Lösung dieses Problems wäre, den betroffenen Marker durch einen anderen Marker mit einer

ähnlich hohen Heterozygotenrate, der keine Assoziation zu dieser Erkrankung besitzt, auszutauschen.

### **4.6 Fazit und Ausblick**

Die Quintessenz dieser Arbeit ist, dass Whole Genome Amplification von aus Plasma extrahierter DNA ein wertvolles Hilfsmittel zur Beschaffung von DNA aus früheren Studien sein kann, in denen diese nicht gesammelt und archiviert wurde, und somit dieses, durch den langen Beobachtungszeitraum hochinteressante Patientenkollektiv, für genetische Untersuchungen verfügbar macht. Diese Methode muss mit einem Selektionsverfahren kombiniert werden, um eine zuverlässige DNA-Qualität zu sichern. Dazu wird in dieser Studie ein Ausschlussalgorithmus vorgestellt, der auf der Genotypisierung von 9 hochpolymorphen STR-Markern mit geringer Wahrscheinlichkeit, homozygot zu sein, beruht und durch den Proben mit einer großen Anzahl homozygoter STR-Loci ausgeschlossen werden, da sich diese aufgrund von Allelverlusten als fehlerbehaftet herausgestellt haben. Da ungenügende DNA-Qualität mit Genotypisierungsfehlern vergesellschaftet ist und diese wiederum zu falschen Assoziationen führen können, sollte dieser zusätzliche Arbeits- und Kostenaufwand der 9-STR-Marker-Genotypisierung durch neue, unschätzbar wertvolle Informationen wieder aufgewogen werden.

Die momentane Durchführung der Rekrutierung der gesamten Population der Nierenpatientenstudie mit ca. 550 zusätzlichen Patienten, von denen nur Plasmaproben vorhanden sind, zeigt, dass sich die Methode auch problemlos im großen Umfang umsetzen lässt. Dabei weisen die bisher erhaltenen Ergebnisse darauf hin, dass sich die Ausschlussrate konstant in einem Bereich von ca. 20 % bewegt.

Nach Rekrutierung kompletter Studien wird es interessant sein, ob Assoziationen mit diversen Erkrankungen oder Phänotypen gefunden werden und ob diese Ergebnisse in Studien, deren DNA aus Vollblut gewonnen wurde, repliziert werden können. Dies wäre der endgültige Beweis für die Funktionsfähigkeit der hier vorgestellten Methode.

## 5 Zusammenfassung

Plasma- und Serumproben waren in früheren epidemiologischen Studien häufig das einzige biologische Material, das gesammelt und untersucht wurde. Diese Studien besitzen gerade durch ihren sehr langen Untersuchungszeitraum einen riesigen Informationsgehalt und wären ein unbezahlbarer Schatz für genetische Analysen. Oft ist aufgrund damals mangelnder Akquirierung jedoch keine genomische DNA verfügbar. Um die in Plasmaproben in geringer Menge vorkommende DNA verwenden zu können, extrahierten wir die DNA mit Hilfe von magnetischen Partikeln und setzten sie in eine Whole Genome Amplification (WGA) mittels  $\Phi$ 29-DNA-Polymerase ein. Wir stellten 88 Probenpärchen, bestehend aus einer WGA-Plasma-DNA und der korrespondierenden Vollblut-DNA derselben Person, zusammen und genotypisierten bei diesen neun hochpolymorphe Short Tandem Repeats (STR) und 25 SNPs. Die durchschnittliche innerhalb der Probenpaare auftretende Diskordanzrate betrug 3,8% für SNPs sowie 15,9% für STRs. Basierend auf den Ergebnissen der Hälfte der Probenpaare entwickelten wir einen Ausschlussalgorithmus und validierten diesen in der anderen Hälfte der Probenpaare. Mit diesem ist es möglich, zum Einen diejenigen Proben mit einer guten DNA-Qualität herauszufiltern, um Genotypisierungsfehler zu vermeiden, und zum Anderen jene Proben mit insuffizienter DNA-Qualität auszuschließen. Nachdem Proben, die fünf oder mehr homozygote Loci in dem 9-STR-Markerset aufwiesen, ausgeschlossen wurden, resultierte dies in einer Ausschlussrate von 22,7% und senkte die durchschnittliche Diskordanzrate auf 3,92% für STRs bzw. 0,63% für SNPs. Bei SNPs entspricht dieser Wert ungefähr der Fehlerquote, wie er auch bei Genotypisierungen mit Vollblut-DNA in vielen Laboratorien auftritt. Unsere Methode und das Ausschlusskriterium bieten damit neue Möglichkeiten, um zuverlässige DNA aus archivierten Plasmaproben wiederzugewinnen. Dieser Algorithmus ist auch besser geeignet, als nur die eingesetzte DNA-Menge in die WGA-Reaktion als Kriterium zu benützen.

## 6 Literaturverzeichnis

### Reference List

- [1] Arking DE, Pfeufer A, Post W, Kao WH, Newton-Cheh C, Ikeda M, West K, Kashuk C, Akyol M, Perz S, Jalilzadeh S, Illig T, Gieger C, Guo CY, Larson MG, Wichmann HE, Marban E, O'Donnell CJ, Hirschhorn JN, Kaab S, Spooner PM, Meitinger T, Chakravarti A: A common genetic variant in the NOS1 regulator NOS1AP modulates cardiac repolarization. *Nat Genet* 2006;38:644-651.
- [2] Carlson CS, Eberle MA, Kruglyak L, Nickerson DA: Mapping complex disease loci in whole-genome association studies. *Nature* 27-5-2004;429:446-452.
- [3] Dawber TR, Kannel WB: The Framingham study. An epidemiological approach to coronary heart disease. *Circulation* 1966;34:553-555.
- [4] Belanger CF, Hennekens CH, Rosner B, Speizer FE: The nurses' health study. *Am J Nurs* 1978;78:1039-1040.
- [5] Blomeke B, Bennett WP, Harris CC, Shields PG: Serum, plasma and paraffin-embedded tissues as sources of DNA for studying cancer susceptibility genes. *Carcinogenesis* 1997;18:1271-1275.
- [6] Stemmer C, Beau-Faller M, Pencreac'h E, Guerin E, Schneider A, Jaqmin D, Quoix E, Gaub MP, Oudet P: Use of magnetic beads for plasma cell-free DNA extraction: toward automation of plasma DNA analysis for molecular diagnostics. *Clin Chem* 2003;49:1953-1955.
- [7] Nelson DL, Ledbetter SA, Corbo L, Victoria MF, Ramirez-Solis R, Webster TD, Ledbetter DH, Caskey CT: Alu polymerase chain reaction: a method for rapid isolation of human-specific sequences from complex DNA sources. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:6686-6690.
- [8] Kolomietz E, Meyn MS, Pandita A, Squire JA: The role of Alu repeat clusters as mediators of recurrent chromosomal aberrations in tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 2002;35:97-112.
- [9] Korenberg JR, Rykowski MC: Human genome organization: Alu, lines, and the molecular structure of metaphase chromosome bands. *Cell* 6-5-1988;53:391-400.
- [10] Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjold M, Ponder BA, Tunnacliffe A: Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 1992;13:718-725.

- [11] Hirose Y, Aldape K, Takahashi M, Berger MS, Feuerstein BG: Tissue microdissection and degenerate oligonucleotide primed-polymerase chain reaction (DOP-PCR) is an effective method to analyze genetic aberrations in invasive tumors. *J Mol Diagn* 2001;3:62-67.
- [12] Huang Q, Schantz SP, Rao PH, Mo J, McCormick SA, Chaganti RS: Improving degenerate oligonucleotide primed PCR-comparative genomic hybridization for analysis of DNA copy number changes in tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;28:395-403.
- [13] Kittler R, Stoneking M, Kayser M: A whole genome amplification method to generate long fragments from low quantities of genomic DNA. *Anal Biochem* 15-1-2002;300:237-244.
- [14] Kuukasjarvi T, Tanner M, Pennanen S, Karhu R, Visakorpi T, Isola J: Optimizing DOP-PCR for universal amplification of small DNA samples in comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1997;18:94-101.
- [15] Larsen J, Ottesen AM, Lundsteen C, Leffers H, Larsen JK: Optimization of DOP-PCR amplification of DNA for high-resolution comparative genomic hybridization analysis. *Cytometry* 1-8-2001;44:317-325.
- [16] Ottesen AM, Skakkebaek NE, Lundsteen C, Leffers H, Larsen J, Rajpert-De ME: High-resolution comparative genomic hybridization detects extra chromosome arm 12p material in most cases of carcinoma in situ adjacent to overt germ cell tumors, but not before the invasive tumor development. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;38:117-125.
- [17] Beheshti B, Vukovic B, Marrano P, Squire JA, Park PC: Resolution of genotypic heterogeneity in prostate tumors using polymerase chain reaction and comparative genomic hybridization on microdissected carcinoma and prostatic intraepithelial neoplasia foci. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;137:15-22.
- [18] Harada T, Okita K, Shiraishi K, Kusano N, Furuya T, Oga A, Kawauchi S, Kondoh S, Sasaki K: Detection of genetic alterations in pancreatic cancers by comparative genomic hybridization coupled with tissue microdissection and degenerate oligonucleotide primed polymerase chain reaction. *Oncology* 2002;62:251-258.
- [19] Peng DF, Sugihara H, Mukaisho K, Tsubosa Y, Hattori T: Alterations of chromosomal copy number during progression of diffuse-type gastric carcinomas: metaphase- and array-based comparative genomic hybridization analyses of multiple samples from individual tumours. *J Pathol* 2003;201:439-450.

- [20] Grant SF, Steinlicht S, Nentwich U, Kern R, Burwinkel B, Tolle R: SNP genotyping on a genome-wide amplified DOP-PCR template. *Nucleic Acids Res* 15-11-2002;30:e125.
- [21] Barbaux S, Poirier O, Cambien F: Use of degenerate oligonucleotide primed PCR (DOP-PCR) for the genotyping of low-concentration DNA samples. *J Mol Med* 2001;79:329-332.
- [22] Cheung VG, Nelson SF: Whole genome amplification using a degenerate oligonucleotide primer allows hundreds of genotypes to be performed on less than one nanogram of genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 10-12-1996;93:14676-14679.
- [23] Dean FB, Hosono S, Fang L, Wu X, Faruqi AF, Bray-Ward P, Sun Z, Zong Q, Du Y, Du J, Driscoll M, Song W, Kingsmore SF, Egholm M, Lasken RS: Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 16-4-2002;99:5261-5266.
- [24] Zhang L, Cui X, Schmitt K, Hubert R, Navidi W, Arnheim N: Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1-7-1992;89:5847-5851.
- [25] Dietmaier W, Hartmann A, Wallinger S, Heinmoller E, Kerner T, Endl E, Jauch KW, Hofstadter F, Ruschoff J: Multiple mutation analyses in single tumor cells with improved whole genome amplification. *Am J Pathol* 1999;154:83-95.
- [26] Bataille F, Rummele P, Dietmaier W, Gaag D, Klebl F, Reichle A, Wild P, Hofstadter F, Hartmann A: Alterations in p53 predict response to preoperative high dose chemotherapy in patients with gastric cancer. *Mol Pathol* 2003;56:286-292.
- [27] Heinmoller E, Dietmaier W, Zirngibl H, Heinmoller P, Scaringe W, Jauch KW, Hofstadter F, Ruschoff J: Molecular analysis of microdissected tumors and preneoplastic intraductal lesions in pancreatic carcinoma. *Am J Pathol* 2000;157:83-92.
- [28] Heinmoller E, Liu Q, Sun Y, Schlake G, Hill KA, Weiss LM, Sommer SS: Toward efficient analysis of mutations in single cells from ethanol-fixed, paraffin-embedded, and immunohistochemically stained tissues. *Lab Invest* 2002;82:443-453.
- [29] Heinmoller E, Bockholt A, Werther M, Ziemer M, Muller A, Ghadimi BM, Ruschoff J: Laser microdissection of small tissue samples--application to chronic pancreatitis tissues. *Pathol Res Pract* 2003;199:363-371.
- [30] Wang VW, Bell DA, Berkowitz RS, Mok SC: Whole genome amplification and high-throughput allelotyping identified five distinct

- deletion regions on chromosomes 5 and 6 in microdissected early-stage ovarian tumors. *Cancer Res* 15-5-2001;61:4169-4174.
- [31] Duddy SK, Gorospe S, Bleavins MR: Genetic analysis of multiple loci in microsamples of fixed paraffin-embedded tissue. *Toxicol Sci* 1998;46:317-323.
- [32] Wells D, Sherlock JK, Handyside AH, Delhanty JD: Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridisation. *Nucleic Acids Res* 15-2-1999;27:1214-1218.
- [33] Paunio T, Reima I, Syvanen AC: Preimplantation diagnosis by whole-genome amplification, PCR amplification, and solid-phase minisequencing of blastomere DNA. *Clin Chem* 1996;42:1382-1390.
- [34] Ludecke HJ, Senger G, Claussen U, Horsthemke B: Cloning defined regions of the human genome by microdissection of banded chromosomes and enzymatic amplification. *Nature* 23-3-1989;338:348-350.
- [35] Klein CA, Schmidt-Kittler O, Schardt JA, Pantel K, Speicher MR, Riethmuller G: Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 13-4-1999;96:4494-4499.
- [36] Tanabe C, Aoyagi K, Sakiyama T, Kohno T, Yanagitani N, Akimoto S, Sakamoto M, Sakamoto H, Yokota J, Ohki M, Terada M, Yoshida T, Sasaki H: Evaluation of a whole-genome amplification method based on adaptor-ligation PCR of randomly sheared genomic DNA. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;38:168-176.
- [37] Lucito R, Nakimura M, West JA, Han Y, Chin K, Jensen K, McCombie R, Gray JW, Wigler M: Genetic analysis using genomic representations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 14-4-1998;95:4487-4492.
- [38] Langmore JP: Rubicon Genomics, Inc. *Pharmacogenomics* 2002;3:557-560.
- [39] Barker DL, Hansen MS, Faruqi AF, Giannola D, Irsula OR, Lasken RS, Latterich M, Makarov V, Oliphant A, Pinter JH, Shen R, Sleptsova I, Ziehler W, Lai E: Two methods of whole-genome amplification enable accurate genotyping across a 2320-SNP linkage panel. *Genome Res* 2004;14:901-907.
- [40] Bergen AW, Haque KA, Qi Y, Beerman MB, Garcia-Closas M, Rothman N, Chanock SJ: Comparison of yield and genotyping performance of multiple displacement amplification and OmniPlex whole genome



- amplified DNA generated from multiple DNA sources. *Hum Mutat* 2005;26:262-270.
- [41] Ballantyne KN, van Oorschot RA, Mitchell RJ: Comparison of two whole genome amplification methods for STR genotyping of LCN and degraded DNA samples. *Forensic Sci Int* 8-5-2006.
- [42] Blanco L, Bernad A, Lazaro JM, Martin G, Garmendia C, Salas M: Highly efficient DNA synthesis by the phage phi 29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication. *J Biol Chem* 25-5-1989;264:8935-8940.
- [43] Esteban JA, Salas M, Blanco L: Fidelity of phi 29 DNA polymerase. Comparison between protein-primed initiation and DNA polymerization. *J Biol Chem* 5-2-1993;268:2719-2726.
- [44] Paez JG, Lin M, Beroukhim R, Lee JC, Zhao X, Richter DJ, Gabriel S, Herman P, Sasaki H, Altshuler D, Li C, Meyerson M, Sellers WR: Genome coverage and sequence fidelity of phi29 polymerase-based multiple strand displacement whole genome amplification. *Nucleic Acids Res* 2004;32:e71.
- [45] Vlcek C, Paces V: Nucleotide sequence of the late region of Bacillus phage phi 29 completes the 19,285-bp sequence of phi 29 genome. Comparison with the homologous sequence of phage PZA. *Gene* 1986;46:215-225.
- [46] Blanco L, Salas M: Relating structure to function in phi29 DNA polymerase. *J Biol Chem* 12-4-1996;271:8509-8512.
- [47] Nelson JR, Cai YC, Giesler TL, Farchaus JW, Sundaram ST, Ortiz-Rivera M, Hosta LP, Hewitt PL, Mamone JA, Palaniappan C, Fuller CW: TempliPhi, phi29 DNA polymerase based rolling circle amplification of templates for DNA sequencing. *Biotechniques* 2002;Suppl:44-47.
- [48] Dunning AM, Talmud P, Humphries SE: Errors in the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* 11-11-1988;16:10393.
- [49] Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 29-1-1988;239:487-491.
- [50] Dean FB, Nelson JR, Giesler TL, Lasken RS: Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi 29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome Res* 2001;11:1095-1099.
- [51] Lizardi PM, Huang X, Zhu Z, Bray-Ward P, Thomas DC, Ward DC: Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nat Genet* 1998;19:225-232.

- [52] Lage JM, Leamon JH, Pejovic T, Hamann S, Lacey M, Dillon D, Seagraves R, Vossbrinck B, Gonzalez A, Pinkel D, Albertson DG, Costa J, Lizardi PM: Whole genome analysis of genetic alterations in small DNA samples using hyperbranched strand displacement amplification and array-CGH. *Genome Res* 2003;13:294-307.
- [53] Hellani A, Coskun S, Benkhalifa M, Tbakhi A, Sakati N, Al-Odaib A, Ozand P: Multiple displacement amplification on single cell and possible PGD applications. *Mol Hum Reprod* 2004;10:847-852.
- [54] Rook MS, Delach SM, Deyneko G, Worlock A, Wolfe JL: Whole genome amplification of DNA from laser capture-microdissected tissue for high-throughput single nucleotide polymorphism and short tandem repeat genotyping. *Am J Pathol* 2004;164:23-33.
- [55] Hosono S, Faruqi AF, Dean FB, Du Y, Sun Z, Wu X, Du J, Kingsmore SF, Egholm M, Lasken RS: Unbiased whole-genome amplification directly from clinical samples. *Genome Res* 2003;13:954-964.
- [56] Cardoso J, Molenaar L, de Menezes RX, Rosenberg C, Morreau H, Moslein G, Fodde R, Boer JM: Genomic profiling by DNA amplification of laser capture microdissected tissues and array CGH. *Nucleic Acids Res* 2004;32:e146.
- [57] Bannai M, Higuchi K, Akesaka T, Furukawa M, Yamaoka M, Sato K, Tokunaga K: Single-nucleotide-polymorphism genotyping for whole-genome-amplified samples using automated fluorescence correlation spectroscopy. *Anal Biochem* 15-4-2004;327:215-221.
- [58] Lovmar L, Fredriksson M, Liljedahl U, Sigurdsson S, Syvanen AC: Quantitative evaluation by minisequencing and microarrays reveals accurate multiplexed SNP genotyping of whole genome amplified DNA. *Nucleic Acids Res* 1-11-2003;31:e129.
- [59] Park JW, Beaty TH, Boyce P, Scott AF, McIntosh I: Comparing whole-genome amplification methods and sources of biological samples for single-nucleotide polymorphism genotyping. *Clin Chem* 2005;51:1520-1523.
- [60] Pask R, Rance HE, Barratt BJ, Nutland S, Smyth DJ, Sebastian M, Twells RC, Smith A, Lam AC, Smink LJ, Walker NM, Todd JA: Investigating the utility of combining phi29 whole genome amplification and highly multiplexed single nucleotide polymorphism BeadArray genotyping. *BMC Biotechnol* 27-7-2004;4:15.
- [61] Hughes S, Arneson N, Done S, Squire J: The use of whole genome amplification in the study of human disease. *Prog Biophys Mol Biol* 2005;88:173-189.

- [62] Brookes AJ: The essence of SNPs. *Gene* 8-7-1999;234:177-186.
- [63] Kruglyak L, Nickerson DA: Variation is the spice of life. *Nat Genet* 2001;27:234-236.
- [64] Hinds DA, Stuve LL, Nilsen GB, Halperin E, Eskin E, Ballinger DG, Frazer KA, Cox DR: Whole-genome patterns of common DNA variation in three human populations. *Science* 18-2-2005;307:1072-1079.
- [65] Lai E: Application of SNP technologies in medicine: lessons learned and future challenges. *Genome Res* 2001;11:927-929.
- [66] Gohlke H, Illig T, Bahnweg M, Klopp N, Andre E, Altmüller J, Herbon N, Werner M, Knapp M, Pescollderungg L, Boner A, Malerba G, Pignatti PF, Wjst M: Association of the interleukin-1 receptor antagonist gene with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1-6-2004;169:1217-1223.
- [67] Smyth DJ, Cooper JD, Bailey R, Field S, Burren O, Smink LJ, Guja C, Ionescu-Tirgoviste C, Widmer B, Dunger DB, Savage DA, Walker NM, Clayton DG, Todd JA: A genome-wide association study of nonsynonymous SNPs identifies a type 1 diabetes locus in the interferon-induced helicase (IFIH1) region. *Nat Genet* 2006;38:617-619.
- [68] Miller DT, Zee RY, Suk DJ, Kozlowski P, Chasman DI, Lazarus R, Cook NR, Ridker PM, Kwiatkowski DJ: Association of common CRP gene variants with CRP levels and cardiovascular events. *Ann Hum Genet* 2005;69:623-638.
- [69] Riemenschneider M, Konta L, Friedrich P, Schwarz S, Taddei K, Neff F, Padovani A, Kolsch H, Laws SM, Klopp N, Bickeboller H, Wagenpfeil S, Mueller JC, Rosenberger A, ehl-Schmid J, Archetti S, Lautenschlager N, Borroni B, Müller U, Illig T, Heun R, Egensperger R, Schlegel J, Forstl H, Martins RN, Kurz A: A functional polymorphism within plasminogen activator urokinase (PLAU) is associated with Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 15-8-2006;15:2446-2456.
- [70] Ardlie KG, Kruglyak L, Seielstad M: Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. *Nat Rev Genet* 2002;3:299-309.
- [71] Carlson CS, Eberle MA, Rieder MJ, Smith JD, Kruglyak L, Nickerson DA: Additional SNPs and linkage-disequilibrium analyses are necessary for whole-genome association studies in humans. *Nat Genet* 2003;33:518-521.
- [72] Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, Higgins J, DeFelice M, Lochner A, Faggart M, Liu-Cordero SN, Rotimi C, Adeyemo A, Cooper R, Ward R, Lander ES, Daly MJ, Altshuler D: The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 21-6-2002;296:2225-2229.

- [73] Herbert A, Gerry NP, McQueen MB, Heid IM, Pfeufer A, Illig T, Wichmann HE, Meitinger T, Hunter D, Hu FB, Colditz G, Hinney A, Hebebrand J, Koberwitz K, Zhu X, Cooper R, Ardlie K, Lyon H, Hirschhorn JN, Laird NM, Lenburg ME, Lange C, Christman MF: A common genetic variant is associated with adult and childhood obesity. *Science* 14-4-2006;312:279-283.
- [74] Ng PC, Henikoff S: Accounting for human polymorphisms predicted to affect protein function. *Genome Res* 2002;12:436-446.
- [75] Cipollone F, Toniato E, Martinotti S, Fazia M, Iezzi A, Cuccurullo C, Pini B, Ursi S, Vitullo G, Averna M, Arca M, Montali A, Campagna F, Uchino S, Spigonardo F, Taddei S, Virdis A, Ciabattini G, Notarbartolo A, Cuccurullo F, Mezzetti A: A polymorphism in the cyclooxygenase 2 gene as an inherited protective factor against myocardial infarction and stroke. *JAMA* 12-5-2004;291:2221-2228.
- [76] Sobrino B, Brion M, Carracedo A: SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic Sci Int* 25-11-2005;154:181-194.
- [77] Fan JB, Chee MS, Gunderson KL: Highly parallel genomic assays. *Nat Rev Genet* 2006;7:632-644.
- [78] Smith RN: Accurate size comparison of short tandem repeat alleles amplified by PCR. *Biotechniques* 1995;18:122-128.
- [79] Koreth J, O'Leary JJ, O'D MJ: Microsatellites and PCR genomic analysis. *J Pathol* 1996;178:239-248.
- [80] Toth G, Gaspari Z, Jurka J: Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Res* 2000;10:967-981.
- [81] Tautz D: Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res* 25-8-1989;17:6463-6471.
- [82] Engelstein M, Hudson TJ, Lane JM, Lee MK, Leverone B, Landes GM, Peltonen L, Weber JL, Dracopoli NC: A PCR-based linkage map of human chromosome 1. *Genomics* 1993;15:251-258.
- [83] Kashi Y, King D, Soller M: Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. *Trends Genet* 1997;13:74-78.
- [84] Stallings RL, Ford AF, Nelson D, Torney DC, Hildebrand CE, Moyzis RK: Evolution and distribution of (GT)<sub>n</sub> repetitive sequences in mammalian genomes. *Genomics* 1991;10:807-815.

- [85] Litt M, Luty JA: A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet* 1989;44:397-401.
- [86] Beckman JS, Weber JL: Survey of human and rat microsatellites. *Genomics* 1992;12:627-631.
- [87] Edwards A, Civitello A, Hammond HA, Caskey CT: DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am J Hum Genet* 1991;49:746-756.
- [88] Krenke BE, Tereba A, Anderson SJ, Buel E, Culhane S, Finis CJ, Tomsey CS, Zachetti JM, Masibay A, Rabbach DR, Amriott EA, Sprecher CJ: Validation of a 16-locus fluorescent multiplex system. *J Forensic Sci* 2002;47:773-785.
- [89] Budowle B, Sprecher CJ: Concordance study on population database samples using the PowerPlex 16 kit and AmpFISTR Profiler Plus kit and AmpFISTR COfiler kit. *J Forensic Sci* 2001;46:637-641.
- [90] Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL: Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature* 4-7-1985;316:76-79.
- [91] Campuzano V, Montermini L, Molto MD, Pianese L, Cossee M, Cavalcanti F, Monros E, Rodius F, Duclos F, Monticelli A, Zara F, Canizares J, Koutnikova H, Bidichandani SI, Gellera C, Brice A, Trouillas P, De MG, Filla A, De FR, Palau F, Patel PI, Di DS, Mandel JL, Coccozza S, Koenig M, Pandolfo M: Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* 8-3-1996;271:1423-1427.
- [92] Durr A, Cossee M, Agid Y, Campuzano V, Mignard C, Penet C, Mandel JL, Brice A, Koenig M: Clinical and genetic abnormalities in patients with Friedreich's ataxia. *N Engl J Med* 17-10-1996;335:1169-1175.
- [93] La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE, Fischbeck KH: Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 4-7-1991;352:77-79.
- [94] A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell* 26-3-1993;72:971-983.
- [95] Urquhart A, Kimpton CP, Downes TJ, Gill P: Variation in short tandem repeat sequences--a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. *Int J Legal Med* 1994;107:13-20.

- [96] Urquhart A, Oldroyd NJ, Kimpton CP, Gill P: Highly discriminating heptaplex short tandem repeat PCR system for forensic identification. *Biotechniques* 1995;18:116-1.
- [97] Rosenberg NA, Pritchard JK, Weber JL, Cann HM, Kidd KK, Zhivotovsky LA, Feldman MW: Genetic structure of human populations. *Science* 20-12-2002;298:2381-2385.
- [98] Puers C, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Schumm JW: Identification of repeat sequence heterogeneity at the polymorphic short tandem repeat locus HUMTH01[AATG]<sub>n</sub> and reassignment of alleles in population analysis by using a locus-specific allelic ladder. *Am J Hum Genet* 1993;53:953-958.
- [99] Moller A, Brinkmann B: Locus ACTBP2 (SE33). Sequencing data reveal considerable polymorphism. *Int J Legal Med* 1994;106:262-267.
- [100] Moller A, Meyer E, Brinkmann B: Different types of structural variation in STRs: HumFES/FPS, HumVWA and HumD21S11. *Int J Legal Med* 1994;106:319-323.
- [101] Butler JM: *Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers*, ed second edition. Academic Press Inc, 2005.
- [102] Wiegand P, Lareu MV, Schurenkamp M, Kleiber M, Brinkmann B: D18S535, D1S1656 and D10S2325: three efficient short tandem repeats for forensic genetics. *Int J Legal Med* 1999;112:360-363.
- [103] Kimpton C, Walton A, Gill P: A further tetranucleotide repeat polymorphism in the vWF gene. *Hum Mol Genet* 1992;1:287.
- [104] Kronenberg F, Konig P, Neyer U, Auinger M, Pribasnic A, Lang U, Reitinger J, Pinter G, Utermann G, Dieplinger H: Multicenter study of lipoprotein(a) and apolipoprotein(a) phenotypes in patients with end-stage renal disease treated by hemodialysis or continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Am Soc Nephrol* 1995;6:110-120.
- [105] Kronenberg F, Neyer U, Lhotta K, Trenkwalder E, Auinger M, Pribasnic A, Meisl T, Konig P, Dieplinger H: The low molecular weight apo(a) phenotype is an independent predictor for coronary artery disease in hemodialysis patients: a prospective follow-up. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:1027-1036.
- [106] Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 11-2-1988;16:1215.
- [107] MagAttract DNA Blood Midi M48 Kit - Handbook. 2005.  
Ref Type: Report

- [108] Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230:1350-1354.
- [109] Ross P, Hall L, Smirnov I, Haff L: High level multiplex genotyping by MALDI-TOF mass spectrometry. *Nat Biotechnol* 1998;16:1347-1351.
- [110] Haff LA, Smirnov IP: Multiplex genotyping of PCR products with MassTag-labeled primers. *Nucleic Acids Res* 15-9-1997;25:3749-3750.
- [111] Karas M, Hillenkamp F: Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 15-10-1988;60:2299-2301.
- [112] Karas M, Bahr U., Ingendoh A., Nordhoff E., Stahl B., Strupat F., Hillenkamp F.: Principles and applications of matrix-assisted UV-laser desorption/ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 1990;241:175-185.
- [113] Tanaka K, H.Waki, .Ido, .Akita, .Yoshida, .Yoshida. Protein and polymer analyses up to  $m/z$  100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. 2[8], 151-153. 1988. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* Ref Type: Generic
- [114] Kirpekar F, Nordhoff E, Larsen LK, Kristiansen K, Roepstorff P, Hillenkamp F: DNA sequence analysis by MALDI mass spectrometry. *Nucleic Acids Res* 1-6-1998;26:2554-2559.
- [115] Wu KJ, Steding A, Becker CH: Matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry of oligonucleotides using 3-hydroxypicolinic acid as an ultraviolet-sensitive matrix. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1993;7:142-146.
- [116] Little DP, Braun A, Darnhofer-Demar B, Frilling A, Li Y, Mclver RT, Jr., Koster H: Detection of RET proto-oncogene codon 634 mutations using mass spectrometry. *J Mol Med* 1997;75:745-750.
- [117] Little DP, Braun A, Darnhofer-Demar B, Koster H: Identification of apolipoprotein E polymorphisms using temperature cycled primer oligo base extension and mass spectrometry. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997;35:545-548.
- [118] Gut IG: Automation in genotyping of single nucleotide polymorphisms. *Hum Mutat* 2001;17:475-492.
- [119] Hillenkamp F, Karas M, Beavis RC, Chait BT: Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Anal Chem* 15-12-1991;63:1193A-1203A.

- [120] Griffin TJ, Smith LM: Single-nucleotide polymorphism analysis by MALDI-TOF mass spectrometry. *Trends Biotechnol* 2000;18:77-84.
- [121] Storm N, rrhofer-Patel B, van den BD, Rodi CP: MALDI-TOF mass spectrometry-based SNP genotyping. *Methods Mol Biol* 2003;212:241-262.
- [122] Leushner J: MALDI TOF mass spectrometry: an emerging platform for genomics and diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 2001;1:11-18.
- [123] Pusch W, Wurmbach JH, Thiele H, Kostrzewa M: MALDI-TOF mass spectrometry-based SNP genotyping. *Pharmacogenomics* 2002;3:537-548.
- [124] Ding C, Cantor CR: A high-throughput gene expression analysis technique using competitive PCR and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight MS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 18-3-2003;100:3059-3064.
- [125] Hartmer R, Storm N, Boecker S, Rodi CP, Hillenkamp F, Jurinke C, van den BD: RNase T1 mediated base-specific cleavage and MALDI-TOF MS for high-throughput comparative sequence analysis. *Nucleic Acids Res* 1-5-2003;31:e47.
- [126] Little DP, Braun A, O'Donnell MJ, Koster H: Mass spectrometry from miniaturized arrays for full comparative DNA analysis. *Nat Med* 1997;3:1413-1416.
- [127] Gross J, Strupat K: Matrix-assisted laser desorption/ionisation-mass spectrometry applied to biological macromolecules. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 9-8-1998;17:470-484.
- [128] Schmittgen TD: Real-time quantitative PCR. *Methods* 2001;25:383-385.
- [129] Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH: Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 15-8-1991;88:7276-7280.
- [130] Lee LG, Connell CR, Bloch W: Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res* 11-8-1993;21:3761-3766.
- [131] Cardullo RA, Agrawal S, Flores C, Zamecnik PC, Wolf DE: Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:8790-8794.
- [132] Förster T: Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* 1948;437:55-75.



- [133] Selvin PR, Hearst JE: Luminescence energy transfer using a terbium chelate: improvements on fluorescence energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 11-10-1994;91:10024-10028.
- [134] Mülhardt C. *Der Experimentator*. 4. Auflage. 2003. Spektrum Akademischer Verlag, Berlin.  
Ref Type: Generic
- [135] Nasarabadi S, Milanovich F, Richards J, Belgrader P: Simultaneous detection of TaqMan probes containing Fam and Tamra reporter fluorophores. *Biotechniques* 1999;27:1116-1118.
- [136] Kumar S, Reed MW, Gamper HB, Jr., Gorn VV, Lukhtanov EA, Foti M, West J, Meyer RB, Jr., Schweitzer BI: Solution structure of a highly stable DNA duplex conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res* 1-2-1998;26:831-838.
- [137] Afonina I, Zivarts M, Kutyavin I, Lukhtanov E, Gamper H, Meyer RB: Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res* 1-7-1997;25:2657-2660.
- [138] Kutyavin IV, Lukhtanov EA, Gamper HB, Meyer RB: Oligonucleotides with conjugated dihydropyrroloindole tripeptides: base composition and backbone effects on hybridization. *Nucleic Acids Res* 15-9-1997;25:3718-3723.
- [139] Schild T.A. *Einführung in die Real-Time TaqMan PCR-Technologie*. 1997. Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt.  
Ref Type: Report
- [140] Livak KJ, Marmaro J, Todd JA: Towards fully automated genome-wide polymorphism screening. *Nat Genet* 1995;9:341-342.
- [141] Allen RC, Graves G, Budowle B: Polymerase chain reaction amplification products separated on rehydratable polyacrylamide gels and stained with silver. *Biotechniques* 1989;7:736-744.
- [142] Haas H, Budowle B, Weiler G: Horizontal polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Electrophoresis* 1994;15:153-158.
- [143] Landers JP, Oda RP, Spelsberg TC, Nolan JA, Ulfelder KJ: Capillary electrophoresis: a powerful microanalytical technique for biologically active molecules. *Biotechniques* 1993;14:98-111.
- [144] Budowle B, Allen RC: Analysis of amplified fragment-length polymorphisms (VNTR/STR loci) for human identity testing. *Methods Mol Biol* 1998;98:155-171.

- [145] Butler JM, McCord BR, Jung JM, Allen RO: Rapid analysis of the short tandem repeat HUMTH01 by capillary electrophoresis. *Biotechniques* 1994;17:1062-4, 1066, 1068.
- [146] Fregeau CJ, Bowen KL, Fournay RM: Validation of highly polymorphic fluorescent multiplex short tandem repeat systems using two generations of DNA sequencers. *J Forensic Sci* 1999;44:133-166.
- [147] Butler JM, Buel E, Crivellente F, McCord BR: Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis. *Electrophoresis* 2004;25:1397-1412.
- [148] Mansfield ES, Robertson JM, Vainer M, Isenberg AR, Frazier RR, Ferguson K, Chow S, Harris DW, Barker DL, Gill PD, Budowle B, McCord BR: Analysis of multiplexed short tandem repeat (STR) systems using capillary array electrophoresis. *Electrophoresis* 1998;19:101-107.
- [149] Wang Y, Wallin JM, Ju J, Sensabaugh GF, Mathies RA: High-resolution capillary array electrophoretic sizing of multiplexed short tandem repeat loci using energy-transfer fluorescent primers. *Electrophoresis* 1996;17:1485-1490.
- [150] Dixon LA, Murray CM, Archer EJ, Dobbins AE, Koumi P, Gill P: Validation of a 21-locus autosomal SNP multiplex for forensic identification purposes. *Forensic Sci Int* 10-11-2005;154:62-77.
- [151] Butler JM: Constructing STR multiplex assays. *Methods Mol Biol* 2005;297:53-66.:53-66.
- [152] Butler JM, Ruitberg CM, Vallone PM: Capillary electrophoresis as a tool for optimization of multiplex PCR reactions. *Fresenius J Anal Chem* 2001;369:200-205.
- [153] Heid IM, Wagner SA, Gohlke H, Iglseider B, Mueller JC, Cip P, Ladurner G, Reiter R, Stadlmayr A, Mackevics V, Illig T, Kronenberg F, Paulweber B: Genetic architecture of the APM1 gene and its influence on adiponectin plasma levels and parameters of the metabolic syndrome in 1,727 healthy Caucasians. *Diabetes* 2006;55:375-384.
- [154] Justenhoven C, Hamann U, Pesch B, Harth V, Rabstein S, Baisch C, Vollmert C, Illig T, Ko YD, Bruning T, Brauch H: ERCC2 genotypes and a corresponding haplotype are linked with breast cancer risk in a German population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:2059-2064.
- [155] Vollmert C, Hahn S, Lamina C, Huth C, Kolz M, Schopfer-Wendels A, Mann K, Bongardt F, Mueller JC, Kronenberg F, Wichmann HE, Herder C, Holle R, Lowel H, Illig T, Janssen OE: Calpain-10 variants and

- haplotypes are associated with polycystic ovary syndrome in Caucasians. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;292:E836-E844.
- [156] Yan J, Feng J, Hosono S, Sommer SS: Assessment of multiple displacement amplification in molecular epidemiology. *Biotechniques* 2004;37:136-3.
- [157] Sjöholm MI, Hoffmann G, Lindgren S, Dillner J, Carlson J: Comparison of archival plasma and formalin-fixed paraffin-embedded tissue for genotyping in hepatocellular carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:251-255.
- [158] Li J, Harris L, Mamon H, Kulke MH, Liu WH, Zhu P, Mike MG: Whole Genome Amplification of Plasma-Circulating DNA Enables Expanded Screening for Allelic Imbalance in Plasma. *J Mol Diagn* 2006;8:22-30.
- [159] Lu Y, Gioia-Patricola L, Gomez JV, Plummer M, Franceschi S, Kato I, Canzian F: Use of whole genome amplification to rescue DNA from plasma samples. *Biotechniques* 2005;39:511-515.
- [160] Sun G, Kaushal R, Pal P, Wolujewicz M, Smelser D, Cheng H, Lu M, Chakraborty R, Jin L, Deka R: Whole-genome amplification: relative efficiencies of the current methods. *Leg Med (Tokyo)* 2005;7:279-286.
- [161] Bergen AW, Qi Y, Haque KA, Welch RA, Chanock SJ: Effects of DNA mass on multiple displacement whole genome amplification and genotyping performance. *BMC Biotechnol* 16-9-2005;5:24.:24.
- [162] Dickson PA, Montgomery GW, Henders A, Campbell MJ, Martin NG, James MR: Evaluation of multiple displacement amplification in a 5 cM STR genome-wide scan. *Nucleic Acids Res* 2005;33:e119.
- [163] Viguera E, Canceill D, Ehrlich SD: Replication slippage involves DNA polymerase pausing and dissociation. *EMBO J* 15-5-2001;20:2587-2595.
- [164] Pompanon F, Bonin A, Bellemain E, Taberlet P: Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nat Rev Genet* 2005;6:847-859.
- [165] Malecki MT, Skupien J, Gorczynska-Kosiorz S, Klupa T, Nazim J, Moczulski DK, Sieradzki J: Renal malformations may be linked to mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha (MODY3) gene. *Diabetes Care* 2005;28:2774-2776.
- [166] Winckler W, Burtt NP, Holmkvist J, Cervin C, de Bakker PI, Sun M, Almgren P, Tuomi T, Gaudet D, Hudson TJ, Ardlie KG, Daly MJ, Hirschhorn JN, Altshuler D, Groop L: Association of common variation in the HNF1alpha gene region with risk of type 2 diabetes. *Diabetes* 2005;54:2336-2342.

- [167] Cheret C, Doyen A, Yaniv M, Pontoglio M: Hepatocyte nuclear factor 1 alpha controls renal expression of the Npt1-Npt4 anionic transporter locus. *J Mol Biol* 4-10-2002;322:929-941.
- [168] Urhammer SA, Fridberg M, Hansen T, Rasmussen SK, Moller AM, Clausen JO, Pedersen O: A prevalent amino acid polymorphism at codon 98 in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene is associated with reduced serum C-peptide and insulin responses to an oral glucose challenge. *Diabetes* 1997;46:912-916.
- [169] Anuradha S, Radha V, Deepa R, Hansen T, Carstensen B, Pedersen O, Mohan V: A prevalent amino acid polymorphism at codon 98 (Ala98Val) of the hepatocyte nuclear factor-1alpha is associated with maturity-onset diabetes of the young and younger age at onset of type 2 diabetes in Asian Indians. *Diabetes Care* 2005;28:2430-2435.
- [170] Schneider PM, Bender K, Mayr WR, Parson W, Hoste B, Decorte R, Cordonnier J, Vanek D, Morling N, Karjalainen M, Marie-Paule CC, Sabatier M, Hohoff C, Schmitter H, Pflug W, Wenzel R, Patzelt D, Lessig R, Dobrowolski P, O'Donnell G, Garafano L, Dobosz M, De KP, Mevag B, Pawlowski R, Gusmao L, Conceicao VM, Alonso AA, Garcia FO, Sanz NP, Kihlgreen A, Bar W, Meier V, Teyssier A, Coquoz R, Brandt C, Germann U, Gill P, Hallett J, Greenhalgh M: STR analysis of artificially degraded DNA-results of a collaborative European exercise. *Forensic Sci Int* 28-1-2004;139:123-134.
- [171] Lasken RS, Egholm M: Whole genome amplification: abundant supplies of DNA from precious samples or clinical specimens. *Trends Biotechnol* 2003;21:531-535.
- [172] Montgomery GW, Campbell MJ, Dickson P, Herbert S, Siemering K, Ewen-White KR, Visscher PM, Martin NG: Estimation of the rate of SNP genotyping errors from DNA extracted from different tissues. *Twin Res Hum Genet* 2005;8:346-352.
- [173] Silander K, Komulainen K, Ellonen P, Jussila M, Alanne M, Levander M, Tainola P, Kuulasmaa K, Salomaa V, Perola M, Peltonen L, Saarela J: Evaluating whole genome amplification via multiply-primed rolling circle amplification for SNP genotyping of samples with low DNA yield. *Twin Res Hum Genet* 2005;8:368-375.
- [174] Cler L, Bu D, Lewis C, Euhus D: A comparison of five methods for extracting DNA from paucicellular clinical samples. *Mol Cell Probes* 2006;20:191-196.
- [175] Pinard R, de WA, Sarkis GJ, Gerstein MB, Tartaro KR, Plant RN, Egholm M, Rothberg JM, Leamon JH: Assessment of whole genome amplification-induced bias through high-throughput, massively parallel whole genome sequencing. *BMC Genomics* 2006;7:216.

- [176] Carroll RJ, Ruppert D, Stefanski LA. Measurement Error in Nonlinear Models. 1995. Chapman & Hall/CRC.  
Ref Type: Generic
- [177] Sanjad SA, Hariri A, Habbal ZM, Lifton RP: A novel PCLN-1 gene mutation in familial hypomagnesemia with hypercalciuria and atypical phenotype. *Pediatr Nephrol* 2007;22:503-508.
- [178] Kim SH, Ma X, Weremowicz S, Ercolino T, Powers C, Mlynarski W, Bashan KA, Warram JH, Mychaleckyj J, Rich SS, Krolewski AS, Doria A: Identification of a locus for maturity-onset diabetes of the young on chromosome 8p23. *Diabetes* 2004;53:1375-1384.
- [179] Xu J, Zheng SL, Hawkins GA, Faith DA, Kelly B, Isaacs SD, Wiley KE, Chang B, Ewing CM, Bujnovszky P, Carpten JD, Bleecker ER, Walsh PC, Trent JM, Meyers DA, Isaacs WB: Linkage and association studies of prostate cancer susceptibility: evidence for linkage at 8p22-23. *Am J Hum Genet* 2001;69:341-350.
- [180] Cai G, Cole SA, Freeland-Graves JH, MacCluer JW, Blangero J, Comuzzie AG: Genome-wide scans reveal quantitative trait Loci on 8p and 13q related to insulin action and glucose metabolism: the San Antonio Family Heart Study. *Diabetes* 2004;53:1369-1374.
- [181] Stambolian D, Ciner EB, Reider LC, Moy C, Dana D, Owens R, Schlifka M, Holmes T, Ibay G, Bailey-Wilson JE: Genome-wide scan for myopia in the Old Order Amish. *Am J Ophthalmol* 2005;140:469-476.
- [182] Kalichman L, Kobylansky E, Malkin I, Yakovenko K, Livshits G: Search for linkage between hand osteoarthritis and 11q 12-13 chromosomal segment. *Osteoarthritis Cartilage* 2003;11:561-568.
- [183] Perusse L, Rice T, Chagnon YC, Despres JP, Lemieux S, Roy S, Lacaille M, Ho-Kim MA, Chagnon M, Province MA, Rao DC, Bouchard C: A genome-wide scan for abdominal fat assessed by computed tomography in the Quebec Family Study. *Diabetes* 2001;50:614-621.
- [184] Fox CS, Heard-Costa NL, Vasan RS, Murabito JM, D'Agostino RB, Sr., Atwood LD: Genomewide linkage analysis of weight change in the Framingham Heart Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:3197-3201.
- [185] Arar N, Nath S, Thameem F, Bauer R, Voruganti S, Comuzzie A, Cole S, Blangero J, Maccluer J, Abboud H: Genome-wide scans for microalbuminuria in Mexican Americans: The San Antonio Family Heart Study. *Genet Med* 2007;9:80-87.

## 7 Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b>	Schematische Darstellung der sich weit verzweigenden (=hyperbranching), DNA-Strang ablösenden Amplifikationsreaktion nach [62]. Genomische Einzelstrang-DNA (rote Linie) dient als Matrize zum Anheften der Random Primer (schwarze Pfeile) (A). Die neu synthetisierten DNA-Einzelstränge werden durch die $\Phi$ 29 DNA-Polymerase mit ihrer Strang ablösenden Aktivität verlängert. Das 5'-Ende jedes Strangs wird durch den vorgelagerten Strang abgelöst, der in die gleiche Richtung verlängert wird (B). Abgelöste DNA Stränge, welche nun als Einzelstrang vorliegen, dienen weiteren Random Primern wiederum als Vorlage zum Anheften und werden in die entgegengesetzte Richtung verlängert (C). Im Verlauf der Reaktion weitet sich dieses weit verzweigte Netzwerk aus, wobei Tausende bis Millionen von Kopien der Original-DNA generiert werden (D).....7	7
<b>Abbildung 2:</b>	Locus-Repräsentation bei unterschiedlichen WGA-Methoden. Nach Amplifikation mit MDA (A), DOP-PCR (B) und PEP (C) wurde die Locus-Repräsentation acht verschiedener Loci quantitativ mittels RT-PCR erfasst und mit nicht-amplifizierter DNA verglichen. Die Resultate der einzelnen Loci sind mit folgenden Symbolen dargestellt: cJun,■; MKP1,□; CCR1,▲; CCR7,●; CCR6,○; acidic ribosomal protein,◆; CXCR5,◇; Connexin40,△. Graphik entnommen aus Ref. [80]. .....8	8
<b>Abbildung 3:</b>	Schematische Darstellung der DNA Extraktion und Aufreinigung von Plasma-DNA. Modifiziert nach [143]. .....30	30
<b>Abbildung 4:</b>	Schematische Darstellung der Whole Genome Amplifikation .....32	32
<b>Abbildung 5:</b>	Schematischer Aufbau eines Maldi-TOF Massenspektrometers nach [168] .....39	39
<b>Abbildung 6:</b>	Schematischer Ablauf der hME-Methode .....41	41
<b>Abbildung 7:</b>	Prinzip des <i>Fluoreszenz- Resonanz-Energie-Transfers</i> (FRET), modifiziert nach [178]. Das Fluorochrom F1 besitzt die Anregungswellenlänge A1 und die Emissionswellenlänge E1, hingegen hat das Fluorochrom F2 die Anregungswellenlänge A2 und die Emissionswellenlänge E2. Ist E1 nun gleich A2 und sind die Fluorochrome in räumlicher Nähe, so wird die von Fluorochrom F1	

	emittierte Energie E1 auf das Fluorochrom F2 übertragen, welches dann seinerseits diese als E2 emittiert. ....	48
<b>Abbildung 8:</b>	Prinzip des TaqMan-Assays. Es ist der Einfluss der 5'-3'-Exonuklease Aktivität der DNA Polymerase auf eine Fluorogene Sonde während der Extensionsphase einer TaqMan PCR ersichtlich. Der Pfeil stellt den FRET vom Reporter auf den Quencher dar (2.2.11.1). R kennzeichnet den Reporter, Q den Quencher und MGB den Minor Groove Binder. Modifiziert nach [184].....	52
<b>Abbildung 9:</b>	Darstellung einer Amplifikationsgrafik: Die gemessene Fluoreszenz (Ordinate) wird gegen die Zyklenzahl (Abszisse) aufgetragen. Dabei zeigt der Reaktionsansatz schon eine gewisse Grundfluoreszenz, bevor es zur Amplifikation gekommen ist. Aus der Standardabweichung der Fluoreszenz zwischen Zyklus 3 und 15 multipliziert mit dem Faktor zehn, wird ein Fluoreszenzwert errechnet, der zur Grundfluoreszenz der Proben addiert wird. So ergibt sich der Schwellenwert ( <i>Threshold</i> ). Der Schnittpunkt zwischen Amplifikationsgraph und Schwellenwert wird als <i>Cycle-threshold</i> (CT) bezeichnet. Er markiert einen Anstieg der Fluoreszenz über den Schwellenwert.....	54
<b>Abbildung 10:</b>	Schematische Darstellung der Alleldifferenzierung mittels TaqMan-PCR nach <a href="http://docs.appliedbiosystems.com/pebi/docs/04364015.pdf">http://docs.appliedbiosystems.com/pebi/docs/04364015.pdf</a> .....	58
<b>Abbildung 11:</b>	Standardkurve für die absolute Quantifizierung im Rahmen der Konzentrationsmessung mittels des Human Quantifiler Assay durch Real-Time-PCR.....	70
<b>Abbildung 12:</b>	Darstellung des Amplifikations-Plots der Dann-Konzentrationsmessung mittels Human Quantifiler. ....	71
<b>Abbildung 13:</b>	Gel-Elektrophorese (2% TBE Agarose Gel) der Kontroll-PCR-Produkte nach Whole Genome Amplifikation der Plasma-DNA. K bezeichnet die interne Kontrolle, LW den Leerwert, 1-11 die Probanden, M den Größenstandard.....	72
<b>Abbildung 14:</b>	Darstellung der DNA-Mengen vor (schwarzer Balken) und nach der WGA Reaktion (roter Balken). Die DNA-Mengen auf der y-Achse sind logarhythmisch aufgetragen. ....	73
<b>Abbildung 15:</b>	MALDI-TOF Massenspektren des SNP rs3774261 [G/A]. A: zeigt den homozygoten Zustand des Allels G. B: zeigt den homozygoten Zustand des Allels A für den SNP. C: zeigt den heterozygoten Zustand für den SNP. Alle Abbildungen sind Auszüge aus dem Massenspektrum einer Multiplexreaktion.....	76

<b>Abbildung 16:</b>	MALDI-TOF Massenspektrum einer Multiplexreaktion zur Genotypisierung sechs biallelischer SNPs. Das Massenspektrum zeigt die Analyse der Primer-Extensions-Reaktion für die SNPs rs778285 [T/C], rs1058808 [G/C], rs17366743 [T/C], rs778331 [A/C], rs812382 [T/C] und eines SNPs (in der Abbildung als SNP X bezeichnet), an Position 104982395 des Chromosoms 13. Letzt genannter SNP hat noch keine rs Nummer nach offizieller Nomenklatur. Die rot markierten Buchstaben zeigen die Stellen im Massenspektrum, an denen die allelspezifischen Extensionsprodukte der durchgeführten Reaktionen detektiert werden konnten. Das Raute Zeichen (#) markiert den Massenbereich, in dem die jeweiligen nicht extendierten Primer detektiert werden konnten. ....77	77
<b>Abbildung 17:</b>	Amplifikations-Plot des SNP rs675 [A/T]. Die für das Allel A homozygoten Proben sind rot markiert, die heterozygoten Proben grün und die für das Allel T homozygoten Proben blau. Die schwarzen Vierecke (■) bezeichnen die Leerwerte, die schwarzen Kreuze (x) sind Proben, deren Genotyp nicht eindeutig bestimmt werden konnte.....80	80
<b>Abbildung 18:</b>	Mittelwert der Minor-Allel-Frequenzen bezogen auf die jeweiligen SNPs, die die gleiche Anzahl von Diskordanzen aufweisen. ....81	81
<b>Abbildung 19:</b>	Graphische Darstellung der Allelverteilung des Markers D8S1130. Der karierte Balken stellt die Allele wie in der Literatur angegeben dar, der schwarze Balken die Allelverteilung der Vollblut-DNA (n=41), der weiße Balken die Allelverteilung der WGA-Plasma-DNA (n=41). ....83	83
<b>Abbildung 20:</b>	Darstellung einer Multiplexreaktion zur STR-Marker Analyse. Dargestellt sind die Marker D1S495, D11S1983 sowie D5S2498. ....84	84
<b>Abbildung 21:</b>	Vergleich zwischen WGA-Plasma-DNA und Vollblut-DNA der gleichen Person. A zeigt einen Allelverlust (Allelic Drop Out) der WGA-Plasma-DNA bei Locus D1S495 bzw. B bei Locus D5S2498. Die DNA-Proben wurden auf einem ABI Prism 3130XL Genetic Analyzer unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Primern analysiert. ....85	85
<b>Abbildung 22:</b>	Vergleich zwischen WGA-Plasma-DNA (WGA) und Vollblut-DNA (gDNA) der gleichen Person. A zeigt einen Allelverlust (Allelic Drop Out) der WGA-Plasma-DNA bei Locus D1S495 bzw. B bei Locus D5S2498. Die DNA-Proben wurden auf einem 8% PAGE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. M kennzeichnet den Größenstandard. ....86	86
<b>Abbildung 23:</b>	Einfluss der eingesetzten Plasma-DNA-Menge in die WGA-Reaktion auf die Anzahl der aufgetretenen homozygoten STR-Marker. Die	



	steigende Anzahl homozygoter Loci korreliert mit einer geringeren in die WGA-Reaktion eingesetzten DNA-Menge. ....	94
<b>Abbildung 24:</b>	Diskordanzrate der WGA-Plasma-DNA-Proben im Vergleich zur Vollblut-DNA bezogen auf die jeweilige Gruppe an homozygoten WGA-Plasma-DNA-Proben im 9-STR-Marker Set. Die schwarzen Balken kennzeichnen die Diskordanzen der STRs, die grauen Balken die der SNPs.....	95
<b>Abbildung 25:</b>	Diskordanzrate der WGA-Plasma-DNA-Proben im Vergleich zur Vollblut-DNA bezogen auf die jeweilige Gesamtheit aller Genotypen derjenigen Proben, die bis zu der auf der x-Achse entsprechenden Anzahl an homozygoten STR-Loci eingeschlossen wurden. Die schwarzen Balken kennzeichnen die Diskordanzen der STRs, die grauen Balken die der SNPs. ....	96
<b>Abbildung 26:</b>	Ausschlussrate von Proben, wenn diejenigen Proben verworfen werden, die gleich viele bzw. mehr als die jeweilige Anzahl an homozygoten STR-Loci aufweisen.....	97
<b>Abbildung 27:</b>	Darstellung der Unterschiede zwischen den beiden Ausschlussalgorithmen zum Ausschluss nicht geeigneter Plasma-DNA-Proben. Der 9-STR-Marker-Algorithmus ist schwarz gekennzeichnet, der Algorithmus über die eingesetzte Plasma-DNA-Menge grau. Betrachtet werden die Unterschiede in den Kategorien SNP- und STR-Diskordanzraten sowie der Probenausschlussrate. ....	101
<b>Abbildung 28:</b>	Schematische Darstellung der Probenaufbereitung und Evaluation von geeigneten bzw. nicht geeigneten Proben. ....	103
<b>Abbildung 29:</b>	Diskordanzrate der WGA-Plasma-DNA-Proben im Vergleich zur Vollblut-DNA bezogen auf die jeweilige Gesamtheit aller Genotypen derjenigen Proben, die bis zu der auf der x-Achse entsprechenden Menge* an eingesetzter DNA in die WGA-Reaktion eingeschlossen wurden. Die schwarzen Balken kennzeichnen die Diskordanzen der STRs, die grauen Balken die der SNPs. ....	109

## 7.2 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b>	WGA Kontroll-PCR Primer.....	23
<b>Tabelle 2:</b>	Primer für die STR-Marker Analyse.....	23
<b>Tabelle 3:</b>	Primer für die Maldi-TOF MS Analyse.....	24
<b>Tabelle 4:</b>	Primer für die Real-Time PCR SNP-Analyse. Die fett markierten und unterstrichenen Basen in der Spalte der Sonden kennzeichnen die Position des SNP.....	25
<b>Tabelle 5:</b>	Mastermix für die Kontroll-PCR.....	35
<b>Tabelle 6:</b>	Temperaturbedingungen für die Kontroll-PCR.....	36
<b>Tabelle 7:</b>	Mastermix für eine 4-plex PCR im 384-well Format.....	42
<b>Tabelle 8:</b>	Mastermix für eine 6-plex PCR im 384-well Format.....	43
<b>Tabelle 9:</b>	Temperaturbedingungen für die PCR im Rahmen der hME-Methode.....	43
<b>Tabelle 10:</b>	Mastermix für die SAP-Verdau-Reaktion im Rahmen der hME-Methode im 384-well Format.....	44
<b>Tabelle 11:</b>	Temperaturprofil für die SAP-Verdau-Reaktion im Rahmen der hME-Methode.....	44
<b>Tabelle 12:</b>	Mastermix für die Primer-Extensions-Reaktion innerhalb der hME-Methode im 384-well Format.....	45
<b>Tabelle 13:</b>	Temperaturprofil für die Primer-Extensions-Reaktion innerhalb der hME-Methode.....	45
<b>Tabelle 14:</b>	Darstellung der aktuellen Reporter Fluoreszenzfarbstoffe mit Angabe der jeweiligen Absorptions- und Emissionsspektren in nm. ....	49
<b>Tabelle 15:</b>	Darstellung der aktuellen Quencher mit Angabe der jeweiligen Absorptions- und Emissionsspektren in nm. N/A bedeutet dabei, dass der Quencher Wärme anstatt Licht emittiert.....	50
<b>Tabelle 16:</b>	Verdünnungsschema für 12 verschiedene Standardkonzentrationen für die Erstellung einer Standardkurve im Rahmen der Konzentrationsmessung mittels Real time PCR.....	56
<b>Tabelle 17:</b>	Mastermix für die absolute Quantifizierung mittels Real-Time PCR.....	57
<b>Tabelle 18:</b>	Temperaturprofil für die absolute Quantifizierung mittels Real-Time PCR.....	57
<b>Tabelle 19:</b>	Mastermix für 40x TaqMan-Assay.....	59
<b>Tabelle 20:</b>	Mastermix für 20x TaqMan-Assay.....	59
<b>Tabelle 21:</b>	Temperaturprofil für den TaqMan-Assay.....	60
<b>Tabelle 22:</b>	Übersicht über die verschiedenen Marker, die jeweils für die Multiplexanalyse zusammengefasst wurden.....	62

## 7. Anhang: Tabellenverzeichnis

---

<b>Tabelle 23:</b>	Mastermix für die Single-Plex PCR innerhalb der STR-Analyse (D3S1314, D11S1983, D19S1167) .....63
<b>Tabelle 24:</b>	Mastermix für die 2-plex PCR innerhalb der STR-Analyse (D1S495 und D5S2498).....64
<b>Tabelle 25:</b>	Mastermix für die 2-plex PCR innerhalb der STR-Analyse (D2S1338 und D8S1130, D12S2078 und D20S481) .....64
<b>Tabelle 26:</b>	Temperaturprofil Mastermix für die PCR innerhalb der STR-Analyse.....65
<b>Tabelle 27:</b>	Zyklusanzahl für die einzelnen Marker für die PCR innerhalb der STR-Analyse .....65
<b>Tabelle 28:</b>	Mastermix für die PCR innerhalb der STR-Analyse mittels PAGE-Gel.....66
<b>Tabelle 29:</b>	Temperaturprofil für die PCR innerhalb der STR-Analyse mittels PAGE-Gel für die Marker D1S495 und D3S1314 .....67
<b>Tabelle 30:</b>	Temperaturprofil für die PCR innerhalb der STR-Analyse mittels PAGE-Gel für die Marker D2S1338, D5S2498 und D12S2078.....67
<b>Tabelle 31:</b>	Mastermix für ein 8% Polyacrylamidgel.....68
<b>Tabelle 32:</b>	Liste der in Abbildung 16 dargestellten, mittels Maldi-TOF MS in einer Multiplexreaktion (Hexaplex) untersuchten, SNPs. Von links nach rechts: NCBI rs Nummer, Größe des Amplikons in der PCR (in bp), Masse des nicht extendierten Primers (in Dalton), Genotyp Allel 1, Masse Allel 1 (in Dalton), Genotyp des Allel 2, Masse Allel 2 (in Dalton) ..78
<b>Tabelle 33:</b>	Vergleich der SNP-Genotypisierung von 41 Probenpärchen, bestehend aus je einer Vollblut-DNA-Probe und einer Whole Genome amplifizierten (WGA) Plasma-DNA, des Evaluations-Probensets. Neunzehn bzw. drei SNPs wurden mittel Maldi-TOF MS und TaqMan-Assays genotypisiert, daraus resultierten 902 Genotypen. ....82
<b>Tabelle 34:</b>	Vergleich der STR-Genotypisierung bei 41 Probenpärchen aus Vollblut-DNA und WGA-Plasma-DNA des Evaluierungs-Probensets. Insgesamt wurden 369 Genotypenpaare erhalten. ....87
<b>Tabelle 35:</b>	Vergleich der STR-Genotypisierung in 47 Probenpärchen aus Vollblut-DNA und WGA-Plasma-DNA des Validierungs-Probensets. Insgesamt wurden 423 Genotypenpaare erhalten. ....89
<b>Tabelle 36:</b>	Vergleich der SNP-Genotypisierung in 47 Probenpärchen bestehend aus einer Vollblut-DNA und einer mittels WGA amplifizierten Plasma-DNA derselben Person des Validierungs-Probensets. Achtzehn bzw. 3 SNPs wurden mittels Maldi-TOF-MS und TaqMan-Assays genotypisiert, daraus resultierten insgesamt 987 Genotyppaare.....92
<b>Tabelle 37:</b>	Abhängigkeit der diskordanten Genotypen von der Anzahl der homozygoten STR-Marker und der Menge der in die WGA-Reaktion

	eingesetzten Plasma-DNA. Die Prozentzahlen zeigen die Diskordanzen für STRs und SNPs zwischen Vollblut-DNA und WGA-Plasma-DNA stratifiziert für die Anzahl der ermittelten Homozygoten bei den neun genotypisierten STR-Markern in der WGA-Plasma-DNA.....	99
<b>Tabelle 38:</b>	Vergleich der STR-Genotypisierung in allen 88 Probenpärchen aus Vollblut-DNA und WGA-Plasma-DNA. Insgesamt wurden 792 Genotypenpaare erhalten.....	107
<b>Tabelle 39:</b>	Vergleich der Studien, die bisher zu WGA aus Plasma-DNA erschienen sind.....	111

## Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Florian Kronenberg, Direktor der Division für genetische Epidemiologie (Department für medizinische Genetik, klinische und molekulare Pharmakologie) der Medizinischen Universität Innsbruck danke ich ganz besonders für die Vergabe dieser interessanten Arbeit und für die Möglichkeit, diese an seinem Institut anfertigen zu können. Für die Betreuung dieser Arbeit, sein Vertrauen, seine Unterstützung, Ratschläge in Theorie und Praxis, seine Begeisterung und Motivation für die verschiedenen Aspekte der Wissenschaft sowie ganz besonders für seine herzliche Menschlichkeit bin ich sehr dankbar.

Herrn Prof. Dr. G. Utermann, Direktor des Department für medizinische Genetik, klinische und molekulare Pharmakologie, danke ich für die Möglichkeit, die Promotion an seinem Institut durchführen zu können sowie für seine vielen Ratschläge und seine Unterstützung.

Dr. Arno Lingenhel und Dr. K. Schmidt möchte ich meinen Dank für die inspirierenden Stunden innerhalb und außerhalb des Instituts, für ihre stetige Motivation und ihre Liebeshwürdigkeit sagen, ohne sie wären viele Teile der Arbeit nicht möglich geworden.

Herrn Prof. Dr. H. Höhn gilt mein Dank die Arbeit an seinem Institut anfertigen zu dürfen sowie für die Motivation, diese Arbeit in Innsbruck anzufertigen, für die Übernahme der Arbeit und deren Begutachtung.

Herrn Prof. F. Jakob gilt mein Dank für die Übernahme des Koreferates.

Den Kollegen aus dem Labor und dem gesamten Institut in Innsbruck und sowie an der GSF in München gilt ein ganz herzliches Dankeschön für ihre tägliche Unterstützung und die vielen Ideen, die maßgeblich zur Entwicklung dieser Arbeit beigetragen haben.

Meinen Eltern und meinen Geschwistern gilt mein Dank für die fortwährende herzliche Unterstützung, dass sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen und die somit meinen privaten und beruflichen Weg erst möglich gemacht haben.

Meinen Freunden möchte ich für die andauernde Unterstützung, die wohlgemeinten Ratschläge und besonders die wunderbare gemeinsame Zeit danken.

## Lebenslauf

Name: Veit Schoenborn

Geburtsdatum: 04.02.1977

Geburtsort: Starnberg

Nationalität: Deutsch

Familienstand: ledig

---

### Berufserfahrung

Seit 10/2008                      Assistenzarzt, Unfallchirurgie Universitätsspital Zürich, Prof. Dr. Hans-Peter Simmen

07/2007- 08/2008              Assistenzarzt, Klinik Gut, St. Moritz, Dr. J.P. Ackermann

---

### Hochschulbildung

05/2007                              3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

09/2005                              2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

03/2002                              1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

08/2000                              Physikum

05/1998                              Beginn des Medizinstudiums, Universität Würzburg

---

### Ersatzdienst

08/1996 – 01/1998              Villa Viva, Kurzzeitpflege für behinderte Kinder, Kempten

---

### Schulbildung

1987 - 1996                        Carl-von-Linde Gymnasium Kempten

1983 - 1987                        Grundschule Sulzberg

---

### Sprachkenntnisse

Deutsch (Muttersprache), Englisch (fließend), Französisch (3 Jahre Schulbildung), Italienisch (Grundkenntnisse), Latein (Latinum)

## Publikationsliste

Schoenborn V, Gohlke H, Heid IM, Illig T, Utermann G, Kronenberg F: *Sample Selection algorithm to improve quality of genotyping from plasma-derived DNA: to separate the wheat from the chaff*. Hum Mutat 2007;28:1141-1149.

Schoenborn V, Heid IM, Vollmert C, Lingenhel A, Adams TD, Hopkins PN, Illig T, Zimmermann R, Zechner R, Hunt SC, Kronenberg F: *The ATGL gene is associated with free fatty acids, triglycerides, and type 2 diabetes*. Diabetes 2006;55:1270-1275.

## Preise und Auszeichnungen

- |         |  |
|---------|--|
| 09/2007 | Wissenschaftspreis 2007 der Österreichischen Gesellschaft für Humangenetik (ÖGH) für die vorliegende Arbeit. |
| 05/2006 | AESCA-MSD Posterpreis der Österreichischen Atherosklerosegesellschaft (AAS)                                  |

## Angemeldete Patente

Schoenborn V, Heid IM, Kronenberg F, Medizinische Universität Innsbruck: „Means and methods for diagnosing ATGL related disorders“, International Application No.: PCT/EP2006/009451, 12.04.2007.