

**Westfälische
Wilhelms Universität
Münster**

Mikrobiologie

**Entwicklung eines DNA-„chip“ zur Detektion somatischer
Mutationen in Brustkrebszellen**

Inaugural–Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms Universität Münster

vorgelegt von
Anja Husemann
(geb. Merschjann)

aus Ibbenbüren
-2004-

Dekan:

Prof. Dr. A. Steinbüchel

Erste Gutachterin:

Prof. Dr. A. Barnekow

Zweiter Gutachter:

PD Dr. U. Seedorf

Tag der mündlichen Prüfung(en):

14./18./19. Mai 2004

Tag der Promotion:

11. Juni 2004

*für Axel und Annabelle
und meine Eltern*

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Gene und Krebs	1
1.1.1 Brustkrebsrisikogene: <i>BRCA1</i> und <i>BRCA2</i>	6
1.2 Somatische und hereditäre Mutationen	8
1.3 Prädiktive molekulargenetische Diagnostik.....	9
1.3.1 Entwicklungstechnologien in der SNP-Analyse.....	10
1.3.2 Das Prinzip der DNA-„chip“-Technologie	12
1.3.3 Aktueller Stand der SNP-„chip“-Analyse	13
1.3.4 DNA-„mismatch“-bindende Proteine: MutS und MutM	15
2 Zielsetzung.....	18
3 Material	19
3.1 Chemikalien.....	19
3.2 Geräte.....	20
3.3 Stammlösungen und Puffer	21
3.4 Medien.....	21
3.5 Organismen und Vektorsysteme	22
3.5.1 Organismen	22
3.5.2 Vektorsysteme	22
3.6 Enzyme und Testsysteme	23
3.6.1 Enzyme.....	23
3.6.2 Testsysteme.....	23
3.7 Antikörper	24

3.8	Größenstandard	24
3.9	Oligonukleotide für die PCR	25
3.10	Oligonukleotide zur Sequenzierung.....	26
3.11	Oligonukleotide zur DNA Hybridisierung.....	26
3.11.1	Sonden und „targets“ für den Slot Blot-Test.....	27
3.11.2	Sonden und „targets“ für den DNA-„chip“.....	27
3.12	QMT-Glas-„slides“	29
3.13	Nadel-Spotter „MikroGridII“.....	30
3.14	„spotting“-Nadeln	32
3.15	„Array Scanner“	33
4	Methoden.....	34
4.1	Methoden der allgemeinen Mikrobiologie	34
4.1.1	Stammhaltung von <i>E.coli</i>	34
4.1.2	Anzucht von <i>Thermus thermophilus</i> (HB8)	34
4.1.3	Isolierung von Gesamt-DNA	34
4.1.4	DNA Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	34
4.2	Aufreinigung und Trennung und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	36
4.2.1	PCR Aufreinigung	36
4.2.2	DNA Agarose-Gelelektrophorese.....	37
4.2.3	Isolierung und Reinigung der DNA Fragmente	37
4.2.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	38
4.3	Methoden zur Klonierung rekombinanter Plasmide	38
4.3.1	Restriktionsspaltung.....	38
4.3.2	Dephosphorylierung von 5`-Enden	39
4.3.3	Klonierung.....	39
4.3.3.1	Klonierung der PCR-Produkte in den TOPO-TA- Klonierungsvektor	41
4.3.3.2	Klonierung in die Expressionsvektoren pQE und pCAL	41

4.3.4	Ligation	41
4.4	Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien.....	42
4.4.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	42
4.4.2	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	43
4.5	Plasmidpräparation und Analyse von DNA.....	44
4.5.1	Plasmidminipräparation.....	44
4.5.2	Plasmidmidipräparation.....	44
4.5.3	Sequenzierung von DNA.....	44
4.5.4	Sequenzierung durch Kapillarelektrophorese	46
4.6	Proteinchemische Methoden	46
4.6.1	Proteinüberexpression	47
4.6.2	Proteinaufreinigung.....	47
4.6.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	48
4.6.4	Coomassie Färbung.....	49
4.6.5	Western Blot Analyse.....	50
4.6.6	Immunologischer Nachweis	51
4.7	DNA/ Protein-Bindungs-Test	51
4.7.1	„Gelshift“-Test	51
4.7.2	Slot Blot Test.....	53
4.8	DNA „Mikroarray“	54
4.8.1	„spotten“ der DNA-Sonden.....	54
4.8.2	Hybridisierung und Detektion fluoreszenzmarkierter DNA- „targets“	56
4.8.3	Aufbau eines SNP-Analyse-„chips“ auf der Basis des DNA- „mismatch“-bindenden Proteins myc-MutS	59
4.8.4	Versuche zur Optimierung der myc-MutS Bindungsaffinität.....	62
4.8.4.1	Untersuchung des Einfluss einer „Mung Bean Nuclease“	62
4.8.4.2	Untersuchung des Einflusses durch „single strand binding“ Proteine („SSB“)	63
4.8.4.3	Amplifikation genetischer <i>BRCA1</i> -Sequenzen zur diagnostischen Applikation.....	63

5	Ergebnisse	65
5.1	Amplifikation und Modifizierung der DNA-„mismatch“-bindenden Proteine MutS und MutM.....	66
5.1.1	DNA Isolierung und Genamplifikation	66
5.1.2	Modifizierung und Subklonierung der amplifizierten Fragmente.....	68
5.1.3	Endklonierung in den pCal-Expressionsvektor.....	69
5.2	Kontrolle der modifizierten myc-Fragmente durch “cycle-sequencing”	71
5.3	Ergebnisse der proteinchemischen Untersuchungen	72
5.4	DNA-Bindungs-Tests.....	74
5.4.1	Ergebnisse des „Gelshift“ Tests.....	74
5.4.2	Ergebnisse des Slot Blot Tests	75
5.5	Entwicklung und Optimierung eines „SNP-chip“	78
5.5.1	Ergebnisse der optimierten DNA-Hybridisierung auf dem DNA-„chip“	80
5.5.2	Ergebnisse der myc-MutS Detektion an fehlgepaarte DNA-Sequenzen.....	82
5.5.3	Einfluss des „SSB“-Proteins auf die DNA-„mismatch“ Detektion.....	85
5.5.4	Einfluss der „Mung Bean Nuclease“ auf die DNA-„mismatch“ Detektion	87
5.5.5	Diagnostische Applikation des DNA-„mismatch“-bindenden Proteins myc-MutS.....	89
6	Diskussion	90
6.1	Modifizierte DNA-„mismatch“-bindende Proteine: myc-MutS und myc-MutM.....	91
6.2	Untersuchungen zur myc-MutS/ DNA-„mismatch“-Bindungsaffinität	92
6.3	Detektion somatischer Mutationen auf einem DNA-„chip“	93
6.3.1	Untersuchungen zur DNA-Hybridisierung	94

6.3.2	Untersuchungen zur myc-MutS-Detektion an fehlgepaarte DNA-Sequenzen	95
6.3.3	Untersuchungen zur diagnostischen Applikation	99
6.4	Ausblick	100
7	Zusammenfassung	101
8	Literaturverzeichnis	103
9	Anhang	113
	Danksagung	119
	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Mehrschritthypothese zur malignen Transformation von Zellen bei der Karzinogenese.....	3
Abb. 2	Innenansicht des „MicroGridII“	31
Abb. 3	SMP3-„stealthpin-spotting“ Nadel (TeleChem).....	32
Abb. 4	Intensitätsverlauf des Fluoreszenzsignals in der Falschfarbendarstellung	33
Abb. 5	Darstellung der MutS- und MutM-Modifizierung	40
Abb. 6	Schematische Darstellung eines DNA-„chips“	58
Abb. 7	Schematischer Verlauf der DNA-„mismatch“-Detektion mit Hilfe des modifizierten myc-MutS.	61
Abb. 8	Entwicklungsschema eines DNA-„chips“	66
Abb. 9	Trennung der PCR-Fragmente im Agarosegel (1%).....	67
Abb. 10	Verlaufsschema zur Klonierung und Expression der Gensequenzen MutS und MutM	68
Abb. 11	Gelelektrophoretische Trennung der restringierten Klonierungskonstrukte: pCAL-myc-MutM und pCAL-myc-MutS	70
Abb. 12	Untersuchungen zur Proteinaufreinigung und Identifizierung	72
Abb. 13	Calmodulin-markiertes myc-MutS Protein nach der Proteinaufreinigung in der SDS-PAGE (Coomassie-Färbung).....	73
Abb. 14	Calmodulin-markiertes myc-MutM Protein nach der Proteinaufreinigung in der Western Blot Analyse.....	73
Abb. 15	DNA-Bindungs-Tests zur Kontrolle der DNA-„mismatch“-bindenden Funktion	74
Abb. 16	Kontrolle der DNA-„mismatch“-bindenden Affinität im Slot Blot Test	76
Abb. 17	Optimierungsfaktoren zur Erhöhung der Bindungsaffinität des DNA-„mismatch“-bindenden Proteins myc-MutS auf dem DNA-„chip“	78
Abb. 18	Darstellung eines DNA-„Arrays“	79
Abb. 19	Darstellung der optimierten DNA-Hybridisierung	81
Abb. 20	DNA-„mismatch“-Detektion (A/A, A/G, A/C) auf einem DNA-„chip“	83
Abb. 21	DNA-„mismatch“- Detektion (A/G, T/G, G/G) auf einem DNA-„chip“	84
Abb. 22	DNA-„mismatch“- Detektion (C/A, G/A, A/A) nach „SSB“-Protein-Inkubation	86

Abb. 23	DNA-„mismatch“ Detektion (C/A, G/A, A/A) nach „Mung Bean Nuclease“ Inkubation	87
Abb. 24	DNA-„mismatch“-Detektion (C/A, G/A, A/A) nach Inkubation mit einer „Mung Bean Nuclease“	88

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Beispiele von Protoonkogen-Alterationen bei menschlichen Tumoren (modifiziert nach Kolb und Reilly, 1999, Wrba 1997).....	5
Tab. 2	Beispiele von Tumorsuppressorgenen (Kolb und Reilly, 1999; Wrba, 1997)	6
Tab. 3	Einstellungen des „MikroGridII“	30
Tab. 4	PCR-Ansätze.....	36
Tab. 5	Temperaturen und Reaktionszeiten der „touch-down-PCR zur MutS- Amplifizierung“	36
Tab. 6	Temperaturen und Reaktionszeiten der „Gradienten-PCR zur MutS- Amplifizierung“	36
Tab. 7	Temperaturen und Reaktionszeiten der „Standard“-PCR.....	36
Tab. 8	Komponenten und Volumen des Reaktionsansatzes I	38
Tab. 9	Komponenten und Volumen des Reaktionsansatzes II	39
Tab. 10	Komponenten und Volumen der Ligationsansätze	42
Tab. 11	Reaktionsansätze des „cycle-sequencing“	45
Tab. 12	Reaktionsbedingungen des „cycle-sequencing“	45
Tab. 13	Zusammensetzung der Komponenten des Sammel- und Trenngels für die Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	48

Abkürzungsverzeichnis

λ	Wellenlänge
°C	Grad Celsius
μ	mikro
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
Amp	Ampicillin
AP	“annealing”-Puffer
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
b/bp	Basen/Basenpaare
bidest	zweifach destilliertes Wasser
BPB	Bromphenolblau
<i>BRCA1</i>	„breast cancer 1“, Brustkrebsrisikogen1
<i>BRCA2</i>	„breast cancer 2“, Brustkrebsrisikogen2
BSA	„bovine serum albumine“, Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
Ca	Calcium
ca.	circa
Cal	Calmodulin
cDNA	komplementäre DNA
C-terminal	carboxyterminal
d.h.	das heißt
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dB	dezibel
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxycytosintriphosphat
ddGTP	Didesoxyguanosintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
dest.	destilliert
DGGE	denaturierende Gradientengelelektrophorese
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid

dsDNA	„double strand DNA“, doppelsträngige DANN
DTT	1,4-Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylen-glycolbis(-aminoethyl)-tetraacetic acid
EL	Eluat
<i>erbB</i>	Onkogen des „avian erythroblastosis virus“
<i>et al.</i>	et altera
etc.	et cetera
EtOH	Ethanol
for	„forward“, vorder
g	Erdbeschleunigung oder Gramm
G	Guanin
gp	Glykoprotein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HA	Heteroduplexanalyse
HCL	Salzsäure
HGO	Humanes Genomprojekt
HNPPC	hereditäres nicht polypöses Kolorektalcarcinom
<i>in vitro</i>	im Reagenzglas
<i>in vivo</i>	im lebenden System
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactosid
K	Kilo
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LDR	„ligase detection reaction“, Ligasedetektionsreaktion
m	milli
M	mol/l
MALDI-TOF-MS	Matrix-unterstützte Laser Desorption/ Ionisation Flugzeit Massenspektrometrie
MCS	„multiple cloning site“, multiple Klonierungsstelle
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
MP	Milchpulver
mRNA	„messenger RNA“, „Boten“-RNA
MRS	„mismatch repair system“, Basenfehlpaarungsreparatursystem
<i>MSS4</i>	multicopy suppressor protein of sec4
<i>myc</i>	Onkogen des Vogel-Myelocytom-Virus

n	nano
NaAc	Natriumacetat
NaClO ₄	Natriumperchlorat
Nr.	Nummer
nt	Nukleotide
N-terminal	aminoterminal
OD	optische Dichte
P	Pellet
p	pico
PAA	Polyacrylamidgel
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	„phosphate buffered saline“, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	„polymerase chain reaction“, Polymerasekettenreaktion
POD	Peroxidase
QMT	„quantifoil epoxy coated-slides“
<i>ras</i>	Onkogen des "murine sarcoma virus" ("rat sarcoma")
Rev	„reverse“, umgekehrt
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s. o.	siehe oben
SDS	Sodium dodecylsulfat
sec	Sekunde
s.	siehe
SMP3	„stealth microspotting pin“
SNP	„single nucleotid polymorphism“, Einzelnukleotidpolymorphismus
sog.	sogenannte
<i>src</i>	Onkogen des RSV
SSC	„saline sodium citrat“
SSCP	„single strand conformation polymorphism“, Einzelstrangkonnformationspolymorphismus
ssDNA	„single strand“ DNA, einzelsträngige DNA
STR´s	„simple tandem repeats“, Mikrosatelliten
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-Puffer
TF	Trankriptionsfaktor
TGGE	„temperature gradienten gelelektrophorese“, Temperatur- Gradientengelelektrophorese
THLSLM	Trx-His ₆ -Linker peptide-Strep-tagII-Linker peptide MutS
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan

U	Unit, Einheit
u.a.	unter anderem
Ü/N	über Nacht
ÜST	Überstand
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	„volume per volume“, Volumen pro Volumen
VNTR´s	„variable number of tandem repeats“, Minisatelliten
w/v	„weight per volume“, Gewicht pro Volumen
wt	„wild typ“, unveränderte Zelle (Ursprungszelle)
YT	„yeast tryptone“, tryptisch verdauter Hefeextrakt
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Gene und Krebs

Die DNA eines jeden Chromosoms trägt Tausende von Informationseinheiten, die sog. Gene, welche Träger der Erbinformationen in der Zelle sind (Levine, 1997). Jede humane Zelle enthält schätzungsweise 30.000 bis 40.000 Gene, deren Funktionen bis heute vielfach noch nicht bekannt sind (Strachan und Read 1996).

Um das menschliche Genom zu entschlüsseln, wurde 1990 in den USA das "*Human Genome Project*" (HGO) gegründet. Hauptaufgabe dieses Projektes war es, das Genom des Menschen zu sequenzieren, d.h. die Sequenz der DNA zu ermitteln, um die Funktionen der Gene zu erforschen. Im Februar 2001 wurden die ersten Ergebnisse der ermittelten DNA-Sequenzen in *Nature und Science* von Wissenschaftlern des "Human Genome Projects" und dem Forschungsteam der Fa. Celera Inc. publiziert (Venter *et al.*, 2001). Seitdem wächst das Interesse der Wissenschaftler zunehmend, die Zusammenhänge zwischen Genen und Krankheiten zu erforschen und zu verstehen (Collins 1999; Stephenson, 1999).

Bisher konnte für eine wachsende Zahl von Krankheiten (Herzerkrankungen, bösartigen Neoplasien, Diabetes mellitus) nachgewiesen werden, dass sie durch genetische Faktoren beeinflusst werden (Weinberg *et al.* 1994). Allein in Deutschland erkranken jährlich mehr als 400.000 Menschen an Krebs. Etwa jeder vierte Mensch stirbt an einer bösartigen Neoplasie (Statistisches Bundesamt, 2003). Dabei lassen sich ca. 10 bis 15% der Krebserkrankungen durch Mutationen einzelner Gene erklären, die mit einem erhöhten Risiko zur Entwicklung von Krebserkrankungen verbunden sind (Fearon, 1997; Bartram, 1999).

Krebs ist ein Sammelbegriff für verschiedene Erkrankungen, die ihren Ursprung auf genetischer Ebene nehmen und in Phasen ablaufen. Normalerweise sind die Zellen eines intakten multizellulären Organismus auf Zusammenarbeit und Kooperation programmiert (Varmus und Weinberg, 1994; Jackson und Loeb, 1998). Durch initiale genetische Alterationen, vererbt oder erworben, und durch Akkumulation weiterer genetischer Veränderungen, erwerben Krebszellen einen Wachstums- und Überlebensvorteil gegenüber normalen Zellen, der durch invasives und destruktives

Wachstum sowie Metastasierung gekennzeichnet ist (Hanahan und Weinberg 2000). Die maligne Transformation von Zellen, nach der Mehrschritthypothese von Knudson, erfolgt über mehrere Transformationsstufen bis zum Vorliegen eines neoplastischen Klon, der alle Kriterien einer malignen Neoplasie wie invasives Wachstum und metastatisches Potential erfüllt (Knudson 1985; Kinzler und Vogelstein, 1996). Sofern nur ein Allel durch Mutation ausgeschaltet ist kann das andere, noch gesunde, diesen Mißstand kompensieren. Treten im Verlauf jedoch auch Veränderungen des gesunden Allels auf, kann die reguläre zelluläre Funktion der Gene aufgehoben sein. Die Pathogenese der Krebsentstehung (Karzinogenese) ist also kein singuläres Ereignis, sondern eine Serie somatischer Mutationen in unterschiedlichen Genen, die über mehrere Jahre hinweg kumulieren (Fearon und Vogelstein, 1990; Hahn 1999; Hanahan und Weinberg, 2000). Im transformierten Gewebe findet eine sog. Mikroevolution statt. Fortschreitende Veränderungen wie Punktmutationen, chromosomale Translokationen und Amplifikation von Genabschnitten können zur Inaktivierung und Überexpression von Genen führen, die zelluläre Signalkaskaden untereinander beeinflussen durch Überstimulation bzw. Inaktivierung (Abb. 1) (Kinzler und Vogelstein, 1997; Skope und Fusening 1998; Olumi *et al.*, 1999).

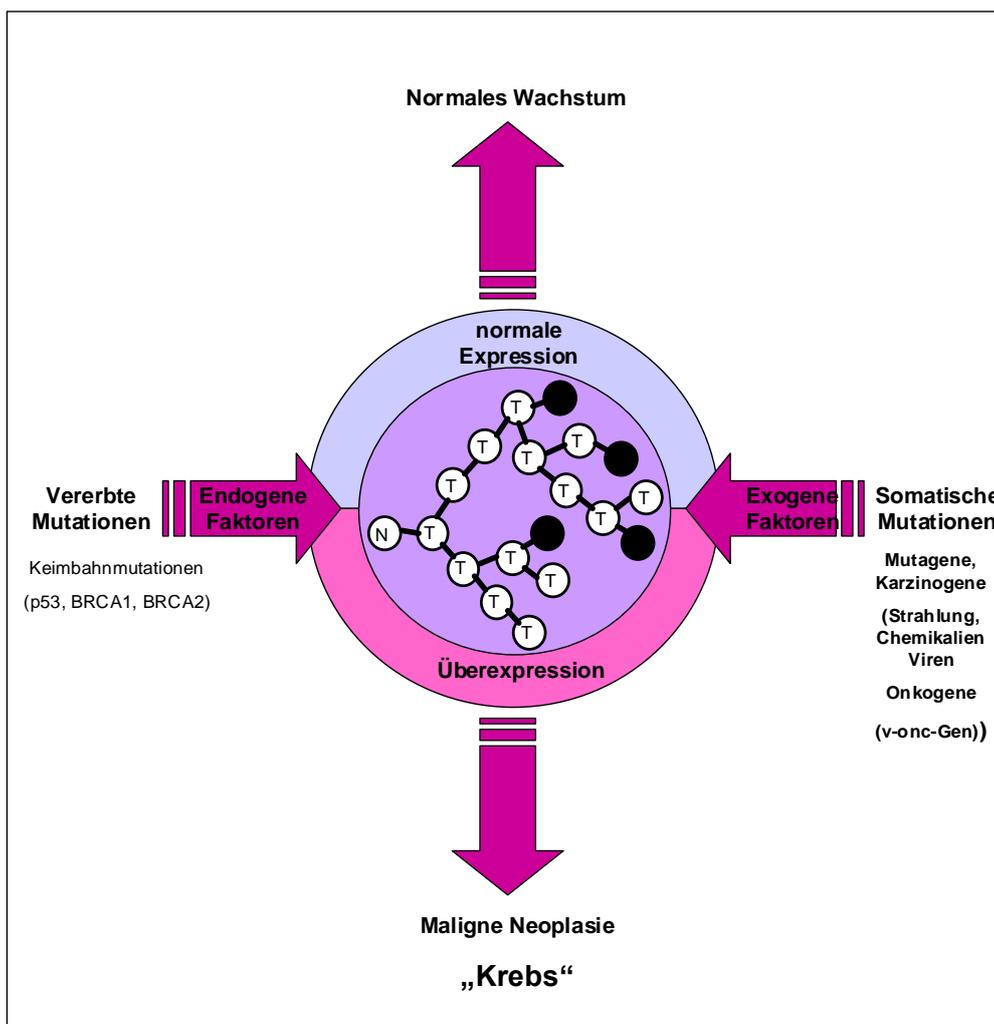


Abb. 1 Mehrschritthypothese zur malignen Transformation von Zellen bei der Karzinogenese.

Die Entwicklung einer normalen Zelle zu einem malignen Zellklon hängt sowohl von endogenen als auch von exogenen Faktoren ab. So erwirbt die Zelle mit jeder kumulierenden Mutation (schwarze Punkte) einen weiteren Wachstumsvorteil gegenüber anderen Zellen. Dabei müssen jedoch nicht alle Mutationen in einem solchen Vorteil resultieren. (modifiziert nach Nowell, 1976 und Arends, 2000)

Entscheidend für die Entstehung maligner Tumorzellen ist die Schädigung von Genen, die das Zellwachstum regulieren. Dabei spielen zwei Klassen von Genen eine wesentliche Rolle: Proto-Onkogene und Tumorsuppressorgene (Bishop und Weinberg 1996). Proto-Onkogene weisen drei wesentliche Unterschiede gegenüber den Tumorsuppressorgenen auf: Sie werden erst durch schädliche Aktivierung (radioaktive Strahlung, chemische Substanzen oder Viren) wirksam, sind dominant aktiv und treten überwiegend nicht im Erbgut auf (Hunter, 1997). Aktivierte Onkogene lassen sich hauptsächlich als somatische Mutationen nachweisen. Bis heute sind mehr als 50 Proto-Onkogene bekannt (Wrba, 1997). Zur Klasse der Proto-Onkogene gehören u.a. die Gene für Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, wie z. B. das erbB-2-Onkoprotein. ErbB-2-Onkoproteine können zu einer übermäßigen Aktivität

des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGF-R) führen (DiFiore *et al.*, 1987; Brandt *et al.*, 1999; Dittmer *et al.*, 2002). Häufig tragen zum Beispiel Brustkrebszellen auf ihrer Oberfläche erbB-2-Rezeptormoleküle, die sich aufgrund genetischer Veränderungen fehlverhalten (Slamon *et al.*, 1987; Yarden und Ullrich 1988). Andere Onkogene weisen Störungen innerhalb der Signalkaskade im Zytoplasma auf. Als Beispiel hierfür ist die Familie der *ras*-Onkogene zu nennen. Proteine mutierter *ras*-Gene melden unablässig stimulatorische Signale an nachgeschaltete Proteine innerhalb der SOS-Ras-Raf-MAP-Signalkaskade weiter (Medema und Bos, 1993; Giancotti und Ruoslahti, 1999). Aktiv veränderte Ras-Proteine treten bei ca. 30-35% aller Tumoren des Menschen auf, darunter Karzinome von Dickdarm, Lunge und Bauchspeicheldrüse (Hall *et al.*, 1983; Kinzler und Vogelstein, 1996; Downward *et al.*, 1998). Eine andere Klasse von Onkogenen beeinflusst die Aktivität von Transkriptionsfaktoren im Zellkern. Zu dieser Klasse gehören die *myc*-Onkogene (Grandori und Eisenman, 1997). Eine erhöhte Konzentration von Myc-Proteinen in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren zeigt sich besonders häufig bei malignen Veränderungen des butbildenden Systems (Dang, 1989). In der Tab. 1 werden Beispiele von Proto-Onkogen-Alterationen bei menschlichen Tumoren aufgeführt:

Tab. 1 Beispiele von Protoonkogen-Alterationen bei menschlichen Tumoren (modifiziert nach Kolb und Reilly, 1999, Wrba 1997).

Gen	Tumor
<i>Sis</i>	Glioblastom
<i>int-2</i>	Mamma-, Kopf-/Halskarzinom
<i>erbB-1/ EGFR</i>	Glioblastome, Plattenepithelkarzinome
<i>erbB-2/her-2/neu</i>	Mamma-, Ovarial-, Bronchialkarzinom
<i>Ret</i>	Schilddrüsenkarzinom
<i>Ros</i>	Glioblastom
<i>Trk</i>	Schilddrüsenkarzinom
<i>H-ras</i>	Lungen-, Kolon-, Pankreaskarzinom
<i>K-ras</i>	Melanom, Schilddrüsenkarzinom, AML, ALL
<i>N-ras</i>	Melanom, Schilddrüsen-, Harnblasenkarzinom
<i>Src</i>	Kolonkarzinom
<i>Abl</i>	CML
<i>Myc</i>	BURKITT* Lymphom, Bronchial-, Zervix-, Mammakarzinom
<i>L-myc</i>	Bronchialkarzinom
<i>N-myc</i>	Neuroblastom, kleinzelliges Bronchialkarzinom
<i>Myb</i>	kolorektales Karzinom
<i>Ets</i>	Lymphome, Leukämien
<i>CyclinD/prad-1</i>	Mammakarzinom

Ebenso kann es infolge inaktivierender Mutationen von Tumorsuppressorgenen entweder zu unkontrolliertem Zellwachstum und Zelltod oder zum Ausbleiben der zelleigenen DNA-Reparatur kommen (Casey *et al.*, 1991). Man unterscheidet bei den Tumorsuppressorgenen anhand der Funktionsweise ihrer Genprodukte zwei Klassen: „Gatekeeper“-Gene und „Caretaker“-Gene. „Gatekeeper“-Gene wurden bei verschiedenen erblichen Tumoren auf Zellart-spezifischer Basis definiert. Sie kodieren i. d. R. für Proteine, die die Proliferation hemmen bzw. Apoptose einleiten. Ein wichtiger Vertreter dieser Gruppe ist das Tumorsuppressorgen *p53*, das bei ca. 50% aller Tumoren beteiligt ist (Harris, 1996). Die zweite Klasse bilden sog. „Caretaker“-Gene, deren Genprodukte Einfluss auf die DNA-Replikation und – Reparatur nehmen. Der Ausfall ihrer Funktion bedingt eine erhöhte Mutationsrate in den betroffenen Zellen, wodurch die schnelle Progression solcher Tumoren erklärt wird (Loeb 1991; 1998). Dazu gehört z. B. das erbliche nicht mit Polyposis coli assoziierte Dickdarmkarzinom (HNPCC) (Kinzler und Vogelstein, 1996). Weitere

„Caretaker“-Tumorsuppressorgene sind die sog. Brustkrebsrisikogene *BRCA1* und *BRCA2*. Die Tab. 2 stellt eine Auswahl bekannter Tumorsuppressorgene dar:

Tab. 2 Beispiele von Tumorsuppressorgenen (Kolb und Reilly, 1999; Wrba, 1997)

Gen	chromosomale Lokalisation	Funktion/Lokalisation des Produkts	mit Funktionsverlust assoziierte Tumoren
<i>Rb</i>	13q14	TF	Retinoblastom, Osteosarkom, Karzinome von Mamma, Harnblase u. Lunge
<i>p53</i>	17p13	TF	multiple, LI-FRAUMENI* Syndrom
<i>APC</i>	5q21	Signaltransduktion	Kolon-, Prostatakarzinom, familiäre Adenomatose
<i>MCC</i>	5q21	Zytoplasma	Kolon-, Prostatakarzinom, familiäre Adenomatose
<i>DCC</i>	18q21	Zelladhäsion	Kolon-, Ösophaguskarzinom
<i>WT-1</i>	11p13	TF	WILMS* Tumor, Denys-Drash* Syndrom
<i>VHL</i>	3p25	Transkriptionsregulation, Elongation	VON-HIPPEL*-LINDAU* Syndrom, Nierenzellkarzinom
<i>BRCA-1</i>	17q21	TF	hereditäre (sporadische) Mamma- u. Ovarialkarzinome
<i>BRCA-2</i>	13q12-q13	TF	hereditäre (sporadische) Mammakarzinome
<i>hMSH2</i>	2p16	DNS-Reparaturenzym	Kolonkarzinom
<i>hPMS1</i>	2q31-q33	DNS-Reparaturenzym	Kolonkarzinom
<i>hMLH1</i>	3p21-p23	DNS-Reparaturenzym	Kolonkarzinom

1.1.1 Brustkrebsrisikogene: *BRCA1* und *BRCA2*

Brustkrebs ist in den meisten industrialisierten Ländern die häufigste Krebserkrankung und Krebs-Todesursache der Frau. Weltweit wird pro Jahr bei ca. 1 Million Frauen Brustkrebs diagnostiziert (Kelsey und Horn-Ross, 1993). In Deutschland erkranken jährlich ca. 50.000 Frauen (Nestle-Krämling *et al.*, 2001). Etwa die Hälfte aller Brustkrebsfälle tritt nach dem 60. Lebensjahr auf und ist durch das Geschlecht, Lebensalter bzw. verschiedenste Risikofaktoren (Hormonpräparate, erste Menstruation) bedingt. Die Mehrzahl der Brustkrebsfälle, ca. 75%, tritt sporadisch, d.h. ohne erkennbaren familiären Hintergrund auf (Kelsey und Horn-Ross, 1993).

In Fällen, wo Brustkrebs in einem ungewöhnlich frühen Alter auftritt, wird eine angeborene, genetische Disposition als Ursache für die Erkrankung vermutet. Dies trifft bei ca. 5-10% der familiären Krebserkrankungen zu (Holzman und Marteau, 2000). 1984 konnten Williams und Anders mit Hilfe der Sekretationsanalyse erste

eindeutige Beweise für das Vorliegen einer genetischen Disposition durch sog. Brustkrebsrisikogene mit hoher Penetranz erbringen. Dieses Modell wurde durch die Sequenzierung von *BRCA1* 1994 und *BRCA2* 1995 verifiziert. Beide Gene erhöhen außerdem das Risiko für Ovarial-(Eierstock)-Krebs (Miki *et al.* 1994; Wooster *et al.*, 1995).

Die Gene *BRCA1* und *BRCA2* werden autosomal-dominant vererbt, d.h. es reicht die fehlerhafte Genkopie eines Elternteils, um das erhöhte Krankheitsrisiko zu tragen. Das *BRCA1*-Gen wurde auf dem langen Arm des Chromosom 17q21 lokalisiert und besteht aus 24 Exonen (Rahman und Stratton, 1998). Statistische Untersuchungen haben gezeigt, dass das Gen für ca. 20-40% der genetisch bedingten Brustkrebserkrankungen verantwortlich ist, wodurch das Brustkrebsrisiko deutlich erhöht wird (Ford *et al.*, 1994). Analog zu *BRCA1* führen auch Mutationen im *BRCA2*-Gen zu einer starken Erhöhung des Brustkrebsrisikos. *BRCA2* wurde auf dem langen Arm von Chromosom 13q12-13 lokalisiert (Rahman und Stratton 1998). Es besteht aus 27 Exons und ist für ca. 35% aller genetischen Brustkrebsfälle verantwortlich (Wooster *et al.*, 1995). Mutationen im *BRCA2*-Gen sind auch bei Männern mit Brustkrebs nachgewiesen worden (Ford *et al.*, 1998).

Weltweit wurden seit der Identifikation der Gene *BRCA1* und *BRCA2* zahlreiche Mutationsanalysen durchgeführt. Die Mutationen sind über die gesamte kodierende Gensequenz verstreut. Die Ergebnisse zeigen über 600 verschiedene Veränderungen im *BRCA1*- und *BRCA2*-Gen (Ford *et al.*, 1998). Eine Mutation in einem dieser beiden Gene bedeutet ein gegenüber der Durchschnittsbevölkerung (10%) stark erhöhtes Risiko (50-80%) an Brustkrebs zu erkranken (Froster *et al.*, 2003). Zu den häufigsten Mutationen im *BRCA1*- und *BRCA2*-Gen gehören die „frameshift“-Mutationen, gefolgt von „nonsense“- und „missense“-Mutationen und Mutationen von Spleiß-Signalsequenzen. Fast 90% dieser Mutationen gehen mit einer Verkürzung („Trunkierung“) oder vollständigen Abwesenheit des kodierenden Proteins einher (Collins *et al.*, 1995; Couch und Hartmann, 1998).

Da unterschiedliche Mutationen eine unterschiedliche Penetranz besitzen, kann nicht genau gesagt werden, wie hoch das tatsächliche Brustkrebsrisiko einer Mutationsträgerin ist. Die Wahrscheinlichkeit mit der eine Genträgerin für eine erbliche Krebsdisposition tatsächlich Symptome entwickelt, hängt vom jeweiligen

Krankheitsbild, sowie der Art und Lage der Mutation innerhalb eines Gens ab (Culver *et al.*, 2000). Um die Überlebensaussichten potentieller Krebsrisikopatienten zu verbessern ist es wichtig, frühzeitig genetische Veränderungen zu erkennen (Schork *et al.*, 2000). Dies könnte mit molekulargenetischen Untersuchungen ermöglicht werden. Nach offiziellen Hochrechnungen sollte es in Zukunft möglich sein, durch die frühzeitige Brustkrebs-Analyse, 3000 bis 4000 Todesfälle jährlich zu vermeiden (Schulz *et al.*, 2002).

1.2 Somatische und hereditäre Mutationen

Allen malignen Tumoren gemeinsam, den hereditären wie den somatischen, ist eine erhöhte genomische Instabilität. Hereditäre, d.h., vererbte genetische Defekte beruhen darauf, dass der genetische Defekt in der Keimzelle eines Elternteils weitervererbt wird. Abhängig von dem betroffenen Gen und seiner Funktion kann dies zur vorzeitigen Tumorentwicklung führen (Fearon und Vogelstein, 1990). Die Keimbahnmutation betrifft zunächst nur ein Allel und hat i.d.R. noch keine Auswirkungen. Es zeigt sich die gleiche schrittweise genetische Veränderung wie bei den spontanen Krebserkrankungen. Aufgrund des genetischen Defektes eines Allels besteht jedoch ein deutlich höheres Risiko durch weitere Mutationen im zweiten Allel die Proliferation eines veränderten Zellklons zu steigern (Bartam *et al.* 1999). Erkrankungen, die auf monogen vererbten Gendefekten beruhen sind sehr selten Ursache einer Krebserkrankung (Hoover, 2000). Der überwiegende Teil resultiert aus dem Zusammenspiel von Umweltfaktoren und Anfälligkeitgenen, sog. Krebsrisikogenen (Hoover, 2000). Einem Review in Science zufolge sind ererbte Mutationen in Keimzellen nur für ca. 4-13% aller Krebserkrankungen verantwortlich (Peltomäki *et al.*, 1993).

In den meisten Fällen sind es exogene Faktoren (Alter, Ernährung, Umwelteinflüsse, ionische Strahlung), die die somatische Tumorentstehung initiieren und fördern (Reit *et al.*, 1991; Perera, 1997; Perera und Weinstein, 2000). Die Tumorerkrankung entwickelt sich unter normalen Lebensumständen, z. B. durch Einflüsse, die die DNA direkt schädigen. Die dadurch hervorgerufenen „spontanen“ Mutationen in der DNA werden nachfolgend bei jeder Mitose an alle folgenden Zellen weitergegeben. Der Umfang der genetischen Veränderungen hängt von dem Entwicklungsstadium der Zelle ab, in dem die Mutation aufgetreten ist (Hanahan und Weinberg, 2000). Die

epidemiologische Arbeit von Lichtenstein *et al.* belegt, dass der Einfluss nicht genetischer Faktoren auf ca. 58-82% geschätzt werden kann (Lichtenstein *et al.*, 2000).

1.3 Prädikitive molekulargenetische Diagnostik

Die Identifikation des genetischen Codes innerhalb der Medizin eröffnet heute die Möglichkeit zur prädiktiven genetischen Diagnostik, d.h. der Untersuchung gesunder Verwandter auf eine Anlage hin, die zur Krebserkrankung im weiteren Leben disponiert. Sobald eine krankheitsrelevante Genvariante identifiziert ist, lassen sich die betreffenden Strukturveränderungen mit Hilfe molekulargenetischer Untersuchungen, sog. „Gentests“, untersuchen (Baird, 2000). Diese vorausschauenden Untersuchungen erlauben es, Personen zu erkennen, die noch nicht krank sind (z.B. beim familiären Brustkrebs). Sie haben zum Ziel, Krankheitsveranlagungen vor deren Manifestation bzw. vor dem Einsetzen schwerer Symptome zu diagnostizieren (Feuerstein und Kollek, 2000).

Durch die Identifizierung des humanen genetischen Codes und der Entschlüsselung der ca. 3,2 Milliarden Basenpaare, stehen den Wissenschaftlern die genetischen Sequenzen durch zugängliche Datenbanken (NCBI) zur Verfügung (Strachan und Read 1999; Venter *et al.*, 2001). Die erhaltenen Sequenzen zeigen aufgrund endogener und exogener Einflüsse eine große Anzahl von natürlich vorkommenden Heterogenitäten, die die Individualität des Menschen begründen (Kirk *et al.*, 2002).

Genetische Heterogenitäten treten entweder spontan durch Mutationen oder aber auch durch Vererbung auf. Man bezeichnet sie als „Polymorphismen“. Die einfachsten Polymorphismen, bei denen nur eine Base, sog. Punktmutationen, ausgetauscht ist, werden als “single nucleotide polymorphisms” (SNP’s) bezeichnet (Sachidanandam *et al.*, 2001). Auf Wiederholungen oder Auslassungen (Deletion) von DNA-Abschnitten basierende Polymorphismen sind bekannt als “simple tandem repeats” (STR’s oder Mikrosatelliten) oder “variable number of tandem repeats” (VNTRs oder Minisatelliten) (Murray *et al.*, 1994; Schork *et al.*, 2000).

Statistisch treten in der humanen DNA genetische Polymorphismen (SNP’s) mit einer Häufigkeit von ca. 1:1000 auf (Venter *et al.*, 2001). In Exon-Regionen wird ihre Häufigkeit mit 1:500 angegeben, während sie in den Intron-Regionen mit einer

Häufigkeit von ca. 1:2000 vorkommen (McPerson *et al.*, 2001). Im September 2001 lagen über 1,4 Millionen identifizierte SNP`s im humanen Genom vor (Sachidanandam *et al.*, 2001; Jenkins und Gibson, 2002). Da viele SNP`s direkt mit Krankheiten assoziiert werden, sind sie innerhalb der medizinischen Diagnostik als sog. „Marker“, von großer Bedeutung. In den letzten Jahren wurde deshalb eine große Anzahl weitreichender SNP-Analyseverfahren entwickelt, von denen einige hier beschrieben werden (Brown, 1999).

1.3.1 Entwicklungstechnologien in der SNP-Analyse

Die in der Molekularbiologie bedeutsamste und älteste Methode der DNA-Analyse, ist die enzymatische Sequenzierung nach Sanger und die chemische Sequenzierung nach Maxam & Gilbert (Maxam und Gilbert, 1977; Sanger *et al.*, 1977). Mit Hilfe dieser Analyseverfahren lassen sich die Basen der DNA-Sequenz und somit Polymorphismen bzw. Mutationen in ihrer genauen Abfolge definieren. Aufgrund des technischen Fortschrittes hinsichtlich der Sequenzierungsautomatisierung, wurde die Sequenzierung nach Maxam & Gilbert durch die Sanger-Sequenzierung immer stärker verdrängt. Statt polymerisierter Gele auf Glasplatten erfolgt die Sequenzierung heute größtenteils in Glaskapillaren mit linear polymerisierten Gelen, der sog. „Kapillarelektrophorese“. Durch diesen Fortschritt konnte die Leseweite der Basenanordnung auf bis zu 1000 bp erweitert werden (Mitchelson, 2001).

DNA-Konformationsanalysen, zu denen die Einzelstrang-Konformations-Polymorphismen-Analyse „SSCP“, die denaturierende Gradientengelelektrophorese „DGGE“ und die Temperaturgradientengelelektrophorese „TGGE“ zählen, werden heute eher selten angewandt (Borresen *et al.*, 1988; Henco *et al.*, 1994; Orita *et al.*, 1989). Die entwickelten Methoden beruhen auf der Eigenschaft von DNA, in Abhängigkeit von Temperatur, Sequenz (Doppel- bzw. Einzelstrang) oder denaturierendem Agens (Harnstoff, Formamid) unterschiedliche Sekundär- und Tertiärstrukturen anzunehmen. Kleinste Änderungen der DNA-Sequenzen führen zu einem veränderten Laufverhalten in dem denaturierenden Polyacrylamidgel. Sie besitzen eine relativ niedrige Detektionsgrenze für Mutationen, da ihre Sensitivität mit der Länge der DNA-Fragmente (PCR-Produkte kleiner als 100 bp) deutlich abnimmt (Orita *et al.*, 1989). Ähnliche Sensitivitätsprobleme zeigen die Mutationsanalysen in nativen Polyacrylamidgelen, die sowohl in der Doppelstrangkonnformationsanalyse

„DSCA“ sowie bei der Heteroduplexanalyse „HA“ verwendet werden (Glavac und Dean, 1995; Aruello *et al.*, 1998). Auch hier resultiert das unterschiedliche Bandenmuster im Gel auf der unterschiedlichen DNA-Konformationen und dem veränderten Laufverhalten.

Deutlich sensitiver dagegen sind DNA-Heterogenitätsanalysen (SNP-Allel-Diskriminierungen) (Glavac und Dean, 1995). Dazu gehören die Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-Analyse „RFLP“, die „realtime-PCR“ (TaqMan), die Massenspektroskopie „MALDI-TOF-MS“ sowie die DNA-„chip“-Analyse. Bei der „RFLP“-Analyse handelt es sich um eine Methode, die heute mit Hilfe moderner molekularbiologischer Geräte aktualisiert wurde. Viele SNP`s werden aufgrund einer spezifischen Erkennungssequenz für ein Restriktionsenzym gespalten. Das Ergebnis der Restriktion wurde ursprünglich mittels Gelelektrophorese ausgewertet (Pourzand und Cerutti, 1993). Neuerdings werden die restringierten DNA-Fragmente auch massenspektrometrisch ermittelt, wodurch die Diagnose schneller und sicherer geworden ist (Jenkins und Gibson, 2002).

Ein breites Anwendungsspektrum in der SNP-Analyse besitzt die Echtzeit-PCR („realtime-PCR“, „TaqMan-Assay“). Aufgrund veränderter DNA-Schmelztemperaturen werden Mutationen innerhalb einer Sequenz schnell und sicher detektiert. Durch die Vorauswahl geeigneter „primer“, müssen die nachzuweisenden Mutationen allerdings bekannt sein (Reiser *et al.*, 1999; van den Bergh *et al.*, 2000).

Neben den genannten Methoden wurde in den letzten Jahren ein weiteres Verfahren entwickelt, welches sich von den bisher beschriebenen Methoden abhebt. Es handelt sich um die DNA-Massenspektrometrie „MALDI-TOF-MS“, die auf der Entwicklung Matrix gestützter Laserdesorption und Ionisation („matrix assisted laser desorption ionisation“) beruht und die Bestimmung verschiedenster Moleküle auf ihre exakte molekulare Masse ermöglicht (Karas und Hillenkamp, 1988). In Verbindung mit einem Flugzeitanalysator („time of flight“, TOF) wird jeder Nukleinsäuresequenz eine spezifische molekulare Gesamtmasse zugeordnet, die sich aus der spezifischen molekularen Masse der einzelnen Nukleotide zusammensetzt (Humeny *et al.*, 2001; Jenkins und Gibson, 2002).

Anfang der 90iger Jahre wurde eine Technologie entwickelt, die im Rahmen der molekularen Diagnostik vielversprechende und vor allem innovative Möglichkeiten hinsichtlich der genetischen DNA-Analyse offerierte. Die Besonderheit dieser Technologie beruht u.a. darauf, dass die DNA nicht mehr in der Flüssigphase vorliegt, sondern an einer Festphase immobilisiert ist (Beaucage, 2001). Es handelt sich um sog. DNA-„chips“, auch DNA-„Mikroarrays“ oder Biochips genannt, deren Versuchsprinzip auf dem Nachweis fluoreszenzmarkierter komplementärer Nukleinsäuren beruht.

1.3.2 Das Prinzip der DNA-„chip“-Technologie

Das Prinzip der DNA-„chip“-Technologie basiert auf der Hybridisierung komplementärer Basen wodurch Basenfehlpaarungen, d.h. Mutationen, in bekannten DNA-Sequenzen aufgedeckt werden können (Brown und Botstein, 1999; Schena, 1999). Die DNA-Hybridisierung ist eine molekularbiologische Technik bei der unter optimalen Versuchsbedingungen zwei einzelsträngige komplementäre Nukleinsäurefragmente aneinander binden wobei die Basen Adenin und Thymin, sowie Guanin und Cytosin über Wasserstoffbrückenbindungen Duplexe formen (Hames und Higgins, 1988). Das Ergebnis dieser Hybridisierung kann entweder direkt durch fluoreszenzmarkierte DNA-Targetmoleküle oder einer indirekten enzymatischen-fluoreszenzgekoppelten Reaktion im Fluoreszenzdetektor dargestellt werden.

Beeinflusst wird die Stabilität der DNA-Duplexe durch die DNA-Schmelztemperatur, Ionenstärke, Lösungsmittel (Formamid) und Anzahl der Basenfehlpaarungen („mismatches“) in der DNA-Sequenz. Der Einfluss der DNA-„mismatches“ ist nicht nur von der Anzahl, sondern auch von der Verteilung der Basenfehlpaarungen in der Sequenz abhängig. Sind die Basenfehlstellungen auf eine Region beschränkt, so bleibt das Hybrid relativ stabil. Verteilen sie sich dagegen über die Sequenz, wird es instabil (Herning *et al.*, 1991; Gotoh *et. al.*, 1995).

In Abhängigkeit von der Art der immobilisierten DNA-Sonden (cDNA-Moleküle bzw. Oligonukleotide) wird zwischen zwei DNA-„chips“ unterschieden: cDNA-„Arrays“ zur Analyse von Genexpressionen und Oligonukleotidarrays zur Analyse von SNP's (Duggan *et al.*, 1999; Relogio *et al.*, 2002)

1.3.3 Aktueller Stand der SNP-„chip“-Analyse

Aufgrund der Effizienz und Generierung von parallelen und vergleichbaren genetischen Daten haben Oligonukleotidarrays einen sehr hohen Stellenwert in der Entwicklung zukünftiger SNP-Analyseverfahren (Sapolsky *et al.*, 1999). Die Entwicklung hoch sensitiver, zeit- und kostengünstiger SNP-Analysen hängt im wesentlichen von den chemisch-physikalischen Eigenschaften der ausgewählten Moleküle und den Detektionssystemen ab (Jenkins und Gibson, 2002). Derzeit werden verschiedene Strategien in der DNA-„chip“-Technologie zur Analyse von somatischen Mutationen eingesetzt und entwickelt.

Als Marktführer ist im Rahmen der Entwicklung innovativer SNP-„chip“-Technologien die Firma Affymetrix zu nennen, die weltweit seit 1992 DNA-„chips“ optimiert und entwickelt. Aktuell wurde 2003 ein SNP-„chip“ entwickelt („Genechip Human Mapping 10 K Array“), auf dem parallel 10.000 SNP's im Genom analysiert werden können (Affymetrix, 2003).

Die Weiterentwicklung der Sequenzierung, sog. Mini-Sequenzierung auf dem Oligonukleotidarray („primer extension“), ermöglicht heute ebenfalls die schnelle und parallele Analyse und Diagnostik vieler DNA-Proben (Khrapko *et al.*, 1991). Im Gegensatz zur Sanger-Sequenzierung erhält man hier keine langen DNA-Sequenzen, denn der eingesetzte „primer“, der direkt vor dem zu bestimmenden Nukleotid an die Zielsequenz bindet, wird im Allgemeinen nur um ein oder zwei Nukleotide verlängert (Humeny *et al.*, 2001). Die Oligonukleotidarrays werden mit unterschiedlichen „primern“ belegt, die jeweils für eine definierte Mutation stehen. Genomische DNA-Fragmente, die als „targets“ dienen, werden zuvor in der Multiplex-PCR amplifiziert, um anschließend auf dem „Array“ mit komplementären DNA-Sequenzen zu hybridisieren. Das Ergebnis homozygoter und heterozygoter DNA wird mit Hilfe der spezifischen „primer extension“ diagnostiziert (Pastinen *et al.*, 1997). Der Vorteil der „Minisequenzierung“ liegt darin, dass eine optimale Diskriminierung heterozygoter und homozygoter Oligonukleotide unter Standardbedingungen erfolgen kann (Syvänen *et al.*, 1993).

Der Biosensor-„chip“ beruht auf dem Prinzip der „Oligonukleotid-Ligation“ („ligase-detection reaction“, LDR). Zhong *et al.* entwickelten diese „Multiplex-SNP-Detektions-Methode“ auf einem beschichteten Siliconchip. Definierte Oligonukleotide werden

kovalent auf der Slideoberfläche gebunden und mit einem Gemisch biotinylierter Proben, eine für jeden SNP, und einer thermostabilen DNA-Ligase inkubiert. Durch die Ligation biotinylierter DNA-„target“-Proben mit komplementären Oligonukleotiden können homozygote DNA-Sequenzen anschließend mit Hilfe eines Detektors (Digital-Kamera) auf dem „Array“ sichtbar gemacht werden. Der Test ist extrem robust, hoch sensitiv und sehr flexibel einzusetzen (Zhong *et al.*, 2003).

Die beschriebenen DNA-Mutationsanalysen zeigen technikspezifische Vor- und Nachteile auf. Die Hauptproblematik der heutigen SNP-Diagnostik liegt bei allen Untersuchungen in der hohen benötigten Spezifität der Allel-Diskriminierung, vor allem bei Tumoren, in denen Zellen mit einem genetischen Defekt in geringer Zahl vorliegen (Hatch *et al.*, 1999). Die meisten Mutationen lassen sich nur dann effektiv nachweisen, wenn das Verhältnis mutierter Allele über 5% liegt, bzw. die Mutationen mit Hilfe der SNP-Analyse oder aufgrund bekannter erblicher Veranlagung nachweisbar sind (Ladner *et al.*, 2001). Der frühe Nachweis mutierter Allele in einem hohem Überschuss von Wildtypallelen ist im Rahmen der Krebsfrüherkennung ausschlaggebend (Brown, 1999).

Ladner *et al.* entwickelten in diesem Zusammenhang eine besonders sensitive und spezifische Technologie. Es handelt es sich um einen universellen DNA-„Mikroarray“, basierend auf „LDR“-Technologie und der „rolling circle“ Amplifikation (Ladner *et al.*, 2001). Entsprechend der „LDR“-Technologie wird genomische DNA mit Hilfe der PCR amplifiziert und ligiert. Punktmutationen werden durch definierte „primer“ erfasst. Zusätzlich besitzen die „primer“ am 5'-Ende eine Erkennungsadresse. Diese ist für jede eingefügte Mutation eines „primers“ unterschiedlich definiert (Gerry *et al.*, 1999). Der DNA-Gegenstrang enthält am 5' Ende einen „rolling circle primer“. Kommt es zur Hybridisierung komplementärer DNA-Sequenzen, kann das „LDR“-Produkt mit den Erkennungsadressen auf dem Mikroarray hybridisieren und den „rolling circle primer“ aktivieren. In Verbindung mit einem fluoreszenz-markierten Oligonukleotid, welches das Signal verstärkt, werden positive Sequenzen im Fluoreszenzdetektor erkannt (Ladner *et al.*, 2001). Durch die Kopplung der „rolling circle“ Amplifikation kommt es zur positiven Signalverstärkung, wodurch sehr schwache Signale erkannt werden.

1.3.4 DNA-„mismatch“-bindende Proteine: MutS und MutM

Unter dem Aspekt der frühzeitigen Detektion somatischer Mutationen wurde 1995 eine Methode entwickelt, in der DNA-„mismatch“-bindende Proteine (MutS, MutM), Basenfehlpaarungen in der DNA-Sequenz erkennen. Diese Methode, die im Unterschied zu den bisherigen Technologien nicht in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese, sondern auf einer Nitrocellulosemembran erfolgte, stellt einen viel versprechenden Ansatz dar (Wagner *et al.*, 1995).

DNA-„mismatch“-bindende Proteine gehören zum DNA-„mismatch“-Reparatursystem (MRS) und verhindern die Rekombination nicht homologer DNA-Stränge und die Entstehung von Mutationen aus Basenfehlpaarungen und nicht gepaarten DNA-Schleifen („loops“) (Modrich, 1991; Modrich, 1997; Tachiki *et al.*, 2000). Eines der am besten charakterisierten DNA-„mismatch“-Reparatursysteme ist der MutH,L,S-Enzym-Komplex in *E. coli*. Das Reparatursystem besteht aus einem komplexen System von Proteinen: (MutS, MutH, MutL, DNA-Helicase II, SSB („single strand binding protein“), DNA-Ligase, DNA-Polymerase, Exonukleas VII und Exonuklease I), in dem dem Protein MutS eine besondere Funktion zukommt (Brown *et al.*, 2001). Es erkennt und bindet in einem ersten Schritt fehlgepaarte DNA (DNA-„mismatches“) und leitet in einem zweiten Schritt die enzymatische Kaskade durch Aktivierung der Proteine MutH und MutL ein, die unter Zusammenwirkung weiterer Hilfsproteine die DNA regenerieren (Harfe und Jinks-Robertson, 1999; Joshi *et al.*, 2000). Homologe MutS und MutM Proteine konnten in nahezu allen Organismen nachgewiesen werden. In humanen Zellen wurden defekte MutS-homologe Proteine (hMSH2) im Zusammenhang einer gehäuften Krebsanfälligkeit beim hereditären nicht polypösen Colonicarcinom (HNPCC) beschrieben (Yang W, 2000; Acharya *et al.* 2003).

Das eukaryotische Protein MutS ist ein vielseitiges und besonders temperaturstabiles (>80°C) Reparaturprotein, welches nicht nur in der Lage ist verschiedenartige Basenpaarfehlstellungen („mismatches“) zu erkennen, sondern auch an Einzelstrang-„loops“ (bis zu 4 Basen) bindet (Takamatsu *et al.*, 1996). Es handelt sich um ein 91,4 kDa-Protein, welches aus drei Strukturdomänen besteht: der A-Domäne (N-Terminus), von der angenommen wird, dass sie zusammen mit der zentralen Domäne einen Einfluß auf die DNA-„mismatch“-Bindungsaffinität hat, einer B-Domäne, die eine unspezifische DNA-Bindungsaktivität besitzt und die Protein

Proteininteraktion (Dimere) stabilisiert und einer C-Domäne (C-Terminus), die im Zusammenhang mit der schwachen ATPase, fehlgepaarte Basen spezifisch erkennt (Tachiki *et al.*, 2000). Die spezifische Bindung an DNA-Fehlpaarungen („mismatches“) ist reguliert durch den Konformations-Status des Proteins und der ATP-Bindungs- bzw. -Hydrolyse-Aktivität (Joshi und Rao, 2002). Mit Hilfe elektronenmikroskopischer Untersuchungen konnte 1997 gezeigt werden, dass das Protein als Homodimer an Heteroduplex-DNA bindet (Allen *et al.*, 1997; Galio *et al.*, 1999). Neuere Gel-Filtrations-Studien zeigten weiterhin, dass MutS-Dimere in Abhängigkeit von der Konzentration gebildet werden (Bjornson *et al.*, 2000).

Im Rahmen wissenschaftlicher Arbeiten wurden verschiedene Experimente bezüglich der Bindungsaffinität des Proteins MutS durchgeführt (Harfe und Jinks-Robertson, 1999; Tachiki *et al.*, 2000; Lamers *et al.*, 2003; Selmane *et al.*, 2003). In den Studien konnte gezeigt werden, dass MutS eine unterschiedlich starke Affinität zu unterschiedlichen Basenfehlpaarungen besitzt (Jiricny, 1998; Brown *et al.*, 2001). So bildet es den stärksten Komplex mit G/T-Fehlpaarungen und DNA-Einzelsträngen, wohingegen es mit C/C-Fehlpaarungen weniger starke Komplexe bildet (Su *et al.*, 1988; Parker und Marinus, 1992). Generell wurden *in vivo* folgende Bindungseffizienzen nachgewiesen: $GT \cong GG \cong CA \cong AA > TT \cong TC \cong AG > CC >$ (Biswas und Hsieh, 1997; Brown *et al.*, 2001). Die Ergebnisse konnten durch *in vitro* Versuche bestätigt werden: Das Enzym bindet an G/T-Fehlpaarungen besser als an A/C-Fehlpaarungen (Jiricny *et al.*, 1988). Jones *et al.* zeigten weiterhin, dass die Erkennung und Bindung an DNA-Fehlpaarungen („mismatches“) außerdem von den benachbarten Basen innerhalb der Sequenz abhängig ist. Die Bindungseffizienz steigt mit zunehmendem G/C-Gehalt innerhalb der Sequenz (Jones *et al.*, 1987).

Hinsichtlich der Reaktionstemperatur zeigten weitere Wissenschaftler, dass die Protein-Bindungsaffinität stark abhängig ist von der Temperatur: Je höher die Temperatur, umso größer ist die Affinität (Biswas und Hsieh, 1997; Tachiki *et al.*, 2000). Dem gegenüber steht die Aussage, dass der MutS-„mismatch“-DNA-Komplex bei höheren Temperaturen (60°C) instabiler ist als bei niedrigeren Temperaturen (35°C). Wobei die Bindung von MutS bei 60°C an G/T-„mismatches“ besonders spezifisch ist (Takamatsu *et al.*, 1996).

Ein weiteres, ebenfalls in *Thermus thermophilus* vorkommendes Protein, welches für die Detektion von Basenfehlpaarungen verantwortlich ist, ist das Protein MutM (Nakahara *et al.*, 2000). MutM kodiert für eine DNA-Glycosilase, die oxidativ veränderte Formen von Guanin-Basen herausschneidet. Das Protein besteht aus 266 AS und besitzt ein Molekulargewicht von ca. 30 kDa. 42% der genetischen Sequenz stimmen mit dem aus *Escherichia coli* vorkommenden Protein MutM überein. Es liegt in der Zelle als globuläres Monomer vor und ist bei neutralem pH Wert und einer Temperatur von bis zu 75°C stabil (Mikawa *et al.*, 1998). Experimentelle Untersuchungen zeigten, dass der Lysin-Rest 155 direkt mit den nicht-komplementären Guanin-Basen interagiert. Der genaue Mechanismus ist allerdings bis heute noch nicht bekannt (Mikawa *et al.*, 1998).

Wie *in vitro* Versuche zeigten, ermöglichen die Proteine MutS und MutM die Detektion fehlgepaarter Basen in der DNA. Die Entwicklung eines SNP-Analyseverfahrens auf der Basis eines DNA-„chips“ kombiniert mit DNA-„mismatch“-bindenden Proteinen, könnte deshalb zur frühzeitigen und sicheren Diagnose von Krebsdispositionen im Rahmen der präventiven Diagnostik führen (Wagner *et al.*, 1995).

2 Zielsetzung

Die Aufklärung genetisch bedingter Krebsdispositionen eröffnet der Medizin eine völlig neue Dimension der Krankheitsprävention. Im Rahmen der Krebsfrüherkennung kann dadurch vor allem Menschen mit einem hohem Krebsrisiko frühzeitig geholfen werden.

Trotz wissenschaftlicher und technischer Fortschritte ist die Durchführung molekularbiologischer Mutationsanalysen (SNP's) immer noch recht aufwendig. Im Rahmen der Krebsfrüherkennung sind vor allem hoch sensitive und spezifische SNP-Analysen zukunftsweisend. Die Möglichkeit geringfügige somatische Mutationen in der Zelle bei einem Überschuß an Wildtypallelen frühzeitig zu identifizieren, würde die Krebsdiagnostik maßgeblich unterstützen.

Die Entwicklung sog. "DNA-chips" verspricht die genetischen Untersuchungen aufgrund der Parallelisierung von Proben auf dem "chip" zu erleichtern und die dafür benötigte Zeit deutlich zu verkürzen. Ziel dieser Arbeit ist es deshalb, einen DNA-Chip zu entwickeln, auf dem frühzeitige somatische Mutationen in Brustkrebsgenen erkannt werden. In einem ersten Schritt soll die prinzipielle Eignung prokaryotischer DNA-„mismatch“-bindender Proteine überprüft werden. Dafür werden die Proteine MutS und MutM kloniert und mit einem myc-„tag“ modifiziert

Das eingefügte myc-„tag“ soll als immunologische Erkennungsequenz dienen, welche nach Bindung des myc-MutS-/ myc-MutM-Proteins an nicht komplementäre DNA-Sequenzen, durch einen spezifischen monoklonalen myc-Antikörper detektiert wird. Als *in vitro* Substrat für die Bindung von myc-MutS sollen sog. DNA-„chips“ eingesetzt werden, die kurze DNA-Sequenzen des wichtigsten Brustkrebsprädispositionsgens *BRCA1* enthalten. Die Bindung von myc-MutS und myc-MutM wird mit Hilfe einer immunologischen fluoreszenzgekoppelten Kaskade sichtbar gemacht. Sie erzeugt nur dann ein Signal, wenn eine Mutation (DNA-„mismatches“) in der DNA-Sequenz vorliegt.

3 Material

3.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden im analytischen Reinheitsgrad bezogen. Soweit nicht anders beschrieben, wurden die Lösungen und Puffer mit A. bidest angesetzt und der pH-Wert mit HCl oder NaOH eingestellt.

Chemikalien/ Lösungen	Hersteller	Bezugsort
Agar	Q-Biogene	Heidelberg
Acrylamid 30%	Roth	Karlsruhe
Agarose	Boehringer Ingelheim	Heidelberg
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Ampicillin	Boehringer Ingelheim	Heidelberg
BSA	Sigma Aldrich	Deisenhofen
Bromphenolblau	Aldrich-Chemie	Steinheim
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
DTT	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
DOC	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
EDTA	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
EGTA	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Ethanol, absolut	Roth	Karlsruhe
Ethidumbromid	Boehringer Ingelheim	Heidelberg
Eisessig	Roth	Karlsruhe
Glycin	Roth	Karlsruhe
Glycerin	Roth	Karlsruhe
Hefeextrakt	Becton Dickinson	Heidelberg
Hi-Di-Formamide	AppliChem	Darmstadt
Imidazol	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
IPTG	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Kaliumchlorid	AppliChem	Darmstadt
LiChrosolv-Wasser	Merck	Darmstadt
Magnesiumacetat	Merck	Darmstadt
Magnesiumchlorid	J.T. Baker	Griesheim
Mercaptoethanol	Gibco/ Life Technologies	Eggenstein

Methanol	Roth	Karlsruhe
Milchpulver	AppliChem	Darmstadt
Natriumchlorid	Merck	Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Natriumhydrogencarbonat	Merck	Darmstadt
Salzsäure, konz.	J.T. Baker	Griesheim
SDS	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Saccharose	Merck	Darmstadt
Tris	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Triton-X-100	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Tween-20	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
TEMED	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Trinatriumcitrat-Dihydrat	Merck	Darmstadt
Trypton	Becton Dickinson	Heidelberg

3.2 Geräte

Agarose-Elektrophoresekammer (Fisherbrand)

Analysenwaage (IKA-Werke)

Brutschrank (New Brunswick Scientific)

Blot-Kammer (BioRad)

Elektrophorese-Minikammer (BioRad)

Slot Blot Kammer (BioRad)

Thermoblock (Eppendorf)

Thermocycler GeneAmp PCR-System 9700 (Applied Biosystems)

Trockenschrank (Heraeus)

Varioklav Dampfsterilisator (H&P)

Zentrifuge (Eppendorf)

„GeneTAC Hybridisation Station“ (Perkin Elmer)

Labortaumler DUMAX 1030 (Heidolph)

Sonopuls GM 70 (Bandelin)

3.3 Stammlösungen und Puffer

Häufig verwendete Puffer sind im folgenden Abschnitt aufgeführt. Lösungen und Puffer, die für spezielle Methoden benötigt wurden, sind an entsprechender Stelle im Methodenteil beschrieben.

1x TBS-Puffer
20 mM Tris-HCl 150 mM NaCl pH 7,5

50x TAE-Puffer
2 M Tris-Acetat 0,05 M EDTA pH 7,4

20x SSC-Puffer
3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat pH 7,0

3.4 Medien

Die Anzucht des Bakterienstammes *Thermus thermophilus* erfolgte unter speziellen Kulturbedingungen (www.dsmz.de). Die *E. coli*-Stämme (DH5 α und BL21 Gold) wurden unter Standardbedingungen kultiviert.

<i>Thermus thermophilus</i> Kulturmedium	<i>E. coli</i> LB-Medium/ LB-Agar
2 g NaCl 8 g Polypepton 4 g Hefeextrakt ad 1 l Aqua dest. pH 7,0 autoklavieren	10 g NaCl 10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 20 g Agar ad 1 l Aqua dest. pH 7,0 autoklavieren

3.5 Organismen und Vektorsysteme

3.5.1 Organismen

Für die Klonierungsexperimente wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli* DH5 α kultiviert. Zur Expression wurde der *Escherichia coli*-Stamm BL21-Gold (DE3) eingesetzt.

Bakterienstamm	Charakterisierung	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA deoR araD139 Δ (ara-leu) 7697 galU gal/K rpsL (StrR) endA1 nupG	Klonierungsstamm (Invitrogen)
<i>E. coli</i> BL21-Gold (DE3)	<i>E. coli</i> BF-ompT hsdS(rB--mB) dcm+ Tetr gal λ (DE3) endA Hte	Expressionsstamm (Stratagene)

3.5.2 Vektorsysteme

Folgende Vektoren wurden für die Klonierungsexperimente in dieser Arbeit verwendet:

Vektor	Charakterisierung	Referenz
TOPO-TA	Klonierungsvektor	Invitrogen
pCAL-n	Expressionsvektor	Stratagene
pUC 18	Kontrollvektor	Stratagene
pGEM	Sequenziervektor	Perkin Elmer
pQE-myc-Mss4	Expressionsvektor	AG Prof. A. Barnekow

3.6 Enzyme und Testsysteme

Die Verwendung der Enzyme und Testsysteme erfolgte nach Angaben des Herstellers.

3.6.1 Enzyme

Alle Enzyme wurden bei -20°C gelagert.

Enzyme	Hersteller	Bezugsort
<i>Taq</i> Plus Precision	Stratagene	Amsterdam
<i>T4</i> DNA Ligase	Promega	Mannheim
Restriktionsendonuklease <i>HindIII</i>	NEB	Frankfurt
Restriktionsendonuklease <i>EcoRI</i>	NEB	Frankfurt
Restriktionsendonuklease <i>NdeI</i>	NEB	Frankfurt
Lysozym	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Restriktionsendonuklease <i>DraIII</i>	NEB	Frankfurt
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Promega	Mannheim
HotStar- <i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Qiagen	Hilden

3.6.2 Testsysteme

Testsysteme	Hersteller	Bezugsort
„BigDye-Sequenzier Kit“	Perkin Elmer	Weierstadt
„QIAquick Gel Extraktion Kit“ (250)	Qiagen	Hilden
“QIAquick PCR Purification Kit” (250)	Qiagen	Hilden
“High Speed Plasmid Kit”	Qiagen	Hilden
“MiniPrep Express Matrix”	Bio101, Inc.	USA
“Affinity Protein Expression and Purification System”	Stratagene	Amsterdam
“Affinity CBP Fusion Protein Detection Kit”	Stratagene	Amsterdam
“TOPO TA Cloning Kit”	Invitrogen	Karlsruhe
„DNA Isolierungs Kit“	Qiagen	Hilden
„ECL-Detektionssystem“	Amersham	Braunschweig

3.7 Antikörper

Für die immunologischen Nachweise wurden folgende Antikörper verwendet:

Primärantikörper	Hersteller	Bezugsort
a-myc (monoklonal)	AG Prof. A. Barnekow	Münster

Sekundärantikörper	Hersteller	Bezugsort
a-Maus-POD (polyklonal)	Amersham	Braunschweig
a-Streptavidin-Biotin-POD	Amersham	Braunschweig
a-Maus-Cy3	Amersham	Braunschweig
a-Streptavidin-Cy3	Amersham	Braunschweig

3.8 Größenstandard

Zur Beurteilung der DNA- und Proteingrößen wurden folgende Größenstandards eingesetzt:

Größenstandard	Referenz	Bezugsort
GeneRuler 1 kb DNA-“ladder“	MBI Fermentas	St. Leon-Rot
GeneCraft, 100bp-DNA-“ladder“	GeneCraft	Münster
“prestained“ SDS-PAGE Standard	BioRad	München

3.9 Oligonukleotide für die PCR

Die in dieser Arbeit verwendeten synthetischen Oligonukleotide der Fa. Gibco/Invitrogen bestehen aus einer Nukleotidsequenz, die homolog ist zu MutS (NCBI; Accession-Nr: D63810) und MutM (NCBI; Accession-Nr: AB008520). Die angegebene Hybridisierungsposition (unterstrichen) kennzeichnet die Position in der cDNA, an der die Hybridisierung beginnt. Die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym ist kursiv und fett geschrieben.

Oligonukleotide	Sequenz (5'-3')	Restriktions- enzym	Hybridisierungs- position
MutS-for	5'-CCG GAA TTC <u>CCG GGG GGT</u> ATG GCG GAG TT-3'	<i>EcoRI</i>	nt 641-661
MutS-rev	5'-CCA AGC TTT <u>TAT CAC CCC</u> TTC ATG CTA CCC AG-3'	<i>HindIII</i>	nt 3079-3103
<i>NdeI</i> -MutS-for	5'-ATT CGA CAT ATG <u>GGG GGG</u> TAT GGC GGA-3'	<i>NdeI</i>	nt 641-661
myc-for	5'-TCA GCA GAA TTC <u>CCA TGG</u> AAC AGA AAT TAA TTT CC-3'	<i>EcoRI</i>	nt 56-94
MutM-for	5'-CCG GAA TTC <u>CCG AGC TTC</u> CCG AGG TGG AG-3'	<i>EcoRI</i>	nt 300-321
MutM-rev	5'-CCA AGC TTT <u>CAC TAG GGG</u> CCT TCC CCC TGG CA-3'	<i>HindIII</i>	nt 1080-1100
<i>NdeI</i> -MutM-for	5'-AAT CGA CAT ATG <u>CCC GAG</u> CTT CCC GAG GTG-3'	<i>NdeI</i>	nt 300-321

3.10 Oligonukleotide zur Sequenzierung

Zur Sequenzierung des amplifizierten und klonierten DNA-Fragmentes MutS wurden folgende Sequenzier-Oligonukleotide der Fa. Gibco/ Invitrogen verwendet:

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')/	Hybridisierungsposition
MutS-Seq 1	5'-TCA AGA GCA AAA GTG CCC TG- 3'	nt 1143-1163
MutS-Seq 2	5'-TTC CGC CTC GCC GAC CTG GA- 3'	nt 1643-1663
MutS-Seq 3	5'-CCT GAT CAA AAG GCG CGA GG-3'	nt 2143-2163
MutS-Seq 4	5'-TCC TGG ACG AGG TGG GCC GG-3'	nt 2643-2663
MutS-Seq 5	5'-CCC TTT CCG CCT CTA CGA CCC-3'	nt 1381-1401
MutS-Seq 6	5'-GGC CCG GGA GAA GAA GAG GAC-3'	nt 1942-1962
MutS-Seq 7	5'-GGC GCC ACC CGG TGG TGG AGC-3'	nt 2331-2351
MutS-Seq 8	5'-GCC GGG GGG AAG AGC ACC TTC-3'	nt 2561-2581
MutM-Seq 1	5'-CGG CGC TTC GGG CGC CTC TTT GG-3'	nt 594-617

3.11 Oligonukleotide zur DNA Hybridisierung

Zur Hybridisierung homologer und heterogener DNA-Doppelstränge („perfect match“/ „mismatch“) wurden synthetische Oligonukleotid-Sonden und –„targets“ verwendet (Wagner *et al.* (1995).

Bezogen wurden die 30 bp DNA Fragmente von der Firma Gibco/ Invitrogen. In den Hybridisierungsexperimenten lag für die DNA-Sonde sowohl das komplementäre DNA-„target“ („perfect match“), als auch drei, durch jeweils einen definierten Basenaustausch nicht-komplementäre („mismatches“) DNA-„targets“ vor. Die in den Experimenten eingesetzten Sonden und „targets“ enthielten, abhängig von der Methode, unterschiedliche Modifikationen.

3.11.1 Sonden und „targets“ für den Slot Blot-Test

Für die Hybridisierung homologer und heterogener DNA-Doppelstränge (pm/mm) auf Nitrocellulose wurden unmarkierte und biotinylierte Oligonukleotide mit folgenden Sequenzen verwendet:

unmarkierte Sonden	Sequenz (5'-3') (30-mer)	Hybridisierung
Rev-Detektion-T	5'-ACG GCA GAC TTC TCC TCA GGA GTC AGG TGC-3'	<i>β-globin</i> -Gen (Wagner <i>et al.</i> 1995)
Rev-Detektion-A	5'-ACG GCA GAC TTC TCC ACA GGA GTC AGG TGC-3'	<i>β-globin</i> -Gen (Wagner <i>et al.</i> 1995)
Rev-Detektion-C	5'-ACC GCA GAC TTC TCC CCA GGT GTC AGG TGC-3'	<i>β-globin</i> -Gen (Wagner <i>et al.</i> 1995)
Rev-Detektion-G	5'-ACC GCA GAC TTC TCC GCA GGT GTC AGG TGC-3'	<i>β-globin</i> -Gen (Wagner <i>et al.</i> 1995)

biotinylierte „targets“	Sequenz (biotin-5'- 3')	Hybridisierung
For-Detektion-T	biotin-5'-GCA CCT GAC TCC TGT GGA GAA GTC TGC CGT-3'	<i>β-globin</i> -Gen (Wagner <i>et al.</i> 1995)
For-Detektion-A	biotin-5'-GCA CCT GAC TCC TGA GGA GAA GTC TGC CGT-3'	<i>β-globin</i> -Gen (Wagner <i>et al.</i> 1995)
For-Detektion-C	biotin-5'-GCA CCT GAC TCC TGC GGA GAA GTC TGC CGT-3'	<i>β-globin</i> -Gen (Wagner <i>et al.</i> 1995)
For-Detektion-G	biotin-5'-GCA CCT GAC TCC TGG GGA GAA GTC TGC CGT-3'	<i>β-globin</i> -Gen (Wagner <i>et al.</i> 1995)

3.11.2 Sonden und „targets“ für den DNA-„chip“

Die Sonden der Hybridisierungsexperimente auf den Glas-„slides“ waren, falls nicht anders angegeben, mit einer Aminogruppe am 5'-Ende versehen. Kontroll-„targets“ trugen am 3'-Ende den Fluoreszenzfarbstoff Cy3, der als Detektionsmarkierung diente. Unmarkierten „targets“ waren erforderlich für Erkennung der DNA-„mismatch“ Bindung mit dem Protein myc-MutS.

Aminolink-Sonden	Sequenz (Aminogruppe-5'-3')	Hybridisierung
Rev-Detektion-T	5'-ACG GCA GAC TTC TCC TCA GGA GTC AGG TGC-3'	<i>β-globin</i> -Gen (Wagner et al. 1995)
Rev-Detektion-A	5'-ACG GCA GAC TTC TCC ACA GGA GTC AGG TGC-3'	<i>β-globin</i> -Gen (Wagner et al. 1995)
Rev-Detektion-C	5'-ACC GCA GAC TTC TCC CCA GGT GTC AGG TGC-3'	<i>β-globin</i> -Gen (Wagner et al. 1995)
Rev-Detektion-G	5'-ACC GCA GAC TTC TCC GCA GGT GTC AGG TGC-3'	<i>β-globin</i> -Gen (Wagner et al. 1995)

Cy3-markierte „targets“	Sequenz (Cy3-5'- 3')	Hybridisierung
For-Detektion-T	5'-Cy3-GCA CCT GAC TCC TGT GGA GAA GTC TGC CGT-3'	<i>β-globin</i> -Gen (Wagner et al. 1995)
For-Detektion-A	5'-Cy3-GCA CCT GAC TCC TGA GGA GAA GTC TGC CGT-3'	<i>β-globin</i> -Gen (Wagner et al. 1995)
For-Detektion-C	5'-Cy3-GCA CCT GAC TCC TGC GGA GAA GTC TGC CGT-3'	<i>β-globin</i> -Gen (Wagner et al. 1995)
For-Detektion-G	5'-Cy3-GCA CCT GAC TCC TGG GGA GAA GTC TGC CGT-3'	<i>β-globin</i> -Gen (Wagner et al. 1995)

unmarkierte „targets“	Sequenz (5' - 3')	Hybridisierung
For-Detektion-T	5'-GCA CCT GAC TCC TGT GGA GAA GTC TGC CGT-3'	<i>β-globin</i> -Gen (Wagner et al. 1995)
For-Detektion-A	5'-GCA CCT GAC TCC TGA GGA GAA GTC TGC CGT-3'	<i>β-globin</i> -Gen (Wagner et al. 1995)
For-Detektion-C	5'-GCA CCT GAC TCC TGC GGA GAA GTC TGC CGT-3'	<i>β-globin</i> -Gen (Wagner et al. 1995)
For-Detektion-G	5'-GCA CCT GAC TCC TGG GGA GAA GTC TGC CGT-3'	<i>β-globin</i> -Gen (Wagner et al. 1995)

Zur diagnostischen Anwendung des DNA-„mismatch“-bindenden Proteins auf dem „chip“, wurden definierte DNA-Sonden und „targets“ aus dem *BRCA1*-Gen verwendet, die im Anschluß an die PCR denaturiert und auf einen Glas-„slide“ gespottet wurden. Die Sequenzen wurden von der Firma MWG-Biotech AG bezogen.

Aminolink-„primer“ und Sonden	Sequenz (Aminogruppe-5'-3')	Hybridisierung
Sonde BC1- Del -(Ex20)-for	5'-CTA GGT CAT CCC CTT CTA A-3'	<i>BRCA1</i> -mRNA, complete cds. (Acc.Nr. U14680)
Sonde-BC1- Ins -(Ex 20)-for	5'-GAG ATG TGG TCA ATG GAA G-3'	<i>BRCA1</i> -mRNA, complete cds. (Acc.Nr. U14680)

unmarkierte „primer“ und „targets“	Sequenz (5' - 3')	Hybridisierung
Target-BC1- Ins -(ex20)-rev	5'-ATT TTT GTC AAC TTG AGG G-3'	<i>BRCA1</i> -mRNA, complete cds. (Acc.Nr. U14680)
Target-BC1- Del -(ex20)-rev	5'-CTC CTC TTG AGA TGG GTA G	<i>BRCA1</i> -mRNA, complete cds. (Acc.Nr. U14680)

3.12 QMT-Glas-„slides“

In den Versuchen wurden sog. „quantifoil epoxy coated slides“ (QMT-„slides“) der Fa. Quantifoil (Jena) verwendet. QMT-„slides“ sind extrem fluoreszenzarme Glasobjektträger im Standardformat 75x25 mm. Die reaktive Epoxy-Oberfläche dient der kovalenten Kopplung von modifizierten Molekülen, wie z.B. Nukleinsäuremolekülen, die am 5`-Ende mit einem Aminolinkermolekül versehen sind.

3.13 Nadel-Spotter „MikroGridII“

Der Nadel-Spotter „MikroGridII“ (BioRobotics) besteht aus einem Modul von vier Einheiten: dem eigentlichen Spotter, der Pumpstation, einem Luftbefeuchter und einem Steuerungscomputer (Abb. 2).

Während eines „spotting“-Vorganges konnte der Spotter mit mehr als 120 „slides“ gleichzeitig bestückt werden. Als Probenbehältnisse wurden 384-„well“-Mikrotiterplatten mit Deckel verwendet, die in einem Turm des Spottermoduls gelagert und automatisch zur Probenentnahme geöffnet wurden. Der Turm verfügte über eine Kühleinrichtung, die die Verdunstung der Proben in den Platten minimieren sollte. Weiterhin wurde das Verdunsten der Flüssigkeit durch einen am Gerät angeschlossenen Luftbefeuchter, einem sog. Ultraschallvernebler, garantiert. An einem Roboterarm wurden die Nadeltyp-spezifischen Halter befestigt, in die 1 bis 64 Nadeln eingesetzt werden konnten. Die Reinigung der Nadeln erfolgte in zwei mit Reinst-Wasser gefüllten Bädern und einer Trockenstation.

Die Herstellung eines Arrays wurde am Steuerungscomputer geplant, d.h., vor jedem Experiment wurden „Array“- und Spotgröße, Luftfeuchtigkeit etc. am Computer definiert. Die festgelegten Grundeinstellungen sind in der folgenden Tabelle aufgeführt. Es handelt sich dabei überwiegend um Grundeinstellungen, die im Handbuch vorgeschlagen sind oder auf Erfahrungen beruhen.

Tab. 3 Einstellungen des „MikroGridII“

Einstellung	Wert
„target height“	0 mm
„pre-spotting“	2 „slides“ je 20 mal
„soft touch“ (source)	5,5 mm
„dwell time“	3 s
„soft touch“ (target)	1,5 mm
„humidity“	60%
„washing“	Bad 1+2 je 5 s
„spot distance“	500 μ m

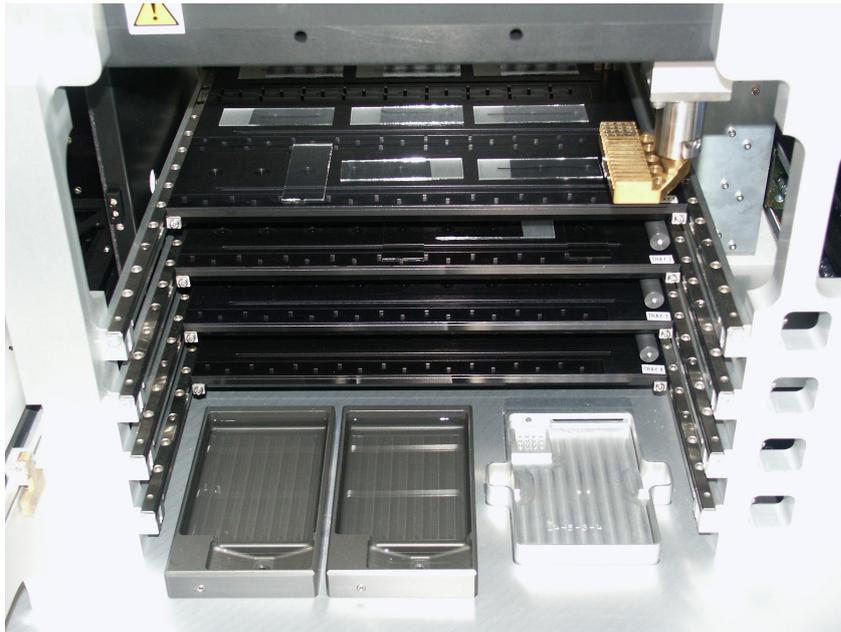


Abb. 2 Innenansicht des „MicroGridII“.

Unten im Bild befindet sich die Waschstation (zwei Bäder und eine Trockeneinrichtung) und darüber vier Laden für „slides“. Der Roboterarm mit einem Nadelhalter, der hier mit 16 Nadeln bestückt ist, ist oben rechts im Bild zu erkennen. Ein Turm zum Aufbewahren von Mikrotiterplatten ist außerhalb dieser Abbildung, links neben den Laden, angeordnet.

3.14 „spotting“-Nadeln

Zum „spotten“ der DNA-Sonden wurden spezielle „spotting“-Nadeln des Typs SMP3-„Stealthpins“ (TeleChem) verwendet (Abb. 3). Hier handelt es sich um Nadeln mit einem Flüssigkeitsreservoir, wodurch mehrere Spots mit nur einer Probenaufnahme (ca. 200) möglich sind. Der Spotdurchmesser dieser Nadeln beträgt ca. 90 bis 100 μm , variiert jedoch in Abhängigkeit von der Zusammensetzung und Konzentration des „spotting“-Puffers“.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit nur einer Nadel gespottet, da die Anzahl der Spots zur Auswertung der Tests ausreichte. Möglich wären aufgrund der Größe des Nadelhalters bis zu 64 Nadeln.



Abb. 3 SMP3-„stealthpin-spotting“ Nadel (TeleChem)

3.15 „Array Scanner“

Das Auslesen der „slides“ erfolgte mit einem „428 Array Scanner“ der Firma Affymetrix. Dieser Fluoreszenzscanner verfügt über einen Laser mit einer Wellenlänge von 532 nm, bei dessen Anregung das Fluoreszenzsignal mit einem PMT (photomultiplier tube) gemessen wird. Die Auflösung des Gerätes beträgt 10 μM und die Verstärkung des Signals kann von 0 bis 70 dB eingestellt werden.

Die Software erstellt 16 bit Graustufenbilder im Tif-Format, die auch in Falschfarben dargestellt werden können. Um den Intensitätsverlauf innerhalb der Spots gut verfolgen zu können, wurden die „Array“-Bilder in dieser Arbeit im Falschfarbenformat wiedergegeben. Dabei entspricht schwarz der geringsten und weiß der stärksten Intensität. Der Farbverlauf erfolgt über blau, grün, gelb, rot bis hin zu weiß. In Abb. ist der Intensitätsverlauf dargestellt.

kein Signal >

> Sättigung



Abb. 4 Intensitätsverlauf des Fluoreszenzsignals in der Falschfarbendarstellung

Mit Hilfe der Software „IconoClust“ der Firma Clondiag Chip Technologies (Jena) wurden die umgewandelten Fluoreszenzintensitäten aus der Querschnittsebene eines Spots ermittelt. Diese Software legte ein quadratisches Gitternetz über das Bild des „Arrays“, so dass sich im Zentrum eines jeden Quadrates ein Spot befand. Mit Hilfe eines Algorithmus wurde der Spot erkannt und die normalisierte Intensität berechnet. Die ermittelten Rohdaten wurden anschließend in Microsoft Excel importiert, um weitere Berechnungen wie die Varianz der Intensität mehrerer Spots, ermitteln zu können.

4 Methoden

4.1 Methoden der allgemeinen Mikrobiologie

4.1.1 Stammhaltung von *E.coli*

Die Stammhaltung dient der kurz- oder langfristigen Kultivierung von Mikroorganismen. Für die Lagerung von *E. coli*-Stämmen bis zu acht Wochen wurden diese auf LB-Nährböden ausgestrichen, bei 37°C im Brutschrank kultiviert und anschließend bei 4°C unter Luftabschluß gelagert.

Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden Gefrierkulturen angelegt. Hierzu wurden 2 ml LB-Medium (mit Antibiotikum) mit einer Einzelkolonie beimpft. Bei einer OD600 von ca. 0,6 bis 0,8 wurden schließlich 930 µl Kultur mit 70 µl DMSO gemischt. Die Lagerung erfolgte bei –70°C.

4.1.2 Anzucht von *Thermus thermophilus* (HB8)

Frisch angeimpfte *Thermus thermophilus*-Kulturen wurden bei 75°C drei Tage im Brutschrank kultiviert. Hierzu wurde mit einer Impföse eine geringe Menge der Bakteriensuspension von der Stammkultur aufgenommen und in 25 ml Nährkultur unter aeroben Bedingungen übertragen.

4.1.3 Isolierung von Gesamt-DNA

Die Isolierung der *Thermus thermophilus* DNA erfolgte mit Hilfe des „DNA-Isolation-Kit“ der Firma Qiagen nach Vorschrift des Herstellers.

4.1.4 DNA Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (engl.: „polymerase chain reaction“, PCR) wurde 1987 von Kary B. Mullis entwickelt und dient der in vitro Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen (Mullis und Faloona, 1987). Durch die Verwendung der hitzestabilen DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* (*Taq*) ein Enzym, das die DNA-Replikation ermöglicht, können DNA-Einzelstränge als Matrize zur Synthese eines neuen komplementären DNA-Stranges eingesetzt werden. Die DNA-Einzelstränge werden durch Hitzedenaturierung erhalten. Der Startpunkt und das Ende des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes werden durch Zugabe synthetischer

Oligonukleotide, sog. „primer“ bestimmt. Diese aus ca. 20 Nukleotiden bestehenden Sequenzen hybridisieren an komplementäre DNA-Abschnitte („annealing“). Durch Zugabe der Desoxynukleotide dATP, dCTP, dGTP und dTTP kann die DNA-Polymerase am 3'Ende mit der Strang-Synthese beginnen. Die Zielsequenz wird durch viele aufeinanderfolgende Zyklen (30-50) bestehend aus Denaturierung, Hybridisierung und DNA-Synthese amplifiziert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden in der „touch-down“-PCR längere DNA-Fragmente amplifiziert, die zum Klonieren in Klonierungs- und Expressionsvektoren bestimmt waren. Die synthetischen Oligonukleotide wiesen für die Klonierungsexperimente endständige Restriktionssequenzen auf, über die die Fragmente in die entsprechenden Vektoren ligiert werden konnten. Desweiteren wurde die Standard-PCR eingesetzt, um 100 bp-DNA-Fragmente als Sonde für die Analyse von DNA-„Arrays“ zu amplifizieren. In diesem Fall wurden kürzere Oligonukleotide als „primer“ verwendet.

Die *Taq*-DNA-Polymerase ist eine hoch prozessive 5'-3'-DNA-Polymerase, d.h. sie verfügt über eine hohe Umsatzrate der DNA-Neusynthese und wird für Sequenzlängen von bis zu 5 kb eingesetzt. Ihre Fehlerrate ist jedoch wesentlich höher als die der *Pfu*-DNA-Polymerase. Die *Pfu*-DNA-Polymerase besitzt eine Korrekturlesefunktion („proof-reading“), die die DNA-Synthese verlangsamt, dafür aber genauer ist. Um eine möglichst fehlerfreie Kopie des Matrizenstranges für eine anschließende Klonierung zu erhalten, wurde die DNA-*Pfu*-Polymerase eingesetzt. Die *Taq*-DNA-Polymerase wurde zur Amplifizierung von kürzeren DNA-Sonden eingesetzt.

Materialien/ Reagenzien:

dNTP's (Amersham)

0,2 µl PCR-„tubes“ (Greiner)

LiCrosolv-Wasser

Tab. 4 PCR-Ansätze

PCR:	10x-Puffer	“primer”-for (0,5 µM)	“primer”-rev (0,5 µM)	dNTP's (250 µM)	Probe (100 µM)	Polymerase (0,5 µM)	H2O
„touch-down“	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	0,5 µl	24,5 µl
Gradient	5 µl	5µl	5 µl	5 µl	5 µl	0,5 µl	24,5 µl
Standard	5 µl	5µl	5 µl	5 µl	4 µl	0,5 µl	25,5 µl

Tab. 5 Temperaturen und Reaktionszeiten der „touch-down-PCR zur MutS-Amplifizierung“

„touch-down“-PCR	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	95 °C	15 min	1x
Denaturierung	94 °C	1 min	35x
„annealing“	65 °C bis 56 °C (-0,5°C pro Zyklus)	1 min	bis 56°C-20x bei 56°C-15x
Synthese	72 °C	1 min	35x

Tab. 6 Temperaturen und Reaktionszeiten der „Gradienten-PCR zur MutS-Amplifizierung“

„Gradienten“ PCR	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	95 °C	15 min	1x
Denaturierung	94 °C	1 min	35x
„annealing“	62-72°C	1 min	35x
Synthese	72 °C	1 min	35x

Tab. 7 Temperaturen und Reaktionszeiten der „Standard“-PCR

Standard-PCR	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	95 °C	15 min	1x
Denaturierung	94 °C	1 min	35x
„Annealing“	58°C	1 min	35x
Synthese	72 °C	1 min	35x

4.2 Aufreinigung und Trennung und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

4.2.1 PCR Aufreinigung

Um die mittels PCR amplifizierte DNA für weitere Klonierungsexperimente einsetzen zu können, war eine Aufreinigung der Amplikons erforderlich. In der vorliegenden

Arbeit wurden die Amplifikate mit dem „PCR-Purification“ Testsystem der Firma Qiagen aufgereinigt. Die Reinigung erfolgte nach Vorschrift des Herstellers.

4.2.2 DNA Agarose-Gelelektrophorese

Durch die Agarose-Gelelektrophorese können verschieden große DNA-Fragmente voneinander getrennt werden. Da Nukleinsäuren negativ geladen sind, wandern sie im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. In der Gelelektrophorese kommt es dabei aufgrund des Molekularsiebeffektes zu einer Größenauftrennung der DNA-Fragmente. Kleinere Fragmente besitzen eine höhere Wanderungsgeschwindigkeit als große Fragmente. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist somit abhängig vom Molekulargewicht der DNA-Fragmente, der Porengröße der Gelmatrix und der angelegten Spannung. Dabei ist der Logarithmus des Molekulargewichtes umgekehrt proportional zur Wanderungsgeschwindigkeit. Mit Hilfe eines Molekulargewichtsmarkers wird die unbekannte Fragmentlänge ermittelt.

Die Auftrennung der „touch-down“-PCR-Produkte erfolgte in einem 1%igen Agarosegel. Zur Auftrennung wurde QA-Agarose TM („high resolution“) der Firma Q-Biogene verwendet. Als Längenstandard wurde ein 1 kb DNA Größenstandard der Firma Fermentas aufgetragen. Die DNA-Produkte der Standard-PCR wurden in einem 3%igen Agarosegel getrennt. Die Fragmentgröße konnte mittels des 100 bp-„ladders“ der Firma GeneCraft ermittelt werden.

DNA-Gel-Ladepuffer
0,25% (w/v) Bromphenolblau 30% Glycerin (w/v)

4.2.3 Isolierung und Reinigung der DNA Fragmente

Zur Rückgewinnung und Reinigung spezifischer DNA Fragmente aus dem Agarosegel wurde das QIAEX II „Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen verwendet. Diese Methode der Aufreinigung beruht auf der Eigenschaft von Nukleinsäuren, in Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen an die Oberfläche von Glas- oder Silikapartikeln zu adsorbieren. Zunächst wird die Agarose durch eine hohe Konzentration Natriumperchlorat (NaClO_4) gelöst. Die hohe Salzkonzentration bewirkt außerdem die Ablösung von Proteinen von der DNA und schließlich die

Adsorption der freigesetzten DNA Moleküle an die Glas- oder Silikapartikel. Nach einigen Waschschritten zur Entfernung von Agaroseresten, Proteinen und Salzen wird die DNA mit TE-Puffer oder dest. Wasser eluiert. Die Durchführung erfolgte nach Vorschrift des Herstellers.

4.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

DNA zeigt eine ausgeprägte UV-Absorptionsbande mit einem Maximum bei 260 nm und einem Minimum bei 230 nm. Auftretende Verunreinigungen in DNA-Präparationen sind Proteine, die eine typische Absorptionsbande bei 280 nm zeigen. Als Maß für die Reinheit der DNA gilt das Extinktionsverhältnis bei 260 und 280 nm (260/280). Liegt das Verhältnis zwischen 1,7 und 2,0, so gilt die DNA-Probe als rein, geringere Werte weisen auf Protein- oder Phenolverunreinigungen hin.

4.3 Methoden zur Klonierung rekombinanter Plasmide

4.3.1 Restriktionsspaltung

Zur spezifischen Spaltung von Plasmid-DNA und PCR-Fragmenten wurden Restriktionsendonukleasen des Typs II eingesetzt. Die Enzyme dieser Klasse erkennen eine meist palindromische DNA-Sequenz, an welcher der DNA-Doppelstrang durch Hydrolyse spezifisch gespalten wird. Viele Restriktionsendonukleasen, z.B. *EcoRI*, erkennen Sequenzen von 6 Nukleotiden. Es gibt aber auch Enzyme, die auf weniger Nukleotide ansprechen. Abhängig vom Ort der Schnittstelle entstehen entweder glatte („blunt“) oder überhängende („sticky“) Enden. Der Restriktionsverdau wurde wie folgt durchgeführt:

Tab. 8 Komponenten und Volumen des Reaktionsansatzes I

Ansätze/ Reagenzien	Insert	Vektor-pCal/ pQE-myc
Template	50 µl	5µl
10x-Puffer	6 µl	3µl
<i>EcoRI/ NdeI</i>	1µl	1µl
H ₂ O	3µl	21µl
Gesamt-Volumen	60µl	60µl

Nach einer Inkubationszeit von 1h bei 37°C erfolgte die Zugabe des zweiten Restriktionsenzym. Es folgte eine weitere Inkubationszeit von 1h bei 37°C.

Tab. 9 Komponenten und Volumen des Reaktionsansatzes II

Ansätze/ Reagenzien	Insert	Vektor-pCal/ pQE-myc
10x-Puffer	1 µl	1µl
<i>HindIII</i>	1µl	1µl
H ₂ O	8µl	8µl
Gesamt-Volumen	70µl	70µl

4.3.2 Dephosphorylierung von 5'-Enden

Um die Religation der linearisierten Vektormoleküle nach der Restriktion zu verhindern, erfolgte ihre Dephosphorylierung an den 5'-Enden der DNA durch Zugabe von *alkalischer Phosphatase* (1U/ Ansatz). Verwendet wurde die bakterielle alkalische Phosphatase aus dem *E.coli* C4-Stamm der Firma MBI Fermentas.

4.3.3 Klonierung

Als Klonierung bezeichnet man das Herstellen rekombinanter Organismen mit dem Ziel der Amplifizierung eines fremden Gens oder Genfragmentes bzw. der Expression des entsprechenden Genproduktes. Mit Hilfe von Klonierungsvektoren können Fremdsequenzen in Zellen kloniert werden.

Die Klonierungstechnik wurde in dieser Arbeit verwendet, um die Zielfragmente im TOPO-TA-Klonierungsvektor zu vervielfältigen und nach anschließender Restriktion aus dem Vektor über komplementäre Enden (*NdeI* bzw. *EcoRI* und *HindIII*) („sticky ends“) in die Expressionvektoren pQE-myc und pCAL zu klonieren und deren Expression in *E. coli* BL21 zu ermöglichen.

In der folgenden Abb. 5 soll die Klonierungs- und Modifizierungsstrategie der Proteine MutS und MutM veranschaulicht werden:

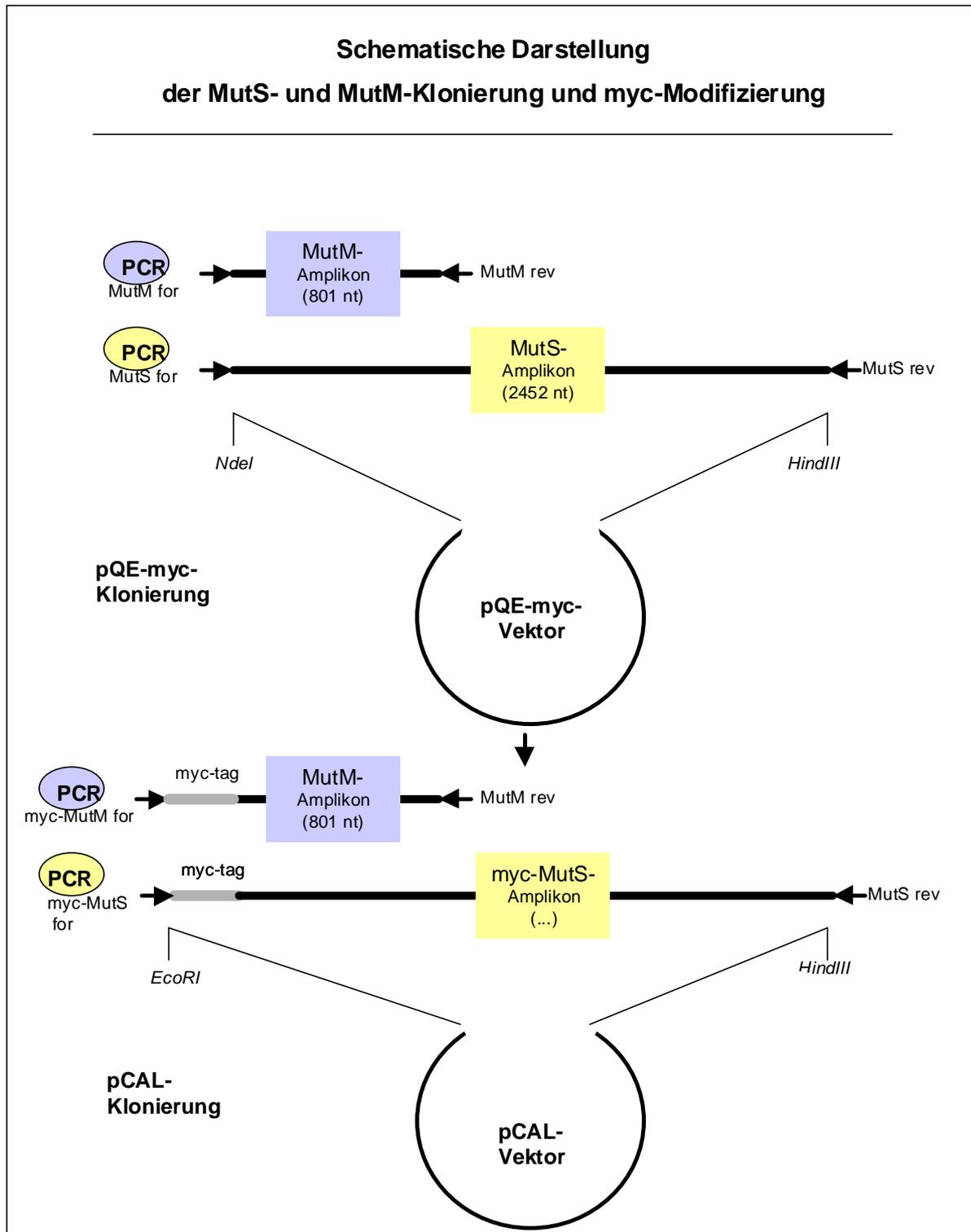


Abb. 5 Darstellung der MutS- und MutM-Modifizierung

Die amplifizierten PCR-Fragmente MutS und MutM wurden nach der Restriktion (*NdeI*/*HindIII*) aus dem TOPO-TA-Vektor in den Zwischenvektor pQE-myc-ligiert. Mit Hilfe der PCR erfolgte anschließend die myc-MutS- bzw. myc-MutM-Amplifizierung. Über die „primer“ myc-MutS/ myc-MutM bzw. MutS-rev/ MutM-rev wurden definierte Restriktionsschnittstellen an die Enden der DNA-Fragmente angefügt, so dass die modifizierten myc-Fragmente nach der Zwischenklonierung aus dem TOPO-TA-Vektor restringiert (*EcoRI*/*HindIII*) und in den Expressionsvektor pCAL ligiert werden konnten.

4.3.3.1 Klonierung der PCR-Produkte in den TOPO-TA-Klonierungsvektor

Die amplifizierten PCR-Fragmente wurden in den TOPO-TA-Vektor nach Herstellerangaben (Invitrogen) kloniert. Voraussetzung für eine erfolgreiche Klonierung ist ein Adeninüberhang der PCR-Produkte am 3'-Ende, welcher durch die Hot Star *Taq*-DNA-Polymerase gewährleistet wird. Die Thymidinüberhänge am 3'-Ende des TOPO-TA-Vektors ermöglichen die effiziente Ligation der PCR-Produkte mit dem Vektor (Vektorkarte s. Anhang).

4.3.3.2 Klonierung in die Expressionsvektoren pQE und pCAL

Nach erfolgreicher Klonierung und Restriktion der PCR-Produkte aus dem TOPO-TA-Klonierungsvektor, wurden die PCR-Produkte in den von der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Barnekow veränderten Expressionsvektor pQE-myc-Mss4 ligiert (Diss. T. Weide, 1998).

Nach Restriktion der klonierten myc-Produkte aus dem pQE-Expressionsvektor erfolgte die Expression der Zielfragmente in dem Expressionsvektor pCAL. Dieser Vektor ist speziell für die Expression von Proteinen im *E.coli*-Stamm BL21 konzipiert. (Vektorkarte s. Anhang)

4.3.4 Ligation

Die Ligation der PCR Produkte in den TOPO-TA-Klonierungsvektor erfolgte durch die an den Klonierungsvektor gekoppelte *Topoisomerase I* des *Vaccinia* Virus. Diese *Topoisomerase I* bindet an doppelsträngige DNA, wird durch die freiwerdende Energie der Phosphodiestererspaltungen aktiviert und verknüpft den DNA-Doppelstrang (Shuman *et al.*, 1994).

Zur Ligation der Expressionsvektoren mit den zu klonierenden DNA-Fragmenten wurde die *T4*-DNA Ligase der Firma Promega, eingesetzt. Dieses Enzym katalysiert in Gegenwart von ATP die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen doppelsträngiger DNA-Moleküle.

Die TOPO-TA-Klonierung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die *T4*-Ligase Reaktion wurden x µg Vektor-DNA und ein fünffacher molarer Überschuß an gespaltenen und gereinigten PCR-Produkten eingesetzt.

Tab. 10 Komponenten und Volumen der Ligationsansätze

Reagenzien/ Ansätze	1. MutS/ TOPO-TA	2. MutS-(<i>NdeI/HindIII</i>)/ pQE-myc	3. myc-MutS- (<i>EcoRI/HindIII</i>)/ pCAL
TOPO-TA-Vektor	1 µl	---	---
Salzlösung	1 µl	---	---
<i>T4</i> -Ligase	---	1 µl	1 µl
10x-Ligasepuffer	---	2 µl	2 µl
Vektor pQE-myc	---	2 µl	---
Vektor pCAL	---	---	2 µl
Insert	4 µl	15 µl	15 µl
<i>A. bidest</i>	---	---	---
Gesamtvolumen	6 µl	20 µl	20 µl

Der TOPO-TA-Ligationsansatz wurde 30 min bei RT inkubiert und anschließend in *E. coli* transformiert. Die *T4*-Ligationsansätze wurden über Nacht bei 16°C inkubiert und am nächsten Tag direkt zur Transformation eingesetzt.

4.4 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien

Die Einführung der gereinigten Plasmid-DNA in kompetente Empfängerzellen bezeichnet man als Transformation. Nur wenige Zellen besitzen eine natürliche Kompetenz und können Fremd-DNA aufnehmen. Die natürliche Kompetenz von *E. coli* ist gering, kann jedoch durch Behandlung der Bakterien mit eiskalter CaCl₂-Lösung und einem anschließenden Hitzeschock erheblich gesteigert werden (Cohen *et al.*, 1972).

4.4.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Die von Mandel und Higa (1970) entwickelte Standardmethode beinhaltet die Behandlung der *E. coli*-Zellen mit eiskalter CaCl₂-Lösung, wodurch die Zellen permeabilisiert werden.

Materialien/ Puffer:

Petrischalen (Waldeck, Münster)

Transformationspuffer
100 mM CaCl ₂

Durchführung:

Die *E.coli* DH5- α -Zellen wurden in 2 ml YT-Medium in einem 50 ml Kulturkolben über Nacht bei 37°C mit 180 rpm im Schüttler inkubiert. Diese Übernachtskultur wurde am folgenden Tag in 50 ml LB-Medium (Verdünnung 1:100) bei 37°C mit 180 rpm in einem 250 ml Kulturkolben bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,5 als Hauptkultur angezogen. Die Suspension wurde anschließend für 10 min auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (2000 x g, 20 min, 4°C). Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und die Zellen in 25 ml eiskaltem Transformationspuffer (CaCl₂) resuspendiert. Die anschließende Inkubationszeit betrug 30 min bei 4°C. Nach einer weiteren Zentrifugation für 30 min bei 2000 x g, 4°C, wurde das Sediment in 2 ml Transformationspuffer resuspendiert. Die „kompetenten“ Zellen können für 48h bei 4°C oder langfristig als Glycerinkultur (15% Glycerin) bei -70°C gelagert werden.

4.4.2 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Transformation wurden 120 μ l der Suspension kompetenter DH5- α -Zellen mit 20 μ l des Ligationsansatzes vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis, erfolgte ein Hitzeschock für 1 min bei 42°C im Thermoblock. Während des Hitzeschocks nehmen die kompetenten *E. coli*-Zellen die Plasmid-DNA auf. Anschließend wurde der Ansatz 5 min auf Eis gekühlt, mit 150 μ l LB-Medium versetzt und für 60 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Transformationsansätze wurden auf Ampicillin-haltige Agarplatten ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Kolonien mit Hilfe der Restriktionsanalyse auf rekombinante Klone überprüft.

4.5 Plasmidpräparation und Analyse von DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* erfolgte durch alkalische Denaturierung der Zellen (verändert nach Birnboim und Doily, 1979).

Diese Methode beruht darauf, dass überspiralisierte („supercoiled“) Plasmid-DNA durch alkalische Behandlung nur teilweise denaturiert wird und nach Neutralisation in ihre ursprüngliche Konformation zurückkehrt. Die chromosomale DNA bleibt auch nach Neutralisierung denaturiert und kann mit den übrigen Bestandteilen des Zellextraktes (RNA, denaturierte Proteine, Zelltrümmer) durch Zentrifugation von der Plasmid-DNA getrennt werden. (Diplomarbeit A. Husemann, 2000)

4.5.1 Plasmidminipräparation

Zur Untersuchung, ob die Plasmide der erhaltenen Klone das ligierte Fragment enthielten, wurde eine Plasmidminipräparation durchgeführt. Die Durchführung erfolgte mit Hilfe der Miniprep Express™ Matrix der Firma BIO 101 nach Angaben des Herstellers.

4.5.2 Plasmidmidipräparation

Die Plasmidmidipräparation dient der Gewinnung größerer Mengen an Plasmid-DNA. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die Plasmid-DNA in einem wesentlich größeren Reinheitsgrad vorliegt als nach einer Phenol-Chloroform-Extraktion.

Für die Plasmidmidipräparation wurde das Reagenziensystem „high speed“ der Firma Qiagen verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Vorschrift des Herstellers.

4.5.3 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung erfolgte nach dem Prinzip der Didesoxyterminator-Methode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Diese Methode wird auch als Kettenabbruch-Methode bezeichnet. Als Ausgangsmaterial für die Polymerasereaktion benötigt man einen „primer“, der an die zu sequenzierende Einzelstrang-DNA bindet. Als Substrat für die DNA-Polymerase dienen die vier üblichen Desoxynukleotide (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) und je ein Didesoxynukleotid (ddNTP) in geringerer Konzentration. Dem Didesoxynukleotid fehlt neben der 2'-OH-Gruppe auch die 3'-OH-Gruppe der Ribose, so dass sein Einbau einen Kettenabbruch zur Folge hat.

In Rahmen dieser Arbeit wurden alle Klone durch Sequenzierung in der Kapillarelektrophorese kontrolliert um sicher zu gehen, dass keine Fehler während der PCR-Amplifizierung und der Restriktion aufgetreten sind.

Reagenzien:

ABIPrism™ BigDye-3.1 „Terminator Cycle Sequencing Ready Kit“

Die Reaktionsansätze für die „cycle“-Sequenzierung wurden wie folgt in 0,2 µl PCR-Reaktionsgefäßen (Fa. Greiner) vorbereitet:

Tab. 11 Reaktionsansätze des „cycle-sequencing“

Reagenzien	Kontrolle	Probe
BigDye Terminator Reaktions Kit	4µl	4µl
Plasmid- bzw. „template“-DNA (100 ng)	---	1 µl
MutS-„Sequence-„primer“ (2,5 pmol/µl)	---	2 µl
M13-„Sequence“ Kontrollvektor“ (100 ng)	2 µl	---
M13-„Sequence“ Kontroll-„primer“ (2,5 pmol/µl)	2 µl	---
HPLC-Wasser	3 µl	3 µl
Gesamtvolumen	10 µl	10 µl

Die „cycle“-Sequenzierung wurde in dem Thermocycler GeneAmp PCR-System 9700 der Firma Applied Biosystems durchgeführt:

Tab. 12 Reaktionsbedingungen des „cycle-sequencing“

Reaktion	Zeit	Temperatur	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	5 min	96°C	---
Denaturierung	10 s	96°C	25
„annealing“	5 s	50°C	25
Synthese	4 min	60°C	25

Im Anschluß an die Sequenzier-PCR wurden die DNA Fragmente mit Hilfe einer 3 M Na-Acetat Lösung (pH 5,2) und 100%-Ethanol-Lösung gereinigt. Die Aufreinigung erfolgte nach Vorschrift der Firma Perkin Elmer.

4.5.4 Sequenzierung durch Kapillarelektrophorese

Die Sequenzbestimmung wurde mit dem ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Perkin Elmer, Weiterstadt) durchgeführt. (Diplomarbeit Husemann A., 2000)

4.6 Proteinchemische Methoden

Um ein Protein hinsichtlich seiner Struktur-, Funktions- und Interaktionseigenschaften genauer charakterisieren zu können, benötigt man größere Mengen dieses Proteins. Häufig ist die Aufreinigung von nativem Material aufwendig und schwierig. Deshalb verwendet man oft prokaryotische bzw. eukaryotische Expressionssysteme. Die von den Organismen produzierten rekombinanten Proteine dieser Systeme enthalten meistens zusätzliche sehr kurze Peptidsequenzen, die eine spezifische Aufreinigung über Affinitätssäulen oder Matrizes ermöglichen.

In dieser Arbeit wurde für die Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* der Expressionsvektor pCAL (Stratagene) verwendet. Über diesen Vektor exprimierte Proteine sind N-terminal durch eine Calmodulin-Bindungssequenz (4 kDa CBP) gekennzeichnet. Das Expressions- und Reinigungssystem gewährleistet die Produktion großer Mengen des Proteins und im Anschluß daran, eine schonende und effektive Aufreinigung der Cal-markierten Proteine mit Hilfe der Calmodulin-Affinitätsmatrix. In Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen erfolgt eine spezifische Bindung des Cal-markierten Proteins an die Calmodulin-Affinitätsmatrix. Die anschließende Reinigung und Elution des Proteins von der Matrix erfolgt durch die Zugabe von 2 mM EGTA. EGTA ist ein Ca^{2+} -Komplexbildner und fängt die Ca^{2+} -Ionen wieder ab.

Reagenzien/ Puffer:

Cal-Affinitätsmatrix (Stratagene)

Equilibrierungs- u. Waschpuffer (CaCl ₂ -Bindungspuffer)	Elutions-Puffer
50 mM Tris-HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 10 mM 2-Mercaptoethanol 1 mM Mg-Acetat 1 mM Imidazol 2 mM CaCl ₂	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 300 mM NaCl 2 mM EGTA 10 mM 2-Mercaptoethanol

4.6.1 Proteinüberexpression

Für die Überexpression des Cal-MutS-Fusionsproteins wurden *E. coli*-Übernacht-Kulturen im Schüttelinkubator bei 37°C unter Zugabe von Ampicillin (0,1 mg/ml) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 angezogen. Anschließend wurde die Überexpression durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,1 mM) induziert. Nach einer einstündigen Inkubation im Schüttelinkubator bei 30 °C, wurden die Zellen abzentrifugiert (6000 x g, 15 in, 4°C) und das Zellpellet in 1/100 Volumen Equilibrierungspuffer (CaCl₂-Bindungspuffer) und einer Spatelspitze Lysozym (Sigma-Aldrich) resuspendiert. Zum Aufschluß der Zellwände wurde die Suspension dreimal in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend dreimal für ca. 20 s mit einer Pause von 10 s einer Ultraschall-Behandlung unterzogen (50 W, Sonopuls GM 70). Die Abtrennung unlöslicher Zellbestandteile erfolgte durch Zentrifugation (14000 x g, 20 min, 4°C). Die Lysate wurden als Schutz vor Proteasen mit einem Proteaseinhibitorkomplex (Sigma) versetzt.

4.6.2 Proteinaufreinigung

Der Proteinüberstand wurde in einem „batch“-Verfahren nach Vorschrift der Firma Stratagene mit einer CaCl₂-equilibrierten Calmodulin-Matrix inkubiert. Die Elution der Calmodulin-Fusions-Proteine erfolgte nach dreimaligem Waschen der Matrix mit dem 300 mM nativen NaCl-Elutionspuffer. Die Reinheit der isolierten Proteine wurde durch Trennung der Protein-Fractionen in einer SDS-PAGE mit anschließender „Coomasie-Blue“-Färbung überprüft.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Elutionspuffer mit unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen (100, 300, 600 mM NaCl) unter nativen und denaturierenden Bedingungen getestet.

4.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

In der diskontinuierlichen SDS-PAGE erfolgt die Proteintrennung unter denaturierenden Bedingungen. Durch den Einsatz von SDS wird die Eigenladung von Proteinen maskiert, so dass die elektrophoretische Auftrennung nach ihrem Molekulargewicht erfolgt (Laemmli, 1970).

Reagenzien/ Puffer:

Rotiphorese® Gel30 (30% (w/v) Acrylamid, 0,8% (w/v) Bisacrylamid)

Sammelgel-Puffer	Trenngel-Puffer
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
SDS-Elektrodenpuffer	(2x) SDS-Probenpuffer
192 mM Glycin 25 mM Tris 0,1% SDS	100 mM Tris-HCl , pH 6,5 4% SDS 0,2% Bromphenolblau 20% Glycerin

Tab. 13 Zusammensetzung der Komponenten des Sammel- und Trenngels für die Gelelektrophorese (SDS-PAGE).

Lösungskomponenten/ Volumen	Volumen der Komponenten 6,25 % iges Trenngel	Volumen der Komponenten 3,0 %iges Sammelgel
30% AA-Bis-Stammlösung	4,7 ml	750 µl
Sammelgelpuffer, pH 6,8	---	1,3 ml
Trenngelpuffer, pH 8,8	11,2	---
Aqua dest.	13,5 ml	7,7 ml
10% (w/v) SDS	300 µl	100 µl
10% (w/v) APS	300 µl	100 µl
TEMED	20 µl	20 µl

Durchführung:

Zur Kontrolle des gereinigten rekombinanten Proteins myc-MutS wurden die Proteine nach der Proteinisolierung in einem 3,0%-igem Sammel- und einem 6,25%-igem Trenngel elektrophoretisch getrennt. Die Konzentrationen der Lösungskomponenten im Sammel- und Trenngel sind in der Tab. 13 zusammengefasst. Das Auftragsvolumen der einzelnen Aufreinigungsfractionen betrug 10-15 µl. Vor dem Gellauf wurden diese in 2x-SDS-Probenpuffer aufgenommen und zur Reduktion der Disulfidbrücken mit Mercaptoethanol für 5 min im Thermoblock bei 95°C denaturiert. Als Referenz wurde parallel ein vorgefärbter „High molecular weight“ Molekulargewichtsstandard („prestained“ SDS-PAGE-Standard) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in der Minikammer bei 200V für 45 min bei RT.

4.6.4 Coomassie Färbung

Bei dieser Färbemethode bindet sich der Farbstoff „Coomassie Brilliant Blue“ unspezifisch an die Proteine. Nicht gebundener Farbstoff wird aus dem Gel durch anschließende Entfärbelösung entfernt. Durch die in der Färbelösung enthaltene Essigsäure wird gleichzeitig eine Fixierung der Proteine bewirkt.

Lösungen:

Coomassie Farblösung
0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G 250 in Entfärbelösung

Entfärbelösung
5 VT Methanol 5 VT Aqua dest. 1 VT Eisessig

Durchführung:

Nach der Elektrophorese wurden die SDS-Gele 15 min bei RT in der Coomassie-Farblösung gefärbt und anschließend bei RT in der Entfärbelösung unter Schütteln so lange entfärbt, bis die Proteine als blaue Banden deutlich wurden.

4.6.5 Western Blot Analyse

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (Kyshe und Anderson, 1984). Der Transfer erfolgte zwischen zwei horizontalen Platinelektroden in einem Transferpuffer im „semi-dry“- Verfahren. Aufgrund der SDS-bedingten negativen Nettoladung der Proteine wandern diese im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode.

Materialien/ Lösungen:

Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schuell, 0,45 μ)

Whatman® 3MM Chromatographiepapier (Schleicher & Schuell)

Hyperfilm-ECL (Amersham)

Blotpuffer
192 mM Glycin 50 mM Tris 20% (v/v) Methanol

Block-Puffer
3% Magermilchpulver in TBS

Wasch-Puffer
0,1% Magermilchpulver in 1xTBS/ Tween (0,1%)

Durchführung:

Die Membran und das Filterpapier wurden in Transferpuffer („Blotpuffer“) equilibriert und in der Reihenfolge Filterpapier, Membran, Gel und Filterpapier zwischen die Elektroden gelegt. Die Proteine wurden bei einer Stromstärke von 1 mA/cm² Gelfläche für 1h auf die Membran transferiert.

4.6.6 Immunologischer Nachweis

Nach dem Western Blot wird das Zielprotein mit spezifischen Antikörpern auf der Membran detektiert. Der Primärantikörper ist dabei gegen das nachzuweisende Protein gerichtet, während der Sekundärantikörper den Primärantikörper erkennt. Dabei ist an den zweiten Antikörper ein Enzym gekoppelt, welches im Nachweis mit einem spezifischen Substrat reagiert.

In dieser Arbeit erfolgte der Nachweis membrangebundener Antigene durch einen Komplex aus zwei Antikörpern: dem Primärantikörper (α -myc (Maus), AG Barnekow) und dem Peroxidase (POD)-markierten Sekundärantikörper (α -Maus-POD).

Durchführung:

Nach dem Elektrotransfer der Proteine erfolgte die Blockierung freier Bindungsstellen für 1 h in Block-Puffer bei RT. Anschließend wurde die Membran dreimal für je 10 min mit 1x TBS/ Tween gewaschen und schließlich für 1h bei RT mit dem Primärantikörper (α -myc, 1:50) inkubiert. Nach weiterem dreimaligen Waschen mit dem Waschpuffer erfolgte die Inkubation des POD-markierten Sekundärantikörpers (α -Maus-POD, 1:1000) für 30 min bei RT. Zum zweiten Mal wurden die ungebundenen Antikörper durch dreimaliges Waschen entfernt. Mit Hilfe des „ECL Western Blotting Kit“ („Enhanced Chemiluminescence“ (ECL), Amersham) wurden die Proteine auf einem ECL-Hyperfilm detektiert. Die Entwicklung des Filmes wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

4.7 DNA/ Protein-Bindungs-Test

4.7.1 „Gelshift“-Test

Um die DNA-„mismatch“-bindende Affinität der exprimierten und aufgereinigten Proteine MutS und MutM mit dem kommerziell erworbenen rekombinaten Protein MutS der Firma GenCheck Inc. zu vergleichen, wurde der „Gelshift“ Test in einem nativen Polyacrylamidgel nach Vorschrift der Fa. Amersham durchgeführt. Die Oligonukleotidsequenzen wurden wie folgt hybridisiert und mit dem Protein inkubiert:

Materialien/ Puffer:

Elektrophorese-Minikammer (BioRad)

DNA- „annealing“-Puffer (AP)	6% Native PAGE
20 mM Tris-HCl 0,1 mM DTT 0,01 mM EDTA 5 mM MgCl ₂ pH 7,6	200 µl 50x TAE-Puffer 2 ml AA-Bis-Stammlösung (29:1) 7,8 ml Aqua dest. 5 µl TEMED 50 µl 10% APS

Durchführung:

Komplementäre, sowie um eine Base veränderte Oligonukleotidsequenzen wurden in einem molaren Verhältnis 1:1 in dem DNA „annealing“-Puffer gemischt. Die Konzentration betrug 14 pmol/µl. Das Gemisch wurde für 10 min auf 70 °C denaturiert und anschließend für 30 min bei Raumtemperatur hybridisiert. Das Gesamtvolumen der Reaktionsansätze betrug 10 µl. Die Oligonukleotide wurden in einer Endkonzentration von 1,4 pmol/µl mit den DNA-bindenden Proteinen myc-MutS und myc-MutM, sowie dem Protein MutS der Firma GenCheck in 0,2 µl-PCR-„tubes“ gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Konzentration der Proteine betrug versuchsweise 1-5 pmol (1pmol entspricht ca. 97 ng). Nach Zugabe von 1 µl 80% Saccharose wurden die Proben bei 4°C in einer 6%-igen nativen PAGE bei 8 V/cm getrennt.

Aufgrund des erhöhten Molekulargewichtes, bedingt durch das gebundene Protein, zeigten fehlgepaarte DNA-Fragmente ein verändertes Laufverhalten im Gel. Die DNA wurde nach erfolgter Trennung mit dem Farbreagens SYBR-Green, welches in die DNA interkaliert, für 30 min inkubiert und bei einer WL von 245 nm UV-Licht emittiert.

4.7.2 Slot Blot Test

In der Slot Blot Analyse nach Wagner *et al.*, wurden die in dieser Arbeit exprimierten und isolierten DNA-„mismatch“-bindenden Proteine MutS und MutM, sowie das Protein MutS (Fa. GenCheck) auf eine Nitrocellulosemembran immobilisiert und mit kurzen DNA-Sequenzen inkubiert. Die hybridisierten DNA-Sequenzen unterschieden sich jeweils durch eine ausgetauschte Base in der Sequenz. Im Gegensatz zu der zuvor beschriebenen Methode („Gelshift“ Test), erfolgt der Nachweis heterogener DNA-Sequenzen nicht in der Gelelektrophorese.

Materialien/ Reagenzien:

Slot Blot Kammer (BioRad)
Nitrocellulose (Schleicher & Schuell)
Filterpapier (Schleicher & Schuell)
ECL Western Blot Kit (Amersham)

Durchführung:

Pro Slot wurden ca. 5 pmol MutS (GenCheck), entsprechend 2 µl MutS und 3 µl MutM, auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen und für 20 min bei RT immobilisiert. Die Absättigung der Membran erfolgte in einer 3% BSA/ „annealing“-Puffer-Lösung (BSA/ AP) für ca. 30 min bei RT, um freie Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurde die Membran mit der biotinmarkierten doppelsträngigen mm-/ pm-DNA für 30 min bei RT inkubiert (s. „Gelshift“ Test). Um keine DNA-Rückstände zu erhalten, wurde diese dreimal in AP für 10 min gewaschen. Die Bindungsaffinität der DNA-„mismatch“-bindenden Proteine wurde nach der Inkubation (30 min, RT) mit einem POD-markierten Sekundärantikörper (α-Biotin-POD, 1:1000) auf einem Röntgenfilm (5 min) mit Hilfe des ECL-Detektionssystem dargestellt (s. Western-Blot Analyse).

4.8 DNA „Mikroarray“

Das Konzept der DNA-„chip“-Analyse ermöglicht es, in einer Reaktion und einem Reaktionsraum - entsprechend der Zahl der DNA-Sonden - eine große Anzahl von DNA-„target“-Molekülen gleichzeitig nachzuweisen. Das Prinzip der DNA-„chip“-Technologie wurde in der Einleitung dargestellt. Im folgenden Abschnitt soll die Herstellung eines DNA-„chips“ näher beschrieben werden.

Um DNA-„chips“ (DNA-„Mikroarrays“) zu generieren mussten DNA-Sonden gefunden werden, die das jeweilige Gen spezifisch und sensitiv detektieren. Dabei wurden Einzelstrangnukleotide, sog. DNA-Sonden mit bekannter Sequenz, in Form von synthetischen Oligonukleotiden und PCR-Produkten, in einem Punktraster auf eine Glasoberfläche („slide“) aufgetragen („gespottet“). Das „spotten“ erfolgte mit einer feinen Nadelspitze („stealthpins“). Dabei wurde jeder DNA-Sonde zuvor eine definierte Position im „Array“ zugeordnet. Mit Hilfe Amino-modifizierter DNA-Sonden am 5'-Ende wurde bei 60°C eine kovalente Kopplung der Sequenzfragmente auf dem epoxybeschichteten Glas-„slide“ ermöglicht. Die Konzentration der Oligonukleotide wurde zuvor in dem entsprechendem „spotting“-Puffer eingestellt. Unter stringenten Bedingungen wurden anschließend fluoreszenzmarkierte DNA-Einzelstränge („targets“) in einer wässrigen Lösung mit den immobilisierten DNA-Sonden inkubiert. Dabei konnten komplementäre DNA-Sequenzen miteinander hybridisieren. Nach der Hybridisierung wurden die „chips“ gewaschen und mit Licht einer bestimmten Wellenlänge im „Array-Scanner 428“ angeregt. Die beobachtete Fluoreszenz wurde von einem Computer in sichtbare Bilder umgewandelt und analysiert. Für das Prozessieren der „chips“ wurden Färbetröge mit Metalleinsatz benutzt, die jeweils 10 „chips“ aufnehmen konnten.

4.8.1 „spotten“ der DNA-Sonden

Das „spotten“ der DNA-Sonden erfolgte mit Hilfe des Mikroarrayroboters „MikroGridII“ (Material).

Materialien/ Reagenzien/ Puffer:

Mikrotiterplatte (Greiner)

Fluoreszenzfarbstoff Bodypy TMR-X (MWG)

„Micro Cleaning Solution“ (TeleChem)

„spotting“-Puffer	DNA-Sonden Konzentration
100 mM Na-Phosphat-Puffer/ 0,005% SDS	10 μ M
	5 μ M
	1 μ M

Für die DNA-Hybridisierung standen vier verschiedene DNA-Sonden und vier verschiedene DNA-„targets“ (3.11.2) zur Verfügung, die sich jeweils durch den Austausch einer Base unterschieden. In den Experimenten wurde jeweils ein DNA-Target mit einer DNA-Sonde inkubiert, sodass 4 komplementäre (DNA-„perfect match“) und 12 fehlgepaarte (DNA-„mismatch“) DNA-Sequenzen hybridisieren konnten.

Die aminomodifizierten DNA-Einzelstrang-Sonden wurden im „spotting-Puffer“ auf eine Endkonzentration von 10 μ M verdünnt. Davon wurden 50 μ l/ Vertiefung in die 96-„well“-Mikrotiterplatte vorgelegt. Die Übertragung der Sonden auf die QMT-„slides“ erfolgte durch den Mikroarrayroboter „MikroGridII“, der mit Hilfe einer feinen Nadel winzige Flüssigkeitstropfen („spots“) aus der Mikrotiterplatte auf die Glasoberfläche („slide“) ablegte. Vor und nach jedem Gebrauch des Spotters wurde die zur „Array“-Herstellung verwendete Nadel zweimal für 3 min in einem Ultraschallbad gereinigt. Im ersten Reinigungsschritt wurde die 2%-ige „Micro Cleaning Solution“ eingesetzt, anschließend wurde die Nadel drei Minuten in A. bidest gewaschen. Pro Probenansatz wurden jeweils 10 „spots“ aufgetragen. Um Konzentrationsunterschiede und Verschleppungen zu vermeiden, erfolgte zu Beginn des „spotting“-Auftrags ein sog. „pre-spotting“. Dafür wurden zwei „slides“ vorgelegt, auf denen die zu „spottende“ Probe 20x aufgetragen wurde.

Um die Markierung eines „Arrays“ zu definieren, wurde zu Beginn des „spotting“-Vorganges der Fluoreszenzfarbstoff Bodypy TMR-X in die vier Eckpunkte eines „Arrays“ gespottet. Im Anschluß daran wurden die einzelnen DNA-Sonden entsprechend ihrer „Array“-Position aufgetragen. Die Immobilisierung der Sonden erfolgte nach dem „spotten“ für 30 min bei 60°C auf den „slides“. Unter diesen Temperaturbedingungen wurden kovalente Bindungen zwischen der „slide“-

Oberfläche und der Sonde begünstigt. Bis zur Hybridisierung wurden die „slides“ trocken und dunkel in „slide“-Boxen gelagert.

4.8.2 Hybridisierung und Detektion fluoreszenzmarkierter DNA-„targets“

Im Rahmen der DNA-Hybridisierung wurden verschiedene Hybridisierungszeiten, Temperaturen und Puffer getestet. Die optimierten Versuchsbedingungen werden im Ergebnisteil detailliert beschreiben.

Material/ Puffer:

„GeneTAC Hybridisation Station“

250µl-„HybriWells“ (Inkubationskammern, Sigma-Aldrich)

DNA-„target“ Konzentration
100 nM
1 µM
5 µM

Hybridisierungspuffer
5x SSC/ 1% SDS
5x SSC/ 0,1%SDS
5x SSC
3x SSC

Inkubationszeit und Temperatur
10 min 95°C anschließend 30 min bei 37°C
10 min 70°C anschließend 30min bei RT
10 min 70°C anschließend 1h bei RT
10 min 70°C anschließend ÜN bei RT
30 min bei RT
1h bei RT
ÜN bei RT

Waschlösung I	Waschlösung II	Waschlösung III
2x SSC 0,1% (w/v) SDS	2x SSC	0,2x SSC

Nachdem die DNA-Sonden kovalent auf dem „slide“ gebunden und das DNA-„Array“ mit einem „HybriWell“ begrenzt wurde, erfolgte die DNA-Hybridisierung unter folgenden Bedingungen:

- Denaturieren der Target-Moleküle : 10 min bei 70°C im Thermoblock
- Hybridisieren der „target“-Lösungen : 1 h bei RT (Taumler)
- Waschen der „slides“ : je 2 min pro SSC-Waschpufferlösung
- Trocknen der „slides“: 5-10 s zentrifugieren (Slide-Zentrifuge)

Durchführung:

Die DNA-„target“-Lösungen, die im Rahmen der Optimierung 100 nM, 1 µM bzw. 5 µM in 5x SSC-Hybridisierungspuffer verdünnt und im Thermoblock bei 70°C für 10 min denaturiert wurden, konnten nach der Hybridisierung (1h bei RT) mit einer Pipette in die Öffnungen der „Hybri-Wells“ gefüllt werden. Damit die Versuchsbedingungen nicht durch äußere Einflüsse (Verdunstung von Flüssigkeit) beeinflusst werden konnten, mußten die „HybriWells“ unmittelbar nach dem Füllen mit kleinen Klebeplättchen verschlossen werden. In den Experimenten variierte die Denaturierungs- und Hybridisierungszeit zwischen 10 min bei 70°C bzw. 90°C und mehreren Stunden bei RT bzw. erhöhter Temperatur (37°C). Die Durchführung erfolgte entweder ruhend oder schwenkend auf einem Labortaumler.

Nach der Hybridisierung wurden die „slides“ für 2-5 min pro Waschlösung (I-III) gewaschen. Im Rahmen der Optimierungsversuche enthielten die Waschlösungen unterschiedliche Konzentrationen SSC und SDS, ebenso variierte die Zeit der jeweiligen Waschlänge. Um unspezifisch gebundene „targets“ von den Sonden abzulösen, aber dennoch eine möglichst geringe Diskriminierung zu erreichen, wurden die „slides“ für jeweils 2 min pro Waschlösung gewaschen. Im Rahmen der

Entwicklung des DNA-„chips“ wurde die Hybridisierung sowohl manuell als auch automatisiert (GeneTac-Hybridization Station, Perkin Elmer) durchgeführt. Die Fluoreszenzdetektion erfolgte mit Hilfe des „Array Scanners 428“.

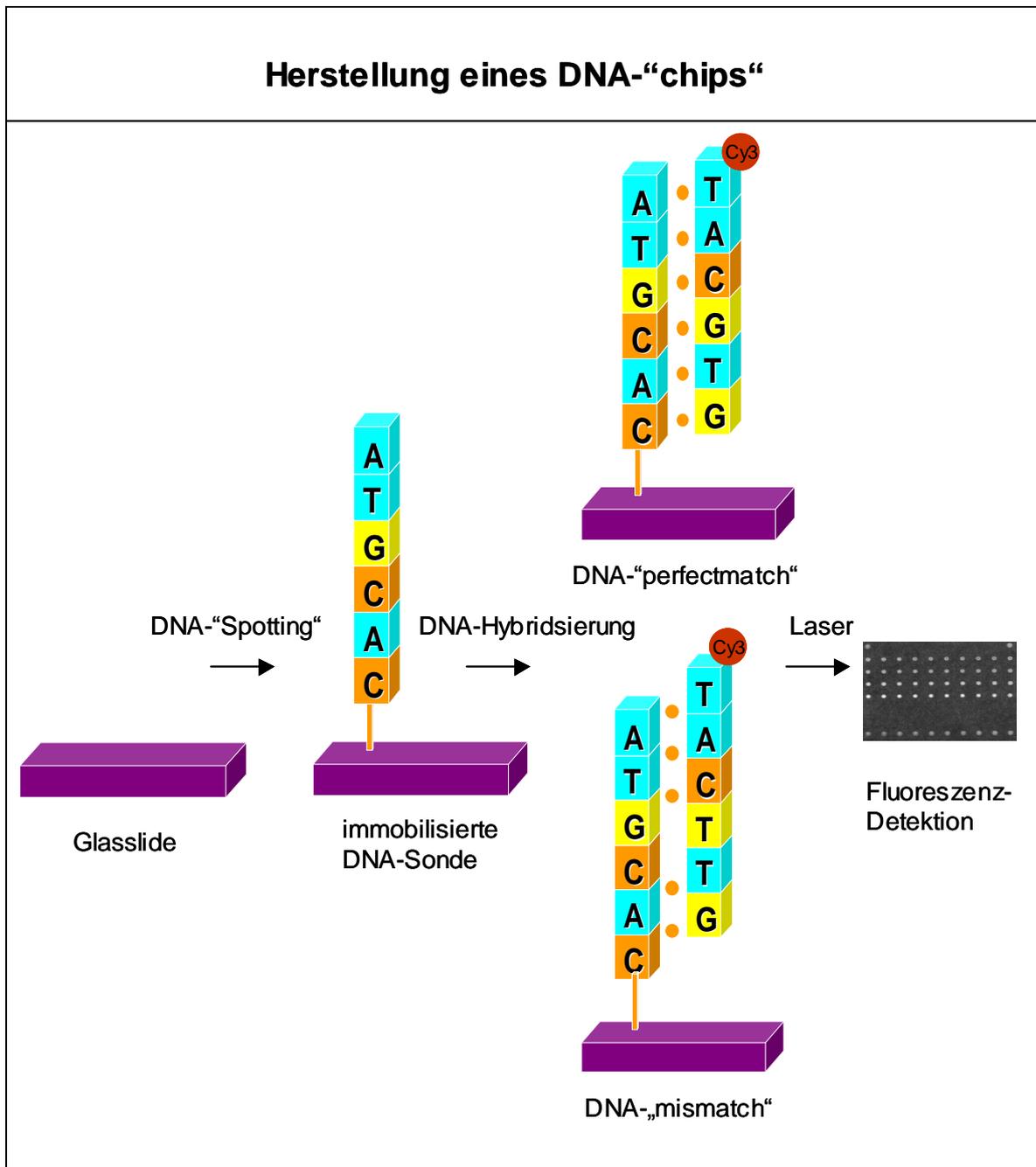


Abb. 6 Schematische Darstellung eines DNA-„chips“.

Aminomodifizierte Oligonukleotide werden auf Aldehyd-modifizierte Glas-„slides“ aufgetragen („gespottet“). Bei 60°C erfolgt ein „crosslink“ zwischen den DNA-Sonden und dem Glas-„slide“. Anschließend wird der „chip“ gewaschen, um ungebundene DNA-Sonden zu entfernen. Die Cy3-markierten DNA-„targets“ werden zur Hybridisierung mit den DNA-Sonden auf dem Chip inkubiert. Um unspezifische DNA-„mismatch“-Bindungen zu vermeiden, werden die „chips“ nach der Hybridisierung gewaschen. Der Nachweis der Hybridisierung erfolgt mit Lasern unterschiedlicher Wellenlänge. Die beobachtete Fluoreszenz wird vom Computer in Bilder umgewandelt und analysiert.

4.8.3 Aufbau eines SNP-Analyse-„chips“ auf der Basis des DNA-„mismatch“-bindenden Proteins myc-MutS

Der Nachweis somatischer Mutationen erfolgte auf dem beschriebenen Oligonukleotid-„Array“ mit Hilfe des DNA-„mismatch“-bindenden Proteins myc-MutS. Unter optimierten Bedingungen binden DNA-„mismatch“-bindende Proteine an nicht komplementäre DNA-Doppelstränge. Im Rahmen dieser SNP-„chip“-Entwicklung wurden keine fluoreszenzmarkierten DNA-„targets“ verwendet.

Reagenzien/ Lösungen:

Antikörper (Material)

Block-Puffer
3% BSA in „annealing“ Puffer (AP)
1% BSA in „annealing“ Puffer (AP)
1% Magermilchpulver (MP) in „annealing“ Puffer (AP)

Optimierung der myc-MutS Konzentration
1:50
1:100
1:150

Optimierung der Inkubationszeit und - Temperatur
15 min bei 60°C
20 min bei 37°C
30 min bei RT°C
1h bei RT

Optimierung des Waschzeit
5 min bei RT
2 min bei RT
1 min bei RT
10x langsam eintauchen, bei RT

Durchführung:

Die Durchführung der DNA-Hybridsierung erfolgte wie beschrieben. Im Rahmen der Entwicklung und Optimierung der Protein-Bindung wurden unterschiedliche Lösungen und Inkubationszeiten getestet. Zur Absättigung der freien Bindungsstellen auf dem „slide“ wurde die „slide“-Oberfläche für 30 min bei RT in einem Block-Puffer (1% BSA/ AP) inkubiert. Zur Detektion fehlgepaarter DNA wurde das DNA-„mismatch“-bindende Protein myc-MutS in einer 1%igen BSA/ AP (1:150) verdünnt

und im Rahmen der Optimierung zwischen 20 min und 30 min bei RT, 37°C bzw. 60°C auf dem DNA-„chip“ inkubiert. Die Proteinkonzentration wurde anhand eines Konzentrationsvergleiches mit dem Protein MutS der Firma Gencheck in einem SDS-PAA-Gel ermittelt, da das in dem Elutionspuffer enthaltene Mercaptoethanol in der Proteinbestimmung nach Bradford störte. Um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen, folgte ein Waschschrift, indem die „slides“ 10x langsam in den Waschpuffer eingetaucht wurden.

Die immunologische Detektion des Proteins myc-MutS erfolgte in Anlehnung an die Western Blot Analyse. Die „slides“ wurden nach dem Waschen mit einem 60 µl „Hybriwell“ beklebt und für 30 min mit dem monoklonalen myc-Antikörper (1:50 verd. in 1% BSA/ AP) bei RT inkubiert. Anschließend wurden die „slides“ vorsichtig in dem „annealing-Puffer“ gewaschen (10 x Eintauchen und Abtropfen) und mit dem Sekundärantikörper α-Maus-Cy3 (1:1000 in 1% BSA/ AP) für 30 min bei RT inkubiert. Nach dem letzten Waschschrift, in dem ungebundene Antikörper-Moleküle entfernt wurden, erfolgte die Fluoreszenzdetektion mit Hilfe des „Array Scanners 428“.

Alle Hybridisierungsschritte, die zum Aufbau des DNA-„chips“ notwendig waren, wurden sowohl manuell als auch automatisiert durch die „GeneTAC Hybridisation Station“ getestet.

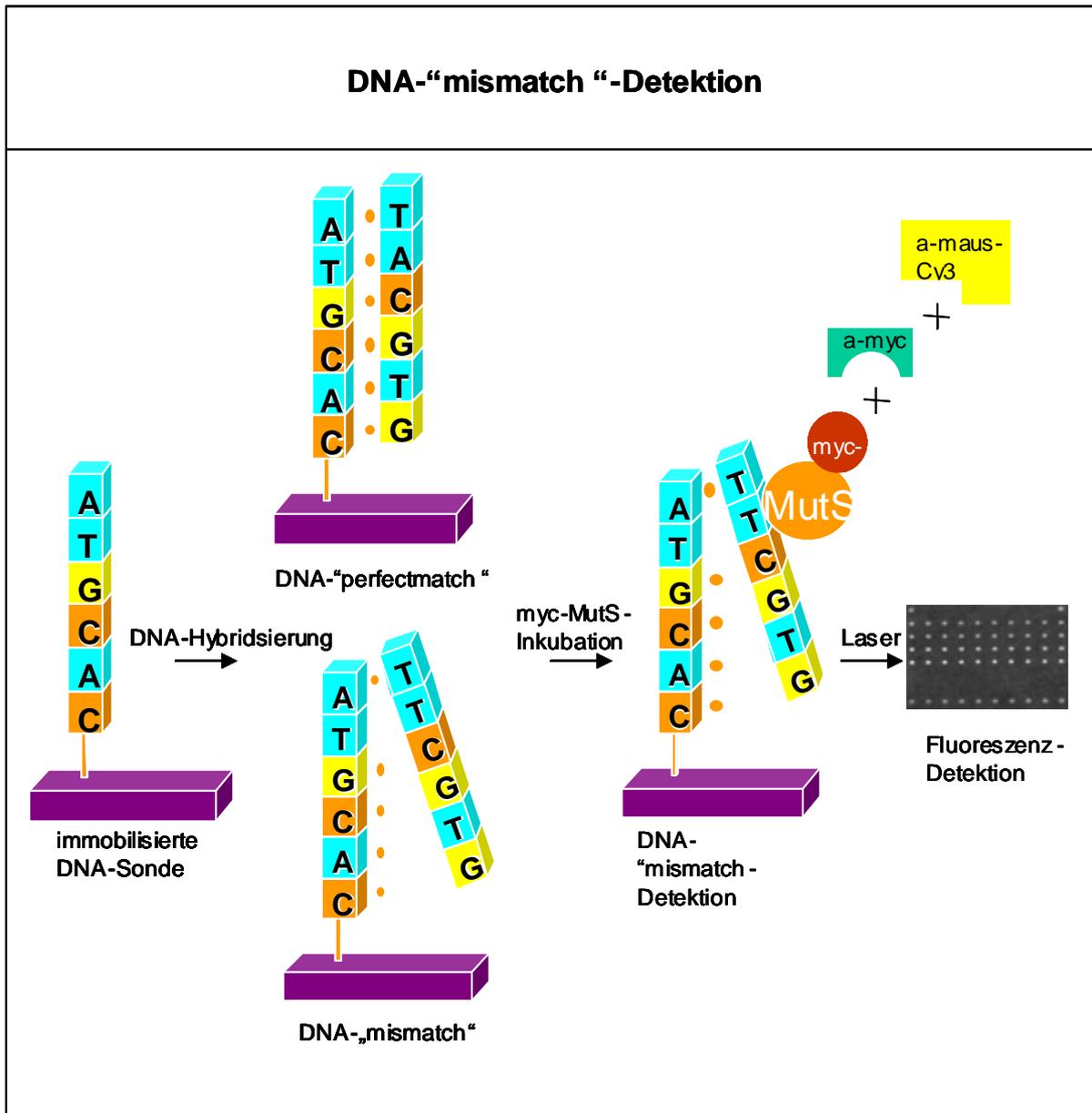


Abb. 7 Schematischer Verlauf der DNA-„mismatch“-Detektion mit Hilfe des modifizierten myc-MutS.

Hybridisierte DNA-„mismatch“-Sequenzen werden auf dem DNA-„chip“ mit Hilfe des modifizierten rekombinanten Proteins myc-MutS detektiert und in einer immunologischen Kaskade (a-myc/ a-Maus-Cy3) fluoreszenzmarkiert. Laser unterschiedlicher Wellenlänge ermöglichen die ortsspezifische Detektion auf dem Glas-„slide“.

4.8.4 Versuche zur Optimierung der myc-MutS Bindungsaffinität

In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob die Bindung des DNA „mismatch“ bindenden Proteins myc-MutS sowie die Verringerung der Hintergrundreaktionen durch die Inkubation mit einer Endonuklease „Mung Bean Nuclease“ bzw. eines „single strand binding Proteins“ („SSB“) erfolgreich verändert werden konnte.

4.8.4.1 Untersuchung des Einfluss einer „Mung Bean Nuclease“

Bei der „Mung Bean Nuclease“ handelt es sich um ein Enzym aus der Gruppe der Endonukleasen. Diese Enzyme sind in der Lage, einzelsträngige DNA-Fragmente endständig (3' und 5') zu verdauen. Im Rahmen der DNA-„mismatch“ Diskriminierung wurde die enzymatische Reaktion direkt nach der Hybridisierungsreaktion auf dem DNA-„chip“ durchgeführt, um einzelsträngige nicht-hybridisierte DNA-Sonden zu verringern und um falsch-positive Ergebnisse durch die Bindung des Proteins an diese Sequenzen, zu verhindern.

In den Experimenten wurden verschiedene Konzentrationen der Endonuklease getestet. Ebenso wurde Inkubationsdauer und die Temperatur variiert. Die Anwendung dieses Enzyms erfolgte nach Herstellerangaben.

Reagenzien:

„Mung Bean Nuclease“ (New England Biolabs)

10x „Mung Bean Nuclease“-Puffer

“HybriWell” (Schleicher & Schuell)

Optimierung der „Mung Bean Nuclease“-Verdünnung (Konz. 10 U/μl):
1:10000
1:1000
1:500
1:100
1:10

Optimierung der Inkubationsdauer u. Temperatur
25 min bei 30°C
30 min bei 37°C
1h bei 37°C

Im Anschluß an die DNA-Hybridisierung wurde das DNA-„Array“ mit einem „HybriWell“ begrenzt und im Rahmen der Optimierung bei unterschiedlichen Temperaturen (30°C, 37°C) und Inkubationszeiten (25 min, 30 min, 60 min in unterschiedlichen Endonuklease-Konzentrationen inkubiert. Die Verdünnung des Enzyms erfolgte nach Vorschrift des Herstellers in Nuklease-Puffer. Nach der Inkubation wurden die „slides“ für je 2 min in den Waschlösungen I-III gewaschen. Die Durchführung der myc-MutS Bindung erfolgte wie beschrieben.

4.8.4.2 Untersuchung des Einflusses durch „single strand binding“ Proteine („SSB“)

Zur Optimierung der DNA-„mismatch“ Detektion, wurde das „single strand DNA binding Protein“ (SSB) der Firma Sigma eingesetzt. Genecheck Inc. (USA) beschreibt in der Versuchsvorschrift der „IMBP96-well plates“, dass die Inkubation von SSB-Proteinen an einzelsträngige DNA-Sequenzen (ssDNA) Hintergrundreaktionen und damit „falsch-positive“ Signale verringern.

Reagenzien:

SSB-Protein (Sigma-Aldrich)

Optimierung der „SSB“ Protein-Konzentration (Konz: 2,67 µg/µl):
1:10
1:20
1:50

Optimierung der Inkubationsdauer und Temperatur
1h bei 37°C
30 min bei 25°C
30 min bei 37°C

Nach Absättigung der „slide“-Oberfläche mit dem Block-Puffer erfolgt die Inkubation des SSB Proteins in einer Konzentration von ca. 0,1 µg (Verd. 1:20) für 30 min bei 37°C. Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an das Gene Check Protokoll („The use of SSB in Mutation Detection Experiments“).

4.8.4.3 Amplifikation genetischer *BRCA1*-Sequenzen zur diagnostischen Applikation

Im Rahmen der diagnostischen Applikation und zur Kontrolle des DNA-„mismatch“-bindenden Proteins myc-MutS wurden 100 bp-*BRCA1*-Fragmente (*BRCA1*-Ins und

BRCA1-Del) in der Standard-PCR amplifiziert. Die genomische DNA wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Preisler (Institut für Humangenetik) zur Verfügung gestellt. Die elektrophoretische Kontrolle der Amplikons erfolgte in einem 3%igen Agarosegel. Nachdem die Proben in dem „spotting“-Puffer“ verdünnt und für 10 min bei 70°C auf dem Thermoblock denaturiert wurden. Die „chip“-Experimente erfolgten in Anlehnung an die beschriebene DNA-„Array“-Durchführung (4.8).

5 Ergebnisse

Die Mehrzahl der malignen Tumore entstehen sporadisch, wobei die genetischen Veränderungen auf der somatischen Ebene erfolgen. Bei manchen Familien liegen jedoch vererbte genetische Alterationen vor, die zu einer frühzeitigen Krebserkrankung führen können.

So ist auch Brustkrebs in 5 bis 10% der Fälle erblich bedingt. Dabei spielen neben dem *p53*-, dem *erbB-2* und dem *PTEN*- Gen vor allem das *BRCA1*- und das *BRCA2*-Gen eine besondere Rolle. Epidemiologische Untersuchungen bezüglich des Vorhandenseins von Mutationen im *BRCA1*- und *BRCA2*-Gen bei betroffenen Frauen zeigten, dass bei 10 bis 30% der Brustkrebspatientinnen eine positive Familienanamnese mit mindestens einem weiteren erstgradig verwandten betroffenen Familienmitglied nachweisbar ist.

Die molekulargenetische Analyse von Mutationen im *BRCA1*- und *BRCA2*-Gen ist derzeit noch sehr zeit- und kostenaufwändig. Dabei hat sich gezeigt, dass im Rahmen der Krebsfrüherkennung und Prävention eine frühzeitige Analyse von Mutationen in diesen beiden Genen die Entwicklung des Brustkrebs und somit die Prognose der betroffenen Frauen erheblich verbessern könnte.

Im Zentrum dieser Arbeit steht die Entwicklung eines klinisch-diagnostischen „screening“-Verfahrens, welches somatische Mutationen in Brustkrebsgenen erkennt.

Wie schon in der Einleitung beschreiben, erlauben DNA-„Mikroarrays“ eine schnelle und kostengünstige genetische Analyse. Mit Hilfe der rekombinanten und myc-modifizierten DNA-„mismatch“-bindenden Proteine myc-MutS und myc-MutM sollten unbekannte somatische Mutationen auf einem DNA-„chip“ detektiert werden.

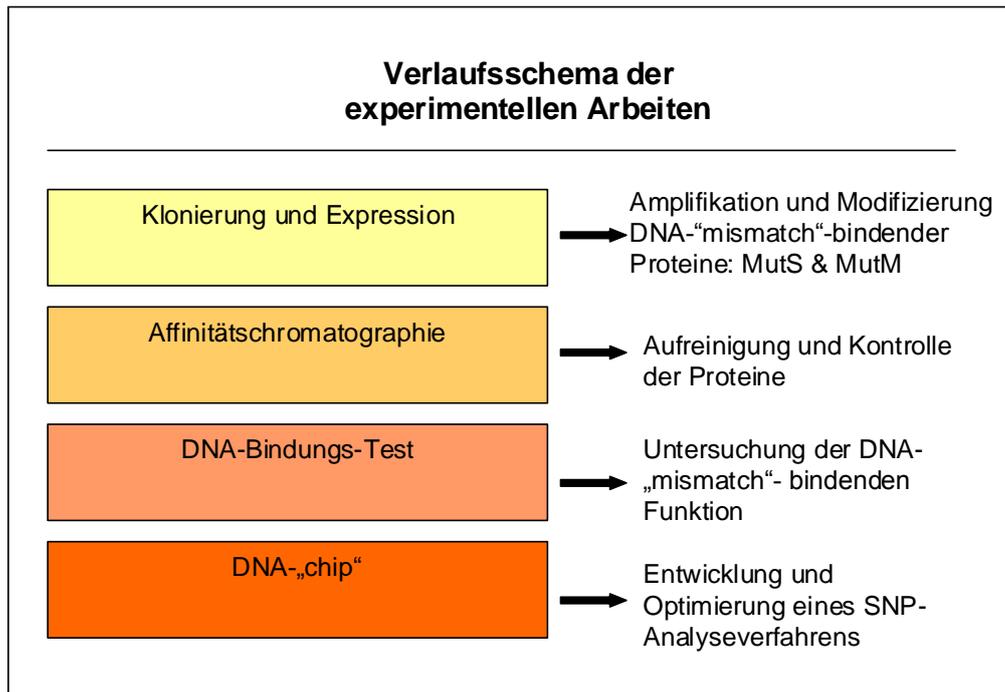


Abb. 8 Entwicklungsschema eines DNA-„chips“

Die Modifizierung und Expression der Proteine MutS und MutM erfolgte mit Hilfe der PCR-Amplifikation und Klonierung in *E. coli*. Nach der Proteinaufreinigung und Molekulargewichtskontrolle wurde die DNA-„mismatch“-bindende Funktion der rekombinanten Proteine in Vorversuchen auf der Basis bekannter DNA-Bindungs-Tests analysiert. Die Entwicklung und Optimierung eines neuen SNP-Analyseverfahrens basierte auf der Technik eines DNA-„Mikroarrays“.

5.1 Amplifikation und Modifizierung der DNA-„mismatch“-bindenden Proteine MutS und MutM

5.1.1 DNA Isolierung und Genamplifikation

Für die *in vitro* Herstellung der DNA-„mismatch“-bindenden Proteine MutS und MutM wurde die bakterielle DNA aus dem thermophilen Bakterienstamm *Thermus thermophilus* (Stamm HB8) isoliert und aufgereinigt. Die Amplifikation der „full length“-cDNA erfolgte mit Hilfe der *Pfu*-DNA-Polymerase in der PCR. Es wurden „primer“ verwendet (MutS for/ MutS rev sowie MutM for/ MutM rev), die neben den definierten Sequenzabschnitten zusätzlich eingefügte Restriktionsschnittstellen (*NdeI* und *HindIII*) enthielten. Diese waren für die anschließende Klonierung in den pQE-myc-Expressionsvektor notwendig.

Die Abb. 9 zeigt die amplifizierten PCR-Fragmenten MutS und MutM in einem 1%igen Agarosegel. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei einer Laufzeit von 1h und einer konstanten Spannung von 100 V. Durch den Vergleich mit einem

parallel aufgetragenen DNA-Längenstandards (1 kb-„ladder“, MBI Fermentas) wurden die DNA-Fragmente MutS (2454 bp) und MutM (801 bp) in der Gelelektrophorese identifiziert.

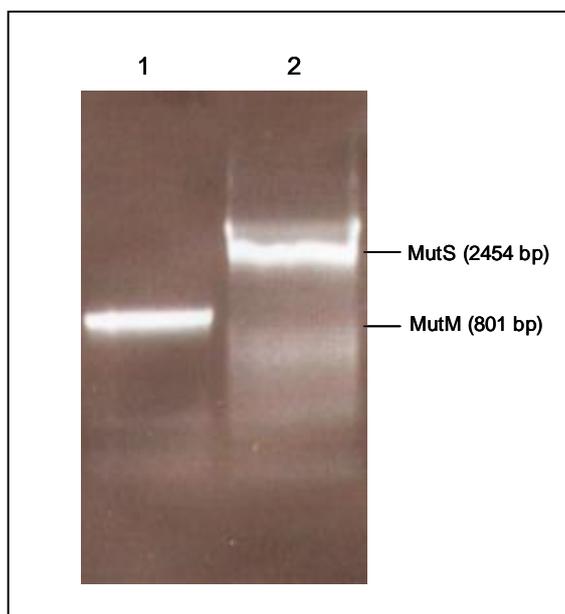


Abb. 9 Trennung der PCR-Fragmente im Agarosegel (1%)

In den Auftragsbahnen 1 und 2 sind die amplifizierten cDNA-Fragmente MutM (801 bp) und MutS (2454 bp) dargestellt. Die doppelsträngige DNA wurde mit Ethidiumbromid gefärbt.

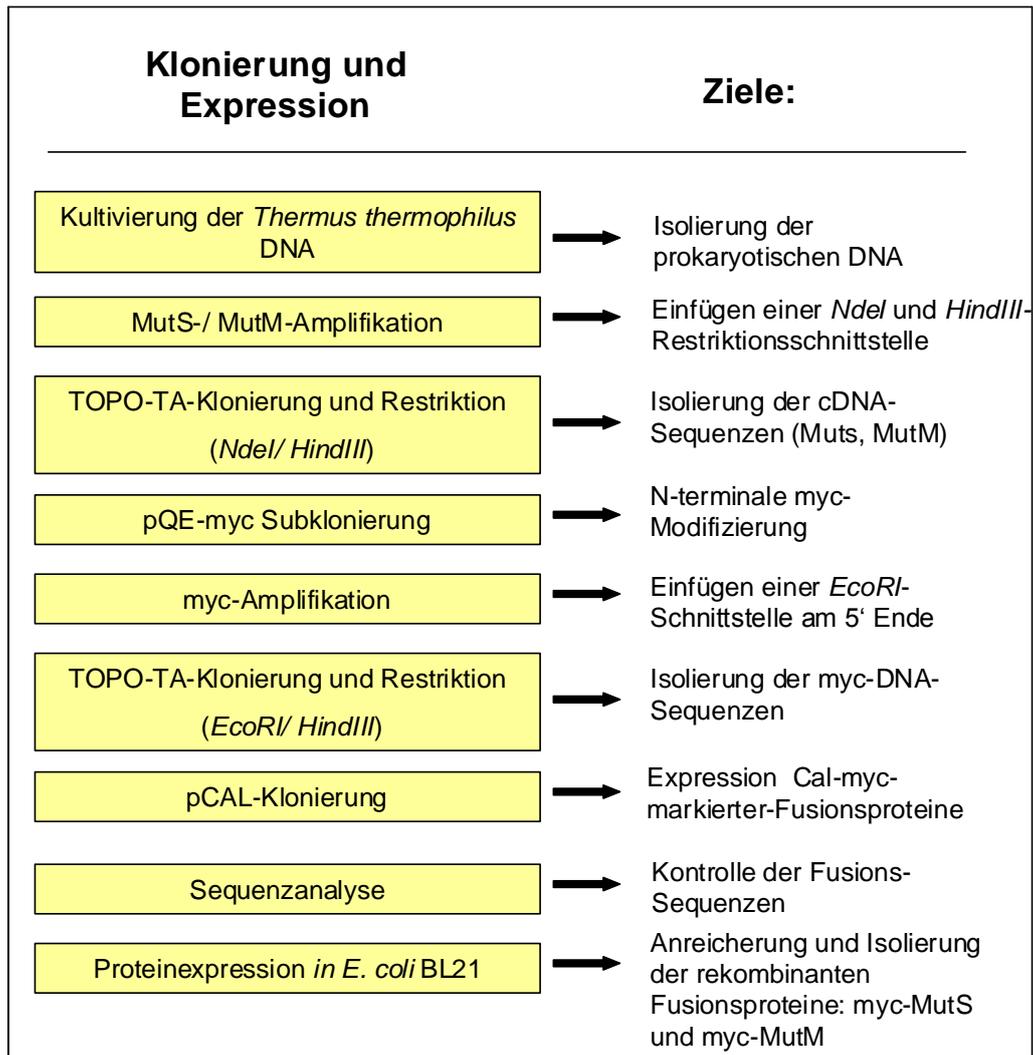


Abb. 10 Verlaufsschema zur Klonierung und Expression der Gensequenzen MutS und MutM

Die amplifizierten und aus dem TOPO-TA-Klonierungsvektor restringierten DNA-Fragmente MutS und MutM, sowie der Vektor pQE-myc-Mss4 wurden mit den Restriktionsenzymen (*NdeI*/*HindIII*) geschnitten. Anschließend wurden die DNA-Fragmente MutS und MutM über die komplementären Enden in den Expressionsvektor pQE-myc ligiert. Auf der Basis dieses DNA-Konstruktes erfolgte im weiteren Schritt die myc-„tag“-Modifikation der DNA-Fragmente durch eine zweite PCR. Die modifizierten DNA-Fragmente wurden wieder in den TOPO-TA-Klonierungsvektor ligiert, um anschließend über die Restriktionsschnittstellen (*EcoRI*/*HindIII*) geschnitten und in den Expressionsvektor pCAL ligiert zu werden.

5.1.2 Modifizierung und Subklonierung der amplifizierten Fragmente

Die folgenden Klonierungs- und Restriktionsexperimente der cDNA-Fragmente MutS und MutM aus dem TOPO-TA-Klonierungsvektor lieferten die gewünschten DNA-Fragmente mit den definierten Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *HindIII*. Die TOPO-TA-Klonierung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Jeweils drei potentiell positive Transformanden wurden in der Plasmid-Minipräparation aufgearbeitet und in der Restriktionsanalyse mit den Enzymen *NdeI*/*HindIII* kontrolliert (Daten nicht

gesondert gezeigt). Das Ergebnis ergab jeweils zwei positive Klone, von denen jeweils ein Klon (MutS-Klon/ MutM-Klon) für die Modifizierung der Fragmente verwendet wurde.

Die experimentelle myc-Modifizierung der amplifizierten cDNA-Fragmente MutS und MutM erfolgte mit Hilfe des eukaryotischen Expressionsvektors pQE-myc-Mss4, der freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Frau Prof. A. Barnekow zur Verfügung gestellt wurde. Diese pQE-His-myc-Vektorvariante ist u. a. bei Schiedel *et al.* beschrieben (Schiedel *et al.*, 1995). pQE-myc-Mss4 wurde als „Zwischenvektor“ eingesetzt, um N-terminal-modifizierte myc-MutS und myc-MutM DNA-Fragmente zu generieren. Die myc-Sequenz des Vektors entspricht einer 13 AS-langen DNA-Sequenz des myc-Onkogens und dient im Rahmen dieser Arbeit als immunologische Erkennungssequenz (Epitop).

Die in dem Expressionsvektor pQE-myc-Mss4 eingefügte Gensequenz Mss4 wurde für die Klonierung der amplifizierten cDNA-Fragmente MutS und MutM mit Hilfe der Restriktionsenzyme *NdeI* und *HindIII* herausgeschnitten. Die Restriktionskontrolle erfolgte in einem 1%igen Agarosegel. Dabei wurde der linearisierte pQE-myc Vektor anschließend aus dem Gel isoliert. Die Ligation der restringierten DNA-Fragmente MutS und MutM erfolgte über die komplementären Schnittstellen *NdeI*/*HindIII* in den Vektor pQE-myc. Die Transformation der pQE-myc cDNA Konstrukte erfolgte in Calciumchlorid-kompetente Zellen des Bakterienstammes *E. coli* DH5 α . Das Ergebnis der Transformation ergab 82 myc-MutM und 54 myc-MutS-Klone. In der Aufarbeitung wurden jeweils ein potentieller myc-MutM und drei potentielle myc-MutS Klone bearbeitet. Jeweils ein positiver Klon wurde in der Restriktionsanalyse anhand des Molekulargewichtes in einem 1%igen Agarosegel identifiziert und für die nachfolgende PCR verwendet. (Daten nicht extra aufgeführt.)

5.1.3 Endklonierung in den pCal-Expressionsvektor

Das Einfügen der *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle am 5'-Ende der myc-modifizierten Sequenzen (myc-MutS, myc-MutM) erfolgte mittels Amplifikation durch die Wahl des myc-spezifischen „primers“ (myc-for). Das komplementäre Fragment wurde über die reversen „primer“ MutS-rev bzw. MutM-rev definiert. Die PCR wurde unter Standardbedingungen durchgeführt. In der DNA Analyse konnte ein myc-MutS Fragment mit einer Länge von ca. 2493 bp und ein myc-MutM Fragment mit einer

Länge von ca. 840 bp dargestellt werden. (Daten nicht aufgeführt.) Die Klonierung der myc-Fragmente erfolgte zunächst in den TOPO-TA-Klonierungsvektor, um mit Hilfe der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *HindIII* DNA-Sequenzen zu erhalten, die über die entsprechenden Schnittstellen in den Expressionsvektor pCal kloniert werden konnten. Aufgrund der N-terminalen Calmodulin-Sequenz, die der Vektor enthält, besaßen die ligierten myc-Fragmente eine zusätzlich eingefügte Calmodulin-Sequenz. Diese Calmodulin-Sequenz entspricht einem 4 kDa-Peptid und diente der nachfolgenden Proteinaufreinigung. Die Transformation der Konstrukte erfolgte zunächst in Calciumchlorid-kompetente *E. coli* Zellen. Das Ergebnis der Klonierung ergab ca. 20 cal-myc-MutS und 15 cal-myc-MutM Klone. Es wurden jeweils drei potentielle Transformanten in der Plasmid-Minipräparation aufgearbeitet und mit Hilfe eines *EcoRI/HindIII*-Restriktionsverdau im Agarosegel analysiert.

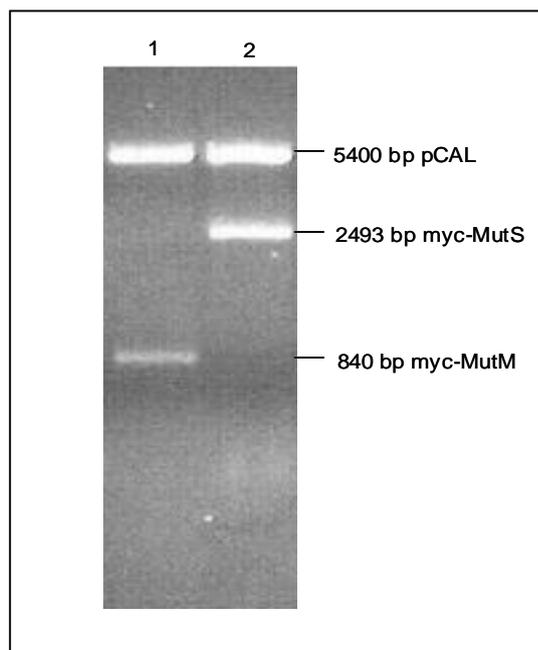


Abb. 11 Gelelektrophoretische Trennung der restringierten Klonierungskonstrukte: pCAL-myc-MutM und pCAL-myc-MutS

In den Auftragsbahnen 1 und 2 sind die restringierten DNA-Fragmente myc-MutM (840 bp) und myc-MutS (2493 bp) zu erkennen. Mit einer Fragmentgröße von 5400 bp ist der restringierte pCAL-Vektor (5400 bp) zu erkennen. Die doppelsträngige DNA wurde nach der elektrophoretischen Trennung im Agarosegel (1%) mit Ethidiumbromid angefärbt.

Abb. 11 zeigt das Ergebnis der *EcoRI/HindIII*-Restriktionsanalyse in einem 1%igen Agarosegel. Die Analyse ergab jeweils einen positiven Cal-myc-MutM und einen Cal-myc-MutS Klon. Die Trennung erfolgte bei einer Laufzeit von ca. 1 h bei einer konstanten Spannung von 100 V. Es wurden jeweils ca. 500 ng gereinigte und geschnittene Plasmid-DNA aufgetragen. Durch den Vergleich eines parallel aufgetragenen DNA-Längenstandards konnte für das modifizierte myc-MutS Fragment eine DNA-Länge von ca. 2493 bp und für das modifizierte myc-MutM Fragment eine Länge von ca. 840 bp in der Elektrophorese ermittelt werden. Der restringierte pCAI-Vektor ist in Höhe von ca. 5400 bp dargestellt.

5.2 Kontrolle der modifizierten myc-Fragmente durch “cycle-sequencing”

Zur Überprüfung der DNA-Sequenzen wurden die Inserts der Plasmide pCal-myc MutM und pCal-myc-MutS vollständig sequenziert. Aufgrund der Insertgröße war es erforderlich, mit Hilfe von 3 (myc-MutM) bzw. 10 (myc-MutS) verschiedenen Sequenzierprimern die Reaktion des „cycle-sequencing“ durchzuführen. Pro Sequenzabschnitt konnten ca. 500 Basen, z.T. in Überschneidung einiger Sequenzabschnitte, vollständig kontrolliert werden. Die Sequenzierungen wurden mit Hilfe der Kapillarelektrophorese des 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) analysiert. Mit Hilfe des Suchprogrammes BLAST (basic local alignment search tool) (Altschul *et al.*, 1990) konnten die Sequenzen direkt auf die Homologie zum prokaryotischen MutS bzw. MutM von *T. thermophilus* geprüft werden. Als DNA-Vergleichssequenz wurde die in der Datenbank beschriebene MutS und MutM DNA von *T. Thermophilus* (Acc-Nr.: D63810 und AB008520, s. Anhang) herangezogen. Die Ergebnisse zeigten eine 100%-ige Übereinstimmung mit den Vergleichssequenzen (Daten nicht extra aufgeführt).

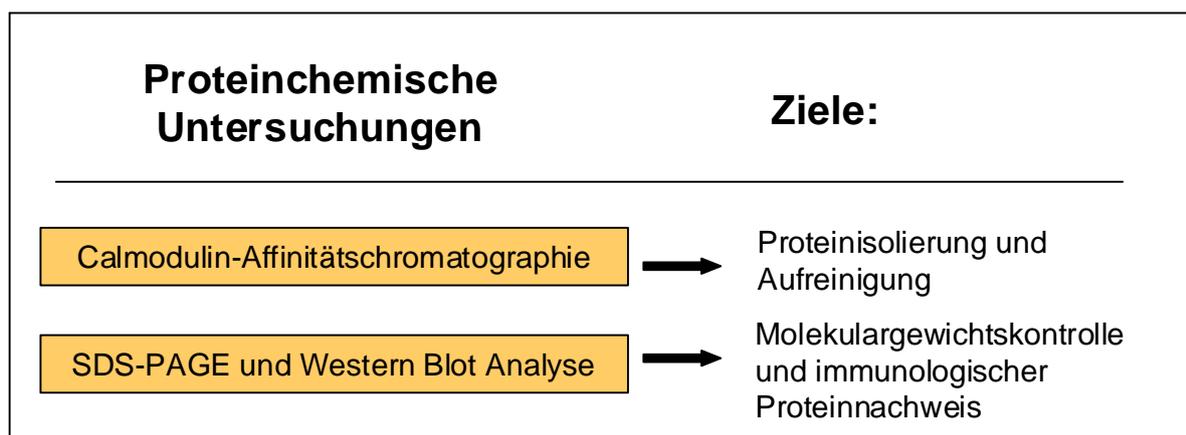


Abb. 12 Untersuchungen zur Proteinaufreinigung und Identifizierung

Die beschriebenen proteinchemischen Untersuchungen dienen dazu, die modifizierten Proteine aufzureinigen und zu identifizieren. Nach der Proteinaufreinigung erfolgte die Ermittlung des Molekulargewichtes in der SDS-PAGE. Der Nachweis der modifizierten Fusionsproteine gelang durch den monoklonalen myc-Antikörper in der Western Blot Analyse.

5.3 Ergebnisse der proteinchemischen Untersuchungen

Die Proteinaufreinigung erfolgte, wie bereits beschrieben, mit einer Calmodulin-Affinitätschromatographie im „batch“ Verfahren. Hierzu wurden die Konstrukte pCal-myc-MutS bzw. pCal-myc-MutM in *E. coli* BL21-Zellen transformiert und überexprimiert. Die Zellyse und Elution des Proteins myc-MutS erfolgte unter nicht denaturierenden Bedingungen in 300 mM NaCl-Elutionspuffer. Das Protein myc-MutM konnte wahrscheinlich aufgrund zellulär gebildeter „inclusion-bodies“ nur unter denaturierenden Bedingungen, d. h. unter Zugabe von 3 M Harnstoff im Lysis- und Elutionspuffer isoliert werden. Die Proteine der eluierten Fraktionen wurden nach der Aufreinigung z.T. vereinigt. Nach dem Kochen der Zellextrakte wurden jeweils 10 µl des zellulären Überstandes (ÜST), des Pellets (P), des Durchlaufs (DL), der Waschlösung (WL) und der vereinten Eluate (EL) in der SDS-PAGE getrennt. Die Durchführung der elektrophoretischen Trennung und der anschließenden Western Blot-Analyse erfolgte wie unter Punkt 4.6.3 beschrieben. Mit Hilfe des Proteinfarbstoffs Coomassie Brilliant Blue wurden die Proteine im Gel direkt dargestellt.

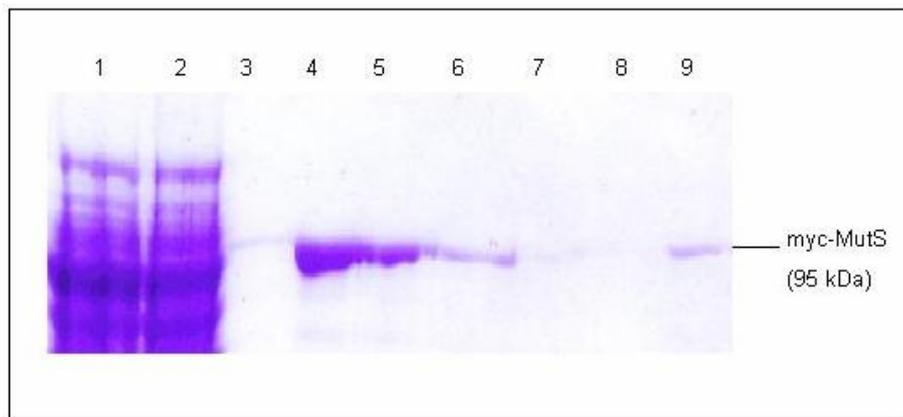


Abb. 13 Calmodulin-markiertes myc-MutS Protein nach der Proteinaufreinigung in der SDS-PAGE (Coomassie-Färbung)

In der 6,25%-igen SDS-PAGE wurden jeweils 10 µl Überstand (Spur 2), Pellet (Spur 3), Waschlösung (Spur 4), Eluate 1-5 (Spur 5, 6, 7, 8, 9), sowie Calmodulin-Matrix (Spur 10) aufgetrennt. Zum Nachweis der Proteine wurden das Gel unmittelbar nach dem Lauf für 15 min einer 0,25%igen Coomassie Brilliant Blue-Farblösung inkubiert und anschließend mit einer Entfärbelösung entfärbt.

Die Abb. 13 zeigt das Coomassie-gefärbte SDS-PAA-Gel. Im Rahmen der Proteinisolierung ist eine deutliche Aufreinigung des Proteins Cal-myc-MutS zu erkennen. Das Calmodulin-markierte Protein konnte in den Waschlösungsfractionen sowie den vereinten Eluaten 1, 3, 5 als Hauptprotein in Form einer Proteinbande im Gel dargestellt werden. Das Molekulargewicht des Fusionsproteins Cal-myc-MutS beträgt ca. 95 kDa. In der Literatur wird das native Protein MutS mit 91,4 kDa angegeben (Takamatsu *et al.*, 1996).

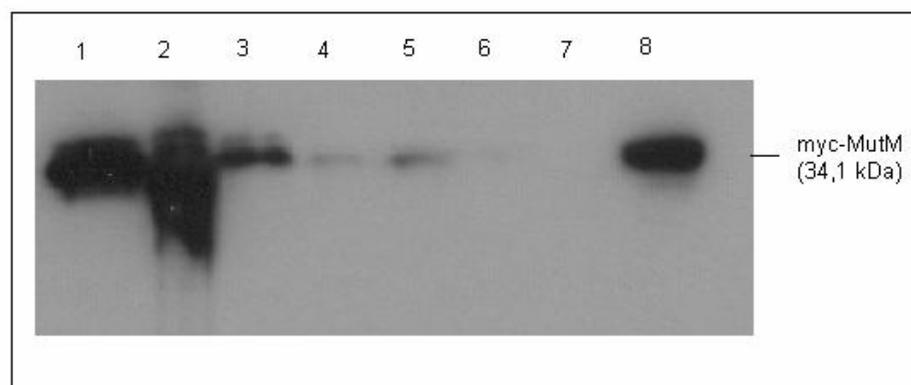


Abb. 14 Calmodulin-markiertes myc-MutM Protein nach der Proteinaufreinigung in der Western Blot Analyse

In einer 6,25%igen SDS-PAGE wurden pro Auftragsbahn 10 µl Probenvolumen aufgetrennt. Neben dem ÜST (Spur 1), P (Spur 2), DL (Spur 3), WL (Spur 4) wurden die Eluate 1, 3, 5 (Spur 5, 6, 7) sowie Cal-Matrix (Spur 8) gelelektrophoretisch getrennt. Zur Detektion wurde der monoklonale myc-Antikörper in einer Verdünnung 1:50 (1% MP in TBS/ 0,1% Tween) eingesetzt. Der zweite POD-markierte Maus-Antikörper wurde in der Verdünnung 1:1000 (1% MP in TBS/ 0,1% Tween) eingesetzt. Der Nachweis erfolgte mit einem ECL-System. Die Expositionsdauer betrug 2 min.

In der Western Blot Analyse, Abb. 14, konnte unter Verwendung des monoklonalen myc-Antikörpers gezeigt werden, dass das Calmodulin-markierte Fusionsprotein Cal-myc-MutM erfolgreich überexprimiert wurde. In den Auftragsbahnen 1 (ÜST) und 2 (P) sind starke Signale der myc-markierten Fusionsproteine zu erkennen. Das starke Signal in der Spur 8 (Mt) deutet auf unlösliche myc-MutM-Proteine hin. In der Literatur wird das native Protein MutM mit einem Molekulargewicht von 30 kDa angegeben (Mikawa *et al.*, 1998). Unter Berücksichtigung der fusionierten Proteinsequenzen Cal (4 kDa) und myc (130 Da) erhöht sich das Molekulargewicht auf ca. 34,1 kDa. Die Western Blot Analysen wurden im Rahmen der Protein-Aufreinigungsoptimierung mehrfach bestätigt.

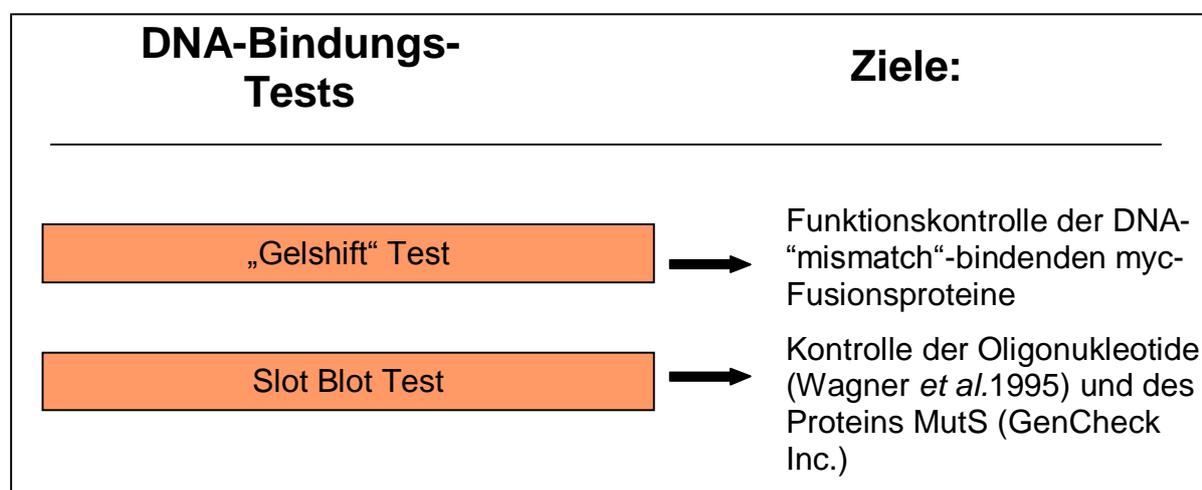


Abb. 15 DNA-Bindungs-Tests zur Kontrolle der DNA-„mismatch“-bindenden Funktion

Mit Hilfe des DNA-„Gelshift“ Tests und dem Slot Blot Test wurden Experimente bezüglich der DNA-„mismatch“-bindenden Aktivität der modifizierten Proteine myc-MutS und myc-MutM sowie dem rekombinanten Protein MutS der Firma GenCheck durchgeführt.

5.4 DNA-Bindungs-Tests

5.4.1 Ergebnisse des „Gelshift“ Tests

Durch die Detektion DNA-„mismatch“-bindender Proteine an fehlgepaarte DNA-Sequenzen (DNA-„mismatches“) und den damit einhergehenden Veränderungen der DNA-Konformation, konnte die Bindungsaffinität der rekombinanten Proteine myc-MutM und myc-MutS im „Gelshift“ Test kontrolliert werden. Weiterhin sollte mit Hilfe dieses methodischen Ansatzes eine Kontrolle der Oligonukleotidhybridisierung und ein Vergleich hinsichtlich der DNA-„mismatch“-bindenden Affinität mit dem Protein MutS der Firma GenCheck Inc. erfolgen. Basierend auf den Ergebnissen konnte die Entwicklung der Mutationsdetektion auf dem DNA-„chip“ aufgebaut werden.

In dem Experiment wurden 8 synthetische Oligonukleotide eingesetzt, die sich in ihrer DNA-Sequenz in einer Base unterschieden. Das Resultat der DNA-Hybridisierung ergab jeweils eine komplementäre DNA-Sequenz (DNA-„perfect match“) und drei fehlgepaarte Sequenzen (DNA-„mismatch“). Die Versuchsdurchführung erfolgte nach Vorschrift der Firma Amersham (Amersham, Application Note 103, 2000).

Das Ergebnis dieses Experimentes ergab eine vergleichbare DNA-Bindungs-Affinität zwischen dem Protein MutS der Firma GenCheck und dem in dieser Arbeit exprimierten Protein myc-MutS. Beide Proteine zeigten eine schwache Bindungsaffinität an Heteroduplex-, aber auch an Homoduplex-Sequenzen. Das Protein myc-MutM zeigte keine reproduzierbare Bindungsaffinität, weder zu den komplementären noch zu fehlgepaarten DNA-Sequenzen. Die Versuche wurden mehrfach durchgeführt. Da die Signalintensität insgesamt sehr schwach war, wurden die Daten nicht extra aufgeführt. Aufgrund der schwachen Signalintensität und der nicht erwarteten Bindungsaffinität an einzelsträngige DNA-Sequenzen wurde zur weiteren Bindungs-Affinitätskontrolle ein Proteinaktivitäts-Test auf Nitrozellulose durchgeführt.

5.4.2 Ergebnisse des Slot Blot Tests

In einem weiteren Kontrollexperiment wurden die modifizierten DNA-„mismatch“ bindenden Proteine myc-MutS und myc-MutM sowie das Protein MutS der Firma GenCheck auf Nitrozellulose immobilisiert (Wagner *et al.*, 1995). Hinsichtlich der Entwicklung eines DNA-„mismatch“-detektierenden DNA-„chip“, konnten vergleichbare Versuchsbedingungen festgestellt werden. Die Inkubation der DNA-„mismatch“- bindenden Proteine erfolgte nicht in Lösung.

Im Rahmen der experimentellen Durchführung wurden unterschiedliche Absättigungslösungen getestet. Im Vergleich zu den mit Magermilchpulver abgesättigten Nitrozellulosemembranen (3%MP/ AP, 1%MP/ AP) konnten dabei erstmals positive Signale bei einer filtrierten 3% BSA/ AP-Absättigungslösung auf der Membran detektiert werden.

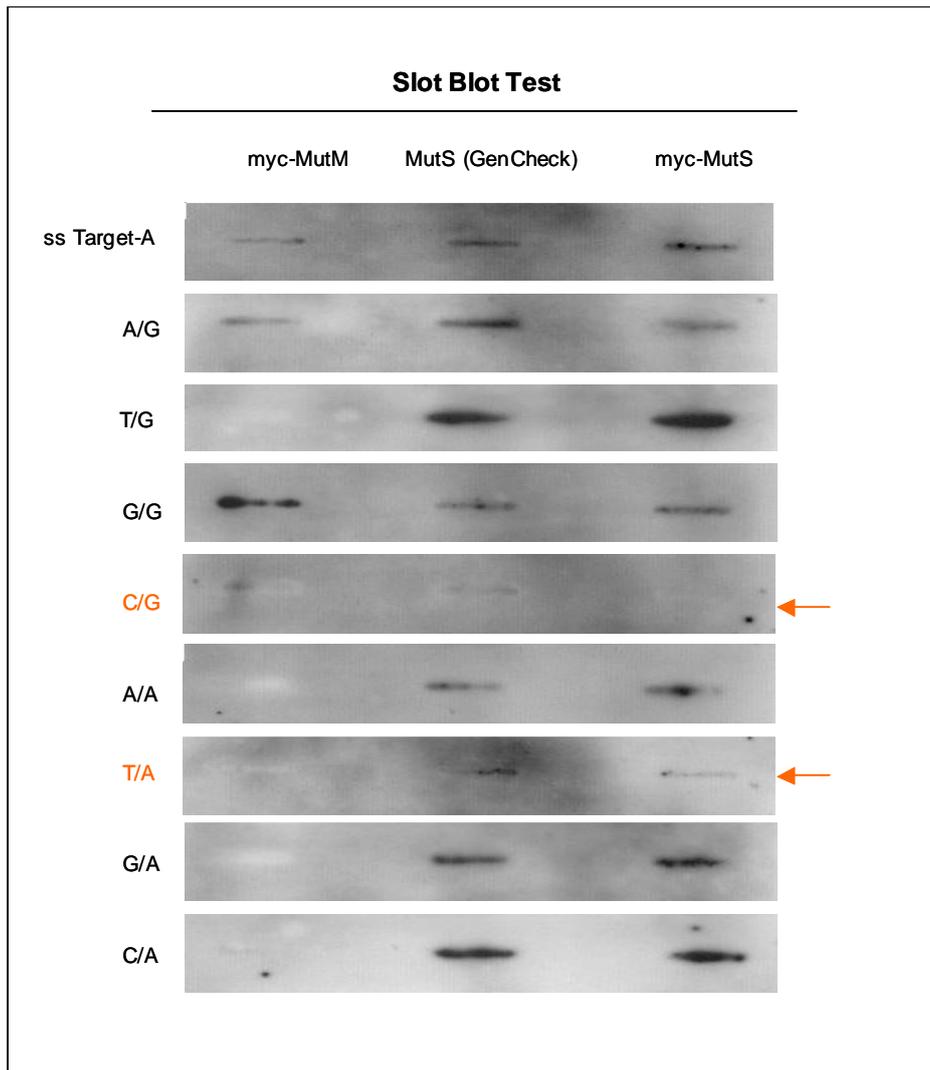


Abb. 16 Kontrolle der DNA-„mismatch“-bindenden Affinität im Slot Blot Test

Dargestellt sind die immobilisierten DNA-„mismatch“-bindenden Proteine myc-MutM, MutS (GenCheck) und myc-MutS, nach Inkubation mit den hybridisierten Oligonukleotid-Sequenzen (A/G, T/G, G/G, C/G, A/A, T/A, G/A, C/A) auf einem ECL-entwickelten Röntgenfilm. Die Inkubationszeit betrug 30 min bei RT. Der Nachweis positiver DNA-Proteinbindungen erfolgte aufgrund biotinmarkierter „target“-Sequenzen, die im Rahmen einer immunologischen Detektionskaskade mit Hilfe des POD-gekoppelten Biotinantikörpers sichtbar gemacht werden konnten. Die Expositionsdauer betrug 20 min. Die Ergebnisse wurden mehrfach bestätigt. Die rot markierten Pfeile kennzeichnen die komplementären Sequenzen C/G und T/A.

Wie in der Abbildung Abb. 16 zu erkennen ist, wurden die Proteine myc-MutM, MutS (GenCheck) und myc-MutS nebeneinander in einer Konzentration von ca. 5 pmol (das entspricht ca. 2 µl EL myc-MutS, 5 µl EL myc-MutM) in einer Slot Blot Kammer auf Nitrozellulose immobilisiert. Es folgte die Inkubation der Proteine mit den hybridisierten Oligonukleotidsequenzen (10 ng). Die Proteine zeigten im Slot Blot Test eine mittelstarke Bindungsaffinität an einzelsträngige-biotinmarkierte DNA-

Sequenzen (ss Target-A). Da im Rahmen der experimentellen Versuchsreihen unterschiedliche Protein- und DNA-Konzentrationen getestet wurden und das Ergebnis unverändert blieb, kann möglicherweise auf eine verminderte Bindungsaffinität der Proteine an nicht-komplementäre Sequenzen geschlossen werden.

Im Hinblick auf die Heteroduplex-Sequenzen (A/G, T/G, G/G, A/A, G/A, C/A) konnte zwischen den Proteinen MutS (GenCheck) und myc-MutS eine vergleichbare Fluoreszenzintensität beobachtet werden. Die Signalintensität variierte jedoch in Abhängigkeit der DNA-Sequenzvariationen (A/G, T/G, G/G, A/A, G/A, C/A). D.h., die Detektion heterogener T/G-Hybride zeigte wesentlich stärkere Fluoreszenzsignale als die Inkubation heterogener A/A-Hybride. Diese Tatsache wurde mehrfach bestätigt. Die stärksten Signale in dieser Abbildung, sind durch die Bindung der Proteine an Heteroduplex-Sequenzen T/G, A/A, G/A und C/A zu erkennen, wobei die Fluoreszenzsignale der Sequenzen T/G und C/A eindeutig stärker sind als die der A/A- und G/A-Sequenzen. Demgegenüber konnte eine sehr schwache Bindungsaffinität der Proteine MutS und myc-MutS an Homoduplex-Sequenzen A/T und G/C in fast allen Versuchen bestätigt werden. In der Abbildung ist die Detektion der Proteine an C/G-Hybride negativ. Da jedoch in wiederholten Kontrollansätzen eine schwache DNA-bindende Aktivität der Proteine MutS und myc-MutS an A/T- und G/C-Homoduplexe zu erkennen war, kann möglicherweise von einer unspezifischen DNA-bindenden Aktivität der Proteine an Homoduplexe ausgegangen werden.

Die DNA-„mismatch“-bindende Affinität des Proteins myc-MutM ist mit Ausnahme einer G/G-spezifischen heterogenen Bindungsaffinität insgesamt sehr schwach. Die Kontrollexperimente zeigten keine stabile Reproduzierbarkeit, weshalb Detektionsversuche mit dem Protein myc-MutM auf einem DNA-„chip“ zurückgestellt wurden.

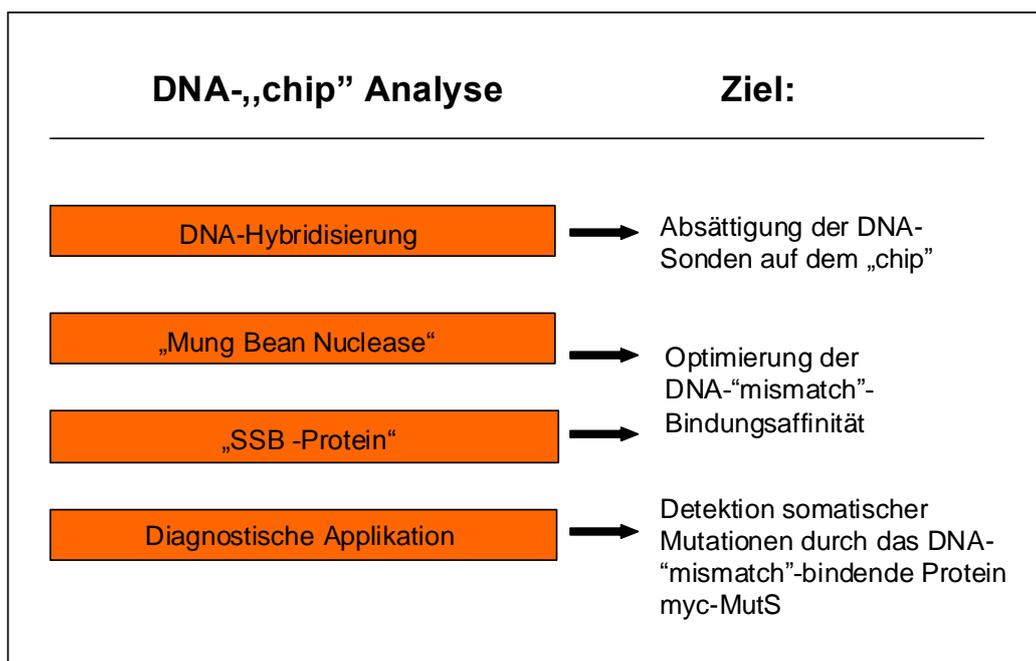


Abb. 17 Optimierungsfaktoren zur Erhöhung der Bindungsaffinität des DNA-„mismatch“-bindenden Proteins myc-MutS auf dem DNA-„chip“

Im Rahmen der DNA-„mismatch“-Detektion wurden verschiedene Faktoren wie die DNA-Oligonukleotidhybridisierung auf dem DNA-„chip“, der Zusatz einer „Mung Bean Nuclease“ und eines „single strand binding Proteins (SSB) getestet und optimiert, um die Protein-Bindungsaffinität und Diskriminierung fehlgepaarter DNA-Sequenzen zu verstärken.

5.5 Entwicklung und Optimierung eines „SNP-chip“

Für die *de novo* Detektion von Mutationen werden häufig gelelektrophoretische Verfahren sowie neuerdings DNA-„chips“ verwendet. Obwohl die Detektionsraten im Vergleich zur Sequenzierung relativ niedrig sind, werden diese Techniken aufgrund des geringeren Aufwands häufig in der molekularen Diagnostik eingesetzt. Die DNA-„chip“-Technologie verfügt zusätzlich über eine hohe Proben-Umsatzrate. Im Rückblick auf die in den Vorversuchen beschriebene DNA-„mismatch“-bindende Funktion des Proteins myc-MutS, sollte die Detektion somatischer Mutationen auf einem DNA-„chip“ auf der Basis dieses Proteins optimiert werden. „spotting“- , Hybridisierungs-, und Proteinbindungsversuche zeigten, dass die etablierten molekularbiologischen SNP-Techniken nicht den in der „chip“-Analyse benötigten chemischen und physikalischen Anforderungen entsprachen, deshalb mussten verschiedene Optimierungsstrategien entwickelt werden.

Experimentelle Strategien:

Im Rahmen der DNA-Hybridisierung wurden Parameter wie Inkubationszeiten, Temperaturen, DNA- sowie Pufferkonzentrationen und Waschlösungen getestet. Das Ziel dieser Experimente bestand darin, möglichst alle gespotteten DNA-Sonden mit einem DNA-Target zu hybridisieren (abzusättigen), um Einzelstrangsequenzen und damit „falsch-positive“ Ergebnisse durch die anschließende Detektion mit dem DNA-„mismatch“-bindenden Protein myc-MutS zu vermeiden.

Um den Effekt der DNA-Hybridisierung abzuschätzen, wurden die vier Amino-markierten DNA-Sonden auf epoxybeschichtete Glas-„slides“ gespottet, für 30 min bei 60°C an die Oberfläche gekoppelt und anschließend für unterschiedliche Zeitspannen bei RT mit Cy3-markierten DNA-„targets“ hybridisiert. Nach dem Waschen (Waschlösung I, II, III je 10 min) wurden die „slides“ getrocknet und mit einem Fluoreszenzscanner mit der für Cy3 erforderlichen Wellenlänge vermessen.

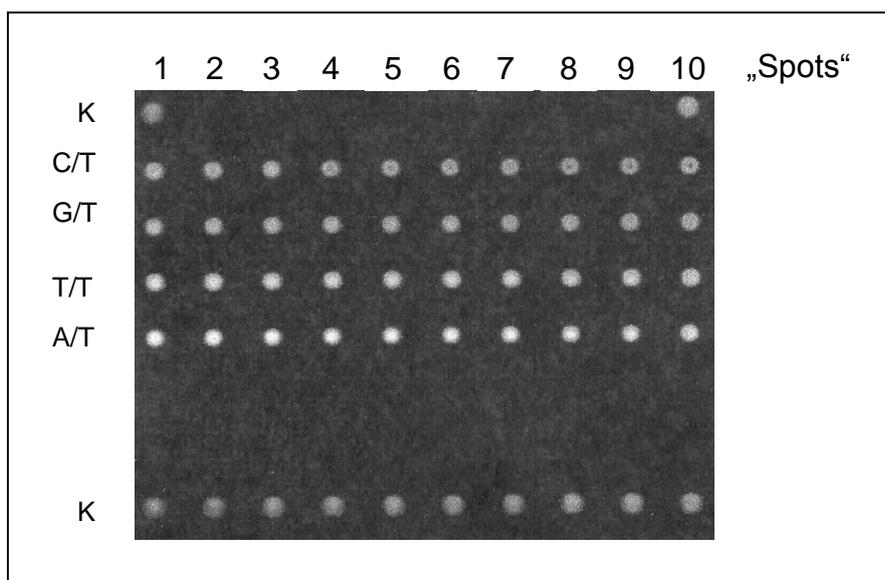


Abb. 18 Darstellung eines DNA-„Arrays“

Das DNA-„Array“ wurde mit einem „stealthpin“ auf einem „Quantifoilslide“ hergestellt. Gespottet wurden die vier DNA-Sonden A, T, G, C (je 10 μ M in „spotting“-Puffer), die anschließend mit der Targetlösung-T (5 μ M in 5X SSC/ 0,1%SDS-Hybridisierungspuffer) für 30 min bei RT hybridisiert wurden. Zu erkennen sind die DNA-Hybride A/T, T/T, G/T, C/T, die jeweils 10x aufgetragen und durch die Fluoreszenz-Kontrollen (K) begrenzt wurden

In der Abb. 18 ist das Bild eines nicht optimierten, hybridisierten DNA-„Arrays“ („chips“) dargestellt. Das „Array“ wurde durch eine Bodipy TMR-X-markierte Sonde, die als „spotting“-Kontrolle eingesetzt wurde, begrenzt. Innerhalb dieser Begrenzung

wurden vier DNA-Sonden (A, T, G, C je 10 μM) pro Reihe, in Form von 10 Spots aufgetragen, die anschließend mit einer DNA-Targetlösung (T, 5 μM) hybridisiert wurden. Die Inkubationszeit betrug 30 min bei RT. Als Hybridisierungspuffer wurde der 5X SSC-Puffer mit 0,1% SDS-Zusatz eingesetzt.

Das Ergebnis der DNA-Hybridisierung zeigt, dass der DNA-„perfect match“ (A/T) eine höhere Fluoreszenzintensität aufweist als die drei fehlgepaarten Hybride, wodurch keine einheitliche DNA-Hybridisierung resultiert. Weiterhin ist zu erkennen, dass die Spotmorphologie nicht homogen kreisrund ist. Um einheitliche und reproduzierbare Resultate zu erhalten, musste die DNA-Hybridisierung auf dem auf dem „chip“ optimiert werden.

5.5.1 Ergebnisse der optimierten DNA-Hybridisierung auf dem DNA-„chip“

Um die Fluoreszenzintensität der in dem Vorversuch beschriebenen DNA-Hybridisierung zu optimieren, und um homogene, vergleichbare Spots zu erhalten, wurden in den folgenden Experimenten die DNA-Sonden- und -Target-Konzentrationen verändert. Dabei zeigte sich: Je geringer die Konzentration der DNA-Sonden war, umso kleiner waren die Spots und umso problematischer war die Beurteilung der DNA-Hybridisierung.

Im Gegensatz zu den gelelektrophoretischen DNA-Hybridisierungsanalysen („Gelshift“ Test, Dot Blot Test), in denen die DNA-Sequenzen in einem gleichen molaren Verhältnis inkubiert wurden, zeigte sich für die DNA-Hybridisierung auf dem „chip“, dass unterschiedliche DNA-Sonden- und -Target-Konzentrationen homogene und stabile Ergebnisse erzeugten. Die Konzentration der gespotteten DNA-Sonden betrug in den meisten „chip“-Experimenten 5 μM und die Konzentration der DNA-„targets“ 1 μM .

Neben der Optimierung der DNA-Konzentration wurden außerdem eine optimale Hybridisierungstemperatur und -zeit definiert. Die Versuche zeigten, dass die Denaturierung der Sequenzen für 10 min gute Voraussetzungen für eine anschließende Hybridisierung gewährleisteten. Die experimentellen Hybridisierungszeiten variierten zwischen 30 min und 12h (ÜN) sowohl bei RT als auch bei 37°C. Die Untersuchungen bestätigten mehrfach, dass zu kurze Hybridisierungszeiten sowie eine erhöhte Temperatur (37°C) sehr heterogene

Hybride und somit Fluoreszenzintensitäten hervorbrachten. Optimal waren Hybridisierungszeiten von mind. 1h bei RT. In Anlehnung an die Puffer der Southern Blot Analyse zeigte der 5x-SSC-Puffer die geringste Diskriminierung hinsichtlich fehlgepaarter Sequenzen. Puffer-Zusätze (0,1% SDS) sowie reduzierte SSC-Konzentrationen (1x-SSC, 3x-SSC) verstärkten vermutlich die Stringenz. Aus diesem Grund ergab die zeitliche Verkürzung des Waschprotokolls nach der Hybridisierung (von 10 min auf 2 min) stabilere Ergebnisse. Mit Hilfe der Hybridisierungs-Station („HybriStation“) der Firma Perkin Elmer konnte die DNA-Hybridisierung sowie die nachfolgende Proteininkubation (myc-MutS) auf dem „chip“ automatisiert durchgeführt werden. Im Vergleich zur manuellen Durchführung ergaben sich jedoch bei der automatisierten Durchführung stärkere Fluoreszenzschwankungen, so dass keine reproduzierbaren Ergebnisse gewährleistet waren. (Daten nicht aufgeführt, da die Fluoreszenzintensitäten der automatisierten Durchführung mit den dargestellten Fluoreszenzintensitäten vergleichbar sind.) Die Auswertung der ermittelten Fluoreszenzdaten erfolgte mit dem „IconoClust“, einem Rechenprogramm, das die Rohdaten der Signalintensitäten eines jeden Spots berechnet und in Form von Balkendiagrammen darstellt.

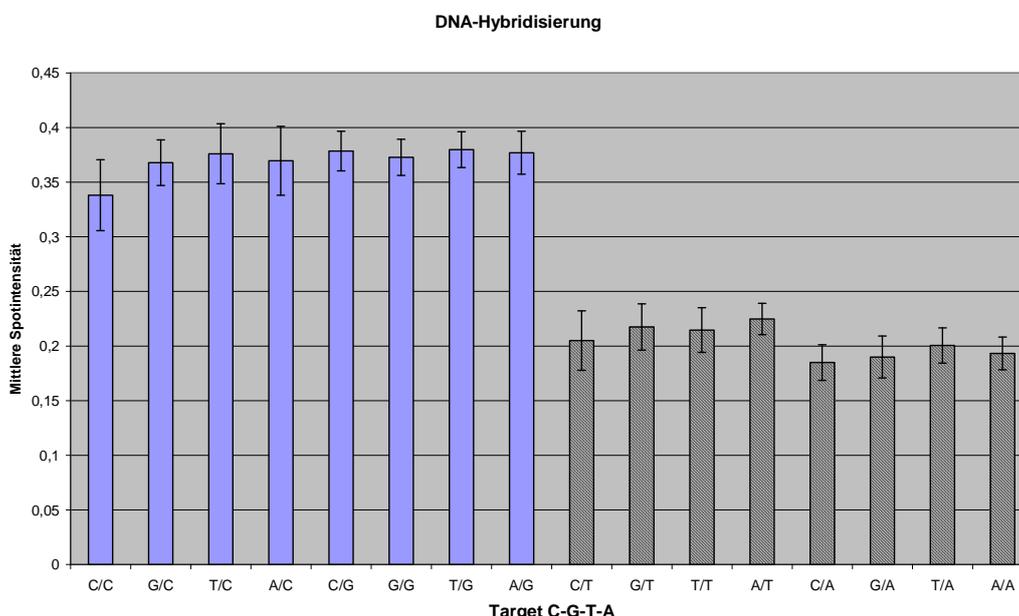


Abb. 19 Darstellung der optimierten DNA-Hybridisierung

In dem Balkendiagramm sind die Ergebnisse der optimierten DNA-Hybridisierung des „slide“ 1 (blau) und „slide“ 2 (schraffiert) mit den gespotteten Sonden (C, G, T, A) und den hybridisierten „targets“ (C, G, T, A) dargestellt. Die einstündige Hybridisierung erfolgte bei RT in 5x-Hybridisierungspuffer. Pro „slide“ sind jeweils 8 DNA-Hybride zu erkennen. Die ermittelte Fluoreszenzintensität eines DNA-Hybrids erfolgte aus der Berechnung 10 aufgetragener Spots.

Die Abb. 19 zeigt exemplarisch die optimierte manuelle DNA-Hybridisierung auf einem DNA-„chip“. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten (0,18-0,38) der 12 DNA-Hybride, die nach der Inkubation mit den „target“-Lösungen C, G, T, A (je 1 μM in 5X SSC-Puffer) auf dem DNA-„chip“ detektiert wurden. Aufgrund einer optimierten, verminderten Hybridisierungsstringenz wurden vergleichbare Fluoreszenzintensitäten zwischen Homoduplex- und Heterduplex-Sequenzen erhalten, wodurch einheitliche Voraussetzungen für die anschließenden Experimente gewährleistet waren. Die konstante Standardabweichung von ca. 20% bestätigt die Reproduzierbarkeit der DNA-Hybridisierung. Die verminderten Fluoreszenzintensitäten der DNA-Hybride auf dem „slide“ 2 (schraffiert) resultierten vermutlich aus einer verminderten Bindungseffizienz der myc-MutS-Proteine, die möglicherweise durch eine zu stringente Durchführung des Waschprotokolls hervorgerufen wurde.

5.5.2 Ergebnisse der myc-MutS Detektion an fehlgepaarte DNA-Sequenzen

Die Entwicklung des DNA-„chips“ zur Detektion somatischer Mutationen beruhte auf dem in dieser Arbeit exprimierten DNA-„mismatch“-bindenden Protein myc-MutS, mit dessen Hilfe Mutationen (SNP's) bei einem Überschuss an Wildtyp-Sequenzen identifiziert werden sollten. Die DNA-Hybridisierung wurde nach optimierter Vorschrift durchgeführt.

Die Blockierung der „slide“-Oberfläche zur Absättigung freier Bindungsstellen erfolgte mit einer Inkubationszeit von 30 min in einer 1% BSA/ AP-Lösung. Um eine optimale Bindungsaffinität des DNA-„mismatch“-bindenden Proteins myc-MutS an fehlgepaarte Sequenzen zu ermitteln, wurde das Protein schrittweise sowohl in AP als auch in einer 1%-igen BSA/ AP-Lösung verdünnt. Bei einer Proteinverdünnung von 1:100 bzw. 1:150 in 1%BSA/ AP-Lösung zeigte sich ein gering ausgeprägter „slide“-Hintergrund („Schlieren“). Weiterhin wurde im Rahmen der Optimierung die Temperaturstabilität des Proteins MutS überprüft. Das Protein myc-MutS zeigte bei RT, bei 37°C sowie bei 60°C eine vergleichbare DNA-Bindungsaffinität. Da die Ergebnisse unter RT-Bedingungen geringfügig stabiler waren, wurden alle weiteren Experimente bei RT durchgeführt. Das Problem der geringen DNA-„mismatch“-Diskriminierung zeigte keine Verbesserung.

Da die Bindung des Proteins an fehlgepaarte DNA-Sequenzen nicht sehr stabil erschien, sollten weder mechanische noch physikalisch-chemische Einflüsse die DNA/-Protein-Interaktionen beeinträchtigen. Überschüssige, ungebundene myc-MutS-Moleküle wurden deshalb unter schonenden Bedingungen (10x Eintauchen/ Abtropfen in SSC-WP) entfernt. Die experimentelle Veränderung des schonenden Waschschrilles hatte einen positiven Einfluss auf die Reproduzierbarkeit der „chip“-Experimente. Im Rahmen der Optimierung zeigte sich außerdem, dass zusätzliche Detergenzien im „annealing“-Puffer eine unerwünschte Stringenz hervorriefen. Aus diesem Grund wurde das DNA-„mismatch“-bindende Protein ohne Zusatz von Detergenzien in dem „annealing“-Puffer auf dem „chip“ inkubiert. Die Durchführung der immunologischen Detektionskaskade, d. h. die Inkubation der „slides“ mit dem monoklonalen myc-Antikörper und dem Cy3-markierten Antikörper, sowie die Konzentration beider Antikörper, erfolgten in Anlehnung an die Western Blot Analyse. Im Rahmen des o.g. optimierten Waschprotokolls wurde dieser Optimierungsschritt übernommen, um überschüssige Moleküle schonend zu entfernen.

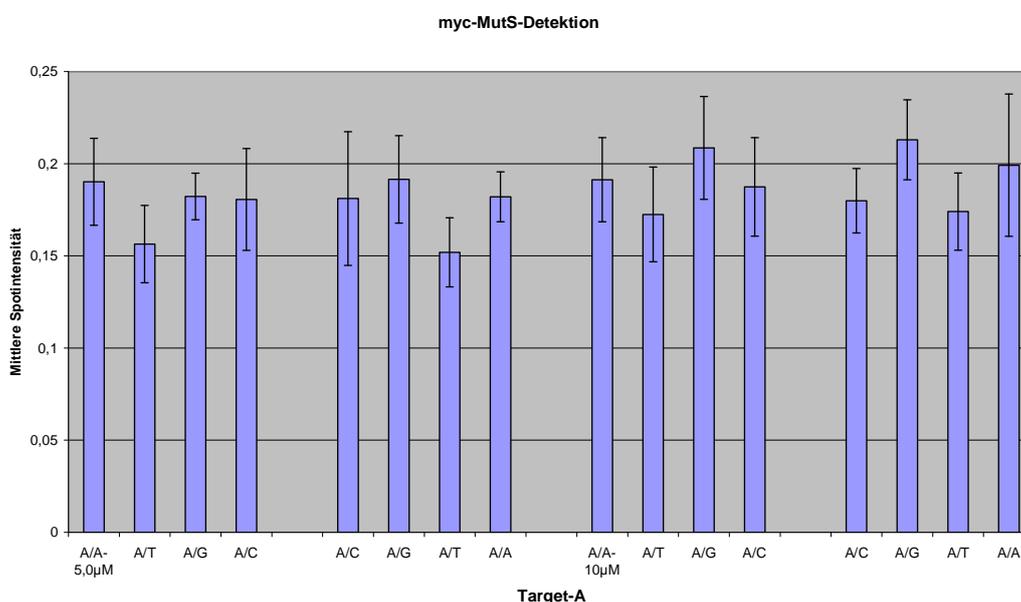


Abb. 20 DNA-„mismatch“-Detektion (A/A, A/G, A/C) auf einem DNA-„chip“

Das Balkendiagramm zeigt die mittleren Fluoreszenzintensitäten der hybridisierten DNA-Sequenzen die mit dem DNA „mismatch“-bindenden Protein myc-MutS (Verd. 1:150, 30 min, RT) inkubiert wurden. Zum Vergleich wurden die Sonden (A, T, G, C) in zwei unterschiedlichen Konzentrationen aufgetragen (5 μ M, 10 μ M). Hybridisiert wurde mit dem Target-A (1 μ M).

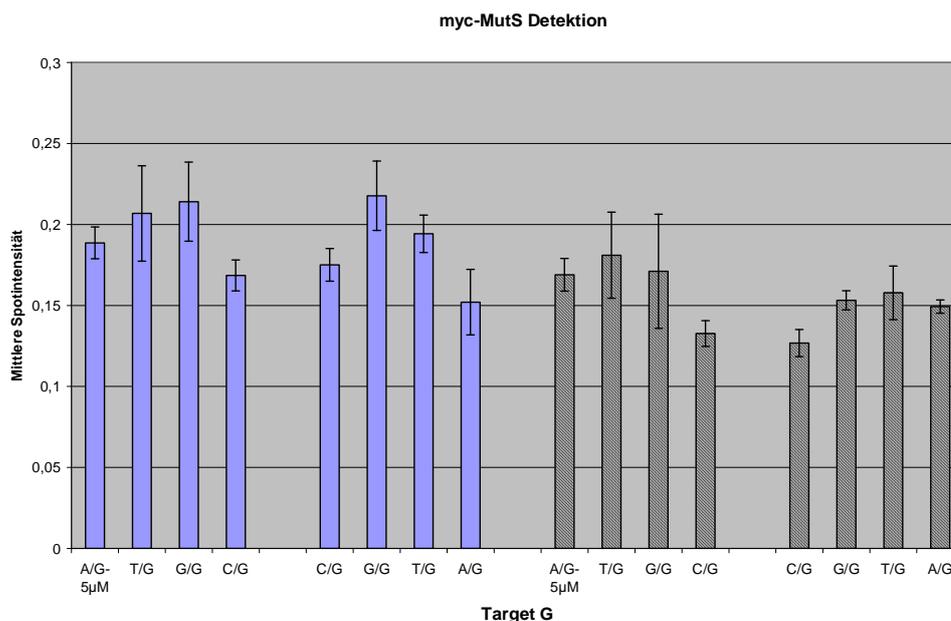


Abb. 21 DNA-„mismatch“ Detektion (A/G, T/G, G/G) auf einem DNA-„chip“

Das Balkendiagramm zeigt die mittleren Fluoreszenzintensitäten der hybridisierten DNA-Sequenzen die mit dem DNA-„mismatch“-bindenden Protein myc-MutS (Verd. 1:150, 30 min, RT) inkubiert wurden. Die DNA-Sonden (A, T, G, C) wurden in einer Konzentration von 5 µM pro Spot aufgetragen. Die Hybridisierung erfolgte mit dem „target“ G (1µM). Zum Vergleich wurden die Ergebnisse der „slides“ 1 (blau) und 2 (schraffiert) nebeneinander dargestellt.

Wie in den Abb. 20 und Abb. 21 zu erkennen ist, wurden jeweils vier unterschiedliche DNA-Sonden (A, T, G, C) in einer definierten Konzentration (5 µM und 10 µM) als „doppelter Ansatz“ auf einen epoxybeschichteten Glas-„slide“ gespottet. Die DNA-Hybridisierung erfolgte mit einer DNA-„target“-Lösung A (Abb. 20) und einer DNA-„target“-Lösung G (Abb. 21). Anschließend folgte die Inkubation auf dem DNA-„chip“ mit dem DNA-„mismatch“-bindenden Protein myc-MutS, unter Berücksichtigung der o.g. Optimierungsbedingungen. Anhand der Fluoreszenzintensitäten ist zu erkennen, dass das DNA-„mismatch“-bindende Protein myc-MutS sowohl an Homo- als auch an Heteroduplex-Sequenzen bindet. Im Hinblick auf die Homoduplex-Sequenzen (A/T, G/C) zeigt sich bei den Heteroduplex-Sequenzen (A/A, A/G, A/C, T/G, G/G) dennoch eine verminderte Fluoreszenzintensität. Dies deutet möglicherweise darauf hin, dass das Protein myc-MutS eine mässig starke Bindungsaffinität an Heteroduplex-Sequenzen besitzt. Die Ergebnisse wurden experimentell mindestens zweimal wiederholt und bestätigt (s. „slide“ 1 und „slide“ 2).

Um konzentrationsabhängige Faktoren auszuschließen, wurden wie in der Abb. 20 zu sehen ist, unterschiedliche DNA-Sonden-Konzentrationen (5 µM, 10 µM) getestet.

Bei einer Sonden-Konzentration von 10 μM zeigte sich bei den dargestellten Spots eine geringfügige Verstärkung der mittleren Fluoreszenzintensität. Die ermittelte Standardabweichung von ca. 20% deutete darauf hin, dass die Bindungsaffinität des Proteins myc-MutS durch weitere Experimente optimiert werden musste, um eine deutlichere Diskriminierung und Sensitivität hinsichtlich fehlgepaarter Sequenzen auf dem DNA-„chip“ zu erreichen.

5.5.3 Einfluss des „SSB“-Proteins auf die DNA-„mismatch“- Detektion

Eine interessante Möglichkeit zur Behebung der Spezifitätsproblematik bezüglich DNA-„mismatch“-bindender Proteine an einzelsträngige DNA-Sequenzen wurde von der Firma GenCheck Inc. beschrieben (USA). GenCheck Inc. verweist beim „IMBP96-well plates“ Test auf den Zusatz eines „SSB“-Proteins, um unspezifische Signale durch das DNA-„mismatch“-bindende Protein MutS zu verhindern.

Auf der Grundlage dieser Beschreibung wurde in einer Reihe von Experimenten der Einfluss des „single strand binding“-Proteins (SSB) auf die DNA-„mismatch“-bindende Affinität des Protein myc-MutS auf dem DNA-„chip“ getestet. Die Inkubation der hybridisierten Sequenzen mit dem „SSB“-Protein sollte die Bindung des DNA-„mismatch“-bindenden Proteins an nicht-hybridisierte (einzelsträngige) DNA-Sonden auf dem DNA-„chip“ verhindern, um „falsch-positive“ Ergebnisse zu vermeiden. In Anlehnung an die Versuchsvorschrift der Firma GenCheck Inc. wurden unterschiedliche Proteinkonzentrationen und Inkubationszeiten experimentell untersucht.

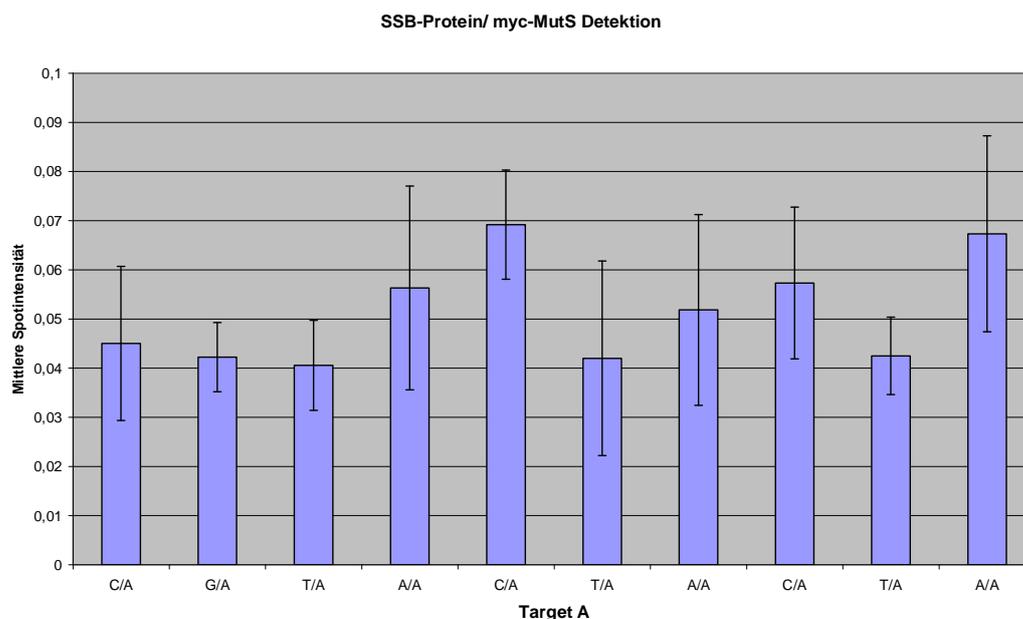


Abb. 22 DNA-„mismatch“ Detektion (C/A, G/A, A/A) nach „SSB“-Protein-Inkubation

Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten der hybridisierten DNA-Sequenzen auf einem DNA-„chip“. Die Detektion des DNA-„mismatch“-bindenden Proteins myc-MutS (Verd. 1:150, 30 min, RT) erfolgte im Anschluß an die „SSB“-Protein-Inkubation (0,1 µg, 1h, 37°C).

Wie in der Abb. 22 zu erkennen ist, wurden DNA-Sonden in der Reihenfolge C, G, T, A, C, G, T, A, T, A (5 µM) auf einen „Quantifoilslide“ gespottet und anschließend mit dem „target“ A (1 µM) hybridisiert. Im Anschluß daran wurden die DNA-Sequenzen mit dem „SSB“-Protein (0,1 µg) für 1h bei 37°C auf dem „chip“ in einem „HybriWell“ inkubiert. Das Ergebnis konnte im Hinblick auf die Abb. 22 folgendermaßen beschrieben werden: Die Fluoreszenzintensität (mittlere Spotintensität: 0,04-0,07) war aufgrund eines starken „Backgrounds“ auf dem „slide“ sehr niedrig, so dass die Auswertung bei einer Fluoreszenzverstärkung von 70 dB (max. Intensität) erfolgte. Die ermittelte Standardabweichung variierte sehr stark innerhalb der einzelnen Spots. Eine verbesserte Spezifität bezüglich der DNA-„mismatch“-bindenden Affinität des Proteins myc-MutS konnte mit Hilfe des „SSB“-Proteins nicht erreicht werden. Für vollständig komplementäre Sequenzen (A/T) konnte eine verminderte Bindungsaffinität erreicht werden.

5.5.4 Einfluss der „Mung Bean Nuclease“ auf die DNA-„mismatch“ Detektion

Im Rückblick auf die bisherigen Ergebnisse und unter Berücksichtigung der von Braun *et al.* beschriebenen unspezifischen „MutS-Einzelstrangbindungsaffinität“, wurden Versuche auf dem DNA-„chip“ durchgeführt, in denen mit Hilfe einer Endonuklease („Mung Bean Nuclease“) ungebundene, einzelsträngige DNA-Sonden verdaut werden sollten (Braun *et al.*, 2001). Das Ziel dieser Nuklease-Inkubation bestand darin, die Bindung des DNA-„mismatch“-bindenden Proteins myc-MutS an einzelsträngige DNA-Sequenzen zu verhindern.

Im Rahmen der Optimierung erfolgte die Inkubation der „Mung Bean Nuclease“ mit den hybridisierten DNA-Sequenzen in unterschiedlichen Konzentrationen und Inkubationszeiten im Anschluß an die DNA-Hybridisierung auf dem DNA-„chip“. Die Durchführung der DNA-Hybridisierung erfolgte nach Vorschrift der optimierten DNA-Hybridisierung. Die besten Ergebnisse sind in den folgenden Abb. 23 und Abb. 24 dargestellt.

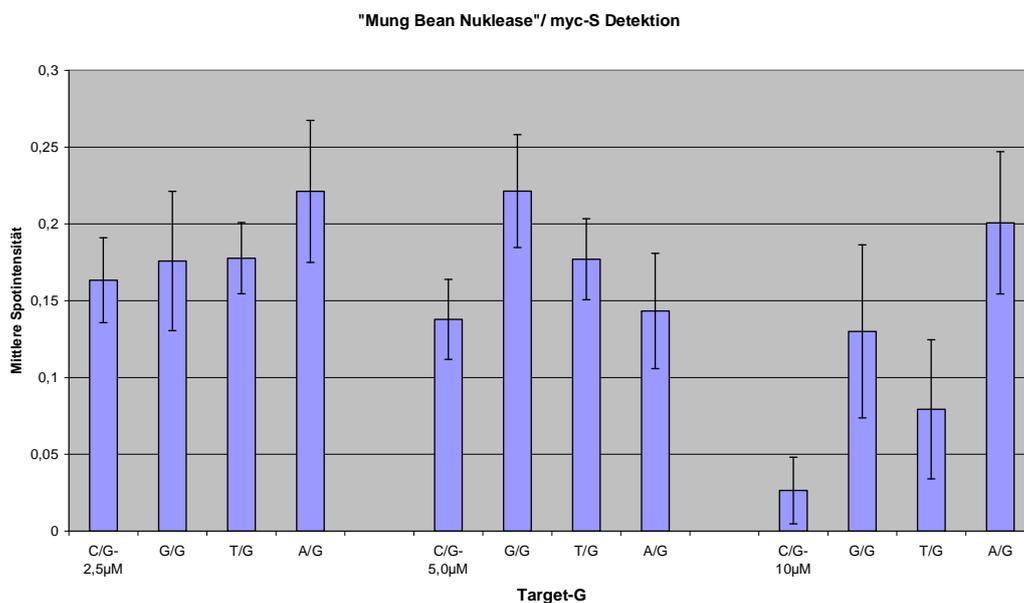


Abb. 23 DNA-„mismatch“ Detektion (C/A, G/A, A/A) nach „Mung Bean Nuclease“ Inkubation

Das Balkendiagramm stellt die mittleren Fluoreszenzintensitäten der hybridisierten DNA-Sequenzen auf einem DNA-„chip“ dar. Die Detektion des DNA-„mismatch“-bindenden Proteins myc-MutS (Verd. 1:150, 30 min, RT) erfolgte im Anschluß an die Nuklease-Reaktion (Verd. 1:10, 30 min, 37°C). Zum Vergleich wurden unterschiedliche DNA-Sonden-Konzentrationen (2,5, 5, 10 µM) aufgetragen. Hybridisiert wurde mit der „target“-Lösung T (1µM). Die Experimente wurden mehrfach wiederholt und bestätigt.

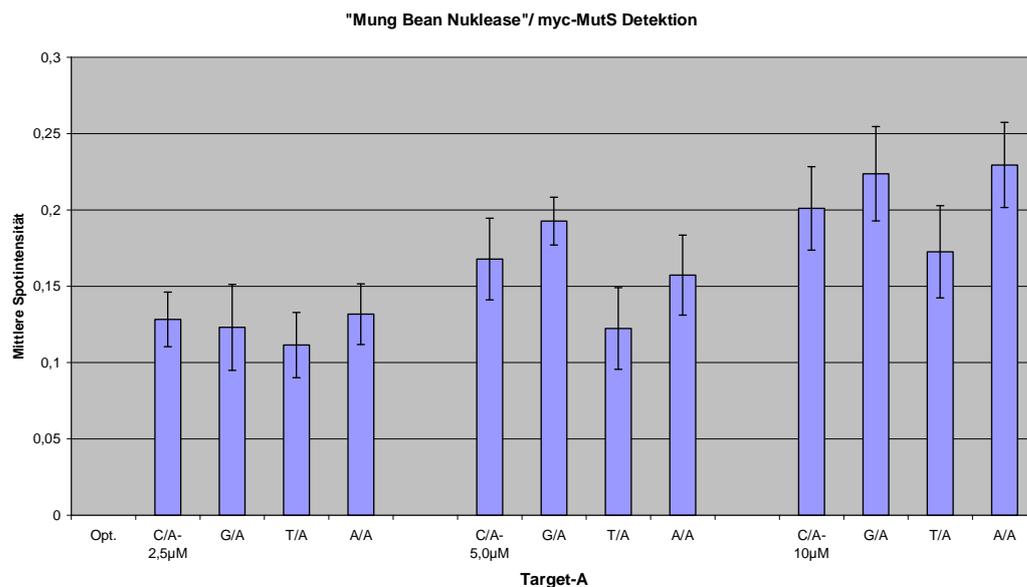


Abb. 24 DNA-„mismatch“-Detektion (C/A, G/A, A/A) nach Inkubation mit einer „Mung Bean Nuclease“

Das Balkendiagramm zeigt die mittleren Fluoreszenzintensitäten der hybridisierten DNA-Sequenzen auf einem DNA-„chip“. Die Detektion des DNA-„mismatch“-bindenden Protein myc-MutS (Verd. 1:150, 30 min, RT) erfolgte im Anschluß an die Nuklease-Reaktion (Verd. 1:10, 30 min, 37°C). Zum Vergleich wurden unterschiedliche Konzentrationen (2,5, 5, 10 µM) der DNA-Sonden (A, T, G, C) aufgetragen. Die Experimente wurden mehrfach wiederholt und bestätigt.

Zur Kontrolle der Endonukleaseaktivität und zur Ermittlung optimaler Konzentrations- und Temperaturbedingungen wurden DNA-Sonden (A, T, G, C) in unterschiedlichen Konzentrationen in einem Vorversuch auf einen DNA-„chip“ gespottet. Die aufgetragenen Sonden wurden direkt mit dem Enzym inkubiert. Dabei zeigte sich, dass die Inkubation der Endonuklease bei einer Verdünnung von 1:10 und einer Inkubationsdauer von 30 min bei 37°C zu optimalen Ergebnissen führte.

Um den Einfluss der „Mung Bean Nuclease“-Aktivität zu beurteilen, wurden DNA-Sonden (C, G, T, A) in unterschiedlichen Konzentrationen (2,5, 5, 10 µM) auf einen „slide“ gespottet und mit der „target“-Lösung-A bzw. -G (je 1 µM) hybridisiert. Nach der Hybridisierung folgte die Inkubation der hybridisierten Sequenzen mit der Endonuklease unter den o.g. Bedingungen, um einzelsträngige DNA-Sonden abzubauen. Die Inkubation des DNA-„mismatch“-bindenden Proteins myc-MutS erfolgte wie beschrieben. In den Abb. 23 und Abb. 24 kann anhand der dargestellten Balkendiagramme der Einfluss der Endonuklease auf die unspezifische Bindungsaffinität des DNA-„mismatch“-bindenden Proteins myc-MutS (Verd. 1:150, 30 min, RT) an einzelsträngige Sequenzen als sehr gering bezeichnet werden. Eine

verstärkte Diskriminierung nicht-komplementärer Sequenzen konnte nicht erreicht werden. Beim Betrachten der Ergebnisse wurden hinsichtlich der unterschiedlich gespotteten DNA-Sonden-Konzentrationen (2,5, 5, 10 μM) sehr heterogene Fluoreszenzsignale hervorgerufen. Dies trifft vor allem bei einer 10 μM Sonden-Konzentration zu (Abb. 24). Interessant ist in diesem Zusammenhang das verminderte Fluoreszenzsignal der komplementären G/C-Sequenzen. Möglicherweise wurde dieser Effekt dadurch hervorgerufen, dass die Bindungsaffinität des Proteins myc-MutS an Heteroduplex-Sequenzen, aufgrund gering vorhandener Einzelstrangsequenzen, verbessert wurde. Mehrfach wiederholte Experimente zeigten übereinstimmende Fluoreszenzdaten. Unter Berücksichtigung der ermittelten Standardabweichung (ca. 40-80%) kann insgesamt auf eine geringe Spezifität des DNA-„mismatch“-bindenden Proteins myc-MutS an fehlgepaarte Sequenzen auf dem DNA-„chip“ geschlossen werden.

5.5.5 Diagnostische Applikation des DNA-„mismatch“-bindenden Proteins myc-MutS

Der Einsatz PCR-amplifizierter *BRCA1*-Gensequenzen, mit denen die diagnostische Anwendung getestet werden sollte, zeigten im Fluoreszenzscanner aufgrund eines starken „Backgrounds“ auf dem „slide“, keine eindeutigen Fluoreszenzsignale. Die Spezifität des DNA-„mismatch“-bindenden Proteins myc-MutS konnte durch verlängerte DNA-Sequenzen (100 bp- statt 30 bp-Sequenzen) nicht verbessert werden. (Daten nicht extra aufgeführt, da die ermittelten Fluoreszenzintensitäten sehr schwach waren.)

6 Diskussion

Für klinisch-diagnostische Zwecke besteht in der Medizin und Grundlagenforschung neben der Analyse bekannter Sequenzvariationen die Notwendigkeit, krankheitsauslösende somatische Mutationen, deren Art und Position nicht bekannt sind, frühzeitig in einem Überschuss an Wildtyp-Sequenzen zu erkennen. Neben dem präventiven Vorteil der prädiktiven molekularen Diagnostik kann die Identifizierung neuer, insbesondere pathologischer Allele außerdem im Rahmen funktioneller Analysen zu einem besseren Verständnis genetischer Erkrankungen führen.

Zur Detektion von Mutationen (SNP's) wurden eine Vielzahl an methodischen Ansätzen in den letzten Jahren entwickelt. Oft basieren diese Methoden auf gelelektrophoretischen Ansätzen oder nutzen die sequenzspezifische Hybridisierung. Der hohe Zeitbedarf dieser Methoden ist insbesondere für die Analyse großer Kollektive ein essentielles Problem. Der Nachteil beruht vor allem auf der limitierten Wanderungsgeschwindigkeit der Proben bei den gelelektrophoretischen Analysen. Der Zeitaufwand für eine Analysenserie liegt im Stundenbereich. Weiterhin zeigen gelelektrophoretische Analysen eine grosse Anfälligkeit bezüglich der Stabilität und Konstanz der Analyseparameter. Aufgrund der exakten Massenbestimmung besitzt die „MALDI-TOF-MS“-basierte DNA-Analytik eine hohe Genauigkeit und Reproduzierbarkeit bei der Untersuchung heterogener DNA-Sequenzen. Pro Versuchsansatz kann jedoch nur eine Probe ermittelt werden. „Echtzeit PCR“-Ansätze erzeugen zur Ermittlung von Mutationen in genetischen Sequenzen neben dem relativ hohen Etablierungsaufwand für die einzelnen Testsysteme durch die Verwendung spezifischer „primer“, sehr hohe Kosten. Die direkte DNA-Sequenzierung, die zwar eine nahezu 100%-ige Wahrscheinlichkeit besitzt unbekannte Mutationen zu detektieren, eignet sich aufgrund der relativ hohen Kosten und den limitierten Probendurchsätze nicht für eine „screening“-Anwendung. Demgegenüber erfasst die DNA-„chip“ Analyse grosse Probenkollektive genetisch veränderter Sequenzen innerhalb kurzer Zeit, wodurch die Analysen kostengünstig und schnell durchgeführt werden können. Aus diesem Grund wurde die DNA-„chip“ Analyse als Basistechnologie zur Entwicklung eines „screening“-Tests für die

Detektion somatischer Mutationen (SNP's) mit Hilfe DNA-„mismatch“-bindender Proteine gewählt.

6.1 Modifizierte DNA-„mismatch“-bindende Proteine: myc-MutS und myc-MutM

Die Proteine MutS und MutM gehören zum prokaryotischen zellulären DNA-Reparatursystem und sind in der Lage fehlgepaarte DNA-Sequenzen in der Zelle zu erkennen und zu binden (Modrich, 1991; Su und Modrich, 1996; Lamers, 2003). Nachdem Wagner *et al.* erstmals den Nachweis genetischer Heterogenitäten in einem *in vitro* Test durch das DNA-„mismatch“-bindende Protein MutS darstellten, wurde die MutS/ DNA-Bindungsaffinität in weiteren DNA-Analyse Tests bestätigt (Joshi *et al.*, 2001; Wagner *et al.*, 1995).

Der in dieser Arbeit zur DNA-Isolierung und Proteinexpression verwendete Bakterienstamm (*Thermus thermophilus* HB8) hatte gegenüber *E. coli* einen grossen Vorteil. Der zur Gattung der „Archaeobakterien“ gehörende Stamm gilt als extrem hitze- und pH-stabil, weshalb davon ausgegangen werden konnte, dass die rekombinanten Proteine durch Temperatur- und Pufferschwankungen während der *in vitro* Versuche nicht beeinträchtigt wurden (Tachiki *et al.*, 2000). Um den Nachweis fehlgepaarter DNA-Sequenzen *in vitro* auf einem DNA-„chip“ detektieren zu können, wurden die Gensequenzen der DNA-„mismatch“-bindenden Proteine mit Hilfe molekularbiologischer Methoden so verändert, dass sie über eine angefügte Erkennungssequenz (myc-„tag“) immunologisch nachweisbar waren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb ein Expressionsvektor mit einer kurzen N-terminalen myc-Sequenz verwendet. Dadurch wurden Fusionsproteine generiert, die mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers (α-myc-Maus) identifiziert werden konnten.

Die Expressionsergebnisse zeigten nach der gelelektrophoretischen Trennung zwei Fusionsproteine: myc-MutM und myc-MutS. Unter dem Einfluss von IPTG konnte gezeigt werden, dass das Protein myc-MutS stark überexprimiert wurde. Die native Zellyse und Elution von der Calmodulin-Matrix zeigte bezüglich der myc-MutS-Aufreinigung keine Beeinträchtigung hinsichtlich der Löslichkeit. Demgegenüber konnte zwar mit Hilfe des Konstruktes pCal-myc-MutM eine gute Expressionsrate erzielt werden, allerdings ließ sich das Protein sehr schlecht unter nativen

Bedingungen isolieren. Selbst unter denaturierenden Bedingungen war die Proteinausbeute sehr gering. Die verminderte Expression und die problematische Zellyse deuteten auf die Bildung zellulärer Einschlusskörper, sog. „inclusion bodies“ hin, die häufig mit einer zu schnellen Proteinexpression zusammen hängen. Der Grund dafür liegt meistens in einer unvollständig gefalteten Proteinkonformation, die die Löslichkeit des Proteins beeinträchtigt (Qiagen 2001). Außerdem sind strukturelle Veränderungen aufgrund mechanischer Einflüsse während der Zellyse denkbar, wodurch die native Elution erschwert und die Proteinausbeute verringert wurde.

6.2 Untersuchungen zur myc-MutS/ DNA-„mismatch“- Bindungsaffinität

Mit Hilfe von DNA-Konformationsanalysen lassen sich genetische Heterogenitäten (SNP's) diagnostizieren. Der von Wagner *et al.* entwickelte Slot Blot Test, der den Nachweis heterogener DNA-Sequenzen aufgrund der DNA-„mismatch“-bindenden Affinität des Proteins MutS ermöglicht, wurde zunächst als sog. „mismatch“-Bindungstest in einem Vorversuch durchgeführt (Wagner, 1995). Ausgehend von synthetischen Oligonukleotidsequenzen mit definierten Einzelbasensubstitutionen wurden Heteroduplex-Sequenzen generiert. Diese standen nach erfolgter Hybridisierung als DNA-Substrat zur Verfügung und wurden sowohl mit dem Protein MutS der Firma GenCheck, als auch mit den in dieser Arbeit exprimierten und modifizierten Proteinen myc-MutS und myc-MutM inkubiert.

Im Gegensatz zum DNA-„mismatch“-bindenden Protein myc-MutM sind die Bindungsergebnisse an heterogene DNA-Sequenzen mit dem Protein MutS (GenCheck Inc.) und dem in dieser Arbeit exprimierten Protein myc-MutS vergleichbar. Beide Proteine zeigten im Gegensatz zu Homoduplex-Sequenzen eine stärkere DNA-„mismatch“-bindende Affinität, die mit Hilfe eines Fluoreszenzscanners detektiert werden konnte. Die in Gegenwart homologer DNA-Sequenzen (A/T, G/C) zu erkennenden Fluoreszenzsignale beruhen vermutlich auf der von Takamatsu *et al.*, sowie Su *et al.* beschriebenen DNA-Einzelstrangbindungsaffinität der prokaryotischen Proteine, die möglicherweise auf eine unvollständige Hybridisierung zurückzuführen sind (Takamatsu *et al.*, 1999; Su *et al.*, 2004). Diese Hypothese wurde außerdem durch eine mit dem Protein inkubierte „Einzelstrangsequenz“ (ss Sonde-A) auf der Membran bestätigt. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass die

unspezifische Einzelstrangaffinität des Proteins myc-MutS auf dem „chip“ nicht vernachlässigt werden konnte. Im Hinblick auf die weniger stabilen Detektionsergebnisse der myc-MutM Detektion im Slot Blot Test wurden weitere Versuche mit dem Protein myc-MutM zurückgestellt.

6.3 Detektion somatischer Mutationen auf einem DNA-„chip“

Die Detektion unbekannter Sequenzvariationen (SNP`s) auf einem DNA-„chip“ wurde kürzlich auch von Bi *et al.* und Su *et al.* beschrieben. Die Wissenschaftler entwickelten mit Hilfe eines rekombinanten DNA-„mismatch“-bindenden Proteins MutS molekularbiologische Analyseverfahren. Im Gegensatz zu den genannten „chip“-Analysen, in denen Su *et al.* das rekombinante Protein MutS auf einer „quarz-crystal-microbalance“- (QCM)-Oberfläche immobilisierten und mit hybridisierten DNA-Sequenzen inkubierten bzw. Bi *et al.* gespottete DNA-Sequenzen auf einem „chip“ mit einem THLSLM-modifizierten MutS Protein detektierten, erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die Detektion somatischer Mutationen auf der Grundlage eines modifizierten DNA-„mismatch“-bindenden Fusionsproteins myc-MutS auf einem epoxybeschichteten Glas-„slide“ (Bi *et al.*, 2003; Su *et al.* 2004).

Die Bindungsaffinität des modifizierten DNA-„mismatch“-bindenden Proteins myc-MutS wurde durch die zuvor beschriebenen Experimente bewiesen. Bei der Entwicklung zeigte sich gegenüber den bisherigen Technologien ein enormer Optimierungsbedarf. So mussten Puffer- und Waschlösungen gefunden werden, die einerseits überschüssige DNA-„targets“ nach der Hybridisierung von der „slide“-Oberfläche entfernten, andererseits fehlgepaarte Sequenzen generierten. Die in dieser Arbeit entwickelten „spotting“-Experimente wurden mit einem Nadel-Spotter „MikroGridII“ durchgeführt. In der Regel wurden pro „spotting“-Auftrag zwischen 10 und 20 „slides“ bespottet, um innerhalb der Versuchsreihen reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Da die „Arrays“ selber gespottet wurden, war die Qualität der „chips“ und die gleichbleibende Qualität der „Arrays“ besonders wichtig. Um eine sensitive und reproduzierbare DNA-Analytik auf dem „chip“ zu generieren, sollten deshalb zwei grundlegende Bedingungen erfüllt werden:

1. Absättigung aller gespotteten DNA-Sonden (Hybridisierung)
2. Spezifische DNA-„mismatch“-Detektion (Proteinbindungsaffinität)

6.3.1 Untersuchungen zur DNA-Hybridisierung

Die als geeignet identifizierten DNA-Sonden- und –Target-Konzentrationen wurden so gewählt, dass die Spotgröße und damit einhergehende Fluoreszenzstärke eine optimale und reproduzierbare Auswertung ermöglichten. Um wenig Einfluss auf die Hybridisierungsstringenz auszuüben, d. h. um auch Heteroduplex-Sequenzen (DNA-„mismatches“) zu hybridisieren und um konstante Hybridisierungsergebnisse zu erhalten, wurde der 5x-SSC-Hybridisierungspuffer ohne Zusatz von Tensiden verwendet. Dieser Puffer zeigte im Gegensatz zu allen anderen getesteten Puffern die geringste Diskriminierung fehlgepaarter Sequenzen. Dennoch konnten regelmäßig geringfügige Schwankungen bezüglich der einzelnen Fluoreszenzintensitäten nach der Hybridisierung beobachtet werden. Dafür gibt es verschiedene Erklärungsansätze. Eine Erklärung liegt möglicherweise im grundsätzlichen Auftrag („spotten“) der DNA-Sonden auf die „slides“. Paweletz beschreibt in seiner Arbeit, dass das Auftreten unterschiedlicher Fluoreszenzintensitäten u.a. auf das unregelmäßige Absetzen der Sonde durch die Nadel zurückzuführen ist (Paweletz, 2002). „spotting“-Pufferreste, die aufgrund der Oberflächenspannung an der Nadel verbleiben, verursachen morphologisch unterschiedlich große Spots. Eisen und Brown bezeichneten dieses Phänomen aufgrund einer morphologischen Ähnlichkeit als sog. „donut holes“ (Eisen und Brown, 1999). Eine weitere Fehlerquelle die anfangs bei der Durchführung der „chip“-Experimente zu unterschiedlichen Hybridisierungseffizienzen einzelner Oligonukleotdhybride führte, ist die Veränderung der Luftfeuchtigkeit beim Spotten. Eine verringerte Luftfeuchtigkeit erzeugt eine Fluktuation der gespotteten Sondenvolumen und verhinderte dadurch reproduzierbare Spots. Um diesen Einfluss zu minimieren wurde zu Beginn eines „spotting“-Auftrages eine definierte Raum-Luftfeuchtigkeit von ca. 60% vorgegeben.

Im Rahmen des Waschprotokolls soll noch kurz auf die Optimierung der einzelnen Waschlösungen und Zeiten eingegangen werden. Durch die anfangs zu lang durchgeführte SSC-Waschkaskade wurden quantitativ zu viele unspezifisch gebundene DNA-Targetmoleküle von der Oberfläche entfernt. Die stringente Durchführung verhinderte die Hybridisierung nicht-komplementärer Sequenzen, so dass einzelsträngige Sonden im Überschuss vorlagen. Die zeitliche Verkürzung des Waschprotokolls gewährleistete dagegen wesentlich stabilere und innerhalb der

DNA-Hybride vergleichbare Fluoreszenzintensitäten. Die Wahl der beschriebenen Hybridisierungstemperatur und -zeit erfolgte in Anlehnung an die in den Vorversuchen („Gelshift“ Test; Slot Blot Test) angewendeten Bedingungen. Dabei zeigte sich jedoch, dass eine Hybridisierungsdauer von 1 h bei RT homogene DNA-Hybride hervorbrachte. Im Gegensatz zu den allgemein beschriebenen 30-minütigen Hybridisierungszeiten, die in Lösung erfolgten, führt eine verlängerte DNA-Hybridisierungszeit auf dem „chip“ zu einer relativ optimalen Sonden-Absättigung.

6.3.2 Untersuchungen zur myc-MutS-Detektion an fehlgepaarte DNA-Sequenzen

Um zu untersuchen, ob die methodischen Ansätze der DNA-„mismatch“-Detektion mit dem DNA-„mismatch“-bindenden Protein myc-MutS auch auf einem epoxybeschichteten DNA-„chip“ durchzuführen sind, wurde das in dieser Arbeit exprimierte Fusionsprotein myc-MutS mit immobilisierten und hybridisierten Oligonukleotiden auf einem Glas-„slide“ inkubiert.

Im Rahmen der DNA-„chip“-Entwicklung konnten qualitativ gute Fluoreszenzspektren nach optimierter DNA-„mismatch“-Bindung an hybridisierte DNA-Sequenzen auf dem Objektträger generiert und mittels einer geeigneten Software („IconoClust“) ausgewertet werden. Die Absättigung der „slides“ mit einer 1%-igen BSA/ AP-Lösung erbrachte erstmals positive Fluoreszenzsignale. Wahrscheinlich enthielt die vergleichsweise getestete 1%-ige Milchpulverlösung zu viele störende Substanzen (Proteine), die unspezifisch mit der epoxybeschichteten Glasoberfläche reagierten, wodurch ein stark diffuser Hintergrund die einzelnen Spots verdeckte.

Die manuelle Durchführung ergab im Vergleich zur automatisierten Durchführung wesentlich reproduzierbarere Ergebnisse. Häufig ging das Auftragen des geringen Inkubationsvolumen von 50 µl pro „slide“ mit der Bildung von Luftblasen einher, so dass die Slideoberfläche nicht gleichmäßig benetzt wurde. Die Folge waren nicht reproduzierbare Fluoreszenzergebnisse, weshalb im weiteren Verlauf auf die automatisierte Durchführung mit der von Perkin Elmer konstruierten „HybriStation“ verzichtet wurde.

Die von Smith und Modrich sowie Takamatsu *et al.* für das Protein MutS beschriebene Temperaturstabilität von 37°C und 60°C, konnte auch für das

modifizierte Fusionsprotein myc-MutS bestätigt werden (Smith und Modrich, 1996; Takamatsu *et al.*, 1996). Die Daten zeigten unter dem Einfluss unterschiedlicher Inkubationstemperaturen (RT, 37°C, 60°C) eine vergleichbare DNA-Bindungsaffinität an Heteroduplex-Sequenzen. Aufgrund einer möglicherweise verbesserten Bindungsstabilität, die sich durch eine geringfügig intensivere Fluoreszenzintensität bei RT nachweisen ließ, wurden die „chip“-Experimente bei RT durchgeführt. Der Vergleich unterschiedlicher Inkubationszeiten basiert auf Ergebnissen publizierter Experimente, in denen rekombinante MutS-Proteine sowohl für 15 min als auch für 30 min mit hybridisierten DNA-Sequenzen inkubiert wurden (Wagner *et al.*, 1995; Smith und Modrich, 1996; Takamatsu *et al.*, 1996; Biswas und Hsieh, 1997; Bi *et al.*, 2003). Um die optimale Dauer der Proteininkubation zu erfassen, wurde außerdem eine einstündige Inkubationszeit getestet. Die Fluoreszenzergebnisse auf dem „chip“ zeigten die besten Ergebnisse bei einer Inkubationsdauer von 30 min bei RT. Diese Inkubationsbedingung wurden von Bi *et al.* in dem von ihnen entwickelten Protein-„chip“ bestätigt (Bi *et al.*, 2003).

Im Zusammenhang der Ermittlung einer optimalen Detektionstemperatur wurde von Takamatsu *et al.* eine interessante Beobachtung beschrieben (Takamatsu *et al.* 1996). Unter optimalen Versuchsbedingungen zeigte das rekombinante Protein MutS im „Gelshift“ Test bei einer Inkubationszeit von 30 min bei 60°C eine 8-10x stärkere G/T-„mismatch“-Diskriminierung als bei 35°C. Unabhängig von der ermittelten Temperatur wurde eine starke G/T-„mismatch“-Diskriminierung durch das Protein MutS auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt (Bi *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2001; Joshi und Rao; 2001; Tachiki *et al.*, 2000). Der Mechanismus der Bindungsdiskriminierung ist bis heute noch nicht erklärt. Bi *et al.* stellen anhand ihrer Ergebnisse die Hypothese auf, dass strukturelle Unterschiede zwischen den Basenpaarbindungen ausschlaggebend sein können. Vermutlich sind bei der G/T-Detektion drei ausgebildete Wasserstoffbrücken durch die Aminosäuren Glu 38, Asp 35 und Phe 36 für die Protein/ DNA-Detektion verantwortlich. Andere Sequenzvariationen (T/C, A/C, A/G etc.) verfügen wahrscheinlich über veränderte Interaktions-Mechanismen zwischen dem Protein MutS und der DNA (Bi *et al.*, 2003).

Die in den Arbeiten beschriebene verstärkte G/T-„mismatch“-bindende Affinität des Proteins MutS konnte im Rahmen der DNA-„chip“-Entwicklung für das Protein myc-MutS nicht regelmäßig bestätigt werden. Die meisten Fluoreszenzergebnisse deuten auf eine stärkere A/G bzw. G/A-„mismatch“-bindende Affinität des Proteins myc-MutS hin. Demgegenüber konnte der Nachweis einer spezifischen G/T-myc-MutS Affinität beim Slot Blot Test gezeigt werden. Eine Erklärung dafür besteht möglicherweise darin, dass immobilisierte myc-MutS Proteine (Slot Blot Test) im Vergleich zu nicht-immobilisierten myc-MutS Proteinen (DNA-„chip“-Analyse) stabilere DNA-Protein-Interaktionen bilden.

Dass strukturelle Proteinveränderungen für die DNA-„mismatch“-bindende Affinität des Proteins MutS verantwortlich sind, wurde in der Literatur mehrfach beschrieben (Biswas *et al.*, 2000; Tachiki *et al.*, 2000; Bjornson *et al.*, 2003; Wang 2003; Bi *et al.*, 2004). Ebenso wird grundsätzlich eine mehr oder weniger stark ausgeprägte DNA-„mismatch“-bindende Affinität in Abhängigkeit von unterschiedlichen Einflüssen (Inkubationszeit und Temperatur, Proteinkonzentration, ATP-ADP-Hydrolyse-Aktivität, DNA-Konformation und Sequenzlänge) von den genannten Arbeitsgruppen diskutiert. Im Rahmen der DNA-„mismatch“-Detektion auf dem DNA-„chip“ wurden diesbezüglich einige der o.g. Einflüsse untersucht. So konnten bei einer Proteinkonzentrationsverdünnung (Ausgangskonzentration 2,5 pmol/μl) von 1:100 bzw. 1:150 qualitativ bessere Fluoreszenzsignale beobachtet werden als bei den zu gering verdünnten Lösungen (1:20, 1:50). Zu stark verdünnte myc-MutS-Proteinlösungen (1:200) zeigten keine reproduzierbaren Ergebnisse. Die Daten lassen sich folgendermaßen erklären: In Anlehnung an die Literatur bildet das MutS-Monomer in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration Dimere, die notwendig sind, um wie eine Klammer an die DNA zu binden und an dieser entlang zu wandern (Bjornson *et al.*, 2003). Die vorhandene intrinsische ATPase-Aktivität des Proteins MutS liegt daraufhin aufgrund der Dimerisierung in asymmetrischer Form vor, wodurch die Proteine möglicherweise spezifisch fehlgepaarte Sequenzen erkennen (Acharya *et al.*, 2003, Lamers *et al.* 2003). Unter dem Einfluss von ATP wird somit die DNA-„mismatch“-bindende Affinität des Proteins verstärkt (Lamers *et al.*, 2000; Joshi *et al.*, 2002; Lamers *et al.*, 2003). Verschiedene Arbeitsgruppen haben bisher grosse Aufmerksamkeit auf die ATP-ADP-Hydrolyse-Aktivität des Proteins MutS geworfen. Dennoch konnte bislang kein Konsensus erreicht werden, in wieweit die ATP-

Bindung und Hydrolyse die Funktion des Proteins tatsächlich beeinflusst. (Lamers *et al.*, 2003 ; Selmane *et al.*, 2003). Experimentelle Untersuchungen von Selmane *et al.* widerlegten die beschriebenen Theorien und zeigten, dass ATP die MutS-Bindungsaffinität an fehlgepaarte Sequenzen reduzierte (Selamane *et al.*, 2003). Aufgrund dieser widersprüchlichen Erklärungsansätze erfolgten im Rahmen der myc-MutS-Detektion keine experimentellen Untersuchungen auf dem DNA-„chip“. Die in dieser Arbeit ermittelten Konzentrationsverdünnungen (1:100, 1:150) deuteten demnach auf eine geeignete Dimerisierung der Proteine hin, wodurch die Spezifität geringfügig verbessert werden konnte.

Die von einigen Arbeitsgruppen als mehr oder weniger problematisch beschriebene DNA-Einzelstrang-Affinität des DNA-„mismatch“-bindenden Proteins MutS erwies sich auch bei der Detektion fehlgepaarter Sequenzen durch das modifizierte Protein myc-MutS auf dem DNA-„chip“ als ein Problem (Au *et al.*, 1992; Smith und Modrich, 1996; Tachiki *et al.*, 1998; Braun *et al.*, 2001; Bi *et al.*, 2003). Im Rückblick auf die gezeigten Kontrollen bezüglich der DNA-Einzelstränge beim Slot Blot Test bestand Grund zur Annahme, dass einzelsträngige DNA-Sonden mit dem DNA-„mismatch“-bindenden Protein myc-MutS einen DNA/ Protein-Komplex bildeten und im Rahmen der immunologischen Detektion „falsch-positive“ Fluoreszenzergebnisse erzeugten. In Anlehnung an das von der Firma Gencheck empfohlene „single strand binding Protein“ („SSB“), wurden unterschiedliche Konzentrationen „SSB“-Protein zur Vermeidung einer unspezifischen DNA-„mismatch“-Detektion auf dem gespotteten „chip“ inkubiert (GenCheck Inc. 2000). Die Untersuchungen ergaben aufgrund starker Hintergrundreaktionen eine stark verminderte Fluoreszenz und folglich keine reproduzierbaren Ergebnisse. Wahrscheinlich beruht die von Tachiki *et al.* identifizierte Bindungsdomäne im MutS-Protein auf einer grundlegend vorhandenen mäßigen Homoduplex- und Einzelstrang-Affinität (Tachiki *et al.*, 1998; Braun *et al.*, 2001). Um die Problematik der Einzelstränge zu lösen, entstand die Idee, immobilisierte einzelsträngige DNA-Sonden auf dem „chip“ enzymatisch mit einer Endonuklease („Mung Bean Nuclease“) zu verdauen. Dadurch sollten unspezifische Proteinbindungen an einzelsträngige DNA-Sequenzen vermieden werden. Die Fluoreszenzergebnisse deuteten besonders bei 10 μ M gespotteter Sonden-Konzentration auf eine stärkere Diskriminierung fehlgepaarter Sequenzen hin, wodurch zumindest bestätigt werden konnte, dass das Protein myc-MutS genauso

wie natives MutS über eine unspezifische DNA-Einzelstrang-Bindungsdomäne verfügt.

Um die vermutlich vorhandene unspezifische Bindungsaffinität des DNA-„mismatch“ bindenden Proteins myc-MutS auf dem DNA-„chip“ zu verringern, wurde in einem weiteren Optimierungsschritt die in der Literatur kontrovers diskutierte DNA-Sequenzlänge berücksichtigt, die möglicherweise einen Einfluss auf die Diskriminierung fehlgepaarter Sequenzen zeigen könnte (Braun *et al.*, 2001; Bi *et al.*, 2003). Bi *et al.* zeigten, dass das Protein MutS in Gegenwart kürzerer DNA-Sequenzen (130 bp statt 612 bp) eine stärkere Diskriminierung bezüglich fehlgepaarter Sequenzen aufwies (Bi *et al.*, 2003). Für den direkten Vergleich sollte im Rahmen dieser Arbeit die Bindung des Proteins myc-MutS an 30 bp-Sequenzen und 100 bp Sequenzen verglichen werden. Da 100 bp-DNA-Sequenzen am besten durch die PCR generiert werden können, lag es nahe, diese Untersuchung in Form einer diagnostischen Applikation mit humanem DNA-Probenmaterial von Brustkrebs-Patientinnen durchzuführen.

6.3.3 Untersuchungen zur diagnostischen Applikation

Brustkrebs gehört zu den häufigsten Krebserkrankungen der Frauen. Die Detektion von *de novo* Mutationen im *BRCA1* und *BRCA2*-Gen spielt deshalb eine wichtige Rolle insbesondere für die Prävention durch Früherkennung. Bei familiär bedingtem Brustkrebs finden sich zahlreiche Mutationen im *BRCA1*-Gen (Chromosom 17q21). In der molekularen Diagnostik wurden Mutationen im *BRCA1*-Gen bisher über DNA-Sequenzierung, „SSCP“ sowie „DDGE“ nachgewiesen. Durch die Entwicklung eines DNA-„mismatch“-basierten Detektions-„chips“ zur Früherkennung von vorhandenen somatischen Mutationen würde der molekularen Diagnostik zukünftig eine sichere, schnelle und kostengünstige Analytik zur Verfügung stehen.

Die Detektion fehlgepaarter PCR-Amplifikate (100 bp) konnte jedoch aufgrund starker Hintergrundreaktionen und einer damit einhergehenden schwachen Fluoreszenzintensität auf dem DNA-„chip“ nicht reproduzierbar ausgewertet werden. Möglicherweise hängt das hohe Hintergrund-Rauschsignal von einer zu hohen Dichte gespotteter PCR-Sequenzen ab, an die das Protein myc-MutS nicht spezifisch binden konnte. Zusammenfassend zeigte sich bei den exemplarisch untersuchten fehlgepaarten DNA-Sequenzen keine reproduzierbare DNA-Analyse.

Trotz der versuchsweise optimierten Detektionsbedingungen konnte insgesamt nur eine geringfügige Diskriminierung nicht-komplementärer Sequenzen auf dem „chip“ erzielt werden.

6.4 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Mutations-Detektion mittels der DNA-„mismatch“-bindenden Proteine myc-MutS und myc-MutM auf dem gewählten Chipformat vielfältige Probleme aufwirft. Trotz vielfältiger Optimierungsversuche blieb die Spezifität weitgehend unbefriedigend.

Im Hinblick auf die von Bi *et al.* veröffentlichten Daten bezüglich einer verstärkten DNA-„mismatch“-bindenden Affinität des Proteins MutS in Gegenwart von G/T-reichen Sequenzen scheint der Sequenzkontext innerhalb einer Sequenz wichtig zu sein (Bi *et al.*, 2003). Diese Aussage wurde auch von Joshi und Rao bestätigt (Joshi und Rao, 2001). Smith und Modrich zeigten außerdem, dass die Anzahl der Mutationen innerhalb einer Sequenz ebenfalls die Affinität verstärkten (Smith und Modrich, 1996). Experimente, in denen gehäuft G/T-Sequenzen bzw. die Anzahl der Mutationen erhöht waren, wurden bisher nicht durchgeführt, könnten jedoch im Rahmen einer weiteren Proteincharakterisierung für den DNA-Test von Vorteil sein. Weiterhin könnten Experimente hinsichtlich der myc-MutS ATPase-Aktivität auf dem DNA-„chip“ durchgeführt werden. Möglicherweise könnte die DNA/ Protein-Interaktion durch die Zugabe von ATP stabilisiert und die DNA-„mismatch“-Diskriminierung positiv verstärkt werden.

Im Rahmen der diagnostischen Applikation könnten ebenfalls weitere Optimierungsansätze durchgeführt werden. So könnte geklärt werden, ob die Sequenzlänge bzw. die gespottete Dichte der PCR-Amplifikate einen Einfluss auf die DNA-„mismatch“-bindende Detektion ausübt. Modifizierte DNA-Sonden mit „spacer“-Molekülen könnten möglicherweise sterische Bindungseffekte verhindern, um eine spezifische Bindung zu fördern. Die Sondenmoleküle wären dadurch leichter zugänglich, so dass die Hybridisierung effektiver stattfinden könnte (Southern *et al.*, 1999; Beaucage, 2001). Dadurch würde sich möglicherweise auch die einzelsträngige Bindungsaffinität des Proteins myc-MutS unterbinden lassen und eine stärkere Diskriminierung fehlgepaarter Sequenzen zeigen.

7 Zusammenfassung

Im Hinblick auf die in der Bevölkerung vorkommenden hereditären und somatischen Mutationen richtet sich der Blickpunkt der molekular-diagnostischen Applikationen immer stärker auf die Entwicklung innovativer genetischer Analysverfahren, mit denen sicher, kostengünstig und im hohen Durchsatz *de novo* Mutationen bei einem Überschuss an „Wildtyp“-Sequenzen detektiert werden können. Neben der DNA-Sequenzierung sind derzeit hauptsächlich gelelektrophoretische und chromatographische DNA-Analysverfahren im Einsatz. Diese Methoden sind jedoch für einen Massendurchsatz nicht geeignet, da sie z.T. Spezifitätsprobleme aufweisen. Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit ein DNA-„chip“ zur Detektion somatischer Mutationen auf der Grundlage eines modifizierten DNA-„mismatch“-bindenden Proteins entwickelt werden.

Ausgehend von einem in dieser Arbeit modifizierten rekombinanten DNA-„mismatch“-bindenden Protein myc-MutS wurden unterschiedliche Sequenzvariationen mit definierten Punktmutationen auf einem DNA-„chip“ nachgewiesen. Mit Hilfe molekularbiologischer Techniken wurde die aus *Thermus thermophilus* isolierte DNA aufgereinigt, das Gen MutS amplifiziert und im Rahmen einer Klonierungsstrategie mit einer myc-„tag“ modifiziert. Der Nachweis hybridisierter fehlgepaarter DNA-Sequenzen auf dem DNA-„chip“ erfolgte durch die Bindung des Proteins myc-MutS. Im Rahmen einer immunologischen Detektionskaskade, die auf einem primären monoklonalen myc- und sekundären Cy3-Antikörper beruht, ließen sich unterschiedliche Protein-Bindungseffizienzen im Fluoreszenzscanner nachweisen.

Die durchgeführten genetischen Analysen zeigten, dass das modifizierte myc-MutS-Protein nach der Inkubation auf dem DNA-„chip“ sowohl über eine spezifisch Basenfahlpaarungen erkennende DNA-Bindungsaffinität als auch über eine unspezifische homologe DNA-Bindungsaffinität verfügt. Die spezifische Mutationserkennung wurde insbesondere durch die relativ hohe Affinität des myc-MutS für einzelsträngige DNA behindert. Obwohl durch verschiedene Optimierungsmaßnahmen eine Verbesserung des Signal-Rauschverhältnisses erreicht werden konnte, wurde eine sichere und schnelle DNA-Analyse auf der Grundlage des gewählten DNA-„chip“-Formats nicht in zufriedenstellender Weise erreicht. Als Fazit aus den durchgeführten Experimenten ergibt sich deshalb, dass

die gewählte Strategie mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht dazu geeignet ist, ein zuverlässiges und kostengünstiges „screening“-Verfahren für die Detektion somatischer Mutationen zu ermöglichen.

8 Literaturverzeichnis

A

Acharya S., Foster P.L., Brooks P., Fishel R. (2003): The coordinated functions of the *E. coli* MutS and MutL proteins in mismatch repair. *Molecular Cell* **12**:233-246

Allen D.J., Makhov A., Grilley M., Taylor J., Thresher R., Modrich P., Griffith J.D. (1997): MutS mediates heteroduplex loop formation by a translocation mechanism. *EMBO J* **16**: 4467-4476

Altschul S.F., Malder T.M., Alejandro A., Schaffer J., Zhang J., Zhang W., Miller D.J., Lippmann D. (1997): Gapped blast and PSI blast: a new search generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Res.* **25**: 3389-3402

Arends J.W. (2000): Molecular interactions in the Vogelstein model of colorectal carcinom. *J Pathol.* **190**(4): 412-416

Aruello J.R., Little A.M., Pay A.L., Gallardo D., Rojas I., Marsh S.G., Goldman J.M., Madrigal J.A. (1998): Mutation detection and typing of polymorphic loci through double-strand conformation analysis. *Nat Genet* **18**: 192-194

B

Baird P.A. (2000): Genetic technologies and achieving health for populations. *International Journal of Health Sciences* **30**: 407-424

Bartam C.R. (1999): Prädiktive Krebsdiagnostik. *Deutsches Ärzteblatt* **96** (18) 1208

Beaucage S.L. (2001): Strategies in the preparation of DNA oligonucleotide arrays for diagnostic applications. *Curr Med Chem* **8**: 1213-1244

Bi L.J., Zhou Y.F., Zhang X.E., Deng J.Y., Zhang Z.P., Xie B., Zhang C.G. (2003): A MutS-based protein chip for detection of DNA mutations. *Anal. Chem.* **75**: 4113-4119

Birnboim H.C., Doly J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recominant plasmid DNA. *Nucleic. Acid. Res.* **7**: 1513-1523

Bishop J.M., Weinberg R.A. (1996): *Molecular Oncology*. New York, Scientific American, Inc

Biswas I., Hsieh P. (1996): Identification and characterization of a thermostabile MutS homolog from *Thermus aquaticus*. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc* **271**(9): 5040-5048

Biswas I., Hsieh P. (1997): Interaction of MutS protein with the major and minor grooves of a heteroduplex DNA. *The Journal of Biological Chemistry* **272**(20): 13355-13364

Bjornson K.P., Allen D.J., Modrich P. (2000): Modulation of MutS ATP hydrolysis by DNA cofactors. *Biochemistry* **39**: 3176-3183

Bjornson K.P., Blackwell L.J., Sage H., Baitinger C., Allen D., Modrich P. (2000): Assembly and molecular

activities of the MutS tetramer. *J. Biol. Chem.* **278**(36): 34667-34673

Borresen A.L., Hovig E., Brogger A. (1998): Detection of base mutations in genomic DNA using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) followed by transfer and hybridization with genespecific probes. *Mutat Res* **202**: 77-83

Brandt B., Beckmann A., Gebhardt F., Roetger A., Merschjann A., Dittmar, Nicolai G., Zaenker K.S. (1999): Targets for secondary and tertiary chemoprevention: the EGFR/c-erbB-2-motogenic phenotype of breast and oral cancer. *Cancer Lett.* **143**, S. 28

Brown J., Brown T., Fox K.R. (2001): Affinity of mismatch-binding protein MutS for heteroduplexes containing different mismatches. *Biochem* **354**: 627-633

Brown P.O., Botstein D. (1999): Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nature Genetics Supplement* **21**: 33-37

Brown T.A. (1999): Genomes. Wiley-Liss BIOS Scientific Publishers LTD, New York

C

Casey G., Lo-Hsueh M., Vogelstein B., Standbridge E.J. (1991): Growth suppression of human breast cancer cells by the introduction of a wild type p53 gene. *Oncogene* **6**(10): 1791-1797

Cohen G.B., Ren G., Baltimore G. (1995): Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell* **80**, 237-248

Collins F.S. (1999): Shattuck Lecture-Medical and societal consequences of the human genome project. *New Engl. J Med* **341**: 28-37

Collins N, McManus R, Wooster R, *et al* (1995): Consistent loss of the wild type allele in breast cancers from a family linked to the BRCA2 gene on chromosome 13q12-13. *Oncogene* **10**(8): 1673-1675

Couch FJ, Hartmann LC (1998): BRCA1 testing: advances and retreats. *Journal of the American Medical Association* **279**(12): 955-957

Culver JB, Hutchinson F, Hull J, Levy-Lahad E, Zedek S, Daly M, Burke W (2000): *BRCA1* and *BRCA2* hereditary breast/ovarian cancer. *Gene Clinics* 1-27

D

Dang C.V. (1989): Oncogenes and proto-oncogenes: general concepts. *Cancer Treat Res.* **47**: 1-24

DiFiore P.P. Pierce J.H., Kraus M.H., Segatto O., King C.R., Aaronson S.A. (1987): ErbB2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science* **237**: 178-182

Dittmar T., Husemann A., Schewe Y., Nofer J.R., Niggemann B., Zänker K.S., Brandt BH (2002): Induction of cancer cell migration by epidermal growth factor is initiated by specific phosphorylation of tyrosine 1248 of c-erbB-2 receptor via EGFR. *FASEB J.* **16**:1823-1825

Downward J. (1998): Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**: 262-267

Duggan D.J., Bittner M., Chen Y., Meltzer P., Trent J.M. (1999): Expression profiling using cDNA microarrays. *Nature genetics suppl.* **21**: 10-14

E

Eisen M.B., Brown P.O. (1999): DNA arrays for analysis of gene expression. *Methods Enzymology* **303**: 179-205

F

Fearon E.R. (1997): Human cancer syndromes: clues to the origin nature of cancer. *Science* **278**: 1043-1050

Fearon E.R., Vogelstein B. (1990): A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**: 759-767

Feuerstein G., Kollek R. (2000): Risikofaktor Prädiktion. Unsicherheitsdimensionen diagnostischer Humanexperimente. *Jahrbuch für Wissenschaft und Ethik* **5**: 91-115

Ford D., Easton D.F., Bishop D.T., Narod S.A., Goldgar D.E. *et al.* (1994): Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. *Lancet* **343**: 692-695

Ford D., Easton D.F., Stratton M., Narod S., Goldgar D. *et al.* (1998): Genetic heterogeneity and penetrance of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. *Am J Hum Genet* **62**: 676-689

G

Galio L., Bouquet C., Brooks P. (1999): ATP hydrolysis-dependent formation of a dynamic ternary nucleoprotein complex with MutS and MutL. *Nucleic Acids Res.* **27**: 2325-2331

Gerry N.P., Witowski N.E., Day J., Hammer R.P., Barany G., Barany F. (1999): Universal DNA microarray method for multiplex detection of low abundance point mutations. *J Mol Biol* **292**: 251-262

Giancotti F.G., Ruoslahti E. (1999): Integrin signalling. *Science* **285**: 1028-1032

Glavac D., Dean M. (1995): Applications of heteroduplex analysis for mutations detection in disease genes. *Hum Mutat* **6**: 281-287

Gotoh M., Hasegawa Y., Shinohara Y., Shimizu M., Tosu M. (1995): A new approach to determine the effect of mismatches on kinetic parameters in DNA hybridization using an optical biosensor. *DNA Res* **2**: 285-293

Grandori C., Eisenman R.N. (1997): Myc target genes. *Trends Biochem Sci.* **22**: 177

H

Hahn W.C., Counter C.M., Lundberg A.S., Beijersbergen R.L., Brooks M.W., Weinberg R.A. (1999): *Nature* **400**: 464-468

Hall A., Marshall C.J., Spurr, N.K., Weiss R.A. (1983): Identification of transforming gene in two human sarcoma cell lines as a new member of the ras gene family located on chromosome 1. *Nature* **303**: 396-400

Hames B.D., Higgins S.J. (1988): Nucleic acid hybridisation – a practical approach. *Oxford, England: IRL Press*, S.3-6

- Hanahan D., Weinberg R.A. (2000): The hallmarks of Cancer. *Cell* **7**; 100(1): 57-70
- Harfe B.D., Jinks-Robertson S. (1999): Mismatch repair proteins and mitotic stability. *Mutation Research* **451**: 151-167
- Harris C.C. (1996): *P53* tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic: an abridged historical perspective. *Carcinogenesis* **17**: 1187-1198
- Hatch A., Sano T., Misasi J., Smith C.L. (1999): Rolling circle amplification of DNA immobilized on solid surfaces and its application to multiplex mutation detection. *Genet Anal* **15**: 25-40
- Henco K., Harders J., Wiese U., Riesner D (1994): Temperatur gradient gel elektrophoresis (TGGE) for detection of polymorphic DNA and RNA. *Methods Mol Biol* **31**: 211-228
- Herning T., Tamiya E., Karube I (1991): Specific liquid DNA hybridization kinetics measures by fluorescence polarization. *Anal Chem Acta* **244**: 207-213
- Holzman N.A., Marteau T.M. (2000): Will genetics revolutionize medicine? *New Engl J Med* **343**: 141-144
- Holzmann N.A. (2001): Putting the search for genes in perspective. *International Journal of Health Services* **31**: 445-461
- Hoover R.N (2000): Cancer - nature, nurture or both. *N. Engl .J Med* **343**: 135-136
- Humeny A., Bonk T., Berkhoz A., Wildt L., Becker C.M. (2001): Genotyping of thrombotic risk factors by MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Biochem* **34**: 531-536
- Hunter T. (1997): Oncoprotein network. *Cell* **7**, **88**(3): 333-346
- I**
- J**
- Jackson A.L., Loeb L.A. (1998): The mutation rate and cancer. *Genetics*. **148**(4): 1483-1490
- Jenkins S., Gibson N. (2002): High throughput SNP genotyping. *Comp Funct Genom* **3**: 57-66
- Jiricny J., Su S.S., Wood S.G., Modrich P. (1988): Mismatch-containing oligonucleotide duplexes bound by the *E. coli* MutS-encoded protein. *Nucleic Acids Res.* **16**: 7843-7854
- Jiricny J. (1998): Eukaryotic mismatch repair: an update. *DNA Repair* **409**: 107-121
- Jones M., Wagner R., Radman M. (1987): Repair of mismatch is influenced by the base composition of the surrounding nucleotide sequence. *Genetics* **115**: 605-610
- Joshi A., Rao B.J. (2001): MutS recognition: Multiple mismatches and sequence context effects. *J Biosci.* **26**(5): 595-606
- Joshi A., Rao B.J. (2002): ATP hydrolysis induces expansion of MutS contacts on heteroduplex: A case for MutS treadmill? *Biochemistry* **41**: 3654-3666

Joshi A., Sen S., Rao B.J. (2000): ATP-hydrolysis-dependent conformational switch modulates the stability of MutS-mismatch complexes. *Nucleic Acids Research* **28**(4): 853-861

K

Karas M., Hillenkamp F. (1988): Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10.000 daltons. *Anal Chem* **60**: 2299-2301

Kelsey J.L., Horn-Ross P.L. (1993): Breast cancer: magnitude of the problem and descriptive epidemiology. (1993) *Epidemiol-Rev* **15**: 7-16

Khrapko K.R., Lysov Y., Khorlin A.A., Ivanov I.B., Yershov G.M., Vasilenko S.K., Florentiev V.L., Mirzabekov A.D. (1991): A method of DNA sequencing by hybridization with oligonucleotide matrix. *DNA Sequence J DNA Sequencing Mapping* **1**: 375-388

Kinzler K.W., Vogelstein B. (1996): Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*. **18**; 87 (2):159-70

Kinzler K.W., Vogelstein B. (1997): Cancer susceptibility genes. Gatekeepers and cartakers. *Nature*. **24**;386 (6627):761-763

Kirk B.W., Feinsod M., Favis R., Kliman R.M., Barany F (2002): *Nucleic Acids Res.* **30**: 3295-3311

Knudson A.G. (1985): Hereditäre cancer: oncogenes and anti-oncogenes. *Cancer Res.* **45**(4): 1437-43

Kolb H.J. und Reilly J.T. (1999): Roche Lexikon Medizin. *Urban & Fischer Verlag, München, 4.Auflage*

Kyshe L., Anderson J. (1984): Elektroblotting of multiple gels. A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from acrylamid to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **10**: 203-209

L

Ladner P.D., Leamon J.H., Haman S., Gemma T., Strugnelli T., Dillon D., Lizardi P., Costa J. (2001): Multiplex detection of hotspot mutations by rolling circle-enabled universal Microarrays. *Laboratory Investigation* **81**: 1079-1086

Laemmli U. (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685

Lamers M.H., Perrakis A., Enzlin J.H., Winterwerp H.H.K., de Wind N., Sixma T.K. (2000): The crystal structure of DNA mismatch repair protein MutS binding to a G:T mismatch. *Nature* **408**: 711-717

Lamers M.H., Winterwerp H.H.K., Sixma T.K. (2003): The alternating ATPase domains of MutS control DNA mismatch repair. *The EMBO Journal* **22**(3): 746-756

Levine A.J. (1997): P53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **7**, **88**(3): 323-331

Lewin B. (1998): Molekularbiologie der Gene. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, S. 132

Lichtenstein P., Holm NV., Verkasalo P.K., Iliadou A., Kaprio J., Koskenvuo M., Pukkala E., Skytthe A., Hemminiki K. (2000): Environmental and heritable factors in the causation of cancer –

analysis of cohorts of twins from Sweden, Denmark and Finland. *N Engl J Med* **343**: 78-85

Lishanski A., Ostrander E.A., Rine J. (1994): Mutation detection by mismatch binding protein MutS, in amplified DNA: Application to the cystic fibrose gene. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **91**: 2674-2678

Loeb L.A. (1991): Mutator phenotype may be required for multistep carcinogenesis. *Cancer Res.* **51**: 3073-3079

Loeb L.A. (1998): Cancer cells exhibit a mutator phenotype. *Adv Cancer Res* **72**: 25

M

Maxam A.M., Gilbert W. (1977): A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**:560-564

Medema R.H., Bos J.L. (1993): The role of p21-ras in receptor tyrosine kinase signalling. *Crit. Rev. Oncog.* **4**: 615-661

Mikawa T., Kato R., Sugahara M, Kuramitsu S. (1998): Thermostable repair enzyme for oxidative DNA damage from extremley thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus* HB8. *Nucleic Acids Research* **26**(4): 903-910

Miki Y., Swenson J., Shattuck-Eidens D., Futreal P.A., Harshman K., Tavtigian S., Liu Q. *et.al.* (1994): A strong candidate for breast cancer and ovarian cancer suseptibility gene BRCA1. *Science* **266**:66-71

Mitchelson K.R. (2001): The application of capillary elektrophoresis

for DNA polymorphism analysis. *Methods Mol Biol* **163**: 3-26

Modrich P. (1991): Mechanisms and biological effects of mismatch repair. *Annu Rev Genet* **25**: 229

Modrich P. (1997): Strand-specific mismatch repair in mammalian cells. *J Biol Chem* **272**: 24727

Mullis K.B., Faloona F. (1987): Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase chain reaction. *Methods. Enzymol.* **55**: 335-350

Murray J.C., Buetow K.H., Weber J.L. *et al.* (1994): A comprehensive human linkage map with centimorgan density. *Science* **265**: 2049-2054

N

Nakahara T., Zhang Q.M., Hashiguchi K., Yonei S. (2000): Identification of proteins of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* that specifically bind to C/C mismatches in DNA. *Nucleic Acids Research* **28**(13): 2551-2556

Nestle-Krämling C., Böttcher B., Holinski-Feder E., Meindl A., Untch M., Vodermaier A. (2001): Hereditäres Mammakarzinom. *Manual Mammkarzinom S.* 44-51

Nollau P., Fischer C., Tschentscher P., Wagner C. (1999): Enrichment of mutant alleles by chromatographic removal of wild type alleles: a new principle for detection of alleles with unknown point mutations at excess of wild type alleles. *Clin Chem Lab Med* **37**(9): 877-881

Nollau P., Moser C., Weinland G., Wagner C. (1999): Detection of k-ras mutations in stools of patients with colorectal cancer by mutant-enriched PCR. *Int J Cancer* **66**: 332

Novell P.C. (1976): The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* **194**: 23-28

O

Olumi A.F., Grossfeld G.D., Hayward S.W., Carroll P.R., Tlsty T.D., Cunha G.R. (1999): Carcinoma associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res.* **59**: 5002-5011

Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K., Sekiya T. (1989): Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 2766-2770

P

Parker B.O., Marinus M.G. (1992): Repair of DNA heteroduplexes containing small heterologous sequences in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 1730-1734

Pastinen T., Kurg A., Metspalu A., Peltonen L., Syvänen C. (1997): Minisequencing: A specific tool for DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide arrays. *Genome Research* **7** (6): 606-614

Paweletz J. (2002): Optimierung der Herstellung von DNA-„Mikroarrays“ mittels Nadel-Spotter-Technologie. Diplomarbeit an der Fachhochschule Münster „University of Applied Sciences/ Ogham Diagnostics GmbH

Peltomäki P., Aaltonen L.A., *et al.* (1993): Genetic mapping of locus predisposing to human colorectal cancer. *Science* **260**: 810-812

Perera F.P. (1997): Environment and cancer. Who are susceptible? *Science* **278**: 1068-1073

Perera F.P., Weinstein I.B. (2000) : Molecular epidemiology: recent advances and future directions. *Carcinogenesis* **21**: 517-524

Pourzand C., Cerutti P. (1993): Genotyp mutation analysis by RFLP/PCR. *Mutat Res* **288**: 113-121

Q

R

Rahman N., Stratton M.R. (1998): The genetics of breast cancer susceptibility. *Annu Rev Genet* **32**: 95-121

Reit T.M., Fry M., Loeb L.A. (1991): Endogenous mutations and cancer. *Princess Takamatsu Smp.* **22**: 221-229

Religio A., Schwager C., Richter A., Ansorge W., Valcarcel J. (2002): Optimization of oligonucleotide-based DNA microarrays. *Nucl. Acids Res.* **30**: 55

S

Sachidanandam R., Weissman D., Schmitz S.C., Kakol J.M., Stein L.D., Marth G., Sherry S., Mullikin J.C., Mortimore B.J., Willey D.L. *et al.* (2001): A map of human genome sequence variation containing 1,42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* **409**:928-933

- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467
- Sapolsky R.J., Hsie L., Berno A., Ghandour G., Mittmann M., Fan J.B. (1999): High throughput polymorphism screening and genotyping with high-density oligonucleotide arrays. *Genetic Anal* **14**: 187-192
- Schena M. (1999): DNA microarrays. A practical approach. *New York* 1999
- Schiedel A.C. (1998): Posttranslationale Modifikation und Membranbindung der rab-Proteine am Beispiel des rab6-Proteins. Dissertation im Fachbereich Biologie der WWU-Münster
- Schorck N.J., Fallin D., Lanchbury S. (2000): Single nucleotide polymorphism and the future of genetic epidemiology. *Clin Genet* **58**: 250-264
- Schorck N.J., Fallin D., Lanchbury S. (2000): Single nucleotide polymorphisms and the future of genetic epidemiology. *Clin Genet* **58**: 250-264
- Schulz K.D., Albert U.S., Kreienberg R., Fischer F. (2002): Konzertierte Aktion Brustkrebsfrüherkennung in Deutschland. Philipps Universität, Manuell, 2. Auflage
- Selmane T., Schofield M.J., Nayak S., Du C., Hsieh P. (2003): Formation of a DNA mismatch repair complex mediated by ATP. *J. Mol. Biol.* **334**: 949-965
- Skope M., Fusening N.E. (1998): Tumorigenic conversion of immortal human keratinocytes through stromal cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 1050-1055
- Slamon D.J., Clark G.M., Wong S.G., Levin W.J., Ullrich A., McGuire W.L. (1987): Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of Her-2/ neu oncogene. *Science* **235**: 177-181
- Smith J., Modrich P. (1996): Mutation detection with MutH, MutL, and MutS mismatch repair proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 4374-4379
- Southern E. Mir K., Shchepinov M. (1999): Molecular interactions on microarrays. *Nature Genetics supplement* **21**: 5-9
- Statistisches Bundesamt Deutschland (2003): http://www.destatis.de/basis/d/gesu/ge_sutab3.htm
- Stephenson J. (1999): Human genome studies expected to revolutionize cancer classification. *JAMA* **282**: 927-928
- Strachan T., Read A.P. (1996): Human Molecular Genetics. *BIOS Scientific Publisher Limited, Oxford*
- Su X., Robelek R., Wu Y., Wang G., Knoll W. (2004): Detection of point mutation and insertion mutations in DANN using a quartz crystal microbalance and MutS, a mismatch binding protein. *Anal. Chem.* **76**: 489-494
- Syvänen A.C., Sajantila A., Lukka M. (1993): Identification of individuals by analysis of biallelic DNA markers, using PCR and solid-phase minisequencing. *Am J Hum Genet* **52**: 46-59

T

Tachiki H., Kato R., Kuramitsu S. (2000): DNA-binding and protein-protein interaction sites in MutS, a mismatched DNA recognition protein from *Thermus thermophilus* HB8. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.*

Takamatsu S., Kato R., Kuramitsu S. (1996): Mismatch DNA recognition protein from an extremely thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus* HB8. *Nucleic Acids Research* **24**(4): 640-647

U**V**

van den Bergh F.H., van Oeveren-Dybicz A.M., Bon M.A. (2000): Rapid single-tube genotyping of the factor V Leiden and prothrombin mutations by real-time PCR using dual-color detection. *Clin Chem* **46**: 1191-1195

Varmus H., Weinberg R.A. (1994): Gene und Krebs. Biologische Wurzeln der Krebsentstehung. *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg

Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W., Li P.W., Mural R.J., Sutton G.G., Smith H.O., Yandell M., Evans C.A., Holt R.A. (2001): The sequence of the human genome. *Science* **291**:1304-1351

W

Wagner R., Debbie P., Radman M. (1995): Mutation detection using immobilized mismatch binding protein (MutS). *Nucleic Acids Research* **23**(19): 3944-3948

Wang W. (2000): Structure and function of mismatch repair proteins. *Mutation Research* **460**: 245-256

Weide T. (1998): Lokalisation und Protein-Proteininteraktionen der kleinen GTPase rab1b. *Dissertationsarbeit im Fachbereich Biologie an der WWU Münster*

Weinberg R.A. (1991): Tumorsuppressor genes. *Science* **254**: 1138-1146

Wooster R., Bignell G., Lancaster J., Swift S., Seal S., Mangion J., Collins N., Gregory S. *et al.* (1995): Identification of the breast cancer susceptibility gene *BRCA2*. *Nature* **378**: 789-792

Wrba F. (1997): Suppressorgene and Oncogene: Grundlagen der Tumorgenese. *Studienbücher Medizin* Bd 9, *Facultas Universitätsverlag*, Wien

Wu T.H., Marinus G. (1999): Deletion mutation analysis of the *mutS* gene in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **274**(9): 5948-5952

X**Y**

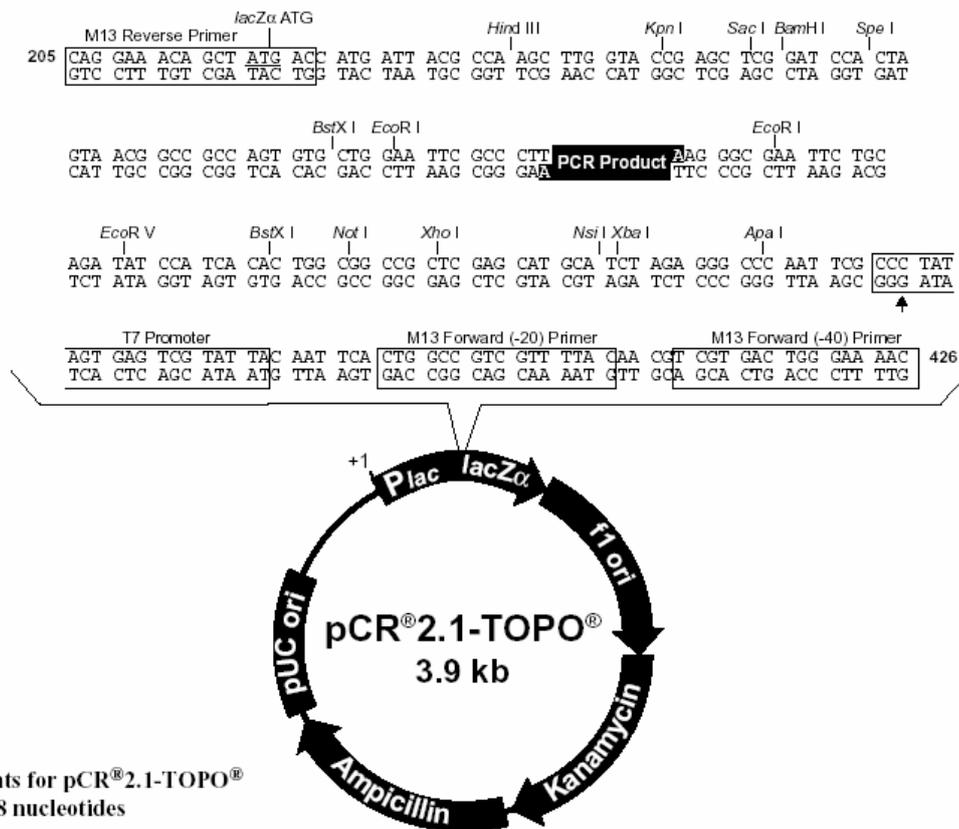
Yang W. (2000): Structure and function of mismatch repair proteins. *Mutation Research* **460**: 245-256

Yarden Y., Ullrich A. (1988): EGF and erb2 receptor overexpression in human tumors. Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu. Rev. Biochem.* **57**: 443-478

Z

Zhong X., Reynolds R., Kidd J.R., Kidd K.K., Jenison R., Marlar R.A., Ward C.W. (2003): Single-nucleotide polymorphism genotyping on optical thin-film biosensor chips *PNAS* **100**: 11559-11564

9 Anhang

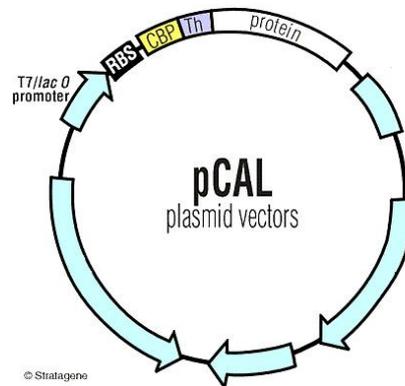


Comments for pCR[®]2.1-TOPO[®]
 3908 nucleotides

- LacZ α fragment: bases 1-571
- M13 reverse priming site: bases 205-221
- Multiple cloning site: bases 234-357
- T7 promoter/priming site: bases 364-383
- M13 Forward (-20) priming site: bases 391-406
- M13 Forward (-40) priming site: bases 411-426
- f1 origin: bases 548-962
- Kanamycin resistance ORF: bases 1296-2090
- Ampicillin resistance ORF: bases 2108-2968
- pUC origin: bases 3113-3786

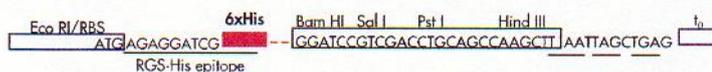
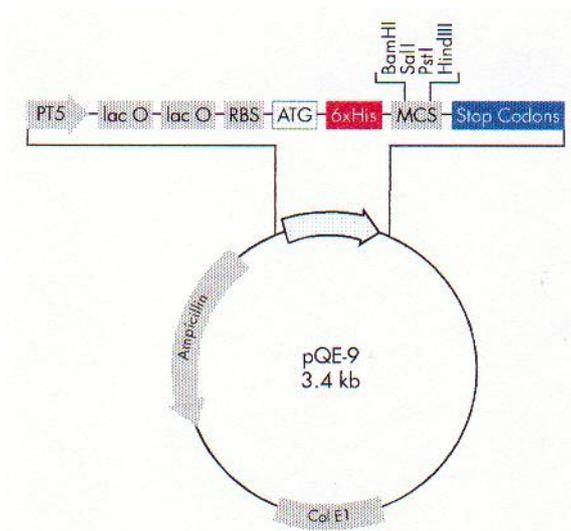
pCR-2.1-TOPO-TA-Vektorkarte (Invitrogen)

Der linearisierte Vektor pCR2.1-TOPO-TA besitzt am 3'-Ende einen Thyminüberhang, über den die PCR-Produkte, bzw. deren Adeninüberhänge spezifisch in den Vektor ligiert werden können.



pCAL-Vektorkarte (Stratagene)

Der zirkuläre Expressionsvektor pCAL besitzt eine MCS („multiple cloning site“), in die DNA-Fragmente über definierte Restriktionsschnittstellen zielorientiert ligiert werden können. Der MCS sind zwei kurze Sequenzabschnitte vorgeschaltet: erstens eine CBP- („calmodulin binding peptid“)-Sequenz und eine Th- („Thrombin“)-Sequenz. Unmittelbar nach dem T7/lacO-Promotor folgt die RBS („Ribosome binding site“), welche die Expression der „CBP-Th-Fusionsproteine“ gewährleistet.



pQE-9 Vector

Positions of elements in bases

Vector size (bp)	3439
Start of numbering at <i>Xho</i> I (CTCGAG)	1–6
T5 promoter/lac operator element	7–87
T5 transcription start	61
6xHis-tag coding sequence	127–144
Multiple cloning site	145–170
Lambda t_0 transcriptional termination region	186–280
<i>rrnB</i> T1 transcriptional termination region	1042–1140
ColE1 origin of replication	1616
β -lactamase coding sequence	3234–2374

pQE-9 Vektorkarte (Qiagen)

Der Expressionsvektor pQE-9 besitzt eine MCS („multiple cloning site“), in die DNA-Fragmente über definierte Restriktionsschnittstellen zielorientiert ligiert werden können. Der MCS ist ein 6xHis-Sequenzabschnitt vorgeschaltet, welche die Expression der 6xHis-Fusionsproteine gewährleistet.

MutS (*Thermus thermophilus*)
Protein- und Gensequenz
(NCBI; Acc.-Nr.: D63810)

translation="MGYGGVKMEGMLKGEGPGPLPPLLQQYVELRDYRDPDYLLLFQV
 GDFYECFGEDAERLALGLVLTHTKTSKDFTTPMAGIPIRAFDAYAERLLKMGFRLAV
 ADQVEPAEEAEGLVRRREVTQLLTPGTLTQEALLPREANYLAAIATGDGWGLAFLDVST
 GEFKGTLLKSKSALYDELFRHRPAEVL LAPELRENEAFVAEFRKRFPVMLSEAPFEPQ
 GEGPLALRRAQGALLAYARATQGGALSVRPFRLYDPGAFVRLPEASLKALEVFEPLRG
 QDTLFGVLDETRTAPGRLLQAWLRHPLLERGPLEARLDRVERFVREGALREGVRRLL
 FRLADLERLATRLELSRASPRDLAALRRSLEILPELKGLLGEEVGLPDL SGLLEELRA
 ALVEDPPLKVSEGLIREGYDPLDALRRAHAEGVAYFLDLEAREKERTGIPTLKVGY
 NAVFGYYLEVTRPYYEKVPQEYRPVQTLKDRQRYTLPENKERERELYRLEALIKRREE
 EVFLALRERARKEAEALREAARILAELDVYAALAEVAVRHGYTRPRFGERLRIRAGRH
 PVVERTAFVPNDLEMAHELVLVTGPNMAGKSTFLRQTALIALLAQIGSFVPAEEAEL
 PLFDGIYTRIGASDDLGGKSTFMVEMEEVALVLKEATERSLVLLDEVGRGTSSLDGV
 AIATALAEALHERRCYTLFATHYFELTALALPRLKNLHVAAKEEEGGLVFYHQVLPGP
 ASKSYGVEVAEMAGLPKEVVERARALLSAMAARREGALEEVLERLLALDPDRLTPLEA
 LRFHELKALALGLPLGSMKG "

ORIGIN

1 tctagaaggt ccttaaggcg caccacacgg aaggtgacgt tccccacccc acccgtttc
 61 caggggttgc ccgaggtgcg gggctggaag agggaaacgcc cgttgccgga gcaactggagg
 121 accatggtca cctcgtgctg gggaaagctcg aggaagctcct tggcctcaaa ggtgaagggg
 181 ttgtccacca gtccccccac ctccaccttc caccctgcca ggctggcccc ctccacgggtg
 241 ttgtagccgg ggaggtccac gttggtgctg atgtagagga tctccttagg ggtgcgctcg
 301 ggctggctga ccaagaggtc ataaggagtt tccaaaacga tggggcgctg ggagagaacc
 361 aagagcttgg ggtttttccc cttcaccaac tggctggccg tgggggcttg ctgggcgaag
 421 cctcggcttc cgcggcccaa aagcgtgccc cctaggccca tgagcttcag ggcggttcgc
 481 cggctgacgc tttccatacc ttatccctcc ctccaagggt ccgggggggac gtttgtcccc
 541 actttccggt tgcccctaact ctagggtggca aacaacaccc atgtcaagtg ggggttaggg
 601 ggttttttagc ccccgtttaa ggggctagga gaaagcgtc atgggggggt atggcggagt
 661 taagatggaa ggcattgctc agggcgaagg cccaggtcca ctccccctc ttctgcagca
 721 gtacgtggag ctccgcgacc gctaccgga ctacctctc ctcttccagg tgggggactt
 781 ctacgagtg ttcggggagg acgcccagcg cctcgcccgc gcgcttggcc tgcctctcac
 841 ccacaagacc agcaaggact taccaccccc catggcgggg atccccataa gggcctttga
 901 cgcctacgcc gaaaggcttc ttaagatggg cttccgctg gcggtggccg accaggtgga
 961 gcctgccgag gaggcggaa ggcctggtgct tggggagggtg acccagctcc tcacccggg
 1021 gaccctcacc caggaggccc tctcccccg ggaggccaac tacctggccg ccatcgccac
 1081 cggggacggy tggggctctg ctttcttggc cgtctccacg ggggagttca aggggacct
 1141 cctcaagagc aaaagtgcc tgtacgacga gcttttccgc caccggccc cccaggtcct
 1201 tttggccccg gagctacggg agaacgagge cttcgtggcc gagttccgga agcgtttcc
 1261 cgtgatgctc tccgaggccc cttttgagcc ccagggggag ggtcctttgg ccctgaggcg
 1321 ggcccagggg gcgctccttg cctacgcccg ggccacccag gggggggcct tgagcgtgcy
 1381 ccctttccgc ctctacgacc ccggggcctt cgtgcgcta ccggaggcga gcctgaaggc
 1441 cctcagaggtc tttgaacctc tgcggggcca ggacacctc tttggcgttc tggacgagac

1501 gcgaaccgcc cccggaagaa ggctcctcca ggcctggctc cgccaccccc ttctggaaag
1561 ggggcccttg gaggcgaggc ttgaccgggt ggagcgcttc gtgcgggagg gggccctacg
1621 cgagggggtg aggcgcctcc tcttccgctt cgccgacctg gagcgcttg ccacgaggct
1681 ggagctttcc cgggcaagcc ccagggacct tgccgcctta aggcggagcc tggagatcct
1741 ccccgagctt aagggccttc tgggggagga ggtggggctt cccgacctct ccggcctttt
1801 ggaggagctt agggcggtt tggtaggagga cccgccccctc aaggctctcc agggggggct
1861 catccgggag gggtagcacc cggacctgga cgccttgagg cgggccacag ccgaggggggt
1921 ggcctacttc ctggacctcg agggccggga gaaggagagg acgggcatcc ccaccctcaa
1981 ggtggggtag aacgccgtct tcggctacta cctggaggtg acccgccctt actacgagaa
2041 ggtgccccag gtagaccgcc ccgtccagac cctcaaggac cggcagcgtt acacctgcc
2101 ggagatgaag gaaaggagc gggagctcta ccgctcgag gccctgatca aaaggcgcga
2161 ggaggaggtc ttccttgccc ttaggtagcg ggcgaggaag gaggcggagg ccctaaggga
2221 gggcgagagg atcctcgccg agcttgacct ctaccgcccc ctcgccgagg tggcggtagc
2281 ccacggctac acccgcccc gcttcgggga aaggcttcgg atcagggcgg ggcgccaccc
2341 ggtggtggag cgccgcaccg ccttcgtccc caacgacctg gagatggccc acgagctcgt
2401 cctcgtcacc gggcccaaca tggcggggaa gtccacctc ctccgccaga ccgccctcat
2461 cgccctcctc gccagatcg ggagcttcgt gcccgccgag gaggcggagc ttccctctt
2521 tgacgggatc tacacgagga tcggggcctc ggacgacctc gccgggggga agagcacctt
2581 catggtggag atggaggagg tggccctggt gctcaaggag gccaccgaac gtagcctcgt
2641 cctcctggac gaggtgggccc ggggcacgag cagcctggac ggggtggcca tcgccaccgc
2701 cctcgccgag gccctgcacg agcggcggtg ctacaccctc ttcgccacc actactttga
2761 gctcaccgcc ctgcacctc cccggtcaa gaacctgcac gtggccgcca aggaggagga
2821 gggggggctc gtctttacc accaggtcct ccccgggccc gcctccaaga gctacgggggt
2881 ggaggtggcg gagatggcgg gcctgccc aa ggaggtggtg gagcgggccc gcgccctcct
2941 cagcgcctat gccgcgagcc gggagggcgc cctggaggag gtcttgagc gcctcctcgc
3001 cttagacccc gaccgcctca cccccctcga ggcctgagg ttctccacg agctcaaggc
3061 cttggccctg ggcctcccc tgggtagcat gaaggggtga tccgccccct ccctccggag
3121 cttaggggcc tcctcgccc gggcgaggtg ctcttacgg tgaaggacgc cgtgcgggag
3181 cttctggaaa acgccctgga cgtggggcc aggaggggtgc gggtaggact ttggggcggg
3241 gggcttaagc ggcttggtt ggaggacgac ggggagggga tcc

MutM (*Thermus thermophilus*)
Protein- und Gensequenz
(NCBI; Acc.-Nr: AB008520)

translation="MPELPEVETTRRRRLRPLVLGQTLRQVVHRDPARYRNTALAEGRR
 ILEVDRRGKFLLLFALEGGVELVAHLGMTGGFRLEPTPHTRAALVLEGR TLYFHDPRRF
 GRLFGVRRGDYREIPLLLRLGPEPLSEAFAPFGFRGLKESARPLKALLLDQRLAAGV
 GNIYADEALFRARLSPFRPARSLTEEEARRLYRALREVLAEAVELGGSTLSDQSYRQP
 DGLPGGFQTRHAVYGREGLPCPACGRPVERRVVAGRGTHFCPTCQEGEP "

ORIGIN

```

1  actgattgac  ggcgcctgcc  cctactgccg  cgccctgggg  cggaccctca  aggccctgga
61  ccttgggggc  accctccagg  tggtgccctt  gcaagatgcc  tccggcctgg  acccgaaggc
121  gcttctggag  gagcttcacg  tcctcgaggg  ggaccggacc  caccggggct  acgccgccct
181  cctcgccctg  gccggcgggc  ttccccctct  ctggccccct  taccctcttc  tcctcctcct
241  cgtccccttc  gggacggggc  agcggctcta  ccgcttctg  gcgaaaagga  ggccccgtgc
301  ccgagcttcc  cgaggtggag  accaccgcta  ggcggctgcg  cccctgggtc  ctgggccaga
361  cccttaggca  ggtggtccac  cgcgaccccc  cccgctaccg  gaacacggcc  ctggcggagg
421  ggaggcggat  cctggaggtg  gaccgccccg  ggaagtctct  cctcttcgcc  ctcgagggcg
481  gggtaggagct  cgtggcccac  ctggggatga  cggggggggt  ccggctggag  ccgacgcccc
541  acaccggggc  ggccctggtc  ctcgagggcc  ggaccctcta  ctccacgac  cccggcgct
601  tcgggcgcct  ctttggggtg  cggcgcgggg  actaccggga  gatccccctc  ctctccgcc
661  tcggccccga  gcccctctcg  gaggccttcg  cctttcccgg  gttcttccga  gggctgaagg
721  agagcgcgag  gccccttaag  gccctcctcc  tggaccagcg  cctcgccgcc  ggggtgggca
781  acatctacgc  cgacgaggcc  ctcttcgcg  ccgcctaag  ccccttcgc  cccgcccga
841  gcctcaccga  ggaggaggcg  cggcgctct  accgggcct  gcgcgaggtg  ctggcggagg
901  ccgtggaact  cgggggaagc  accctctcgg  accaaagcta  ccgccagccc  gacggcctcc
961  ctgggggctt  ccagacgcgc  cacgcctct  acggccggga  gggcctcccc  tgcccggcct
1021  gcgggcgccc  ggtggagcgg  cgggtggtgg  ccgggcgggg  caccacttc  tgccccacct
1081  gccaggggga  aggccctag

```

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich sehr herzlich bedanken bei...

...Frau Prof. Dr. Angelika Barnekow für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit, ihren Anregungen, sowie für die Begutachtung dieser Arbeit.

...Herrn P.D. Dr. Udo Seedorf für die Überlassung des interessanten Themas und des Arbeitsplatzes, sowie für die Begutachtung dieser Arbeit.

...Herrn P.D. Dr. Paul Cullen für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

...Frau Dr. Bianka Höpfner für die konstruktiven Diskussionen und Anregungen.

...bei allen Mitarbeitern der Firma Ogham Diagnostiks, für ihre technische Unterstützung beim „spotten“ und ihre meist gute Laune, die für ein angenehmes Arbeitsklima sorgten.

...bei Frau Dr. Miriam Köster, Frau Mechtild Rosing und Frau Doreen Wendholt für ihre aufmunternden Worte und das schnelle Korrekturlesen dieser Arbeit.

...allen, die in mich während der gesamten Zeit motiviert und begleitet haben.

Zum Schluß möchte ich mich ganz besonders herzlich bedanken bei meinen Eltern und Schwiegereltern, die mich immer motiviert haben und ohne die ich diese Arbeit nicht so schnell hätte beenden können,

... und vor allem bei Dir Axel, für Deine liebevolle und kreative Unterstützung und Deine unglaubliche Geduld mich immer wieder zu motivieren und aufzumuntern. Danke!

