

Aus dem Institut für klinische Transfusionsmedizin und
Immungenetik der Universität Ulm

(Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. H. Schrezenmeier)

Etablierung eines auf Luminex xMAP® Carboxybeadtechnologie basierenden Untersuchungsverfahrens, zum Einsatz in der Routinediagnostik von Zytokinpolymorphismen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von
Jens Putzbach
geb. in Dohna

2013

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernd Jahrsdörfer
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Marion Schneider

Tag der Promotion: 26.06.2014

**„Der Geist ist wie ein
Fallschirm - er kann nur
funktionieren, wenn
er offen ist.“**

Thomas R. Deware

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
1. EINLEITUNG	1
1.1 Zytokine	1
1.2 Single Nucleotide Polymorphismen (SNP)	7
1.3 Möglichkeiten der SNP-Analyse	8
1.4 Beschreibung der untersuchten SNP und deren Bedeutung	11
1.5 Bedeutung der Zytokine für die Transplantationsimmunologie	19
1.6 Fragestellung	21
1.7 Entwicklungsansatz	21
2. MATERIAL UND METHODEN	23
2.1 Material	23
2.2 Methoden	41
3. ERGEBNISSE	67
3.1 Ergebnisse der PCR und MPCR	67
3.2 Ergebnisse des Amplifikationserfolgs durch Sequenzierung	68
3.3 Ergebnisse der Testvalidierung	76

4.	DISKUSSION	102
4.1	Vergleich zwischen Luminex xMAP® Carboxybeads, der Referenzmethode (SSP), sowie Sequenzierung und DNA- Microarray	102
4.2	Beurteilung der Ergebnisse und Problemanalyse	107
4.3	Erfahrungen in der Entwicklung und Möglichkeiten der Systemoptimierung	110
4.4	Ausblick und Zukunft der xMAP® Carboxybeadtechnologie in der Abteilung für Transplantationsimmunologie	112
5.	ZUSAMMENFASSUNG	114
6.	LITERATUR	116
	Danksagung	VI
	Lebenslauf	VII

Abkürzungsverzeichnis

A	A denin
Abb.	A bbildung
bp	B asenpaare
C	C ytosin
CCR5	Chemokine-5 Rezeptor
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (c omplementary D esoxyribonucleic a cid)
CFTR	C ystic F ibrosis T ransmembrane C onductance R egulator
COOH	Carboxylgruppe
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung (C hronic o bstructive p ulmonary d isease)
dATP	D esoxy a denosin t riphosphat
DAXX	Death domain-associated protein 6
dCTP	D esoxycytidin t riphosphat
ddNTP	D idesoxyribonukleosid t riphosphat
dGTP	D esoxy g uanosin t riphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (D esoxyribonucleic a cid)
dNTP	D esoxyribonukleosid t riphosphat
dTTP	D esoxy t himidin t riphosphat
EDC	1- E thyl-3-(3- d imethylaminopropyl) c arbodiimid ($C_8H_{17}N_3$)
EDTA	E thylendiamintetraacetat
Fa	F irma
fw	f orward
G	G uanin
GvHD	Transplantat-Wirt-Reaktion (G raft v ersus H ost D isease)
HGMD	H uman G ene M utation D atabase
IFNg	I nterferon g amma
IFNgR	I nterferon g amma R ezeptor

IgA	Immunglobulin A
IgE	Immunglobulin E
IL1	Interleukin-1
IL1a	Interleukin-1 alpha
IL1b	Interleukin-1 beta
IL1R	Interleukin-1 Rezeptor
IL1RN	Interleukin-1 Rezeptorantagonist
IL2	Interleukin-2
IL4	Interleukin-4
IL4Ra	Interleukin-4 Rezeptor alpha
IL6	Interleukin-6
IL10	Interleukin-10
IL12b	Interleukin-12 beta
JAK-STAT	Januskinase Signal Transducers and Activators of Transcription
Lo	Locus
MAPK	Mitogen-activated-protein-Kinase
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure (2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid hydrate - C ₆ H ₁₃ NO ₄ S)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (M ajor H istocompatibility C omplex)
MPCR	Multiplex Polymerasekettenreaktion (M ultiplex P olymerase C hain R eaction)
NCBI	N ational C enter for B io T echnology I nformation
NF-κB	N uclear factor ' κ appa-light-chain-enhancer'
NOD2 Card 15	N ucleotide-binding o ligomerization d omain-containing protein 2
PCR	Polymerasekettenreaktion (P olymerase C hain R eaction)
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure (r ibosomale D esoxyribonucleic a cid)
rev	r everse

RNA	Ribonukleinsäure (R ibonucleic a cid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (R ounds p er m inute)
SDS	Natriumdodecylsulfat (Lauryl sulfate sodium salt - C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S)
SNP	Punktmutation (S ingle N ucleotide P olymorphism)
SODD	S ilencer of D eath D omain
SSP	sequenzspezifischer Primer (S equence S pecific P rimer)
T	T hymine
Tbl.	T abelle
TE	T ris- E DTA
TGFb	T ransforming g rowth f actor b eta
TMAC	T etramethylammonium C hloride (C ₄ H ₁₂ ClN)
TNFa	T umor n ecrosis f actor a lpha
TNF R1	T umor n ecrosis f actor R eceptor T ype 1
TNF R2	T umor n ecrosis f actor R eceptor T ype 2
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol (C ₄ H ₁₁ NO ₃)
Tween20	Poly(oxy-1,2-ethandiyl)-monododekansäure-sorbitylester (C ₁₈ H ₃₄ O ₆)
TRADD	TNF-Rezeptor assoziiertes Protein
UV	u ltraviolett

1. Einleitung

1.1 Zytokine

Zytokine stellen eine Gruppe von Proteinen und Peptiden dar, welche als signalvermittelnde Elemente von humanen wie auch tierischen Zellen produziert werden, damit diese untereinander kommunizieren können. Die Übermittlung dieser Signale wird über die Gruppe der Zytokinrezeptoren vermittelt, die sich auf der Oberfläche der Zielzellen befinden. Die Zytokine selbst wirken wie Hormone oder Neurotransmitter, werden jedoch nicht von spezifischen Organen oder Neuronen produziert, sondern von einer Vielzahl von Zelltypen. Eine zentrale Rolle nimmt ihre Funktion im Immunsystem ein. Hier haben die Zytokine einen wichtigen Stellenwert in der Modulation von immunologischen, entzündlichen oder infektiösen Prozessen. So werden beispielsweise T-Zellen und Makrophagen durch Zytokine aktiviert und stimuliert, wenn das Immunsystem ein Pathogen bekämpft. Weiterhin werden Makrophagen und T-Zellen durch Chemotaxis mittels Zytokinen zum Ort der Infektion „gelockt“.

Ihren Effekt entfalten die Zytokine über die Bindung an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche von Effektorzellen. Über eine intrazelluläre Signalkaskade findet die Signalverarbeitung statt, indem zum Beispiel die Transkription von Genen hoch beziehungsweise herunter reguliert wird. Daraus resultierend ergibt sich eine Vielzahl von möglichen Effekten, wie die vermehrte Produktion von anderen Zytokinen, ein erhöhter Einbau von Zelloberflächenrezeptoren oder Feedback-Inhibition des eigenen Signalprozesses. Dabei wirken Zytokine oft pleiotrop, das heißt einzelne Zytokine haben verschiedenste Wirkungen, je nach dem Zielgewebe, an das sie binden. Gleichzeitig sind die Auswirkungen mancher Signalkaskaden verschiedener Zytokine redundant, sprich verschiedene Zytokine haben bei Bindung an das gleiche Zielgewebe einen ähnlichen Effekt. Die Einteilung der Zytokine wird oft anhand der Rezeptorenfamilie, an die sie

binden, vorgenommen. Dies schließt die Typ I Zytokine (Hämatopoetin Familie), Typ II Zytokine (Interferon Familie), die Tumornekrose Faktor Familie, die Interleukin 1 Familie, sowie die Transforming growth factor Familie ein.

Interleukin-1 (IL1) gehört zu den zuerst beschriebenen Zytokinen. Zunächst wurde es als Substanz, welche Fieber induziert und Lymphozyten kontrolliert, erkannt. In den Jahren 1984/1985 wurde herausgefunden, dass IL1 aus zwei verschiedenen Proteinen besteht, die IL1 alpha (IL1a) und IL1 beta (IL1b) genannt wurden [41]. Beide werden von Makrophagen, dendritischen Zellen und Monozyten gebildet und nehmen eine proinflammatorische Wirkung bei der Bekämpfung von Infektionen ein. Sie erhöhen die Expression von Adhäsionsfaktoren an endothelialen Zellen, um die Transmigration von Leukozyten an den Ort der Entzündung zu ermöglichen. Weiter greifen sie in die Thermoregulation des Hypothalamus ein, was zu einer Erhöhung der Körpertemperatur führt und als Fieber wahrgenommen wird. Daher wird IL1 auch als Pyrogen bezeichnet. Die Produktion von IL1b ist mit der Beobachtung von Hyperalgesie im Bereich des entzündeten Gewebes und der Entstehung von Fieber assoziiert [80]. Eine weitere Rolle nimmt IL1 in der Regulation der Hämatopoese ein.

Neben IL1a und IL1b gehört auch der Interleukin-1 Rezeptorantagonist (IL1RN) zur IL1 Superfamilie. Dieser, ursprünglich 1984 von zwei unabhängigen Instituten beschriebene und damals noch als Interleukin-1 Inhibitor bezeichnete Antagonist, bindet auf den Zelloberflächen an dieselben Rezeptoren, wie es auch IL1a und IL1b tun. Im Unterschied zu IL1a und IL1b entfaltet die Bindung von IL1RN jedoch keine Signalwirkung, sondern hemmt die Signalübermittlung durch IL1a und IL1b kompetitiv [41]. Der Rezeptor über den die Wirkung der beschriebenen Zytokine der Interleukin-1 Superfamilie vermittelt wird, heißt Interleukin-1 Rezeptor (IL1R).

Interleukin-2 (IL2) wird als Immunantwort produziert, wenn Antigene aus der Umgebung Zugang zum Organismus erhalten [22,106]. Diese werden von Lymphozyten als fremdartig erkannt, worauf die Lymphozyten beginnen IL2 auszuschütten. Die Interaktion mit dem Interleukin-2 Rezeptor bewirkt, durch die Aktivierung und die Expression spezifischer Gene, die Stimulation, Differenzierung und das Überleben der antigenselektierten, zytotoxischen T-Zelle [7,8,108]. Damit ist IL2 essentiell für die Entwicklung und Ausbildung des T-Zellgedächtnisses, welches von der Anzahl und Funktion von Antigen selektierten T-Zell-Klonen abhängig ist. IL2 ist außerdem an der Entwicklung der T-Zellen im Thymus, hinsichtlich der Reifung von regulatorischen T-Zellen, beteiligt [94,110,111]. Diese regulatorischen T-Zellen verhindern, dass andere T-Zellen Selbstantigene erkennen und auf diese reagieren. Somit wird verhindert, dass eine Autoimmunantwort erfolgen kann. IL2 wird daher benötigt, um zwischen „eigen“ und „fremd“ unterscheiden zu können. IL2 ermöglicht zudem die Produktion von Immunglobulinen durch B-Zellen und induziert die Differenzierung und Proliferation von natürlichen Killerzellen [119,120].

Interleukin-4 (IL4) wurde erstmals 1982 von Howard et al. beschrieben. Es nimmt eine Schlüsselrolle in der humoralen und adaptiven Immunantwort ein [54]. IL4 ist ein Zytokin, welches die Differenzierung von nativen T-Helferzellen in Th2-Zellen induziert. Durch die Aktivierung von IL4 produzieren die Th2-Zellen zusätzliches IL4 und stimulieren sich so selbst (autokrine Stimulation). In B-Zellen induziert IL4 den Klassenwechsel zu IgE und reguliert die Produktion von MHC-Klasse 2 Molekülen hoch. Vermittelt wird die Wirkung durch den Interleukin-4 Rezeptor. IL4 gehört zudem zu den antiinflammatorischen Zytokinen, die ein Überschießen von Entzündungsreaktionen verhindern.

Interleukin-6 (IL6) ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches von T-Zellen und Makrophagen ausgeschüttet wird, um eine Immunantwort bei Traumata, wie zum Beispiel Verbrennungen, auszulösen. Die Ausschüttung findet unter anderem in Skelettmuskelzellen, wie auch glatte Muskelzellen der Gefäße, statt.

Weiterhin wurde die Produktion von IL6 auch in Osteoblasten beobachtet [43]. IL6 stellt einen wichtigen Mediator für Fieber und der Akutphasereaktion bei Entzündungen dar. Im Muskel und Fettgewebe führt die Stimulation des dort gebildeten IL6 zu einer Energiemobilisation, was eine Erhöhung der Körpertemperatur zur Folge hat. Darüber hinaus kann IL6 von Makrophagen als Reaktion auf spezifische, mikrobielle Moleküle sezerniert werden. Diese Moleküle binden an Detektionsmoleküle auf der Zelloberfläche, welche als Toll-like Rezeptoren bezeichnet werden. Diese induzieren eine intrazelluläre Signalkaskade, welche die Produktion von weiteren inflammatorischen Zytokinen initiiert [9].

Interleukin-10 (IL10) wird primär von Monozyten gebildet und hat vielfältige Effekte bei der Immunregulation und bei Entzündungen. IL10 reguliert die Expression von Th1-Zytokinen und MHC-Klasse II Antigenen. Dies erfolgt aufgrund der Eigenschaft, dass IL10 in der Lage ist, die Synthese von Interferon gamma (IFN γ), Interleukin-2 (IL2), Interleukin-3 (IL3), sowie Tumor necrosis factor alpha (TNF α) zu inhibieren, welche von Makrophagen und T1-Helferzellen ausgeschüttet werden. IL10 verstärkt das Überleben, die Proliferation und die Antikörperproduktion von B-Zellen. Knockout Studien an Mäusen lassen vermuten, dass IL10 zudem eine entscheidende immunregulatorische Funktion im Gastrointestinaltrakt hat. Weitere Tierversuche zeigten, dass IL10 auch in Mastzellen produziert wird und der inflammatorischen Antwort dieser Zellen entgegen wirkt, welche sie bei allergischen Reaktionen entfalten [50].

Interleukin-12 beta (IL12b) ist eine Untereinheit von Interleukin-12. Es ist ein Zytokin, welches unter anderem mit T-Zellen und natürlichen Killerzellen interagiert. IL12 selbst ist ein durch Disulfidbrücken verbundenes Heterodimer. Dieses besteht aus Interleukin-12 alpha und Interleukin-12 beta. Sezerniert wird es durch aktivierte Makrophagen und dendritische Zellen, welche ihrerseits der Th1-Zellentwicklung dienen [56]. Weitere Effekte sind die vermehrte Produktion

von Interferon gamma (IFN γ), Tumor necrosis factor alpha (TNF α) und die Reduktion der Suppression von IFN γ , welche durch IL4 vermittelt wird.

Interferon gamma (IFN γ) ist ein dimerisiertes lösliches Zytokin, das zur Familie der Typ II Interferone gehört [49]. Die ursprüngliche Bezeichnung lautete „Makrophagen aktivierender Faktor“. Im Gegensatz zu Interferon alpha und Interferon beta, die von jeder Zelle exprimiert werden können, wird IFN γ nur von T-Lymphozyten, dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen ausgeschüttet. Dieses Zytokin wirkt antiviral, immunmodulatorisch und anti-tumorös [100]. Die Wirkung von IFN γ wird durch die Interaktion mit den Rezeptoren Interferon gamma receptor 1 und Interferon gamma receptor 2 (IFN γ R1 und IFN γ R2) vermittelt. Durch die Bindung an die Rezeptoren wird die Signalkaskade des JAK-STAT Weges aktiviert. Zusätzlich fördert IFN γ die Differenzierung von Th1-Zellen durch Hochregulation von Transkriptionsfaktoren.

Der Transforming growth factor beta (TGF β) ist ein Protein, welches in drei Isoformen existiert. Diese werden als TGF β 1, TGF β 2 und TGF β 3 bezeichnet. TGF β gehört zu einer Familie von Proteinen, welche als Transforming growth factor Superfamilie bekannt ist und zu der außerdem Inhibine, Activin, Anti-müllerian hormone und Bone morphogenetic protein gehören. TGF β selbst kontrolliert unter anderem die Proliferation und Differenzierung verschiedener Zelltypen. Allerdings kann es auch als negativer, autokriner Wachstumsfaktor wirken. So spielt TGF β eine wichtige Rolle bei der Apoptose, indem es über den SMAD oder DAXX pathway Apoptose in Zellen induzieren kann [92,101].

Tumor necrosis factor alpha (TNF α) ist ein Zytokin, welches in der systemischen inflammatorischen Immunantwort eine Rolle spielt. Aufgrund dieser Eigenschaft wird es auch den Zytokinen zugeordnet, die eine Akutphasereaktion auslösen. Im einzelnen kann TNF α den Zelltod durch Apoptose induzieren, aber auch Einfluss auf die Differenzierung von Zellen nehmen, Inflammation auslösen und

die virale Replikation modulieren. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde impliziert, dass seine Dysregulation, zum Beispiel in Form einer Überexpression, Einfluss auf eine Vielzahl menschlicher Krankheiten haben könnte, nicht zuletzt auch auf die Entstehung von malignen Tumoren [73]. Die Signalkaskade kann durch Binden von TNF α an die Rezeptoren TNFR1 oder TNFR2 initiiert werden. TNFR1 findet sich in den meisten Gewebearten, während TNFR2 nur auf Zellen des Immunsystems exprimiert wird. Das Binden der Liganden an die TNF-Rezeptoren führt zu einer Änderung der Konfiguration des Rezeptors und damit zu einer Dissoziation des inhibitorischen Proteins SODD. Die Dissoziation erlaubt das Binden des agonistischen Proteins TRADD an die entsprechende Bindungsdomäne. Hierdurch werden drei Pfade der weiteren Signalkaskade beschränkt [28,118].

Über die Aktivierung von NF- κ B, einem heterodimeren Transkriptionsfaktor, wird die Transkription von Proteinen verstärkt, die in den Zellüberlebenszyklus und die Proliferation von Zellen eingreifen, inflammatorische Immunantworten regulieren, sowie Faktoren, die der Apoptose entgegenwirken.

Über den MAPK pathway werden über mehrere Schritte einer Kaskade Transkriptionsfaktoren aktiviert, welche zur Zelldifferenzierung und Proliferation beitragen. Diese Signalkette ist im allgemeinen als proapoptotisch zu sehen. Der dritte Signalweg führt wie bei allen Mitgliedern der TNF-Rezeptoren Superfamilie, die sogenannte „death-domains“ enthalten, zur Induktion von Apoptose [47]. Auch wenn der durch TNF α induzierte Zelltod eine, in Anbetracht der starken inflammatorischen Wirkung, eher untergeordnete Rolle spielt. Denn auch im Vergleich zu anderen Apoptose auslösenden Signalkaskaden, wie zum Beispiel dem Fas-System, ist die Fähigkeit, den Zelltod auszulösen vergleichsweise schwach und oftmals durch den antiapoptotischen Effekt von NF- κ B maskiert.

Ausgeschüttet wird TNF α hauptsächlich von Makrophagen, jedoch auch von anderen Zellen, wie Lymphozyten, Mastzellen, endothelialen Zellen, kardialen Monozyten, Fettgewebe, Fibroblasten und neuronalem Gewebe. Als Stimulus für

die Freisetzung wirken Lipopolysaccharide und andere bakterielle Antigene, sowie IL1. Zusammen mit IL1 und IL6 entfaltet es, je nach Zielorgan, verschiedene Wirkungen. Im Hypothalamus führt TNFa zur Suppression des Appetits und zur Induktion von Fieber. In der Leber führt es zur Produktion von Akutphaseproteinen, wie C-reaktivem Protein, und einer Vielzahl weiterer Entzündungsmediatoren. Weiterhin kommt es zu Erhöhung der Insulinresistenz in der Leber und im peripheren Gewebe. Neutrophile Granulozyten werden durch TNFa angelockt und können mit dessen Hilfe an die endothelialen Zellen binden, um anschließend in das umliegende Gewebe zu migrieren. Makrophagen selbst werden durch TNFa autokrin zur vermehrten Phagozytose stimuliert, sowie zur Produktion von IL1 und dem inflammatorischen Prostaglandin E2 angeregt. Lokal führt eine erhöhte Konzentration von TNFa im Gewebe zu den kardinalen Zeichen einer Entzündung, nämlich Schwellung, Rötung, Überwärmung und Schmerz.

1.2 Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

Beim Vergleich von zwei beliebigen menschlichen Individuen, lässt sich in deren Genomen eine Übereinstimmung von 99,99% finden [116]. Lediglich die restlichen 0,1% zeigen interindividuell Unterschiede der DNA-Sequenz. Diese Unterschiede werden als Polymorphismen bezeichnet. Handelt es sich hierbei um einen Unterschied, der nur eine Base an einer Position der DNA-Sequenz umfasst, spricht man von einem Single Nucleotide Polymorphismus, beziehungsweise einer Punktmutation oder kurz SNP. Etwa 90% der polymorphen Stellen im Genom werden durch SNPs abgebildet, nur die restlichen 10% entfallen auf andere Ausprägungen, wie zum Beispiel repetitive DNA-Sequenzen [32]. Ein SNP ist dadurch charakterisiert, dass für eine Stelle im Genom mindestens zwei verschiedene Nucleotide existieren. Dabei ist die zahlenmäßig geringer vertretene Variante mindestens zu 1% in der Population zu finden [20].

SNPs können sich innerhalb eines Gens im kodierenden oder nicht kodierenden Bereich befinden, aber auch in der Region zwischen den Genen. Befindet sich ein SNP in einem kodierenden Abschnitt, heißt dies nicht zwingend, dass auch die Aminosäuresequenz und somit das gebildete Produkt verändert wird. Dies ist der Degeneration des genetischen Codes geschuldet. SNP, die auch aus dem mutierten Allel das korrekte Protein bilden, werden als stumme Mutationen bezeichnet.

Wirkt sich ein SNP auf die Aminosäuresequenz aus, so spricht man von Missense- und Nonsense-Mutationen. Während bei der Missense-Mutation ein verändertes Protein gebildet wird, welches die natürliche Funktion nicht so erfüllen kann, wie das unveränderte Original, kommt es im Fall der Nonsense-Mutation zu einem Abbruch der Proteinbildung, ohne die Entstehung eines fertigen Proteins.

SNPs, die sich in einer nicht kodierenden Region befinden, können über Veränderungen beim Spleißen der Gene, über ein verändertes Bindungsverhalten von Transkriptionsfaktoren oder durch Veränderung der Sequenzen von nicht- kodierender RNA ebenfalls Einfluss auf die normale Funktionen des Gens nehmen und so Erkrankungen verursachen. Um Angaben über die mittlerweile hohe Anzahl nachgewiesener SNP bereit zu stellen, existieren verschiedene Datenbanken, die es unter anderem erlauben, entsprechende Informationen über Lage, nachgewiesene Allele und deren Häufigkeit im Genom verschiedener Ethnien einzuholen. Eine dieser Datenbanken, welche auch für diese Arbeit genutzt wurde, ist die des National Center for Biotechnology Information (NCBI) [131]. Eine weitere Datenbank stellt zum Beispiel die Human Gene Mutation Database dar (HGMD).

1.3 Möglichkeiten der SNP-Analyse

Für die Bestimmung von SNP im Routinebetrieb medizinischer Einrichtungen stehen mehrere Methoden zur Verfügung. Zum einen kommt die Methode der

sequenzspezifischen Primer (SSP) zur Anwendung. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Sequenzierung der entsprechenden Abschnitte des Genoms. Als verhältnismäßig neue Methode wurde die Typisierung mittels BioChips, sogenannten DNA-Microarrays etabliert.

1.3.1 Sequenzspezifische Primer (SSP)

Bei der Typisierung mittels sequenzspezifischer Primer, bindet einer der Primer im Bereich des SNP an die DNA. Der zweite Primer bindet weiter von der polymorphen Stelle entfernt. Ist der sequenzspezifische Primer komplementär zu dem jeweiligen SNP kann der Primer vollständig binden und die PCR-Reaktion findet statt. Im Fall das die Mutation vorliegt, kann dieser Primer nicht binden und somit auch kein PCR-Produkt entstehen. Über den Nachweis der amplifizierten PCR-Produkte in einem Agarosegel, nach elektrophoretischer Auftrennung und optischer Auswertung mit Ethidiumbromid und UV-Licht, kann anschließend der Genotyp der Probe für den untersuchten SNP bestimmt werden [85,124,125].

1.3.2. Sequenzierung

Bei der Methode der DNA Sequenzierung nach Sanger, auch Kettenabbruch-Synthese genannt, wird durch enzymatische Verlängerung mittels einer DNA-Polymerase einer der beiden komplementären DNA-Stränge verlängert. Dies geschieht ausgehend von einem Primer, welcher komplementär an eine kurze Zielsequenz der DNA bindet.

Als Sequenzierreaktion kommt danach eine abgewandelte Form der PCR zum Einsatz, in der aber nur ein Primer eingesetzt wird, der die DNA linear amplifiziert. Bei der Reaktion werden neben den dNTPs, die auch bei der PCR

eingesetzt werden, auch Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTP) zugesetzt. Diese sind für eine spätere Nachweisreaktion markiert. Im Vergleich zu den Ursprüngen der Methode kommen heutzutage vor allem Fluoreszenzfarbstoffe bei der Markierung zur Anwendung, während früher mit Radioisotopen gearbeitet wurde. Heute wird jeder der vier ddNTPs durch einen spezifischen Fluoreszenzfarbstoff gekennzeichnet, die mittels Anregung durch einen Laser, Licht in verschiedenen Wellenlängenbereichen emittieren. Dieses kann durch Detektoren erfasst und anschließend zur Auswertung genutzt werden.

Durch den Zusatz von ddNTPs kommt es bei der Amplifikation aufgrund des Fehlens einer Hydroxylgruppe am 3'-Kohlenstoffatom zu einem Abbruch der Reaktion, da die Phosphatgruppe des nächsten Nukleotids nicht binden kann. So entstehen während der Amplifikation verschieden lange DNA-Fragmente, die jeweils mit einem der markierten ddNTPs enden. Alle Fragmente derselben Länge, weisen am Ende das entsprechende, für diese Position im komplementären Strang kodierte, ddNTP auf. Da bei der Reaktion für jede Position der Basen ein entsprechend langes Fragment entsteht, kann im Anschluss an die Sequenzierreaktion diese Fragmente mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und analysiert werden, indem die Fluoreszenzsignatur für jede Fragmentlänge erfasst wird. Das so entstehende Chromatogramm gibt dann, entsprechend der Abfolge der Farben, die Sequenz der entsprechenden Basen der untersuchten DNA-Region wieder [95,96]. Im Falle einer Mutation werden an der selben Position verschiedene Fluoreszenzsignaturen registriert.

1.3.3 DNA-Microarrays

In steigender Zahl findet auch die Methode der DNA-Microarrays beim Nachweis von SNP Einzug in die Laborwelt. Bei dieser Methode werden cDNA-Oligonukleotide oder Fragmente von PCR-Reaktionen auf ein Trägermaterial („Spotted Microarrays“) oder aber synthetisch hergestellte Oligonukleotide

(„Oligonucleotide Microarrays“) aufgebracht. Diese sind auf einer bestimmten Position eines Rasters aufgebracht, zum Beispiel einem Glasträger, und dienen als Sonden für das zu untersuchende Material.

Aus dem zu untersuchenden Material kann RNA extrahiert werden, die nach Schritten der Aufreinigung und Vervielfältigung in cDNA oder RNA umgeschrieben und mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert wird. Eine andere Möglichkeit besteht in der Extraktion von DNA, welche zunächst amplifiziert und ebenfalls mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert wird. In der eigentlichen Hybridisierungsreaktion binden die markierten cDNA, RNA oder PCR-Produkte an die komplementären Sonden, welche sich auf dem Array befinden. Im Anschluss wird durch einen Waschschrift das ungebundene Material vom Array entfernt und für jede Position das Fluoreszenzsignal mittels Anregung durch einen Laser und Nutzung der entsprechenden Detektoren registriert. Auf diese Weise kann ermittelt werden, ob ein gesuchte spezifische Sequenz an der entsprechenden Sonde gebunden hat und somit im zu untersuchenden Material nachzuweisen war.

1.4 Beschreibung der untersuchten SNP und deren klinische Bedeutung

Die von uns untersuchten Polymorphismen werden mit zahlreichen Einflüssen auf Erkrankungen in Verbindung gebracht, die zum Teil vermutet, in anderen Fällen auch schon hinreichend bewiesen sind. Nicht zuletzt sind die von uns untersuchten Polymorphismen in unserem Institut mit der gezielten Fragestellung verbunden, ob diese SNP einen Einfluss auf das Auftreten und eine unterschiedlich starken Ausprägung von Graft-versus-Host Reaktionen (GvHD) bei Knochenmarktransplantierten Patienten haben. Eine der ersten Studien, welche diese Frage zur Grundlage nahm, erschien 1998 und wurde von

Middleton et al. publiziert [78]. Auch wenn in dieser Arbeit noch kein Zusammenhang zwischen ausgewählten Zytokinpolymorphismen und der Mortalität bei GvHD festgestellt werden konnte, zeigten sich jedoch Hinweise darauf, dass die untersuchten SNP Einfluss auf die Stärke der Ausprägung einer GvHD nehmen und legte damit den Grundstein für weitere Betrachtungen.

Im IL1a-Gen, welches sich auf Chromosomen 2 (2q14) befindet, untersuchten wir den Polymorphismus rs1800587 (C>T). Er befindet sich im 5'-untranslatierten Bereichs des Gens, so dass vermutet wird, dass er Einfluss auf die Transkription und Expression des Gens hat. Dieser Polymorphismus stellt wie alle anderen von uns betrachteten Polymorphismen eine Punktmutation dar. Der Einfluss dieser Mutation wurde bereits in Zusammenhang mit der Abnahme der Knochendichte und Wirbelsäulenfrakturen untersucht [63], sowie auf die Prädisposition für eine ankylosierende Spondylitis [126]. Anlass der oben genannten Studie war die Beobachtung, dass in Monozyten von Patienten mit Osteoporose ein erhöhter Spiegel von IL1a festgestellt wurde, welches die Resorption der Knochenmasse fördert. Daher erfolgte die Untersuchung verschiedener SNP auf IL1a, unter anderem auch der von rs1800587. Allerdings konnte diese Studie keinen Einfluss von rs1800587 auf ein häufigeres Auftreten von verminderter Knochendichte und pathologischen Wirbelkörperfrakturen aufzeigen. Die zweite der genannten Studien, welche zur Klärung eines eventuellen Effektes von IL1a Polymorphismen auf das Auftreten von ankylosierender Spondylitis durchgeführt wurde, zeigte eine häufigeres Auftreten des mutierten Allels in der Gruppe der Erkrankten. In einer Metastudie zu diesem Thema zeigte sich, dass ein erhöhtes Vorkommen dieser Mutation bei ankylosierender Spondylitis bei Europäern, nicht aber bei Asiaten zu verzeichnen war [70].

Ein weiter Einfluss, der rs1800587 zugeschrieben wurde, steht im Zusammenhang zu spontanem Hörverlust und Morbus Ménière. Als Grund hierfür wurde eine erhöhte Permeabilität von Blutgefäßen im Innenohr angeführt, die durch Entzündungsreaktionen entsteht. Diese soll durch IL1a

beeinflusst werden und damit nicht zuletzt auch mit dem Vorhandensein der Mutation rs1800587 verknüpft sein [44]. Für die Transplantationsimmunologie bedeutend war der 2003 erschienene Beitrag von Cullop et al., in der im Zusammenhang mit Knochenmarktransplantationen die Vermutung äußerte, dass neben anderen Risikofaktoren, die Typisierung von rs1800587 dazu beitragen kann, eine GvHD bei HLA-gematchten Knochenmarktransplantationen vorherzusagen [34]. Auch wenn Mehta et al. in der 2007 veröffentlichten Studie dies nicht bestätigen konnten [77], bleibt rs1800587 weiter Gegenstand ähnlicher Betrachtungen.

Im IL1b-Gen, welches ebenfalls auf Chromosomen 2 (2q14) zu finden ist, untersuchten wir die beiden SNP rs1143634 (C>T) und rs16944 (T>C). Der Polymorphismus rs1143634 ist im Exon 5 lokalisiert, rs16944 ist noch vor dem ersten Exon im Promotorbereich zu finden. Ähnlich wie bei IL1a wurden auch diese beiden SNP auf einen Zusammenhang mit Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises und degenerativen Gelenkerkrankungen untersucht [74,81,102]. In neueren Studien wurde auch ein Zusammenhang zu neurodegenerativen Erkrankungen aufgezeigt, so wurde rs1143634 eine Rolle bei der Entwicklung von Demenz zugeschrieben [10,98]. Das mutierte Allel von rs16944 scheint Auswirkungen auf die Aktivität des dorsolateralen, präfrontalen Cortex, bei an Schizophrenie erkrankten Patienten, zu haben [88] und wurde in einer Studie von 2007 ebenfalls mit dem Auftreten von multipler Sklerose in Verbindung gebracht [16]. 2009 wurde der Einfluss von IL1b auf die Entstehung von GvHD nach Knochenmarktransplantationen in einer Studie untersucht. Hier zeigte sich zwar kein direkter Zusammenhang mit dem Auftreten einer GvHD, es scheint aber einen Einfluss auf die Entstehung von Komplikationen, wie Infektionen und Thrombosen, während einer GvHD zu haben [45].

Neben Polymorphismen in den IL1-Genen wurden auch jeweils ein SNP im Bereich des IL1R (rs2234650) und IL1RN (rs315952) untersucht. Rs2234650 (C>T) und rs315952 (C>T) finden sich beide auf Chromosom 2 (rs2234650:

2q12; rs315952: 2q14). Rs2234650 befindet sich mehrere tausend Basen vor dem ersten Exon des IL1R Gens, rs315952 hingegen liegt im letzten Exon des IL1RN Gens. Neben einem Einfluss auf eine ankylosierende Spondylitis [40], wurde auch der Einfluss von rs315952 in der Pathogenese des systemischen Lupus erythematosus postuliert [113].

Im IL2-Gen untersuchten wir die zwei Polymorphismen rs2069762 (T>G) und rs2069763 (G>T). Beide finden sich auf Chromosom 4 (4q26). Der Einfluss beider SNP wurden aufgrund der immunmodulatorischen Wirkung von IL2 untersucht, unter anderem bezüglich der Immunantwort nach Vakzinierung gegen Masern. Hier zeigte sich eine erhöhte Antikörperproduktion und Lymphozytenantwort bei Vorliegen der Mutationen [39,51]. In einer 2011 veröffentlichten Studie wurde der Einfluss beider SNP auf mögliche akute Abstoßungsreaktionen bei Nierentransplantation untersucht, welcher sich jedoch in dieser Studie nicht nachweisen ließ [89]. Rs2069762 wurde weiter in Zusammenhang mit der Prognose bei Patienten, die an einem folliculären Lymphom erkrankten untersucht. Neben weiteren Faktoren schien auch dieser Polymorphismus die Prognose zu beeinflussen [27]. In einer anderen Studie wurde der Zusammenhang dieses SNP und einer verstärkten Expression von IL2, als Folge der durch den Polymorphismus veränderten Promoterregion, untersucht. Hieraus resultierte ein verändertes Verhältnis von Th1- zu Th2-Zellen, welches zugunsten der Th2 Zellen verschoben war und womit ein Zusammenhang einer erhöhten Anfälligkeit für allergische Erkrankungen vermutet wurde [30].

Insgesamt vier Polymorphismen weckten unser Interesse bei IL4 und dessen Rezeptor IL4Ra. Für IL4, gelegen auf Chromosom 5 (5q31), untersuchten wir rs2243248 (T>G), rs2243250 (C>T) und rs2070874 (T>C). Im Gen des IL4Ra auf Chromosom 16 (16q12) untersuchten wir rs1801275 (G>A). Bedeutung erlangten die Polymorphismen in Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen. Rs2243248 hat laut Studienlage einen Einfluss auf die

Entstehung von Gliomen [19]. Der Polymorphismus rs2243250 zeigte einen signifikanten Unterschied in der Menge des Sezernierten von IL4 und wurde in Bezug zur Pathogenese der Multiplen Sklerose diskutiert [1].

Im IL6-Gen fanden zwei weitere SNP unsere Beachtung. Die auf Chromosom 7 (7p21) im Promotorbereich befindlichen SNP rs1800795 (G>C) und rs1800797 (G>C). Beide SNP wurden zusammen auf eine prognostische Graduierung in Bezug auf Erkrankungen der Bandscheiben untersucht. Hier zeigten sich erste Hinweise darauf, dass bestimmte Haplotypen einen Einfluss auf Schmerzhäufigkeiten zu haben scheinen [62]. In einer weiteren Studie wurde unter der Annahme, dass verschiedene Haplotypen, resultierend aus den Polymorphismen in der Promotorregion, eine erhöhte Transkription und Sekretion von IL6 nach sich ziehen und damit das Risiko des Auftretens einer symptomatischen distalen Osteoarthritis erhöhen [57]. Nebst diesen Studien wurden die beiden im Promotorbereich gelegenen SNP auch auf ihren Zusammenhang zu verschiedenen Formen von Neoplasien untersucht. So wird angenommen, dass neben anderen Faktoren, Polymorphismen in der Promotorregion von IL6 einen Einfluss auf Brustkrebs [103,104], die Entstehung von Gliomen im erwachsenen Alter [19] und das Auftreten von kolorektalen Karzinomen haben [105]. Bedeutend für die Transplantationsimmunologie wurde rs1800795 durch den Einfluss auf die Funktion und den Verlust von transplantierten Nieren. Hier wurde ein erhöhter Spiegel von IL6 als Ursache für Abstoßungsreaktionen diskutiert [65]. Ähnlich verhält es sich bei hämatopoetischen Stammzellspenden, wo die SNP der IL6-Promotorregion Einfluss auf das Auftreten einer GvHD bei den Empfängern nehmen [2].

Die Polymorphismen rs1800896 (A>G), rs1800871 (C>T) und rs1800872 (C>A) wurden von uns im Bereich des Gens für IL10 untersucht, welches sich auf Chromosom 1 (1q31) befindet. Alle drei SNP befinden sich im Promotorbereich und nehmen so Einfluss auf die Sezernierung von IL10. In bestehenden Studien wurde der Einfluss von rs1800896 unter anderem bei der Entstehung von

allergischem Asthma untersucht [55]. Hier zeigte sich in Zusammenhang mit Mutationen in IL10 ein erhöhter IgE-Spiegel im Serum und lässt auf Basis dessen einen Zusammenhang bei der Entstehung von Allergien und Asthmaexazerbationen vermuten. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass die Haplotypen, die aus den untersuchten SNP entstehen, Einfluss auf die Menge von IL10 nehmen, welches produziert wird. Der Haplotyp ATA ist mit einem signifikant höheren IL10 Serumspiegel assoziiert als die übrigen. Auf Basis dieser Erkenntnis folgte die Schlussfolgerung, dass dieser Haplotyp einen Einfluss auf die Entstehung von rheumatoider Arthritis habe, was Gegenstand einer weiteren Studie war [52]. Die Vermutung, dass diese Polymorphismen auch mit dem Entstehungsrisiko von Non-Hodgkin-Lymphomen assoziiert seien, lies sich allerdings bisher nicht belegen [68]. In einer weiteren Arbeit fand sich allerdings ein Indiz dafür, dass rs180071 eine Rolle bei der Entwicklung von Morbus Alzheimer spielen könnte [5].

Die durch die Mutationen veränderten IL10 Werte sind auch in der Transplantationsimmunologie interessant. In einer Untersuchung über das Outcome bei Nierentransplantationen stellte sich ein schlechteres Outcome der Patienten heraus, wenn sie den Haplotypen ACC, im Vergleich zu dem Haplotypen GCC, aufwiesen [109]. Eine ähnliche Aussage fand man bei einer Studie zu hämatopoetischer Stammzelltransplantation und dem Auftreten von GvHD, denn auch hier ergaben sich günstigere Ergebnisse beim Vorhandensein des Haplotypen GCC [11]. Diese Arbeit unterstreicht die Ergebnisse von Karabon et al., die ebenfalls eine Verringerung des Risikos einer GvHD bei Vorliegen des Haplotypen GCC beim Empfänger ergab. Zusätzlich schien der Haplotyp ACC beim Spender sich ebenfalls günstig auf die Verringerung des GvHD Risikos auszuwirken [58].

Das Gen für IL12b befindet sich auf Chromosom 5 (5q31). Wir untersuchten daraus den SNP rs3212227 (A>C). Bisher fand dieser Polymorphismus Aufmerksamkeit in der Untersuchung eines eventuellen Zusammenhanges mit Psoriasis [23,24,84]. Des Weiteren wurde auch der Zusammenhang zu dem

Auftreten von Myokardinfarkten [75] und dem Überleben bei folliculären Lymphomen untersucht [27]. Während ein signifikanter Zusammenhang in Fall der Mutation mit Psoriasis festgestellt werden konnte und auch ein Einfluss auf das Outcome bei folliculären Lymphomen nachgewiesen wurden, konnte keine signifikante Assoziation zwischen rs3212227 und Myokardinfarkten beschrieben werden.

Im Bereich des Gens IFN γ , lokalisiert auf Chromosomen 12 (12q14), untersuchten wir den Polymorphismus rs2430561 (T>A). Dieser Polymorphismus liegt in der Region eines Short-Tandem-Repeats mit einer CA Basenabfolge. Untersucht wurde rs2430561 auf einen Zusammenhang mit Hepatitis C [91], subakuter sklerosierender Panenzephalitis [128] und IgA-Nephropathie [99]. Während die ersten beiden Studien keinen eindeutigen Zusammenhang zu den untersuchten Krankheiten ergaben, konnte im Falle der IgA-Nephropathie eine eindeutige Assoziation des Auftretens mit dem Vorhandensein des A-Allels gezeigt werden. In Bezug auf Transplantationen zeigte sich auch bei IFN γ ein Einfluss auf die Abstoßungsreaktion bei transplantierten Nieren. In mehreren Studien konnte aufgezeigt werden, dass der Genotyp AA sich günstig auf das Transplantat auswirkt, während das Vorliegen von T-Allelen mit einer erhöhten Abstoßungsrate verbunden war [33,61,129]. Dies ließ sich auf verschieden stark ausgeprägte Produktion von IFN γ zurückführen. Während der Genotyp TT mit einem hohen IFN γ -Spiegel korreliert war, zeigte der Genotyp AA im Vergleich niedrigere Werte und führte somit zu den besseren Prognosen. Im Kontext zu diesem SNP wurde ebenfalls der Einfluss auf lebertransplantierte Patienten untersucht und auch hier konnte ein Zusammenhang zwischen diesem SNP und dem Auftreten einer Abstoßungsreaktion nachgewiesen werden [60].

Für den Bereich des TGF β -Gens untersuchten wir zwei SNP. TGF β ist auf Chromosomen 19 (19q13) lokalisiert, der erste der beiden SNP lautete rs1982073 (C>T), der zweite SNP war rs1800471 (G>C). In bisherigen Studien

zeigten sich Zusammenhänge zwischen rs1982073 und der Entstehung einer COPD, aber auch der koronaren Herzkrankheit [26,64,115]. Neben diesen Erkenntnissen wurde auch ein modulierender Aspekt bei der Krankheitsausprägung der zystischen Fibrose beschrieben [18]. Untersuchungen, die der Frage nachgingen, inwiefern dieser Polymorphismus einen Einfluss auf Osteoporose bei Frauen hat, zeigten jedoch keinen eindeutigen Anhalt für eine Assoziation mit rs1982073 [69,76]. Rs1800471 wird in der aktuellen Studienlage zusammen mit drei weiteren, von uns nicht betrachteten, TGFb Polymorphismen und dem sich daraus ergebenden Haplotypen, hinsichtlich des Einflusses auf das Risiko für die Entstehung vom Myokardinfarkten untersucht [114]. Für die Transplantationsimmunologen wurde rs1982073 interessant, da dieser SNP Einflüsse auf Komplikationen und Abstoßungsreaktionen bei sowohl Nieren- als auch Lungentransplantierten hatte [4,74]. So nimmt TGFb Einfluss auf Lungenfibrosen und stellt so einen Risikomarker bei Lungentransplantationen dar [4].

Die letzten beiden Polymorphismen, die wir betrachteten, waren zwei SNP im Bereich des TNFa-Gens. Dieses befindet sich auf Chromosomen 6 und die untersuchten SNP lauteten rs1800629 (G>A) und rs361525 (G>A). In der Literatur wurden bisher verschiedenste Einflüsse dieser Mutationen auf Krankheitsbilder diskutiert. Der Einfluss von rs1800629 wurde in Zusammenhang mit verschiedenen Neoplasien untersucht. Während die Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs zwischen Mutationen im TNFa Genen und der Entstehung von Prostatakarzinomen keine Signifikanz ergab [36], zeigte sich jedoch eine Erhöhung des Erkrankungsrisikos bei Non-Hodgkin Lymphomen [122,123]. Weiterhin wurde das Risiko für das Auftreten von Osteoporose bei Frauen untersucht, die Träger des mutierten Alleles waren. Es wurde der Vermutung nachgegangen, ob sich durch diese Mutation ein reduziertes Risiko für Osteoporose ergab [79]. Hier zeigte sich für Patientinnen mit der homozygoten Variante eine bessere Belastbarkeit gegenüber Krafteinwirkung durch Biegung. Der zweite SNP, rs361525, zeigte in ersten Studien ein erhöhtes

Risiko für Brustkrebs bei Frauen, wenn diese die mutierte Variante des SNP im Genom trugen. Allerdings stammten diese Daten aus einer Erstuntersuchung und müssen noch auf ihre Reproduzierbarkeit hin geprüft werden [46]. Für die Transplantationsimmunologie wiederum bedeutend sind beide SNP aufgrund des nachgewiesenen Einflusses beider Mutationen auf das Auftreten einer GvHD. So belegten mehrere Studien, dass zum einen rs361525 Auswirkungen auf das Auftreten einer chronischen GvHD hat, während sich derselbe Polymorphismus bei einer akuten GvHD nicht bemerkbar machte [117]. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Wang et al. in ihrer Studie, nach der ebenfalls das Auftreten des Genotyps G/A in diesem SNP mit einer erhöhten Inzidenz von GvHD assoziiert war. Rs1800629 scheint gemäß der Studienlage Einflüsse auf den Erfolg von Nierentransplantationen zu nehmen. Als Ursache hierfür wurden unterschiedlich hohe TNF α -Serumspiegel vermutet, verursacht durch die Mutation in rs1800629 [48,83,86,90]. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch bei hämatopoetischen Stammzellspenden, bei denen der Einfluss dieses SNP ebenfalls nachgewiesen wurde [13,87]

1.5 Bedeutung der Zytokine für die Transplantationsimmunologie

Das vorausgegangene Kapitel demonstriert die Vielfalt der Fragestellungen, welche mit den von uns untersuchten SNP verknüpft sind. Gerade in der Transplantationsimmunologie besteht ein besonderes Interesse an deren Auswirkungen. Die untersuchten Zytokine haben Auswirkungen auf eine große Anzahl von immunologischen Prozessen und sind daher auch mit dem Verlauf und der Entstehung von immunologischen Erkrankungen assoziiert [38]. Durch die Entwicklung der molekularbiologischen Techniken konnten während der vergangenen Jahrzehnte eine Vielzahl von polymorphen Stellen identifiziert werden, die in Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren der Zytokingene

liegen und so unterschiedlichen Einfluss auf die Produktion selbiger nehmen [59]. Aus diesem Grund sind, je nach genetischer Anlage, einige Individuen anfälliger für inflammatorische Prozesse und die Entwicklung einer Immunantwort nach Transplantationen. So ziehen erhöhte TNFa und erniedrigte IL10 Werte eine höhere Rate an Abstoßungsreaktionen nach Herztransplantation nach sich, während hohe Werten für TNFa und IL10 bei Nierentransplantierten zu schlechteren Prognosen führten [59]. Ähnlich verhielt es sich auch beim Outcome nach Knochenmarktransplantationen. Hier zeigen die polymorphen Stellen innerhalb der Zytokingene ebenfalls Auswirkungen auf die Prognose und Entwicklung von Immunreaktionen nach Knochenmarkspenden. So wurden Polymorphismen in den Genen für IL6, IL10, IFNg und TNFa hinreichend untersucht und deren Einfluss belegt [3,12,25,59,72].

Dies schließt Graft-versus-Host-Reaktionen nach allogenetischen Knochenmarktransplantationen mit ein. Hier kommt es initial zu einer inflammatorischen Antwort und es werden IL1 und TNFa freigesetzt, die zu einer Gewebeschädigung führen. In einer zweiten Phase werden alloreaktive T-Zellen des Spenderknochenmarks aktiviert [67,78]. Erhöhte Spiegel von TNFa konnten mit schweren Komplikationen und erhöhter Mortalität nach Knochenmarktransplantation in Beziehung gebracht werden [78]. In einer klinischen Phase II Studie konnte durch die Gabe von monoklonalen TNFa-Antikörpern das Auftreten und die Schwere einer GvHD verzögert werden [53,78]. Dies ließ die Vermutung zu, dass die Produktion von TNFa beim Empfänger einer Knochenmarkspende einen Einfluss auf die Entwicklung einer GvHD hat [78]. Ein niedriger Spiegel von IL10, als Inhibitor von TNFa [66,78,93], führt zu einem erhöhten Auftreten von akuten und chronischen GvHD [78]. Die Prädispositionen von Spender sowie Empfänger führen so zu Unterschieden im Outcome der Patienten nach Transplantationen, womit deutlich wird, wie hoch der Einfluss von Zytokinen ist und welche Bedeutung diese in der Transplantationsimmunologie haben.

1.6 Fragestellung

Die Fragestellung, die dieser Arbeit zu Grunde lag, ist die Schaffung der Möglichkeit zur Etablierung einer Luminex xMAP® Carboxybead basierenden Anwendung, die es ermöglicht 22 SNP in den beschriebenen Zytokinen zu detektieren. Diese Anwendung soll in unserem Labor die bisher verwendete SSP Technologie ablösen, um einen höheren Probendurchsatz zu ermöglichen und damit schneller Typisierung bei wissenschaftlichen Fragestellungen, wie den Einfluss auf Immunreaktionen und GvHD bei Knochenmarks- und Stammzelltransplantationen, zu gewährleisten.

1.7 Entwicklungsansatz

Die Entwicklungsarbeit beschränkte sich im Wesentlichen auf drei Kernpunkte. Der erste Punkt der Entwicklung umfasste zunächst die Notwendigkeit der Etablierung von PCR-Amplifikaten für alle Gene, welche die für uns interessanten Polymorphismen tragen. Dies musste geschehen, um eine ausreichend große Menge spezifischer Amplifikate zur Verfügung stehen zu haben, um am Ende die Typisierung der SNP vornehmen zu können. Dabei war zu beachten, dass alle Amplifikate unter gleichen Bedingungen entstanden, um die Möglichkeit zu haben, diese in insgesamt drei Gruppen einteilen und im Rahmen von drei MPCR, mit jeweils sechs beziehungsweise sieben Amplifikaten, amplifizieren zu können. Der Amplifikationserfolg dieser MPCR wurde durch Sequenzierung gesichert. Zum einen wurde damit sichergestellt, dass alle der sechs beziehungsweise sieben MPCR-Produkte wie erwartet amplifiziert wurden und zum zweiten, dass es sich bei den MPCR-Produkten um korrekte, die Polymorphismen tragende Genabschnitte handelte.

Der zweite und dritte Entwicklungsschritt befassten sich mit der Kopplungsreaktion der Captureoligonukleotide an die xMAP® Carboxybeads, sowie der

eigentlichen Messung der Proben mit einem Luminex 100 IS Gerät (Fa. Luminex). Die Messung wurde in drei Teilmessungen unterteilt, die sich an den drei MPCR orientierten. Kopplungsreaktion und Messung mussten speziell für unsere Ansprüche an den Test optimiert werden. Anhand der Messung von 52 Proben, die bereits mit dem Zytokine CTS-PCR-SSP Tray Kit im Rahmen einer weiteren, in unserer Abteilung durchgeführten Studie typisiert wurden, konnte die neue Methode validiert werden. Die Kontrolle von Unstimmigkeiten zwischen Referenzmethode und der neuen Luminexmethode wurden durch Sequenzierung der betroffenen Proben überprüft.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Untersuchungsmaterial

Zur Entwicklung der MPCR, welche als Grundlage der späteren Typisierung mit Luminex diente, wurden ausschließlich Proben meiner eigenen DNA verwendet (E1). Aus dem durch Venenpunktion gewonnenem Vollblut wurde die DNA isoliert. Zur Etablierung der Hybridisierungsreaktion wurden sechs DNA Proben verwendet (K1-K6). Bei diesen Probenmaterial handelte es sich um DNA von Mitarbeitern der Abteilung Transplantationsimmunologie des IKT Ulm sowie der Abteilung Transplantationsimmunologie der Universität Heidelberg. Diese DNA-Proben wurden freiwillig von den Probanden zu Forschungszwecken abgegeben. Für die endgültige Validierung der neuen Anwendung wurden die Proben K1 bis K6, sowie 46 Proben (bezeichnet als V01-V46) verwendet. Letztere DNA-Proben stammten aus einer zeitgleich in unserem Institut durchgeführten Studie, die den Einfluss von Zytokinpolymorphismen auf eine Graft-versus-Host Reaktion (GvHD) untersuchte. Diese untersuchte die DNA-Proben aus einem Probenpanel, welches Patienten beinhaltete, die an Erkrankungen des hämatopoetischen Systems litten, und den zugehörigen Spendern, deren Knochenmark den Patienten transplantiert wurde. Die Vortypisierung dieser Proben erfolgte mittels des Zytokine CTS-PCR-SSP Tray Kit (Universität Heidelberg) und ist unter Kapitel 2.2.6 beschrieben.

Da diese zeitgleich durchgeführte Studie die selben Polymorphismen untersuchte, wie der von uns neu entwickelte Test, konnten die von uns ermittelten Ergebnisse mit denen der Parallelstudie auf Übereinstimmung verglichen werden. Da diese DNA-Proben nur in geringer Menge vorlagen und einen nicht unerheblichen wissenschaftlichen Wert besaßen, wurde die gesamte DNA mit einem kommerziell erhältlichem Reagenziensystem so vermehrt, dass

eine ausreichende Menge zur Verfügung stand und so gleichzeitig DNA-Material eingespart. Zur Vervielfältigung kam das Illustra GenomiPhi™ V2 DNA Amplification Kit (Fa. GE Healthcare) zur Anwendung.

Tabelle 1 Übersicht der verwendeten DNA Proben		
Probenbezeichnung	Identität/Herkunft	Bemerkungen
E1	Jens Putzbach	Genutzt zur Entwicklung der MPCR
K1-K6	6 freiwillige Spender unter den Labormitarbeitern	Genutzt zur Entwicklung der Hybridisierungsreaktion und Vorvalidierung
V01-V46	23 Erkrankte und 23 Knochenmarkspender einer Studienpopulation zu hämatopoetischen Erkrankungen	Genutzt zur Validierung Amplifikation mit GenomiPhi™ V2 zum Ausgleich geringer Probenmenge
DNA MPCR	Desoxyribonukleinsäure (D esoxyribonucleic acid) Polymerasekettenreaktion (M ultiplex P olymerase C hain R eaction)	

2.1.2 Konstruktion und Synthese von sequenzspezifischen PCR-Primern

Zur Bestimmung der umliegenden Gensequenzen der 22 von uns untersuchten Punktmutationen (rs1800587, rs16944, rs1143634, rs2234650, rs315952, rs2069762, rs2069763, rs2243248, rs2243250, rs2070874, rs1801275, rs1900797, rs1800795, rs1800896, rs1800871, rs1800872, rs3212227, rs2430561, rs1982073, rs1800471, rs1800629 und rs361525) in den Genen IL1a, IL1b, IL1R, IL1RN, IL2, IL4, IL4Ra, IL6, IL10, IL12b, IFN γ , TNF α und TGF β wurde die Datenbank des National Center for Biotechnology (NCBI) genutzt [131]. Anhand dieser Sequenzen erfolgt die Planung für die PCR. Die Länge der PCR-Produkte sollte insgesamt 100 bp nicht unter-, sowie 350 bp nicht überschreiten, um später im Agarosegel noch gut auftrennbar und unterscheidbar zu sein. Eine weitere Bedingung, die an die PCR-Primer gestellt wurde, war die Schmelztemperatur der Primer, die zwischen 65,0 – 66,0 °C

liegen sollte. Diese war durch das von uns verwendete PCR-Programm vorgegeben. Die rechnerische Bestimmung der Schmelztemperatur übernahm das Programm Gene Fisher2 [133]. Dies stützte sich auf die Daten einer von SantaLucia veröffentlichten Arbeit, welche sich mit der Nearest-Neighbour-Thermodynamics Theorie für Oligonukleotide beschäftigte [97]. Alle für die PCR benötigten Primer wurden mittels des Programms GeneFisher der Universität Bielefeld (Technische Fakultät, Praktische Informatik) entworfen [133]. Anhand der eingegebenen DNA-Sequenzen und unter Berücksichtigung der gewählten Parameter erstellte Gene Fisher eine Liste von möglichen Primern, die den Bedingungen entsprachen. Die letzte von uns festgelegte Bedingung für die PCR-Primer war, dass die Primer, deren Amplifikate für die spätere Nachweisreaktion an Luminex xMAP® Carboxybeads hybridisiert werden sollten, am 5' Ende über eine Biotin Modifikation verfügten, über die der Farbstoff Streptavidin-R-Phycoerythrin an das Amplifikat binden konnte.

Durch diese Vorgaben ergab sich die Notwendigkeit insgesamt 19 PCR-Amplifikate zu realisieren, um alle 22 SNP durch die PCR zu erfassen. Der Grund hierfür lag in der Entfernung der einzelnen SNP innerhalb des Genoms. Die meisten SNP lagen soweit voneinander entfernt, dass sie nicht in einem gemeinsamen PCR-Amplifikat erfasst werden konnten, ohne die vorgegebene maximale Größe der PCR-Produkte zu überschreiten. Nur in den Fällen von IL10 (rs1800871 und rs1800872), TGFb (rs1982073 und rs1800471) und TNFa (rs1800629 und rs361525) konnten jeweils zwei SNP mittels einer PCR-Reaktion erfasst werden, wodurch sich die niedrigere Gesamtanzahl der PCR-Produkte im Vergleich zu den untersuchten SNP ergab. Für jedes der insgesamt 19 geplanten Amplifikate wurden jeweils mehrere forward und reverse Primer generiert. In der Regel wurden für jeden zu untersuchenden Genort drei forward und drei reverse Primer erstellt und dann durch die Fa. Thermo synthetisiert und geliefert. Diese wurden zur Etablierung in allen möglichen forward-reverse Kombinationen unter einheitlichen Bedingungen, wie unter Kapitel 2.2.4 beschrieben, amplifiziert. Die PCR-Ergebnisse wurden später in

Tabelle 2 Übersicht der verwendeten PCR-Primer						
Gen/ Genort	Primerbe- zeichnung	Sequenz	Schmelz- temp. °C	Produkt- länge	s/ as	Biotin Modifik.
IL1a	IL1a_fw	AGG GGC ATG CCA TCA CAC CTA G	65,2088	271 bp	s	X
	IL1a_rev	TGC GTA AAG CCT CAG CCA GAA G	65,6072		as	
IL1b Lo1	IL1b_1_fw	AGC TCA TCT GGC ATT GAT CTG GTT C	65,0516	242 bp	s	X
	IL1b_1_rev	ATG TGG GAC AAA GTG GAA GAC ACA C	65,2970		as	
IL1b Lo2	IL1b_2_fw	CCG TAT ATG CTC AGG TGT CCT CCA	65,1321	184 bp	s	X
	IL1b_2_rev	CGG AGC GTG CAG TTC AGT GAT C	65,0041		as	
IL1R	IL1R_fw	TAG CGA AGT GGA GGG GGA AAG C	65,0930	147 bp	s	X
	IL1R_rev	ACA CCC AGG GGA ATG GAA GGA TG	65,3851		as	
IL1RN	IL1RN_fw	TTC CTA GGC CTC AGC TCT CAC CT	65,3813	222 bp	s	X
	IL1RN_rev	ACG CCT TCG TCA GGC ATA TTG GT	65,5991		as	
IL2 Lo1	IL2_1_fw	CTT GCT CTT GTC CAC CAC AAT ATG CT	65,8517	221 bp	s	X
	IL2_1_rev	CCC CCA AAG ACT GAC TGA ATG GAT G	65,4704		as	
IL2 Lo2	IL2_2_fw	ACA AAC AGT GCA CCT ACT TCA AGT TCT	65,3630	209 bp	s	X
	IL2_2_rev	CCT GGT GAG TTT GGG ATT CTT GTA ATT C	65,2755		as	
IL4 Lo1	IL4_1_fw	AAA ACA AGC AGG GCG GGT GGT	65,5348	181 bp	s	X
	IL4_1_rev	CTA CCT CAG TCT CCC AAA GCT CTG A	65,2047		as	
IL4 Lo2	IL4_2_fw	GGG TAA GGA CCT TAT GGA CCT GCT	65,1006	133 bp	s	X
	IL4_2_rev	GGC AGA ATA ACA GGC AGA CTC TCC TA	65,9596		as	
IL4 Lo3	IL4_3_fw	TGA TTG GCC CCA AGT GAC TGA CA	65,2053	239 bp	s	X
	IL4_3_rev	AGT TGC CGG CAC ATG CTA GCA	65,3818		as	
IL4Ra	IL4Ra_fw	AGC TCT CTG AGC CAA CCA CTG TG	65,7313	216 bp	s	X
	IL4Ra_rev	AGA AGG CCT TGT AAC CAG CCT CTC	65,7616		as	
IL6 Lo1	IL6_1_fw	CGC GGT GGC AAA AAG GAG TCA C	65,9700	184 bp	s	X
	IL6_1_rev	ACT CCA TCG CAG CCC CCC AA	65,8390		as	
IL6 Lo2	IL6_2_fw	GAC ATG CCA AAG TGC TGA GTC ACT	65,1236	184 bp	s	X
	IL6_2_rev	AGC GGG TGG GGC TGA TTG GA	65,8390		as	
A	Adenosin	IL4	Interleukin-4			
as	antisense Sequenz entspricht dem nicht kodierenden komplementärer DNA Strang	IL4Ra	Interleukin-4 Rezeptor alpha			
bp	Basenpaare	IL6	Interleukin-6			
C	Cytosin	Lo	Locus			
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic acid)	rev	reverse			
fw	forward	s	sense Sequenz entspricht dem kodierenden DNA Strang			
G	Guanin	T	Thymin			
IL1a	Interleukin-1 alpha	X	markiert den Primer, der am 5' Ende mit Biotin modifiziert wurde			
IL1b	Interleukin-1 beta					
IL1R	Interleukin-1 Rezeptor					
IL1RN	Interleukin-1 Rezeptorantagonist					
IL2	Interleukin-2					

Fortsetzung der Tabelle auf Seite 27

Fortsetzung Tabelle 2 Übersicht der verwendeten PCR-Primer von Seite 26							
Gen/ Genort	Primerbe- zeichnung	Sequenz	Schmelz- temp. °C	Produkt- länge	s/ as	Biotin Modifik.	
IL10 Lo1	IL10_1_fw	TCC TCG CCG CAA CCC AAC TG	65,5607	255 bp	s		X
	IL10_1_rev	GTT GTA AGC TTC TGT GGC TGG AGT C	65,8233		as		
IL10 Lo2	IL10_2_fw	GTT GGC ACT GGT GTA CCC TTG TAC	65,3612	315 bp	s		X
	IL10_2_rev	AAG TTC CCA AGC AGC CCT TCC AT	65,5607		as		
IL12b	IL12b_fw	GGC ATT CTC TTC CAG GTT CTG ATC C	65,2768	249 bp	s		X
	IL12b_rev	GAA GGC CCA TGG CAA CTT GAG AG	65,2828		as		
IFNg	IFNg_fw	TCG TTG CTC ACT GGG ATT TTG GAA G	65,5799	274 bp	s		
	IFNg_rev	GTT CCA AAC ATG TGC GAG TGT GTG	65,0023		as		
TGFb	TGFb_fw	TCG AGG CCC TCC TAC CTT TTG C	65,0930	244 bp	s		X
	TGFb_rev	TCC GCT TCA CCA GCT CCA TGT C	65,6072		as		
TNFa	TNFa_fw	AGA CCA CAG ACC TGG TCC CCA A	65,5608	269 bp	s		X
	TNFa_rev	ACC CAT GAG CTC ATC TGG AGG AAG	65,3675		as		
A	Adenosin		Lo	Locus			
as	antisense Sequenz entspricht dem nicht kodierenden komplementärer DNA Strang		rev	reverse			
bp	Basenpaare		s	sense Sequenz entspricht dem kodierenden DNA Strang			
C	Cytosin		T	Thymin			
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic acid)		TGFb	Transforming growth factor beta			
fw	forward		TNFa	Tumor necrosis factor alpha			
IFNg	Interferon gamma		G	Guanin			
IL10	Interleukin-10		X	markiert den Primer, der am 5' Ende mit Biotin modifiziert wurde			
IL12b	Interleukin-12 beta						

einer Agarosegelelektrophorese (siehe Kapitel 2.2.7) beurteilt. Im Anschluss wählten wir die als am besten geeignet erscheinende Primerkombination aus. Die Auswahlkriterien dabei waren einerseits deutlich abgrenzbare DNA-Banden unter UV-Licht, sowie andererseits das Fehlen von unspezifischen PCR-Produkten und Dimeren, die nicht der erwarteten PCR-Produktlänge entsprachen. Tabelle 2 auf den Seiten 26 und 27 zeigt die ausgewählten und letztlich genutzten Primerkombinationen mit deren Schmelztemperaturen und der Produktlänge für jede der 19 PCR-Reaktionen. Darüber hinaus sind die Primer angegeben, die für die spätere Nachweisreaktion mit den Luminex xMAP® Carboxybeads am 5' Ende mit Biotin modifiziert synthetisiert wurden.

2.1.3. Konstruktion und Synthese der Captureoligonukleotide

Die Captureoligonukleotide wurden als DNA-Sonden für die nachzuweisenden SNP benötigt. Für den Nachweis eines SNP wurden jeweils zwei Captureoligonukleotide benötigt, die jeweils auf eine Sorte xMAP® Carboxybeads gekoppelt wurden. Es wurde für jeden SNP ein Oligonukleotid mit der komplementären DNA-Sequenz des Wildtyps und eines mit der komplementären DNA-Sequenz der Mutation konstruiert. Diese sollten später sequenzspezifisch an die zu untersuchenden PCR-Amplifikate hybridisieren und somit die Auswertung ermöglichen. Die erste Konstruktionsbedingung aller Oligonukleotide war, dass sie eine am 5' Ende des Captureoligonukleotides platzierte Modifikation, bestehend aus einem Aminolink mit einem C12-Spacer, besaßen. Der Aminolink wurde zum Koppeln an die Oberfläche der xMAP® Carboxybeads benötigt. Der C12-Spacer gewährleistete eine entsprechende Entfernung zwischen der bindenden DNA-Sequenz und der Beadoberfläche, damit die PCR-Amplifikate ausreichend Platz zur Bindung an die Captureoligonukleotide hatten. Die zweite Konstruktionsbedingung war die Anzahl der Basen der Captureoligonukleotide. Sie sollten eine Länge von 22 bp aufweisen, um genügend Sequenzspezifität zu gewährleisten. Einzige Ausnahme bildet das Captureoligonukleotid IL1a_Cap_C, welches nur 21 bp lang war. Dies war nur der Tatsache geschuldet, dass dieses Captureoligonukleotid das erstsynthetisierte war. Die Position des SNP innerhalb des Captureoligonukleotids sollte dabei regelhaft an Position zwölf, gezählt vom 5'-Ende, liegen. Abweichungen davon zeigten das Captureoligonukleotid IL1a_Cap_C und die Captureoligonukleotide IL1b_1_Cap_T, IL1b_1_Cap_C, IL1R_Cap_T, IL1R_Cap_C, IL10_2_Cap_T, IL10_2_Cap_C, IFNg_Cap_T, IFNg_Cap_A, TGFb_2_Cap_C und TGFb_2_Cap_G. Im Falle von IFNg liegt die polymorphe Stelle asymmetrisch in Richtung des 3'-Ende verschoben, da sich der Polymorphismus in einem Short-Tandem-Repeat befindet und durch diese

Tabelle 3 Übersicht der verwendeten Captureoligonukleotide			
Zytokin/SNP	Bezeichnung Oligonukleotid	Sequenz	sense/ antisense
IL1a -899 rs1800587	IL1a_Cap_C	GCC TTC AAT G G T GTT GCC TGG	antisense
	IL1a_Cap_T	AGC CTT CAA T G A TGT TGC CTG G	antisense
IL1b -511 rs16944	IL1b_1_Cap_T	GCT GTT CTC TGC CTC A GG AGC T	antisense
	IL1b_1_Cap_C	GCT GTT CTC TGC CTC G GG AGC T	antisense
IL1b +3962 rs1143634	IL1b_2_Cap_T	TCC CAT GTG T C A AAG AAG ATA G	antisense
	IL1b_2_Cap_C	TCC CAT GTG C G AAG AAG ATA G	antisense
IL1R +1970 rs2234650	IL1R_Cap_T	GTC GAG TCT GCA A CT CCC TCG G	antisense
	IL1R_Cap_C	GTC GAG TCT GCA G CT CCC TCG G	antisense
IL1RN +11100 rs315952	IL1RN_Cap_T	GTG GTG GGG C A CTG TCT GAG C	antisense
	IL1RN_Cap_C	GTG GTG GGG C G CTG TCT GAG C	antisense
IL2 -330 rs2069762	IL2_1_Cap_T	TTT TCT TTG T C A TAA AAC TAC A	antisense
	IL2_1_Cap_G	TTT TCT TTG C T A TAA AAC TAC A	antisense
IL2 +166 rs2069763	IL2_2_Cap_T	TGT AAA TCC A G A AGT AAA TGC T	antisense
	IL2_2_Cap_G	TGT AAA TCC C G A AGT AAA TGC T	antisense
IL4 -1098 rs2243248	IL4_1_Cap_T	AAA AGA GCT A C A GTC TTA CCA A	antisense
	IL4_1_Cap_G	AAA AGA GCT C C A GTC TTA CCA A	antisense
IL4 +166 rs2243250	IL4_2_Cap_T	CAG CAC TGG G A ACA ATG TTC T	antisense
	IL4_2_Cap_C	CAG CAC TGG G G ACA ATG TTC T	antisense
IL4 -590 rs2070874	IL4_3_Cap_T	GAC AAT GTG A G A CAA TTA GTT T	antisense
	IL4_3_Cap_C	GAC AAT GTG G A CAA TTA GTT T	antisense
IL4Ra +1902 rs1801275	IL4R_Cap_A	GTA CAA ACT C T GAT AGC CAC T	antisense
	IL4R_Cap_G	GTA CAA ACT C C GAT AGC CAC T	antisense
IL6 nt565 rs1800797	IL6_1_Cap_A	CTG CCT GGC C A T CCT CAA ATT T	antisense
	IL6_1_Cap_G	CTG CCT GGC C A C CCT CAA ATT T	antisense
IL6 -174 rs1800795	IL6_2_Cap_C	TCC TTT AGC G A GCA AGA CAC A	antisense
	IL6_2_Cap_G	TCC TTT AGC C A GCA AGA CAC A	antisense
IL10 -1082 rs1800896	IL10_1_Cap_A	CCT ACT TCC C T TCC CAA AGA A	antisense
	IL10_1_Cap_G	CCT ACT TCC C C TCC CAA AGA A	antisense
A	Adenosin	IL1RN	Interleukin-1 Rezeptorantagonist
antisense	Sequenz entspricht dem nicht kodierenden komplementären DNA Strang	IL2	Interleukin-2
bp	Basenpaare	IL4	Interleukin-4
C	Cytosin	IL4Ra	Interleukin-4 Rezeptor alpha
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic acid)	IL6	Interleukin-6
G	Guanin	IL10	Interleukin-10
IL 1a	Interleukin	sense	Sequenz entspricht dem kodierenden DNA Strang
IL1b	Interleukin-1 beta	SNP	Punktmutation (Single Nucleotide Polymorphism)
IL1R	Interleukin-1 Rezeptor	T	Thymin
Rot markiert die Stelle des SNP innerhalb der Captureoligonukleotidsequenz			
Fortsetzung der Tabelle auf Seite 30			

Fortsetzung Tabelle 3 Übersicht der verwendeten Captureoligonukleotide von Seite 29			
Zytokin/SNP	Bezeichnung Oligonukleotid	Sequenz	sense/ antisense
IL10 -819 rs1800871	IL10_2_Cap_T	GGC ACA GAG AT A TTA CAT CAC C	antisense
	IL10_2_Cap_C	GGC ACA GAG AT G TTA CAT CAC C	antisense
IL10 -592 rs1800872	IL10_3_Cap_A	CCC CGC CTG T AC TGT AGG AAG C	sense
	IL10_3_Cap_C	CCC CGC CTG T CC TGT AGG AAG C	sense
IL12b -1188 rs3212227	IL12b_Cap_A	CAT TTA GCA T CT AAC TAT ACA A	antisense
	IL12b_Cap_C	CAT TTA GCA T CG AAC TAT ACA A	antisense
IFN γ UTR5644 rs2430561	IFN γ _Cap_T	ACA ACA CAA AAT CAA ATC T CA C	sense
	IFN γ _Cap_A	ACA ACA CAA AAT CAA ATC ACA C	sense
TGFb Codon 10 rs1982073	TGFb_1_Cap_T	GTA GCA GCA G CA GCA GCA GCC G	antisense
	TGFb_1_Cap_C	GTA GCA GCA G CG GCA GCA GCC G	antisense
TGFb Codon 25 rs1800471	TGFb_2_Cap_C	ACG CCT GGC CG CCG GCC GCG G	sense
	TGFb_2_Cap_G	ACG CCT GGC CG CCG GCC GCG G	sense
TNFa -308 rs1800629	TNFa_1_Cap_A	GAA CCC CGT C CT CAT GCC CCT C	antisense
	TNFa_1_Cap_G	GAA CCC CGT C CC CAT GCC CCT C	antisense
TNFa -238 rs361525	TNFa_2_Cap_A	CCT CCC TGC T CT GAT TCC GAG G	antisense
	TNFa_2_Cap_G	CCT CCC TGC T C GAT TCC GAG G	antisense
A antisense	Adenosin Sequenz entspricht dem nicht Kodierenden komplementärer DNA Strang	IL12b sense	Interleukin-12 beta Sequenz entspricht dem kodierenden DNA Strang
bp	Basenpaare	SNP	Punktmutation (Single nucleotide P olymorphism)
C	Cytosin	T	Thymin
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribo nucleic a cid)	TGFb	Transforming Growth Factor beta
G	Guanin	TNFA	Tumor Necrosis Factor alpha
IFNγ	Interferon gamma		
IL 10	Interleukin-10		
Rot markiert die Stelle des SNP innerhalb der Captureoligonukleotidsequenz			

verschobene Position die Bindungsspezifität erhöht werden sollte. In den Fällen, in denen zwei SNP innerhalb eines PCR-Produktes nachgewiesen werden sollten, erfolgte der Nachweis für das eine SNP auf dem kodierenden Strang, die des zweiten SNP auf dem komplementären Strang, um eine gegenseitige Behinderung der Captureoligonukleotide zu verhindern. Alle Captureoligonukleotide wurden von der Fa. Metabion München synthetisiert. Sequenzen, Lokalisation des SNP innerhalb der Captureoligonukleotide sind in Tbl. 3 auf dieser und der vorangehenden Seite abgebildet.

2.1.4 Chemikalien

In Tabelle 4 sind alle Chemikalien verzeichnet, die bei der Entwicklung und der Durchführung aller Arbeitsschritte benötigt wurden. Abgebildet sind die genaue Bezeichnung und die Firma, über welche die Reagenzien bezogen wurden.

Tabelle 4 Verwendete Chemikalien		
Bezeichnung	Chemisches Zeichen/Substanz (Summenformel)	Firma
Ammoniumsulfat	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Sigma, Steinheim
Borsäure	H_3BO_3	Sigma, Steinheim
Cresolrot	o-Cresolsulfonphthalein ($\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_5\text{S}$)	Sigma, Steinheim
dNTP Set 100 mMol/l Desoxyribonukleosidtriphosphat	dATP, dTTP, dCTP und dGTP (Desoxyadenosintri-phosphat, Desoxythymidintri-phosphat, Desoxycytidintri-phosphat, Desoxy-guanosintri-phosphat)	Sigma, Steinheim
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid ($\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_3$)	Pierce Biotechnologie, Rockford USA
EDTA Triplex III	Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt
Ethanol 96 % und 70 %	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	Sigma, Steinheim
Ethidiumbromid	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{BrN}_3$	Fisher scientific, Schwerte
Glycerin	1,2,3-Propantriol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$)	Sigma, Steinheim
HiDi-Formamid	CH_3NO	Applied Biosystem, Foster City USA
LE Agarose	Agarose	Biozym, Hamburg
LiChromosolv/Chromatographie-wasser	H_2O	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	MgCl_2	Merck, Darmstadt
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}$)	Sigma, Steinheim
Natriumacetat	CH_3COONa	Sigma, Steinheim
Natriumhydroxid	NaOH-Pellets	Sigma, Steinheim
Salzsäure 37%	HCl	Sigma, Steinheim
Sarkosyl	Natrium-N-lauroylsarkosinat ($\text{C}_{15}\text{H}_{28}\text{NO}_3\text{Na}$)	Sigma, Steinheim

Fortsetzung der Tabelle auf Seite 32

Fortsetzung der Tabelle 4 Verwendete Chemikalien von Seite 31		
Bezeichnung	Chemisches Zeichen/Substanz (Summenformel)	Firma
SDS 10%	Natriumdodecylsulfat (C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S)	Sigma, Steinheim
Streptavidin 1mg/ml	Streptavidin-R-phycoerythrin Lösung	Molecular Probes, Eugene USA
TMAC 5 mol/l	Tetramethylammoniumchlorid (C ₄ H ₁₂ ClN)	Sigma, Steinheim
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Merck, Darmstadt
Tris EDTA 100x Concentrate pH 8,0	1 mol/l 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol - HCl, pH 8,0 / 0.1 mol/l Ethylendiamintetraessig- säure	Sigma, Steinheim
Tris HCl 1M pH 8,0	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol - HCl, pH 8,0	Sigma, Steinheim
Tween 20	Poly(oxy-1,2-ethandiyl)-monododekansäure- sorbitylester (C ₁₈ H ₃₄ O ₆)	Sigma, Steinheim
Ultra Pure EDTA 0,5 M	Ethylendiamintetraessigsäure (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈)	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.5 Puffer und Gebrauchslösungen

Für das Herstellen der Puffer und Gebrauchslösungen wurden verschiedene Glasmesskolben, eine Accu Jet Pro Pipette (Fa. Brand) mit entsprechenden Glasspitzen, sowie die Eppendorf Research Mikropipetten 100 µl und 1000 µl (Fa. Eppendorf) verwendet. Feste Substanzen wurden mit der Navigator Waage (Fa. OHAUS) abgewogen.

2.1.5.1 PCR-Reaktionspuffer

Der PCR-Reaktionspuffer basiert auf einem in unserem Institut etablierten Mischungsverhältnis und wurde für alle PCR und MPCR verwendet. Der Reaktionspuffer besteht aus 10x Sulfatpuffer, 20 nmol/l dNTP Lösung, 0,1 mol/l MgCl₂ Lösung und einem 50% Glycerin-Farbstoffgemisch.

Tabelle 5 Lösungen für PCR-Reaktionspuffer		
Lösung	Reagenzien	Masse/Volumen
10x Sulfatpuffer		500 ml
	Tris	40,568 g
	Ammonium-Sulfat	10,960 g
	Tween 20	0,50 ml
	37% HCl Lösung	5,00 ml
	Chromatographiewasser	494,50 ml
0,1 mol/l MgCl ₂ Lösung		1000 ml
	MgCl ₂	20,330 g
	Chromatographiewasser	1000,00 ml
20 mM dNTP Lösung		20 ml
	dNTPs-Set (jeweils 1ml dATP, dCTP, dGTP und dTTP)	4,00 ml
	Chromatographiewasser	16,00 ml
Cresolrot-Stammlösung		120 ml
	Cresolrot	1,200 g
	Chromatographiewasser	120,00 ml
50% Glycerin-Farbstoff-lösung		500 ml
	Glycerin	315,00 g
	Cresolrot-Stammlösung	55,00 ml
	Chromatographiewasser	195,00 ml
PCR	Polymerasekettenreaktion (P olymerase C hain R eaction)	
dNTP	D esoxynukleosid t riphosphat	
dATP	D esoxyadenosin t riphosphat	
dCTP	D esoxycytidin t riphosphat	
dGTP	D esoxyguanosin t riphosphat	
dTTP	D esoxythymidin t riphosphat	
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	
Tween 20	Poly(oxy-1,2-ethandiyl)-monododekansäure-sorbitylester (C ₁₈ H ₃₄ O ₆)	

Tabelle 6 PCR-Reaktionspuffer	
Reagenzien	Volumen
10x Sulfatpuffer	37,70 ml
0,1 M MgCl ₂ Lösung	18,90 ml
20 mM dNTP Lösung	5,70 ml
50% Glycerin-Farbstofflösung	37,70 ml
Gesamtvolumen:	100 ml
PCR	Polymerasekettenreaktion (P olymerase C hain R eaction)
dNTP	D esoxynukleosid t riphosphat

Die Zusammensetzung der Grundlösungen geht aus Tabelle 5 auf Seite 33 hervor, während Tabelle 6 auf Seite 33 das Mischungsverhältnis der Grundlösungen im letztlich verwendeten PCR-Reaktionspuffer wiedergibt. Der PCR-Reaktionspuffer wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.1.5.2 Boratpuffer für die Gelelektrophorese

Für das Gießen von Agarosegelen und das Befüllen der Elektrophoresekammer wurde 1x Boratpuffer benötigt, der durch Verdünnen von 10x Boratpuffer hergestellt wurde. Die Zusammensetzung beider Puffer sind in den Tabellen 7 und 8 auf dieser Seite folgend zu finden.

Tabelle 7 10x Boratpuffer für die Gelelektrophorese	
Reagenzien	Volumen
Tris	544,6 g
Borsäure	278,0 g
EDTA Triplex III	46,52 g
destilliertes Wasser	5000 ml
Gesamtvolumen:	5000 ml
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

Tabelle 8 1x Boratpuffer für die Gelelektrophorese	
Reagenzien	Volumen
10x Boratpuffer	250 ml
Destilliertes Wasser	2250ml
Gesamtvolumen	2500 ml

2.1.5.3 Pufferlösungen für die Beadkopplung

Für die Kopplung der C12-Aminolink modifizierten Captureoligonukleotide an die xMAP® Carboxybeads von Luminex wurde zunächst ein Hybridisierungspuffer benötigt. Für das Aufreinigen nach der Hybridisierung setzten wir zwei verschiedene Waschpuffer ein. Die fertigen Beads wurden in einem Lagerpuffer resuspendiert. Die Zusammensetzung der Puffer sind in Tabelle 9 ersichtlich [132].

Tabelle 9 Gebrauchslösungen für Beadkopplung		
Lösung	Reagenzien	Masse/Volumen
0,1 M MES pH 4,5 Kopplungs-Puffer		250 ml
	MES	4,880 g
	5 mol/l NaOH Lösung	5 Tropfen
	Chromatographiewasser	250,00 ml
0,02% Tween Waschpuffer I		250 ml
	Tween 20 Lösung	50,00 µl
	Chromatographiewasser	250,00 ml
0,1% SDS Waschpuffer II		250 ml
	SDS 10% Lösung	2,50 ml
	Chromatographiewasser	247,50 ml
TE pH 8,0 Lagerpuffer		250 ml
	Tris EDTA Puffer pH 8,0 Lösung	2,5 ml
	Chromatographiewasser	47,50 ml
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure (C ₆ H ₁₃ NO ₄ S)	
Tween 20	Poly(oxy-1,2-ethandiyl)-monododekansäure-sorbitylester (C ₁₈ H ₃₄ O ₆)	
SDS	Natriumdodecylsulfat (C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S)	
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	
NaOH	Natriumhydroxyd	
TE	Tris-EDTA	

2.1.5.4 Pufferlösung für die Hybridisierungsreaktion

Für die Hybridisierung der PCR-Produkte mit den Beads und die anschließende Analyse wurden 1,5x TMAC Hybridisierungspuffer und 1,0x TMAC Analysepuffer verwendet. Für die Verdünnung der PCR-Produkte wurde ein Probenpuffer genutzt. Alle Puffer in ihrer Zusammensetzung sind in Tabelle 10 zu finden [132].

Tabelle 10 Gebrauchslösungen für Hybridisierungsreaktion		
Lösung	Reagenzien	Masse/Volumen
20% Sarkosyl Lösung		250 ml
	Sarkosyl	50,0 g
	Chromatographiewasser	250 ml
1,5x TMAC Hybridisierungspuffer		250 ml
	5 mol/l TMAC Lösung	225,00 ml
	20% Sarkosyl Lösung	1,88 ml
	1 mol/l Tris HCl pH 8,0 Lösung	18,75 ml
	0,5 mol/l EDTA pH 8,0 Lösung	3,0 ml
	Chromatographiewasser	1,37 ml
1,0x TMAC Analysepuffer		250 ml
	5 mol/l TMAC Lösung	150,00 ml
	20% Sarkosyl Lösung	1,25 ml
	1 mol/l Tris HCl pH 8,0 Lösung	12,50 ml
	0,5 mol/l Lösung EDTA pH 8,0	2,0 ml
	Chromatographiewasser	84,25 ml
TE pH 8,0 Probenpuffer		250 ml
	Tris EDTA Puffer pH 8,0	2,5 ml
	Chromatographiewasser	47,50 ml
TMAC	Tetramethylammoniumchlorid (C ₄ H ₁₂ ClN)	
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	
TE	Tris-EDTA	

2.1.6 Verwendete kommerziell erhältliche Reagenzsysteme und Enzyme

Für die Isolierung der DNA Proben, die PCR, das Aufreinigen und Sequenzieren der PCR-Produkte, die genomische Vervielfältigung der DNA-Proben, die Gelelektrophorese, sowie die Typisierung der DNA Proben zur Validierung wurden kommerziell erhältliche Reagenzsysteme (Kits), beziehungsweise Enzyme und DNA-Längenmarker verwendet, wie sie auch in unserer Routinediagnostik Anwendung finden. Die Übersicht der verwendeten Reagenzien gibt Tabelle 11 auf dieser Seite wieder.

Tabelle 11 Verwendete kommerziell erhältliche Reagenzsysteme und Enzyme		
Bezeichnung	Firma	
QIAmp Blood Micro Kit	Quiagen	Hilden
Exosap It Clean Up	USB Corp.	Cleveland USA
BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems	Foster City USA
CTS-SSP Zytokine Kit	Universität Heidelberg Abteilung für Transplantationsgenetik	Heidelberg
Illustra GenomiPhi V2	GE Healthcare	München
Olerup DNA Size Marker	Genovision/Quiagen	Vienne Österreich
Taq DNA Polymerase	Quiagen	Hilden

2.1.7. Geräte

In Tabelle 12 auf den folgenden beiden Seiten sind alle genutzten Geräte aufgeführt, die während Entwicklung und Versuchsdurchführung zum Einsatz kamen. Die Geräte sind nach den Arbeitsschritten sortiert aufgelistet, bei welchen sie verwendet wurden.

Tabelle 12 Verwendete Geräte		
Arbeitsschritt	Gerät	Firma
Herstellung von Gebrauchslösungen	Micropipette Research 100 µl und 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
	Navigator Waage	Ohaus, Pine Brook USA
	Pipette Accu Jet Pro	Brand, Wertheim
Lagerung	Profiline Kühl- und Tiefkühlschrank(-20 °C)	Liebherr Ochsenhausen
	Tiefkühltruhe -70°C	Revco, Asheville USA
DNA Isolierung und Konzentrationsmes- sung	Micropipetten Research 100 µl und 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
	Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg
	Spectrometer DU640	Beckmann, München
	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
	Vortex Genie	Bender & Hobein AG, Zürich Schweiz
	Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus, Hanau
	Zentrifuge Variofuge K	Heraeus, Hanau
PCR/MPCR	Micropipetten Research 2,5 µl, 10 µl, 100 µl und 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
	Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg
	PCR System 9700	GeneAmp, Foster City USA
	Vortex Genie	Bender & Hobein AG, Zürich Schweiz
Gelelektrophorese	Accura 853 8 Kanalpipette	Socorex, Isba Schweiz
	Electrophoresis Power Supply EPS 300	Amersham Pharma- cia Biotech, Frei- burg
	Elektrophoresekammer	Protrans, Ketsch am Rhein
	Fotografiereinheit	MWG Biotech, Ebersberg
	Mikrowelle Micromat	AEG, Nürnberg
Fortsetzung der Tabelle auf Seite 39		

Fortsetzung der Tabelle 12 Verwendete Geräte von Seite 38		
Arbeitsschritt	Gerät	Firma
Gelelektrophorese	Navigator Waage	Ohaus, Pine Brook USA
	UV Transilluminator	UVP Inc., Cambridge UK
Aufreinigung und Sequenzierung	3730 DNA Analyzer	Applied Biosystems, Foster City USA
	Accura 855 5-50 µl 8 Kanalpipette	Socorex, Isba Schweiz
	Micropipette Research 10 µl, 100 µl und 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
	Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
	PCR System 9700	GeneAmp, Foster City USA
	Vortex Genie	Bender & Hobein AG, Zürich Schweiz
	Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau
Beadkopplung	Micropipetten Research 10 µl, 100 µl und 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
	Navigator Waage	Ohaus, Pine Brook USA
	Vortex Genie	Bender & Hobein AG, Zürich Schweiz
	Zentrifuge Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Luminex Auswertreaktion	8 Kanal Micropipette Refference 10 µl	Eppendorf, Hamburg
	12-pette 20-200 µl	Corning Costar Corp., Acton USA
	e300 Pipette 10-300 µl	Biohit, Rosbach v.d. Höhe
	Luminex 100 IS (Liquichip)	Quiagen, Hilden
	Micropipetten Research 10 µl, 100 µl und 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
	PCR System 9700	GeneAmp, Foster City USA
	Pipette Proline 50-1200 µl	Biohit, Rosbach v.d. Höhe
	Magnetschüttler Monoshake	Carl Roth, Karlsruhe
	Vortexgerät Reax Top	Heidoplph, Schwabach
	Centrifuge 2-5	Sigma, Steinheim

2.1.8. Software

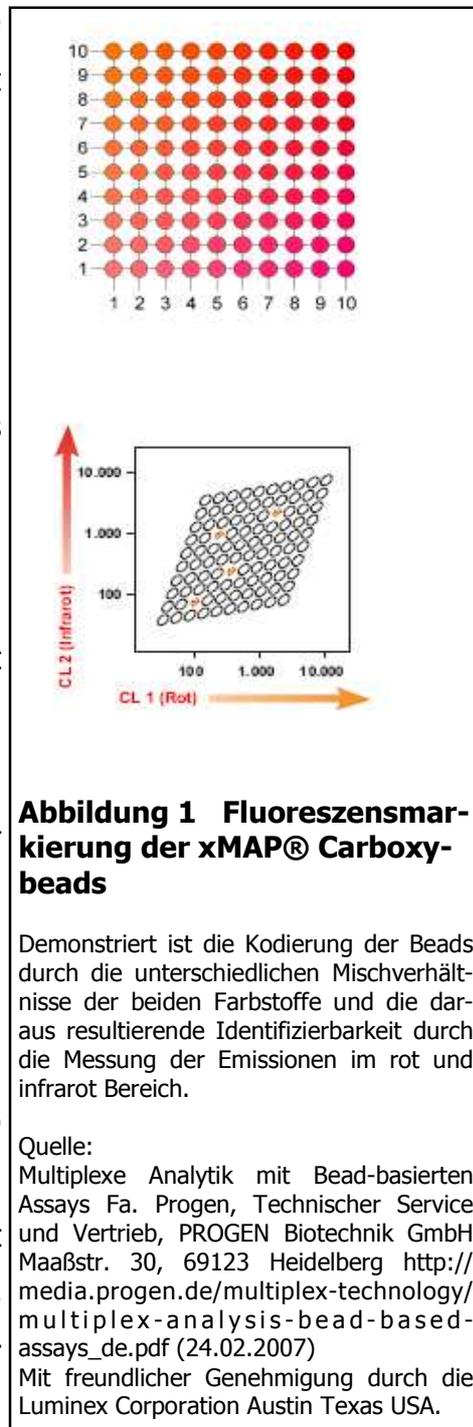
Zur Dokumentation und Auswertung benutzen wir Microsoft Office 2007, sowie den Microsoft Publisher 2007. Die Bearbeitung von Bildmaterial erfolgte mit dem von der Fa. Arcsoft vertriebenen PhotoStudio 2000. Für die Suche der umgebenden Gensequenzen der zu untersuchenden SNP wurden die Internetdatenbank des National Center for Biotechnology im Internet verwendet. Die Erstellung der Primer und Berechnung der Schmelztemperaturen erfolgte über das Programm Gene Fisher2 der Universität Bielefeld, welches ebenfalls über das Internet zugänglich war. Der 3730 DNA Analyser, der zum Sequenzieren verwendet wurde, arbeitete mit der Data Collection Software 3.0, die im Lieferumfang enthalten war. Die Ergebnisse der Sequenzierung sind mit dem Programm Sequenzing Analysis v.5.2 ausgewertet und visualisiert worden. Die Datenaufnahme mit dem Luminex 100 IS wurde mittels der mitgelieferten Software Luminex IS Software v 2.3.182 betrieben. Tabelle 13 auf dieser Seite bildet eine Übersicht der Programme ab.

Tabelle 13 Verwendete Software		
Bezeichnung	Firma	
Luminex IS 100 2.3.182	Luminex Corp, Austin USA	Gerätetreiber Luminex IS 100 Gerät
Datacollection Software 3.0	Applied Biosystems	Gerätetreiber DNA Analyser
MS Office 2007	Microsoft Deutschland Unterschleißheim	Dokumentation
MS Publisher 2007	Microsoft Deutschland Unterschleißheim	Dokumentation
PhotoStudio 2000	Arcsoft, Fremont USA	Bildbearbeitung
Sequenzing Analysis v.5.2	Applied Biosystems, Foster City USA	Analyse DNA-Sequenzen
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp	National Center for Biotechnology Information U.S. National Library of Medicine, Bethesda USA	Internetdatenbank
http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher2/	Universität Bielefeld Technische Fakultät Praktische Informatik	Programm zur DNA-Primererstellung

2.2 Methoden

2.2.1 Funktionsweise der Luminex xMap® Carboxybeads

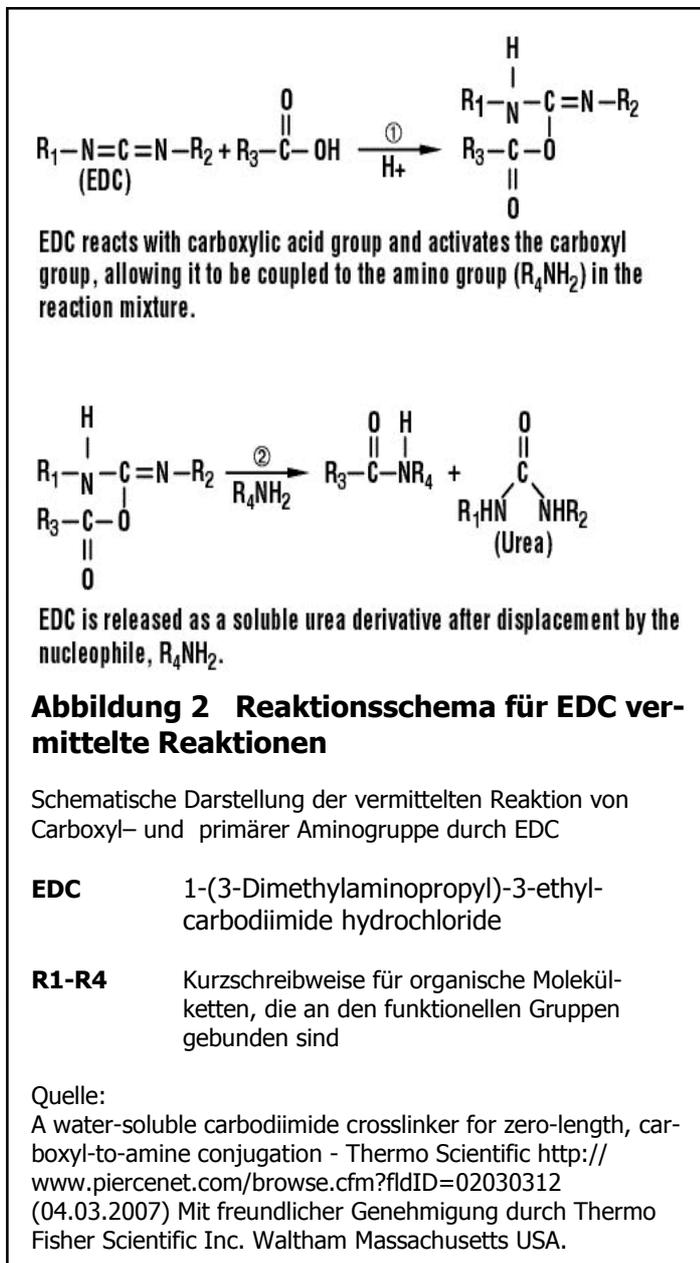
Die xMAP® Carboxybead Technologie kombiniert fluoreszenzmarkierte Partikel mit der Technik einer Durchflusszytometrie. Bei den von der Firma Luminex gelieferten xMAP® Carboxybeads handelt es sich um sphärisch geformte Polystyrolpartikel, deren Größendimension sich im Mikrometerbereich bewegen [29]. Die Partikel, die auch als Beads bezeichnet werden, wurden mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, wovon jeder dieser Farbstoffe verschiedene Teile des Farbspektrums emittiert (Rot und Infrarot) [35]. Durch Kombination der zwei Farbstoffe, die jeweils in zehn verschiedenen Konzentrationsstufen vorliegen, ergaben sich daraus 100 spektral unterscheidbare Schattierungen, wodurch insgesamt 100 verschiedene Beadpopulationen (Beadklassen) entstanden. Diese Tatsache ermöglicht es, dass innerhalb eines einzigen Testansatzes die Analyse von bis zu 100 verschiedenen Items möglich ist [17,35]. Nebenstehende Abb. 1 gibt das Prinzip der Fluoreszenzmarkierungen wieder [134].



Die zweite bedeutende Eigenschaft der Beads ist die Beschaffenheit der Beadoberfläche. Auf dieser finden sich zahlreiche primäre Carboxylgruppen

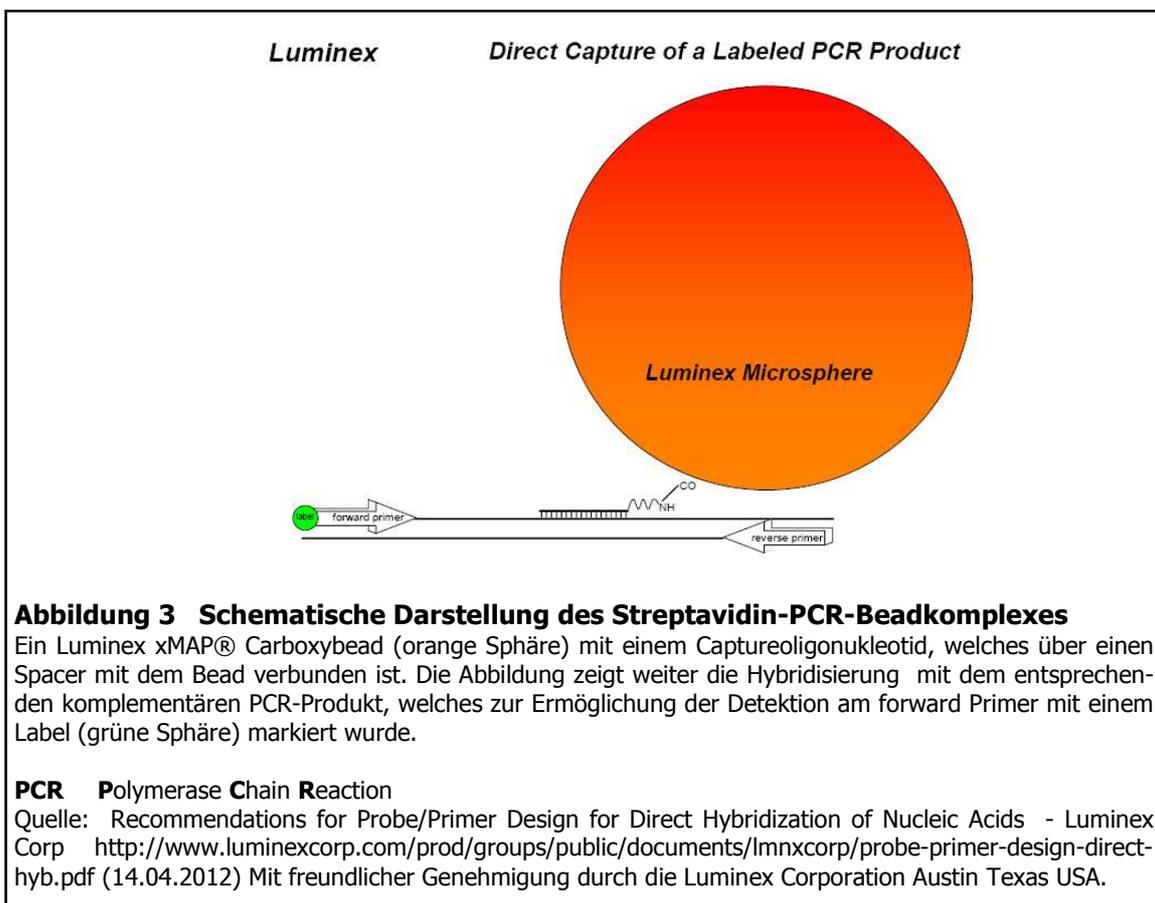
(COOH). Diese erlauben es auf einfache Weise Liganden auf der Beadoberfläche zu binden, die als Detektionsmolekül der eigentlichen Nachweisreaktion dienen. Diese Nachweismoleküle können je nach geplanter Anwendung synthetisierte DNA Sonden sein (Captureoligonukleotide), die sequenzspezifisch, komplementär an die zu untersuchenden DNA Sequenzen binden können, welche durch PCR amplifiziert wurden. Neben der Möglichkeit Captureoligonukleotide für molekulargenetische Untersuchungen zu binden, können auch Antikörper, Enzyme oder Rezeptoren gebunden werden. Damit ist auch die Bestimmung von spezifischen Antigenen oder anderen Substraten in zu untersuchenden Proben

möglich. Zur Bindung von Captureoligonukleotiden, wie in unseren speziellen Fall, bedurfte es einer primären Aminogruppe am 5' Ende der Captureoligonukleotide. Zur Verbesserung der späteren Bindungsfähigkeit bei der Hybridisierung an PCR-Produkte musste zwischen der Aminogruppe und dem Captureoligonukleotid ein Spacer liegen, der aus einem Kohlenstoffgerüst von 12 Atomen besteht (C12-Spacer). Die Bindung zwischen den Carboxygruppen und der primären Aminogruppe wurde durch die Chemikalie EDC vermittelt. Hierbei aktiviert das EDC die Carboxylgruppe, so



dass der aktivierte Carboxyl-EDC-Komplex mit der endständigen Aminogruppe des am Captureoligonukleotid befindlichen Spacers reagieren kann. Im zweiten Reaktionsschritt erfolgt dann die kovalente, chemische Bindung der beiden funktionellen Gruppen, unter Abspaltung des EDC-Rest in Form eines Harnstoffderivates. Abbildung 2 auf der vorangegangenen Seite zeigt das Reaktionsschema [130]. Zum Nachweis einer Bindung zwischen den Beads und dem nachzuweisenden Analyten wird ein Reportermolekül benötigt, welches zusammen mit dem Bead während der Messung detektiert werden muss, um eine erfolgreiche Nachweis führen zu können. Dieses Reportermolekül emittiert Licht im Bereich des grünen Farbspektrums und ist somit von den Fluoreszenzeigenschaften der Beadmarkierungen eindeutig zu unterscheiden.

Im Falle von molekulargenetischen Untersuchungen, die wie in unserem Fall die Analyse von SNP zum Ziel haben, wird als Reportermolekül Streptavidin-R-Phycoerythrin verwendet. Für die Messung muss die Möglichkeit bestehen, die zu untersuchende DNA markieren zu können. Da dies mit nativer DNA nicht problemlos möglich ist, muss zuvor von der zu untersuchenden Genregion eine PCR angefertigt werden. Bei dieser wurden entweder der forward oder reverse

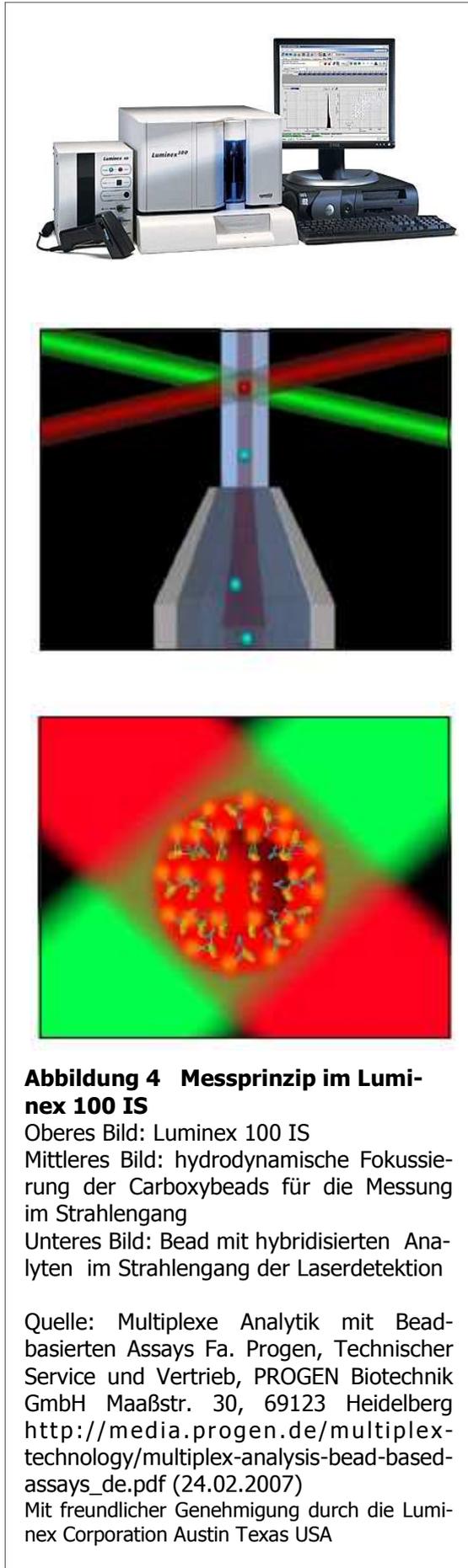


PCR-Primer so synthetisiert, dass sich an deren 5'-Ende eine Biotinmodifikation befindet. Diese erlaubt es, dass Streptavidin-R-Phycoerythrin an das Biotin binden kann und so ein Streptavidin-PCR-Amplifikatkomplex entsteht [37]. Abbildung 3 auf Seite 43 zeigt schematisch den Streptavidin-PCR-Beadkomplex [135]. Ein solcher entstandener Beadkomplex kann nach abgeschlossener Hybridisierung mit dem Luminex 100 IS Gerät analysiert werden.

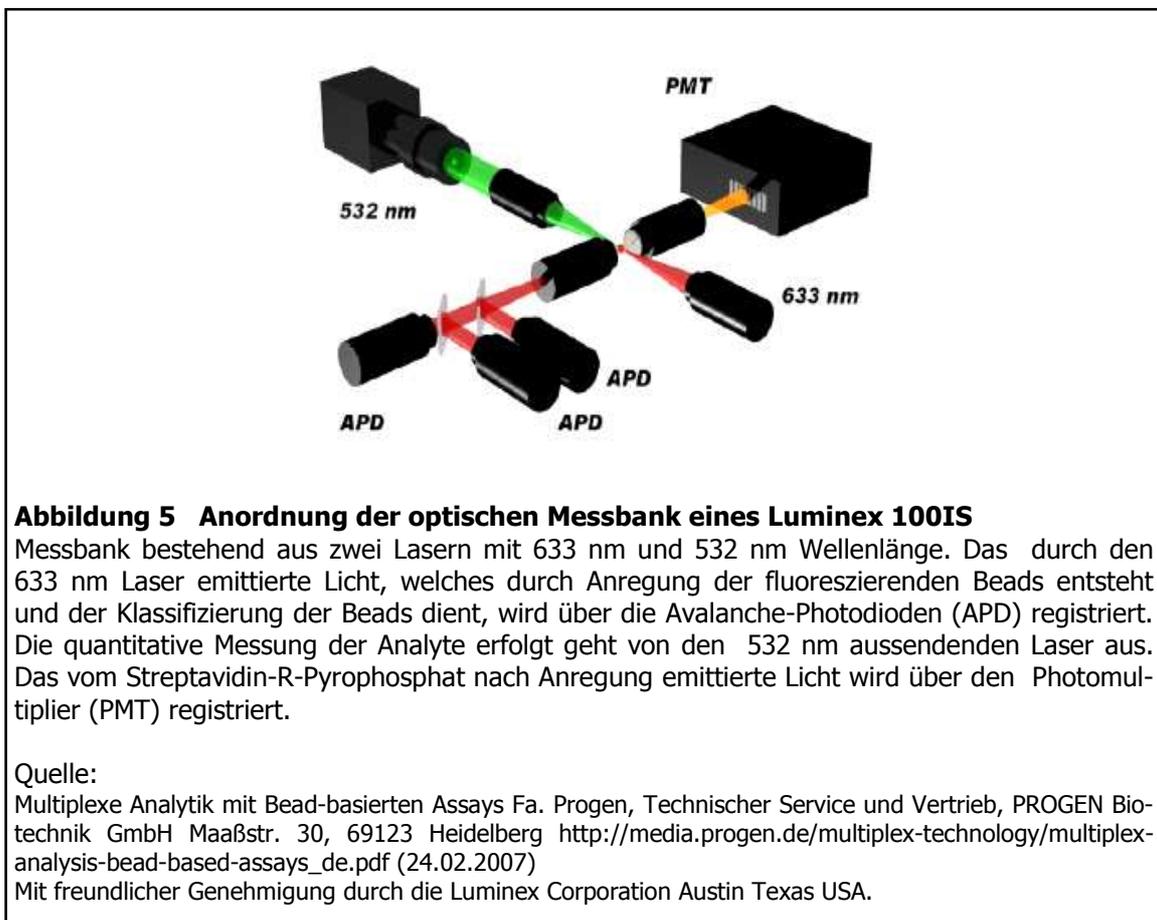
Das für die Analyse der auf Beadtechnologie basierenden Assays genutzte Luminex 100 IS nutzt zwei Laser, die die Assays im Verfahren einer Durchflusszytometrie messen. Für die Assays werden 96-Well Platten, die auf dem XY-System gründen, verwendet, so dass 96 Proben vollautomatisch auf einmal analysiert werden können [29]. Hierzu werden die Proben nacheinander mittels einer Kolbenpumpe aus den Wells evakuiert und in eine Messküvette geleitet. In dieser wird die Probe hydrodynamisch fokussiert, indem die Probe mit einer Mantelflüssigkeit umspült wird, sodass eine wirbelfreie laminare Strömung entsteht, die es ermöglicht, dass die Beadkomplexe einzeln und präzise durch die Laserdetektion geführt werden können. Für die Detektion der Beads und die Quantifizierung der Analyte wurden zwei Festkörperlaser verbaut, die in einer optischen Bank angeordnet sind. Die Laser sind auf den Probenstrom fokussiert und regen die Fluoreszenzfarbstoffe der Beads und des Reportermolekül an. Diese emittieren senkrecht zu den einfallenden Laserstrahlen ihrerseits Licht, in der für die Farbstoffe spezifischen Wellenlänge. Dieses Prinzip ist in Abbildung 4 auf der folgenden Seite verdeutlicht [134]. Das emittierte Licht wird über Spiegel und Filter zu entsprechenden Detektoren geleitet. Die Detektoren wandeln das Licht wiederum in ein Messsignal um. Die erste Laserdiode arbeitet mit einer Wellenlänge von 633 nm und wird zur Erkennung der Beads verwendet, indem sie die in den Mikrosphären verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe anregt und diese daraufhin Licht in einem Wellenlängenbereich von 645-669 nm und bei >712 nm emittieren. Die unterschiedlichen gemessenen Signalverhältnisse, die aus den verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffkonzentrationen in den Carboxybeads resultieren, machen

die Detektion und Unterscheidung der verschiedenen Beadpopulationen möglich. Zusätzlich erfolgt durch eine zusätzliche Photodiode eine Messung der Seitwärtsstreuung, um die Partikelgröße bestimmen zu können. Durch diese Methode können fluoreszierende Verunreinigungen oder unspezifisch verbundene Beadaggregate herausgefiltert werden.

Zur Quantifizierung der gebundenen Analyten wird ein Yttrium-Argon-Germanium Feststofflaser verwendet. Dieser arbeitet mit einer Wellenlänge von 532 nm und regt den Fluoreszenzfarbstoff der Reportermoleküle an, so dass diese Licht emittieren. Der Farbstoff des Reportermoleküls muss Licht mit einer Wellenlängen im Bereich von 563-587 nm emittieren, um detektiert werden zu können. Die Intensität dieses emittierten Signals ist direkt proportional zu der an die Beads gebundenen Anzahl von Analyten und erlaubt so eine Aussage über die in der Probe vorhandene Menge des Analyten. Die Messung des Lichtsignals erfolgt mittels eines Photomultipliers. Die Signalverarbeitung erfolgt in der Zusammenbetrachtung aller gemessenen Signale. Die Photodioden



ermitteln die Beadklassifizierung und den Größenausschluss bei Verunreinigungen. Die im Photomultiplier gemessene Signalstärke liefert das Ergebnis über die Menge der gebundenen Analyten. Die im Analysegerät empfangene Signale werden digitalisiert und in einen Signalprozessor geleitet, welcher die angefallenen Messwerte verstärkt und verarbeitet. Auf diese Weise kann das Luminex 100 IS Analysesystem bis zu 20.000 Messereignisse pro Sekunde verarbeiten. Abb. 5 auf dieser Seite zeigt schematisch die Anordnung der Laser- und Photodioden, welche die Lichtsignale messen [134].



Die Analyse von Mutationen anhand der xMAP® Carboxybeadtechnologie wurde bereits für die Typisierung von Genveränderungen außerhalb des Bereichs der Zytokingene angewandt. Exemplarisch sind folgend einige Anwendungen aufgeführt, die sich dieser von Luminex angebotenen Technologie bedienen. So wurden beispielsweise Hämoglobinopathien bei Neugeborenen mittels Luminex xMAP® Carboxybeads aus getrockneten Blutproben diagnostiziert, mit dem Ziel

diesen Test auch beim Neugeborenenenscreening einsetzen zu können [31]. Eine weitere Verwendung fand die Technik von Luminex in der Diagnostik von häufigen erblichen Erkrankungen der aschkenasischen Bevölkerung. In einer Anwendung wurden Proben auf acht verschiedene, epidemiologisch für diese Bevölkerungsgruppe bedeutende Erkrankungen untersucht. Diese Erkrankungen waren im einzelnen Tay-Sachs, Morbus Gaucher Typ I, Morbus Niemann-Pick Typ A und B, Mukopolidose Typ IV, familiäre Dysautonomie, Leukodystrophie, Bloom Syndrom und Fanconi Anämie Typ C [21]. Auch in der Diagnostik von SNP assoziierten Thrombophilien fand diese Methode bereits Anwendung [15]. In dieser Studie wurden sechs verschiedene Polymorphismen analysiert, um eine schnellere Diagnostik dieser zu erproben. Weiterhin konnte die Methode in der Diagnostik von mit zystischer Fibrose assoziierten Mutationen eingesetzt werden. In diesem Beispiel wurden 25 Mutationen und sechs polymorphe Sequenzen innerhalb des CFTR Gens untersucht [42]. Bereits 2001 wurde Luminex xMAP® Technologie nicht nur zur Typisierung von SNP im humanen Genom genutzt, sondern auch zur Identifizierung von Bakterien, die aufgrund spezifischer rDNA-Sequenzen nachgewiesen wurden [127]. Hier konnten 17 verschiedene Bakterienspezies unterschieden werden, die eine Bandbreite von gram-positiven und gram-negativen Vertretern wieder spiegelten.

2.2.2 DNA-Isolierung

Die Isolierung der DNA erfolgte nach dem in unserer Abteilung etablierten Standardverfahren nach Boom et al. [14]. Die Gewinnung der DNA erfolgte mittels des QIAmp Blood Micro Kit der Fa. Quiagen, welches die verwendeten Reagenzien und Enzyme (Proteinkinase K, AL Puffer, AW1 und AW2 Waschpuffer) enthielt. Entsprechend der laborinternen Arbeitsvorschriften wurden 200 µl einer in EDTA-Blut Röhrchen abgenommenen Blutprobe zusammen mit 20 µl der Proteinkinase K Lösung und 200 µl Puffer AL zusammen in ein Eppendorfröhrchen gegeben. Zur Erhöhung der DNA-

Konzentration hatte es sich bewährt, die benötigten 200 µl aus dem Buffycoat der vorher zentrifugierten Blutröhrchen zu entnehmen, welche 5 min lang bei 2500 rpm in einer Variofuge K (Fa. Heraeus) zentrifugiert wurden. Der Ansatz wurde durch 15 sekündiges Vortexen gut durchmischt und anschließend für 10 min in einem Eppendorf Thermomixer 5436 bei 56 °C inkubiert. Danach wurde dieses Reaktionsgemisch auf die im Kit enthaltenen Filtersäulen (Spin-Column) übertragen. Darauf folgend war zum Denaturieren der DNA die Zugabe von 200 µl 96% Ethanol nötig. Der nächste Schritt beinhaltete die einminütige Zentrifugation in einer Biofuge pico (Fa. Heraeus) bei 8000 rpm , wobei die DNA in den Filter der Spin-Column übertragen und von den restlichen Bestandteilen des Ansatzes getrennt wurde. Die durch den Filter zentrifugierte Lösung wurde verworfen. Zur vollständigen Aufreinigung folgten jetzt zwei Waschschriffe mit den als AW1 und AW2 bezeichneten Pufferlösungen. Hierzu wurden im ersten Waschschriff 500 µl AW1 Puffer auf die Säule gegeben und wiederum bei 8000 rpm für eine Minute zentrifugiert und anschließend die abzentrifugierte Lösung wiederum verworfen. Dieser Waschschriff wiederholte sich ein weiteres mal mit dem AW2 Puffer, wobei jetzt eine Zentrifugation bei 13000 rpm (20000 G) für 3 Minuten erfolgte. Auch jetzt wurde die Waschlösung verworfen. Im letzten Schriff wurde die DNA durch Zugabe von 150 µl Chromatographiewasser (Li Chromosolve Fa. Merck) gelöst und durch Zentrifugieren für eine Minute bei 8000 rpm (6000 G) aus dem Filter der Spin-Column in ein Eppendorfröhrchen eluiert. Bis zur Verwendung wurden die DNA Proben bei – 21°C eingefroren.

2.2.3 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Um die Menge der DNA Probe in den MPCR-Reaktionen korrekt kalkulieren zu können, war es nötig, die DNA Konzentrationen der eingesetzten Proben zu messen. Hierzu verwendet unsere Abteilung ein DU640 Spectrometer (Fa.

Beckmann). Die zugrundeliegende Messtechnik basiert darauf, dass die sich in Lösung befindliche DNA einfallendes Licht eines definierten Wellenlängenbereichs, wenn es durch die Lösung hindurchtritt, absorbiert. Dieses transmittierte Licht wird gemessen und über den Grad der Abschwächung, anhand das Lambert-Beerschen-Gesetzes, konnte die Konzentration der DNA bestimmt werden. Um die Messungen durchzuführen, wurden die Proben im Verhältnis 1:10 verdünnt. Hierzu wurden 10 µl jeder DNA Probe zu 90 µl Chromatographiewasser hinzu gegeben. Die resultierende 100 µl Lösung wurde anschließend in einer Präzisions-Küvette Quarzglas Suprasil (Fa. Hellma) mittels des Spectrometers bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen und so die DNA Konzentration ermittelt.

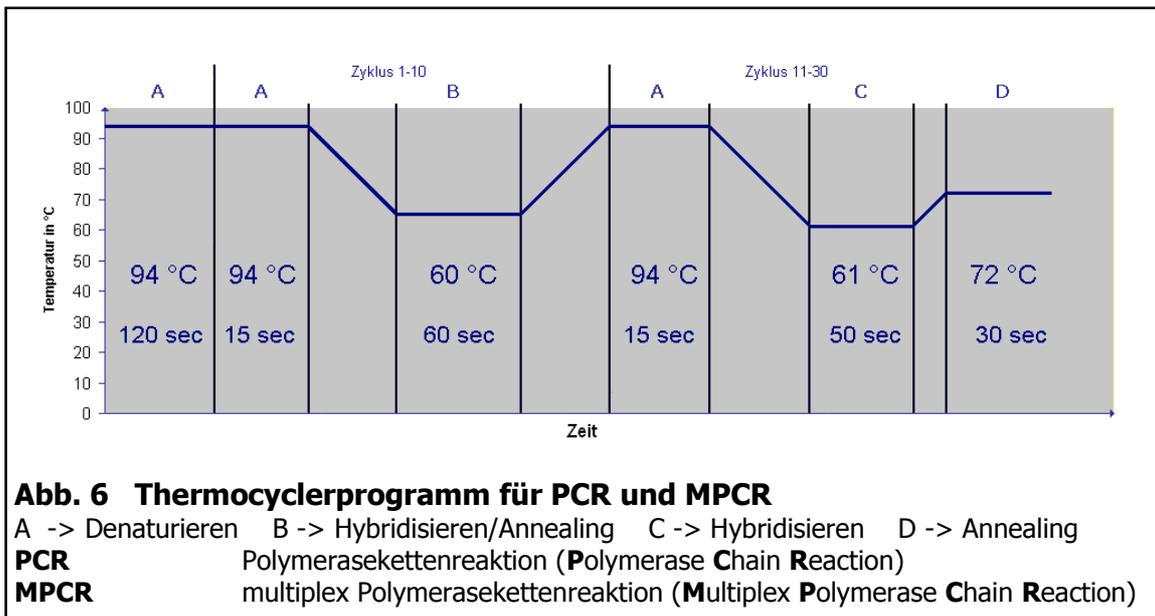
2.2.4 PCR und MPCR

Die Entwicklung der PCR basierte auf der von Mullins et al. 1986 [82] beschriebene Methode. Die Bedingungen für die PCR wurden vorab festgelegt, um zu gewährleisten, dass alle Amplifikationen unter den gleichen Bedingungen zum gewünschten Ergebnis führten. Der Reaktionsansatz für die PCR wurde für ein Gesamtvolumen von 25 µl konzipiert. Die genaue Zusammensetzung des Reaktionsansatzes geht aus Tabelle 14 auf

Tabelle 14 PCR-Ansatz	
Reagenzien	Volumen
PCR-Reaktionspuffer	4,0 µl
Taq Polymerase 5 U/µl	0,1 µl
Primer 10 pmol/µl (je Primer 1 µl)	2,0 µl
Proben DNA	2,0 µl
Chromatographiewasser	16,9 µl
Gesamtvolumen:	25,0 µl
PCR	Polymerasekettenreaktion (P olymerase C hain R eaction)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (D esoxyribonucleic a cid)

dieser Seite hervor. Die Gesamtmenge der eingesetzten Primer belief sich auf 2 µl einer 10 pmol/µl Primerlösung, so dass für den forward, wie auch den

reverse Primer, jeweils 1 µl der Lösung benutzt wurden. Die verwendeten Primer, Reagenzien, sowie Gebrauchslösungen wurden bereits unter Kapitel 2.1 Material abgehandelt und können an dieser Stelle nachgeschlagen werden. Die PCR wurde in einem GeneAmp 9700 Thermocyclersystem amplifiziert. Im ersten Schritt wurde die DNA für 120 sec bei 94 °C denaturiert. Die nächsten zehn Zyklen begannen jeweils mit 15 sec zum Denaturieren bei 96 °C, gefolgt von 60 sec bei 65 °C in der das Annealing der Primer an die DNA und die Extension stattfand. Zyklus 11 bis 30 begannen wieder mit 15 sec bei 96 °C zum Denaturieren der DNA. Dem folgten 50 sec bei 61 °C zum Annealing der Primer und anschließend 30 sec bei 72 °C zur Extension der Amplifikate. Abbildung 6 auf dieser Seite zeigt dieses Thermocyclerschema graphisch. Die fertig amplifizierten PCR-Produkte wurden bei 4 °C im Kühlschrank gelagert, beziehungsweise bei einer Lagerdauer von mehr als drei Tagen bei -20 °C eingefroren.



Bei der MPCR musste der Reaktionsansatz wie folgt modifiziert werden, um mehrere Genloci gleichzeitig in einem Well sicher amplifizieren zu können. Das Gesamtvolumen von 25 µl wurde beibehalten. Die Menge des verwendeten PCR Puffers wurde auf 6 µl erhöht. Die zu untersuchenden SNP wurden in drei Gruppen aufgeteilt und für jede Gruppe eine MPCR entwickelt. Dies folgte keinem festen Grundsatz. Die Primer der Gruppen wurden zu je einem

Primermix zusammen gefasst. Hierzu wurden die Primer in der ursprünglich gelieferten Konzentration von 100 pmol/ μ l zu gleichen Teilen in ein Eppendorfröhrchen zusammengeführt. Aus Tabelle 16 auf der folgenden Seite geht hervor, welche Genloci zu den drei MPCR zusammengefasst wurden. Für die Reaktionsansätze wurden jeweils 0,3 μ l des entsprechenden Primermixes verwendet. Während bei der einfachen PCR 10 pmol eines jeden Primers im Reaktionsansatz zu finden waren, waren es bei der MPCR nur noch 2,5 pmol im Falle der beiden

Tabelle 15 MPCR-Ansatz

Reagenzien		Volumen
PCR-Reaktionspuffer		6,0 μ l
Taq Polymerase 5 U/ μ l		0,1 μ l
Primer Mix (100 pmol/ μ l)		0,3 μ l
Proben DNA		2,0 μ l
Chromatographiewasser		16,6 μ l
Gesamtvolumen:		25,0 μl
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)	
MPCR	multiplex Polymerasekettenreaktion (Multiplex Polymerase Chain Reaction)	
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic acid)	

MPCR eins und zwei und im Fall der dritten MPCR 2,1 pmol je Primer. Die Gesamtmenge an Primern war im Falle der PCR 20 pmol, bei der MPCR 30 pmol. Die eingesetzte Probenmenge an DNA betrug mindestens 100 ng, so dass das Volumen entsprechend der gemessenen DNA-Konzentrationen eingesetzt werden musste. Um nicht für jede Reaktion unterschiedliche Probenvolumina pipettieren zu müssen, wurden ausschließlich DNA-Proben mit mindestens 50 ng/ μ l DNA Konzentration verwendet.

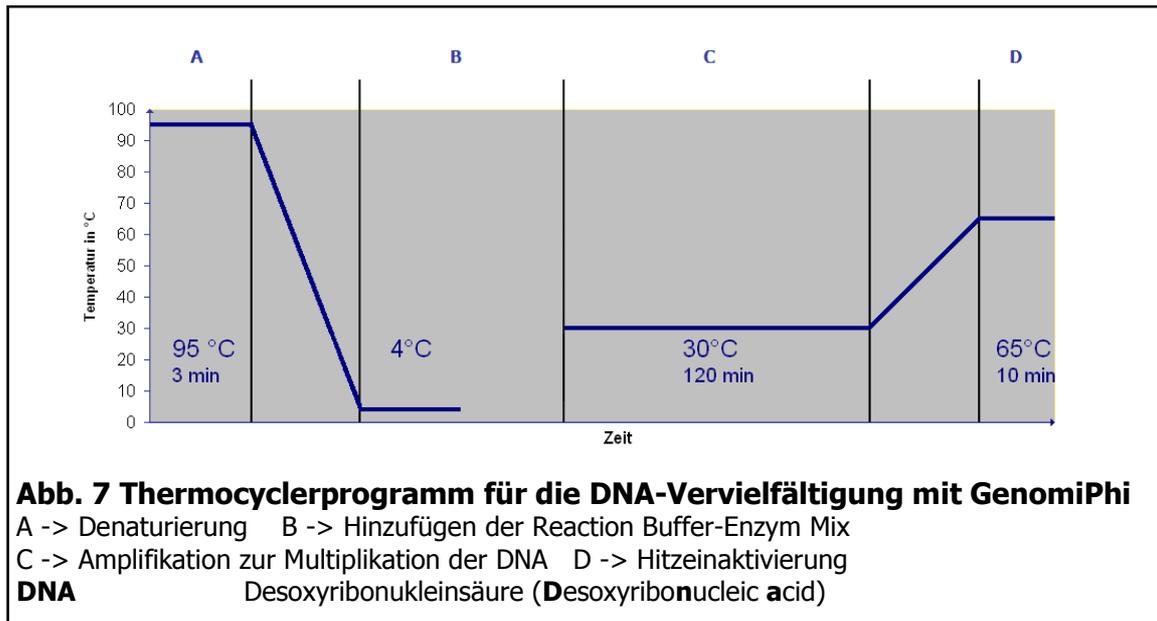
Daher legten wir die eingesetzten Volumina auf 2 μ l der DNA Proben fest. Wie bei der PCR nutzten wir auch bei den MPCR 0,1 μ l Taq Polymerase (Fa. Quiagen) je Reaktionsansatz. Tabelle 15 auf dieser Seite liefert eine Übersicht über den Reaktionsansatz für die MPCR.

Genau wie die PCR wurde auch die MPCR in einem GeneAmp 9700 Thermocyclersystem amplifiziert. Dazu wurde das gleiche Cyclerschema verwendet wie bei der PCR beschrieben (siehe Abb. 6 Seite 50). Auch die Lagerung bis zur weiteren Analyse wurde gleich zu der PCR gehandhabt.

Tabelle 16 Zusammenstellung der Primer-Mixe für die MPCR Kits 1-3			
Primer Mix	Genloci	Primer Bezeichnung	SNP
Kit 1	IL1a	IL1a_fw IL1a_rev	rs1800587
	IL1b Lo1	IL1b_1_fw IL1b_1_rev	rs16944
	IL1b Lo2	IL1b_2_fw IL1b_2_rev	rs1143634
	IL1R	IL1R_fw IL1R_rev	rs2234650
	IL1RN	IL1RN_fw IL1RN_rev	rs315952
	TNFa	TNFa_fw TNFa_rev	rs1800629 rs361525
Kit 2	IL4Ra	IL4Ra_fw IL4Ra_rev	rs1801275
	IL10 Lo1	IL10_1_fw IL10_1_rev	rs1800896
	IL10 Lo2	IL10_2_fw IL10_2_rev	rs1800871 rs1800872
	IL12b	IL12b_fw IL12b_rev	rs3212227
	IFNg	IFNg_fw IFNg_rev	rs2430561
	TGFb	TGFb_fw TGFb_rev	rs1982073 rs1800471
Kit 3	IL2 Lo1	IL2_1_fw IL2_1_rev	rs2069762
	IL2 Lo2	IL2_2_fw IL2_2_rev	rs2069763
	IL4 Lo1	IL4_1_fw IL4_1_rev	rs2243248
	IL4 Lo2	IL4_2_fw IL4_2_rev	rs2243250
	IL4 Lo3	IL4_3_fw IL4_3_rev	rs2070874
	IL6 Lo1	IL6_1_fw IL6_1_rev	rs1800797
	IL6 Lo2	IL6_2_fw IL6_2_rev	rs1800795
IFNg	Interferon gamma	IL10	Interleukin-10
IL1a	Interleukin-1 alpha	IL12b	Interleukin-12 beta
IL1b	Interleukin-1 beta	Lo	Locus
IL1R	Interleukin-1 Rezeptor	MPCR	multiplex Polymerasekettenreaktion
IL1RN	Interleukin-1 Rezeptorantagonist	SNP	(Multiplex Polymerase Chain Reaction)
IL2	Interleukin-2		Punktmutation
IL4	Interleukin-4		(Singlenucleotide Polymorphism)
IL4Ra	Interleukin-4 Rezeptor alpha	TGFb	Transforming growth factor beta
IL6	Interleukin-6	TNFa	Tumor necrosis factor alpha

2.2.5 Genomamplifikation mit GenomiPhi V2

Aufgrund der zum Teil geringen Menge der vorhandener DNA-Proben mussten diese vervielfältigt werden. Hierzu kam das von der Fa. GE Healthcare angebotene Kit Illustra GenomiPhi V2 zum Einsatz, welches zugegebene DNA in der gesamten Länge des DNA Stranges dupliziert und nicht, wie bei einer PCR üblich, nur kurze DNA Fragmente erzeugt. Auf diese Weise konnte erreicht werden, dass aus der eingesetzten Menge von 10 ng DNA am Ende der Reaktion eine 20 µl Probe mit einer DNA Menge von 4-7 µg wurden. Die letzte Angabe beruft sich auf die vom Hersteller angegebene DNA Menge. Entsprechend der Arbeitsvorschrift wurden jeweils 1 µl jeder DNA Probe mit 9 µl des mitgelieferten Sample Buffers in ein Well einer AB Gene 96-Well Platte pipettiert. Dieser Ansatz wurde im Anschluss in einen GeneAmp 9700 Thermocyclersystem für 180 sec bei 95 °C inkubiert, wodurch die komplementären DNA-Stränge der Doppelhelix getrennt wurden. Nach diesem Schritt wurde das Produkt auf 4 °C abgekühlt, dem Thermocycler entnommen und auf einen Kühlblock gestellt. Für die Amplifikationsreaktion wurden zu jedem Well 10 µl einer Mischung, bestehend aus 9 µl Reaction Buffer und 1 µl Enzyme Mix, gegeben. Dieser Reaktionsansatz wurde zur Vervielfältigung der DNA für 120 Minuten bei 30 °C im GeneAmp 9700 Thermocycler inkubiert. Zur Inaktivierung der Enzyme wurden am Schluss der Inkubation die Reaktionsansätze für 10 Minuten auf 65 °C erhitzt. Das entsprechende Thermocycler Programm findet sich auf Seite 54 in Abb. 7 graphisch dargestellt. Nach abgeschlossener Reaktion wurden die Reaktionsansätze mit 20 µl Chromatographiewasser (Fa. Merck) auf ein Gesamtvolumen von 40 µl verdünnt, wodurch eine rechnerische DNA-Konzentration von 100-170 ng/µl entstand. Die Lagerung der aufbereiteten Proben erfolgte bis zur weiteren Nutzung bei -21 °C im Tiefkühlschrank.



2.2.6 SNP-Typisierung mit Zytokin CTS-PCR-SSP Tray Kit

Die Typisierung der Proben, die zum Validieren unserer neuen Anwendung verwendet wurden, erfolgte mit der in unserem Labor genutzten Methode der sequenzspezifischen Primer. Alle Proben wurden mit dem Zytokine CTS-PCR-SSP Tray Kit typisiert, den die Abteilung für Transplantationsimmunologie der Universität Heidelberg vertreibt.

Zur Typisierung einer Probe wurden 28 PCR-Reaktionen benötigt. In den Reaktionsmix wurden 50 µl Proben DNA mit einer DNA Konzentration von 100 ng/µl, 138 µl des im Kit enthaltenen Mastermix, 329 µl LiChromosolv Chromatographiewasser (Fa. Merck) und 3 µl Taq Polymerase (5 U/µl, Fa. Quiagen) zusammen pipettiert. Auf diese Weise entstanden 520 µl Reaktionsansatz. Für jede PCR-Reaktion wurden 10 µl des Reaktionsansatzes in jedes Well der PCR-Platten gegeben. Die notwendigen PCR-Primer befanden sich in den PCR-Platten, in denen die Primer im getrockneten Zustand auf dem Boden der Wells vorlagen. Im Anschluss wurden die PCR-Platten in einem GeneAmp 9700 Thermocyclersystem amplifiziert. Das PCR-Programm war dabei identisch zu dem, welches für unsere PCR und MPCR verwendet wurde (siehe Kapitel 2.2.4). Nach der Inkubation im Thermocycler wurden alle Amplifikate wie unter

Kapitel 2.2.7 beschrieben, einer Gelelektrophorese unterzogen. Die Proben wurden im Anschluss gemäß der im Kit befindlichen Anleitung ausgewertet. Gemäß der SSP-Technik ergab sich das Typisierungsergebnis aus den Vorhandensein oder Fehlen von PCR-Amplifikaten, ersichtlich in Form der DNA-Banden im Agarosegel unter UV-Licht. Diese ließen eine Aussage über die Genotypisierung der SNP zu. Besonders zu beachten war, dass die bei jeder Reaktion mitgeführte Positivkontrolle ebenfalls als Bande im Gel erschien.

2.2.7 Agarosegelelektrophorese

Zur Kontrolle des Vorhandenseins aller PCR-Produkte, und damit einer erfolgreichen Reaktion, wurde nach jeder PCR eine Elektrophorese in einem 2% igen Agarosegel angefertigt. Hierzu wurde eine Elektrophoresekammer der Firma Protrans in Verbindung mit einem Power Supply EPS 300 der Firma Pharmacia Biotech als Spannungsquelle verwendet.

Für ein 2%iges Agarosegel wurden 6 g LE Agarose (Fa. Biozym) mit 300 ml 1x Boratpuffer in einem Erlenmeyerkolben vermischt und in einer Mikrowelle (Fa. AEG) bis zum Siedepunkt erhitzt. Nach einer kurzen Abkühlphase, in der das flüssige Gel auf 70 °C abgekühlt wurde, wurden sechs Tropfen Ethidiumbromid (Fa. Eurobio) hinzu gegeben. Anschließend wurde die Lösung in den mit Gelkämmen vorbereiteten Gelträger gegeben. Das Gel kühlte dann auf Raumtemperatur ab und härtete aus, sodass die Gelkämme wieder entfernt und das Gel in die mit 1x Boratpuffer gefüllte Elektrophoresekammer gestellt werden konnte. Für die Gelelektrophorese wurden 10 µl jedes PCR-Produktes in je eine Geltasche pipettiert. Da der für die PCR benutzte Reaktionspuffer den Farbstoff Cresolrot beinhaltete, war kein Ladepuffer mehr notwendig, und das PCR-Produkt konnte direkt der Elektrophorese unterzogen werden. Um später die Länge der PCR-Produkte abschätzen zu können, wurden je Elektrophorese 10 µl SSP-AB-DNA-Size-Marker (Fa. Olerup) in eine Tasche unter den PCR-Amplifikaten gegeben.

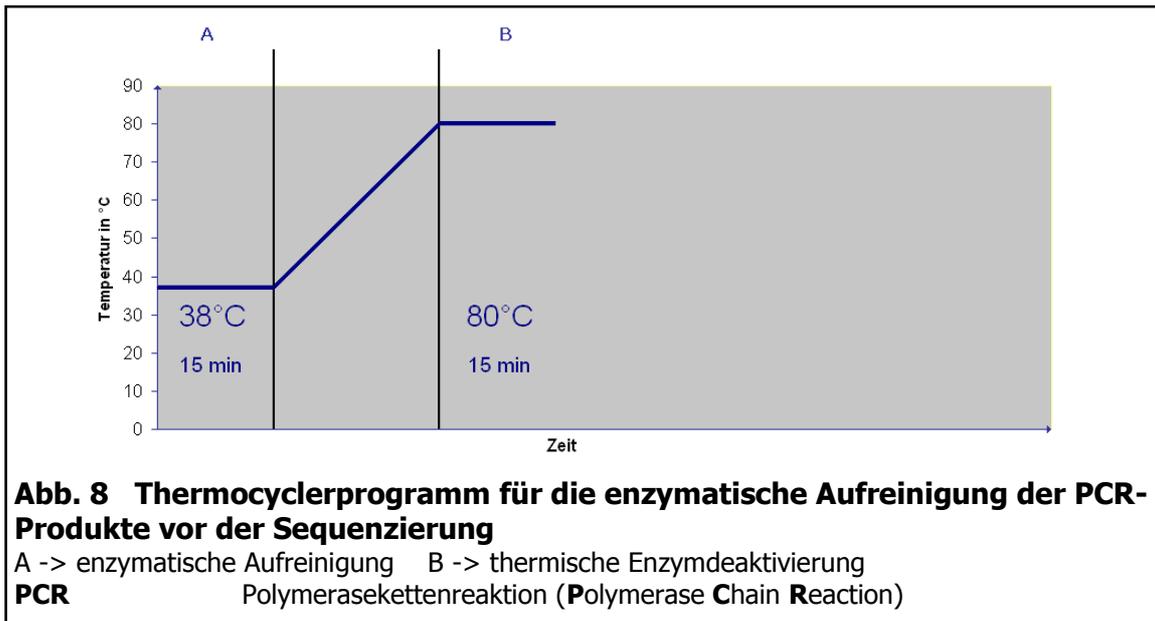
Die Elektrophorese wurde im Anschluss für 20 Minuten bei einer Spannung von 170 Volt und einer Stromstärke von 400 mA durchgeführt.

Die Beurteilung der Gele erfolgte unter UV-Licht mit Hilfe eines UV-Transilluminators (Fa. UVP Inc.). Die Ergebnisse wurden mit einer MWG Fotografiereinheit (Fa. Biotech) und einem Fotodrucker (Fa. Mitsubishi) als Bild dokumentiert.

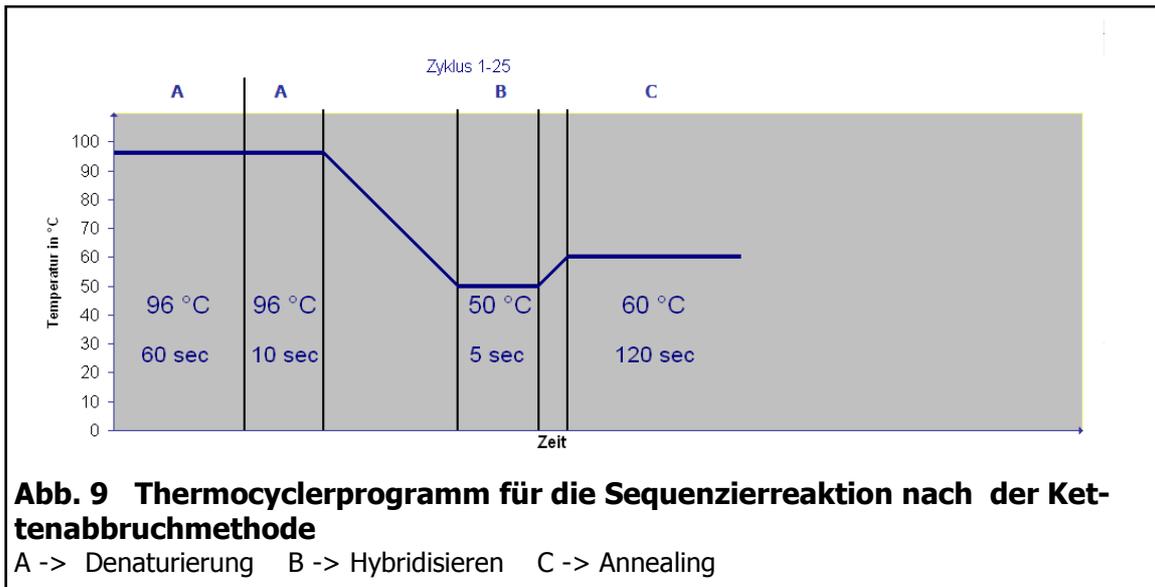
2.2.8 Sequenzierung

Die Sequenzierung der MPCR-Produkte wurde eingesetzt, um einen sicheren Nachweis zu haben, dass erstens alle Produkte in den drei MPCR wie vorgesehen amplifiziert wurden, und zweitens um Unstimmigkeiten zwischen den Ergebnissen der SSP-Methode als Referenzmethode und unseres neuen xMAP® Carboxybead basierten Tests zu überprüfen.

Die Sequenzierung erfolgte nach dem von Sanger et al [95,96] beschriebenen Kettenabbruchverfahren. Bevor jedoch die MPCR-Produkte sequenziert werden konnten, mussten sie zunächst aufgereinigt werden, um Reste von Primern und übrig gebliebene dNTPs zu entfernen. Dies war nötig, da diese die Sequenzierung empfindlich gestört hätten. Hierzu wurde ein kommerziell erhältliches Enzym namens Exosap It (Fa. USB Corp) verwendet. Zur Aufreinigung wurden 10 µl des MPCR-Produktes mit 3 µl des Aufreinigungs-enzymes versetzt und nach dem Verschließen der 96-Well Platte kurz durch Vortexen vermischt. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 38 °C für 15 min in einem GeneAmp 9700 Thermocyclersystem. Die 38 °C stellten hierbei das Temperaturoptimum für die Enzymaktivität dar. Im Anschluss wurde der Reaktionsansatz für 15 min bei 80 °C inkubiert, wobei das Enzym denaturiert und somit inaktiviert wurde. Abb. 8 auf der nächsten Seite zeigt das Reaktionsschema. Die 13 µl der aufgereinigten Probe konnte nun weiter für die Sequenzierung bearbeitet werden.



Für den Ansatz zur Sequenzierung wurden 2 µl aufgereinigte Probe zusammen mit 2 µl LiChromosolv (Fa. Merk) Chromatographiewasser in eine mit Strichcode markierten PCR-Platte vorgelegt, welche kompatibel zu unserem Sequenzierautomaten war. Zu den vorgelegten 5 µl Probe wurden 5 µl des Reaktionsgemisches hinzugefügt. Dieses Reaktionsgemisch bestand aus dem kommerziell erhältlichen Sequenzierkit BigDye Terminator (Fa. Applied Biosystems) und dem Sequenzierprimer. Da bei der Sequenzierung nur ein Strang der MPCR-Produkte amplifiziert werden durfte, wurde nur ein Primer zu jeder Probe hinzu gegeben. Hierzu verwendeten wir die von uns für die PCR designten PCR-Primer. Diese wurden allerdings stärker verdünnt, so dass 3 µl einer 1 pmol/µl konzentrierten Primerlösung verwendet wurden. Zu diesen 3 µl kamen 1 µl Reaktionspuffer, sowie 1 µl Reaktionsenzym, welches die DNA-Polymerase und die dNTPs und ddNTPs beinhaltete. Dieser Ansatz von 10 µl Gesamtvolumen wurde in einem Thermocyclersystem 9700 von GeneAmp, nach dem in Abb. 9 auf der folgenden Seite dargestellten PCR-Programm, amplifiziert. Nach dieser Reaktion musste das Reagenz vor der Analyse aufgereinigt und die MPCR-Produkte gefällt werden. Hierfür wurden die Amplifikate in der PCR-Platte mit 25 µl einer Mischung aus 96% Ethanol und 3 mol/l Natriumacetatlösung versetzt. Das Mischungsverhältnis der Grundlösung war dabei 1000 µl 96% Ethanol und 40 µl 3 mol/l Natriumacetatlösung. Dieser



Ansatz wurde für 40 Minuten bei 2000 G in einer Zentrifuge Multifuge 3 S-R (Fa. Heraeus) zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde der Überstand verworfen und zur Entfernung der gesamten Menge an Flüssigkeit die Platte für drei Minuten bei 150 G kopfüber zentrifugiert. Anschließend wurden die Pellets der Proben in den Wells mit 50 µl 70% Ethanol resuspendiert und ein weiteres mal für 15 Minuten bei 2000 G zentrifugiert. Nach diesem zweiten Zentrifugationsschritt wurde analog zum ersten wieder der Überstand abgegossen und die letzten Flüssigkeitsreste abzentrifugiert, indem die Platte kopfüber für drei Minuten bei 150 G zentrifugiert wurde. Bei allen Zentrifugationsschritten war die Zentrifuge so programmiert, dass sie möglichst langsam abbremste, damit die am Boden befindlichen Proben nicht wieder gelöst wurde und versehentlich mit dem Überstand verworfen wurden. Nach diesen Schritten wurden die Proben in 25 µl HiDi-Formamid-Lösung (Fa. Applied Biosystems) resuspendiert. Zur vollständigen Lösung der Proben vom Boden in der Formamidlösung wurden die Platten für zwei Minuten bei 90 °C inkubiert, um anschließend in einem 3730 DNA Analysor (Fa. Applied Biosystems) analysiert zu werden. Ausgewertet wurden die Rohdaten mit dem Programm Sequenzierung Analysis (Fa. Applied Biosystems).

2.2.9 Kopplung der Captureoligonukleotide mit den xMAP® Carboxybeads

Die Kopplung der Captureoligonukleotide an die xMAP® Carboxybeads (=Beads) erfolgte angelehnt an ein von der Fa. Luminex vorgegebenem Schema [136]. Jedem Captureoligonukleotid wurde einer der 16 verschiedenen bestellten Beadpopulationen zugeordnet, so dass es bei keinem der drei Kits zu einer Überschneidung kam und jedes innerhalb eines Kits eingesetzten Captureoligonukleotid auf eine eigene Beadsorte gekoppelt wurde.

Für die Kopplung eines Captureoligonukleotids wurden aus dem Tube der entsprechend zugeordneten Beadpopulation nach sorgfältigem Vortexen 125 µl Beadsuspension entnommen und in ein Eppendorfröhrchen gegeben. Dieses wurde in einer Centrifuge 5415C (Fa. Eppendorf) bei 14000 rpm für drei Minuten zentrifugiert, sodass alle Beads in einem weißen Pellet am Boden des Röhrchens zu finden waren. Der Überstand an Lösung wurde vorsichtig abgegossen und verworfen. Das Pellet wurde im Anschluss in 40 µl des 0,1 mol/l MES pH 4,5 Kopplungs-Puffer resuspendiert. Dazu wurden anschließend 2 µl der Captureoligonukleotidlösung (unverdünnt wie geliefert, 100 pmol/µl) hinzu gegeben. Zur Vermittlung der Bindung wurden 3 µl der frisch hergestellten EDC-Lösung zugefügt, welche aus 10 mg EDC-Puder und 1000 µl LiChromosolv (Fa. Merck) hergestellt wurde. Die Chemikalie EDC bewirkt in der Lösung, dass die COOH-Gruppen auf der Oberfläche der Beads und die primären Aminogruppen am Ende der C12-Aminomodifikation der Captureoligonukleotide eine Bindung eingehen, sodass diese kovalent aneinander gebunden werden. Der Ansatz wurde nach Vortexen bei Raumtemperatur abgedunkelt (abgedeckt in einer Schachtel) für 30 Minuten inkubiert. Nach diesen 30 min wurden noch einmal 3 µl einer nach gleicher Vorgehensweise frisch hergestellten EDC-Lösung zum Ansatz hinzugegeben. Nach nochmaligem Vortexen wurde der Ansatz ein zweites mal für 30 Minuten bei Raumtemperatur abgedunkelt inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation folgten zwei Waschschrte, die das Ziel hatten, nicht gebundene Captureoligonukleotide und die Reste des EDC zu entfernen. Für

den ersten Waschschrift wurden 250 µl des 0,02% Tween Waschpuffer I in das Eppendorfröhrchen gegeben und dieses in der Centrifuge 5415C (Fa. Eppendorf) bei 14000 rpm für drei Minuten zentrifugiert. Der Überstand über dem entstandenen Pellet wurde abgegossen und verworfen. Für den zweiten Waschschrift wurden das Pellet in 250 µl des 0,1% SDS Waschpuffer II resuspendiert und ein letztes Mal in der Centrifuge 5415C (Fa. Eppendorf) bei 14000 rpm für drei Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abgegossen und verworfen.

Zur Lagerung der Beads wurde das Pellet in 125 µl TE pH 8,0 Lagerpuffer resuspendiert und diese Lösung dunkel im Kühlschrank bei +4 °C aufbewahrt.

Auf diese Art wurden alle Captureoligonukleotide an die entsprechenden Beads gekoppelt. Alle innerhalb eines Messansatzes genutzten Beads wurden vor der Verwendung in gleicher Menge zu einer Beadmischung zusammen pipettiert, sodass insgesamt die drei Beadmischungen entstanden, deren Zusammensetzungen auf Seite 61 in Tabelle 17 zu finden sind.

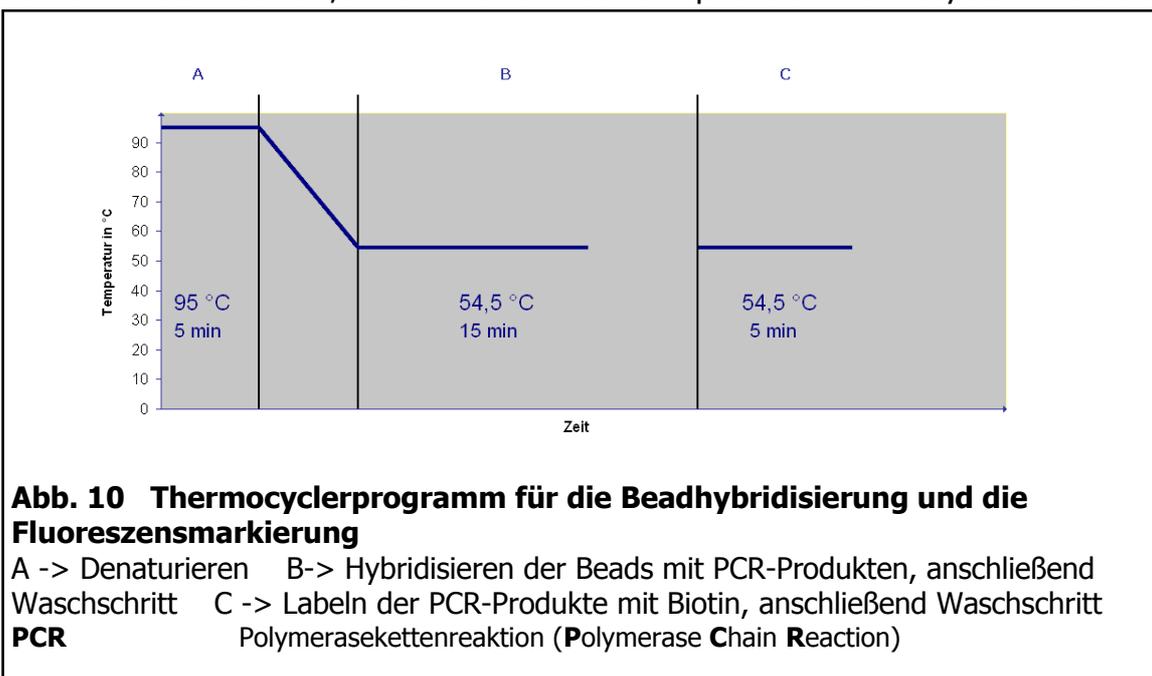
2.2.10 Hybridisierung und Probenanalyse mit dem Luminex 100 IS

Für die Analyse der Proben mussten die Beadmischungen zusammen mit den entsprechenden MPCR Produkten hybridisiert werden. Auch hierfür wurde eine allgemeine Arbeitsanleitung der Fa. Luminex für unsere Anwendung modifiziert [137]. Im ersten Schritt wurden für die Typisierung eines jeden Kits jeweils 6 µl der MPCR-Amplifikate in eine neue 96-Well Platte übertragen. Zu diesen Proben wurden 33 µl des 1,5x TMAC Hybridisierungspuffer hinzugegeben. Dieser Puffer bewirkt den Ausgleich der verschieden hohen Schmelztemperaturen, den die an die xMAP® Carboxybeads gebundenen Captureoligonukleotide aufwiesen. Dazu wurden entsprechend des zu typisierenden Kits, die zugehörige Beadmischung gegeben. In den Fällen von Kit 1 und 3 waren dies 7 µl und im Fall von Kit 2 8

Tabelle 17 Zusammenstellung der xMAP® Bead Mixe für die Kits 1-3			
Primer Mix	Genloci	Captureoligonukleotid Bezeichnung	SNP/ Messung am sense oder antisense strand
Kit 1	IL1a	IL1a_Cap_C IL1a_Cap_T	rs1800587 sense
	IL1b Lo1	IL1b_1_Cap_T IL1b_1_Cap_C	rs16944 sense
	IL1b Lo2	IL1b_2_Cap_T IL1b_2_Cap_C	rs1143634 sense
	IL1R	IL1R_Cap_T IL1R_Cap_C	rs2234650 sense
	IL1RN	IL1RN_Cap_T IL1RN_Cap_C	rs315952 sense
	TNFA	TNFA_1_Cap_A TNFA_1_Cap_G TNFA_2_Cap_A TNFA_2_Cap_G	rs1800629 sense rs361525 sense
Kit 2	IL4Ra	IL4Ra_Cap_A IL4Ra_Cap_G	rs1801275 sense
	IL10 Lo1	IL10_1_Cap_A IL10_1_Cap_G	rs1800896 sense
	IL10 Lo2	IL10_2_Cap_T IL10_2_Cap_C	rs1800871 antisense
		IL10_3_Cap_A IL10_3_Cap_C	rs1800872 sense
	IL12b	IL12b_Cap_A IL12b_Cap_C	rs3212227 sense
	IFNG	IFNG_Cap_T IFNG_Cap_A	rs2430561 antisense
TGFb	TGFb_1_Cap_T TGFb_1_Cap_G	rs1982073 sense	
	TGFb_2_Cap_C TGFb_2_Cap_G	rs1800471 antisense	
Kit 3	IL2 Lo1	IL2_1_Cap_T IL2_1_Cap_G	rs2069763 sense
	IL2 Lo2	IL2_2_Cap_T IL2_2_Cap_G	rs2069763 sense
	IL4 Lo1	IL4_1_Cap_T IL4_1_Cap_G	rs1800896 sense
	IL4 Lo2	IL4_2_Cap_T IL4_2_Cap_C	rs1800871 sense
	IL4 Lo3	IL4_3_Cap_T IL4_3_Cap_C	rs1800872 sense
	IL6 Lo1	IL6_1_Cap_A IL6_1_Cap_G	rs1900797 sense
	IL6 Lo2	IL6_2_Cap_C IL6_2_Cap_G	rs1800795 sense
antisense	Sequenz entspricht dem nicht kodierenden komplementärer DNA Strang	IL10 IL12b Lo MPCR	Interleukin-10 Interleukin-12 beta Locus multiplex Polymerasekettenreaktion (Multiplex Polymerase Chain Reaction)
IFNG	Interferon gamma	sense	Sequenz entspricht dem kodierenden DNA Strang
IL1a	Interleukin-1 alpha	SNP	Punktmutation (Single Nucleotide Polymorphism)
IL1b	Interleukin-1 beta	TGFb	Transforming growth factor beta
IL1R	Interleukin-1 Rezeptor	TNFA	Tumor necrosis factor alpha
IL1RN	Interleukin-1 Rezeptorantagonist		
IL2	Interleukin-2		
IL4	Interleukin-4		
IL4Ra	Interleukin-4 Rezeptor alpha		
IL6	Interleukin-6		

μl der entsprechenden Beadmischung (die zusammengehörige MPCR und Beadmischung, sowie der Inhalt dieser geht aus Tabelle 17 auf Seite 61 hervor). Zu jedem Ansatz kamen noch 4 μl (Kit 1 und 3) beziehungsweise 3 μl (Kit 2) TE 8,0 Probenpuffer hinzu, so dass insgesamt 50 μl Gesamtvolumen je Well entstanden. Zum Hybridisieren wurde der Ansatz in einem GeneAmp 9700 Thermocycler bei 95 °C für fünf Minuten inkubiert, wodurch die PCR-Amplifikate denaturierten und die Doppelstränge gelöst wurden. Danach fand die Hybridisierung bei 54,5 °C für 15 Minuten statt, in der die MPCR-Amplifikate an die komplementären Captureoligonukleotide hybridisierten.

Zur Entfernung von nicht gebundenen PCR-Produkten aus dem Analyseansatz, wurden die Reaktionsansätze nach dem Hybridisieren gewaschen. Dafür wurden die Ansätze in der 96-Well Platte in einer Zentrifuge des Typs Centrifuge 2-5 (Fa. Sigma) bei 3900 rpm für drei Minuten zentrifugiert, in welcher sich die an die Beads gebundenen MPCR-Amplifikate am Boden im Pellet absetzten. Anschließend wurde der Überstand dekantiert und das je Probe verbliebene Pellet mit 50 μl einer 1,0x TMAC/Streptavidin-R-phycoerythrin (Fa. Invitrogen) Lösung resuspendiert. Diese Lösung wurde direkt vor dem Waschen hergestellt. In 1000 μl 1,0x TMAC wurden 4 μl Streptavidin R-phycoerythrin (Fa. Invitrogen) gelöst. Nachdem alle Proben resuspendiert wurden, konnte der Ansatz wieder für 5 Minuten bei 54,5 °C in einem GeneAmp 9700 Thermocycler inkubiert



werden. In diesem Reaktionsschritt erfolgte die Markierung mit dem Reporter-molekül (Streptavidin-R-phycoerythrin), welches an die Biotinmarkierung gebunden wurde. Das Thermocyclerprogramm für die Hybridisierung und das Labeling ist in Abb. 10 auf der vorherigen Seite zu finden. Nach dem Labeling wurden die Reaktionsansätze ein zweites Mal gewaschen. Dieser Waschschrift erfolgte analog zum erste Waschschrift bei 3900 rpm für wiederum drei Minuten. Danach wurde der Überstand abermals dekantiert und die Pellets in den Wells mit je 50 µl 1,0x TMAC resuspendiert. Zuletzt wurden die Proben in eine 96-Well Platte umpipettiert, die für die Analyse im Luminex 100 IS konzipiert war. Hierzu wurden die Proben mit einer Corning Costar 12-Kanalpipette in eine entsprechende Platte übertragen und anschließend im Luminex 100 IS Gerät analysiert.

2.2.11 Auswertung der Analysedaten

Für die Auswertung und Typisierung der Proben, wurden die vom Luminex 100 IS ausgegebenen „Trimmed Mean“ Daten verwendet. Diese spiegeln den medianen Wert des für jede Beadpopulation kumulierten Signals wieder, welches durch den Photomultiplier gemessen wurde.

Zur Typisierung eines SNP wurden immer beide zugehörigen Beadpopulationen betrachtet, also die für den Wildtyp und die Mutation. Beide Werte wurden jeweils mit dem aus der negativ Kontrolle ermittelten Leerwert korrigiert und folgend dividiert. Der daraus resultierende Quotient stellte die Grundlage der Auswertung dar. Siehe Formel (1) auf dieser Seite.

$$(1) \quad Q = (MW - LW) / (MM - LM)$$

Q Quotient zur Auswertung

MW Trimmed Mean Wildtyp

MM	Trimmed Mean Mutation
LW	Trimmed Mean Leerwert Wildtyp
LM	Trimmed Mean Leerwert Mutation

Um diese Rechnung weitgehend automatisiert vornehmen zu können, wurde in Microsoft Excel ein Auswertmakro erstellt, das die Berechnung ausführte, nachdem die Rohdaten in dieses kopiert wurden.

Die Auswertung der Quotienten erfolgte nach der Idee, dass im Falle eines homozygoten Wildtyps ein hoher Wert im Zähler von Gleichung (1) steht und ein niedriger Wert im Nenner. Damit ergab sich ein hoher Quotient. Im Falle einer heterozygoten Situation sollten im optimalen Fall Zähler und Nenner gleich groß sein, so dass sich ein Quotient um den Wert 1 bildete. Im Falle der homozygoten Variante der Mutante nahm der Zähler einen kleinen Wert und der Nenner einen großen ein. Damit ergab sich ein Quotient der kleiner als eins war. Dieser Idee folgend konnten anhand der Ergebnisse für jeden SNP zwei Cut-Offs definiert werden, die die drei Möglichkeiten der Typisierung gegeneinander abgrenzte. So wurde für jeden einzelnen SNP verfahren und die Proben anhand dessen typisiert.

2.2.12 Ermittlung der Haplotypen

Bei mehreren SNP, welche nahe beieinander innerhalb des selben Gens zu finden waren, interessierte uns nicht nur die alleinige Genotypisierung der SNP, sondern auch die Konfiguration der Haplotypen, sprich welche Ausprägungen der SNP zusammen auf dem selben Chromosom lagen. Im Vergleich zur Methode SSP war die Bestimmung von Haplotypen mit Luminex bedeutend schwieriger und in bestimmten Konstellationen schlicht unmöglich. Die Bestimmung eines Haplotypen aus den Genotypen war dann kein Problem, wenn im Fall von zwei SNP im Gen einer oder beide SNP homozygot vorlagen.

Probleme ergaben sich dann, wenn beide SNP in der Genotypisierung heterozygot waren. Aufgrund dessen, dass die Ermittlung der Genotypen jedes SNP völlig unabhängig von einander durchgeführt wurde, lässt sich nicht ermitteln, welche Kombination der Genotypen zusammen auf einem Chromosom zu finden sind. Es ergäben sich drei Möglichkeiten für ein Chromosom, entweder an beiden Stellen der SNP den Wildtyp aufzuweisen, im zweiten möglichen Fall an beiden Stellen die Mutation oder aber die dritte Möglichkeit an einer Stelle den Wildtyp und am anderen die Mutation. Anhand der Messergebnisse im von uns entwickelten Verfahren ist die Auflösung dieses Problems nicht möglich.

Gleiches gilt für die beiden Gene, in denen drei SNP den Haplotypen bilden. Für eine eindeutige Bestimmung sind hier mindestens zwei homozygote Typisierungen erforderlich. Bei zwei oder mehr heterozygoten SNP wird die Zuordnung eines Haplotypen theoretisch unmöglich. Dennoch gelang es uns mit Ausnahme des Gens IL1b, die Haplotypen zu bestimmen. Möglich wurde dies, da in den anderen vorliegenden Haplotypisierungen durch SSP auffiel, dass nicht jeder theoretisch mögliche Haplotyp gleich häufig im menschlichem Genom zu existieren schien. Da bestimmte Haplotypen nicht beziehungsweise nur in einer sehr geringen Haplotypfrequenz vorkamen, konnte selbst bei Heterozygotie mehrerer SNP die Haplotypen bestimmt werden. Diese Möglichkeit konnte auch bei den zwei Genen angewendet werden, die sich aus drei SNP zusammensetzten. Nur im Falle von IL1b traf dies nicht zu, da hier alle vier theoretisch möglichen Haplotypen etwa gleich häufig nachgewiesen wurden. Tabelle 18 auf dieser Seite gibt eine Übersicht über die häufig nachgewiesenen Haplotypen und zeigt die resultierende Schlussfolgerungen auf die Haplotypen, wie sie anhand der Genotypisierung mit xMAP® Carboxybeads von uns gezogen wurden. Anhand der in der Tbl. 18 auf der nachfolgenden Seite dargestellten Regeln, konnte jeweils einer der Haplotypen festgelegt werden [112].

Tbl. 18 Übersicht der hauptsächlich vorkommenden Haplotypen der untersuchten Zytokinpolymorphismen

Zytokin	IL2	IL4	IL6
Hohe Haplotypfrequenz	GG 0,310 TG 0,425 TT 0,240	GCC 0,285 TCC 0,353 TTC 0,120 TTT 0,140	CA 0,286 CG 0,150 GG 0,698
Keine oder niedrige Haplotypfrequenz	GT 0,024	GCT 0,014 GTC 0,007 GTT 0,002 TCT 0,007	GA 0,002
Bemerkung	Eine Genotypisierung mit G an 1. Stelle bedingt den Haplotypen GG, eine Genotypisierung mit T an 2. Stelle bedingt den Haplotypen TT	Eine Genotypisierung mit G an 1. Stelle bedingt den Haplotypen GCC, ein T an 3. Stelle bedingt den Haplotypen TTT	Eine Genotypisierung mit G an 1. Stelle bedingt den Haplotypen GG, eine Genotypisierung mit A an 2. Stelle bedingt den Haplotypen CA
Zytokin	IL10	TGFb	TNFa
Hohe Haplotypfrequenz	ACC 0,296 ATA 0,269 GCC 0,411	AC 0,502 GC 0,445 GG 0,053	CC 0,834 CT 0,043 TG 0,123
Keine oder niedrige Haplotypfrequenz	ACA 0,020 ATC 0,003 GCA 0,000 GTC 0,000 GTA 0,000	AG 0,000	TT 0,000
Bemerkung	Eine Genotypisierung mit G an 1. Stelle bedingt den Haplotypen GCC, ein T an 2. Stelle bedingt den Haplotypen ATA, eine Genotypisierung von A an 3. Stelle bedingt ebenfalls den Haplotypen ATA	Eine Genotypisierung mit A an 1. Stelle bedingt den Haplotypen AC, eine Genotypisierung mit G an 2. Stelle bedingt den Haplotypen GG	Eine Genotypisierung mit T an 1. Stelle bedingt den Haplotypen TG, eine Genotypisierung mit C an 2. Stelle bedingt den Haplotypen CC
A Adenin C Cytosin G Guanin T Thymin	IL2 Interleukin-2 IL4 Interleukin-4 IL6 Interleukin-6 IL10 Interleukin-10	TGFb Transforming growth factor beta TNFa Tumor necrosis factor alpha	
Die Zahl hinter den Haplotypen gibt die Haplotypfrequenz an, die in der Studie von Trajkov et al. ermittelt wurde.			
Quelle: Trajkov D, Arsov T, Petlichkovski A, Strezova A, Efinska-Mladenovska O, Gogusev J, Spiroski M: Distribution of the 22 cytokine gene polymorphisms in healthy Macedonian population. Bratisl Lek Listy. 110(1): 7-17 (2009)			

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der PCR und MPCR

Die PCR Primer wurden so ausgewählt, dass für jeden zu untersuchenden Genabschnitt ein stabiles, ausfallsicheres PCR-Produkt zur Analyse zur Verfügung stand. Für die MPCR wurden in den Fällen für Kit1 (IL1a, IL1b Lo1, IL1b Lo2, IL1R, IL1RN und TNFa) und Kit2 (IL4Ra, IL10 Lo1, IL10 Lo2, IL12b, IFNg und TGFb) jeweils sechs Amplifikate in einen Reaktionsansatz zusammengesetzt und erfolgreich amplifiziert. In Kit 3 (IL2 Lo1, IL2 Lo 2, IL4 Lo1, IL4 Lo2, IL4 Lo3, IL6 Lo1 und IL6 Lo2) waren es sieben Amplifikate.

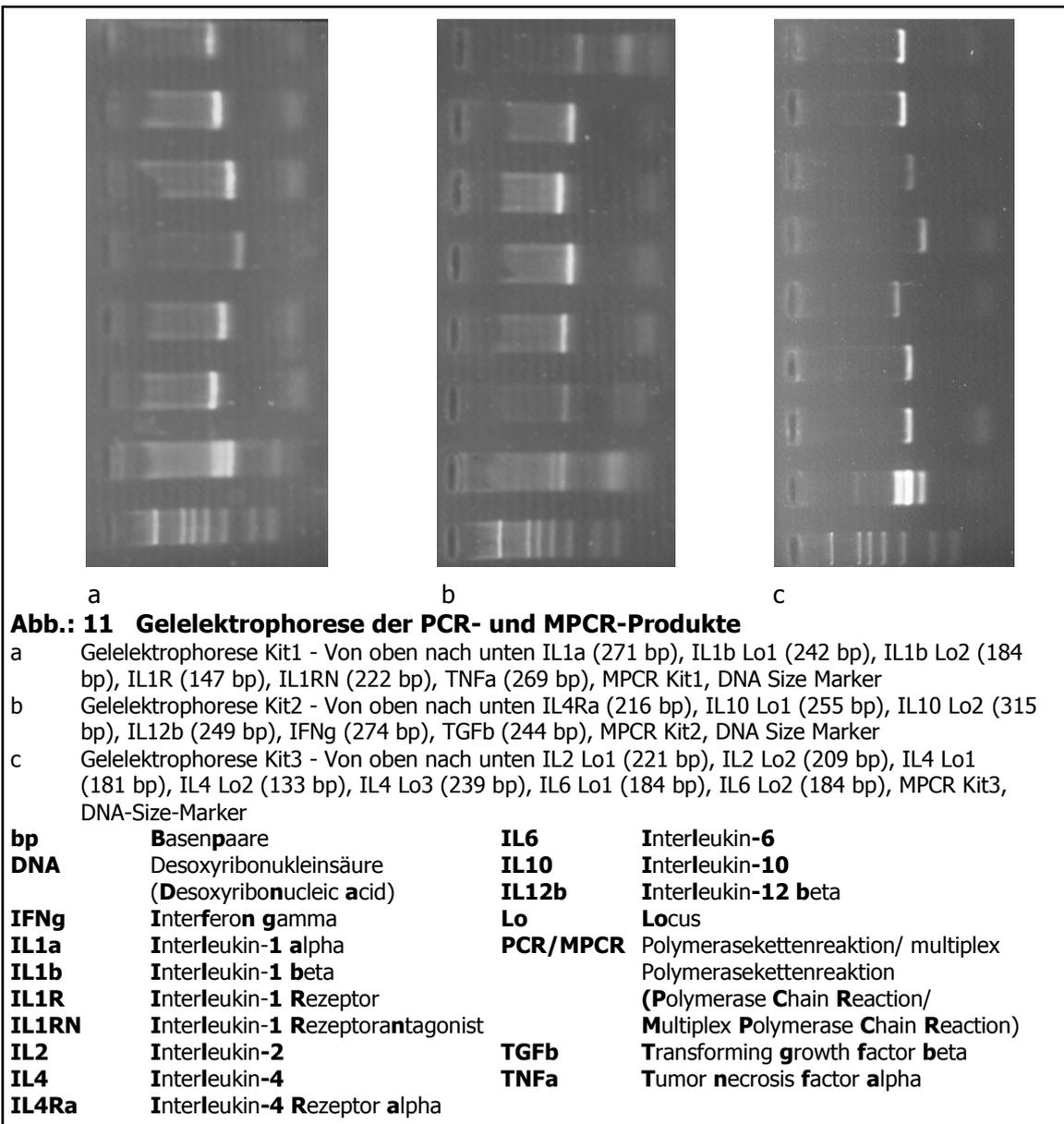


Abbildung 11 auf Seite 67 zeigt für jeden Kit die Gelelektrophorese der einzelnen PCR-Produkte, sowie darunter an vorletzter Position die Gelelektrophorese der gesamten MPCR. Zur Verdeutlichung der Produktlänge ist in der untersten Zeile ein DNA-Marker mit vordefinierten Banden bei 50 bp, 100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp und 1000 bp abgebildet. Das sich ergebende Bandenmuster der MPCR entstand durch Überlagerung der einzelnen Reaktionen. Aufgrund der ähnlichen Länge der Amplifikate und der nicht hochauflösenden Trennung im Agarosegel sind nicht mehr alle Amplifikate einzeln optisch identifizierbar, sondern mehrere Amplifikate einer Länge bilden innerhalb der MPCR eine gemeinsame Bande. Aus diesem Grund wurde die Sequenzierung zur Bestätigung der erfolgreichen Amplifikation angeschlossen.

3.2 Ergebnisse des Amplifikationserfolgs durch Sequenzierung

Die zur Kontrolle des Amplifikationserfolgs aus den MPCR angefertigten Sequenzierungen sind im folgenden auf den Seiten 70 bis 76 abgebildet. Es wurde für alle MPCR-Amplifikate repräsentative Abschnitte der DNA Sequenzen ausgewählt, die gleichzeitig die Stellen der untersuchten SNP darstellen. Bei mehreren SNP innerhalb eines Gens, die zu weit auseinander lagen, um sie innerhalb eines Sequenzabschnittes demonstrieren zu können, wurden zwei Abschnitte ausgewählt. Wenn möglich wurden die Sequenzen des kodierenden Stranges dargestellt. Nur in den Fällen von IL1R, TNFa, IL4Ra, IL10, sowie IL2 wurde der komplementäre Strang gezeigt. Dies geschah immer dann, wenn der SNP zu wenige bp vom forward Primer entfernt war, da methodenbedingt zirka die ersten 20 bp der Amplifikate nicht in der Sequenz dargestellt werden konnten. Erst nach dieser Strecke ergab sich eine auswertbare Sequenz. Lag der SNP in dieser „blinden Zone“, nutzten wir die Darstellung der komplementären Stränge. Ein weiterer Grund, um auf den komplementären

Strang auszuweichen war IL10 Lo1, bei dem am Anfang des Amplifikates noch vor dem eigentlich zu untersuchenden SNP ein Short-Tandem-Repeat lag, welcher aufgrund verschiedener Anzahl an Wiederholungen der Basenfolge CA in beiden Allelen zu einer Phasenverschiebung in der weiteren Sequenz führte. Damit waren die Sequenzen im kodierenden Strang nicht mehr auswertbar, so dass auch hier die Darstellung des komplementären Stranges genutzt wurde. Zur Darstellung der SNP wurden zur Demonstration sequenzierte Proben verwendet, die für den nachzuweisenden SNP heterozygot waren. Lediglich bei TNFa, TGFb und IL2 konnten keine Proben sequenziert werden, die dieser Anforderung entsprachen, so dass in diesen Fällen eine homozygote Variante abgebildet wurde. Alle untersuchten SNP wurden in den gezeigten Sequenzen durch einen senkrechten gelben Balken markiert. Auf den nachfolgenden Seiten sind in den Abb. 12 bis 19 die Ergebnisse der Sequenzierung sortiert nach den drei MPCR gezeigt.

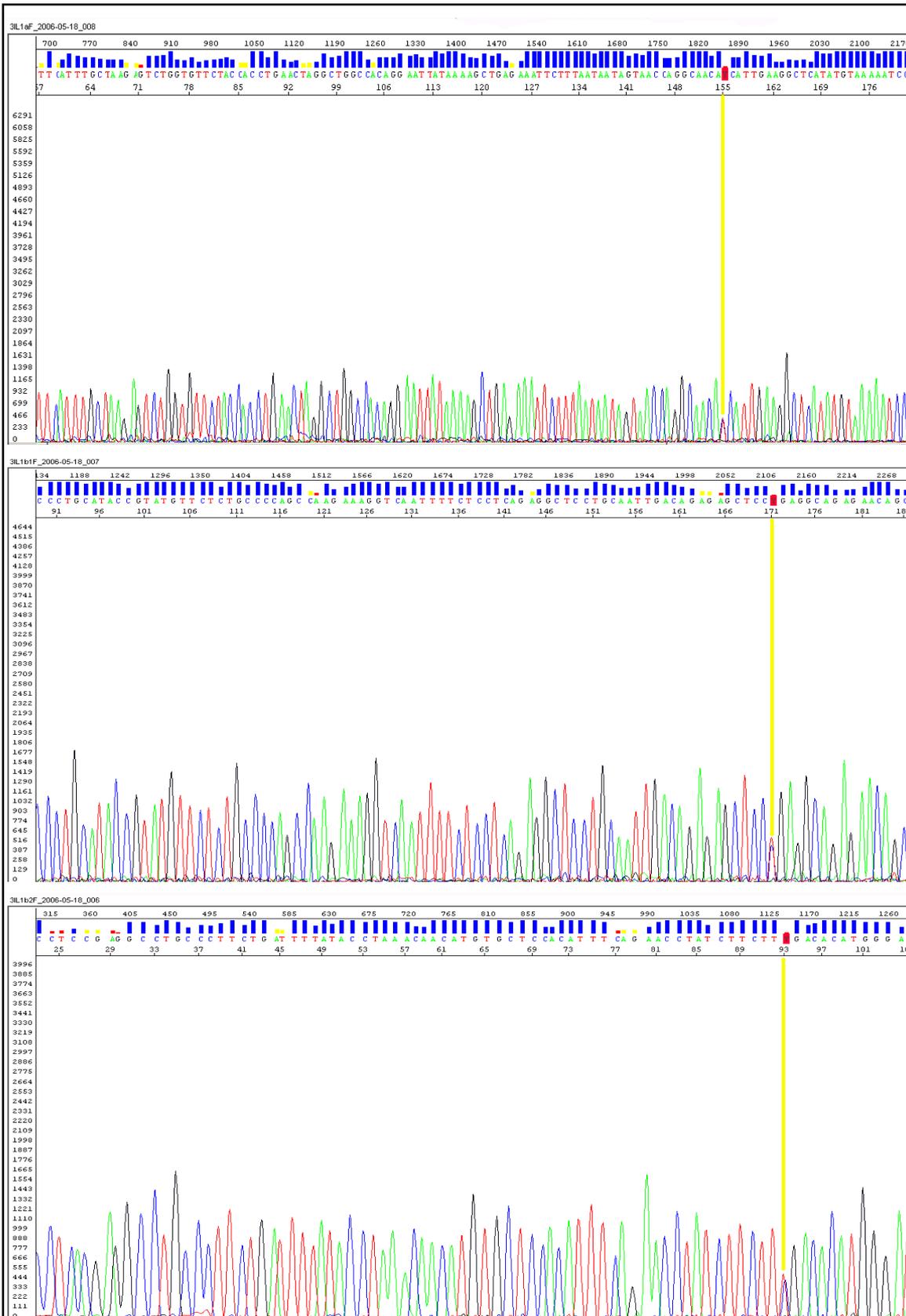


Abb. 12 Ergebnisse der Sequenzierung für die Zytokinpolymorphismen aus Kit1:

- Oben IL1a (Interleukin-1 alpha) rs1800587 markiert mit gelbem Balken
- Mitte IL1b (Interleukin-1 beta) rs16944 markiert mit gelbem Balken
- Unten IL1b (Interleukin-1 beta) rs1143634 markiert mit gelbem Balken

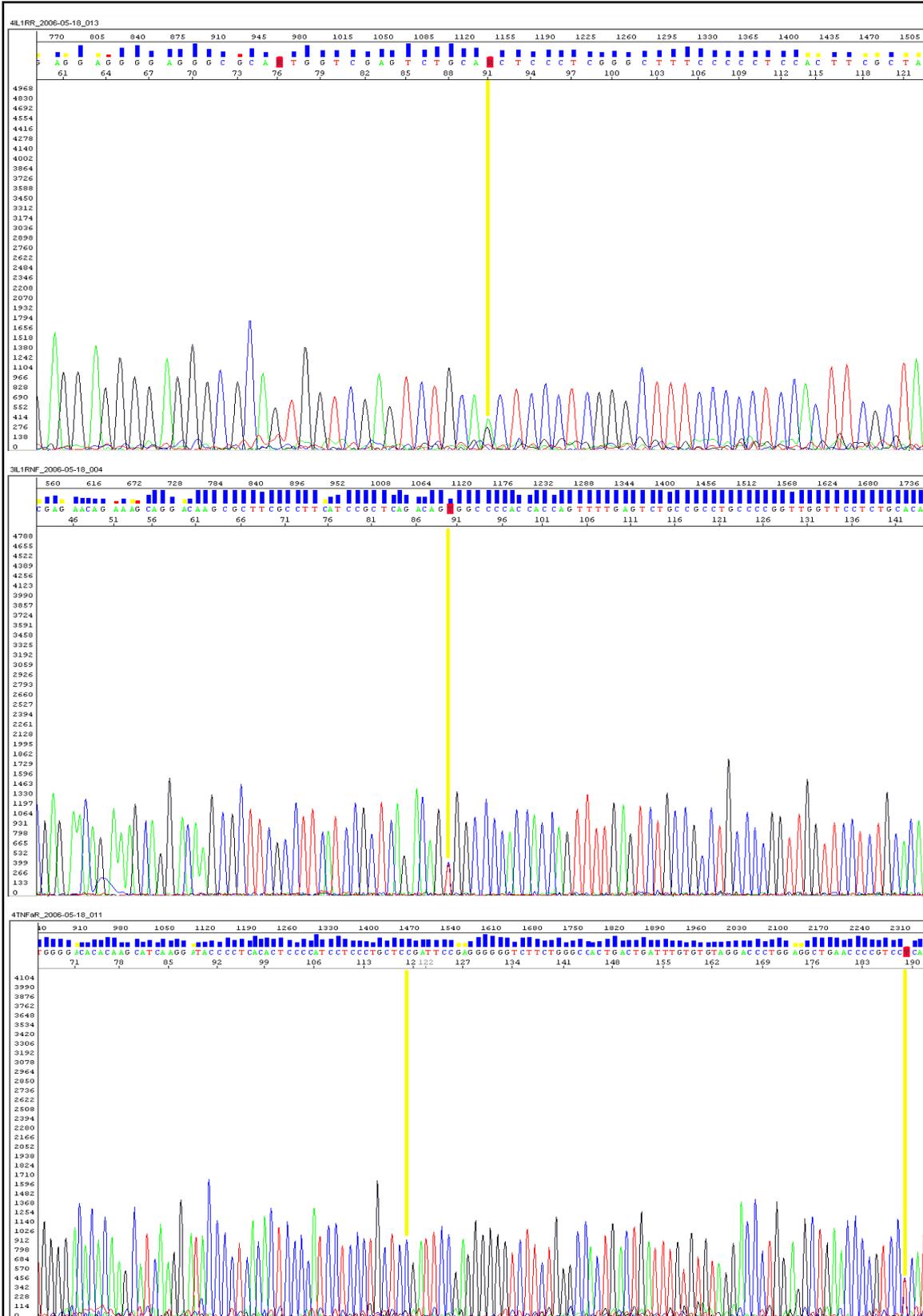


Abb. 13 Ergebnisse der Sequenzierung für die Zytokinpolymorphismen aus Kit1:

- Oben IL1R (Interleukin-1 Rezeptor) rs2234650 markiert mit gelbem Balken
- Mitte IL1RN (Interleukin-1 Rezeptorantagonist) (reverse strand) rs315952 markiert mit gelbem Balken
- Unten TNFa (Tumor necrosis factor alpha) (reverse strand) rs1800629 markiert mit gelben Balken rechts
TNFa (Tumor necrosis factor alpha) (reverse strand) rs361525 markiert mit gelben Balken links

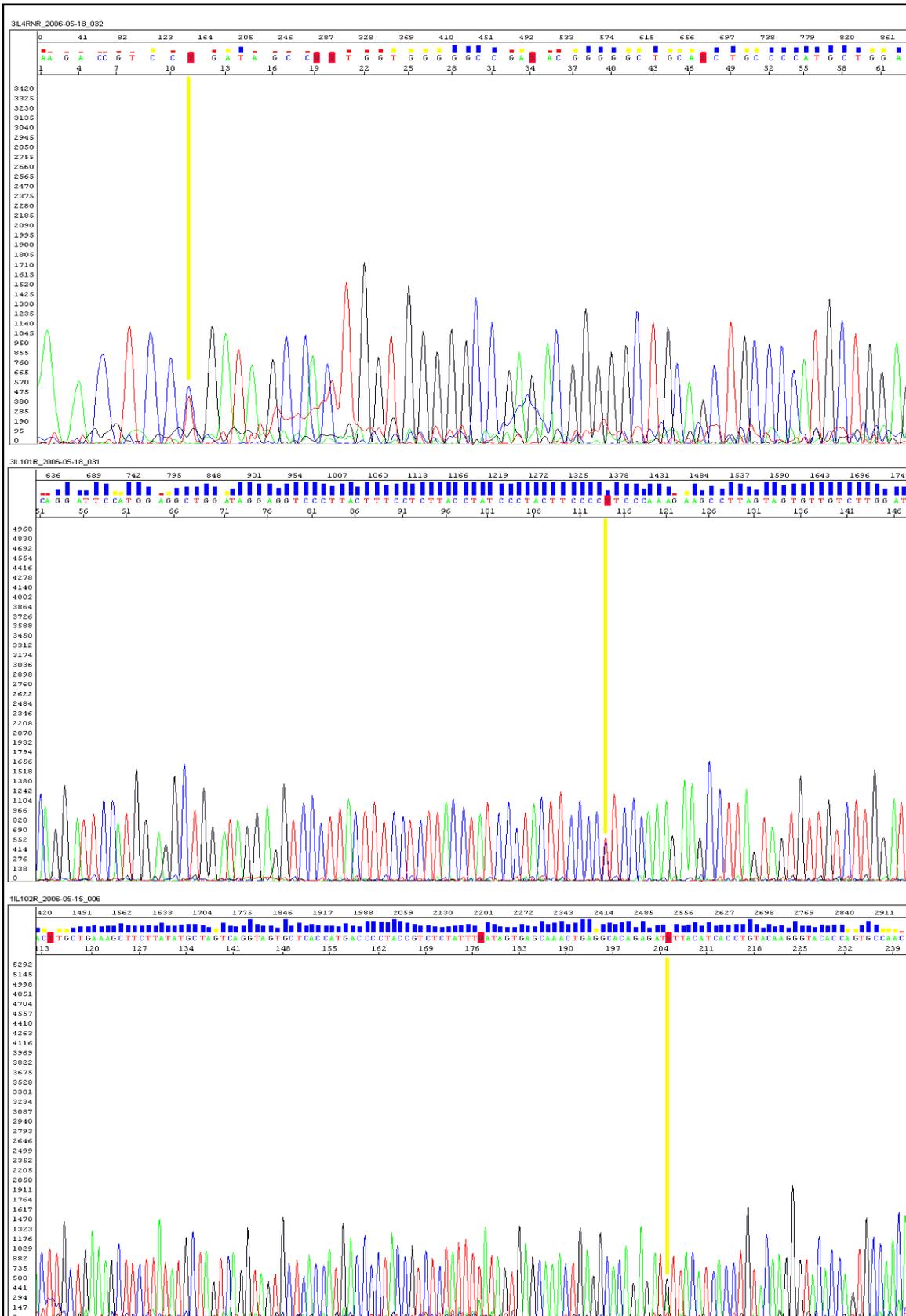


Abb. 14 Ergebnisse der Sequenzierung für die Zytokinpolymorphismen aus Kit2:

- Oben IL4Ra (Interleukin-4 Rezeptor alpha) (reverse strand) rs1801275 markiert mit gelbem Balken
- Mitte IL10 (Interleukin-10) (reverse strand) rs1800896 markiert mit gelbem Balken
- Unten IL10 (Interleukin-10) (reverse strand) rs1800871 markiert mit gelbem Balken

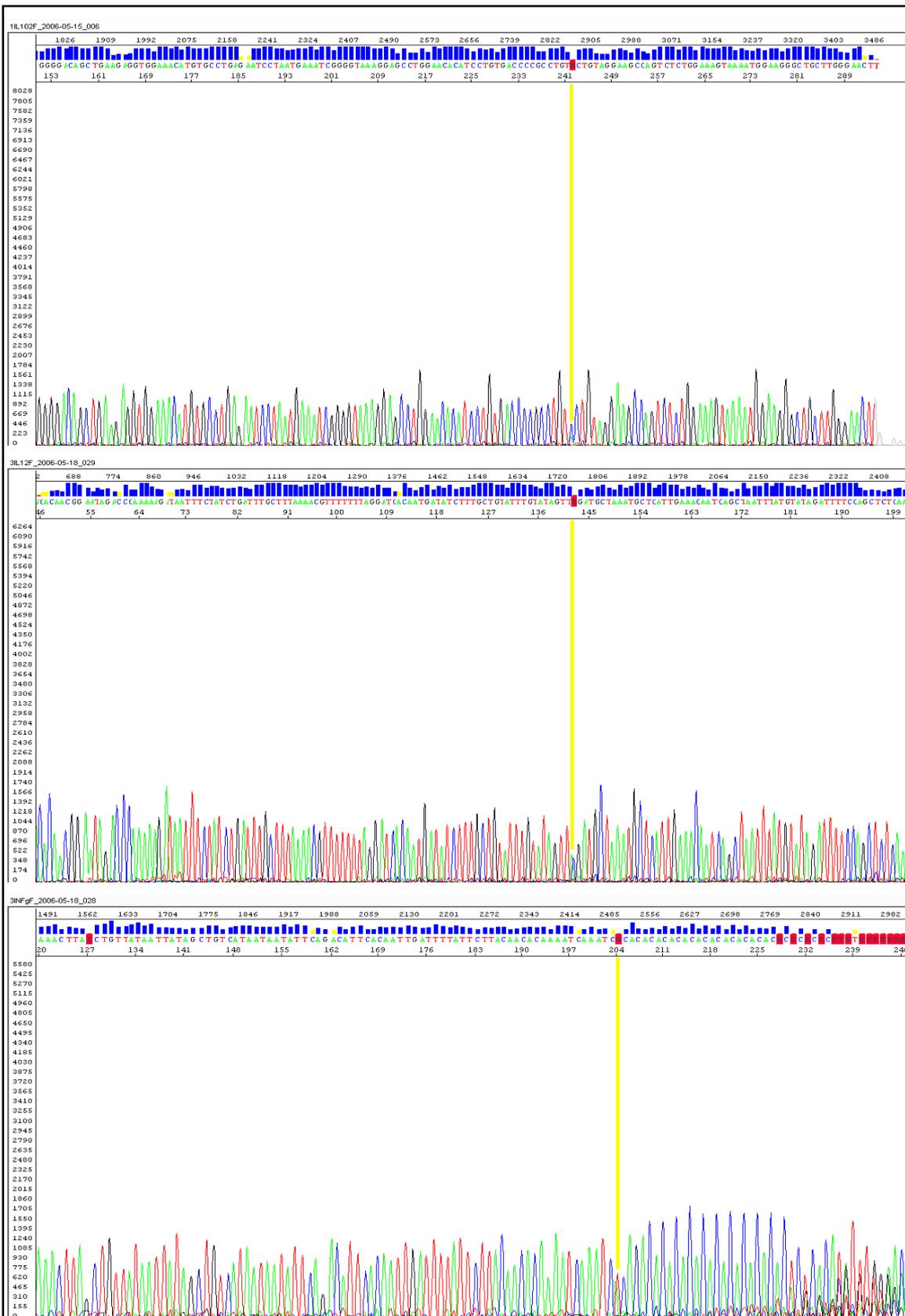


Abb. 15 Ergebnisse der Sequenzierung für die Zytokinpolymorphismen aus Kit2:

- Oben IL10 (Interleukin-10) rs1800872 markiert mit gelbem Balken
- Mitte IL12b (Interleukin-12 beta) rs3212227 markiert mit gelbem Balken
- Unten IFNg (Interferon gamma) rs2430561 markiert mit gelbem Balken

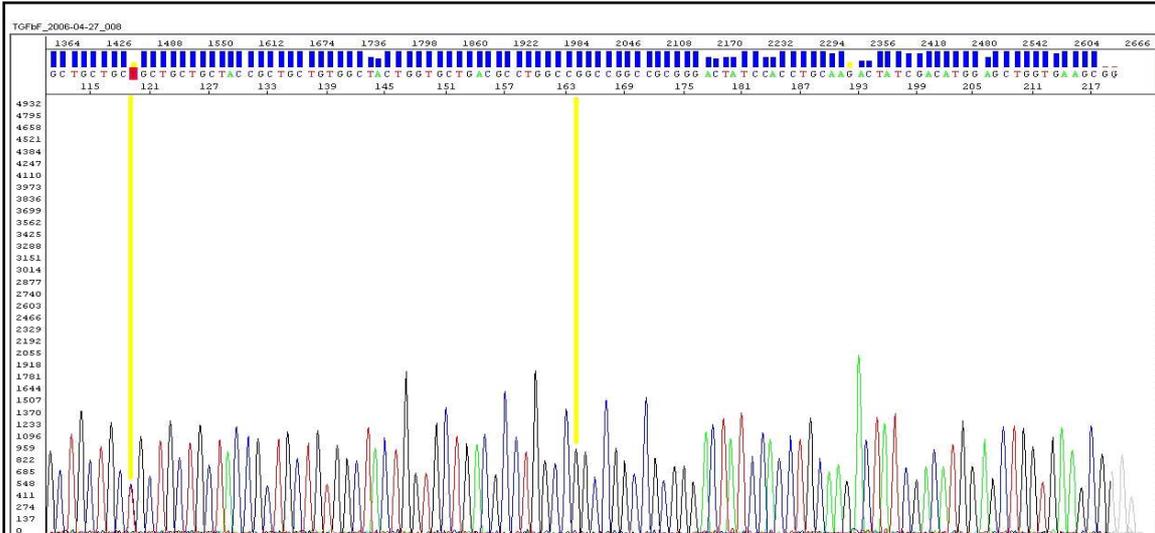


Abb. 16 Ergebnisse der Sequenzierung für die Zytokinpolymorphismen aus Kit2:

TGFb (Transforming growth factor beta) rs1982073 markiert mit gelbem Balken links

TGFb (Transforming growth factor beta) rs1800471 markiert mit gelbem Balken rechts

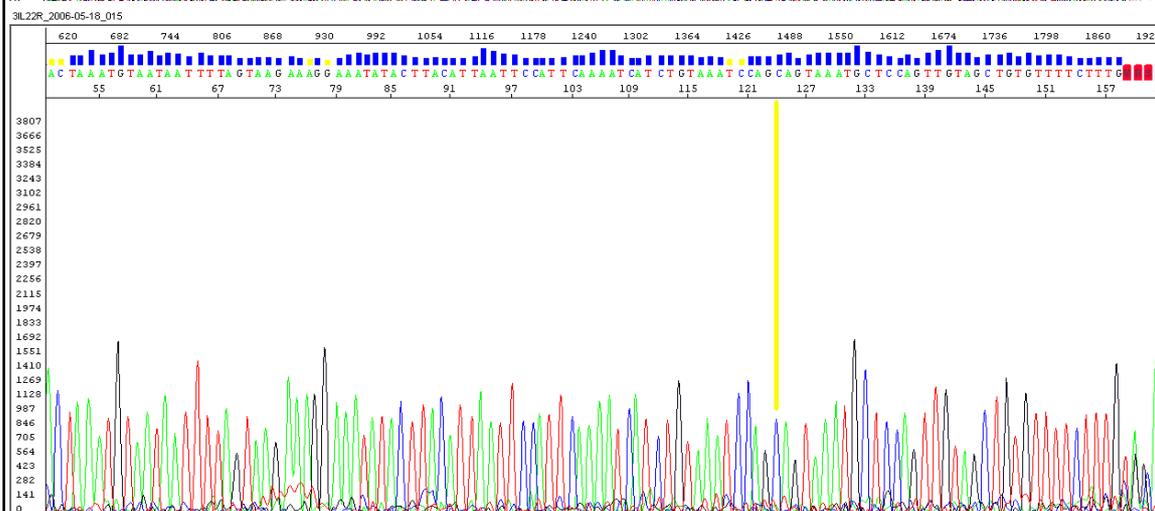
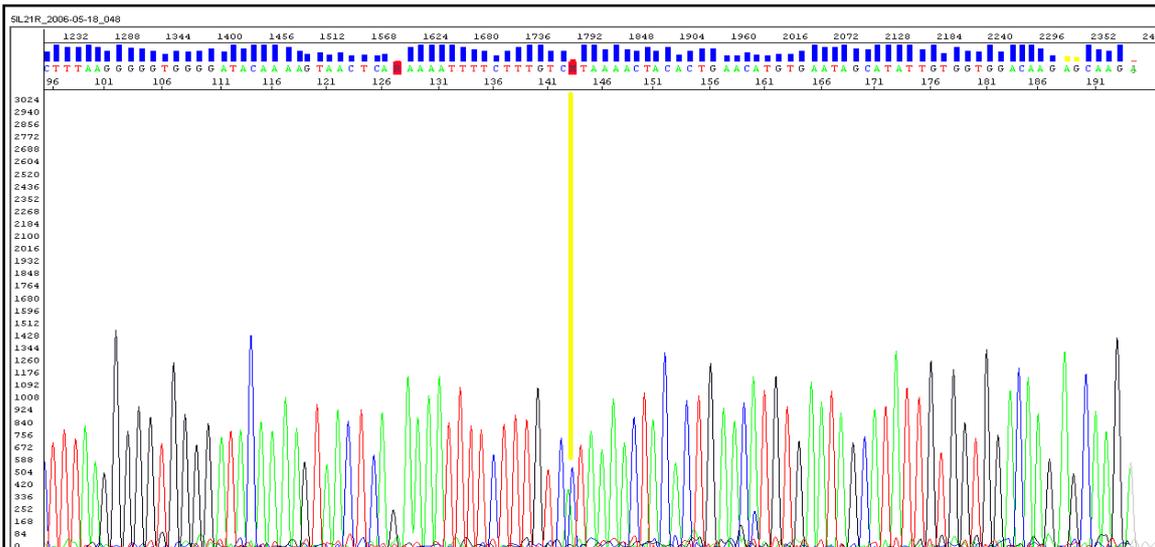


Abb. 17 Ergebnisse der Sequenzierung für die Zytokinpolymorphismen aus Kit3:

Oben IL2 (Interleukin-2) (reverse strand) rs2069762 markiert mit gelbem Balken

Unten IL2 (Interleukin-2) reverse strand) rs2069763 markiert mit gelbem Balken

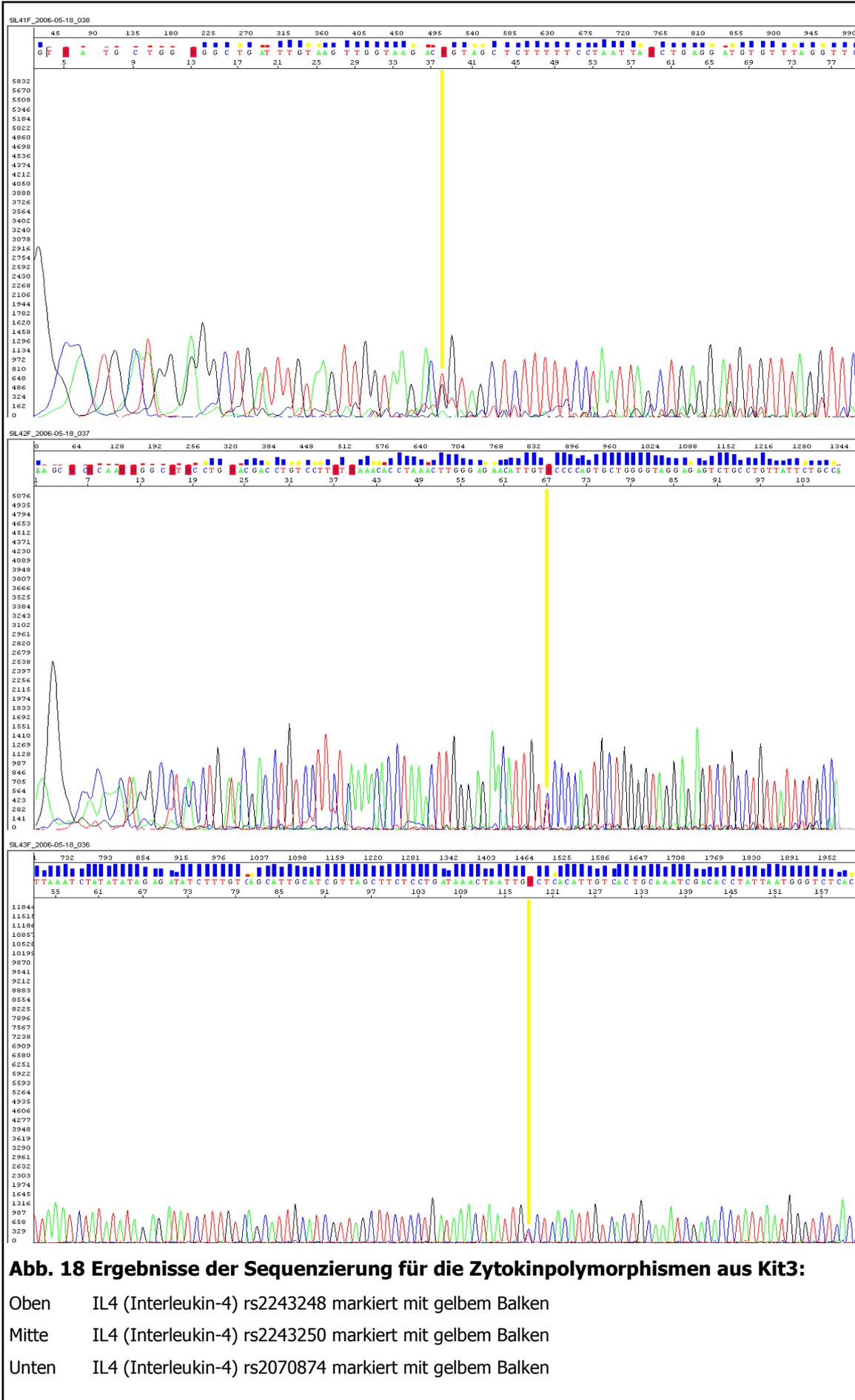
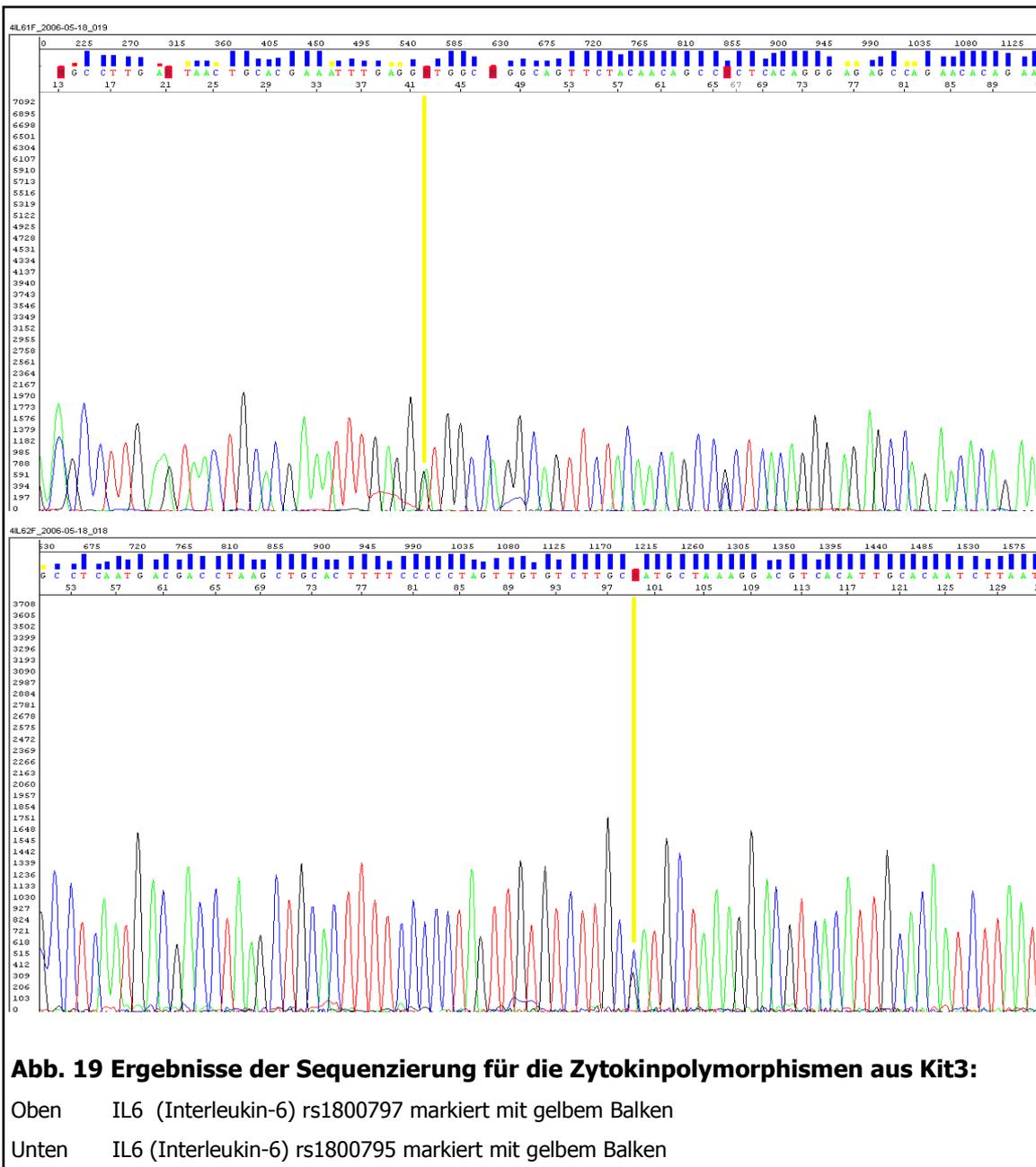


Abb. 18 Ergebnisse der Sequenzierung für die Zytokinpolymorphismen aus Kit3:

- Oben IL4 (Interleukin-4) rs2243248 markiert mit gelbem Balken
- Mitte IL4 (Interleukin-4) rs2243250 markiert mit gelbem Balken
- Unten IL4 (Interleukin-4) rs2070874 markiert mit gelbem Balken



3.3 Ergebnisse der Testvalidierung

Auf den nachfolgenden Seiten 78 bis 99 werden die Ergebnisse der Typisierung mittels Luminex 100 IS, welche zur Validierung ermittelt wurden, dargestellt. Die nachstehenden Tabellen demonstrieren für jeden einzelnen SNP, den zu jeder Probe aus den Rohdaten gemäß Formel (1) Seite 63 ermittelten Quotienten. Dahinter stehend sind die sich aus den festgelegten Cut-Offs ergebenden Genotypisierungen ausgewiesen. Die Übersichtstabellen zeigen des weiteren die aus

der gleichen Probe ermittelten Ergebnisse der Referenzmethode. Im Falle einer Diskrepanz zwischen beiden Methoden sind die Daten in den entsprechenden Zeilen farblich hervorgehoben. In diesen Fällen ist zusätzlich das Ergebnis der Sequenzierung angegeben. Für den Fall, dass die Ergebnisse aus Luminex und der Sequenzierung stimmig waren, ist die Zeile grün markiert, für den Fall, dass das Kontrollergebnis der Sequenzierung mit der der SSP-Referenzmethode übereinstimmte, wurde diese Zeilen rot hervor gehoben.

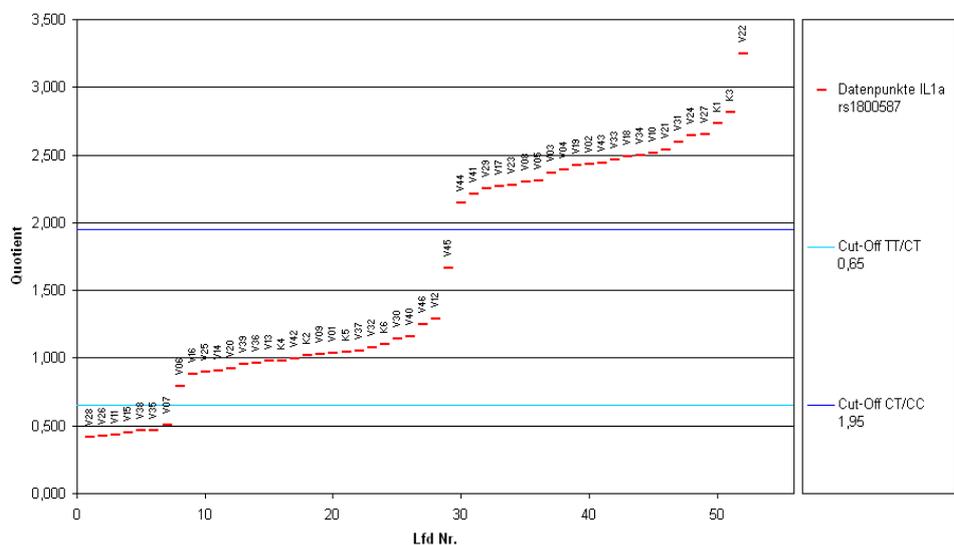
In vereinzelt Fällen waren keine Vortypisierungen verfügbar, meist war dies auf ein nicht auswertbares Testergebnis des SSP-Test zurück zuführen. Für diejenigen Proben, bei deren Polymorphismen dies zutraf, wurde diese in der Spalte der Referenzmethode mit „—“ markiert.

Unter jeder Tabelle ist eine graphische Aufarbeitung der Quotienten zu finden. In diesen Graphiken sind die Quotienten vom Kleinsten zum Größten Quotienten sortiert dargestellt und jeweils mit der Probennummer versehen. In den Diagrammen sind die für den jeweiligen SNP festgelegten Cut-Off Werte ersichtlich, so dass die Ergebnisquotienten der Proben in Bezug zu der Lage der Cut-Off Werte betrachtet werden können. Datenpunkte, die als blaue Raute gekennzeichnet sind, markieren die Messungen, welche weder mit der Referenzmethode noch mit der Sequenzierung übereinstimmen, und dementsprechend Falschmessungen der Methode Luminex darstellen.

Tab. 19 / Abb. 20 Ergebnisse Typisierung für Interleukin 1 alpha (IL1a) rs1800587
A - Adenosin C - Cytosin G - Guanodin T - Thymin SSP - Sequenzspezifische Primer Q - Quotient
rot - Sequenzierung nicht übereinstimmend mit Luminex **grün** - Sequenzierung übereinstimmend mit Luminex

Probe	Q	Typisierung Luminex	Typisierung SSP	Sequenzierung	Probe	Q	Typisierung Luminex	Typisierung SSP	Sequenzierung
V01	1.039	CT	CT		V27	2.648	CC	CC	
V02	2.429	CC	CC		V28	0.413	TT	TT	
V03	2.369	CC	CC		V29	2.255	CC	CC	
V04	2.389	CC	CC		V30	1.140	CT	CT	
V05	2.312	CC	CC		V31	2.591	CC	CC	
V06	0.792	CT	CT		V32	1.078	CT	CT	
V07	0.510	TT	TT		V33	2.467	CC	CC	
V08	2.300	CC	CC		V34	2.498	CC	CC	
V09	1.031	CT	CT		V35	0.464	TT	TT	
V10	2.509	CC	CC		V36	0.961	CT	CT	
V11	0.433	TT	CT	TT	V37	1.056	CT	CT	
V12	1.291	CT	CT		V38	0.462	TT	TT	
V13	0.978	CT	CC	CT	V39	0.956	CT	CT	
V14	0.904	CT	CC	CT	V40	1.158	CT	CT	
V15	0.452	TT	CT	TT	V41	2.213	CC	CC	
V16	0.884	CT	CT		V42	0.998	CT	CT	
V17	2.270	CC	CT	CC	V43	2.437	CC	CC	
V18	2.485	CC	CC		V44	2.147	CC	CT	CC
V19	2.425	CC	CC		V45	1.666	CT	CT	
V20	0.919	CT	CT		V46	1.249	CT	CT	
V21	2.536	CC	CC		K1	2.734	CC	CC	
V22	3.245	CC	CC		K2	1.017	CT	CT	
V23	2.275	CC	CC		K3	2.814	CC	CC	
V24	2.647	CC	CC		K4	0.980	CT	CT	
V25	0.901	CT	CT		K5	1.043	CT	CT	
V26	0.424	TT	TT		K6	1.099	CT	CT	

IL1a rs1800587



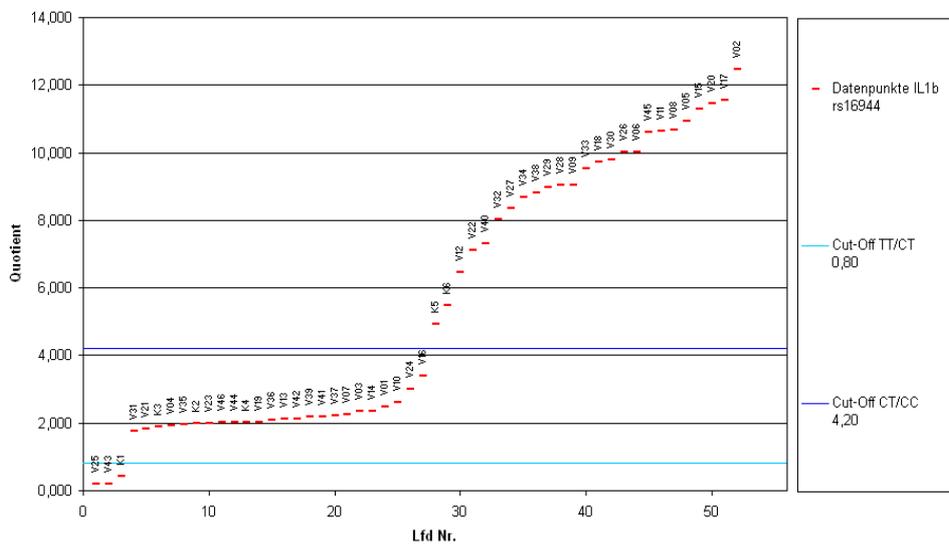
rote Balken stellen korrekt typisierte Proben dar/über den Datenpunkten ist die Probenbezeichnung angegeben

Tab. 20 / Abb. 21 Ergebnisse Typisierung für Interleukin 1 beta (IL1b) rs16944

A - Adenosin C - Cytosin G - Guanodin T - Thymin SSP - Sequenzspezifische Primer Q - Quotient
rot - Sequenzierung nicht übereinstimmend mit Luminex **grün** - Sequenzierung übereinstimmend mit Luminex

Probe	Q	Typisierung Luminex	Typisierung SSP	Sequenzierung	Probe	Q s	Typisierung Luminex	Typisierung SSP	Sequenzierung
V01	2.486	CT	CT		V27	8.359	CC	CC	
V02	12.467	CC	CC		V28	9.030	CC	CC	
V03	2.345	CT	CT		V29	8.984	CC	CC	
V04	1.919	CT	CT		V30	9.790	CC	CC	
V05	10.939	CC	CC		V31	1.768	CT	CT	
V06	10.016	CC	CC		V32	8.023	CC	CC	
V07	2.261	CT	CT		V33	9.513	CC	CC	
V08	10.667	CC	CC		V34	8.678	CC	CC	
V09	9.035	CC	CC		V35	1.964	CT	CT	
V10	2.602	CT	CT		V36	2.103	CT	CT	
V11	10.648	CC	CC		V37	2.211	CT	CT	
V12	6.460	CC	CC		V38	8.803	CC	CC	
V13	2.109	CT	CT		V39	2.194	CT	CT	
V14	2.352	CT	CT		V40	7.317	CC	CC	
V15	11.277	CC	CC		V41	2.201	CT	CT	
V16	3.399	CT	CT		V42	2.112	CT	CT	
V17	11.567	CC	CC		V43	0.210	TT	TT	
V18	9.712	CC	CC		V44	2.033	CT	CT	
V19	2.038	CT	CT		V45	10.596	CC	CC	
V20	11.452	CC	CC		V46	2.007	CT	CT	
V21	1.811	CT	CT		K1	0.413	TT	TT	
V22	7.114	CC	CC		K2	1.992	CT	CT	
V23	2.002	CT	CT		K3	1.906	CT	CT	
V24	3.005	CT	CT		K4	2.036	CT	CT	
V25	0.190	TT	TT		K5	4.936	CC	CC	
V26	10.005	CC	CC		K6	5.473	CC	CC	

IL1b rs16944

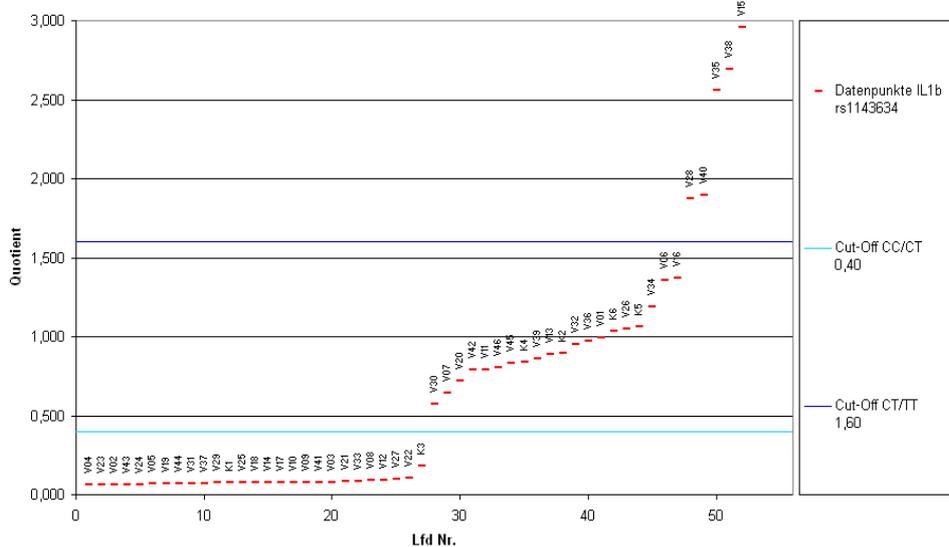


rote Balken stellen korrekt typisierte Proben dar/über den Datenpunkten ist die Probenbezeichnung angegeben

Tab. 21/Abb. 22 Ergebnisse Typisierung für Interleukin 1 beta (IL1b) rs1143634
A - Adenosin C - Cytosin G - Guanosin T - Thymin SSP - Sequenzspezifische Primer Q - Quotient
rot - Sequenzierung nicht übereinstimmend mit Luminex **grün** - Sequenzierung übereinstimmend mit Luminex

Probe	Q	Typisierung Luminex	Typisierung SSP	Sequenzierung	Probe	Q	Typisierung Luminex	Typisierung SSP	Sequenzierung
V01	0.993	CT	CT		V27	0.100	CC	CC	
V02	0.063	CC	CC		V28	1.871	TT	TT	
V03	0.080	CC	CC		V29	0.074	CC	CC	
V04	0.061	CC	CC		V30	0.576	CT	CT	
V05	0.068	CC	CC		V31	0.071	CC	CC	
V06	1.359	CT	CT		V32	0.948	CT	CT	
V07	0.646	CT	CT		V33	0.083	CC	CC	
V08	0.088	CC	CC		V34	1.186	CT	CT	
V09	0.079	CC	CC		V35	2.558	TT	TT	
V10	0.078	CC	CC		V36	0.971	CT	CT	
V11	0.792	CT	CT		V37	0.073	CC	CC	
V12	0.092	CC	CC		V38	2.693	TT	TT	
V13	0.890	CT	CT		V39	0.860	CT	CT	
V14	0.078	CC	CC		V40	1.896	TT	CT	TT
V15	2.958	TT	CT	TT	V41	0.079	CC	CT	CC
V16	1.370	CT	CT		V42	0.789	CT	CT	
V17	0.078	CC	CC		V43	0.063	CC	CC	
V18	0.077	CC	CC		V44	0.070	CC	CT	CC
V19	0.068	CC	CC		V45	0.832	CT	CT	
V20	0.719	CT	CT		V46	0.801	CT	CT	
V21	0.082	CC	CC		K1	0.075	CC	CC	
V22	0.108	CC	CC		K2	0.896	CT	CT	
V23	0.063	CC	CC		K3	0.181	CC	CC	
V24	0.066	CC	CC		K4	0.837	CT	CT	
V25	0.076	CC	CC		K5	1.062	CT	CT	
V26	1.046	CT	CT		K6	1.036	CT	CT	

IL1b rs1143634

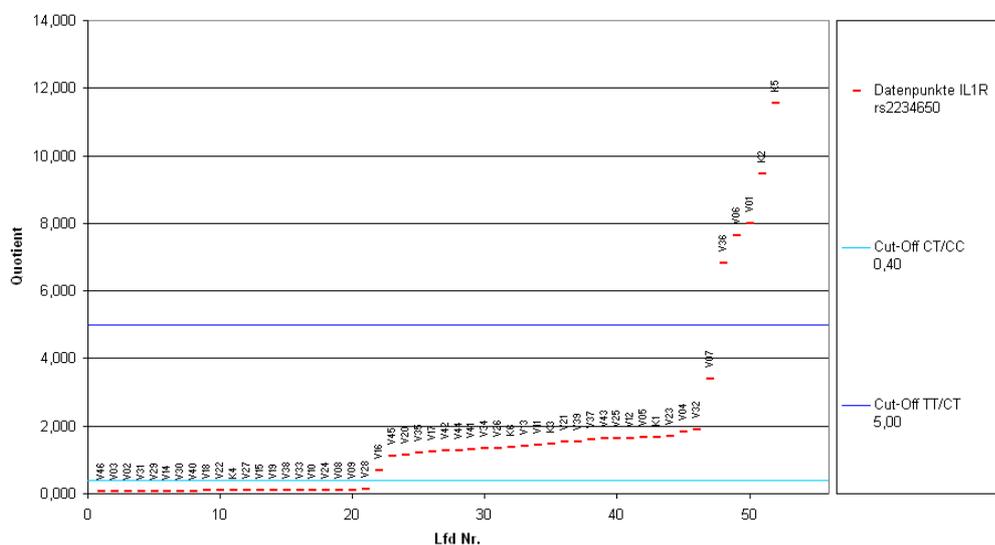


rote Balken stellen korrekt typisierte Proben dar/über den Datenpunkten ist die Probenbezeichnung angegeben

Tab. 22/Abb. 23 Ergebnisse Typisierung f. Interleukin 1 Rezeptor (IL1R) rs2234650
A - Adenosin C - Cytosin G - Guanosin T - Thymin SSP - Sequenzspezifische Primer Q - Quotient
rot - Sequenzierung nicht übereinstimmend mit Luminex grün - Sequenzierung übereinstimmend mit Luminex

Probe	Q	Typisierung Luminex	Typisierung SSP	Sequenzierung	Probe	Q	Typisierung Luminex	Typisierung SSP	Sequenzierung
V01	7.996	TT	CC	TT	V27	0.089	CC	CC	
V02	0.074	CC	CC		V28	0.124	CC	CT	CC
V03	0.066	CC	CC		V29	0.077	CC	CC	
V04	1.825	CT	CT		V30	0.081	CC	CC	
V05	1.648	CT	CT		V31	0.076	CC	CC	
V06	7.639	TT	TT		V32	1.880	CT	CT	
V07	3.400	CT	CT		V33	0.099	CC	CC	
V08	0.105	CC	CC		V34	1.322	CT	CT	
V09	0.107	CC	CC		V35	1.208	CT	CT	
V10	0.103	CC	CC		V36	6.831	TT	TT	
V11	1.428	CT	CT		V37	1.595	CT	CT	
V12	1.636	CT	CT		V38	0.098	CC	CC	
V13	1.405	CT	CT		V39	1.543	CT	CT	
V14	0.080	CC	CC		V40	0.081	CC	CC	
V15	0.092	CC	CC		V41	1.293	CT	CT	
V16	0.685	CT	CT		V42	1.263	CT	CT	
V17	1.231	CT	CT		V43	1.619	CT	CT	
V18	0.084	CC	CC		V44	1.265	CT	CT	
V19	0.094	CC	CC		V45	1.115	CT	CT	
V20	1.158	CT	CT		V46	0.060	CC	CC	
V21	1.541	CT	CT		K1	1.677	CT	CT	
V22	0.086	CC	CC		K2	9.465	TT	TT	
V23	1.701	CT	CC	CT	K3	1.476	CT	CT	
V24	0.104	CC	CC		K4	0.086	CC	CC	
V25	1.634	CT	CT		K5	11.538	TT	TT	
V26	1.353	CT	CT		K6	1.363	CT	CT	

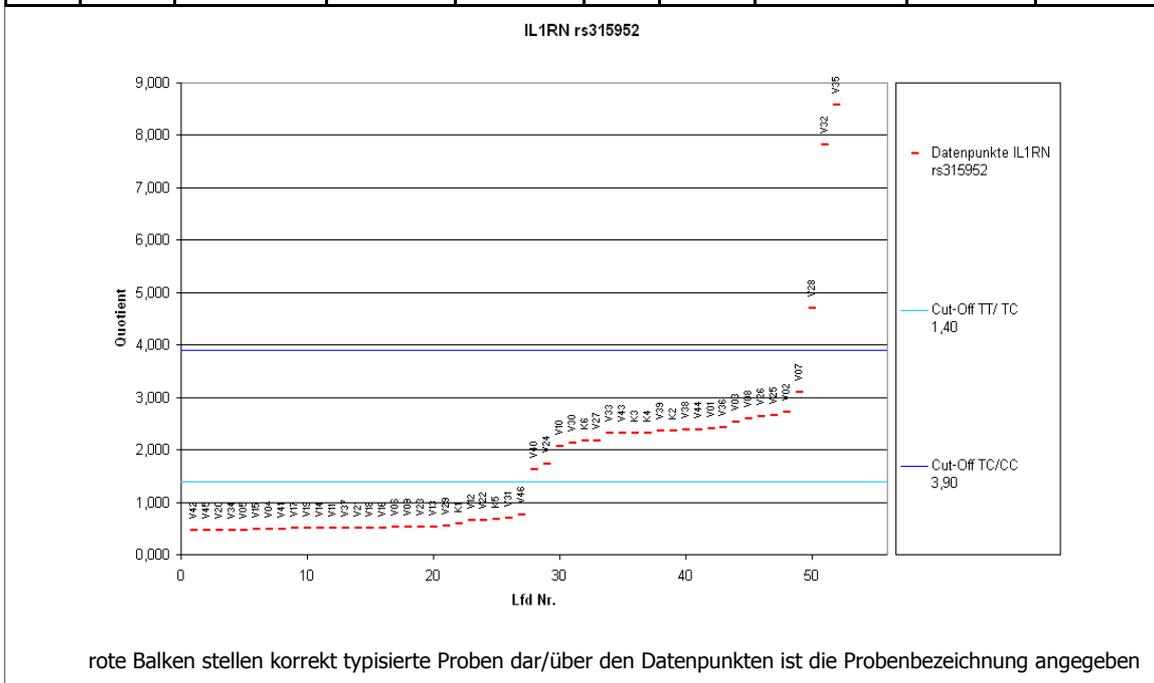
IL1R rs2234650



rote Balken stellen korrekt typisierte Proben dar/über den Datenpunkten ist die Probenbezeichnung angegeben

Tab. 23/Abb. 24 Ergebnisse Typisierung Interleukin 1 Rezeptorantagonist (IL1RN) rs315952
A - Adenosin C - Cytosin G - Guanosin T - Thymin SSP - Sequenzspezifische Primer Q - Quotient
rot - Sequenzierung nicht übereinstimmend mit Luminex **grün** - Sequenzierung übereinstimmend mit Luminex

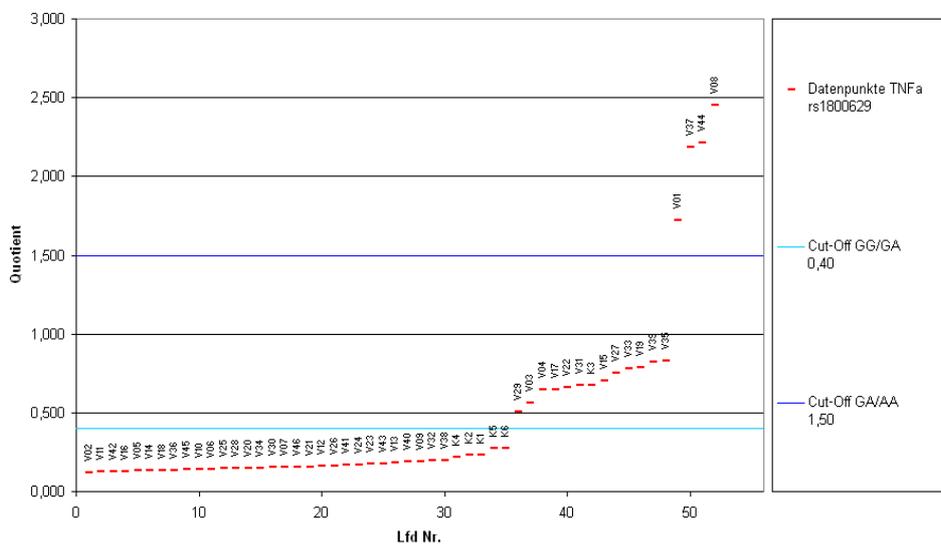
Probe	Q	Typisierung Luminex	Typisierung SSP	Sequenzierung	Probe	Q	Typisierung Luminex	Typisierung SSP	Sequenzierung
V01	2.400	TC	TC		V27	2.178	TC	TC	
V02	2.729	TC	TC		V28	4.701	CC	TC	CC
V03	2.532	TC	TC		V29	0.540	TT	TT	
V04	0.486	TT	TT		V30	2.135	TC	TC	
V05	0.474	TT	TT		V31	0.688	TT	TT	
V06	0.518	TT	TT		V32	7.819	CC	CC	
V07	3.103	TC	TC		V33	2.311	TC	TC	
V08	2.592	TC	TC		V34	0.474	TT	TT	
V09	0.523	TT	TT		V35	8.571	CC	CC	
V10	2.055	TC	TC		V36	2.430	TC	TC	
V11	0.499	TT	TT		V37	0.501	TT	TT	
V12	0.658	TT	TT		V38	2.379	TC	TC	
V13	0.537	TT	TT		V39	2.352	TC	TC	
V14	0.498	TT	TT		V40	1.633	TC	TC	
V15	0.478	TT	TC	TT	V41	0.493	TT	TC	TT
V16	0.516	TT	TT		V42	0.459	TT	TT	
V17	0.498	TT	TT		V43	2.313	TC	TC	
V18	0.506	TT	TT		V44	2.385	TC	TC	
V19	0.498	TT	TT		V45	0.459	TT	TT	
V20	0.461	TT	TT		V46	0.765	TT	TT	
V21	0.505	TT	TT		K1	0.591	TT	TT	
V22	0.662	TT	TT		K2	2.354	TC	TC	
V23	0.536	TT	TT		K3	2.316	TC	TC	
V24	1.735	TC	TC		K4	2.327	TC	TC	
V25	2.651	TC	TC		K5	0.671	TT	TT	
V26	2.640	TC	TC		K6	2.168	TC	TC	



Tab. 24/Abb. 25 Ergebnisse Typisierung für Tumor necrosis factor alpha (TNFα) rs1800629
A - Adenosin C - Cytosin G - Guanodin T - Thymin SSP - Sequenzspezifische Primer Q - Quotient
rot - Sequenzierung nicht übereinstimmend mit Luminex **grün** - Sequenzierung übereinstimmend mit Luminex

Probe	Q	Typisierung Luminex	Typisierung SSP	Sequenzierung	Probe	Q	Typisierung Luminex	Typisierung SSP	Sequenzierung
V01	1.723	AA	GA	AA	V27	0.754	GA	GA	
V02	0.123	GG	GG		V28	0.146	GG	GG	
V03	0.562	GA	GA		V29	0.508	GA	GA	
V04	0.644	GA	GA		V30	0.151	GG	GG	
V05	0.132	GG	GG		V31	0.672	GA	GA	
V06	0.144	GG	GG		V32	0.197	GG	GG	
V07	0.153	GG	GG		V33	0.780	GA	GA	
V08	2.452	AA	AA		V34	0.150	GG	GG	
V09	0.190	GG	GG		V35	0.832	GA	GA	
V10	0.140	GG	GG		V36	0.134	GG	GG	
V11	0.124	GG	GG		V37	2.185	AA	AA	
V12	0.161	GG	GG		V38	0.200	GG	GG	
V13	0.180	GG	GG		V39	0.821	GA	GA	
V14	0.132	GG	GG		V40	0.187	GG	GG	
V15	0.702	GA	GA		V41	0.166	GG	GG	
V16	0.125	GG	GG		V42	0.124	GG	GG	
V17	0.645	GA	GA		V43	0.179	GG	GG	
V18	0.133	GG	GG		V44	2.214	AA	GA	AA
V19	0.789	GA	GA		V45	0.139	GG	GG	
V20	0.150	GG	—		V46	0.154	GG	GG	
V21	0.157	GG	GG		K1	0.231	GG	GG	
V22	0.658	GA	GA		K2	0.228	GG	GG	
V23	0.174	GG	GG		K3	0.676	GA	GA	
V24	0.169	GG	GG		K4	0.217	GG	GG	
V25	0.145	GG	GG		K5	0.272	GG	GG	
V26	0.163	GG	GG		K6	0.275	GG	GG	

TNFα rs1800629

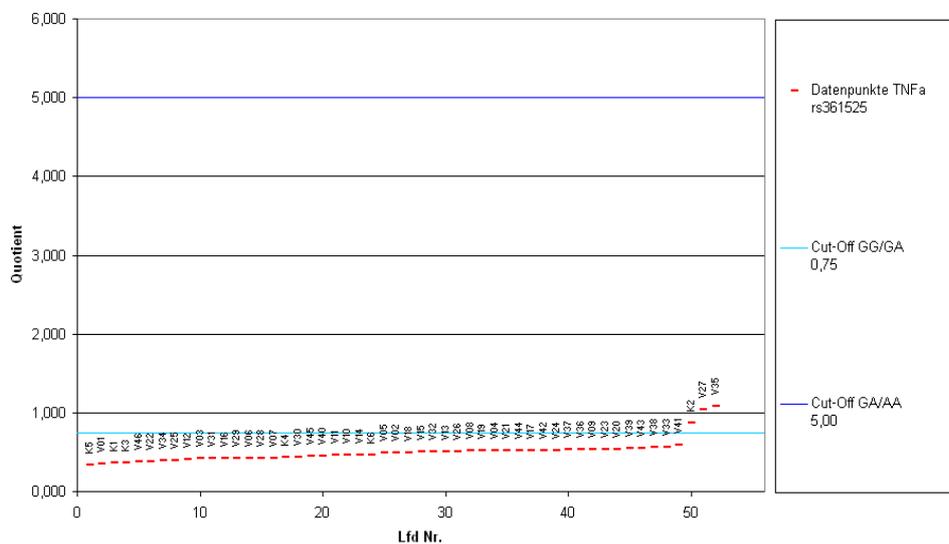


rote Balken stellen korrekt typisierte Proben dar/über den Datenpunkten ist die Probenbezeichnung angegeben

Tab. 25 / Abb. 26 Ergebnisse Typisierung für Tumor necrosis factor alpha (TNFa) rs361525
A - Adenosin C - Cytosin G - Guanodin T - Thymin SSP - Sequenzspezifische Primer Q - Quotient
rot - Sequenzierung nicht übereinstimmend mit Luminex **grün** - Sequenzierung übereinstimmend mit Luminex

Probe	Q	Typisierung Luminex	Typisierung SSP	Sequenzierung	Probe	Q	Typisierung Luminex	Typisierung SSP	Sequenzierung
V01	0.356	GG	GG		V27	1.041	GA	GA	
V02	0.494	GG	GG		V28	0.422	GG	GG	
V03	0.417	GG	GG		V29	0.419	GG	GG	
V04	0.515	GG	GG		V30	0.440	GG	GG	
V05	0.487	GG	GG		V31	0.417	GG	GG	
V06	0.420	GG	GG		V32	0.500	GG	GG	
V07	0.426	GG	GG		V33	0.566	GG	GG	
V08	0.513	GG	GG		V34	0.396	GG	GG	
V09	0.532	GG	GG		V35	1.085	GA	GA	
V10	0.466	GG	GG		V36	0.532	GG	GG	
V11	0.462	GG	GG		V37	0.531	GG	GG	
V12	0.404	GG	GG		V38	0.559	GG	GG	
V13	0.500	GG	GG		V39	0.553	GG	GG	
V14	0.470	GG	GG		V40	0.450	GG	GG	
V15	0.500	GG	GG		V41	0.588	GG	GA	GG
V16	0.417	GG	GG		V42	0.525	GG	GG	
V17	0.524	GG	GG		V43	0.554	GG	GG	
V18	0.494	GG	GG		V44	0.521	GG	GG	
V19	0.515	GG	GG		V45	0.443	GG	GG	
V20	0.540	GG	—		V46	0.379	GG	GG	
V21	0.517	GG	GG		K1	0.362	GG	GG	
V22	0.383	GG	GG		K2	0.865	GA	GA	
V23	0.533	GG	GG		K3	0.366	GG	GG	
V24	0.525	GG	GG		K4	0.433	GG	GG	
V25	0.400	GG	GG		K5	0.343	GG	GG	
V26	0.511	GG	GG		K6	0.471	GG	GG	

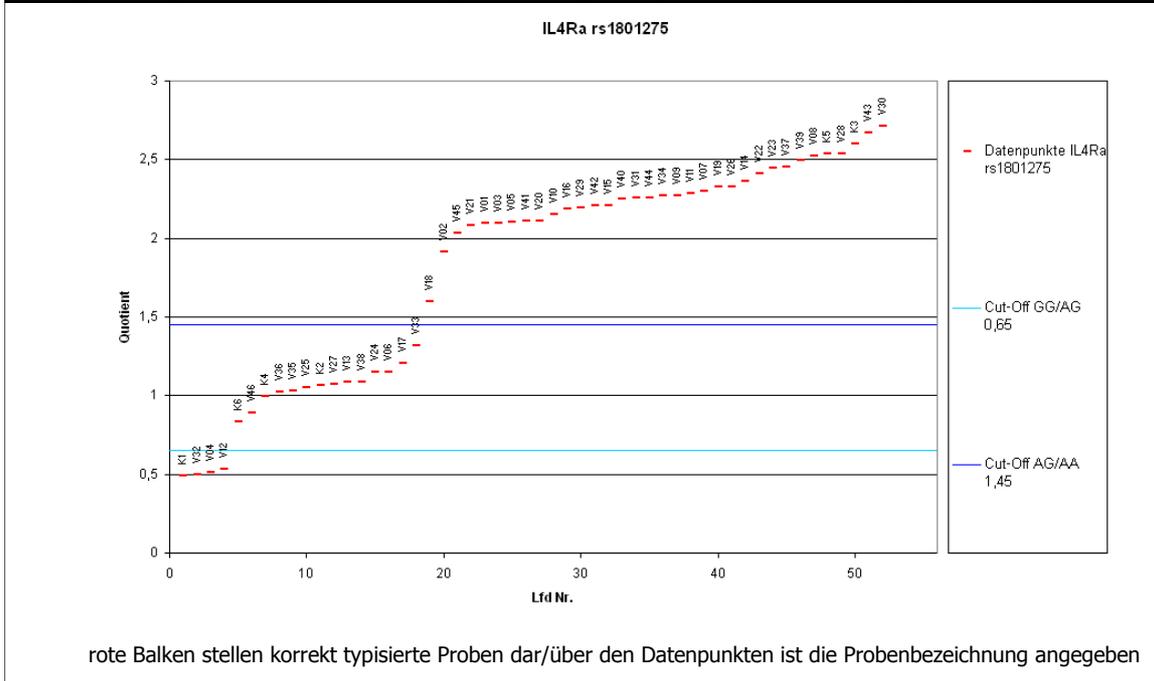
TNFa rs361525



rote Balken stellen korrekt typisierte Proben dar/über den Datenpunkten ist die Probenbezeichnung angegeben

Tab. 25 / Abb. 26 Ergebnisse Typisierung für Interleukin 4 Rezeptor alpha (IL4Ra) rs1801275
A - Adenosin C - Cytosin G - Guanosin T - Thymin SSP - Sequenzspezifische Primer Q - Quotient
rot - Sequenzierung nicht übereinstimmend mit Luminex **grün** - Sequenzierung übereinstimmend mit Luminex

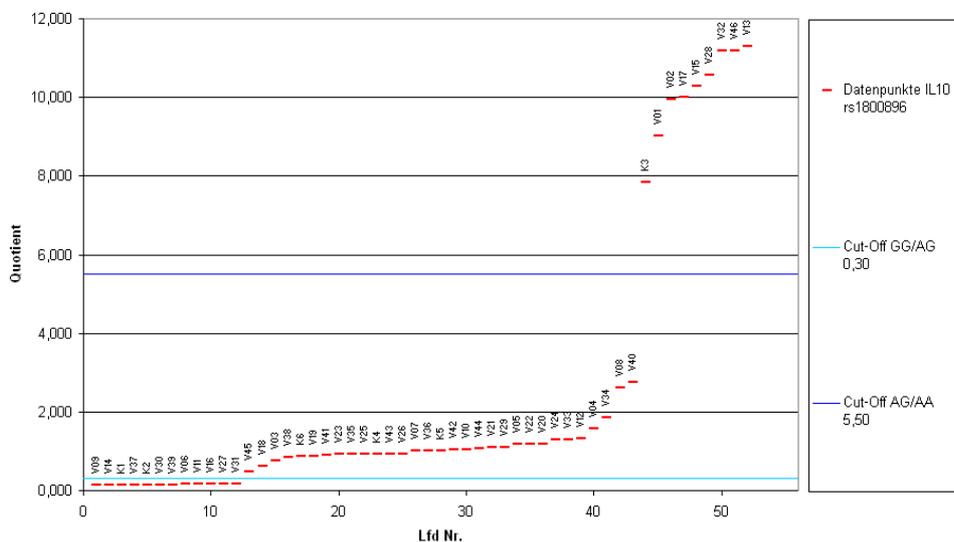
Probe	Q	Typisierung Luminex	Typisierung SSP	Sequenzierung	Probe	Q	Typisierung Luminex	Typisierung SSP	Sequenzierung
V01	2.093	AA	AG	AA	V27	1.069	AG	AG	
V02	1.915	AA	AG	AA	V28	2.537	AA	AA	
V03	2.094	AA	AA		V29	2.194	AA	AA	
V04	0.515	GG	GG		V30	2.712	AA	AA	
V05	2.106	AA	AA		V31	2.259	AA	AA	
V06	1.152	AG	AG		V32	0.497	GG	GG	
V07	2.297	AA	AA		V33	1.321	AG	AG	
V08	2.525	AA	AA		V34	2.268	AA	AA	
V09	2.273	AA	AA		V35	1.032	AG	AG	
V10	2.154	AA	AA		V36	1.021	AG	AG	
V11	2.288	AA	AA		V37	2.454	AA	AA	
V12	0.532	GG	GG		V38	1.086	AG	AG	
V13	1.086	AG	AG		V39	2.498	AA	AA	
V14	2.362	AA	AA		V40	2.251	AA	AA	
V15	2.211	AA	AG	AA	V41	2.109	AA	AG	AA
V16	2.186	AA	AA		V42	2.206	AA	AA	
V17	1.207	AG	AG		V43	2.669	AA	AA	
V18	1.597	AA	AG	AA	V44	2.260	AA	AA	
V19	2.330	AA	AA		V45	2.031	AA	AA	
V20	2.110	AA	AA		V46	0.892	AG	AG	
V21	2.079	AA	AA		K1	0.491	GG	GG	
V22	2.411	AA	AA		K2	1.062	AG	AG	
V23	2.444	AA	AA		K3	2.601	AA	AA	
V24	1.148	AG	AG		K4	0.998	AG	AG	
V25	1.048	AG	AG		K5	2.535	AA	AA	
V26	2.330	AA	AA		K6	0.836	AG	AG	



Tab. 26/Abb. 27 Ergebnisse Typisierung für Interleukin 10 (IL10) rs1800896
A - Adenosin C - Cytosin G - Guanodin T - Thymin SSP - Sequenzspezifische Primer Q - Quotient
rot - Sequenzierung nicht übereinstimmend mit Luminex **grün** - Sequenzierung übereinstimmend mit Luminex

Probe	Q	Typisierung Luminex	Typisierung SSP	Sequenzierung	Probe	Q	Typisierung Luminex	Typisierung SSP	Sequenzierung
V01	9.024	AA	AG	AA	V27	0.170	GG	GG	
V02	9.950	AA	AA		V28	10.568	AA	AG	AA
V03	0.745	AG	AG		V29	1.103	AG	AG	
V04	1.586	AG	AG		V30	0.152	GG	GG	
V05	1.174	AG	GG	AG	V31	0.172	GG	GG	
V06	0.160	GG	GG		V32	11.174	AA	AA	
V07	1.002	AG	AG		V33	1.305	AG	AG	
V08	2.614	AG	AG		V34	1.848	AG	AG	
V09	0.132	GG	GG		V35	0.916	AG	AG	
V10	1.039	AG	AG		V36	1.021	AG	AG	
V11	0.164	GG	GG		V37	0.148	GG	GG	
V12	1.319	AG	AG		V38	0.853	AG	AG	
V13	11.307	AA	AA		V39	0.154	GG	GG	
V14	0.141	GG	GG		V40	2.767	AG	AG	
V15	10.274	AA	AA		V41	0.890	AG	AG	
V16	0.168	GG	GG		V42	1.037	AG	AG	
V17	10.001	AA	AA		V43	0.931	AG	AG	
V18	0.609	AG	AG		V44	1.080	AG	AG	
V19	0.868	AG	AG		V45	0.474	AG	AG	
V20	1.187	AG	AG		V46	11.174	AA	AA	
V21	1.084	AG	AG		K1	0.143	GG	GG	
V22	1.182	AG	AG		K2	0.149	GG	GG	
V23	0.916	AG	AG		K3	7.842	AA	AA	
V24	1.289	AG	AG		K4	0.926	AG	AG	
V25	0.917	AG	AG		K5	1.023	AG	AG	
V26	0.938	AG	AG		K6	0.858	AG	AG	

IL 10 rs1800896

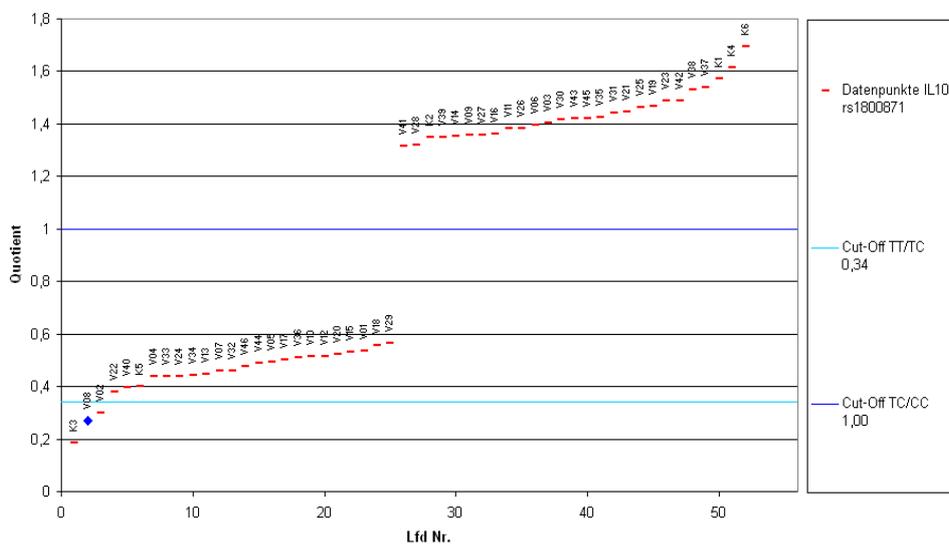


rote Balken stellen korrekt typisierte Proben dar/über den Datenpunkten ist die Probenbezeichnung angegeben

Tab. 27/Abb. 28 Ergebnisse Typisierung für Interleukin 10 (IL10) rs1800871
A - Adenosin C - Cytosin G - Guanosin T - Thymin SSP - Sequenzspezifische Primer Q - Quotient
rot - Sequenzierung nicht übereinstimmend mit Luminex grün - Sequenzierung übereinstimmend mit Luminex

Probe	Q	Typisierung Luminex	Typisierung SSP	Sequenzierung	Probe	Q	Typisierung Luminex	Typisierung SSP	Sequenzierung
V01	0.534	TC	TC		V27	1.358	CC	CC	
V02	0.299	TT	TT		V28	1.321	CC	CC	
V03	1.404	CC	CC		V29	0.566	TC	TC	
V04	0.437	TC	TC		V30	1.417	CC	CC	
V05	0.494	TC	CC	TC	V31	1.440	CC	CC	
V06	1.397	CC	CC		V32	0.458	TC	TC	
V07	0.458	TC	TC		V33	0.438	TC	TC	
V08	0.271	TT	TC	TC	V34	0.443	TC	TC	
V09	1.358	CC	CC		V35	1.423	CC	CC	
V10	0.514	TC	TC		V36	0.508	TC	TC	
V11	1.382	CC	CC		V37	1.538	CC	CC	
V12	0.514	TC	TC		V38	1.531	CC	CC	
V13	0.448	TC	TC		V39	1.348	CC	CC	
V14	1.354	CC	CC		V40	0.395	TC	TC	
V15	0.532	TC	TC		V41	1.316	CC	CC	
V16	1.363	CC	CC		V42	1.490	CC	CC	
V17	0.500	TC	TC		V43	1.421	CC	CC	
V18	0.556	TC	TC		V44	0.487	TC	TC	
V19	1.467	CC	CC		V45	1.422	CC	CC	
V20	0.522	TC	TC		V46	0.476	TC	TC	
V21	1.447	CC	CC		K1	1.572	CC	CC	
V22	0.379	TC	TC		K2	1.347	CC	CC	
V23	1.490	CC	CC		K3	0.187	TT	TT	
V24	0.439	TC	TC		K4	1.615	CC	CC	
V25	1.464	CC	CC		K5	0.401	TC	TC	
V26	1.382	CC	CC		K6	1.696	CC	CC	

IL 10 rs1800871



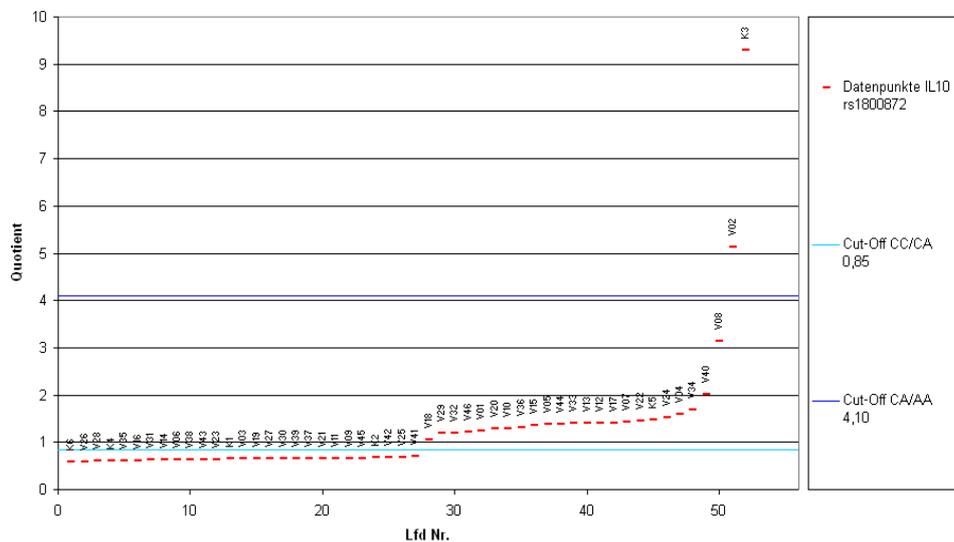
blaue Raute entspricht einer durch Luminex fehltypisierten Probe, rote Balken stellen korrekt typisierte Proben dar/über den Datenpunkten ist die Probenbezeichnung angegeben

Tab. 28/Abb. 29 Ergebnisse Typisierung für Interleukin 10 (IL10) rs1800872

A - Adenosin **C** - Cytosin **G** - Guanosin **T** - Thymin **SSP** - Sequenzspezifische Primer **Q** - Quotient
rot - Sequenzierung nicht übereinstimmend mit Luminex **grün** - Sequenzierung übereinstimmend mit Luminex

Probe	Q	Typisierung Luminex	Typisierung SSP	Sequenzierung	Probe	Q	Typisierung Luminex	Typisierung SSP	Sequenzierung
V01	1.251	AC	AC		V27	0.648	CC	CC	
V02	5.122	AA	AA		V28	0.598	CC	CC	
V03	0.647	CC	CC		V29	1.195	AC	AC	
V04	1.600	AC	AC		V30	0.648	CC	CC	
V05	1.378	AC	CC	AC	V31	0.631	CC	CC	
V06	0.633	CC	CC		V32	1.200	AC	AC	
V07	1.436	AC	AC		V33	1.398	AC	AC	
V08	3.134	AC	AC		V34	1.680	AC	AC	
V09	0.665	CC	CC		V35	0.615	CC	CC	
V10	1.289	AC	AC		V36	1.300	AC	AC	
V11	0.659	CC	CC		V37	0.649	CC	CC	
V12	1.415	AC	AC		V38	0.633	CC	CC	
V13	1.408	AC	AC		V39	0.648	CC	CC	
V14	0.632	CC	CC		V40	2.011	AC	AC	
V15	1.360	AC	AC		V41	0.691	CC	CC	
V16	0.616	CC	CC		V42	0.678	CC	CC	
V17	1.415	AC	AC		V43	0.638	CC	CC	
V18	1.048	AC	AC		V44	1.382	AC	AC	
V19	0.648	CC	CC		V45	0.666	CC	CC	
V20	1.279	AC	AC		V46	1.229	AC	AC	
V21	0.651	CC	CC		K1	0.645	CC	CC	
V22	1.444	AC	AC		K2	0.675	CC	CC	
V23	0.640	CC	CC		K3	9.287	AA	AA	
V24	1.511	AC	AC		K4	0.608	CC	CC	
V25	0.682	CC	CC		K5	1.480	AC	AC	
V26	0.589	CC	CC		K6	0.587	CC	CC	

IL10 rs1800872



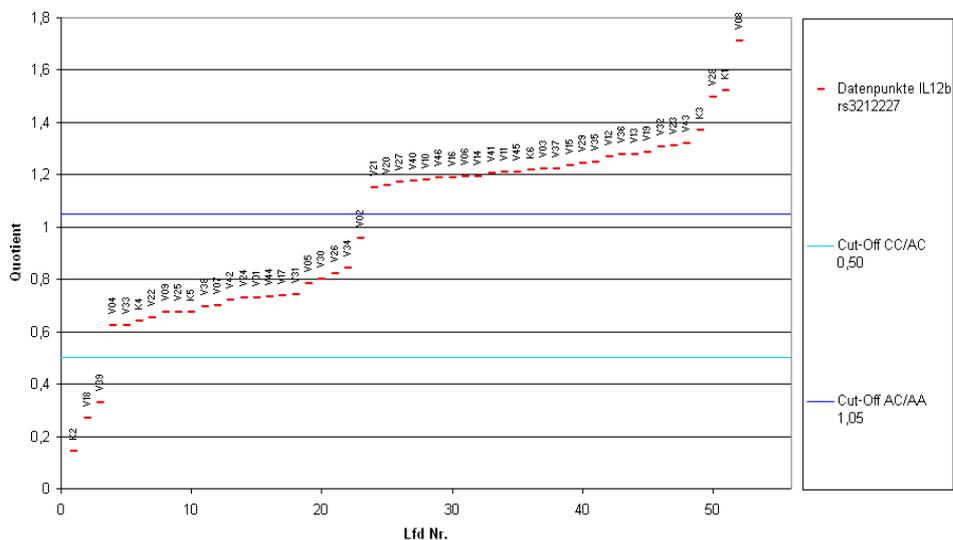
rote Balken stellen korrekt typisierte Proben dar/über den Datenpunkten ist die Probenbezeichnung angegeben

Tab. 29/Abb. 30 Ergebnisse der Typisierung für Interleukin 12 beta (IL12b) rs3212227

A - Adenosin **C** - Cytosin **G** - Guanosin **T** - Thymin **SSP** - Sequenzspezifische Primer **Q** - Quotient
rot - Sequenzierung nicht übereinstimmend mit Luminex **grün** - Sequenzierung übereinstimmend mit Luminex

Probe	Q	Typisierung Luminex	Typisierung SSP	Sequenzierung	Probe	Q	Typisierung Luminex	Typisierung SSP	Sequenzierung
V01	0.731	AC	AC		V27	1.173	AA	AA	
V02	0.957	AC	AC		V28	1.495	AA	AA	
V03	1.223	AA	AA		V29	1.242	AA	AA	
V04	0.622	AC	AC		V30	0.803	AC	AC	
V05	0.782	AC	AC		V31	0.740	AC	AC	
V06	1.195	AA	AA		V32	1.307	AA	AA	
V07	0.700	AC	AC		V33	0.625	AC	AC	
V08	1.711	AA	AA		V34	0.842	AC	AC	
V09	0.674	AC	AC		V35	1.249	AA	AA	
V10	1.182	AA	AA		V36	1.276	AA	AA	
V11	1.209	AA	AA		V37	1.224	AA	AA	
V12	1.268	AA	AA		V38	0.696	AC	AC	
V13	1.279	AA	AA		V39	0.327	CC	CC	
V14	1.195	AA	AA		V40	1.177	AA	AA	
V15	1.236	AA	AA		V41	1.206	AA	AA	
V16	1.188	AA	AA		V42	0.720	AC	AC	
V17	0.736	AC	AC		V43	1.319	AA	AA	
V18	0.271	CC	CC		V44	0.734	AC	AC	
V19	1.284	AA	AA		V45	1.209	AA	AA	
V20	1.161	AA	AA		V46	1.187	AA	AA	
V21	1.151	AA	AA		K1	1.522	AA	AA	
V22	0.653	AC	AC		K2	0.145	CC	CC	
V23	1.309	AA	AA		K3	1.368	AA	AA	
V24	0.728	AC	AC		K4	0.64	AC	AC	
V25	0.675	AC	AC		K5	0.676	AC	AC	
V26	0.821	AC	AC		K6	1.219	AA	AA	

IL12b rs3212227

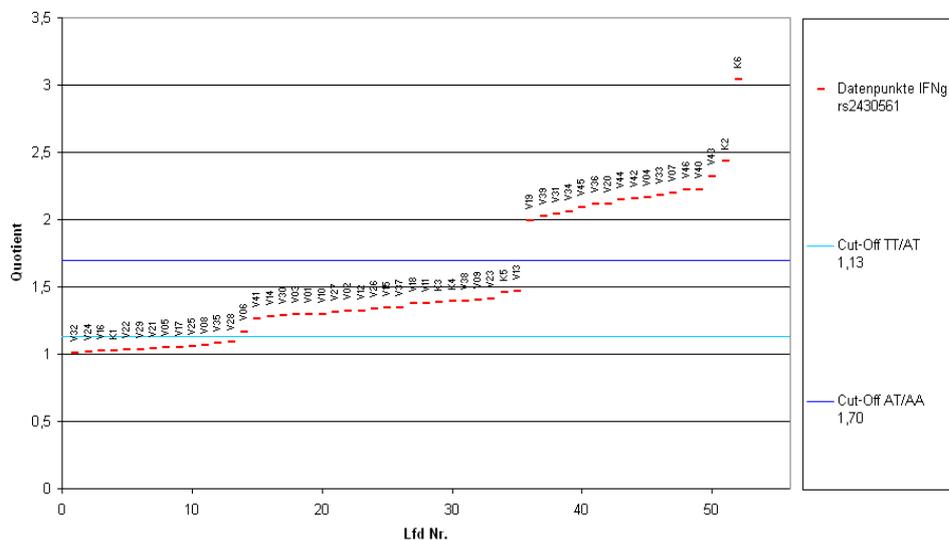


rote Balken stellen korrekt typisierte Proben dar/über den Datenpunkten ist die Probenbezeichnung angegeben

Tab. 30/Abb. 31 Ergebnisse Typisierung für Interferon gamma (IFNg) rs2430561
A - Adenosin C - Cytosin G - Guanodin T - Thymin SSP - Sequenzspezifische Primer Q - Quotient
rot - Sequenzierung nicht übereinstimmend mit Luminex **grün** - Sequenzierung übereinstimmend mit Luminex

Probe	Q	Typisierung Luminex	Typisierung SSP	Sequenzierung	Probe	Q	Typisierung Luminex	Typisierung SSP	Sequenzierung
V01	1.292	AT	AA	AT	V27	1.308	AT	AT	
V02	1.318	AT	AT		V28	1.093	TT	TT	
V03	1.291	AT	AT		V29	1.032	TT	TT	
V04	2.162	AA	AA		V30	1.287	AT	AT	
V05	1.046	TT	TT		V31	2.041	AA	AA	
V06	1.167	AT	AT		V32	1.005	TT	TT	
V07	2.194	AA	AA		V33	2.181	AA	AA	
V08	1.062	TT	TT		V34	2.056	AA	AA	
V09	1.404	AT	AT		V35	1.079	TT	TT	
V10	1.296	AT	AT		V36	2.114	AA	AA	
V11	1.376	AT	AT		V37	1.348	AT	AT	
V12	1.319	AT	AT		V38	1.391	AT	AT	
V13	1.469	AT	AT		V39	2.023	AA	AA	
V14	1.282	AT	AT		V40	2.225	AA	AA	
V15	1.344	AT	AT		V41	1.260	AT	AT	
V16	1.025	TT	TT		V42	2.158	AA	AA	
V17	1.046	TT	TT		V43	2.319	AA	AA	
V18	1.375	AT	AT		V44	2.146	AA	AA	
V19	1.989	AA	AA		V45	2.091	AA	AA	
V20	2.116	AA	AA		V46	2.219	AA	AA	
V21	1.038	TT	TT		K1	1.027	TT	TT	
V22	1.030	TT	TT		K2	2.431	AA	AA	
V23	1.412	AT	AT		K3	1.385	AT	AT	
V24	1.016	TT	TT		K4	1.391	AT	AT	
V25	1.055	TT	TT		K5	1.459	AT	AT	
V26	1.335	AT	AT		K6	3.041	AA	AA	

IFNg rs2430561



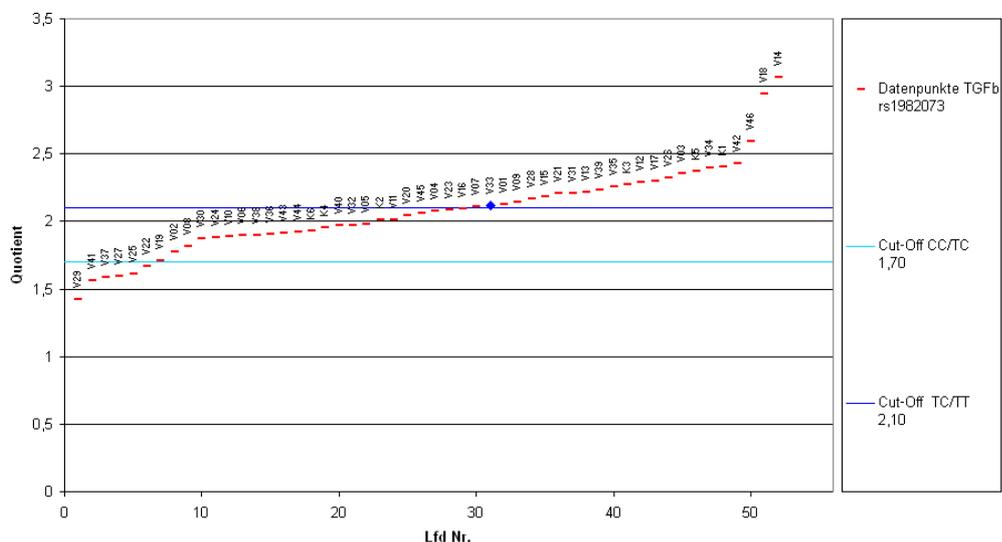
rote Balken stellen korrekt typisierte Proben dar/über den Datenpunkten ist die Probenbezeichnung angegeben

Tab. 31/Abb. 32 Ergebnis Typisierung für Transforming growth factor beta (TGFB) rs1982073

A - Adenosin **C** - Cytosin **G** - Guanodin **T** - Thymin **SSP** - Sequenzspezifische Primer **Q** - Quotient
rot - Sequenzierung nicht übereinstimmend mit Luminex **grün** - Sequenzierung übereinstimmend mit Luminex

Probe	Q	Typisierung Luminex	Typisierung SSP	Sequenzierung	Probe	Q	Typisierung Luminex	Typisierung SSP	Sequenzierung
V01	2.124	TT	CT	TT	V27	1.591	CC	CC	
V02	1.776	TC	TC		V28	2.167	TT	TT	
V03	2.355	TT	TT		V29	1.426	CC	CC	
V04	2.077	TC	TC		V30	1.874	TC	TC	
V05	1.975	TC	TC		V31	2.209	TT	TT	
V06	1.895	TC	TC		V32	1.973	TC	TC	
V07	2.109	TT	TC	TT	V33	2.114	TT	TC	TC
V08	1.813	TC	TC		V34	2.396	TT	TT	
V09	2.142	TT	TT		V35	2.255	TT	TT	
V10	1.892	TC	TC		V36	1.907	TC	TC	
V11	2.014	TC	TC		V37	1.590	CC	CC	
V12	2.291	TT	TT		V38	1.899	TC	TC	
V13	2.218	TT	TT		V39	2.232	TT	TT	
V14	3.069	TT	TT		V40	1.972	TC	TC	
V15	2.187	TT	TT		V41	1.564	CC	TC	CC
V16	2.094	TC	TC		V42	2.430	TT	TT	
V17	2.295	TT	TT		V43	1.914	TC	TC	
V18	2.944	TT	TC	TT	V44	1.920	TC	TC	
V19	1.711	TC	TC		V45	2.059	TC	TC	
V20	2.047	TC	—		V46	2.593	TT	TT	
V21	2.208	TT	TT		K1	2.408	TT	TT	
V22	1.669	CC	CC		K2	2.010	TC	TC	
V23	2.084	TC	TC		K3	2.275	TT	TT	
V24	1.884	TC	TC		K4	1.958	TC	TC	
V25	1.611	CC	CC		K5	2.373	TT	TT	
V26	2.325	TT	TT		K6	1.929	TC	TC	

TGFB rs1982073

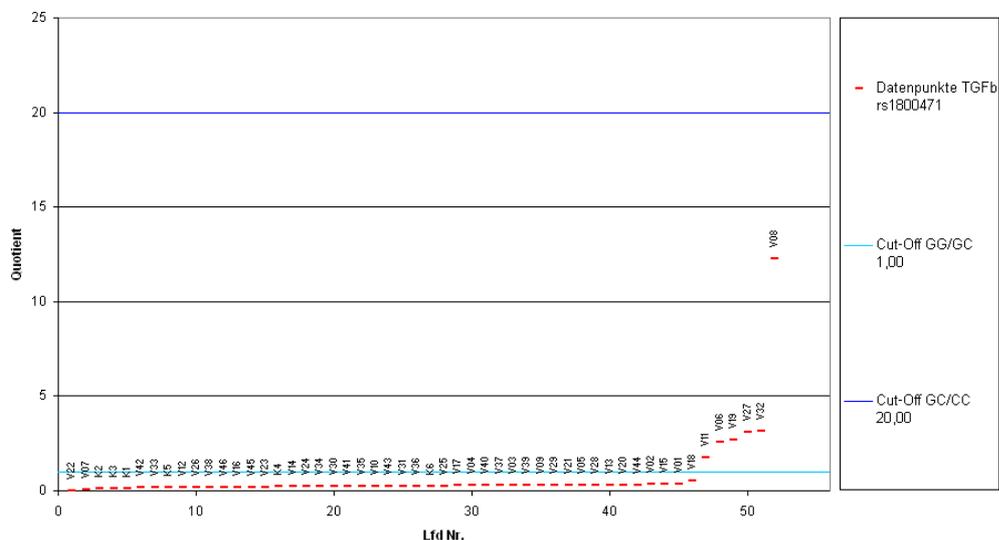


blaue Raute entspricht einer durch Luminex fehltypisierten Probe, rote Balken stellen korrekt typisierte Proben dar/über den Datenpunkten ist die Probenbezeichnung angegeben

Tab. 32/Abb. 33 Ergebnis Typisierung für Transforming growth factor beta (TGFB) rs1800471
A - Adenosin C - Cytosin G - Guanodin T - Thymin SSP - Sequenzspezifische Primer Q - Quotient
rot - Sequenzierung nicht übereinstimmend mit Luminex **grün** - Sequenzierung übereinstimmend mit Luminex

Probe	Q	Typisierung Luminex	Typisierung SSP	Sequenzierung	Probe	Q	Typisierung Luminex	Typisierung SSP	Sequenzierung
V01	0.326	GG	GG		V27	3.104	GC	GC	
V02	0.325	GG	GG		V28	0.284	GG	GG	
V03	0.269	GG	GG		V29	0.277	GG	GG	
V04	0.265	GG	GG		V30	0.238	GG	GG	
V05	0.284	GG	GG		V31	0.253	GG	GG	
V06	2.542	GC	GC		V32	3.129	GC	GC	
V07	0.073	GG	GG		V33	0.170	GG	GG	
V08	12.267	GC	GC		V34	0.235	GG	GG	
V09	0.275	GG	GG		V35	0.249	GG	GG	
V10	0.250	GG	GG		V36	0.256	GG	GG	
V11	1.737	GC	GC		V37	0.268	GG	GG	
V12	0.183	GG	GG		V38	0.187	GG	GG	
V13	0.287	GG	GG		V39	0.271	GG	GG	
V14	0.218	GG	GG		V40	0.266	GG	GG	
V15	0.325	GG	GG		V41	0.245	GG	GG	
V16	0.195	GG	GG		V42	0.154	GG	GG	
V17	0.264	GG	GG		V43	0.252	GG	GG	
V18	0.502	GG	GG		V44	0.308	GG	GG	
V19	2.708	GC	GC		V45	0.198	GG	GG	
V20	0.299	GG	—		V46	0.193	GG	GG	
V21	0.281	GG	GG		K1	0.140	GG	GG	
V22	0.025	GG	GG		K2	0.117	GG	GG	
V23	0.203	GG	GG		K3	0.136	GG	GG	
V24	0.228	GG	GG		K4	0.216	GG	GG	
V25	0.262	GG	GG		K5	0.176	GG	GG	
V26	0.184	GG	GG		K6	0.259	GG	GG	

TGFb rs1800471



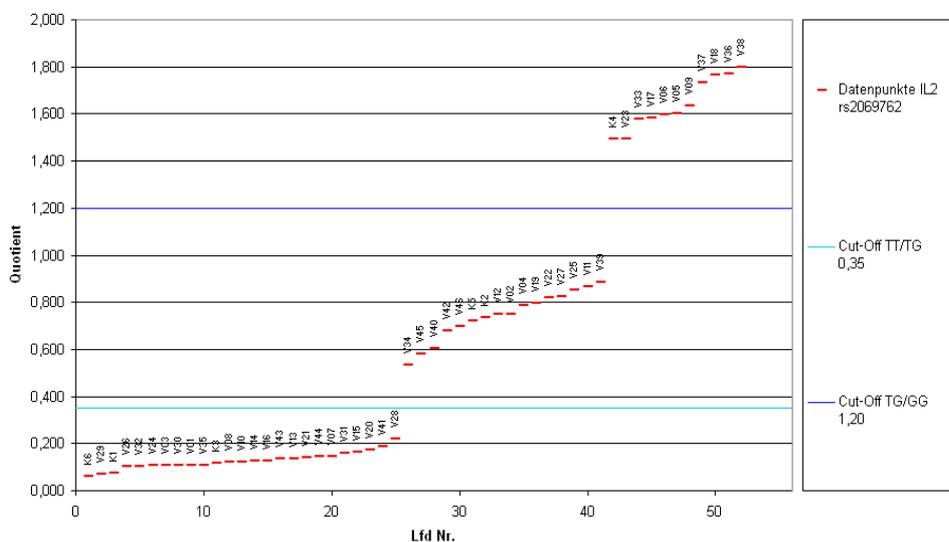
rote Balken stellen korrekt typisierte Proben dar/über den Datenpunkten ist die Probenbezeichnung angegeben

Tab. 34/Abb. 35 Ergebnisse Typisierung für Interleukin 2 (IL2) rs2069762

A - Adenosin **C** - Cytosin **G** - Guanosin **T** - Thymin **SSP** - Sequenzspezifische Primer **Q** - Quotient
rot - Sequenzierung nicht übereinstimmend mit Luminex **grün** - Sequenzierung übereinstimmend mit Luminex

Probe	Q	Typisierung Luminex	Typisierung SSP	Sequenzierung	Probe	Q	Typisierung Luminex	Typisierung SSP	Sequenzierung
V01	0.109	TT	GG	TT	V27	0.823	TG	TG	
V02	0.751	TG	TG		V28	0.219	TT	TG	TT
V03	0.108	TT	TT		V29	0.072	TT	—	
V04	0.785	TG	TG		V30	0.108	TT	TT	
V05	1.603	GG	GG		V31	0.158	TT	—	
V06	1.599	GG	GG		V32	0.105	TT	TT	
V07	0.146	TT	TT		V33	1.580	GG	GG	
V08	0.124	TT	TT		V34	0.533	TG	TG	
V09	1.636	GG	GG		V35	0.109	TT	TT	
V10	0.124	TT	TT		V36	1.770	GG	GG	
V11	0.867	TG	TG		V37	1.731	GG	GG	
V12	0.749	TG	TG		V38	1.797	GG	TG	GG
V13	0.136	TT	TT		V39	0.885	TG	—	
V14	0.128	TT	TT		V40	0.604	TG	TG	
V15	0.162	TT	TT		V41	0.186	TT	TT	
V16	0.128	TT	TT		V42	0.678	TG	TG	
V17	1.581	GG	—		V43	0.135	TT	TT	
V18	1.768	GG	GG		V44	0.145	TT	TT	
V19	0.794	TG	TG		V45	0.581	TG	—	
V20	0.171	TT	TT		V46	0.700	TG	TG	
V21	0.141	TT	TT		K1	0.076	TT	TT	
V22	0.819	TG	TG		K2	0.734	TG	TG	
V23	1.496	GG	GG		K3	0.119	TT	TT	
V24	0.106	TT	TT		K4	1.496	GG	GG	
V25	0.854	TG	TG		K5	0.719	TG	TG	
V26	0.104	TT	TT		K6	0.063	TT	TT	

IL2 rs2069762



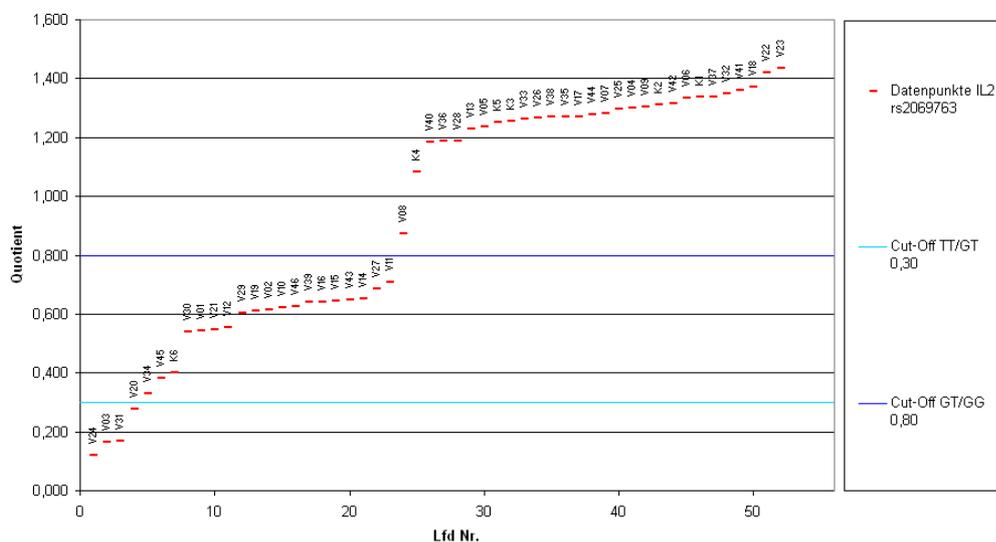
rote Balken stellen korrekt typisierte Proben dar/über den Datenpunkten ist die Probenbezeichnung angegeben

Tab. 35/Abb. 36 Ergebnisse Typisierung für Interleukin 2 (IL2) rs2069763

A - Adenosin C - Cytosin G - Guanodin T - Thymin SSP - Sequenzspezifische Primer Q - Quotient
rot - Sequenzierung nicht übereinstimmend mit Luminex **grün** - Sequenzierung übereinstimmend mit Luminex

Probe	Q	Typisierung Luminex	Typisierung SSP	Sequenzierung	Probe	Q	Typisierung Luminex	Typisierung SSP	Sequenzierung
V01	0.544	GT	GG	GT	V27	0.684	GT	GT	
V02	0.613	GT	GT		V28	1.189	GG	GG	
V03	0.165	TT	TT		V29	0.602	GT	—	
V04	1.299	GG	GG		V30	0.540	GT	GG	GT
V05	1.236	GG	GG		V31	0.168	TT	—	
V06	1.333	GG	GG		V32	1.349	GG	GG	
V07	1.283	GG	GG		V33	1.264	GG	GG	
V08	0.872	GG	GG		V34	0.331	GT	GT	
V09	1.304	GG	GG		V35	1.270	GG	GG	
V10	0.623	GT	GT		V36	1.187	GG	GG	
V11	0.710	GT	GT		V37	1.339	GG	GG	
V12	0.555	GT	GT		V38	1.269	GG	GG	
V13	1.229	GG	GG		V39	0.639	GT	—	
V14	0.651	GT	GG	GT	V40	1.185	GG	GG	
V15	0.646	GT	GT		V41	1.362	GG	GG	
V16	0.640	GT	GT		V42	1.314	GG	GG	
V17	1.271	GG	—		V43	0.650	GT	GT	
V18	1.372	GG	GG		V44	1.279	GG	GG	
V19	0.609	GT	GT		V45	0.383	GT	—	
V20	0.276	TT	TT		V46	0.627	GT	GT	
V21	0.546	GT	GT		K1	1.336	GG	GG	
V22	1.421	GG	GG		K2	1.310	GG	GG	
V23	1.437	GG	GG		K3	1.255	GG	GG	
V24	0.119	TT	TT		K4	1.082	GG	GG	
V25	1.298	GG	GG		K5	1.250	GG	GG	
V26	1.268	GG	GG		K6	0.401	GT	GT	

IL2 rs2069763

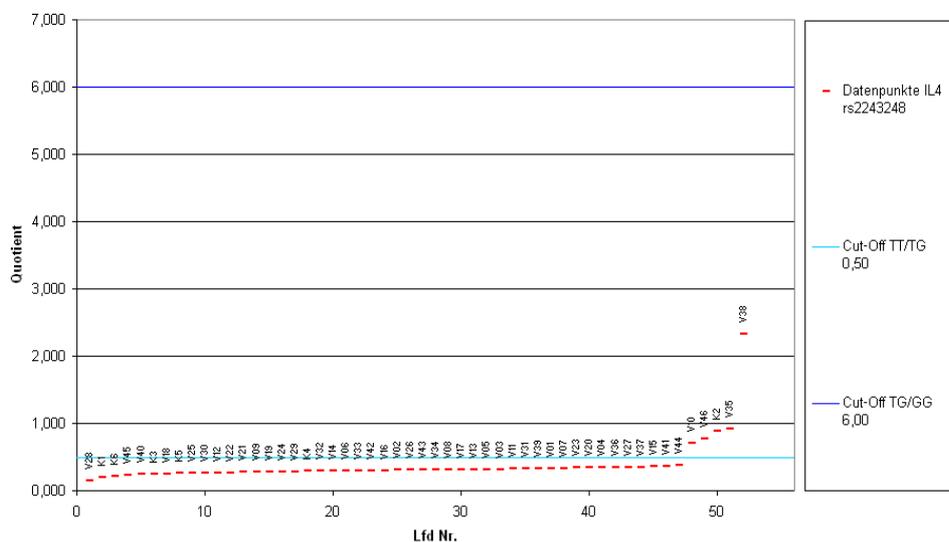


rote Balken stellen korrekt typisierte Proben dar/über den Datenpunkten ist die Probenbezeichnung angegeben

Tab. 36/Abb. 37 Ergebnisse der Typisierung für Interleukin 4 (IL4) rs2243248
A - Adenosin C - Cytosin G - Guanosin T - Thymin SSP - Sequenzspezifische Primer Q - Quotient
rot - Sequenzierung nicht übereinstimmend mit Luminex **grün** - Sequenzierung übereinstimmend mit Luminex

Probe	Q	Typisierung Luminex	Typisierung SSP	Sequenzierung	Probe	Q	Typisierung Luminex	Typisierung SSP	Sequenzierung
V01	0.327	TT	TT		V27	0.351	TT	TT	
V02	0.304	TT	TT		V28	0.151	TT	TT	
V03	0.318	TT	TT		V29	0.284	TT	TT	
V04	0.343	TT	TT		V30	0.261	TT	TT	
V05	0.317	TT	TT		V31	0.323	TT	TT	
V06	0.301	TT	TT		V32	0.290	TT	TT	
V07	0.331	TT	TT		V33	0.302	TT	TT	
V08	0.313	TT	TT		V34	0.312	TT	TT	
V09	0.281	TT	TT		V35	0.914	TG	TG	
V10	0.702	TG	TG		V36	0.345	TT	TT	
V11	0.323	TT	TT		V37	0.351	TT	TT	
V12	0.263	TT	TT		V38	2.336	TG	—	
V13	0.316	TT	TT		V39	0.326	TT	TT	
V14	0.293	TT	TT		V40	0.243	TT	TT	
V15	0.353	TT	TT		V41	0.359	TT	TT	
V16	0.303	TT	TT		V42	0.302	TT	TT	
V17	0.313	TT	TT		V43	0.307	TT	TT	
V18	0.252	TT	TT		V44	0.374	TT	TT	
V19	0.282	TT	TT		V45	0.230	TT	TT	
V20	0.340	TT	TT		V46	0.775	TG	TG	
V21	0.278	TT	TT		K1	0.202	TT	TT	
V22	0.270	TT	TT		K2	0.886	TG	TG	
V23	0.337	TT	TT		K3	0.245	TT	TT	
V24	0.284	TT	TT		K4	0.289	TT	TT	
V25	0.260	TT	TT		K5	0.257	TT	TT	
V26	0.307	TT	TT		K6	0.208	TT	TT	

IL4 rs2243248



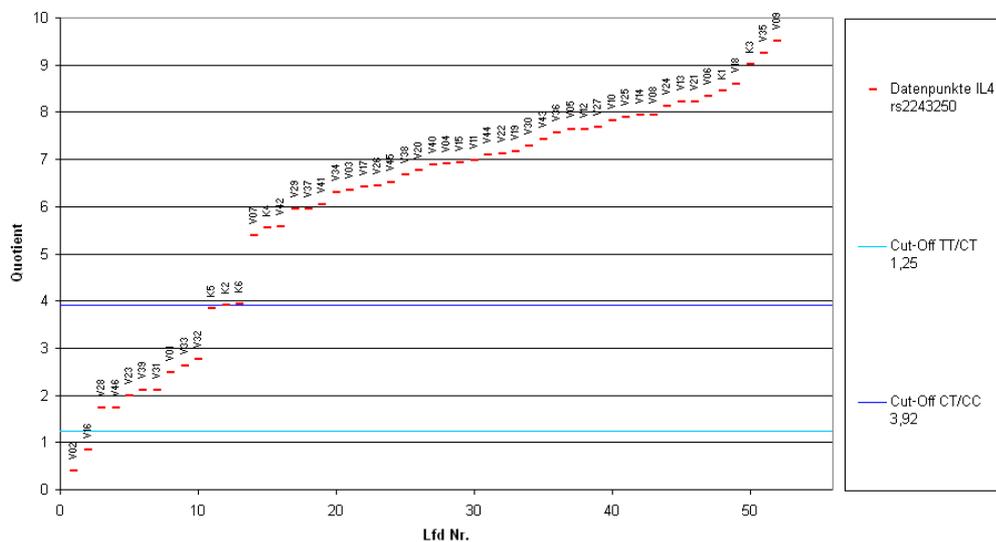
rote Balken stellen korrekt typisierte Proben dar/über den Datenpunkten ist die Probenbezeichnung angegeben

Tab. 37/Abb. 38 Ergebnisse Typisierung für Interleukin 4 (IL4) rs2243250

A - Adenosin **C** - Cytosin **G** - Guanosin **T** - Thymin **SSP** - Sequenzspezifische Primer **Q** - Quotient
rot - Sequenzierung nicht übereinstimmend mit Luminex **grün** - Sequenzierung übereinstimmend mit Luminex

Probe	Q	Typisierung Luminex	Typisierung SSP	Sequenzierung	Probe	Q	Typisierung Luminex	Typisierung SSP	Sequenzierung
V01	2.476	CT	CT		V27	7.674	CC	CC	
V02	0.405	TT	TT		V28	1.730	CT	TT	
V03	6.337	CC	CC		V29	5.959	CC	CC	
V04	6.904	CC	CC		V30	7.282	CC	CC	
V05	7.623	CC	CC		V31	2.115	CT	CT	
V06	8.332	CC	CC		V32	2.755	CT	CT	
V07	5.383	CC	CC		V33	2.612	CT	CT	
V08	7.942	CC	CC		V34	6.300	CC	CC	
V09	9.505	CC	CC		V35	9.244	CC	CC	
V10	7.820	CC	CC		V36	7.576	CC	CC	
V11	6.977	CC	CC		V37	5.960	CC	CC	
V12	7.631	CC	CC		V38	6.667	CC	—	
V13	8.217	CC	CC		V39	2.104	CT	TT	CT
V14	7.935	CC	CC		V40	6.876	CC	CC	
V15	6.923	CC	CC		V41	6.052	CC	CT	CC
V16	0.839	TT	TT		V42	5.583	CC	CC	
V17	6.414	CC	CC		V43	7.423	CC	CC	
V18	8.599	CC	CC		V44	7.105	CC	CC	
V19	7.171	CC	CC		V45	6.502	CC	CC	
V20	6.777	CC	CC		V46	1.737	CT	CT	
V21	8.225	CC	CC		K1	8.452	CC	CC	
V22	7.129	CC	CC		K2	3.912	CT	CT	
V23	1.979	CT	CT		K3	9.013	CC	CC	
V24	8.134	CC	CC		K4	5.557	CC	CC	
V25	7.893	CC	CC		K5	3.852	CT	CT	
V26	6.433	CC	CC		K6	3.937	CC	CC	

IL4 rs2243250



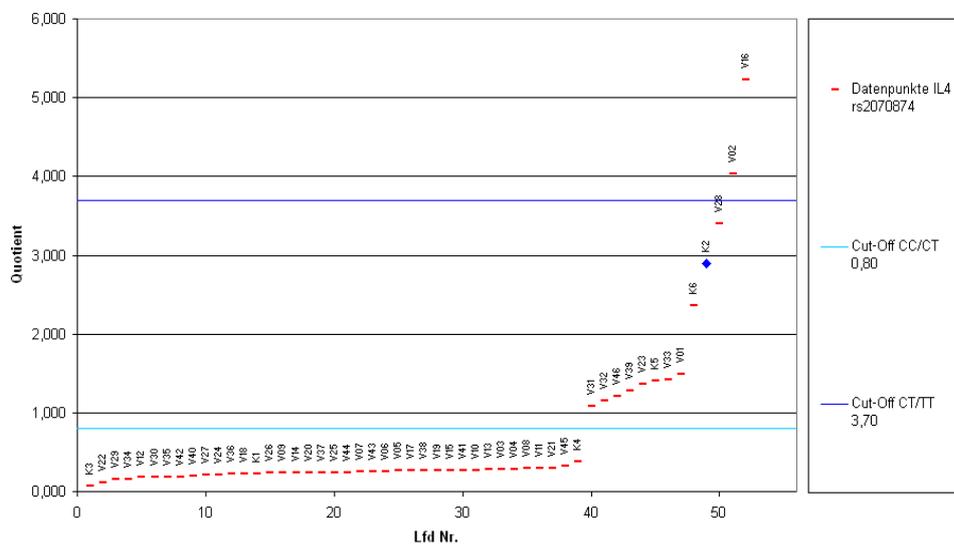
rote Balken stellen korrekt typisierte Proben dar/über den Datenpunkten ist die Probenbezeichnung angegeben

Tab. 38/Abb. 39 Ergebnisse Typisierung für Interleukin 4 (IL4) rs2070874

A - Adenosin **C** - Cytosin **G** - Guanodin **T** - Thymin **SSP** - Sequenzspezifische Primer **Q** - Quotient
rot - Sequenzierung nicht übereinstimmend mit Luminex **grün** - Sequenzierung übereinstimmend mit Luminex

Probe	Q	Typisierung Luminex	Typisierung SSP	Sequenzierung	Probe	Q	Typisierung Luminex	Typisierung SSP	Sequenzierung
V01	1.489	TC	TC		V27	0.212	CC	CC	
V02	4.034	TT	TT		V28	3.394	TT	TT	
V03	0.283	CC	CC		V29	0.149	CC	CC	
V04	0.285	CC	CC		V30	0.185	CC	CC	
V05	0.261	CC	CC		V31	1.086	CT	CT	
V06	0.256	CC	CC		V32	1.156	CT	CT	
V07	0.250	CC	CC		V33	1.412	CT	CT	
V08	0.292	CC	CC		V34	0.154	CC	CC	
V09	0.234	CC	CC		V35	0.188	CC	CC	
V10	0.270	CC	CC		V36	0.220	CC	CC	
V11	0.294	CC	CC		V37	0.240	CC	CC	
V12	0.182	CC	CC		V38	0.266	CC	—	
V13	0.283	CC	CC		V39	1.284	CT	TT	CT
V14	0.236	CC	CC		V40	0.202	CC	CC	
V15	0.268	CC	CC		V41	0.269	CC	CT	CC
V16	5.224	TT	TT		V42	0.188	CC	CC	
V17	0.263	CC	CC		V43	0.255	CC	CC	
V18	0.222	CC	CC		V44	0.245	CC	CC	
V19	0.268	CC	CC		V45	0.326	CC	CC	
V20	0.236	CC	CC		V46	1.208	CT	CT	
V21	0.299	CC	CC		K1	0.227	CC	CC	
V22	0.111	CC	CC		K2	2.890	CT	CC	CC
V23	1.362	CT	CT		K3	0.074	CC	CC	
V24	0.217	CC	CC		K4	0.382	CC	CC	
V25	0.244	CC	CC		K5	1.399	CT	CT	
V26	0.234	CC	CC		K6	2.358	CT	CC	

IL4 rs2070874

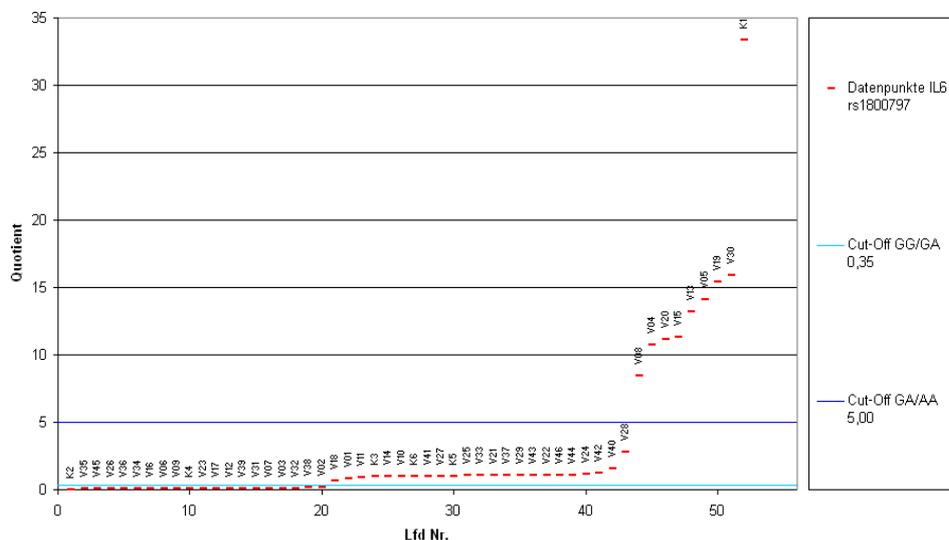


blaue Raute entspricht einer durch Luminex fehltypisierten Probe, rote Balken stellen korrekt typisierte Proben dar/über den Datenpunkten ist die Probenbezeichnung angegeben

Tab. 39/Abb. 40 Ergebnisse der Typisierung für Interleukin 6 (IL6) rs1800797
A - Adenosin C - Cytosin G - Guanosin T - Thymin SSP - Sequenzspezifische Primer Q - Quotient
rot - Sequenzierung nicht übereinstimmend mit Luminex **grün** - Sequenzierung übereinstimmend mit Luminex

Probe	Q	Typisierung Luminex	Typisierung SSP	Sequenzierung	Probe	Q	Typisierung Luminex	Typisierung SSP	Sequenzierung
V01	0.833	GA	GA		V27	0.994	GA	GA	
V02	0.132	GG	GG		V28	2.783	GA	GA	
V03	0.119	GG	GG		V29	1.061	GA	GA	
V04	10.746	AA	AA		V30	15.936	AA	AA	
V05	14.125	AA	GA	AA	V31	0.111	GG	GG	
V06	0.096	GG	GG		V32	0.122	GG	GG	
V07	0.116	GG	GG		V33	1.031	GA	GA	
V08	8.479	AA	GA	AA	V34	0.091	GG	GG	
V09	0.096	GG	GG		V35	0.077	GG	GG	
V10	0.988	GA	GA		V36	0.090	GG	GG	
V11	0.925	GA	GA		V37	1.058	GA	GA	
V12	0.106	GG	GG		V38	0.128	GG	GA	GG
V13	13.183	AA	AA		V39	0.106	GG	GG	
V14	0.974	GA	GA		V40	1.526	GA	GG	GA
V15	11.344	AA	GA	AA	V41	0.992	GA	GA	
V16	0.095	GG	GG		V42	1.192	GA	GA	
V17	0.104	GG	GG		V43	1.065	GA	GA	
V18	0.629	GA	GA		V44	1.082	GA	GA	
V19	15.423	AA	AA		V45	0.078	GG	GG	
V20	11.120	AA	AA		V46	1.073	GA	GA	
V21	1.048	GA	GA		K1	33.392	AA	AA	
V22	1.069	GA	GA		K2	0.007	GG	GG	
V23	0.103	GG	GG		K3	0.961	GA	GA	
V24	1.188	GA	GA		K4	0.097	GG	GG	
V25	1.026	GA	GA		K5	1.021	GA	GA	
V26	0.090	GG	GG		K6	0.990	GA	GA	

IL6 rs1800797

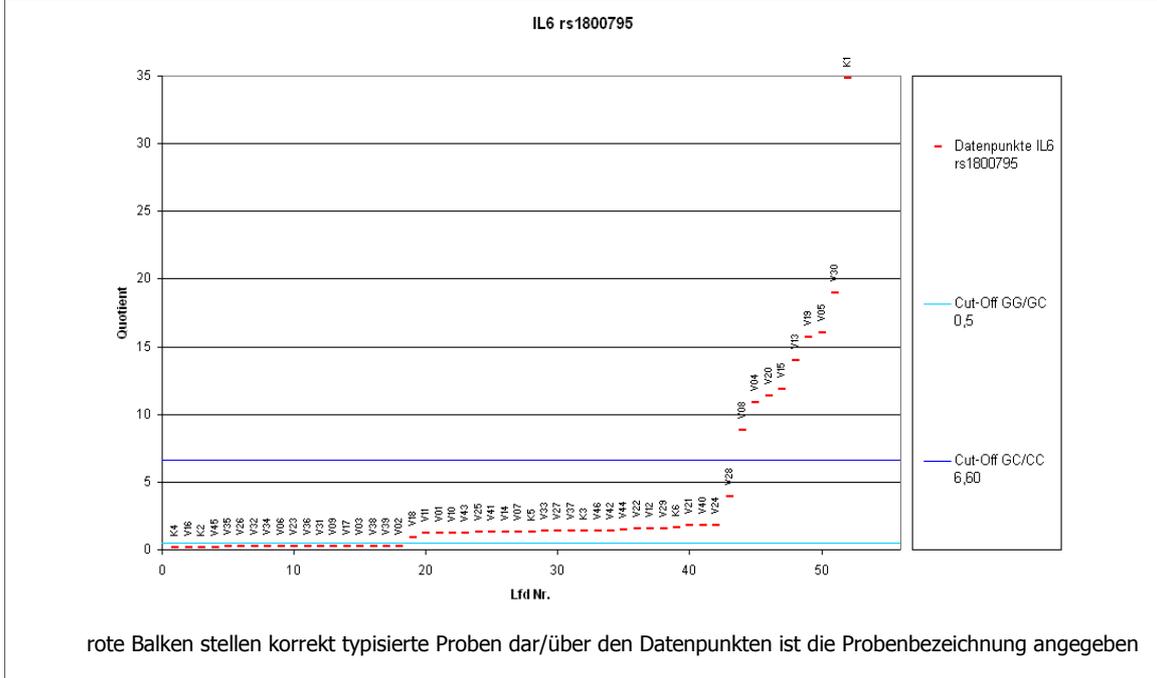


rote Balken stellen korrekt typisierte Proben dar/über den Datenpunkten ist die Probenbezeichnung angegeben

Tab. 40/Abb. 41 Ergebnisse Typisierung für Interleukin 6 (IL6) rs1800795

A - Adenosin **C** - Cytosin **G** - Guanodin **T** - Thymin **SSP** - Sequenzspezifische Primer **Q** - Quotient
rot - Sequenzierung nicht übereinstimmend mit Luminex **grün** - Sequenzierung übereinstimmend mit Luminex

Probe	Q	Typisierung Luminex	Typisierung SSP	Sequenzierung	Probe	Q	Typisierung Luminex	Typisierung SSP	Sequenzierung
V01	1.226	GC	GC		V27	1.373	GC	GC	
V02	0.279	GG	GG		V28	3.952	GC	GC	
V03	0.244	GG	GG		V29	1.565	GC	GC	
V04	10.856	CC	CC		V30	18.990	CC	CC	
V05	16.063	CC	GC	CC	V31	0.236	GG	GG	
V06	0.223	GG	GG		V32	0.218	GG	GG	
V07	1.329	GC	GC		V33	1.370	GC	GC	
V08	8.806	CC	GC	CC	V34	0.220	GG	GG	
V09	0.239	GG	GG		V35	0.207	GG	GG	
V10	1.240	GC	GC		V36	0.229	GG	GG	
V11	1.202	GC	GC		V37	1.378	GC	GC	
V12	1.551	GC	GC		V38	0.249	GG	GC	GG
V13	14.010	CC	CC		V39	0.254	GG	GG	
V14	1.292	GC	GC		V40	1.770	GC	GG	GC
V15	11.835	CC	GC	CC	V41	1.271	GC	GC	
V16	0.198	GG	GG		V42	1.418	GC	GC	
V17	0.242	GG	GG		V43	1.252	GC	GC	
V18	0.900	GC	GC		V44	1.442	GC	GC	
V19	15.719	CC	CC		V45	0.204	GG	GG	
V20	11.396	CC	CC		V46	1.408	GC	GC	
V21	1.766	GC	GC		K1	34.823	CC	CC	
V22	1.517	GC	GC		K2	0.200	GG	GG	
V23	0.229	GG	GG		K3	1.383	GC	GC	
V24	1.805	GC	GC		K4	0.191	GG	GG	
V25	1.269	GC	GC		K5	1.335	GC	GC	
V26	0.217	GG	GG		K6	1.614	GC	GC	



Die 52 Proben wurden für alle 22 SNP typisiert. Damit ergaben sich für die Methode der Analyse mit dem Luminex 100 IS insgesamt 1144 Typisierungen. Diese konnten mit 1127 Ergebnissen der Referenzmethode verglichen werden, da in 17 Fällen kein Ergebnis der Typisierung durch die SSP-Methode vorlag. Von diesen 1127 Messungen stimmten 1070 im Vergleich der zwei Methoden im Ergebnis überein. Damit war in 57 Fällen eine Kontrolle der Ergebnisse durch Sequenzieren der entsprechenden Probe für den jeweiligen SNP notwendig. Diese verteilten sich wie folgt auf die Kits und einzelnen Zytokine:

Auf Kit 1 entfielen 19 zu kontrollierende Messungen und zwei fehlende Typisierungen durch die SSP Methode. Die 19 Kontrollen stellten 5,25% der in Kit 1 gemessenen Proben, bezogen auf 362 verglichenen Messungen (52 Proben typisiert auf sieben SNP, abzüglich zwei fehlender Ergebnisse), dar. Für IL1a rs1800587 mussten sechs, für IL1b rs1143634 vier, für IL1R rs2234650 drei, für IL1RN rs315952 drei und für TNFa rs1800629 zwei, sowie rs361525 eine Probe kontrolliert werden. Die Sequenzierung ergab eine Übereinstimmung in allen 19 diskrepanten Fällen mit den Ergebnissen der Typisierung durch Luminex. Damit ergab sich eine Fehlerquote von 0,00% bei der Untersuchung der SNP in Kit 1 mittels Luminex. Im Umkehrschluss stellten wir fest, dass unter unseren Laborbedingungen durch die SSP-Methode 5,25% der Proben falsch typisiert wurden und 0,55% kein Ergebnis aufwiesen.

Bei der Analyse der Proben für Kit 2 fielen 17 Typisierungen auf, die nicht mit der SSP-Methode übereinstimmten und wiederum zwei fehlende Typisierungen. Bei 414 verglichenen Typisierungen in Kit 2 (52 Proben typisiert auf acht SNP, abzüglich zwei fehlender Ergebnisse) machten diese 17 Diskrepanzen 4,11% der gesamten Typisierungen aus. Für IL4Ra rs1801275 mussten fünf, für IL10 rs1800896 drei, für rs1800871 zwei, für rs1800872 eine, für IFNg rs2430561 eine und für TGFb rs1982073 fünf Ergebnisse durch Sequenzierung kontrolliert werden. Hierbei zeigten sich zwei Fehler für die Methode Luminex. Diese fanden sich bei IL10 rs1800871 Probe V08 und TGFb rs1982073 Probe V33. Die übrigen

15 Sequenzierungen bestätigten die Ergebnisse von Luminex und widersprachen der Referenzmethode. Für Kit 2 lag damit die Fehlerquote für Luminex bei 0,48%, die Fehlerquote für die Typisierung mit SSP lag bei 3,62%. Bei 0,48% lag kein Ergebnis durch die Referenzmethode vor.

Für Kit 3 waren, bei 364 Typisierungen, 21 Kontrollen notwendig und es gab 13 fehlende Ergebnisse durch die SSP-Methode. Dies entsprach bei 351 zu vergleichende Proben (52 Proben auf sieben SSP typisiert, abzüglich 13 fehlender Ergebnisse) 5,98%, welche zur Kontrolle sequenziert werden mussten. Für IL2 rs2069762 und rs2069763 mussten jeweils drei, für IL4 rs2243250 zwei, für rs2070874 drei, für IL6 rs1800797 fünf und rs1800795 ebenfalls fünf überprüft werden. Im Fall der Probe K2 war für den SNP rs2070874 im IL4 Gen eine Fehlbestimmung seitens Luminex zu verzeichnen. Die übrigen 20 durch Sequenzierung überprüften Typisierungen stimmten mit dem Ergebnis von Luminex überein. Damit entsprach die Fehlerquote für Luminex für Kit 3 0,28%. Die Typisierung mittels SSP zeigte eine Fehlerquote von 5,70% auf. Bei 3,57% der SSP-Typisierungen lagen von Beginn an keine Ergebnisse vor.

Für alle Kits zusammen gezählt ergaben sich in 0,27% der Fälle eine Fehltypisierung durch Luminex. Einzeln für die SNP betrachtet ergaben sich eine Fehlerquote, bei IL10 rs1800871 von 1,92%, bei TGFb rs1982073 von 1,96% und bei IL4 rs2070874 von 1,96%. Dem gegenüber standen in 4,79% der Fälle Fehler seitens der Typisierung durch die SSP-Referenzmethode. In 1,48% der Typisierung gab es überhaupt kein Ergebnis durch die Methode der sequenzspezifischen Primer. Die Gesamtfehlerrate für die Referenzmethode, die sich aus Fehltypisierung und fehlendem Ergebnis ergebend, betrug 6,21%. Im Vergleich dazu lag die Gesamtfehlerrate der auf Luminex xMAP® Carboxybeads basierenden Methode bei 0,27%.

4. Diskussion

4.1. Vergleich zwischen Luminex xMAP® Carboxybeads, der Referenzmethode (SSP), sowie Sequenzierung und DNA-Microarray

Durch die Möglichkeit der Typisierung mittels des auf xMAP® Carboxybeads basierenden Systems zur Ermittlung der Genotypen, ergaben sich im Vergleich zu der vorher genutzten Methode der sequenzspezifischen Primer (SSP) einige Unterschiede.

Zum Ersten ist der Zeitaufwand anzumerken. Betrachtet man die Typisierung eines einzelnen Patienten, mussten bei der Referenzmethode mit sequenzspezifischen Primern 48 PCR-Reaktionen angesetzt und amplifiziert werden, welche im Anschluss auf ein Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt, fotografiert und ausgewertet werden mussten. Für die Vorbereitung waren 30 Minuten einzurechnen, die PCR im Thermocycler benötigte 60 Minuten, das Auftragen auf das Agarosegel und die Elektrophorese 30 Minuten. Insgesamt ergab sich für die Typisierung eines Patienten ein Zeitaufwand von zwei Stunden. Da für die Typisierung 96-Well-Platten genutzt wurden, ließen sich innerhalb dieser Zeit zwei Patientenproben bestimmen.

Für die Bestimmung mittels xMAP® Carboxybeads ergaben sich folgende Zeiten. Für die Vorbereitungen waren, ähnlich zur Referenzmethode, 30 min und 60 min für die MPCR zu veranschlagen. Diesen Schritten folgte die Hybridisierungsreaktion, welche 50 Minuten dauerte. Die Typisierung mit dem Luminex 100 IS benötigte 40-50 sec je Probe. Da für die komplette Typisierung eines Patienten drei MPCR und damit auch drei Analysen im Luminex 100 IS nötig waren, waren für die Analyse einer Probe rund 145 min zu veranschlagen. Bei der Nutzung einer 96-Well-Platte war, abzüglich der drei Leerproben, die Analyse von 31 Proben in einem Arbeitsschritt möglich. Bei der kompletten Typisierung einer 96-Well Platte wurden, da alle Proben nacheinander typisiert

wurden, insgesamt 220 Minuten benötigt. Folglich benötigte man bei der auf xMAP® Carboxybeads basierenden Methode drei Stunden und 40 Minuten im Vergleich zu zwei Stunden mit SSP. Allerdings wurde bei unserer Methode, mit insgesamt 31 analysierten Proben im Vergleich zu zwei Proben mittels SSP, die 15fache Zahl an Proben typisiert. Die fast verdoppelte Laufzeit wird also durch den wesentlich höheren Probendurchsatz nicht einfach nur ausgeglichen, sondern bietet im Vergleich zur SSP-Methode eine wesentlich zeiteffizientere Verarbeitung bei hohen Probenzahlen.

Der nächste wesentliche Punkt war die für eine Typisierung benötigte Menge an Proben DNA. Da bei der SSP-Methode 48 PCR notwendig waren, musste in entsprechendem Maße auch DNA eingesetzt werden. So wurden 50 µl einer 100 ng/µl konzentrierten DNA-Lösung eingesetzt, was insgesamt 5 µg entsprach. Bei der von uns entwickelten Methode hingegen wurden für jede MPCR 100 ng DNA eingesetzt. Was bei den drei für die Typisierung notwendigen Reaktionen eine Gesamtmenge von 300 ng bedeutete. Stellt dieser Mengenunterschied in der alltäglichen Routine mit DNA Proben nicht unbedingt ein Problem dar, macht es sich jedoch sehr stark bemerkbar, wenn die zu untersuchenden Proben nur in geringen Mengen vorliegen, und auch nicht problemlos weiteres Untersuchungsmaterial beschafft werden kann. Dies war bei unseren Untersuchungen so, da wir DNA-Proben von knochenmarktransplantierten Patienten untersuchten, die ihr Blut vor einer Knochenmarktransplantation für Untersuchungszwecke zur Verfügung stellten. Damit war es nach der Transplantation ausgeschlossen eine erneute native Blutprobe des Empfängers zur Isolierung von DNA entnehmen zu können. Demnach kam der eingesetzten Menge an DNA in diesem Fall eine beträchtliche Bedeutung zu.

Im Routinebetrieb würde sich der um den Faktor 16,66 erhöhte Bedarf an DNA in den Kosten, als auch dem Zeitaufwand, der für die Isolierung aufgebracht werden müsste, stark zum Nachteil der SSP-Methode unterscheiden. Im Fall unseres Probenpanels mussten wir einen zusätzlichen Schritt zu Vervielfältigung der DNA mittels Illustra GenomiPhi V2 zwischenschalten, um die Typisierung

mittels SSP durchführen zu können. Dieser verursachte zusätzliche Kosten und erhöhte den Zeit- und Ressourcenbedarf. Als weiteren Vorteil kann man hinsichtlich der Kosten den Umstand werten, dass die Luminexanwendung modular in Kits aufgebaut wurde, so dass bei Fragestellungen, die nicht die Typisierung aller Polymorphismen benötigen, nicht das komplette Paket zum Test verwendet werden muss und somit wiederum Ressourcen gespart werden können.

Als nächster und gleichsam wichtigster Punkt im Vergleich der beiden Methoden soll die Fehlerquote bzw. Genauigkeit genannt sein. Hier sprechen die Zahlen, die bereits unter Ergebnisse dargestellt sind, klar für die Methode der xMAP® Carboxybeads von Luminex. Während bei der Methode der SSP eine Fehlerquote von 6,21% zu verzeichnen war, standen dem 0,27% bei den Carboxybeads entgegen. Abgesehen von der höheren Fehlerquote, bei den mittels SSP ermittelten Testergebnissen, gab es dort auch einen höheren Anteil von Testausfällen. Diese Proben hätten also ein weiteres mal mit SSP typisiert werden müssen, um eine vollständige Auswertung zu ermöglichen.

Ein nicht von der Hand zu weisender Vorteil den die SSP Methode bietet, ist der Umstand, dass mit ihr tatsächlich auch Haplotypen getestet werden konnten, da die sequenzspezifischen Primer dieser Anwendung auf einem DNA Strang innerhalb eines Gens jeweils zwei benachbarte SNP berücksichtigen, indem jeweils beide Primer an benachbarte SNP binden. Bei der Analyse mit xMAP® Carboxybeads war diese Bestimmung aufgrund der Entfernung nicht möglich. Die Bestimmung erfolgte bei uns nach der Ausschlussmethode, da bisher nur einige Haplotypen nachgewiesen wurden und nicht alle theoretisch denkbaren Möglichkeiten vorkamen. Nur aufgrund dieser Tatsache war es bei zwei und mehr SNP innerhalb eines Haplotypen möglich, Angaben über diesen treffen zu können. Auch wenn die Typisierung mittels xMAP® Carboxybeads im laufenden Routinebetrieb günstiger ist, stehen zu Beginn zunächst Investitionskosten an. Während die SSP-Methode lediglich einen Thermocycler, eine Gelelektro-

phoresekammer und UV-Lichteinheit benötigt, die in den meisten Labors ohnehin vorhanden sind, muss für die xMAP® Carboxybead Technologie zunächst ein Luminex 100 IS und gegebenenfalls weitere Ausrüstung beschafft werden. Diesen Bemühungen folgt dann noch die Einweisung für das labortechnische Personal, welche diese Applikation benutzen soll. Im Vorteil sind dabei sicherlich Labore, die ohnehin schon die Technologie des Luminex 100 IS für andere Applikationen, zum Beispiel der HLA-Typisierung, nutzen.

Im Vergleich dazu lassen Sequenzierung und DNA-Microarray ebenfalls keinen Rückschluss auf Haplotypen zu. Hiermit bieten Sequenzierung und DNA-Microarray also keine Vorteile, was die Aussagekraft der Typisierung angeht, gegenüber unserer Methode. Vom Verfahrensweg und Aufwand ähneln sich Sequenzierung, DNA-Microarray und unsere Methode grundsätzlich zu Beginn. Am Anfang steht bei beiden eine PCR-Reaktion, beziehungsweise ist auch ähnlich zu unserem Verfahren eine MPCR denkbar. Dieser Schritt ist also für alle Methoden bezogen auf den zeitlichen und arbeitstechnischen Aufwand gleich zu bewerten. Bei der Sequenzierung schließt sich jedoch noch das Aufreinigen, die eigentliche Sequenzierreaktion im Thermocycler gemäß der Kettanbruchmethode und schließlich die Fällung der entstandenen Produkte an. Diese Arbeitsschritte beanspruchen selbst bei zügigem, routinierten Arbeiten einen Zeitraum von drei Stunden und anschließend folgt noch die Analyse mittels entsprechender Kapillarelektrophorese. Da es bei der Sequenzierung notwendig ist, die Amplifikate der PCR, beziehungsweise der MPCR, einzeln zu sequenzieren, würden im Fall der Typisierung aller von uns untersuchten SNP insgesamt 19 Sequenzierreaktionen durchgeführt werden müssen, um eine Probe komplett typisieren zu können. Im Vergleich zu unserer Methode stünde entsprechend ein deutlich höherer Arbeits- und Zeitaufwand dem gegenüber, sowie ein höherer Einsatz an Materialien.

Da bei der Sequenzierung kein Erwerb von mehr Informationen gegenüber den Carboxybeads zu erwarten wären, da auch hier die Bestimmung von Haplotypen unmöglich ist, scheint mir der erhöhte Aufwand in keinem Verhältnis zu einem

etwaigen Nutzen zu stehen. Auch bei der Methode der Sequenzierung bleiben, je nachdem ob entsprechende Geräte bereits im Labor vorhanden sind, die Investitionskosten der entsprechenden Gerätschaften zu berücksichtigen.

Am vergleichbarsten ist meiner Meinung nach, unter Berücksichtigung von Zeit- und Arbeitsaufwand, die Methode des DNA-Microarray. Hierzu fehlen in unserem Labor die praktischen Erfahrungswerte, da wir diese Methode zum Zeitpunkt dieser Arbeit nicht in unserem Labor nutzten. Auch hier dient eine PCR oder MPCR als Grundlage und benötigt einen vergleichbaren Zeit- und Ressourceneinsatz. Die anschließende Hybridisierungsreaktion auf dem entsprechend gestalteten DNA-Microarray, die Waschschritte und die letztliche Auswertung sollten, gemäß meiner Einschätzung, einen ähnlichen Umfang zu dem der Carboxybeads einnehmen. Bei dieser Methode ist ein ähnlich hoher Probendurchlauf wie im Luminex 100 IS denkbar. Ein möglicher Vorteil könnte die Tatsache sein, dass mit einem „Chip“ alle 22 Polymorphismen typisiert werden könnten, jedoch ist dies prinzipiell auch mit der Methode der xMAP® Carboxybeads möglich. Dieser Weg wurde allerdings aus zwei Gründen nicht von uns beschritten. Zum einen benötigten wir ohnehin drei MPCR um alle SNP zu erfassen, da zu befürchten stand bei einer einzigen MPCR mit allen Primern nicht mehr alle Amplifikate und unspezifische Produkte zu erhalten. Dabei sollte auf den Schritt eines theoretisch möglichen Zusammenfügens der drei verschiedenen MPCR-Ansätze nach erfolgter Amplifikation verzichtet werden. Die zweite Befürchtung lag in unspezifischen Bindungen bei der Hybridisierung mit den Captureoligonukleotid bestückten Carboxybeads, die die Genauigkeit der Auswertung verschlechtern hätten. Ähnliche Probleme könnten sich aber auch bei der Methode des DNA-Microarray auftun. Wie auch bei der Methode der xMAP® Carboxybeads ist keine Bestimmung von Haplotypen möglich und entsprechende Geräte zur Analyse der DNA-Microarrays müssten beschafft werden. Womit sich der Schluss ziehen lässt, dass auch diese Methode keine signifikanten Vorteile gegenüber der von uns etablierten aufweist.

4.2. Beurteilung der Ergebnisse und Problemanalyse

Bei der Betrachtung der Typisierungsergebnisse der Polymorphismen fällt regelhaft eine hohe Trennschärfe zwischen den Genotypen der Polymorphismen auf. Bei den SNP in IFN γ (rs2430561) und TGF β (rs1982073) traten allerdings Probleme auf. Zwar ließen sich durch Kenntnis des Typisierungsergebnis hier die Cut-Offs bestimmen, jedoch lagen die Quotienten der einzelnen Proben zum Teil sehr nah an den Cut-Offs, was eine sichere Typisierung von Proben für diese Polymorphismen schwierig machte. Insgesamt wiesen diese beiden Polymorphismen in der Entwicklung auch die größten Probleme auf, da zu Beginn die Ergebnisse von Luminex in keiner Weise die bekannte Typisierung widerspiegelten. Erst durch das Einführen des zweiten Waschschrilles nach der Markierung mit Streptavidin-R-phycoerythrin war der Polymorphismus für den SNP in IFN γ überhaupt auswertbar. Allerdings verloren wir dadurch bei allen getesteten SNP beim Auslesen im Luminex 100 IS an Signalintensität, was die Qualität der Ergebnisse teils reduzierte, jedoch stellte sich die gewünschte Abgrenzbarkeit für die oben genannte Typisierung des Polymorphismus rs2430561 ein. Auf die Auswertbarkeit und Signalunterschiede der restlichen SNP-Typisierungen wirkte sich dieser Waschschrill, mit Ausnahme von IL4, im Endeffekt nur unwesentlich aus, so dass wir diesen Kompromiss eingingen.

Das Einführen des zusätzlichen Waschschrilles allein reichte jedoch nicht aus, um eine ausreichende Abgrenzbarkeit der Genotypen zu erhalten. So änderten wir zusätzlich das Design der Captureoligonukleotide für den betroffenen SNP. Hier zeigt sich die Notwendigkeit, im Gegensatz zu den übrigen Captureoligonukleotiden bei denen die polymorphe Stelle genau in der Mitte lag. Die Position zu verändern. Im Falle von IFN γ wurde die polymorphe Stelle weiter nach außen an den Rand gerückt. Der Grund dieser Veränderung ging auf unsere Überlegungen zurück, dass durch diese Änderung eine spezifischere Bindung an die Zielsequenz ermöglicht werden sollte. Trotz dieser Maßnahmen blieb die Abgrenzbarkeit für die SNP rs2430561 und rs1982073 nur passabel

und lag im Vergleich zu den restlichen SNP-Typisierungen hinsichtlich Genauigkeit zurück (vergleiche hierzu Tbl. 31 und 32 auf den Seiten 91 und 92). In der Überlegung darüber, was die Ursache für diesen Effekt sein könnte, kamen hierfür am ehesten die Sequenzabfolgen infrage, welche die Polymorphismen aufwiesen. Beide Polymorphismen lagen innerhalb, beziehungsweise am Ende eines Short-Tandem-Repeats. In diesen Basensequenzauffälligkeiten sahen wir einen Grund für unspezifische Bindung der Captureoligonukleotide, die zu der schlechteren Abgrenzbarkeit führten. Die neue Position am Rand des Captureoligonukleotides wird gemäß einer Empfehlung von Luminex für eher ungünstig gehalten, da die Bindungsspezifität abnimmt und nur dann angeraten, wenn wie in unserem Fall, andere Eigenheiten der Zielsequenz zu diesem Schritt zwingen [138].

Der zusätzliche Waschschrift für die Optimierung der Typisierung von IFNg und TGFb ging zu Lasten der Genauigkeit der Typisierung von IL4. Bei rs2243250 lagen die Proben K2, K5 und K6 direkt am Cut-Off. Im Polymorphismus rs2070874 kam es zu einer Fehltypisierung für die Probe K2. Durch den Vorgang des zusätzlichen Waschschrilles reduzierte sich die Signalstärke der gezählten Beads, welche vom Luminex 100 IS ausgelesen wurde. Dies wirkte sich wiederum negativ auf die ermittelten Quotienten aus, die wir zur Bestimmung des Genotyps heranzogen. Im Vorfeld der Entwicklung wurde die Typisierung nur mit einem Waschschrift durchgeführt, daher standen aus ersten Probeläufen ebenfalls Rohdaten zur Verfügung, welche zum Vergleich herangezogen werden konnten. Aus diesen Vorversuchen standen die Typisierungen für Kit 1 und Kit 3 zur Verfügung. Im Falle von IL4 zeigte sich hier, in den Versuchen mit nur einem Waschschrift, eine Typisierung wie sie wünschenswert gewesen wäre, mit ausreichend großen und eindeutigen Abständen zwischen den Quotienten der einzelnen Genotypen, so dass sich problemlos ein Cut-Off bestimmen ließ und es trat bei diesen Typisierungen kein Fehler auf.

Letztlich musste also die Konfiguration einen Kompromiss darstellen, um eine möglichst genaue Typisierung aller SNP zu erreichen. Eine Möglichkeit war es, unter der Prämisse für alle drei Kits den gleichen Verfahrensablauf zu haben, den zweiten Waschschrift immer durchzuführen, was jedoch auf Kosten der Genauigkeit bei der Typisierung von IL4 geschehen musste. Die zweite Möglichkeit wäre, ausschließlich bei der Typisierung von Kit 2 den zweiten Waschschrift durchzuführen, wodurch die bessere Auswertbarkeit von TGFb und IFNg gegeben wäre, und die restlichen Typisierungen von Kit 1 und Kit 3, inklusive der Typisierung von IL4, unbeeinflusst bliebe. Hierbei entstünde der Nachteil, dass aufgrund des zusätzlichen Waschschriftes in Kit 2, die Verfahrensweise für alle drei Kits nicht einheitlich wäre.

Im Verlauf des Entwicklungsprozesses erwies sich die MPCR als robuste Anwendung, die die an sie gestellten Erwartungen vollumfänglich erfüllte. Als nachteilig betrachteten wir zunächst, dass es nicht möglich war, die MPCR auf das Funktionieren aller Primerpaare innerhalb eines Kits überprüfen zu können. Zwar war es möglich die Amplifikate in einem Agarosegel elektrophoretisch aufzutrennen, dies lieferte jedoch nur ein Bandenmuster, welches jedoch nicht eindeutig die Frage beantwortete, ob alle fünf beziehungsweise sechs MPCR-Produkte auch wirklich amplifiziert wurden. Dies ergab sich aus der Tatsache, dass die unterschiedlichen PCR-Amplifikate sich oft nur unwesentlich in der Basenzahl unterschieden und die Auflösung im normalen Agarosegel für die komplette und eindeutige Trennung nicht ausreichte. So ließ ein Gelbild nur eine Aussage darüber zu, ob überhaupt eine Reaktion abgelaufen war und ob Amplifikate mit den zu erwartenden Basenlängen entstanden waren. Zwar testeten wir auch unterschiedliche Beschaffenheiten der Agarosegele und länger dauernde elektrophoretischer Auftrennungen, um die Unterschiede zwischen Basendifferenzen von 2-40 bp herauszuarbeiten, jedoch erwies sich dies als zu Zeit- und Materialaufwendig, um dies bei jeder Reaktion anzuschließen. Benutzt wurden die Gelbilder nur noch, um von vornherein sagen zu können, ob eine Reaktion stattgefunden hatte oder nicht. Zum Beweis der erfolgreichen MPCR

für jedes gewünschte Amplifikat nutzten wir letztlich die Sequenzierung. Hier zeigte sich mehrfach, dass sich aus den MPCR-Reaktionen jedes einzelne Produkt heraus ausfallsicher sequenzieren ließ. Hieraus zogen wir die Schlussfolgerung, dass die drei MPCR ausreichend zuverlässig waren, um sie direkt mit den xMAP® Carboxybeads hybridisieren und analysieren zu können, ohne dass wir einen Nachweisschritt zur Überprüfung der MPCR zwischenschalten hätten müssen.

4.3 Erfahrungen in der Entwicklung und Möglichkeiten der Systemoptimierung

Bei der Entwicklung dieser Applikation ergaben sich diverse Probleme, sowohl bei der Etablierung der MPCR, wie auch beim Erstellen der gekoppelten xMAP® Carboxybeads. Während bereits zu Beginn klar war, dass die Schmelztemperaturen der benutzten Primerpaare für die MPCR alle in etwa gleich sein mussten, stellte sich die Menge der eingesetzten Primer zunächst als schwierig heraus. Abgeleitet von der Menge der eingesetzten Primer in der PCR eines für die einzelne Amplifikationsreaktion, setzten wir die selbe Menge auch in der MPCR ein, so dass sich die gesamte Menge an Primern bei fünf bis sechs Primerpaaren je MPCR auch um den Faktor fünf bis sechs erhöhte. Das Ergebnis war, dass zunächst vor allem neben in geringem Grad amplifizierten MPCR-Produkten, eine stark ausgeprägte Bildung von Primerdimeren und unspezifischen MPCR-Produkten die Folge war. Über den Versuch, die Primerkonzentration anhand der Stärke der Bandenmuster für die jeweiligen Produkte individuell anzupassen, gelangten wir am Ende zu dem Entschluss, die Primerkonzentration drastisch zu senken. Daher setzten wir nur noch 30 pmol des Primer-Mix je Reaktion ein, wo es zuvor noch bis zu 120 pmol waren. Den Ergebnissen kam dies zugute, denn die Primerdimere und unspezifischen Banden in der Kontrolle durch die Gelelektrophorese verschwanden zugunsten

einer deutlich besseren Qualität bei der Amplifikation der MPCR-Produkte [6]. Letztlich führte diese Erkenntnis auch zu der Entscheidung, keinen Versuch mehr zu unternehmen, eine MPCR mit allen Primern in einer Reaktion zu entwickeln. Basierend auf diesem neuen Konzept verlief die weitere Entwicklung der MPCR mit anschließender Sequenzierung zur Überprüfung des Amplifikationserfolges problemlos. Im Vergleich der drei etablierten MPCR-Kits schien es von Vorteil gewesen zu sein, wenn alle verwendeten Primerpaare möglichst kurze, das heißt um die 100 bp Länge liegende, Amplifikate ergaben. Hier zeichnete sich noch einmal eine bessere Qualität, im Vergleich zu den Kits die PCR-Produktlängen von über 250 bp beinhalteten, ab. Ob dies im geringeren Substratverbrauch in Form von dNTP zu sehen war, weil die Amplifikate kürzer waren, bleibt an dieser Stelle nur zu vermuten, auch wenn die Zugabe einer erhöhten Menge MPCR-Reaktionspuffers die Ergebnisse verbesserte. Jedoch ergaben höhere Mengen als 6 µl MPCR-Reaktionspuffer keine Verbesserung der Ergebnisse.

Die Entwicklung der gekoppelten xMAP® Carboxybeads verlief ebenfalls nicht ohne Schwierigkeiten. Während das Koppeln der Carboxybeads problemlos erfolgen konnte, traten die ersten Schwierigkeiten bei der Hybridisierungsreaktion auf. In den ersten Versuchen setzten wir C6-Spacer am 5'-Ende der Captureoligonukleotide ein und erhielten damit nur unspezifische Ergebnisse. Nachdem mehrere Testreihen mit geänderten Hybridisierungsbedingungen keine Änderung der Ergebnisse erbrachten, gingen wir der Überlegung nach, ob nicht ein längerer Spacer notwendig war. Unter der Vorstellung, dass die unspezifische Bindung aufgrund eines sterischen Problems die Hybridisierung der PCR-Produkte an die beadgebundenen Captureoligonukleotide verhinderten, entschieden wir uns für die Verwendung von Spacern mit einem Kohlenstoffgerüst, bestehend aus 12 Atomen [40]. Dieser Schritt erbrachte den gewünschten Erfolg und von diesem Zeitpunkt an waren die Hybridisierungsreaktionen bei der Entwicklung von Kit 1 und Kit 3 erfolgreich. Probleme traten dann erst wieder bei Kit 2 auf, als es an die

Auswertung von IFNg und TGFb ging, die bereits zuvor beschrieben wurden. Für eine zukünftige weitere Optimierung der Applikation ist es wahrscheinlich notwendig sie in Teilen neu zu konzipieren. In den Fällen, in denen die Bestimmung der Polymorphismen TGFb und IFNg nicht notwendig sein sollte, können die entsprechenden Primer- und Beadmixe komplikationslos weggelassen und die Anwendung ohne den zusätzlich eingeführten Waschschrift bei der Hybridisierung ausgeführt werden. Für die Verbesserung der Anwendung hinsichtlich des Verbleibs der beiden problematischen Polymorphismen im Kit, sollten zunächst die Captureoligonukleotide für TGFb überarbeitet werden. Damit könnte unter Umständen durch Veränderung des Designs der Captureoligonukleotide, vergleichbar zu IFNg, durch Verschiebung der polymorphen Stelle innerhalb des Captureoligonukleotides der Einfluss des Short-Tandem-Repeats minimiert werden. Eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung könnte die Ausgliederung von TGFb und IFNg in einen eigenen Kit, beziehungsweise die Neuordnung der Kitzusammenstellung, sein. Hierzu müsste allerdings im letzten Fall die MPCR neu zusammengestellt und erneut validiert werden. Insgesamt entwickelten wir trotz der Probleme eine zuverlässige Anwendung, die eine rasche und genaue Typisierung der Proben erlaubt.

4.4. Ausblick und Zukunft der xMAP® Carboxybead-technologie in der Abteilung für Transplantationsimmunologie

Mittels des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Testverfahrens wurden in unserem Institut Einflüsse auf die Graft-versus-Host-Reaktion bei knochenmarktransplantierten Spender-/Empfängerpaaren untersucht. Hierzu wurden ca. 400 Proben von Spender/Empfängerpaaren analysiert.

Basierend auf den Erfahrungen zu dieser Technologie entwickelten wir für drei Polymorphismen im NOD2/Card 15 Gen einen gleich angelegten Test, wenn auch in einem geringeren Umfang, der ebenfalls eine MPCR nutzt und bei dem mittels xMAP® Carboxybeads, die mit entsprechenden Captureoligonukleotiden gekoppelt wurden, typisiert werden konnten. Damit wurden die bereits auf die Polymorphismen im Bereich der Zytokine getesteten 400 Spender-/Empfängerpaare ebenfalls auf die Merkmale von NOD2/Card 15 mit derselben Fragestellung wie bei den SNP der Zytokingene untersucht. Die jüngste Anwendung, die anhand dieser Basisdaten entwickelt wurde, war zur Typisierung einer Deletion im Bereich des CCR5-Gens. Hierzu erfolgt aktuell eine Studie zur Klärung des Einflusses dieser Deletion auf die Infektionshäufigkeit von Cytomegalieviren auf humane Zellen. Die Entwicklung dieser beiden folgenden Anwendungen konnte mit den aus dieser Arbeit hervorgegangenen Basisdaten schneller und effizienter durchgeführt werden, beweist die Übertragbarkeit auf andere Gensysteme und ermöglicht so zukünftig vielfältige Anwendungsmöglichkeiten bei Fragestellungen, die Typisierungen von polymorphen Stellen im Genom verlangen.

5. Zusammenfassung

Wir knüpften an diese Arbeit die Zielsetzung, eine neue Methode zur Typisierung von Zytokinpolymorphismen im menschlichen Genom zu etablieren. Hierzu wollten wir 22 verschiedene Single Nucleotide Polymorphism (SNP) in den 13 Zytokingenen Interleukin-1 alpha (IL1a), Interleukin-1 beta (IL1b), Interleukin-1 Rezeptor (IL1R), Interleukin-1 Rezeptorantagonist (IL1RN), Interleukin-2 (IL2), Interleukin-4 (IL4), Interleukin-4 Rezeptor alpha (IL4Ra), Interleukin-6 (IL6), Interleukin-10 (IL10), Interleukin-12 beta (IL12b), Interferon gamma (IFNg), Tumor necrosis factor alpha (TNFa) und Transforming growth factor beta (TGFb) untersuchen, die mittels der xMAP® Carboxybead Technologie der Firma Luminex typisiert werden sollten. Dies geschah, um in Folgearbeiten den Einfluss dieser SNP auf das Auftreten und das Ausmaß von Graft-versus-Host-Reaktion bei Knochenmarktransplantierten Patienten untersuchen zu können.

Für die praktische Umsetzung entwickelten wir zunächst drei MPCR (multiplex Polymerase Chain Reaction), in denen die 13 betroffenen Zytokingene mit den SNP amplifiziert werden konnten. In einem weiteren Schritt koppelten wir an die xMAP® Carboxybeads Captureoligonukleotide, die an die entsprechenden Genabschnitte im Bereich der untersuchten SNP binden sollten. An die in den MPCR gewonnenen Amplifikaten erfolgte die Hybridisierung der an die Beads gekoppelten Captureoligonukleotide und die anschließende Analyse mit dem Luminex 100 IS Gerät. Aufgrund der gewonnenen Signale konnten anschließend der Genotyp für die SNP bestimmt, sowie die Haplotypen angegeben werden.

Zur Validierung der von uns entwickelten Testmethode analysierten wir 52 DNA (Desoxyribonucleic acid) Proben und typisierten sie hinsichtlich ihrer Genotypen. Dies geschah zum einen mit einer bei uns ebenfalls genutzten Methode durch sequenzspezifische Primer und zum Vergleich die neue Testmethode. Bei Unterschieden im Ergebnis zwischen der neuen und der Referenzmethode kam zur

Bestätigung des korrekten Genotyp die Sequenzierung zum Einsatz. Bei der Validierung wurden für jeden der zu untersuchenden SNP 52 Proben typisiert, was eine Gesamtzahl von 1144 Typisierungen ergab. Von diesen 1144 Proben fanden sich in 57 Fällen ein abweichendes Ergebnis zwischen der Methode der sequenzspezifischen Primer und der neu entwickelten xMAP® Carboxybead Methode. Bei der Kontrolle mittels Sequenzierung ergab sich das Bild, dass lediglich drei Fehltypisierungen bei den Carboxybeads zu verzeichnen waren, denen 54 Fehltypisierungen durch die sequenzspezifischen Primer gegenüberstanden. Damit ergab sich eine Fehlerquote von 0,27% bei den Carboxybeads, im Vergleich zu der von uns gewählten Referenzmethode mit einer Fehlerquote von 4,79%. Darüber hinaus erbrachte die Methode der sequenzspezifischen Primer bei der Testung in 17 Fällen kein Ergebnis, was zu einer Gesamtfehlerquote von 6,21% seitens der Methode SSP (sequenzspezifische Primer) führte.

Damit erbrachte diese Arbeit im Ergebnis eine neue Möglichkeit der effizienteren und schnelleren Typisierung von DNA-Proben, auf die für uns wichtigen SNP im Bereich der genannten Zytokingene, als sie bisher in unserem Labor möglich war. Diese bietet jedoch noch Raum für Optimierung im Bereich der Testung von IFN γ und TGF β bietet, da hier eine schlechtere Abgrenzbarkeit der einzelnen Genotypen voneinander zu verzeichnen war, im Vergleich zu den restlichen untersuchten SNP in den anderen Zytokingenen. Zudem konnten basierend auf den Erfahrungen für die Testung dieser SNP, diese Methodik auch für SNP im Bereich von NOD2/Card 15 (Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2), sowie bei der CCR5-Diagnostik (Chemokine-5 Rezeptor) eingesetzt werden.

6. Literatur

- [1] Akkad DA, Arning L, Ibrahim SM, Peplen JT: Sex specifically associated promoter polymorphism in multiple sclerosis affects interleukin 4 expression levels. *Genes Immun* 8: 703-706 (2007)
- [2] Ambruzova Z, Mrazek F, Raida L, Jindra P, Vidan-Jeras B, Faber E, Pretnar J, Indrak K, Petrek M: Association of IL6 and CCL2 gene polymorphisms with the outcome of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 44: 227-235 (2009)
- [3] Asderakis A, Sankaran D, Dyer P, Johnson RW, Pravica V, Sinnott PJ, Roberts I, Hutchinson IV: Association of polymorphisms in the human interferon-gamma and interleukin-10 gene with acute and chronic kidney transplant outcome: the cytokine effect on transplantation. *Transplantation* 71: 674-677 (2001)
- [4] Awad MR, El-Gamel A, Hasleton P, Turner DM, Sinnott PJ, Hutchinson IV: Genotypic variation in the transforming growth factor-beta1 gene: association with transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. *Transplantation* 66: 1014-1020 (1998)
- [5] Bagnoli S, Cellini E, Tedde A, Nacmias B, Piacentini S, Bessi V, Bracco L, Sorbi S: Association of IL10 promoter polymorphism in Italian Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 418: 262-265 (2007)
- [6] Bartošová P, Fiala I: Molecular evidence for the existence of cryptic species Assemblage of several myxosporeans (Myxozoa). *Parasitol Res* 108: 573-583 (2011)
- [7] Beadling C, Johnson KW, Smith KA: Isolation of interleukin 2-induced immediate-early genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 2719-2723 (1993)

-
- [8] Beadling C, Smith KA: DNA array analysis of interleukin-2-regulated immediate/early genes. *Med Immunol* 1: 2 (2002)
- [9] Benedict C, Scheller J, Rose-John S, Born J, Marshall L: Enhancing influence of intranasal interleukin-6 on slow-wave activity and memory consolidation during sleep. *FASEB J* 23: 3629-3636 (2009)
- [10] Benke KS, Carlson MC, Doan BQ, Walston JD, Xue QL, Reiner AP, Fried LP: Arking interleukin-1 genes with cognition: Findings from the cardiovascular health study. *Exp Gerontol* 46: 1010-1019 (2011)
- [11] Bertinetto FE, Dall'Omo AM, Mazzola GA, Rendine S, Berrino M, Bertola L, Magistroni P, Caropreso P, Falda M, Locatelli F, Busca A, Amoroso A: Role of non-HLA genetic polymorphisms in graft-versus-host disease after haematopoietic stem cell transplantation. *Int J Immunogenet* 33: 375-384 (2006)
- [12] Bogunia-Kubik K, Mlynarczewska A, Wysoczanska B, Lange A: Recipient interferon-gamma 3/3 genotype contributes to the development of chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 90: 425-426 (2005)
- [13] Bogunia-Kubik K: Polymorphisms within the genes encoding TNF-alpha and TNF-beta associate with the incidence of post-transplant complications in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 52: 240-249 (2004)
- [14] Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J: Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28: 495-503 (1990)

-
- [15] Bortolin S, Black M, Modi H, Boszko I, Kobler D, Fieldhouse D, Lopes E, Lacroix JM, Grimwood R, Wells P, Janeczko R, Zastawny R: Analytical validation of the tag-it high-throughput microsphere-based universal array genotyping platform: application to the multiplex detection of a panel of thrombophilia-associated single-nucleotide polymorphisms. *Clin Chem* 50: 2028-2036 (2004)
- [16] Borzani I, Tola MR, Caniatti L, Collins A, De Santis G, Luiselli D, Mamolini E, Scapoli C. The interleukin-1 cluster gene region is associated with multiple sclerosis in an Italian Caucasian population. *Eur J Neurol* 17: 930-938 (2010)
- [17] Bovers M, Diaz MR, Hagen F, Spanjaard L, Duim B, Visser CE, Hoogveld HL, Scharringa J, Hoepelman IM, Fell JW, Boekhout T: Identification of genotypically diverse *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates by Luminex xMAP technology. *J Clin Microbiol* 45: 1874-1883 (2007)
- [18] Bremer LA, Blackman SM, Vanscoy LL, McDougal KE, Bowers A, Naughton KM, Cutler DJ, Cutting GR: Interaction between a novel TGFB1 haplotype and CFTR genotype is associated with improved lung function in cystic fibrosis. *Hum Mol Genet* 17: 2228-2237 (2008)
- [19] Brenner AV, Butler MA, Wang SS, Ruder AM, Rothman N, Schulte PA, Chanock SJ, Fine HA, Linet MS, Inskip PD: Single-nucleotide polymorphisms in selected cytokine genes and risk of adult glioma. *Carcinogenesis* 28: 2543-2547 (2007)
- [20] Brookes AJ: The essence of SNPs. *Gene* 234: 177-186 (1999)
- [21] Brown JT, Lahey C, Laosinchai-Wolf W, Hadd AG: Polymorphisms in the glucocerebrosidase gene and pseudogene urge caution in clinical analysis of Gaucher disease allele c.1448T>C (L444P). *BMC Med Genet* 7: 69 (2006)

-
- [22] Cantrell DA, Smith KA: The interleukin-2 T-cell system: a new cell growth model. *Science* 224: 1312-1316 (1984)
- [23] Capon F, Di Meglio P, Szaub J, Prescott NJ, Dunster C, Baumber L, Timms K, Gutin A, Abkevic V, Burden AD, Lanchbury J, Barker JN, Trembath RC, Nestle FO: Sequence variants in the genes for the interleukin-23 receptor (IL23R) and its ligand (IL12B) confer protection against psoriasis. *Hum Genet* 122: 201-206 (2007)
- [24] Cargill M, Schrodi SJ, Chang M, Garcia VE, Brandon R, Callis KP, Matsunami N, Ardlie KG, Civello D, Catanese JJ, Leong DU, Panko JM, McAllister LB, Hansen CB, Papenfuss J, Prescott SM, White TJ, Leppert MF, Krueger GG, Begovich AB: A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. *Am J Hum Genet* 80: 273-290 (2007)
- [25] Cavet J, Dickinson AM, Norden J, Taylor PR, Jackson GH, Middleton PG: Interferon-gamma and interleukin-6 gene polymorphisms associate with graft-versus-host disease in HLA-matched sibling bone marrow transplantation. *Blood* 98: 1594-1600 (2001)
- [26] Celedón JC, Lange C, Raby BA, Litonjua AA, Palmer LJ, DeMeo DL, Reilly JJ, Kwiatkowski DJ, Chapman HA, Laird N, Sylvia JS, Hernandez M, Speizer FE, Weiss ST, Silverman EK: The transforming growth factor-beta1 (TGFB1) gene is associated with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Hum Mol Genet* 13: 1649-1656 (2004)
- [27] Cerhan JR, Wang S, Maurer MJ, Ansell SM, Geyer SM, Cozen W, Morton LM, Davis S, Severson RK, Rothman N, Lynch CF, Wacholder S, Chanock SJ, Habermann TM, Hartge P: Prognostic significance of host immune gene polymorphisms in follicular lymphoma survival. *Blood* 109: 5439-5446 (2007)

-
- [28] Chen G, Goeddel DV: TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 296: 1634-1635 (2002)
- [29] Chen J, Iannone MA, Li MS, Taylor JD, Rivers P, Nelsen AJ, Slentz-Kesler KA, Roses A, Weiner MP: A microsphere-based assay for multiplexed single nucleotide polymorphism analysis using single base chain extension. *Genome Res* 10: 549-557 (2000)
- [30] Christensen U, Haagerup A, Binderup HG, Vestbo J, Kruse TA, Børghlum AD: Family based association analysis of the IL2 and IL15 genes in allergic disorders. *Eur J Hum Genet* 14: 227-235 (2006)
- [31] Colinas RJ, Bellisario R, Pass KA: Multiplexed genotyping of beta-globin variants from PCR-amplified newborn blood spot DNA by hybridization with allele-specific oligodeoxynucleotides coupled to an array of fluorescent microspheres. *Clin Chem* 46: 996-998 (2000)
- [32] Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A: A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Res* 8: 1229-1231 (1998)
- [33] Crispim JC, Wastowski IJ, Rassi DM, Mendes-Junior Silva CT, Bassi C, Castelli EC, Costa RS, Saber LT, Silva TG, Donadi EA: Interferon- γ +874 polymorphism in the first intron of the human interferon- γ gene and kidney allograft outcome. *Transplant Proc* 42: 4505-4508 (2010)
- [34] Cullup H, Dickinson AM, Cavet J, Jackson GH, Middleton PG: Polymorphisms of interleukin-1 α constitute independent risk factors for chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 122: 778-787 (2003)
- [35] Dalva K, Beksac M: HLA typing with sequence-specific oligonucleotide primed PCR (PCR-SSO) and use of the Luminex technology. *Methods Mol Med* 134: 61-69 (2007)

-
- [36] Danforth KN, Rodriguez C, Hayes RB, Sakoda LC, Huang WY, Yu K, Calle EE, Jacobs EJ, Chen BE, Andriole GL, Figueroa JD, Yeager M, Platz EA, Michaud DS, Chanock SJ, Thun MJ, Hsing AW: TNF polymorphisms and prostate cancer risk. *Prostate* 68: 400-407 (2008)
- [37] Das S, Brown TM, Kellar KL, Holloway BP, Morrison CJ: DNA probes for the rapid identification of medically important *Candida* species using a multianalyte profiling system. *FEMS Immunol Med Microbiol* 46: 244-250 (2006)
- [38] Daser A, Mitchison H, Mitchison A, Müller B: Non-classical-MHC genetics of immunological disease in man and mouse. The key role of pro-inflammatory cytokine genes. *Cytokine* 8: 593-597 (1996)
- [39] Dhiman N, Ovsyannikova IG, Cunningham JM, Vierkant RA, Kennedy RB, Pankratz VS, Poland GA, Jacobson RM: Associations between measles vaccine immunity and single-nucleotide polymorphisms in cytokine and cytokine receptor genes. *J Infect Dis* 195: 21-29 (2007)
- [40] Diaz MR, Fell JW. High-throughput detection of pathogenic yeasts of the genus *trichosporon*. *J Clin Microbiol* 42: 3696-3706 (2004)
- [41] Dinarello CA: The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB J.* 8: 1314-1325 (1994)
- [42] Dunbar SA, Jacobson JW: Rapid screening for 31 mutations and polymorphisms in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene by Lminex xMAP suspension array. *Methods Mol Med* 114: 147-171 (2005)
- [43] Febbraio MA, Pedersen BK: Contraction-induced myokine production and release: is skeletal muscle an endocrine organ? *Exerc Sport Sci Rev* 33: 114-119 (2005)

-
- [44] Furuta T, Teranishi M, Uchida Y, Nishio N, Kato K, Otake H, Yoshida T, Tagaya M, Suzuki H, Sugiura M, Sone M, Hiramatsu M, Sugiura S, Ando F, Shimokata H, Nakashima T: Association of interleukin-1 gene polymorphisms with sudden sensorineural hearing loss and Ménière's disease. *Int J Immunogenet* 38: 249-254 (2011)
- [45] Gao HL, Sun AN, Han Y, Zhang W, Hu XH, Wu DP, Ruan CG: Clinical significance of TNF-alpha, IL-1beta and IFN-gamma levels at early phase after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 17: 1321-1325 (2009)
- [46] Gaudet MM, Egan KM, Lissowska J, Newcomb PA, Brinton LA, Titus-Ernstoff L, Yeager M, Chanock S, Welch R, Peplonska B, Trentham-Dietz A, Garcia-Closas M: Genetic variation in tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha (TNF-LTA) and breast cancer risk. *Hum Genet* 121: 483-490 (2007)
- [47] Gaur U, Aggarwal BB: Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol* 66: 1403-1408 (2003)
- [48] Gendzekhadze K, Rivas-Vetencourt P, Montano RF: Risk of adverse post-transplant events after kidney allograft transplantation as predicted by CTLA-4 +49 and TNF-alpha -308 single nucleotide polymorphisms: a preliminary study. *Transpl Immunol* 16: 194-199 (2006)
- [49] Gray PW, Goeddel DV: Structure of the human immune interferon gene. *Nature* 298: 859-863 (1982)
- [50] Grimbaldston MA, Nakae S, Kalesnikoff J, Tsai M, Galli SJ: Mast cell-derived interleukin 10 limits skin pathology in contact dermatitis and chronic irradiation with ultraviolet B. *Nat Immunol* 8:1095-1104 (2007)

-
- [51] Haralambieva IH, Ovsyannikova IG, Kennedy RB, Vierkant RA, Pankratz VS, Jacobson RM, Poland GA: Associations between single nucleotide polymorphisms and haplotypes in cytokine and cytokine receptor genes and immunity to measles vaccination. *Vaccine* 29: 7883-7895 (2011)
- [52] Hee CS, Gun SC, Naidu R, Gupta E, Somnath SD, Radhakrishnan AK: Comparison of single nucleotide polymorphisms in the human interleukin-10 gene promoter between rheumatoid arthritis patients and normal subjects in Malaysia. *Mod Rheumatol* 17: 429-435 (2007)
- [53] Holler E, Ertl B, Hintermeier-Knabe R, Roncarolo MG, Eissner G, Mayer F, Fraunberger P, Behrends U, Pfannes W, Kolb HJ, Wilmanns W: Inflammatory reactions induced by pretransplant conditioning--an alternative target for modulation of acute GvHD and complications following allogeneic bone marrow transplantation? *Leuk Lymphoma* 25: 217-224 (1997)
- [54] Howard M, Paul WE: Interleukins for B lymphocytes. *Lymphokine Res* 1: 1-4 (1982)
- [55] Hunninghake GM, Soto-Quirós ME, Lasky-Su J, Avila L, Ly NP, Liang C, Klanderman BJ, Raby BA, Gold DR, Weiss ST, Celedón JC: Dust mite exposure modifies the effect of functional IL10 polymorphisms on allergy and asthma exacerbations. *J Allergy Clin Immunol* 122: 93-98 (2008)
- [56] Kaliński P, Hilkens CM, Snijders A, Snijdewint FG, Kapsenberg ML: IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E₂, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells. *J Immunol* 159: 28-35(1997)
- [57] Kämäräinen OP, Solovieva S, Vehmas T, Luoma K, Riihimäki H, Ala-Kokko L, Männikkö M, Leino-Arjas P: Common interleukin-6 promoter variants associate with the more severe forms of distal interphalangeal osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*: R21 (2008)

-
- [58] Karabon L, Wysoczanska B, Bogunia-Kubik K, Suchnicki K, Lange A: IL-6 and IL-10 promoter gene polymorphisms of patients and donors of allogeneic sibling hematopoietic stem cell transplants associate with the risk of acute graft-versus-host disease. *Hum Immunol* 66: 700-710 (2005)
- [59] Karabon L: The role of cytokine gene polymorphisms in organ and haematopoietic stem cell transplantation. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 58: 270-284 (2004)
- [60] Karimi MH, Daneshmandi S, Pourfathollah AA, Geramizadeh B, Malekhosseini SA, Nikeghbalian S, Yaghobi R, Bolandparvaz S: Association of IL-6 promoter and IFN- γ gene polymorphisms with acute rejection of liver transplantation. *Mol Biol Rep* 38: 4437-4443 (2011)
- [61] Karimi MH, Daneshmandi S, Pourfathollah AA, Geramizadeh B, Yaghobi R, Rais-Jalali GA, Roozbeh J, Bolandparvaz S: A study of the impact of cytokine gene polymorphism in acute rejection of renal transplant recipients. *Mol Biol Rep* 39: 509-515 (2012)
- [62] Karppinen J, Daavittila I, Noponen N, Haapea M, Taimela S, Vanharanta H, Ala-Kokko L, Männikkö M: Is the interleukin-6 haplotype a prognostic factor for sciatica? *Eur J Pain* 12: 1018-1025 (2008)
- [63] Knudsen S, Harsløf T, Husted LB, Carstens M, Stenkjaer L, Langdahl BL: The effect of interleukin-1 α polymorphisms on bone mineral density and the risk of vertebral fractures. *Calcif Tissue Int* 80: 21-30 (2007)
- [64] Koch W, Hoppmann P, Mueller JC, Schömig A, Kastrati A. Association of transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms with myocardial infarction in patients with angiographically proven coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 1114-1149 (2006)

-
- [65] Kocierz M, Siekiera U, Kolonko A, Karkoszka H, Chudek J, Cierpka L, Więcek A: -174G/C interleukin-6 gene polymorphism and the risk of transplanted kidney failure or graft loss during a 5-year follow-up period. *Tissue Antigens* 77: 283-290 (2011)
- [66] Körholz D, Kunst D, Hempel L, Söhngen D, Heyll A, Bönig H, Göbel U, Zintl F, Burdach S: Decreased interleukin 10 and increased interferon-gamma production in patients with chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 19: 691-965 (1997)
- [67] Körholz D, Kunst D, Hempel L, Söhngen D, Heyll A, Bönig H, Göbel U, Zintl F, Burdach S: Decreased interleukin 10 and increased interferon-gamma production in patients with chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 19: 691-965 (1997)
- [68] Kube D, Hua TD, Klöss M, Kulle B, Brockmöller J, Wojnowski L, Löffler M, Pfreundschuh M, Trümper L: The interleukin-10 gene promoter polymorphism -1087AG does not correlate with clinical outcome in non-Hodgkin's lymphoma. *Genes Immun* 8: 164-167 (2007)
- [69] Langdahl BL, Uitterlinden AG, Ralston SH, Trikalinos TA, Balcells S, Brandi ML, Scollen S, Lips P, Lorenc R, Obermayer-Pietsch B, Reid DM, Armas JB, Arp PP, Bassiti A, Bustamante M, Husted LB, Carey AH, Pérez Cano R, Dobnig H, Dunning AM, Fahrleitner-Pammer A, Falchetti A, Karczmarewicz E, Kruk M, van Leeuwen JP, Masi L, van Meurs JB, Mangion J, McGuigan FE, Mellibovsky L, Mosekilde L, Nogués X, Pols HA, Reeve J, Renner W, Rivadeneira F, van Schoor NM, Ioannidis JP; APOSS investigators; DOPS investigators; EPOS investigators; EPOLOS investigators; FAMOS investigators; LASA investigators; ERGO investigators; GENOMOS Study: Large-scale analysis of association between polymorphisms in the transforming

-
- growth factor beta 1 gene (TGFB1) and osteoporosis: the GENOMOS study. *Bone* 42: 969-981 (2008)
- [70] Lea WI, Lee YH: The associations between interleukin-1 polymorphisms and susceptibility to ankylosing spondylitis: A meta-analysis. (Publikation in Vorbereitung)
- [71] Li CJ, Yu LX, Xu J, Fu SJ, Deng WF, DU CF, Wang YB: Association between transforming growth factor beta-1 gene polymorphism and chronic allograft nephropathy. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Bao* 27: 535-537 (2007)
- [72] Lin MT, Storer B, Martin PJ, Tseng LH, Gooley T, Chen PJ, Hansen JA: Relation of an interleukin-10 promoter polymorphism to graft-versus-host disease and survival after hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med* 349: 2201-2210 (2003)
- [73] Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ: The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104: 487-501 (2001)
- [74] Maksymowych WP, Rahman P, Reeve JP, Gladman DD, Peddle L, Inman RD: Association of the IL1 gene cluster with susceptibility to ankylosing spondylitis: an analysis of three Canadian populations. *Arthritis Rheum* 54: 974-985 (2006)
- [75] Mangino M, Braund P, Singh R, Steeds R, Stevens S, Channer KS, Samani NJ: Association analysis of IL-12B and IL-23R polymorphisms in myocardial infarction. *J Mol Med (Berl)* 86: 99-103 (2008)
- [76] McGuigan FE, Macdonald HM, Bassiti A, Farmer R, Bear S, Stewart A, Black A, Fraser WD, Welsh F, Reid DM, Ralston SH: Large-scale population-based study shows no association between common polymorphisms of the TGFB1 gene and BMD in women. *J Bone Miner Res* 22: 195-202 (2007)

-
- [77] Mehta PA, Eapen M, Klein JP, Gandham S, Elliott J, Zamzow T, Combs M, Aplenc R, MacMillan ML, Weisdorf DJ, Petersdorf E, Davies SM: Interleukin-1 alpha genotype and outcome of unrelated donor haematopoietic stem cell transplantation for chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 137: 152-157 (2007)
- [78] Middleton PG, Taylor PR, Jackson G, Proctor SJ, Dickinson AM: Cytokine gene polymorphisms associating with severe acute graft-versus-host disease in HLA-identical sibling transplants. *Blood* 92: 3943-3948 (1998)
- [79] Moffett SP, Zmuda JM, Oakley JI, Beck TJ, Cauley JA, Stone KL, Lui LY, Ensrud KE, Hillier TA, Hochberg MC, Morin P, Peltz G, Greene D, Cummings SR: Tumor necrosis factor-alpha polymorphism, bone strength phenotypes, and the risk of fracture in older women. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 3491-3497 (2005)
- [80] Morgan MM, Clayton CC, Heinricher MM: Dissociation of hyperalgesia from fever following intracerebroventricular administration of interleukin-1beta in the rat. *Brain Res.* 1022: 96-100 (2004)
- [81] Moxley G, Han J, Stern AG, Riley BP: Potential influence of IL1B haplotype and IL1A-IL1B-IL1RN extended haplotype on hand osteoarthritis risk. *Osteoarthritis Cartilage* 15: 1106-1112 (2007)
- [82] Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51: 263-273 (1986)
- [83] Mytilineos J, Laux G, Opelz G: Relevance of IL10, TGFbeta1, TNFalpha, and IL4Ralpha gene polymorphisms in kidney transplantation: a collaborative transplant study report. *Am J Transplant* 4: 1684-1690 (2004)

-
- [84] Nair RP, Ruether A, Stuart PE, Jenisch S, Tejasvi T, Hiremagalore R, Schreiber S, Kabelitz D, Lim HW, Voorhees JJ, Christophers E, Elder JT, Weichenthal M: Polymorphisms of the IL12B and IL23R genes are associated with psoriasis. *J Invest Dermatol* 128: 1653-1661 (2008)
- [85] Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF: Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 17: 2503-2516 (1989)
- [86] Nikolova PN, Ivanova MI, Mihailova SM, Myhailova AP, Baltadjieva DN, Simeonov PL, Paskalev EK, Naumova EJ: Cytokine gene polymorphism in kidney transplantation--impact of TGF-beta 1, TNF-alpha and IL-6 on graft outcome. *Transpl Immunol* 18: 344-348 (2008)
- [87] Nordlander A, Uzunel M, Mattsson J, Remberger M: The TNFd4 allele is correlated to moderate-to-severe acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 119: 113-1136 (2002)
- [88] Papiol S, Molina V, Rosa A, Sanz J, Palomo T, Fañanás L: Effect of interleukin-1beta gene functional polymorphism on dorsolateral prefrontal cortex activity in schizophrenic Patient. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144B: 1090-1093 (2007)
- [89] Park SJ, Yoon YC, Kang SW, Kim TH, Kim YW, Joo H, Kim HJ, Jeong KH, Lee DY, Lee SS, Chung JH, Kim YH: Impact of IL2 and IL2RB genetic polymorphisms in kidney transplantation. *Transplant Proc* 43: 2383-2837 (2011)
- [90] Pawlik A, Domanski L, Rozanski J, Czerny B, Juzyszyn Z, Dutkiewicz G, Myslak M, Hałasa M, Słojewski M, Dabrowska-Zamojcin E: The association between cytokine gene polymorphisms and kidney allograft survival. *Ann Transplant* 13: 54-58 (2008)

-
- [91] Pereira FA, Pinheiro da Silva NN, Rodart IF, Carmo TM, Lemaire DC, Reis MG: Association of TGF-beta1 codon 25 (G915C) polymorphism with hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 80: 58-64 (2008)
- [92] Perlman R, Schiemann WP, Brooks MW, Lodish HF, Weinberg RA: TGF-beta-induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation. *Nat Cell Biol* 3: 708-714 (2001)
- [93] Roncarolo MG, Battaglia M, Gregori S: The role of interleukin 10 in the control of autoimmunity. *J Autoimmun* 20: 269-272 (2003)
- [94] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M: Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 155: 1151-1164 (1995)
- [95] Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchinson CA, Slocombe PM, Smith M: Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 265: 687-695 (1977)
- [96] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* 24: 104-108 (1992)
- [97] SantaLucia J Jr: A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:1460-1465 (1998)
- [98] Sasayama D, Hori H, Teraishi T, Hattori K, Ota M, Matsuo J, Kawamoto Y, Kinoshita Y, Higuchi T, Amano N, Kunugi H: Association of interleukin-1 β genetic polymorphisms with cognitive performance in elderly females without dementia. *J Hum Genet* 56: 613-616 (2011)

-
- [99] Schena FP, Cerullo G, Torres DD, Scolari F, Foramitti M, Amoroso A, Pirulli D, Floege J, Mertens PR, Zerres K, Alexopoulos E, Kirmizis D, Zelante L, Bisceglia L: Role of interferon-gamma gene polymorphisms in susceptibility to IgA nephropathy: a family-based association study. *Eur J Hum Genet* 14: 488-496 (2006)
- [100] Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA: Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75: 163-189 (2004)
- [101] Sebestyén A, Hajdu M, Kis L, Barna G, Kopper L: Smad4-independent, PP2A-dependent apoptotic effect of exogenous transforming growth factor beta 1 in lymphoma cells. *Exp Cell Res* 313: 3167-3174 (2007)
- [102] Sims AM, Timms AE, Bruges-Armas J, Burgos-Vargas R, Chou CT, Doan T, Dowling A, Fialho RN, Gergely P, Gladman DD, Inman R, Kauppi M, Kaarela K, Laiho K, Maksymowych W, Pointon JJ, Rahman P, Reveille JD, Sorrentino R, Tuomilehto J, Vargas-Alarcon G, Wordsworth BP, Xu H, Brown MA: International Genetics of Ankylosing Spondylitis. Prospective meta-analysis of interleukin 1 gene complex polymorphisms confirms associations with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 67: 1305-1309 (2008)
- [103] Slattery ML, Curtin K, Baumgartner R, Sweeney C, Byers T, Giuliano AR, Baumgartner KB, Wolff RR: IL6, aspirin, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and breast cancer risk in women living in the southwestern United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 16: 747-755 (2007)
- [104] Slattery ML, Curtin K, Sweeney C, Wolff RK, Baumgartner RN, Baumgartner KB, Giuliano AR, Byers T: Modifying effects of IL-6 polymorphisms on body size-associated breast cancer risk. *Obesity (Silver Spring)* 16: 339-347 (2008)

-
- [105] Slattery ML, Wolff RK, Herrick JS, Caan BJ, Potter JD: IL6 genotypes and colon and rectal cancer. *Cancer Causes Control* 18: 1095-1105 (2007)
- [106] Smith KA: Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science* 240: 1169-76 (1988)
- [107] Socié G, Loiseau P, Tamouza R, Janin A, Busson M, Gluckman E, Charron D: Both genetic and clinical factors predict the development of graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transplantation* 72: 699-706 (2001)
- [108] Stern JB, Smith KA: Interleukin-2 induction of T-cell G1 progression and c-myc expression. *Science* 233: 203-206 (1986)
- [109] Thakkestian A, Dmitrienko S, Gerbase-Delima M, McDaniel DO, Inigo P, Chow KM, McEvoy M, Ingsathit A, Trevillian P, Barber WH, Attia J: Association between cytokine gene polymorphisms and outcomes in renal transplantation: a meta-analysis of individual patient data. *Nephrol Dial Transplant* 23: 3017-3023 (2008)
- [110] Thornton AM, Donovan EE, Piccirillo CA, Shevach EM: Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J Immunol.* 172: 6519-6523 (2004)
- [111] Thornton AM, Shevach EM: CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 188: 287-296 (1998)
- [112] Trajkov D, Arsov T, Petlichkovski A, Strezova A, Efinska-Mladenovska O, Gogusev J, Spiroski M: Distribution of the 22 cytokine gene polymorphisms in healthy Macedonian population. *Bratisl Lek Listy.* 110(1): 7-17 (2009)

- [113] Tsai LJ, Lan JL, Lin CY, Hsiao SH, Tsai LM, Tsai JJ: The different expression patterns of interleukin-1 receptor antagonist in systemic lupus erythematosus. *C640+C23 Tissue Antigens* 86: 493-501 (2006)
- [114] Tucker WB, Jackson JA, Hopkins DM, Hogue JF: Influence of dietary sodium bicarbonate on the potassium metabolism of growing dairy calves. *J Dairy Sci* 74: 2296-2302 (1991)
- [115] van Diemen CC, Postma DS, Vonk JM, Bruinenberg M, Nolte IM, Boezen HM: Decorin and TGF-beta1 polymorphisms and development of COPD in a general population. *Respir Res* 16: 89 (2006)
- [116] Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huxson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann

A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigó R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Dieimer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X: The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-1351 (2001)

[117] Viel DO, Tsuneto LT, Sossai CR, Lieber SR, Marques SB, Vigorito AC, Aranha FJ, de Brito Eid KA, Oliveira GB, Miranda EC, de Souza CA, Visentainer JE: IL2 and TNFA gene polymorphisms and the risk of graft-versus-host disease after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Scand J Immunol* 66: 703-710 (2007)

[118] Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P: Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10: 45-65 (2003)

-
- [119] Waldmann TA, Tagaya Y: The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. *Annu Rev Immunol.* 17: 19-49 (1999)
- [120] Waldmann TA: The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat Rev Immunol* 6: 595-601 (2006)
- [121] Wang JB, Ren HY, Li D, Sun Q, Lu DP: Frequency of donor TNF-alpha gene polymorphism in patients with graft versus host disease following hematopoietic stem cell transplantation. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 10: 133-137 (2002)
- [122] Wang SS, Cerhan JR, Hartge P, Davis S, Cozen W, Severson RK, Chatterjee N, Yeager M, Chanock SJ, Rothman N: Common genetic variants in proinflammatory and other immunoregulatory genes and risk for non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Res* 66: 9771-9780 (2006)
- [123] Wang SS, Cozen W, Cerhan JR, Colt JS, Morton LM, Engels EA, Davis S, Severson RK, Rothman N, Chanock SJ, Hartge P: Immune mechanisms in non-Hodgkin lymphoma: joint effects of the TNF G308A and IL10 T3575A polymorphisms with non-Hodgkin lymphoma risk factors. *Cancer Res* 67: 5042-5054 (2007)
- [124] Watanabe G, Umetsu K, Yuasa I, Sato M, Sakabe M, Naito E, Yamanouchi H, Suzuki T: A novel technique for detecting single nucleotide polymorphisms by analyzing consumed allele-specific primers. *Electrophoresis* 22: 418-420 (2001)
- [125] Watanabe G, Umetsu K, Yuasa I, Suzuki T: Amplified product length polymorphism (APLP): a novel strategy for genotyping the ABO blood group. *Hum Genet* 99: 34-37 (1997)

- [126] Wu Z, Gu JR: A meta-analysis on interleukin-1 gene cluster polymorphism and genetic susceptibility for ankylosing spondylitis. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 87: 433-437 (2007)
- [127] Ye F, Li MS, Taylor JD, Nguyen Q, Colton HM, Casey WM, Wagner M, Weiner MP, Chen J: Fluorescent microsphere-based readout technology for multiplexed human single nucleotide polymorphism analysis and bacterial identification. *Hum Mutat* 17: 305-316 (2001)
- [128] Yilmaz V, Demirbilek V, Gürses C, Yentür SP, Uysal S, Yapici Z, Yilmaz G, Muncey A, Cokar O, Onal E, Gökyiğit A, Saruhan-Direskeneli G: Interleukin (IL)-12, IL-2, interferon-gamma gene polymorphisms in subacute sclerosing panencephalitis patients. *J Neurovirol* 13: 410-415 (2007)
- [129] Zibar L, Wagner J, Pavlinić D, Galić J, Pasini J, Juras K, Barbić J: The relationship between interferon- γ gene polymorphism and acute kidney allograft rejection. *Scand J Immunol* 73: 319-324 (2011)

Internetquellen:

- [130] A water-soluble carbodiimide crosslinker for zero-length, carboxyl-to-amine conjugation - Thermo Scientific <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=02030312> (04.03.2007)
- [131] dbSNP Short Genetic Variations - National Center for Biotechnology <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp> (03.12.2011)
- [132] DNA Buffers - Luminex Corp <http://www.luminexcorp.com/prod/groups/public/documents/lmncorp/dna-buffer-list-protocol.pdf> (03.12.2011)

-
- [133] GeneFisher2 – Interactive PCR Primer Designe BiBi Serv – Bielefeld University Bioinformatics Server <http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher2/> (03.12.2011)
- [134] Multiplexe Analytik mit Bead-basierten Assays Fa. Progen, Technischer Service und Vertrieb, PROGEN Biotechnik GmbH Maaßstr. 30, 69123 Heidelberg http://media.progen.de/multiplex-technology/multiplex-analysis-bead-based-assays_de.pdf (24.02.2007)
- [135] Recommendations for Probe/Primer Design for Direct Hybridization of Nucleic Acids - Luminex Corp <http://www.luminexcorp.com/prod/groups/public/documents/lmncorp/probe-primer-design-direct-hyb.pdf> (14.04.2012)
- [136] Sample Protocol For Carbodiimide Coupling of Amine-Modified Oligonucleotides to Carboxylated Microspheres – Luminex Corp <http://www.luminexcorp.com/prod/groups/public/documents/lmncorp/oligonucleotide-coupling-proto.pdf> (03.12.2011)
- [137] Sample Protocol for Oligonucleotide Hybridization – Luminex Corp <http://www.luminexcorp.com/prod/groups/public/documents/lmncorp/oligonucleotide-hybridization.pdf> (03.12.2011)
- [138] SNP Genotyping – Effect of Mismatch Position and Type on Duplex Stability - Luminex Corp <http://www.luminexcorp.com/prod/groups/public/documents/lmncorp/snp-genotyping-effect-of-misma.pdf> (03.12.2011)

Danksagung

Zunächst möchte ich Prof. Dr. med. Schrezenmeier und PD Dr. med. Mytilineos dafür danken, mir diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht zu haben. Desweiteren danke ich allen Mitarbeitern der Abteilung Transplantationsgenetik für das Einarbeiten in die Thematik und die verwendeten Methoden. Nicht zuletzt hat das gesamte Team dazu beigetragen meine Motivation hoch zu halten, als Versuche mal nicht die gewünschten Ergebnisse lieferten. Besonders möchte ich an dieser Stelle Kerstin Buschle und André Skambraks hervorheben, die mir die Welt der Sequenzierung und des Luminex 100 IS zu Beginn meiner Arbeit näher gebracht und auch immer wieder mit Anregungen bei der Optimierung meiner Verfahrensweise unterstützt haben.

Selbstverständlich müssen auch Andrea Martindale, Dr. med. Eva Hennel und Dr. med. Kirsten Recker Erwähnung finden, die mir, ebenfalls als Doktoranden am Institut, zur Seite standen, mit mir Probleme gewälzt, Lösungen gesucht oder einfach für ein Gespräch zur Ablenkung zwischen zwei Arbeitsschritten bereit standen. Großen Dank an Kirsten dafür, dass sie es auf sich genommen hat, meine Arbeit Korrektur zu lesen und ihr damit den letzten Schliff gegeben hat.

Zuletzt danke ich noch meiner Familie und meinen Freunden, vor allem Dr. med. René Kaiser, die mich immer wieder zum Weitermachen ermuntert haben, als ich die Lust schon fast gänzlich verloren hatte.

Alle hatten einen maßgeblichen Anteil daran, dass diese Arbeit zu einem Abschluss kommen konnte. Daher nochmals...

DANKE.

Lebenslauf

Persönliche Informationen:

Jens Putzbach

Geboren am 29.06.1981 in Dohna, Sachsen

Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung:

1988 - 1992 135. Polytechnische Oberschule Dresden

1992 - 2000 Johann Andreas Schubert Gymnasium - Abschluss mit allgemeiner Hochschulreife

2001 - 2007 Studium der Humanmedizin Universität Ulm mit Approbation 2007

2005 - 2013 Institut für Transfusionsmedizin und Immunogenetik Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

Thema: Etablierung eines auf Luminex xMAP® Carboxybeadtechnologie basierenden Untersuchungsverfahrens, zum Einsatz in der Routinediagnostik von Zytokinpolymorphismen

Beruflicher Werdegang:

2001 Eintritt in die Bundeswehr als Sanitätsoffiziersanwärter
Militärische Vorausbildung bis zum Beginn des Studiums der Humanmedizin im Oktober 2001

2007 - 2010 Bundeswehrkrankenhaus Ulm - Assistenzarzt für Innere Medizin
Station Kardiologie, Aufnahmestation und Innere Intensivstation

2010 - 06/2013 Truppenarzt und stellvertretender Staffelchef der Sanitätsstaffel
Dillingen an der Donau

Seit 07/2013 Bundeswehrkrankenhaus Ulm - Assistenzarzt für Innere Medizin
Innere Intensivstation, Angiologie

Tätigkeiten im Ausland:

März bis Juli 2011 Einsatz als beweglicher Arzttrupp 25. Einsatzkontingent ISAF
im Rahmen des Bundeswehreinsatzes in Afghanistan

Zusätzliche Qualifikationen:

2010 Erwerb der Zusatzbezeichnung Notfallmedizin

2012 Fortbildung zum Hygienebeauftragten Arzt

2013 Fortbildung zum Ernährungsmediziner

Blaustein, den 26.06.2014

Ort und Datum

Unterschrift