

5. Ergebnisse und Ausblick

5.1 Ergebnisse der Arbeit

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen haben sowohl den Einsatz von Membranen als Medium zum Transfer von DNA in Trenngele ermöglicht als auch zu einem tieferen Verständnis der Wechselwirkungen zwischen Membranen und DNA beigetragen.

In der ersten Versuchsphase wurde die Durchführbarkeit der Methode anhand typischer Labormembranen gezeigt. Die besten Resultate wurden mit einer hydrophilen und ungeladenen Cellulose Mischester Membran erzielt. Es konnten auf einem 30 cm breiten Trenngel parallel 200 Spuren analysiert werden.

Für die weiteren Untersuchungen wurde, um Qualitätsschwankungen der Proben zu vermeiden, ein biologisches Testsystem, das aus fluoreszent markierten 50 und 100 Nukleotiden langen Oligomeren besteht, eingeführt. Mit diesem System wurde die Abhängigkeit der elektrophoretischen Auflösung und des integrierten Fluoreszenzsignals vom auf die Membran aufgetragenen Probenvolumen untersucht. Es zeigte sich, dass die elektrophoretische Auflösung für das kleinste Probenvolumen (0,1 µl) am besten ist. Das Ergebnis ist in Übereinstimmung mit der Theorie. Das integrierte Fluoreszenzsignal zeigt sein Optimum bei Probenvolumina zwischen 0,2 und 0,4 µl. Die relativ große Schwankungsbreite lässt sich auf Schwierigkeiten beim Pipettieren von 0,1 µl Probenlösung zurückführen.

Das neuentwickelte Protokoll zum gezielten Eindampfen großer Probenvolumina unter Ausnutzung der unterschiedlichen Flüchtigkeiten der Einzelkomponenten der Probe erlaubt die reproduzierbare Herstellung kleiner Volumina zwischen 0,1 und 0,2 µl.

In einer ersten Testreihe zeigten sich bereits beträchtliche Unterschiede in der elektrophoretischen Auflösung verschiedener Membrantypen, die sich nur auf deren unterschiedliche chemische Zusammensetzung zurückführen ließen. Deshalb wurde eine Vielzahl unterschiedlicher Membrantypen auf durch Verunreinigungen verursachte Untergrundänderungen, die elektrophoretische Auflösung und das integrierte Fluoreszenzsignal untersucht. Da die in dieser Arbeit vorgestellte Anwendung von Membranen eher zwischen den herkömmlichen Anwendungsgebieten der Chromatographie und Filtrierung liegt, wurden keine Vorgaben an die Auswahl der

Typen gemacht. Bei diesen Untersuchungen zeigte eine auf Polyethersulfon basierende Membran die besten Resultate.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde das integrierte Fluoreszenzsignal und die elektrophoretische Auflösung in Abhängigkeit von der Stärke des elektrischen Transferfeldes bei konstantem Produkt aus elektrischer Feldstärke und Wirkungszeit gemessen.

1) Es zeigte sich, dass eine Membran mit positiver Oberflächenladung keine DNA in das Gel abgibt. Das heißt, dass die Summe aus den Adsorptionskräften und der Coulomb-Kraft bei den hier verwendeten elektrischen Feldstärken (10-45 V/cm) nicht überwunden werden kann.

2) Die DNA-Mengenabgabe in das Gel der nach außen elektrisch neutralen Membranen liegt zwischen den Werten der Membran mit positiver Oberflächenladung und der Membran mit negativer Oberflächenladung. Das heißt, die verwendeten elektrischen Feldstärken sind bereits bei einigen DNA-Molekülen ausreichend, die mit dem Abstand von der Membranoberfläche sehr schnell abfallenden Adsorptionskräfte zu überwinden.

3) Eine Membran mit negativen Oberflächenladungen gab am meisten DNA in das Gel ab. Das heißt, die Adsorptionskräfte können durch die Summe aus der abstoßenden Coulomb-Kraft und den verwendeten elektrischen Feldkräften von sehr vielen DNA-Molekülen überwunden werden. Leider zeigte diese Membran eine sehr schlechte elektrophoretische Auflösung, was wahrscheinlich auf ein ungerichtetes Austreten der DNA-Moleküle aus der Membran, vor dem Einschalten des elektrischen Transferfeldes, zurückzuführen ist.

Das elektrische Feld im Bereich der Eintrittsphase der DNA-Moleküle aus der Membran in das Gel wurde mit dem Programm Quick Field der Firma "Tera Analysis" simuliert. Dieses Programm berechnet nach Vorgabe der Randbedingungen die elektrischen Feldlinien des jeweiligen Problems mit der Methode der finiten Differenzen. Theoretische Überlegungen haben gezeigt, dass Membranen mit gefrästen „Zähnen“ eine bessere horizontale Auflösung erreichen sollten, als durchgehende Membranstreifen. Diese Voraussage ließ sich experimentell bestätigen.

Mit der Entwicklung eines computergesteuerten Roboters, der das Auftragen der DNA-Lösung aus der Probenaufbereitungsvorrichtung auf die Membranzähne ermöglicht wurde die Automatisierung dieser neuartigen Methode abgerundet.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Resultate ermöglichten die Sequenz-Analyse von 75 Klonen (300 Spuren), bei einer aktiven Gelbreite von 30 cm. Die Pixelbreite der Photodioden beträgt 0,2 mm.

Die Übertragbarkeit der Methode auf das Sequenzier-System ABI PRISM 377 der Firma "Applied Biosystems" (Foster City, CA) wurde in Zusammenarbeit mit dem Sanger-Center in Cambridge gezeigt.

5.2 Ausblick auf weitere Einsatzmöglichkeiten von Membranen in der Genom- und Funktionsanalyse

Aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Resultate sind weitere Einsatzgebiete von Membranen denkbar. Ohne Anspruch auf Vollständigkeit sind vor allem zu nennen:

- Der verstärkte Einsatz von Membranen in der heute hauptsächlich auf Glas und Plastik stattfindenden „Micro-Array“ Analyse.
- Die Anwendung von Membranen, in der im nächsten Abschnitt näher besprochenen Technik der Sequenzierung durch Hybridisierung und der „Nanoporen“-Sequenzierung.
- Der Einsatz von Membranen sowohl als Probenvorbereitungsort als auch als Trennmedium (Mikrokanäle oder Nanokanäle).

5.3 Ausblick auf alternative DNA-Sequenzierungstechniken

Im Folgenden wird ein Überblick über alternative DNA-Sequenzierungstechniken und deren zukünftiges Potential gegeben:

Sequenzierung durch Hybridisierung (SBH)

Bei diesem Verfahren wird die spezifische Hybridisierung einer großen Zahl von Oligonukleotiden (6-10 Basen lang) bekannter Sequenz an die Ziel-DNA ausgenutzt. Beim ersten Typ werden Oligonukleotide an unterschiedliche Stellen einer festen Phase gebunden. Die markierten Zielmoleküle befinden sich im Hybridisierungsgemisch.

Beim zweiten Typ wird die Ziel-DNA auf der festen Phase immobilisiert. Die markierten Oligomere befinden sich in der Hybridisierungslösung.

Um einen neue Sequenz abbilden zu können müssen für ein 8-Mer, 65536 (4^8) unterschiedliche Oligomere vorliegen. Da Fehlhybridisierungen sehr schwer zu unterdrücken sind, macht sich deren Untergrund störend bemerkbar.

Mikrokanal-Sequenzierung

Mikrokanäle werden auf einer Platte durch Photolithographie und anschließender Verschmelzung mit einer Deckplatte hergestellt. Die bisher erreichbare Elektrophoresegeschwindigkeit liegt bei 700 Basen in 2,5 Stunden. Ein 16 x 11 cm großes 48-Kanal DNA-Sequenzierungssystem befindet sich bereits im Einsatz.

Pyrosequenzierung

Pyrosequenzierung ist eine neuartige Methode, die das Zusammenspiel von vier Enzymen in einem Reaktionsröhrchen vereint. Die Enzyme sind DNA-Polymerase, Luciferase, Apyrase und ATP-Sulfurylase. Bei der spezifischen Inkorporation einer Base und der damit einher gehenden Abspaltung von Pyrophosphat werden Photonen erzeugt. Die Desoxytrinukleotide A, C, G und T werden nacheinander zur einzelsträngigen Matrize und dem Primer zugegeben. Nur der Einbau der zur Sequenz der Matrize komplementären Base erzeugt Licht. Die nicht eingebauten Nukleotide werden durch die Apyrase inaktiviert. Bei Komplementarität wird die Base allerdings durch die DNA-Polymerase eingebaut. Das dadurch freiwerdende Pyrophosphat erzeugt im Verbund mit den Enzymen ATP-Sulfurylase und Luciferase sichtbares Licht. Dieses Verfahren lässt sich einfach automatisieren und ist ideal für die diagnostische Sequenzierung.

Massenspektroskopie

Mit dieser Technik wird das Molekulargewicht direkt gemessen. Der Vorgang dauert für 60 Nukleotide weniger als eine Minute. Diese 60 Nukleotide sind bis heute die Grenze der verlässlichen Sequenzbestimmung mittels Massenspektroskopie. Bei größeren Molekülen nimmt die Fragmentation der Moleküle so stark zu, dass das Molekulargewicht nicht mehr verlässlich zugewiesen werden kann.

Rastertunnelmikroskopie

Die Sequenzierung soll über Erkennung der DNA-Basentopographie geschehen. Bisher kann die DNA mit einer Ortsauflösung von 20 nm direkt sichtbar gemacht werden. Diese Auflösung reicht allerdings noch nicht aus, einzelne Basen zu unterscheiden.

Nanoporen

Experimente wurden durchgeführt, die zeigen sollten, ob Poren mit Porengrößen im Nanometer Bereich, die zwischen zwei wässrigen Kompartimenten eingelagert sind, unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes Nukleinsäure-Anionen transportieren

können. Es wurde festgestellt, dass das Eintauchen von einzelsträngiger DNA in die Poren zu einer vorübergehenden Blockade des Ionenstroms in der Pore führt. Die Blockade geschieht wegen des Transports der Nukleinsäure durch die Poren und ist in Korrelation mit der Länge und der Konzentration der DNA (Kasianowicz et al. 1996). Falls dieses System in der Einzelmolekül-Detektion einsetzbar wäre, wäre es eine extrem schnelle und kostengünstige Methode.

5.4 Abschlussbemerkungen

Wir befinden uns in dem Entwicklungsstadium, in welchem die Genom-Sequenzierung, Mikroarray-Technologien und „Proteomics“ ein tiefes Verständnis der Regulierung der Gene versprechen. Allerdings folgte der ersten Begeisterung über die Sequenzierung des menschlichen Genoms bereits die - zumindest teilweise - Ernüchterung. So wird die Niederlage der Theorie des genetischen Determinismus immer deutlicher.

Ein sehr großer Beitrag zur Erkenntnis des Zusammenspiels der Gene wird von den Untersuchungen der funktionellen nuklearen Architektur erwartet (T. Cremer & C. Cremer, 2001). Man kann heute davon ausgehen, dass Chromosomen in diskrete Territorien unterteilt sind. Der Ort eines Gens in einem Chromosomenterritorium scheint Einfluss auf die Transkription und das „Splicing“ zu besitzen.

Bei allem Forscherdrang sollte aber nicht vergessen werden, dass immer die Natur im Mittelpunkt aller Anstrengungen steht.