

Ines-Christine Andrea Kanter

Dr.med.

**Entwicklung einer Methode zur molekularen Haplotypisierung:
allelspezifische Bestimmung von Mutationen und genetischen Markern im PAH-Gen**

Geboren am 22.11.1979 in Heidelberg

Staatsexamen am 19.06.2006 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Humangenetik

Doktorvater: Prof. Dr. Dr. med. Johannes Zschocke

Etwa 0,1 % des menschlichen Genoms ist variabel, d.h. die Nukleotidsequenz an derselben Position unterscheidet sich bei zwei unterschiedlichen Personen. Die häufigsten Varianten sind Einzelnukleotidpolymorphismen (single nucleotide polymorphisms, SNPs) die in der Regel in 2 Varianten (biallelisch) vorkommen. Für ihre Typisierung stehen zahlreiche Methoden zur Verfügung. Meist haben solche Polymorphismen keine funktionelle Relevanz, sie lassen sich jedoch für die Kennzeichnung der jeweiligen Chromosomenstränge bzw. assoziierter Mutationen verwenden. Da die Variabilität eines biallelischen Markers begrenzt ist, bietet es sich an, die physikalisch nebeneinander auf demselben Chromosomenstrang (*in cis*) liegenden Varianten zu *Haplotypen* zu kombinieren. Haplotypen lassen sich in ihrer Gesamtheit wie polymorphe Marker verwenden und werden unverändert von Generation zu Generation weitergegeben, solange keine Rekombination stattfindet. Die genaue Charakterisierung von Haplotypen ist allerdings bei den menschlichen Autosomen problematisch, da die Chromosomen jeweils paarweise vorliegen, und gelingt in der Regel nur durch Untersuchung von mehreren Familienangehörigen. Die Haplotypisierung einer Einzelprobe ist technisch schwierig, da eine allelspezifische Zuordnung von heterozygot nachgewiesenen Allelen in der Regel nicht möglich ist.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode zur molekularen Haplotypisierung von SNPs etabliert. Als Modell wurden gut charakterisierte biallelische Polymorphismen im *PAH*-Gen ausgewählt. Es handelt sich um stumme Mutationen, RFLPs und andere SNPs, die sowohl in Exons als auch in Introns liegen. Der erste Schritt der neu entwickelten Methode ist

die Typisierung von SNPs mittels fluoreszenzmarkierter PCR auf Homo- bzw. Heterozygotie. Anschließend werden ausgehend von heterozygot vorliegenden SNPs die beiden unterschiedlichen Chromosomenstränge über eine allelspezifische long-range PCR aufgetrennt. Dabei können genomische Strecken von mindestens 16.000 Nukleotiden (16 Kilobasen) überspannt werden. Im dritten Schritt werden die ursprünglich heterozygot vorliegenden SNPs auf den beiden einzelnen Chromosomensträngen getrennt mittels fluoreszenzmarkierter PCR typisiert. Aus den Ergebnissen lassen sich die auf den beiden Chromosomensträngen jeweils vorliegenden Haplotypen einfach ableiten. Die Zuverlässigkeit der entwickelten Methodik wurde über einen Vergleich mit den Ergebnissen bei Familien mit mehreren typisierten Angehörigen überprüft. Dadurch wurde eine angemessene Validierung der neuen Methode gewährleistet.

Es steht nun eine neue, schnelle und kostengünstige Methode der molekularen Haplotypisierung zur Verfügung. Der Ansatz ermöglicht eine effiziente Untersuchung auch einer großen Zahl von Proben. Durch die individuell veränderbare Auswahl der SNPs sowie die Möglichkeit, einen relativ großen Genabschnitt unabhängig von den Abständen zwischen den untersuchten SNPs bzw. von der Zahl der typisierten Marker zu haplotypisieren, ist eine Adaptation an unterschiedliche experimentelle Anforderungen leicht möglich. Die Identifikation von Haplotypen ist für eine Reihe von Anwendungen relevant. So kann aus der Assoziation einer bestimmten Krankheit mit einem bestimmten Haplotyp an einem Locus bei betroffenen Individuen ggf. auf das krankheitsrelevante Allel zurückgeschlossen werden, auch wenn die eigentlich krankheitsverursachende Mutation unbekannt ist. Von Interesse ist auch eine populationsgenetische Anwendung: durch die Charakterisierung von unterschiedlichen Haplotypen in Kombination mit krankheitsrelevanten Mutationen in genomischen Abschnitten, die nur gering von Rekombination betroffen sind, können einzelne Allele ggf. über viele Generationen hinweg verfolgt werden. So lassen sich u.a. die Migrationsbewegungen einzelner Völker nachvollziehen.