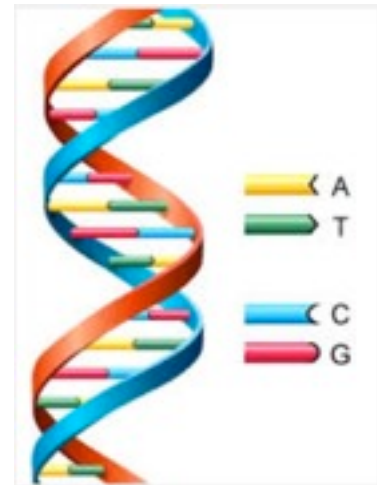


Zusammenfassung ProScientia Referat: Revolution in der DNA Sequenzierung gehalten von Joachim Krysl am 19.3.2013

In jeder tierischen und pflanzlichen Zelle befindet sich DNA (Desoxyribonucleinsäure). Die Gesamtheit der DNA wird Genom genannt und ist der Träger der Erbinformation und konserviert die Zellidentität. In anderen Worten: Sie sorgt bei der Zellteilung dafür dass aus einer gesunden Zelle einer Spezies zwei gesunde Tochterzellen derselben Spezies hervorgehen und regelt dass sich eine Leberzelle wie eine Leberzelle verhält und eine Muskelzelle wie eine Muskelzelle.

Dieses polymere Makromolekül besteht aus vier Bausteinen den vier Nukleotiden: Adenosin, Thymin, Guanosin und Cytosin. Das sind Purin/Pyrimidin Basen N-glycosidisch an einen Desoxyribosephosphatrest verbunden. Diese vier Bausteine werden miteinander zu einer Abfolge verknüpft die für Proteinsequenzen codiert. Es entsteht ein linearer Strang. In der Natur bildet die DNA Doppelstränge aus. Dabei bilden die vier Basen zwei Paare. Adenosin hält über 2 Wasserstoffbrücken mit Thymin, Cytosin mit 3 Wasserstoffbrücken mit Guanosin zusammen. So ergibt sich dass die entstehenden Stränge gegenläufig sind: zu einem AATTGCCG Strang passt ein TTAACGGC Strang. Dies dient zur Steigerung der Stabilität und es unterstützt die Konservierung der Sequenz.



Beim Menschen hat der gesamte genomische Code eine Länge von 3 Milliarden Basen. Diese verteilen sich auf 46 Chromosomen. 23 davon hat ein Kind vom Spermium und 23 von der Eizelle erhalten. Das Genom der Eltern jeweils besteht zur Hälfte aus großväterlichen und großmütterlichen Anteilen. Man beachte: Das eigene Genom setzt sich zu je 25% aus den Genomen der Großeltern (Oma Opa)väterlicher und (Oma Opa)mütterlicher Seits zusammen. So wird deutlich dass sich Merkmale (Aussehen, Eigenschaften, Krankheiten) eines Großelternteils (Generation -1) in der Enkelgeneration (2. Generation) wieder manifestieren können.

Vor 1970 war es nicht möglich den die Basenabfolge auszulesen = den genetischen Code zu sequenzieren. In den 80er Jahren entwickelten zwei amerikanische Forscher (Maxam und Gilbert) die erste Methode. Diese war aber schwer zu automatisieren und es setzte sich die parallel dazu entwickelte Methode von Frederick Sanger (britischer Forscher), die Kettenabbruchmethode durch. Dafür bekam er 1980 den Nobelpreis für Chemie verliehen. In den darauffolgenden Jahrzehnten wurde die Kettenabbruchmethode optimiert und vereinfacht ehe die technologische Revolution die Sequenzierung der 2. Generation hervorbrachte.

Um ein Genom zu sequenzieren bedient man sich der „Shot Gun“ Strategie. Man fragmentiert das Genom mithilfe von Schneideenzymen und trennt die Fragmente auf. Jedes wird nun für sich sequenziert und die Bruchstücksequenzen anhand von Sequenzüberlappungen über Software-Alignment wieder zu einer genomisch Sequenz zusammengesetzt.

Prinzip der Kettenabbruchmethode:

In einer enzymatischen Reaktion lässt man den Gegenstrang am einsträngigen Template Strang polymerisieren. Als Substrat verwendet man die vier Desoxynukleotide (dATP,

dTTP, dGTP, dCTP) und setzt in vier Ansätzen je ein Didesoxynukleotid (ddTTP/ddATP/ddGTP/ddCTP) im Unschuss zu. Wird bei der Synthese des Gegenstranges nun ein Didesoxynukleotid eingebaut bricht die Synthese ab da eine essentielle Hydroxygruppe für die weitere Synthese fehlt. So entstehen verschieden lange Gegenstränge je nachdem wann ein Didesoxynukleotid eingebaut wurde. Über eine Gelelektrophorese werden diese Einzelstrangfragmente der Größe nach aufgetrennt. Über die Länge der einzelnen Fragmente lassen sich die Positionen der eingebauten Didesoxynukleotide bestimmen. Im ersten Ansatz also beispielsweise alle Positionen der ddTTPs, im zweiten aller ddATPs, im dritten aller ddGTPs und im vierten aller ddCTPs. Nun hat man Tausende Fragmente mit unterschiedlichen Längen wobei in allen vier Ansätzen unterschiedliche Längen entstehen.

Im Idealfall entstehen beim ersten Sequenziersuch alle möglichen Fragmentgrößen. Bei einer Templategröße von 100 Basen sollten 100 Fragmente mit den Längen 1-100 entstehen um alle Positionen ermitteln zu können.

Oftmals braucht es aber einen zweiten oder dritten Versuch bis alle Fragmente erzielt werden.

Mit dieser Methode wurde das Humane Genom mit 200 Forschern in 5 Jahren erstmals durchsequenziert und alignet.

Das Prinzip ließ sich aufgrund der vielen Arbeitsschritte auch nicht so automatisieren wie es für heute Standard ist.

In den Jahren zwischen 1990 - 2000 wurden mehrere neue Ansätze zur automatischen Genomsequenzierung von unterschiedlichen Unternehmen entwickelt und optimiert. Hier seien neben der unten beschriebenen Pyrosequenzierung von ROCHE die Methoden „Sequenzierung via Ligation“ und „Solexa“ von der Firma Illumina als wegweisend zu nennen.

Mit diesen drei Methoden ist es nun möglich Genome binnen Wochen bei geringerem Material- und Personalaufwand zu sequenzieren.

Prinzip der 454 Pyrosequenzierung:

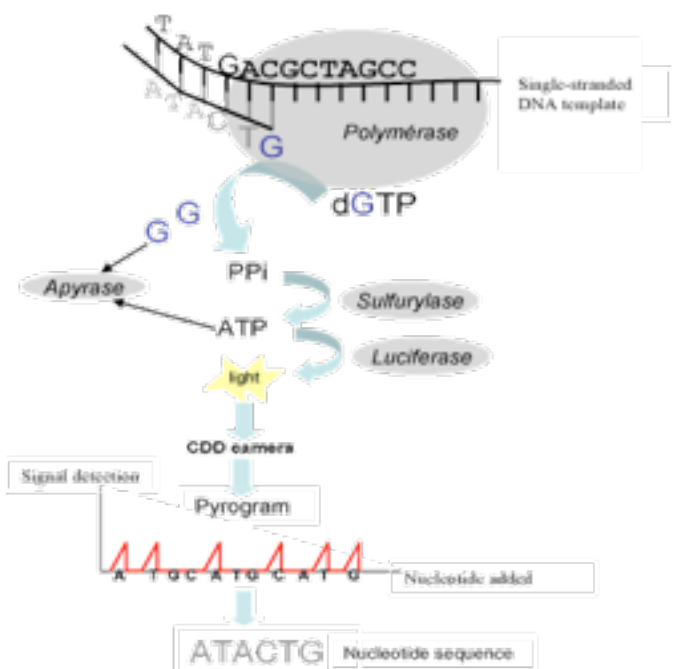
Detektiert wird das Lichtsignal welches erzeugt wird wenn ein gewisses Nukleotid in den entstehenden Doppelstrang eingebaut wird. Dies ist nur möglich da die zeitliche Auflösung der Detektoren heutzutage im Nanosekunden Bereich liegt. In winzigen Reaktionskammern befinden sich viele Hundert Kopien die einsträngigen Template DNA Moleküle mit einer Länge von einigen 100 Basen. Zusätzlich liegen vier Enzyme in jeder Kammer vor:

DNA Polymerase: Sie vermag es einzeln hinzugegebene Nukleotide einzubauen

Sulfurylase: Sie kann Diphosphat welches beim Einbau eines Nukleotides übrig bleibt in das Substrat APS einzubauen und so ATP generieren.

Luciferase: ist ein Enzym welches mit Hilfe von ATP eine chemolumineszente Reaktion katalysieren kann.

Apyrase: Unterstützt die Luciferasereaktion indem es ADP weiterspaltet zu AMP und Phosphat.



Die Ermittlung der einzelnen Positionen erfolgt über ein zyklisches Reaktionsschema: Nacheinander werden die vier Basen in die Reaktionskammern gespült. Wenn der angebotene Baustein nicht passt - passiert nichts und der Baustein wird vor dem Einspülen des nächsten Bausteines wieder ausgespült. Wenn der Baustein (zB: dATP) eingebaut - entsteht ein Pyrophosphat. Dieses wird von der Sulfurylase mit APS in ein ATP überführt. Das ATP ermöglicht die Luciferase Reaktion und es entsteht ein Lichtblitz welcher von einer Detektoreinheit detektiert wird. Anhand der Zeitpunkte der Lichtblitze ist bekannt welches Nukleotid eingebaut wurde und somit auch die Sequenz des Templatestranges.