

## Schlußbericht

**Zuwendungsempfänger:** Institut für Klinische Molekularbiologie (IKMB),  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel,  
Schittenhelmstr. 12, 24105 Kiel

**Förderkennzeichen:** 0313867B

**Vorhabensbezeichnung:** „BioChancePlus-3: Neue Werkzeuge und  
Anwendungen für die funktionelle Genom- und  
Proteomforschung durch die zielgerichtete  
Applizierung von Kleinstflüssigkeitsmengen;  
Teilprojekt 2“

**Laufzeit des Vorhabens:** 1.12.2006 bis 30.11.2008

**Berichtszeitpunkt:** 31.05.2009

### I. Kurze Darstellung zu

#### 1. Aufgabenstellung

Entwicklung und Etablierung neuer Technologien und Applikationen im Bereich der nanoliterbasierten PCR/RT-PCR, der zellbasierten Arraysystemen und der Methodik zur Probenvorbereitung für die Ultra-Hochdurchsatzsequenzierung (Abk.: UHS, engl.: „next generation sequencing“).

#### 2. Voraussetzungen

Piezo Plattformtechnologie (Sciencion), Hochdurchsatzgenotypisierungsplattform (IKMB), Plattform für UHS (IKMB, MPI-MG)

#### 3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Die Abarbeitung der im Antrag definierten Arbeitspakete erfolgte zeitlich analog dem im Antrag aufgestellten Arbeitsplan. Die Arbeitspakete als solche wurden z. T. abgewandelt bzw. den Entwicklungen im Technologie-sektor angepasst. So wurde das Teilprojekt „Glycan microarrays“ zu Gunsten einer neuen Aufgabenstellung aus dem Bereich UHS zurückgestellt.

#### 4. wissenschaftlichem und technischem Stand, an den angeknüpft wurde

Die Arbeiten beruhten zu einem wesentlichen Teil auf der technologischen

Plattform der Fa. SCIENION, die im Schlussbericht der Firma separat dargelegt ist. Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit humaner Patientenproben und der möglichen Kosteneffizienzsteigerung sollte der Frage nachgegangen werden, inwieweit Schlüsseltechnologien der translationalen Forschung (Genotypisierung, Biomarkerentwicklung, zelluläre Assays) miniaturisierbar im Nanolitermassstab darstellbar sind. Während der Antragsperiode ergab sich eine Refokussierung auf neue ultraschnelle Sequenzierung. Hier wurden Methoden der Anreicherung bestimmter DNA-Abschnitte und die Transkriptomsequenzierung durch das IKMB bearbeitet bzw. vorbereitete Proben/Bibliotheken an SCIENION gegeben.

#### **5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen**

Scienion AG (Berlin), Max-Planck-Institut für molekulare Genetik (Berlin)

## **II. Eingehende Darstellung**

### **1. der Verwendung der Zuwendung**

Die Entschlüsselung des humanen Genoms und die Möglichkeit SNP-basierte genomweite Assoziationsstudien (GWAS) zeit- und kosteneffizient in großen Patientenkohorten durchzuführen haben eine entscheidende Rolle gespielt, dass für polygene, komplexe Erkrankungen („Volkserkrankungen“) eine Vielzahl von Risikoloci identifiziert werden konnten.

In den vergangenen Jahren haben wir uns an der Erstellung derartiger molekularer Risikokarten beteiligt. Hierbei lag ein besonderer Fokus der Arbeitsgruppe auf entzündlichen Erkrankungen von Barriereorganen (Darm: chronisch-entzündliche Darmerkrankungen; Haut: Atopische Dermatitis, Psoriasis und Lunge: Sarkoidose). Die Gründung eines deutschen Konsortiums zur Durchführung von GWAS hat die Voraussetzungen geschaffen, Barriereerkrankungen jeweils für sich selbst aber auch als übergreifendes Phänomen zu untersuchen. Zentrale

Elemente sind auch die gemeinsam genutzten Kontrollpopulationen (popgen aus Schleswig-Holstein), an denen jeweils eine Million aus Einzelbasenpolymorphismen („SNPs“) basierende Genotypen pro Individuum erhoben wurde (Affymetrix SNP 6.0). Für jede Erkrankung wurden 500 - 1.300 Fälle typisiert.

In einer typischen genomweiten Assoziationsstudie werden auf diese Weise 200 - 500 assoziierte Polymorphismen identifiziert. Zur Verifikation und weiteren Aufarbeitung der Befunde sind mehrere Schritte notwendig, die derzeit im nicht miniaturisierten Maßstab ablaufen. Ein großes benötigtes Ausgangsvolumen in einer Reaktion stellt mehrere Anforderungen: (1) große Lagerkapazität, die eine gleichbleibende Qualität der Proben gewährleistet (Umfang der Biobank), und (2) große Mengen an Ausgangsprobenmaterial, welches bei Patientenproben (z.B. Gewebebiopsien) häufig nicht in hinreichender Menge und Zahl zur Verfügung gestellt werden kann.

Mehrere Schlüsseltechnologien werden im „follow-up“ einer GWAS verwendet.

- (1) Die in einer ersten Kohorte aufgestellten Befunde müssen in zu mindestens einer weiteren größeren Kohorte bestätigt werden. Dieses erfolgt typischerweise über nicht chip-basierte Typisierungstechnologien (z.B. SNPlex oder Taqman). In dem abgearbeiteten Projekt wurde der Grundstein gelegt, solche Arbeiten in Folgestudien in Nanolitermaßstab durchzuführen. Eine genaue Beschreibung findet sich im Appendix.
- (2) Bei den meisten genetischen Assoziationsbefunden stellt sich die Frage nach einem vollständigen Katalog der Sequenzvarianten in den identifizierten und replizierten Genen. Hierfür ist der bestehende Zugang zu entsprechenden Sequenzieretechnologien unerlässlich. Die genetische Ätiologie polygen-bedingter Krankheiten basiert in vielen Fällen nicht auf einzelnen Varianten sondern auf einem Spektrum seltener Mutationen. Die Aufklärung von Mutationsspektren anstelle

von Einzelmutationen ist für das Verständnis von Krankheiten aber auch zur Absicherung der IP-Position von Wichtigkeit. Dazu muss eine Hochdurchsatzsequenzierung auch von großen Genen (idealerweise Promotorregionen, Introns und Exons) in vielen Hundert Individuen mit einem bestimmten Phänotyp erfolgen und gegen Kontrollen verglichen werden. Hierzu muss die Komplexität der DNA durch Anreicherungsstrategien reduziert werden. Wir haben in der vergangenen Förderperiode intensiv den Einsatz von unterschiedlichen Oligonukleotidarrays als Basis für eine Sequenzierung auf dem SOLiD System untersucht. Leider kam es hierbei sowohl bei der Verwendung der sehr kurzen Oligos, die bei den fotoaktivierten Oberflächen der Affymetrix Chips verwandt werden, als auch bei den Customarrays der FA. SCIENION mit längeren PCR Produkten als Hybridisierungspartner zu keinen vielversprechenden Ergebnissen (siehe Anhang). Ein weiterer Ansatz der Nachverfolgung der Befunde ist die Sequenzierung der Patiententranskriptome, i.e. der umfassenden und quantitativen Sequenzierung der transkribierten Abschnitte des Genoms. Hier haben wir gemeinsam mit SCIENION an der Miniaturisierung und Reduktion der Ausgangsmengen der verwendeten RNA gearbeitet, so dass in Folgestudien die theoretische Sequenzierung einzelner Zellen „Single-cell-sequencing“ möglich geworden ist.

- (3) Zur näheren Charakterisierung von Risikogenen und ihren Transkripten muss die Untersuchung der Funktion der jeweiligen kodierten Proteine erfolgen, um die Befunde in ein molekulares Verständnis von Pathophysiologie zu übersetzen. Gemeinsam mit dem MPI-MG und der Fa. Scienion wurde hier initial an einer Lösung zur Miniaturisierung von zellbasierten Assays zur systematischen Kartierung von Signaltransduktionswegen (2pathwas mapping“ ) gearbeitet. Das IKMB stellte hierbei initial die Optimierung der Transfektion von mikroRNA und siRNA Bibliotheken in humanen Zelllinien in kleinen Volumina sicher. Weiterhin wurden die in der Promoterresource des NGFN vom MPI und IKMB gemeinsam erstellten Reporterkonstrukte verwandt, um

systematisch die Co-transfektion von siRNA und Plasmiden zu verbessern.

**2. der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises**

Kosten siehe separate Aufstellung. Die Personal- und Materialkosten wurden entsprechend des Antrages eingesetzt.

**3. der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit**

Die geleistete Arbeit bildete eine wichtige Grundlage für das Erreichen der bei Antragstellung formulierten Ziele. Weiterhin konnten die technischen Grundlagen für Applikationen im Bereich der Nanoliter-PCR und der UHS gelegt werden. Im Anhang werden einige Ergebnisse diesbezüglich näher erörtert.

**4. des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans**

Im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans ist der Nutzen der erzielten Ergebnisse wie folgt zu bewerten:

1. Beitrag zur Kostenreduktion und Durchsatzerhöhung im Bereich der Hochdurchsatzgenotypisierung
2. Initiierung von Folgestudien zur Anwendung zellbasierter Arraysysteme.
3. Steigerung der Effizienz und Validität von UHS-Experimenten durch gezielte DNA-Anreicherung

**5. des während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen**

Während der Entwicklung der TaqMan Nanoliter Plattform kamen Firmen mit ähnlichen Produkten auf den Markt, z.B. die Firma BioTrove (Woburn, MA, USA) mit dem OpenArray System. Beim OpenArray System können zum derzeitigen Stand der Technik PCR-basierte Endpunkt Analysen von 16 bis 256 TaqMan Assays durchgeführt werden. Diese Technologie wurde