

Bestimmung des
MDR1 (Multidrug resistance 1)-Genstatus beim Hund
mittels allel-spezifischer PCR und allel-spezifischer Loop-
mediated Isothermal Amplification (LAMP)

von Cathrin Petra Stiedl

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Bestimmung des
MDR1 (Multidrug resistance 1)-Genstatus beim Hund
mittels allel-spezifischer PCR und allel-spezifischer Loop-
mediated Isothermal Amplification (LAMP)

von Cathrin Petra Stiedl

aus Sindelfingen

München 2017

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Medizinische Kleintierklinik

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Priv.-Doz. Dr. Karin Weber

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, PhD

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Karin Weber

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

Tag der Promotion: 29. Juli 2017

meinen lieben Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Multidrug resistance 1 (MDR1)-Gen und P-Glykoprotein (P-Gp)	3
1.1.	Der MDR1-Gendefekt beim Tier	4
1.1.1.	Der MDR1-Gendefekt bei der Maus	4
1.1.2.	Der MDR1-Gendefekt beim Hund	5
1.1.2.1.	Klinische Bedeutung des MDR1-Gendefekts bei Therapie mit P-Gp-Substraten	6
1.1.2.2.	Rasseprädispositionen für den MDR1-Gendefekt	8
1.2.	Nachweismethoden des MDR1-Gendefekts beim Hund	9
2.	Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)	11
2.1.	Detektions- und Visualisierungsmöglichkeiten der LAMP-Reaktion	16
2.1.1.	Direkte Methoden zum Nachweis der Amplifikationsreaktion	16
2.1.2.	Indirekte Methoden zum Nachweis der Amplifikationsreaktion	18
2.2.	Einsatz in der Diagnostik	20
III.	PUBLIKATION	22
IV.	DISKUSSION	39
1.	Probensammlung und -bearbeitung	40
1.1.	Probenentnahme	40
1.2.	Lagerung von Tupferproben und Extrakten	41
1.3.	Extraktionsmethoden	42
2.	Allel-spezifische Amplifikationsmethoden für den MDR1-Nachweis	43
2.1.	Allel-spezifische PCR als Nachweismethode	43
2.2.	Allel-spezifische LAMP als Nachweismethode	44
3.	Ergebnisdarstellung der allel-spezifischen Nachweis-methoden für den MDR1-Gendefekt	48
3.1.	Ergebnisdarstellung bei der allel-spezifischen PCR	48
3.2.	Ergebnisdarstellung bei der allel-spezifischen LAMP	49
V.	ZUSAMMENFASSUNG	53

VI.	SUMMARY	55
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	56
VIII.	ANHANG	67
1.	Abbildungsverzeichnis	67
2.	Tabellenverzeichnis	68
IX.	DANKSAGUNG	69

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
ABC	ATP-binding-Cassette
AS-LAMP	Allel-spezifische LAMP
AS-PCR	Allel-spezifische PCR
ATP	Adenosintriphosphat
B3	Backward Outer Primer
BIP	Backward Internal Primer
Bst	Bacillus stearothermophilus
C	Cytosin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
F3	Forward Outer Primer
FIP	Forward Internal Primer
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G	Guanin
GABA	γ -Aminobuttersäure
ggf.	Gegebenenfalls
HNB	Hydroxynaphtolblau
inkl.	Inklusive
kcal	Kilokalorien
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
LAMP	Loop-mediated Isothermal Amplification
LP	Längenpolymorphismus
MDR	Multidrug resistance
Me	Metall
Mg	Magnesium
mg	Milligramm
Mn	Mangan
mRNA	Messenger-RNA

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
P-Gp	P-Glykoprotein
POC	Point-of-Care
RNA	Ribonukleinsäure
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus
T	Thymin
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UV	Ultraviolett

I. EINLEITUNG

Der Multidrug resistance 1 (MDR1)-Gendefekt stellt eine Mutation dar, welche beim Hund durch den Verlust von vier Basenpaaren im vierten Exon des MDR1-Gens gekennzeichnet ist (MEALEY et al., 2001). Einige Hunderassen und Mischlinge, vor allem Collies und andere Hütehunde, sind von dieser autosomal rezessiv vererbten Mutation bis zu 52 % homozygot betroffen (TAPPIN et al., 2012). Sie können kein funktionierendes P-Glykoprotein (P-Gp) bilden, welches als Wirkstofftransporter in der Blut-Hirn-Schranke die Anreicherung von Arzneimitteln in neuronalem Gewebe verhindert. So entsteht eine Unverträglichkeit und Überreaktion auf in der Veterinärmedizin häufig verwendete Arzneimittel wie Ivermectin. Es treten vor allem neurologische Symptome wie Ataxie, Bewusstlosigkeit und Krämpfe auf. Bei schwerer Intoxikation kommt es zu Koma und Tod des Tieres (PULLIAM et al., 1985; MEALEY et al., 2001).

In den Zuchtverbänden stark betroffener Rassen werden MDR1-Gentests als Voraussetzung für die Zuchtzulassung häufig schon bei den Welpen durchgeführt. Bei anderen Hunden wie Mischlingen geben erst Reaktionen auf ein Medikament Hinweise auf den Gendefekt.

Bei Hunden mit neurologischen Symptomen unklarer Ätiologie ist eine unverzügliche Diagnosestellung wichtig, um die Therapie anzupassen und eine Prognose stellen zu können. Um als Veterinärmediziner einschätzen zu können, ob einem Patienten das Arzneimittel der Wahl verabreicht werden darf, ist eine schnelle, in der Praxis durchführbare Nachweismethode für den MDR1-Gendefekt wünschenswert. Keine der bisher veröffentlichten Methoden zur Unterscheidung des Genstatus stellt einen kostengünstigen und zugleich schnellen Nachweis dar, welcher ohne aufwendige Laborausstattung durchzuführen wäre.

Abhilfe könnte hier die Methode der Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) schaffen. Im Bereich des Erregernachweises wird sie heute bereits als Point-of-Care (POC)-Test eingesetzt, da die Reaktion schnell abläuft und in einfachen, kleinen Geräten durchgeführt werden kann (PARIDA et al., 2008; CRAW & BALACHANDRAN, 2012).

Ziel der vorliegenden Arbeit war die schnelle und eindeutige Bestimmung des

MDR1-Genstatus beim Hund. Dazu wurden nach der Extraktion von Desoxyribonukleinsäure (DNA) aus Backenschleimhauttupfern von Hunden mit bekanntem Genstatus Reaktionen als allel-spezifische Polymerase-Kettenreaktion (AS-PCR) und als allel-spezifische LAMP (AS-LAMP) angesetzt.

Außerdem wurden verschiedene Detektionsmethoden getestet, um die Zeit von der Probenentnahme bis zum Testergebnis zu verkürzen. Eine eindeutige Genotyp-Zuordnung konnte mit diesen Methoden in etwa 60 Minuten erreicht werden.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Multidrug resistance 1 (MDR1)-Gen und P-Glykoprotein (P-Gp)

Das MDR1-Gen kodiert für das transmembrane P-Gp (GROS et al., 1986d). Als Transportprotein dient P-Gp dem Schutz des Organismus vor einer zytotoxischen Wirkstoffanreicherung (SCHINKEL et al., 1994). Untersuchungen beim Menschen ergaben, dass das P-Gp in verschiedenen Geweben, wie Nieren, Nebennieren, Leber, Lunge und Darm, physiologisch zu finden ist (FOJO et al., 1987; THIEBAUT et al., 1987). Im Jahr 1989 wurde erstmals die Expression von P-Gp in Endothelzellen von Gehirngefäßen nachgewiesen (CORDON-CARDO et al., 1989). P-Gp hat ein Molekulargewicht von 170 Kilodalton (kDa) (JULIANO & LING, 1976). Es besteht aus großen hydrophoben transmembranen Regionen, weist jedoch auch hydrophile Elemente auf der dem Zytoplasma zugewandten Seite auf (KARTNER et al., 1985; GERLACH et al., 1986). Das Transportprotein funktioniert über einen primär aktiven Pumpmechanismus (GROS et al., 1986d). Es gehört zu der Familie der ABC (Adenosintriphosphat(ATP)-binding-Cassette)-Transporter (GOTTESMAN & PASTAN, 1993). An Mäusezellen konnte immunoelektronenmikroskopisch gezeigt werden, dass P-Gp an der apikalen Zellseite lokalisiert ist (TATSUTA et al., 1992).

Die Bedeutung des P-Gp wurde zuerst in Tumorzellen erfasst, die eine Resistenz gegen Chemotherapeutika entwickelten (SEE et al., 1974; INABA et al., 1979). Die Menge des in diesen entarteten Zellen nachgewiesenen P-Gp korreliert mit dem Grad der Resistenz der Zelle (JULIANO & LING, 1976; RIORDAN & LING, 1979). Später konnte gezeigt werden, dass in diesen Zellen eine Überexpression des MDR1-Gens und zugehöriger Messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) vorlag. Arzneimittelsensitive Zellen konnten durch Transfer des MDR1-Gens in das Genom zu resistenten Zellen umgewandelt werden (GROS et al., 1986b; GROS et al., 1986c; GROS et al., 1986a).

Bei den Substraten von P-Gp handelt sich um eine Vielzahl amphipathischer Stoffe, bei welchen die hydrophoben Eigenschaften überwiegen und die lipidlöslich sind. Zu den Substraten gehören im Bereich der Chemotherapeutika Vinca-Alkaloide wie Vinblastin, Anthrazykline wie Doxorubicin und Antibiotika

wie Actinomycin D. Neben Avermectinen stellen auch Opioide wie Loperamid, Steroidhormone wie Dexamethason, Antibiotika wie Doxycyclin und Fluorchinolone und Ondansetron Substrate von P-Gp dar (GOTTESMAN & PASTAN, 1993; MEALEY, 2004).

Bestimmte Substrate können durch die Konkurrenz am Transportprotein als "Resistenzumkehrer" und somit als Chemosensibilisatoren wirken. Dazu gehören Kalziumkanalblocker wie Verapamil, Antiarrhythmika wie Amiodaron, hydrophobe Cephalosporine, Immunsuppressiva wie Cyclosporin A und einige weitere Stoffe (GOTTESMAN & PASTAN, 1993). Klinische Versuche bei Menschen zeigten in manchen Fällen ein verbessertes Ansprechen von resistenten B-Zell-Tumoren auf Chemotherapeutika bei Zugabe von einem Antiarrhythmikum als Chemosensibilisator (DALTON et al., 1989). Bei Menschen, die mit Chemotherapeutika und P-Gp-Inhibitoren behandelt werden, treten Nebenwirkungen auf, die durch die herunter gesetzte physiologische Funktion des P-Gp in betroffenen Geweben verursacht sein könnten (SCHINKEL et al., 1994). Therapieprotokolle, bei denen Chemosensibilisatoren in Kombination mit kardio- oder neurotoxischen Wirkstoffen verabreicht werden, sind daher zu vermeiden. Auch Hunde, die gleichzeitig mit P-Gp-Inhibitoren und P-Gp-Substraten behandelt werden, sollten deshalb auf Toxizitätsanzeichen überwacht werden (MEALEY, 2004).

1.1. Der MDR1-Gendefekt beim Tier

Um die Funktion von P-Gp im Gesamtorganismus besser untersuchen zu können, wurde eine MDR1 knockout-Mauslinie erstellt. Die homozygoten MDR1 knockout-Mäuse zeigten nach Applikation von P-Gp-Substraten zentralnervöse Störungen, die vergleichbar waren mit Intoxikationssymptomen von Collies, die mit Ivermectin behandelt wurden. Ein Zusammenhang mit einer spontanen Mutation im MDR1-Gen des Hundes wurde dabei erstmals vermutet (SCHINKEL et al., 1994).

1.1.1. Der MDR1-Gendefekt bei der Maus

MDR1 knockout-Mäuse haben ein verändertes und somit funktionsloses MDR1-Gen, zeigen aber keine phänotypischen Auffälligkeiten, so lange ihnen keine P-Gp-Substrate verabreicht werden. Auf Ivermectin- und Vinblastingaben entwickeln die Tiere jedoch zentralnervöse Störungen. Im Vergleich zu Wildtyp-

Mäusen kann eine erhöhte Wirkstoffkonzentration im Gehirn und eine geringere Wirkstoffelimination aus Herz-, Leber- und Nierengewebe festgestellt werden. Dies ist auf das Fehlen von P-Gp zurückzuführen (SCHINKEL et al., 1994).

Eine spontane Mutation im MDR1-Gen konnte in einer Subpopulation von Mäusen der CF1-Linie nachgewiesen werden. Diese Tiere zeigen daher ebenfalls eine Übersensibilität auf Ivermectin. P-Gp fehlt nicht nur in den Kapillaren des Gehirns, sondern auch in den Epithelien des Darms der Mäuse. P-Gp nimmt dort Einfluss auf die Wirkstoffaufnahme (LANKAS et al., 1997; UMBENHAUER et al., 1997). Somit sind zwei wichtige Barrieren betroffen, die die Anreicherung von Stoffen im systemischen Kreislauf und im zentralen Nervensystem normalerweise verhindern. Heterozygote Genotypen bilden eine geringere Menge an P-Gp als homozygote Wildtypen und zeigen daher im Vergleich eine höhere Wirkstoffsensitivität. Bei einer Verpaarung von heterozygoten (+/-) Mäusen, sind die Nachkommen zu je 25 % homozygot (+/+ und -/-) und zu 50 % heterozygot (+/-) Merkmalsträger, was der Mendel'schen Regel entspricht (UMBENHAUER et al., 1997). Weder die spontan mutierte Subpopulation noch die genetisch veränderten MDR1 knockout-Mäuse zeigen zu homozygoten Wildtyp-Mäusen anatomische, physiologische oder histologische Unterschiede und auch keine voneinander abweichenden Lebenserwartungen (SCHINKEL et al., 1994; UMBENHAUER et al., 1997).

1.1.2. Der MDR1-Gendefekt beim Hund

Schon lange bevor der MDR1-Gendefekt beim Hund bekannt war, wurde über Vergiftungssymptome nach der Verabreichung von Ivermectin an Collies berichtet (PULLIAM et al., 1985). Ivermectin ist ein halbsynthetischer Wirkstoff zur Parasitenbekämpfung. Er gehört zu den makrozyklischen Laktonen aus der Gruppe der Avermectine und ist ein Stoffwechselprodukt von *Streptomyces avermitilis*. Er bindet bei Wirbellosen an Glutamat-aktivierte und γ -Aminobuttersäure (GABA)-aktivierte Chloridkanäle, wodurch es zu Lähmung und Tod der Parasiten kommt (CAMPBELL et al., 1983).

In den Untersuchungen von PULLIAM und Mitarbeitern (1985) wurden vier Gruppen zu je vier Collies unterschiedliche Ivermectinkonzentrationen verabreicht (0, 50, 200 und 600 Milligramm (mg)/Kilogramm (kg)). Jeweils zwei Hunde der beiden Gruppen, die 200 mg/kg und 600 mg/kg erhielten, entwickelten

neurologische Symptome wie Ataxie, Hypersalivation, Verlust der Reflexe, Mydriasis, verminderte Schmerzantwort, Bewusstseinsverlust und Koma. Diese Tiere verstarben anschließend. Die Autoren schlossen auf zentralnervöse Störungen multifokalen Ursprungs. Sie wiesen eine höhere Penetration von Ivermectin durch die Blut-Hirn-Schranke nach. Während die Ivermectinkonzentration im Gehirn bei klinisch unauffälligen Tieren 1/10 bis 1/100 der Plasma- und Leberkonzentrationen betrug, war sie bei den betroffenen Collies deutlich höher als die Plasma- und Leberkonzentrationen.

Die genetische Grundlage dieser Überempfindlichkeit wurde schließlich im Jahr 2001 aufgedeckt (MEALEY et al., 2001). Durch das Fehlen von vier Basenpaaren (4-bp-Deletion, nt230(del4)) im MDR1-Gen Ivermectin-sensitiver Collies kommt es zu einer Rastermutation. Somit werden mehrere Stop-Codons generiert, durch welche kein funktionsfähiges P-Gp entstehen kann. Die Mutation liegt im vierten kodierenden Exon des Gens in einer palindromischen Sequenz ('GATAG'), wodurch nicht unterschieden werden kann, ob die vier Basen 'GATA' oder 'ATAG' eliminiert wurden (ROULET et al., 2003). Die Ursache für die Mutation kann nur vermutet werden. Es wäre möglich, dass das neun Basenpaare entfernte Palindrom (GGTTTTTGG) als instabile Sequenz eine Prädisposition für die Deletion in der benachbarten Region dargestellt hat (LEWIS et al., 1999; MEALEY et al., 2001). Der MDR1-Gendefekt wird autosomal-rezessiv vererbt (MEALEY et al., 2001).

1.1.2.1. Klinische Bedeutung des MDR1-Gendefekts bei Therapie mit P-Gp-Substraten

Neben Ivermectin führen auch andere Avermectine wie Doramectin, Milbemycin-Oxim oder Moxidectin zu Vergiftungserscheinungen bei Hunden mit MDR1-Gendefekt (TRANQUILLI et al., 1991; GEYER et al., 2005; GEYER et al., 2007; GEYER & JANKO, 2012). Die Neurotoxizität ist dosisabhängig und kann bei Unterschreitung der für die Wirkstoffe benannten Grenzwerte vermieden werden. So ist die empfohlene Dosis genannter Medikamente zur Herzwurmprophylaxe für keinen Hund gefährlich, während es bei der höheren Dosis zur Demodikose- oder Räudebehandlung bei Hunden mit MDR1-Gendefekt zu den bereits erwähnten, schwerwiegenden Symptomen kommt. Zudem ist die Art der Applikation bedeutend. Bei oraler Gabe geringerer Dosen kommt es früher zu Symptomen, als bei subkutaner Injektion oder bei Applikation auf die Haut (SEE

et al., 2009; GEYER & JANKO, 2012). Bei subkutaner Injektion ist mit einem langsameren Fortschreiten und einem längeren Andauern der Symptome zu rechnen (HOPPER et al., 2002). Auch die einzelnen Wirkstoffe haben eine unterschiedlich starke Toxizität. Selamectin und Milbemycin-Oxim werden in höheren Dosen toleriert, als Ivermectin und Doramectin (PULLIAM et al., 1985; BISHOP et al., 2000; GEYER et al., 2007). Heterozygote Hunde tolerieren höhere Dosen und entwickeln eher milde Symptome im Vergleich zu Hunden, die homozygot für das mutierte Allel sind. Hohe Dosen führen jedoch auch bei Heterozygoten zu neurologischen Symptomen, die Wahrscheinlichkeit an einer Intoxikation zu versterben ist aber geringer. Therapieversuche mit PicROTOXIN zur Hemmung von GABA-aktivierten Chloridkanälen führten zu Krämpfen. Durch Physostigmin kommt es zur Hemmung der Acetylcholinesterase, zu einer zentralen Aktivierung und somit einer kurzfristigen Besserung der Symptome, jedoch nicht zu einer Beschleunigung der Genesung. Es ist kein Antidot gegen Avermectine verfügbar (GEYER & JANKO, 2012).

In einer retrospektiven Studie wurden 17 Collies mit Ivermectinvergiftung untersucht. Alle Hunde entwickelten neurologische Symptome unterschiedlichen Ausmaßes: Ataxie, Orientierungslosigkeit, generalisierter Tremor, Sopor, Mydriasis, Bradykardie und starkes Speicheln. Stupor und Koma wurden nur bei besonders schweren Intoxikationen beobachtet. Bei oraler Applikation wurden die Tiere mit Diazepam sediert, Magenspülungen durchgeführt und Aktivkohle eingegeben. Die Hunde wurden intensiv betreut und untersucht, zur Aufrechterhaltung des Flüssigkeits- und Nährstoffbedarfs intravenös infundiert und bei Bedarf ventiliert. Aspirationspneumonien und Sepsis traten als sekundäre Komplikationen auf. Die Autoren stellen für Patienten, die eine intensive Pflege und Behandlung erfahren, trotz Koma eine gute Prognose bei Ivermectinvergiftungen. Die Zeit bis zur stationären Entlassung der Patienten variiert stark, kann aber mehrere Tage bis Wochen betragen. Daher ist eine Behandlung nicht nur sehr aufwendig, sondern auch zeit- und kostenintensiv (HOPPER et al., 2002).

Neben der klinisch relevanten Wirkung auf das zentrale Nervensystem wird vermutet, dass Hunde mit MDR1-Gendefekt anfälliger für Erkrankungen anderer Organsysteme sind, da ihnen die Schutzfunktion von P-Gp nicht nur im Gehirn fehlt. Hunde, die homozygot für den MDR1-Gendefekt sind, scheinen aufgrund

einer geschwächten Darmbarriere häufiger an ulzerativen Colitiden zu leiden. Da eine Besserung auf die Therapie mit Antibiotika zu bemerken ist, wird vermutet, dass die Darmbakterien entzündliche oder toxische Komponenten produzieren, welche Substrate von P-Gp darstellen (MEALEY, 2004).

Es konnte ein deutlicher Unterschied in der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse zwischen homozygot mutierten Hunden und Wildtyp-Hunden festgestellt werden. Durch das Fehlen von P-Gp kommt es zu einer höheren Konzentration von Kortikosteroiden im Hypothalamus und in der Hypophyse. Die Folge ist eine stärkere negative Rückkopplung und eine geringere Kortisolausschüttung aus der Nebennierenrinde (relative Nebenniereninsuffizienz). Daraus resultiert eine Unterdrückung und unzureichende Funktion des Systems beim Auftreten von Krankheit oder Stress. Dies bestätigt die Beobachtung, dass manche Hunde der vom MDR1-Gendefekt betroffenen Rassen generell schlechter auf Therapieversuche ansprechen, da sie keine adäquate Stressantwort entwickeln können. Daher sollte bei Hunden, bei denen aus ungeklärten Gründen kein Therapieerfolg erzielt wird, ein MDR1-Genest durchgeführt werden. Bis zur Mitteilung des Ergebnisses sollte Kortison in physiologischen Dosen verabreicht werden, um die Aussicht auf Heilung zu verbessern (MEALEY et al., 2007).

Der MDR1-Gendefekt kann für Patienten die eine Chemotherapie erhalten sollen sogar zum Vorteil werden, da die verwendeten Medikamente eine höhere orale Verfügbarkeit haben und eine intravenöse Gabe umgangen werden kann. Auch bei Hirntumoren oder Epilepsie kann ein Wirkstoff die Blut-Hirn-Schranke besser passieren und so das Gehirn zielgerichtet erreichen. Wichtig ist in jedem Fall, den MDR1-Genstatus eines Patienten vor der Therapie zu kennen. Für Patienten mit intaktem MDR1-Gen kann eine pharmakologische Ausschaltung des P-Gp durch P-Gp-Inhibitoren genutzt werden (MEALEY, 2004).

1.1.2.2. Rasseprädispositionen für den MDR1-Gendefekt

Die Häufigkeit des mutierten Allels wurde bei verschiedenen Rassen in den Vereinigten Staaten von Amerika (USA) beschrieben (siehe Tabelle 1). Die betroffenen Rassen scheinen einen gemeinsamen Vorfahren in Großbritannien zu haben, der vor der genetischen Isolation der einzelnen Rassen im Jahr 1873 lebte (NEFF et al., 2004). In einer weiteren Studie wurde der Genstatus von 7378 in

Deutschland lebenden Hunden untersucht (siehe Tabelle 2). Das Ziel war neben der Evaluierung der Häufigkeit der Mutation bei den Rassen auch die Einschätzung des Risikos für Einzeltiere, unter anderem für Mischlinge. Mischlinge ohne weitere Klassifizierung weisen eine Allel-Frequenz von 2%, Hütehund-Mischlinge von 8% auf. Durch den Vergleich mit 7500 Hunden aus Studien weiterer Länder konnte eine Liste für 94 Hunderassen erstellt werden, bei welchen bis dato keine MDR1-Mutation nachgewiesen werden konnte (GRAMER et al., 2011).

Tabelle 1: Anteil der MDR1-Allele nach Rasse, USA (NEFF et al., 2004).

Rasse	Mutiertes Allel (%)	Genotyp (%)		
		MDR (+/+)	MDR (+/-)	MDR (-/-)
Collie	54,6	22,0	46,8	31,2
Langhaar Whippet	41,6	32,6	51,7	15,7
Miniatur Australian Shepherd	25,9	51,8	44,6	3,6
Silken Windhound	17,9	65,5	33,3	1,2
Mc Nab	17,1	68,6	28,6	2,8
Australian Shepherd	16,6	68,5	29,8	1,7
Shetland Sheepdog	8,4	84,2	14,7	1,1
English Shepherd	7,1	85,7	14,3	0
Old English Sheepdog	3,6	92,7	7,3	0

Tabelle 2: Anteil der MDR1-Allele nach Rasse, Deutschland (GRAMER et al., 2011).

Rasse	Mutiertes Allel (%)	Genotyp (%)		
		MDR (+/+)	MDR (+/-)	MDR (-/-)
Collie	59	19	45	36
Langhaar Whippet	45	25	60	15
Shetland Sheepdog	30	49	43	8
Miniatur Australian Shepherd	24	54	43	3
Australian Shepherd	22	62	32	6
Wäller	17	65	35	0
Weißer Schweizer Schäferhund	14	75	23	2
Old English Sheepdog	4	92	8	0
Border Collie	1	98,7	0,9	0,4
Hütehundmischlinge	8	86	12	2
Mischlinge	2	97	3	0

1.2. Nachweismethoden des MDR1-Gendefekts beim Hund

Um eine sichere Anwendung verschiedener Medikamente bei vom MDR1-Gendefekt betroffenen Hunderassen gewährleisten zu können, ist es nötig, den Genstatus eines Hundes vor der Therapie bestimmen zu können.

Eine Möglichkeit zur Bestimmung des Genstatus ist die Sequenzierung der DNA (MEALEY et al., 2001). Auch der durch den Verlust von vier Basenpaaren entstandene Längenpolymorphismus (LP) in der DNA kann zur Diagnostik herangezogen werden. In der Gelelektrophorese legt das um vier Basen kürzere Fragment in der gleichen Zeit eine größere Distanz zurück (ROULET et al., 2003).

GEYER und Mitarbeiter (2005) übernahmen diese Idee und vervielfältigten genomische DNA aus dem Blut von drei Hunden mittels PCR. Der Gen-Abschnitt, in dem die Mutation liegt, wird dabei von den beiden Primern umschlossen. Die Amplifikate der mutierten DNA legen in einer hochauflösenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese eine größere Distanz pro Zeiteinheit zurück, da sie aufgrund der Basendeletion um vier Basen kürzer sind, als die der Wildtyp-DNA. Mit dieser Methode können alle drei Genotypen (+/+, +/- und -/-) unterschieden werden. Auch andere Autoren nutzen diese Art des Nachweises, wobei sie die Primer zur Sichtbarmachung der Amplifikate im Gel mit einem Fluoreszenzfarbstoff markieren (HUGNET et al., 2004; NEFF et al., 2004; MEALEY et al., 2005; FECHT et al., 2007).

Etwas später wurde eine AS-PCR vorgestellt, bei der jede Probe aus Blut oder Backenschleimhaut mit zwei unterschiedlichen Reaktionsansätzen untersucht wird. Im ersten Ansatz wird ein Primer-Set mit einem für den Wildtyp spezifischen und im zweiten ein Set mit einem für die Mutation spezifischen Primer verwendet. Bei letzterem Primer wurde für die durch die Mutation fehlenden Basen eine Verlängerung des Primers um vier Basen am 5'-Ende vorgenommen. Bei Vorhandensein des zugehörigen Allels zeigt sich nach der PCR in der Gelelektrophorese eine Bande aus den Amplifikaten des DNA-Abschnitts. Durch eine anschließende Sequenzierung wurden die Ergebnisse in den Versuchen validiert (BAARS et al., 2008).

Um eine bessere Eignung für die Routine-Diagnostik zu erreichen, wurde eine Nachweismethode entwickelt, bei der eine Bearbeitung der Proben nach der PCR umgangen wird. Die genomische DNA aus Blutproben wird mit genspezifischen Primern in nur einem Reaktionsansatz mit einer Real-time PCR amplifiziert. Hierbei werden mutations- und wildtypspezifische Oligonukleotide, die jeweils mit einem unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende versehen sind, in die DNA eingebaut. Der am 3'-Ende eingebaute Quencher unterdrückt die

Fluoreszenz beim intakten Oligonukleotid. Sobald die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase jedoch Fluorophor und Quencher trennt, nimmt die Intensität der Fluoreszenz mit steigender Zykluszahl zu und kann gemessen werden. Da die Fluoreszenz der spezifischen Farbstoffe getrennt aufgezeichnet wird, kann eine direkte Unterscheidung der Genotypen stattfinden. Zur Validierung wurde zusätzlich eine LP-Analyse und eine Sequenzierung der Proben durchgeführt (KLINTZSCH et al., 2010).

Die Vorteile von allel-spezifischen Primern wurden in einer weiteren Studie mit der Detektion von LP kombiniert, indem der Wildtyp-Primer um einige Basen länger gestaltet wurde, als der Primer für das mutierte Allel. Die Amplifikationen beider Allele können so in einem Ansatz stattfinden und die Genotypen anschließend in der LP-Analyse erkannt werden. Fortschritte in der Genauigkeit und dem zeitlichen Aufwand brachte die Ergebnisdarstellung mit Mikrochip-Elektrophorese. Sowohl beim mutierten als auch beim Wildtyp-Primer wurden am 3'-Ende an der Stelle der Mutation Einzelbasen-Fehlpaarungen eingebaut, die Thymin (T) enthalten. Die zuvor ähnlichen Primer unterscheiden sich anschließend deutlicher voneinander (MIZUKAMI et al., 2012). Fehlpaarungen mit T schränken die Amplifikation nur wenig ein. Liegen im 3'-Ende mehrere Fehlpaarungen vor, kommt es zu einer drastischen Senkung der Amplifikationsrate (KWOK et al., 1990).

2. Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)

Im Rahmen der POC-Diagnostik gewinnen vor allem isothermale Amplifikationsmethoden an Bedeutung. Sie werden bereits routinemäßig beim Nachweis von Infektionserregern und zunehmend auch für Mutationsnachweise bei Menschen und Tieren eingesetzt (MORI & NOTOMI, 2009; CRAW & BALACHANDRAN, 2012).

Bei der LAMP handelt es sich um eine hocheffiziente Amplifikationsmethode, die sich durch den Reaktionsablauf bei einer konstanten Temperatur auszeichnet. Vier Primer, die zu sechs definierten Zielsequenzen in der DNA passen, führen zu einer hohen Spezifität der LAMP. Sie benötigt zu Beginn der Reaktion nur eine geringe Anzahl an Kopien der Zielsequenz und weist dadurch eine hohe

Sensitivität auf. In weniger als einer Stunde werden 10^9 Kopien der Zielsequenz amplifiziert (NOTOMI et al., 2000). Die verwendeten Polymerasen, wie die *Bacillus stearothermophilus* (Bst) DNA Polymerase, Large Fragment, haben eine 5'-3'-Strangverdrängungsaktivität aber keine 5'-3'-Exonukleaseaktivität (ALIOTTA et al., 1996). Hierdurch werden komplexe Temperaturprofile zur Initialisierung der Reaktion vermieden. Die Amplifikation läuft bei einer konstanten Temperatur zwischen 60 °C und 65 °C ab, womit die Verwendung eines Heizblocks oder Wasserbades ausreichend ist (NOTOMI et al., 2000). Im Vergleich zur klassischen PCR konnte eine höhere Toleranz der LAMP auf Proben, die mit biologischen Substanzen wie Harn, Kammerwasser, Plasma und Serum versetzt wurden, festgestellt werden (KANEKO et al., 2007). Dies macht den Einsatz in der POC-Diagnostik noch interessanter, da möglicherweise eine vorhergehende Reinigung des Templates und eine aufwendige DNA-Extraktion vermieden werden können.

Die beiden äußeren Primer, Forward Outer Primer (F3) und Backward Outer Primer (B3), werden nur bei der Initialisierung der Amplifikationsreaktion verwendet. Die beiden inneren Primer, Forward Internal Primer (FIP) und Backward Internal Primer (BIP), sind bei der gesamten Reaktion für die Bildung der Amplifikate zuständig. Der FIP besteht aus den Sequenzen der Regionen F1c und F2, während sich der BIP aus B1c und B2 zusammensetzt (siehe Abbildung 1).

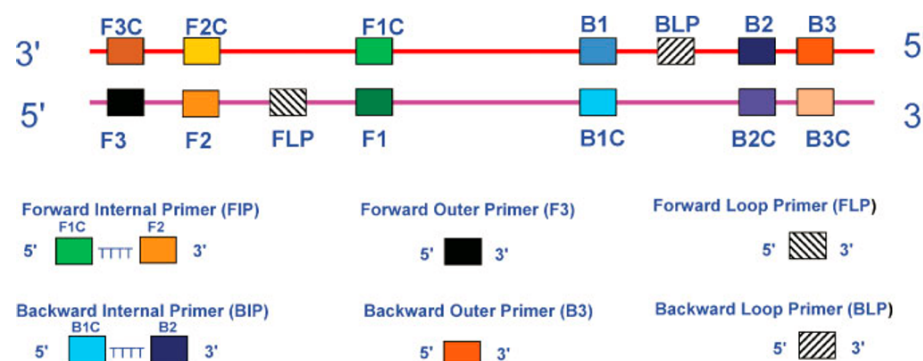


Abbildung 1: Schema zur Primer-Anordnung und deren Design für die LAMP inkl. zusätzlicher Loop-Primer. Durch C gekennzeichnete Abschnitte stellen die komplementäre Sequenz zur gegenüberliegenden Region dar (PARIDA et al., 2008). Der Abdruck erfolgte mit Genehmigung des Rechteinhabers.

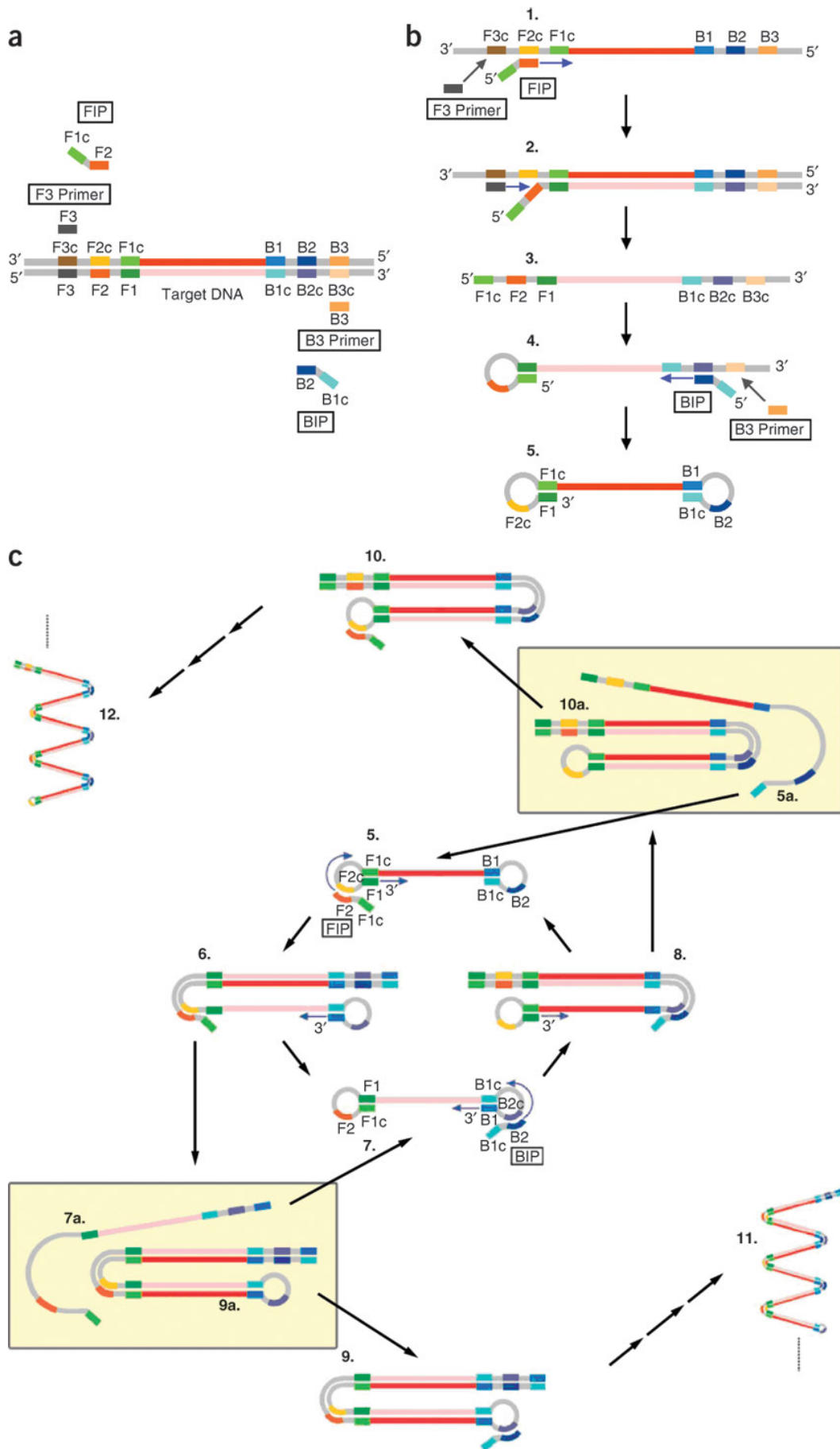


Abbildung 2: LAMP - Schema der ersten Amplifikationschritte (TOMITA et al., 2008). Der Abdruck erfolgte mit Genehmigung des Rechteinhabers.

Im ersten Schritt der Reaktion entstehen hantelförmige Amplifikate mit schleifenähnlichen Strukturen ("Loops"), die neue Bindungsstellen für die Primer darstellen (siehe Abbildung 2). Im weiteren Verlauf bilden sich weitere in Form und Größe verschiedene, blumenkohlartige Schleifenamplifikate (NOTOMI et al., 2000).

Das Primer-Design für die LAMP sollte bestimmte Voraussetzungen erfüllen, um die angestrebte Spezifität und Sensitivität zu erreichen. Der Basengehalt an Guanin (G) und Cytosin (C) sollte bei GC-reichen Regionen 50 - 60 %, bei Adenin (A)T - reichen Regionen 40 - 50 % betragen. Vor allem das 3'-Ende sollte GC-reich sein. Die Primer dürfen keine sekundären Strukturen durch Selbstanlagerung bilden, ebenso sollten die 3'-Enden nicht komplementär sein, um die Bildung von Primer-Dimeren zu vermeiden. Der Abstand zwischen den Primern F2 und B2 entspricht der zu amplifizierenden Region und sollte 120 bis 160 Basenpaare betragen. Zwischen F2 und F3 sollten Null bis 60 Basenpaare liegen. Zwischen den 5'-Enden der schleifenbildenden Primer F2 und F1 sollten 40 - 60 Basenpaare liegen. Die Schmelztemperaturen von F1c, B1c und ggf. verwendeten Loop-Primern sollten zwischen 64 °C und 66 °C liegen, die der restlichen Primer bei 60 °C. Die für die Stabilität wichtige freie Energie der Primer-Enden darf -4 Kilokalorien (kcal)/mol nicht übersteigen (PARIDA et al., 2008; EIKEN CHEMICAL CO., 2016).

Wenn Mutationen in der Zielsequenz vorkommen, muss sich der Untersucher zwischen gemeinsamen und spezifischen Primern entscheiden. Wenn die Amplifikation beispielsweise von mehreren, häufig vorkommenden Mutationen nicht beeinflusst werden soll, wählt man gemeinsame Primer, in deren Sequenz keine Mutation liegt. Soll eine bestimmte Mutation nachgewiesen werden, wählt man zu der Mutation und dem Wildtyp passende spezifische Primer, bei denen die Mutationsstelle im 3'- oder 5'- Ende liegt (siehe Abbildung 3). Die stattgefundenen Amplifikation ist der Nachweis für das Vorhandensein des gesuchten Allels (MORI & NOTOMI, 2009; EIKEN CHEMICAL CO., 2016).

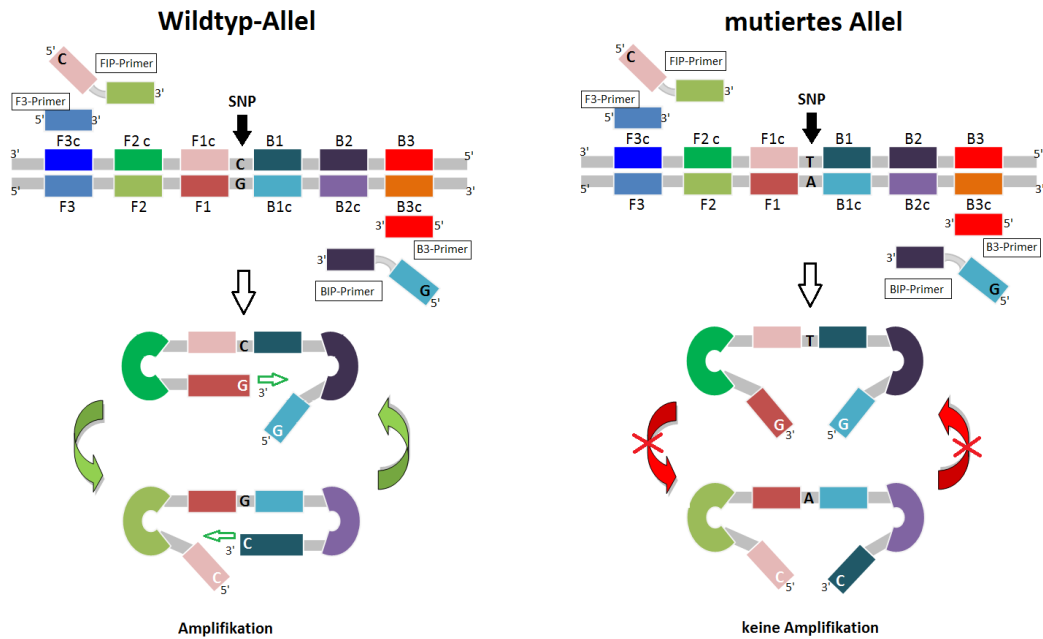


Abbildung 3: Grundprinzip des Mutationsnachweises mittels Wildtyp-Primern. Die Mutationsregion liegt im 5'-Ende des FIP und BIP. Bei Präsenz des Wildtyps wird die hantelförmige DNA-Struktur amplifiziert. Falls die Mutation vorliegt, findet keine Amplifikation statt. Modifiziert nach EIKEN CHEMICAL CO. (08.12.2016).

Durch die Anzahl von vier bis sechs Primern stellt das Design eine größere Schwierigkeit dar, als bei anderen Amplifikationsmethoden. Zur Erleichterung und Unterstützung des Primer-Designs wurde die Software "PrimerExplorer" entwickelt. Unter Berücksichtigung der beschriebenen Anforderungen an die Primer erstellt die Software Primer-Sets, die dem Benutzer anschließend vorgeschlagen werden. Die neueste Version ist auch bei der Erstellung von gemeinsamen und spezifischen Primern behilflich (MORI & NOTOMI, 2009).

Weiterentwicklungen der LAMP beziehen sich vor allem auf ergänzende oder alternative Primer-Sets. Durch den zusätzlichen Einsatz von Loop-Primern kann die Reaktionsgeschwindigkeit gesteigert werden (siehe Abbildung 1) (NAGAMINE et al., 2002). Zusätzlich zu Loop-Primern können Stem-Primer verwendet werden. Diese führen zu einer weiteren Steigerung in Effektivität, Spezifität und Sensitivität. Stem-Primer können Loop-Primer oder äußere Primer aber auch ersetzen und haben den Vorteil eines einfacheren Primer-Designs. Werden mehrere Stem-Primer in einem Reaktionsansatz kombiniert, wird die Amplifikationszeit weiter verkürzt. Es empfiehlt sich in diesem Fall, keine Loop-Primer zu verwenden, da beim Primer-Design aufgrund der hohen Anzahl an

Bindungsstellen zu große Einschränkungen entstehen. Stem-Primer sind im Gegensatz zur Loop-Primern flexibel in der Vorwärts- oder Rückwärtsorientierung, was das Primer-Design bei komplexen DNA-Abschnitten vereinfacht. Eine Basen-Fehlpaarung oder eine mögliche Haarnadelbildung am 3'-Ende des Primers wird durch einen Orientierungswechsel vermieden. Genau so kann einer Entstehung von Primer-Dimeren am 3'-Ende entgegen gewirkt werden (siehe Abbildung 4) (GANDELMAN et al., 2011).

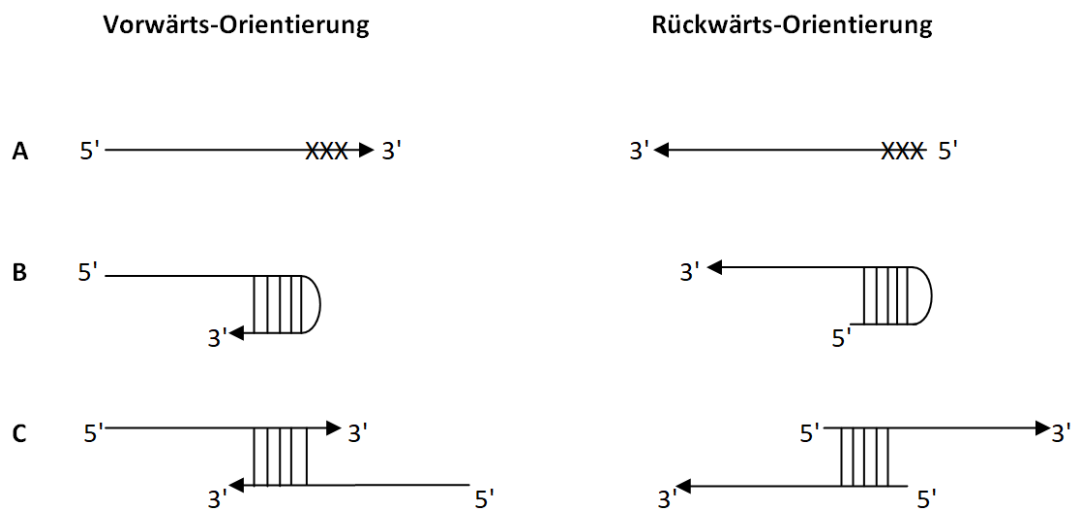


Abbildung 4: Beispiele für die Verwendung von rückwärts-orientierten Primern. A) Vermeidung von Basen-Fehlpaarungen nahe des 3'-Endes. B) Vermeidung von Haarnadelbildungen am 3'-Ende C) Vermeidung von Primer-Dimer-Entstehung. Modifiziert nach GANDELMAN et al. (2011).

2.1. Detektions- und Visualisierungsmöglichkeiten der LAMP-Reaktion

Es wurden direkte und indirekte Verfahren zur Detektion der LAMP-Produkte publiziert. Einfache Methoden, die keine Geräte zur Evaluierung der Ergebnisse benötigen, erlangen zunehmend an Bedeutung, um Kosten zu sparen und die Durchführung zu erleichtern (CRAW & BALACHANDRAN, 2012).

2.1.1. Direkte Methoden zum Nachweis der Amplifikationsreaktion

Nach erfolgreicher Amplifikation der Zielsequenz entstehen bei der Gelelektrophorese leiterartige Banden (siehe Abbildung 5). Im Gegensatz zur klassischen PCR, die mit zwei Primern Amplifikate der selben Länge erstellt, führt die höhere Anzahl an Primern mit versetzten Startpunkten bei der LAMP zu unterschiedlich langen DNA-Fragmenten (NOTOMI et al., 2000).

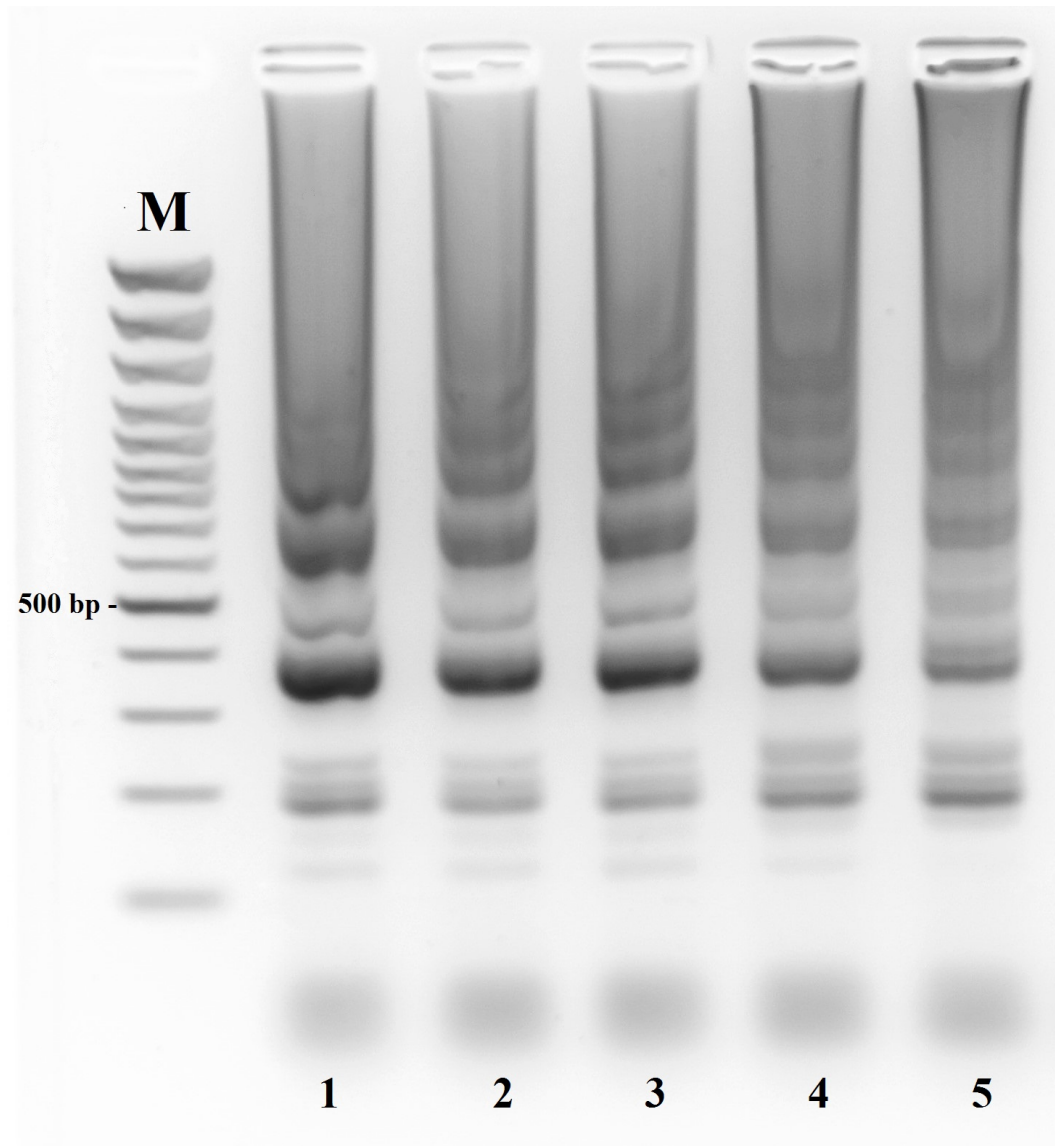


Abbildung 5: LAMP-Produkte in der Gelelektrophorese. M = Marker, Linie 1 - 5: positive LAMP-Reaktionen. Die Amplifikation ergibt zahlreiche, unterschiedlich lange DNA-Fragmente.

Interkalierende Farbstoffe für doppelsträngige DNA, welche bei der klassischen PCR routinemäßig im Einsatz sind, werden auch bei der LAMP verwendet. Hier lösen Farbstoffe wie SYBR Green I, EvaGreen oder Berberin das giftigere Ethidiumbromid ab (siehe Abbildung 6) (NJIRU et al., 2008; MAIR et al., 2013; FISCHBACH et al., 2015). SYBR Green I wechselt im Falle einer positiven Amplifikation seine orangene Grundfarbe zu grün, was im sichtbaren und noch besser im ultravioletten (UV)-Licht beurteilt werden kann (PARIDA et al., 2008). Berberin ist ein natürlich vorkommendes Pflanzenalkaloid und kann als ungiftige Alternative zum Fluoreszenznachweis verwendet werden (FISCHBACH et al., 2015).

Die LAMP kann auch in Kombination mit einem lateral-flow Teststreifen verwendet werden. Der FIP wird für diese LAMP mit Biotin markiert. Die Amplifikate werden anschließend mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markierten Oligonukleotiden hybridisiert. Diese werden wiederum von Gold-markierten FITC-Antikörper gebunden. Der so entstandene Dreifach-Komplex wird nach dem Eintauchen des Teststreifens in das Reaktionsgemisch an der Testlinie von Biotin-Antikörpern fixiert und zeigt sich durch einen gut sichtbaren Streifen. Nicht-hybridisierte Doppel-Komplexe aus FITC-Oligonukleotiden und FITC-Antikörpern wandern bis zur Kontrolllinie, an der sie festgehalten und detektiert werden (JAROENRAM et al., 2009).

Mit einer weiteren Methode lassen sich mehrere DNA-Sequenzen in einer Reaktion nachweisen. Mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Oligonukleotide hybridisieren während der LAMP mit den gesuchten Sequenzen. Nach der Amplifikation wird dem Reaktionsmix ein kationisches Polymer hinzugefügt, das sich mit den negativ geladenen Amplifikaten zu unlöslichen Komplexen verbindet. Das nach dem Zentrifugieren entstandene Pellet leuchtet im UV-Licht aufgrund der enthaltenen Fluoreszenzfarbstoffe in den Farben oder Farbkombinationen der zugehörigen, gesuchten DNA-Sequenzen (MORI et al., 2006).

2.1.2. Indirekte Methoden zum Nachweis der Amplifikationsreaktion

Bei der fortlaufenden LAMP bilden sich Pyrophosphat-Ionen als Nebenprodukt und verbinden sich mit Magnesium-Ionen (Mg^{2+}) zu Magnesiumpyrophosphat (siehe Abbildung 6). Dieses fällt als weißer Niederschlag aus und wird mit bloßem Auge sichtbar. Die Konzentration freier Mg^{2+} sinkt. Die Präzipitatbildung korreliert mit der Menge gebildeter DNA, was bei der turbidimetrischen Messung genutzt wird. Um eine positive Reaktion zu erkennen, kann das Gefäß nach der Amplifikation außerdem zentrifugiert werden, woraufhin sich ein gut sichtbares Pellet aus Magnesiumpyrophosphat am Boden absetzt (MORI et al., 2001; MORI et al., 2004). Allerdings kann es bei einer geringen Amplifikationsrate vor allem für ungeübte Augen schwierig sein, eine positive und negative Amplifikation klar zu unterscheiden (GOTO et al., 2009).

Fügt man dem Reaktionsansatz den Metall-Ionen-Indikator Hydroxynaphtolblau (HNB) zu, findet bei einer positiven Amplifikation ein Farbwechsel von lila nach

himmelblau statt, da die Konzentration von freien Mg^{2+} durch die fortschreitende Bildung von Magnesiumpyrophosphat abnimmt (siehe Abbildung 6). Da der Indikator den Reaktionsablauf nicht beeinflusst und zu Beginn mit in das Reaktionsgefäß gegeben wird, entfällt ein weiterer Arbeitsschritt. Das Reaktionsgefäß muss nach der Amplifikation nicht geöffnet werden und somit sinkt die Kontaminationsgefahr für die Umgebung und die Proben (GOTO et al., 2009). Bei geringen Amplifikationsraten kann ein Farbumschlag jedoch schlecht oder nicht erkennbar sein (HARPER et al., 2010).

Die Verwendung von Calcein stellt eine weitere Möglichkeit der indirekten Visualisierung dar. Die zu Beginn an das Calcein gebundenen Mangan-Ionen (Mn^{2+}) unterdrücken dessen Fluoreszenz. Im Laufe der Amplifikationsreaktion werden Mn^{2+} durch Mg^{2+} ausgetauscht, da die entstandenen Pyrophosphat-Ionen bevorzugt mit Mn^{2+} präzipitieren. Durch die fehlende Unterdrückung des Calceins durch Mn^{2+} entsteht eine auch im sichtbaren Licht wahrnehmbare Fluoreszenz mit einem Farbwechsel von orange zu leuchtendem grün (siehe Abbildung 6) (TOMITA et al., 2008).

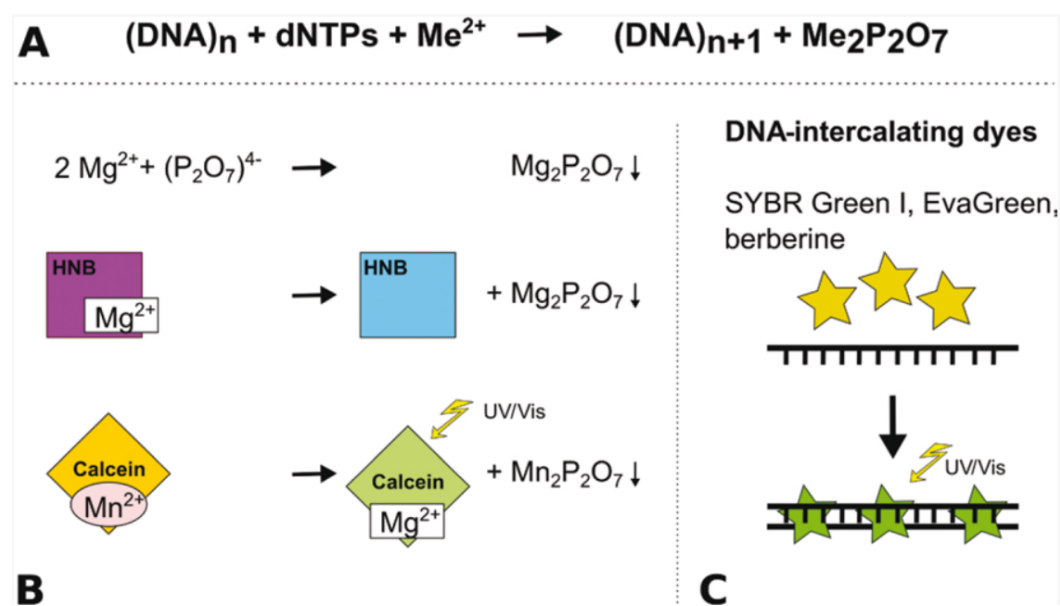


Abbildung 6: Übersicht über direkte und indirekte Methoden zum Nachweis von Amplifikationsprodukten bei der LAMP. A) Vereinfachte chemische Formel der LAMP, Me^{2+} bedeutet Metall-Ionen (Mg^{2+} oder Mn^{2+}). B) Indirekte Nachweise von Nebenprodukten der LAMP. Oben: Trübung durch die Entstehung von Präzipitaten aus Magnesiumpyrophosphat. Mitte: Farbwechsel des Metall-Ionen-Indikators HNB durch die abnehmende Konzentration freier Mg^{2+} . Unten: Fluoreszenzsignale von Calcein durch den Austausch von Mn^{2+} zu Mg^{2+} . Alle indirekten Methoden sind mit bloßem Auge zu erkennen. C) Direkte Nachweismethoden von amplifizierter DNA nach der LAMP durch SYBR Green I, EvaGreen und Berberin. Alle Farbstoffe können für real-time Analysen verwendet werden (FISCHBACH et al., 2015). Der Abdruck erfolgte mit Genehmigung des Rechteinhabers.

2.2. Einsatz in der Diagnostik

Mittlerweile gibt es sehr viele Publikationen über den Nachweis von Pathogenen beim Menschen mittels LAMP. Darunter befinden sich lebensmittelassoziierte Erreger wie Salmonellen, Listerien und *Escherichia coli*, aber auch andere Humanpathogene wie *Plasmodium falciparum*, *Mycobacterium tuberculosis* und das Humane Immundefizienz-Virus. Es werden zunehmend mikrofluidische Systeme (Lab-on-a-Chip Tests) erwartet, die gerade in Entwicklungsländern im Kampf gegen endemische Infektionserkrankungen von Bedeutung sind (PARIDA et al., 2008; MORI & NOTOMI, 2009; CRAW & BALACHANDRAN, 2012).

Auch in der Veterinärmedizin wurden Nachweismethoden von infektiösen Erkrankungen wie Maul- und Klauenseuche, Staupe, Parvovirose, equine Rotavirus-Infektion und Babesiose mittels LAMP etabliert (GUAN et al., 2008; PARIDA et al., 2008; NEMOTO et al., 2010). Sie wird sogar zur Geschlechtsbestimmung von Wasserbüffelembryos herangezogen (HIRAYAMA et al., 2006).

Für den Mutationsnachweis mittels LAMP sind bisher wenige Publikationen bekannt. Der Nachweis einer Punktmutation im Gen eines epidermalen Wachstumsfaktors ist bei der Vorhersage des Effekts von Gefitinib zur Behandlung von Lungenkrebs beim Menschen von Bedeutung. Neben einer konventionellen LAMP findet hier eine in-situ LAMP direkt auf den histologischen Schnitten auf Objektträgern statt. Zur Visualisierung werden die Primer mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert (IKEDA et al., 2007).

In einer weiteren Studie wurde eine LAMP für den Nachweis einer Mutation, die bei chronisch myeloproliferativen Neoplasien des Menschen eine Rolle spielt, entwickelt. Dabei kommt zur Unterscheidung des mutierten Genotyps und des Wildtyps eine Peptid-Nukleinsäure zum Einsatz, die durch ihre Anlagerung an das Wildtyp-Allel eine weitere Amplifikation verhindert. An die mutierte Sequenz, welche nicht zur Peptid-Nukleinsäure passt, setzt sich ein weiterer "self-annealing"-Primer an, der zum Fortschreiten der Amplifikation führt. Es folgt eine turbidimetrische Messung. Ab einem bestimmten Trübungsgrad übersteigen die Werte eine festgelegte Schwelle (Threshold) und es kann eine positive Amplifikation verzeichnet werden. Anhand der bis zu dieser Überschreitung benötigten Zeit wird die Anzahl der DNA-Kopien zu Beginn der Reaktion ermittelt (MINNUCCI et al., 2012).

Im Rahmen der Malariabekämpfung wurde eine AS-LAMP für den Nachweis von Insektizid-Resistenzen der Überträgermücken (*Anopheles gambiae*) entwickelt. Bei einigen Mücken liegt eine Mutation im *kdr*-Gen (West-Afrika Typ, *kdr-w*) vor. Dieser Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) liegt im kodierenden Gen für einen spannungsabhängigen Natriumkanal, wodurch die Insekten resistent gegen Pyrethroide geworden sind. Die AS-LAMP kann alle Genotypen (homozygote Wildtypen, Heterozygote und homozygote *kdr-w* Typen) spezifisch unterscheiden, da der BIP allel-spezifisch ist. Die Mutation liegt an dessen 5'-Ende, während am 3'-Ende eine Basen-Fehlpaarung eingebaut wurde. Es werden zwei Reaktionsansätze mit den Proben durchgeführt - ein Ansatz mit dem BIP für das mutierte Allel und einer mit dem BIP für das Wildtyp-Allel. Eine positive Amplifikation beweist das Vorhandensein des jeweiligen Allels (BADOLO et al., 2012).

III. PUBLIKATION

Die folgende Publikation

"Fast and simple detection methods for the 4–base pair deletion of canine *MDR1/ABCB1* gene by PCR and isothermal amplification"

wurde am 15. November 2016 von der Zeitschrift "Journal of Veterinary Diagnostic Investigation" zur Veröffentlichung angenommen.

Article first published online: January 6, 2017

Issue published: March 1, 2017

Volume 29, Issue 2, pages 176-180

DOI: 10.1177/1040638716683213

Fast and simple detection methods for the 4-base pair deletion of canine *MDR1/ABCB1* gene by PCR and isothermal amplification Cathrin P. Stiedl, Karin Weber¹

Centre for Clinical Veterinary Medicine, Clinic of Small Animal Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität-München, Germany (Stiedl, Weber).

¹Corresponding author: Karin Weber, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Clinic of Small Animal Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität München, Veterinärstrasse 13, 80539 München, Germany. karin.weber@lmu.de

Running title: Fast detection of the *MDR1/ABCB1* deletion in dogs

Abstract.

Dogs with a 4-base pair deletion in the *MDR1* (or *ABCB1*) gene show intolerance to certain drugs routinely used in veterinary medicine, like ivermectin, vincristine or doxorubicin. The mutation leads to a dysfunctional P-glycoprotein drug transporter, which results in drug accumulation in the brain and severe neurotoxicity. A rapid and accurate in-house test to determine the genotype of patients in cases of acute neurotoxic symptoms or in tumor patients is desirable. This study aimed to develop a cost-effective detection method with simple technical equipment for veterinary practice. Two allele-specific methods are presented, which allow discrimination of all genotypes, require little hands-on-time and show the results within about one hour after DNA sampling. DNA from buccal swabs of 115 dogs with known genotype (no mutation n = 54; heterozygous n = 37; homozygous for the mutation, n = 24) was extracted either by using a column-based extraction kit or by heating swabs in a simple NaOH/Tris-buffer. Amplification was performed either by allele-specific fast PCR or by allele-specific Loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Analysis was done either on agarose gels, simple end-point visualization using UV light, or by measuring increase of fluorescence and time to threshold crossing. Commercially available mastermixes reduced the preparation time and minimized sources of error in both methods. Both methods allowed the discrimination of all 3 genotypes, and the results of the new methods matched the results of the previous genotyping. The presented methods could be used for fast individual *MDR1/ABCB1* genotyping with less equipment than existing methods.

Key words: deletion mutation, dog, ivermectin, nucleic acid amplification technique

Introduction

A 4-base pair deletion mutation in the gene for the drug transporter P-glycoprotein (formerly multidrug resistance gene *MDR1*, now referred to as *ABCB1* gene) is found with a very high allele frequency in several sheepdog breeds, with over 70% in the Collie breed, and about 50% in Australian Shepherd dogs.^{13,22} Other breeds of Collie descent and mixed breed dogs with Collie ancestry are affected to a lesser extent.⁷ Since the gene product of the deleted allele has been found to be dysfunctional, treatment with drugs that are substrates for P-glycoprotein causes severe or even fatal neurotoxic reactions in individuals homozygous for the deletion.¹² Some of these drugs, like ivermectin, vincristine and doxorubicin, are frequently used in veterinary medicine. A fast and accurate genotyping method for the *ABCB1* gene status of individual dogs could be used to preempt, cases of acute neurotoxicity, and for the choice of safe therapeutic options. Several PCR-based methods for allelic discrimination are used to date, but have not reached a format that may be used as a point-of-care diagnostic test.^{1,6,11,16} Ideally, an in-house test for allele-specific DNA amplification would be based on non-invasive DNA sampling, require minimal hands-on time, and little technical equipment for DNA extraction, amplification and detection.

In 2000, an isothermal amplification method (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) was developed.¹⁹ Four primers, matching 6 specific sequences, form products with self-hybridizing loop structures. The reaction does not require melting or annealing steps, since the DNA polymerases used display strand displacement activity. At a constant amplification temperature of 60 – 65 °C, DNA-fragments of different lengths are formed, which can be detected by various methods. The technique was improved by including additional stem primers or loop-primers to facilitate and accelerate the reaction.^{5,18} The method has been found to be quite robust and less affected by inhibitors found in crude sample material than PCR.¹⁰ Due to its high sensitivity, it is recommended to avoid opening of the reaction tubes after amplification to decrease the risk of carry-over contamination.²³ Since LAMP reactions require only simple heat blocks, and DNA amplification can be detected by fluorescence or color change, the method can be applied for point-of-care diagnostics.^{3,20} While numerous LAMP reactions for the detection of infectious agents have been described, only few studies using this method for the detection of DNA mutations have been

published.^{2,4,9,15}

Although reliable amplification methods for *MDR1/ABCB1* genotyping do exist, a simple and cost-effective test for individual patients could improve diagnosis in cases of suspected intoxication and help select adequate drugs in tumor patients. In our study, we developed 2 rapid methods for allele-specific *MDR1/ABCB1* genotyping that were compared against the results of official genotyping tests. The results of both methods, allele-specific PCR with fast amplification, and allele-specific LAMP with fluorescent detection of amplicons, matched the expected genotypes of every individual. From sample to result, both methods could be completed in about 60 minutes.

Materials and methods

DNA sampling and extraction

For DNA-sampling, buccal epithelial cells were collected using sterile dry cotton swabs^a from 115 dogs with known genotypes, (no mutation, *MDR1* (+/+), n = 54; heterozygous for the mutation, *MDR1* (+/-), n = 37; homozygous for the mutation, *MDR1* (-/-), n = 24). All dogs had been tested for their genotype by a licensed laboratory (TransMIT GmbH, Gießen), or were offspring from tested parents with a homozygous genotype (both parents *MDR1* (+/+) or *MDR1* (-/-)). The test is patent-protected and details are not disclosed. The breed distribution of the dogs is shown in Table 1. Two swabs per dog were rotated at the inside of the cheek, dried for 10 min, sealed and subsequently stored at -20 °C. Permission to use these samples was granted by the ethics commission of the Centre for Clinical Veterinary Medicine at the Ludwig Maximilian University Munich (No. 5-05-29-13).

DNA from 98 swabs was extracted using a commercial extraction kit^b and eluted with 150 µl buffer AE (10 mM Tris-Cl and 0.5 mM EDTA; pH 9.0). To test the feasibility of a simple and cheap extraction protocol, 40 swabs were extracted using a variation of a protocol created for non-invasive genotyping of mice.¹⁴ The swabs were soaked with 28 µl 0.1 M NaOH, clipped off, and incubated for 10 min at 75 °C in a reaction tube containing 252 µl Tris-buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0). The swabs were removed, and the supernatant was used as a template without further purification. Extracted DNA samples were stored at -20 °C until further processing.

DNA amplification

For allele-specific (AS-) PCR, the total reaction volume of 20 μl included 10 μl FastPCR MasterMix^c, 5 μl template, 4 μl water, 0.5 μl allele-specific forward primer (F_wtMDR or F_mutMDR) and 0.5 μl reverse primer (R_MDR) at a concentration of 25 pmol/ μl each (Table 2). The forward primer was specific either to the wild type or to the mutant allele, and each sample was tested in 2 separate reactions. The amplification was performed on a thermal cycler with fast ramping rates^d with the following cycling protocol: hot start at 95 °C for 5 min; 45 cycles of denaturation at 98 °C for 5 sec, annealing at 50 °C for 5 sec, synthesis at 68 °C for 10 sec and extension at 72 °C for 1 min. The reaction was completed in 35 min and generated amplicons of 335 or 331 base pairs, respectively. All 115 dogs with known genotypes were tested. The distribution of genotypes is shown in table 1.

The primer design for AS-LAMP was assisted by the software PrimerExplorer^e. Two allele-specific reactions were performed for each sample. The reaction mix contained 15 μl Mastermix^f, 5 μl primer mix, 3 μl water and 2 μl template for a total volume of 25 μl . The primer mix consisted of 1 μM F3, 1 μM B3, 4 μM FIP_wt or FIP_mut, 4 μM BIP, 2 μM stemB and 2 μM stemF (Table 2). The reaction mix was incubated at 61 °C for 75 min in a Real Time PCR system^g. The total reaction time of 75 min was chosen to detect unspecific amplification. Sixty-five samples, which had all been extracted using the extraction kit, were tested (25 *MDRI* (+/+), 21 *MDRI* (+/-), 19 *MDRI* (-/-)).

Analysis

PCR products were visualized on a 2% agarose gel^h. Alternatively, 1 μl of a 1:100 GelRedⁱ dilution was added to the AS-PCR tubes after amplification, and the tubes were examined under UV light^j at 312 nm.

During AS-LAMP, accumulation of DNA products was measured by detecting the increase of fluorescence in the FAM detection channel (λ_{max} 518 nm), and the time to threshold crossing was analyzed. A subset of samples was analyzed on a 2% agarose gel to demonstrate the formation of DNA-fragments by the LAMP reaction.

Results

The fast allele-specific PCR yielded the expected results for all individuals when analyzed on an agarose gel (Figure 1). The amplification products of DNA samples from swabs extracted with a commercial kit could also be visualized directly under UV light by adding GelRed to the reaction tube after amplification (Figure 2). DNA from swabs that were only heated in buffer was sufficient as a template when the reaction product was visualized on a gel, but did not yield enough DNA for direct visualization with GelRed.

The LAMP reaction could also be used for genotyping when the times to threshold crossing between the reactions containing the FIP primer for the wild type and the primer for the mutation for each individual were compared. The amplification efficiency of the wild type primer was higher than that of the primer for the mutation. Time to threshold crossing was dependent on DNA content. The wild type allele in *MDRI* (+/+) and *MDRI* (+/-) animals was detected in 26 to 43 min. The mutant allele in *MDRI* (+/-) and *MDRI* (-/-) animals was detected in 34 to 50 min. Ten out of 25 *MDRI* (+/+) and one out of 19 *MDRI* (-/-) samples did not show any unspecific amplification after 75 min. In 15 *MDRI* (+/+) samples, an unspecific signal was detected with the primer for the mutation after 50 to 69 min, which was at least 18 min later than the corresponding specific signal. In 18 *MDRI* (-/-) samples, an unspecific signal with the wild type primer was detected after 43 to 70 min, but always (at least 3 min) later than the specific signal. In heterozygous samples, the wild type allele was always detected before the mutated allele with a minimal time between detection of both alleles of 1 min and a maximal time of 11 min. Using these cutoffs, all samples could be assigned to the correct genotype (specificity 100%).

Fixed cutoffs of time to threshold without comparison between both amplifications of 45 min for the wild type allele and 55 min for the mutant allele would have misclassified 2 *MDRI* (+/+) samples and one *MDRI* (-/-) sample as heterozygous (specificity 95% and 97%, respectively). Figure 3 shows LAMP amplification reactions that were terminated after 55 min and run on an agarose gel. The shorter runtime could suppress unspecific amplification.

Discussion

Major limitations for PCR-based methods as point-of-care tests are the rather time-consuming DNA extraction, long amplification protocols, and the need for specialized equipment for amplification and detection of PCR products. In this study, we tried to overcome some of these limitations to assess the *MDR1/ABCBI* genotype of dogs accurately and fast with methods that might be used in a clinical setting.

Non-invasive DNA sampling by buccal swabs is a fast and simple method that can be carried out by dog owners or any clinic staff. To facilitate the extraction step, instead of a column-based extraction, some buccal swabs were heated in a simple buffer, which yielded enough DNA for AS-PCR. A specialized PCR machine with high ramping rates was used to shorten amplification. Detection using an agarose gel always yielded a reliable result, independent of the extraction method. However, this detection method needs equipment and hands-on time hardly compatible with a point of care test. After amplification, DNA could also be detected by adding an intercalating dye and using an UV lamp, which is an easy and fast method. However, a reliable differentiation between positive and negative reactions was only possible when DNA concentrations were high enough, which needed higher sample DNA input that could not be achieved by the simple extraction method in heated buffer. More sensitive and simple DNA detection methods are needed for samples with limited DNA content. Advances in label-free detection of DNA molecules with more sensitive dyes might overcome this drawback, or primers labeled with tag-spacer and biotin might be used for low-cost and easy detection with single tag hybridization on chromatographic printed array strips¹⁷.

The AS-LAMP method could also be used for fast genotyping. Since opening LAMP reaction tubes after amplification is not advisable, direct detection methods built into the amplification device are preferred. Several small point-of-care amplification and detection devices are available. The isothermal Mastermix used in this study is designed for a portable device with heat blocks delivering a constant temperature and fluorescent detection at 510 nm^k. The Real Time PCR system used in this study was programmed to hold a constant temperature for a comparable reaction setup. Although unspecific amplification did occur, the differences in time to threshold between the reactions for the wild type and the

mutant allele were large enough to distinguish the 3 genotypes. Several samples were analyzed 2 or 3 times in different reaction setups with changes in time and temperature, and yielded reproducible results. Amplification detection in LAMP reactions could be further simplified if the reaction could be adapted to run in a setup with pH-sensitive dyes, leading to equipment-free visual detection²¹.

Different primer sets were tested for AS-LAMP, which showed variable specificity and sensitivity. The higher number of primers needed for LAMP makes primer design more challenging compared to PCR. The PrimerExplorer software helps the investigator choosing the best combinations, but adequate binding sites may be limited. In this study, the best results were achieved with FIP primers including mismatched bases close to the 5' end in the region of the mutation site. In the recommendations for LAMP primer design, selecting this region should improve the specificity of the primers to distinguish between wild type and mutant sequences. In the AS-PCR reactions, forward primers with comparable variations close to the 3'-end were used, since they had been shown to work well in a previous study.¹⁶ Instead of loop primers, which are most often used in LAMP reactions, so called stem primers were introduced as proposed in an earlier study to achieve fewer restrictions of binding site options.⁵ Although sensitivity and specificity were good for the wild type FIP primer, which produced only little unspecific amplification for the mutant allele after long incubation times, the mutant FIP primer appeared to be less efficient and less specific. Further variations of the primer sequence might improve the specificity of the mutant FIP primer. An alternative approach could be the inclusion of a single sequence-specific fluorescent probe in the LAMP reaction and the analysis of the melting curves to distinguish wild type and mutant alleles.⁸

Both the AS-PCR and the AS-LAMP appear as robust and reproducible methods suitable for a point-of-care test, especially when coupled to an easy extraction method and a portable amplification and detection device. Especially dogs from breeds with a high frequency of the mutant *MDR1* allele like Collie, Australian Shepherd and Shetland Sheepdogs (allele frequency > 20%) would benefit from rapid genotyping when presented to a veterinary clinic⁷. In our clinic, purebred dogs of these 3 breeds and mixed dogs with sheepdog and collie ancestry represented 2.5% of canine patients.

Acknowledgements

We thank the study dog owners and clinical staff for their cooperation.

Sources and manufacturers

- a. Swabs 155 x 12 mm, sterile, No. 80.1301, Sarstedt, Nümbrecht, Germany.
- b. QiaAMP DNA Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany. Protocol: DNA Purification from Buccal Swabs (Spin Protocol) in QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook 11/2007.
- c. Fast Cycling PCR Master Mix, Qiagen, Hilden, Germany.
- d. Eppendorf Gradient S thermocycler, Eppendorf, Hamburg, Germany.
- e. <https://primerexplorer.jp/e/>
- f. Isothermal Mastermix, OptiGene, Horsham, UK.
- g. 7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Foster City, CA.
- h. Thermo Scientific TopVision Agarose #R0491, Thermo Fisher, Waltham, MA.
- i. GelRed, Biotium, Hayward, CA.
- j. UV Transilluminator, Major Science, Saratoga, CA.
- k. Genie II, OptiGene, Horsham, UK.

Declaration of conflicting interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship and /or publication of this article.

Funding

The author(s) received no financial support for the research, authorship and/or publication of this article.

References

1. Baars C, et al. Allele-specific polymerase chain reaction diagnostic test for the functional MDR1 polymorphism in dogs. *Vet J* 2008;177:394-397.
2. Badolo A, et al. Development of an allele-specific, loop-mediated, isothermal amplification method (AS-LAMP) to detect the L1014F kdr-w mutation in *Anopheles gambiae* s. l. *Malar J* 2012;11:227.
3. Fischbach J, et al. Shining a light on LAMP assays--a comparison of LAMP visualization methods including the novel use of berberine. *Biotechniques* 2015;58:189-194.
4. Fu S, et al. Applications of loop-mediated isothermal DNA amplification. *Appl Biochem Biotechnol* 2011;163:845-850.
5. Gandelman O, et al. Loop-mediated amplification accelerated by stem primers. *Int J Mol Sci* 2011;12:9108-9124.
6. Geyer J, et al. Development of a PCR-based diagnostic test detecting a nt230(del4) MDR1 mutation in dogs: verification in a moxidectin-sensitive Australian Shepherd. *J Vet Pharmacol Ther* 2005;28:95-99.
7. Gramer I, et al. Breed distribution of the nt230(del4) MDR1 mutation in dogs. *Vet J* 2011;189:67-71.
8. Howard RL, et al. Rapid detection of diagnostic targets using isothermal amplification and HyBeacon probes--a homogenous system for sequence-specific detection. *Mol Cell Probes* 2015;29:92-98.
9. Ikeda S, et al. Detection of gene point mutation in paraffin sections using in situ loop-mediated isothermal amplification. *Pathol Int* 2007;57:594-599.
10. Kaneko H, et al. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *J Biochem Biophys Methods*

- 2007;70:499-501.
11. Klintzsch S, et al. Detection of the nt230[del4] MDR1 mutation in dogs by a fluorogenic 5' nuclease TaqMan allelic discrimination method. *Vet J* 2010;185:272-277.
 12. Martinez M, et al. The pharmacogenomics of P-glycoprotein and its role in veterinary medicine. *J Vet Pharmacol Ther* 2008;31:285-300.
 13. Mealey KL, et al. Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. *Pharmacogenetics* 2001;11:727-733.
 14. Meldgaard M, et al. Non-invasive method for sampling and extraction of mouse DNA for PCR. *Lab Anim* 2004;38:413-417.
 15. Minnucci G, et al. A novel, highly sensitive and rapid allele-specific loop-mediated amplification assay for the detection of the JAK2V617F mutation in chronic myeloproliferative neoplasms. *Haematologica* 2012;97:1394-1400.
 16. Mizukami K, et al. Rapid genotyping assays for the 4-base pair deletion of canine MDR1/ABCB1 gene and low frequency of the mutant allele in Border Collie dogs. *J Vet Diagn Invest* 2012;24:127-134.
 17. Monden Y, et al. A rapid and enhanced DNA detection method for crop cultivar discrimination. *J Biotechnol* 2014;185:57-62.
 18. Nagamine K, et al. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes* 2002;16:223-229.
 19. Notomi T, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 2000;28:E63.
 20. Surabattula R, et al. Simple, rapid, inexpensive platform for the diagnosis of malaria by loop mediated isothermal amplification (LAMP). *Exp Parasitol* 2013;134:333-340.

21. Tanner NA, et al. Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. *Biotechniques* 2015;58:59-68.
22. Tappin SW, et al. Frequency of the mutant MDR1 allele in dogs in the UK. *Vet Rec* 2012;171:72.
23. Zanolli LM, Spoto G. Isothermal amplification methods for the detection of nucleic acids in microfluidic devices. *Biosensors (Basel)* 2013;3:18-43.

Table 1. Breed distribution of collected samples

Breed	Number of dogs sampled	Genotype		
		<i>MDR1</i> (+/+)	<i>MDR1</i> (+/-)	<i>MDR1</i> (-/-)
Smooth Collie	53	16	21	16
Shetland Sheepdog	22	14	6	2
Rough Collie	14	4	4	6
Australian Shepherd	10	6	4	0
Mixed breed	8	7	1	0
Border Collie	6	6	0	0
Borzoi	1	1	0	0
Miniature Australian Shepherd	1	0	1	0
Total number	115	54	37	24

Table 2. Primers used for AS-PCR and AS-LAMP. The lower-case letters represent the base mismatches

Assay	Primer/name	Primer sequence
AS-PCR	F_wtMDR	5'-GTTTTTGGAAACATGACAtA-3'
	F_mutMDR	5'-GTTTTTGGAAACATGACgGC-3'
	R_MDR	5'-CTGAAACTTCCTGGGATCT-3'
AS-LAMP	F3	5'-CGCTATTCAAATTGGCTTGA-3'
	B3	5'-CTGAAACTTCCTGGGGATCT-3'
	FIP_wt	5'-TaTGTCATGTTTCCAAAAACCAGCA-TTGTATATGTTGGTGGGGAC-3'
	FIP_mut	5'-GCcGTCATGTTTCCAAAAAGTAGC-TTGTATATGTTGGTGGGGAC-3'
	BIP	5'-ATCCACACTGGAAGGTCTTGG-TCTGAATTCACAGAACTCTGC-3'
	stemF	5'-TTCTGGGGGAAAAGGGAG-3'
	stemB	5'-GGCTAAACATCCTTCTAAGTAACA-3'

Figure 1. AS-PCR products from *MDR1* (+/+), *MDR1* (+/-) and *MDR1* (-/-) dogs on a 2 % agarose gel. M: 100 bp marker ladder. Upper panel: Amplification with a primer specific for the wildtype allele; lower panel: Amplification with a primer specific for the mutant allele.

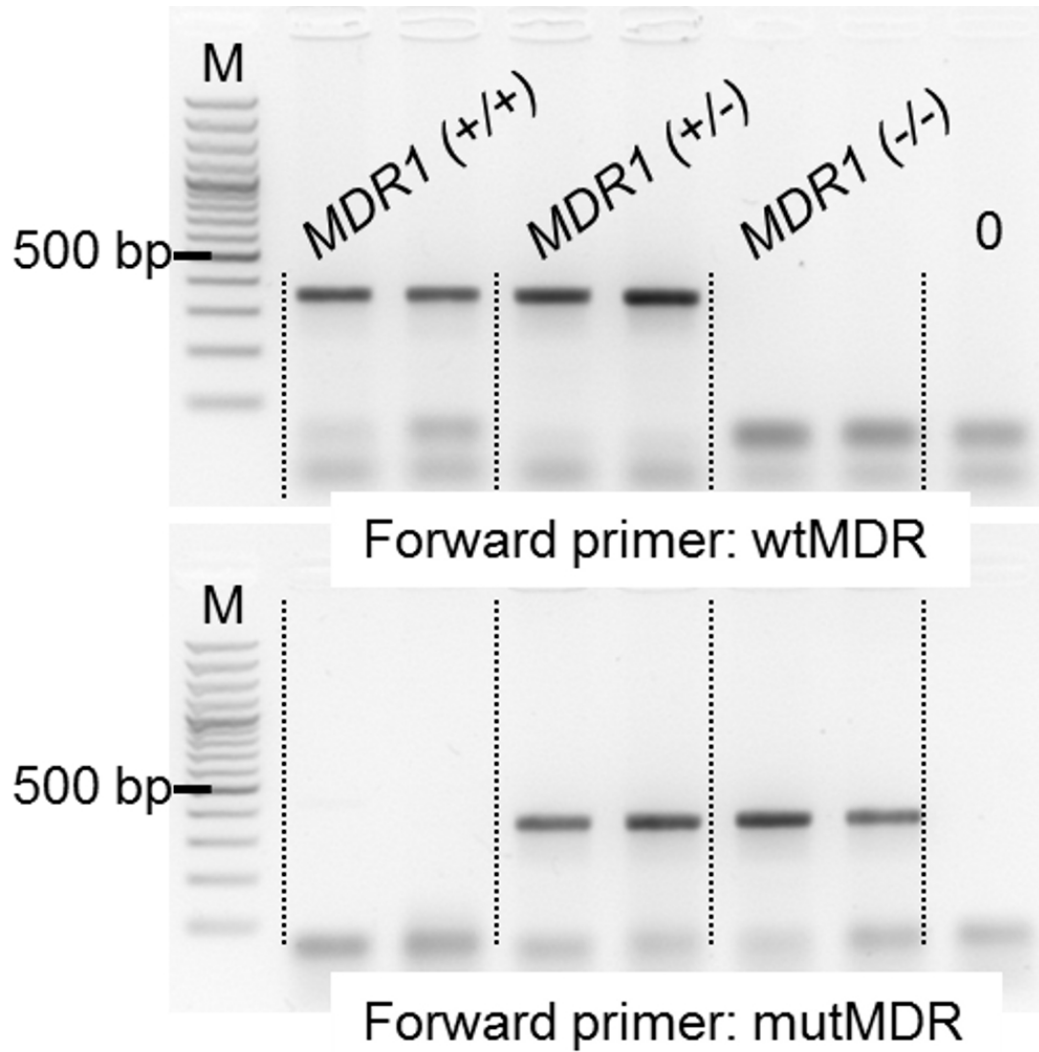


Figure 2. AS-PCR products from *MDR1* (+/+), *MDR1* (+/-) and *MDR1* (-/-) dogs using GelRed and UV light for visualization. Upper panel: Amplification with a primer specific for the wildtype allele; lower panel: Amplification with a primer specific for the mutant allele.

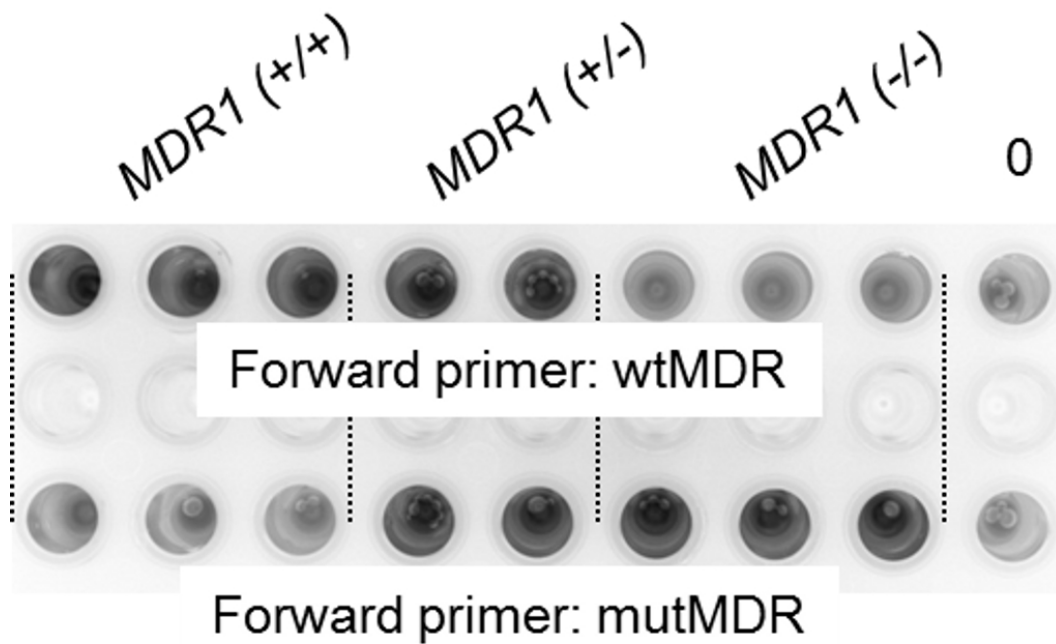
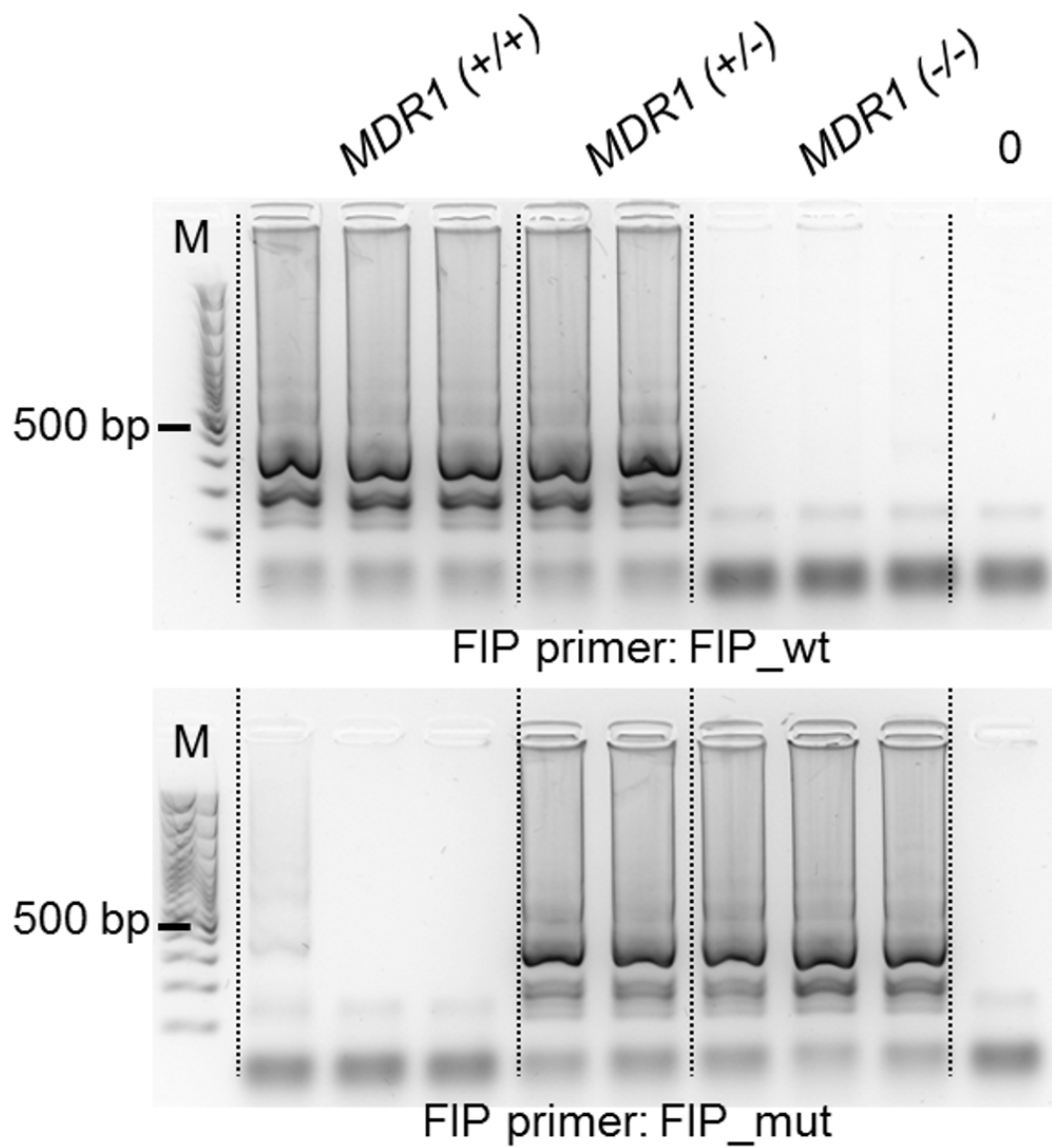


Figure 3. AS-LAMP products from MDR1 (+/+), MDR1 (+/-) and MDR1 (-/-) dogs on a 2 % agarose gel. M: 100 bp marker ladder. Upper panel: Amplification with a primer specific for the wildtype allele; lower panel: Amplification with a primer specific for the mutant allele.



IV. DISKUSSION

Die Nachfrage nach Testsystemen, die mit den Eigenschaften der POC-Diagnostik vereinbar sind, ist groß. Sie sollen günstig, schnell und auch von weniger qualifiziertem Personal durchzuführen sein. Die verwendeten Geräte sollen handlich und tragbar sein. Die DNA-Extraktion, die Vorbereitung der Reaktionsgemische und die Ergebnisdarstellung sollen einfachen Protokollen folgen.

Im diagnostischen Bereich sind als optimierte POC-Methoden vor allem SNAP-Tests bekannt, die die Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)-Technologie als antikörperbasiertes Nachweisverfahren nutzen. Es können Enzyme wie die feline und canine spezifische Pankreaslipase und Antikörper oder Antigene von Infektionserkrankungen wie Parvovirose, feliner Leukose, feliner Immundefizienz oder Reisekrankheiten erkannt werden. PCR-basierte Schnelltests sind weit weniger verbreitet, da zur Vorbereitung meist eine DNA-Extraktion durchgeführt werden muss und zur Amplifikation und Ergebnisdarstellung eine aufwendigere Technologie benötigt wird.

Die Firma Biogal stellt mit PCRTM-Systemen handliche Geräte zum Nachweis von Infektionserregern bei Tieren her. Sie vereinen isothermale Nachweismethoden mit einer einfachen Ergebnisdarstellung. Mit PCRTM lateral-flow Systemen können qualitative und mit dem PCRTM Reader qualitative und semi-quantitative Ergebnisse ermittelt werden.

In der vorliegenden Studie war das Ziel, eine Nachweismethode für den MDR1-Genstatus beim Hund zu entwickeln, die den Ansprüchen der POC-Diagnostik gerecht wird. Das Resultat soll kurze Zeit nach der Probenentnahme in der Klinik verfügbar sein, um angepasste Therapien für den jeweiligen Hund auswählen zu können.

Dafür wurde der MDR1-Genstatus erstmals mittels AS-LAMP nachgewiesen. Auch die Anwendung einer AS-PCR wurde untersucht. Diese beiden schnellen Amplifikationsmethoden wurden mit einer einfachen Probensammlung und unkomplizierten DNA-Extraktion kombiniert. Die Ergebnisdarstellung ist einfach und bedarf keiner toxischen Substanzen.

1. Probensammlung und -bearbeitung

Mittels steriler, trockener Tupfer wurden Maulschleimhautproben von Hunden entnommen. Besitzern und Züchtern, die die Proben nicht unter Aufsicht des Studienpersonals nehmen konnten, wurde eine Anleitung zur Probenentnahme zur Verfügung gestellt.

Nicht alle extrahierten Tupfer führten zu einer positiven Amplifikation, was auf unterschiedliche DNA-Mengen und/oder unterschiedliche DNA-Qualität zurück zu führen ist. Ursächlich könnten Unterschiede in der Probenentnahme, die Zeit bis zur gekühlten Lagerung und die Extraktionsmethode sein.

WALKER und Mitarbeiter (1999) führten eine Studie zur Evaluierung von Schleimhauttupferproben der Wange bei Menschen durch, welche dem Design der vorliegenden Studie ähnlich ist. So wurden ebenfalls frisch in der Klinik vom Personal genommene und per Post eingesandte, von den Probanden selbst genommene, Tupferproben verglichen. Die Tupfer wurden bei 4 °C gekühlt und anschließend mit einem einfachen Extraktionsprotokoll bearbeitet, welches, wie in der vorliegenden Studie, eine zehnminütige Erhitzung in Natriumhydroxid und ein anschließendes Zugeben von Tris-Puffer beinhaltet.

Sie stellten in der PCR eine signifikante Überlegenheit der frisch genommenen Tupfer mit einer erfolgten Amplifikation von 96,1 % zu den eingeschickten Tupfern mit 77,6 % fest. Es ist davon auszugehen, dass es sich weniger um ein Fehlen als um eine verminderte Qualität der DNA handelt, da sich die gemessenen DNA-Mengen der Extrakte nicht signifikant unterschieden. Proben, die keine Amplifikation in der PCR zeigten, wurden mit einem kommerziell erhältlichen Extraktionskit aufgereinigt und nochmals ausgewertet. Dies führte bei 58,3 % der Proben zu einer Amplifikation.

1.1. Probenentnahme

Die beschriebene unkomplizierte und schnelle Vorgehensweise der Probengewinnung sind gut mit einem POC-Test vereinbar. Probennehmer brauchen keine spezielle Ausbildung, wie es bei einer Blutprobenentnahme der Fall ist. Die Entnahme der Tupferproben erfolgte durch unterschiedliche Personen und nicht immer unter Aufsicht von Studienpersonal. Es kann daher nicht nachvollzogen werden, ob der jeweilige Tupfer lang genug über die Innenseite der

Wange gestrichen wurde, ob er mit anderem Material in Berührung kam, ob und wie lange eine Trocknung stattgefunden hat und wie lange die Dauer bis zur Übermittlung an das Studienpersonal war. Auch in der Studie zu Wangenabstrichen bei Menschen wird dieser Umstand als Problem beschrieben, welches nicht evaluierbar ist und zu einem schlechteren Amplifikationsergebnis der eingesandten Proben geführt haben könnte (WALKER et al., 1999). Die in dieser und in der vorliegenden Studie gemachten Beobachtungen führen zu der Empfehlung, die Proben wenn möglich frisch in der Klinik oder am Ort der Probenlagerung zu nehmen.

Um Störfaktoren beim experimentellen Vergleich von Proben zu minimieren, sollten die Tupfer idealerweise von derselben Person unter standardisierten Abläufen entnommen und verarbeitet werden.

Die Trocknungszeit der Tupfer nach der Entnahme könnte eine wichtige Rolle bei der Probengewinnung spielen. Einige Tupfer, die in der vorliegenden Studie eingesandt wurden, zeigten Schimmelartefakte während der Lagerung. Es ist davon auszugehen, dass eine Trocknungszeit von mindestens zehn Minuten nach der Probenentnahme solche Artefakte minimiert und die Qualität der Proben erhält. WALKER und Mitarbeiter (1999) vermuten vorerst, dass sich eine Austrocknung ihrer per Post verschickten Proben nachteilig ausgewirkt haben könnte. Bei Tupfern deren Schutzhüllen beim Versand zerbrachen, wurde jedoch keine schlechtere Amplifikationsrate zu erkannt, was die Vermutung der vorliegenden Studie stützt, dass eine Trocknung des Tupfers nicht zum DNA-Verlust sondern zur Qualitätserhaltung führt.

1.2. Lagerung von Tupferproben und Extrakten

Auch Unterschiede in der Lagerung von Proben und Extrakten könnten einen Qualitäts- oder Quantitätsverlust von DNA begünstigen. In der vorliegenden Studie variierte die Zeit von der Probenentnahme bis zum Beginn der Probenlagerung bei -20 °C stark und betrug Minuten bis mehrere Stunden. Auch die Zeit bis zur Extraktion variierte deutlich. Vereinzelt wurden Tupfer ohne vorheriges Einfrieren direkt nach der Probenentnahme extrahiert.

In anderen Studien wurden keine Unterschiede bei der Amplifikation durch die Dauer der Lagerung von Tupfern nach Ankunft im Labor bei 4 °C festgestellt. Daher besteht keine Notwendigkeit, genommene Proben zeitnah zu extrahieren

(RICHARDS et al., 1993; WALKER et al., 1999). Studien zu weiteren Lagerungsbedingungen von Baumwolltupfern zeigten, dass sich weder Hitze noch Minusgrade nachteilig auswirken. Bei in Feuchtigkeit gelagerten Tupfern wurde eine geringere DNA-Menge in der Gelelektrophorese ermittelt. Die Autoren vermuten, dass dies auf Unterschiede bei der Probensammlung zurückzuführen ist (RICHARDS et al., 1993). Da eine zu hohe Feuchtigkeit der Baumwolle bei der Probenentnahme ebenfalls zu Problemen führt, wird nach der vorliegenden Studie jedoch angenommen, dass die Feuchtigkeit bei der Lagerung zu einer Schädigung dieser Proben geführt hat. Es wird empfohlen, diesbezüglich weitere Untersuchungen anzustellen.

Betreffend der Lagerungszeit von bereits extrahierten Proben werden in einer anderen Studie zwar sogar noch nach 12 bis 36 Monaten relativ hohe (> 90 %) PCR-Erfolge erzielt. Es wird jedoch eine möglichst zeitnahe Bearbeitung der Extrakte empfohlen. Die Amplifikationsraten waren bei frischen Extrakten am besten (WALKER et al., 1999). In der vorliegenden Studie entstand ebenfalls der Eindruck, dass Extrakte nach längerer Lagerung und häufigem Auftauen und Wiedereinfrieren schlechtere Ergebnisse lieferten.

Um möglichst korrekte Vergleiche anstellen zu können, sollten Tupfer unter Studienbedingungen nach der gleichen Zeit gekühlt und extrahiert werden. Die Lagerungszeit von Tupfern und Extrakten sollte jeweils möglichst ähnlich sein, um weitere Untersuchungen zu deren Haltbarkeit durchführen zu können.

1.3. Extraktionsmethoden

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Methoden zur DNA-Extraktion aus Tupferproben durchgeführt. Vom Großteil der Proben wurde die DNA mit einem kommerziell erhältlichen Kit von QIAGEN isoliert. Es konnte eine ausreichende DNA-Menge für die AS-PCR und die AS-LAMP erzielt werden. Da diese Extraktion jedoch aufwendig ist und viel Zeit benötigt, ist das Kit für die POC-Diagnostik weniger geeignet.

Weitere Proben wurden mit einem einfachen und schnellen Protokoll bearbeitet, welches wenig Equipment benötigt und somit sehr gut mit den Ansprüchen der POC-Diagnostik vereinbar ist. Es beinhaltet eine zehnmündige Erhitzung der Tupfer in Natriumhydroxid und Pufferlösung. Es konnte weniger DNA als mit der kommerziellen Methode extrahiert werden. Diese Menge reichte zwar für die AS-

PCR, jedoch nicht für ein zuverlässiges Ergebnis mit der AS-LAMP.

2. Allel-spezifische Amplifikationsmethoden für den MDR1-Nachweis

In der vorliegenden Studie wurden für die AS-PCR und die AS-LAMP Primer mit Basen-Fehlpaarungen eingesetzt. Sie zeigten sich in den Versuchen exakt komplementären Primern in der Spezifität überlegen. Durch die stärkere Unterscheidung der Sequenzen sinkt die Komplementarität der Primer zu dem Allel, das nicht amplifiziert werden soll. Unspezifische Kreuzreaktionen werden deutlich reduziert (RUST et al., 1993). Bei jedem der in der vorliegenden Studie verwendeten, allel-spezifischen Primer wurde an dem Ende, an welchem auch die Mutation zu finden ist, eine Basen-Fehlpaarung eingebaut. So sind sowohl der mutations- als auch der wildtypspezifische Primer an diesem Ende identisch zu bereits erfolgreich zum MDR1-Nachweis beim Hund eingesetzten Primern (MIZUKAMI et al., 2012).

2.1. Allel-spezifische PCR als Nachweismethode

In der vorliegenden Studie enden beide Primer identisch und ohne weitere Basen-Fehlpaarungen am 5'-Ende nach insgesamt 20 Basen. In der beschriebenen, früheren Studie ist der Wildtyp-Primer um 29 weitere Basen länger, da sowohl die Amplifikationen für das mutierte, als auch für das Wildtyp-Allel in einem Reaktionsansatz stattfinden. In der anschließenden Gel- und Mikrochip-Elektrophorese können die Genotypen durch den deutlichen Längenunterschied der Amplifikationsprodukte unterschieden werden. In den für die Mutation spezifischen Primer wurden in dieser Studie zwei weitere Basen-Fehlpaarungen eingebaut. Der rückwärts orientierte Primer liegt näher bei der Mutationsstelle, wodurch ein deutlich kürzeres Amplifikationsprodukt entsteht, als in der vorliegenden Studie (MIZUKAMI et al., 2012).

Die Verwendung des kommerziell erhältlichen PCR-Mastermix vereinfacht und beschleunigt die Vorbereitungen der Reaktionsansätze. Da nur noch die gewünschten Primer und das Template ergänzt werden müssen, sinkt die Anzahl an Fehlerquellen beim Pipettieren. Die im Mastermix enthaltene HotStarTaq Plus Polymerase führt mit der Unterstützung eines Puffers mit neuer Formulierung zu

besonders schnellen Amplifikationszyklen, da der Annealing-Schritt verkürzt wird. Der Entstehung von Primer-Dimeren wird vorgebeugt und die Spezifität der Amplifikationsreaktion gesteigert (QIAGEN, 2017).

Der Gradient S Thermocycler von Eppendorf bietet eine übersichtliche Handhabung und verringert durch die schnelle Temperaturanpassung die Amplifikationszeit. Der finanzielle Aufwand für die Anschaffung dieses Geräts lässt sich aber nicht mit einem Schnelltest vereinbaren. Da bei der untersuchten AS-PCR die exakte Wiederholung des definierten Temperaturprofils unumgänglich ist, kann das Gerät aber nicht durch eine ausreichend günstigere und dabei qualitativ gleichgestellte Variante ersetzt werden.

Das Interesse an der klassischen PCR im Bereich der POC-Diagnostik sinkt im Laufe der Zeit. Isothermale Amplifikationsmethoden sind durch ihre einfachen Protokolle und Geräte benutzerfreundlicher, während sie meist schnellere Ergebnisse liefern. Die Anwendung der PCR in mikrofluidischen Systemen ist zwar möglich, aber durch die sich ständig wiederholende, präzisen Temperaturprofile erschwert. Das Design solcher Systeme ist sehr energieaufwendig und umfangreich (CRAW & BALACHANDRAN, 2012).

2.2. Allel-spezifische LAMP als Nachweismethode

Vorteile der LAMP sind die übersichtliche Handhabung mit einfachem Equipment, der verhältnismäßig geringe Kosten- und Arbeitsaufwand, die schnelle Durchführbarkeit und die sehr hohe Genauigkeit der Ergebnisse (CRAW & BALACHANDRAN, 2012). In der vorliegenden Studie wird die Vermutung aufgestellt, dass diese hohe Leistung der LAMP stark von den Voraussetzungen der zu amplifizierenden Sequenz und der genauen Anpassung des Primer-Sets abhängig ist. Das herausfordernde Primer-Design der LAMP stellt sich in der vorliegenden Studie als Nachteil dar und wurde auch von anderen Autoren als Problem erkannt (CRAW & BALACHANDRAN, 2012). Durch die im Gegensatz zur PCR hohe Anzahl an Primern ist es schwierig, alle bereits erwähnten, gewünschten Bedingungen einzuhalten. Kürzere Sequenzen können problematisch werden, wenn die empfohlenen Basen-Abstände zwischen den Primern nicht mehr eingehalten werden können. Auch die Verteilung von GC- und AT-reichen Regionen, sowie die Verteilung der Basen (Palindrome, hohe Wiederholungsraten der Basen) können die Platzierung von Primern erschweren.

Mit einer höheren Anzahl an Primern, die mit unterschiedlichen Orientierungen einhergehen, entsteht auch eine höhere Anzahl an Fehlerquellen. Zwar wird der Forscher von der Design-Software "PrimerExplorer" unterstützt, indem meist mehrere Primer-Sets nach voreingestellten Anforderungen vorgeschlagen werden. Trotzdem werden meist nicht alle Vorgaben eingehalten und der Forscher sollte die Primer manuell überprüfen. Da die durch den "PrimerExplorer" erstellten Primer-Sets keine sicher zuverlässige Leistung bringen, haben andere Autoren bereits weitere Untersuchungen zur Optimierung von Design-Software angestellt (KIMURA et al., 2011).

In der vorliegenden Studie wurden Versuche mit unterschiedlichen Primer-Sets durchgeführt, bei denen die Mutationsstelle im F3 oder im BIP lokalisiert ist. Obwohl diese Möglichkeiten im PrimerExplorer-Benutzerhandbuch von Eiken Chemical Co. Ltd. für die spezifische Detektion von Mutationen beschrieben werden, konnten keine erfolgreichen Amplifikationsprotokolle mit ihnen erstellt werden. Variationen betreffend der Mutationsstelle in den Primern führten zu stark schwankenden Ergebnissen. Kombinationen, die lediglich die vier Grundprimer (FIP, BIP, F3, B3) nach Vorschlägen des Primer Designers enthielten, führten nicht zu reproduzierbaren und zufriedenstellenden Ergebnissen. Obwohl theoretisch alle Forderungen für eine sensitive und spezifische Reaktion erfüllt wurden, konnten häufig unspezifische Amplifikationen und Primer-Dimere ermittelt werden. Da auch häufig bei Kontrollproben ohne Template Amplifikationen stattfanden, scheinen die Primer eine zu hohe Komplementarität zueinander gehabt zu haben.

Nach einer weiteren Empfehlung des Benutzerhandbuchs zur Erhöhung der Spezifität wurde das 5'-Ende des FIP (Region F1c) an die Mutationsstelle platziert. Dieses wurde, wie oben beschrieben, durch den Einbau der Basen-Fehlpaarungen ergänzt (MIZUKAMI et al., 2012). Beide allel-spezifischen Primer erreichen eine Sensitivität von 100 %. Der Wildtyp-Primer führt jedoch durchgehend früher zu spezifischen Amplifikationen als der Primer für das mutierte Allel und arbeitet mit dieser höheren Amplifikationsrate effizienter. Der Reaktionsansatz für das mutierte Allel benötigt zur Amplifikation aller gesuchten Proben eine längere Laufzeit als der Ansatz für das Wildtyp-Allel. Bei einer Laufzeit von 75 Minuten finden sowohl in den Reaktionsansätzen für das Wildtyp- als auch für das mutierte Allel unspezifische Amplifikationen statt. Eine

Angleichung der Amplifikationsraten beider Ansätze durch eine Veränderung des FIP fürs das mutierte Allel mit daraus resultierender Leistungsverbesserung sollte in folgenden Untersuchungen vorgenommen werden. So könnte nach einer definierten Zeitspanne eine Endpunktanalyse der Amplifikationsreaktion durchgeführt und unspezifische Reaktionen unterbunden werden.

Da die MDR1-Sequenz des Hundes im Design bereits für die Anzahl der Grundprimer eine Herausforderung darstellte, wurden als weitere Ergänzung Stem-Primer gewählt. Diese sind einfacher in der Sequenz zu platzieren und haben keine Nachteile gegenüber Loop-Primern (GANDELMAN et al., 2011). Durch diese Primer wurde die Spezifität der AS-LAMP gesteigert, denn es wurden weniger unspezifische Amplifikationen verzeichnet. Beide Stem-Primer befanden sich in Vorwärts-Orientierung zwischen dem FIP und BIP. Die erfolgreichen Reaktionsansätze mit dem Verzicht auf äußere Primer in einer früheren Studie konnten in den vorliegenden Untersuchungen nicht nachvollzogen werden (GANDELMAN et al., 2011). Beim Fehlen von F3 und B3 zeigte, im Gegensatz zum gleichen Versuchsaufbau mit dem kompletten Primer-Set, nur einer von vier gewünschten Reaktionsansätzen eine geringe Amplifikationsrate. Daher wird bei der AS-LAMP zum MDR1-Nachweis beim Hund empfohlen, äußere Primer in Kombination mit Stem-Primern zu den inneren Primern zu verwenden.

In der vorliegenden Studie wurden mehrere unterschiedliche Reaktionsmischungen untersucht. Bevor Versuche mit dem isothermalen Mastermix durchgeführt wurden, wurden unterschiedliche Konzentrationszusammensetzungen von HNB, Puffer, Magnesiumsulfat, Betain, Desoxyribonukleosidtriphosphaten, Primern, DNA-Polymerase, Wasser und Template untersucht. Als Polymerasen wurden die Bst DNA Polymerase, Large Fragment und die Bst 2.0 DNA Polymerase untersucht, welche beide zuverlässig funktionierten. Die Bst 2.0 DNA Polymerase zeichnet sich in anderen Studien durch eine erhöhte Amplifikationsgeschwindigkeit, Thermostabilität und Toleranz zu Salzen, welche während der Amplifikation entstehen, aus (TANNER et al., 2012). In der vorliegenden Studie konnten keine sensitiveren oder spezifischeren Ergebnisse mit der Bst 2.0 DNA Polymerase erzielt werden.

Der isothermale Mastermix beinhaltet die GspSSD DNA Polymerase, Large Fragment, welche eine ausgezeichnete Strangverdrängungsaktivität und keine

Exonuklease-Aktivität besitzt. Sie führt zu einer höheren Amplifikationsrate als die Bst DNA Polymerase (OPTIGENE, 2017). In den vorliegenden Untersuchungen kann die hohe Amplifikationsrate bestätigt werden. Alle spezifischen Amplifikationen fanden innerhalb von 50 Minuten statt.

Eine Verlängerung der Amplifikationszeit (90 - 120 Minuten) und eine Temperaturerhöhung (bis 65 °C) führten im Allgemeinen zu einer höheren Amplifikationsrate aber auch zu vermehrten unspezifischen Amplifikationen. Eine Verkürzung der Amplifikationszeit (30 Minuten) und eine Temperaturabsenkung (bis 58 °C) führten zu einer schlechteren Sensitivität. Temperaturen zwischen 61 °C und 63 °C erzielten sensitive, spezifische und reproduzierbare Ergebnisse.

Es wurden schon mehrere mikrofluidische Systeme (Lab-on-a-Chip-Tests) entwickelt, welche die LAMP einsetzen. Der Vorteil der voll verschlossenen Systeme liegt in der Reduzierung der Kontaminationsgefahr für die Proben und in der örtlichen Flexibilität durch die geringe Größe. Es werden geringere Volumina von Proben und Reagenzien benötigt (CRAW & BALACHANDRAN, 2012; ZANOLI & SPOTO, 2012). Solch ein Mikrochip-Test könnte auch die Zukunft des MDR1-Nachweises in der Praxis sein. Es wurde bereits ein Lab-on-a-Chip-Test zur Diagnose von Salmonellen in Lebensmitteln mittels LAMP entwickelt, für den keine vorhergehende DNA-Extraktion als separater Schritt nötig ist (SUN et al., 2015).

Die Verwendung von HyBeacon-Oligonukleotiden stellt eine Alternative für die Genotypisierung mittels allel-spezifischer Primer dar. HyBeacons sind mit Fluoreszenzfarbstoff markierte, zielspezifische Oligonukleotide, durch welche mittels Analyse der Schmelzkurven oder Annealing-Kurven sogar SNP unterschieden werden können. Die Amplifikation findet in einem Ansatz statt. Auf eine darauf folgende Bearbeitung der Amplifikate zur Detektion kann verzichtet werden. HyBeacons binden spezifisch nur an die gesuchte, amplifizierte Sequenz und nicht an unspezifische Amplifikate oder Primer-Dimere (HOWARD et al., 2015).

3. Ergebnisdarstellung der allel-spezifischen Nachweismethoden für den MDR1-Gendefekt

Ein Ziel der vorliegenden Studie war die Kombination der untersuchten allel-spezifischen Nachweismethoden mit einer unkomplizierten Visualisierung der Ergebnisse. Dafür können direkte oder indirekte Detektionsmethoden verwendet werden.

3.1. Ergebnisdarstellung bei der allel-spezifischen PCR

Die Ergebnisdarstellung mittels Gelelektrophorese brachte zwar eindeutige Ergebnisse für alle Proben, ist als Schnelltest aber aufgrund des hohen Aufwandes an Zeit und Materialien unbrauchbar.

Dagegen stellt die Detektion mittels des interkalierenden Farbstoffs GelRed unter UV-Licht eine gute Alternative dar. Die Durchführung ist einfach und die Unterscheidung von negativen und positiven Reaktionen bei einer hohen Menge an produzierter DNA leicht. Proben, die mit der einfachen Erhitzung in Puffer extrahiert werden, können nicht mit dieser Methode untersucht werden. Aufgrund der zu geringen Menge an gebildeten Amplifikaten können positive und negative Reaktionen nicht mit bloßem Auge unterschieden werden.

Es wurde eine Möglichkeit zur Visualisierung geringerer DNA-Mengen, wie sie durch die einfache Extraktionsmethode entstehen, veröffentlicht (siehe Abbildung 7). Das Verfahren hat eine zehnfach höhere Sensitivität als die Detektion mit Agarose-Gelelektrophoresen. Bei der Amplifikation kommen ein mit Biotin markierter Primer und mit unterschiedlicher Einzelstrang-DNA und Platzhalter markierte, spezifische Primer zum Einsatz. Nach der Amplifikation wird das PCR-Produkt mit einem Farbstoff und einer weiteren Lösung gemischt und der Nachweisstreifen 15 Minuten darin eingetaucht. Dieser wurde zuvor an unterschiedlichen Lokalisationen mit den jeweils zum Einzelstrang komplementären Oligonukleotiden bedruckt. Die Einzelstrang-DNA der Proben bindet nach einer positiven Amplifikation an diesen Oligonukleotiden auf dem Streifen. Das gegenüberliegende Biotin verbindet sich mit einem Farbstoff und wird so auf dem Streifen sichtbar (MONDEN et al., 2014). Für den MDR1-Nachweis könnten die allel-spezifischen Vorwärts-Primer mit dem Platzhalter und einer unterschiedlichen Einzelstrang-DNA verbunden werden, während der gemeinsame Rückwärts-Primer mit Biotin markiert wird. Auf dem

Nachweistreifen würden je eine Lokalisation für das mutierte und das Wildtyp-Allel mit dem jeweils zum Einzelstrang komplementären Oligonukleotid bedruckt werden. Die komplette Amplifikation könnte in einem Ansatz stattfinden. Dadurch wird nicht nur Zeit und Material gespart, sondern auch eine einfache Ermittlung des Ergebnisses erzielt, da der Genotyp anhand der aufleuchtenden Bereiche direkt auf dem Nachweistreifen abgelesen werden kann. Diesbezügliche Untersuchungen der AS-PCR mit einfach extrahierten Proben sind anzuraten.

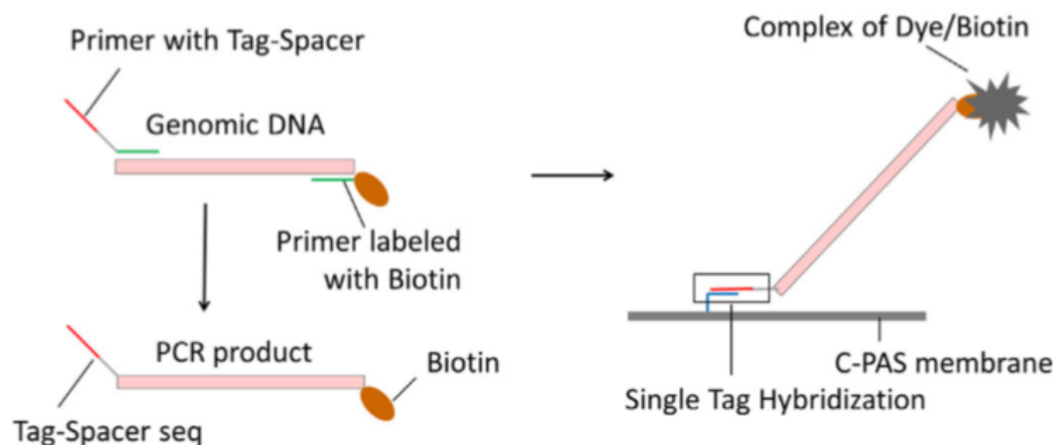


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Amplifikation und Detektion mit Einzelstranghybridisierungen auf Teststreifen. Links: Amplifikation mit Einzelstrang-DNA- und Biotin-markierten Primern. Rechts: Detektion des Farbsignals. Die auf den Nachweistreifen gebundene komplementäre Sequenz zur Einzelstrang-DNA fixiert das Amplifikat. Der zugegebene Farbstoff führt zur Färbung beim Vorhandensein von Biotin (MONDEN et al., 2014). Für den Abdruck ist nach Angaben des Rechteinhabers keine Genehmigung erforderlich.

3.2. Ergebnisdarstellung bei der allel-spezifischen LAMP

Es ist wünschenswert, die Reaktionsgefäße nach der Amplifikation nicht nochmals zu öffnen, um die Ergebnisse der AS-LAMP abzulesen.

Aufgrund der in Abschnitt 2.2 beschriebenen unterschiedlichen Effizienz und Spezifität der Primer, konnte in der vorliegenden Studie keine Endpunkt-Analyse der Ergebnisse nach einem definierten Zeitpunkt erfolgen. Die Ermittlung des MDR1-Genotyps erfolgte daher anhand der Messung von Amplifikationskurven. Die benötigten Zyklen oder Zeiten der Fluoreszenzsignale bis zur Überschreitung einer festgelegten Schwelle wurden verglichen. So konnten die Proben dem jeweiligen Genotyp zugeordnet werden. Nicht nur die spezifischen, sondern auch die unspezifischen Signale des Wildtyp-Primers treten früher auf als die des

Primers für das mutierte Allel. So liegt das spezifische Signal bei MDR1(-/-)-Proben zeitlich sehr nah am unspezifischen Signal des Wildtyp-Primers. Allerdings erscheint das unspezifische Signal des Wildtyp-Primers immer mindestens drei Minuten später als das spezifische Signal des Mutations-Primers. Bei MDR1(+/-)-Proben liegen zwischen dem spezifischen Wildtyp-Signal und dem späteren unspezifischen Signal des Primers für das mutierte Allel mindestens 18 Minuten. Bei MDR1(+/-)-Proben erscheinen die beiden spezifischen Signale im Abstand von maximal 11 Minuten, wobei der Wildtyp-Primer hier aufgrund der besseren Effizienz immer früher zu Amplifikationen und daher zu messbaren Fluoreszenzsignalen führt. Alle Genotypen konnten so zuverlässig unterschieden werden.

Weitere Untersuchungen mit den unter Abschnitt 2.2 beschriebenen HyBeacon-Oligonukleotiden zur MDR1-Diagnostik sollten durchgeführt werden. Dabei sind nach der Amplifikation keine weiteren Arbeitsschritte erforderlich. Das Ergebnis wird anhand der Schmelz- oder Annealing-Kurven abgelesen, wobei für jedes Allel ein spezifischer Peak bei einer Temperatur zu erwarten ist.

Es sind POC-Testgeräte verfügbar, die die Amplifikationsreaktion und Evaluierung der Ergebnisse vereinen. Der verwendete Mastermix für isothermale Amplifikationen wurde für die tragbaren Amplifikationsgeräte der Genie®-Reihe von OptiGene entwickelt. Diese Geräte erlauben die gleichzeitige Detektion der Produkte durch Evaluierung der Amplifikationskurven.

Der Vergleich von Amplifikationskurven kann für unerfahrene Personen schwierig sein und ist für den Gebrauch in tierärztlichen Kliniken oder Praxen nicht praktikabel. Die Bestimmung eines klaren positiven oder negativen Ergebnisses auf einen Blick ist erstrebenswert. Der PCRTM Reader von Biogal zeigt dem Benutzer während der isothermalen real-time Amplifikation neben den Amplifikationskurven auch eine Unterscheidung in positive und negative Ergebnisse an.

Die Verwendung von Calcein zur Detektion hat den Vorteil, dass es schon vor Beginn der Amplifikation ins Reaktionsgefäß gegeben wird. Die Visualisierung mit Calcein zeigt aber eine geringere Sensitivität als die Detektion mit SYBR Green I. Wenn SYBR Green I direkt zum Reaktionsgemisch gegeben wird, hemmt es die Amplifikationsreaktion (GOTO et al., 2009; TAO et al., 2011). Zu

Beginn der Amplifikation könnte auch eine Wachskapsel, die mit SYBR Green I gefüllt ist, ins Reaktionsgefäß gegeben werden. Die Kapsel bleibt während der gesamten LAMP intakt. Anschließend wird die Wachs-Kapsel durch Erhitzung geschmolzen und SYBR Green I gelangt zum Amplifikationsgemisch. Auf diesem bildet das Wachs nach dem Erkalten eine Schutzschicht und reduziert die Kontaminationsgefahr für die Umgebung. Eine Unterscheidung von positiven und negativen Proben kann im sichtbaren Licht, besser aber im UV-Licht oder im blauen Licht einer modifizierten Taschenlampe gemacht werden (TAO et al., 2011).

Zukünftige Detektionsmethoden kommen ohne weitere Geräte zur Ablesung der Ergebnisse, wie es bei der Fluoreszenzdetektion der Fall ist, aus. Bei den folgenden Methoden sind die Ergebnisse mit bloßem Auge abzulesen. Da bereits zu Beginn alle benötigten Reagenzien ins Amplifikationsgefäß gegeben werden, entfällt ein weiterer Arbeitsschritt und die Kontaminationsgefahr für die Proben und die Umgebung sinkt.

Der Ausfall von Magnesiumpyrophosphat kann bei erfolgter Amplifikation als Trübung wahrgenommen werden (MORI et al., 2001). Bei einer großen Menge an gebildeten Amplifikaten ist diese Trübung gut zu erkennen. Nach dem Zentrifugieren setzen sich die Präzipitate als Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes ab, was auch in den Versuchen der vorliegenden Studie beobachtet werden konnte. Allerdings ist diese Art der Detektion bei geringeren Trübungen fehleranfällig. Wird so wenig DNA amplifiziert, dass eine positive Reaktion mit dem bloßen Auge nicht mehr sichtbar ist, müssen sensitivere Detektionsmethoden zum Einsatz kommen.

Eine weitere Möglichkeit wäre die Detektion mit pH-sensitiven Farbstoffen. Diese sollten keinen Einfluss auf die Amplifikation haben. Da als Nebenprodukt bei fortschreitender Amplifikation nicht nur Pyrophosphat, sondern auch Wasserstoff-Ionen entstehen, sinkt der pH-Wert im Laufe der LAMP und kann durch den Farbumschlag des Indikators gemessen werden. Die verwendeten Polymerasen arbeiten trotz der geringen Pufferzugabe zuverlässig (TANNER et al., 2015).

Die Visualisierung der Ergebnisse mittels HNB als Metall-Ionen-Indikator für Mg^{2+} ist eine weitere Option (GOTO et al., 2009). In der vorliegenden Studie wurden mit diesem Indikator mehreren Ansätze mit unterschiedlichen

Reaktionsbedingungen (Temperatur, Dauer, Zusammensetzung) untersucht. Ein wichtiger Parameter für den Zeitpunkt der Umfärbung ist die Konzentration von Magnesiumsulfat im Reaktionsansatz. Bei einer großen gebildeten DNA-Menge war in der vorliegenden Studie ein deutlicher Unterschied zwischen dem ursprünglichen Lila und dem positiven Himmelblau zu erkennen. Probleme ergeben sich bei geringeren Amplifikationsmengen. Während in der Kontroll-Gelelektrophorese deutliche Banden zu erkennen waren, war eine Umfärbung des Indikators mit bloßem Auge oft nicht oder nur leicht sichtbar. Diese Beobachtungen werden von anderen Autoren geteilt (HARPER et al., 2010). Teilweise konnte vor einer Umfärbung nach Himmelblau die Bildung eines Pellets nach dem Zentrifugieren registriert werden, weshalb die Visualisierung mittels HNB in dieser Studie als zu wenig sensitiv eingestuft wird. Nach Optimierung der Primer zur Steigerung der Effizienz und Spezifität sollten weitere Versuche mit der LAMP in Kombination mit HNB vorgenommen werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Studie wurden die allel-spezifische PCR (AS-PCR) und die allel-spezifische Loop-mediated Isothermal Amplification (AS-LAMP) auf ihre Eignung als neue Nachweismethoden für den MDR1-Gendefekt beim Hund untersucht. Ziel war die Etablierung eines Verfahrens, welches den Ansprüchen eines Point-of-Care (POC)-Tests gerecht wird. Hunden mit bekanntem MDR1-Genstatus wurden Backenschleimhautzellen mittels trockenen, sterilen Baumwolltupfern für die DNA-Gewinnung entnommen. Es wird empfohlen, die frisch genommenen Tupfer ausreichend zu trocknen und die Extraktion und weitere Untersuchungen möglichst zeitnah durchzuführen.

Für die AS-PCR kann eine einfache Erhitzung der Tupferproben in Tris-Puffer als DNA-Extraktionsmethode Anwendung finden. Die Ergebnisse werden mittels Gelelektrophorese der PCR-Produkte ermittelt. Eine einfachere und schnellere Ergebnisdarstellung ohne Gelelektrophorese gelingt mittels UV-Licht nach Zugabe eines interkalierenden Farbstoffes ins Probengefäß. Dafür wird jedoch eine größere DNA-Menge im Reaktionsansatz benötigt, welche nur mit aufwendigeren Extraktionsverfahren wie Kieselgel-Säulen zur DNA-Aufreinigung erreicht wird. Die AS-PCR kann zügig und unkompliziert unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Mastermix durchgeführt und somit in der MDR1-Diagnostik eingesetzt werden. Weitere Untersuchungen über die Ergebnisermittlung geringerer DNA-Mengen, wie sie mit dem einfacheren Extraktionsverfahren entstehen, sollten durchgeführt werden.

Die AS-LAMP stellt durch ihr konstantes Temperaturprofil eine gute Möglichkeit für weniger spezialisierte Labore dar, da die Amplifikation auch in einem einfachen Heizblock durchgeführt werden kann. Auch hier wird die Vorbereitungszeit durch einen kommerziell erhältlichen, isothermalen Mastermix reduziert. Die im Vergleich zum Wildtyp-Primer geringere Effizienz und Spezifität des Primers für das mutierte Allel sollten in folgenden Untersuchungen verbessert werden, um unspezifische Amplifikationen zu minimieren. In der vorliegenden Studie werden zur Unterscheidung des MDR1-Genstatus Amplifikationskurven verglichen. Zukünftige Untersuchungen sollten sich auf eine unkomplizierte Ermittlung der Ergebnisse, ebenfalls ohne eine Öffnung der

Reaktionsgefäße nach der Amplifikation, konzentrieren. Die AS-LAMP könnte so für POC-Analysen von genetischen Mutationen eingesetzt werden.

VI. SUMMARY

The present study investigated two new methods for MDR1 genotyping in dogs: the allele-specific PCR (AS-PCR) and the allele-specific Loop-mediated Isothermal Amplification (AS-LAMP). The aim of the study was to create a test that complies with the scientific standards of point-of-care (POC) diagnostics. Buccal epithelial cells from dogs with known MDR1 genotype were taken with sterile dry cotton swabs for DNA isolation. It is recommended to dry freshly taken samples thoroughly before storage. Extraction and further processing should be performed immediately if possible.

For AS-PCR, simple heating of the cotton swabs in Tris-buffered saline can be used as DNA extraction method. The results are determined by gel electrophoresis. Easier and faster visualization of results without gel electrophoresis can be achieved using UV light after adding an intercalating dye to the amplified sample. However, this method depends on higher DNA concentrations in the starting material, which can only be achieved using more time-consuming and more expensive silica-based DNA extraction kits. Using a commercially available master mix makes the AS-PCR a simple and rapid method for MDR1 genotyping. Further research is necessary for visualization of lower DNA concentrations that are yielded by the simple extraction method.

AS-LAMP is a good option for lower-equipped laboratories. Due to the constant temperature profile, amplification can be performed on a simple heat block. Preparation time is reduced by using a commercial isothermal master mix. In comparison to the wild-type primer, the primer for the mutant allele shows less efficiency and specificity. It should be improved in further investigations to minimize unspecific amplification. In the present study, amplification curves are compared to define MDR1-genotypes. Further studies should focus on the straightforward detection of results, preferably without the need to open the reaction tubes after amplification. Accordingly, AS-LAMP could be employed for POC-analyses of genetic mutations.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Aliotta JM, Pelletier JJ, Ware JL, Moran LS, Benner JS, Kong H. Thermostable Bst DNA polymerase I lacks a 3'→ 5' proofreading exonuclease activity. *Genetic analysis: biomolecular engineering* 1996; 12: 185-95.

Baars C, Leeb T, von Klopmann T, Tipold A, Potschka H. Allele-specific polymerase chain reaction diagnostic test for the functional MDR1 polymorphism in dogs. *The Veterinary Journal* 2008; 177: 394-7.

Badolo A, Okado K, Guelbeogo WM, Aonuma H, Bando H, Fukumoto S, Sagnon N, Kanuka H. Development of an allele-specific, loop-mediated, isothermal amplification method (AS-LAMP) to detect the L1014F kdr-w mutation in *Anopheles gambiae* s. l. *Malaria journal* 2012; 11: 227.

Bishop B, Bruce C, Evans N, Goudie A, Gration K, Gibson S, Pacey M, Perry D, Walshe N, Witty M. Selamectin: a novel broad-spectrum endectocide for dogs and cats. *Veterinary parasitology* 2000; 91: 163-76.

Campbell W, Fisher M, Stapley E, Albers-Schonberg G, Jacob T. Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. *Science* 1983; 221: 823-8.

Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Casals D, Rittman-Grauer L, Biedler JL, Melamed MR, Bertino JR. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1989; 86: 695-8.

Craw P, Balachandran W. Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: a critical review. *Lab on a Chip* 2012; 12: 2469-86.

Dalton WS, Grogan TM, Meltzer PS, Scheper RJ, Durie B, Taylor CW, Miller TP, Salmon SE. Drug-resistance in multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma: detection of P-glycoprotein and potential circumvention by addition

of verapamil to chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology* 1989; 7: 415-24.

Eiken Chemical Co. L. http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/snps_index.html.
08.12.2016:

Eiken Chemical Co. L. *A Guide to LAMP primer designing (Manual)*. 2016;

Fecht S, Wöhlke A, Hamann H, Distl O. Analysis of the Canine *mdr1*-1 Δ Mutation in the Dog Breed Elo. *Journal of Veterinary Medicine Series A* 2007; 54: 401-5.

Fischbach J, Xander NC, Frohme M, Glokler JF. Shining a light on LAMP assays--a comparison of LAMP visualization methods including the novel use of berberine. *BioTechniques* 2015; 58: 189-94.

Fojo A, Ueda K, Slamon D, Poplack D, Gottesman M, Pastan I. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1987; 84: 265-9.

Gandelman O, Jackson R, Kiddle G, Tisi L. Loop-mediated amplification accelerated by stem primers. *International journal of molecular sciences* 2011; 12: 9108-24.

Gerlach JH, Endicott JA, Juranka PF, Henderson G, Sarangi F, Deuchars KL, Ling V. Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance. *Nature* 1986; 324: 485-9.

Geyer J, Döring B, Godoy J, Moritz A, Petzinger E. Development of a PCR-based diagnostic test detecting a nt230 (del4) MDR1 mutation in dogs: verification in a moxidectin-sensitive Australian Shepherd. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 2005; 28: 95-9.

Geyer J, Klintzsch S, Meerkamp K, Wöhlke A, Distl O, Moritz A, Petzinger E.

Detection of the nt230 (del4) MDR1 mutation in White Swiss Shepherd dogs: case reports of doramectin toxicosis, breed predisposition, and microsatellite analysis. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 2007; 30: 482-5.

Geyer J, Janko C. Treatment of MDR1 mutant dogs with macrocyclic lactones. *Current pharmaceutical biotechnology* 2012; 13: 969.

Goto M, Honda E, Ogura A, Nomoto A, Hanaki K-I. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *BioTechniques* 2009; 46: 167-72.

Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annual review of biochemistry* 1993; 62: 385-427.

Gramer I, Leidolf R, Döring B, Klintzsch S, Krämer E-M, Yalcin E, Petzinger E, Geyer J. Breed distribution of the nt230 (del4) MDR1 mutation in dogs. *The Veterinary Journal* 2011; 189: 67-71.

Gros P, Neriah YB, Croop JM, Housman DE. Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance. *Nature* 1986a; 323: 728-31.

Gros P, Croop J, Roninson I, Varshavsky A, Housman DE. Isolation and characterization of DNA sequences amplified in multidrug-resistant hamster cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1986b; 83: 337-41.

Gros P, Fallows D, Croop J, Housman D. Chromosome-mediated gene transfer of multidrug resistance. *Molecular and cellular biology* 1986c; 6: 3785-90.

Gros P, Croop J, Housman D. Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins. *Cell* 1986d; 47: 371-80.

Guan G, Chauvin A, Luo J, Inoue N, Moreau E, Liu Z, Gao J, Thekiso OM, Ma M, Liu A. The development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of *Babesia* spp. infective to sheep and goats in China. *Experimental parasitology* 2008; 120: 39-44.

Harper S, Ward L, Clover G. Development of LAMP and real-time PCR methods for the rapid detection of *Xylella fastidiosa* for quarantine and field applications. *Phytopathology* 2010; 100: 1282-8.

Hirayama H, Kageyama S, Takahashi Y, Moriyasu S, Sawai K, Onoe S, Watanabe K, Kojiya S, Notomi T, Minamihashi A. Rapid sexing of water buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos using loop-mediated isothermal amplification. *Theriogenology* 2006; 66: 1249-56.

Hopper K, Aldrich J, Haskins SC. Ivermectin toxicity in 17 collies. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2002; 16: 89-94.

Howard RL, French DJ, Richardson JA, O'Neill CE, Andreou MP, Brown T, Clark D, Clarke IN, Holloway JW, Marsh P. Rapid detection of diagnostic targets using isothermal amplification and HyBeacon probes—A homogenous system for sequence-specific detection. *Molecular and cellular probes* 2015; 29: 92-8.

Hugnet C, Bentjen S, Mealey K. Frequency of the mutant MDR1 allele associated with multidrug sensitivity in a sample of collies from France. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 2004; 27: 227-9.

Ikeda S, Takabe K, Inagaki M, Funakoshi N, Suzuki K. Detection of gene point mutation in paraffin sections using in situ loop-mediated isothermal amplification. *Pathology international* 2007; 57: 594-9.

Inaba M, Kobayashi H, Sakurai Y, Johnson RK. Active efflux of daunorubicin and adriamycin in sensitive and resistant sublines of P388 leukemia. *Cancer research* 1979; 39: 2200-3.

Jaroenram W, Kiatpathomchai W, Flegel TW. Rapid and sensitive detection of white spot syndrome virus by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *Molecular and cellular probes* 2009; 23: 65-70.

Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1976; 455: 152-62.

Kaneko H, Kawana T, Fukushima E, Suzutani T. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *Journal of biochemical and biophysical methods* 2007; 70: 499-501.

Kartner N, Evernden-Porelle D, Bradley G, Ling V. Detection of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell lines by monoclonal antibodies. *Nature* 1985; 316: 820-3.

Kimura Y, De Hoon MJ, Aoki S, Ishizu Y, Kawai Y, Kogo Y, Daub CO, Lezhava A, Arner E, Hayashizaki Y. Optimization of turn-back primers in isothermal amplification. *Nucleic acids research* 2011; 39: e59-e.

Klitzsch S, Meerkamp K, Döring B, Geyer J. Detection of the nt230 [del4] MDR1 mutation in dogs by a fluorogenic 5' nuclease TaqMan allelic discrimination method. *The Veterinary Journal* 2010; 185: 272-7.

Kwok S, Kellogg D, McKinney N, Spasic D, Goda L, Levenson C, Sninsky J. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic acids research* 1990; 18: 999-1005.

Lankas GR, Cartwright ME, Umbenhauer D. P-glycoprotein deficiency in a subpopulation of CF-1 mice enhances avermectin-induced neurotoxicity. *Toxicology and applied pharmacology* 1997; 143: 357-65.

Lewis S, Akgün E, Jasin M. Palindromic DNA and Genome Stability: Further Studies. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1999; 870: 45-57.

Mair G, Vilei EM, Wade A, Frey J, Unger H. Isothermal loop-mediated amplification (LAMP) for diagnosis of contagious bovine pleuro-pneumonia. *BMC veterinary research* 2013; 9: 108.

Mealey K, Bentjen S, Gay J, Cantor G. Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. *Pharmacogenetics and Genomics* 2001; 11: 727-33.

Mealey K. Therapeutic implications of the MDR-1 gene. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 2004; 27: 257-64.

Mealey K, Munyard K, Bentjen S. Frequency of the mutant MDR1 allele associated with multidrug sensitivity in a sample of herding breed dogs living in Australia. *Veterinary parasitology* 2005; 131: 193-6.

Mealey K, Gay J, Martin L, Waiting D. Comparison of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in MDR1-1 Δ and MDR1 wildtype dogs. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 2007; 17: 61-6.

Minnucci G, Amicarelli G, Salmoiraghi S, Spinelli O, Montalvo MLG, Giussani U, Adlerstein D, Rambaldi A. A novel, highly sensitive and rapid allele-specific loop-mediated amplification assay for the detection of the JAK2V617F mutation in chronic myeloproliferative neoplasms. *haematologica* 2012; 97: 1394-400.

Mizukami K, Chang H-S, Yabuki A, Kawamichi T, Hossain MA, Rahman MM, Uddin MM, Yamato O. Rapid genotyping assays for the 4–base pair deletion of canine MDR1/ABCB1 gene and low frequency of the mutant allele in Border Collie dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2012; 24: 127-34.

Monden Y, Takasaki K, Futo S, Niwa K, Kawase M, Akitake H, Tahara M. A

rapid and enhanced DNA detection method for crop cultivar discrimination. *Journal of biotechnology* 2014; 185: 57-62.

Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochemical and biophysical research communications* 2001; 289: 150-4.

Mori Y, Kitao M, Tomita N, Notomi T. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *Journal of biochemical and biophysical methods* 2004; 59: 145-57.

Mori Y, Hirano T, Notomi T. Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymers. *BMC biotechnology* 2006; 6: 3.

Mori Y, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *Journal of infection and chemotherapy* 2009; 15: 62-9.

Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and cellular probes* 2002; 16: 223-9.

Neff MW, Robertson KR, Wong AK, Safra N, Broman KW, Slatkin M, Mealey KL, Pedersen NC. Breed distribution and history of canine *mdr1-1Δ*, a pharmacogenetic mutation that marks the emergence of breeds from the collie lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101: 11725-30.

Nemoto M, Imagawa H, Tsujimura K, Yamanaka T, Kondo T, Matsumura T. Detection of equine rotavirus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Journal of Veterinary Medical Science* 2010; 72: 823-6.

Njiru Z, Mikosza A, Matovu E, Enyaru J, Ouma J, Kibona S, Thompson R, Ndung'u J. African trypanosomiasis: sensitive and rapid detection of the sub-genus *Trypanozoon* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of parasite DNA. *International journal for parasitology* 2008; 38: 589-99.

Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research* 2000; 28: e63-e.

OptiGene. GspSSd LF DNA Polymerase. 2017:
<http://www.optigene.co.uk/gspssd-lf-dna-polymerase/>.

Parida M, Sannarangaiah S, Dash PK, Rao P, Morita K. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Reviews in medical virology* 2008; 18: 407-21.

Pulliam J, Seward R, Henry R, Steinberg S. Investigating ivermectin toxicity in Collies. *Veterinary medicine (USA)* 1985;

QIAGEN. QIAGEN Fast Cycling PCR Kit. 2017:
<https://www.qiagen.com/us/shop/pcr/end-point-pcr-enzymes-and-kits/regular-pcr/qiagen-fast-cycling-pcr-kit/#productdetails>.

Richards B, Skoletsky J, Shuber AP, Balfour R, Stern RC, Dorkin HL, Parad RB, Witt D, Klinger KW. Multiplex PCR amplification from the CFTR gene using DNA prepared from buccal brushes/swabs. *Human molecular genetics* 1993; 2: 159-63.

Riordan JR, Ling V. Purification of P-glycoprotein from plasma membrane vesicles of Chinese hamster ovary cell mutants with reduced colchicine permeability. *Journal of Biological Chemistry* 1979; 254: 12701-5.

Roulet A, Puel O, Gesta S, Lepage J-F, Drag M, Soll M, Alvinerie M, Pineau T. MDR1-deficient genotype in Collie dogs hypersensitive to the P-glycoprotein substrate ivermectin. *European journal of pharmacology* 2003; 460: 85-91.

Rust S, Funke H, Assmann G. Mutagenically separated PCR (MS-PCR): a highly specific one step procedure for easy mutation detection. *Nucleic acids research* 1993; 21: 3623-9.

Schinkel A, Smit J, Van Tellingen O, Beijnen J, Wagenaar E, Van Deemter L, Mol C, Van der Valk M, Robanus-Maandag E, Te Riele H. Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 1994; 77: 491-502.

See A, McGill S, Rasis A, Swindells K. Toxicity in three dogs from accidental oral administration of a topical endectocide containing moxidectin and imidacloprid. *Australian veterinary journal* 2009; 87: 334-7.

See YP, Carlsen SA, Till JE, Ling V. Increased drug permeability in Chinese hamster ovary cells in the presence of cyanide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1974; 373: 242-52.

Sun Y, Quyen TL, Hung TQ, Chin WH, Wolff A, Bang DD. A lab-on-a-chip system with integrated sample preparation and loop-mediated isothermal amplification for rapid and quantitative detection of *Salmonella* spp. in food samples. *Lab on a Chip* 2015; 15: 1898-904.

Tanner NA, Zhang Y, Evans Jr TC. Simultaneous multiple target detection in real-time loop-mediated isothermal amplification. *BioTechniques* 2012; 53: 81-9.

Tanner NA, Zhang Y, Evans Jr TC. Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. *BioTechniques* 2015; 58: 59-68.

Tao Z-Y, Zhou H-Y, Xia H, Xu S, Zhu H-W, Culleton RL, Han E-T, Lu F, Fang

Q, Gu Y-P. Adaptation of a visualized loop-mediated isothermal amplification technique for field detection of *Plasmodium vivax* infection. *Parasites & vectors* 2011; 4: 115.

Tappin S, Goodfellow M, Peters I, Day M, Hall E, Mealey K. Frequency of the mutant MDR1 allele in dogs in the UK. *Veterinary Record* 2012; 171: 72.

Tatsuta T, Naito M, Oh-Hara T, Sugawara I, Tsuruo T. Functional involvement of P-glycoprotein in blood-brain barrier. *Journal of Biological Chemistry* 1992; 267: 20383-91.

Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1987; 84: 7735-8.

Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature protocols* 2008; 3: 877-82.

Tranquilli WJ, Paul A, Todd K. Assessment of toxicosis induced by high-dose administration of milbemycin oxime in collies. *American Journal of Veterinary Research* 1991; 52: 1170-2.

Umbenhauer DR, Lankas GR, Pippert TR, Wise LD, Cartwright ME, Hall SJ, Beare CM. Identification of a P-glycoprotein-deficient subpopulation in the CF-1 mouse strain using a restriction fragment length polymorphism. *Toxicology and applied pharmacology* 1997; 146: 88-94.

Walker AH, Najarian D, White DL, Jaffe J, Kanetsky PA, Rebbeck TR. Collection of genomic DNA by buccal swabs for polymerase chain reaction-based biomarker assays. *Environmental health perspectives* 1999; 107: 517.

Zanoli LM, Spoto G. Isothermal amplification methods for the detection of nucleic acids in microfluidic devices. *Biosensors* 2012; 3: 18-43.

VIII. ANHANG

1. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Schema zur Primer-Anordnung und deren Design für die LAMP inkl. zusätzlicher Loop-Primer. Durch C gekennzeichnete Abschnitte stellen die komplementäre Sequenz zur gegenüberliegenden Region dar (PARIDA et al., 2008).* 12
- Abbildung 2: LAMP - Schema der ersten Amplifikationsschritte (TOMITA et al., 2008).* 13
- Abbildung 3: Grundprinzip des Mutationsnachweises mittels Wildtyp-Primer. Die Mutationsregion liegt im 5'-Ende des FIP und BIP. Bei Präsenz des Wildtyps wird die hantelförmige DNA-Struktur amplifiziert. Falls die Mutation vorliegt, findet keine Amplifikation statt. Modifiziert nach (EIKEN CHEMICAL CO., 08.12.2016)* 15
- Abbildung 4: Beispiele für die Verwendung von rückwärts-orientierten Primern. A) Vermeidung von Basen-Fehlpaarungen nahe des 3'-Endes. B) Vermeidung von Haarnadelbildungen am 3'-Ende C) Vermeidung von Primer-Dimer-Entstehung. Modifiziert nach GANDELMAN et al. (2011).*..... 16
- Abbildung 5: LAMP-Produkte in der Gelelektrophorese. M = Marker, Linie 1 - 5: positive LAMP-Reaktionen. Die Amplifikation ergibt zahlreiche, unterschiedlich lange DNA-Fragmente.* 17
- Abbildung 6: Übersicht über direkte und indirekte Methoden zum Nachweis von Amplifikationsprodukten bei der LAMP. A) Vereinfachte chemische Formel der LAMP, Me^{2+} bedeutet Metall-Ionen (Mg^{2+} oder Mn^{2+}). B) Indirekte Nachweise von Nebenprodukten der LAMP. Oben: Trübung durch die Entstehung von Präzipitaten aus Magnesium-pyrophosphat. Mitte: Farbwechsel des Metall-Ionen-Indikators HNB durch die abnehmende Konzentration freier Mg^{2+} . Unten: Fluoreszenzsignale von Calcein durch den Austausch von Mn^{2+} zu Mg^{2+} . Alle indirekten Methoden sind mit bloßem Auge zu erkennen. C) Direkte*

Nachweismethoden von amplifizierter DNA nach der LAMP durch SYBR Green I, EvaGreen und Berberin. Alle Farbstoffe können für real-time Analysen verwendet werden (FISCHBACH et al., 2015)..... 19

Abbildung 7: Schematische Darstellung der Amplifikation und Detektion mit Einzelstranghybridisierungen auf Teststreifen. Links: Amplifikation mit Einzelstrang-DNA- und Biotin-markierten Primern. Rechts: Detektion des Farbsignals. Die auf den Nachweisstreifen gebundene komplementäre Sequenz zur Einzelstrang-DNA fixiert das Amplifikat. Der zugegebene Farbstoff führt zur Färbung beim Vorhandensein von Biotin (MONDEN et al., 2014)..... 49

2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Anteil der MDRI-Allele nach Rasse, USA (NEFF et al., 2004). 9

Tabelle 2: Anteil der MDRI-Allele nach Rasse, Deutschland (GRAMER et al., 2011). 9

IX. DANKSAGUNG

Ich danke meiner Doktormutter Frau Priv.-Doz. Dr. Karin Weber für die Überlassung des interessanten Themas, für die intensive Zusammenarbeit und wissenschaftliche Betreuung der gesamten Dissertation. Ich bedanke mich herzlich für ihre Vorbereitungen, ihr außerordentliches Engagement und ihre große Hilfe bei der gemeinsamen Arbeit im Labor. Weiter bedanke ich mich für ihre unermüdliche Geduld sowie ihre konstruktive Unterstützung bei der Erstellung der Publikation und des Manuskripts. Ihre persönlichen und fachlichen Ratschläge waren für mich auch bei der Präsentation der Forschungsarbeit auf der InnLab 2015 sehr hilfreich.

Bei Frau Prof. Dr. Katrin Hartmann möchte ich mich für die Ermöglichung der Promotion und Mitarbeit an der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München bedanken.

Herzlichen Dank an alle Oberärzte, Residents, Interns, Doktoranden und Mitarbeiter der Medizinischen Kleintierklinik für die Hilfe bei der Beschaffung der Proben und die unvergessliche, schöne und lehrreiche Zeit.

Ich danke den Hundebesitzern für die Teilnahme an der Studie.

Mein größter Dank gebührt meinen lieben Eltern für die bedingungslose und immerwährende Unterstützung und Fürsorge. Sie haben mir das Studium und die Doktorarbeit ermöglicht und mich selbstlos und geduldig in meinem Weg bestärkt. Auch meinem Freund und meinen Freunden danke ich für ihr stets offenes Ohr und die lieben Worte.