

2 Materialien und Methoden

2.1 Patienten und Kontrollkollektive

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Kollektiv von insgesamt 46 Patienten mit einer klinisch gesicherten dilatativen Kardiomyopathie (DCM) ausgewählt. Eine koronare Herzerkrankung, eine Myokarditis, eine arterielle Hypertonie und eine valvuläre Herzerkrankung wurden als Ursache für die Entstehung und für die Progression der DCM ausgeschlossen.

Das ausgewählte Patientenkollektiv setzt sich aus unverwandten, überwiegend deutschenstämmigen Patienten des Deutschen Herzzentrums Berlin (DHZB) zusammen. 17 % der ausgewählten Patienten sind weiblich ($n = 8$) und 83 % männlich ($n = 38$). Das Durchschnittsalter bei Diagnosestellung war 29 ± 8 Jahre. Die Diagnose wurde anhand von echokardiographischen Untersuchungen, Koronarangiographien und in einigen Fällen durch zusätzliche Endomyokardbiopsien gestellt.

Die Diagnose DCM wurden mittels der Kriterien linksventrikuläre Ejektionfraktion (LVEF) ≤ 50 %, fraktionierte Verkürzung (FS) ≤ 27 % und linksventrikuläre enddiastolische Dimension (LVEDD) $\geq 2,7$ cm/m² Körperoberfläche (KO) gestellt.

Die für diese Arbeit ausgewählten Patienten zeigten eine LVEF von 22 ± 8 %, eine FS von 14 ± 7 % und eine LVEDD von $3,7 \pm 0,7$ cm/m² KO.

Als Kontrollkollektiv wurden unverwandte, nach eigenen Angaben gesunde Blutspender verwendet.

Alle Patienten wurden über den Zweck der molekulargenetischen Untersuchungen aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Verwendung ihres genetischen Materials.

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Charité, der Humboldt-Universität Berlin genehmigt.

2.2 Materialien

2.2.1 Geräte

Autoclav

Varioclav Typ 500, H&P Labortechnik, München

Elektrophoresekammern	Horizon [®] 58, Gibco BRL, Eggenstein Multilong, Typ G 47, Biometra, Göttingen
Geldokumentationsanlage	Fluor-Imager [™] SI-Scanner
Laborwaage	Typ 1712004, Sartorius, Göttingen
Magnetrührer	Typ MR 3001 K, Heidolph, München
Mikrowelle	Micromat, AEG Typ EEH 8733
Photometer	Smart Spec [™] 3000, BioRad, München
Sequenzierer	ABI Prism [™] 310 DNA- Sequenzierer, Perkin Elmer, Weiterstadt
Spannungsgeräte	Elektrophoresis Power Supply, Pharmacia Biotech, Freiburg
Thermocycler	Gene Amp PCR System 9600, Perkin Elmer, Weiterstadt
Vortex Mixer	Typ REAX 2000, Heidolph, München
Wasserbad	Typ WB 7, Memmert, Schwabach
Zentrifugen	Tischzentrifuge Typ 5417 R, Eppendorf, Hamburg Megafuge 1.0 R, Heraeus Instruments, Berlin

2.2.2 Chemikalien

2.2.2.1 DNA-Aufarbeitung

Merck, Darmstadt	Ammoniumchlorid, Chloroform, Ethanol(70%), Isopropanol, Kaliumhydrogencarbonat, Natriumchlorid, Natriumperchlorat, Tris-HCL, Titriplex [®] III (Ethylendinitrilotetraessigsäure), Natronlauge
Sigma, Taufkirchen	Triton X 100

2.2.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Invitrogen, Karlsruhe	Magnesiumchlorid, 10x PCR- Puffer, dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
Braun, Melsungen	Aqua ad injectabilia

2.2.2.3 Agarose-Gele

Biozym, Hameln	Agarose Universal
----------------	-------------------

	Sigma, Taufkirchen	Ethidiumbromid
	Merck, Darmstadt	Bromphenolblau, Borsäure, Titriplex [®] III, Tris Base
	Pharmacia, Freiburg	Ficoll [®] 400
2.2.2.4	SSCP-Gele	
	Amresco [®] , Ohio, USA	Acryl- 40 Solution, Bis- 2 Solution, Ammoniumpersulfat (APS), 0.1 % Tetramethylethyldiamid (TEMED)
	Merck, Darmstadt	Borsäure, Bromphenolblau (0.1%), Formamid, Titriplex [®] III, Tris Base
2.2.2.5	RFLP-Analyse	
	MBI Fermentas, Vilnius	BSA
	BioLabs, New England	NEBuffer 1, NEBuffer 4, Y ⁺ /Tango Buffer

2.2.3 Enzyme und Längenstandards

2.2.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Invitrogen, Karlsruhe Taq- DNA- Polymerase, 100 bp- DNA- Ladder

2.2.3.2 RFLP-Analyse

BioLabs, New England Restriktionsendonukleasen: *Aat* II, *Eae*I, *Hga*I, *Hga*II und *Nla*III

MBI Fermentas, Vilnius Restriktionsendonuklease *Bfm*I

2.2.4 Sonstiges

2.2.4.1 SSCP-Analyse

Biometra, Göttingen Glasplattensystem Multigel- Long, Größe 110x120x1mm mit fixiertem Spacer und U-Dichtung

2.2.4.2 Sequenzierung

ABI Perkin Elmer,

Weiterstadt Big-Dye DNA Sequencing Kit Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction[™]

Pharmacia	Seqhadex G 50 [®] Säule
InViTek, Berlin	Invisorb [®] Spin PCRapid Kit

2.2.5 Synthetische Oligonukleotide (Primer)

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer wurden mit Hilfe des Computerprogramms „Primer“ (Genetics Computer Group, Inc., Wisconsin, USA (Version 5.0)) ausgewählt.

Für das *MYBPC3* wurde die von Carrier, L. et al. (1997) veröffentlichte Sequenz (Y10129) verwendet.

Für das α - Tropomyosin wurde die mRNA-Sequenz XM029494 gegen das Genom geblastet (NT_010194.16), um die Intronsequenzen zu erhalten.

Die Primer wurden von den Firmen Applied Biosystems (Weiterstadt) und Invitek GmbH (Berlin) synthetisiert.

Die Charakteristika der Primer mit ihrer Sequenz, Nukleotidposition, Fragmentgröße und Annealingtemperatur sind in den nachfolgenden Tabellen aufgeführt.

Die Primer wurden so ausgewählt, dass sie eine PCR-Fragmentlänge von 160-300 Basenpaaren amplifizieren. Die Primer wurden so designt, dass sie die angrenzenden Introns in einem Bereich von 30-50 Bp mit amplifizieren; dadurch war es möglich, gleichzeitig die Spleißstellen zu untersuchen. Weitere Parameter zur Auswahl der Primer waren eine Schmelztemperatur von 57-63 °C, eine Primerlänge von 18–24 Nukleotiden, ein GC-Gehalt von 40-60 % und eine möglichst geringe Sekundärstrukturbildung und 3'-Selbstkomplementarität.

Primer	Primersequenz	Nukleotid-Position	Fragmentgröße bp	Annealingtemperatur
6 F	5'-ATT ACA GGC CTG AGC CAC C-3'	4067-4085	291	72 °C
6 R	5'-GAG GTA GGA GAC CAG GAC CC-3'	4338-4357		
7 F	5'-CAT GAA TGG GCA AGT CTG TG-3'	4706-4725	210	66 °C
7 R	5'-GAA GGG CCT CAG ACT CCA G-3'	4897-4915		
8 F	5'-GAG TCT GAG GCC CTT CAG G-3'	4900-4918	259	64 °C
8 R	5'-GGG AGA AAG GGA CAC TAG CC-3'	5139-5158		
9 F	5'-CCT GCT CCT AAT CCC TTT CC-3'	5177-5196	223	64 °C
9 R	5'-TCA GAG AGG TGC AGT GTT GTG-3'	5379-5399		
10 F	5'-AGG GTC TAC CAG GTC GGC-3'	5589-5606	234	64 °C
10 R	5'-GAC TCA CCC CTG TCC GTG-3'	5805-5822		

11 F	5'-AGG TGG CCA TAC CTC TCA TG-3'	6013-6032	265	56 °C
11 R	5'-CAG GAC CAA GGA GCT GTA GC-3'	6258-6277		
12 F	5'-ACA GCC TAG ACT GCG GGA C-3'	6323-6341	268	68 °C
12 R	5'-GGC TAA CCT ATG CCC TCT CC-3'	6571-6590		
13 F	5'-CCA GCC ACA GCC ACA GTA G-3'	8119-8137	275	64 °C
13 R	5'-AGG AGG CAA GGC TAT GGG-3'	8376-8393		
14 F	5'-CTC TCT GGG CCT AAT TTC CC-3'	8443-8462	263	60 °C
14 R	5'-CTT GGC ACC GAT GGA CTC-3'	8688-8705		
15 F	5'-GGG GCA CAG GGA TTA TCA C-3'	8594-8612	282	66 °C
15 R	5'-GGT GAG CAT GAG GGT TGG-3'	8858-8875		
16 F	5'-AAC CTG GGG AGG AGA TGG-3'	8829-8846	296	56 °C
16 R	5'-GTA TTT GAA GGT CTC CTC CCG-3'	9104-9124		
17 F	5'-AGA GGC CAC AGC ACT TGC-3'	9042-9059	290	60 °C
17 R	5'-TTG CCT GCT CCC CTA CAG-3'	9314-9331		
18 F	5'-CCT CCA CAG GGA TTC ACG-3'	9600-9617	299	58 °C
18 R	5'-CCC TGT GTC TCT CTC TGT CTC C-3'	9877-9898		
19 F	5'-TCA GAA TAC CAA CAA GCC AGG-3'	10462-10482	247	63 °C
19 R	5'-ACC CTA CCC TGG AGC AGG-3'	10691-10708		
20 F	5'-AGC CTG CTC CAG GGT AGG-3'	10689-10706	161	58 °C
20 R	5'-AAC CAA GAC TCA GGG GCC-3'	10832-10849		
21 F	5'-CCC CAG TGA CCT GTG CTC-3'	11969-11986	263	58 °C
21 R	5'-CTT GGC TGG TTC CAC ACA C-3'	12213-12231		
22 F	5'-GGC AAG GTG GGC AGT GTG G-3'	12313-12331	228	62 °C
22 R	5'-TGA AAG ACA AAC GAT CCT CCT CC-	12518-12540		
23 F	5'-TCC TGG GTC TGA CTT GGA TC-3'	13092-13111	292	62 °C
23 R	5'-TTG TCG AGT GGC TGA ATG AG-3'	13364-13383		
24 F	5'-GGC TGA TGT GGG TCC ATC-3'	13990-14007	281	62 °C
24 R	5'-GTA GCT CTT CTT CTT CTT GCG C-3'	14249-14270		
25 F	5'-TTC CAG ACC AGA GCT GCC-3'	14202-14219	295	60 °C
25 R	5'-GAG CAC CTG CTA TTA TTG GAG G-3'	14475-14496		
26 F	5'-GAG TCT AGG GCA TGG ATC TCC-3'	15598-15618	248	60 °C
26 R	5'-TGT TCT TCC TTT GGG GAG G-3'	15827-15845		
27 F	5'-CAG TGG GAG TGG GGT GTC-3'	16406-16423	271	60 °C
27 R	5'-TCA ATG GCG GGT CTT GTG-3'	16659-16676		
28 F	5'-GCT CTC TGG GCC TTG TCT C-3'	17575-17593	227	58 °C
28 R	5'-TAT AGC CTC TCT CCC CTG GG-3'	17782-17801		
29 F	5'-ATC CAG GTT CAG GGT TAA GC-3'	17891-17910	264	65 °C
29 R	5'-ACA AGG GGG CTC AAG GAG-3'	18137-18154		
30 F	5'-GTC AGG AGG CGT GGT GAC-3'	18305-18322	260	58 °C
30 R	5'-GGA CAG TGA AGG GTA GCT GC-3'	18545-18564		
31 F	5'-GCT CTC GGC ATC AGG AAG-3'	18647-18664	280	63 °C
31 R	5'-TCT CCC TGT TCC CAC AGC-3'	18909-18926		
32 F	5'-AGG GGC CTA GCT TTG TGT G-3'	18926-18944	264	56 °C
32 R	5'-GGA GAG GAC TGC TCA ACG TC-3'	19170-18189		
33 F	5'-GGC TTC CCT CCC TCT CTT TA-3'	19389-19408	300	62 °C
33 R	5'-GAG GAC AAC GGA GCA AAG C-3'	19670-19688		
34 F	5'-GCT TTG CTC CGT TGT CCT C-3'	19670-19688	194	62 °C
34 R	5'-ACT TGT GCC CTG GGT GTC-3'	19846-19863		

Tab. 2.1: Charakteristika der Primerpaare für die SSCP- Analyse im kodierenden Bereich des *MYBPC3*-Gens

Primer	Primersequenz	Nukleotid-Position	Fragmentgröße bp	Annealingtemperatur
2 F	5'-TCC CTG TAC CCC CTG GCC AA-3'	2228-2247	188	62 °C
2 R	5'-CGC GGA TCC GGG AAG CAG TGT GAG CGT GC-3'	2387-2415		
3 F	5'-CCC AGC CAT TTC CTG AAG CTA CCA-3'	15142-15165	252	66 °C
3 R	5'-CCA CCA GGA AAG GCA GCT GCA AAA G-3'	15369-15393		
4 F	5'-GGC CAC AGC AGT GCA GTG TGC ATT T-3'	17716-17740	249	66 °C
4 R	5'-GGC TGT CCT GAA GGC CAC TGC T-3'	17944-17964		
5 F	5'-CCA TGC CCT TCT GTT ACA CAA AGC-3'	19031-19054	212	56 °C
5 R	5'-TGC CAG AAG GTC ATG CTG TTT AGT C-3'	19218-19242		
6 F	5'-TTG GCT TGT CTC CCA CCC TT-3'	19897-19916	179	58 °C
6 R	5'-GGC CTC TTT TGA GCA GCT CTT AAA AG-3'	20050-20075		
7 F	5'-GAG TAG ATT GAG CAG CAG CTT GAC A-3'	20393-20417	191	58 °C
7 R	5'-ATG AAA AGG CCT GAC CGG TTC CAT G-3'	20558-20583		
8 F	5'-CCC TAT GTT TGT AGC TAC AGG AAA C-3'	20740-20764	241	62 °C
8 R	5'-AGT GCA AAG GAG CGT ATC AAT GTG G-3'	20956-20980		
9 F	5'-TCT GCC TTC CAC TTC CTG GT-3'	22267-22286	180	58 °C
9 R	5'-CAA GGA GGC ATG GTG GTG AGT TTA-3'	22423-22446		

Tab. 2.2: Charakteristika der Primerpaare für die SSCP- Analyse im kodierenden Bereich des α -Tropomyosin-Gens

2.3 Methoden

2.3.1 Methodischer Überblick

Im Rahmen dieser Dissertation wurden die kodierenden Genregionen des *MybPC3*-Gens (Exon 6 bis Exon 34) und des α -Tropomyosin-Gens (Exon 2 bis Exon 9) in dem oben beschriebenen Patientengut (n = 46) auf genetische Varianten untersucht. Zu diesem Zweck wurde die PCR-, SSCP-, RFLP-Analyse und die Sequenzierung eingesetzt.

Zu Beginn wurden die Exone mittels PCR mit exonflankierenden Primern amplifiziert. Anschließend wurde eine SSCP-Analyse der einzelnen Fragmente bei Raumtemperatur und bei 4 ° C durchgeführt. Nach einer durchschnittlichen Dauer von 16 Stunden wurde das Gel mittels SYBR-GoldTM gefärbt und auf Laufmusterabweichungen hin geprüft. Bei Vorliegen einer Abweichung wurde eine erneute Amplifikation und SSCP – Analyse des Exons des betreffenden Patienten durchgeführt. Konnte die Laufmusterabweichung verifiziert werden, wurde das entsprechende Fragment des Patienten sequenziert und sofern möglich, wurde die Variante mit einer zweiten Methode (RFLP-Analyse) gesichert.

Alternativ, bei Fehlen entsprechender Enzyme, wurde eine erneute Sequenzierung aus einem unabhängigen PCR-Produkt durchgeführt.

2.3.2 Isolierung und Aufarbeitung der DNA

Die genomische DNA wurde aus Leukozyten mittels modifizierten Protokolls, nach standardisierter Aussalzmethode ((Miller et al. (1988)), wie folgt isoliert:

1. Mittels EDTA antikoaguliertes Frischblut wird mit der dreifachen Menge an Frischlysispuffer (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃ + 0,1 mM EDTA) versetzt, 15 Minuten auf Eis lysiert und im Anschluss für 10 Minuten bei 3000 rpm und 4°C zentrifugiert.
2. Der Überstand wird vorsichtig abgossen und das am Boden entstandene Leukozytenpellet wird kurz mit 2 ml Frischlysispuffer aus einer Pasteurpipette gespült.
3. Das Pellet wird in einem Kernlysispuffer (400 mM Tris-HCL, 60 mM EDTA, 150 mM NaCl + 1 % SDS) vollständig resuspendiert.
4. Das gelöste Pellet wird nun mit 3,6 M Na-Perchlorat versetzt.
5. Nach Chloroformzugabe und erneuter Zentrifugation (3000 rpm für 5 Minuten) wird der Überstand vorsichtig, ohne Interphase, in ein neues Falconröhrchen abpipettiert.
6. Durch die Zugabe von eisgekühltem Isopropanol erfolgt die Präzipitation der DNA. Diese wird mittels Glaspasteurpipette separiert, in 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und anschließend in 400 µl TE-Puffer gelöst.

Die Konzentration und Reinheit der DNA wird im Anschluss durch photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm bestimmt. Die Endkonzentration wird dann auf 20 ng/µl eingestellt.

2.3.3 Genamplifikation mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) nach Mullis et al. (1987) können selektiv Teilsequenzen eines Gens amplifiziert und vervielfältigt werden. Es handelt sich bei dem Verfahren um eine Reaktion, die mehrere Zyklen umfasst. Bei jedem neuen Reaktionszyklus verdoppelt sich die Anzahl der DNA-Kopien. Um den Bereich einzugrenzen, den man amplifizieren will, sind zwei synthetisch hergestellte Oligonukleotide, so genannte Primer notwendig. Diese rahmen den

DNA-Abschnitt ein. Der Vorwärts-Primer wird komplementär zur entsprechenden Sequenz am 3'-Ende des Antisense-Stranges und der Rückwärts-Primer wird komplementär zur Sequenz am 5'-Ende des Sense-Stranges ausgewählt (Saiki et al. (1988); Orita et al. (1989)).

Um optimale PCR-Ergebnisse zu erzielen, ist es notwendig die optimalen Bedingungen (Annealingtemperatur, Primermenge und Menge der DNA) jedes Primerpaars experimentell zu ermitteln.

Ein PCR-Standardansatz mit einem Gesamtvolumen von 25 μl enthielt folgende Reagenzien:

2,5 μl	10 x PCR – Puffer (10 mM Tris – HCl, 50 mM KCl)
0,75 μl	MgCl ₂ (50 mM)
4,0 μl	dNTPs (jeweils 200 μM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
0,2 μl	Taq-Polymerase (5 U/ μl)
1 μl	Vorwärts-Primer (10 pmol/ μl)
1 μl	Rückwärts-Primer (10 pmol/ μl)
1 –5 μl	DNA (20 ng/ μl)
ad 25 μl	Aqua bidest

Die PCR-Reaktion wurde in einem Thermozykler (Perkin Elmer Amp 9600) nach folgendem Standardprotokoll durchgeführt:

	Funktion	Dauer	Temperatur
1.	Initiale Denaturierung:	5 Minuten	94 °C
2.	35 Zyklen:		
	1. Denaturierung:	20 Sekunden	94 °C
	2. Annealing:	20 Sekunden	siehe Tabelle 2.1 & 2.2
	3. Elongation:	20 Sekunden	72 °C
3.	Finale Elongation:	5 Minuten	72 °C

2.3.4 Agarosegel-Elektrophorese

Zur Überprüfung der Spezifität und Qualität der PCR-Produkte wurden sie auf ein 1,2%iges Agarosegel aufgetragen.

0,4	g	Agarose
30	ml	1 x TBE
2,5	µl	Ethidiumbromid (0,7 µg/µl)

4 µl des Amplifikates wurden mit 2 µl Agaroseladepuffer (5fach TBE, 20 % Ficoll[®] 400, 0,1 %iges Bromphenolblau + Aqua ad inject.) versetzt, auf das Gel aufgetragen und bei 120 Volt für 20 Minuten in einer Elektrophoresekammer in einem 1fach TBE-Puffer (0,1 M Tris Base, 0,1 M Borsäure, 0,002 M Titriplex[®] III) aufgetrennt. Die mit Ethidiumbromid gefärbte DNA wurde auf einem Transilluminator unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografisch mit Hilfe einer Videodokumentationsanlage dokumentiert.

Zum Ausschluss von Kontaminationen wurde bei jedem PCR-Ansatz eine Negativkontrolle, ohne DNA als Substrat, zusammen mit den DNA-Proben amplifiziert und auf das Agarosegel aufgetragen.

2.3.5 Einzelstrangkonnformationsanalyse (Single-strand conformation polymorphism- (SSCP-) analysis)

Zur Identifikation von Mutationen und Polymorphismen wurde die SSCP-Analyse durchgeführt. Die SSCP-Analyse ist eine sensitive, zuverlässige und kostengünstige Methode zur Detektion von Veränderungen in genomischen Sequenzen (Orita et al. (1989)). Bei entsprechenden Elektrophoresebedingungen lassen sich in PCR-Produkten mit einer Basenpaarlänge von 150 bis 300 70-97 % der Mutationen identifizieren (Grompe (1993)). Um eine möglichst hohe Sensitivität zu erzielen, wurde die Analyse bei Raumtemperatur und bei 4°C durchgeführt.

Bereits Unterschiede von einer Base in der DNA-Sequenz führen durch Veränderung der Sekundärstrukturen zu einem Unterschied im Laufverhalten von Wildtyp und mutierter DNA, woraus eine Abweichung im Bandenmuster der Mutante resultiert (Orita et al. (1989); Condie et al. (1993); Glavac et al. (1993)).

An die SSCP-Analyse wurde eine Sequenzierung angeschlossen, die der Bestimmung der Position und der Art der Mutation diente.

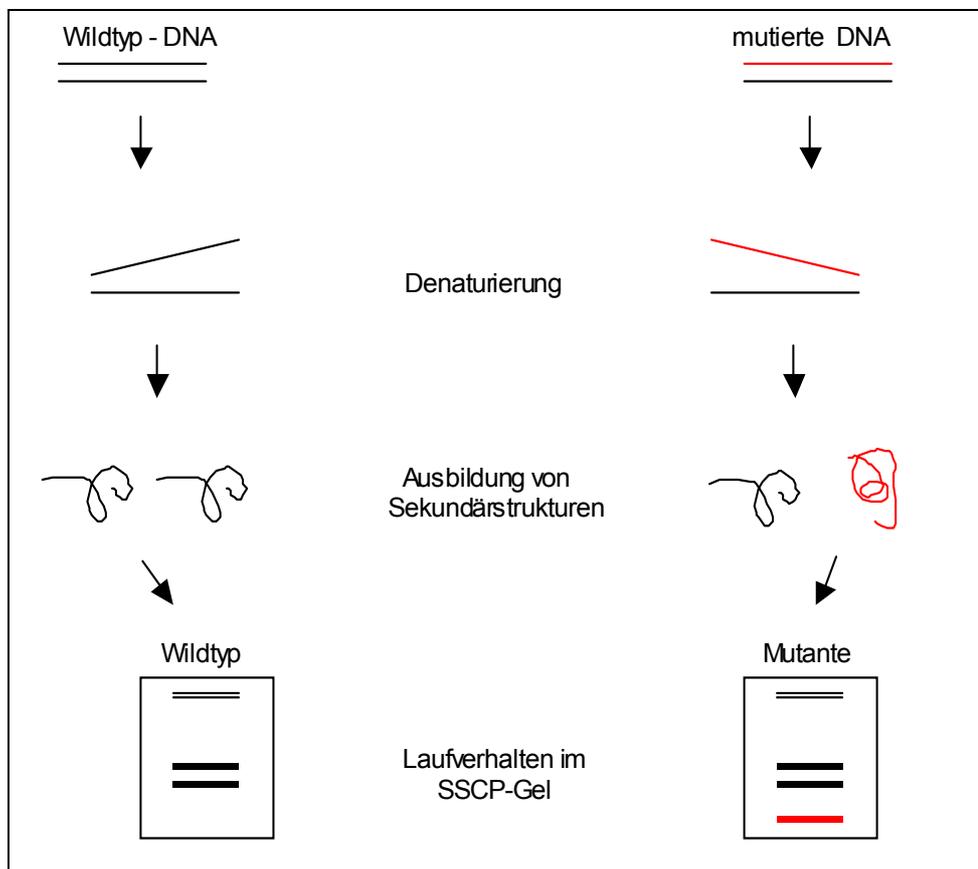


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Prinzips der SSCP-Analyse (nach Grompe et al. (1993)). Der Strang mit dem Basenaustausch ist rot, die mit der Wildtypsequenz sind schwarz.

Die für die SSCP-Analyse verwendeten Gele sind 10 %ige Polyacrylamidgele, Als Laufpuffer diente ein 0,5x TBE-Puffer. Die Herstellung der 10 % Gelstocklösung erfolgte nach folgendem Rezept:

122,5	ml	40 % Acrylamid
50	ml	2 % Bis-Acrylamid
25	ml	10 x TBE
500	µl	0,1 % TEMED
ad 500	ml	H ₂ O

Pro Gel wurden 20 ml der Gelstocklösung mit 300 µl einer 10 %igen APS-Lösung versetzt und gemischt. Anschließend wurde das Gemisch in das vorbereitete

Glasplattensystem gegossen. Nach etwa 20 Minuten ist die Polymerisation des Gels beendet.

Das PCR-Produkt wurde mit einem Puffer (1 Teil Agaroseladepuffer (5x TBE, 20 % Ficoll + 0,1 %iges Bromphenolblau): 6 Teile Formamid 100 %), in einem Verhältnis von 2: 3, versetzt und durch Hitze denaturiert. Die dadurch entstandenen einzelsträngigen DNA-Fragmente wurden anschließend auf das nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gel aufgetragen und, bei einer Laufzeit von 16-18 Stunden, elektrophoretisch aufgetrennt.

Die einzelnen Bandenmuster wurden anschließend mittels SYBR[®]-Gold-Färbung sichtbar gemacht. Die SYBR[®]-Gold-Färbung ist eine relativ neue Methode zur Visualisierung und Dokumentation der Polyacrylamidgele, sie ist einfacher und schneller und, mit einer Nachweisgrenze von ca. 40 pg je Bande sensitiver als die bisher durchgeführte Silberfärbung.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die vordere Glasplatte entfernt, anschließend wurde das Gel in horizontaler Lage mit 3-5 ml SYBR[®]-Gold-Lösung (5 µl SYBR[®]/DMSO-Stocklösung, 50 ml 1x TBE, pH = 8) gleichmäßig bedeckt. Nach 10-20 Minuten wurden die Banden mit Hilfe eines Fluor-Imager[™] SI-Scanner detektiert.

2.3.6 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung dient der Identifizierung der Nukleotidsequenz der PCR-Produkte, die in der SSCP-Analyse ein zu den anderen Patienten abweichendes Bandenmuster aufwies. Die Sequenzierung ist die Methode mit der höchsten Detektionsrate für Mutationen. Da sie jedoch sehr zeitaufwendig und kostenintensiv ist, ist sie zur Mutationssuche in ganzen Genen in einem großen Patientenkollektiv ungeeignet.

Die DNA-Sequenzanalyse erfolgte nach dem Kettenabbruchverfahren von Sanger et al. (1977) und wurde auf einem automatischen DNA-Sequenziergerät von Perkin Elmer (ABI Prism TM 310 DNA-Sequenziergerät) durchgeführt. Zunächst erfolgte die Amplifikation des zu untersuchenden Genabschnittes mit der oben

beschriebenen PCR. Anschließend wurde dieses PCR-Produkt mit dem Invisorb[®] Spin PCRapid Kit von InViTek nach deren Angaben aufgereinigt. Die gereinigte DNA wird mit 20 µl Aqua dest. eluiert.

Nun erfolgt die Sequenzreaktion mit dem Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit der Firma Applied Biosystems. Dieser Kit, der auch als Terminationsmix bezeichnet wird, enthält unter anderem ein Gemisch aus dNTPs, mit BigDye-Farbstoffen markierten ddNTPs und die AmpliTaq DNA-Polymerase. Als Sequenzierprimer wurden dieselben Primer verwendet, die auch zur Mutationssuche dienten. Um den Verlust der ersten Basen, die bei der Forward-Sequenzierung durch die Verwendung derselben Primer entstehen, zu vermeiden wurde das PCR-Produkt zusätzlich rückwärts sequenziert.

Der Ansatz setzte sich somit wie folgt zusammen:

3 µl	Terminationsmix
2 µl	Primer (1 pmol/µl)
2 – 3 µl	aufgereinigtes PCR-Produkt (100-150 ng)
ad 10 µl	Aqua ad injectabilia

Die Reaktion wird im Perkin Elmer Gene Amp 9600 nach folgenden Angaben durchgeführt:

Funktion	Dauer	Temperatur
1. Initiale Denaturierung:	60 Sekunden	96 °C
2. 25 Zyklen:		
1. Denaturierung:	10 Sekunden	96 °C
2. Annealing:	10 Sekunden	50 °C
3. Elongation:	240 Sekunden	60 °C
3. Abkühlung:	∞	4 °C

Das Endprodukt dieser Sequenzierungs-PCR ist eine Reihe von verschiedenen Polynukleotiden, die der Summe aller möglichen Fragmente des DNA-Segmentes entsprechen. Diese Fragmente werden zunächst in einer Sephadex G 50[®] Säule aufgereinigt. Das 3'-Ende jedes Polynukleotids trägt eine farbstoffmarkierte Base. Aufgrund der nukleotidspezifischen Fluoreszenzfarbstoffe kann die Auftrennung in einem einzigen Gefäß stattfinden. Diese Methode wird als Kapillar-Gelelektrophorese bezeichnet und mit Hilfe eines automatischen Sequenziergerätes (ABI Prism[™] 310 DNA-Sequenzierer von Perkin Elmer) durchgeführt. Die Auswertung der Sequenz erfolgte manuell.

2.3.7 Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus- (RFLP-) Analyse

Mit Hilfe der RFLP-Analyse wurden die durch die SSCP-Analyse gefundenen und mittels DNA-Sequenzierung charakterisierten Mutationen nochmals unabhängig bestätigt.

Diese Methode eignet sich für die schnelle Genotypisierung bekannter Varianten. Das Computerprogramm „Webcutter“ wurde eingesetzt, um eine geeignete Schnittstelle in der entsprechenden Sequenz zu suchen. Anschließend wurde das PCR-Produkt mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease verdaut.

Die Restriktionsendonukleasen schneiden die Doppelstrang-DNA an einer bestimmten Stelle, die innerhalb oder in einem bestimmten Abstand zu einer spezifischen Erkennungssequenz liegt. Liegt die Variante im Bereich der Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease, so wird diese von ihr erkannt und das PCR-Produkt wird an der für die Restriktionsendonuklease spezifischen Schnittstelle geschnitten.

Der für den Restriktionsenzymverdau verwendete Standardansatz besteht aus:

1,5 µl	Puffer (vom Hersteller mit dem Enzym mitgeliefert)
x µl	Enzym (5 U)
ad 10 µl	Aqua dest.
x µl	PCR-Produkt (~250 ng)

Die Inkubation erfolgte im Wasserbad nach Angaben des Herstellers. Anschließend wurden die durch den Verdau entstandenen Fragmente mittels Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Banden wurden durch die bereits oben erläuterte SYBR-Gold-Färbung sichtbar gemacht. Der Genotyp ließ sich anschließend anhand des Schnittmusters zuordnen.

2.3.8 Statistische Methoden

„Power-Kalkulation“

Die Wahrscheinlichkeit P , mit der eine Mutation mit der Häufigkeit f in einem Kollektiv mit n Patienten vorkommt, wird nach folgender Formel berechnet:

$$P=1-(1-f)^{2n}$$

Berechnung der Allelfrequenzen

Aus der beobachteten Anzahl der Genotypen lässt sich die Allelfrequenz in jedem Kollektiv berechnen. Hierzu wird die Anzahl der homozygoten Merkmalsträger doppelt gezählt und zu der Anzahl der heterozygoten Träger, jeweils einzeln genommen, addiert. Die daraus resultierende Allelhäufigkeit wird durch die Gesamtzahl der Allele in dem Kollektiv dividiert. Daraus ergibt sich für jedes Kollektiv die Allelfrequenz, die in Prozent angegeben wird.

Hardy-Weinberg-Regel:

Die Verteilung von Allelen lässt sich nach der Hardy-Weinberg-Regel durch eine einfache Beziehung darstellen, die sich direkt aus den Mendelschen Regeln ableiten lässt:

Beschreibt man die Allelfrequenzen zweier Allele in einer Population mit p_{x1} und q_{x2} , wobei deren Summe 100% ergeben muss, so lässt sich die Verteilung dieser Allele in einer Population wie folgt beschreiben:

$$p_{x1}^2 + 2 \times p_{x1} q_{x2} + q_{x2}^2 = 1$$

Voraussetzung für die Anwendung der Regel ist, dass es sich um eine sogenannte Mendel-Population handelt. Eine Mendel-Population liegt dann vor, wenn sich diploide Organismen nach den Regeln der Panmixie sexuell fortpflanzen, so dass die Mendelschen Regeln angewendet werden können. Die Hardy-Weinberg-Regel

besagt, dass in einer Mendel-Population Allelfrequenzen und Allelverteilungen in aufeinander folgenden Generationen gleich bleiben sofern die Population sich im Gleichgewicht befindet und keine Selektion stattfindet. Daher lassen sich mit Hilfe dieser Regel aus den errechneten Allelfrequenzen die erwarteten Allelhäufigkeiten berechnen.

Um die erwartete absolute Genotypenhäufigkeit zu erlangen, muss die erwartete Allelhäufigkeit mit der Anzahl der Individuen multipliziert werden. Die erwarteten Werte, die mit Hilfe der Hardy-Weinberg-Regel berechnet wurden, entsprechen der Normalverteilung der Genotypen.

χ^2 -Test

Der χ^2 -Test dient dazu die Wahrscheinlichkeit zu ermitteln, mit der ein experimentell ermittelter Wert dem erwarteten Mittelwert einer normierten Zufallsverteilung entspricht. Hierfür wendet man die folgende Formel an:

$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{beobachtete Häufigkeit (n)} - \text{erwartete Häufigkeit (n)})^2}{\text{erwartete Häufigkeit (n)}}$$

Es kann überprüft werden, ob in einer Population eine Normalverteilung der Genotypen nach der Mendelschen Regel vorliegt. Mit Hilfe des χ^2 -Test kann eine statistische Aussage über die Signifikanz der Abweichung zwischen der beobachteten und erwarteten Genotypenhäufigkeit gemacht werden. Sollen allerdings mehrere zusammenhängende Werte auf ihre Signifikanz hin untersucht werden, so muss die Anzahl der Freiheitsgrade berücksichtigt werden. Die Anzahl der Freiheitsgrade f ist um 1 geringer als die Gesamtzahl der Beobachtungsmöglichkeiten.

Die Korrelation zwischen dem ermittelten χ^2 -Test, dem Freiheitsgrad f und der Wahrscheinlichkeit p wird durch eine mathematische Anwendung der Kurvenfunktion bestimmt. Als statistisch signifikant angesehen werden Werte von $p \geq 0,05$, das heißt, p -Werte in diesem Bereich sprechen mit großer Wahrscheinlichkeit dafür, dass die Genotypen in dieser Population einer Mendelschen Normalverteilung unterliegen.