

2. Materialien und Methoden

2.1 Klinische Methoden

2.1.1 Patientengut

Für diese Studie wurden insgesamt 108 Patienten ausgewählt, die wegen einer hypertrophen Kardiomyopathie im Deutschen Herzzentrum Berlin in Behandlung waren. Das Patientenkollektiv bestand aus 66 männliche und 42 weibliche Personen. Sie wiesen ein Durchschnittsalter von 54 ± 16 Jahren auf. Das Manifestationsalter der Krankheit lag bei 44 ± 16 Jahren. Von den 108 Personen hatten 49 Patienten eine familiäre und 59 Patienten eine sporadische hypertrophe Kardiomyopathie. Die untersuchten Patienten waren vor der Blutentnahme über die geplanten molekulargenetischen Untersuchungen informiert worden und hatten ihr schriftliches Einverständnis zur Verwendung ihrer DNA für diese Studie gegeben. Die Studie wurde von der Ethik Kommission der Charité, Campus Virchow-Klinikum der Humboldt Universität Berlin genehmigt.

2.1.2 Anamnese und Untersuchung der Patienten

Bei den Patienten wurde eine ausführliche Anamnese sowie eine körperliche Untersuchung vorgenommen. Dabei wurde in der Anamnese nach Symptomen der hypertrophen Kardiomyopathie, wie Dyspnoe, Angina pectoris und Synkopen gefragt. Des weiteren war von Bedeutung, welche Medikamente die Patienten einnahmen (Beta-Blocker, Ca-Antagonisten, ACE-Hemmer, Diuretika) und ob die hypertrophe Kardiomyopathie in der Familie häufiger vorkam.

2.1.3 Erfassung von Patientendaten

Als anamnestische Daten wurden die Stammdaten der Patienten in eine Datenbank aufgenommen. Diese beinhaltet das Alter und Geschlecht des Patienten, das Alter bei Diagnosestellung, die Familienanamnese und die Symptome.

Als diagnostische Daten wurden die EKG-Parameter (Rhythmus, LVH, HF, VES, SVES, Couplets), die echokardiographischen Parameter (LVEDV, LVESD, IVS, HW, FS) und die Herzkatheter-Parameter (LVEDV, LVEF, EDP, PAP, AoPS) erfasst.

Die Patientenakten wurden im Hinblick auf die für die Diagnose wichtigen echokardiographischen und elektrokardiographischen Daten durchgearbeitet. In die Grundlagen der Echokardiographie wurde man eingearbeitet.

Auch die Komplikationen, die während der hypertrophen Kardiomyopathie aufgetreten waren, wurden ermittelt. Zu nennen sind der Apoplex, das akute Koronarsyndrom, maligne Arrhythmien und der Tod.

Die Therapie der HCM-Patienten, ob medikamentös, operativ (Myektomie, Tash), oder ob ein Herzschrittmacher indiziert war, wurde in dieser Datenbank gesammelt .

2.1.4 Statistik

2.1.4.1 Allelfrequenz

Die Häufigkeit (Frequenz), mit der ein Allel (A oder B) in einem Kollektiv an einem gegebenen Genlocus vertreten ist, bezeichnet man als Allelfrequenz . Aus der beobachteten Anzahl der Genotypen lässt sich die Allelfrequenz berechnen. Hierzu wird die Anzahl der homozygoten Merkmalsträger doppelt gezählt und zu einer Anzahl der heterozygoten Träger, die 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.

2.1.4.2 Hardy-Weinberg-Gesetz

Mit Hilfe des Hardy-Weinberg-Gesetzes kann die erwartete Häufigkeit der Allele berechnet werden

Bezeichnet man die Häufigkeit des Allels A mit p und die Häufigkeit des Allels B mit q , dann gilt: $p + q = 1$ (100%) [102].

In der nachfolgenden Generation erscheinen dann die Genotypen (AA, AB, BB) mit definierten Häufigkeiten.

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

p^2 = erwartete Häufigkeiten des Genotyps AA (homozygot für das Allel A)

$2pq$ = erwartete Häufigkeiten des Genotyps AB (heterozygot)

q^2 = erwartete Häufigkeiten des Genotyps BB (homozygot für das Allel B)

2.1.4.3 Chi²- Test

Der Chi² – Test dient dazu die Wahrscheinlichkeit zu ermitteln, mit der ein experimentell ermittelter Wert dem erwarteten Mittelwert einer normierten Zufallsverteilung entspricht. Hierzu wurde folgende Formel angewandt:

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

Es kann überprüft werden, ob in einer Population eine Normalverteilung der Genotypen vorliegt. Mit Hilfe des Testes kann eine statistische Aussage über die Signifikanz der Abweichung zwischen der beobachteten und erwarteten Genotypenhäufigkeit gemacht werden. Als Nullhypothese wurde die Gleichverteilung der Genotypen in Stichprobe und Grundgesamtheit formuliert. Je höher die Wahrscheinlichkeit (p), desto verlässlicher entsprechen die experimentellen Daten der aufgestellten Nullhypothese. Ein Wert von $p \geq 0.05$ wird als statistisch signifikant angesehen, das bedeutet Werte, die in einem solchen p -Wertbereich fallen, sprechen mit großer Wahrscheinlichkeit für die Richtigkeit der Nullhypothese [102].

2.2 Molekulargenetische Methoden

2.2.1 Blutgewinnung

Von den zu untersuchenden Patienten mit HCM wurden nach Einwilligungserklärung ca. 10-20ml Blut aus einer peripheren Vene zur DNA-Aufbereitung entnommen.

2.2.2 DNA-Isolierung und Aufbereitung

Aus dem mit EDTA antikoagulierten Frischblut [62] wurden die Leukozyten getrennt, um aus diesen die genomische DNA zu isolieren. Die DNA wurde aufbereitet, und bei einer Konzentration von 20 ng/ μ l photometrisch bei einer Wellenlänge von 260nm und 280nm gemessen.

Die Aufarbeitung der DNA wurde nach folgendem Standardprotokoll durchgeführt:

- Zu 10ml Frischblut wurde 30 ml Frischlysispuffer (155mM NH₄CL, 10mM KHCO₃, 0.1mM EDTA) zugefügt und 15 min auf Eis lysiert und anschließend für 10min bei 4 °C bei 1300 rpm zentrifugiert.
- Nach Abgießen des Überstandes, wurde das entstandene Leukozytenpellet kurz mit 2 ml Frischlysispuffer gespült.
- Das Pellet wurde in 8 ml Lösung B (400 mM Tris-HCL, 60 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% SDS) vollständig gelöst und eine 2,7 ml Lösung C (3.6 M Na-Perchlorat) dazugegeben und durchmischt.
- Nach Zugabe von 8 ml Chloroform wurde das Gemisch geschüttelt und bei 3000rpm 5min lang zentrifugiert.
- Der nun entstandene Überstand wurde ohne Interphase vorsichtig abpipetiert.
- Zur Präzipitation der DNA wurde 1 vol. eiskaltes Isopropanol zugeführt und vorsichtig vermischt.
- Im Anschluss wurden die DNA-Fäden isoliert und in 70%igen Ethanol gewaschen und dann in 400 μ l TE-Puffer gelöst.
- Die DNA-Konzentration wurde nach folgender Proportion gemessen:
2 μ l DNA + 98 μ l Wasser (1:50).
$$c[\mu\text{g/ml}] = \text{OD } 260\text{nm} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Multiplikationsfaktor}$$
$$\qquad\qquad\qquad (50) \qquad\qquad\qquad (\text{dsDNA} = 50)$$
- Die Konzentration und Reinheit der DNA wurde anschließend durch spektrometrische Messung bei 260 und 280 nm bestimmt.
- Die DNA-Stocklösungen wurden bei einer Temperatur von -80°C aufbewahrt.

2.2.3 PCR der DNA

Die Polymerasen-Kettenreaktion wird durchgeführt, um DNA-Sequenzen enzymatisch zu vervielfältigen und definierte DNA-Bereiche mittels spezifischen Primer zu amplifizieren [63].

Bei diesem Verfahren benötigt man zwei Oligonukleotide (Primer). Der Vorwärts-(forward-) Primer wird dabei komplementär zur Sequenz am 3'-Ende des Antisense-Stranges und der Rückwärts-(reverse-) Primer homolog zur Sequenz am 5'-Ende des sense- Stranges ausgewählt [64]. Dabei werden die Primer so ausgewählt, dass sie überlappende Fragmente von 160–300 Bp amplifizieren. Das hat den Vorteil, dass auch Varianten, die im Primerbereich eines PCR-Fragments liegen detektiert werden können.

Die Primer wurden nach folgenden Parametern ausgewählt:

Schmelztemperatur :	57-63°C
Länge des Primers :	18-24 Nukleotide
GC-Gehalt :	40-60%
Fragmentlänge:	180-280 Nukleotide

Das PCR-Programm besteht aus einem Denaturierungs-, einem Annealing- und einem Elongationsschritt.

Denaturiert wird bei 94°C 20s lang. Dabei trennen sich die beiden Stränge der Template-DNA. Danach wird auf die Annealingtemperatur (57°C–64°C) gesenkt, damit es in den darauffolgenden 20s zur Hybridisierung der vorhandenen Oligonucleotidprimer an die einzelsträngige Template-DNA kommt.

Schließlich wird die Temperatur auf 72°C, das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase, für 20s erhöht. Somit wird der Primer verlängert bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt, die der ursprünglichen Template-DNA komplementär ist.

Dieser Zyklus wird 35 mal wiederholt damit man eine ausreichende Menge an PCR- Amplifikat hat.

Zwei zusätzliche Schritte werden nur einmal durchgeführt: Die Aktivierung der Taq Polymerase durch 5 min vollständiger Denaturierung der DNA bei

Material und Methoden

94°C und am Ende einer PCR Reaktion eine 5 min lange Elongationsphase bei 72°C zur Verdrängung der Primer und Bildung des Amplifikats.

Die PCR-Reaktionen wurden in dem Thermocycler Perkin Elmer Gene Amp 9600 nach folgendem Standardprotokoll durchgeführt:

1.	5 min	94°C	initiale Denaturierung
2.	20 sec	94°C	Denaturierung
	20 sec	59-64°C	primer-Annealing x 35 Zyklen
	20 sec	72°C	Primer-Extension
3.	5 min	72°C	finaler Verlängerungsschritt

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

2.5	µl	PCR-Puffer (50 mM KCL, 10 mM Tris-HCL (pH=8.5), 1.5 mM MgCl ₂ , 0.01% Gelatine)
4.0	µl	d NTPs (jeweils 200 µM d ATP, d CTP, d GTP, d TTP)
0.2	µl	Tag-Polymerase (5U/µl)
3	µl	Forward-Primer (10 pmol/µl)
3	µl	Reverse-Primer (10 pmol/ µl)
ad 25	µl	Aqua bidest.
1-5	µl	DNA (20 ng/µl)
<hr/> Gesamtvolumen = 25 µl		

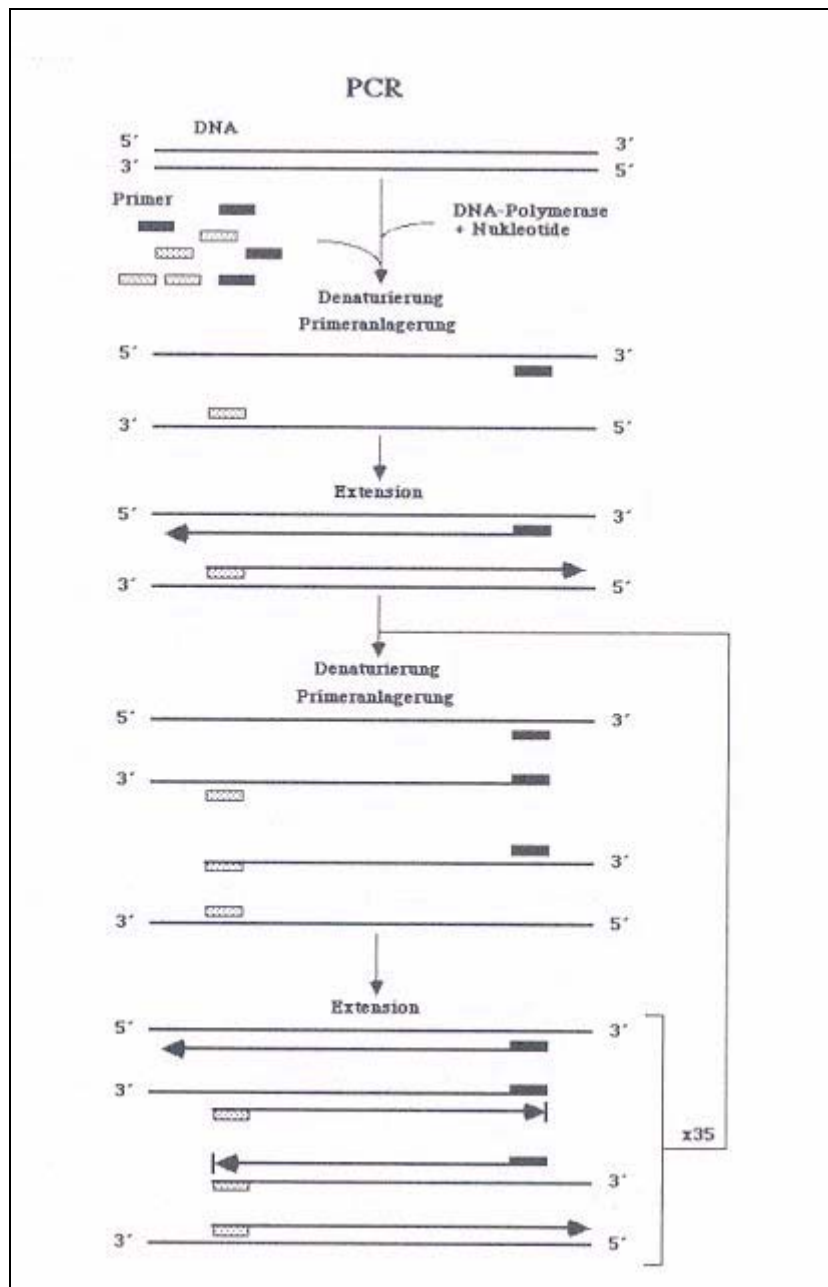


Abbildung 9: schematische Darstellung der Polymerasekettenreaktion [97]

2.2.4 Agarose-Gel-Elektrophorese der PCR-Amplifikate

Die PCR-Produkte werden im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf ihre Spezifität überprüft. Agarose, das aus glycosidisch verbundener D-Galaktose und 3,6- Anhydrogalaktose besteht, dient als interne Matrix, in dem DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld wegen der negativ geladenen Phosphatgruppen im Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat der DNA zur Anode wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit wird durch verschiedene Faktoren, wie die Molekülgröße, die DNA-Konformation, die Agarose-

Material und Methoden

konzentration sowie durch die angelegte Gleichspannung beeinflusst. 2%iges Agarosegel (40ml) wird in einfachem TBE-Puffer aufgekocht und nach Hinzufügen von 2µl Ethidiumbromid (10mg/ml) auf 50-60 °C abgekühlt. Das Gel wird dann luftblasenfrei in einem vorbereiteten Gelträger mit Kamm gegossen und nach dem Erstarren des Gels wird der Kamm vorsichtig herausgezogen. In die Kammervertiefungen des gehärteten Gels werden jeweils 5µl PCR-Amplifikat und 5µl Agaroseblaupuffer aufgetragen und mit einer Spannung von 120V in 20 min in der Gelkammer (Gibco BRL Horizon) elektrophoretisch aufgetrennt. Als Längenstandard wird eine 100Bp DNA-Leiter benutzt. Die mit Ethidiumbromid gefärbte DNA wird auf einem Transluminator unter UV-Licht sichtbar gemacht und anhand des Längenstandard die Größe des entstandenen PCR-Fragments überprüft. Anschließend wird mittels einer Videodokumentationsanlage der Firma Biometra das Ergebnis fotografiert.

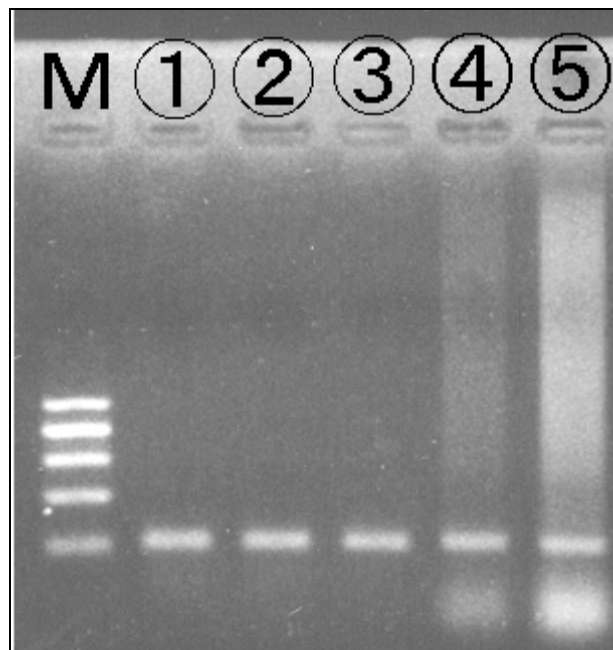


Abbildung 10: Agarosegelelektrophorese, M=100Bp DNA-Leiter, 1-5 verschiedene PCR-Fragmente

2.2.5 SSCP-Analyse

Zur Suche nach Mutationen wird die SSCP-Analyse (single-strand-conformational-polymorphism) durchgeführt. Sie beruht auf der Beobachtung, dass einzelsträngige DNA-Fragmente eine sequenzspezifische Konformation einnehmen und bei elektrophoretischer Auftrennung in einem nicht denaturierenden Gel ein spezifisches Laufverhalten aufweisen. So kann man schon Unterschiede in der DNA von nur einer Base erkennen, da sich die Laufgeschwindigkeit des Einzelstranges ändert, weil die DNA durch ihre veränderte Basensequenz eine andere andere Sekunärstruktur einnimmt [64, 84, 85, 86]. Bei dieser Methode lassen sich die Mutationen und Polymorphismen nachweisen. Es können beliebige Primer verwendet werden und die Methode lässt sich an große Probenmengen anpassen. Ihr Vorteil ist die schnelle, einfache und kostengünstige Durchführung.

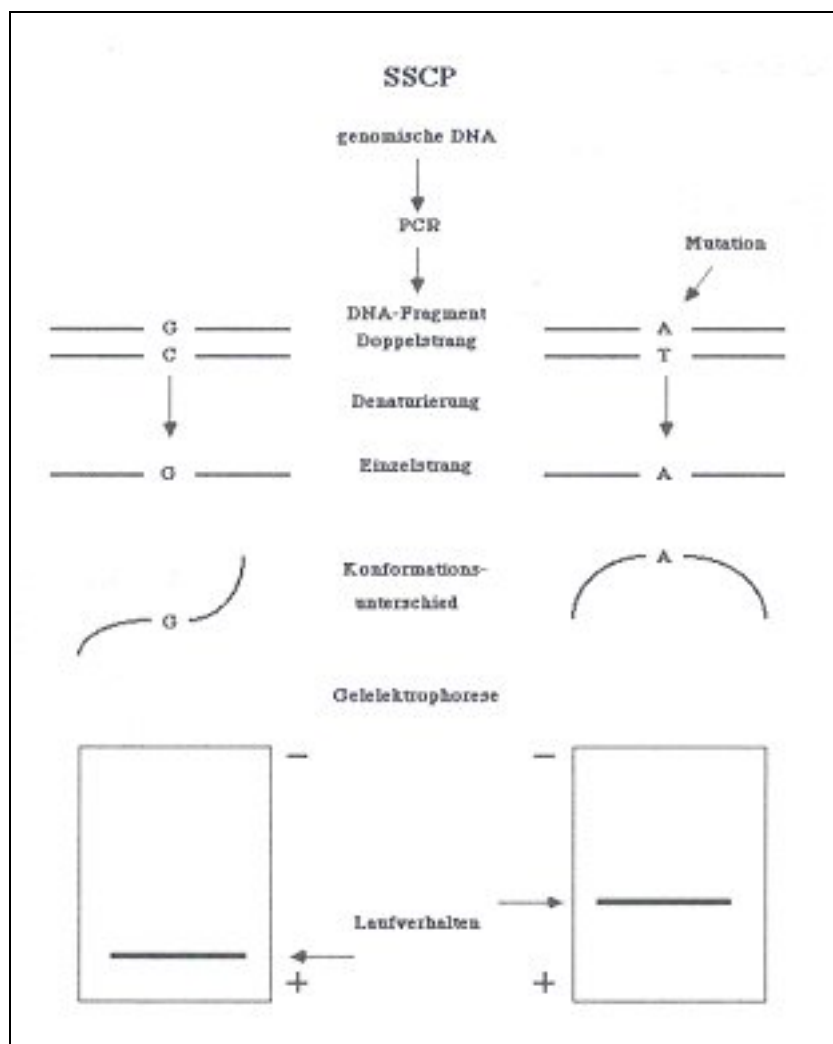


Abbildung 11: schematischer Überblick des SSCP (97)

Material und Methoden

Die Länge der Fragmente, die mittels SSCP analysiert werden können, ist auf ca. 300 Basen begrenzt. Bei längeren Fragmenten nimmt die Wahrscheinlichkeit, eine Mutation nachweisen zu können, stark ab. Allgemein geht man davon aus, dass die Wahrscheinlichkeit, eine beliebige Mutation mittels SSCP zu entdecken, bei 70-90% liegt [65, 87].

Jedes PCR-Amplifikat wurde unter zwei verschiedenen Elektrophoresebedingungen aufgetrennt, um eine möglichst hohe Sensitivität zu erreichen. Die Analyse erfolgte sowohl bei Raumtemperatur und einer Spannung von 60 Volt als auch bei 4° C und 70 Volt. Die Laufzeit der Gele betrug jeweils ca. 16 Stunden. Für die SSCP-Analyse wird mit Hilfe von Polyacrylamid (PAA)-Gelen durchgeführt.

Polyacrylamid-Gele entstehen durch Kopolymerisation von Acrylamid (AA) und Bis-Acrylamid (BA) in 0,5 x TBE Pufferlösung (0,05M Tris Base; 0,05M Borsäure, 0,001M Tritriplex III; pH8).

Die Polymerisation wird durch die Zugabe von 0,1% N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin (TEMED) katalysiert und durch 0,1% Ammoniumpersulfat (APS) gestartet. Die Polyacrylamid-Gele haben eine sehr große Trennschärfe, so dass das variantentragende Fragment, das sich nur in einer einzigen Base unterscheidet, auf dem Gel ein unterschiedliches Laufmuster aufweist.

Für die SSCP-Analyse wurden Glasplatten (Größe 110 x 120 x 1 mm) der Firma Biotetra verwendet. Als Elektrophoresekammern wurden die Multi-Long TYP G 47 Geräte der Firma Biometra benutzt.

Für ein 10%iges Polyacrylamidgel (Acrylamid:Bisacrylamid 49:1) in 0,5 x TBE werden als Gelstocklösung angesetzt:

122.5	ml	40% Acrylamid
50	ml	2% Bisacrylamid
25	ml	10 X TBE
500	µl	0.1% TEMED
ad 500	ml	H ₂ O
Gesamtvolumen	500ml	

Pro Gel benötigt man 20ml Gelstocklösung und 300µl 10%iges APS. Die Polymerisation erfolgt in 30-40 min bei Raumtemperatur in horizontaler Lagerung. Jeweils 8µl der PCR-Amplifikate wurden mit 12µl eines formamid-

haltigen Gelladepuffers (6 Teile Formamid, 1Teil Agarose-ladepuffer) gemischt. Diese Menge des SSCP-Ansatzes reicht für eine SSCP-Analyse bei zwei Temperaturen. Die SSCP-Ansätze werden bei 95°C für 5 min erhitzt, damit die DNA- Doppelstränge denaturieren und Einzelstränge entstehen. Durch sofortige Lagerung in Eis wird die Renaturierung der DNA verhindert. Im Anschluss werden je Gel-Tasche 8µl des SSCP-Ansatzes aufgetragen. Als Elektrophoresepuffer wird 0.5x TBE (Endkonzentrationen: 0.05M Tris Base; 0.05M Borsäure 0.001M Tritriplex III; pH 8) verwendet. Als Größenmarker wird eine 100-Bp-Leiter verwendet. Um mehrere SSCP-Gele voneinander zu unterscheiden, wird der Marker pro Gel auf unterschiedliche Taschen aufgetragen. Für eine hohe Sensitivität bei der Analyse, werden alle PCR-Produkte bei zwei unterschiedlichen Elektrophoresebedingungen untersucht. Die Analyse bei Raumtemperatur erfolgt mit einer Spannung von 60V und bei 4°C im Kühlraum mit einer Spannung von 70V. Die Laufzeit für die Gele beträgt zwischen 16-18 Stunden.

2.2.6 SYBR[®]-Gold-Färbung

Die PAA-Gele, die man für SSCP- oder RFLP-Analyse verwendet, werden zur Sichtbarmachung der DNA-Fragmente mittels SYBR[®]-Gold (C₂H₆OS) gefärbt. SYBR[®]-Goldfärbung ist eine Methode zur Visualisierung und Dokumentation der PAA-Gele. Diese Methode ist einfach, schnell und sensitiv (Nachweisgrenze: ca. 40 pg je Bande). Es sind Dunkel-Helligkeitsgrad sowie die Größe des Gelbildes einstellbar. Die Dokumentation der Gele erfolgt durch Speichern auf der Festplatte oder auf eine Diskette. Die DMSO-Grundlösung (500µl) ist ein 10.000 x Konzentrat und ausreichend für die Färbung von ca. 100 PAA-Gele. Das SYBR[®]-Gold hat fluoreszierende Eigenschaften und wie DMSO interkaliert es in den DNA-Fragmenten.

Nach der Beendigung der Elektrophorese wird die vordere Glasplatte entfernt. Das Gel wird in der horizontalen Lage mit 3-5 ml SYBR[®]-Gold-Lösung (5µl SYBR-Gold, 50 ml 1x TBE, 1:10000, pH=8) gleichmäßig benetzt und nach 10-20 min mit Hilfe eines geeigneten Gelträgers in einen Fluor-Imager[™] SI-Scanner geführt. Im Fluor-Imager[™] SI System bestrahlt man das Gel mit dem Laser-Licht im ultravioleten Spektralbereich. Der Laser regt das fluoreszenzgefärbte Gel zur langwelligen Sekundärstrahlung an. Nach

der Abfilterung des anregenden Lichtes mittels 530 nm Filter wird das freigegebene fluoreszierende Licht in Fluor-Imager™ SI System gesammelt, mengenmäßig erfasst und in wenigen Minuten Punkt für Punkt zu einem Bild umgesetzt. Das Gelbild wurde mittels Scanning-Programm auf einen angeschlossenen Monitor übertragen und in schwarz-weiß Bildern ausgedruckt. Die auftretenden Banden erscheinen schwarz bis grau.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

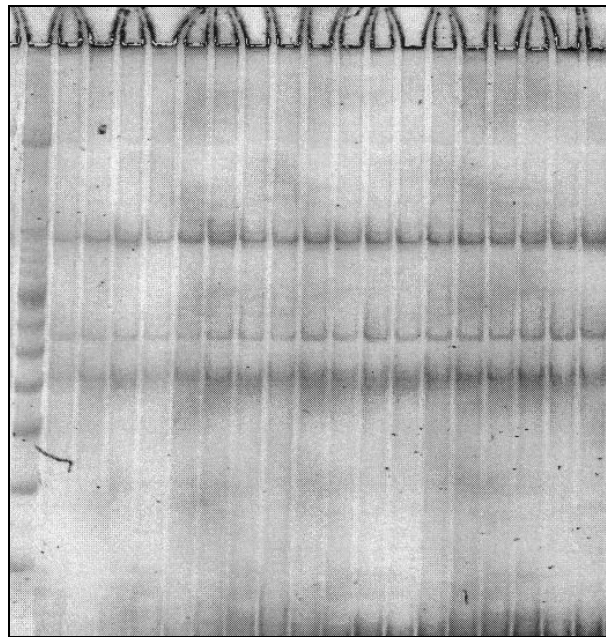


Abbildung 12: Muster eines SSCP-Gel Bildes. M=100Bp-Leiter; 1-18 = Probennummern von Patienten

2.2.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung dient zur Ermittlung der Nukleotidsequenz von PCR-Produkten. Sie hat als Screening-Methode für Mutationen eine hohe Detektionsrate ist aber sehr zeitaufwendig und kostenintensiv.

Die heute am häufigsten verwendete Methode der Sequenzbestimmung ist die Dideoxy-Kettenterminationsmethode (engl.: „chain termination method“) [88]. Bei dieser Methode wird von einem Primer aus mit Hilfe von DNA-Polymerase an einer Einzelstrang-DNA ein komplementärer Strang synthetisiert. Diese Synthese erfolgt in Gegenwart von Nukleotidtriphosphaten, denen in niedriger Konzentration fluoreszenz-markierte Dideoxynukleotide (ddNTPs) beigefügt sind. Diesen Nukleotiden fehlt am 3`-Ende der

Material und Methoden

Desoxyribose eine Hydroxylgruppe, so dass hier keine weiteren Nukleotide angefügt werden können. Zur Fluoreszenz-Sequenzierung wird aus Bakterien gewonnene AmpliTaq[®] Polymerase FS verwendet, bei der es sich um eine Doppelmutante handelt. Durch die erste Mutation (G46D) verliert das Enzym seine 5'-3'-Nuklease-Aktivität. Die zweite Mutation im aktiven Zentrum des Enzyms (F667J) führt zu einer Veränderung der Akzeptanz gegenüber Dideoxynukleotiden, so dass diese leichter eingebaut werden. Die Dideoxynukleotide, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind (Dye-Terminatoren), werden nach dem Zufallsprinzip in den neu synthetisierten Strang eingebaut und führen zum Abbruch der DNA-Synthese. So entsteht eine Mischung neu synthetisierter DNA-Stränge unterschiedlicher Länge.

Für die Sequenzierungs PCR werden folgende Reagenzien eingesetzt:

3	µl	Terminator Premix (ddNTPs,dNTPs,AmpliTag DNA Polymerase)
x	µl	PCR-Amplifikat (o.2 µg)
2.0	µl	entsprechende PCR-Primer (1.6 pmol)
x	µl	Aqua dest
<hr/>		
Gesamtvolumen = 10 µl		

Die zu sequenzierenden DNA-Fragmente wurden in 25 Zyklen nach folgendem PCR Standardprofil amplifiziert:

I.	Denaturierung bei 96°C		
II.	10 sec	bei 96°C	insgesamt 25 Zyklen
	5 sec	bei 50°C	
	4 min	bei 60°C	
III.	sofortiges Abkühlen auf 4°C		

Die Aufreinigung der Sequenzierungs-PCR-Produkte:

Nach der Sequenzierungs-PCR werden die PCR-Produkte aufgereinigt und jeweils 10µl Amplifikat mit 10µl Aqua dest. eingemischt. Diese Mischung wird in einem Säulenreiniger (Sephadex50[®]) aufgereinigt. Man entfernt mit dieser Methode die überschüssigen ddNTPS, die auf Grund ihrer Fluoreszenzmarkierung zu einer Verfälschung der Sequenzierung führen. Die gereinigten PCR-Ansätze werden in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

Die Sequenzierungs-PCR-Produkte, die sich nur um eine Basenlänge unterscheiden, werden elektrophoretisch im Sequenziergel aufgetrennt.

Zur Herstellung des Sequenziergels wurden folgende Reagenzien verwendet:

18.0 g	Harnstoff
7.5 ml	30 %ige Acrylamidlösung [Acrylamid (4.35%) : Bis- Acrylamid (0.15%) 29:1]
6.0 ml	10xTBE -Puffer
22.0 ml	Aqua bidest.

Die getrockneten PCR-Produkte werden mit 2.0 ml einer Stop-Lösung (5 Teile deionisiertes Formamid / 25 mM EDTA/1 Teil Dextran Blau) bei 90°C für 2 min denaturiert und sofort auf Eis überführt. Jeweils 1,5µl der denaturierten Proben trägt man auf's Sequenziergel auf. Als Puffer dient 1xTBE. Die Elektrophorese führt man bei 2700V und 50W für 4 Stunden durch.

Ein Laser regt die fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente zur Sekundärstrahlung an. Anschließend erfolgt der Ausdruck des Ergebnisses mit Hilfe eines angeschlossenen Computers in Form von vierfarbigen Kurvendiagrammen.

2.2.8 Restriktionsfragmentenlängen- Polymorphismus (RFLP)- Analyse

Durch die Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus-Analyse (RFLP) können in der SSCP-Analyse gefundene und durch DNA-Sequenzierung charakterisierte Varianten unabhängig bestätigt werden [66].

Es ist eine schnelle und robuste Methode zur Genotypisierung bekannter Varianten in ausgesuchten Kollektiven.

Ebenfalls kann man durch die Sequenzierung erhaltene DNA Sequenzen bestätigen, in dem man mit Hilfe des Computerprogramms „Mapsort“ eine geeignete Schnittstelle für das Restriktionsenzym in der erhaltenen Sequenz bestimmt und das Amplifikat mit der bestimmten Endonuklease verdaut.

Zu jeweils 7µl PCR-Amplifikat werden 5 Teile des entsprechenden Restriktionsenzym gegeben. Zum Enzymverdau gibt man dieses Produkt für 2,5 Stunden in ein Wasserbad mit einer enzymespezifischen Temperatur. Die Restriktionsendonuklease hydrolysiert das PCR-Produkt durch die Spaltung einer Phosphodiesterbindung zwischen zwei Nukleotiden der Erkennungssequenz. Je nach Vorhandensein der Variante ist es möglich, dass Schnittstellen der Restriktionsenzyme zerstört werden oder neue entstehen. Es bilden sich Restriktionsfragmente unterschiedlicher Länge, die durch die Gelelektrophorese mit einem Polyacrylamidgel (10%ig 49:1 Acrylamid:Bis-Acrylamid; 0,5xTBE; Laufzeit ca. 2h) und anschließender Silberfärbung sichtbar gemacht werden. Die Auswertung der sich darstellenden Banden ermöglicht die genaue Bestimmung des Genotyps der untersuchten Personen [66].

Bei korrekter DNA-Sequenz erhält man nun die erwarteten Schnittfragmente. Die Auswahl geeigneter möglicher Restriktionsenzyme erfolgt mit Hilfe der Datenbank Webcutter [67].

2.3 Materialien

2.3.1 Frischblut von Patienten

2.3.2 Geräte

Autoklav, München	Varioklav Typ 500, H + P Labortechnik, München
Brutschrank	Heraeus Instruments UT 20, Berlin
Elektrophoresekammern	GNA 200 Pharmacia LKB, Freiburg Horizon 58, Gibco BRL, Eggenstein Multigel-Long TypG47, Biometra, Göttingen
Fluorimager™ SI system	Molecular Dynamics, Amersham LIFE SCIENCE, Eugene, OR
Fünfkanalpipette	TI 3 BioDoc II™, Bio Doc CCD-Camera Biometra, Göttingen
Geldokumentationsanlage	TI; BioDoc Htm; BioDoc CCD-Camera, Biometra, Göttingen
Geltrockner	Geldryer Model 583, Vapor Trap, Vacuum Pump, Bio-Rad, Richmond, USA
Laborwaage	Typ 1712004, Sartorius, Göttingen
Magnetrührer	MR 3001 K, Heidolph, München
Mikrowelle	Micromat, AEG
PCR-Gerät	Gene Amp PCR System 9600, Perkin Elmer, Weiterstadt
Photometer	Lumat LB 9501, Berthold, Bad Wildbad
Schüttelinkubator	Model 3033, GFL, Burgwedel
Schüttler	SM 25, Bühler, Tübingen
Sequenzierer	ABI Prism™ 377 DNA- Sequencer, Perkin El, Weiterstadt
Spannungsgeräte	Elektrophoresis Power Supply EPS 200, Pharmacia Biotech, Freiburg
Vortex Mixer	Reax 2000, Heidolph, München
Wasserbad	Typ WB 7, Memmert, Schwabach
Zentrifuge	Centrifuge 5417 C, Eppendorf, Hamburg

2.3.3 Reagenzien

ABI	Amp Taq FS
Amresco, Ohio	Acrylamid 40%, Ammoniumpersulfat, Bisacryl mid 2%, TEMED
Biorad	Acrylamid/Bisacrylamid 19:1, Ionenaust. AG 501-X8
Biozym, Hameln	Agarose universal
Boeringer, Mannheim	dNTPs (Desoxy-Nukleotidtriphosphatate)
Braun, Melsungen	Aqua ad injectabilia
Gibco BRL	dNTPs, PCR-Puffer, Taq-Polymerase,
Merck, Darmstadt	Borsäure, EDTA, Essigsäure, Ethanol, Formamid, Magnesiumchlorid, Natriumbicarbonat, Salpetersäure, Silbernitrat, TBE Puffer (Trisaminomethan, Borsäure, Titriplex III), Tris-Base (Trishydroxymethyl-Aminomethan), Tris-HCL
Sigma –Aldrich	Alconox
Sigma-Chemie, Taufkirchen	Ammoniumpersulfat, Bromphenolblau, DMSO (Dimethylsulfoxid), Ethidiumbromid, Formaldehyd, Harnstoff, N,N- Dimethylformamid, Temed (N,N,N,N-Tetramethylethylenediamin), Triton X 100

2.3.4 synthetische Oligonukleotide (Primer)

Primer zur Amplifikation des Myosinbindungsprotein C Gens

Primer	Sequenz	Annealing-Temperatur	Fragment-Größe
Ex6F	40 67 -> 40 85 : att aca ggc ctg agc cac c	72°C	291
Ex6R	43 57 -> 43 38 : gag gta gga gac cag gac cc		
Ex7F	47 06 -> 47 25 : cat gaa tgg gca agt ctg tg	66°C	210
Ex7R	49 15 -> 48 97 : gaa ggg cct cag act cca g		
Ex8F	49 00 -> 49 18 : gag tet gag gcc ctt cag g	64°C	259
Ex8R	51 58 -> 51 39 : ggg aga aag gga cac tag cc		
Ex9F	51 77 -> 51 96 : cct gct cct aat ccc ttt cc	64°C	223
Ex9R	53 99 -> 53 79 : tca gag agg tgc agt gtt gtg		
Ex10F	55 89 -> 56 06 : agg gtc tac cag gtc ggc	64°C	234
Ex10R	58 22 -> 58 05 : gac tea ccc ctg tec gtg		
Ex11F	60 13 -> 60 32 : agg tgg cca tac ctc tca tg	56°C	265
Ex11R	62 70 -> 62 58 : cag gac caa gga gct gta gc		
Ex12F	63 23 -> 63 41 : acc gcc tag act gct gga c	68°C	268
Ex12R	65 90 -> 65 71 : ggc taa cct atg ccc tet cc		
Ex13F	81 19 -> 81 37 : cca gcc aca gcc aca gta g	64°C	275
Ex13R	83 93 -> 83 76 : agg agg caa ggc tat ggg		
Ex14F	84 43 -> 84 62 : ctc tct ggg cct aat ttc cc	60°C	263
Ex14R	87 05 -> 86 88 : ctt ggc acc gat gga ctc		
Ex15F	85 94 -> 86 12 : ggg gca cag gga tta tca c	66°C	282

Material und Methoden

Ex15R	88 75 -> 88 58 : ggt gag cat gag ggt tgg		
Ex16F	88 29 -> 88 46 : aac ctg ggg agg aga tgg	56°C	296
Ex16R	91 24 -> 91 04 : gta ttt gaa ggt ctc ctc ccg		
Ex17F	90 42 -> 90 59 : aga ggc cac agc act tgc	60°C	290
Ex17R	93 31 -> 93 14 : ttg cct gct ccc cta cag		
Ex18F	96 00 -> 96 17 : cct cca cag gga ttc acg	58°C	299
Ex18R	98 98 -> 98 77 : ccc tgt gtc tct ctc tgt ctc c		
Ex19F	10 462 -> 10 482 : tca gaa tac caa caa gcc agg	63°C	247
Ex19R	10 708 -> 10 691 : acc cta ccc tgg agc agg		
Ex20F	10 689 -> 10 706 : agc ctg ctc cag ggt agg	58°C	161
Ex20R	10 849 -> 10 832 : aac caa gac tca ggg gcc		
Ex21F	11 969 -> 11 986 : ccc cag tga cct gtg ctc	58°C	263
Ex21R	12 231 -> 12 213 : ctt ggc tgg ttc cac aca c		
Ex22F	12313 -> 12331 ggc aag gtg ggc agt gtg g	62°C	228
Ex22R	12518 -> 12540 tga aag aca aac gat cct cct cc		
Ex23F	13092 -> 13111 tcc tgg gtc tga ctt gga tc	62°C	292
Ex23R	13383 -> 13364 ttg teg agt ggc tga atg ag		
Ex24F	13990 -> 14007 ggc tga tgt ggg tcc atc	62°C	281
Ex24R	14270 -> 14249 gta gct ctt ctt ctt ctt gcg c		
Ex25F	14202 -> 14219 ttc cag acc aga gct gcc	60°C	295
Ex25R	14496 -> 14475 gag cac ctg cta tta ttg gag g		
Ex26F	15598 -> 15618 gag tct agg gca tgg atc tcc	60°C	248
Ex26R	15845 -> 15827 tgt tet tcc ttt ggg gag g		
Ex27F	16406 -> 16423 cag tgg gag tgg ggt gtc	60°C	271
Ex27R	16659 -> 16676 tca atg gcg ggt ctt gtg		
Ex28F	17575 -> 17593 gct ctc tgg gcc ttg tct g	58°C	227
Ex28R	17801 -> 17782 tat agc ctc tct ccc ctg gg		
Ex29F	17891 -> 17910 atc cag gtt cag ggt taa gc	65°C	264
Ex29R	18154 -> 18137aca agg ggg ctc aag gag		
Ex30F	18305 -> 18322 gtc agg agg cgt ggt gac	58°C	260
Ex30R	18564 -> 18545 gga cag tga agg gta gct gc		
Ex31F	18647 -> 18664 gct ctc ggc atc agg aag	63°C	280
Ex31R	18926 -> 18909 tct ccc tgt tcc cac agc		
Ex32F	18926 -> 18944 agg ggc cta gct ttg tgt g	56°C	264
Ex32R	19189 -> 19170 gga gag gac tgc tca acg tc		
Ex33F	19389 -> 19408 ggc ttc cct ccc tet ctt ta	62°C	300
Ex33R	19688 -> 19670 gag gac aac gga gca aag c		
Ex34F	19670 -> 19688 gct ttg ctc cgt tgt cct c	62°C	194
Ex34R	19863 -> 19846 : act tgt gcc ctg ggt gtc		

Primer zur Amplifikation des Troponin T Gens

Primer	Sequenz	Annealing-Temperatur	Bedingung	Konzentration
Ex2F neu Ex2R	ttc tga gga agg cag gct tc ccc cac tca ggc aag atg	58°C	35 Zyklen	10pmol 10pmol
Ex3+4F Ex3+4R	Atg tgc tgt gtg cga gct ac Gac aga tga gct gct ttc cc	60°C	35 Zyklen	10pmol 10pmol
Ex5F Ex5R	Tgg tcc tgc ctg ata gca tg Gtc agg tgc aca tgg gaa g	60°C	35 Zyklen	10pmol 10pmol
Ex6F Ex6R	Cag ggg aat gtg tgt gtg ag Tgt ggg att ctc ctc caa ag	62°C	35 Zyklen	5pmol 5pmol
Ex7F Ex7R	Atg ggg aaa tgg aaa tcc ac Ctc tcc tag gcc tct gct cc	62°C	35 Zyklen	10pmol 10pmol
Ex8F Ex8R neu	Tgc cat tgt tga cgt cag Ggc cta ctc aac cca cag	59°C	35 Zyklen	5pmol 5pmol
Ex9Fb Ex9R	Gtg gtc tag ccc acc cat ctc Tga gac aga ctg gcc atc ag	62°C	35 Zyklen	5pmol 5pmol
Ex.10 F (11Fs) Ex.10 Rs	Gga ggc cgg gca cca ttg Atg ggc ctg ggc tag ggg	68°C	35 Zyklen	10pmol 10pmol
Ex.11 F Ex.11 R	Caa tcc ttt ccc cta att tgc Ctg cag tgg aca cct cat tc	60°C	35 Zyklen	10pmol 10pmol
Ex.12 F Ex.12 R	Ctc ttc cat gtc tet cct tgc Ggg gag gaa gaa ggc ttg ag	54°C	35 Zyklen + 5% DMSO	10pmol 10pmol
Ex.13 F Ex.13 R	Gtg gca gtt tac tet get tcc Tgg tgg ctc aca gca aga ag	60°C	35 Zyklen	10pmol 10pmol
Ex.14 Fmod Ex.14Rmod	Aga gaa gtt cga cct gca gaa ga Ggg gaa tag gga cag gga ccc	60°C	35 Zyklen	10pmol 10pmol
Ex.15 F Ex.15 R	Tgc act cac ccc ctt ctc Ctg gaa ggc agg gaa gga gg	60°C	35 Zyklen	10pmol 10pmool
Ex.16 F Ex.16 R	Cca tgt cac tgc gtc ctg Ccc cat ttc caa aca gga g	60°C	35 Zyklen	10pmol 10pmol

Primer zur Amplifikation des Alpha-Tropomyosin Gens

Primer	Sequenz	Annealing-Temperatur	Bedingung	Konzentration
Ex2F Ex2R	tcc ctg tac ccc ctg gcc aa cgc gga dcc ggg aag cag tgt gag cgt gc	62°C	35 Zyklen	5pmol 5pmol
Ex3F Ex3R	ccc agc cat ttc ctg aag cta cca cca cca gga aag gca gct gca aaa g	66°C	35 Zyklen	5pmol 5pmol
Ex4F Ex4R	ggc cac agc agt gca gtg tgc att t ggc tgt cct gaa ggc cac tgc t	66°C	35 Zyklen	5pmol 5pmol
Ex5F Ex5R	cca tgc cct tct gtt aca caa agc tgc cag aag gtc atg ctg ttt agt c	56°C	35 Zyklen	10pmol 10pmol
Ex6F Ex6R	ttg gct tgt ctc cca ccc tt ggc ctc ttt tga gca gct ctt aaa ag	58°C	35 Zyklen	5pmol 5pmol
Ex7F Ex7R	gag tag att gag cag cag ctt gac a atg aaa agg cct gac cgg ttc cat g	58°C	35 Zyklen	5pmol 5pmol
Ex8F Ex8R	ccc tac gtt tgt agc tac agg aaa c agt gca aag gag cgt atc aat gtg g	62°C	35 Zyklen	10pmol 10pmol
Ex9F Ex9R	tct gcc ttc cac ttc ctg gt caa gga ggc atg gtg gtg agt tta	58°C	35 Zyklen	5pmol 5pmol