Aus der Medizinischen Fakultät der Charité, Campus Berlin-Buch, Franz-Volhard-Klinik
HELIOS Klinikum-Berlin und Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin,

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Friedrich C. Luft
Abteilung: Klinische Molekulargenetik
Arbeitsgruppe: Prof. Dr. med. Friedrich C. Luft

Universelle Multifluoreszenzunterstützte PCR-SSCP für den Nachweis von genetischen Variationen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Grades Doctor rerum medicarum
an der Charité - Universitätsmedizin Berlin

vorgelegt von : Atakan Aydin
aus : Berlin

Referent: Prof. Dr. med. Detlev Ganten
Koreferent: Prof. Dr. med. S.-M. Brand-Hermann

Gedruckt mit Genehmigung der Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
Promoviert am: 27.05.2005

Meinen Eltern Ismet und Baton Aydin

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 3

1.1 Genetische Variationen 3
1.2 Die Rolle von Mutationen und Polymorphismen in der Epidemiologie 4
1.3 Nachweisverfahren von Mutationen und Polymorphismen 6
1.4 Familiäre Hypercholesterinämie 9
1.4.1 Der LDL-Rezeptor 10
1.5 Long-QT-Syndrom 11
1.5.1 Long-QT-Syndrom-Gene 13

2 Aufgabenstellung und Vorgehensweise 15

3 Darstellung der entwickelten Applikation 16

4 Material und Methoden 18

4.1 Material 18
4.1.1 Geräte 18
4.1.2 Chemikalien, Puffer und Lösungen 18
4.1.3 Enzyme 19
4.1.4 Oligonukleotide 19
4.1.5 Datenbanken 24
4.1.6 Software 24
4.2 Methoden 25
4.2.1 Isolierung genomischer DNA aus EDTA-Blut 25
4.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) 27
4.2.2.1 Ein-Schritt-PCR 27
4.2.2.2 Zwei-Schritt-PCR 28
4.2.3 Kapillar-Single-Strand-Conformation-Polymorphism (Kapillar-SSCP) 30
4.2.3.1 Prinzip und Verfahrensweise 30
4.2.4 Sequenzierung 31
4.2.5 Primer-Extension Reaktion 32

5 Ergebnisse 34

5.1 Optimierung wesentlicher Schritte der universellen Multifluoreszenz-unterstützten PCR-SSCP 34
5.1.1 Entwickeln von universellen Amplifikationsprimern 34
5.1.2 Entwickeln von spezifischen Amplifikationsprimern 36

5.1.3 Fluoreszenzmarkierung von Amplifikaten 36
5.1.4 Optimierung verschiedener SSCP Bedingungen 37
5.1.5 Einfluss von Temperatur und Polymer 37
5.2 Etablierung der universellen Multifluoreszenzunterstützten PCR-SSCP als Diagnostikverfahren für die Familiäre Hypercholesterinämie 39
5.2.1 Etablierung einer Fluoreszenzmarkierten Ein-Schritt-PCR 39
5.2.2 Nachweis von genomischen Mutationen im LDL-Rezeptor-Gen 41
5.2.3 Multiplex-Fluoreszenz-SSCP 44
5.2.4 Sensitivität und Reproduzierbarkeit 45
5.3 Etablierung der universellen Multifluoreszenzunterstützten PCR-SSCP als Nachweisverfahren zur Detektion von genetischen Variationen an den Long-QT-Syndrom-Genen 46
5.3.1 Nachweis von genetischen Variationen an DNA-Proben der Normalpopulation 46
5.3.2 Nachweis der identifizierten genetischen Variationen an Proben eines Zwillingskollektivs 47
5.3.3 Genotypisierung genetischer Variationen in Zwillingen 48
5.3.4 Phänotyp Darstellung 49
5.3.5 Spektrum und Frequenz der gefundenen SNPs in den Long-QT-Genen 51
5.3.6 Assoziation von genetischen Variationen in Zwillingen 54

6 Diskussion 56

6.1 Leistungsfähigkeit der universellen Multifluoreszenzunterstützten PCR-SSCP 56
6.2 Analyse von Mutationen für die Diagnose der Familiären Hypercholesterinämie 59
6.3 Genetische Variationen in den Long-QT-Syndrom-Genen und deren Analyse 63

7 Zusammenfassung 69

8 Literaturverzeichnis 71

9 Abkürzungsverzeichnis 78

10 Anhang 81

10.1 Danksagung 81
10.2 Publikationen 82
10.3 Vorträge 84
10.4 Patente 84
10.5 Lebenslauf 85