2 Aufgabenstellung und Vorgehensweise

Ziel dieser vorliegenden Arbeit war die Entwicklung und Etablierung einer neuartigen Applikation, die auf markierten, nicht-humanen Oligonukleotiden und der SSCP basiert. Es sollte geprüft werden, inwieweit diese Methode als Diagnostikverfahren bei der Familiären Hypercholesterinämie (FH) und als Nachweisverfahren zur Detektion von genetischen Variationen am Beispiel des Long-QT-Syndroms (LQT-Syndrom) eingesetzt werden kann.

Für die Etablierung der Diskriminierung von Mutationen und genetischen Variationen sollten folgende Ziele erarbeitet und durchgeführt werden:

1) Entwickeln von universellen Oligonukleotiden, um diese an die 5'-Enden der spezifischen Vorwärts- und Rückwärtsprimer der zu untersuchenden Gene zu koppeln.
2) Etablieren von spezifischen Oligonukleotiden für die Amplifikation und die Mutationssuche am LDL-Rezeptor-Gen.
3) Untersuchung der Applikation als Methode zur Diagnose der Familiären Hypercholesterinämie.

3a) Optimierung der Bedingungen zur Detektion von Sequenzunterschieden mittels Kapillar-SSCP.

3b) Untersuchung und Charakterisierung von verschiedenen Bedingungen zum Nachweis von Mutationen: Überprüfung eines Einschritt-PCR-Systems; Überprüfen von Duplex- bzw. Multiplexfähigkeit von fluoreszenzmarkierten universellen Oligonukleotiden.

4) Etablieren von spezifischen Oligonukleotiden für die Amplifikation und Suche von genetischen Variationen an den LQT-Syndrom-Genen. Die Variationssuche wird an Proben der Normalbevölkerung durchgeführt. Fragmentunterschiede werden durch Sequenzierung bestätigt.
5) An einem Kollektiv von gesunden monozygoten und dizygoten Zwillingspaaren werden die unter Punkt 4) gefundenen allelischen Variationen durch die Primer-Extension-Reaktion genotypisiert und Muster verglichen.
6) Durchführen von statistischen Assoziationsanalysen des Einflusses der gefundenen genetischen Variationen für das frequenzkorrigierte QT-Intervall (QTc) in der Normalbevölkerung.