4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Außer den üblichen Geräten, die zur Ausstattung eines Labors gehören, wurden folgende Geräte genutzt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Eingesetzte Geräte

Geräte	Bezeichnung (Herstellerfirma)
PCR-Gerät	Gene Amp PCR System 9600 und 9700 (Applied Biosystems)
Gel-Dokumentation	Video-Imager, Appligene
Zentrifuge	Sigma 4K15
Elektrophorese-Kammer	AGS
Kapillarsequenzer	ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)

4.1.2 Chemikalien, Puffer und Lösungen

Chemikalien wurden, wenn nicht anders erwähnt, von den Firmen Applied Biosystems, Merck, Roth oder Sigma in analytischer Qualität eingesetzt. Agarose wurde von der Firma Gibco BRL, dNTPs von Amersham bezogen. Als DNA-Fragmentlängenstandard für die Agarosegele wurde entweder Marker V oder VIII von der Firma Roche eingesetzt. Als DNA-Fragmentlängenstandard für die Kapillarelektrophorese wurden Fragmentlängenstandards von der Firma Applied Biosystems verwendet; diese waren mit dem Fluoreszenzfarbstoff LIZ oder ROX markiert. Häufig verwendete Puffer wie TE, TAE und TBE wurden nach dem Laboratory Manual (Molecular Cloning, Second edition, Maniatis et al. 1989) angesetzt. Alle weiteren Puffer und Lösungen sind bei den jeweiligen Methoden angegeben.

4.1.3 Enzyme

Für die Amplifikation von verschiedenen DNA-Abschnitten wurde die AmpliTaq Gold-DNA-Polymerase der Firma Applied Biosystems sowie die Taq-Polymerase der Firma Eppendorf (bezogen von der Firma Invitek) verwendet. Bei schwierigen DNA-Abschnitten mit hohen GC-Gehalt wurde die Thermal Ace-DNA-Polymerase der Firma Invitrogen eingesetzt. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit der Exonuklease I und Shrimp Alkaline Phosphatase der Firma New England BioLabs und der Firma Amersham. Der Einsatz der Enzyme ist nach den Anweisungen der Herstellerfirmen in den mitgelieferten Puffern erfolgt.

4.1.4 Oligonukleotide

Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind in den Tabellen 4.1 bis 4.4 zusammengefasst. Alle Oligonukleotide wurden von den Firmen *BioTez* Berlin-Buch GmbH oder Applied Biosystems bezogen. Für das Entwickeln der Oligonukleotide sind verschiedene Datenbanksequenzen verwendet worden. **LDL-Rezeptor:** NT_011295, mRNA NM_000527; **KCNE1:** Chromosomen 21 Abschnitt AC001720.1, US Patent 6,274,332; **KCNE2:** Chromosomen 21 Abschnitt Accession AP001719.1, mRNA AF302095.1; **HERG:** BAC-Klon AC0112334.1, PAC-Klon AC006343.1; US Patent 6,207,383; **SCN5A:** BAC-Klon AC137587.2, Celera hCT33707.2, mRNA NM_000335.1; **KCNQ1:** Chromosomen 11 Arbeitsversion NT_009368.6, mRNA XM_052604.2.

Tabelle 4.1: Oligonukleotidsequenzen, die bei der Ein-Schritt-PCR für den Nachweis von Mutationen im LDL-Rezeptor eingesetzt wurden.

Name / Verwendung	Oligonukleotidsequenz 5'->3'	TM °C	$MgCl_2$ mM	Länge bp	GC %
LDLR-Promotor-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGG AGT GGG AAT CAG AGC TTC ACG GGT	60	3,5	252	53,5
LDLR-Promotor-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC CGG ATC ACG ACC TGC TGT GTC CTA				
LDLR-E1-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGC ACA TTG AAA TGC TGT AAA TGA CG	60	3,5	250	63,7
LDLR-E1-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC CTA TTC TGG CGC CTG GAG CAA GCC				
LDLR-E2-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGT TGA GAG ACC CTT TCT CCT TTT CC	60	3,5	218	54,1
LDLR-E2-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC GCA TAT CAT GCC CAA AGG GG				
LDLR-E3-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGC AGT GGG TCT TTC CTT TGA GTG ACA	60	3,5	262	55,9
LDLR-E3-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC CAG ACC ACT CCC CAG GAC TCA GAT A				
LDLR-E4A-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGA ATG GGC TGG TGT TGG GAG ACT	60	3,5	358	62,8
LDLR-E4A-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC CCT TGG AAC ACG TAA AGA CCC CTA C				
LDLR-E4B-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGA ACG ACC CCG ACT GCG AAG A	60	3,5	279	63,5
LDLR-E4B-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC GGA GCC CAG GGA CAG GTG ATA				

LDLR-E5-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGA GGC CCT GCT TGT TTT TCT CTG	60	3,5	306	52,4
LDLR-E5-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC CGC CCT CTG GCT TCA CAA ATC				
LDLR-E6-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGC CAT TGC ATG CGT TCT TAT GTG A	60	3,5	358	52,6
LDLR-E6-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC AGT GGA GTT CCC AAA ACC CTA CAG				
LDLR-E7-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGC GGG AGG TGG AGG TTG TAA TGA	60	3,5	315	62,5
LDLR-E7-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC CAT GAG GGT TTG GTT GCC ATG				
LDLR-E8-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGG CCC CAT CGC TCC GTC TCT A	64	3,5	336	64,5
LDLR-E8-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC GGA TGA AAC TCC CCC ACC ACT G				
LDLR-E9-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGC AGG ATG ACA CAA GGG GAT G	60	3,5	372	62,6
LDLR-E9-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC AGG AGG AGA GAA GGG CAT CA				
LDLR-E10-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGC TGG TGC GAT GCC CTT CTC T	64	3,5	321	59,8
LDLR-E10-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC AGC CCT CAG CGT CGT GGA TAC				
LDLR-E11-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGT CCT CCC CCG CCC TCC AGC C	58	2,5	229	57,2
LDLR-E11-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC GCT GGG ACG GCT GTC CTG CG				
LDLR-E12-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGC CCT CTG GGA CTG GCA TCA G	60	3,5	313	53,6
LDLR-E12-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC TCT GCG TTC ATC TTG GCT TGA GTG				
LDLR-E13-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGG TCA TCT TCC TTG CTG CCT CT	58	2,5	251	50,9
LDLR-E13-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC TTC CAC AAG GAG GTT TCA AGG TTG $(G)_6$				
LDLR-E14-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGC CTT GTG GAA ACT CTG GAA TGT TCT	58	2,5	333	58,7
LDLR-E14-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC AGG GGG CAG TTG GAG GAC AC				
LDLR-E15-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGT CAA GAG ATC CTC CTG CCT T	60	3,5	404	57,7
LDLR-E15-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC TCG TGA CCA AAA TGT TCG TG				
LDLR-E16-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGC CTT CCT TTA GAC CTG GGC C	58	2,5	208	62,4
LDLR-E16-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC CAT AGC GGG AGG CTG TGA CC				
LDLR-E17-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGG GGT CTC TGG TCT CGG GGG C	60	3,5	277	55,8
LDLR-E17-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC GGC TCT GGC TTT CTA GAG AGG G				
LDLR-E18-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGG TAG GTG GCC CTC CAG CCT GTT TC	58	2,5	206	56,1
LDLR-E18-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC AAT AAA ACA AGG CCG GCG AGG TCT C				

Tabelle 4.2: Oligonukleotidsequenzen, die bei der Zwei-Schritt-PCR für den Nachweis von Polymorphismen in den LQT-Genen eingesetzt wurden. (T.A.= $MgCl_2$ vom Thermal Ace DNA-Polymerase Kit).

Name / Verwendung	Oligonukleotidsequenz 5'->3'	TM °C	$MgCl_2$ mM	Länge bp	GC %
KCNE1-E1-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGC TGG GGT GCA GAG TGT GGA G	55	T.A.	385	74,3
KCNE1-E1-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC GGA GAC GCA GGT TCC AGG AG				
KCNE1-E2-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGG GAC TTT GCT GAG TTC ACA C	60	3,5	352	43,8
KCNE1-E2-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC CTA CCA GAA AGA GCG AAA CC				
KCNE1-E3A-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGT GGA GTG GTG GAT GGA AAT A	60	3,5	364	48,3
KCNE1-E3A-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC CTG AAC TGT CTC CTG CCA CA				
KCNE1-E3B-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGT CCT GTC TAA CAC CAC AGC G	60	3,5	390	58,3
KCNE1-E3B-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC GTG TTG GGT TGT TCT ATG GC				
KCNE1-E3C-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGC TAC AGG TCG TGC TAT GTC G	60	3,5	362	45,9
KCNE1-E3C-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC CCT CAG GGA TTC TGC TAA AT				
KCNE1-E3D-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGT AGA CTG TCA GTG GTT CCC C	60	3,5	397	51,9
KCNE1-E3D-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC CTCTCTCCTGTAAATCTGGC				
KCNE1-E3E-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGA TCC TCC TTA CCA CCC ACC A	60	3,5	414	47,6
KCNE1-E3E-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC CCT CCA TCT CAG CCC TGT AC				
KCNE1-E3F-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGT GAA AAC ACA CAG GCA CAT A	60	3,5	435	50,2
KCNE1-E3F-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC CGA TAA GGA CTC CAG TCA TA				
KCNE2-E1-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGT GGG TTC ATA AAA GCA TAG G	60	3,5	288	45,5
KCNE2-E1-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC TCT GGA AAA GGC ACA TAG AT				
KCNE2-E2A-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGA CTT ATA CCC TGG CAT CTC C	60	3,5	342	43
KCNE2-E2A-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC CCA CGA TGA TGA AAG AGA AC				
KCNE2-E2B-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGT GTC ATC CTG TAC CTC ATG G	60	3,5	463	45,1
KCNE2-E2B-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC CTC CAA CAA GCA AGC ATA AA				
KCNE2-E2C-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGA TGG AGA TTA TGT GGT TGG C	60	3,5	367	35,8
KCNE2-E2C-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC CCG TCT GGT AAG CAA GTG AT				

HERG-5UTR/E1-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGG CTC AGG CGG CTC CAG GCC	62,5	T.A.	355	77,8
HERG-5UTR/E1-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC CCT CCC CGC TCA GCC CCC T				
HERG-E2-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGG GGG AAG GGC TGG GAG TCC	62,5	T.A.	392	70,3
HERG-E2-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC TGG TCC CGC CCC TCT TGA C				
HERG-E3-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGG GCT ATG TCC TCC CAC TCT	60	2,5	272	59,1
HERG-E3-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC GAA ATG AGA CCA CGA ACC C				
HERG-E4A-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGA GCG GCT GGG GGT CCA TTT	62,5	T.A.	425	76,7
HERG-E4A-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC GTC GGG GTT GAG GCT GTG C				
HERG-E4B-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGC CCT GGA CGA AGT GAC AGC	57,5	T.A.	374	76,7
HERG-E4B-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC CTG GCA GCA GAA GAA GCG T				
HERG-E5-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGT GAC CAC GCT GCC TCT CCA	60	2,5	333	60,4
HERG-E5-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC ACT CCC ACC CCC TCT CCA A				
HERG-E6A-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGG AGA TGT CAT CGC TCC TGC	60	2,5	395	63,1
HERG-E6A-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC GCG GAA GTT GAT GAG GAT G				
HERG-E6B-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGG TGG ACC TCA TCG TGG ACA	60	2,5	219	59,8
HERG-E6B-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC CAC CTG CCT CCT TGC TGA C				
HERG-E7A-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGT CTG ATG CTC GCT CTG AGG	55	T.A.	411	64,4
HERG-E7A-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC CGC CGT CAC ATA CTT GTC C				
HERG-E7B-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGG GCA AAC CCT ACA ACA GCA	60	2,5	378	61,8
HERG-E7B-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC CCA CCC TTC AGT AGT CCC C				
HERG-E8-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGC GAC GCT GAG ACT GAG ACA	60	2,5	421	65,3
HERG-E8-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC TTT GCT GTG CCA AGA GGT T				
HERG-E9-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGA GTA GAG TGT GGG TTG GGG	60	2,5	391	65,4
HERG-E9-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC AGG GCA TTT CCA GTC CAG T				
HERG-E10-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGG AGG GTG GGC TGG CAG ATT	60	2,5	440	63,5
HERG-E10-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC GAA GCA GGA GGA TGG GGT C				
HERG-E11-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGC AGG AGA GCA CTG AAA GGG	58	T.A.	300	63,4
HERG-E11-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC ACA CTG GAG GAA GGG ATG G				
HERG-E12-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGG CCC ATT CTC TGT TTC CC	57,5	T.A	389	74,3
HERG-E12-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC GTA GAC GCA CCA CCG CTG				
HERG-E13-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGC AGC GGT GGT GCG TCT AC	57,5	T.A.	399	67,3
HERG-E13-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC AGG AAT GGA AGA AGG GGA				
HERG-E14-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGT CTG AGC ATC CCC CAC TT	60	2,5	320	64,2
HERG-E14-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC AAG GCA GCA AAG CAG GTT				
HERG-E15-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGG CCC ATG CTC TGT GTG TA	60	4,5	322	68,3
HERG-E15-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC CGA GTT CCT CTC CCC TTC				
HERG-3UTR-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGC GTG GCT CAC CCA GGG AT	64	3,5	440	57,3
HERG-3UTR-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC CAC CCT CCC AGC ACC ACT				
KCNQ1-5UTR/E1A-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGC TCG GCC ACT GCC CCC TCC G	57,5	T.A.	372	82,2
KCNQ1-5UTR/E1A-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC GGC GCG ATG GGC GCG TAG AG				
KCNQ1-E1B-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGA AGT GCC CCT TCT CGC TGG A	57,5	T.A.	374	74
KCNQ1-E1B-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC GCT CTC AGG AAG CAC CTT CG				
KCNQ1-E2-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGG TGA TGC TGA CTG CC GTG TC	60	2,5	347	61,9
KCNQ1-E2-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC GGC ACA TAC ATC CCA AGT CA				
KCNQ1-E3-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGATG GCT GGG TTC AAA CAG GTT	60	2,5	332	63,3
KCNQ1-E3-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC ACT CCA TCT GGT AGG GGT CAT				
KCNQ1-E4-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGA GAC GAG AGC AGG GTG TAT G	60	2,5	296	66,3
KCNQ1-E4-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC GCA TCT GAG CAA GGT GGA TG				
KCNQ1-E5-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGC CTG TCG GGA TGG ACA TAT A	60	2,5	375	67,6
KCNQ1-E5-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC CGC ATC TCA AGC TGT CCT AG				
KCNQ1-E6-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGA GCC CGA CAC TGT GTG TTT T	60	2,5	268	60,1
KCNQ1-E6-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC AGA TGT CCT GCC CAC TCC TC				
KCNQ1-E7-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGG AGT GGT GGG TTT GGG TTA G	60	2,5	377	62
KCNQ1-E7-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC GGT GGG GCT CTG GAG TAT AG				
KCNQ1-E8-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGT CCA GCA CTG ACC ATA CCT G	60	2,5	381	60,1
KCNQ1-E8-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC AAG CAG AGT ATG CCC CAC AG				
KCNQ1-E9-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGC TGT GAC TCT GAG GTC CCA G	57	T.A.	433	65,1
KCNQ1-E9-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC AAC GAT GCT GAC TCC CTG AC				
KCNQ1-E10-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGA GGA ACC GCT AAT CTG TTG T	60	2,5	346	54,3

KCNQ1-E10-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC TCC ACC CTC TGT CTG TTC AT				
KCNQ1-E11-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGG TGC TGT CCC CAC ACT TTC T	60	2,5	365	58,8
KCNQ1-E11-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC AGT GCC CTT GCT CTC CTC TC				
KCNQ1-E12-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGC CAC TCA CAA TCT CCT CTC C	60	2,5	303	60,1
KCNQ1-E12-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC GGC ACT GTC AGG TCT CAG AT				
KCNQ1-E13-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGG CTT ATG CCA TCA CCA CAT	60	2,5	374	63,4
KCNQ1-E13-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC AGA ACT CAG GGT CTC AGC C				
KCNQ1-E14-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGG TTG GGA GTG ACC TGG CAG	57	T.A.	417	58,9
KCNQ1-E14-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC CAC TTT GCT AAG GGT GGG G				
KCNQ1-E15-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGC TAC CAC CCC ACT TCC CAA	60	2,5	261	63,3
KCNQ1-E15-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC TTC ACA CGC AGA CCA CAG G				
KCNQ1-E16-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGG CAC CTT CCC TTC TCT GG	57	T.A.	413	68,5
KCNQ1-E16-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC CTC CCC TCT CAC TCA GGC				
SCN5A-5UTR/E1-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGC CCG TAG GAT GCA GGG A	58	T.A.	328	78,8
SCN5A-5UTR/E1-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC GCT CTC TGG GGC ACT GAT C				
SCN5A-E2-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGG CCC ACC CTG CTC TCT G	60	3,5	487	61,5
SCN5A-E2-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC CCC CCT CTG CTC CAT TG				
SCN5A-E3-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGC CAC AGT CCA AGG GCT CT	60	3,5	272	52,3
SCN5A-E3-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC CAG GGG GTA CTC AGC AGG				
SCN5A-E4-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGC AGC CCC AGT GTG TCT CC	60	3,5	322	60,6
SCN5A-E4-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC TGG AAT GGA AAG GAA GGG				
SCN5A-E5-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGC CTC CCT AAG AAA CCC CA	60	3,5	233	53
SCN5A-E5-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC GGC ATA GCA CAG CAT AGC				
SCN5A-E6-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGC CCA GGT TTG CCT CTC AG	60	3,5	416	52,2
SCN5A-E6-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC TGT CCA CTG CCA ATA GCC				
SCN5A-E7-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGT CTG GTT GCC TAC ACT GG	60	3,5	428	61,1
SCN5A-E7-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC GGT CTG CTG GTC TCA CAA				
SCN5A-E8-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGC AAG GCG GAA ACTT TTG G	60	3,5	254	53,1
SCN5A-E8-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC TGG GGT CAG GGC ATA AAT				
SCN5A-E9-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGG GTC TCA AGG GCA GCA GA	60	3,5	288	60,9
SCN5A-E9-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC GTA GCC TGG ACC CTG AGC				
SCN5A-E10-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGG GAA ATG CCA TAA CCC AG	60	3,5	337	57,3
SCN5A-E10-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC AGG TGA GGG CTT AGA GGC				
SCN5A-E11-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGT CAC TGA GAG TTG CCT GG	62	4,5	389	54,8
SCN5A-E11-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC ATG GGG GCT GTG ACT GTA				
SCN5A-E12-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGC GTG TCC CCT CTC CTC AT	60	2,5	471	62,2
SCN5A-E12-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC AGA CCT GCT GTG GTG CCT				
SCN5A-E13-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGC AGC CTG AGT CTG GAC CG	60	3,5	360	63,7
SCN5A-E13-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC AGA CAA ATG GGG GAT GCC				
SCN5A-E14-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGC AGC CCT GTC ATC TCC CA	62	4,5	415	52,4
SCN5A-E14-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC GCC CAT TTG AGA GCC AGC				
SCN5A-E15-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGC CTG CCA CAG CAA GAG TC	62	4,5	362	57,8
SCN5A-E15-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC CTC AGA TTG GGT TGT GCC				
SCN5A-E16-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGG GAG CCA GAG CCC TTC AC	60	3,5	521	55,8
SCN5A-E16-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC GAT GGG TGG GTA GCT GGG				
SCN5A-E17A-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGC CCT GGA TTC AAG CCT CG	58	2,5	489	61
SCN5A-E17A-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC TGG TTG CTC GCC TTC CTC				
SCN5A-E17B-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGC AGA GAC GGA GAA GGT GC	60	3,5	311	62
SCN5A-E17B-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC TGC TTT GAG AGA GGC TGG				
SCN5A-E18-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGC CTG GAG ACC CTC TGG CT	60	3,5	366	64
SCN5A-E18-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC TGT GAC AGT GGC TGT GGC				
SCN5A-E19-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGG ATG CTG CCT CCC TTC AG	60	3,5	341	62,4
SCN5A-E19-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC GCT GCT GGT CCT CCT GTC				
SCN5A-E20-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGG CTC ACC ATA TTG CCC TG	60	3,5	403	59,5
SCN5A-E20-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC GAG ACC TCC TTT CCC TGC				
SCN5A-E21-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGG AAA GAA ACG GTG CCT GG	60	4,5	392	57,1
SCN5A-E21-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC TCC CCT TCA GCC TAC TGG				
SCN5A-E22-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGC ACC CAG CAC CGT CTT AG	58	4,5	392	62,5
SCN5A-E22-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC CCT ACC AAG TCA GCC TCG				

SCN5A-E23-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGG CAG GGG GTC TTG AAA AG	58	4,5	427	55,6
SCN5A-E23-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC CCA TTG GGA GGA AGG AAG				
SCN5A-E24-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGG GGT GGC TTG CTT TTC AT	58	4,5	357	51,2
SCN5A-E24-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC GCA TTC CAG AGA GGC TGA				
SCN5A-E25-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGG ACC CCA GCC TGT CTG AT	60	4,5	333	51,7
SCN5A-E25-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC GAG GAC CAT CCC CAA CAG				
SCN5A-E26-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGT CAA TCC TGG CAT CCT CA	60	4,5	396	57,1
SCN5A-E26-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC GGC TGG GAC CTC TCT TCA				
SCN5A-E27-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGA GGC AGC AAC AGG CAT TT	60	3,5	458	52,7
SCN5A-E27-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC TGG CAT TCA GCA GAG ACC				
SCN5A-E28A-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGG ATG CTG GCT GGA AGA CA	60	3,5	477	58,8
SCN5A-E28A-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC CAG AGT GGG GTC GCA GTA				
SCN5A-E28B-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGC TCA GCC CCA TCC TCA AC	60	3,5	431	56,8
SCN5A-E28B-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC GAT GCG GTC CCC ACT CAC				
SCN5A-E28C-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGG CCA AGC CCA ACC AGA TA	60	3,5	435	59
SCN5A-E28C-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC CAA GGG GTC GGG AGA AGT				
SCN5A-E28D-F-Uni	GTG ACG TAC TAG CAA CGG AAG AGG ATG CCC CTG AG	60	3,5	431	59,3
SCN5A-E28D-R-Uni	TAG CAG GAT ACG ACT ATC GCC ACA GAA CTC TGC CTG				

Tabelle 4.3: Nicht humane universelle Oligonukleotidsequenzen, die bei der Ein-Schritt-PCR sowie der Zwei-Schritt-PCR für die Fluoreszenzmarkierung eingesetzt wurden. Für Sequenzierungen sind ausschließlich unmarkierte (*) Primer eingesetzt worden.

Name / Verwendung	Oligonukleotidsequenz 5'->3'	TM °C	$MgCl_2$ mM	Länge bp	GC %
F-Universal*	GTG ACG TAC TAG CAA CG	58	-	-	-
R-Universal*	TAG CAG GAT ACG ACT ATC	58	-	-	-
F-Universal-Dye	FAM- GTG ACG TAC TAG CAA CG	58	-	-	-
R-Universal-Dye	HEX- TAG CAG GAT ACG ACT ATC	58	-	-	-
F-Universal-Dye	VIC- GTG ACG TAC TAG CAA CG	58	-	-	-
R-Universal-Dye	PET- TAG CAG GAT ACG ACT ATC	58	-	-	-
R-Universal-Dye	NED- TAG CAG GAT ACG ACT ATC	58	-	-	-

Tabelle 4.4: Oligonukleotidsequenzen, die für die Primer-Extension-Reaktion zum genotypisieren von SNPs eingesetzt worden sind.

SNP-Nr	Gen Name	Oligonukleotidsequenz 5'->3'	TM °C	Oligolänge bp	Pool Nr
1	KCNE1	(T)10-GAC CCA AGA TGG CAC A	55	26	6
2	KCNE1	(T)19-ACT CCA CAG GCC ATG G	55	35	6
3	KCNE1	TGT ATA CGT GTG TGT GCG	55	18	1
4	KCNE1	(T)27-CAG GGT GGC AAC ATG TC	55	44	6
5	KCNE1	(T)20-CCA GCT TGC CGT CAC	55	35	1
6	KCNE1	(T)35-AAC GTC TAC ATC GAG TCC	55	53	6
7	KCNE1	(T)45-GGC TGT TGT AAG GGG TG	55	62	6
8	KCNE1	(T)24-CAG TGA AAC AGT GTC ATT AA	55	44	1
9	KCNE1	(T)34-TTA TGA GAC TGG GAA AGA A	55	53	1
10	KCNE1	(T)54-CAC ACA CAT CTG GGC CT	55	71	6
11	HERG	(T)27-TTG AAG TAG TGG ACG GC	55	44	3
12	HERG	(T)19-CCT CAG AGC CAG AGC C	55	35	3
13	HERG	(T)37-CCC CAG CCC TCA TGT A	55	53	3
14	HERG	(T)56-GTG GGT GGC AGG CTG	55	71	3
15	HERG	CTG CCA CCC CAC TCT T	55	16	3
16	HERG	(T)47-GCA GGC GCA CGG ACA	55	62	3
17	KCNQ1	(T)37-CAG GTC CTC GGC GAA G	55	53	5
18	KCNQ1	(T)17-AAG TCT GAC TCC TTG AGC	55	35	4
19	KCNQ1	(T)26-CAC CAA GTC TGA CTC CTT	55	44	5

20	KCNQ1	(T)37-GAG GGC AGG AAG GCT C	55	53	4
21	KCNQ1	(T)46-GGT TGA GGT GGC CCT G	55	62	4
22	KCNQ1	(T)11-GGG CTG GGC AGG ACC	55	26	4
23	KCNQ1	(T)28-AGG TGC GGG AGA GTC C	55	44	4
24	KCNQ1	GCC CCA GGA CGC TAAC	55	71	4
25	KCNE2	CTG AAC CTT CTT GCT GG	55	17	2
26	KCNE2	(T)7-CGA ACA AGG TTA GGA AAA C	55	26	2
27	KCNE2	(T)17-ACC TTG TTC GCC TAT TTT	55	35	2
28	KCNE2	(T)27-GTC TTC CAG CGT CTG TG	55	44	2
29	SCN5A	(T)20-CGA GAA GCG CAT GGC	55	35	8
30	SCN5A	(T)55-GCG GAC CTG AGG GTC T	55	71	7
31	SCN5A	(T)32-CAA AGT CTC AAT GAT GGA AAC	55	53	7
32	SCN5A	(T)37-GAG AGC GAG AGC CAC C	55	53	8
33	SCN5A	(T)16-ACA CAG ATG ACC AAG AAG A	55	35	7
34	SCN5A	(T)28-CAC CTG AGG CTC CTG G	55	44	7
35	SCN5A	(T)8-CTG AAC TCC AGA GTG ACA	55	26	7

4.1.5 Datenbanken

Folgende Datenbanken wurden für die Arbeit genutzt (Tabelle 4.5):

Tabelle 4.5: Eingesetzte Datenbanken

Name	Homepage / Kontakt
National Center for Biotechnology Information	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
Ensemble Genome Browser	http://www.ensembl.org
LDLR Locus und Mutationen	http://www.ucl.ac.uk/fh/
LDLR Mutationen	http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/search/119362.html
United States Patent and Trademark Office	http://www.uspto.gov/patft/index.html

4.1.6 Software

Folgende EDV-Programme wurden für die Arbeit eingesetzt (Tabelle 4.6):

Tabelle 4.6: Eingesetzte EDV-Programme

Name	Verwendung	Hersteller
Mac OS 8-9.1	Betriebssystem	Apple
Windows NT, Windows 2000	Betriebssystem	Microsoft
Oligo 4.0	Primerdesign	National Biosciencees
Primer Express™	Primerdesign	Applied Biosystems

GeneScan	SSCP/Genotypisierung	Applied Biosystems
Sequencing Analysis	Sequenzierung	Applied Biosystems
Data Collection	Datenerfassung	Applied Biosystems
MS Word	Texterstellung	Microsoft
MS Excel	Tabellenerstellung/Statistik	Microsoft
MS Powerpoint	Präsentation	Microsoft
Photoshop	Bildbearbeitung	Adobe
Illustrator	Bildbearbeitung	Adobe
Navigator	Sequenzierung	Applied Biosystems
EndNote	Literaturverwaltung	ISI ResearchSoft
Factura	Sequenzierung	Applied Biosystems
SPSS	Statistik	SPSS GmbH

4.2 Methoden

4.2.1 Isolierung genomischer DNA aus EDTA-Blut

Die für die Untersuchungen notwendige genomische DNA wurde aus peripheren Blutlymphozyten unter Verwendung des Genomix-Präparations-Kits der Firma Talent, Triest nach deren Protokoll isoliert. Hierfür wurden 5-10 ml EDTA-Blut eingesetzt. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte visuell nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung in einem GelStar (Biozym, wässrige Lösung 2 % v/v) gefärbten Agarosegel in TAE-Puffer. Die DNA wurde mit sterilem Wasser der Firma Merck weiterverdünnt. Für die Untersuchungen der Familiären Hypercholesterinämie wurden Wildtyp-DNA-Proben von gesunden Familienmitgliedern von Patienten mit einer Mutation im LDL-Rezeptor-Gen, die in der Franz-Volhard-Klinik (FVK) in den Jahren 1996-1998 untersucht wurden, eingesetzt. Die Proben mit bekannten Mutationen im LDL-Rezeptor-Gen, die für die Untersuchungen eingesetzt wurden, stammen neben der FVK in Berlin freundlicherweise von Arbeitsgruppen aus München sowie dem Institut für Medizinische Molekular Diagnostik (IMMD). Die DNA war zum größten Teil schon isoliert. Eine Auflistung der verwendeten Mutationskontrollen ist in Tabelle 4.7 zusammengefasst:

Tabelle 4.7: Eingesetzte Mutationskontrollen im LDL-Rezeptor (LDL-R)-Gen.

Nr.	Amplikon im LDL-R	Nukleotidposition	Nukleotid	Mutation	Arbeitsgruppe /DNA- Nr.
1	2	131	G -> A	W23X	Berlin (54)
2	3	225	T -> A	C54X	Berlin (3275)
3	3	245	G -> A	C61Y	München (-)
4	3	253	C -> T	Q64X	München (87)
5	3	259	T -> G	W66G	München (-)
6	3	313+1 (Intron3)	G -> A	313+1G>A	IMMD (L6448)
7	3	313+2 (Intron3)	T -> C	313+2T>C	IMMD (L3374)
8	4A	420	G -> C	E119D	München (-)
9	4A	500	G -> A	C146Y	München (-)
10	4A	501	C -> A	C146X	Berlin (3448)
11	4A	E92X	G -> T	E92X	Berlin (171)
12	4B	552	T -> G	C163W	Berlin (3445)
13	4B	682	G -> T	E207X	München (57)
14	5	598	T -> A	D245E	IMMD (L7754)
15	5	596	G -> T	D245Y	München (58)
16	6	917	C -> T	S285L	München (1034)
17	6	829	G -> A	E256K	München (-)
18	7	971	delG	Fs3003	München (81)
19	8	1072	T -> A	C337S	Berlin (3439)
20	8	1123	insGGCT	1123inGGC	Berlin (1448)
21	9	1285	G -> A	V408M	Berlin (35)
22	10	1475	A -> G	D471G	Berlin (3430)
23	10	1478	delCT	Fs472	München (1884)
24	11	1690	A -> C	N543H	Berlin (3698)
25	12	1829	C -> G	S589C	Berlin (1225)
26	12	1775	G -> A	G571E	Berlin (176)
27	14	2096	C -> T	P678L	München (81)
28	14	2042	G -> A	C660Y	München (1903)
29	15	2177	C -> T	T705I	München (-)
30	17	2392	delAAGCGCGGG	del777-779	Berlin (3698)

Für die Untersuchungen zur Detektion von genetischen Variationen an den Long-QT-Syndrom (LQT-Syndrom)-Genen wurde DNA von 30 Personen der Normalbevölkerung kaukasischen Ursprungs isoliert. Gefundene Polymorphismen wurden an isolierten DNAs in einem Kollektiv von 47 dizygoten Zwillingspaaren (DZ) und 94 Einzelpersonen monozygoter

Zwillinge (MZ) untersucht. Die eingesetzten Zwillingspaarproben stammen aus verschiedenen Teilen Deutschlands, die in der Franz-Volhard-Klinik gesammelt wurden.

4.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Für die Amplifikation von genomischen DNA-Abschnitten wurden die Primer in Tabelle 4.1 und Tabelle 4.2 eingesetzt. Diese wurden für eine bestmögliche Reaktion einer Optimierung unterzogen. Hierbei konnten verschiedene Parameter wie Annealingtemperatur (TM), Magnesiumchlorid-Konzentration ($MgCl_2$) und Enzymauswahl, die für eine PCR wichtig sind, etabliert werden. Alle PCR-Produkte wurden langfristig bei –20 °C und kurzfristig bei 4 °C gelagert. Die Kontrollen der PCR-Amplifikate erfolgten in einem GelStar (Biozym, wässrige Lösung 2 % v/v Firma) gefärbten Agarosegel in TAE-Puffer.

4.2.2.1 Ein-Schritt-PCR

Für den Nachweis von Mutationen im LDL-Rezeptor-Gen wurde eine Ein-Schritt-PCR durchgeführt. Die Vorwärts- und Rückwärtsprimer sind beide mit unterschiedlichen, nicht humanen universellen Oligonukleotidsequenzen verlängert und dienen als „template“ (Basis). Die zu den universellen Oligonukleotidsequenzen fluoreszenzmarkierten verlängerten Primer sind ebenfalls in der Reaktion enthalten (Tabelle 4.3). Für die Ein-Schritt-PCR wurden insgesamt vier verschiedene Oligonukleotide eingesetzt und folgende Protokolle etabliert (Tabelle 4.8):

Tabelle 4.8: Ein-Schritt-PCR

	Endkonzentration	PCR Profil		
5’-Spezifischer Vorwärtsprimer	33 nM	95 °C	10 Min.	1 Zyklus
3’-Spezifischer Rückwärtsprimer	33 nM			
5’-Universeller markierter Vorwärtsprimer	166 nM	94 °C	15 Sek.	
3’-Universeller markierter Rückwärtsprimer	166 nM	Tabelle 4.1	15 Sek.	10 Zyklen
10 x Puffer	1 x	72 °C	30 Sek.	
dNTPs	250 nM			

$MgCl_2$	Tabelle 4.1	94 °C	15 Sek.	
AmpliTaq™ Gold DNA-Polymerase	0,04 U	58 °C	15 Sek.	30 Zyklen
H_2O (steril)	variabel	72 °C	30 Sek.	
DNA	15 - 40 ng			
Endvolumen	15 µl	72 °C	10 Min.	1 Zyklus

4.2.2.2 Zwei-Schritt-PCR

Für den Nachweis von Polymorphismen in den Long-QT-Syndrom-Genen wurde eine Zwei-Schritt-PCR durchgeführt. Die Vorwärts- und Rückwärtsprimer sind beide mit unterschiedlichen, universellen Oligonukleotidsequenzen verlängert, mit denen eine spezifische Amplifikation durchgeführt wurde (Tabelle 4.2). Das entstandene Produkt diente als „template“ (Basis) für die anschließende universelle Amplifikation. In einer anschließenden PCR-Reaktion wurden universelle fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide eingesetzt, die komplementär zu den verlängerten Enden der Vorwärts- und Rückwärtsprimer waren (Tabelle 4.3). Für die Zwei-Schritt-PCR wurden folgende Protokolle etabliert (Tabelle 4.8a bis 4.8d):

Tabelle 4.8a: Spezifische Reaktion der Zwei-Schritt-PCR

	Endkonzentration	PCR Profil		
5’-Spezifischer Vorwärtsprimer	166 nM	95 °C	10 Min.	1 Zyklus
3’-Spezifischer Rückwärtsprimer	166 nM			
10 x Puffer	1 x	94 °C	15 Sek.	
dNTPs (je 10 mM, dATP, dTTP, dCTP, dGTP)	je 250 nM	Tabelle 4.2	15 Sek.	35 Zyklen
$MgCl_2$	Tabelle 4.2	72 °C	30 Sek.	
AmpliTaq™ Gold DNA-Polymerase	0,6 U			
H_2O (steril)	variabel	72 °C	10 Min.	1 Zyklus
DNA	15 - 40 ng			
Endvolumen	15 µl			

Tabelle 4.8b: Universelle Reaktion der Zwei-Schritt-PCR (Fluoreszenzmarkierung)

	Endkonzentration	PCR Profil		
5’-Universeller markierter Vorwärtsprimer	166 nM	95 °C	5 Min.	1 Zyklus
3’-Universeller markierter Rückwärtsprimer	166 nM			
10 x Puffer (mit 15 mM $Mg(OAc)_2$	1 x	94 °C	15 Sek.	

dNTPs (je 10 mM, dATP, dTTP, dCTP, dGTP)	je 250 nM	58 °C	15 Sek.	35 Zyklen
$MgCl_2$	1 mM	72 °C	30 Sek.	
Invitek DNA-Polymerase	0,6 U			
H_2O (steril)	variabel	72 °C	10 Min.	1 Zyklus
DNA aus spezifischer PCR (20ng/µl)	10 ng			
Endvolumen	15 µl			

Bei PCR-Reaktionen, die nicht unter den oben angegebenen Bedingungen amplifizierbar waren, wurde die Thermal Ace DNA-Polymerase der Firma Invitrogen mit den mitgelieferten Komponenten eingesetzt.

Tabelle 4.8c: Spezifische Reaktion der Zwei-Schritt-PCR für schwer amplifizierbare DNA

	Endkonzentration	PCR Profil		
5'-Spezifischer Vorwärtsprimer	400 nM	98 °C	3 Min.	1 Zyklus
3'-Spezifischer Rückwärtsprimer	400 nM			
10 x Thermal Ace Puffer	1 x	94 °C	30 Sek.	
dNTPs (je 10 mM, dATP, dTTP, dCTP, dGTP)	je 200 µM	Tabelle 4.2	30 Sek.	30 Zyklen
Thermal Ace DNA-Polymerase	1 U	72 °C	45 Sek.	
H_2O (steril)	variabel			
DNA	30 - 80 ng	72 °C	10 Min.	1 Zyklus
Endvolumen	25 µl			

Tabelle 4.8d: Universelle Reaktion der Zwei-Schritt-PCR für schwer amplifizierbare DNA (Fluoreszenzmarkierung)

	Endkonzentration	PCR Profil		
5'-Universeller markierter Vorwärtsprimer	200 nM	98 °C	3 Min.	1 Zyklus
3'-Universeller markierter Rückwärtsprimer	200 nM			
10 x Thermal Ace Puffer	1 x	94 °C	30 Sek.	
dNTPs (je 10 mM, dATP, dTTP, dCTP, dGTP)	je 200 µM	58 °C	30 Sek.	30 Zyklen
Thermal Ace DNA-Polymerase	1 U	72 °C	45 Sek.	
H_2O (steril)	variabel			
DNA aus spezifischer PCR (20ng/µl)	10 ng	72 °C	10 Min.	1 Zyklus
Endvolumen	25 µl			

4.2.3 Kapillar-Single-Strand-Conformation-Polymorphism (Kapillar-SSCP)

Die durch universelle Vorwärts- und Rückwärtsprimer unterschiedlich fluoreszenzmarkierten PCR-Produkte wurden für die kapillarelektrophoretische Trennung vorbereitet. 5 µl vom markierten PCR-Produkt wurden mit 0,5 µl NaOH (0,3 N) und 10,5 µl HiDi-Formamid (Applied Biosystems) gemixt und bei 94 °C für 2 Minuten denaturiert und schnell auf 4 °C abgekühlt. Die schnelle Abkühlung bewirkte, dass sich die komplementären Einzelstränge nicht wieder zu Doppelsträngen zusammenlagern konnten. Für die kapillarelektrophoretische Trennung wurden Kapillaren der Firma Applied Biosystems mit einer Länge von 36 cm und einem Durchmesser von 50 µm eingesetzt. Die Bedingungen für den Lauf, das Polymer und dem Puffer für den ABI 3100 Genetic Analyzer sahen folgendermaßen aus (Tabelle 4.9):

Tabelle 4.9: Kapillar-SSCP-Bedingungen zum Detektieren von Fluoreszenzmarkierten PCR-Produkten

Laufbedingungen		Polymerbedingungen		Pufferbedingungen	
Run Temp	25-40 °C	HPLC-H_2O	450 µl	HPLC-H_2O	24 ml
Cap Fill Volume	250 steps	Glycerin (100 %)	525 µl	Glycerin (100 %)	3 ml
PreRun Voltage	15 kV	10 x TBE Puffer	525 µl	10 x TBE Puffer	3 ml
PreRun Time	180 Sek.	GeneScan-Polymer (7 %)	3,75 ml		
Injection Voltage	3 kV	Gesamt:	5,25 ml	Gesamt:	30 ml
Injection Time	10 Sek.				
Run Voltage	15 kV				
Data Delay Time	1 Sek.				
Run Time	1500 Sek.				

4.2.3.1 Prinzip und Verfahrensweise

Im nicht denaturierenden Polymer genügte ein einziger Unterschied in der Basensequenz, damit sich unterschiedliche Faltstrukturen in den beiden Strängen ausbildeten (SSCP). Dabei nahm jeder DNA Einzelstrang eine seiner Sequenz entsprechende Konformation an, welche zu unterschiedlichen Laufeigenschaften der Stränge führte. Da die Stränge mit jeweils zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert worden waren, konnte die Laufbande beider Stränge mittels Laser-Detektion separat als „Fluoreszenz-Peak“ ausgewertet werden. Um Sequenzunterschiede in den Amplikons zu sehen, wurden für die Mutationsnachweise im

LDL-Rezeptor-Gen immer eine Wildtyp-DNA-Probe mit den zu untersuchenden Proben exonweise verglichen. War das Fluoreszenzmuster nicht gleich, so handelte es sich bei der unbekannten Probe um einen Mutationsträger. Für Polymorphismusuntersuchungen in den Long-QT-Syndrom-Genen wurden die eingesetzten DNA-Proben untereinander verglichen. War das Fluoreszenzmuster gleich, so gab es bei den eingesetzten Proben keine Polymorphismusträger.

4.2.4 Sequenzierung

Die Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte nach der Sanger-Methode. Für die Sequenzierung wurde der *ABI PRISM™ BigDye Terminator v.2.0 Cycle Sequencing Ready Reaction* Kit eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden immer mit den unterschiedlichen universellen Vorwärts- und/oder Rückwärtsprimern (Tabelle 4.3) separat sequenziert. Ist bei den Untersuchungen eine Zwei-Schritt-PCR durchgeführt worden, so wurde für die Sequenzierung ein Aliquot des spezifischen PCR-Produktes eingesetzt. Lag eine Ein-Schritt-PCR vor, so wurde nur die eine spezifische Reaktion durchgeführt und das Amplikon sequenziert. Der Sequenzierungsansatz und die Reaktionsbedingung waren folgendermaßen (Tabelle 4.9.1):

Tabelle 4.9.1: Sequenzierungs- und Reaktionsbedingungen

Sequenzierungsansatz		Reaktionsbedingung		
ABI PRISM™ Kit	2 µl	95 °C	3 Min.	1 Zyklus
Universalprimer (10µM)	0,5 µl			
PCR-Produkt (20 ng/µl)	1 µl	96 °C	10 Sek.	
HPLC-H_2O	6,5 µl	50 °C	10 Sek.	25 Zyklen
Endvolumen	10 µl	60 °C	4 Min.	

Bei PCR-Produkten die nicht unter den oben angegebenen Ansatz sequenzierbar waren, wurde der *ABI PRISM™ dGTP BigDye Terminator Ready Reaction* Kit unter den selben Bedingungen eingesetzt. Die Sequenzierung erfolgte auf einem Gene Amp PCR System 9700 der Firma Applied Biosystems. Die Reinigung der Sequenzierungsreaktion erfolgte unter Zugabe von 2 µl NaOAc (3M pH 5,2) und 50 µl Ethanol (96%). Nach einer Fällungszeit von

15 Minuten bei Raumtemperatur wurde bei 3.000 g für 30 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde durch vorsichtige Zugabe von 250 µl Ethanol (80 %) sofort wieder bei 3.000 g für 15 Minuten zentrifugiert bzw. gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet luftgetrocknet. Das Pellet wurde in 10 µl HPLC-H_2O resuspendiert. Hiervon wurden in einem neuen Gefäß 5 µl mit 10 µl HPLC-H_2O verdünnt und bei 94 °C für 2 Minuten denaturiert und schnell auf 4 °C abgekühlt. Die sequenzierten Proben wurden in einer 36 cm langen Kapillare und POP6, auf einem ABI PRISM 3100 DNA Sequencer unter Nutzung der originalen Module, kapillarelektrophoretisch aufgetrennt und ausgewertet.

4.2.5 Primer-Extension Reaktion

Die Genotypisierung der gefundenen SNPs wurde mit einer Multiplex-Primer-Extension Reaktion durchgeführt. Hierfür sind die aus der Zwei-Schritt-PCR erhaltenen spezifischen PCR-Produkte mit 4 U Exo I und 4 U SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) bei 37 °C für 2 Stunden gereinigt worden. Der Enzymmix wurde anschließend bei 72 °C für 15 Minuten denaturiert. Vor die zu untersuchenden SNPs wurden Primer gesetzt, die exakt eine Base vor der polymorphen Stelle lagen. Für jeden Multiplex-Lauf wurden 5 verschiedene SNP Primer benutzt. Diese waren in der Länge durch das Addieren von T-Basen am 5'-Ende verändert, um eine unterschiedliche Trennzeit zu erreichen. Für die Multiplex-Primer-Extension Reaktion ist der ABI SNaPshot™ Multiplex-Kit nach folgendem Protokoll eingesetzt worden (4.9.2):

Tabelle 4.9.2: Primer Extension- und Reaktionsbedingungen

Primer-Extension Reaktion		Reaktionsbedingung		
ABI SNaPshot™ Multiplex Kit	4 µl	96 °C	10 Sek.	
SNP Primer-Mix aus 5 Primer	1 µl	50 °C	10 Sek.	25 Zyklen
PCR-Produkt Pool	5 µl	60 °C	30 Sek.	
Endvolumen	10 µl			

Im ABI SNapShot-Kit befanden sich unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (F-ddNTP), die komplimentär auf die polymorphe Base nach dem SNP Primer eingebaut wurden. Der SNP-Primer-Mix enthielt 5 verschiedene SNP-Primer zu

gleichen Anteilen (je 0,1 nM). Der PCR-Produkt-Pool enthielt zu gleichen Anteilen PCR-Produkte, innerhalb derer die SNPs lagen (je 1 µl). Die Primer-Extension-Reaktion wurde anschließend mit 1 U SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) von den nicht eingebauten F-ddNTP bei 37 °C für 2 Stunden gereinigt. Der Enzymmix wurde anschließend bei 72 °C für 15 Minuten denaturiert. 5 µl SAP verdautes Minisequenzierungsprodukt wurde mit 8 µl HiDi Formamid (Applied Biosystems) und 1 µl GeneScan LIZ 120 Standard (Applied Biosystems) gemixt und bei 94 °C für 2 Minuten denaturiert und schnell auf 4 °C abgekühlt. Die Auftrennung und Detektion der erhaltenen Produkte wurde mit einer 36 cm langen Kapillare und POP4 auf dem ABI Prism 3100 DNA Sequencer von Applied Biosystems durchgeführt.