

7 Zusammenfassung

Die Fragestellung dieser Arbeit war darauf ausgerichtet, eine universelle Multifluoreszenzunterstützte PCR-SSCP zu entwickeln, um Mutationen und Polymorphismen zu analysieren. Durch die Kombination von unmarkierten spezifischen und fluoreszenzmarkierten universellen Oligonukleotiden wurden die als Ein-Schritt bzw. Zwei-Schritt durchgeführten Amplifikationen nach ihrem Konformationsverhalten in einer Hochdurchsatz Kapillar-SSCP separiert und analysiert. Nach der technisch-methodischen Entwicklung und Optimierung einzelner Verfahrensschritte konnte die Applikation als Diagnostikverfahren für die Familiäre Hypercholesterinämie überprüft und als Nachweisverfahren zur Detektion von Polymorphismen in fünf Long-QT-Genen herangezogen werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Detektion von Mutationen und Polymorphismen auf genomischer Ebene durch den Einsatz der entwickelten und etablierten Applikation möglich ist.

Für die molekulare Diagnostik wurden 30 verschiedene Mutationen im LDL-Rezeptor-Gen mit einer Ein-Schritt-PCR amplifiziert und in einer Kapillar-SSCP separiert. Um die Mutationsvielfalt im LDL-Rezeptor abzudecken, wiesen die Kontrollmutationen Basenaustausche sowie eine kleine Deletion und eine Insertion auf, die sich in 15 Exons verteilen. Von 30 unterschiedlichen Mutationen konnten 28 identifiziert werden. Dies entspricht einer Sensitivität von 93 %. Zwei Mutationskontrollen konnten aufgrund der hervorgerufenen Konformationsänderung nicht erkannt werden. Die Molekulare Diagnostik der Familiären Hypercholesterinämie mit der universellen Multifluoreszenzunterstützten PCR-SSCP ermöglicht es, Risikopersonen für die Koronare Herzkrankheit zu identifizieren. Sie kann einzeln oder in Verbindung mit bereits existierenden Verfahren genutzt werden.

Um den Einfluss von genetischen Varianten auf die QT-Zeit zu untersuchen wurden 30 DNA-Proben eines gesunden Kontrollkollektivs kaukasischen Ursprungs mit einer Zwei-Schritt-PCR exonübergreifend amplifiziert und in einer Kapillar-SSCP separiert. Die Fluoreszenzmuster aller Kontrollproben wurden für die Gene KCNE1, KCNE2, KCNQ1, HERG und SCN5A untereinander verglichen. Jede Veränderung im Muster wurde verifiziert und zwecks Bestätigung sequenziert. In 27091 untersuchten Basen konnten 35 Polymorphismen gefunden und identifiziert werden, von den 13 neu und noch unbeschrieben waren. Alle gefundenen Polymorphismen sind mit derselben Methodik auch in einem gesunden Zwillingskollektiv von 188 DNA Proben mit digitalisierten EKG-Daten bestehend

aus 47 dizygoten Zwillingspaaren und 94 Einzelpersonen monozygoter Zwillinge untersucht worden, um etwaige Einflüsse der Polymorphismen auf die QT-Zeit in einer normalen Population zu finden. Der Genotypstatus wurde für jeden SNP nach einer Validierung mit einer Multiplex Primer-Extension-Reaktion im Zwillingskollektiv bestimmt. Die Phänotypdaten zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen den mittleren frequenzkorrigierten QT-Zeiten (QTc) bei Männern (402,91 mSek.) und Frauen (420,88 mSek.) sowie eine gleichzeitige Zunahme mit dem Alter (2 mSek./10 Jahre). Daher wurde der Einfluss der SNPs auf die QTc-Werte anhand der QTc-Residuen untersucht. In einer Varianzanalyse aller genotypisierten Zwillinge haben 4 SNPs eine Assoziation zum frequenzkorrigierten QT-Intervall mit einem p-Wert $< 0,05$ gezeigt. Es zeigt sich, dass die Präsenz von SNPs, abhängig vom Genotyp, die QT-Zeit im EKG verändern und sogar einen mildereren Phänotyp bewirken können. Die Daten können genutzt werden, um für das QT-Intervall verantwortliche Haplotyp-Blöcke zu finden, die in der allgemeinen Population vorkommen und gegebenenfalls das frühzeitige Erkennen eines langen QT-Intervalls ermöglichen.