

Material und Methoden

Klinische Evaluation

Es wurden insgesamt 351 nicht miteinander verwandte Patienten aus Polen und Deutschland untersucht. Die Untersuchung war stets nach dem gleichen Untersuchungsprotokoll vorgenommen, welches Anamnese, körperliche Untersuchung, zweidimensionale und M-Modus-Echokardiographie umfaßte, sowie EKG, und in einigen Fällen Langzeit-EKG und Herzkatheteruntersuchung. Die Diagnose der HCM basierte auf Kriterien, die von der WHO sowie McKenna vorgeschlagen wurden (Richardson et al. 1996; McKenna et al. 1997). Die wesentlichen Einschlusskriterien waren eine Wanddicke des linken Ventrikels von ≥ 13 mm und Fehlen anderer Gründe für das Vorliegen einer Hypertrophie wie z.B. Hypertonie, Aortenstenose etc. (38), sowie größere Auffälligkeiten im EKG, wie z.B. negative T-Wellen, pathologische Q-Wellen und AV-Knoten-Blockierungen. Die EKG-Untersuchung wurde nach den Standards der *American Society of Echocardiography* durchgeführt (Sahn et al. 1978), in Unkenntnis des genetischen Status. Die Familienangehörigen eines Patienten, der im Verlauf der genetischen Analyse aufgefallen war, wurden an der *Silesian School of Medicine* in Katowitce (Polen) mit freundlicher Unterstützung von Frau Dr. Anna Wycisk klinisch untersucht. Blutproben der HCM-Patienten und der polnischen Familienangehörigen wurden jeweils in Röhrchen, die 1,6mg/ml EDTA enthielten, bei -20°C bis zur DNA-Extraktion aufbewahrt. Blut für Kontroll-DNA stammte von 285 anonymen Blutspendern. Diese wurden einer körperlichen Routineuntersuchung unterzogen; ihr Blut wurde untersucht, und sie hatten keine bekannte Herzkrankheit.

Genetische Analyse

Überblick

Der Ansatz dieser Untersuchung bestand darin, in dem Kollektiv von HCM-Patienten nach Mutationen im Kandidatengen Myomesin zu screenen. Die DNA der Patienten wurde aus deren Blut extrahiert und bei -20°C aufbewahrt. Die weiteren Arbeitsschritte bestanden darin, zunächst definierte DNA-Fragmente des Myomesin-Gens jedes einzelnen Patienten mittels PCR zu amplifizieren und danach mittels SSCP nach auffälligen Bandenmustern zu screenen. Dabei wurden systematisch die

einzelnen Exons des Myomesingens nacheinander untersucht. Sobald einzelne auffällige Banden auftraten, wurden die DNA-Fragmente der entsprechenden Patienten in einer automatischen Sequenzierung auf Mutationen hin untersucht, wobei zur Kontrolle immer auch eine nicht auffällige Probe sequenziert wurde.

Tabelle 3: Methodische Vorgehensweise

| PCR → → | SSCP → → | Sequenzierung |
|--|--|---|
| Exonweise Amplifikation der DNA sämtlicher HCM-Patienten | Suche nach Auffälligkeiten: Nebenbanden, unterschiedliche Musterverteilung, etc. | Auffällige Banden wurden sequenziert um evt. vorhandene Mutationen zu finden. |

Darstellung der methodischen Ablaufs der Untersuchung.

Abkürzungen: PCR, Polymerase Chain Reaction; DNA, deoxyribo nucleic acid bzw.

Desoxyribonukleinsäure; SSCP, Single Strand Conformation Polymorphism

Die Sequenzen wurden dann mit der in der NCBI-Datenbank veröffentlichten Sequenz verglichen. Sobald eine Basenveränderung gefunden worden war, stellte sich die Frage, ob diese Mutation im Intron oder im Exon lag, und im letzteren Fall, ob diese eine Aminosäure veränderte oder nicht. Danach wurde diese Mutation anhand einer weiteren Sequenzierung oder mittels Enzymverdau bestätigt.

DNA-Extraktion:

Die DNA der Patienten des Kollektivs wurde mittels einer Standard-DNA-Extraktion extrahiert. Dabei kam die Methode nach Lahiri (23) zur Anwendung. Anders als bei anderen Techniken werden bei dieser Methode die Proteine unter Zuhilfenahme von Natriumchlorid entfernt. Der Vorteil dieser Methode besteht in einer Zeitersparnis sowie darin, daß keine toxischen Substanzen verwendet werden. Die Arbeitsschritte waren wie folgt:

1. 5ml der Blutprobe, 5ml Puffer TKM1 (10 mM Tris, pH 7,6; 10 mM MgCl₂; 2mM EDTA) und 100 µl Triton X-100 wurden vermischt und 20 min bei 2500 U/min zentrifugiert.
2. Das Pellet wurde in 800 µl Puffer TKM2 (10 mM Tris, pH 7,6; 10 mM KCL 10 mM MgCl₂; 0,4 mM NaCl, 2 mM EDTA) und 50 µl 10% SDS resuspendiert, vermischt und 10 min bei 55°C im Wasserbad inkubiert.
3. 100 µl 5 M NaCl wurden hinzupipettiert, vermischt und 5 min bei 1200 U/min zentrifugiert. Der Überstand mit der DNA (ca. 1 ml) wurde in ein neues Gefäß überführt und mit dem doppelten Volumen reinen Alkohols

(ca 2 µl) bei Raumtemperatur vermischt. Das Gefäß wurde mehrmals gedreht, bis die DNA sichtbar wurde.

4. Die DNA wurde in ein Gefäß überführt, das 1ml eiskaltes 70% Ethanol enthielt. Das Gefäß wurde 5 min bei 1200 U/min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde 10 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und dann in 500 µl Tris-Puffer (10 mM, pH 8,0) 15 min bei 65° resuspendiert. Nun konnte es als DNA-Stammlösung verwendet werden.

Polymerase-Chain-Reaction:

Die PCR ist eine vielfach verwendete Methode, um bestimmte DNA-Abschnitte zu amplifizieren. Dabei wird das zu amplifizierende DNA-Fragment spezifisch herausgegriffen, indem man zwei Primer – Oligonukleotide von ca. 20 bp Länge – benutzt, die sich komplementär an bestimmte Bereiche der DNA anlagern, wobei mittels eines Vorwärts- und eines Rückwärtsprimers der interessante DNA-Bereich eingekreist wird. Es wird also eine Arbeitslösung hergestellt, zu welcher die DNA des jeweiligen Patienten und die beiden Primer sowie desweiteren dNTPs, Puffer, Magnesiumchlorid sowie eine thermostabile DNA-Polymerase hinzugegeben werden. Innerhalb mehrerer sich zyklisch wiederholender Arbeitsschritte, welche automatisch von einem Cycler ausgeführt werden, wird die Temperatur dieser Mischung stufenweise verändert, so daß das Primerannealing und die sich anschließende DNA-Polymerisierung sich kontinuierlich abwechseln. Zunächst wurden die Primer für die zu amplifizierenden Exons des Myomesin-Gens hergestellt. Diese Primer sollten sich im Intronbereich kurz vor und kurz nach dem betreffenden Exon befinden. Allerdings sollten sie auch nicht allzu nahe am Exon sein, weil in der Sequenzierung die ersten 10-20 bp nach dem Primer oftmals schlecht zu lesen sind, und weil eventuell in der Nähe des Exons auftretende Mutationen sich möglicherweise an funktionell bedeutsamen Intron-Stellen befinden könnten, wie z.B. Splice-Sites oder Branch-Point-Sites. Daher wurden Primer hergestellt, die sich meist in einem Abstand von mehr als 30-50 bp um das Exon herum anlagerten. Zu diesem Zweck wurde aus der NCBI-Datenbank die zu diesem Zeitpunkt bekannte gDNA-Sequenz heruntergeladen, und die Primer wurden mit dem Programm OLIGO (Version 4.06; National Biosciences, Inc, Plymouth, USA) entwickelt. Die gDNA des

Myomesins findet sich im Internet unter www.ncbi.nlm.nih.gov und unter der Accession number NT_010859. Exons 29/30 wurden zusammengefaßt. Um eine spätere Sequenzierung zu ermöglichen, wurde an die 5'Enden jedes Primers eine zusätzliche Sequenz gehängt, die für alle Primer identisch war, nämlich die 21-M13-Sequenz (5'-TGTAAGGAGGGCCAGT-3') an die Vorwärtsprimer bzw. die M13-Sequenz (5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3') an die Rückwärtsprimer .

Tabelle 4: Übersicht Primer Exons 27-36

| Exon | Vorwärtsprimer | Rückwärtsprimer |
|-------|----------------------------------|-----------------------------------|
| 27 | 5'-CTTCCTAAGCCTATTTCTTCATC-3' | 5'-ATTTTCTCTTTATCCACGGC-3' |
| 28 | 5'-TCAGATGTAATCACCTAGGAC-3' | 5'-CTCAGATGGAAGAGATGAAAAAT-3' |
| 29 | 5'-CATTGGTGTCCACTTGATTCTAAACT-3' | 5'-TTTGGGGTAAGATAGAGGGTAGAGAG-3' |
| 30 | 5'-ACTGGGGGCTACGAAAGGTG-3' | 5'-GCCTCAATCATCATTCTGGTAAGC-3' |
| 31/32 | 5'-ATGCTAAAGTTTTGGCTCTGAATCTCT- | 5'-ATGATCCACCTGCCTCGGC-3' |
| 33 | 5'-AGCCCTGGATGGAAGCAAAT-3' | 5'-GCTGGTCTTGAACCTCCTGACTT-3' |
| 34 | 5'-AATCGCCCCTGTGTGTCATC-3' | 5'-ACTTGACGACATTTTCCTTGCC-3' |
| 35 | 5'-CTTCGTCTGTTTGTTCGTTTCTC-3' | 5'-CTTCCATTCTCCTCCATCTGTAGTTAT-3' |
| 36 | 5'-TTGTGAGTATGACCGCTGGC-3' | 5'-AAAATCTGGGGTGCTGGAAC-3' |

Die Primer mußten optimiert werden. Zu diesem Zweck wurden die Primer entsprechend der Gebrauchsanweisung mit Aqua dest gelöst, und es wurden im Verhältnis 1:10 verdünnte Arbeitslösungen angefertigt. Sodann wurde ein Gradientencycler der Firma MJ Res. benutzt, um eine geeignete annealing temperature auszuwählen. Außerdem wurden teilweise verschiedene Primerkonzentrationen und Zyklenzahlen getestet. Man sollte dabei bedenken, daß die Spezifität der Primer bei steigender Temperatur zunimmt, aber bei steigender Zyklenzahl abnimmt. Das Exon 27 erwies sich als problematisch, so daß eine besondere Fidelity-Taq-Polymerase verwendet werden mußte. Außerdem wurde die Menge des verwendeten Primers herabgesetzt. Das Volumen wurde mit Aqua dest. wieder ausgeglichen.

Die optimierten Parameter sind wie folgt:

Tabelle 5: Optimierte Primerbedingungen

| Exon | Primermenge | Annealing temperature °C | Zyklenzahl |
|-------|-------------|--------------------------|------------|
| 27 | 0,8 µl | 49 | 37 |
| 28 | 1 µl | 55 | 40 |
| 29 | 1 µl | 55 | 40 |
| 30 | 1 µl | 63 | 35 |
| 31/32 | 1 µl | 60 | 38 |
| 33 | 1 µl | 60 | 40 |
| 34 | 1 µl | 60 | 35 |
| 35 | 1 µl | 60 | 40 |
| 36 | 1 µl | 60 | 35 |

Die Primer wurden vor der Durchführung der PCR mit den anderen Reagenzien vermischt, deren Konzentration für jedes Exon gleich war. Für Exon 27 wurde auch ein spezieller Puffer verwendet, der mit der Fidelity-Taq-Polymerase (Roche) mitgeliefert worden war. Die Konzentrationen der einzelnen Arbeitslösungen waren wie folgt:

Tabelle 6: Zusammensetzung einer PCR-Arbeitslösung

| Reagenzien | Exon 27 (µl) | Restliche Exons (µl) |
|--|--------------|----------------------|
| Aqua Dest. | 17,8 | 17,4 |
| 10X PCR-Puffer, Appl. Biosys. | 2,5 | 2,5 |
| MgCl ₂ , 25 mM, Appl. Biosys. | 1,5 | 1,5 |
| Vorwärtsprimer., 5 pmol/µl.; BioTeZ | 0,8 | 1,0 |
| Rückwärtsprimer., 5 pmol/µl.; BioTeZ | 0,8 | 1,0 |
| DNTPs, 20 mM, Biozym | 0,3 | 0,3 |
| Amplitaq, 5 U/µl, Appl. Biosys | 0,3 | 0,3 |
| DNA, 25 ng/µl | 1 | 1 |

Abkürzungen: Aqua Dest, destilliertes Wasser; Appl. Biosys, Applied Biosystems; MgCl₂, Magnesiumchlorid; dNTPs, Desoxynukleotidtriphosphate

Alle Reagenzien bis auf die DNA wurden zunächst für das Gesamtvolumen der Patientenproben einer PCR berechnet und vermischt. Danach wurde ein Volumen von je 24 µl auf die einzelnen 0,2-µl-Tubes verteilt und die DNA zuletzt hinzugegeben. Hernach wurden die Tubes in einen Thermocycler (Peltier Thermo Cycler, MJ Research Inc; Uno-Thermoblock, Biometra) gestellt und das Programm gestartet.

Tabelle 7: PCR-Thermocycler-Programm

| | | |
|-----------------------|-----------------------------------|--------|
| I. Denaturieren: | 90°C | 2 min |
| | 94°C | 1 min |
| | 90°C | 15 sec |
| II. 35-40 Zyklen: | | |
| Primerannealing: | Primerspezifische Temp. (49-60°C) | 30 sec |
| Extension: | 72°C | 1 min |
| Denaturieren: | 90°C | 15 sec |
| III. Letzte Extension | 72°C | 5 min |

Die Qualität der amplifizierten PCR-Produkte wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Auf diese Weise war es möglich, die PCRs einzelner Proben zu wiederholen, ehe sie in der SSCP untersucht wurden.

Single-Strand-Conformation-Polymorphism

Das Screening mittels SSCP ist eine bewährte und sensitive Methode zur Mutationsdetektion, die auf der Konformationenbildung der DNA-Einzelstränge beruht. Die DNA wird durch Hitze denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Dabei falten die Einzelstränge sich zusammen und bilden bestimmte Konformationen aus. Sequenzunterschiede bedingen Änderungen dieser Konformationen und daher auch des Wanderungsverhaltens in einem Gel. Wenn nun die DNA durch ein nicht denaturierendes Gel wandert, machen sich diese Konformationsänderungen als verändertes Bandenmuster bemerkbar, wobei üblicherweise zusätzliche Banden auftreten, wenn man sie mit den Bandenmustern von Wildtyp-DNA vergleicht. Man geht davon aus, daß die Sensitivität der SSCP für Mutationen bei ca. 80-90% liegt, wenn die Fragmentlänge nicht mehr als 400 bp beträgt. (5) Um diese Sensitivität noch zu steigern, wurden beim Screening für jedes Exon jeweils zwei unterschiedliche Bedingungen gebraucht, die sich in Temperatur, Laufzeit und Zusammensetzung des Gels unterschieden.

Tabelle 8: Optimierte SSCP-Bedingungen der einzelnen Exons

| Exon | SSCP-Bedingung 1 | SSCP-Bedingung 2 |
|-------|---------------------|---------------------|
| 27 | 10%FA, 4°C, 40min | MDE, 20°C, 40min |
| 28 | 10%PAA, 10°C, 60min | 10%FA, 20°C, 60min |
| 29 | 10%PAA, 10°C, 60min | 10%FA, 20°C, 60min |
| 30 | 10%PAA, 4°C, 60min | 10%FA, 20°C, 40min |
| 31/32 | 10%PAA, 10°C, 60min | MDE, 20°C, 60min |
| 33 | 6%PAA, 4°C, 45min | 10%FA, 20°C, 42min |
| 34 | 10%FA, 4°C, 60min | 10%PAA, 20°C, 60min |
| 35 | 12%PAA, 4°C, 80min | 10%FA, 20°C, 40min |
| 36 | 10%PAA, 10°C, 60min | 12%PAA, 20°C, 70min |

Abkürzungen: PAA, Polyacrylamidgel; FA, Formamidgel; MDE, Mutation Detection Enhancement

Wie der Tabelle zu entnehmen ist, wurde die SSCP bei jedem Exon unter zwei unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt. Dabei wurden sowohl unterschiedliche Temperaturen als auch unterschiedliche Gele benutzt. Es wurden zwei Sorten von Gelen verwendet. Zum einen Polyacrylamidgele unterschiedlicher Konzentration, die mittels einer Stammlösung (Roth; Acrylamid / Bisacrylamid im Verhältnis 29:1) hergestellt wurden. Zum anderen MDE-Gele, die in den meisten Fällen auch mit einem Formamidzusatz versehen worden waren. Diese sog. Mutation Detection Enhancement-Gele sollen besonders sensitiv für Konformationsänderungen der DNA sein (BioWhittaker Molecular Application). 10xTBE-Puffer setzt sich zusammen aus 60,5g Tris, 30g Borsäure und 4,65g EDTA. Diese Zutaten wurden vermischt und mit Aqua dest. auf 500 ml aufgefüllt. Die Zusammensetzung der unterschiedlichen Geltypen findet sich in der folgenden Tabelle.

Tabelle 9: Zusammensetzung der verschiedenen Gele

| Gelart | Zusammensetzung | |
|----------------------|-----------------|---------|
| 12% Polyacrylamidgel | 10 x TBE-Lösung | 1,8 ml |
| | 40% PAA-Lösung | 9,4 ml |
| | Aqua dest. | 19,8 ml |
| 10% Polyacrylamidgel | 10 x TBE-Lösung | 1,8 ml |
| | 40% PAA-Lösung | 7,8 ml |
| | Aqua dest. | 21,4 ml |
| 6% Polyacrylamidgel | 10 x TBE-Lösung | 1,8 ml |
| | 40% PAA-Lösung | 4,7 ml |
| | Aqua dest. | 24,5 ml |
| 10% MDE-Formamidgel | MDE-Lösung | 7,5 ml |
| | 10 x TBE-Lösung | 1,8 ml |
| | Aqua dest. | 17,8 ml |
| | Formamid | 3,0 ml |
| MDE-Gel | MDE-Lösung | 7,5 ml |
| | 10 x TBE-Lösung | 1,8 ml |
| | Aqua dest. | 20,8 ml |

Abkürzungen: PAA, Polyacrylamidgel; FA, Formamidgel; MDE, Mutation Detection Enhancement
10xTBE besteht aus: 450mM Tris, 450 mM Borsäure, 20 mM EDTA

Die Gießvorrichtung eines SSCP-Gels bestand aus zwei Glasplatten der Größe 26x20 cm (Amersham Bioscience). Eine der Platten hat eine Gummi-Abdichtung an den Seiten und am unteren Rand (0,5 mm dick), sowie am unteren Rand eine Reihe von 26 Slotformern aus DYMO-Klebeband. Eine spezielle Plastikfolie (Gel-Fix von Serva) wurde zwischen die Glasplatten gefügt, um als Trägerfolie für das Gel zu dienen. Die Zutaten für das jeweilige Gel wurden vermischt, und es wurden zur Polymerisation 24 µl 99% TEMED und 48 µl Ammoniumpersulfat hinzugegeben. Sofort danach wurde die Gellösung zwischen die Trägerfolie und die Glasplatte mit den Slotformern gegossen. Die Polymerisation dauerte dann ca. eine Stunde. Die zu untersuchenden PCR-Produkte wurden währenddessen mit Formamidpuffer (0,9g/ml Formamid; 10mM NaOH; 11mM EDTA) im Verhältnis 1:2 bzw. 1:3 gemischt. Danach erfolgte eine Denaturierung dieser Proben bei 95°C für 5 Minuten. Die Proben wurden sofort auf Eis gestellt, und eine Minute lang wurde gewartet, bevor die Slots der bereits in den Elektrophoresekammern (MultiphorII, Pharmacia) befindlichen und vorgekühlten Gele mit jeweils 8,5 µl der Proben beladen wurden. Ein Gellauf wurde mit 35 Watt durchgeführt. Nach dem Lauf wurden die DNA-Bandenmuster mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. (siehe nachfolgende Tabelle).

Tabelle 10: Silberfärbung eines Gels

| Schritt (Lösung) | Zusammensetzung | Zeit |
|----------------------|---|-------------------------------|
| Fixierlösung | Eisessig 25 ml Auffüllen mit Aqua dest auf 250 ml | 20 min |
| Waschen | Aqua dest | 3x 2 min |
| Silberfärbung | 1% Silbernitratlösung 25 ml 37 % Formaldehyd 0,25 ml Auffüllen mit Aqua dest auf 250 ml | 20 min |
| Waschen | Aqua dest. | 30 sek |
| Entwicklerlösung | Natriumcarbonat 6,25 g 37 % Formaldehyd 0,25 ml 2 % Natriumthiosulfat 0,25 ml Auffüllen mit Aqua dest auf 250 ml | Bis Banden Sichtbar werden |
| Stopplösung | Glycin 5g 0,5 M EDTA 18,8 ml Auffüllen mit Aqua dest auf 250 ml | 10 min |
| Konservierungslösung | 99,5 % Glycerol 25 ml Auffüllen mit Aqua dest auf 250 ml | 10 min |

Zuletzt erfolgte die Trocknung der Gele auf einer vorher mit 95% Ethanol gereinigten Glasplatte, nachdem sie mit einer in Wasser gequollenen Celluphanfolie (Cotech) bedeckt und die Ränder mit Klebeband befestigt worden waren. Nach einer Trocknung von 24-48 Stunden konnten die Gele ausgeschnitten und ausgewertet

werden. Proben mit auffälligem Bandenmuster wurden dann einer automatischen Sequenzierung zugeführt.

Automatische DNA-Sequenzierung:

Die Sequenzierung wurde mittels eines automatischen 373-DNA-Sequenziersystems (Applied Biosystems) durchgeführt, wobei sowohl das Dye-Primer-Chemistry-Kit als auch das Dye-Terminator-Chemistry-Kit benutzt wurden. Bei beiden Kits wurde die Kettenabbruchmethode benutzt. Dabei wurde das PCR-Produkt amplifiziert, und es wurden zufällig ddNTPs eingebaut, welche einen Kettenabbruch verursachten. Die 4 verschiedenen Basen korrespondierten mit 4 jeweils unterschiedlichen fluoreszierenden Farbstoffen (JOE, FAM, TAMRA, ROX). Beim Dye-Primer-Kit war jeweils der Primer farbstoffmarkiert, und es wurden 4 verschiedene Ansätze mit je unterschiedlich vorhandenen ddNTP-Basen benutzt. Beim Dye-Terminator-Kit waren jeweils die ddNTPs farbstoffmarkiert, weshalb ein einziger Reaktionsansatz ausreichte. Die Primer, welche benutzt wurden, waren komplementär zu der M13- bzw. 21M13-Sequenz. Daher reichte eine einzige Sorte Primer aus, um alle PCR-Produkte zu amplifizieren. Denn die Primer, mittels derer die PCR-Produkte hergestellt worden waren, waren auch je an einem Ende mit der M13- bzw. 21-M13-Sequenz versehen worden. Bevor das Cycle Sequencing erfolgen konnte, mußten die zu sequenzierenden PCR-Produkte in bestmöglicher Qualität vorliegen, d.h. es sollten möglichst keine Nebenbanden und Verunreinigungen bei der Überprüfung des PCR-Produktes in der Agarosegelelektrophorese auftreten.

Tabelle 11: Zusammensetzung Dye Primer Kit

| Ready-Reaction-Mix | Zusammensetzung |
|---------------------------|---|
| A-Mix | ddATP, JOE-Dye-Primer |
| C-Mix | ddCTP, FAM-Dye-Primer |
| G-Mix | ddGTP, TAMRA-Dye-Primer |
| T-Mix | ddTTP, ROX-Dye-Primer |
| Alle Ready-Reaction-Mixes | dATP, dCTP, 7-deaza-dGTP, dTTP, Tris-HCL (pH 9,0 bei 25°C), MgCl ₂ , thermostabile pyrophosphatase, ampliTaq DNA Polymerase FS |

Abkürzungen: ddATP, Didesoxy-Adenosintriphosphat; synonym: CTP, Cytosintriphosphat; GTP, Guanintriphosphat; TTP, Thymintriphosphat

Die Menge des PCR-Produktes war abhängig von der Stärke der Banden im Agarosegel und der Höhe der Peaks aus vorherigen Versuchen. Die Zusammensetzung der Reaktionslösungen für das Dye-Primer-Kit war wie folgt:

Tabelle 12: Pipettierschema der Sequenzierungsansätze des Dye Primer Kits

| | Ready-Reaction-Mix (µl) | PCR-Produkt (µl) | Gesamtvolumen (µl) |
|---------|-------------------------|------------------|--------------------|
| Adenin | 4 | 1 | 5 |
| Cytosin | 4 | 1 | 5 |
| Guanin | 8 | 2 | 10 |
| Thymin | 8 | 2 | 10 |

Beim Dye-Terminator-Kit waren die ddNTPs farbstoffmarkiert, so daß ein einziger Ansatz ausreichte:

Tabelle 13: Pipettierschema Dye Terminator Kit

| | |
|------------------------|--------|
| Aqua dest. | 6,6 µl |
| PCR-Produkt | 4,0 µl |
| M13-Primer (5 µM/µl) | 1,4 µl |
| 21M13-Primer (5 µM/µl) | 1,4 µl |
| Terminatoren-Mix | 8,0 µl |

Nach der Cycle-Sequencing-Reaktion wurden die Produkte dieser Reaktion auf ein denaturierendes Harnstoffgel aufgetragen. Während der Elektrophorese wurden die farbstoffmarkierten Kettenabbruchfragmente von einem Laser erfaßt, und das von dem Fluoreszenzfarbstoff emittierte Licht wurde dann von einer Fozelle registriert. Die erfaßten Daten wurden danach auf einen Computer übertragen und einer weiteren Verarbeitung zugänglich gemacht. Die Cycle-Sequencing-Reaktion fand in einem Cycler mit folgendem Programm statt:

Tabelle 14: Programm Cycle Sequencing

| | | |
|-------------------|------|--------|
| I. Denaturieren: | 94°C | Pause |
| | 96°C | 10 sek |
| II. 15 Zyklen: | | |
| Primerannealing: | 55°C | 5 sec |
| Extension: | 70°C | 1 min |
| Denaturieren: | 96°C | 15 sec |
| III. 14 Zyklen | | |
| Extension: | 70°C | 1 min |
| Denaturieren: | 96°C | 10 sek |
| Letzte Extension: | 70°C | 1 min |

Nach dem Cycle-Sequencing erfolgte die Aufreinigung der Proben. Die vier Reaktionslösungen des Dye-Primer-Kits wurden nach dem Cycle-Sequencing vereinigt. Dies war beim Dye-Terminator-Kit natürlich unnötig. Es wurde 1 µl Dextranblau (20 mg/ml) zum Sichtbarmachen des Pellets hinzugegeben, mit 80 µl Ethanol vermischt, um die DNA zu fällen, und das ganze dann für 15 Minuten auf Eis gestellt. Es folgte eine Zentrifugation bei 25000 U/Min und 4°C für 30 Minuten (Sigma

3K30, Rotor 12154). Das Ethanol wurde verworfen, und das Pellet wurde in der Vakuumzentrifuge (Speedvac) 10 Minuten lang getrocknet. In diesem Zustand konnte es bei -20°C mehre Tage aufbewahrt werden. Zur Resuspendierung wurden 3,5 μl Formamidpuffer hinzugegeben (deionisiertes Formamid und EDTA / 5% Dextranblau im Verhältnis (5:1)). Nun erfolgten die Herstellung und das Gießen des 0,3mm dicken Sequenziergels. Dazu wurden zwei 25x59 cm große Glasplatten (Applied Biosystems) mit 1% Alconox-Lösung gewaschen und mit 70% Ethanollösung gereinigt. 30g Harnstoff, 10ml 30% Acrylamidlösung, 6ml 10x TBE-Puffer (450 mM Tris pH 8,0 ; 450 mM Borsäure, 20 mM EDTA) und 22 ml aqua dest. wurden vorsichtig vermischt, und zur Polymerisation wurden 15 μl 99% TEMED und 350 μl 10% Ammoniumsulfat hinzugefügt. Danach wurde die Gellösung mittels einer 50 ml fassenden Spritze zwischen die Glasplatten eingebracht und 2 Stunden getrocknet. Das resuspendierte Pellet wurde sodann für 2 Minuten bei 95°C denaturiert, und das Gel wurde damit beladen. Ein Gellauf dauerte 15 Stunden bei 2500 Volt. Zur Bearbeitung der eingelesenen Rohdaten wurde das Programm Sequencher (Power PC Version 4.1; Gene Codes Corporation, USA) benutzt.

Restriktionsenzymverdau

Wenn man in der Sequenzierung eine interessante Mutation gefunden hat, lohnt es sich, diese anhand eines Enzymverdaus zu bestätigen. Dabei wird ein Enzym benutzt, welches das betreffende PCR-Produkt auf unterschiedliche Weise schneidet, je nachdem, ob die Sequenz verändert ist oder als Wildtyp vorliegt. Im Fall der missense mutation in Exon 32 wurde das Enzym Hinc II benutzt. Dieses schnitt das PCR-Produkt einmal an der betreffenden Stelle, wenn die DNA als Wildtyp vorlag, jedoch nicht, wenn die Mutation vorlag. Dies führte zu unterschiedlichen Bandenmustern, die in der Agaroseelektrophorese identifiziert werden konnten. Die Zutaten für den Restriktionsverdau waren folgende.

Tabelle 15: Reagenzien Enzymverdau

| | |
|------------------------|-------------------|
| PCR-Produkt | 3 μl |
| Enzym HincII (5 Units) | 0,5 μl |
| 10 x BSA | 1 μl |
| 10 x NEB-Puffer | 1 μl |
| Aqua dest. | 4,5 μl |

Die Reagenzien wurden vermischt und bei 37°C zwei Stunden lang in den Thermocycler gestellt.

Agarosegelelektrophorese

Zur Darstellung der Bandenmuster des Enzymverdaus wie auch zur Überprüfung der Qualität sämtlicher PCR-Produkte wurden Elektrophoresen mit Agarosegelen durchgeführt. Zur Sichtbarmachung der DNA wurde das Gel mit Ethidiumbromid versetzt und nach dem Gellauf unter einer UV-Lampe betrachtet (Transluminator TI 1 ; Biometra). Zur Herstellung eines 2% Gels wurden 0,4 g Agarosepulver mit 20 ml 10x TBE-Puffer vermischt und in einer Mikrowelle bis zum Schmelzen der Agarose vermischt. Danach wurde 1,5 µl Ethidiumbromid zugefügt und gut umgerührt. Das Gel wurde dann in eine Gießkammer gefüllt und die Slotformer eingesteckt. Nach 20 Minuten war das Gel polymerisiert. Aufgetragen wurden pro Slot jeweils 3 µl PCR-Produkt bzw. verdaute DNA, die mit je 3 µl Farbstoff vermischt worden waren. Zum Größenvergleich der DNA-Fragmente wurde immer auch ein VIII-DNA-Molekulargewichtsmarker (Roche und GibcoBRL) aufgetragen.

Geräte und Chemikalien

Geräte

| | |
|--------------------------------------|----------------------|
| 373 DNA Sequencer | Applied Biosystems |
| Eismaschine AF – 100 | Scotsman |
| Elektrophorese Kammer Multiphor II | Pharmacia |
| Enhanced Analysis System 429K | Herolab |
| Eppendorf Thermomixer 5436/5437 | Eppendorf |
| Gelgießplatten | Amersham Biosciences |
| Horizon 58 Gelelektrophorese-Apparat | Gibco BRL |
| Metallblock – Thermostat DB-3D | Techne |
| Mikrowelle | AEG |
| Optilab – Plus – System | MembraPure |
| Pelitier Thermal – Cycler PTC – 200 | MJ Reseach, Inc |
| Pelitier Thermal – Cycler, PTC – 100 | MJ Research, Inc |
| Power supply Power Pack P 25 | Biometra |
| Power supply Power Pack ST 606 | Gibco BRL |
| Power supply PS 9009 TC | Gibco BRL |
| Thermocycler Uno- Thermoblock | Biometra |
| Transilluminator TI 1 | Biometra |
| Vakuumpumpe Cryo Vac | Appligene |
| Vakuumzentrifuge UNIVAPO 150/100 | UniEquip |
| Video copy Prozessor | Mitsubishi |
| Waage Kern 510 | Kern |
| Wassermaschine | Membra Pure |
| Zentrifuge 3K30 | Sigma |

Chemikalien

| | |
|---------------------|---------------------|
| 10 x BSA Puffer | New England Biolabs |
| 10 x NEB-Puffer | New England Biolabs |
| Aceton | Merck |
| Acrylamid/Bis- 29:1 | BioRad |
| Agarose | Cambrex |