

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Proben zur DNA-Analytik

Blutproben zur Gewinnung von DNA aus Leukozyten wurden uns freundlicherweise von Dr. Ramaekers, Universität Aachen, überlassen. Ein positives Votum der dortigen Ethikkommission liegt vor.

Es handelt sich um Proben von Patient 2 aus der weiter oben zitierten Studie (Ramaekers et al., 1994) – im folgenden als Proband 3 bzw. 3(P) bezeichnet – sowie von acht weiteren, bisher unpublizierten Fällen mit vergleichbarem klinischem Erscheinungsbild sowie ähnlichen Laborwerten. Die Probanden 3 und 4 sind Cousin und Cousine.

Selektionskriterien waren: (1) Unbehandelbare Epilepsie, (2) niedrige Plasma Se Werte, sowie (3) Ansprechen der antikonvulsiven Medikation nach Normalisierung des Selenstatus.

Daneben wurden für alle Produkte zwei Standard-DNA-Kontrollen, 1(K) und 2(K), amplifiziert und sequenziert. Zum einen dienten sie zur Überprüfung einer regelrechten PCR-Reaktion und Primerfunktionalität; zum anderen stellten sie neben den verwendeten Referenzsequenzen aus öffentlichen Datenbanken (vgl. 2.2.3.5) eine zusätzliche Vergleichsmöglichkeit mit der Basensequenz gesunder Probanden dar.

Wurde eine Abweichung von der Referenz in der kodierenden Sequenz eines Patienten, jedoch bei keiner der beiden Standardkontrollen festgestellt, und handelte es sich dabei nicht um eine stille Mutation, so wurde das betreffende Produkt bei acht zusätzlichen, gesunden Kontrollen (Kontrollen 3-10) sequenziert. Bei allen zehn Kontrollen handelte es sich um Mitarbeiter des Instituts für Experimentelle Endokrinologie der Charité Berlin, welche freiwillig an dieser Untersuchung teilnahmen, aufgeklärt wurden und deren Proben im Anschluss an die Blutabnahme anonymisiert wurden.

2.1.2 *Verwendete Materialien, Chemikalien und Geräte*

2.1.2.1 Allgemeines

Agarose GTQ	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva
DNA Ladder 1 kb	New England BioLabs
dNTPs 2,5 mM	New England BioLabs
Ethanol 100 %	J. T. Baker
Ethidium-Bromid	Sigma
MgCl ₂ 25 mM	Qiagen
10 × PCR Reaktionspuffer BioTherm™	Natutec Genecraft
Primer	Invitrogen
Q-Solution	Qiagen
Sephadex-Filterplatten	Amersham Biosciences
Kunststoffwaren	Eppendorf, Falcon, TPP, Biozym

2.1.2.2 Enzyme

Exonuklease I	New England Biolabs
Shrimp Alkalische Phosphatase	Promega
Taq-Polymerase Supratherm	Natutec Genecraft

2.1.2.3 “Kits”

Big Dye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	PE Applied Biosystems
Montage™ Seq ₉₆ Sequencing Reaction Cleanup Kit	Millipore

2.1.2.4 Lösungen und Puffer

TAE	0,04 M Tris-Acetat, 1 mM EDTA (pH 8,0)
TE	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA (pH 8,0)
Ladepuffer	0,125 % Bromphenolblau, 0,125 % Xylen-Cyanol, 0,125 % Orange G, 50 % Glycerol, 1 mM 0,5 M-EDTA (pH 8,0), 50 % TAE Puffer
Lysispuffer	300 mM NH ₄ Cl 1 mM EDTA (pH 7,4)

2.1.2.5 Geräte

BioPhotometer	Eppendorf
Chromas 2.24 Software	Technelysium Inc.
Genetic Analyzer ABI 3730	Applied Biosystems
iCycler™	Bio Rad
Schüttelheizblock ThermoStat plus	Eppendorf
Thermal Cycler Primus 96 ^{plus}	MWG Biotech
Vakuumentrifuge Concentrator 5301	Eppendorf
Vortex Microspin	Hartenstein
Waage	Sartorius
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf

2.1.3 DNA-Oligonukleotide

Primer wurden nach folgenden Regeln ausgesucht: G oder C am 3'-Ende, GC-Anteil von 30-50 % sowie eine Länge von 19-21 Basen. Die Gesamtlänge des zu amplifizierenden Produkts sollte - soweit mit der Primer-Wahl vereinbar - zwischen 400 und 550 bp liegen, um möglichst einheitliche PCR-Bedingungen anwenden zu können. Trotzdem wurden anhand von Test-PCR-Reaktionen mit Kontroll-DNA unter Temperaturgradienten sehr unterschiedliche Hybridisierungstemperaturen für die einzelnen DNA-Produkte ermittelt; sie variierten zwischen 45 und 63 °C. Teilweise waren außerdem Zusätze im PCR-Ansatz notwendig, um eine befriedigende Produktamplifizierung zu erreichen (vgl. 2.2.2.2).

Musste ein Exon aufgrund seiner Größe in zwei Produkten amplifiziert werden, wurden die Primer so gewählt, dass die Teilstücke sich überlappten und damit tatsächlich die gesamte kodierende Sequenz analysiert werden konnte.

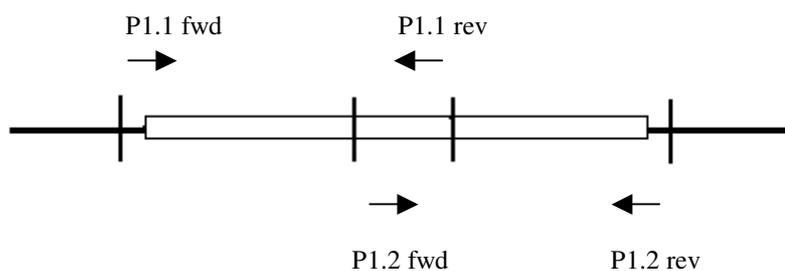


Abb. 5: Schematische Darstellung der Primerwahl bei sich überlappenden Teilsequenzen eines Produkts

Oligonukleotide für Selenocystein-Elongationsfaktor (EFSEC)

Primer		Produkt- größe	ermittelte Annealing- Bedingungen
EFSEC 1 fwd	5'- CAC ATC GAC AGC GGC AAG AC -3'	459	61°C
EFSEC 1 rev	5'- CAA AGC CTC CGC TCA CTT GC -3'		+ DMSO (3%)

EFSEC 2 fwd	5'- GTC GTG TAG TCA CCA TTT ATT C -3'	432	57°C
EFSEC 2 rev	5'- TGA CAC CTG CCT GTC CAA TTC -3'		
EFSEC 3 fwd	5'- CAT TGC ATC ATG TGC CAT GTG -3'	394	57°C
EFSEC 3 rev	5'- GAA CCA ACT GAG TCC TCT TG -3'		
EFSEC 4 fwd	5'- CTC TGA GCT GAG TTC ACC TTG -3'	484	57°C
EFSEC 4 rev	5'- GCA GTC CTA GAA TCT GAG TTG -3'		
EFSEC 5.1 fwd	5'- TTC AGT GTG GTA CCT GCT C -3'	541	57°C
EFSEC 5.1 rev	5'- CTT GGA CAG GTA CTG CTC CTG -3'		
EFSEC 5.2 fwd	5'- GGT TGA TGT TCT TCT GTC CTG -3'	492	57°C
EFSEC 5.2 rev	5'- CTG GCT CTC ATC ACA GAT GTC -3'		
EFSEC 6 fwd	5'- AGT TGC CAG TCT CAG GTT TCT G -3'	428	57°C
EFSEC 6 rev	5'- ACC TCT GCC ATC TCT CTG TGC -3'		
EFSEC 7 fwd	5'- CCT CAG GGC TGA TTG GCT AG -3'	380	57°C
EFSEC 7 rev	5'- GGA TTT GGC ACA GCA GCC TG -3'		

Oligonukleotide für Selenocystein Binding Protein 2 (SBP2)

Primer		Produkt- größe	ermittelte Annealing- Bedingungen
SBP2 1 fwd	5'- TTT GCT GTG ACG CAC TTC CT -3'	486	50,5-53,0 °C
SBP2 1 rev	5'- ACA ATC TAT CCG TTC CCA AG -3'		
SBP2 2 fwd	5'- TTG TCT TTA CGA GGC AGA AG -3'	449	51,0-54,5 °C
SBP2 2 rev	5'- GAT ACA GTT AAG TTG TGC TAC -3'		
SBP2 3 fwd	5'- ATT ATT CCA GTG CTA GAG TG -3'	472	50,0 °C + 2mM Mg ²⁺
SBP2 3 rev	5'- GAT ACT TAA ATA TGA TGT AC -3'		
SBP2 4 fwd	5'- GAA TAC TTA ATA TTT TGC TGC -3'	463	55,0 °C
SBP2 4 rev	5'- AAA TTA TAG GCA CTT AAG ATC -3'		
SBP2 5 fwd	5'- CAA CAC CGG TAA GAG TTA CG -3'	516	54,5-62,0 °C
SBP2 5 rev	5'- AGT GCA CAA TGA AAG GCT TC -3'		
SBP2 6 fwd	5'- ATA TGG TAA GAG TAT GGT TAG -3'	497	50,0-54,5 °C + 2mM Mg ²⁺
SBP2 6 rev	5'- TTC ATT TAG AAT TCT TGT CAC -3'		
SBP2 7 fwd	5'- GAC TAC TAT AGT TTC CAA GAG -3'	500	50,0-51,0 °C
SBP2 7 rev	5'- ATC ATC ACC ATC CAT CTT CAG -3'		

SBP2 8 fwd	5'- TCA TGT GAT TAT AGG ACT TG -3'	489	50,0 °C
SBP2 8 rev	5'- AAA CTA TTC AAC TCT GAT AC -3'		+ 2mM Mg ²⁺
SBP2 9 fwd	5'- AGC TCT TAT GTG AGA GTT TCG -3'	490	50,0-62,0 °C
SBP2 9 rev	5'- AGC AAC TGC AGT TAC CAA ATC -3'		
SBP2 10 fwd	5'- ACT TTA TAC AAG TGC TAG TG -3'	507	45,0-48,5 °C
SBP2 10 rev	5'- TGG TAA CAT AAT AAT CTA GC -3'		
SBP2 11 fwd	5'- TTG GCA AAC TCC TTC AGA TAC -3'	501	50,0-61,0 °C
SBP2 11 rev	5'- TTT CCT CTC AGG TAG CTA AAG -3'		
SBP2 12 fwd	5'- ATT GTC TTT AGA GCT CAG GGC -3'	527	54,5-62,0 °C
SBP2 12 rev	5'- TGT AAA GCT GGG AGC TCA ATG -3'		
SBP2 13 fwd	5'- TCT GCA TGT TGT CTG TGA ATG -3'	481	51,0-62,0 °C
SBP2 13 rev	5'- AGT AGA AGC AGA ATC AGA CAC -3'		
SBP2 14 fwd	5'- AGT AGT ACT TGT TGA AAC GTG -3'	508	50,0-62,0 °C
SBP2 14 rev	5'- ATG CAG TTG GGA AAC AGT TAC -3'		
SBP2 15 fwd	5'- AGA GTT GAT TCT GCA ACT TGC -3'	470	50,0-62,0 °C
SBP2 15 rev	5'- TAA GAA GGT TCT GCC TAA GTG -3'		

SBP2 16 fwd	5'- TAA GCA TGA GGT CCA CAT TAC -3'	530	51,0-61,0 °C
SBP2 16 rev	5'- AGA CAT CTG ACT TGA AGT CTG -3'		

SBP2 17.1 fwd	5'- TGA GAA CAG TGA GTG AAT GTC -3'	508	50,0-62,0 °C
SBP2 17.1 rev	5'- TCA GAA AGC CAG AGC TGT ATC -3'		

Oligonukleotide für RPL30

Primer		Produkt- größe	ermittelte Annealing- Bedingungen
--------	--	-------------------	---

L30 1 fwd	5'- TTC TGC TTG CGA TCT GTT TCC -3'	453	55 °C
L30 1 rev	5'- CTT AAA CTT CCG AAG TCG AGG -3'		+ 1 mM Mg ²⁺

L30 2 fwd	5'- CCT CGA CTT CGG AAG TTT AAG -3'	477	60,0 °C
L30 2 rev	5'- TGC CAC ACA CAC ACA TTT CTC -3'		+ 2 mM Mg ²⁺

L30 3 fwd	5'- AAG GCC TTA ACA ACA TTA AC -3'	310	54,0 °C
L30 3 rev	5'- CGT AGT AAG AAA TAC TTG TC -3'		

L30 4 fwd	5'- TTG TCT ACA GAA GGG ATA AC -3'	292	54,0 °C
L30 4 rev	5'- ATC CAA CCT TCA GGA AAT TG -3'		+ 2 mM Mg ²⁺

Oligonukleotide für Selenoprotein P (SEPP)

Primer		Produkt- größe	ermittelte Annealing- Bedingungen
SEPP 1 fwd	5'- AGC AGC AGC ATA ATT CGC T -3'	522	54,0 °C
SEPP 1 rev	5'- ACC AGT TTT CTG AAT CTA TTC TAT GG -3'		
SEPP 2 fwd	5'- TAG GTT GTG TTT GCA GAA TGT TAC -3'	550	54,0 °C
SEPP 2 rev	5'- GTT CTA TGC AAA CAC ATA G -3'		
SEPP 3 fwd	5'- TAA AGA ATA GGT GCA GTA T -3'	566	54,0 °C
SEPP 3 rev	5'- GGT ATA GTG TCA TAG AAA T -3'		
SEPP 4 fwd	5'- ATA CTA GTA TTA GAC TAA T -3'	496	54,0 °C
SEPP 4 rev	5'- AAA GTA GAG GTT AGA TGA C -3'		
SEPP 5.1 fwd	5'- CAG TTT ACT TCA TTT GCT TC -3'	631	54,0 °C
SEPP 5.1 rev	5'- ATA TCA GAT GTC GAC AAT G -3'		
SEPP 5.2 fwd	5'- CAA TTA CTC TGT AAA TTG C -3'	506	54,0 °C
SEPP 5.2 rev	5'- ACC TTT CAG TTG CTC CAT C -3'		
SEPP 5.3 fwd	5'- TGA ATT GGC TTC CAG ATT T -3'	491	54,0 °C
SEPP 5.3 rev	5'- GAA GAG TAT GAT ACA ACA T -3'		

SEPP 5.4 fwd	5' - TGT ATA TCT AAG ACT CAT CC -3'	535	52,0 °C
SEPP 5.4 rev	5' - TGT TGT TCC TTG TAC TAA A -3'		+ 2mM Mg ²⁺

Oligonukleotide für Selenocystein-β-Lyase (SCLY)

Primer		Produkt- größe	ermittelte Annealing- Bedingungen
--------	--	-------------------	---

SCLY 1fwd	5' - TTC GCT CAG CCA ATC CGG AC -3'	459	63,0 °C
SCLY 1 rev	5' - TGC AAA CCT CAC CCC TGG AAG -3'		+ DMSO (3%)

SCLY 2 fwd	5' - ACA CAG AGC AGC CAT ATT TC -3'	417	51,0-62,0 °C
SCLY 2 rev	5' - ACA GGA CAG CAT GTT AAA G -3'		

SCLY 3 fwd	5' - CAG ACC TCT TAT TCC TTT GTA -3'	412	52,5-61,0 °C
SCLY 3 rev	5' - GAT GGA CTT TCC CTA TGT TGC -3'		

SCLY 4 fwd	5' - CCA CTC AGG AAG TTG AAT TTC -3'	455	50,0-62,0 °C
SCLY 4 rev	5' - CAT CAG AAC CAG TGA GTT AC -3'		

SCLY 5 fwd	5' - TGA CTG CAG CCG CGT TAA AG -3'	408	52,5-61,0 °C
SCLY 5 rev	5' - CAT GAG TCT AAG CTG CTG TTC -3'		

SCLY 6 fwd	5'- TCT CTG TTC ACT TTG ATA AC -3'	412	51,0-62,0 °C
SCLY 6 rev	5'- ACA AGG ATC CCA CGT TGC TC -3'		
SCLY 7 fwd	5'- CTA TGC ATT GCA GAG CAT TTC -3'	429	52,0-62,0 °C
SCLY 7 rev	5'- CTT CAT TGC TTT CAA TCA TTC -3'		
SCLY 8 fwd	5'- TGC AGC TGC CAT TGA GAT AG -3'	455	52,0-61,0 °C
SCLY 8 rev	5'- CTC TGC TGT AAC AGT ATC AC -3'		
SCLY 9 fwd	5'- TCA GGA GAA ATG GCA GTT TC -3'	446	52,0-57,5 °C
SCLY 9 rev	5'- ATA CCA CCT CTG CAT ATT TG -3'		
SCLY 10 fwd	5'- TAT GCA CCT GCT GAA GTT GTG -3'	476	54,5-60,0°C
SCLY 10 rev	5'- AAT GCC AGA CAC GAG AGT TTG -3'		
SCLY 11 fwd	5'- GAA TGG CCA GTG CTG GAA TTC -3'	406	54,5-60,0 °C
SCLY 11 rev	5'- CAA GTC CTA GTC CTT CAG ATG -3'		
SCLY 12.1 fwd	5'- TTG AGC CAC ACC TTG ATG TGG -3'	452	59,0-61,0 °C
SCLY 12.1 rev	5'- ATG AGA CAG TCA TCC TGG CAC -3'		

Die lyophilisiert gelieferten Primer wurden kurz herunterzentrifugiert, in doppelt destilliertem Wasser aufgenommen und eine Stunde bei 37 °C im Schüttelheizblock (700 rpm) gelöst. Dabei wurde das Volumen des Wassers so berechnet, dass Lösungen zu 100 µM entstanden.

Anschließend wurden Arbeitskonzentrationen zu 5 µM und zu 1 µM hergestellt und zusammen mit den Stammlösungen bei – 20 °C gelagert.

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Extraktion aus Leukozyten

2.2.1.1 Durchführung der Extraktion

Die DNA wurde aus Leukozyten gewonnen; hierzu war den Patienten jeweils 5 ml Blut abgenommen worden. Die Extraktion wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Dem Patientenblut wurde 30 ml eiskalter Lysepuffer zugegeben, das Ganze durch Inversion gemischt und 15 Min. zur Lyse der Erythrozyten auf Eis gelegt. Anschließend wurden die Leukozyten durch Zentrifugation des Lysats 10 Min. bei 1500 rpm und 4 °C sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in weiteren 10 ml Lysepuffer suspendiert und wiederum 10 Min. bei 1500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dann mit 2 Volumina 100 % Ethanol versetzt, darin 2-3 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und die gefällte DNA durch Zentrifugation (5 Min. bei 2000 g und 4 °C) sedimentiert. Sie wurde danach zweifach in 1 ml 0,1 M Natriumcitrat und 10 % Ethanol gewaschen, 30 Min. bei Raumtemperatur belassen, 5 Min. bei 2000 g und 4 °C zentrifugiert und in 1 ml 75 % Ethanol aufgenommen. Die so entstandenen Flocken wurden zunächst in 50 µl H₂O gelöst, bevor im Anschluss weitere 450 µl H₂O, 1 ml 100 % Ethanol und 50 µl NaOAc 3 M (pH 4,5) hinzugefügt wurden. Nach einer erneuten Fällung (2600 g für 10 Min.) wurde das Pellet in 500 µl 75 % Ethanol gewaschen, zentrifugiert und schließlich in destilliertem Wasser aufgenommen.

2.2.1.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung, Verdünnung und Lagerung

Die Konzentration der gelösten DNA wurde photometrisch in Quarzküvetten im Spektralphotometer gemessen. Dazu wurde die optische Dichte der wässrigen Lösung der Wellenlängen 260 nm und 280 nm bestimmt. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht bei 1 cm Pfadlänge einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Die Konzentration unserer Proben lag zwischen 180 und 410 ng/µl.

Es wurden Arbeitslösungen zu einer Konzentration von 50 ng/µl angelegt und diese zusammen mit den Stammlösungen bei - 20 °C gelagert.

2.2.2 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

2.2.2.1 Allgemeines

Mithilfe dieser Methode können spezifische DNA-Abschnitte amplifiziert werden, um sie einer anschließenden Untersuchung, in diesem Fall der Sequenzanalyse, zugänglich zu machen.

In festgelegten Temperaturzyklen werden nacheinander die DNA-Doppelstränge voneinander getrennt (Denaturierung), an den gewünschten Stellen durch spezifische Oligonukleotide („Primer“) eine Polymerisierung initiiert („Annealing“) und diese anschließend durch Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs) vervollständigt (Extension). Diese Reaktion wird durch die ursprünglich aus thermostabilen Bakterien gewonnene *Thermus aquaticus* Polymerase (Taq-Polymerase) katalysiert. Das Verfahren der PCR mit Taq-Polymerase wurde erstmals 1988 von Saiki et al. beschrieben (Saiki et al., 1988).

Folgender Standard-Ansatz wurde für die PCR-Reaktion verwendet:

dNTPs	2,0 nmol
10 × PCR Puffer	1 µl
DNA	25-200 ng
Primer fwd	1,25 pmol
Primer rev	1,25 pmol
Taq-Polymerase	0,5 U
H ₂ O	ad 10 µl

Tab. 3: PCR-Ansatz pro Probe

Die PCR-Reaktion lief dabei für jede Probe nach folgendem Programm ab:

96 °C	5 Min.	Initiale Denaturierung	
96 °C	30 Sek.	Denaturierung	} 35 Zyklen
x °C	30 Sek.	Primer-Anlagerung („Annealing“)	
72 °C	40 Sek.	Extension	
72 °C	7 Min.	Abschließende Extension	

Tab. 4: zyklischer Ablauf der PCR

x: Primer-spezifische Annealingtemperatur (vgl. 2.1.3)

Zu Beginn der Reaktion wurden die Proben auf den bereits auf 96 °C aufgeheizten Thermocycler gestellt, um eine unspezifische Hybridisierung der Primer zu vermeiden (sog. einfacher Hot Start).

2.2.2.2 Optimierung der PCR-Bedingungen

Um ein optimales Amplifikationsergebnis zu erzielen, wurde anhand von Kontroll-DNA die spezifische Annealing-Temperatur eines jeden Primer-Paars mit Hilfe eines Gradienten im iCycler-Gerät ermittelt. Konnte auf diese Weise kein in der Elektrophorese gut sichtbares Produkt gewonnen werden, wurden verschiedene Zusätze, jeweils allein oder in Kombination, in die Standardreaktion integriert. Dabei blieb das Gesamtvolumen des Ansatzes unverändert bei 10 µl.

Nachdem so für jedes Exon der optimale Ansatz ermittelt worden war, wurde anschließend das entsprechende Produkt unter den jeweiligen Reaktionsbedingungen aus Patienten-DNA amplifiziert.

Um nicht unnötig Material und Reagenzien zu verbrauchen (ein vollständiger Optimierungsansatz nach diesem Schema bedeutet für jedes Primer-Paar 40 Ansätze zu je 10 µl), wurde auf die Optimierung mithilfe von Zusätzen erst zurückgegriffen, wenn die Variation der Temperatur allein kein befriedigendes Ergebnis geliefert hatte.

Temperatur- gradient	Keine Zusätze (Standardansatz)	+ 1 mM Mg ²⁺	+ 1 mM Mg ²⁺ + Q-Solution	+ 1 mM Mg ²⁺ + DMSO (3%)	+ 2 mM Mg ²⁺
50,0 °C					
50,9 °C					
52,3 °C					
54,4 °C					
57,5 °C					
59,7 °C					
61,2 °C					
62,0 °C					

Abb. 6: Schema zum Vorgehen bei Primer-spezifischer Optimierung der Annealingtemperatur in der PCR

Das Optimierungsergebnis für die einzelnen Primerpaare und Produkte ist den Übersichten in 2.1.3 zu entnehmen.

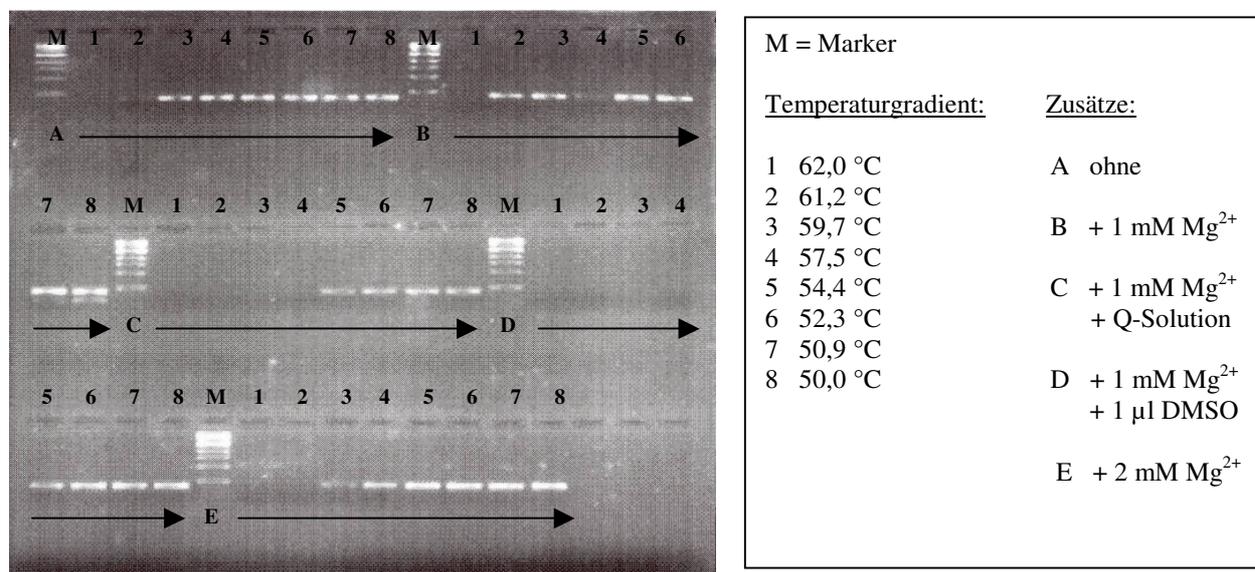


Abb. 7: Beispiel eines PCR-Optimierungsergebnisses: SCLY, Produkt 1

Fotografie des Elektrophoresegels.

In diesem Fall wurden die Bedingungen 52,3 °C-Annealing und Zusatz von 2 mM Mg²⁺ für die Amplifizierung der Patienten-DNA gewählt.

2.2.2.3 Prüfung durch Gelelektrophorese

Zum Nachweis einer erfolgreichen Amplifizierung wurden jeweils 2 µl PCR-Produkt zusammen mit einem Tropfen Ladepuffer auf ein 1,5 %iges, mit Ethidiumbromid versetztes Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Ein Gel lief im Durchschnitt 50 Vh.

Dabei wurden regelmäßig ein DNA-Marker (1kB) und eine Kontrolle mitgeführt, so dass eine zweifelsfreie Zuordnung der Banden zum gewünschten Produkt möglich war.

Die PCR-Produkte wurden am UV-Schirm sichtbar gemacht und mithilfe einer Polaroid-Videokamera als Fotografie dokumentiert.

2.2.3 Sequenzierung

2.2.3.1 Allgemeines

Bei der Sequenzierung handelt es sich um die Bestimmung der genauen Basenfolge eines kurzen DNA-Abschnitts. Sie erfolgte nach dem Kettenabbruchverfahren (Sanger et al., 1977).

Ähnlich wie bei der PCR wird DNA an einer einzelsträngigen Matritze neu synthetisiert. Dem Ansatz hinzugefügte Nukleotide in Didesoxyform (ddNTPs) werden jedoch dabei zufällig in die Sequenz eingebaut und führen daraufhin zum Kettenabbruch. Da die vier Nukleotide ddATP, ddTTP, ddGTP und ddCTP durch unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe gekennzeichnet sind, deren Emissionsmaxima bei unterschiedlichen Wellenlängen liegen, kann auf diese Weise die genaue Position einzelner Nukleotide in der Sequenz bestimmt werden. Die Messung der neu synthetisierten, verschieden langen DNA-Fragmente erfolgt elektronisch. Am Computer kann die Information anschließend als einheitliche Sequenz dargestellt werden.

2.2.3.2 Enzymatische Aufreinigung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe von Exonuklease (Exo I) von Primern, Nukleotiden, Salzen und Polymerase gereinigt und durch Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP) dephosphoryliert. Dies geschah in ein und derselben Reaktion nach folgendem Protokoll:

1,8 U Exonuklease, 0,32 U Shrimp Alkalische Phosphatase, 8 µl aufzureinigendes PCR-Produkt und H₂O ad 10 µl wurden 35 Min. bei 37 °C inkubiert und die Enzyme anschließend für 15 Min. bei 80 °C denaturiert.

2.2.3.3 Sequenzierungsreaktion

Zur Sequenzierung der PCR Produkte wurden je 3 µl gereinigte DNA eingesetzt. Hinzu kamen 1,25 pmol fwd Primer, 0,5 µl Big Dye Mix und 1,75 µl zugehöriger Puffer sowie H₂O ad 10 µl. Es wurde folgendes Programm für den Thermocycler verwendet:

96 °C	10 Sek.	} 32 Zyklen
55 °C	5 Sek.	
60 °C	4 Min.	

Tab. 5: Zyklischer Ablauf der Sequenzier-PCR

Unabhängig von den für die PCR ermittelten optimalen Reaktionsbedingungen gelang – bei klarer Bande des PCR-Produkts in der Gelelektrophorese – die Sequenzierungsreaktion bei einer Standard-Annealingtemperatur von 55 °C.

Im Falle einer misslungenen Sequenzierung trotz deutlicher Bande des PCR-Produkts in der Gelelektrophorese wurde die Reaktion mit dem jeweiligen Reverse-Primer wiederholt und so statt des Hin- der komplementäre Rückstrang sequenziert. Dies musste natürlich bei der späteren Auswertung der Sequenz berücksichtigt werden. Eine systematische Antisense-Sequenzierung aller Produkte fand nicht statt; das Verfahren blieb den beschriebenen Sonderfällen vorbehalten.

2.2.3.4 Aufreinigung und Fluoreszenzmesung

Die Produkte wurden entweder über Milipore-Filterplatten oder über Sephadex-Platten nach Anleitung der Hersteller gereinigt. In einigen Fällen wurde eine Natrium-Acetat-Ethanol-Fällung nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Zum Sequenzierungs-PCR-Produkt wurden 2 µl 3 M NaOAc und 50 µl Ethanol 95 % gegeben, durch Vortexen gemischt und für 15 Min. zur Präzipitation bei Raumtemperatur belassen. Im Anschluss wurde 30 Min. bei maximaler Drehgeschwindigkeit (14 000 rpm) und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand abgenommen und verworfen, das Pellet in 250 µl Ethanol 70 % aufgenommen und durch vorsichtiges Antippen vom Boden des Eppendorfgefäßes gelöst. Es folgten eine erneute Zentrifugation (10 Min., 14 000 rpm, Raumtemperatur) und die Abnahme des Überstandes. Das Pellet wurde in der Vakuumzentrifuge getrocknet und schließlich in 10 µl H₂O aufgenommen.

Aufreinigung und Fluoreszenzanalyse mit dem Genetic Analyzer ABI 3730 der Firma Applied Biosystems erfolgten an den Geräten und mit der Hilfe der AG Nürnberg am Max-Delbrück-Zentrum in Berlin-Buch.

2.2.3.5 Auswertung

Die Rohdaten aus der Fluoreszenzanalyse wurden anhand der Software des Genetic Analyzers in einheitliche Sequenzen umgewandelt.

Mithilfe des Programms Chromas 2.24 konnten die so gewonnen DNA-Sequenzen mit den folgenden veröffentlichten Referenzsequenzen verglichen werden:

<i>Gen</i>	<i>Referenz: Gen-Identifikations-Nr. (gi)</i>
EFSEC	39725642
SBP2	21359954
RPL30	15812218
SEPP	4885590
SCLY	39725671

Tab. 6 : Referenzsequenzen der analysierten Gene

Zusätzlich wurde die Intaktheit aller Exon-Intron-Grenzen überprüft. Auf diese Weise sollten Mutationen erkannt werden, die zu fehlerhaftem Spliceverhalten führen könnten.

Wie bereits erwähnt wurden für alle analysierten Genprodukte zwei Standardkontrollen von gesunden Probanden (Kontrollen 1 und 2) amplifiziert, sequenziert und ausgewertet.

Ebenso fand wie in Abschnitt 2.1.1 beschrieben eine Analyse acht weiterer Kontrollen (K3-K10) statt, sobald eine Patientensequenz sowohl im Vergleich mit der Referenz als auch im Vergleich mit den zwei Standardkontrollen Unterschiede aufwies und es sich dabei nicht um eine stille Mutation handelte.

Daneben wurden alle beobachteten Varianten mit der SNP-Datenbank des National Center for Biotechnology Information, NCBI, in ihrem Stand von Dezember 2005 verglichen (www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=snp). Es handelt sich hierbei um eine Sammlung bisher veröffentlichter genspezifischer Polymorphismen (*single nucleotide polymorphisms*) mit Angabe ihrer jeweiligen Häufigkeit in der Gesamtbevölkerung. Auf einen eventuellen Krankheitswert der einzelnen Polymorphismen wird in dieser Quelle nicht eingegangen.