

2. PATIENTEN UND METHODEN

2.1 Patienten

Alle Patienten, die sich einer Genanalyse zur Identifizierung einer PBGD-Mutation unterzogen, waren vorher aufgeklärt worden und hatten eine Einwilligungserklärung unterschrieben. Es handelte sich um Patienten aus der Ambulanz der Hämatologie-Onkologie des Universitätsklinikums „Charité“ in Berlin, um Patienten des „Hämatologie/Onkologie-Zentrums“ München und um Patienten aus Praxen von niedergelassenen Ärzten aus der gesamten Bundesrepublik Deutschland, deren Blutproben zur Untersuchung zugesandt worden waren. Der Verdacht, daß die betreffenden Personen an einer AIP litten, war aufgrund des klinischen Eindrucks, oder aufgrund bereits durchgeführter, labormedizinischer Diagnostik in den meisten Fällen abgesichert. Es handelte sich um 20 Personen, die bereits durch eine klinische Symptomatik aufgefallen waren und nicht miteinander verwandt waren. Darunter waren 17 Frauen und 3 Männer. 17 Individuen waren deutschen Ursprungs, ein Patient aus Afghanistan, einer aus dem ehemaligen Jugoslawien und ein Patient war türkischen Ursprungs. Für die meisten Untersuchten lagen klinische Daten vor (**Tabelle 8**).

Es war schwierig Patientenproben für diese Arbeit zu gewinnen. Einerseits lag es daran, daß die AIP eine extrem seltene Erkrankung ist, andererseits daran, daß in Deutschland kein zentrales Register existiert. Die vorangegangene Studie aus Frankreich (Puy *et al.*, 1997b) war von der Arbeitsgruppe des französischen Porphyrizentrums veröffentlicht worden, die auf sämtliche Blutproben des Zentrums zurückgreifen konnte.

Tabelle 8: Patientendaten (eigene Tabelle)

Nr.	Initialen	Geschlecht	Geburtsjahr	Ethnische Zugehörigkeit	Symptome	PBG im Urin mg/24h Ref:<2	δ-ALA im Urin mg/24h Ref:<5	ery. PBGD Akt. pMUp/h/mgHb Ref:11nM/l/s ± 4	PBGD Aktivität in %
1	M. K.	♀	1953	D	Neuropathie, Psychose, Krämpfe	446	362	14.9	100
2	W. L.	♀	1942	D	Dunkler Urin, chronische Bauchschmerzen, Attacken	6.3	6.3	7.10	64
3	M. SK.	♀	1966	D	Übelkeit, Erbrechen, Appetitlosigkeit, Kreuzschmerzen, Zunahme der Beschwerden bei Einnahme von NSAR	>100	>100	k.A.	k.A.
4	A. A.	♀	1966	T	Unklare Bauchbeschwerden	k.A.	k.A.	3.68	33
5	D. K.	♀	1950	D	Ständige Bauchschmerzen, Rückenschmerzen, Morphinabhängigkeit	37	22	k.A.	k.A.
6	B. B.	♂	1940	D	Kolikartige Bauchschmerzen, paralytische Attacken des rechten Armes und Beines, seit 1971 an Depression leidend	8.3	44.5	k.A.	40
7	U. K.	♀	1937	D	Abdominelle Beschwerden, Subileus, Tetraplegie	1.94	2.3	7.20	65
8	S. A.	♀	1980	A	Heftige abdominelle Schmerzen, Rückenschmerzen, Halluzinationen	66.2	105	k.A.	49
9	I. K.	♀	1980	D	Akutes Abdomen mit Aszitesbildung und kolikartigen Schmerzen	k.A.	5.74	k.A.	k.A.
10	P. S.	♀	1942	D	Akutes Abdomen, Bluthochdruck, Durchfall, Schwitzen	erhöht	erhöht	k.A.	k.A.
11	M. M.	♀	1946	D	Wiederholt abdominelle Schmerzen, Obstipation, Tachykardie, Krämpfe; prämenstruell gehäuftes Auftreten der Symptome	22.40	10.50	k.A.	50

Nr.	Initialen	Geschlecht	Geburtsjahr	Ethnische Zugehörigkeit	Symptome	PBG im Urin mg/24h Ref:<2	δ-ALA im Urin mg/24h Ref:<5	ery. PBGD Akt. pMUp/h/mgHb Ref: 11nM/l/s ± 4	PBGD Aktivität in %
12	E. M.-S.	♀	1918	D	1981 schwere Attacke, Brechdurchfall, Schüttelfrost, schmerzhafte, schwerste Muskelfaszikulationen, hoher Temperaturanstieg, sekundäre Atemdepression	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
13	T. T.	♀	1945	D	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
14	M. T.	♀	1958	D	Erbrechen, abdominelle Atonie und Schmerzen, psychologische Auffälligkeiten, Beschwerden nach einer Erkrankung mit Fieber	73.9	93.5	k.A.	k.A.
15	O. L.	♂	1939	D	Akute Attacken abdomineller Beschwerden, Durchfall	1.1	4.9	verringert	<50
16	K. K.	♀	1969	D	Latente Verlaufsform, abdominelle Schmerzen während der Adoleszenz	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
17	I. V.-A.	♀	1940	D	k.A.	9.68	4.55	k.A.	59
18	A. N.	♂	1979	KA	Akuter, intermittierender abdomineller Schmerz	60.2	32.5	k.A.	k.A.
19	K. H.	♀	1939	D	Wiederholt auftretende, kolikartige, abdominelle Schmerzen, postoperativ Anzeichen einer Paralyse, Hyponatriämie	Stark erhöht	11.8	k.A.	k.A.
20	S. P.	♀	1954	D	Latente Verlaufsform, keine Symptome	Normal	Normal	k.A.	44

Legende: ♀- weiblich, ♂- männlich, D - deutsch, T - türkisch, A - afghanisch, KA - kosovo-albanisch, k.A. - keine Angaben, Ref. – Referenzwert, PBG – Porphobilinogen, mg – Milligramm, ery. PBGD Akt. pMUp/h/mgHb – erythrozytäre Porphobilinogen-Desaminase-Aktivität in Picomol Uroporphyrin pro Stunde pro Milligramm Hämoglobin

2.2 Methoden

Für die Identifikation der AIP-Mutationen wurden drei verschiedene Ansätze zur Analyse des PBGD-Gens angewandt. Die Methoden waren so strukturiert, daß zunächst aus Patientenblut die DNA isoliert wurde und das PBGD-Gen mit einer PCR amplifiziert wurde. Im Anschluß wurde bei der ersten Methode (DGGE) das Amplifikat mit einer DGGE voruntersucht und bei Nachweis einer Aberration sequenziert. Bei der zweiten Methode (SEA) wurden die Exonamplifikate in Dreiergruppen zusammengefasst und nacheinander in der Sequenzanalyse auf Mutationen untersucht. Wurde eine Mutation identifiziert, wurde keine weitere Untersuchung für den Patienten mehr vorgenommen. Bei der dritten Methode (EIS) wurde das PBGD-Gen möglichst vollständig sequenziert und zu diesem Zweck große, zusammenhängende Genabschnitte amplifiziert.

2.2.1 Methode 1 – Denaturierende Gradientengel Elektrophorese (DGGE)

2.2.1.1 DNA-Extraktion – DGGE

Der Patientin wurde peripher-venöses Blut entnommen und mit EDTA versetzt. Anschliessend wurde die Desoxyribunukleinsäure nach der Methode von Higuchi (Higuchi, 1989), aus den Lymphozyten extrahiert.

Agenzien:

NaCl, Ficoll, DNA- Extraktionspuffer, Proteinase K, Phenol+Tris (pH 8.0), Phenol+Chloroform (pH 8.0), Isopropanol, 70% Ethanol, TE-Puffer

DNA- Extraktionspuffer:

10mM TrisCl (pH 8.0)

0.1M EDTA (pH 8.0)

20µg/ml Pankreas- RNase

0.5% SDS (kann bei -20°C aufbewahrt werden)

Extraktionsprotokoll:

Zunächst Probe mit gleichem Volumen NaCl verdünnen, auf 10-15ml mit Ficoll auffüllen, dann zentrifugieren: 30min bei 2000U/min (Bremse ausschalten). Interphase entnehmen, Entnommenes mit NaCl verdünnen und zentrifugieren: 10min bei 2000U/min. Überstand verwerfen. Abhängig von der Größe des Pellets mit 1-2ml DNA- Extraktionspuffer verdünnen.

Daraufhin Proteinase K 100µg/ml zugeben und 3h bei 50°C im Wasserbad schütteln. Auf Raumtemperatur abkühlen lassen. Gleiches Volumen Phenol + Tris (pH 8.0) zugeben und >15sec vortexen, danach zentrifugieren: 15min bei 14000U/min. Gleiches Volumen Phenol:Chloroform (pH 8.0) zugeben und >15sec vortexen und zentrifugieren: 10min bei 14000U/min. Die wässrige (obere) Phase in neues Behältnis geben (es sollte keine Interphase sichtbar sein), gleiches Volumen Isopropanol zugeben und >15sec vortexen, dann bei -20°C über Nacht lagern. Am nächsten Tag zentrifugieren: 20min bei 14000U/min, Überstand verwerfen und 70%igen Alkohol zum Pellet zugeben. Probe waschen, vortexen, zentrifugieren, dann Alkohol verwerfen und Pellet bei Raumtemperatur für 5-10min trocknen lassen. Pellet in kleiner Menge TE-Puffer lösen (50µl) und bei -20°C lagern.

Zur spektrophotometrischen Konzentrationsmessung der DNA und der verunreinigenden Proteine wurden respektive die Wellenlängen 260nm und 280nm gebraucht. Der Quotient von OD₂₆₀ und OD₂₈₀ war Indikator für die Reinheit der Proben.

2.2.1.2 PCR – DGGE

Um das 203bp lange Exon 1 zu vervielfältigen und zudem, mittels einer GC-Klammer, eine Domäne mit einem Schmelzpunkt bei höheren Temperaturen zu inkorporieren (Sheffield *et al.*, 1989), wurden bereits beschriebene Primer verwandt (Puy *et al.*, 1997b; Petrides, 1998). Die Sequenzen waren wie folgt:

Exon 1 forward Primer: GCG CGC GCG CGC GCG CGC GCG CGC GCG CGC CGT GTC
CCC GGT ACT CGC C;

Exon 1 reverse Primer: CTC GTC CAG AAG CCC AAA GTG TG.

200ng DNA, 5µM von jedem der Primer, 0.2mmol dNTP, 10µl 10xPufferlösung, 6µl MgCl₂, 0.4µl AmpliTaqGold[®] (Applied Biosystems) wurden mit destilliertem Wasser zu 50µl Reaktionsmischung aufgefüllt und dann in einen PCR Automaten (Perkin Elmer[®]) gegeben.

Das Protokoll für die Amplifikationszyklen war wie folgt:

Initiale Denaturierung: 15min / 95°C;

40 Amplifikationszyklen: 30sec / 95°C, 30sec / 58°C, 40sec / 72°C;

Abkühlungszeit : 10min / 72°C ;

Schließlich wurden die Proben bei 4°C aufbewahrt.

Um die Resultate zu überprüfen wurden Aliquots des PCR-Produktes neben einer DNA-Leiter durch ein 0.8%iges Agarosegel (0.8g Agarose in 40ml 1xTAE Puffer) bei 50 Volt für 150min elektrophoriert. Die PCR war modifiziert nach Gu und de Rooij (Gu *et al.*, 1992). Die Aliquots wurden vor dem Auftragen auf das Gel, mit 6xDNA Loading Dye im Verhältnis 5:1 gemischt. Im Anschluß wurde das Gel mit 10mg/ml Ethidium-Bromid 20min im Wasserbad gefärbt. Darauf wurde es 5min im Wasserbad gewaschen und das Ergebnis unter dem UV-Licht betrachtet und photographiert (**Abbildung 11**).



Abbildung 11: PCR-Produkte im Agarosegel nach der Elektrophorese (eigene Abbildung)

2.2.1.3 DGGE

Für die DGGE (Myers *et al.*, 1987) wurde das DCode™ Universal Mutation Detection System (BioRad) genutzt (**Abbildung 12**).

Folgende Lösungen wurden benötigt:

40% Acrylamid/Bis (37.5 : 1) :

38.93g Acrylamid, 1.07g Bis-acrylamid, mit Wasser auf 100ml auffüllen, durch einen 0.45µm Filter geben und bei 4°C lagern.

50xTAE-Puffer:

Tris Base 242g (2M), Essigsäure 57.1ml (1M), 0.5M EDTA, pH 8.0 100ml (50 mM), mit destilliertem Wasser auffüllen auf 1000ml. Mischen, für 20-30min autoklavieren und bei Zimmertemperatur lagern.

8% Gel; 40% Denaturierungslösung:

20ml des 40% Acrylamid/Bis, 2ml des 50xTAE-Puffers, 16ml deionisiertes Formamid, 16.8g Harnstoff (Urea) mit dH₂O auffüllen auf 100ml.

8% Gel; 70% Denaturierungslösung:

20ml des 40% Acrylamid/Bis, 2ml des 50xTAE-Puffers, 28ml deionisiertem Formamid, 29.4g Harnstoff (Urea) mit dH₂O auffüllen zu 100ml.

Denaturierungslösungen für 10-15min entgasen, durch einen 0.45µm Filter geben, bei 4°C in einer lichtgeschützten Flasche für bis zu einem Monat lagern. Vor Verwendung erneut in einem warmen Wasserbad unter Rühren (Magnetstab) auflösen.

25µl des PCR-Produktes (50µg/ml) wurden mit 10% Glycerolfarbe bei 60°C für 5½ Stunden mit 150 Volt durch ein 8% Acrylamid-Gel mit einer Zunahme des denaturierenden Gradienten von 40% – 70% elektrophoriert. Um die Resultate vergleichen zu können, wurde gleichzeitig immer auch eine Positivprobe und eine Negativprobe auf das Gel geladen.

Zu diesem Zweck wurden 7L TAE Lauf-Puffer im Tank vorgewärmt. Das 70% Denaturierungsgel wurde mit 100µl der Dcode Dye Solution® pro 5ml Denaturierungslösung gefärbt. Den Denaturierungslösungen wurde 0.09% (v/v) Ammonium Persulfat und 0.09% (v/v)

TEMEI beigegeben, die Lösungen daraufhin gemischt (Vortex). Direkt im Anschluß wurden die Gele gegossen. Polymerisationszeit war 1.5h. Nach der abgeschlossenen Polymerisation wurden die Gele in den DGGE Tank eingebracht. 200ml des 50xTAE Puffers wurden vorher entnommen und vor dem Beschicken des Gels mit DNA-Proben in die obere Kammer wieder eingefüllt. Nachdem die Proben auf das Gel gegeben wurden, wurde der Tank wieder beheizt, die Umwälzpumpe wurde erst 2h vor dem Ende der Elektrophorese eingeschaltet. Das Gel wurde anschließend im Schwenkbad mit Ethidium-Bromid angefärbt (wie Agarose-Gel) und mit einem Polaroidfilm Typ 667 und der Blende 4.5 unter UV-Licht photographiert.



Abbildung 12: DGGE- Gerät von BioRad® (<http://www.bio-rad.com>)

2.2.1.4 Sequenzierung – DGGE

Folgende Primer wurden eingesetzt:

Exon 1 sense Primer 1: 5'-Biotin-Cgt gTC CCC ggT ACT CgC C

Exon 1 antisense Primer 1: 5'-Cgt CCA gAA gCC CAA Agt gTg

Exon 1 sense Primer 2: 5'-Fluorescein-gTC CCC ggT ACT CgC Cgg CC

Exon 1 antisense Primer 2: 5'-Fluorescein-CCA gAA gCC CAA Agt gTg CT

Die Stränge wurden unter Einsatz der Dynabead Technik (Dynal) und der biotinylierten Primer aufgereinigt und isoliert. Die Sequenzierung wurde mit einer Sequenase-Reaktion

(Apbiotech) und einem automatischen Laser-Fluoreszenz-Sequenzierer (Apbiotech) ausgeführt.

Die Sensitivität der verschiedenen Sequenzierungsapparate bei den drei Methoden ist gleich. Wurde bei einem der untersuchten Individuen eine Mutation festgestellt, wurde die Sequenzierung zur Bestätigung nochmals mit dem gegenläufigen Primer durchgeführt (forward primer – reverse primer (sense – antisense)). In **Abbildung 17** ist ein Beispiel einer Sequenzierung mit **Abi-Prism[®]** zu sehen.

2.2.2 Methode 2 – Sequenzielle Exonanalyse (SEA)

2.2.2.1 DNA-Extraktion – SEA

DNA-Extraktion wie bei Methode 1.

2.2.2.2 PCR – SEA

PCR wie bei Methode 1.

Die Primer, die verwendet wurden, sind in **Tabelle 9** zu sehen. Sie sind teilweise den Primern ähnlich, die in einer anderen Publikation benutzt wurden (Puy *et al.*, 1997b), mit dem Unterschied, daß sie keine GC-Klammern enthalten.

Tabelle 9: Liste der PCR- und Sequenzierungs- Primer (eigene Tabelle)

EXON	PRIMER	5'-SEQUENCE	SIZE (bp)
2	sense	CAC AGC ACT CCC ACT GAC AA	20
	antisense	GAG TGG GGA AAT ACT CCA AGG	21
3	sense	CCA GTG ATT CTG GTT CTT GGA C	22
	antisense	TCC CCC AAT TTG TGA TGC TGT	21
4	sense	AAG AGT CTG AGC CGT GGC TGG	21
	antisense	GTT GTG TTC TCT CCT CTC GGG G	22
5&6	sense	AAA TGC TGA TCA ATA ATG AGC ACC T	25
	antisense	CCT GGG AGG GCA CCA CAC TCT CC	23
7	sense	TGG CTG CTC ATA CCC TTT CTC T	22
	antisense	ATG ATG CCT ACC CCT GCC CA	20
8	sense	AAT CGA GAG AGA ATA GAG GTG AT	23
	antisense	TCC CAT CCC TGC ATC TTC TGG	21
9	sense	ATC TCA TTG TAA CTT CTC TCT GGG C	25
	antisense	CCT TGT CTT TTT CCT TGG CTG CT	23
10	sense	CCG ACA CTG TGG TCC TTA GCA A	22
	antisense	TGG GGA TGA CTG TAA GGC AGA	21
11	sense	CTG CCA GGT GCT TTT AGA CA	20
	antisense	AGG CAT ATG TCA CCA TGT GG	20
12	sense	CAG GCC TGA TGT CCT AGG ATG T	22
	antisense	TCC CCA GCC CTC CAC AGG T	19
13	sense	GTT GTG TAT GGA TAG GAC CAG	21
	antisense	CTA CCT AGA AAC CTG GGA TG	20
14	sense	GTA GTC CCC TCT CAG ACT GTG	21
	antisense	ATG CAC TCT TGT TTA TTA CCC C	22
15	sense	TTC TCA CCA AAT CCC ACC TC	20
	antisense	GTT CCT ATC TTC CCG CCA AC	20

2.2.2.3 Strategie – SEA

Eine Strategie wurde ersonnen, um Mutationen im Spektrum Exon 3 bis 15 möglichst schnell und effizient zu identifizieren. Aus vorherigen Publikationen (Puy *et al.*, 1997b) war ersichtlich, daß das Vorkommen von Mutationen in den 15 Exons nicht gleichverteilt ist, sondern daß besonders viele Mutationen z. B. in Exon 10 gefunden wurden, nur sehr wenige hingegen in Exon 8. Basierend auf der Wahrscheinlichkeit, mit der eine Mutation in der Sequenz von einem Exon entsteht, bzw. besteht, wurde die Amplifizierung und Sequenzierung der Abschnitte des PBGD – Gens in verschiedene Schritte unterteilt:

Die Exons wurden in vier Gruppen eingeteilt, geordnet nach absinkender Wahrscheinlichkeit eine Mutation aufzuweisen. Erst nach Analyse der ersten Gruppe von Exons wurde die Analyse der nächsten Gruppe von Exons aufgenommen.

Zuerst wurden die

Exons 10 – 12 – 14

untersucht. War keine Mutation auf diesem Genabschnitt des Patienten gefunden worden, folgte als zweiter Schritt die Sequenzierung von

Exons 4 – 7 – 13.

Der dritte Schritt, nach abermals negativem Ergebnis, bestand in der Untersuchung von Exons 3 – 5+6 – 9.

Konnte noch keine Mutation in den bisher untersuchten Exons eines Patienten identifiziert werden, wurden abschließend

Exons 8 – 11 – 15

sequenziert (**Abbildung 13**).

Sobald bei einem Patienten eine Mutation nachgewiesen wurde, wurde für die Probe der betreffenden Person kein weiteres Exon untersucht.

Zur Bestätigung aller identifizierten Mutationen, wurde die Sequenzierung des Genabschnitts auf der sie sich befanden, nochmals mit gegensinnigen (reverse) Primern wiederholt.

Da es bei den Patienten keinen Hinweis auf das Vorliegen der varianten Form der AIP gab, was auch unwahrscheinlich gewesen wäre, schließlich macht diese nur ca. 4% aller AIP-Fälle aus, wurde die Analyse des Exons 1 bei diesen Patienten nicht von vornherein geplant. Die Untersuchung des Exons 1 hätte später an eine ansonsten erfolglos verlaufende Genanalyse noch angehängt werden können.

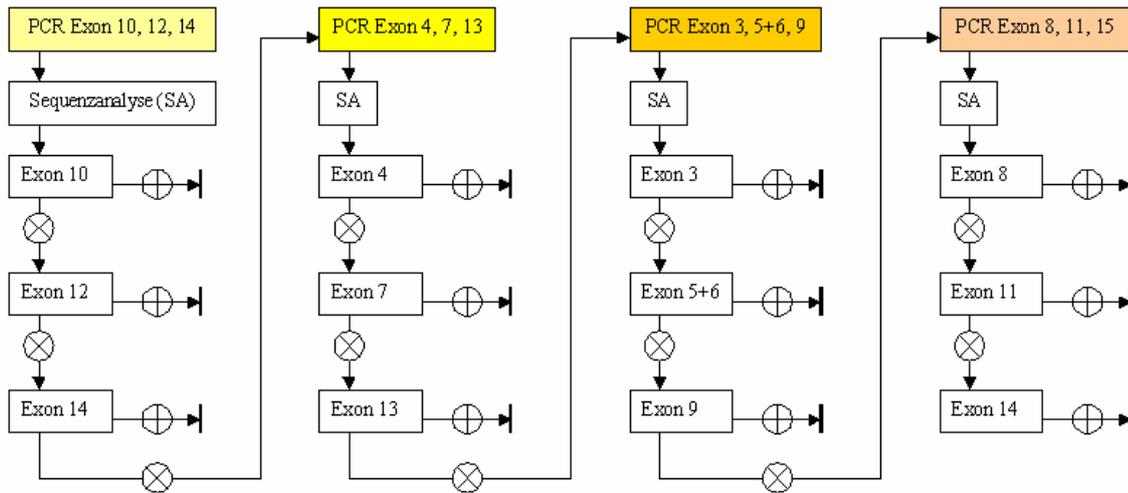


Abbildung 13: Schema der sequenziellen Exon-Analyse (SEA)
 PCR-Polymerasekettenreaktion, SA-Sequenzanalyse, + - Mutation identifiziert, x – Mutation nicht identifiziert (eigene Abbildung).

2.2.2.4 Sequenzierung – SEA

Sequenzierungsprotokoll:

100-200ng DNA; 6-10pmol primer; 10µl Volumen für eine Reaktion.

Benutzt wurde das BigDye™ Terminator V2 Cycle – Sequenzierungs-Kit (Applied Biosystems®). Ausgeführt wurde die Sequenzierung mit 5min bei 95°C, 10sec bei 55°C und 4min bei 60°C. Dann wurde auf 4°C abgekühlt und die Temperatur gehalten. Sequenzierer war der ABI Prism 377 DNA Sequencer®.

Als Gelsystem wurde verwendet: 48cm WTR (well-to-read), 4.25% PAA, 7M Harnstoff.

Zur Analyse wurde die Software Sequencing Analysis Version 3.2 (Mac®) benutzt.

Die Sequenzierung wurde gemeinsam mit Dr. Krüger von der AGOWA GmbH, Berlin, durchgeführt.

2.2.3 Methode 3 – Exon-Intron Sequenzierung (EIS)

2.2.3.1 DNA – EIS

Genomische DNA wurde mit Hilfe des NucleoSpinBlood QuickPure Kit (Macherey und Nagel) aus 0.2ml EDTA-antikoaguliertem Blut extrahiert.

2.2.3.2 PCR – EIS

Das HMBS-Gen wurde in drei Fragmente unterteilt (Exon 1, Exons 2-9 und Exons 10-15) und amplifiziert. Hierzu wurden Primer verwendet, die zwischen 39bp bis 55bp intronischer Sequenz in die Genanalyse miteinbezogen. Die PCR-Primer sind aus der **Tabelle 10** zu ersehen.

Tabelle 10: Primer-Sequenzen für Methode 3 (eigene Tabelle)

Exons	5'-Sequenz	Fragmentgröße in bp
1 (plus 54 bp 5' und 46 bp 3')	Cca cgt gtc ccc ggt act cgc c Ctc gtc cag aag ccc aaa gtg tg	176
2-9 (plus 39 bp 5' und 55 bp 3')	Ccc act gac aac tgc ctt ggt c Ctc act gcc tct gtc gtc gg	2375
10-15 (plus 51 bp 5' und 41 bp 3')	Gca ega ggc ccc aga ttg cc Ctg gac agc agc aac cca ggc	1962

Für die Amplifikationsreaktion wurden Komponenten des Expand High Fidelity PCR Systems (Roche®) verwendet:

1.5mM MgCl₂, 0.3µM Primer und 200µM jedes dNTP.

Von der DNA-Probe wurden 200-300ng eingesetzt. Ausgeführt wurde die PCR mit einer anfänglichen Denaturierung bei 94°C für 2min, es folgten

10 Zyklen von 30sec lang 94°C, 30sec 62°C und 2min 30sec 72°C, gefolgt von

20 Zyklen von 30sec 94°C, 30sec 62°C und 2min 30sec 72°C, hierbei mit einem Zuwachs von jeweils 5 sec für die Elongationszeit pro Zyklus.

Vor dem Ende wurden die Proben für 7min bei 72°C gehalten.

2.2.3.3 Sequenzierung – EIS

Doppelsträngige PCR-Produkte wurden mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Roche®) aufgereinigt, bevor sie am automatisierten ABI 310 Sequenzierer® sequenziert wurden. Als Probe wurden 1-5µl des PCR-Produktes und ein neues Set an Primern benutzt (Tabelle 11).

Tabelle 11: Sequenzierungsprimer für Methode 3 (eigene Tabelle)

Exons	Primer	5'-Sequenz
1	sense	CCACGTGTCCCCGGTACTCGCC
	antisense	CTCGTCCAGAAGCCCAAAGTGTG
2+3	sense	CCCCTGACAACCTGCCTTGGTC
	antisense	GAGTCCCCCAATTTGTGATGC
4	sense	AAAGAGTCTGAGCCGTGGCTGG
	antisense	AGAGAGTCAATCAATCAGGTGC
6	sense	CTCTTCTTTCCTTCCCTGAAGGG
	antisense	CAAGAGACCTAGCATACTAGGG
7	sense	GTAGAGGCAGGGGTGGGTGG
	antisense	GCCTACCCCTGCCAAGCCC
8+9	sense	ATCTCTTCCCTCATTCTGTGC
	antisense	GGCTGCTGTCTCCGTCCTC
10	sense	GCACGAGGCCCCAGATTGCC
	sense	CAGATTGCCCGACACTGTGG
	antisense	AAGGAGATGCAGATGAGCTGG
11+12	sense	CTGCCAGGTGCTTTTAGACACC
	antisense	TTCCCAGCTCTCCAAGTCCCC
13-15	sense	GGTGTTAAGAGCCCTTGCAGC
	antisense	CTGGACAGCAGCAACCCAGGC

Diese Methode wurde in Kooperation mit Dr. T. Haverkamp aus der Laboratoriumsmedizin Dortmund, Dr. Eberhard und Partner, durchgeführt (Von Brasch *et al.*, 2004).