

2 Material und Methoden

2.1 Probanden

Es wurde DNA von insgesamt 192 Probanden auf Vorliegen einer Mutation in den 11 Exons des Melusin mittels SSCP-Analyse bei Raumtemperatur und bei 4 °C untersucht. Die Probanden sind sämtlich an einer DCM bzw. HCM erkrankte Patienten des Deutschen Herzzentrum Berlin (DHZB).

Vor DNA-Aufarbeitung aus dem Blut der Patienten lag schriftlich das Einverständnis der Betroffenen vor.

Es wurden insgesamt 106 miteinander nicht verwandte Patienten mit der gesicherten Diagnose einer Hypertrophischen Kardiomyopathie (s. 1.1.4) untersucht. Bei der Hälfte der Patienten (n=52) liegt eine Obstruktion der linksventrikulären Ausflussbahn vor. Es ist jeweils keine Ätiologie der Herzerkrankung bekannt.

Bei 46 dieser Patienten liegt eine positive Familienanamnese vor, bei 12 eine sicher leere Familienanamnese. Im Durchschnitt betrug das Alter bei der Erstdiagnose 38,9 Jahre (n=69).

Alter (bei der echokardiografischen Untersuchung) (n=106)	53 Jahre \pm 1,35
männl. Geschlecht	61 %
BMI (n=99)	27,3 kg/m ² \pm 0,42
LVEDD (n=103)	46,0 mm \pm 0,73
IVS (n=102)	18,1 mm \pm 0,47
Fraktionelle Verkürzung (n=89)	37,7 % \pm 1,04
Arterielle Hypertonie (n=98)	37 %
Hyperlipoproteinämie (n=106)	32 %
Diabetes mellitus (n=106)	7,6 % (2 % gestörte Glucosetoleranz)
Raucheranamnese (n=66)	47 %

Tab. 2.1: Dargestellt sind klinische und echokardiografische Parameter von Patienten der HCM-Gruppe, angegeben sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM. Die unterschiedlichen Anzahlen n resultieren aus den verzeichneten Angaben in den Krankenakten der Patienten.

An einer primären DCM erkrankte und nicht miteinander verwandte Patienten wurden insgesamt 85 untersucht.

Alter (bei der echokardiografischen Untersuchung) (n=85)	50 Jahre \pm 1,0
männl. Geschlecht	77,6 %
BMI (n=81)	26,3 kg/m ² \pm 0,41
LVEF (n=79)	24,8 % \pm 0,66
LVEDD (n=85)	69,9 mm \pm 1,0

Tab. 2.2: Dargestellt sind klinische und echokardiografische Parameter von Patienten der DCM-Gruppe, angegeben sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM. Die unterschiedlichen Anzahlen n resultieren aus den verzeichneten Angaben in den Krankenakten der Patienten.

Eine Patientin zeigte im Alter von 14 Jahren eine HCM. An dieser Diagnose konnte im Verlauf nicht festgehalten werden, da sich eine DCM entwickelte, diese wurde im Alter von 39 Jahren diagnostiziert. An kardiovaskulären Risikofaktoren liegen bei der Patientin ein Nikotinabusus und eine Hyperlipoproteinämie vor. Ansonsten weder arterieller Hypertonus noch Diabetes mellitus oder Adipositas (BMI von 20,2). Die Familienanamnese ist leer.

Der LVEDD betrug im Alter von 39 Jahren 61 mm, die Fraktionelle Verkürzung 21 %.

2.2 Chemikalien

	Hersteller
100 bp DNA Leiter	Invitrogen
100 mM dATP- Lösung	Invitrogen
100 mM dCTP- Lösung	Invitrogen
100 mM dGTP- Lösung	Invitrogen
100 mM dTTP- Lösung	Invitrogen
2-Propanol (Isopropanol)	Roth
50 mM Magnesiumchlorid	Rapidozym GmbH
Acrylamidlösung 30 %	Roth
Agarose	Biozym
Ammoniumchlorid	Merck
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck
Aqua purificata	Roth
Bisacrylamidlösung 2 %	Roth
Borsäure	Roth
Bromphenolblau	Sigma

Chloroform	Merck
EDTA	Roth
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Sigma
Ficoll 400	Amersham Pharmacia Biotech AB, Schweden
Formaldehydlösung 37 %	J.T.Baker
Formamid	Amresco
GenTherm DNA-Polymerase (5000 U/ml)	Rapidozym
Kaliumhydrogencarbonat	Merck
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumperchlorat	Sigma
Reaction buffer (PCR)	Rapidozym
Salpetersäure	Roth
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Merck
Silbernitrat	Roth
TEMED p.a.	Roth
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Merck
Tris-HCl	Roth
Trisriplex III	Merck
Xylencyanol	Sigma

Tab. 2.3: Übersicht verwendeter Chemikalien und Bezugsquellen

2.3 Puffer und Lösungen

- **Reaktionspuffer DNA**

160 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 670 mM Tris-HCl (pH 8,8 bei 25 °C), 15 mM MgCl_2 , 0,1 % Tween20

- **10× TBE**

121,1 g TrisBase

61,8 g Borsäure

7,4 g TrisriplexIII

ad 1 l Aqua destillata

- **Agarosegel**

- 0,8 mg Agarose
 - 40 ml 0,5×TBE
 - 1,5 µl Ethidiumbromid

- **Agarose-Auftragspuffer**

- 20 ml 5×TBE
 - 40 ml 20 % Ficoll 400
 - 10 ml 0,1 % Bromphenolblau
 - 30 ml Aqua destillata

- **Gelstocklösung für 10 % Polyacrylamidgele**

- 327 ml 30 % Acrylamid
 - 100 ml 2 % Bisacrylamid
 - 50 ml 10× TBE
 - 523 ml Aqua destillata
 - 1 ml TEMED

- **Polyacrylamidgel**

- pro Gel 15 ml Gelstocklösung gemischt mit 300 µl Ammoniumperoxodisulfat-Lösung 10 %

- **15× SSCP-Loading buffer**

- 100 mg Bromphenolblau
 - 100 mg Xylencyanol
 - 200 µl 0,5 M EDTA
 - 10 ml Formamid
 - für Arbeitspuffer 1:15 mit Formamid verdünnen

- **Frischlysispuffer**

- 155 mM NH₄Cl
 - 10 mM KHCO₃
 - 0,1 mM EDTA

- **Lösung B**

400 mM Tris-HCl

60 mM EDTA

150 mM NaCl

1 % SDS

2.4 Geräte

Gerät	Hersteller
Biofuge primo R	Heraeus
GeneAmp PCR System 9600	Applied Biosystems
Gradienten-Cycler	Eppendorf
Elektrophoresis Power Supply PS 3002	Life Technologies
Elektrophoresis Power Supply EPS 200	Pharmacia Biotech
Elektrophoresis Constant Power Supply ECPS 3000/150	Pharmacia Biotech
Mikrowelle Mikromat	AEG
Vortexer REAX 2000	Heidolph
Heizblock Thermomixer 5436	Eppendorf
Schüttler Polymax 1040	Heidolph
Magnetrührer MR3001K	Heidolph
Waage Scout II	Ohaus
Zentrifuge Galaxy Mini	Merck
Kühlschrank	Liebherr
-20°C Tiefkühltruhe	Liebherr
-80°C Tiefkühltruhe	Sanyo
Pipetten	Gilson
Multigel-Long Typ: G47 (SSCP-Kammer)	Biometra
Horizon 58 (Horizontal Gel Electrophoresis System)	Life Technologies
Laborgläser	Schott-Duran
Laborgläser	Brand
Spektrometer SmartSpec3000	Biorad
Labogaz 206	Campinggaz
Sequenzier ABI prism 310	Applied Biosystems
Pipetten	Eppendorf

Tab. 2.4: Übersicht verwendeter Geräte und Bezugsquellen

2.5 Verbrauchsmaterialien

	Hersteller
Verpackungsfolie	Saran
PCR-Tubes und –Deckel	Biozym
Pipettenspitzen	Roth, Biozym
Safeskin Handschuhe	Kimberly-Clark
Handschuhe Touch N Tuff	Ansell
Falcon-Röhrchen	TPP, Schweiz
Eppendorf-Gefäße	Eppendorf
Pasteurpipetten	Roth
Sterile Pipetten	TPP
Microtiterplatten	Becton Dickinson
Abdeckfilm für Microtiterplatten	Excel Scientific

Tab. 2.5: Übersicht verwendeter Verbrauchsmaterialien und Bezugsquellen

2.6 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde 1987 von Mullis eingeführt und ist seitdem zu einer der wichtigsten Standardmethoden der Molekularbiologie geworden. Für diese Arbeit wurde nachstehender Standardansatz verwandt:

2,5 µl PCR-Puffer (10×)

3 µl DNA (20 ng/µl)

1 µl Forward-Primer(10 pmol/µl)

1 µl Reverse-Primer(10 pmol/µl)

0,2 µl *Taq* (*Thermus aquaticus*) – Polymerase (5 U/µl)

4 µl dNTPs (je 1,25 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

0,75 µl MgCl₂ (50 mM)

ad 25 µl Aqua destillata

Die Primer für jedes Exon des Melusins und die zugehörige optimierte Annealing-Temperatur lassen sich Tabelle 3.1 unter dem Unterpunkt PCR-Etablierung entnehmen.

Die PCR wurde nach folgendem Standardprotokoll durchgeführt:

1. 5 min 95 °C initialer Denaturierungsschritt

2. (in 35 Zyklen) 20 s 95 °C Denaturierung
 20 s (s.o.) Primer-Annealing
 20 s 72 °C Primer-Verlängerung

3. 5 min 72 °C terminaler Verlängerungsschritt

Zur Überprüfung ob ein Amplifikat der richtigen Fragmentlänge vorliegt, wurden jeweils 4 µl PCR-Produkt und 2 µl Agarose-Laufpuffer vermischt und auf ein Ethidiumbromid enthaltendes Agarosegel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 30 min bei einer Spannung von 120 V. Auf einem Transluminator konnte nun unter UV-Licht die DNA und ein mit-aufgetragener Längenstandard sichtbar gemacht und mittels einer Dokumentationsanlage der Firma Biometra aufgezeichnet werden.

Zudem wurden nach erfolgreicher Optimierung der PCR-Reaktion alle Amplifikate sequenziert, um sicher zu stellen, dass die gewünschte Sequenz amplifiziert wurde.

2.7 Single Strand Confirmation Polymorphism (SSCP)

Zur Mutationsanalyse wurde die SSCP-Methode verwendet. Bis zu einer Fragmentlänge von 400bp weist dieses Verfahren eine ausgesprochen hohe Sensitivität auf, die durch ein unterschiedliches Laufverhalten von denaturierter DNA selbst nur in einer Base differierende Basenabfolgen im elektrischen Feld erkennen lässt.

Es wurde jede Probe sowohl bei 4 °C als auch bei Raumtemperatur untersucht.

Zum Ablauf des Versuches: Mithilfe eines Glasplattensystems wurden Polyacrylamidgele gegossen und nach Auspolymerisation vertikal an SSCP-Kammern angebracht. In die Kammern wurde außerdem 0,5×TBE als Elektrophoresepuffer verbracht. In die Slots der Gele wurde nun das zuvor mit dem formamidhaltigen Ladepuffer 1:1 vermischte und hernach bei 95 °C in 5 min denaturierte PCR-Produkt, insgesamt ca.10 µl, pipettiert. Die Laufzeit betrug bei 40 V (Raumtemperatur) bzw. 45 V (4 °C) 15-17 Stunden. Anschließend erfolgte die Färbung nach einem Silberfärbungsprotokoll von Budowle *et al.*(1991) wie folgt:

- Fixierung mit 10%igem Ethanol für mindestens 5 min
- pH-Wert-Einstellung mit 1%iger Salpetersäure mindestens 2 min
- Anlagerung von Silberionen an die DNA während des mindestens 30 min dauernden Färbeprozesses mit 0,2%iger Silbernitratlösung
- Entfernung freier und unspezifisch gebundener Silberionen durch dreimaliges kurzes Waschen mit Aqua bidestillata
- Entwicklung mit 3%iger Natriumcarbonatlösung mit einem Zusatz von 100 µl Formaldehyd pro 200 ml Lösung, dabei dreimaliges Austauschen der Lösung, Entwicklung bis zu guter Bandensichtbarkeit
- Fixierung mit 10%iger Essigsäure

Zur Dokumentation wurden die Gele mit einer Digitalkamera von Kodak fotografiert und das Bild ausgedruckt. Die Gele selbst wurden in Saran-Folie verpackt und werden nun gemeinsam mit den Bildern in Dokumentfolien aufbewahrt.

2.8 DNA-Aufarbeitung

Die DNA-Gewinnung aus 10 ml Frischblut erfolgte nach folgendem Protokoll:

- Zugabe von 30 ml Frischlysispuffer und 15 min Lyse auf Eis
- Zentrifugation über 10 min bei 3000 rpm

- Zugabe von 8 ml Lösung B zum entstandenen Leukozytenpellet nach Abgießen des Überstandes, Resuspendieren mittels Vortexer
- Zugabe von 2,7 ml 3,6 M Na-perchlorat, schütteln
- Zugabe von 8 ml Chlorform, schütteln
- Zentrifugation über 5 min bei 3000 rpm
- Zugabe eiskalten Isopropanols zum abpipettierten Überstand (gleiches Volumen)
- Aufwickeln des sichtbaren DNA-Fadens mittels Glaspasteurpipette
- Waschen in 1 ml 70%igem Ethanol
- Lösen in 400 µl TE-Puffer

Nach diesen Arbeitsschritten erfolgte die Messung der erhaltenen DNA-Konzentrationen und die Verdünnung auf die gewünschte Konzentration. Für die PCR wurde im Rahmen dieser Arbeit eine DNA-Konzentration von 20 ng/µl verwendet.

2.9 Sequenzierung

Amplifikate, die im SSCP-Gel ein von den anderen Proben differierendes Bild boten, wurden mittels der Kettenabbruchmethode nach Sanger sequenziert. Das Gerät ABI PRISM 310 der Firma Applied Biosystems wurde dazu verwendet. Die Sequenzierung führte J. Milde, eine Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe, durch.

2.10 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme wurden verwendet, um durch die Mutation entstandene Schnittstellen im PCR-Amplifikat in größeren Patientengruppen spezifisch nachzuweisen. Zum anderen wurde exemplarisch für das Amplifikat jedes Exons ein Restriktionsverdau durchgeführt, der die Amplifikation der richtigen Sequenz im Genom untermauerte.

Das übliche Protokoll sah einen Ansatz von 10 µl vor, in dem sich 7,5 µl PCR-Amplifikat, je-

weils 1 µl des entsprechenden Enzyms und des dazugehörigen Puffers plus 0,5 µl Aqua destillata befanden. Die Enzyme wurden zuvor jeweils so verdünnt, dass 1 U pro Reaktionsansatz verwendet werden konnte. Verdaut wurde bei einer Temperatur von 37 °C über einen Zeitraum von 2 bis 16 Stunden, je nach Enzym.

2.11 PCR Troponin T

Es wurde ein in unserer Arbeitsgruppe schon anderweitig optimiertes Protokoll verwendet (Haase, Doller unpublizierte Daten).

Die Primer für die Amplifikation der 3'UTR – Sequenz des Troponin T waren:

TropT F 5'-GGG AAG GCT AAA GTC-3'

TropT R 5'- TCT CTC TCT CTC TGA AGG-3'

Die PCR wurde mit einer Annealing-Temperatur von 53 °C nach oben beschriebenem Standardprotokoll durchgeführt (s.2.6).

2.12 Statistik

Zur Überprüfung ob sich die untersuchte Population einer idealen Population (d.h. es ist unter anderem Panmixie, keine Selektion, Mutation und Migration gegeben) annähert, wird das Hardy-Weinberg-Gesetz verwendet. Damit kann überprüft werden, ob eine Übereinstimmung zwischen den aus den Allelfrequenzen erwarteten und den tatsächlich beobachteten Genotypenfrequenzen besteht, d.h. ob die beobachteten Ergebnisse im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht liegen.

Hardy-Weinberg-Gesetz: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$

Zur Überprüfung der Nullhypothese in Vierfeldertafeln wird, wenn die erwarteten Zellhäufigkeiten < 5 sind, der exakte Test nach Fisher angewandt. Die Nullhypothese wird dann abgelehnt, wenn die zur Testgröße gehörende Wahrscheinlichkeit P kleiner als die gewählte Irrtumswahrscheinlichkeit α ausfällt.

Fishers exakter Test:
$$P = \frac{(a+b)!(c+d)!(a+c)!(b+d)!}{n!} \sum_i \frac{1}{a_i!b_i!c_i!d_i!}$$

Die Standardabweichung dient als Maß für die Abweichung der Einzelwerte einer Messreihe von ihrem arithmetischen Mittelwert (mw).

Standardabweichung:
$$s = \sqrt{\sum \frac{(x - mw)^2}{n - 1}}$$

Der Standardfehler des Mittelwerts SEM (standard error of the mean) ist ein international verwendetes Maß für die Präzision der Schätzung des Erwartungswertes durch den Mittelwert. Er beschreibt also die Variabilität von Mittelwerten.

$$SEM = s / \sqrt{n}$$