

2 Material und Methoden

2.1 Probanden

Die Study of Health in Pomeriana (SHIP) ist eine epidemiologische Querschnittstudie, die vom Forschungsverbund „Community Medicine“ der Medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald durchgeführt wird. Die Studie erfasst stichprobenartig 4.310 Frauen und Männer im Alter zwischen 20 und 79 Jahren, die in einer 2.024 km² großen Region in Nord- und Ostvorpommern leben. Ziel der Studie ist die Prävalenzschätzung eines breiten Spektrums an Erkrankungen, Risiko- und Gesundheitsfaktoren für eine Region in der früheren DDR (John et al., 2001).

In der Studienregion liegen drei Städte (Stralsund, Greifswald, Anklam) und zwölf Gemeinden mit mehr als 1.500 Einwohnern sowie 84 Dörfer mit weniger als 1.500 Einwohnern. Zunächst wurden aus diesen 99 Ortschaften 32 gezogen. Eine repräsentative Stichprobe von 7.008 Individuen wurde mittels offizieller Daten des Einwohnermeldeamts bestimmt. Die 20- bis 79-Jährigen wurden geschichtet nach Alter und Geschlecht randomisiert. In altersbezogene Fünfjahresschichten eingeteilt ergaben sich je Geschlecht zwölf Altersgruppen mit jeweils 292 Probanden. Es wurden nur Personen eingeschlossen, die zum einen ihren hauptamtlichen Wohnsitz in der Region und zum anderen die deutsche Staatsbürgerschaft besaßen.

Die Datenerhebung fand von Oktober 1997 bis 2001 statt. Unter den 7.008 angeschriebenen Personen waren 741 „neutrale Ausfälle“ (verzogen bzw. verstorben). Von den 6.267 erreichten Personen nahmen 4.310 freiwillig an der Studie teil, dies entsprach einer Responserate von 68,8%. Eine medizinische Untersuchung der Probanden sowie ein gesundheitsbezogenes Interview wurden durchgeführt. Insbesondere Daten zu Hypertonie, Dyslipoproteinämie, Diabetes mellitus und Zigarettenkonsum (mindestens eine Zigarette täglich) fanden als Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen Eingang in diese Arbeit.

2.2 DNA-Isolierung

Die Isolierung der DNA führten Mitarbeiter des Instituts für Humangenetik der Medizinischen Fakultät der Universität Greifswald durch. Die genomische DNA wurde aus den Blutproben der Probanden, aus den kernhaltigen Leukozyten, mittels Standard Chloroform/Phenol-Extraktion gewonnen und in Tris/EDTA-Puffer gelöst.

2.3 Genotypisierung

Die Genotypisierung der DNA-Proben erlaubte es, Aussagen über Vorliegen eines Wildtyps oder einer hetero- oder homozygoten Variante zu treffen, indem eine Allediskriminierung vorgenommen wurde. Dazu wurden zwei Methoden angewandt, denen gemeinsam als Anfangsschritt eine Polymerasekettenreaktion zugrunde lag. Im Anschluss folgte eine Restriktionsenzymanalyse oder ein TaqMan™-Assay.

2.3.1. Polymerasekettenreaktion (PCR) und Restriktionsenzymanalyse

Die PCR (polymerase chain reaction) ist ein zyklisches Verfahren zur Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Segments (Amplikon). Dazu wird der DNA-Doppelstrang auf 93-100°C erhitzt, so dass sich die beiden Stränge voneinander lösen. Bei Abkühlung auf 37-65°C binden an die denaturierte DNA-Matrize sequenzspezifische Primer (Annealing). Durch die enzymatische Aktivität einer hitzestabilen Taq-Polymerase werden bei 72°C mit dNTPs (Nukleotidbausteine) vom Primer als Starthilfe ausgehend komplementäre DNA-Abschnitte synthetisiert (Elongation). Das Vorhandensein eines jeweiligen Vorwärts- und Rückwärtsprimers bewirkt das Eingrenzen des neu gebildeten DNA-Abschnitts auf eine bestimmte, mehrere Basenpaare umfassende Länge.

Durch zyklische Wiederholung von Erwärmen und Abkühlen im Thermocycler verdoppelt sich im Idealfall pro Runde die Anzahl an Amplikons, die mit jedem Zyklus exponentiell ansteigt.

Zur Erfassung des G894T-Polymorphismus' im Exon 7 des eNOS-Gens wurde ein 248 Basenpaare (bp) umfassendes Fragment amplifiziert, das die polymorphe Sequenz enthielt. In Tabelle 2.1 sind die verwendeten Primer aufgeführt.

Tabelle 2.1: Sequenzen des Vorwärts- und Rückwärtsprimers zur Amplifizierung der polymorphen G894T-Sequenz im Exon 7 des eNOS-Gens; NOS 7 bindet auf Intron 6 160 bis 138 Positionen vor dem G894T-Polymorphismus, NOS 8 in komplementärer 5'-Richtung auf Intron 7 88 bis 64 Positionen vor dem G894T-Polymorphismus

Primer	Fragmentlänge (bp)	Sequenz
NOS 7	248	5'-AAG GCA GGA GAC AGT GGA TGG A-3'
NOS 8		5'-CCC AGT CAA TCC CTT TGG TGC TCA-3'

Zur Durchführung der PCR wurde je Probe ein 25 µl großer Reaktionsansatz bereitgestellt und diesem jeweils 1 µl der zu untersuchenden DNA zugefügt. Tabelle 2.2 zeigt die Zusammensetzung.

Tabelle 2.2: Zusammensetzung eines 25 µl-PCR-Ansatzes zur Vervielfältigung der polymorphen G894T-Sequenz

Menge	Bestandteil
2,5 µl	Taq-Puffer
2,5 µl	dNTP (2mM)
0,5 µl	Primer NOS-7 (10nmol)
0,5 µl	Primer NOS-8 (10nmol)
0,1 µl	Taq-Polymerase
2,0 µl	MgCl ₂ (2,0 mM)
16,9 µl	H ₂ O (deionisiert)

Der so erhaltene Reaktionsansatz wurde unter folgenden Cyclo-Bedingungen bearbeitet: 2 min bei 94°C (Auftrennung des DNA-Doppelstrangs, Denaturierung), 35 Zyklen mit je 30 sec bei 94°C (Denaturierung), 30 sec bei 60°C (Annealing), 30 sec bei 72°C (Elongation), abschließend 7 min bei 72°C (Abschließen der Elongation).

Bei anschließender Elektrophorese ließ der Vergleich mit dem ebenfalls aufgetragenen Marker V erkennen, dass das gewonnene PCR-Produkt wie gewünscht 248 bp umfasste. Daraufhin wurde zur Genotypisierung des G894T-Polymorphismus' im Exon 7 nach der in Tabelle 2.3 abgebildeten Zusammensetzung mit dem Restriktionsenzym BanII gearbeitet.

Tabelle 2.3: Zusammensetzung eines 25 µl-Ansatzes zum BanII-Verdau

Menge	Bestandteil
15 µl	PCR-Produkt
6,5 µl	H ₂ O
2,5 µl	NEBuffer 4
1 µl	BanII

Der Ansatz wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Das Restriktionsenzym BanII schnitt das 248 bp umfassende PCR-Produkt bei Vorliegen des Wildtyps der eNOS (G894G) in zwei Fragmente, mit einer jeweiligen Länge von 163 bp bzw. 85 bp. Die homozygote Variante der eNOS (T894T) hingegen wurde nicht gespalten, es blieb bei der Fragmentlänge von 248 bp des PCR-Produkts. Abbildung 2.1 zeigt die Photodokumentation der Elektrophorese nach BanII-Verdau.

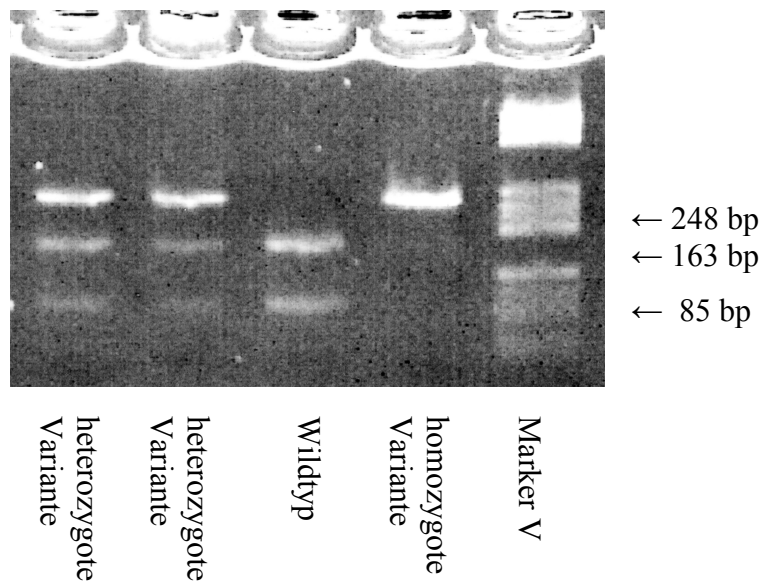


Abbildung 2.1: Photodokumentation der Elektrophorese nach PCR und BanII-Verdau. Das 248 bp umfassende PCR-Produkt wird beim Wildtyp (G894G) in zwei Fragmente gespalten, mit einer Fragmentlänge von 163 bp und 85 bp. Bei homozygoter Variante (T894T) findet keine Spaltung statt, so dass das 248 bp große PCR-Produkt seine Länge behält. Bei heterozygoter Variante (G894T) wird das G-Allel in zwei Fragmente gespalten, das T-Allel hingegen bleibt vom Restriktionsenzym unberührt. So erscheinen bei der Elektrophorese Banden bei 163 bp und 85 bp und zusätzlich bei 248 bp als Ausdruck der Heterozygotie.

Auf diese Weise konnte mittels PCR und Restriktionsenzymanalyse die Alleldiskriminierung in Wildtyp, hetero- und homozygote Variante vorgenommen werden. Die Methode war arbeits- und zeitaufwendig, da PCR, Restriktionsenzymanalyse und Auswertung jeweils in einzelnen Arbeitsschritten durchgeführt werden mussten.

2.3.2 Alleldiskriminierung mittels TaqMan™-Verfahrens

Auch diesem Verfahren liegt eine PCR zugrunde. Ranade et al. (2001) stellten eine Methode vor, bei der sie bei 1.699 Probanden die Genotypisierung des G894T-Polymorphismus' mittels TaqMan™-Verfahrens vornahm. Anstelle der Alleldiskriminierung mit einem Restriktionsenzym findet diese beim TaqMan™-Assay durch zwei fluorogene Sonden statt. Diese bestehen aus Oligonukleotiden, die an ihrem jeweiligen 5'-Ende einen Reporter-Farbstoff (Fluoreszein-Derivat) und am 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat) tragen.

Bei der intakten Sonde verhindert der Quencher, dass der Reporter bei einer spezifischen zur Fluoreszenz anregenden Wellenlänge von 488 nm fluoresziert. Dies geschieht durch den Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET), der durch die räumliche Nähe von Reporter und Quencher bedingt ist. Ist die Sonde nicht mehr intakt und somit der FRET durch Aufhebung der räumlichen Nähe von Quencher und Reporter unterbrochen, so sendet der Reporter ein fluoreszierendes Signal.

Wenn nun ein PCR-Zyklus beginnt und die doppelsträngige DNA denaturiert, binden komplementär die Sonden an die denaturierte DNA-Matrize. Die Sonden sind in ihrer Struktur so gewählt, dass die eine bei der komplementären Basenpaarung spezifisch auf das dem Wildtyp entsprechende DNA-Segment passt, und die andere der homozygoten Variante entspricht. Hiermit wird erreicht, dass je nach vorliegendem Alleltyp nur jeweils eine Sonde vollständig hybridisiert (Match), die andere wegen einer Basenfehlpaarung nicht (Mismatch). Die Base, welche die Fehlpaarung von Matrize und Sonde bedingt, entspricht der Variante.

Schreitet der PCR-Zyklus fort, so findet von den Primern als Starthilfe ausgehend durch die Taq-Polymerase die Elongation der Zielsequenz statt. Trifft nun die Polymerase auf eine komplett hybridisierende Sonde, dann wird die Sonde durch die

5'→3'-Exonucleaseaktivität der Taq-Polymerase hydrolytisch vom DNA-Strang abgespalten. Durch den Spaltungsprozess geht die räumliche Nähe von Reporter und Quencher verloren, der FRET wird aufgehoben und ein Signal wird ausgesendet.

Beinhaltet die Sonde bei Anlagerung an den DNA-Strang eine Basenfehlpaarung, ist die Bindung thermodynamisch instabil. Beim Aufeinandertreffen von Sonde und Taq-Polymerase erfolgt vor Aktivierung der enzymatischen Exonucleaseaktivität eine frühzeitige Abspaltung der intakten Sonde. Der FRET bleibt erhalten, und es wird kein Signal erzeugt. Signal der Sonde 1 (FAM-Farbstoff) entspricht dem Wildtyp, Signal der Sonde 2 (VIC-Farbstoff) der homozygoten Variante. Signal beider Sonden wird von einer heterozygoten Variante hervorgerufen, da beide Alleltypen in derselben DNA-Probe vorliegen.

Mit jedem PCR-Zyklus steigt die Zahl der Amplikons annähernd exponentiell an, ebenso auch die Zahl der hydrolysierten bzw. Signal aussendenden Sonden. Das sich verstärkende Fluoreszenzsignal wird mit einem Sequence Detector für jeden Zyklus im geschlossenen Reaktionsgefäß gemessen. In Abbildung 2.2 ist das Prinzip der Alleldiskriminierung mit fluorogenen Sonden dargestellt.

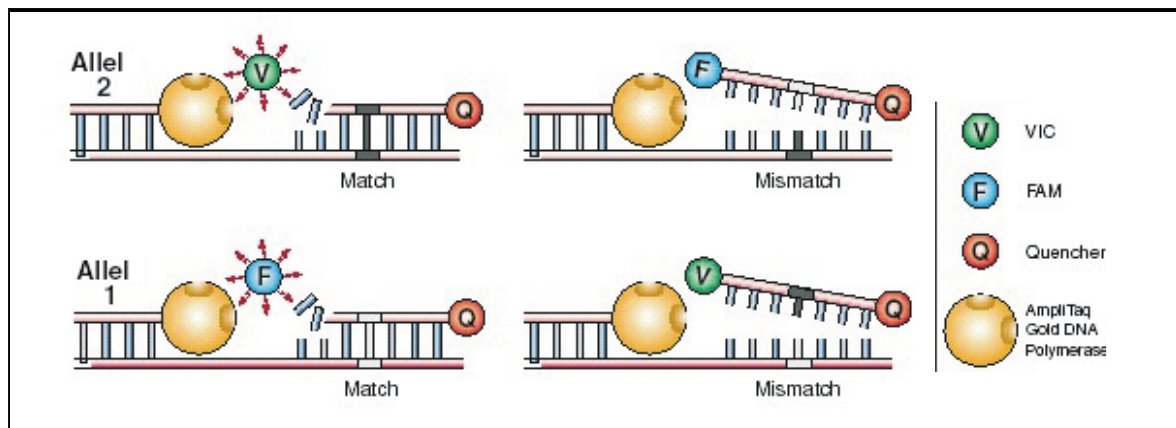


Abbildung 2.2: Alleldiskriminierung mittels TaqManTM-Verfahrens (modifiziert nach Applied Biosystems). Zu Beginn des PCR-Zyklus bindet die Sonde an die denaturierte DNA-Matrize, je nach vorliegendem Alleltyp mit bzw. ohne eine Basenfehlpaarung (Match/Mismatch). Während der Elongationsphase wird im Falle der passenden Basenpaarung die Sonde durch die Taq-Polymerase in einzelne Nukleotidbausteine gespalten, der FRET wird aufgehoben und ein fluoreszierendes Signal ausgesendet. Im Falle der Basenfehlpaarung löst sich die intakte Sonde, und es kommt nicht zur Signalabgabe.

2.3.3 TaqManTM-Reaktionsansatz

Ein TaqManTM-PCR-Ansatz umfasste ein Volumen von 20 μl . Die Titration von Primern und Sonden ergab optimale Ergebnisse bei einer Konzentration von 600 nM bzw. 200 nM mit den in Tabelle 2.4 aufgeführten Reagenzien.

Tabelle 2.4: Reaktionsansatz für eine PCR mittels TaqManTM-Verfahrens

Menge	Bestandteil
10 μl	TaqMan TM -Universal Master Mix
2,4 μl	Vorwärts-Primer (600 nM)
2,4 μl	Rückwärts-Primer (600 nM)
0,8 μl	FAM-Sonde (200 nM)
0,8 μl	VIC-Sonde (200 nM)
3,6 μl	H ₂ O

Der TaqManTM-Universal Master Mix wurde von der Firma Applied Biosystems bezogen. Er enthielt neben Pufferkomponenten, Coenzymen wie MgCl₂, dNTPs, dUTP und dem passiven Referenzfarbstoff ROX eine modifizierte Form der rekombinanten AmpliTaq-DNA-Polymerase, AmpliTaq-Gold. Dieses Enzym war bei Lieferung inaktiv und wurde erst durch neun- bis zwölfminütige Inkubation bei 95°C aktiviert. Diese Eigenschaft barg den Vorteil, dass ein kompletter Reaktionsansatz bei Raumtemperatur vorpipettiert und bei 4°C über mehrere Tage im Kühlschrank gelagert werden konnte, ohne dass eine Primer-Dimer-Bildung stattfand. Bei hoher Zahl an Probendurchläufen wurden so die Arbeitsabläufe erleichtert.

Desweiteren besaß die AmpliTaq-Gold-DNA-Polymerase bereits bei Temperaturen über 55°C eine signifikante Aktivität, so dass die Annealing- und Elongationsphase eines PCR-Zyklus' bei einer Temperatur zwischen 55°C und 72°C zu einer einzigen Phase zusammengefasst werden konnte. Im TaqManTM-Universal Master Mix war außerdem eine Uracil-N-Glykosylase (UNG) enthalten. Sie schützte den PCR-Ansatz vor Kontaminationen, indem sie Carry-over-Moleküle verdaute. Um diese Reaktion zu

katalysieren, wurde vor Beginn der eigentlichen PCR eine zweiminütige Inkubation bei 50°C und anschließend eine zehnminütige Inkubation bei 95°C durchgeführt, um sowohl die UNG als auch die durch sie entstandenen Moleküle zu inaktivieren.

2.3.4 Primer- und Sondendesign

Primer und Sonden wurden dem G894T-Polymorphismus des eNOS-Gens entsprechend mit Hilfe der Primer Express Software von der Firma Applied Biosystems vorgeschlagen. In Abbildung 2.3 ist die den Polymorphismus tragende Basenfolge des eNOS-Gens mit den entsprechenden Sequenzen der entwickelten Primer und Sonden dargestellt.

```

AGACCCAGCC AATGAGGGAC CCTGGAGATG AAGGCAGGAG ACAGTGGATG GAGGGGTCCC
TGAGGAGGGC ATGAGGCTCA GCCCCAGAAC CCCCTCTGGC CCACTCCCCA CAGCTCTGCA
824 TTCAGCACGG CTGGACCCCA GGAAACGGTC GCTTCGACGT GCTGCCCTG CTGCTGCAGG
884 CCCCAGATGA GCCCCAGAA CTCTTCCTTC TGCCCCCGA GCTGGTCCTT GAGGTGCCCC
944 TGGAGCACCC CACGTGAGCA CCAAAGGGAT TGA CTGGGTG GGATGGAGGG GGCCATCCCT
GAGCCTCTCA AGAAGGGCCT GCAAGGGGGT GCTGATCCCA CACCCCAACA CCCCAGGCT
GGAGTGGTTT GCAGCCCTGG GCCTGCGCTG GTACGCCCTC CCGGCAGTGT CCAACATGCT

```

Abbildung 2.3: Ausschnitt aus dem eNOS-Gen, der das 140 bp umfassende Exon 7 enthält (modifiziert nach Nadaud et al., 1994)

Intron: grau; Exon: schwarz und nummeriert; Basenaustausch: G → T (gekennzeichnete Stelle an Position 894 der translatierten DNA); Vorwärts-Primer: 5'-GGC TGG ACC CCA GGA AAC-3'; Rückwärts-Primer: 5'-CCA CCC AGT CAA TCC CTT TG-3' (komplementäre 5'-Richtung); FAM-Sonde: FAM-CAG ATG AGC CCC CAG A-NFQ; VIC-Sonde: VIC-CCA GAT GAT CCC CCA GA-NFQ

Das während der PCR gebildete DNA-Fragment umfasste 139 Basenpaare.

Bei den Sonden war der Reporterfarbstoff (FAM bzw. VIC) kovalent ans 5'-Ende geknüpft. Der Quencherfarbstoff TAMRA stand diesem am 3'-Ende gegenüber, gebunden an ein „Left-Arm-modified-Nucleotid“ (LAN). Die chemische Phosphorylierung am 3'-OH-Ende verhinderte eine Elongation am 3'-Ende während der PCR. Den chemischen Aufbau einer Sonde zeigt Abbildung 2.4.

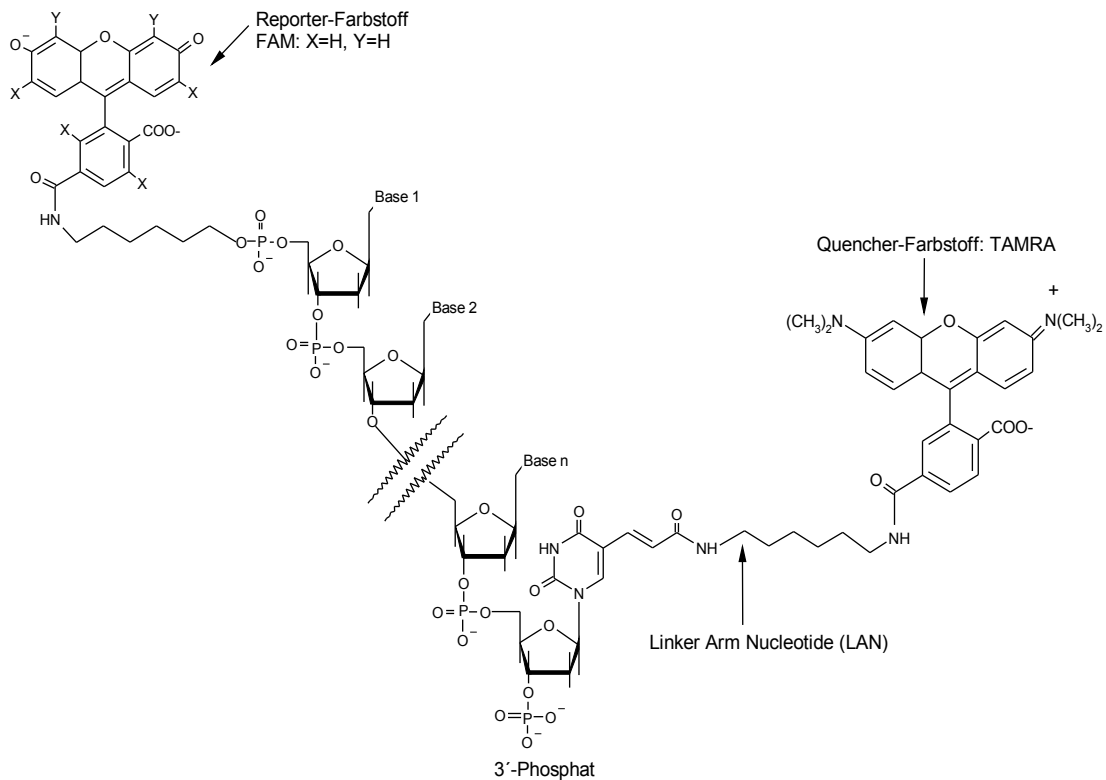


Abbildung 2.4: chemischer Aufbau einer Sonde mit Reporterfarbstoff FAM am 5'-Ende, dem über ein LAN an die Sonde gebundenen Quencherfarbstoff TAMRA am 3'-Ende und dem blockierenden 3'-OH-Phosphat (modifiziert nach Applied Biosystems)

In die verwendeten Sonden war ein „Minor Groove Binder“ zwischen dem 3'-Ende der Sonde und dem Quencherfarbstoff eingebaut. Dieses sichelförmige Molekül fügte sich bei Hybridisierung von Sonde und DNA-Matrize in die kleine Furche der DNA-Doppelhelix ein und stabilisierte die Bindung. Im Falle einer Basenfehlpaarung trat dieser Stabilisierungseffekt nicht ein. Die Anwendung von MGB-Sonden erleichterte somit die Differenzierung von „Match“ bzw. „Mismatch“ und ermöglichte es, die Länge der Sonden auf 13 bis 18 Nukleotidbausteine (früher 15 bis 40) zu reduzieren. Das Sondendesign wurde zusätzlich verbessert durch Einsatz eines nicht fluoreszierenden Quenchers (NFQ) anstelle des TAMRA-Farbstoffs. Durch die nicht vorhandene Eigenfluoreszenz des Quenchers traten die allelabhängigen Fluoreszenzsignale der Sonden umso deutlicher hervor (s. Abb. 2.5).

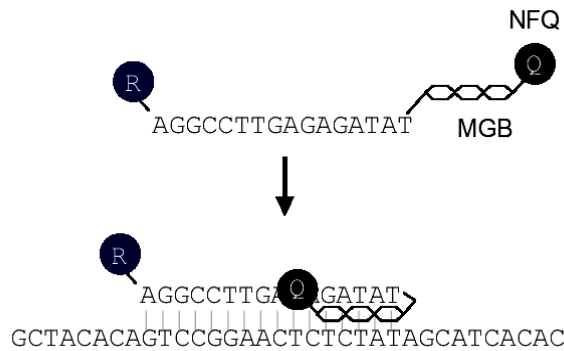


Abbildung 2.5: Schematischer Aufbau einer TaqManTM-MGB-Sonde vor und nach Hybridisierung an die DNA-Matrize mit R: Reporter und NFQ: Nicht Fluoreszierender Quencher (modifiziert nach Applied Biosystems)

2.3.5 Ablauf einer TaqManTM-PCR

Tabelle 2.5 zeigt den Ablauf des PCR-Programms zur Alleldiskriminierung. Die Schritte drei und vier entsprechen dabei einem PCR-Zyklus, der 40 Mal wiederholt wurde. Durch die besonderen Eigenschaften der AmpliTaq-Gold-DNA-Polymerase (s. oben) konnte die PCR bei nur zwei verschiedenen Temperaturniveaus stattfinden.

Tabelle 2.5: Ablauf des PCR-Programms zur TaqManTM-Alleldiskriminierung; 40 Zyklen einer 2-Schritt-PCR (entsprechend den Schritten 3 und 4) wurden durchgeführt

Schritt	Bezeichnung	Temperatur	Dauer	Funktion
1	Hold	50°C	2 min	Aktivierung der Uracil-N-Glykosylase (UNG)
2	Hold	95°C	10 min	Inaktivierung der UNG Denaturierung der Carry-over-Moleküle und Aktivierung der AmpliTaq-Gold-Polymerase
3	Denaturierung	92°C	15 sec	Aufschmelzen der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge
4	Annealing/ Elongation	60°C	1 min	Primer- und Sondenanlagerung und Synthese der Zielsequenz
5	Cooling	4°C	∞	

2.3.6 Datenanalyse

Für einen Probendurchlauf wurden Mikrotiterplatten mit 96 Löchern („Wells“) benutzt. Unter Einsatz des ABI Prism™ 7700 Sequence Detection Systems konnte in Echtzeit von jedem der 96 Reaktionsgefäße das sich im Laufe der PCR ändernde Fluoreszenzsignal gemessen und als Kurvenverlauf aufgezeichnet werden.

Dem Reaktionsansatz war als ein Bestandteil des TaqMan™-Universal Master Mix der passive Fluoreszenzfarbstoff ROX beigemischt. Er glied störende Fluoreszenzschwankungen aus und ging folgendermaßen in die Signalberechnung mit ein:

$$\text{Normalisiertes Reportersignal } R_n = \frac{\text{Emissionsintensität des Reporterfarbstoffs}}{\text{Emissionsintensität des Referenzfarbstoffs}}$$

Während der ersten PCR-Zyklen herrschte ein Grundrauschen (Baseline) als Ausdruck der noch schwachen Signalgebung vor. Diesem wurde durch Ermittlung des ΔR_n -Werts Rechnung getragen, indem das Hintergrundsignal vom jeweilig vorliegenden R_n -Wert abgezogen wurde.

Der Treshold-Cycle C_T entsprach der Zyklenzahl, bei der das Fluoreszenzsignal erstmals über dem Grundrauschen lag. Abbildung 2.6 zeigt beispielhaft für den Alleltyp 1 des Wildtyps, wie sich in ihrem Fluoreszenzsignal die FAM- bzw. VIC-Sonden verhielten.

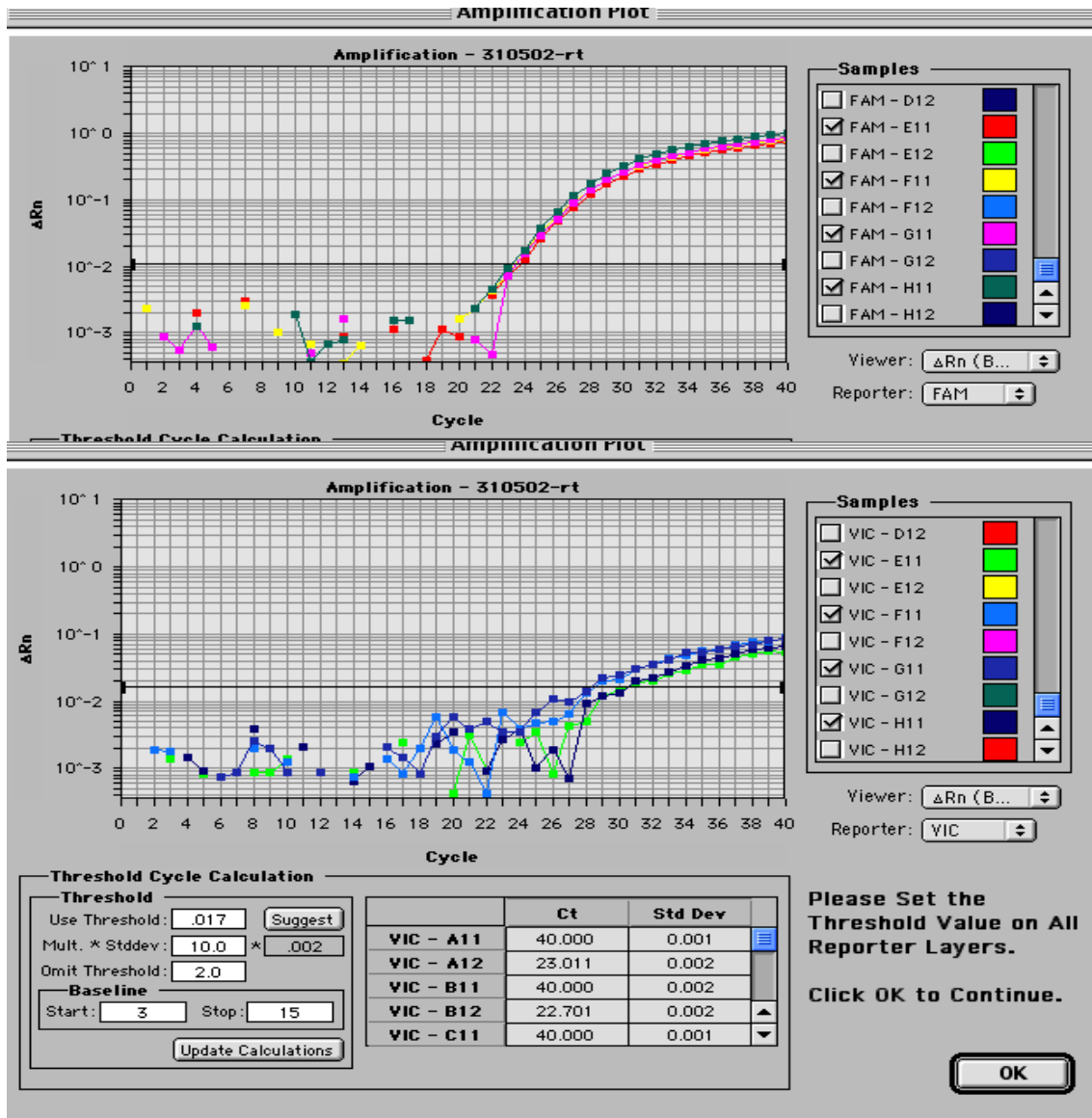
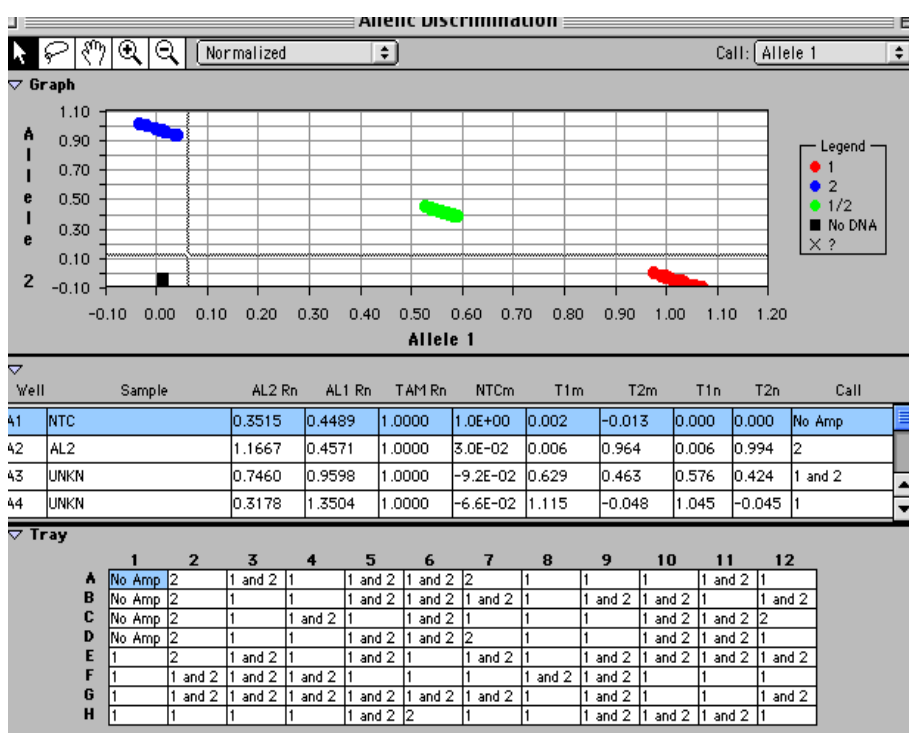


Abbildung 2.6: Signalaufzeichnung während einer Real-Time PCR der FAM-Sonde (oben) und der VIC-Sonde (unten) bei Vorliegen des Wildtyps, der dem Alleltyp 1 entspricht. Auf der Ordinate sind die ΔR_n -Werte, auf der Abszisse die Zahl der Zyklen aufgetragen. Zu sehen ist ein Ansteigen des FAM-Signals über den Treshhold-Cycle C_T ab dem 24. Zyklus auf einen ΔR_n -Wert von 10^0 am Ende des 40. Zyklus', wohingegen das VIC-Signal erst ab dem 29. Zyklus C_T übersteigt und $\Delta R_n < 10^{-1}$ nicht überschreitet.

Für einen Probendurchlauf wurden in jedes Reaktionsgefäß (well) einer 96 well-Platte 20 μ l Reaktionsansatz gegeben. Dabei wurde folgende Reihenfolge eingehalten: Vier wells (Reihe 1 A bis D) wurden mit nicht DNA-haltigen Leerproben bestückt. Vier weitere wells (Reihe 1 E bis H) enthielten je 20 μ l Reaktionsansatz mit DNA-Proben des zuvor mittels PCR/Restriktionsenzym bestimmten Wildtyps (Alleltyp 1), vier weitere (Reihe 2 A bis D) enthielten die homozygote Variante (Alleltyp 2). Durch diese

definierten internen Kontrollen konnte der Prozess des sogenannten Autocallings von der TaqMan™-Software durchgeführt werden, indem bei den unbekannt DNA-Proben die gemessenen Fluoreszenzintensitätsverhältnisse der beiden Sondenfarbstoffe den definierten Genotypen zugeordnet wurden. Weitere vier wells (Reihe 2 E bis H) dienten der Analyse bekannter DNA-Proben, darunter auch heterozygoten Genotypen, um sicherzustellen, dass die Zuordnung korrekt stattgefunden hatte.

Somit blieben von einer 96 well Platte 80 Positionen, die der Alleldiskriminierung unbekannter DNA-Proben der Probanden vorbehalten waren (Reihen 3 – 12).



Zuordnung für Alleltyp 1

Graphische Darstellung der Ergebnisse

Aufzeichnung der gemessenen Parameter

Ergebnistabelle der vorliegenden Genotypen

Abbildung 2.7: Fenster der Alleldiskriminierung mit TaqMan™-Software

Bei der graphischen Ergebnisdarstellung für den Alleltyp 1 (s. Abb. 2.7) waren auf der Ordinate die ΔR_n -Werte aufgezeichnet, die bei Messung des VIC-Signals erhalten

wurden. Auf der Abszisse waren die ΔR_n -Werte der FAM-Sonde dargestellt. Ein starkes VIC-Signal sendete der Alleltyp 2, bei gleichzeitig geringer bis gar keiner Signalintensität der FAM-Sonde. Dies entsprach der blauen Markierung. Alleltyp 1 mit intensivem FAM- und entsprechend niedrigem VIC-Signal fand seinen Ausdruck in der roten Markierung.

Die heterozygote Variante, bei der gleichermaßen Alleltyp 1 und 2 vorlagen, ging in die Darstellung als grüne Punktwolke ein, beide Sonden sendeten Fluoreszenzsignale.

In der Leerprobe NTC (NonTemplateControl) fand keine DNA-Amplifikation statt, die im Reaktionsansatz enthaltenen Sonden blieben intakt, und es ging kein Signal von ihnen aus – die schwarze Markierung entsprach diesem Umstand.

2.4 Statistische Methoden

2.4.1 Hardy-Weinberg-Gesetz

Sind die Kriterien dieses Gesetzes erfüllt, so besteht ein Gleichgewicht über die Verteilung zweier Allele eines Gens und der entsprechenden Phänotypen in einer Population über Generationen hinweg.

Für die Häufigkeit eines Allels $A = p$ und des anderen Allels $B = q$ gilt nach dem

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

AA = Wildtyp; entspricht p^2

AB = heterozygote Variante; entspricht $2pq$

BB = homozygote Variante; entspricht q^2

2.4.2 Odds Ratio

Die Berechnung der Odds Ratio erfolgt mittels einer Vierfeldertafel. Durch Bildung von Quotenverhältnissen ($a:b / c:d = \text{Odds Ratio}$) wird berechnet, ob ein bestimmtes Merkmal (in dieser Arbeit der eNOS-Polymorphismus) einen Risikofaktor für eine Erkrankung darstellt (s. Tab. 2.6).

Tabelle 2.6: Vierfeldertafel zur Berechnung der Odds Ratio

	Fallgruppe	Kontrollgruppe
Merkmal positiv	a	b
Merkmal negativ	c	d

Eine Odds Ratio von 1 bedeutet, dass das Merkmal keinen Risikofaktor darstellt. Eine Odds Ratio > 1 entspricht einem erhöhten Erkrankungsrisiko (Merkmal entspricht Risikofaktor), eine Odds Ratio < 1 entspricht einem protektiven Effekt des fraglichen Merkmals.

2.4.3 Konfidenzintervall

Das 95% Konfidenzintervall gibt den Wertebereich an, in dem für einen bestimmten Parameter 95% aller Werte einer Stichprobe liegen. In Bezug auf die Odds Ratio bedeutet ein die 1 einschließendes 95% Konfidenzintervall, dass das Merkmal weder einen Risikofaktor darstellt noch einen protektiven Effekt ausübt.

2.4.4 Chi-Quadrat-Test und p-Wert

Mit Hilfe des χ^2 -Tests wird die Hypothese über das Bestehen oder Nichtbestehen (Nullhypothese) eines Zusammenhangs zwischen zwei Merkmalen A und B überprüft. Beobachtete und erwartete Häufigkeiten werden auf Zufälligkeit getestet.

$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{beobachtete Häufigkeit} - \text{erwartete Häufigkeit})^2}{\text{erwartete Häufigkeit}}$$

Aus Tafeln mit Quantilen der χ^2 -Verteilung, Freiheitsgraden und Signifikanzniveau α kann für jeden χ^2 -Wert der dazugehörige p-Wert abgelesen werden. Dieser wird bei Werten $< 0,05$ als statistisch signifikant angesehen.

In dieser Arbeit wurde der χ^2 -Test angewandt, um eine Aussage darüber zu treffen, inwiefern ein signifikanter Zusammenhang zwischen Genotyp und Vorliegen eines Merkmals A bzw. B besteht (beispielsweise Hypertonie ja/nein).

2.4.5 Logistische Regression

Die logistische Regression geht der Frage nach, inwiefern ein Merkmal ein anderes oder mehrere andere bedingt. „Abhängige Variable“ und davon „unabhängige Variable(n)“ werden herausgestellt.

Folgende mathematische Gleichungen liegen zugrunde:

$$\text{Logit}(Y_{1/0}) = \ln \frac{P(Y=1)}{P(Y=0)} \qquad \text{logit} = \log \left[\frac{p}{1-p} \right] = \beta_0 + \beta_1 X$$

Nach der Idee der Odds wird der Wahrscheinlichkeit $P(Y=1)$ die Gegenwahrscheinlichkeit $1-P(Y=1)$ bzw. $P(Y=0)$ gegenübergestellt. Y sei die abhängige und X die unabhängige Variable:

$$\text{Odds}(Y_{1/0}|X) = \exp(\beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_k X_k)$$

Ein Regressionskoeffizient $\exp(\beta_n) > 1$ bedeutet einen positiven Einfluss auf die Odds, einen negativen Einfluss bei $\exp(\beta_n) < 1$.

In dieser Arbeit wurden als abhängige Variablen sowohl Bluthochdruck als auch ein diagnostizierter Herzinfarkt hinsichtlich ihrer Assoziation zu Risikofaktoren einer KHK und eNOS-Genotyp (unabhängige Variablen) betrachtet.

Für die statistischen Berechnungen wurde SPSS-11.0-Software genutzt.