

Entwicklung und Optimierung eines Mikroarray

zur Erfassung der genetischen
Prädisposition von Atherosklerose

Dissertation zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Elisabeth Pfützner-Riehn
geb. in Mainz
Mainz, 2011

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 20.09.2011

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Fragestellung	4
2 Grundlagen	6
2.1 Atherosklerose	6
2.2 Risikofaktoren der Atherosklerose	6
2.3 Zelluläre Mechanismen der Atherosklerose	8
2.4 Atherosklerotisch-assoziierte Gene (Mutations-Chip)	11
2.4.1 Prostaglandinsynthase-1 und 2 (PTGS1 und PTGS2)	12
2.4.2 Endotheliale NO-Synthase (eNOS)	13
2.4.3 Faktor V (F5)	13
2.4.4 5,10-Methylentetrahydrofolsäure-Reduktase (MTHFR)	14
2.4.5 Arachidonat-5-Lipoxygenase-aktivierendes Protein (Alox AP)	15
2.4.6 Cholesterinester-Transferprotein (CETP)	15
2.4.7 Apolipoprotein E (ApoE)	16
2.4.8 Prothrombin (F2)	17
2.4.9 Lymphotoxin- α (LTA)	17
2.4.10 Lipoproteinlipase (LPL)	17
2.5 Biochip-Technologie	18
3 Material & Methoden	21
3.1 DNA-Extraktion.....	21
3.2 PCR	22
3.2.1 Gelelektrophorese	24
3.3 PCR zur Mutagenese	25
3.3.1 PCR-Aufreinigung.....	27
3.3.2 Gelextraktion	27
3.4 FRET zur Detektion von Mutationen.....	28
3.5 Mutations-Chip	32
3.5.1 Durchführung.....	35
3.5.2 Verbesserte Durchführung	36

3.5.3 Vorgehensweise der Validierung	37
4 Ergebnisse.....	39
4.1 Selektion der Marker.....	39
4.2 Etablierung von polymorphismenspezifische PCRs	40
4.3 Herstellung von Referenzproben	41
4.4 Entwicklung eines Referenzsystems zur Detektion der SNP	43
4.5 Entwicklung des Mutations-Chips.....	46
4.5.1 Multiplex-PCR	48
4.5.2 Anpassung des Protokolls	50
4.5.3 Verbesserung des Mutations-Chips.....	52
4.6 Validierung des Mutations-Chips	54
4.6.1 Leistungsbewertung mit Probandenproben.....	56
4.6.2 Leistungsbewertung mit Referenzproben	58
4.6.3 Stabilitäts-Test	59
4.7 Software	61
5 Diskussion.....	65
5.1 Selektion der Marker.....	65
5.2 Assoziation mit Atherosklerose.....	66
5.2.1 Prostaglandinsynthase-1 und 2 (PTGS1 und PTGS2)	66
5.2.2 Endotheliale NO-Synthase (eNOS)	67
5.2.3 Faktor V (F5).....	67
5.2.4 5,10-Methylentetrahydrofolsäure-Reduktase (MTHFR)	68
5.2.5 Arachidonat-5-Lipoxygenase-aktivierendes Protein (Alox AP)	68
5.2.6 Cholesterinester-Transferprotein (CETP).....	69
5.2.7 Apolipoprotein E (ApoE)	69
5.2.8 Prothrombin (F2)	70
5.2.9 Lymphotoxin- α (LTA).....	70
5.2.10 Lipoproteinlipase (LPL).....	71
5.2.11 Ergebnis der Analyse.....	71

5.3 Entwicklungstechnische Aspekte	73
5.3.1 Etablierung der PCR und Erstellung der Referenzproben	73
5.3.2 Referenzsystem LightCycler	74
5.3.3 Entwicklung des Mutations-Chips.....	75
5.4 Klinischen Anwendbarkeit.....	78
5.5 Ausblick.....	78
6 Zusammenfassung	80
7 Summary	81
8 Literaturverzeichnis.....	82
9 Abkürzungsverzeichnis	95
Danksagung.....	99
Lebenslauf.....	100
Veröffentlichungen	101
Anhang 1: Sequenzen der Chipsonden.....	103
Anhang 2: Leistungsbewertung mit Probandenproben	107
Anhang 3: Leistungsbewertung mit Referenzproben	110
Anhang 4: Stabilitätstest.....	112

1 Einleitung und Fragestellung

Die häufigste Todesursache in den industrialisierten Ländern ist Atherosklerose, welche im Volksmund auch Gefäßverkalkung genannt wird (International Task Force, 2003). Durch zunehmende Alterserkrankungen wie diese steigen die Kosten des Gesundheitssystems dramatisch an. Um diese explodierenden Kosten zu begrenzen, ist die Entwicklung neuer präventiver diagnostischer und therapeutischer Tests für eine personalisierte Medizin notwendig. Es werden Tests benötigt, um Biomarker in den gesamten Prozess der medizinischen Versorgung zu integrieren. Bei biologischen Markern handelt es sich um spezielle Botenstoffe des Körpers, welche Indikatoren einer normalen oder pathologischen Reaktion des Organismus sind (Schmitz et al., 2008).

Erst wenn Atherosklerose schon prävalent ist, gibt es Methoden zur Identifikation der Plaques und Testverfahren für verschiedene Marker. Diese weisen den prinzipiellen Nachteil von hohen Kosten und langen Bearbeitungszeiten für die Testdurchführung auf. Die Tests können nicht vom behandelnden Arzt vor Ort durchgeführt werden, sondern müssen an ein Labor geschickt werden. Ein einfaches Testverfahren für die frühe spezifische Diagnose der Atherosklerose bzw. des Atheroskleroserisikos fehlt.

Eine initiale Screening-Methode für das Atheroskleroserisiko soll in Zusammenhang mit dieser Arbeit etabliert werden. Ziel ist es, ein System mit geringer Komplexität und hoher Anwenderfreundlichkeit zu entwickeln, welches für kosteneffektive diagnostische Tests eingesetzt werden kann. Zur Erfassung der genetischen Prädisposition wurden Punktmutationen ausgewählt, die in Studien mit dem Auftreten von Atherosklerose assoziiert sind. Bei Atherosklerose handelt es sich um eine sehr komplexe Krankheit, welche durch viele Faktoren beeinflusst wird.

Durch die Entwicklung eines neuartigen humanen Mutations-Chips zur Detektion von Erbgutveränderungen soll das individuelle Risiko abgeschätzt werden können. So haben Labore in Zukunft ein Instrument an der Hand, mit dem möglichst schnell viele DNA-Variationen simultan gemessen werden können.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, einen neuartigen Biochip als schnelle und einfache, routinetaugliche und frühe Diagnosemöglichkeit für Atherosklerose zu entwickeln. Mit

dem Mutations-Chip sollen Patientenproben auf bekannte Atherosklerose-Mutationen untersucht werden, um das Therapie-Monitoring von Atherosklerose zu unterstützen. Zur Analyse der Polymorphismen sollen Bereiche von interessanten Genen mittels Multiplex-PCR amplifiziert werden, wobei genomische DNA als Matrize dient. Das Produkt der Amplifikation wird nach einem noch zu entwickelnden Protokoll auf den Mikroarray gegeben. Eine eindeutige Genotypisierung sollte durch die anschließende Präzipitationsreaktion möglich sein.

2 Grundlagen

2.1 Atherosklerose

Trotz jahrelanger, weltweiter Forschungsarbeiten sind die grundlegenden Vorgänge der Pathogenese der Atherosklerose noch immer nicht vollständig bekannt (Dietel et al., 2005).

Im Allgemeinen wird angenommen, dass Faktoren des Immunsystems eine Schlüsselrolle bei der Entstehung und dem Fortschreiten dieser chronisch-inflammatorischen Krankheit spielen (Milioti et al., 2008). Atherosklerose (auch Arteriosklerose) wird durch Einlagerung von Fett, Blutgerinnseln oder Entzündungszellen in die Gefäßwände der Arterien ausgelöst (Aichner et al., 2002). Durch Adhäsion und Emigration der zirkulierenden Monozyten an den betroffenen Stellen kommt es, bedingt durch eine verstärkte Lipidaufnahme, zur Entwicklung von Schaumzellen. Diese leiten eine proinflammatorische Immunantwort ein, bei der Zytokine ausgeschüttet werden (Libby et al. 2002). Der Begriff Arteriosklerose beschreibt die Gefäßverhärtung (scleros, hart), während durch Atherosklerose (Atherom, fetter Tumor) Fettläsion und Gefäßverhärtung beschrieben werden (Aichner et al., 2002).

2.2 Risikofaktoren der Atherosklerose

Die Atherosklerose spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen. Weist ein Patient ein kardiovaskuläres Ereignis auf, hat er ein sehr hohes Risiko weitere Gefäßereignisse zu entwickeln. Es wurden ähnliche Risikofaktoren für die identifizierten Mechanismen, die den Prozess der Atherosklerose beeinflussen, gefunden (siehe Tabelle 1), somit ist einem Risikofaktor nicht immer genau einer Folgeerscheinung zuzuordnen (Aichner et al., 2002). Ein Faktor, der mit Auftreten und Progression einer Erkrankung statistisch begünstigt ist, wird als Risikofaktor bezeichnet (Böcker et al., 2008).

Tabelle 1: Anerkannte Risikofaktoren bzw. –marker für Atherosklerose (nach Lusic et al., 2000).

Genetische Prädisposition
erhöhter LDL/VLDL-Spiegel
reduzierter HDL-Spiegel
erhöhter Lipoprotein(a)-Spiegel
Hypertonie
Homocysteinämie
familiäre Häufung
Diabetes mellitus und Adipositas
erhöhte Spiegel von Gerinnungsfaktoren
Depressionen und Verhaltensstörungen
Geschlecht
generalisierte Entzündungserkrankungen
metabolisches Syndrom
Umweltfaktoren
fetteiche Ernährung
Nikotinabusus
niedrige Antioxidantienpiegel
Bewegungsmangel
Infektionen

Erhöhtes LDL-Cholesterin (low density-Lipoprotein) ist ein Hauptrisikofaktor für eine koronare Herzerkrankung (Schmitz et al., 2008). Risikofaktoren für atherosklerotische Arterienveränderungen und den damit verbundenen Folgeerkrankungen sind Diabetes mellitus, das metabolische Syndrom oder Infektionen (z.B. mit *Chlamydomphila pneumoniae*, Lusic et al., 2000). Der protektive Effekt von Östrogenen hat zur Folge, dass Männer eher unter Atherosklerose leiden als Frauen (bis zur Menopause). Mit fortschreitendem Alter manifestiert sich die Atherosklerose auch klinisch, was sich auf zunehmende Lipideinlagerungen in der Gefäßintima zurückführen lässt. Bluthochdruck (Hypertonie) führt zu Endothelschäden, welche die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen fördern (Böcker et al., 2008). Nikotinkonsum und die kontinuierlich steigende Zahl übergewichtiger und adipöser Menschen (ausgelöst durch falsche Ernährungsgewohnheiten und Bewegungsmangel) sind zusätzliche Faktoren, die für den weltweiten Anstieg der Prävalenz der Erkrankung sorgen (Aichner et al., 2002). Neue Risikofaktoren bzw. –marker sind ein erhöhter Wert an Inflammationsmarkern wie CRP (C-reaktives Protein), IL-6 (Interleukin 6), Koagulationsfaktoren wie Fibrinogen, PAI-1, Homocystein, Lipoproteine und modifizierte Lipide wie Lp(a) und atherogenes HDL (high density-Lipoprotein).

Eine entscheidende Rolle spielen genetische Polymorphismen, die intensiv in den letzten Jahren erforscht wurden (International Task Force, 2003).

Auf endogene Faktoren wie Diabetes mellitus, genetische Defekte, Alter oder das Geschlecht kann kein Einfluss genommen werden. Wird aber ein exogener Faktor (Rauchen, Ernährung, Lebensstil) eliminiert, so kann das zu einer Halbierung des Risikos führen (Aichner et al., 2002). Neben den etablierten Risikofaktoren gibt es immer noch viele unbekannte Auslöser von Atherosklerose (z.B. Umweltfaktoren, unbekannte genetische Defekte etc.).

2.3 Zelluläre Mechanismen der Atherosklerose

Atherosklerose ist eine chronische Entzündung, bei der sich Blutbestandteile, Lipide, Calcium sowie Bindegewebe an Endothelzellen bzw. glatten Muskelzellen aufgrund anhaltender Irritationen anlagern. Es gibt viele Hypothesen, die die Initiierung von Atherosklerose beschreiben, von denen die „response to injury“ von Russel Ross die anerkannteste und am weitesten verbreitete ist und die von einer Verletzung bzw. Störung der Gefäßwand ausgeht (Lehr et al., 2002).

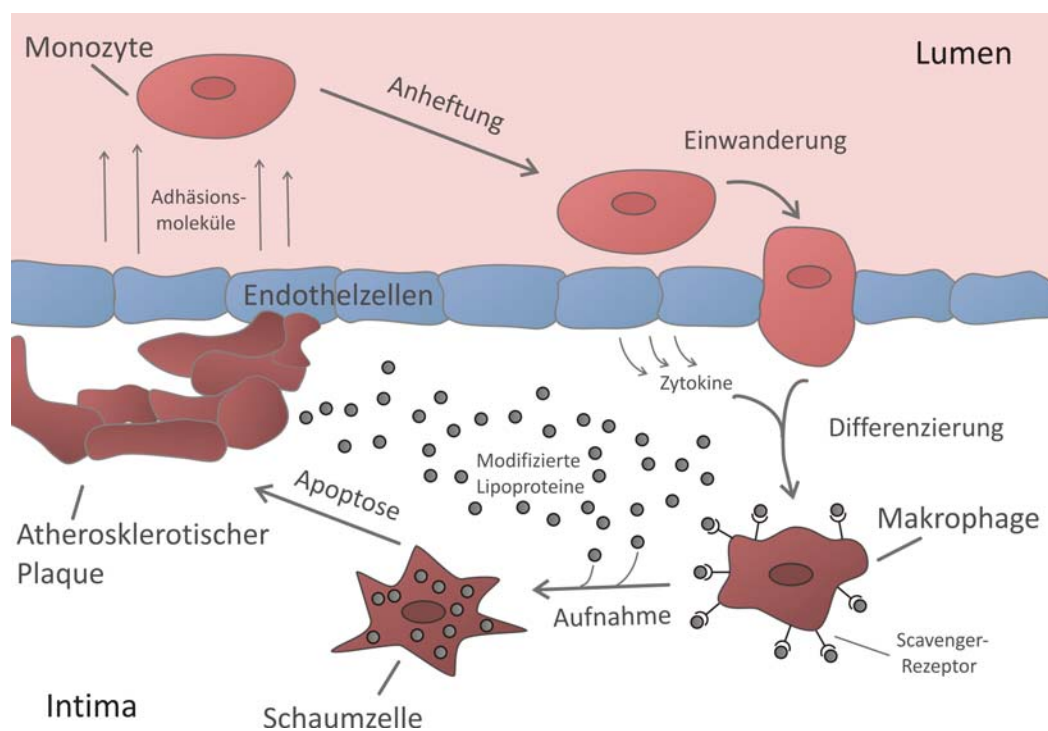


Abbildung 1: Entstehung von atherosklerotischen Plaques.

Das Gefäßendothel ist für den normalen Blutfluss mitverantwortlich und wird durch Einlagerungen geschädigt. Dies hat zur Folge, dass die Permeabilität des Endothels für Lipoproteine erhöht ist, welche in der Intima akkumulieren und dort vor allem oxidativ und/oder enzymatisch modifiziert werden (Schmitz et al., 2008). Durch diese Endothel-Aktivierung werden Adhäsionsmoleküle und Chemokine freigesetzt, die für die Rekrutierung und Einwanderung der Leukozyten (T-Zellen, Monozyten) in den Subendothelialraum sorgen (Milioti et al., 2008) (siehe Abbildung 1). Des Weiteren findet eine gesteigerte Expression von Zytokinen statt, welche die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen induzieren. Dieser Prozess führt zur Freisetzung von TNF- α (Tumornekrosefaktor α). Die Makrophagen nehmen große Mengen an Lipoproteinen (überwiegend oxidiertes LDL) über den Scavenger Rezeptor auf. Da sie dieses nicht abbauen können, kommt es zu einer intrazellulären Akkumulation von Cholesterin. Durch diese unregulierte Aufnahme bilden sich allmählich Schaumzellen aus den Makrophagen, welche die Intima nicht mehr verlassen können. Aufgrund der Cholesterinüberladung gehen die Schaumzellen apoptotisch zugrunde. Dabei werden die Lipide wieder freigesetzt und bilden den Induktor für atherosklerotische Plaques. Zudem wandern glatte Gefäßmuskelnzellen aus der Media ein und bilden kollagenreiche, fibröse Plaquekappen, was zur Verhärtung der Arterienwände führt. Bei diesem Prozess werden Entzündungsfaktoren wie proinflammatorische Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren freigesetzt und so die Aktivierung des Immunsystems initiiert (Schmitz et al., 2008). Eine zentrale Rolle spielen die modifizierten Lipoproteine, was durch die „Lipoprotein-induced-atherosclerosis“-Hypothese verdeutlicht wird, in der der Nobelpreisträger Joseph Leonard Goldstein die Acetylierung des Proteinanteils von LDL als eigentliche Ursache bei der Entstehung von Atherosklerose sieht.

Ein in Mainz entwickeltes Konzept sieht eine Überlastung des physiologischen Lipid-Abtransportsystems aus dem Gewebe als Auslöser für die Atherosklerose. Gestrandete LDL-Moleküle werden nicht oxidiert, sondern enzymatisch so verändert, dass sie das Komplementsystem über den alternativen Weg aktivieren und damit von Makrophagen erkannt und aufgenommen werden. Die Makrophagen bilden sich durch Aufnahme des LDLs zu Schaumzellen um, die im Sinne des Reversen-Cholesterin-Transports ins Gefäßlumen remigrieren und das Cholesterin zur Leber transportieren

können. Bei Überschreitung der Transportkapazität dieses Mechanismus kann es jedoch zur Akkumulation der Schaumzellen in der Gefäßwand und damit zur Plaquebildung /-progression kommen (Bhakdi et al., 2004). Die verschiedenen theoretischen Erklärungsansätze überlappen sich, weshalb nicht ein einzelner Faktor für eine Folgeerscheinung verantwortlich sein kann.

Eine Embolie entsteht, wenn sich Teile der Plaques lösen, sich aber aufgrund von Verengungen wieder im Gefäßsystem ablagern und dieses dadurch verstopfen. Der Entzündungsprozess führt zur vermehrten Anlagerung von Thrombozyten, welche für die Blutgerinnung verantwortlich sind. Der Gefäßdurchmesser der Arterien wird durch die Blutgerinnungsreaktionen, die an den Plaques stattfinden, noch weiter verringert (Arterienverkalkung) und eine Behinderung des normalen Blutflusses entsteht (Thrombose). Die Folgen sind kleine Funktionsschwächen der entsprechenden Gewebe und Organe, im ungünstigsten Fall kann es zu einem Gefäßverschluss kommen (Herzinfarkt oder Schlaganfall). Der Stabilitätsverlust der Gefäßwand birgt die Gefahr der Entstehung eines Aneurysmas (permanente Gefäßerweiterung), wodurch betroffene Stellen reißen und Blutungen ausgelöst werden können.

Atherosklerose tritt vor allem an elastischen und großen, muskelstarken Arterien auf (z.B. Aorta, Koronararterien) (Aichner et al., 2002). Jahrelang verläuft diese Entwicklung ohne Symptome, bis sie sich im späten Stadium durch Absterben (Nekrose) des betroffenen Organs manifestieren oder durch einen Herzinfarkt/Schlaganfall bemerkbar machen. Die meisten kardiovaskulären Erkrankungen sind Folgeerscheinungen der Atherosklerose.

Die Diagnose der Atherosklerose erfolgt derzeit meist erst in einem späten Stadium über EKG (Elektrokardiogramm), Sonographie, Magnetresonanztomographie, Computertomographie oder durch andere neuere Verfahren der Endothelzellfunktionsmessung (Wilhelm et al., 2007). Daneben gibt es auf dem Markt ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)-Testverfahren für verschiedene Marker (z.B. Asymmetrisches Dimethylarginin, Homocystein, hsCRP etc.), die im Zusammenhang mit der Bestimmung des Atheroskleroserisikos diskutiert werden (Pfützner et al., 2008).

Neben der generellen Risikoabschätzung anhand der Risikofaktoren gibt es keine diagnostische Möglichkeit, das akute Risiko zu bestimmen. Es gibt lediglich bildgebenden Verfahren, wenn eine Atherosklerose schon prävalent ist.

2.4 Atherosklerotisch-assoziierte Gene (Mutations-Chip)

Es gibt bereits mehrere hundert Gene, die als mögliche Kandidaten für einen Atheroskleroserisikofaktor benannt werden. Eine Identifizierung von Risikofaktoren wird zusätzlich erschwert, da sich die Gene gegenseitig beeinflussen und eine Mutation von nur einem Gen viele Merkmale hervorrufen kann (Pleiotrophie). Eine genaue klinische Manifestation der Gene kann wegen der hohen Bedeutung von Umgebungsfaktoren nicht erfolgen, da eine Relation zwischen Vererbung und Umwelt nicht bekannt ist.

Tabelle 2: Übersicht der ausgewählten Polymorphismen, der Häufigkeit des unbedeutenderen Allels und das assoziierte Risiko.

Gen	Variation			Häufigkeit	Risiko (Odds Ratio)
PTGS1	G-1006A	G>A		0,06	1,7
	R8W	C>T	rs1236913	0,07	2,21
	P17L	C>T	rs3842787	0,06	1,36
PTGS2	G-765C	G>C	rs20417	0,15	0,48
eNOS	-786T/C	T>C	rs2070744	0,35	1,17
	E298D	G>T	rs1799983	0,42	1,17
F5	G1691A	G>A	rs6025	0,02	4,43
MTHFR	C677T	C>T	rs1801133	0,29	1,14
	A1298C	A>C	rs1801131	0,32	2,5
Alox AP	HapAB	T-A	rs10507391	0,33	1,17
	HapA	G>A	rs17222814	0,1	2
	HapB	G>A	rs17216473	0,14	
CETP	Taq 1b	G>A	rs708272	0,4	0,79
	A1061G	A>G	rs5882	0,3	0,94
ApoE	Cys112Arg	T>C	rs429358	ε2 0,11	ε2/ε2 1,7
	Arg158Cys	T>C	rs7412	ε3 0,72	
				ε4 0,17	ε4/ε4 1,4
Prothrombin	G20210A	G>A	rs1799963	0,03	1,30
LTA	252A/G	A>G	rs909253	0,4	1,69
	804C/A	C>A	rs1041981	0,3	1,78
LPL	D9N	G>A	rs1801177	0,04	2
	S447X	C>G	rs328	0,2	0,4
	N291S	A>G	rs268	0,02	bei Erkrankung 2-3

Somit können diese genetische Faktoren nur verwendet werden, um das Basisrisiko aufzuzeigen (Aichner et al., 2002).

Die Auswahl der Kandidatengene erfolgt aufgrund von genetisch-epidemiologischen Studien. Es werden Gene mit hoher Erkrankungsassoziation ausgewählt, um das individuelle Risiko (nach heutigem Wissensstand) eines Patienten zu erfassen.

In Tabelle 2 sind die ausgewählten Genvariationen mit ihrer Allelhäufigkeit in der kaukasischen Bevölkerung und dem assoziierten Risiko (OR=Odds Ratio, Quotenverhältnis) angegeben. Die rs (Referenz-SNP) Nummer definiert die eindeutige Position des SNP (Einzelnukleotidpolymorphismus) im Genom.

In dieser Arbeit werden elf Kandidatengene untersucht, die mit dem Erkrankungsrisiko korrelieren. Unter einem Kandidatengen versteht man, dass die Assoziation eines Genes mit der entsprechenden Störung noch nicht eindeutig nachgewiesen ist (Mencke, 1997).

2.4.1 Prostaglandinsynthase-1 und 2 (PTGS1 und PTGS2)

Die Prostaglandinsynthase-1 und 2, auch Cyclooxygenase-1 (COX-1) und COX-2 genannt, oxidiert Arachidonsäure zu Prostaglandin. Dieses bildet den Ausgangspunkt für die Synthese von Eicosanoiden wie Prostacylin und Thromboxan A₂, welche für die Blutgefäßverengung und Thrombozytenaggregation verantwortlich sind (Scott et al., 2002). Prostaglandin beeinflusst die Entwicklung von Atherosklerose, indem es für die immunologische Antwort, die Expression von Metalloproteinen und die Entwicklung von glatten Muskelzellen verantwortlich ist (Kohsaka et al., 2008). PTGS1 kommt in allen Gewebstypen vor, wohingegen PTGS2 eher in Endothelzellen proliferierender Blutgefäße, atherosklerotischen Läsionen und entzündetem Gewebe zu finden ist.

Eine untersuchte Punktmutation des PTGS1 ist an Position -1006, bei der ein Nukleotid-Austausch von G nach A stattfindet (G-1006A).

Der Polymorphismus R8W führt in vitro zur Bildung eines Enzyms mit gleicher Aktivität (Lee et al., 2007). Bei Pro17Leu findet ein Nukleotid-Austausch an Position 144 C/T statt (Hillarp et al., 2003) und bewirkt ebenfalls eine normale Aktivität des PTGS1-Proteins in vitro (Lee et al., 2007). Die Allel-Häufigkeit für das Mutationsallel liegt bei allen drei PTGS1-Variationen bei 6-7% (Lee et al., 2008).

Für PTGS2 wird der Polymorphismus G-765C analysiert, welcher mit einer 30% geringeren PTGS2-Transkription assoziiert ist (Ueda et al., 2008). Das -785C-Allel kommt mit einer Häufigkeit von 15% in der Bevölkerung vor und führt zur Bildung eines Proteins, was eine Reduktion des CRP-Levels bewirkt (Orbe et al., 2006).

2.4.2 Endotheliale NO-Synthase (eNOS)

Ein weiterer potentieller Risikofaktor für Atherosklerose sind Mutationen in der endothelialen Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase. NO spielt eine Rolle bei der Kontrolle des Gefäßtonus und der Thrombozytenaggregation (Fatini et al., 2009). Das Enzym NO-Synthase (NOS) katalysiert die Reaktion von NO aus der Aminosäure L-Arginin (Napoli et al., 2006). Es werden drei Isoformen von NOS unterschieden: NOS1 (neuronal NOS, nNOS), NOS2 (induzierbare NOS, iNOS) und NOS3 (endotheliale NOS, eNOS) (Dafni et al., 2010). Die verschiedenen Mutationen des eNOS-Gens haben eine Variation der Expression und der Aktivität von eNOS zur Folge, wodurch sich koronare Herzkrankheiten entwickeln können (Kunnas et al., 2002).

Die -786 T/C-Mutation in der 5'-Region des eNOS Genes führt zu einer Unterdrückung der eNOS-Transkription und reduziert so die endotheliale NO-Synthese. Der Promotor-Polymorphismus führt zu einem Protein, welches einen geringeren Nitrit/Nitrat-Level zur Folge hat (Nakayama et al., 1999).

Der Glu298Asp-Polymorphismus in Exon 7 wird durch einen Austausch von Guanin gegen Thymin an Position 894 hervorgerufen (Lacchini et al., 2010). Dieses Protein führt zu geringeren NO-Konzentrationen und einer Reduzierung der Gefäßaktivität (Casas et al., 2006).

Ein signifikanter Unterschied herrscht zwischen den Häufigkeiten der ethnischen Gruppen. Asp298- und -786C-Allele kommen vor allem bei Asiaten und Hispanics kaum vor (Casas et al., 2006). In der kaukasischen Bevölkerung werden Allelhäufigkeiten von 35% für Asp298 und 42% für -786C angegeben (Tanus-Santos et al., 2001).

2.4.3 Faktor V (F5)

Der Koagulationsfaktor V (F5) wird durch Thrombin (F2) in seine aktive Form (Faktor Va) umgewandelt, welches ein essentielles Protein für die Blutgerinnung ist und selbst ein Co-Faktor für die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin darstellt. Die

Punktmutation G1691A im Faktor-V-Gen ist die sogenannte Faktor-V-Leiden-Mutation, ein mutiertes Allel tragen 2% der europäischen Bevölkerung (Koeleman et al., 1994). Die Mutation hat eine Veränderung der Proteinsequenz an Position 506 zur Folge (Arg506Gln) (Bertina et al., 1994). An dieser Position liegt die Schnittstelle für das aktivierende Protein C (APC) und die Mutation führt dazu, dass Faktor V nicht mehr durch APC proteolytisch inaktiviert werden kann. So kann Faktor V nicht mehr inaktiviert werden und behält seine gerinnungsfördernde Wirkung (Ercan et al., 2008).

2.4.4 5,10-Methylen tetrahydrofolsäure-Reduktase (MTHFR)

MTHFR ist ein weiterer Genort, der eine Assoziation mit dem Atheroskleroserisiko aufweist. Die 5,10-Methylen tetrahydrofolsäure-Reduktase ist für die Remethylierung des Homocysteins zum Methionin verantwortlich. Des Weiteren ist sie in die Methylierung von DNA, Proteinen, Neurotransmittern und Phospholipiden involviert (Sazci et al., 2006). Ein hoher Level an Homocystein steht im Verdacht die Blutgerinnsel-Bildung zu fördern, die Gefäßwand zu schädigen und oxidativen Stress auszulösen (Maitland-van der Zee et al., 2008). In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass mit einem erhöhten Homocysteinspiegel das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen steigt.

Im C677T-MTHFR-Polymorphismus kommt es zu einem Austausch von C nach T an Nukleotidposition 665, was zu einer Substitution in Exon 4 von Valin nach Alanin an Aminosäureposition 222 führt (Selzer et al., 2003). Die Namensgebung 677 ist verwirrend genauso wie beim anderen MTHFR-Polymorphismus A1298C, bei dem der Nukleotid-Austausch (A>C) an Position 1289 erfolgt (Donnelly et al., 2000). Die homozygote Variation 677T kommt mit einer Häufigkeit von 5-18% in der Bevölkerung vor. Diese Variante hat die Bildung eines thermolabilen Enzyms mit geringerer Aktivität zur Folge (bei 37°C 40-50% Restaktivität) (Kara et al., 2003), woraus ein geringer Folsäurespiegel und ein hoher Homocystein-Level resultieren (Frosst et al., 1995, Tanaka et al., 2009). Eine weitere Variante ist A1298C, welche bewirkt, dass in Exon 7 Alanin gegen Glutaminsäure an Aminosäureposition 429 ausgetauscht wird (Selzer et al., 2003). Homozygote Anlageträger von A1298C (10% der Bevölkerung) scheinen keinen höheren Homocystein-Spiegel aufzuweisen. Personen, die aber gleichzeitig eine Heterozygotie für C677T und A1298C haben, zeigen einen erhöhten Homocystein-Level

und geringeren Folsäure-Spiegel analog der Personen mit homozygotem C677T (Kara et al., 2003).

2.4.5 Arachidonat-5-Lipoxygenase-aktivierendes Protein (Alox AP)

Entzündungsmediatoren wie Arachidonsäuremetaboliten (z.B. Leukotrine) sind an atherosklerotischen Veränderungen beteiligt (Lehr et al., 2002). Alox AP kodiert das Enzym FLAP (5-Lipoxygenase-aktivierendes Protein), das die Produktion von Leukotrienen reguliert und dadurch wichtig für die Atherogenese und die Plaqueruptur ist (Lövkvist et al., 2008).

Drei SNPs, die das 5'-Ende von deCODEs „HapA“ (Haplotype A) und „HapB“ definieren, wurden ausgewählt.

Einer der Polymorphismen von HapA ist rs17222814, welcher auch SG13S25 genannt wird. Entscheidend ist hierbei die Wildtypallel, die zu 90% in der deutschen Bevölkerung vorkommt (Linsel-Nitschke et al., 2008). Der von HapB ausgewählte Polymorphismus (rs17216473, SG13S377) weist eine Häufigkeit von 0,14 auf (Linsel-Nitschke et al., 2008). Der Polymorphismus SG13S114 (rs110507391) ist sowohl Bestandteil der vier Polymorphismen für HapA als auch für HapB, weswegen er „HapAB“ genannt wird. Die Wildtypallel ist in HapA enthalten und die Mutationsallel in HapB, welches mit einer Häufigkeit von 0,33 vorkommt (Linsel-Nitschke et al., 2008).

2.4.6 Cholesterinester-Transferprotein (CETP)

Das Cholesterinester-Transferprotein vermittelt den Cholesterin-Rücktransport (Tsai et al., 2008) und ist an der Regulation des HDL-Levels beteiligt (Barzilai et al., 2003). Dabei sorgt CETP für den Austausch von Triglyceriden aus VLDL (very-low-density-Lipoprotein), LDL oder Chylomikronen gegen Cholesterinester des HDLs (Hassanzadeh et al., 2009).

Ein bekannter Polymorphismus ist Taq 1b, welcher im ersten Intron des CETP-Gens liegt (Teupser et al., 2001). Der Wildtyp B1B1 enthält eine Restriktionsschnittstelle für TaqI. Die Aktivität des Enzyms ist bei homozygoten Trägern des B1-Allels erhöht, was mit einer höheren CETP-Konzentration einhergeht (Klerkx et al., 2003). Das B2-Allel kommt zu 40% in der Bevölkerung vor (Kuivenhoven et al., 1998) und führt zu einer

signifikant geringere CETP-Proteinkonzentration. Dies hat einen höheren HDL-Level (Tsai et al., 2008) zur Folge.

Die Variation A1061G im CETP-Gen bewirkt im Exon 14 am Kodon 405 einen Austausch von Isoleucin gegen Valin (I405V), was zu einer deutlichen Erhöhung der HDL- und LDL-Partikelgröße führt (Barzilai et al., 2003). Das 405V Allel bewirkt eine Verringerung der Proteinmasse und -aktivität von CETP (Terán-García et al., 2008) und kommt mit einer Häufigkeit von 30% in der europäischen Population vor (Pallaud et al., 2001).

2.4.7 Apolipoprotein E (ApoE)

Unter Apolipoproteinen versteht man den Proteinanteil der Lipoproteine, welche als Transportproteine für die wasserunlöslichen Lipide dienen (Schwandt et al., 2007).

ApoE ist Bestandteil von VLDL und HDL im Plasma und ist für die Ausschleusung des Cholesterins aus peripheren Zellen zuständig. Es vermittelt die Aufnahme von HDL aus der Leber, hemmt die Thrombozytenaggregation, reguliert die Steroidsynthese und spielt eine Rolle beim Wachstum und der Differenzierung von Neuronen (Schwandt et al., 2007).

Von ApoE gibt es drei unterschiedliche Allele ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ und $\epsilon 4$), deren Proteine nehmen Einfluss auf die Cholesterinkonzentration im Blut, indem sie die rezeptorvermittelte Aufnahme von Lipoproteinen und die Expression von LDL-Rezeptoren beeinflussen. Diese drei Protein-Isoformen unterscheiden sich durch zwei Aminosäuren (an Position 112/158): E2 Cystein/Cystein, E3 Cystein/Arginin und E4 Arginin/Arginin. $\epsilon 3$ ist der Wildtyp mit einer Häufigkeit von 70-80%, das Allel $\epsilon 2$ kommt zu 5-10% in der Bevölkerung vor und $\epsilon 4$ zu 10-15% (Kolovou et al., 2007).

Der ApoE2/2-Phänotyp ist aufgrund der geringen Affinität zum Lipoproteinrezeptor der Leber mit hohen Cholesterin- und Triglycerid-Werten assoziiert, was zu Hyperlipoproteinämie Typ III und Herzinfarkt führt (Kolovou et al., 2007).

Das $\epsilon 4$ -Allel führt zu einem entgegengesetzten Effekt zu $\epsilon 2$: ApoE E4 wird aufgrund seiner hohen Affinität zu triglyceridischen Lipoproteinen schnell abgebaut. Da es keinen Cysteinrest aufweist, bildet sich kein Multimer über Disulfidbrücken aus und es kann daher voll mit dem Rezeptor interagieren (Schwandt et al., 2007). Dies führt dazu, dass bei $\epsilon 4$ -Allel-Trägern die LDL-Rezeptoren herunterreguliert sind und so einen höheren LDL-Plasmaspiegel aufweisen (Schmitz et al., 2008). Der genetische

Polymorphismus bedingt ein erniedrigtes HDL-Cholesterin (Vaisi-Raygani et al., 2007) sowie ein erhöhtes Risiko für Morbus Alzheimer (Kolovou et al., 2007).

2.4.8 Prothrombin (F2)

Neben Faktor-V-Leiden ist Prothrombin 20120A (F2) einer der wichtigsten vererbbaaren Thrombophilie-Marker. Prothrombin ist die Vorstufe für Thrombin, welches bei der vaskulären Thrombozytenaktivierung eine wichtige Rolle spielt. Die Protease-Aktivität des Thrombins sorgt für die Spaltung der im Blutplasma gelösten Gerinnungsfaktoren und Fibrine.

Poort et al. entdeckte 1996 einen Basenaustausch (G>A an Position 20210) in der 3'-untranslatierten Region des Prothrombins Gens, welcher eine höhere Prothrombin-Konzentration im Plasma zur Folge hat. Die G20210A-Variante im F2-Gen kommt mit einer Häufigkeit von 0,03 vor (Burzotta et al., 2004) und führt zu einer erhöhten Prothrombin-Aktivität (Endler et al., 2001).

2.4.9 Lymphotoxin- α (LTA)

Das Zytokin Lymphotoxin- α (auch TNF- β genannt) gehört zur Tumornekrosefaktor-Familie und wird von den Lymphozyten sezerniert. LTA ist an der Expression von verschiedenen Genen beteiligt, die für das Fortschreiten der Atherosklerose verantwortlich sind (Suna et al., 2008).

Der Austausch von A>G an Position 252 (im Intron 1) erhöht den Transkriptionslevel von LTA (Ozaki et al., 2002) und C-reaktives Protein (Minzuno et al., 2006). Ein weiterer Polymorphismus (804C>T in Exon 3), bewirkt einen Austausch von Threonin zu Asparagin im Kodon 26 und führt zu einem Protein, welches für die erhöhte Ausschüttung von Zelladhäsionsmolekülen wie VCAM 1 und Selektin E verantwortlich ist (Yamada et al., 2008). Die Allelhäufigkeit für die beiden Polymorphismen liegt zwischen 0,3 und 0,4 (Clarke et al., 2006).

2.4.10 Lipoproteinlipase (LPL)

Die Lipoproteinlipase ist an der Hydrolyse der exogenen Triglyceride beteiligt, die in Chylomikronen und VLDL enthalten sind (Schwandt et al., 2007, Milioti et al., 2008).

Die drei Polymorphismen D9N, S447X und N291S von LPL wurden als Marker ausgewählt.

Asp9Asn (D9N) in Exon 2 (Kastelein et al., 1998) bewirkt eine 25-30%ige Reduktion der Enzymaktivität von LPL (Brisson et al., 2002). Dies führt zu erhöhten Triglyceriden im Plasma (Cheng et al., 1999) und einem Abfall des HDL-Cholesterin-Levels (Rip et al., 2006). Der Polymorphismus an Nukleotidposition 280 tritt mit einer Allelhäufigkeit von 2-4% auf, was mit einem doppelten Risiko für koronare Herzerkrankungen bei Kaukasier einhergeht (Bockxmeer et al., 2001).

Die Punktmutation bei Nukleotid 1595 C>G (S447X) im Exon 9 kommt mit einer Häufigkeit von 17-22% in der kaukasischen Bevölkerung vor (Bockxmeer et al., 2001). Clee et al. (2001) berichtete sogar von einer deutlich höherer Häufigkeit (>30%). Das X447-Allel führt zu einer Verkürzung des carboxyterminalen Endes um zwei Aminosäuren (Yamada et al., 2008). Als Folge dieser Stopp-Mutation kommt es zu einer Verdopplung der Enzymaktivität (Moennig et al., 2000) oder zu einer Erhöhung der LPL-Expression im Vergleich zum Wildtyp (Merkel et al., 2002). Dies äußert sich in einer geringeren Triglycerid- und höheren HDL-Konzentration (Lee et al., 2004) sowie niedrigerem Blutdruck (Clee et al., 2001).

Für N291S wird eine Allelhäufigkeit von 2% postuliert (Moening et al., 2000), welche bewirkt, dass der Homodimer-Komplex des Enzyms destabilisiert wird und so an Lipase-Aktivität (30%) verliert (Wittrup et al., 1997). Die Heterozygotizität der Punktmutation, die für den Austausch von Asparagin gegen Serin in Kodon 291 verantwortlich ist, ist mit einem geringen Plasma-HDL assoziiert (Kastelein et al., 1998).

2.5 Biochip-Technologie (Mikroarray)

Mikroarray bedeutet wörtlich übersetzt etwas Kleines (= mikro) mit einer großen Aufstellung (= array), womit verdeutlicht wird, dass eine große Anzahl bestimmter Moleküle auf kleinstem Raum geordnet sind (Müller et al., 2004). Die Biochip-Technologie leitet sich vom Southern-Blot ab, bei dem die Zielmoleküle auf einer Membran fixiert sind und die Detektion mit komplementären, radioaktiven- oder fluoreszenz-markierten Sonden erfolgt. Bei einem Biochip ist es umgekehrt, die

komplementären Sonden sind auf einer festen Phase immobilisiert und die markierten Zielmoleküle hybridisieren anschließend (Jansohn, 2007). Die Watson-Crick-Basenpaarung ermöglicht eine selektive Hybridisierung.

Für die feste Phase sind Membranen, Glas- oder Kunststoffträger geeignet, auf welche die Oligonukleotid-Sonden durch so genanntes „Spotting“ aufgebracht werden. Die Detektion kann anschließend durch Fluoreszenzfarbstoffe, Radioaktivität oder eine Chemilumineszenzreaktion erfolgen.

Die Entdeckung der Mikroarray-Technologie geht auf Stephen P. A. Fodor zurück, der 1989 ein Verfahren zur Identifikation von Tausenden von Genen in nur einem Experiment entwickelte. Der erste kommerziell erhältliche Mikroarray war der „HIV GeneChip“, den Affymetrix 1994 auf den Markt brachte. Dieser enthielt damals 16000 DNA-Sonden, mittlerweile können Mikroarrays mit über 6 Millionen DNA-Sonden hergestellt werden (McDonnell et al., 2005).

Die Einsatzmöglichkeiten für diese Technologie sind vielfältig: Identifizierung von Molekülen im Stoffwechsel, Klassifizierung von Tumoren, Identifikation von Zielgenen für Medikamente oder Untersuchungen von Signaltransduktionskaskaden sind nur einige Beispiele von vielen (Jansohn, 2007). Die wichtigste Anwendung für Mikroarrays ist die Untersuchung der Genexpression (Lockhart et al., 2000).

Bestimmte Krankheitsbilder lassen sich mit Hilfe der „in-vitro-Diagnostik“ untersuchen. Dazu wird dem Patienten eine Blutprobe entnommen und in ein Diagnostiklabor eingeschickt. Genetische Anomalien könnten dort mit Hilfe eines Biochip analysiert werden (Müller et al., 2004). Der Chip hat den Vorteil, dass man mit ihm sehr viele unterschiedliche Mutationen gleichzeitig analysieren kann. Er besteht aus speziell entwickelten Oligonukleotiden, welche die komplementäre Sequenz der zu untersuchenden Genvariation enthalten. Diese Oligonukleotide weisen entsprechende Sequenzen sowohl für das Wildtyp-Allel als auch für das Mutations-Allel auf, sodass die DNA entsprechend ihrer Identität an die passende Genotypen-Sonde binden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde die an Sonden gebundene DNA durch eine Präzipitations-Reaktion nachgewiesen. Dafür wurde zuvor DNA aus Blut isoliert und diese mit einer PCR vermehrt und biotinyliert. Das Biotin bindet selektiv an HRP (Meerrettich-Peroxidase) gekoppeltes Streptavidin. Das HRP führt zur Spaltung eines Substrates, welches durch ein grünes Präzipitat sichtbar wird. Das erhaltene

Hybridisierungs-Muster wird mit einem Reader visualisiert und mit einer geeigneten Software ausgewertet. Somit kann die genetische Variation detektiert werden, da das PCR-Produkt allelspezifisch entweder an die synthetisch hergestellten Wildtyp- oder an die Mutations-Sonden des Biochips bindet.

Der eingesetzte Mikroarray stammen von der Firma Alere Technologie GmbH, und ist in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß integriert, in dem alle notwendigen Reaktionen stattfinden. Dieser Aufbau weist gegenüber konventionellen Biochips (meist Glasobjektträger) den Vorteil auf, dass keine Gefahr des Austrocknens besteht. Das Austrocknen führt zu einer Verfälschung der Hybridisierungsergebnisse, da die Ionenkonzentration verändert wird. Der verwendete Mikroarray ermöglicht die gleichzeitige Analyse von über 200 unterschiedlichen DNA-Molekülen auf kleinstem Raum.

3 Material & Methoden

3.1 DNA-Extraktion

Das menschliche Genom besteht aus $3,2 \times 10^9$ Basenpaaren, welche verteilt auf die Chromosomen durchschnittlich 150 Millionen Basenpaare pro Chromosom ergeben. Bei dem Verfahren zur Isolierung der DNA muss sichergestellt werden, dass dieses gigantische Molekül aus den Zellen aufgereinigt wird, ohne dass es zu sehr beschädigt wird (Mülhardt, 2006). Die Aufreinigung erfolgt über Kieselsäure-Säulen, an welche sich die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA binden. Die weniger stark negativ geladenen Proteine werden nicht gebunden und laufen durch die Säule. Die Präparation aus Blut ermöglicht 50 kb DNA-Fragmente.

Die DNA-Isolierung wurde mit einem Kit von QIAGEN (QIAamp DNA Blood Mini Kit, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Dafür wurden 20 µl QIAGEN Protease auf den Boden eines Röhrchens vorgelegt und anschließend 200 µl Vollblut hinzugefügt. Zur Zelllyse wurde die Protease-Blut-Mischung mit 200 µl AL Puffer 15 Sekunden gründlich gemischt (Vortexer Typ Reax 1DR, Heidolph, Schwabach, Deutschland) und anschließend bei 56°C für zehn Minuten inkubiert (Thermomixer compact, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt wurden 200 µl 96% Ethanol hinzugegeben. Es folgten 15 Sekunden gründliches Mischen und kurzes Zentrifugieren (Eppendorf Zentrifuge 5415D, Eppendorf AG). Der Inhalt wurde in eine Säule (QIAamp Mini spin column, QIAGEN, Hilden, Deutschland) überführt und bei 8000 rpm für eine Minute zentrifugiert, um die DNA an die Membran zu binden. Zur Entfernung von Kontaminationen wurde die Säule in ein neues Röhrchen überführt und 500 µl AW1 Puffer hinzugegeben (8000 rpm für eine Minute zentrifugiert). Die Säule kam in ein weiteres neues Röhrchen und ein Zentrifugationsschritt folgte. Für einen weiteren Waschschrift wurde 500 µl AW2 Puffer hinzugegeben und bei 14000 rpm für drei Minuten zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und die Säule in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Mit 200 µl AE Puffer wurde für fünf Minuten bei Raumtemperatur die Säule inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (8000 rpm für eine Minute) war die extrahierte DNA im Filtrat. Aus 200 µl Blut konnten so etwa 6 µg DNA gewonnen werden (30 ng/µl).

3.2 PCR

Stehen nur geringe Mengen einer bestimmten DNA-Sequenz zur Verfügung, eignet sich zu deren Vervielfältigung die Durchführung einer PCR. Diese ermöglicht beliebige Abschnitte der DNA in genau definierter Länge in großen Mengen herzustellen. Dafür laufen in einem einzigen Reaktionsgefäß mehrere Reaktionen ab. Zyklisch werden Denaturierung, Annealing und Extension in unterschiedlichen Temperaturen des Reaktionsansatzes durchlaufen (Wrba et al., 2007). Kary Mullis erhielt 1993 für die Erfindung der PCR den Nobelpreis für Chemie (Kück et al., 2005).

Zuerst wird die DNA auf 95°C erhitzt, wodurch der Doppelstrang der DNA aufgebrochen wird (Denaturierung). Die nun als Einzelstrang vorliegende DNA wird auf 55-65°C heruntergekühlt (abhängig von der Schmelztemperatur des verwendeten Primers), was die Anlagerung der im großen Überschuss vorliegenden Primer ermöglicht (Annealing). Primer sind Oligonukleotide, die sich spezifisch an das zu amplifizierende Fragment anlagern. Die Nukleotide bieten die Bausteine zur Replikation des gewünschten Abschnittes mit Hilfe der hitzestabilen *Taq*-Polymerase (aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*), welche bei 72°C ihr Temperaturoptimum hat (Extension). Der neu synthetisierte Strang ist komplementär zum Template-Strang (Wrba et al., 2007). Da dieser Schritt an beiden Strängen der Template-DNA abläuft, hat sich nach einem Zyklus die DNA-Menge verdoppelt (Mühlhardt, 2006). Auf den ersten Zyklus folgen 20-45 Zyklen, in denen die neusynthetisierten DNA-Fragmente ebenfalls als Matrize dienen. Nachdem die DNA exponentiell vermehrt wurde (nach 20 Zyklen schon eine millionenfache Vermehrung) (Wrba et al., 2007), kommt es durch die Zunahme an Amplifikationsprodukten mit zunehmenden Zyklen immer mehr zur Selbsthybridisierung der Produkte. Dadurch können sich immer weniger Primer anlagern, und die Vermehrungsrate nimmt ab. Eine Verlangsamung der Synthese geschieht durch das in der Reaktion entstehende Pyrophosphat und zerfallende Nukleotide (Produkthemmung).

Für die PCR-Reaktion wurde eine Kombination von 50 ng DNA, 5 pM jedes Primers (Biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland), 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0.001% Gelantine, 0,2 mM dNTP-Mix, Stabilisatoren und 0,75 U Taq DNA-

Polymerase eingesetzt (REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix, SIGMA, Saint Louis, USA). Der Tabelle 3 ist die genaue Sequenz der eingesetzten Primer zu entnehmen.

Tabelle 3: Übersicht aller verwendeten Primer; aus Asensi et al., 2006¹, Koeleman et al., 1994², Kara et al., 2003³, Bertina et al., 1994⁴, von Ahsen et al., 1999⁵.

Name	Variation		forward Primer	reverse Primer
PTGS1	G-1006A		CAGGTTTCACCTCTCCCACC	CCAAGATCACCCAAAGTCCCA
	R8W	rs1236913	CCGGTGGGGAATTTTCTTGG	GAGGGGAAAGGAGGGGGTTGA
	P17L	rs3842787	CCGGTGGGGAATTTTCTTGG	GAGGGGAAAGGAGGGGGTTGA
PTGS2	G-765C	rs20417	CGCCGCTTCTTTGTCCATC	TCCGTACCTTACCCCCTCT
eNOS	-786T/C	rs2070744	TGGAGAGTGCTGGTGTACCCCA	GCCTCCACCCACCCTGTC ¹
	E298D	rs1799983	GGCCCACTCCCACAGCTCT	CCCCCTCATCCCACCATCA
F5	G1691A	rs6025	CTTGAAGGAAATGCCCATTA ²	TGCCCAGTGCTTAACAAGACCA ⁴
MTHFR	C677T	rs1801133	TCATCCCTATTGGCAGTTAC	GCAAGTGATGCCCATGTGGTG ³
	A1298C	rs1801131	CTTTGGGGAGCTGAAGGACTACTA ³	CACCTTGTGACCATTCCGGTTG ³
Alox AP	HapAB	rs10507391	TTTGCATATTTTTTGAAGTCT	ACTATTTGTTTTAACTGTGA
	HapA	rs17222814	GAGTGGAAATCCATGTT	TAAGATGATTATTCTGACAGC
	HapB	rs17216473	CAAAGGTTAAGGCCGGG	GCACCACTATGCCCATC
CETP	Taq 1B	rs708272	GCAAACAGCCAGGTATAG	CCCCAACACCAAATATACAC
	A1061G	rs5882	CATGGGCATTTGATTGGC	GTGAAATGGGAAGCTCTGT
ApoE	Cys112Arg	rs429358	GTCCAAGGAGCTGCAGG	TCGCGGATGGCGCTGAG
	Arg158Cys	rs7412	GTCCAAGGAGCTGCAGG	TCGCGGATGGCGCTGAG
Prothrombin	G20210A	rs1799963	CCGCTGGTATCAAATGGG ⁵	CCAGTAGTATTACTGGCTTCTCCTG ⁵
LTA	252A/G	rs909253	TCTGTCACTCTATTGTCT	GAGAGAGATCGACAGAGAA
	804C/A	rs1041981	CCTCAACTCTGTTCTCC	GTGGATGTTTACCAATGAG
LPL	D9N	rs1801177	AATCAAGCAACCTCCAG	GGAATGAGGTGGCAAGTG
	S447X	rs328	GGTGATCTTCTGTTCTAGGG	ATGGGGTGAAGAGGGAATG
	N291S	rs268	TGCTTGAGTTGTAGAAAGAACC	TTACAACAGTCTCCAGCC

Bei der PCR folgten auf einen initialen Denaturierungsschritt (95°C, zwei Minuten), 35 Zyklen mit je 30 Sekunden Denaturierung (95°C), eine Minute Annealing der Primer (Primer abhängig) und eine Minute Extension bei 72°C. Im Anschluss an die 35 Zyklen folgte eine fünf Minuten andauernde Extension, die sicherstellte, dass alle Stränge vollständig amplifiziert worden waren (iCycler, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland).

Um die Proben auf dem Chip sichtbar zu machen, musste während des Amplifizierens Biotin in die DNA-Stränge eingebaut werden. Dies kann durch den Einsatz von Biotin-16-dNTPs oder durch Primer, die am 5'-Ende biotinmodifiziert sind, erfolgen (Metabion international AG, Martinsried, Deutschland).

REDTaq® ReadyMix™ ist nicht für die Reaktion mit Biotin-16-dNTP geeignet, da dieser ReadyMix™ schon Nukleotide enthält. In diesem Fall wurde für die PCR-Reaktion eine Kombination von 1x TrueStart™ Taq Puffer, 4 U TrueStart™ Taq DNA Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) und 5 µl Biotin-dNTP-Mix (je 1,25 µl 1 mM dATP, dCTP, dGTP, 0,94 µl 1 mM dTTP und 0,3 µl 1 mM Biotin-16-dUTP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)) eingesetzt.

Zur einfacheren Handhabbarkeit wurde für die PCR ein Multiplex-Ansatz entwickelt, der ermöglichte, dass in einem Reaktionsgefäß mehrere PCRs gleichzeitig stattfinden. Dies hatte den Vorteil, dass die 20 einzelnen PCRs in nur fünf Reaktionsansätzen durchgeführt werden konnten. Ein Ansatz bestand aus 2 µl DNA, 8 µl des jeweiligen Primermixes und 10 µl REDTaq® ReadyMix™. Die Annealing-Temperatur für den Primermix 1&5 betrug 60°C, für Mix 2&4 62°C und für Mix 3 64°C. Der Primermix 3 enthielt, wie der Tabelle 4 zu entnehmen ist, außerdem die Primer für CETP A1163G (fwd TCGAGGTAGTGTTCACAG, rev GCTTTGACTCACATCTC).

Tabelle 4: Zusammensetzung und Bedingungen der einzelnen Primermixe.

Primer-Mix	Mischung der Primer, jeweils forward+reverse Primer zu gleichen Teilen	Annealing-Temperatur	PCR-Produkt Menge/Chip
1	0,3 µl MTHFR A1298C, 0,6 µl PTGS1 G-1006A, 0,6 µl PTGS2 G-765C, 2,6 µl PTGS1 R8W+P17L 2,6 µl CETP Taq 1b, 1,3 µl eNOS -786T/C	60°C	4 µl
2	3,6 µl PCR H ₂ O, 1 µl F5 G1691A, 0,1 µl MTHFR C677T, 1 µl LPL S447X, 1 µl LPL D9N, 0,4 µl CETP A1061G, 1 µl MgCl ₂ , 1 µl eNOS E298D	62°C	4 µl
3	0,2 µl LPL N291S, 0,4 µl MgCl ₂ , 2 µl LTA 804C/A, 1,6 µl LTA 252A/G, 0,4 µl CETP A1163G, 0,8 µl Alox AP HapB, 2 µl Alox AP HapA, 2 µl Alox AP HapAB	64°C	4 µl
4	1,5 µl eNOS E298D, 1,5 µl LPL S447X, 3 µl Prothrombin G20210A, 3 µl MgCl ₂	62°C	4 µl
5	1,5 µl DMSO, 3 µl ApoE Cys112Arg+Arg158Cys, 4,5 µl PCR H ₂ O	60°C	6 µl

Für den anschließenden Chip-Versuch wurden jeweils 4 µl vom PCR-Produkt von Mix 1-4 eingesetzt sowie 6 µl von Mix 5.

3.2.1 Gelelektrophorese

Zur Visualisierung der PCR-Produkte wurde die Gelelektrophorese verwendet. Es wurde ein 1,25%iges Agarosegel angefertigt, wofür 0,63 g Agarose (Invitrogen™, Palsley, Schottland) in 50 ml TAE (0,4 M Tris Pufferan, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland; 0,01 M EDTA, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland; 0,2 M

Essigsäure, Carl Roth GmbH) in der Mikrowelle aufgelöst und anschließend mit 1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml, Carl Roth GmbH) versetzt wurden. Nach Abkühlung und Polymerisation wurde das Gel mit einem Plastischlitten in die, mit TAE geflutete, Gelelektrophoresekammer (Agagel Biometra®, biomed. Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland) überführt. Die PCR-Proben wurden zur Erhöhung ihrer Dichte mit Loading dye gemischt, sodass sie beim Auftragen auf das Gel in den Taschen blieben. Proben, deren PCR mit REDTaq® erfolgte, benötigten keinen weiteren Ladungspuffer, da dieser bereits im PCR-Mix enthalten war.

Anschließend wurde eine Spannungsquelle (Whatman PS 304 Biometra®, biomed. Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland) mit Gleichspannung von 90 V angelegt, sodass die DNA-Moleküle durch ihre negative Eigenladung zur Anode wanderten. Die Agarose des Gels und die Spannung bewirkten eine Auftrennung nach Molekülgröße. Zur Detektion der Fragmentlänge wurde ein Marker der Firma Fermentas verwendet (O'GeneRuler™ 50bp DNA Ladder). Die Detektion (Gel Doc 2000, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) erfolgte durch das im Gel enthaltene Ethidiumbromid, welches mit der DNA interkalierte und durch die Anregung mit UV-Licht fluoreszierte. Die Auswertung der Gelbilder erfolgte mit der Quantity one® Software (Version 4.2.3 Bio-Rad Laboratories GmbH).

3.3 PCR zur Mutagenese

Zur Etablierung des Mutations-Chips werden so genannte Referenzproben benötigt. Dies sind Proben, bei denen durch eine Sequenzierung nachgewiesen wurde, dass sie entweder das Wildtyp-Allel oder eine Mutation tragen. Mutationen, die nur mit einer geringen Wahrscheinlichkeit vorkommen, mussten künstlich erzeugt werden. Die gerichtete Mutagenese der DNA erfolgte mit modifizierten Primern, welche in der Mitte die gewünschte Mutation trugen (siehe Abbildung 2). Die Oligonukleotide wurden möglichst so konzipiert, dass die Fehlpaarung mindestens 10 Basenpaare vom Rand entfernt war, damit die Hybridisierung erfolgreich sein konnte (Grabowski, 2005). Komplementär zum ersten Primer (P2), der die Mutation trägt, wurde ein zweiter Primer (P3) benötigt. Die Reaktion fand jeweils mit einem mutierten und einem

äußeren Primer statt. In zwei unabhängigen Reaktionen wurden einmal die linke und einmal die rechte Hälfte amplifiziert. Anschließend wurde die beiden Produkte in einer dritten PCR durch Hybridisierung miteinander vereint, wobei das gewünschte mutierte PCR-Produkt entstand (Jansohn et al., 2007). Als DNA wurden für die dritte PCR überwiegend 1:10 verdünnte Produkte von PCR 1 und 2 eingesetzt.

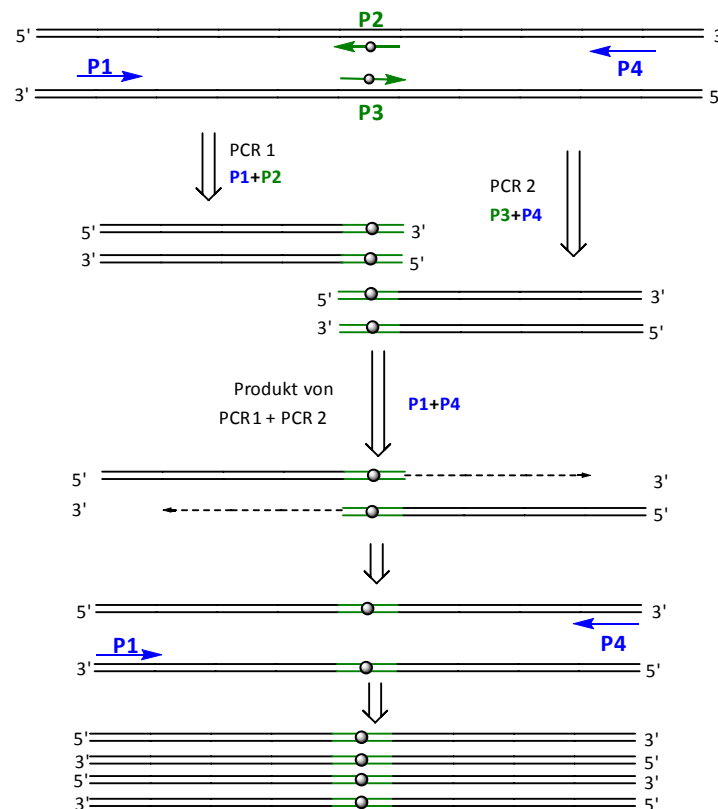


Abbildung 2: Ablauf der gerichteten Mutagenese zur Erzeugung von Referenzproben
(nach Grabowski, 2006).

Häufig wurden die PCR-Produkte vor dem erneuten Einsatz von Primern und anderen Störelementen gereinigt (siehe 3.3.1). Vereinzelt musste eine geringe Menge so genannter Matrizen-DNA eingesetzt werden, damit sich die Produkte an diese anlagern konnten. Teilweise wurde das Fünffache der normalen Primermenge eingesetzt oder die $MgCl_2$ -Konzentration erhöht. In Tabelle 5 sind die für die Mutagenese benötigten Primer P2 und P3 dargestellt. Als P1 wurde der forward Primer und als P4 wurde der reverse Primer der jeweiligen Mutation eingesetzt.

Tabelle 5: Überblick über die eingesetzten Mutagenese-Primer.

Gen	Variation	P2	P3
PTGS1	G-1006A	GGCAGGAGAGTTCAGAGGTTTC	GAACCTCTGAACTCTCCTGCC
	R8W	GAACAGCAAGAACCAGAGCAAG	GGAGTCTCTTGCTCTGGTTCTTGC
	P17L	GGGAGCGGCAGGAGC	TGCTCCTGCTCCTGCCG
PTGS2	G-765C	CTTGAAAGAGAGGGGGGAAAGG	CCTTTCCCCCTCTTTTCCAAGAAA CAAGGAGGGGGTGAAGGTACGGA
eNOS	-786T/C	GCAGGGTCAGCCGCCAGGGAAG	CTCTCCCTGGCCGGCTGACCCTGCC
	E298D	GAGTTCTGGGGATCATCTGGGGCC	CAGGCCCCAGATGATCCCCAGAACTCTTC
F5	G1961A	TCCCTGGACAGGCAAGGAATAC	GACAAAATACCTGTATTCCTTGCTGTC
Prothrombin	G20210A	TTGAGGCTTGCTGAG	ACTCTCAGCAAGCCTC
LPL	D9N	TTCGATGTTGATAAAATCTCTTCTTCTG GAAAGGAAAAATTGGATATGAGGTTAAC	GAAGAGATTTTATCAACATCGAA
	N291S	TAGAAAGAACCGCTGCAACAATCT GGGCTATGAGATCAGTAAAGTC	GCTATGAGATCAGTAAAGTC

Das PCR-Produkt wurde von störenden Nebenprodukten und Edukten befreit (siehe 3.3.1) und anschließend sequenziert. Die Sequenzierung zur Identifikation der erfolgreichen Mutagenese wurde von der Firma GENterprise Genomics durchgeführt (Gesellschaft für Genanalyse und Biotechnologie mbH, Mainz, Deutschland).

3.3.1 PCR-Aufreinigung

Das erhaltene PCR-Produkt wurde mit dem QIAquick® Gel Extraktion Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) von störenden Nukleotiden, Primern und anderen Fragmenten befreit. Dafür wurde PB1 Puffer in fünffacher Menge des aufzureinigenden PCR-Produkts eingesetzt. Dieser wurde mit dem PCR-Produkt vermischt und auf die QIAquick® Zentrifugationssäule gegeben. Bei 10000 rpm wurde die Probe eine Minute lang zentrifugiert, damit sich das Produkt an die Säule binden konnte. Das Filtrat wurde verworfen und 750 µl PE Puffer auf die Säule gegeben. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde die Flüssigkeit verworfen und die Säule durch Zentrifugation getrocknet (immer eine Minute, 10000 rpm). Die Säule wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 30 µl H₂O eine Minute lang inkubiert. Die DNA wurde durch Zentrifugation aus der Säule eluiert.

3.3.2 Gelextraktion

Bei der Mutagenese war das gewünschte Produkt häufig mit dem Edukt (Produkt von PCR 1 und 2) verunreinigt. Um diese voneinander zu trennen, wurde das Produkt über

ein 1,25%iges Gel aufgetrennt, die gewünschte Produkt-Bande aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem QIAquick® Gel Extraktion Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) aufgereinigt. QG Puffer wurde in dreifacher Menge des Gelstückes eingesetzt und zusammen mit diesem bei 50°C für zehn Minuten unter geringem Schütteln inkubiert, um das Gelstück aufzulösen. Anschließend wurde die Lösung auf die QIAquick®-Zentrifugationssäule gegeben, damit die DNA an sie binden konnte und für eine Minute bei 10000 rpm zentrifugieren. Nun wurden 500 µl QC Puffer eingesetzt, um sicherzustellen, dass das Gel vollständig von der Säule entfernt wurde. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden 750 µl PE Puffer hinzugegeben und zentrifugiert (immer eine Minute bei 10000 rpm). Das Filtrat wurde entfernt und die Säule erneut zentrifugiert. Zum Schluss wurde die Säule mit 30 µl H₂O für eine Minute inkubiert und das aufgereinigte DNA-Fragment durch eine einminütige Zentrifugation bei 10000 rpm erhalten.

3.4 FRET zur Detektion von Mutationen

Als qualitative Referenzmethode für den Mutations-Chip wurde die Real-Time PCR eingesetzt, bei der Mutationen mit Hilfe der FRET (Fluorescence resonance energy transfer)- Technik detektiert werden. Dabei handelt es sich um einen 1946 von Theodor Förster entdeckten Prozess, bei dem ein Fluoreszenzfarbstoff durch Licht angeregt wird. Dieser gibt die aufgenommene Energie nicht in Form von Fluoreszenz ab, sondern transferiert sie praktisch verlustfrei (über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen) auf einen zweiten benachbarten Farbstoff, der nur wenige Nanometer vom ersten entfernt ist. Diese zweite Komponente gibt die Energie in Form von langwelligerem Sekundärlicht ab. Voraussetzung für diesen Energietransfer ist, dass die beiden Farbstoffsysteme einen Überlappungsbereich in ihren Spektren aufweisen (Lottspeich et al., 2006).

Zur Identifikation der Mutation wurden zwei nebeneinander liegende Hybridisierungssonden verwendet, welche jeweils 3'- bzw. 5'- endmarkiert waren. Das FRET-System besteht aus einer am 3'-Ende mit Fluorescein (Donor-Fluorophor) und einer am 5'-Ende mit LC-RED Farbstoff (Akzeptor-Fluorophor) gekoppelten

Fluoreszenzsonde. Die beiden Komponenten geben in Lösung kein FRET-Signal ab. Lagern sie sich jedoch in der Annealing-Phase in unmittelbarer Nähe zueinander an das Amplifikationsprodukt an, wird ein Signal erzeugt (Lottspeich et al., 2006).

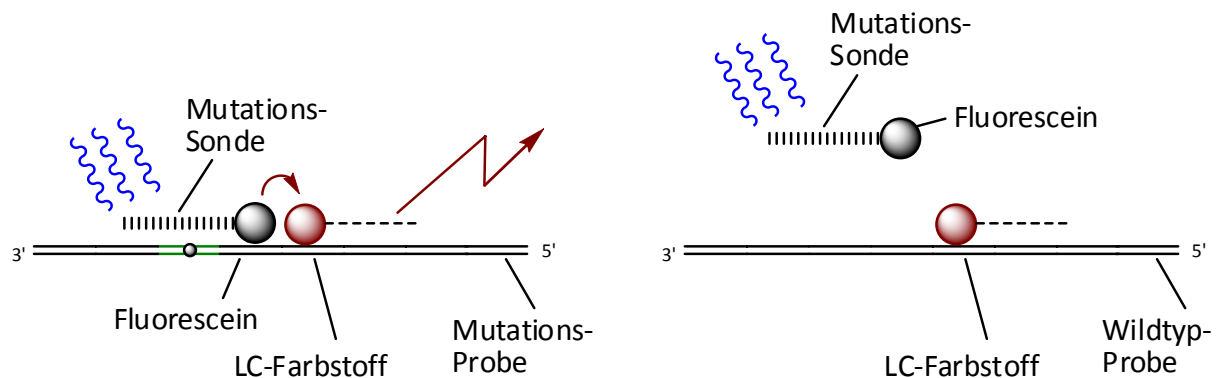


Abbildung 3: Funktionsprinzip der Hybridisierungs-Sonde.

In Abbildung 3 ist die Funktionsweise der Hybridisierungs-Sonde dargestellt. Die Mutations-Sonde bindet perfekt an die Mutations-Sequenz, wodurch Energie von Fluorescein auf den LC-Farbstoff übertragen wird und ein Signal zu erkennen ist (links), die Mutations-Sonde hingegen kann an die Wildtyp-Probe nicht perfekt binden, weswegen kein Energietransfer stattfindet und somit kein Fluoreszenzsignal sichtbar wird (rechts).

Die Allelunterscheidung erfolgt durch das Schmelzprofil, was nach der PCR-Amplifikation an der Zielsequenz durchgeführt wird. Bei der perfekten Bindung zwischen Sonde und DNA-Strang ist aufgrund der starken Bindungsenergie ein hoher Schmelzpunkt zu erkennen. Bei einer Fehlpaarung ist weniger Energie nötig, um die beiden Stränge voneinander zu trennen, was einen geringeren Schmelzpunkt zur Folge hat (Kück et al., 2005). Die Detektion der Mutation wurde mit dem LightCycler® 1.5 (Roche Diagnostics GmbH) durchgeführt. Das Gerät weist zwei verschiedene Farbkanäle auf, damit ist es möglich, in nur einem PCR-Ansatz simultan zwei verschiedene Variationen zu detektieren. Für die PCR-Reaktion wurde LightCycler® FastStart DNA MasterPlus HybProbe (Roche Diagnostics GmbH) eingesetzt, welche FastStart Taq DNA- Polymerase, Reaktion-Puffer, $MgCl_2$ und dNTP enthielt. Die verwendeten Sonden (3 pM) stammten von Tib Molbiol (Syntheselabor GmbH, Berlin,

Deutschland), es wurde 5 pM Primer eingesetzt. Die verwendeten Hybridisierungs-Sonden sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Verwendete Hybridisierungs-Sonden.

Name	Variation	Sonde	Anchor
PTGS1	G-1006A	LC Red 705-CAGGAGAGCT CAGAGTTCTTGT-Phosphate	GCCCCACAGTGGGGAAAGCC-Fluorescein
	R8W	LC Red 705-AGTCTCTTGTCCGGTTCTTG- Phosphate (Tib Molbiol)	GCCCTCATCTCTCCTCTGCAGG- Fluorescein (Tib Molbiol)
	P17L	CTGCTCCC GCCGCT-Fluorescein	LC Red 640-CCGTCCTGCTCGCGGACC- Phosphate
PTGS2	G-765C	LC Red 640-TTATGAGGAGAATTT ACCTTTCCCCCTC-Phosphate	ACTATTTACAGGGTAACTGCTTAGGACCAG- Fluorescein
eNOS	-786T/C	AAGCTCTCCCTGGCCGG-Fluorescein	LC Red 640- GACCCTGCCTC AGCCCTAGTCTC-Phosphate
	E298D	LC Red 705-AGAGTTCTGGGGGCTCATCTG- Phosphate	CCAGCTCGGGGGGCAGAAG-Fluorescein
F5	G1691A	GGCGAGGAATACAGGTAT-Fluorescein (Tib Molbiol)	LC Red 640-TGTCCTTGAAGTAACCTTTC AGAAATTCTG-Phosphate (Tib Molbiol)
MTHFR	C677T	GAGCCGATTCATCATCACGCAGC- Fluorescein	LC Red 640-TTCTTTGAGGCTGA CACATTCTCCGC-Phosphate
	A1298C	GCTGACCAGTGAAGCAAGTGTC- Fluorescein	LC Red 705-TGAAGTCTTTGTTCTT TACCTCTCGGGAGA-Phosphate
Alox AP	HapAB	LC Red 640-CTAATTAACCTCAATG TTGCAACCATAGACC-Phosphate	AAGATCCAGATGTATGTCCAAGCCTCTCTT GCAA-Fluorescein
	HapA	LightSNiP rs17222814 Alox5AP HapA, (Tib Molbiol)	
	HapB	TGCCTCAGCCTCCCACAG-Fluorescein Tib Molbiol	LC640-TGTGATTATAGGCATGAGCCACC GTGC—Phosphate (Tib Molbiol)
CETP	Taq 1b	LightSNiP rs708272 hu CETP Taq1b (Tib Molbiol)	
	A1061G	LightSNiP rs5882 hu CETP A1061G (Tib Molbiol)	
ApoE	Cys112Arg	CATGGAGGACGTGtGCG-Fluorescein	LC Red 640-CGCCTGGTGCAGTACCGCG- Phosphate
	Arg158Cys	GACCTGCAGAAGcGCCTG-Fluorescein	LC Red 705-AGTGTACCAGGCCGGGGC- Phosphate
Pro- thrombin	G20210A	LC Red 640-TCCCAGTGCTATTCATGGGC- Phosphate (von Ahsen et al., 1999)	CTCAGCGAGCCTCAATG-Fluorescein (von Ahsen et al., 1999)
LTA	252A/G	LC Red 640-GAGGAACCATGGC AGAAACAGAGAAT-Phosphate	GGGAGACAGAGAGAGACAGGAAGGG AACA-Fluorescein
	804C/A	LC Red 705-AGCACCTCAAACCTGCTG- Phosphate	CAGCACCCCAAGATGCATCTTGCCC- Fluorescein
LPL	D9N	LightSNiP rs1801177 hu LPL D9 (Tib Molbiol)	
	S447X	GCCATGACAAGTCTCTGAATAAGAA GTCAGG-Fluorescein	LC Red 640-GGTGAGCATTCTGG GCTAAAGCTGACT-Phosphate
	N291S	CTTTTGCTCTGACTTTACTGATCTCA- Fluorescein (Tib Molbiol)	LC640- AGCCAGATTGTTGCAGCG GTTCTT-Phosphate (Tib Molbiol)

In einigen Fällen wurde ein fertiges LightSNiP-Kit der Firma Tib Molbiol verwendet. In diesen Fällen war der Primer bereits im Kit enthalten (1 µl Reaktionsmischung/Ansatz).

Sonst wurden die in Tabelle 3 dargestellten Primer verwendet. Die einzige Ausnahme bildete PTGS1 R8W & P17L, wo die Primer forward TTTCTTGGCCTCCTGGT und reverse TTCCCTTGGGGAGGGAT eingesetzt wurden. Einige Hybridisierungs sonden wurden von Tib Molbiol entwickelt, in diesen Fällen steht hinter der Sequenz der Name der Firma.

Tabelle 7: Light Cycler®-Protokoll mit Schmelzkurve;
X und Y sind in Tabelle 8 variationsabhängig angegeben.

Zyklen	Schritt		Temperatur [°C]	Zeit [sec]	Rate [°C/s]
1	Denaturierung	Aktivierung	95	600	20
45	Amplifikation	Denaturierung	95	10	20
		Extension	72	Y	20
1	Schmelzkurve	Denaturierung	95	20	20
		Detektion	40	20	20
			80	0	0.2
1	Kühlen	Kühlen	40	30	20

Nach einem Vorinkubationsschritt, bei dem die DNA denaturiert und die Polymerase aktiviert wurde (95°C, zehn Minuten), folgte die Amplifikation der Probe. Diese bestand aus 45 Zyklen, Denaturierung (95°C, zehn Sekunden), Anlagerung der Primer (abhängig vom Primer, zehn Sekunden) und Extension (72°C, amplifikatgrößenabhängig). Abschließend wurde zur Mutationsdetektion die Schmelzkurve von 40-80°C bestimmt und die Proben auf 40°C abgekühlt (Tabelle 7).

Die genaue Anlagerungstemperatur und Extensionszeit der einzelnen Variationen ist in Tabelle 8 dargestellt. Bei F5 G1691A und LPL S447X wurden die Amplifikationszyklen auf 35 reduziert. In Tabelle 8 ist ebenfalls angegeben, wann einem PCR-Ansatz zusätzliche Additive wie MgCl₂ oder DMSO zugesetzt werden mussten. Bei Prothrombin wurden 55 Zyklen zur Amplifikation benötigt. Dazu wurde folgendes Programm verwendet: null Sekunden bei 94°C Denaturierung, fünf Sekunden bei 50°C Anlagerung und fünf Sekunden bei 72°C Extension (aus von Ahsen et al. 1999).

Um zwei verschiedene Farbstoffe in einer Kapillare messen zu können, wurde eine Farbkompensation mit dem LightCycler® Color Compensation Set von Roche durchgeführt.

Tabelle 8: Übersicht der variationsabhängigen Anlagerungstemperatur und Extensionszeit.

Name	Variation		X	Y	Sonstiges
PTGS1	G-1006A	G>A	60°C	11 sec	
	R8W	C>T	60°C	7 sec	
	P17L	C>T	60°C	7 sec	
PTGS2	G-765C	G>C	60°C	11 sec	
eNOS	-786T/C	T>C	62°C	11 sec	
	E298D	G>T	62°C	11 sec	
F5	G1691A	G>A	58°C	11 sec	35 Zyklen
MTHFR	C677T	C>T	58°C	11 sec	
	A1298C	A>C	58°C	11 sec	
Alox AP	HapAB	T-A	64°C	7 sec	2 µl MgCl ₂
	HapA	G>A	58°C	15 sec	
	HapB	G>A	62°C	7 sec	
CETP	Taq 1b	G>A	58°C	15 sec	
	A1061G	A>G	58°C	15 sec	
ApoE	Cys112Arg	T>C	60°C	11 sec	2 µl DMSO
	Arg158Cys	T>C	60°C	11 sec	2 µl DMSO
Prothrombin	G20210A	G>A	50°C	5 sec	Anderes Protokoll
LTA	252A/G	A>G	63°C	7 sec	
	804C/A	C>A	63°C	7 sec	
LPL	D9N	G>A	58°C	15 sec	
	S447X	C>G	62°C	8 sec	1 µl MgCl ₂ , 35 Zyklen
	N291S	A>G	62°C	7 sec	

3.5 Mutations-Chip

Bei dem verwendeten Mikroarray handelt es sich um ein innovatives System, das von der Firma Alere Technologie GmbH (Jena, Deutschland) entwickelt wurde. Auf diesem 3x3 mm-Chip wurden 20 µM des jeweiligen Sondenmoleküls (Metabion international AG), welches spezifisch an die nachzuweisenden Targets bindet, durch Epoxidbindung immobilisiert. Die Sequenzen der eingesetzten Sonden sind in Anhang 1 aufgeführt. Der Chip besteht aus Borosilicatglas (Schott Glas GmbH, Jena, Deutschland) und ist in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß integriert, indem alle notwendigen Detektion-Reaktionen stattfinden können (Abbildung 4, links). Die anschließende Nachweisreaktion erfolgt über ein grünes Präzipitat, das in einem optischen Reader ausgelesen wird (dargestellt in Abbildung 4, rechts). Auf der Oberfläche des Chips sind vier Cr/Ni-Metallmarker

(MEAS, Dortmund, Deutschland), welche für die Ausrichtung der Chips bei der späteren Auswertung benötigt werden. Des Weiteren enthält der Chip Biotinmarker, dabei handelt es sich um biotinylierte Oligonukleotide, die als Kontrolle der Nachweisreaktion dienen.

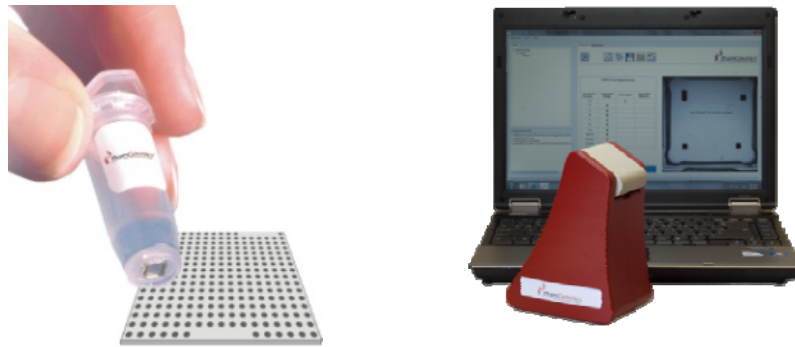


Abbildung 4: Mikroarray integriert in 1,5 ml Reaktionsgefäß (links). Chip-Reader mit Auswertungs-Software (rechts) (mit freundlicher Genehmigung der Pharmgenomics GmbH).

Diese Array-Technik basiert auf der Watson-Crick-Basenpaarung, wobei sich zwei komplementäre Einzelstränge über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Purin- und der Pyrimidin-Base zusammenlagern. Der Vorteil ist, dass eine Probe gleichzeitig mit mehreren Sonden untersucht werden kann (Lockhart et al., 2000).

Bei diesem Verfahren hybridisiert die zu analysierende Probe mit den an definierten Positionen auf dem Trägermaterial angebrachten Sonden. Die Sonden sind kurze Oligonukleotide, welche 3'-aminomodifiziert sind und eine spezifische Sequenz, komplementär zu dem zu untersuchenden Gen, tragen. Nach Entfernung der unspezifisch gebundenen Nukleinsäuren werden die noch freien Stellen blockiert.

Der Nachweis erfolgt über ein indirektes Indikatorsystem, bei dem Streptavidin an die zu analysierenden biotinylierten Nukleinsäuren bindet (aus *Streptomyces avidinii*) (Luttman et al., 2006). Streptavidin besitzt vier hoch affine Bindungsstellen für Biotin, was zu einer Signalverstärkung führt (Lottspeich et al., 2006). Zusätzlich ist es mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert (Poly-HRP-Streptavidin), welche O-Dianisidin in ein grünes Präzipitat spaltet. Das Hybridisierungsmuster wird in einem optischen Reader ausgelesen. Die Funktionsweise der Mutationschips ist in Abbildung 5 anhand einer Wildtyp-DNA dargestellt. Das Prinzip des Mutations-Chips beruht darauf, dass die Fragmente entsprechend ihrer Identität mit einer hohen Affinität an der passenden

Sonde binden. Durch anschließende Waschschritte werden alle nicht perfekt gebundenen Fragmente entfernt. Der anschließende Nachweis der biotinmarkierten Probe erfolgt mit dem HRP-Nachweissystem.

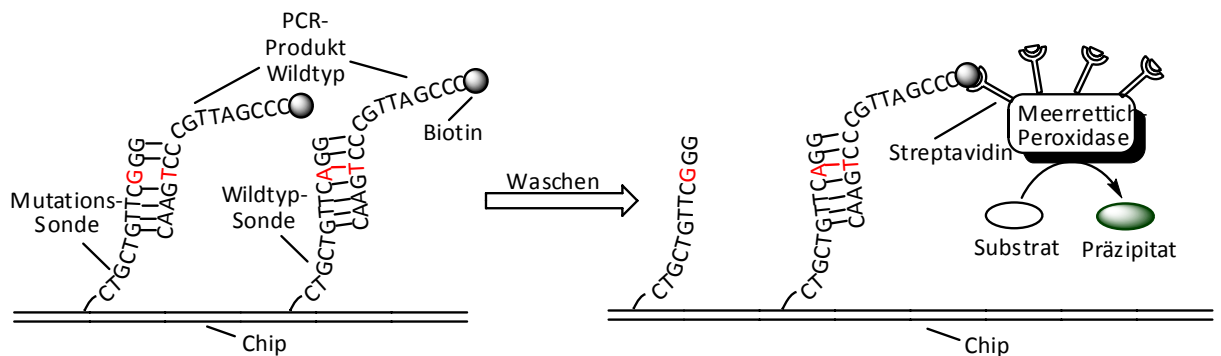


Abbildung 5: Funktionsprinzip des Mutations-Chips.

Aus dem Blut der zu untersuchenden Person wurde wie bereits in 3.1 beschrieben die DNA extrahiert und die interessanten Gen-Abschnitte mit Hilfe der Multiplex-PCR vermehrt. Diese biotinylierten PCR-Produkte wurden an die allel-spezifischen, synthetisch hergestellten Oligonukleotide auf einem Chip hybridisiert, der sowohl Sonden für den Wildtyp als auch für die mutierte Sequenz aufwies.

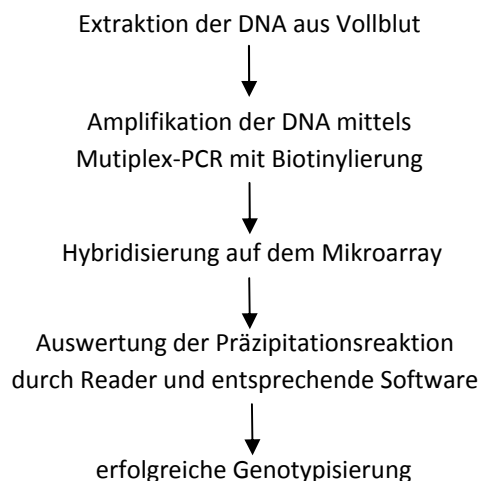


Abbildung 6: Vorgehensweise des Mutationschips

Eine eindeutige Genotypisierung wird durch die Analyse der Präzipitationsreaktion möglich (siehe Abbildung 6).

Für die Durchführung des Chips wurden verschiedene Puffer benötigt, welche sich wie folgt zusammensetzen:

Hybridisierungspuffer

250 mM Na_2HPO_4 , pH= 7,2 (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) + 4,5% SDS (Natriumdodecylsulfat, Carl Roth GmbH) + 1 mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) + 1x SSC (Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer, AppliChem GmbH)

Waschpuffer (WP) 1

2x SSC + 0,01% Triton X100 (SIGMA, Saint Louis, USA)

Waschpuffer 2

2x SSC

Waschpuffer 3

0,2x SSC

HRP-Streptavidin Enzym-Mix

1:100 Poly-HRP-Streptavidin (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland)+ 6x SSPE (NaCl + Na_2HPO_4 + EDTA, AppliChem GmbH)

Blocking Mix

2% Blocking-Reagent (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland) + 6x SSPE + 0,005% Triton X100; zum Lösen bei 62°C inkubieren

3.5.1 Durchführung

Im ersten Schritt wurde der Chip mit 500 μl H_2O bei 550 rpm leicht horizontal geschüttelt (fünf Minuten, RT=Raumtemperatur), anschließend wurde das Wasser entfernt und mit 500 μl Hybridisierungspuffer gewaschen (fünf Minuten, 550 rpm, RT). Währenddessen wurden die Biotin-Proben für zwei Minuten bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt, um die Doppelstränge aufzubrechen. Der Puffer wurde entfernt und

die mit 100 µl Hybridisierungspuffer verdünnten Proben auf den Chip geben. Nun folgte die Hybridisierung bei 48°C für 45 Minuten (550 rpm schütteln), bei der sich die Biotin-Proben an die Sonden (Metabion international AG) des Chips anlagerten. Nach der Hybridisierung waren drei Waschschritte erforderlich. Es wurde jeweils fünf Minuten (550 rpm schütteln, 48°C) mit 500 µl WP 1, dann mit 500 µl WP 2 und anschließend mit 500 µl WP 3 gewaschen. Nach dem Waschen wurden die noch freien Sonden mit Milchpulver abgestoppt, indem 100 µl Blocking-Mix für 15 Minuten bei 550 rpm und RT auf den Chip gegeben wurden. Nach Entfernung der Blockierungslösung wurden 100 µl des HRP-Streptavidin Enzym-Mixes für 15 Minuten, 550 rpm schütteln bei RT inkubiert. Im Anschluss daran folgten mehrere Waschschritte, bei denen der Waschpuffer jeweils fünf Minuten inkubiert wurde (550 rpm schütteln, RT). Erst wurde mit 500 µl WP 1 dann mit 500 µl WP 2 und abschließend mit 500 µl WP 3 gewaschen. Zum Schluss wurde die Farbreaktion durchgeführt. Dafür wurden 100 µl SeramunGrün® (O-Dianisidin, Seramun Diagnostica GmbH, Heidesee, Deutschland, RT, kurz vorher 15 Sekunden bei 5000 rpm zentrifugiert) hinzugefügt und der Chip nach fünf Minuten mit dem ATR-01-Reader (Alere Technologie GmbH) ausgelesen. Die resultierenden Signale wurden mit Hilfe der Partisan Icono Clust-Software von Alere Technologie analysiert. Dabei wurde von der Software für alle detektierten Signale eine lokale Hintergrundkorrektur durchgeführt. Diese Vorgehensweise gilt als Ausgangspunkt für die Chip-Durchführung. In 4.5.2 wird beschrieben, welche Anpassungen vorgenommen wurden, um zum finalen Protokoll zu kommen.

3.5.2 Verbesserte Durchführung

Die Mikroarrays wurden in Kombination mit dem Hybridisations-Kit der Firma Alere Technologie eingesetzt. Alle im Folgenden beschriebene Lösungen stammen aus diesem Kit.

Zuerst wurde 500 µl H₂O vorsichtig, ohne den Boden zu berühren, in den Mikroarray pipettiert. Nach anschließendem Mischen (4x hoch und runter pipettieren) wurde es wieder entfernt und 100 µl C1 Puffer auf den Chip gegeben. Dieser Puffer wurde dann für zwei Minuten bei 50°C (550 rpm) im Thermomixer inkubiert. Parallel dazu wurden die biotinylierten PCR-Proben zwei Minuten bei 95°C denaturiert. Der C1 Puffer wurde

vom Chip entfernt und die denaturierten Proben mit 90 µl C1 gemischt und bei 50°C (550 rpm) auf dem Chip hybridisiert.

Nach 45 Minuten wurde die Probe entfernt und zweimal mit 200 µl C2 für fünf Minuten bei 50°C gewaschen (550 rpm). Für das Enzym wurde 1 µl C3 und 99 µl C4 gemischt und für zehn Minuten bei 30°C auf den Chip inkubiert (550 rpm). Das Enzym wurde entfernt und zweimal mit 200 µl C5 gründlich gewaschen. Genau fünf Minuten nach Zugabe des D1 Substrats (100 µl) wurde der Chip im Reader ausgelesen und die resultierenden Daten mit der Partisan Icono Clust Software ausgewertet.

3.5.3 Vorgehen bei der Validierung

Bei der Validierung musste gezeigt werden, dass der Nachweis der Mutationen mit dem Chip funktioniert. Für die Leistungsbewertungs-Prüfung wurden fünf DNA-Proben an drei verschiedenen Tagen mit Hilfe des Chips analysiert. Der tatsächliche Genotyp der DNA-Proben wurde zuvor mit dem LightCycler ermittelt.

Für die Leistungsbewertung mit Referenzproben musste jede dieser Referenzprobe einzeln amplifiziert werden. Dafür wurden 2 µl DNA mit 2 µl Primer, 6 µl PCR H₂O und 10 µl REDTaq™ Polymerase gemischt. Alle Referenzproben wurden entsprechend ihrer Allel-Zugehörigkeit gepoolt. Dafür wurden jeweils 5 µl des PCR-Produktes für jede Variation miteinander gemischt (jeweils eine Mischung für Wildtyp, eine für Heterozygote und eine für die Mutanten). Dabei wurde die doppelte PCR-Produktmenge für HapAB, R8W+P17L, Cys112Arg+Arg158Cys, 252A/G und 804C/A und die halbe PCR-Produktmenge für C677T eingesetzt. Da P17L und R8W in einem PCR-Produkt lagen, wurde in den Wildtyp-Mix das PCR-Produkt von P17L-Mutante R8W-Wildtyp und in den Mutanten-Mix das PCR-Produkt von P17L-Wildtyp R8W-Mutante gegeben. Der anschließende Chip-Lauf wurde von drei verschiedenen Personen an drei verschiedenen Tagen durchgeführt. An jedem Tag fand der Test mit drei Chips (mit jeweils einem PCR-Produkt-Mix) statt. Dafür wurden jeweils auf einen Chip 20 µl des PCR-Produkt Wildtyp-Mixes, 14 µl des PCR-Produkt heterozygoten Mixes und 18 µl des PCR-Produkt Mutanten-Mixes gegeben.

Dass bei einer sachgemäßer Lagerung und Transport die Funktionalität des Tests gewährleistet ist, wurde in einem Stabilitätstest gezeigt. Dafür wurden vier Chargen an unterschiedlichen Tagen hergestellt und nach zwei Monaten auf ihre

Funktionsfähigkeit überprüft. Mit der vierten Charge wurde ein zweitägiger Transport-Test durchgeführt, bei dem in Anschluss alle Bestandteile getestet wurden.

Der Einfluss von unterschiedlich alten DNAs auf die Funktionalität des Tests wurde des Weiteren überprüft. Dafür wurde drei Jahre altes Blut, drei Jahre alte DNA, die öfters aufgetaut und wieder eingefroren wurden und ein Monat alte DNA mit aus frischem Blut isolierte DNA verglichen.

4 Ergebnisse

Die Erbinformation weist an vielen Stellen individuelle Variationen auf, welche von Mutationen hervorgerufen werden, die zu keinem negativen Selektionsdruck führen. Dadurch kommt es zu Anreicherungen von Sequenzvariationen im Genom. Sobald ihre Häufigkeit über ein Prozent im Genpool liegt, werden sie als Polymorphismen bezeichnet. Unter SNP (Single Nucleotide Polymorphism) versteht man die Variation von einem einzelnen Basenpaar in einem DNA-Strang, welches unregelmäßig im Genom verteilt ist und meist in der nicht-kodierten Sequenz liegt. Es besteht der Verdacht, dass SNPs mit Krankheiten und Medikamentenunverträglichkeiten assoziiert sind (Wrba et al., 2007). Durch Genotypisierung ist die Erfassung der genetischen Prädisposition für bestimmte Krankheiten möglich. Das Ziel der Arbeit war die erfolgreiche Entwicklung eines Biochips zur Detektion genetischer Faktoren, die im Zusammenhang mit einem erhöhten Atheroskleroserisiko stehen.

4.1 Selektion der Marker

In einer ausführlichen Literatur- und Datenbankrecherche wurden SNPs ausgewählt, die laut Literatur mit dem Auftreten von Atherosklerose assoziiert sein könnten. Für diese komplexe Krankheit gibt es eine Vielzahl an Ursachen und Risikofaktoren und es findet ein Zusammenwirken von einer genetischen Prädisposition mit exogenen Risikofaktoren statt. Generell treten diese verschiedenen genetischen Varianten in den diversen Populationen mit unterschiedlicher Frequenz auf, was zu Widersprüchen beim Vergleich von genetisch-epidemiologischen Studien führt und die Auswahl von möglichen Kandidaten erschwert (Schmitz et al., 2008). Ein Polymorphismus allein führt selten zu einem erhöhten Erkrankungsrisiko, da die atheroskleroseassoziierten SNPs aber mit hoher Koinzidenz auftreten, kann dies das Risiko entscheidend erhöhen (Gerok et al., 2007).

Nach gründlicher Recherche wurden SNPs der Gene Prostaglandinsynthase-1 und 2 (PTGS1 und PTGS2), Endotheliale NO-Synthase (eNOS), Faktor V (F5), 5,10-Methylen-

tetrahydrofolsäure-Reduktase (MTHFR), Cholesterinester-Transferprotein (CETP), Apolipoprotein E (ApoE), Prothrombin (F2), Lymphotoxin- α (LTA), Arachidonat-5-Lipoxygenase-aktivierendes Protein (Alox AP) und Lipoproteinlipase (LPL) ausgewählt.

4.2 Etablierung von polymorphismenspezifischen PCRs

Die Mutationen der definierten Zielgene wurden in den entsprechenden Nukleotidsequenzen identifiziert. In bestimmten Genabschnitten lagen die interessanten SNPs in unmittelbarer Nähe zueinander, weshalb die Primer so gewählt wurden, dass diese SNPs zusammen amplifiziert werden konnten. Dies war der Fall bei PTGS1 P17L und R8W sowie bei ApoE (Cys112Arg und Arg158Cys). Für alle Polymorphismen wurden flankierende Primer konzipiert und anschließend ein PCR-Verfahren zur Amplifikation der zu untersuchenden Genabschnitte entwickelt (Tabelle 9).

Tabelle 9: Übersicht der Anlagerungstemperaturen der einzelnen Variationen.

Name	Variation	Anlagerung	Sonstiges
PTGS1	G-1006A	60°C	
	R8W+ P17L	60°C	
PTGS2	G-765C	60°C	
eNOS	-786T/C	62°C	
	E298D	62°C	
F5	G1691A	58°C	
MTHFR	C677T	60°C	
	A1298C	58°C	
	HapAB	64°C	
Alox AP	HapA	62°C	
	HapB	62°C	
	Taq 1b	64°C	
CETP	A1061G	60-64°C	
ApoE	Cys112Arg+Arg158Cys	60°C	2 μ l DMSO
Prothrombin	G20210A	62°C	
LTA	252A/G	64°C	2 μ l MgCl ₂
	804C/A	61°C	
LPL	D9N	64°C	
	S447X	64°C	
	N291S	64°C	

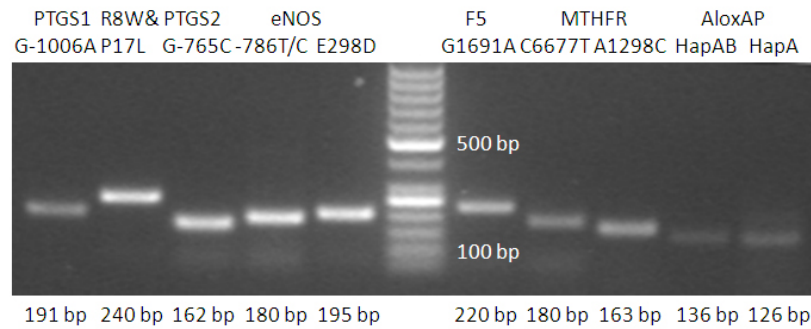


Abbildung 7: Agarose-Gele von zehn zu untersuchten Atherosklerose-SNPs.

Für den PCR-Ansatz der ApoE Probe wurde anstelle von 2 μ l H₂O, 2 μ l DMSO eingesetzt. Bei LTA 252A/G wurde anstelle von 2 μ l H₂O 2 μ l MgCl₂ verwendet. Die entwickelten PCR-Protokolle wurden mittels Gelelektrophorese überprüft. Die einzelnen Produkte wurden aufgrund ihrer zu erwartenden Amplifikatlänge identifiziert, welche unterhalb des Gelbildes angegeben sind (Abbildung 7 und 8).

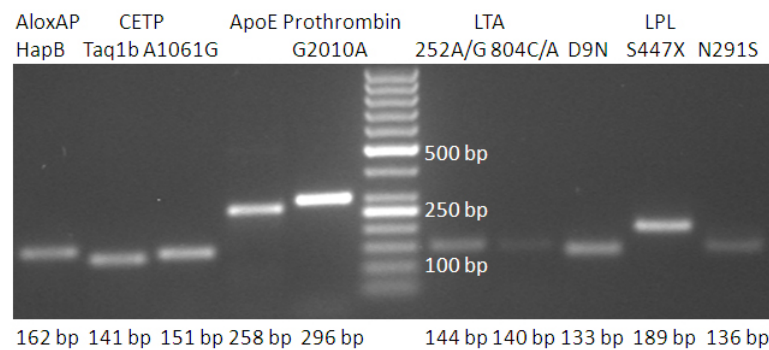


Abbildung 8: Agarose-Gele von zehn anderen zu untersuchten Atherosklerose-SNPs.

4.3 Herstellung von Referenzproben

Zur Kalibration der Chip-Sonden wurden Referenzproben für die einzelnen Variationen benötigt. Diese wurden für den allelspezifischen Nachweis der jeweiligen Mutation hergestellt. Ebenso wurden sie für die Etablierung des Referenzmesssystems mit dem LightCycler eingesetzt. Die Referenzproben für die Wildtyp-Allele konnten aus Probandenproben durch eine einfache PCR generiert werden. Aufgrund der teilweise sehr niedrigen Prävalenz der Mutations-Allele wurden diese Referenzproben über zielgerichtete Mutagenese hergestellt (siehe 3.3). Die Herstellung der Referenzproben

erfolgte in zwei hintereinander folgenden PCR-Reaktionen, deren Produkte dann anschließend in einer dritten PCR-Reaktion miteinander fusioniert wurden.

Tabelle 10: Bedingungen zur Referenzprobenherstellung durch zielgerichtete Mutagenese.

Gen	Variation	PCR 1+PCR 2	Fusion (PCR 3)
PTGS1	G-1006A	beide 60°C, Produkte aufgereinigt	5x Primer bei 60°C, Produkt aus Gel
	R8W	beide 58°C	1 µl DMSO bei 60°C, Produkt aus Gel
	P17L	beide 58°C, Produkte aufgereinigt	5x Primer bei 60°C, 2 µl DMSO, Produkt aus Gel
PTGS2	G-765C	60°C, Produkte aufgereinigt + Fragment P3	1:10 verdünnte Edukte 5x Primer bei 60°C, 1 µl 1:10 DNA
eNOS	-786T/C	62°C + 60°C	5x Primer bei 64°C, 1 µl 1:1 Million DNA
	E298D	beide 64°C	5x Primer bei 66°C
F5	G1961A	beide 56°C, Produkte aufgereinigt	60°C, Produkt aus Gel
Prothrombin	G20210A	beide 64°C + 2 µl MgCl ₂	1:10 verdünnte Edukte bei 63°C
LPL	D9N	Fragment P2 + 64°C	1:10 verdünnte Edukte bei 64°C
	N291S	Fragment P2 + 64°C	1:10 verdünnte Edukte bei 64°C

Tabelle 10 gibt Einblick in die genauen Bedingungen, die zu einer erfolgreichen künstlichen Mutagenese führten. Die angegebenen Temperaturen beziehen sich auf die Anlagerungsphase der PCR.

Bei PTGS1 G-1006A, P17L, PTGS2 und F5 wurde das Produkt von PCR 1 und 2 vor dem Einsatz bei der Fusion durch Aufreinigung von störenden Nebenprodukten befreit. Da auf dem Gel des Fusionsproduktes noch weitere Nebenprodukte zu erkennen waren, wurde die gewünschte Produktbande aus dem Gel ausgeschnitten (Extraktion nach 3.3.2). Teilweise wurde für die anschließende Fusion die fünffache Menge der normalen Primerkonzentration eingesetzt oder die Produkte aus PCR 1 und 2 wurden vor Verwendung 1:10 verdünnt.

Bei PTGS2 und LPL war eines der erwarteten Fragmente von PCR1 oder 2 unter 80 bp, sodass dieses Fragment als Oligonukleotid gekauft wurde. Alle Referenzproben wurden anschließend sequenziert und auf die gewünschten SNPs überprüft. Letztendlich konnten alle erforderlichen Wildtyp-Referenzproben in Probandenproben gefunden werden.

Für einige Polymorphismen konnten Heterozygote ebenfalls in Probandenproben identifiziert werden und für fast alle Mutationen konnte eine entsprechende Referenzprobe hergestellt werden (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Überblick über die erfolgreich entwickelten Referenzproben.

Gen	Variation	Referenzproben
PTGS1	G1006A	Wildtyp + Heterozygot + Mutation
	R8W	Wildtyp + Mutation
	P17L	Wildtyp + Mutation
PTGS2	G-765C	Wildtyp + Mutation
eNOS	-786T/C	Wildtyp + Heterozygot + Mutation
	E298D	Wildtyp + Heterozygot + Mutation
F5	G1691A	Wildtyp + Heterozygot + Mutation
MTHFR	C677T	Wildtyp + Heterozygot + Mutation
	A1298C	Wildtyp + Heterozygot + Mutation
Alox AP	HapAB	Wildtyp + Mutation
	HapA	Wildtyp + Heterozygot + Mutation
	HapB	Wildtyp + Heterozygot
CETP	Taq 1b	Wildtyp + Heterozygot + Mutation
	A1061G	Wildtyp + Heterozygot + Mutation
ApoE	Cys112Arg	Wildtyp + Heterozygot + Mutation
	Arg158Cys	Wildtyp + Heterozygot + Mutation
Prothrombin	G20210A	Wildtyp + Mutation
LTA	252A/G	Wildtyp + Heterozygot + Mutation
	804C/A	Wildtyp + Mutation
LPL	D9N	Wildtyp + Mutation
	S447X	Wildtyp + Heterozygot
	N291S	Wildtyp + Mutation

4.4 Entwicklung eines Referenzsystems zur Detektion der SNP

Um Punktmutationen detektieren zu können, wurde der LightCycler von Roche als Referenzsystem eingesetzt. Dafür wurden zwei Oligonukleotid-Sonden benötigt. Sobald diese in räumlicher Nähe zueinander mit der Zielsequenz hybridisieren, findet ein Energietransfer zwischen den beiden Sonden statt (FRET). Eine Fluoreszenz-Emission ist messbar und die anschließende Analyse einer Schmelzkurve des PCR-Produktes ermöglicht es, die Proben zu identifizieren.

Die Etablierung eines Nachweissystems erfolgte mit den zuvor hergestellten Referenzproben. Exemplarisch ist im Folgenden eine Schmelzpunkt-Analyse von ApoE Cys112Arg und F5 G1691A dargestellt (Abbildung 9).

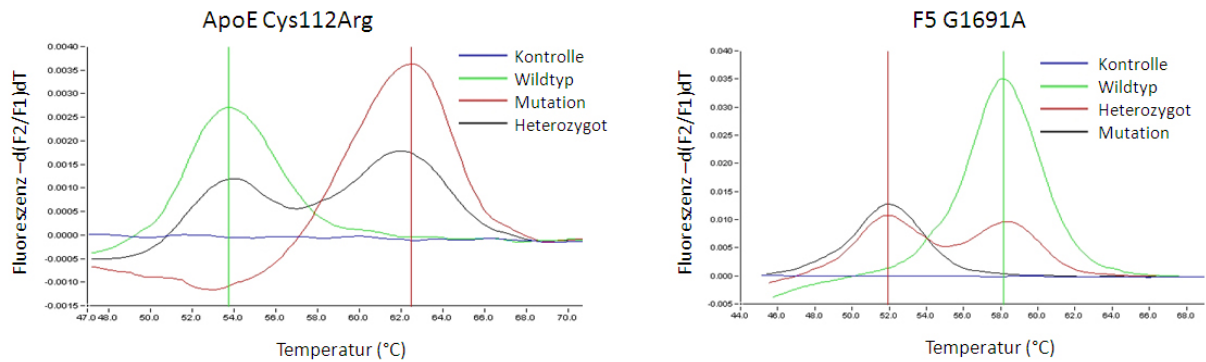


Abbildung 9: Schmelzkurve von ApoE (links) und F5 (rechts)

Mit Wildtyp-, heterozygote- und Mutations-Probe.

Die Hybridisierungs sonden für ApoE Cys112Arg wurden für die Mutante konzipiert und haben aufgrund der perfekten Bindung mit der Mutante einen höheren Schmelzpunkt. Der erste Peak in der ApoE-Schmelzkurve ist bei etwa 54°C und stammt von der Wildtyp-DNA. Die Schmelzkurve der Mutante hat, wie zu erwarten, ein höheres Maximum (bei 62°C), was auf die höhere Bindungsenergie zurückzuführen ist. Die dritte Schmelzkurve resultiert von einer heterozygoten Referenzprobe, welche einen Peak bei 54°C und einen bei 62°C aufweist. Die Negativkontrolle (enthält keine DNA) beweist eine kontaminationsfreie Reaktion (Nulllinie). Im Gegensatz zu ApoE wurden die F5-Hybridisierungssonden für die Wildtypprobe konzipiert, was sich in einem geringeren Schmelzpunkt für die Mutante (52°C) und einem höheren (58°C) für den Wildtyp bemerkbar macht. Auch hier zeigt die heterozygote Probe zwei Peaks und die Negativkontrolle weist nach, dass keine Kontaminationen vorhanden sind.

Zur Analyse von unbekanntem Probandenproben wurden nun die Schmelzkurven der Referenzproben mit denen der unbekanntem DNA-Proben verglichen. In Abbildung 10 sind Schmelzkurven für MTHFR A1298C (links, Hybridisierungssonden für Mutation konzipiert) und Prothrombin G20120A (rechts, Hybridisierungssonden für Wildtyp konzipiert) von einigen DNA-Proben dargestellt.

Eine 1298A Wildtyp-Probe erzielt einen Schmelzpunkt von 59°C, während durch und die entsprechende Mutanten-Probe (1298C) ein Schmelzpunkt von 68°C erreicht wird. Eine heterozygote Probe weist Maxima bei beiden Temperaturen auf, womit jede unbekanntem Probe eindeutig bestimmt werden kann. Die Schmelzkurven von Prothrombin haben ihren Peak bei 56°C (Mutation) und 62°C (Wildtyp).

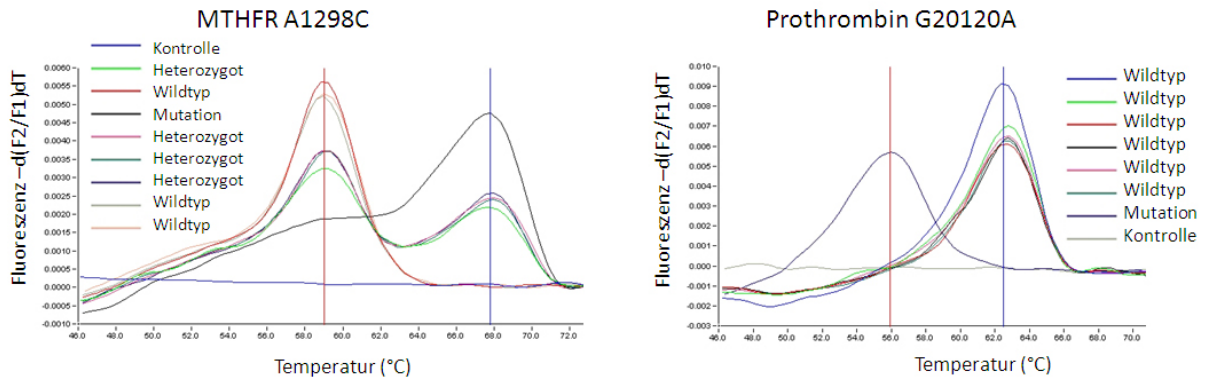


Abbildung 10: Schmelzkurve von MTHFR (links) und Prothrombin (rechts) mit unbekannten Probandenproben.

Neben den Hybridisierungssonden wurden auch LightSNiP-Kits der Firma Tib Molbiol eingesetzt. Die Graphen der Schmelzkurvenanalyse sind in der folgenden Abbildung 11 dargestellt.

Die aus dem LightSNiP-Kit resultierenden Schmelzkurven verlaufen analog zu denen der Hybridisierungssonden. Der Hersteller gibt die verwendeten Sequenzen der Sonden nicht an. Es ist aber dem Ergebnis zu entnehmen, dass die HapA-Sonden für Mutanten (links) und die Taq 1b-Sonden für den Wildtyp entwickelt wurden (rechts). Auch hier ist eine eindeutige Bestimmung der Probandenproben nach Wildtyp, Heterozygote und Mutante möglich.

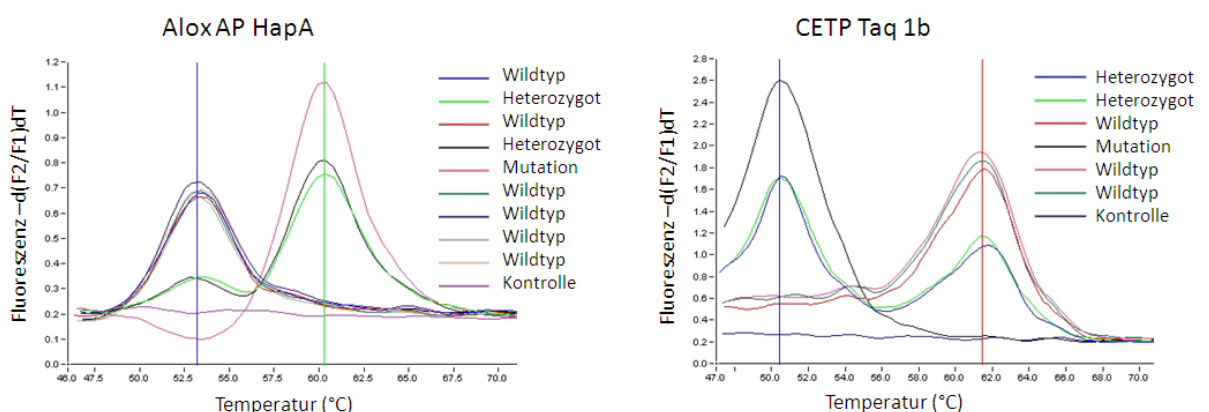


Abbildung 11: Schmelzkurve von AloxAP (links) und CETP (rechts) unter Verwendung von LightSNiP.

Es konnten alle Variationen am LightCycler etabliert werden. Das Ergebnis aller Schmelzkurvenanalysen ist der Tabelle 12 zu entnehmen. In dieser werden die Schmelzpunkte aller Wildtyp- und Mutationsfragmente zusammenfassend dargestellt.

Je nach Design weist entweder das Wildtyp-Fragment oder die Mutationsprobe einen höheren Schmelzpunkt auf.

Tabelle 12: Schmelzpunkt (T_m) der PCR-Fragmente.

Gen	Variation	Wildtyp	Mutation
PTGS1	G-1006A	68°C	61°C
	R8W	70°C	63°C
	P17L	63°C	51°C
PTGS2	G-765C	62°C	66°C
eNOS	-786T/C	59°C	68°C
	E298D	67°C	59°C
F5	G1691A	58°C	52°C
MTHFR	C677T	68°C	64°C
	A1298C	59°C	68°C
Alox AP	HapAB	60°C	62°C
	HapA	53°C	60°C
	HapB	58°C	60°C
CETP	Taq 1b	61°C	50°C
	A1061G	66°C	60°C
ApoE	Cys112Arg	54°C	62°C
	Arg158Cys	53°C	62°C
Prothrombin	G20210A	62°C	56°C
LTA	252A/G	60°C	64°C
	804C/A	59°C	55°C
LPL	D9N	53°C	59°C
	S447X	60°C	57°C
	N291S	60°C	66°C

Der LightCycler wurde als qualitative Referenzmethode zum Chip entwickelt. Durch die Schmelzkurvenanalyse kann jede unbekannte Probe eindeutig bestimmt werden. Dies ist eine essentielle Voraussetzung für die Etablierung des Mutations-Chips.

4.5 Entwicklung des Mutations-Chips

Um die verschiedenen Punktmutationen nachweisen zu können, wurden komplementäre Oligonukleotid-Sequenzen benötigt, die eine eindeutige Detektion der ausgewählten Zielsequenzen ermöglichen. Für jeden zu untersuchenden Polymorphismus wurden acht Sonden entwickelt, um ausreichend

Kombinationsmöglichkeiten für eine spätere Auswahl zu haben. Sowohl für das Wildtyp- als auch für das Mutations-Allel wurden für jede Genregion spezifische Sonden konzipiert, welche von der Firma Tib Molbiol hergestellt wurden. Die Alere Technologie GmbH aus Jena integrierte anschließend diese Sonden in ihre Biochip-Plattform. Zu Beginn der Etablierung wurde jede Sonde nur einmal auf einen Chip gespottet. Um die versuchsbedingten Schwankungen zu reduzieren, wurden die Sonden im späteren Verlauf an mehrere Positionen auf den Chip gebracht.

Für alle identifizierten Atherosklerose-Mutationen wurden Protokolle für das Nachweissystem entwickelt. Dies geschah auf Grundlage der zuvor entwickelten PCR-Verfahren und der Empfehlung der Alere Technologie GmbH.

Im ersten Schritt wurde ein Nachweis der prinzipiellen Durchführbarkeit eines Chips erbracht.

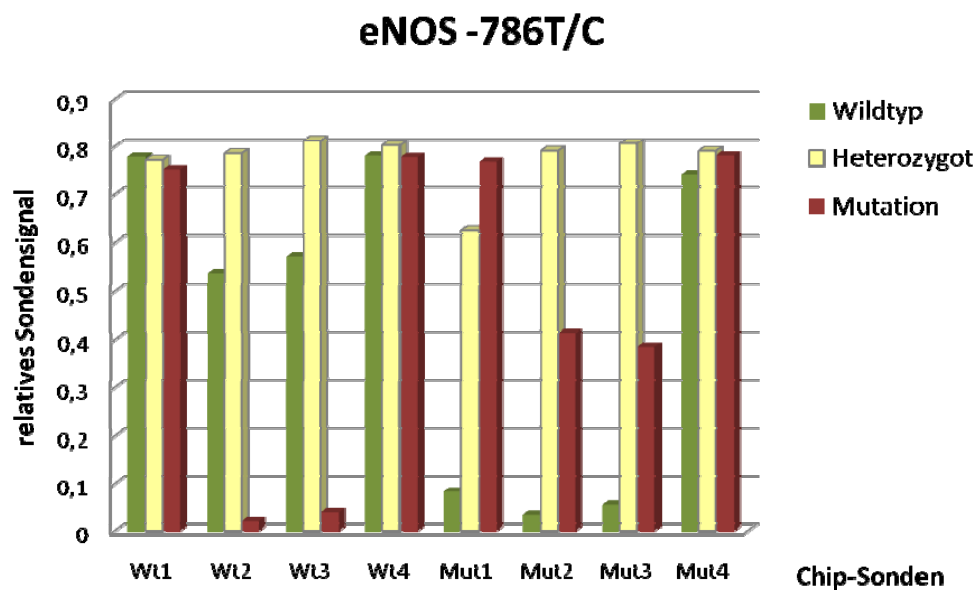


Abbildung 12: Ergebnis von drei verschiedenen Chips.
Signal-Intensität der Wildtyp- (Wt) und Mutations-Sonden (Mut).

Dazu wurde die eNOS-Mutation 786T/C ausgewählt und die entsprechenden Sonden (je 4 für den Wildtyp (Wt) und je 4 für die Mutation (Mut)) auf einen Biochip gespottet. In Abbildung 12 ist das Ergebnis aus drei Chips dargestellt. Auf den ersten Chip wurde der Wildtyp, auf den zweiten die Heterozygote und auf den dritten die Mutante von eNOS 786T/C gegeben. Die folgende Hybridisierung der biotinmarkierten PCR-Produkte mit den Sonden des Chips wurde durch eine Präzipitationsreaktion sichtbar

gemacht. Die Visualisierung der gebundenen Probe erfolgte durch einen Reader, der die resultierende optische Dichte des Präzipitates in Relation zu den Hintergrundsignalen des Chips gesetzt hat. Anschließend wurde das relative Sondensignal von jedem der vier Sondenkandidaten für 786T/C in einem Balkendiagramm dargestellt.

Eine ideale Wildtyp-Sonde zeigt nur bei einem Wildtyp und bei einer heterozygoten Probe ein Signal jedoch nicht bei einer Mutante.

In Abbildung 12 ist zu erkennen, dass die Sonden Wildtyp 1, Wildtyp 4 und Mutante 4 nicht geeignet waren, da sie unabhängig von der Probenart eine ähnliche Reaktion zeigten. Mit Wildtyp 2 und Wildtyp 3 ist eine Detektion möglich, da selektiv ein Signal zu erkennen ist. Mutante 1 liefert ein eindeutiges Signal, bei Mutante 2 und Mutante 3 ist die Sondenintensität bei einer Mutationsprobe nicht ganz so stark, ein richtiger Nachweis wäre aber damit dennoch möglich.

Als Chip-Sonden würden somit Wildtyp 2 oder Wildtyp 3 in Kombination mit Mutante 1 eine eindeutige Detektion ermöglichen. Diese drei Sonden wurden im Folgenden als geeignet eingestuft.

4.5.1 Multiplex-PCR

Um auf dem Biochip alle gewünschten 22 Genloci identifizieren zu können, mussten im Vorfeld alle Genabschnitte mit Hilfe einer PCR amplifiziert werden. Zur einfacheren Handhabung konnte eine Multiplex-PCR entwickelt werden, welche es ermöglichte alle 22 Mutationen in nur fünf Ansätzen zu amplifizieren.

Während der Entwicklung wurden jeweils zwei verschiedene Mutationen auf unterschiedliche Weise miteinander kombiniert und die resultierenden PCR-Produkte auf dem Mutations-Chip hybridisiert, um nachzuweisen, dass die Amplifikation erfolgreich war. Sobald eine PCR-Kombination erfolgreich war, wurden nach und nach mehr Mutationen hinzugefügt. In Tabelle 4 sind die unterschiedlichen PCR-Ansätze, um alle Zielgene zu amplifizieren, dargestellt. In Ansatz eins wurden die MTHFR A1298C, PTGS1 G-1006A, PTGS2 G-765C, PTGS1 R8W+P17L CETP Taq 1b und eNOS -786T/C zusammen amplifiziert. In Ansatz zwei waren F5 G1691A, MTHFR C677T, LPL S447X, LPL D9N, CETP A1061G und eNOS E298D enthalten. Ansatz drei bestand aus LPL N291S, LTA 804C/A, LTA 252A/G, CETP A1163G, Alox AP HapB, Alox AP HapA und Alox

AP HapAB. eNOS E298D, LPL S447X und Prothrombin G20210A waren in Ansatz vier. ApoE Cys112Arg+Arg158Cys wurde in einem eigenen Ansatz amplifiziert. In Abbildung 13 sind die elektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkte der verschiedenen Multiplex-Mischungen zu sehen.

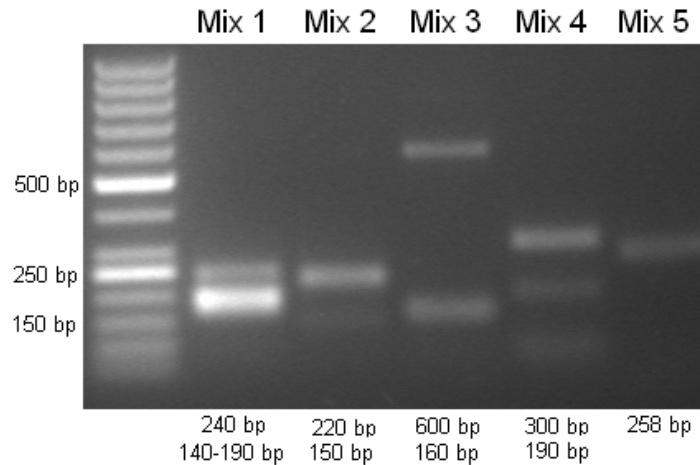


Abbildung 13: PCR-Produkte von den einzelnen PCR-Multiplex-Mixen.

Abbildung 14 zeigt das Ergebnis eines Chips zu Beginn der Multiplex-Entwicklung (links) und das Ergebnis eines Chips mit Proben, die mit dem endgültigen Multiplex-Ansatz amplifiziert wurden (rechts).

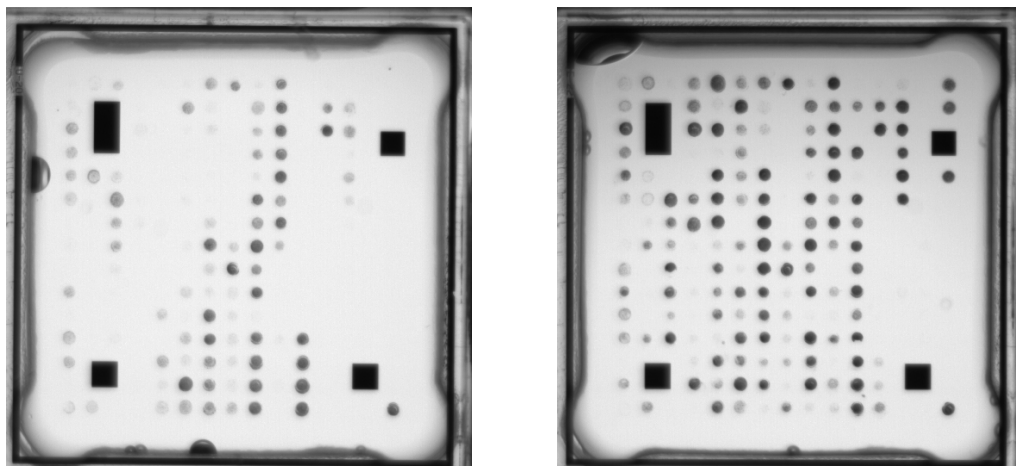


Abbildung 14: Bilder von Mutations-Chips mit Multiplex-PCR-Produkten.
Zu Beginn der Entwicklung (links) und am Ende der Multiplex-Entwicklung (rechts).

Der Nachweis einer spezifischen Bindung beider Interaktionspartner (Amplifikat mit Sonde) erfolgte durch die Sondensignale. Die Punkte repräsentieren die an Sonden

gebundenen Amplifikate, je dunkler die Punkte sind desto mehr Amplifikat wurde an die Sonden gebunden.

Es ist anhand der wenigen hellen Spots zu erkennen, dass zu Beginn der Entwicklung nicht immer alle Gene erfolgreich amplifiziert wurden. Am Ende der Entwicklung sind auf dem Chip sehr viel deutlichere Signale sichtbar. Mindestens eine Sonde für jede Mutation (für das Wildtyp- oder das Mutationsallel) zeigte ein Signal. Damit war die Amplifikation jedes gewünschten Genabschnittes erfolgreich.

4.5.2 Anpassung des Protokolls

Bei der Etablierung des Mutationschips wurde zuerst ein Protokoll gewählt, bei dem alle zu untersuchenden Genabschnitte ein Signal lieferten. Anschließend fanden Anpassungen des Produktes statt, sodass ein probenspezifischer Nachweis auf dem Chip erfolgen konnte. Dabei wurden verschiedene Parameter des Protokolls variiert. Es wurden unterschiedliche Zusammensetzungen der Hybridisierungspuffer und Waschpuffer ausgetestet. Die Bindungsspezifität der DNA mit den Sonden des Chips konnte durch die Änderung der Hybridisierungstemperatur und –dauer beeinflusst werden. Durch eine Veränderung der Waschttemperatur und Anzahl der Waschschrte konnte Einfluss auf die Stringenz genommen werden. Tabelle 13 zeigt beispielhaft, wie die einzelnen Parameter variiert wurden.

Tabelle 13: Übersicht über die Anpassungen der Chip-Durchführung.

Modifikation des Parameters	Beispiele
Unterschiedliche DNA-Ausgangsmengen	2 µl, 4 µl, 6 µl, 10 µl PCR-Produkt
Zusammensetzung Hybridisierungspuffer	Triton-Puffer, SDS-Puffer, Formamid-Puffer
Variation der Hybridisierungstemperatur	60°C, 58°C, 55°C, 52°C, 50°C, 48°C, 45°C, 40°C
Veränderung der Hybridisierungsdauer	30 min, 40 min, 45 min, 50 min 60 min
Variation der Waschttemperatur	Raumtemperatur, 50°C, 40°C, 45°C
Verwendung von unterschiedlichen Waschpuffern	WP1/2/3, WP 1/3/3, WP 1/2/3/3
Anzahl der Waschschrte	2, 3 oder 4 Waschschrte
Verschiedene Enzyme und Substrate	andere Hersteller, Konzentration
Dauer der Präzipitationsreaktion	3 min, 5 min, 7 min, 10 min

Durch Verlängerung der Hybridisierungszeit und Reduzierung der Hybridisierungstemperatur konnten Signale verstärkt werden, wohingegen durch mehrere Waschschrte bei höherer Temperatur die Menge an gebundenem Probenmaterial

deutlich reduziert wurde. So fand schrittweise eine Optimierung der Bedingungen statt, bei der auch unterschiedliche Enzyme oder Substrate ausgetestet wurden. In Abbildung 15 sind die Auswirkungen von Hybridisierungstemperatur und Waschtemperatur auf die gebundene DNA-Menge an den Sonden dargestellt. Dazu wurden fünf Chips mit der gleichen DNA-Probe ausgewertet, welche sowohl für PTGS1 G-1006A als auch für R8W zwei Wildtyp-Allele aufweisen. Dabei wurde bei allen Chips nach dem gleichen Protokoll verfahren, welches sich nur durch die Hybridisierungstemperatur und die Temperatur der Waschschritte direkt nach der Hybridisierung unterschied. Die ersten Sonden sind Biotin-Marker, die an verschiedenen Positionen auf dem Chip verteilt sind. Diese lassen unabhängig von den Temperaturbedingungen ein Signal erkennen, wenn die Nachweisreaktion (von Enzym und Substrat) erfolgreich war.

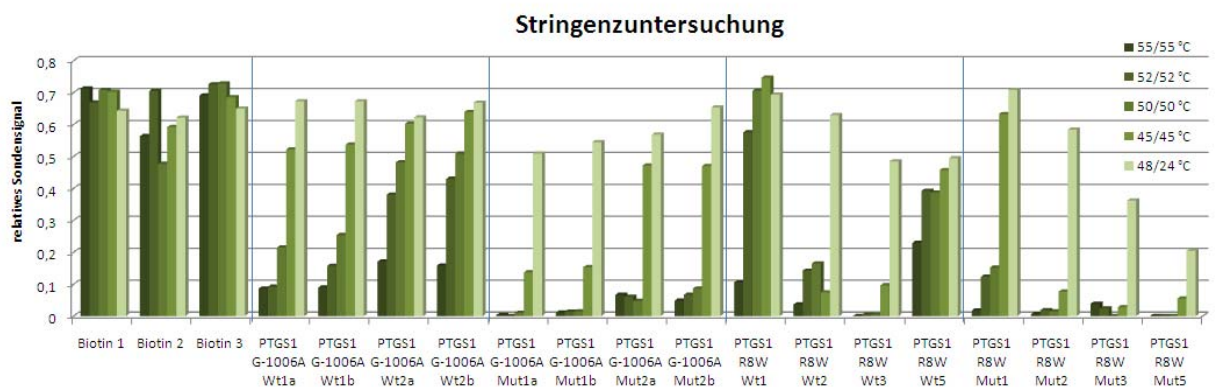


Abbildung 15: Veränderung der Signalstärke in Abhängigkeit der Hybridisierungstemperatur (Hybridisierungstemperatur/Waschtemperatur). Links sind Biotin-Marker dargestellt.

Es lässt sich ein gleichbleibendes Biotin-Signal erkennen, welches nur die normalen versuchsbedingten Schwankungen aufwies, welche unter 10% lagen. Bei den Sonden a und b (z.B. Wt1a und Wt1b) handelte es sich um redundante Sonden, die an verschiedene Positionen auf dem Chip gespottet wurden. Um die Spezifität der Hybridisierung zu erhöhen, wurde diese bei 45°C, 48°C, 50°C, 52°C und 55°C durchgeführt. Der anschließende Waschschriff wurde bei derselben Temperatur durchgeführt mit Ausnahme von 48°C, bei der der anschließende Waschschriff bei Raumtemperatur erfolgt ist. Es ist zu erkennen, dass die Erhöhung der Hybridisierungstemperatur kaum einen Einfluss auf die Sensitivität der Chips hat. Die Temperatur des anschließenden Waschschriffes, der die unspezifisch gebundene DNA

entfernt, ist viel entscheidender. Bei 55°C wurde fast alle zuvor gebundene DNA gewaschen, sodass diese Temperatur zu hoch war. Das Waschen bei Raumtemperatur erbrachte keine Spezifität, da beinahe für alle Sonden eine sehr hohe Signalstärke zu beobachten war. Das beste Ergebnis konnte bei 50°C Waschen erzielt werden, da hier die Wildtyp-Sonden die DNA der Wildtyp-Probe noch gebunden hatten, wohingegen bei dem überwiegenden Teil der Mutationssonden keine gebundene DNA mehr nachweisbar war.

Für die folgenden Experimente wurden die Hybridisierungstemperatur und die Temperatur der anschließenden drei Waschschriffe auf 50°C festgelegt.

4.5.3 Verbesserung des Mutations-Chips

Nach der Optimierung des Protokolls zur Chip-Durchführung wurden neue Sonden für die Polymorphismen konzipiert, bei denen der allelspezifische Nachweis nicht zufriedenstellend funktioniert hat. Bei Polymorphismen, die bisher zu geringe Sonden signale lieferten, wurden die Sonden verlängert, waren die Signale zu unspezifisch wurden die Sonden verkürzt.

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse aus den vorherigen Chip-Experimenten wurde ein neuer Chip mit den bisher gut funktionierenden und den neu entwickelten Sonden gespottet. Dieser neue Chip wurde mit den zuvor etablierten Bedingungen getestet.

Ziel war es, eine eindeutige Detektion von Mutation und Wildtyp aller Variationen auf dem Biochip zu ermöglichen und dabei Bedingungen zu finden, bei denen sich möglichst viele Polymorphismen auf einem Chip gleichzeitig nachweisen lassen. Dafür wurde das Protokoll zur Chip-Durchführung bestmöglich angepasst und immer neue Sondenkandidaten ausgetestet.

Im Verlauf der Arbeit wurde von der Alere Technologie GmbH ein käuflich erwerbbares Hybridisierungs-Kit entwickelt, welches die Arbeitszeit bei der Chip-Durchführung um die Hälfte reduzierte. Beispielsweise wurde die Blockierung der nicht gebundenen Sonden während der Hybridisierung und im anschließenden Waschschriffe integriert. In Abbildung 16 wird das bestehende Protokoll mit der Verwendung des Hybridisierungs-Kits verglichen. Die Hybridisierungszeit und –temperatur sowie die Anzahl und Temperatur der Waschschriffe waren identisch. Jedoch haben sich die verwendeten

Reagenzien unterschieden und die daraus teilweise resultierenden Ablaufänderungen der einzelnen Schritte.

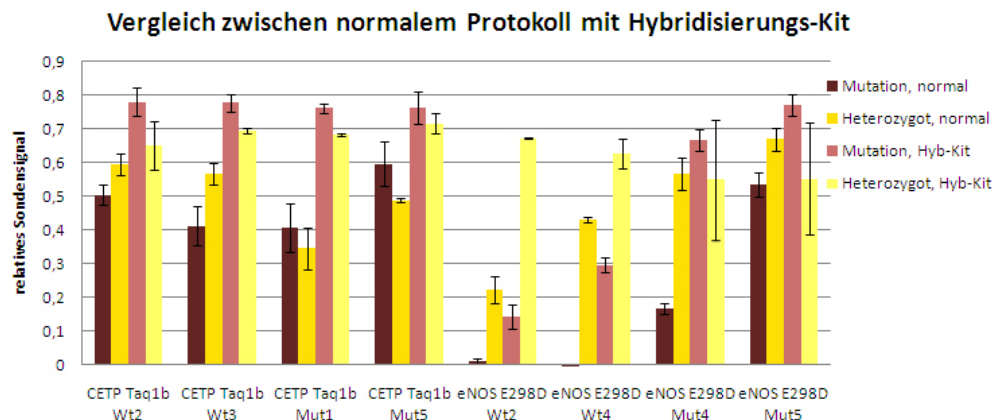


Abbildung 16: Darstellung der Ergebnisse zweier Chip-Protokolle mit unterschiedlichen Referenzproben. Ausgewählt wurden die redundanten Sonden von CETP Taq 1b und eNOS E298D.

Mit Hilfe von zwei Referenzproben (Mutation und Heterozygot) wurden die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen den beiden Chip-Durchführungen an Hand von CETP Taq 1b und eNOS E298D dargelegt. In Abbildung 16 sind zuerst die Signale der beiden Chips, die nach dem etablierten Protokoll durchgeführt wurden, dargestellt (normal). Anschließend sind dieselben Proben mit Hilfe zweier anderer Chips dargestellt, die mit Substanzen des neuen Hybridisierungs-Kits realisiert wurden (Hyb-Kit).

Bei den Signalintensitäten handelt es sich jeweils um den Mittelwert der beiden redundanten Sonden; die Fehlerbalken sind die entsprechenden Standardabweichungen. Es ist zu erkennen, dass der probenspezifische Nachweis für CETP Taq 1b unabhängig vom eingesetzten Protokoll nicht gelang. Die Signalstärken der Chips, die mit dem Hybridisierungs-Kit durchgeführt wurden, sind deutlich höher als die mit den normalen Reagenzien. Im Fall von eNOS ist ein probenspezifischer Nachweis mit beiden Protokollen möglich, jedoch sind die Signale mit dem Hybridisierungs-Kit eindeutig höher.

$$\text{Asymmetrie} = \frac{\Delta}{\Sigma} = \frac{\text{Wildtyp-Sonde} - \text{Mutations-Sonde}}{\text{Wildtyp-Sonde} + \text{Mutations-Sonde}}$$

Abbildung 17: Relative Signalstärke der Sonden wird zur Berechnung der Asymmetrie herangezogen.

In einem weiteren Schritt wurde eine neue Analyseart der Chipergebnisse entwickelt. Dafür wird die Asymmetrie berechnet, wofür der Quotient aus der Differenz und der Summe der Sondenintensitäten bestimmt wird. In Abbildung 17 ist die Formel dargestellt. Die Zuordnung der Asymmetrie-Werte in gewisse Bereiche ist der Tabelle 14 zu entnehmen. Durch die Daten aller Versuche wurden die Grenzen für jede einzelnen Variationen entsprechend angepasst.

Tabelle 14: Grenzen der einzelnen Polymorphismen zur eindeutigen Genotypisierung. Die Asymmetrie der relativen SONDENSIGNALE liegt je nach Genotyp in den angegebenen Bereichen.

Gen	Variation					
PTGS1	G-1006A	Wt >	0,15	> Het >	-0,6	> Mut
	R8W	Wt >	0,5	> Het >	-0,5	> Mut
	P17L	Wt >	-0,15	> Het >	-0,22	> Mut
eNOS	-786T/C	Wt >	0,15	> Het >	-0,2	> Mut
F5	G1691A	Wt >	0,5	> Het >	-0,5	> Mut
MTHFR	A1298C	Wt >	0,55	> Het >	0	> Mut
CETP	Taq 1b	Wt >	0,8	> Het >	-0,2	> Mut
ApoE	Cys112Arg	Wt >	0,5	> Het >	-0,15	> Mut
	Arg158Cys	Wt >	0,1	> Het >	-0,2	> Mut
Prothrombin	G20210A	Wt >	0,25	> Het >	-0,75	> Mut
LPL	D9N	Wt >	0,25	> Het >	-0,5	> Mut
	S447X	Wt >	0,23	> Het >	-0,5	> Mut

Ergibt beispielsweise die Berechnung der SONDENSIGNALE von Mutation und Wiltyp 0,52, so wäre dies bei ApoE für beide Variationen der Wiltyp, bei MTHFR oder CETP wäre es hingegen eine heterozygote Probe. Damit die Detektion mit Hilfe des Chips erfolgreich ist, musste mindestens eine der Nachweissonden für den jeweiligen Polymorphismus eine relative Signalstärke von über 0,05 aufweisen. Invaliden Signale und die Signale einer redundanten Sonde, die mehr als 0,1 voneinander abweichen, wurden als nicht auswertbare Ergebnisse gewertet.

4.6 Validierung des Mutations-Chips

Das Protokoll wurde soweit optimiert, dass der sondenspezifische Nachweis für insgesamt zwölf Polymorphismen gelang. Somit konnte eine Validierung zum Chip basierten Nachweis von Mutationen durchgeführt werden. Für eine Validierung muss

gezeigt werden, dass die Anforderungen für die spezifische Anwendung erfüllt werden. Der Chip muss eine eindeutige Genotypisierung für jeden Polymorphismus ermöglichen.

Für die letztendliche Genotypisierung einer Probandenprobe wird die Asymmetrie der Sondensignale für jede einzelne Variation ermittelt. Dafür wurde die Signal-Intensität der Differenz durch die Summe der Mutationssonde und des Wildtypes geteilt. Entsprechend dem Quotienten fand die eindeutige Zuordnung der Genotypen statt. In Abbildung 18 ist beispielhaft dargestellt, wie die Einteilung der Allele aufgrund der Sondensignale erfolgt.

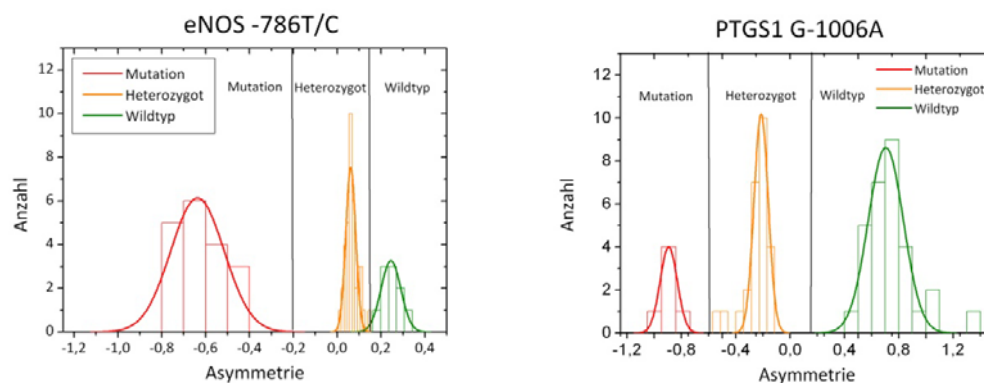


Abbildung 18: Asymmetrie der Sonden werden in Verhältnis zur Anzahl der Proben gesetzt, für die erhaltenen Werte ist die entsprechende Gauß-Kurve dargestellt.

Es wurde ein Histogramm für jeden Polymorphismus erstellt, der die Asymmetrien für jeden Genotypen enthält. Die entsprechende Wahrscheinlichkeitsverteilung ist mit einer Gauß-Kurve gezeigt. Die geringe Menge an Daten ermöglicht es nicht, eine aussagekräftige Gauß-Kurve zu erstellen, sie soll lediglich Hinweise auf die mögliche Verteilung bieten. Für den Polymorphismus eNOS -786T/C ergibt dies eine Grenze bei -0,2 (Heterozygot/Mutation) und 0,15 (Wildtyp zu Heterozygot). Bei PTGS1 G-1006A erfolgt die Zuordnung des heterozygoten Genotyps für Werte zwischen -0,6 und 0,15. In Tabelle 15 sind der Mittelwert (μ) und die entsprechende Standardabweichung (σ) aller zwölf Polymorphismen dargestellt. Für die Grenze von Wildtyp zu Heterozygot wurde der Mittelwert und die Standardabweichung des Wildtypes verwendet. Der Grenzwert für Heterozygot nach Mutation wurde der Mittelwert und die Standardabweichung der Mutation herangezogen.

Tabelle 15: Mittelwert (μ) und Standardabweichung (σ) aller Polymorphismen mit korrespondierendem Konfidenzintervall (KI).

Gen	Variation		μ (Wt) - σ (Wt)		μ (Mut) + σ (Mut)		KI
PTGS1	G-1006A	Wt >	0,746 - 0,170	> Het >	-0,898 + 0,051	> Mut	3 σ
	R8W	Wt >	0,925 - 0,110	> Het >	-0,750 + 0,081	> Mut	3 σ
	P17L	Wt >	-0,062 - 0,120	> Het >	-0,290 + 0,072	> Mut	1 σ
eNOS	-786T/C	Wt >	0,241 - 0,039	> Het >	-0,630 + 0,111	> Mut	2 σ
F5	G1691A	Wt >	1,029 - 0,108	> Het >	-0,938 + 0,125	> Mut	3 σ
MTHFR	A1298C	Wt >	0,922 - 0,171	> Het >	-0,158 + 0,090	> Mut	1 σ
CETP	Taq 1b	Wt >	0,997 - 0,193	> Het >	-0,567 + 0,211	> Mut	1 σ
ApoE	Cys112Arg	Wt >	0,891 - 0,137	> Het >	-0,624 + 0,247	> Mut	2 σ
	Arg158Cys	Wt >	0,304 - 0,102	> Het >	-0,927 + 0,316	> Mut	1 σ
Prothrombin	G20210A	Wt >	0,662 - 0,087	> Het >	-0,929 + 0,046	> Mut	3 σ
LPL	D9N	Wt >	0,584 - 0,099	> Het >	-0,910 + 0,093	> Mut	3 σ
	S447X	Wt >	0,409 - 0,098	> Het >	0,061 - 0,069	> Mut	1 σ

Für S447X wurde mangels Mutation der Mittelwert der heterozygoten Proben verwendet, weswegen die Standardabweichung des Heterozygoten substrahiert werden musste (blau dargestellt). Für alle Polymorphismen wurde ein Konfidenzintervall angegeben, das zwischen der einfachen bis zur dreifachen Standardabweichung liegt. Diese gesamte Auswertung ist aufgrund der geringen Anzahl an Daten nur bedingt aussagekräftig.

4.6.1 Leistungsbewertung mit Probandenproben

Im Rahmen der Validierung wurde eine Leistungsbewertungsprüfung durchgeführt, welche die Reproduzierbarkeit und die Funktionalität für den vorgesehenen Verwendungszweck nachweist. Für diese Prüfung wurden fünf DNA-Proben an drei verschiedenen Tagen amplifiziert und anschließend mit Hilfe des Chips analysiert. Die Genotypen dieser Proben wurden parallel dazu mit dem LightCycler als Referenzsystem untersucht, sodass von jeder Probandenprobe eindeutig der Genotyp bestimmt werden konnte. Das Ergebnis des Quotienten aus Differenz und Summe der Mutations- und Wildtyp-Signale vom Chip wurde mit den tatsächlichen Genotypen aus dem Referenzsystem verglichen. Durch die dreifache Messung der identischen DNA-Proben an unterschiedlichen Tagen sollte die inter-assay Präzision des Chips gezeigt werden.

In Tabelle 16 ist das Ergebnis der Leistungsbewertung beispielhaft an vier Variationen anhand der relativen Signalstärken der ausgewählten Sonde dargestellt. In Spalte zwei

ist die relative Signalstärke der Wildtyp-Sonde, in Spalte drei die Mutations-Sonde der jeweiligen Variation dargestellt und in der vierten Spalte der mit dem LightCycler ermittelte Genotyp. Der Mittelwert aus den redundant gespotteten Sonden wurde gebildet. Sobald bei einer Sonde die relative Signalstärke über 0,05 liegt wird dieses als Signal gewertet und entsprechend ihrer Zugehörigkeit eingefärbt. Eine Wildtyp-Sonde soll erwartungsgemäß an die Wildtyp-Sonde binden (grün dargestellt), die Mutations-Sonde dementsprechend an die Mutationssonde (rot dargestellt). Eine heterozygote Probe (gelb dargestellt) soll bei beiden Sonden ein Signal hervorrufen. Zur besseren Übersicht wurde die Asymmetrie automatisch in der entsprechenden Farbe der jeweiligen Zugehörigkeit eingefärbt. Diese kann direkt mit dem Ergebnis des LightCycler verglichen werden. Im Anhang 2 sind die Ergebnisse aller zwölf Marker dargestellt.

Tabelle 16: Relative Signalstärken der jeweiligen Sonden.
Jede der fünf Proben wurde dreimal gemessen.

eNOS -786T/C					ApoE Arg158Cys					Prothrombin G20210A					LPL S447X				
Probe/Tag	Wt	Mut	LC	Asym.	Probe/Tag	Wt	Mut	LC	Asym.	Probe/Tag	Wt	Mut	LC	Asym.	Probe/Tag	Wt	Mut	LC	Asym.
DNA1/1	0,748	0,709	het	0,027	DNA1/1	0,075	0,650	Mut	-0,792	DNA1/1	0,571	0,115	Wt	0,664	DNA1/1	0,742	0,397	Wt	0,303
DNA1/2	0,623	0,551	het	0,061	DNA1/2	0,005	0,156	Mut	-0,942	DNA1/2	0,313	0,048	Wt	0,736	DNA1/2	0,609	0,158	Wt	0,588
DNA1/3	0,736	0,631	het	0,077	DNA1/3	0,058	0,612	Mut	-0,826	DNA1/3	0,520	0,129	Wt	0,602	DNA1/3	0,724	0,344	Wt	0,356
DNA2/1	0,728	0,699	het	0,020	DNA2/1	0,054	0,566	Mut	-0,826	DNA2/1	0,536	0,086	Wt	0,725	DNA2/1	0,723	0,346	Wt	0,352
DNA2/2	0,793	0,673	het	0,082	DNA2/2	0,006	0,334	Mut	-0,965	DNA2/2	0,432	0,051	Wt	0,789	DNA2/2	0,736	0,220	Wt	0,540
DNA2/3	0,741	0,632	het	0,080	DNA2/3	0,048	0,532	Mut	-0,834	DNA2/3	0,469	0,113	Wt	0,611	DNA2/3	0,729	0,294	Wt	0,425
DNA3/1	0,786	0,687	het	0,067	DNA3/1	0,530	0,457	het	0,073	DNA3/1	0,516	0,123	Wt	0,615	DNA3/1	0,769	0,338	Wt	0,390
DNA3/2	0,824	0,737	het	0,056	DNA3/2	0,452	0,383	het	0,083	DNA3/2	0,554	0,166	Wt	0,539	DNA3/2	0,778	0,399	Wt	0,322
DNA3/3	0,726	0,581	het	0,111	DNA3/3	0,417	0,419	het	-0,003	DNA3/3	0,427	0,107	Wt	0,600	DNA3/3	0,648	0,261	Wt	0,426
DNA4/1	0,171	0,745	Mut	-0,627	DNA4/1	0,010	0,520	Mut	-0,961	DNA4/1	0,470	0,080	Wt	0,708	DNA4/1	0,695	0,648	het	0,035
DNA4/2	0,193	0,624	Mut	-0,528	DNA4/2	0,043	0,456	Mut	-0,828	DNA4/2	0,322	0,039	Wt	0,785	DNA4/2	0,626	0,418	het	0,199
DNA4/3	0,208	0,659	Mut	-0,520	DNA4/3	0,045	0,453	Mut	-0,818	DNA4/3	0,390	0,070	Wt	0,695	DNA4/3	0,605	0,542	het	0,055
DNA5/1	0,188	0,726	Mut	-0,588	DNA5/1	0,628	0,335	Wt	0,304	DNA5/1	0,506	0,072	Wt	0,752	DNA5/1	0,771	0,365	Wt	0,358
DNA5/2	0,110	0,631	Mut	-0,703	DNA5/2	0,338	0,129	Wt	0,449	DNA5/2	0,379	0,082	Wt	0,645	DNA5/2	0,656	0,216	Wt	0,505
DNA5/3	0,236	0,662	Mut	-0,474	DNA5/3	0,490	0,361	Wt	0,152	DNA5/3	0,445	0,091	Wt	0,659	DNA5/3	0,667	0,285	Wt	0,401

Die ersten beiden DNA-Proben sind für ApoE Arg158Cys Mutanten genauso wie die vierte DNA-Probe. Die entsprechenden Mutations-Sonden zeigen höhere relative Signale als die Wildtyp-Sonden. Der entsprechende Quotient liegt deutlich unter -0,2, sodass der Chip eindeutig eine Mutationsprobe anzeigt. Bei der dritten DNA-Probe handelt es sich um eine Heterozygote. Sowohl die Wildtyp-Sonde als auch die Mutations-Sonde zeigen ein ähnlich hohes Signal. Die Asymmetrie der beiden Sonden liegt bei allen drei Durchgängen zwischen -0,2 und 0,1, sodass die Zuordnung Heterozygot zutreffend ist. Die Letzte der fünf untersuchten DNA-Proben ist ein Wildtyp, bei dieser Probe liegt die Asymmetrie über 0,1, sodass auch diese einwandfrei identifiziert wurde. Es fand eine 100% Übereinstimmung des Referenzsystems mit dem

Chip für PTGS1 G-1006A, PTGS1 R8W, PTGS1 P17L, eNOS -786T/C, F5 G1691A, MTHFR A1298C, CETP Taq 1b, ApoE Cys112Arg, ApoE Arg158Cys, Prothrombin G20210A, LPL D9N und LPL S447X statt.

4.6.2 Leistungsbewertung mit Referenzproben

Auf dem Biochip konnte eine eindeutige Einteilung der Probandenproben in Wildtyp, Heterozygote und Mutante bezüglich der entsprechenden Variation vorgenommen werden.

Tabelle 17: Referenzproben, welche für die Validierung eingesetzt wurden.

Name	Variation	DNA			künstlich
		Wildtyp	Heterozygot	Mutation	Mutation
PTGS1	G-1006A	x	x		x
	P17L +R8W	x			x
PTGS2	G-765C	x		x	
eNOS	-786T/C	x	x	x	
	E298D	x	x	x	
F5	G1691A	x	x		x
MTHFR	C677T	x	x	x	
	A1298C	x	x	x	
Alox AP	HapAB	x		x	
	HapA	x	x	x	
	HapB	x	x		
CETP	Taq 1b	x	x	x	
	A1061G	x	x	x	
ApoE	Cys112Arg+Arg158Cys	x	x	x	
Prothrombin	G20210A	x			x
LTA	252A/G	x	x	x	
	804C/A	x		x	
LPL	D9N	x			x
	S447X	x	x		
	N291S	x			x

Mittels des Referenzmesssystems LightCycler wurden geeignete Referenzproben identifiziert, die teilweise zuvor durch künstliche Mutagenese hergestellt wurden. Diese Referenzmaterialien wurden zusätzlich durch Sequenzierung bestätigt. Soweit es möglich war, wurde echte DNA als Referenzprobe für die Validierung verwendet. In

Tabelle 17 ist zu entnehmen, bei welchen Variationen echte DNA-Proben und bei welcher Variation durch Mutagenese künstlich hergestellte Proben zum Einsatz kamen. Die inter-assay Präzession wurde an drei verschiedenen Tage von drei verschiedenen Personen durchgeführt. Die Ergebnisse des Tests sind in Tabelle 18 dargestellt. Die Asymmetrie als Quotienten der Differenz und der Summe der Sondensignale wurden berechnet. Aufgrund der bekannten Grenzwerte (siehe Tabelle 14) kann von den Ergebnissen auf den entsprechenden Genotyp geschlossen werden.

Für PTGS1 R8W konnte keine heterozygote Referenzprobe gefunden werden, daher gilt sie als Negativkontrolle. Es ist zu erkennen, dass keine Detektion möglich war, da die erhaltenen Sondensignale alle unter 0,05 lagen. Der Chip zeigt somit keine Falsch-Positiven Werte an und lässt eine Auswertung aufgrund von mangelndem Probenmaterial nicht zu.

Tabelle 18: Ergebnis von Chips mit Referenzproben für Wildtyp (Wt), Heterozygot (het) und Mutation (Mut). Jede Messung wurde dreimal wiederholt.

PTGS1 G-1006A					PTGS1 R8W					CETP Taq 1b					ApoE Cys112Arg				
Wdh.	Wt	Mut	LC	Asym.	Wdh.	Wt	Mut	LC	Asym.	Wdh.	Wt	Mut	LC	Asym.	Wdh.	Wt	Mut	LC	Asym.
1	0,501	0,083	Wt	0,715	1	0,377	0,064	Wt	0,711	1	0,414	0,001	Wt	0,995	1	0,549	0,014	Wt	0,951
2	0,457	0,105	Wt	0,625	2	0,368	0,088	Wt	0,612	2	0,375	0,007	Wt	0,964	2	0,437	-0,001	Wt	1,007
3	0,464	0,117	Wt	0,596	3	0,418	0,089	Wt	0,648	3	0,404	0,003	Wt	0,986	3	0,511	0,007	Wt	0,973
1	0,346	0,594	het	-0,264	1	-0,009	-0,002			1	0,293	0,161	het	0,291	1	0,480	0,499	het	-0,020
2	0,305	0,496	het	-0,239	2	-0,001	0,002			2	0,260	0,164	het	0,225	2	0,339	0,371	het	-0,046
3	0,295	0,479	het	-0,238	3	-0,001	0,014			3	0,273	0,157	het	0,271	3	0,340	0,372	het	-0,045
1	0,012	0,493	Mut	-0,953	1	0,045	0,532	Mut	-0,843	1	0,018	0,269	Mut	-0,876	1	0,072	0,496	Mut	-0,745
2	0,030	0,421	Mut	-0,865	2	0,065	0,383	Mut	-0,708	2	0,034	0,091	Mut	-0,455	2	0,015	0,341	Mut	-0,915
3	0,031	0,461	Mut	-0,872	3	0,079	0,441	Mut	-0,698	3	0,074	0,143	Mut	-0,318	3	0,029	0,439	Mut	-0,877

Bei allen anderen Variationen ist eine eindeutige Zuordnung möglich (siehe Anhang 3), die mit den LightCycler-Ergebnissen und denen der Sequenzierung zu 100% übereinstimmt.

4.6.3 Stabilitäts-Test

Ein weiterer wichtiger Bestandteil einer Validierung ist der Nachweis der Stabilität der einzelnen Komponenten, welche für die Durchführung des Tests benötigt werden. Es soll folglich nachgewiesen werden, dass bei sachgemäßer Lagerung und Transport die Funktionalität des Tests gewährleistet ist. Für eine solche Validierung wurden vier Chargen an unterschiedlichen Tagen hergestellt, die sofort auf ihre Funktionalität hin überprüft wurden. Mit der vierten Charge fand ein zweitägiger Transport-Test statt,

bei dem im Anschluss die Kit-Bestandteile überprüft wurden.

Die unterschiedlichen Produktionen wurden des Weiteren nach zwei und vier Monaten auf ihre Funktionalität hin überprüft. Um Qualitätsschwankungen zu umgehen, wurde für den Test immer die gleiche DNA verwendet. In Tabelle 19 sind die Ergebnisse der vier getesteten Chargen an Tag 1, Tag 60 und an Tag 120 dargestellt.

Tabelle 19: Ergebnisse des Stabilitätstests der vier Chargen, an Tag 1, Tag 60 und Tag 120.

MTHFR A1298C					PTGS1 P17L					F5 G1691A					LPL D9N				
Charge	Wt	Mut	LC	Asym.	Charge	Wt	Mut	LC	Asym.	Charge	Wt	Mut	LC	Asym.	Charge	Wt	Mut	LC	Asym.
1 /Tag 1	0,612	0,003	Wt	0,991	1 /Tag 1	0,651	0,689	Wt	-0,028	1 /Tag 1	0,438	0,005	Wt	0,975	1 /Tag 1	0,668	0,322	Wt	0,349
1 /Tag 60	0,381	-0,008	Wt	1,041	1 /Tag 60	0,564	0,666	Wt	-0,083	1 /Tag 60	0,419	-0,015	Wt	1,073	1 /Tag 60	0,626	0,215	Wt	0,489
1 /Tag 120	0,372	-0,009	Wt	1,047	1 /Tag 120	0,636	0,695	Wt	-0,045	1 /Tag 120	0,435	0,002	Wt	0,993	1 /Tag 120	0,698	0,270	Wt	0,443
2 /Tag 1	0,363	0,030	Wt	0,846	2 /Tag 1	0,335	0,437	Wt	-0,132	2 /Tag 1	0,266	0,000	Wt	0,997	2 /Tag 1	0,408	0,064	Wt	0,729
2 /Tag 60	0,612	0,003	Wt	0,991	2 /Tag 60	0,651	0,689	Wt	-0,028	2 /Tag 60	0,438	0,005	Wt	0,975	2 /Tag 60	0,668	0,322	Wt	0,349
2 /Tag 120	0,425	0,017	Wt	0,923	2 /Tag 120	0,630	0,683	Wt	-0,040	2 /Tag 120	0,394	-0,002	Wt	1,009	2 /Tag 120	0,678	0,266	Wt	0,436
3 /Tag 1	0,558	0,057	Wt	0,813	3 /Tag 1	0,536	0,599	Wt	-0,056	3 /Tag 1	0,440	-0,001	Wt	1,002	3 /Tag 1	0,555	0,134	Wt	0,612
3 /Tag 60	0,497	0,020	Wt	0,921	3 /Tag 60	0,536	0,559	Wt	-0,021	3 /Tag 60	0,380	0,000	Wt	1,001	3 /Tag 60	0,537	0,183	Wt	0,491
3 /Tag 120	0,530	0,032	Wt	0,886	3 /Tag 120	0,597	0,648	Wt	-0,041	3 /Tag 120	0,405	-0,004	Wt	1,021	3 /Tag 120	0,646	0,312	Wt	0,348
4 /Tag 1	0,494	0,010	Wt	0,960	4 /Tag 1	0,443	0,546	Wt	-0,103	4 /Tag 1	0,332	-0,005	Wt	1,033	4 /Tag 1	0,493	0,088	Wt	0,697
4 /Tag 60	0,328	-0,002	Wt	1,011	4 /Tag 60	0,648	0,693	Wt	-0,033	4 /Tag 60	0,317	-0,002	Wt	1,015	4 /Tag 60	0,662	0,218	Wt	0,505
4 /Tag 120	0,222	0,143	Wt	0,218	4 /Tag 120	0,538	0,558	Wt	-0,019	4 /Tag 120	0,349	0,056	Wt	0,723	4 /Tag 120	0,486	0,201	Wt	0,415

Es sind versuchsbedingte Schwankungen zu beobachten, die aber aufgrund der Asymmetrieberechnung zum gleichen Ergebnis führen. Es lassen sich aufgrund der zweimonatigen Lagerungsdauer keine Tendenzen erkennen, dass z.B. die Signalstärke mit der Zeit abnimmt oder ähnliches. Lediglich bei der vierten Charge, dem Transport-Test, lässt sich bei zwei Polymorphismen (MTHFR und R8W) nach vier Monaten eine falsche Zuordnung der Genotypen erkennen.

Für alle zwölf Variationen konnten die richtigen Signale auf dem Chip mit zwei Monate alten Komponenten nachgewiesen werden (siehe Anhang 4).

Nach vier Monaten kann jedoch keine vollständige Funktionalität aller Bestandteile mehr garantiert werden.

Des Weiteren wurde die Stabilität der DNA in einem Langzeittest überprüft. Dafür wurde aus frischem Blut isolierte DNA mit drei Jahre altes Blut, drei Jahre alte DNA, die öfters aufgetaut und wieder eingefroren wurden und ein Monat alte DNA verglichen. Die ganzen DNAs zeigten keine deutlichen Unterschiede im Ergebnis.

4.7 Software

Für eine schnelle und zuverlässige Auswertung der Daten wurde von der PharmGenomics GmbH ein Computerprogramm in Form einer anwenderfreundlichen Software entwickelt. Dieser Prototyp stellt eine Möglichkeit der technischen Auswertung dar und kann nach den speziellen Bedürfnissen des Arztes angepasst werden. Zur Analyse der Patientengenotypisierung muss der Reader per USB-Schnittstelle mit dem Computer verbunden werden. Die Präzipitationsreaktion wird innerhalb von wenigen Sekunden visualisiert. Anschließend ermöglicht die Software auch die Erstellung eines diagnostischen Reports, der dem Arzt bei der Bewertung der Ergebnisse helfen soll.

Wird die Software geöffnet, erscheint zunächst eine Eingabemaske, in die der Arzt die Patienteninformationen einträgt (siehe Abbildung 19). Die Angaben ermöglichen eine eindeutige Zuordnung der Analyseergebnisse, die später auch noch für Studienzwecke genutzt werden können.

The screenshot displays the 'PharmGenomics Diagnostic System' window. The main area is titled 'Diagnostischen Report anpassen'. It contains several input fields for patient and sample information:

- Behandelnder Arzt:** Name (Dr. John Doe), Vollständige Anschrift (Musterstraße 8).
- Patient:** Name (Jane Doe), Geburtsdatum (12.05.1978), Geschlecht (radio buttons for männlich and weiblich, with weiblich selected), Patient ID (C1223).
- Probe:** Probenart (EDTA Blut), Entnahmedatum, and Aufbereitungsdatum.
- Anmerkungen:** A large empty text area for notes.

On the left side, there is a 'Projekte' tree view and an 'Analyseprotokoll' log showing the analysis steps, such as 'Willkommen beim PharmGenomics Diagnostic System', 'Wechsle Analysenmodus -> Rohdatenanalyse', and 'Starte Genotypisierung'. The bottom status bar indicates 'Analysefortschritt'.

Abbildung 19: Eingabemaske für Patienteninformationen.

Nach Eintrag der patientenbezogenen Daten wird der Chip in den Reader eingesteckt und die Abdeckung geschlossen. Durch Auswählen des Play-Buttons wird die

Präzipitationsreaktion durch ein Foto digitalisiert. Wie in Abbildung 20 dargestellt können die Sondenintensitäten der einzelnen Genvariationen bereits auf dem Foto erkannt werden. Die genaue Interpretation der Präzipitationsreaktion erfolgt automatisch. Dafür wird der Quotient aus der Differenz und der Summe der Sondenintensitäten bestimmt und daraus die Asymmetrie berechnet. Die Ergebnisse werden mit den festgelegten Grenzen der einzelnen Polymorphismen verglichen und eindeutig dem Genotyp zugeordnet. Werden defekte Allele entdeckt, werden diese in einer Übersicht dargestellt.

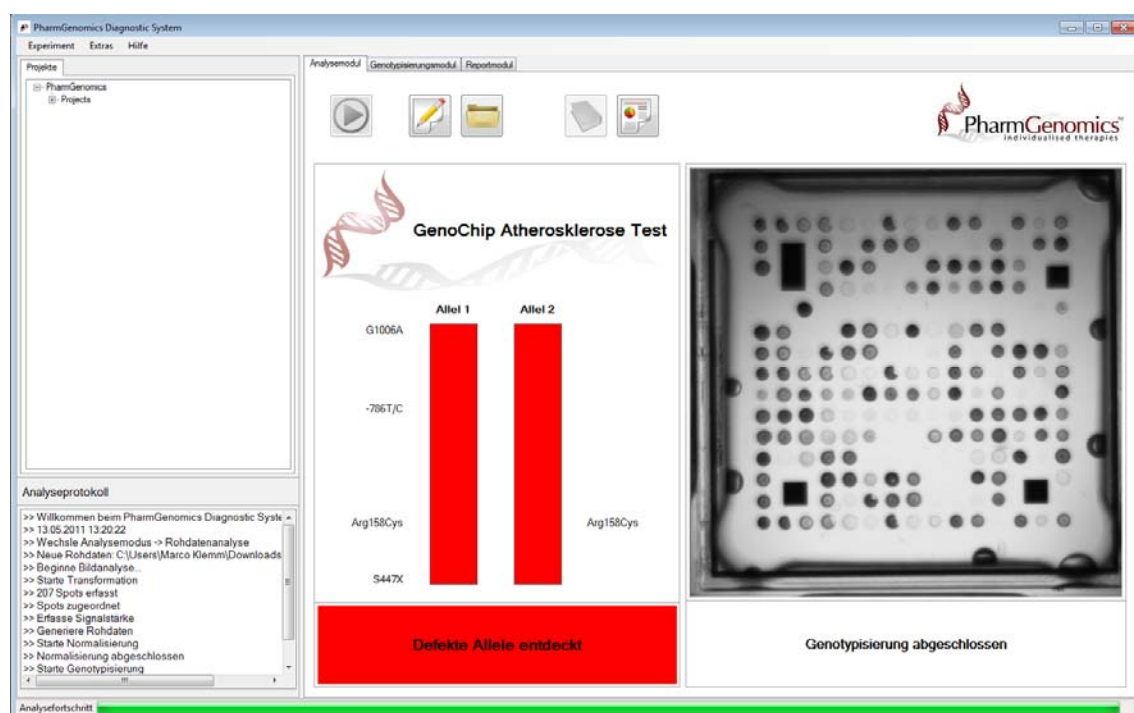


Abbildung 20: Die Interpretation der einzelnen Sondenintensitäten erfolgt automatisch.

Die Software erkennt automatisch, wenn die Nachweisreaktion fehlerhaft ist, was beispielweise durch falsche Handhabung hervorgerufen werden kann. Dies äußert sich in nicht auswertbaren Ergebnissen. Wenn zum Beispiel die Signale der redundanten Sonden stark voneinander abweichen, wird dies als nicht auswertbares Resultat erkannt und dem Arzt durch eine Fehlermeldung mitgeteilt.

Neben der Schnellübersicht kann auch auf eine genaue Aufstellung der einzelnen Genvariationen und ihre Ausprägung zugegriffen werden. In einer Tabelle (siehe Abbildung 21) wird jede Genvariation einzeln nach ihrem Genotyp aufgeschlüsselt.

PharmGenomics Diagnostic System

Experiment Extras Hilfe

Projekte

PharmGenomics
Projects

Analyseprotokoll

>> Willkommen beim PharmGenomics Diagnostic System
>> 13.05.2011 13:20:22
>> Wechsle Analysemodus -> Rohdatenanalyse
>> Neue Rohdaten: C:\Users\Marco Klemm\Downloads
>> Beginne Bildanalyse...
>> Starte Transformation
>> 207 Spots erfasst
>> Spots zugeordnet
>> Erfasse Signalstärke
>> Generiere Rohdaten
>> Starte Normalisierung
>> Normalisierung abgeschlossen
>> Starte Genotypisierung

Analysefortschritt

GenoChip Atherosklerose Panel

Gene	Variation	Homozygot Wildtyp	Heterozygot	Homozygot Mutation
PTGS1	G1006A		▲	
	R8W	●		
	P17L	●		
PTGS2	G-765C	●		
eNOS	-788T/C		▲	
F5	G1691A	●		
MTHFR	C677T			
CETP	Taq 1b	●		
ApoE	Cys 112 Arg	●		
	Arg 158 Cys			●
Prothrombin	G20210A	●		
LPL	D9N	●		
	S447X		▲	

Abbildung 21: Resultat der Genotypisierung.

Abschließend erhält der Arzt das Ergebnis der Genotypisierungsanalyse in einem Ergebnisreport zusammengefasst. Dieser liefert zugleich eine Interpretationshilfestellung mit einer detaillierten Angabe der Literaturstellen, die wie in Abbildung 22 dargestellt aussehen könnte: Gemäß der Literatur ist aufgrund der vorliegenden Mutationen ein erhöhtes Atheroskleroserisiko beim Patienten zu erwarten. Die Empfehlung sieht eine engmaschigere diagnostische Begleitung vor und weitere prophylaktische Maßnahmen sollten eingeleitet werden.

Der Ergebnisreport bietet dem Arzt eine Abschätzung des Atheroskleroserisikos seines Patienten und kann bei der Entscheidung der geeigneten Behandlungsmethode helfen. Da die Software die Auswertung der Genotypisierungsergebnisse weitgehend übernimmt, kann der Arzt sich unter der Berücksichtigung der aktuellen Studienlage auf die richtige Behandlungs- und Therapiemethode fokussieren.

Durch die Software wird die Effizienz des gesamten Auswertungsablaufes gesteigert, was sowohl dem Patienten als auch dem Arzt zugutekommt.

GenoChip Atherosklerose

Analyse - Ergebnis

Behandelnder Arzt	Probenmaterial	Patient
Prof. Dr. Max Mustermann Musterstraße 18 D-55116 Mainz	Probenart: EDTA-Blut Entnahmedatum: 02.05.2011 Aufbereitungsdatum: 02.05.2011 Report erstellt: 02.05.2011	Name: Karin Schmidt Geburtsdatum: 12.07.1971 Patienten ID: C-1221 Geschlecht: weiblich

Ergebnisse und Interpretation

Erhöhtes Risiko

Analysierte Gene	Untersuchte Variationen	Ergebnis
PTGS1	G1006A	Heterozygot
PTGS1	R8W	Wildtyp
PTGS1	P17L	Wildtyp
PTGS2	G-765C	Wildtyp
eNOS	-786T/C	Heterozygot
F5	G1691A	Wildtyp
MTHFR	C677T	Wildtyp
CETP	Taq 1b	Wildtyp
ApoE	Cys 112 Arg	Wildtyp
ApoE	Arg 158 Cys	Mutation
Prothrombin	G20210A	Wildtyp
LPL	D9N	Wildtyp
LPL	S447X	Heterozygot

Bei der Genanalyse der Atherosklerosefaktoren konnten 4 Mutationen identifiziert werden.

Therapeutische Empfehlung: Gemäß der Literatur ist aufgrund der vorliegenden Mutationen ein erhöhtes Atheroskleroserisiko beim Patienten zu erwarten. Die Empfehlung sieht eine engmaschigere diagnostische Begleitung vor und weitere prophylaktische Maßnahmen sollten eingeleitet werden.

Weiterführende Literatur zu den betreffenden Mutationen siehe Lee et al., 2008, Casas et al., 2006, Kolovou et al., 2007 und Rib et al., 2008.

Zusätzliche Informationen: Umfangreiche Informationen über den GenoChip Atherosklerose Test sind unter PharmGenomics.com zu finden.

Abbildung 22: Ergebnis der Genotypisierungsanalyse.

5 Diskussion

Derzeit werden Biochips in der Diagnostik nur selten angewandt, was im Wesentlichen auf die hohen Kosten zurückzuführen ist. Diese belaufen sich bei einem herkömmlichen Mikroarray auf mehrere Hundert Euro. Zusätzlich wird noch eine teure Infrastruktur (Geräte, qualifiziertes Personal, usw.) im Wert von einmalig ca. einer viertel Million Euro benötigt (Mülhardt et al., 2006).

Die in dieser Arbeit eingesetzte Technologieplattform stammt von der Alere Technologie GmbH aus Jena. Der entwickelte Mikroarray und der handlichere Reader zur Visualisierung der Genotypisierung sind wesentlich kostengünstiger als bei vergleichbaren Anbietern. Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass die Detektion nicht mit der teuren Fluoreszenz erfolgt. Auch die weiter benötigten Reagenzien sind wesentlich preiswerter.

Bislang wird der verwendete Mikroarray überwiegend für einen qualitativen Nachweis verschiedener bakterieller Gene und Viren eingesetzt. Bakterien haben im Gegensatz zu uns Menschen nur ein Allel, was die Anwendung deutlich vereinfacht.

5.1 Selektion der Marker

Atherosklerose ist eine hochkomplexe Krankheit, welche durch unterschiedlichste Einflüsse bestimmt werden kann. Daher ist eine gleichzeitige Messung von mehreren Parametern essentiell, um mögliche Interaktionen untereinander aufzuzeigen (Stephens et al., 2003). Wird nur ein einzelner Polymorphismus - bei einer ganz speziellen klinischen Bedingung - isoliert für sich untersucht, hat dies nur begrenzte Aussagekraft (Tanus-Santos et al., 2001).

Es wurden Polymorphismen ausgewählt, bei denen in der Literatur Assoziationen mit Atherosklerose gefunden wurden. Ob die ausgewählten Gene tatsächlich Risikofaktoren sind, soll hier nicht hinterfragt werden, da es sich bei der Auswahl lediglich um Kandidatengene handelt. Die derzeitige Datenlage ist noch nicht

ausreichend, um einen aussagekräftigen Test für die klinische Anwendung zu entwickeln (Humphries et al., 2004).

Aufgrund der großen Komplexität der Erkrankung ist anzunehmen, dass es nicht nur ein Gen gibt, das für die Entstehung von Atherosklerose verantwortlich ist (Mencke, 1997). Wahrscheinlicher ist, dass eine Vielzahl von Genen beteiligt sind, die zusätzlich miteinander interagieren.

5.2 Assoziation mit Atherosklerose

Bei einzelnen Risikofaktoren werden in den veröffentlichten Studien teilweise widersprüchliche Daten im Bezug auf die Assoziation mit Atherosklerose gefunden. Deshalb wird im Folgenden eine Risikoklassifizierung nach einem einfachen Ampelschema durchgeführt. Für die einzelnen Gene wurde eine Analyse der in der Literatur beschriebenen Studien durchgeführt und kritisch betrachtet. Daraus ergab sich die folgende Farbeinteilung:

- Die Mutation impliziert erwiesenermaßen Atherosklerose
- Es gibt hinreichende Hinweise, dass die Mutation im Zusammenhang mit Atherosklerose steht, aber keinen eindeutigen Beweis
- Die Mutation erhöht nicht das Risiko des Ausbruchs von Atherosklerose, sondern zeigt protektive Eigenschaften

5.2.1 Prostaglandinsynthase-1 und 2 (PTGS1 und PTGS2)

Die Punktmutation des PTGS1-Gens G-1006A wurde im Zusammenhang mit ischämischen Schlaganfällen bei Kaukasiern untersucht. Dabei wurde ein Quotenverhältnis (Odds Ratio=OR) von 1,7 gefunden (Lee et al., 2008). Aufgrund dieses erhöhten Wertes wird G-1006A dem roten Bereich zugeordnet.

Der Polymorphismus R8W, eine weitere Mutation des Gens, wurde ebenfalls in diesem Zusammenhang analysiert. Das untersuchte Kollektiv waren hierbei Afro-Amerikaner. Der postulierte Odds Ratio lag bei 2,21. Dabei muss aber beachtet werden, dass unterschiedliche Resultate bei der Untersuchung von anderen Bevölkerungsgruppen

und im Zusammenhang mit anderen Gefäßerkrankungen vorliegen (Lee et al., 2008). Deshalb wird R8W im gelben Bereich angesiedelt.

Studien zu der Mutation P17L, durchgeführt mit Kaukasiern, zeigten ein erhöhtes Risiko von 1,36 für ischämische Schlaganfälle, weshalb P17L in den roten Bereich fällt. Bei dem Polymorphismus G-765C des PTGS2-Gens wurde eine Halbierung des Risikos für Herzinfarkt und Schlaganfall bei Italienern nachgewiesen (Cipollone et al., 2004). Andere Quellen konnten dieses Resultat aber nicht belegen (Kohsaka et al., 2008; Lee et al., 2008). Aufgrund der widersprüchlichen Datenlage erfolgt eine gelbe Risikoklassifizierung.

5.2.2 Endotheliale NO-Synthase (eNOS)

22 Studien zu der Mutation 786 T/C erwiesen jeweils einen Odds Ratio von 1,17 für kardiovaskuläre Erkrankungen (Casas et al., 2006). 786 T/C fällt somit in den roten Bereich.

Homozygote Allelträger des E298D-Polymorphismus wiesen einen geringeren Blutdruck auf, bei Japanern wurde eine Prädisposition für koronare Spasmen aufgezeigt (Yoshimura et al., 1998). Weitere Studien über diesen eNOS-Polymorphismus zeigten Unstimmigkeiten sowohl für koronare Spasmen als auch den Zusammenhang mit Herzinfarkt (Tanus-Santos et al., 2001).

Die Untersuchung von 14 Studien über ischämischen Herzkrankheiten erwies für E298D schließlich einen Odds Ratio von 1,31 (Casas et al., 2004). Casas et al. erhielt außerdem beim Vergleich von 42 Studien über E298D einen Odds Ratio von 1,17 für kardiovaskuläre Erkrankungen (Casas et al., 2006) und Dafni et. al. einen Odds Ratio von 1,43 bei Herzinfarktpatienten (Dafni et al., 2010). Da Casas et al. in der Metaanalyse die vorherigen Studien berücksichtigt hat, erfolgt eine rote Klassifizierung.

5.2.3 Faktor V (F5)

Bei der Faktor-V-Leiden-Mutation (G1691A) hat eine Homozygotie ein 80-fach erhöhtes Risiko für Thrombose zur Folge (Kalafatis et al., 1997). In klinischen Studien wurde es in den Zusammenhang mit koronaren Herzerkrankungen gebracht (27277 Personen, OR=4,43 Morgan et al., 2003). Die Klassifizierung ist somit auch hier rot.

5.2.4 5,10-Methylen tetrahydrofolsäure-Reduktase (MTHFR)

Träger der 677T-Mutation haben ein 15% höheres Risiko für koronare Herzkrankheiten und zu 25% häufiger einen Schlaganfall als 677C-Träger (Schmitz et al., 2008), denn aus dem mutierten Protein resultiert ein geringer Folsäurespiegel und ein hoher Homocystein-Level (Frosst et al., 1995, Tanaka et al., 2009). Gleicht man diesen Mangel durch die Gabe von Folsäure aus, bewirkt dies einen normalisierten Homocystein-Level (Kara et al., 2003). Vitaminsubstitutionen in Interventionsstudien, welche zur Senkung des Homocysteinspiegels führen, konnten aber keine Risikoverminderung für kardiovaskuläre Ereignisse zeigen (Schmitz et al., 2008). Die Risikoeinschätzung wird von verschiedenen Autoren kontrovers diskutiert: Klerk et al. untersuchte dies 2002 in 40 Studien und fand zusammengefasst für alle Studienteilnehmer einen OR von 1,16; spezifisch für Europa 1,14. Humphries et al. (2004) kam nach Analyse von 48 Studien zu einem OR von 1,2. Lewis et al. (2005) verglich diesbezüglich 80 Studien und kam zu einem absoluten Risiko von 1,14; für Europa nur auf einen OR von 1,08 und schlussfolgerte hieraus, dass es keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Mutation und koronaren Herzkrankheiten in Europa zu geben scheint. Bei genauer Betrachtung der Studienvergleiche fällt auf, dass für dieselben zitierten Studien unterschiedliche ORs für MTHFR angegeben werden (Humphries et al., 2004, Lewis et al., 2005). Die Studienergebnisse können also durch unterschiedliche statistische Auswertungen zu gegenteiligen Schlussfolgerungen führen. Eine weitere Erklärung, weshalb die Studien unterschiedliche Ergebnisse liefern, könnte der altersabhängige Einfluss des MTHFR-Genotyps auf den Homocystein-Level sein (Visvikis-Siest et al., 2006). Aufgrund der Unstimmigkeiten und der deshalb nicht ausreichend aussagekräftigen Werte wird C677T in den gelben Bereich eingeordnet.

Eine weitere Variante ist A1298C, bei dem das Schlaganfallrisiko von Sazci et al. (2006) mit einem OR von 2,5 angegeben wird. Dieser Wert liegt eindeutig im roten Bereich.

5.2.5 Arachidonat-5-Lipoxygenase-aktivierendes Protein (Alox AP)

Mutationen in Alox AP sind sowohl mit Herzinfarkt (OR=1,8) als auch mit Schlaganfall (OR=1,7) assoziiert (Yamada et al., 2008). In Island wurde für die Träger von HapA ein doppeltes Risiko für Herzinfarkt und Schlaganfall nachgewiesen, wohingegen in

England nur HapB mit Schlaganfällen und Herzinfarkten assoziiert wurde (Helgadottir et al., 2004). Studien aus Schweden zeigen eine Beziehung zwischen allen vier SNPs von HapA und Schlaganfall bedingt durch Ischämie (OR=1,82, Lövkvist et al., 2008). Für alle vier SNPs von HapB wurden für Briten, Italiener und Deutsche Assoziationen mit Herzinfarkt gefunden (van der Net et al., 2008). Wegen der regional kontroversen Ergebnisse erfolgt die Klassifikation gelb für HapA und HapB.

HapAB ist in der europäischen Population mit einem Odds Ratio von 1,17 mit Schlaganfall assoziiert, bei Männern sogar mit 1,24 (Löhmußaar et al., 2005). Die Klassifizierung ist deshalb rot.

5.2.6 Cholesterinester-Transferprotein (CETP)

Es konnte gezeigt werden, dass eine Korrelation zwischen dem CETP-Gen und dem Risiko, eine kardiovaskuläre Krankheit zu entwickeln, besteht.

Die Mutation Taq 1b (B2) weist eine signifikant geringere CETP-Konzentration auf, welche mit einer Verringerung des koronaren Herzerkrankungsrisikos um 32% einhergeht (Sandhofer et al., 2008). Boekholdt et al. (2005) untersuchte Studien mit insgesamt 24331 Personen und fand für homozygote B2-Träger eines Odds Ratio von 0,78. Diese Mutation hat somit protektive Eigenschaften und wird grün klassifiziert.

Über die Variation A1061G des CETP-Gens gibt es kontroverse Meinungen. Thompson et al. (2008) analysierte 102 Studien und fand nur schwache Assoziationen mit dem koronaren Risiko (OR=0,95 für Taq 1b und 0,94 für A1061G). Die A1061G-Mutation wird deshalb dem gelben Bereich zugeordnet.

5.2.7 Apolipoprotein E (ApoE)

Der ApoE2/2-Phänotyp ist mit Hyperlipoproteinämie und Herzinfarkt assoziiert (Kolovou et al., 2007). Bei Patienten mit koronaren Herzerkrankungen und Diabetes wurde für das ApoE-Allel ϵ 2 eine Prävalenz von 1,86 (ohne Diabetes 1,65) gefunden (Vaisi-Raygani et al., 2007). Andere Autoren gehen von keinem erhöhten Risiko aus (Yamada et al., 2008), weswegen dieses Allel in der mittleren Risikoklasse (gelb) eingestuft wird.

Das ϵ 4-Allel führt zur dem ApoE E4-Protein und Humphries et al. (2004) geht, wie viele andere Autoren, von einem Atheroskleroserisiko von OR=1,4 aus. Dieses Risiko

potenziert sich, wenn noch andere Faktoren hinzukommen. So liegt z.B. die Gefahr für Koronaren Herzerkrankungen bei Raucher allein bei 1,94, für männliche Raucher mit $\epsilon 4$ -Genotyp schon bei 3,17 (Stephens et al., 2003) und bei homozygoten $\epsilon 4$ -Patienten mit (ohne) Diabetes bei 6,78 (2,85) (Vaisi-Raygani et al., 2007). Die Zuordnung ist entsprechend rot.

5.2.8 Prothrombin (F2)

Es ist bekannt, dass Träger der Mutation G20210A (F2), ebenso wie Träger der Mutation G1691A (F5), ein erhöhtes Risiko für venöse Thrombose aufweisen. Ob es aber auch mit arterieller Thrombose einhergeht, wird kontrovers diskutiert (Ercan et al., 2008).

Eine Prävalenz für die Prothrombin-Variation wurde bei Frauen mit Bluthochdruck mit einem erhöhten Risiko für Herzinfarkt gesehen (OR=4,32 Psaty et al., 2001). Bei Patienten mit schwerer Atherosklerose der Karotiden wurde eine Heterozygotie für G20210A mit einem Odds Ratio von 2,8 assoziiert (Marcucci et al., 2005). In einem Metavergleich wurden ischämische Herzerkrankungen mit einem Risiko von 1,3 belegt (Kim et al., 2003). Somit wird die Mutation G20210A rot klassifiziert.

5.2.9 Lymphotoxin- α (LTA)

Für beide Mutationen des LTA-Gens, 252A/G und 804C/A wurde durch eine Studie mit 1133 Japanern eine signifikante Erhöhung des Herzinfarkttrisikos auf OR=1,8 gefunden (Ozaki et al., 2002), in einer anderen für 252A/G sogar ein um 2,46 fach erhöhtes Risiko (Mizuno et al., 2006).

In der PROCARDIS-Studie von 2004 wurde bei Europäern eine höhere Herzinfarkt-Assoziation gefunden (OR=1,96 für homozygote - 1,40 für heterozygote Träger).

Demgegenüber steht zum Beispiel die ISIS-Studie, die keine Assoziation mit koronaren Erkrankungen gefunden hat (Clarke et al., 2006). Da zu diesen Mutationen sehr unterschiedliche Ergebnisse existieren, werden hier beide dem gelben Bereich zugeordnet.

5.2.10 Lipoproteinlipase (LPL)
























Asp9Asn (D9N) geht mit einem doppelten Risiko (OR=2) für koronare Herzkrankheiten bei Kaukasiern einher (Bockxmeer et al., 2001), womit es in den roten Bereich fällt. Bei S447X wurde eine Erniedrigung des Blutdrucks nachgewiesen (Clee et al., 2001), wodurch die Mutation als athero-protektiv gilt (Odds Ratio 0.4 (Rip et al., 2008)) und folglich grün einzustufen ist.

Die Mutation N291S führt nicht generell zu koronaren Arterienerkrankungen, das Risiko erhöht sich aber um das 2-3 fache in Kombination mit anderen atheroskleroseverwandten Erkrankungen (Merkel et al., 2002). Da N291S von sich aus aber nicht unbedingt zu koronaren Arterienerkrankungen führt, wird es, statt rot, gelb eingestuft.

5.2.11 Ergebnis der Analyse

Nach der detaillierten Analyse der einzelnen Genvariationen ergibt sich daraus die in Tabelle 20 dargestellte Übersicht der Risikoklassifizierung.

Tabelle 20: Assoziation der einzelnen Variationen mit Atherosklerose, klassifiziert nach dem Ampelschema.

Gen	Variation			Risiko (odd ratio)
PTGS1	G1006A	G>A		1,7
	R8W	C>T		2,21
	P17L	C>T		1,36
PTGS2	G-765C	G>C		0,48
eNOS	-786T/C	T>C		1,17
	E298D	G>T		1,17
F5	G1691A	G>A		4,43
MTHFR	C677T	C>T		1,14
	A1298C	A>C		2,5
Alox AP	HapAB	T-A		1,17
	HapA	G>A		2
	HapB	G>A		
CETP	Taq 1b	G>A		0,79
	A1061G	A>G		0,94
ApoE	Cys112Arg	T>C	ε2 	ε2/ε2 1,7
	Arg158Cys	T>C	ε3 	
				ε4 
Prothrombin	G20210A	G>A		1,30
LTA	252A/G	A>G		1,69
	804C/A	C>A		1,78
LPL	D9N	G>A		2
	S447X	C>G		0,4
	N291S	A>G		bei Erkrankung 2-3

Die stark abweichenden Ergebnisse der einzelnen Studien sind auf die Auswahl der Probanden zurückzuführen, da die meist inhomogenen Studienpopulationen keine passenden Kontrollgruppen aufweisen. Genetische Varianten kommen mit unterschiedlicher Häufigkeit in verschiedenen ethnischen Gruppen vor. Sobald die Probanden aus unterschiedlichen Populationen stammen, bedingt die resultierende ethnische Vielfalt schon eine unterschiedliche Allelhäufigkeit (Clarke et al., 2006). Spielen dann noch geographische Unterschiede und andere Ernährungsgewohnheiten eine Rolle, verstärkt sich der Effekt noch mehr. Ein weiterer Grund könnte der Einsatz von nicht geeigneten Messverfahren sein, durch die Falsch-Positive Resultate aufgrund falscher Charakterisierung der genetischen Risiken entstehen.

Hoch signifikante Ergebnisse werden vor allem in kleinen Studien gewonnen, die dann zu falschen Risikoklassifizierungen führen können. Es werden größere Studien benötigt, um das Risiko vor allem für gering vorkommende Polymorphismen richtig detektieren zu können.

Eine Metaanalyse (Zusammenfassung von Studien) setzt den vollständigen Vergleich aller relevanten Studien voraus. Die Daten müssen sorgfältig interpretiert werden. Kleine Studien oder negative, nicht publizierte Ergebnisse, sind meist nicht in ihnen enthalten. Des Weiteren hat eine selektive Veröffentlichung von positiven Ergebnissen zur Folge, dass sich eine widersprüchliche Datenlage schwerer durchsetzt (Lewis et al., 2005). Personen, die während der Studien gestorben sind oder zu krank waren, um an den Studien teilzunehmen, werden bei der Auswertung eliminiert (Assimes et al., 2008).

Neben einer adäquaten Studiengröße müssten in zukünftigen Studien Interaktionen von genetischen Markern mit dem Umfeld ebenso präzise erfasst werden wie Gen-Gen-Interaktionen (Visvikis-Siest et al., 2006).

Abhängig vom Polymorphismus (Auftreten einer Genvariante) ist eine speziell angepasste Therapie notwendig. Der Mutations-Chip soll eine individuelle Therapie abhängig vom Genotyp ermöglichen, wobei bedacht werden muss, dass erst die Kombination von mehreren Faktoren das Risiko an Atherosklerose zu erkranken drastisch erhöht. Mit dem in dieser Arbeit entwickelten Multiplexarray ist eine kostengünstige Messung mehrerer Genvariationen simultan möglich und damit eine Basis für notwendige Interaktionsstudien geschaffen.

5.3 Entwicklungstechnische Aspekte

5.3.1 Etablierung der PCR und Erstellung der Referenzproben

Die Polymerase-Kettenreaktion, mit deren Hilfe sich charakteristische Genabschnitte millionenfach vervielfältigen lassen, hat eine zentrale Bedeutung in der klinischen Diagnostik. Die Funktionalität der entwickelten Primer für Genabschnitte, die in Assoziation mit Atherosklerose stehen, wurde im ersten Schritt überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Primer spezifisch an den entsprechenden Genabschnitt anlagern, und so das gewünschte Produkt amplifizieren, welches anhand der Fragmentlänge auf einem Gel identifiziert wurde.

Der Einsatz einer Multiplex-PCR erlaubt die effiziente Analyse einer Vielzahl von Markern, da mehrere PCR-Reaktionen in einem Reaktionsgefäß parallel ablaufen können. Bei der Etablierung dieses Verfahrens muss bedacht werden, dass Transkripte, die häufiger vorkommen, bevorzugt amplifiziert werden. Des Weiteren muss die Hybridisierungseffizienz von Primer und PCR-Produkt optimiert und die Rehybridisierungen vermieden werden, da sie zu einer Hemmung der Amplifikationsreaktion führen können (Jansohn, 2007). Für Amplifizierung und Biotinylierung der Proben in einem Multiplex-Ansatz wurden speziell angepasste Primer entwickelt. Es hat sich gezeigt, dass viele Primer nicht bei der Amplifizierung funktioniert haben. Daher wurden zum Großteil neue Primer konzipiert. Ziel war es, alle Variationen mit möglichst geringem Aufwand zu amplifizieren. Einige der untersuchten Genfragmente wie ApoE (Cys112Arg und Arg158Cys) konnten jedoch aufgrund der schwierigen Sequenz nur separat amplifiziert werden. In manchen Multiplex-Ansätzen sind längere als die zu erwartenden Gelfragmente entstanden. Dies wurde durch die Visualisierung der Genfragmente durch die Gelelektrophorese nachgewiesen. Bei diesen handelte es sich wahrscheinlich um mit einander hybridisierende PCR-Produkte. Dies führte aber in keiner Weise zu einem falschen Nachweis der einzelnen Polymorphismen, da diese größeren Fragmente bei jedem Versuch vorkamen und somit auch in die Validierung mit einfließen.

Bisher ist es gelungen, alle Gene in fünf Ansätze zu integrieren. Eventuell könnten durch die Entwicklung neuer Primer die Ansätze, in denen die Gene amplifiziert werden, reduziert werden.

Die gezielte Mutagenese zur Herstellung der Referenzproben erforderte lange Entwicklungsarbeiten, bis die Mutante durch eine erfolgreiche Sequenzierung bestätigt wurde. Teilweise führte das gleiche Protokoll nach einer Vielzahl von Misserfolgen letztendlich doch zu einem positiven Ergebnis. Das Hauptproblem bestand darin, dass entstandene Nebenprodukte die PCR und die Sequenzierung störten. Wurde zu viel DNA eingesetzt, wurde der Wildtyp anstelle der mutagenisierten Teilprodukte vermehrt. Andererseits war eine gewisse DNA-Menge nötig, damit sich die Teilprodukte daran anlagern konnten, um den gesamten Strang zu amplifizieren. Einfacher, wenn ungleich teurer, wäre die externe Herstellung der Teilfragmente gewesen, welche man anschließend nur noch miteinander fusionieren müsste.

5.3.2 Referenzsystem LightCycler

Es gibt viele Möglichkeiten zum Nachweis einer Punktmutation wie beispielsweise den Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP), die direkte Sequenzierung oder die, auf Fluoreszenz basierende Real-Time PCR in Verbindung mit TaqMan™, Molecular-Beacon-System, Scorpions™-System oder FRET™.

Für diese Arbeit wurde die Real-Time PCR eingesetzt, um die unbekanntenen Proben zu analysieren. Die Hybridisierungssonden wurden so konzipiert, dass die identifizierten Proben als Referenzproben für den Mutations-Chip eingesetzt werden konnten. Eine deutliche Diskriminierung der unterschiedlichen Genotypen (Wildtyp, Heterozygote, Mutante) konnte durch die unterschiedlichen Schmelzpunkte der PCR-Produkte erreicht werden. Es konnte durch Sequenzierung bestätigt werden, dass die Hybridisierungssonden eine geeignete Methode zur Genotypisierung darstellen.

Räumlich nahe beieinander liegende Mutationen können einen großen Einfluss auf die Detektion haben, weswegen die erhaltenen Schmelzkurven sorgfältig interpretiert werden müssen. Im Zweifelsfall muss eine Sequenzierung durchgeführt werden. Bereits beim Nachweis von CETP Taq 1b kann es mit TaqMan™-Sonden zu Fehlklassifizierungen kommen, wenn andere Variationen in der Nähe sind, die nicht beachtet wurden (Teupser et al., 2001).

Bei einem RFLP wird die DNA einer Patientenblutprobe mittels PCR vervielfältigt und durch ein Restriktionsenzym verdaut. Die Länge des Restriktionsfragments wird mithilfe der Gelelektrophorese bestimmt und ist abhängig vom Vorhandensein einer

Erkennungssequenz für das Enzym. Diese Restriktionsschnittstelle kann aber durch eine Variation entweder entstehen oder verloren gehen, wodurch es zu einer Missklassifizierung kommen kann. Dies konnte bei der Diagnose von Faktor-V-Leiden passieren, denn dort gibt es eine zusätzliche Punktmutation (A>C) bei Nukleotid 1692, welches in räumlicher Nähe zu Faktor-V-Leiden ist (Teupser et al., 2001). Der Autor hatte dieses Problem erkannt und Hybridisierungs sonden eingesetzt. Die Sonden haben den Vorteil, dass sich Anomalien anhand der Schmelzkurve direkt zeigen lassen.

Das LightCycler-System mit den Hybridisierungs sonden liefert eine einfache, reproduzierbare Technik, bei der nur eine geringe Menge an Substanzen benötigt wird. Das Risiko von Kontaminationen wird durch das geschlossene Kapillar-System reduziert. Mit den Glas-Kapillaren sind schnelle Heiz- und Kühlraten möglich, was sich in einer kurzen PCR-Dauer bemerkbar macht. Der Nachteil dieser Methode ist, dass die Menge an Fluoreszenzkanälen des LightCyclers die Genvariationanzahl begrenzt, die in einem Lauf gleichzeitig gemessen werden können. Der für diese Arbeit verwendete LightCycler hatte nur zwei Kanäle, sodass maximal zwei Genvariationen gleichzeitig gemessen werden konnten. Des Weiteren sind die Kosten hoch, wenn viele Genvariationen von einem Probanden gemessen werden müssen.

5.3.3 Entwicklung des Mutations-Chips

Mikroarrays stehen noch ganz am Anfang der Entwicklung und werden aufgrund ihrer vielfältigen Entwicklungsmöglichkeiten bald populärer und preiswerter werden (Mülhardt et al., 2006). Auf dem in dieser Arbeit eingesetzten Mikroarray wurden mit einem Spottingroboter Sonden aus Nukleinsäuren aufgetragen. Die Hybridisierung zwischen Proben-Fragment und Sonde wurde anschließend mit Hilfe eines optischen Readers nachgewiesen. Die konventionellen Methoden sind sehr zeit- und kostenintensiv, viele teure Spezialgeräte werden benötigt ebenso wie entsprechendes Fachpersonal. Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines einfachen und schnelleren Verfahrens, das in möglichst vielen Laboren ihren Einsatz finden kann und dabei kein teures Spezialequipment benötigt. Lediglich ein kostengünstiger Reader zur elektronischen Erfassung der Nachweisreaktion wird gebraucht, aufgrund seiner Handlichkeit ist er nicht viel höher als ein Kugelschreiber.

Zuerst wurde für die Entwicklung des Mutations-Chips ein Protokoll entwickelt, bei dem alle zu untersuchenden Genabschnitte ein Signal zeigten. Dies ließ sich bereits durch wenige Waschschriffe nach der Hybridisierung bei Raumtemperatur erreichen. Gleichzeitig wurde an der erfolgreichen Multiplex-PCR gearbeitet. Diese amplifiziert bevorzugt DNA-Sequenzen, die sowieso schon in größeren Mengen vorhanden sind. Es war anspruchsvoll, Bedingungen zu finden, bei denen auch die benachteiligten Gene in ausreichender Menge, für den Nachweis, erzeugt werden.

War dies erreicht, konnte der sondenspezifische Nachweis optimiert werden. Abhängig von der Identität der eingesetzten Probe sollten die Sonden ein spezifisches Signal für die jeweiligen Genotypen zeigen. Aufgrund von Protokolländerungen bei der Chip-Durchführung konnte die Sensitivität beeinflusst werden. Dafür wurden Tests mit verschiedensten Puffern und Temperaturen durchgeführt.

Durch die Erhöhung der Hybridisierungstemperatur konnte keine deutliche Stringenz erreicht werden, da, sobald der Chip wärmer als 60°C wurde, die Dichtigkeit deutlich nachließ und so Flüssigkeit austreten konnte. In späteren Chargen wurde das Problem vom Hersteller durch Veränderung der Zusammensetzung des Klebers gelöst. Dennoch wurde nicht die Hybridisierungstemperatur, sondern die Temperatur der anschließenden Waschschriffe erhöht, da diese einen viel stärkeren Einfluss auf die Hybridisierung hatte. Die Ionenstärke der verwendeten Waschpuffer wie auch die Anzahl der Waschschriffe hatten nur einen geringen Einfluss auf das Ergebnis. Sobald eine Änderung vorgenommen wurde, waren Anpassungen aller anderen Parameter notwendig, da sich die Bedingungen verändert hatten.

Bei einer neuen Chip-Charge wurden sowohl ganz neu designte Sonden als auch bereits geeignete Sonden des Chips der alten Charge eingesetzt. Zur Optimierung fanden erneute Modifikationen der PCR- und Chip-Protokolle statt, wodurch sich ehemals ungeeignete Sonden später doch als ideale Kandidaten herausstellten. Der Einsatz von redundanten Sonden führte zu einer größeren Sicherheit und Verlässlichkeit der Ergebnisse, da Helligkeitsschwankungen oder nicht entfernbare geringe Verschmutzungen zu nicht auswertbaren Ergebnissen führten.

Eine deutliche Vereinfachung der Chip-Durchführung brachte der Einsatz des Hybridisierungs-Kits der Alere Technologie GmbH. Damit ließ sich die Inkubationszeit der einzelnen Puffer deutlich reduzieren.

Nach der erfolgreichen Etablierung wurde der Chip mit artifiziell hergestellten Referenzproben und mit Referenz-DNA von den zu untersuchenden Genabschnitten validiert. Dies geschah durch unterschiedliche Personen an unterschiedlichen Tagen, um durchführungsbedingte Schwankungen zu simulieren. Das Verhalten der Referenzproben lässt sich mit richtiger DNA nicht gleichsetzen, da es sich um die in der Mutagenese entstandene PCR-Produkte handelt. Schon allein die Ausgangsmenge lässt sich unmöglich gleich einstellen und die Vergleichbarkeit der Amplifikation der PCR ist erst recht nicht gegeben, da die DNA mit Hilfe der Multiplex-PCR vermehrt wird. Dieses Vorgehen ist bei einer Referenzprobe nicht möglich, da sie nur aus einem gewünschten Genabschnitt besteht. Zudem kann nie ausgeschlossen werden, dass in einer Referenzprobe noch Reste anderer DNA enthalten sind, die zufällig durch die anderen Primer in der PCR vermehrt werden könnten. Aus diesen Gründen wird jede Referenzprobe für sich amplifiziert. Für den anschließenden Chip-Versuch ist es schwierig, die gleiche Menge zu wählen, wie die, die in einem Multiplex-Ansatz entstanden wäre. Daher wurden für die Validierung zusätzlich noch Versuche mit Referenz-DNA durchgeführt. Sobald eine Mutation in einer DNA gefunden wurde, wurde die DNA im entsprechenden Multiplex-Ansatz vermehrt und auf einem separaten Chip untersucht. Nur so konnten die späteren Bedingungen exakt nachgestellt werden. Mit Mutationen, die nur als Referenzprobe vorlagen, ging dies natürlich nicht.

Die Leistungsbewertungsprüfung und die Stabilitätstests ergaben, dass für die zwölf Polymorphismen eine zu 100% genaue Detektion möglich ist und die Lösungen über mindestens zwei Monate stabil sind.

Wie bei den meisten SNP-Nachweisen gibt es bei Proben Probleme, die in unmittelbarer Nähe zu einer Variation noch eine weitere ausweisen. Sobald die weitere Variation an einer Stelle ist, an der die Sonde bindet, kann diese nicht mehr perfekt binden und wird beim Waschen entfernt. Das Ergebnis ist, dass idealerweise keine DNA an der Sonde für die entsprechende Variation gebunden hat und daher kein Nachweis möglich ist. Dies geschieht aber nur, wenn die Spezifität der Sonden gegeben ist, was sich aber nur sehr schlecht überprüfen lässt. Im Zweifelsfall würde es am LightCycler anhand der Schmelzkurve zu sehen sein, eine Sequenzierung würde in allen Fällen Sicherheit bringen.

5.4 Klinische Anwendbarkeit

Ziel war es ein diagnostisches Instrument zu entwickeln, welches ein einfaches und preiswertes Verfahren zur Aufklärung von genomischen Variationen liefert. Diese SNP-Detektion ist ein ökonomisches Hilfsmittel, das nun seinen Einsatz in der Forschung und Wissenschaft finden soll. Die Erfassung der genetischen Prädisposition hilft in der klinischen Behandlung, Patienten zu motivieren, das persönliche Risiko zu beeinflussen und bestenfalls zu vermindern. Außerdem kann die Abschätzung des Atheroskleroserisikos aufgrund der spezifischen Variationen bei der Entscheidung für alternative Behandlungsmethoden hilfreich sein.

Einer kommerziellen Nutzung des entwickelten Microarray steht nun nichts mehr im Wege. Der innovative Chip bietet eine kostengünstige und besonders zuverlässige Möglichkeit, reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Dabei ist er intuitiv zu verwenden und ermöglicht im Vergleich zu herkömmlichen Verfahren eine schnellere Genotypisierung von vielen Polymorphismen. Eine erfolgreiche Messung der zwölf Genvariationen mit dem Mutations-Chip dauert nur vier Stunden. Die reine Arbeitszeit für die Isolierung der DNA aus Blut, die Multiplex-PCR sowie die anschließende Detektion mit dem Chip betragen eine Stunde.

Moralische Bedenken dürfen aber hier nicht außer Acht gelassen werden. So können beispielsweise Versicherungen in Zukunft für wenig Geld alle potentiellen Mitglieder auf mögliche Erbkrankheiten hin untersuchen lassen. Andererseits kann diese Diagnostik eine individuell angepasste Therapie ermöglichen und so vielen Menschen helfen (Mülhardt et al., 2006).

5.5 Ausblick

Die Sequenzierung des gesamten Genoms ist heute schon Realität. Durch Gen-Chips könnten 100000 Gene gleichzeitig untersucht werden, so dass eine intensive Forschung der genetischen Physiologie und Interaktionen mit der Umwelt möglich wäre (Stephens et al., 2003). Die Entwicklung eines solchen Mikroarrays erfordert

umfangreiche Testreihen, da mögliche Interaktionen zwischen den nachzuweisenden Variationen sorgfältig verifiziert werden müssen. Des Weiteren müssen Investoren gefunden werden, die diese aufwändige Entwicklung finanzieren. Zukünftig müssen für die Analyse der Daten neue Verfahren entwickelt werden, um die Datenflut bewältigen zu können (Mülhardt et al., 2006).

Aufbauend auf dieser Arbeit wäre der Einsatz des Chips im Rahmen einer Studie zu empfehlen, um an einem Kollektiv von Patienten festzustellen, wie die einzelnen Faktoren zu gewichten sind und wie diese mit dem Atheroskleroserisiko zu korrelieren sind. Zukünftige Studien müssen zudem noch zeigen, inwieweit eine Variation in den Stoffwechselprozess eingreift und ob das daraus resultierende Enzym mit einer veränderten Aktivität einhergeht.

Bereits im Vorfeld einer Therapie könnte der Chip aufdecken, ob eine atheroskleroserelevante Variation vorliegt. So könnte der Patient dann durch eine frühere Erkennung der Erkrankung profitieren, was sich in einer höheren Lebenserwartung, besseren Therapie-Verträglichkeit und Lebensqualität äußert.

Zukünftige Einsatzmöglichkeiten wären vor allem epidemiologische Studien, die ganze Familien einem Risikoscreening unterziehen, oder Präscreenings von medizinischen Studien. Auch die Anwendung für die genetische Beratung oder die Risikoklassifizierung bei Übergewichtigen wäre denkbar.

Aufgrund der guten Anpassbarkeit des Chips könnten je nach Studienlage sogar noch zusätzliche Variationen auf dem Chip etabliert werden. Dies würde die Aussagekraft weiter erhöhen.

6 Zusammenfassung

Die Entstehung der Atherosklerose ist ein komplexer Vorgang, der sich durch Ablagerung von Lipiden an der Gefäßwand sowie durch immunologische und inflammatorische Prozesse auszeichnet. Neben konventionellen Risikofaktoren wie Alter, Geschlecht, Rauchen, HDL-Cholesterin, Diabetes mellitus und einer positiven Familienanamnese werden zur Bestimmung des atherosklerotischen Risikos neue Biomarker der inflammatorischen Reaktion untersucht. Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Methode zur Diagnostik des Atheroskleroserisikos. Es wurde eine neuartige Chip-Technologie eingesetzt, um das Risiko für eine potentiell drohende atherosklerotische Erkrankung abzuschätzen. Dabei wurde ausgenutzt, dass molekulare Veränderungen in Genen bestimmte Krankheitsbilder auslösen können.

Es wurde ein molekularbiologischer Test entwickelt, welcher die Untersuchung von genetischen Variationen aus genomischer DNA ermöglicht. Dafür fand die Entwicklung einer Multiplex-PCR statt, deren Produkt mit der Chip-Technologie untersucht werden kann. Dazu wurden auf einem Mikroarray Sonden immobilisiert, mit deren Hilfe genspezifische Mutationen nachgewiesen werden können. So wurden mehrere Gene mit einem geringen Aufwand gleichzeitig getestet.

Die Auswahl der entsprechenden Marker erfolgte anhand einer Literaturrecherche von randomisierten und kontrollierten klinischen Studien. Der Mikroarray konnte für zwölf Variationen in den acht Genen Prostaglandinsynthase-1 (PTGS1), Endotheliale NO-Synthase (eNOS), Faktor V (F5), 5,10-Methylentetrahydrofolsäure-Reduktase (MTHFR), Cholesterinester-Transferprotein (CETP), Apolipoprotein E (ApoE), Prothrombin (F2) und Lipoproteinlipase (LPL) erfolgreich etabliert werden. Die Präzision des Biochips wurde anhand der Echtzeit-PCR und der Sequenzierung nachgewiesen.

Der innovative Mikroarray ermöglicht eine einfache, schnelle und kosteneffektive Genotypisierung von wichtigen Allelen. Viele klinisch relevante Variationen für Atherosklerose können nun in nur einem Test überprüft werden. Zukünftige Studien müssen zeigen, ob die Methode eine Vorhersage über den Ausbruch der Erkrankung und eine gezielte Therapie ermöglicht. Dies wäre ein erster Schritt in Richtung präventive und personalisierter Medizin für Atherosklerose.

7 Summary

The development of atherosclerosis is characterized by lipid aggregation in the endothelium as well as immunological and inflammatory processes. Aside from conventional risk factors such as age, sex, smoking, low HDL-cholesterol levels, diabetes mellitus and a positive family history, new biomarkers for the determination of inflammatory processes are studied in order to evaluate the individual atherosclerotic risk. The aim of this thesis was the development of a diagnostic method to assess the risk of atherosclerosis. A newly developed chip technology was adapted to predict a potential atherosclerotic disease. Molecular changes in genes can cause certain diseases.

A molecular biology test was developed to investigate genetic variations within genomic DNA. The general principle of this test based on a multiplex-PCR which product could be assayed with the Chip-Technology. Therefore samples were immobilized on the microarray in order to identify gene-specific mutations. With this technology, numerous genes could be measured simultaneously only with little effort.

The selection of the respective markers was based on randomized and controlled clinical studies. A microarray for twelve gene variations of prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (PTGS1), endothelial nitric oxide synthase (eNOS), coagulation factor V (F5), 5,10- methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), cholesteryl ester transfer protein (CETP), apolipoprotein E (ApoE), prothrombin (F2) and lipoprotein lipase (LPL) has been successfully established in the course of this project. The precision of the microarray was evaluated by using real-time PCR and sequencing.

The innovative microarray enables a simple, quick and cost effective genotyping of important alleles. Various clinical relevant variations for atherosclerosis could be now analyzed in just one comprehensive test. Future studies will have to show if this method really enables a prediction of the development of the disease. This would be a first approach to a preventive diagnostic method and a personalized medicine approach for atherosclerosis.

8 Literaturverzeichnis

- von Ahsen N, Schütz E, Armstrong VW, Oellerich M. (1999) Rapid detection of prothrombotic mutations of prothrombin (G20210A), factor V (G1691A), and methylenetetrahydrofolate reductase (C677T) by real-time fluorescence PCR with the LightCycler. *Clin Chem.* **5**: 694-696
- Aichner F, Brainin M, Eber B, Huber K, Magometschnigg H, Pilger E, Wiedermann C 2002. Atherothrombose. *Georg Thieme Verlag (Stuttgart)*.
- Asensi V, Montes AH, Valle E, Ocaña MG, Astudillo A, Alvarez V, López-Anglada E, Solís A, Coto E, Meana A, Gonzalez P, Carton JA, Paz J, Fierer J, Celada A 2006. The NOS3 (27-bp repeat, intron 4) polymorphism is associated with susceptibility to osteomyelitis. *Am J Epidemiol.* **164**: 921-935
- Assimes TL, Knowles JW, Priest JR, Basu A, Volcik KA, Southwick A, Tabor HK, Hartiala J, Allayee H, Grove ML, Tabibiazar R, Sidney S, Fortmann SP, Go A, Hlatky M, Iribarren C, Boerwinkle E, Myers R, Risch N, Quertermous T 2008. Common polymorphisms of ALOX5 and ALOX5AP and risk of coronary artery disease. *Hum Genet.* **123**: 399-408
- Barzilai N, Atzmon G, Schechter C, Schaefer EJ, Cupples AL, Lipton R, Cheng S, Shuldiner AR 2003. Unique lipoprotein phenotype and genotype associated with exceptional longevity. *JAMA.* **290**: 2030-2040
- Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, Reitsma PH 1994. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature.* **369**: 64-67
- Bhakdi S, Lackner KJ, Han SR, Torzewski M, Husmann M 2004. Beyond cholesterol: the enigma of atherosclerosis revisited. *Thromb Haemost.* **91**: 639-645
- van Bockxmeer FM, Liu Q, Mamotte C, Burke V, Taylor R 2001. Lipoprotein lipase D9N, N291S and S447X polymorphisms: their influence on premature coronary heart disease and plasma lipids. *Atherosclerosis.* **157**: 123-129

- Böcker W, Denk H, Heitz U, Moch H 2008. Pathologie. *Elsevier GmbH (München)*. **4**:
- Boekholdt SM, Sacks FM, Jukema JW, Shepherd J, Freeman DJ, McMahon AD, Cambien F, Nicaud V, de Groot GJ, Talmud PJ, Humphries SE, Miller GJ, Eiriksdottir G, Gudnason V, Kauma H, Kakko S, Savolainen MJ, Arca M, Montali A, Liu S, Lanz HJ, Zwinderman AH, Kuivenhoven JA, Kastelein JJ 2005. Cholesteryl ester transfer protein TaqIB variant, high-density lipoprotein cholesterol levels, cardiovascular risk, and efficacy of pravastatin treatment: individual patient meta-analysis of 13,677 subjects. *Circulation*. **111**: 278-287
- Brisson D, Ledoux K, Bossé Y, St-Pierre J, Julien P, Perron P, Hudson TJ, Vohl MC, Gaudet D 2002. Effect of apolipoprotein E, peroxisome proliferator-activated receptor alpha and lipoprotein lipase gene mutations on the ability of fenofibrate to improve lipid profiles and reach clinical guideline targets among hypertriglyceridemic patients. *Pharmacogenetics*. **12**: 313-320
- Burzotta F, Paciaroni K, De Stefano V, Crea F, Maseri A, Leone G, Andreotti F 2004. G20210A prothrombin gene polymorphism and coronary ischaemic syndromes: a phenotype-specific meta-analysis of 12 034 subjects. *Heart*. **90**: 82-86
- Casas JP, Bautista LE, Humphries SE, Hingorani AD 2004. Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic heart disease: meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects. *Circulation*. **109**: 1359-1365
- Casas JP, Cavalleri GL, Bautista LE, Smeeth L, Humphries SE, Hingorani AD. 2006. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and cardiovascular disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. **164**: 921-935
- Cheng S, Grow MA, Pallaud C, Klitz W, Erlich HA, Visvikis S, Chen JJ, Pullinger CR, Malloy MJ, Siest G, Kane JP 1999. A multilocus genotyping assay for candidate markers of cardiovascular disease risk. *Genome Res*. **9**: 936-949
- Cipollone F, Toniato E, Martinotti S, Fazio M, Iezzi A, Cuccurullo C, Pini B, Ursi S, Vitullo G, Averna M, Arca M, Montali A, Campagna F, Uchino S, Spigonardo F, Taddei S, Virdis A, Ciabattini G, Notarbartolo A, Cuccurullo F, Mezzetti A; Identification of New Elements of Plaque Stability (INES) Study Group 2004. A

polymorphism in the cyclooxygenase 2 gene as an inherited protective factor against myocardial infarction and stroke. *JAMA*. **291**: 2221-2228.

- Clarke R, Xu P, Bennett D, Lewington S, Zondervan K, Parish S, Palmer A, Clark S, Cardon L, Peto R, Lathrop M, Collins R; International Study of Infarct Survival (ISIS) Collaborators 2006. Lymphotoxin-alpha gene and risk of myocardial infarction in 6,928 cases and 2,712 controls in the ISIS case-control study. *PLoS Genet*. **2**: e107
- Clee SM, Loubser O, Collins J, Kastelein JJ, Hayden MR 2001. The LPL S447X cSNP is associated with decreased blood pressure and plasma triglycerides, and reduced risk of coronary artery disease. *Clin Genet*. **60**: 293-300
- Dafni C, Drakoulis N, Landt O, Panidis D, Reczko M, Cokkinos DV 2010. Association of the eNOS E298D polymorphism and the risk of myocardial infarction in the Greek population. *BMC Med Genet*. **11**: 133
- Dietel M, Zeitz M, Suttrop N, 2005. Harrisons Innere Medizin. *ABW Wissenschaftsverlag GmbH (Berlin)*. 1528 - 1540
- Donnelly JG 2000. The 1298(A-->C) mutation of methylenetetrahydrofolate reductase should be designated to the 1289 position of the gene. *Am J Hum Genet*. **66**: 744-745
- Endler G, Kyrle PA, Eichinger S, Exner M, Mannhalter C 2001. Multiplexed mutagenically separated PCR: simultaneous single-tube detection of the factor V R506Q (G1691A), the prothrombin G20210A, and the methylenetetrahydrofolate reductase A223V (C677T) variants. *Clin Chem*. **47**: 333-335
- Ercan B, Tamer L, Sucu N, Pekdemir H, Camsari A, Atik U 2008. Factor VLeiden and prothrombin G20210A gene polymorphisms in patients with coronary artery disease. *Yonsei Med J*. **49**: 237-243

- Fatini C, Sticchi E, Bolli P, Marcucci R, Giusti B, Paniccia R, Gori AM, Gensini GF, Abbate R 2009. eNOS gene influences platelet phenotype in acute coronary syndrome patients on dual antiplatelet treatment. *Platelets*. **20**: 548-554
- Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, Rozen R 1995. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*. **10**: 111-113
- Gerok W, Huber C, Meinertz T, Zeidler H 2007. Die Innere Medizin Referenzwerk für den Facharzt. *Schattauer GmbH (Stuttgart)*. **11**:
- Grabowski G 2005. Zielgerichtete Mutagenese, Teil 1 *Laborjournal* **12**; 60-61
- Grabowski G 2006. Zielgerichtete Mutagenese, Teil 3 *Laborjournal* **12**; 58-59
- Hassanzadeh T, Firoozrai M, Zonouz AE, Zavarehee A, Paoli M 2009. Taq1B polymorphism of cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene in primary combined hyperlipidaemia. *Indian J Med Res*. **129**: 293-298
- Helgadottir A, Manolescu A, Thorleifsson G, Gretarsdottir S, Jonsdottir H, Thorsteinsdottir U, Samani NJ, Gudmundsson G, Grant SF, Thorgeirsson G, Sveinbjornsdottir S, Valdimarsson EM, Matthiasson SE, Johannsson H, Gudmundsdottir O, Gurney ME, Sainz J, Thorhallsdottir M, Andresdottir M, Frigge ML, Topol EJ, Kong A, Gudnason V, Hakonarson H, Gulcher JR, Stefansson K 2004. The gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke. *Nat Genet*. **36**: 233-239
- Hillarp A, Palmqvist B, Lethagen S, Villoutreix BO, Mattiasson I 2003. Mutations within the cyclooxygenase-1 gene in aspirin non-responders with recurrence of stroke. *Thromb Res*. **112**: 275-283
- Humphries SE, Ridker PM, Talmud PJ 2004. Genetic testing for cardiovascular disease susceptibility: a useful clinical management tool or possible misinformation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **24**: 628-636.

- International Task Force for Prevention of Coronary Heart Disease, International Atherosclerosis Society 2003. Prävention der koronalen Herzkrankheit. Börm Bruckheimer Verlag GmbH (Grünwald).
- Jansohn M. 2007. Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag, (Heidelberg). 4:
- Kalafatis M, Mann KG 1997. Factor V Leiden and thrombophilia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **17**: 620-627
- Kara I, Sazci A, Ergul E, Kaya G, Kilic G 2003. Association of the C677T and A1298C polymorphisms in the 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase gene in patients with migraine risk. *Brain Res Mol Brain Res.* **111**: 84-90
- Kastelein JJ, Groenemeyer BE, Hallman DM, Henderson H, Reymer PW, Gagné SE, Jansen H, Seidell JC, Kromhout D, Jukema JW, Brusckhe AV, Boerwinkle E, Hayden MR 1998. The Asn9 variant of lipoprotein lipase is associated with the -93G promoter mutation and an increased risk of coronary artery disease. The Regress Study Group. *Clin Genet.* **53**: 27-33
- Kim RJ, Becker RC 2003. Association between factor V Leiden, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations and events of the arterial circulatory system: a meta-analysis of published studies. *Am Heart J.* **146**: 948-957
- Klerk M, Verhoef P, Clarke R, Blom HJ, Kok FJ, Schouten EG and MTHFR Studies Collaboration Group 2001. MTHFR 677C-->T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *JAMA* **288**: 2023-2031
- Klerkx AH, Tanck MW, Kastelein JJ, Molhuizen HO, Jukema JW, Zwinderman AH, Kuivenhoven JA 2003. Haplotype analysis of the CETP gene: not TaqIB, but the closely linked -629C-->A polymorphism and a novel promoter variant are independently associated with CETP concentration. *Hum Mol Genet.* **12**: 111-123

- Koeleman BP, Reitsma PH, Allaart CF, Bertina RM 1994. Activated protein C resistance as an additional risk factor for thrombosis in protein C-deficient families. *Blood*. **84**: 1031-1035
- Kohsaka S, Volcik KA, Folsom AR, Wu KK, Ballantyne CM, Willerson JT, Boerwinkle E 2008. Increased risk of incident stroke associated with the cyclooxygenase 2 (COX-2) G-765C polymorphism in African-Americans: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Atherosclerosis*. **196**: 926-930
- Kolovou GD, Anagnostopoulou KK 2007. Apolipoprotein E polymorphism, age and coronary heart disease. *Ageing Res Rev*. **6**: 94-108
- Kück U, Buse A, Holländer-Czytko H, Jeske S, Klämbt C, Klapper R, Kubigsteltig I, Meinhardt F, Nickelsen J, Nowrousian M, Pollmann S, Pöggeler S, Strasser T, Weiler E, Wolff G, Wolff K 2005. *Praktikum der Molekulargenetik*. Springer-Verlag (Berlin, Heidelberg, New York).
- Kuivenhoven JA, Jukema JW, Zwinderman AH, de Knijff P, McPherson R, Brusckhe AV, Lie KI, Kastelein JJ, for the Regression Growth Evaluation Statin Study Group 1998. The role of a common variant of the cholesteryl ester transfer protein gene in the progression of coronary atherosclerosis. *N Engl J Med*. **338**: 86-93
- Kunnas TA, Ilveskoski E, Niskakangas T, Laippala P, Kajander OA, Mikkelsen J, Goebeler S, Penttilä A, Perola M, Nikkari ST, Karhunen PJ 2002. Association of the endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism with risk of coronary artery disease and myocardial infarction in middle-aged men. *Journal of Molecular Medicine*. **80**: 605-609
- Lacchini R, Silva PS, Tanus-Santos JE 2010. A pharmacogenetics-based approach to reduce cardiovascular mortality with the prophylactic use of statins. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. **106**: 357-361
- Lee CR, Bottone FG Jr, Krahn JM, Li L, Mohrenweiser HW, Cook ME, Petrovich RM, Bell DA, Eling TE, Zeldin DC 2007. Identification and functional characterization of polymorphisms in human cyclooxygenase-1 (PTGS1). *Pharmacogenet Genomics*. **17**: 145-160

- Lee CR, North KE, Bray MS, Couper DJ, Heiss G, Zeldin DC 2008. Cyclooxygenase polymorphisms and risk of cardiovascular events: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Clin Pharmacol Ther.* **83**: 52-60
- Lee J, Tan CS, Chia KS, Tan CE, Chew SK, Ordovas JM, Tai ES 2004. The lipoprotein lipase S447X polymorphism and plasma lipids: interactions with APOE polymorphisms, smoking, and alcohol consumption. *J Lipid Res.* **45**: 1132-1139
- Lehr HA, Sagban TA, Kirkpatrick CJ 2002. Atherosklerose - Progression durch unspezifische Aktivierung des Immunsystems. *Med Klin (München).* **97**: 229-235
- Lewis SJ, Ebrahim S, Davey Smith G 2005. Meta-analysis of MTHFR 677C->T polymorphism and coronary heart disease: does totality of evidence support causal role for homocysteine and preventive potential of folate? *BMJ.* **331**: 1053
- Libby P 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* **420**: 868-874
- Linsel-Nitschke P, Götz A, Medack A, König IR, Bruse P, Lieb W, Mayer B, Stark K, Hengstenberg C, Fischer M, Baessler A, Ziegler A, Schunkert H, Erdmann J 2008. Genetic variation in the arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein (ALOX5AP) is associated with myocardial infarction in the German population. *Clin Sci (Lond).* **115**: 309-315
- Lockhart DJ, Winzeler EA 2000. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature.* **405**: 827-836
- Löhmußaar E, Gschwendtner A, Mueller JC, Org T, Wichmann E, Hamann G, Meitinger T, Dichgans M 2005. ALOX5AP gene and the PDE4D gene in a central European population of stroke patients. *Stroke.* **36**: 731-736
- Lottspeich F, Engels JW 2006. Bioanalytik. *Spektrum Akademischer Verlag, Elsevier GmbH (München).* **2**: 701-735

- Lövkvist H, Smith JG, Luthman H, Höglund P, Norrving B, Kristoffersson U, Jönsson AC, Lindgren AG 2008. Ischaemic stroke in hypertensive patients is associated with variations in the PDE4D genome region. *Eur J Hum Genet.* **16**: 1117-1125
- Lusis AJ 2000. Atherosclerosis. *Nature.* **407**: 233-241
- Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D 2006. Der Experimentator Immunologie. *Spektrum Akademischer Verlag, Elsevier GmbH (München).* **2**:
- Maitland-van der Zee AH, Lynch A, Boerwinkle E, Arnett DK, Davis BR, Leidecker-Foster C, Ford CE, Eckfeldt JH 2008. Interactions between the single nucleotide polymorphisms in the homocysteine pathway (MTHFR 677C>T, MTHFR 1298 A>C, and CBSins) and the efficacy of HMG-CoA reductase inhibitors in preventing cardiovascular disease in high-risk patients of hypertension: the GenHAT study. *Pharmacogenet Genomics.* **18**: 651-656
- Marcucci R, Sofi F, Fedi S, Lari B, Sestini I, Cellai AP, Pulli R, Pratesi G, Pratesi C, Gensini GF, Abbate R 2005. Thrombophilic risk factors in patients with severe carotid atherosclerosis. *J Thromb Haemost.* **3**: 502-507
- McDonnell C (2005) Genomweite Kartierung von Genfunktionen mit Tiling Mikroarrays. *BIOspektrum.* **5**: 790-791
- Mencke T 1997. DNA-Polymorphismus des endothelialen leukozytären Adhäsionsmoleküls-1 bei Patienten (unter 50 Jahren) mit interventionsbedürftigen Koronararterienstenosen. *Dissertation, Medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin*
- Merkel M, Eckel RH, Goldberg IJ 2002. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J Lipid Res.* **43**: 1997-2006
- Milioti N, Bermudez-Fajardo A, Penichet ML, Oviedo-Orta E 2008. Antigen-induced immunomodulation in the pathogenesis of atherosclerosis. *Clin Dev Immunol.* **2008**: 723539

- Mizuno H, Sato H, Sakata Y, Ohnishi Y, Hishida E, Kinjo K, Nakatani D, Shimizu M, Kondo H, Tanaka T, Ozaki K, Hirayama A, Ito H, Otsu K, Hori M; Osaka Acute Coronary Insufficiency Study (OACIS) Group 2006. Impact of atherosclerosis-related gene polymorphisms on mortality and recurrent events after myocardial infarction. *Atherosclerosis*. **185**: 400-405
- Moennig G, Wiebusch H, Enbergs A, Dorszewski A, Kerber S, Schulte H, Vielhauer C, Haverkamp W, Assmann G, Breithardt G, Funke H 2000. Detection of missense mutations in the genes for lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase in patients with dyslipidemia undergoing coronary angiography. *Atherosclerosis*. **149**: 395-401
- Morgan TM, Coffey CS, Krumholz HM 2003. Overestimation of genetic risks owing to small sample sizes in cardiovascular studies. *Clin Genet*. **64**: 7-17
- Mülhardt C 2006. Der Experimentator, Molekularbiologie/Geomics. *Spektrum Akademischer Verlag (München)*. **5**:
- Müller HJ, Röder T 2004. Der Experimentator, Microarrays. *Spektrum Akademischer Verlag (München)*. **1**:
- Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, Motoyama T, Saito Y, Ogawa Y, Miyamoto Y, Nakao K. T-786-->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation*. **99**: 2864-2870
- Napoli C, de Nigris F, Williams-Ignarro S, Pignalosa O, Sica V, Ignarro LJ 2006. Nitric oxide and atherosclerosis: an update. *Nitric Oxide*. **15**: 265-279
- Orbe J, Beloqui O, Rodriguez JA, Belzunce MS, Roncal C, Páramo JA 2006. Protective effect of the G-765C COX-2 polymorphism on subclinical atherosclerosis and inflammatory markers in asymptomatic subjects with cardiovascular risk factors. *Clin Chim Acta*. **368**: 138-143
- Ozaki K, Ohnishi Y, Iida A, Sekine A, Yamada R, Tsunoda T, Sato H, Sato H, Hori M, Nakamura Y, Tanaka T 2002. Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene

that are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nat. Genet.* **32**: 650-654

- Pallaud C, Stranieri C, Sass C, Siest G, Pignatti F, Visvikis S 2001. Candidate gene polymorphisms in cardiovascular disease: a comparative study of frequencies between a French and an Italian population. *Clin Chem Lab Med.* **39**: 146-154
- Pfützner A, Forst T 2008. HsCRP as cardiovascular risk marker in patients with diabetes mellitus. *Diab. Technol. Ther.* **8**: 28–36
- Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM 2003. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood.* **88**: 3698-3703
- Psaty BM, Smith NL, Lemaitre RN, Vos HL, Heckbert SR, LaCroix AZ, Rosendaal FR 2001. Hormone replacement therapy, prothrombotic mutations, and the risk of incident nonfatal myocardial infarction in postmenopausal women. *JAMA.* **285**: 906-913
- Rip J, Nierman MC, Ross CJ, Jukema JW, Hayden MR, Kastelein JJ, Stroes ES, Kuivenhoven JA 2006. Lipoprotein lipase S447X: a naturally occurring gain-of-function mutation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **26**: 1236-1245
- Sandhofer A, Tatarczyk T, Laimer M, Ritsch A, Kaser S, Paulweber B, Ebenbichler CF, Patsch JR 2008. The Taq1B-variant in the cholesteryl ester-transfer protein gene and the risk of metabolic syndrome. *Obesity.* **16**: 919-922
- Sazci A, Ergul E, Tuncer N, Akpinar G, Kara I 2006. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms are associated with ischemic and hemorrhagic stroke: Dual effect of MTHFR polymorphisms C677T and A1298C. *Brain Res Bull.* **71**: 45-50
- Schmitz G, Endres S, Götte D 2008. Biomarker; Bedeutung für medizinischen Fortschritt und Nutzenbewertung. *Schattauer GmbH (Stuttgart, New York).*

- Schwandt P, Parhofer K. 2007 Handbuch der Fettstoffwechselstörungen. *Schattauer GmbH (Stuttgart)*. **3**:
- Scott BT, Hasstedt SJ, Bovill EG, Callas PW, Valliere JE, Wang L, Wu KK, Long GL 2002. Characterization of the human prostaglandin H synthase 1 gene (PTGS1): exclusion by genetic linkage analysis as a second modifier gene in familial thrombosis. *Blood Coagul Fibrinolysis*. **13**: 519-531
- Selzer RR, Rosenblatt DS, Laxova R, Hogan K 2003. Adverse effect of nitrous oxide in a child with 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *N Engl J Med*. **349**: 45-50
- Stephens JW, Humphries SE 2003 The molecular genetics of cardiovascular disease: clinical implications. *J Intern Med*. **253**: 120-127
- Suna S, Sakata Y, Sato H, Mizuno H, Nakatani D, Shimizu M, Usami M, Takashima S, Takeda H, Hori M 2008. Up-regulation of cell adhesion molecule genes in human endothelial cells stimulated by lymphotoxin alpha: DNA microarray analysis. *J Atheroscler Thromb*. **15**: 160-165
- Tanaka T, Scheet P, Giusti B, Bandinelli S, Piras MG, Usala G, Lai S, Mulas A, Corsi AM, Vestrini A, Sofi F, Gori AM, Abbate R, Guralnik J, Singleton A, Abecasis GR, Schlessinger D, Uda M, Ferrucci L 2009. Genome-wide association study of vitamin B6, vitamin B12, folate, and homocysteine blood concentrations. *Am J Hum Genet*. **84**: 477-482
- Tanus-Santos JE, Desai M, Flockhart DA 2001. Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants. *Pharmacogenetics*. **11**: 719-725
- Terán-García M, Després JP, Tremblay A, Bouchard C 2008. Effects of cholesterol ester transfer protein (CETP) gene on adiposity in response to long-term overfeeding. *Atherosclerosis*. **196**: 455-460
- Teupser D, Rupprecht W, Lohse P, Thiery J 2001. Fluorescence-based detection of the CETP TaqIB polymorphism: false positives with the TaqMan-based

exonuclease assay attributable to a previously unknown gene variant. *Clin Chem.* **47**: 852-857

- Thompson A, Di Angelantonio E, Sarwar N, Erqou S, Saleheen D, Dullaart RP, Keavney B, Ye Z, Danesh J 2008. Association of cholesteryl ester transfer protein genotypes with CETP mass and activity, lipid levels, and coronary risk. *JAMA.* **299**: 2777-2788
- Tsai MY, Johnson C, Kao WH, Sharrett AR, Arends VL, Kronmal R, Jenny NS, Jacobs DR Jr, Arnett D, O'Leary D, Post W 2008. Cholesteryl ester transfer protein genetic polymorphisms, HDL cholesterol, and subclinical cardiovascular disease in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Atherosclerosis.* **200**: 359-367
- Ueda N, Maehara Y, Tajima O, Tabata S, Wakabayashi K, Kono S 2008. Genetic polymorphisms of cyclooxygenase-2 and colorectal adenoma risk: the Self Defense Forces Health Study. *Cancer Sci.* **99**: 576-581
- Vaisi-Raygani A, Rahimi Z, Nomani H, Tavilani H, Pourmotabbed T 2007. The presence of apolipoprotein epsilon4 and epsilon2 alleles augments the risk of coronary artery disease in type 2 diabetic patients. *Clin Biochem.* **40**: 1150-1156
- Visvikis-Siest S, Marteau JB 2006. Genetic variants predisposing to cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol.* **17**: 139-151
- Wilhelm B, Weber MM, Kreisselmeier HP, Kugler M, Ries C, Pfützner A, Kann PH, Forst 2007. Endothelial dysfunction and arterial stiffness in uncomplicated type 1 diabetes and healthy controls and the impact of insulin on these parameters during an euglycemic clamp. *J. Diabetes. Sci. Technol.* **1**: 582-589
- Wittrup HH, Tybjaerg-Hansen A, Abildgaard S, Steffensen R, Schnohr P, Nordestgaard BG 1997. A common substitution (Asn291Ser) in lipoprotein lipase is associated with increased risk of ischemic heart disease. *J Clin Invest.* **99**: 1606-1613
- Wrba F, Dolznig H, Mannhalter C 2007. Genetik verstehen- Grundlagen der molekularen Biologie. *Facultas Verlags- und Buchhandels AG, Wien.*

- Yamada Y, Ichihara S, Nishida T 2008. Molecular genetics of myocardial infarction. *Genomic Med.* **2**: 7-22.
- Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, Shimasaki Y, Sumida H, Sugiyama S, Kugiyama K, Ogawa H, Ogawa Y, Saito Y, Miyamoto Y, Nakao K 1998. A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese. *Hum Genet.* **103**: 65-69

9 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AG	Aktiengesellschaft
Alox AP	Arachidonat-5-Lipoxygenase-aktivierendes Protein
APC	aktivierendes Protein C
ApoE	Apolipoprotein E
Asp, D	Asparaginsäure
Asym.	Asymmetrie
Arg, R	Arginin
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin, Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CETP	Cholesterinester-Transferprotein
CRP	C-reaktives Protein
Cr	Chrom
Cys	Cystein
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
Δ	Differenz
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuraciltriphosphat
E, Glu	Glutaminsäure
ε2	Allel 2 der ApoE-Gens
E2	Proteinisoform 2 von ApoE
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm

ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
eNOS	Endotheliale NO-Synthase, NOS3
et al.	et alii, und andere
F2	Faktor II, (Pro)thrombin
F5	Faktor V
FLAP	5-Lipoxygenase-aktivierendes Protein
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
°C	Grad Celsius
G	Guanin
g	Gramm oder mittlere Erdbeschleunigung
Gln	Glutamin
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
Hap	Haplotype
Het	Heterozygot
HDL	high density-Lipoprotein
Hyb-Kit	Hybridisierungs-Kit
HIV	Humane Immundefizienz-Virus
H ₂ O	Wasser
HRP	<i>Horseradish</i> peroxidase, Meerrettich-Peroxidase
hsCRP	hoch sensitives C-reaktives Protein
I	Isoleucin
IKFE	Institut für klinische Forschung und Entwicklung
iNOS	induzierbare NOS, NOS2
IL-6	Interleukin 6
KCl	Kaliumchlorid
KI	Konfidenzintervall
L, Leu	Leucin
LC	LightCycler®
LDL	low density-Lipoprotein
LPL	Lipoproteinlipase
Lp(a)	Lipoprotein a
LTA	Lymphotoxin- α

μ	Mittelwert
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
μl	Mikroliter
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimol
mm	Milimeter
MTHFR	5,10-Methylentetrahydrofolsäure-Reduktase
Mut	Mutation, Mutante
N, Asn	Asparagin
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
ng	Nanogramm
Ni	Nickel
nm	Nanometer
nNOS	neuronale NOS, NOS1
NO	Stickstoffmonoxid
OR	Odds Ratio, Quotenverhältnis
P1, fwd	Primer 1, forward Primer
P2	Mutagenese Primer 2
P3	Mutagenese Primer 3
P4, rev	Primer 4, reverse Primer
PAI	Plasminogen activator Inhibitor Typ 1
P, Pro	Prolin
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
Phe	Phenylalanin
PTGS1	Prostaglandinsynthase-1
PTGS2	Prostaglandinsynthase-2
pM	pico Mol
%	Prozent

rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
rs	Referenz-SNP
S	Serin
σ	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
Ser	Serin
SNP	Single Nucleotide Polymorphism, Einzelnukleotidpolymorphismus
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer,
SSPE	NaCl + Na ₂ HPO ₄ + EDTA
Σ	Summe
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
T _m	Schmelzpunkt
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
Tris-HCl	<i>Tris</i> (hydroxymethyl) aminomethan-Salzsäure
U	unit, Einheit
UV	Ultraviolet
V	Valin
VCAM	vaskuläres Zelladhäsionsmolekül
VLDL	very-low-density-Lipoprotein
W	Tryptophan
Wdh.	Wiederholung
WP	Waschpuffer
Wt	Wildtyp

Danksagung

Ich danke von Herzen meiner Familie für die grenzenlose und uneingeschränkte Unterstützung bei der Erstellung meiner Dissertationsarbeit. Besonders möchte ich mich bei meinem Vater bedanken für seinen unermüdlichen Einsatz und die Hilfsbereitschaft, die er mir entgegen gebracht hat. Meinem Ehemann danke ich für alles, vor allem für seine unendliche Geduld. Zu guter Letzt spreche ich allen engagierten Korrekturen dieser Arbeit ein herzliches Dankeschön aus.

Lebenslauf

Veröffentlichungen

Pfützner A, Weise A, **Pfützner-Riehn E**, Lübben G, Morcos M, Karagiannis E, Weber MM, Forst T

Downregulation of the Proinflammatory State of Circulating Mononuclear Cells by Short Term Treatment with Pioglitazone in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus and Coronary Artery Disease.

PPAR Res. 2011; 2011:647017

Pfützner E., Eidens M., Musholt P., Forst T., Pfützner A., Weber M.M.

Development of a DNA-Panel Macroarray Chip to Determine the Risk of Atherosclerosis and Related Disorders

10th Diabetes Technology Meeting, Bethesda , Maryland, USA 11/2010

Pfützner E., Weise A., Eidens M., Prause S., Maurer R., Weber M.M., Musholt P., Forst T., Pfützner A.

Is Insulin Atherogenic or Cardio-protective? - Method for the Assessment of Insulin Post-Receptor Signal Transduction in Peripheral Monocytes

9th Diabetes Technology Meeting, San Francisco, Kalifornien, USA 11/2009

Pfützner A., Weise A., **Pfützner E.**, Krasner A., Flacke F., Weber M.M., Steiner S., Forst T.

Influence of VIAject™ Absorption Kinetics on the Post Receptor Signal Transduction and Vascular Function of Insulin in Patients with Type 2 Diabetes

9th Diabetes Technology Meeting, San Francisco, Kalifornien, USA 11/2009

Weise A., **Pfützner E.**, Krasner A., Flacke F., Weber M.M., Steiner S.S., Forst T., Pfützner A.

Influence of Insulin Kinetics on the Post Receptor Signal Transduction of Insulin in Patients with Type 2 Diabetes

45th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Wien, Österreich 09/2009

Pfützner A., Weise A., **Pfützner E.**, Krasner A., Flacke F., Weber M.M., Steiner S., Forst T.

Influence of Insulin Kinetics on the Post Receptor Signal Transduction of Insulin in Patients with Type 2 Diabetes

69th Scientific Sessions of the American Diabetes Association, New Orleans, Louisiana, USA 06/2009

Weise A., **Pfützner E.**, Mjumjunov E., Eidens M., Prause S., Weber M.M., Musholt P., Forst T., Pfützner A.

Entwicklung einer quantitativen Methode zur Bestimmung des Einflusses von Insulin auf die mRNA-Expression peripherer Monozyten

Diabetologie & Stoffwechsel 2009; 4: S1–S110

(44. Jahrestagung der Deutscher Diabetes Gesellschaft, Leipzig 05/2009)

Pfützner A., Weise A., **Pfützner E.**, Kassner A., Flacke F., Weber M.M., Steiner S.S., Forst T.

Einfluss der Insulinkinetik auf die Postrezeptor Signaltransduktion bei Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus

Diabetologie & Stoffwechsel 2009; 4: S1–S110

(44. Jahrestagung der Deutschen Diabetes Gesellschaft, Leipzig 05/2009)

Eidens M., Prause S., **Pfützner E.**, Weise A., Klemm M., Weber M.M., Forst T., Musholt P., Pfützner A.

Novel Technologies for the Implementation of Pharmacogenomics in Medical Practice

GEN-T 2008 Dec.; 2: 56 (3rd EuroEspes Annual Conference, 12/2008, La Coruna, Spanien)

Pfützner E., Weise A., Prause S., Eidens M., Musholt P.B., Weber M.M., Forst T., Pfützner A.

Inflammatory Activation of Circulating Macrophages from Patients with Type 2 Diabetes can be reduced by a PPAR γ -Agonist

GEN-T 2008 Dec.; 2: 91 (3rd EuroEspes Annual Conference, 12/2008, La Coruna, Spanien)

Rigault C., Bernard A., Georges B., Kandel A., **Pfützner E.**, Le Borgne F., Demarquoy J.

Extracellular ATP Increases L-Carnitine Transport and Content in C2C12 Cells

Pharmacology 2008; 81: 246–250

Patent

Pfuetzner E., Prause S., Eidens M., Weise A., Pfuetzner A. 2010. Genotyping for Risk of Atherosclerosis. WO/2010/113034

Anhang 1: Sequenzen der Chipsonden

Name	Sequenz
Pb51_eNOS_M_786TC_mut1	AGCTCTCCCTGGCCGGCTG
Pb52_eNOS_M_786TC_wt1	AAGCTCTCCCTGGCTGGCTG
Pb53_eNOS_M_786TC_wt2	CAGCCAGCCAGGGAAGAGCTTG
Pb54_eNOS_M_786TC_mut2	CAGCCGCGCCAGGGAAGAGCTTG
Pb55_eNOS_M_786TC_wt3	TCAGCCAGCCAGGGAAGAGCTTG
Pb58_eNOS_M_786TC_mut4	TCAAGCTCTCCCTGGCCGGCTGAC
Pb64_eNOS_M_E298D_mut1	GGGGATCATCTGGGGCCT
Pb65_eNOS_M_E298D_mut2	GGGGATCATCTGGGGCCTG
Pb66_eNOS_M_E298D_wt2	GGGGCTCATCTGGGGCCTG
Pb68_eNOS_M_E298D_wt3	CTGCAGGCCCCAGATGAGCCC
Pb69_eNOS_M_E298D_wt4	GGGGCTCATCTGGGGCCTGC
Pb70_eNOS_M_E298D_mut4	GGGGATCATCTGGGGCCTGCA
Pb_71_CETP_Taq1_Wt1	GAACCCTAACTCGAACCCAGTG
Pb_72_CETP_Taq1_Mut1	CTGAACCCTAACTGAACCCAG
Pb_73_CETP_Taq1_Wt2	CTGGGGTTTCGAGTTAGGGTTCAGATC
Pb_74_CETP_Taq1_Mut2	ACTGGGGTTCAAGTTAGGGTTCAGATC
Pb_75_CETP_Taq1_Wt3	ACTGGGGTTTCGAGTTAGGGTTCAG
Pb_76_CETP_Taq1_Mut3	CACTGGGGTTCAAGTTAGGGTTC
Pb_77_CETP_629_Wt1	CTCTGGGGGGGTATACAGCCTC
Pb_78_CETP_629_Mut1	AACTCTGGGTGGGTATACAGCCTC
Pb_79_CETP_629_Wt2	GGGGTATACAGCCTCTGAGAT
Pb_80_CETP_629_Mut2	GGGTGGGTATACAGCCTCTGAGA
Pb_81_CETP_629_Wt3	GAGGCTGTATACCCCCCAGAG
Pb_82_CETP_629_Mut3	CAGAGGCTGTATACCCACCAGAG
Pb_83_CETP_A1061G_Wt1	AGGAAGCTCTGGATGGACTCGGA
Pb_84_CETP_A1061G_Mut1	GGAAGCTCTGGACGGACTCGGA
Pb_85_CETP_A1061G_Mut2	CTCTGGACGGACTCGGAGCTG
Pb_86_CETP_A1061G_Wt2	CTCTGGATGGACTCGGAGCTGC
Pb_87_CETP_A1061G_Wt3	CTCCGAGTCCATCCAGAGCTTCC
Pb_88_CETP_A1061G_Mut3	CTCCGAGTCCGTCCAGAGCTTCC
Pb_89_CETP_A1163G_Wt1	CCTCTTCGACATCATCAACCCTGAGATTA
Pb_90_CETP_A1163G_Mut1	CTTCGGCATCATCAACCCTGAGATTATCA
Pb_91_CETP_A1163G_Mut2	CGGCATCATCAACCCTGAGATTATC
Pb_92_CETP_A1163G_Wt2	CTTCGACATCATCAACCCTGAGATTATC
Pb_93_CETP_A1163G_Mut3	CAGGGTTGATGATGCCGAAGAG
Pb_94_CETP_A1163G_Wt3	AGGGTTGATGATGTCGAAGAGGC
Pb_95_ApoE_112_Wt1	GACATGGAGGACGTGTGCGG
Pb_96_ApoE_112_Mut1	GGACATGGAGGACGTGCGCG
Pb_97_ApoE_112_Wt2	CCGCACACGTCTCCATGTCC
Pb_98_ApoE_112_Mut2	CGCGCACGTCTCCATGTCC
Pb_99_ApoE_112_Wt3	CATGGAGGACGTGTGCGGCC
Pb_100_ApoE_112_Mut3	GACATGGAGGACGTGCGCGG
Pb_101_ApoE_158_Wt1	CCAGGCACTTCTGCAGGTCATC
Pb_102_ApoE_158_Mut1	AGGCGCTTCTGCAGGTCATC
Pb_103_ApoE_158_Wt2	CAGGCACTTCTGCAGGTCATCG
Pb_104_ApoE_158_Mut2	AGGCGCTTCTGCAGGTCATCG
Pb_105_ApoE_158_Wt3	GTACACTGCCAGGCACTTCTGCAG
Pb_106_ApoE_158_Mut3	GTACACTGCCAGGCGCTTCTGC
Pb_107_F5_G1691A_Wt1	CTGGACAGGCGAGGAATACAGG

Pb_108_F5_G1691A_Mut1	CCTGGACAGGCAAGGAATACAGG
Pb_109_F5_G1691A_Wt2	GGACAGGCGAGGAATACAGGTAT
Pb_110_F5_G1691A_Mut2	CCTGGACAGGCAAGGAATACAGGT
Pb_111_F5_G1691A_Wt3	CTGGACAGGCGAGGAATACAGGT
Pb_112_F5_G1691A_Mut3	CTGGACAGGCAAGGAATACAGGTAT
Pb_113_Prothrombin_G20210A_Wt1	CCAATAAAAGTGACTCTCAGCGAGCC
Pb_114_Prothrombin_G20210A_Mut1	CCAATAAAAGTGACTCTCAGCAAGCCTC
Pb_115_Prothrombin_G20210A_Wt2	AAGTGACTCTCAGCGAGCCTCAA
Pb_116_Prothrombin_G20210A_Mut2	AAGTGACTCTCAGCAAGCCTCAA
Pb_117_Prothrombin_G20210A_Wt3	CTCTCAGCGAGCCTCAATGCTCC
Pb_118_Prothrombin_G20210A_Mut3	CTCTCAGCAAGCCTCAATGCTCC
Pb_119_PTGS1_G1006A_Wt1	CGGCAGGAGAGCTCAGAGGTT
Pb_120_PTGS1_G1006A_Mut1	CCGGCAGGAGAGTTCAGAGGT
Pb_121_PTGS1_G1006A_Wt2	CGGCAGGAGAGCTCAGAGGTTT
Pb_122_PTGS1_G1006A_Mut2	CCGGCAGGAGAGTTCAGAGGTTT
Pb_123_PTGS1_G1006A_Wt3	GAACCTCTGAGCTCTCCTGCCGG
Pb_124_PTGS1_G1006A_Mut3	AAGAACCTCTGAACTCTCCTGCCG
Pb_125_PTGS1_R8W_Wt1	GCAAGAACCGGAGCAAGAGACTC
Pb_126_PTGS1_R8W_Mut1	GCAAGAACCAGAGCAAGAGACTCC
Pb_127_PTGS1_R8W_Wt2	GAGTCTCTTGCTCCGGTCTTGCT
Pb_128_PTGS1_R8W_Mut2	GGAGTCTCTTGCTCTGGTCTTGCT
Pb_129_PTGS1_R8W_Wt3	CTTGCTCCGGTCTTGCTGT
Pb_130_PTGS1_R8W_Mut3	CTTGCTCTGGTCTTGCTGTT
Pb_131_PTGS1_P17L_Wt1	GTTCTGCTCCTGCTCCCGC
Pb_132_PTGS1_P17L_Mut1	GTTCTGCTCCTGCTCCTGC
Pb_133_PTGS1_P17L_Wt2	GGCGGGAGCAGGAGCAGGAA
Pb_134_PTGS1_P17L_Mut2	CGGCAGGAGCAGGAGCAGGAA
Pb_135_PTGS1_P17L_Wt3	GCGGGAGCAGGAGCAGGAACA
Pb_136_PTGS1_P17L_Mut3	GCGGCAGGAGCAGGAGCAGGAA
Pb_137_PTGS2_765_Wt1	AGGCGGGAAAGGTAAATTCTCCTCAT
Pb_138_PTGS2_765_Mut1	GAGGGGGAAAGGTAAATTCTCCTCAT
Pb_139_PTGS2_765_Wt2	CTTGTTTCTTGAAAGAGAGGGGG
Pb_140_PTGS2_765_Mut2	TCCTTGTTTCTTGAAAGAGAGGGGG
Pb_141_PTGS2_765_Wt3	TTTCTTGAAAGAGAGGGGGA
Pb_142_PTGS2_765_Mut3	GTTTCTTGAAAGAGAGGGGG
Pb_143_MTHFR_C677T_Wt1	GATGAAATCGGCTCCCGCAGACA
Pb_144_MTHFR_C677T_Mut1	ATGAAATCGACTCCCGCAGACAC
Pb_145_MTHFR_C677T_Wt2	GCCGATTTTCATCATCACGCAGCTTTTC
Pb_146_MTHFR_C677T_Mut2	GAGTCGATTTTCATCATCACGCAGCTTT
Pb_147_MTHFR_C677T_Wt3	AGCCGATTTTCATCATCACGCAGCTTT
Pb_148_MTHFR_C677T_Mut3	GAGTCGATTTTCATCATCACGCAGCTT
Pb_149_MTHFR_A1298C_Wt1	GGAGGAGCTGACCAGTGAAGAAAG
Pb_150_MTHFR_A1298C_Mut1	GAGGAGCTGACCAGTGAAGCAAG
Pb_151_MTHFR_A1298C_Wt2	ACACTTTCTTCACTGGTCAGCTCC
Pb_152_MTHFR_A1298C_Mut2	AGACACTTGCTTCACTGGTCAGC
Pb_153_MTHFR_A1298C_Wt3	AGACACTTTCTTCACTGGTCAGCT
Pb_154_MTHFR_A1298C_Mut3	GACACTTGCTTCACTGGTCAGCT
Pb_155_LTA_10GA_Wt1	GGGTCCGCACAGCAGGTGA
Pb_156_LTA_10GA_Mut1	GGGGCTCCACACAGCAGGTGA
Pb_157_LTA_10GA_Wt2	TCACCTGCTGTGCGGAGCCC
Pb_158_LTA_10GA_Mut2	TCACCTGCTGTGCGGAGCCC
Pb_159_LTA_10GA_Wt3	GGCTCCGCACAGCAGGTGAG
Pb_160_LTA_10GA_Mut3	GCTCCACACAGCAGGTGAGGC

Pb_161_LTA_252AG_Wt1	CCATGATTCTCTCTGTTCCCTTCC
Pb_162_LTA_252AG_Mut1	ATGGTTCTCTCTGTTCCCTTCT
Pb_163_LTA_252AG_Wt2	GCCATGATTCTCTCTGTTCCCT
Pb_164_LTA_252AG_Mut2	CATGGTTCTCTCTGTTCCCTTCC
Pb_165_LTA_252AG_Wt3	CTGCCATGATTCTCTCTGTTCC
Pb_166_LTA_252AG_Mut3	CCATGGTTCTCTCTGTTCCCTT
Pb_167_LTA_804CA_Wt1	TCTTGCCCCACAGCACCTCAA
Pb_168_LTA_804CA_Mut1	TCTTGCCCCACAGCAACCTCAA
Pb_169_LTA_804CA_Wt2	TTTGAGGGTGCTGTGGCAAGAT
Pb_170_LTA_804CA_Mut2	TGAGGTTGCTGTGGCAAGATGC
Pb_171_LTA_804CA_Wt3	CCCACAGCACCTCAAACCT
Pb_172_LTA_804CA_Mut3	CCCACAGCAACCTCAAACCT
Pb_173_LPL_D9N_Wt1	CGACATCGAAAGTAAATTTGCCCT
Pb_174_LPL_D9N_Mut1	ATCAACATCGAAAGTAAATTTGCCCTA
Pb_175_LPL_D9N_Wt2	ATTTTATCGACATCGAAAGTAAATTTGCC
Pb_176_LPL_D9N_Mut2	ATTTTATCAACATCGAAAGTAAATTTGCC
Pb_177_LPL_D9N_Wt3	CCAGAAAGAAGAGATTTTATCGACATCGA
Pb_178_LPL_D9N_Mut3	CCAGAAAGAAGAGATTTTATCAACATCGAA
Pb_179_LPL_S447X_Wt1	AGCCTGACTTCTTATTAGAGACTTGTCAT
Pb_180_LPL_S447X_Mut1	CCTCACTTCTTATTAGAGACTTGTCATGG
Pb_181_LPL_S447X_Wt2	ACAAGTCTCTGAATAAGAAGTCAGGCT
Pb_182_LPL_S447X_Mut2	ACAAGTCTCTGAATAAGAAGTCAGGCT
Pb_183_LPL_S447X_Wt3	AGCCTGACTTCTTATTAGAGACTTGTCAT
Pb_184_LPL_S447X_Mut3	AGCCTCACTTCTTATTAGAGACTTGTCAT
Pb_185_LPL_N291S_Wt1	GCTGCTTCTTTGGCTCTGACTTTATTGA
Pb_186_LPL_N291S_Mut1	GCTGCTTCTTTGGCTCTGACTTTACTG
Pb_187_LPL_N291S_Wt2	ATGAGATCAATAAAGTCAGAGCCAAAAGA
Pb_188_LPL_N291S_Mut2	ATGAGATCAGTAAAGTCAGAGCCAAAAGA
Pb_189_LPL_N291S_Wt3	AGATCAATAAAGTCAGAGCCAAAAGAAG
Pb_190_LPL_N291S_Mut3	AGATCAGTAAAGTCAGAGCCAAAAGAAG
Pb_191_AloxAP_HapAB_B1	CTCTTTGCAATTCTAATTAACCTCAATGT
Pb_192_AloxAP_HapAB_A1	CTCTTTGCAATTCTAATTAACCTCAATGT
Pb_193_AloxAP_HapAB_B2	AGCCTCTCTTTGCAATTCTAATTAACCTCA
Pb_194_AloxAP_HapAB_A2	AGCCTCTCTTTGCAATTCTAATTAACCTCA
Pb_195_AloxAP_HapAB_B3	TGAGGTAAATTAGAATTGCAAAGAGAGGCT
Pb_196_AloxAP_HapAB_A3	TGAGGTAAATTAGAATTGCAAAGAGAGGCT
Pb_197_AloxAP_HapA_Wt1	AAGCCCACTGGGCAACAGTGG
Pb_198_AloxAP_HapA_Mut1	GCCCACTGGGTAACAGTGGC
Pb_199_AloxAP_HapA_Wt2	GTAAGCCCACTGGGCAACAGTG
Pb_200_AloxAP_HapA_Mut2	AAGCCCACTGGGTAACAGTGGC
Pb_201_AloxAP_HapA_Wt3	GGGCAACAGTGGCTGGGGAAA
Pb_202_AloxAP_HapA_Mut3	GGGTAACAGTGGCTGGGGAA
Pb_203_AloxAP_HapB_Wt1	TCGGCCTCCCACAGTTTTGTGAT
Pb_204_AloxAP_HapB_Mut1	CAGCCTCCCACAGTTTTGTGATT
Pb_205_AloxAP_HapB_Wt2	CTCAGGTGATCTGCCTGCCTCGG
Pb_206_AloxAP_HapB_Mut2	TCAGGTGATCTGCCTGCCTCAG
Pb_207_AloxAP_HapB_Wt3	CGGCCTCCCACAGTTTTGTGATTA
Pb_208_AloxAP_HapB_Mut3	CTCAGCCTCCCACAGTTTTGTGAT
Pb_250_eNOS_E298D_mut5	GTTCTGGGGGATCATCTGGGGCCT
Pb_251_CETP_Taq1_Mut5	CTGGGGTTCAAGTTAGGGTTTCAGAT
Pb_252_CETP_629_Wt6	TCTGGGGGGGTATACAGCCT
Pb_253_CETP_629_Wt5	CTCTGGGGGGGTATACAGCCTCTGAGAT
Pb_254_CETP_629_Mut5	ACTCTGGGTGGGTATACAGCCTCTGAGA

Pb_255_CETP_A1061G_Wt5	AGCTCCGAGTCCATCCAGAGCTTCCTG
Pb_256_CETP_A1061G_Mut5	AGCTCTGGAcGGACTCGGAGCTGCTC
Pb_257_CETP_A1163G_Wt5	CCTCTTCGaCATCATCAACCTGAGATTAT
Pb_258_CETP_A1163G_Mut5	CTCTTCGgCATCATCAACCCTGAGATTATC
Pb_259_ApoE_158_Wt5	ACTGCCAGGCaCTTCTGCAGGTCATCG
Pb_260_ApoE_158_Wt6	GTACACTGCCAGGCaCTTCTGCAGGTCa
Pb_261_ApoE_158_Mut5	ACTGCCAGGCGCTTCTGCAGGTCATCG
Pb_262_ApoE_158_Mut6	GTACACTGCCAGGCGCTTCTGCAGGTCAT
Pb_263_Prothrombin_G20210A_Wt5	AGTGACTCTCAGCGAGCCTCA
Pb_264_Prothrombin_G20210A_Mut5	CAATAAAAGTGA ^T CTCAGCAAGCCT
Pb_265_PTGS1_R8W_Wt5	GGAGTCTCTTGCTCcGGTTCTTGCTGTT
Pb_266_PTGS1_R8W_Mut5	CAAGAACCAGAGCAAGAGACTC
Pb_267_PTGS1_P17L_Wt5	GGCGGGAGCAGGAGCAGG
Pb_268_PTGS2_765_Wt5	AAGAGAGGGCGGGAAAGGTAAATTCTCCTC
Pb_269_PTGS2_765_Mut5	TTGTTTCTTGAAAGAGAGGGGGGAAAG
Pb_270_MTHFR_C677T_Wt5	AGCCGATTTcATCATCACGCAGCT
Pb_271_MTHFR_C677T_Mut5	GAGTCGATTTcATCATCACGCAGCT
Pb_272_MTHFR_A1298C_Wt5	AGACACTTTCTTCACTGGTCAG
Pb_273_MTHFR_A1298C_Mut5	GAGGAGCTGACCAGTGAAGCA
Pb_274_LTA_252AG_Wt5	TTTCTGCCATGATTCTCTCTGTTC
Pb_275_LTA_252AG_Mut5	CTGCCATGGTTCTCTCTGTTCCTTC
Pb_276_LTA_804CA_Wt5	GCAGGTTTGAGGGTGTGTGGGCAAGA
Pb_277_LTA_804CA_Mut5	GAGGTTGCTGTGGCAGATG
Pb_278_LPL_D9N_Mut5	TTATCAACATCGAAAGTAAATTTGCC
Pb_279_LPL_S447X_Wt5	ACAAGTCTCTGAATAAGAAGTcAGGCTGGTGA
Pb_280_LPL_S447X_Mut5	ACAAGTCTCTGAATAAGAAGTgAGGCTGGT
Pb_281_LPL_S447X_Mut6	CCTCACTTCTTATTcAGAGACTTGTCa
Pb_282_LPL_N291S_Mut5	GCTATGAGATCAGTAAAGTCAGAGCCAAAA
Pb_283_LPL_N291S_Mut6	AGATCAGTAAAGTCAGAGCCAAAAGA
Pb_284_AloxAP_HapAB_B5	ACATTGAGGTAAAtTAGAATTGCAAAGAGAGG
Pb_285_AloxAP_HapAB_A5	CTCTCTTTGCAATTCTAtTTAACCTCAATGTTG
Pb_286_AloxAP_HapA_Wt5	TGTAAGCCCACTGGGcAACAGTGGC
Pb_287_AloxAP_HapA_Wt6	CCACTGGGcAACAGTGGCTGGGGAAA
Pb_288_AloxAP_HapA_Mut5	GTAAGCCCACTGGGtAACAGTGGCT
Pb_289_AloxAP_HapA_Mut6	ACTGGGtAACAGTGGCTGGGGAA
Pb_290_AloxAP_HapB_Wt5	TGCCTCgGCCTCCCACAGTTTTGTGAT
Pb_291_AloxAP_HapB_Mut5	CTGCCTCaGCCTCCCACAGTTTTGTGAT

Anhang 2: Leistungsbewertung mit Probandenproben

PTGS1 G-1006A

Probe/Tag	Wt	Mut	LC	Asym.
DNA 1/ 1	0,414	0,605	het	-0,188
DNA 1/ 2	0,094	0,313	het	-0,538
DNA 1/ 3	0,326	0,516	het	-0,226
DNA 2/ 1	0,479	0,151	Wt	0,521
DNA 2/ 2	0,264	-0,019	Wt	1,156
DNA 2/ 3	0,440	0,058	Wt	0,767
DNA 3/ 1	0,540	0,110	Wt	0,661
DNA 3/ 2	0,265	0,001	Wt	0,995
DNA 3/ 3	0,376	0,083	Wt	0,639
DNA 4/ 1	0,430	0,044	Wt	0,816
DNA 4/ 2	0,346	0,049	Wt	0,751
DNA 4/ 3	0,389	0,043	Wt	0,803
DNA 5/ 1	0,495	0,071	Wt	0,748
DNA 5/ 2	0,311	0,039	Wt	0,779
DNA 5/ 3	0,484	0,120	Wt	0,604

PTGS1 P17L

Probe/Tag	Wt	Mut	LC	Asym.
DNA 1/ 1	0,541	0,645	Wt	-0,088
DNA 1/ 2	0,280	0,369	Wt	-0,137
DNA 1/ 3	0,580	0,595	Wt	-0,013
DNA 2/ 1	0,587	0,346	Wt	0,258
DNA 2/ 2	0,554	0,422	Wt	0,135
DNA 2/ 3	0,605	0,444	Wt	0,154
DNA 3/ 1	0,682	0,474	Wt	0,179
DNA 3/ 2	0,674	0,473	Wt	0,175
DNA 3/ 3	0,555	0,406	Wt	0,155
DNA 4/ 1	0,626	0,489	Wt	0,123
DNA 4/ 2	0,471	0,382	Wt	0,104
DNA 4/ 3	0,563	0,411	Wt	0,157
DNA 5/ 1	0,650	0,479	Wt	0,152
DNA 5/ 2	0,405	0,239	Wt	0,257
DNA 5/ 3	0,565	0,443	Wt	0,121

PTGS1 R8W

Probe/Tag	Wt	Mut	LC	Asym.
DNA 1/ 1	0,543	0,027	Wt	0,904
DNA 1/ 2	0,183	0,008	Wt	0,921
DNA 1/ 3	0,444	-0,003	Wt	1,012
DNA 2/ 1	0,485	0,026	Wt	0,898
DNA 2/ 2	0,347	0,002	Wt	0,991
DNA 2/ 3	0,386	-0,007	Wt	1,037
DNA 3/ 1	0,440	0,018	Wt	0,923
DNA 3/ 2	0,476	0,004	Wt	0,983
DNA 3/ 3	0,368	0,012	Wt	0,939
DNA 4/ 1	0,409	-0,003	Wt	1,017
DNA 4/ 2	0,346	0,000	Wt	0,999
DNA 4/ 3	0,339	0,006	Wt	0,965
DNA 5/ 1	0,392	0,027	Wt	0,869
DNA 5/ 2	0,274	-0,002	Wt	1,015
DNA 5/ 3	0,432	0,008	Wt	0,964

eNOS -786T/C

Probe/Tag	Wt	Mut	LC	Asym.
DNA 1/ 1	0,748	0,709	het	0,027
DNA 1/ 2	0,623	0,551	het	0,061
DNA 1/ 3	0,736	0,631	het	0,077
DNA 2/ 1	0,728	0,699	het	0,020
DNA 2/ 2	0,793	0,673	het	0,082
DNA 2/ 3	0,741	0,632	het	0,080
DNA 3/ 1	0,786	0,687	het	0,067
DNA 3/ 2	0,824	0,737	het	0,056
DNA 3/ 3	0,726	0,581	het	0,111
DNA 4/ 1	0,171	0,745	Mut	-0,627
DNA 4/ 2	0,193	0,624	Mut	-0,528
DNA 4/ 3	0,208	0,659	Mut	-0,520
DNA 5/ 1	0,188	0,726	Mut	-0,588
DNA 5/ 2	0,110	0,631	Mut	-0,703
DNA 5/ 3	0,236	0,662	Mut	-0,474

F5 G1691A

Probe/Tag	Wt	Mut	LC	Asym.
DNA 1/ 1	0,481	0,000	Wt	0,998
DNA 1/ 2	0,192	-0,008	Wt	1,083
DNA 1/ 3	0,277	-0,002	Wt	1,011
DNA 2/ 1	0,376	-0,015	Wt	1,084
DNA 2/ 2	0,231	-0,011	Wt	1,096
DNA 2/ 3	0,220	-0,001	Wt	1,007
DNA 3/ 1	0,480	-0,014	Wt	1,061
DNA 3/ 2	0,375	-0,001	Wt	1,004
DNA 3/ 3	0,298	0,002	Wt	0,988
DNA 4/ 1	0,380	-0,001	Wt	1,007
DNA 4/ 2	0,233	-0,001	Wt	1,005
DNA 4/ 3	0,270	0,000	Wt	1,001
DNA 5/ 1	0,339	-0,002	Wt	1,015
DNA 5/ 2	0,250	-0,001	Wt	1,010
DNA 5/ 3	0,266	-0,003	Wt	1,026

MTHFR A1298C

Probe/Tag	Wt	Mut	LC	Asym.
DNA 1/ 1	0,632	0,068	Wt	0,807
DNA 1/ 2	0,007	0,020	Wt	
DNA 1/ 3	0,168	-0,016	Wt	1,203
DNA 2/ 1	0,587	0,053	Wt	0,835
DNA 2/ 2	0,004	-0,024	Wt	
DNA 2/ 3	0,159	-0,013	Wt	1,178
DNA 3/ 1	0,384	0,574	Mut	-0,198
DNA 3/ 2	0,000	-0,014	Mut	
DNA 3/ 3	0,090	0,140	Mut	-0,217
DNA 4/ 1	0,437	0,335	het	0,132
DNA 4/ 2	0,321	0,241	het	0,143
DNA 4/ 3	0,137	0,052	het	0,452
DNA 5/ 1	0,566	0,070	Wt	0,780
DNA 5/ 2	0,190	0,012	Wt	0,877
DNA 5/ 3	0,587	0,052	Wt	0,837

CETP Taq 1b

Probe/Tag	Wt	Mut	LC	Asym.
DNA 1/ 1	0,154	0,179	het	-0,077
DNA 1/ 2	0,001	0,004	het	
DNA 1/ 3	0,104	0,096	het	0,036
DNA 2/ 1	0,061	0,077	het	-0,116
DNA 2/ 2	-0,002	0,009	het	
DNA 2/ 3	0,030	0,015	het	
DNA 3/ 1	0,033	0,156	Mut	-0,648
DNA 3/ 2	-0,003	0,007	Mut	
DNA 3/ 3	0,034	0,118	Mut	-0,556
DNA 4/ 1	0,089	-0,005	Wt	1,111
DNA 4/ 2	0,164	0,007	Wt	0,918
DNA 4/ 3	0,205	0,006	Wt	0,944
DNA 5/ 1	0,224	-0,001	Wt	1,005
DNA 5/ 2	0,035	0,001	Wt	
DNA 5/ 3	0,390	0,009	Wt	0,953

ApoE Cys112Arg

Probe/Tag	Wt	Mut	LC	Asym.
DNA 1/ 1	0,673	0,045	Wt	0,875
DNA 1/ 2	0,308	0,001	Wt	0,996
DNA 1/ 3	0,672	0,066	Wt	0,820
DNA 2/ 1	0,556	0,490	het	0,063
DNA 2/ 2	0,428	0,392	het	0,044
DNA 2/ 3	0,587	0,561	het	0,023
DNA 3/ 1	0,592	0,556	het	0,032
DNA 3/ 2	0,603	0,599	het	0,003
DNA 3/ 3	0,504	0,512	het	-0,007
DNA 4/ 1	0,221	0,633	Mut	-0,483
DNA 4/ 2	0,268	0,511	Mut	-0,311
DNA 4/ 3	0,234	0,559	Mut	-0,411
DNA 5/ 1	0,695	0,063	Wt	0,833
DNA 5/ 2	0,418	0,011	Wt	0,949
DNA 5/ 3	0,597	0,061	Wt	0,815

ApoE Arg158Cys

Probe/Tag	Wt	Mut	LC	Asym.
DNA 1/ 1	0,075	0,650	Mut	-0,792
DNA 1/ 2	0,005	0,156	Mut	-0,942
DNA 1/ 3	0,058	0,612	Mut	-0,826
DNA 2/ 1	0,054	0,566	Mut	-0,826
DNA 2/ 2	0,006	0,334	Mut	-0,965
DNA 2/ 3	0,048	0,532	Mut	-0,834
DNA 3/ 1	0,530	0,457	het	0,073
DNA 3/ 2	0,452	0,383	het	0,083
DNA 3/ 3	0,417	0,419	het	-0,003
DNA 4/ 1	0,010	0,520	Mut	-0,961
DNA 4/ 2	0,043	0,456	Mut	-0,828
DNA 4/ 3	0,045	0,453	Mut	-0,818
DNA 5/ 1	0,628	0,335	Wt	0,304
DNA 5/ 2	0,338	0,129	Wt	0,449
DNA 5/ 3	0,490	0,361	Wt	0,152

Prothrombin G20210A

Probe/Tag	Wt	Mut	LC	Asym.
DNA 1/ 1	0,571	0,115	Wt	0,664
DNA 1/ 2	0,313	0,048	Wt	0,736
DNA 1/ 3	0,520	0,129	Wt	0,602
DNA 2/ 1	0,536	0,086	Wt	0,725
DNA 2/ 2	0,432	0,051	Wt	0,789
DNA 2/ 3	0,469	0,113	Wt	0,611
DNA 3/ 1	0,516	0,123	Wt	0,615
DNA 3/ 2	0,554	0,166	Wt	0,539
DNA 3/ 3	0,427	0,107	Wt	0,600
DNA 4/ 1	0,470	0,080	Wt	0,708
DNA 4/ 2	0,322	0,039	Wt	0,785
DNA 4/ 3	0,390	0,070	Wt	0,695
DNA 5/ 1	0,506	0,072	Wt	0,752
DNA 5/ 2	0,379	0,082	Wt	0,645
DNA 5/ 3	0,445	0,091	Wt	0,659

LPL D9N

Probe/Tag	Wt	Mut	LC	Asym.
DNA 1/ 1	0,624	0,212	Wt	0,493
DNA 1/ 2	0,330	0,054	Wt	0,718
DNA 1/ 3	0,626	0,196	Wt	0,524
DNA 2/ 1	0,596	0,159	Wt	0,580
DNA 2/ 2	0,524	0,099	Wt	0,682
DNA 2/ 3	0,551	0,141	Wt	0,593
DNA 3/ 1	0,567	0,104	Wt	0,690
DNA 3/ 2	0,636	0,215	Wt	0,495
DNA 3/ 3	0,528	0,170	Wt	0,512
DNA 4/ 1	0,510	0,110	Wt	0,646
DNA 4/ 2	0,420	0,120	Wt	0,556
DNA 4/ 3	0,479	0,142	Wt	0,543
DNA 5/ 1	0,581	0,168	Wt	0,551
DNA 5/ 2	0,347	0,058	Wt	0,714
DNA 5/ 3	0,513	0,141	Wt	0,568

LPL S447X

Probe/Tag	Wt	Mut	LC	Asym.
DNA 1/ 1	0,742	0,397	Wt	0,303
DNA 1/ 2	0,609	0,158	Wt	0,588
DNA 1/ 3	0,724	0,344	Wt	0,356
DNA 2/ 1	0,723	0,346	Wt	0,352
DNA 2/ 2	0,736	0,220	Wt	0,540
DNA 2/ 3	0,729	0,294	Wt	0,425
DNA 3/ 1	0,769	0,338	Wt	0,390
DNA 3/ 2	0,778	0,399	Wt	0,322
DNA 3/ 3	0,648	0,261	Wt	0,426
DNA 4/ 1	0,695	0,648	het	0,035
DNA 4/ 2	0,626	0,418	het	0,199
DNA 4/ 3	0,605	0,542	het	0,055
DNA 5/ 1	0,771	0,365	Wt	0,358
DNA 5/ 2	0,656	0,216	Wt	0,505
DNA 5/ 3	0,667	0,285	Wt	0,401

Anhang 3: Leistungsbewertung mit Referenzproben

PTGS1 G-1006A

Wdh.	Wt	Mut	LC	Asym.
1	0,501	0,083	Wt	0,715
2	0,457	0,105	Wt	0,625
3	0,464	0,117	Wt	0,596
1	0,346	0,594	het	-0,264
2	0,305	0,496	het	-0,239
3	0,295	0,479	het	-0,238
1	0,012	0,493	Mut	-0,953
2	0,030	0,421	Mut	-0,865
3	0,031	0,461	Mut	-0,872

PTGS1 P17L

Wdh.	Wt	Mut	LC	Asym.
1	0,319	0,710	Mut	-0,379
2	0,382	0,642	Mut	-0,253
3	0,418	0,676	Mut	-0,236
1	0,024	0,008		
2	-0,001	0,007		
3	-0,002	0,006		
1	0,643	0,540	Wt	0,087
2	0,647	0,524	Wt	0,104
3	0,647	0,557	Wt	0,075

PTGS1 R8W

Wdh.	Wt	Mut	LC	Asym.
1	0,377	0,064	Wt	0,711
2	0,368	0,088	Wt	0,612
3	0,418	0,089	Wt	0,648
1	-0,009	-0,002		
2	-0,001	0,002		
3	-0,001	0,014		
1	0,045	0,532	Mut	-0,843
2	0,065	0,383	Mut	-0,708
3	0,079	0,441	Mut	-0,698

eNOS -786T/C

Wdh.	Wt	Mut	LC	Asym.
1	0,797	0,522	Wt	0,208
2	0,575		Wt	
3	0,756	0,446	Wt	0,258
1	0,758	0,665	het	0,065
2	0,684	0,611	het	0,056
3	0,741	0,581	het	0,121
1	0,083	0,638	Mut	-0,769
2	0,077	0,630	Mut	-0,783
3	0,125	0,663	Mut	-0,682

F5 G1691A

Wdh.	Wt	Mut	LC	Asym.
1	0,151	-0,003	Wt	1,039
2	0,128	0,012	Wt	0,826
3	0,147	-0,020	Wt	1,319
1	0,027	0,009	het	
2	0,038	0,013	het	
3	0,042	0,014	het	
1	0,012	0,190	Mut	-0,884
2	0,002	0,098	Mut	-0,961
3	0,005	0,101	Mut	-0,911

MTHFR A1298C

Wdh.	Wt	Mut	LC	Asym.
1	0,672	0,047	Wt	0,869
2	0,591	0,066	Wt	0,800
3	0,610	0,065	Wt	0,808
1	0,693	0,586	het	0,083
2	0,587	0,428	het	0,157
3	0,533	0,392	het	0,152
1	0,495	0,637	Mut	-0,126
2	0,380	0,454	Mut	-0,088
3	0,395	0,525	Mut	-0,142

CETP Taq 1b

Wdh.	Wt	Mut	LC	Asym.
1	0,414	0,001	Wt	0,995
2	0,375	0,007	Wt	0,964
3	0,404	0,003	Wt	0,986
1	0,293	0,161	het	0,291
2	0,260	0,164	het	0,225
3	0,273	0,157	het	0,271
1	0,018	0,269	Mut	-0,876
2	0,034	0,091	Mut	-0,455
3	0,074	0,143	Mut	-0,318

ApoE Cys112Arg

Wdh.	Wt	Mut	LC	Asym.
1	0,549	0,014	Wt	0,951
2	0,437	-0,001	Wt	1,007
3	0,511	0,007	Wt	0,973
1	0,480	0,499	het	-0,020
2	0,339	0,371	het	-0,046
3	0,340	0,372	het	-0,045
1	0,072	0,496	Mut	-0,745
2	0,015	0,341	Mut	-0,915
3	0,029	0,439	Mut	-0,877

ApoE Arg158Cys

Wdh.	Wt	Mut	LC	Asym.
1	0,419	0,260	Wt	0,235
2	0,244	0,119	Wt	0,343
3	0,382	0,188	Wt	0,340
1	0,244	0,338	het	-0,162
2	0,127	0,176	het	-0,164
3	0,172	0,196	het	-0,065
1	0,020	0,246	Mut	-0,850
2	-0,036	0,088	Mut	-2,366
3	0,001	0,135	Mut	-0,980

Prothrombin G20210A

Wdh.	Wt	Mut	LC	Asym.
1	0,357	0,047	Wt	0,769
2	0,231	0,045	Wt	0,672
3	0,302	0,037	Wt	0,780
1	-0,028	0,003		
2	0,010	0,000		
3	0,015	0,000		
1	0,026	0,657	Mut	-0,925
2	0,032	0,517	Mut	-0,885
3	0,007	0,593	Mut	-0,978

LPL D9N

Wdh.	Wt	Mut	LC	Asym.
1	0,602	0,169	Wt	0,563
2	0,470	0,093	Wt	0,669
3	0,486	0,114	Wt	0,621
1	0,013	-0,016		
2	-0,005	0,019		
3	-0,012	0,013		
1	0,017	0,211	Mut	-0,853
2	0,005	0,079	Mut	-0,892
3	0,001	0,090	Mut	-0,972

LPL S447X

Wdh.	Wt	Mut	LC	Asym.
1	0,735	0,350	Wt	0,355
2	0,669	0,233	Wt	0,484
3	0,686	0,227	Wt	0,502
1	0,742	0,743	het	0,000
2	0,617	0,581	het	0,030
3	0,573	0,522	het	0,047
1	0,020	0,010		
2	0,013	0,018		
3	0,010	0,016		

Anhang 4: Stabilitätstest

PTGS1 G-1006A

Charge	Wt	Mut	LC	Asym.
1 /Tag 1	0,439	0,611	het	-0,164
1 /Tag 60	0,347	0,564	het	-0,239
1 /Tag 120	0,410	0,667	het	-0,239
2 /Tag 1	0,168	0,361	het	-0,365
2 /Tag 60	0,439	0,611	het	-0,164
2 /Tag 120	0,405	0,573	het	-0,171
3 /Tag 1	0,353	0,520	het	-0,191
3 /Tag 60	0,385	0,568	het	-0,192
3 /Tag 120	0,424	0,589	het	-0,163
4 /Tag 1	0,312	0,515	het	-0,245
4 /Tag 60	0,412	0,626	het	-0,207
4/Tag 120	0,344	0,462	het	-0,147

PTGS1 P17L

Charge	Wt	Mut	LC	Asym.
1 /Tag 1	0,651	0,689	Wt	-0,028
1 /Tag 60	0,564	0,666	Wt	-0,083
1 /Tag 120	0,636	0,695	Wt	-0,045
2 /Tag 1	0,335	0,437	Wt	-0,132
2 /Tag 60	0,651	0,689	Wt	-0,028
2 /Tag 120	0,630	0,683	Wt	-0,040
3 /Tag 1	0,536	0,599	Wt	-0,056
3 /Tag 60	0,536	0,559	Wt	-0,021
3 /Tag 120	0,597	0,648	Wt	-0,041
4 /Tag 1	0,443	0,546	Wt	-0,103
4 /Tag 60	0,648	0,693	Wt	-0,033
4/Tag 120	0,538	0,558	Wt	-0,019

PTGS1 R8W

Charge	Wt	Mut	LC	Asym.
1 /Tag 1	0,548	0,025	Wt	0,912
1 /Tag 60	0,460	0,007	Wt	0,971
1 /Tag 120	0,602	0,013	Wt	0,958
2 /Tag 1	0,288	-0,001	Wt	1,008
2 /Tag 60	0,548	0,025	Wt	0,912
2 /Tag 120	0,512	0,008	Wt	0,971
3 /Tag 1	0,432	0,011	Wt	0,953
3 /Tag 60	0,456	0,009	Wt	0,962
3 /Tag 120	0,492	0,008	Wt	0,966
4 /Tag 1	0,403	0,008	Wt	0,962
4 /Tag 60	0,507	0,011	Wt	0,959
4/Tag 120	0,417	0,224	Wt	0,302

eNOS -786T/C

Charge	Wt	Mut	LC	Asym.
1 /Tag 1	0,791	0,708	het	0,055
1 /Tag 60	0,797	0,718	het	0,052
1 /Tag 120	0,835	0,762	het	0,046
2 /Tag 1	0,619	0,586	het	0,027
2 /Tag 60	0,791	0,708	het	0,055
2 /Tag 120	0,810	0,689	het	0,080
3 /Tag 1	0,718	0,634	het	0,062
3 /Tag 60	0,735	0,661	het	0,053
3 /Tag 120	0,735	0,675	het	0,043
4 /Tag 1	0,720	0,633	het	0,064
4 /Tag 60	0,817	0,698	het	0,079
4/Tag 120	0,712	0,652	het	0,044

F5 G1691A

Charge	Wt	Mut	LC	Asym.
1 /Tag 1	0,438	0,005	Wt	0,975
1 /Tag 60	0,419	-0,015	Wt	1,073
1 /Tag 120	0,435	0,002	Wt	0,993
2 /Tag 1	0,266	0,000	Wt	0,997
2 /Tag 60	0,438	0,005	Wt	0,975
2 /Tag 120	0,394	-0,002	Wt	1,009
3 /Tag 1	0,440	-0,001	Wt	1,002
3 /Tag 60	0,380	0,000	Wt	1,001
3 /Tag 120	0,405	-0,004	Wt	1,021
4 /Tag 1	0,332	-0,005	Wt	1,033
4 /Tag 60	0,317	-0,002	Wt	1,015
4/Tag 120	0,349	0,056	Wt	0,723

MTHFR A1298C

Charge	Wt	Mut	LC	Asym.
1 /Tag 1	0,612	0,003	Wt	0,991
1 /Tag 60	0,381	-0,008	Wt	1,041
1 /Tag 120	0,372	-0,009	Wt	1,047
2 /Tag 1	0,363	0,030	Wt	0,846
2 /Tag 60	0,612	0,003	Wt	0,991
2 /Tag 120	0,425	0,017	Wt	0,923
3 /Tag 1	0,558	0,057	Wt	0,813
3 /Tag 60	0,497	0,020	Wt	0,921
3 /Tag 120	0,530	0,032	Wt	0,886
4 /Tag 1	0,494	0,010	Wt	0,960
4 /Tag 60	0,328	-0,002	Wt	1,011
4/Tag 120	0,222	0,143	Wt	0,218

CETP Taq 1b

Charge	Wt	Mut	LC	Asym.
1 /Tag 1	0,308	0,217	het	0,173
1 /Tag 60	0,137	0,077	het	0,282
1 /Tag 120	0,190	0,025	het	0,769
2 /Tag 1	0,022	0,009	het	
2 /Tag 60	0,308	0,217	het	0,173
2 /Tag 120	0,263	0,188	het	0,168
3 /Tag 1	0,061	0,031	het	0,333
3 /Tag 60	0,124	0,070	het	0,276
3 /Tag 120	0,156	0,120	het	0,132
4 /Tag 1	0,073	0,064	het	0,066
4 /Tag 60	0,116	0,053	het	0,371
4/Tag 120	0,140	0,144	het	-0,013

ApoE Cys112Arg

Charge	Wt	Mut	LC	Asym.
1 /Tag 1	0,709	0,174	Wt	0,606
1 /Tag 60	0,609	0,048	Wt	0,855
1 /Tag 120	0,750	0,157	Wt	0,653
2 /Tag 1	0,362	-0,024	Wt	1,142
2 /Tag 60	0,709	0,174	Wt	0,606
2 /Tag 120	0,719	0,088	Wt	0,783
3 /Tag 1	0,594	0,055	Wt	0,832
3 /Tag 60	0,545	0,061	Wt	0,799
3 /Tag 120	0,667	0,165	Wt	0,604
4 /Tag 1	0,539	0,002	Wt	0,994
4 /Tag 60	0,728	0,062	Wt	0,843
4/Tag 120	0,572	0,163	Wt	0,557

ApoE Arg158Cys

Charge	Wt	Mut	LC	Asym.
1 /Tag 1	0,182	0,690	Mut	-0,583
1 /Tag 60	0,027	0,529	Mut	-0,904
1 /Tag 120	0,153	0,729	Mut	-0,653
2 /Tag 1	-0,005	0,353	Mut	-1,029
2 /Tag 60	0,182	0,690	Mut	-0,583
2 /Tag 120	0,095	0,688	Mut	-0,757
3 /Tag 1	0,031	0,561	Mut	-0,895
3 /Tag 60	0,061	0,554	Mut	-0,801
3 /Tag 120	0,144	0,612	Mut	-0,619
4 /Tag 1	-0,003	0,468	Mut	-1,013
4 /Tag 60	0,086	0,694	Mut	-0,780
4 /Tag 120	0,119	0,490	Mut	-0,608

Prothrombin G20210A

Charge	Wt	Mut	LC	Asym.
1 /Tag 1	0,598	0,219	Wt	0,464
1 /Tag 60	0,485	0,121	Wt	0,601
1 /Tag 120	0,656	0,183	Wt	0,563
2 /Tag 1	0,371	0,061	Wt	0,717
2 /Tag 60	0,598	0,219	Wt	0,464
2 /Tag 120	0,565	0,123	Wt	0,643
3 /Tag 1	0,489	0,147	Wt	0,538
3 /Tag 60	0,502	0,148	Wt	0,544
3 /Tag 120	0,536	0,200	Wt	0,457
4 /Tag 1	0,427	0,077	Wt	0,694
4 /Tag 60	0,512	0,111	Wt	0,644
4 /Tag 120	0,452	0,191	Wt	0,406

LPL D9N

Charge	Wt	Mut	LC	Asym.
1 /Tag 1	0,668	0,322	Wt	0,349
1 /Tag 60	0,626	0,215	Wt	0,489
1 /Tag 120	0,698	0,270	Wt	0,443
2 /Tag 1	0,408	0,064	Wt	0,729
2 /Tag 60	0,668	0,322	Wt	0,349
2 /Tag 120	0,678	0,266	Wt	0,436
3 /Tag 1	0,555	0,134	Wt	0,612
3 /Tag 60	0,537	0,183	Wt	0,491
3 /Tag 120	0,646	0,312	Wt	0,348
4 /Tag 1	0,493	0,088	Wt	0,697
4 /Tag 60	0,662	0,218	Wt	0,505
4 /Tag 120	0,486	0,201	Wt	0,415

LPL S447X

Charge	Wt	Mut	LC	Asym.
1 /Tag 1	0,739	0,442	Wt	0,252
1 /Tag 60	0,754	0,355	Wt	0,359
1 /Tag 120	0,780	0,381	Wt	0,344
2 /Tag 1	0,655	0,159	Wt	0,609
2 /Tag 60	0,739	0,442	Wt	0,252
2 /Tag 120	0,764	0,417	Wt	0,293
3 /Tag 1	0,712	0,360	Wt	0,328
3 /Tag 60	0,726	0,350	Wt	0,350
3 /Tag 120	0,687	0,461	Wt	0,197
4 /Tag 1	0,725	0,275	Wt	0,451
4 /Tag 60	0,791	0,405	Wt	0,323
4 /Tag 120	0,662	0,311	Wt	0,360

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt wurden.