

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Probanden

Für die Untersuchung, die im Rahmen der Forschungsgruppe Geriatrie des Berliner Universitätsklinikums Charité durchgeführt wurde, wurde ein Fall-Kontroll-Design gewählt, bei dem die Probanden krankenhausbezogen rekrutiert wurden. Eingeschlossen wurden 146 Patienten mit ischämischem Schlaganfall, die zwischen November 1998 und November 2001 im Evangelischen Geriatriezentrum Berlin (EGZB), einem geriatrischen Krankenhaus mit Rehabilitationsschwerpunkt, stationär oder teilstationär behandelt wurden. Dabei wurden 87 Probanden nach ihrer Entlassung im Hausbesuch rekrutiert, die restlichen während des Krankenhausaufenthaltes. Folgende Daten bzw. vaskuläre Risikofaktoren wurden erhoben:

- Lebensalter sowie Alter zum Zeitpunkt des Ereignisses,
- Geschlecht,
- arterielle Hypertonie (behandelt vor dem Ereignis oder  $\geq 160$  mmHg systolisch resp.  $\geq 90$  mmHg diastolisch, gemessen bei Aufnahme im EGZB),
- Diabetes mellitus (behandelt vor dem Ereignis oder Nüchtern-Blutzucker  $\geq 110$  mg/dl im Kapillarblut, gemessen bei Aufnahme im EGZB),
- Hypercholesterinämie (behandelt vor dem Ereignis oder Gesamtcholesterin  $\geq 200$  mg/dl, gemessen bei Aufnahme im EGZB),
- Nikotinabusus (zum Zeitpunkt des Ereignisses),
- Alkoholabusus (regelmäßig  $\geq 40$  g Alkohol pro Tag oder mehrere Exzesse pro Jahr),
- früherer symptomatischer Hirninfarkt,
- bekannte Stenose der Arteria carotis interna, ein- oder beidseitig, mit Stenosegrad  $\geq 70\%$ ,
- bekannte vaskuläre Begleiterkrankungen, wie KHK oder periphere arterielle Verschlusskrankheit (PAVK),
- Behandlung mit gerinnungsmodulierenden Substanzen, wie Thrombozytenaggregationshemmern, oralen Antikoagulantien oder Heparin, zum Zeitpunkt des Ereignisses.

Die Schlaganfall-Diagnostik und die Erstbehandlung fanden in der Regel jeweils im Akutkrankenhaus statt, was bedeutet, dass auf den Umfang der diagnostischen Maßnahmen keine Einflussnahme möglich war. Zur Basis-Diagnostik eines Schlaganfalls zählen heutzutage

- eine zerebrale Bildgebung mittels Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT),
- eine nicht-invasive Untersuchung der hirnersorgenden Arterien mittels Duplex-Dopplersonographie, transkranieller Dopplersonographie (TCD), Magnetresonanz-Angiographie (MRA) oder CT-Angiographie,
- eine echokardiographische Untersuchung mittels transthorakaler (TTE) oder transösophagealer Echokardiographie (TEE),
- die Elektrokardiographie (EKG) sowie
- die Routine-Blutuntersuchung (12).

Obwohl diese Diagnostik bei jedem, zumindest jedem erstmalig aufgetretenen Schlaganfall durchgeführt werden sollte, gab es bei einzelnen Patienten teils erhebliche diagnostische Lücken, so dass nicht immer eine eindeutige Subtypen-Zuordnung möglich war. Der Befund einer kranialen CT lag vor bei 90%, einer kranialen MRT bei 15%, einer Duplex-Dopplersonographie bei 78%, einer TCD bei 14%, einer zerebralen Angiographie (DSA) bei 12%, einer MRA bei 5%, einer TTE bei 49%, einer TEE bei 15%, einer EKG bei 90% und einer 24-h-EKG bei 42% der eingeschlossenen Patienten. Schlaganfälle infolge intrakranieller Blutung wurden in dieser Untersuchung nicht berücksichtigt. Patienten mit bekanntem Vorhofflimmern, auch bei intermittierendem Auftreten, sowie anderen bekannten kardialen Erkrankungen mit erhöhtem Risiko einer Thrombenbildung, z. B. Klappenvitien, Klappenersatz, dilatativer Kardiomyopathie und linksventrikulären Kinetikstörungen, wurden ausgeschlossen. Das Gleiche galt für Patienten mit nachgewiesenen mikroangiopathischen Läsionen, sofern diese als einzige Schlaganfall-Ursache in Betracht kamen. Eingeschlossen wurden somit alle Schlaganfälle mit arteriell thrombotischer, arterio-arteriell embolischer Genese oder unbestimmter Ursache.

Zur Bestimmung der Genotyp-Verteilung bei nicht Erkrankten wurden 211 Kontrollpersonen rekrutiert. Hierbei handelte es sich ebenfalls um Patienten des EGZB, jedoch ohne jegliche klinisch nachweisbare zerebrovaskuläre Erkrankung. Berücksichtigt wurden dabei alle Personen, die von

Januar bis Mai 2001 sowie von Oktober 2001 bis August 2002 im EGZB stationär oder teilstationär aufgenommen wurden. Es galten dieselben Ausschlusskriterien wie für die Verumgruppe.

Nicht einbezogen wurden grundsätzlich Patienten,

- die an einer Demenz litten, sofern kein gesetzlicher Betreuer existierte, der auch die anamnestischen Fragen beantworten konnte,
- die der deutschen Sprache nicht mächtig waren und keine deutsch sprechenden Angehörigen hatten,
- die aus anderen Gründen nicht einwilligungsfähig oder zur Angabe anamnestischer Daten fähig waren,
- die die Teilnahme ablehnten.

Alle Probanden gaben nach erfolgter Aufklärung ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an der Untersuchung. Daraufhin erfolgten die Befragung der Probanden sowie die Entnahme von 2 ml EDTA-Blut, welches bis zur Weiterverarbeitung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert wurde.

## 2.2 Material

### 2.2.1 Chemikalien

- Ethidiumbromid EtBr (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- Magnesiumchlorid MgCl<sub>2</sub>(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA)
- SeaKem<sup>®</sup> LE Agarose (Cambrex Bio Science Rockland, Inc., Rockland, ME, USA)
- W-1 Detergens (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA)

### 2.2.2 Biochemikalien

- B5-Puffer 10x (Jena Bioscience GmbH, Jena, Deutschland)
- BSA-Puffer 10x (Jena Bioscience GmbH, Jena, Deutschland)
- DNA-Leiter 1 kb (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA)
- dNTP-Mischung (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA)
- PCR-Puffer 10x (-MgCl<sub>2</sub>) (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA)
- Probenpuffer (Ambion, Inc., Austin, TX, USA)
- *Sma* I-Restriktionsenzym (Jena Bioscience GmbH, Jena, Deutschland)
- *Taq*-DNA-Polymerase (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA)

### 2.2.3 Primersequenzen

- Primer *Sma*I\_F1: 5'-AGG TAG TTT GCA CAA GTT GGT CAC-3' (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA)
- Primer *Sma*I\_RI: 5'-CAA CCT TCA TGA GCC TTG GTT CTC-3' (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA)

### 2.2.4 Kits

- AGOWA<sup>®</sup> mag Maxi DNA Isolation Kit (Agowa GmbH, Berlin, Deutschland)

- NucleoFast<sup>®</sup> 96 PCR-Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland)

### 2.2.5 Laborgeräte

- Luminescent Image Analyzer LAS-1000 (Fuji Photo Film Co., Ltd., Tokio, Japan)
- Eppendorf Research<sup>®</sup> Pipetten (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Eppendorf Centrifuge 5402 (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Finnpipette<sup>®</sup> (ThermoLabsystems Oy, Helsinki, Finnland)
- Gelkammer BlueMarine (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- Gelsystem Electro-Fast<sup>®</sup> *Stretch* 108 Complete (ABgene House, Epsom, Surrey, Großbritannien)
- Mastercycler<sup>®</sup> Gradient (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Multifuge<sup>®</sup> 3S-R (Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland)
- Waage LP5200P (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland)

### 2.2.6 Software

- Image Reader LAS-1000 Pro Version 2.1 (Fuji Photo Film Co., Ltd., Tokio, Japan)

### 2.2.7 Verbrauchsmaterialien

- Biosphere<sup>®</sup> Filterspitzen (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland)
- Multiply<sup>®</sup>- $\mu$ Strip 0,2 ml Kette mit Deckelkette (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland)
- PCR-Folie, selbstklebend (ABgene House, Epsom, Surrey, Großbritannien)
- PP-PCR-Platten, 96 Well mit Rand (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
- Pipettenspitzen (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland)
- Reagiergefäße 1,5 und 2 ml (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland)

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 DNA-Extraktion

Die Extraktion der DNA aus Leukozyten (EDTA-Blut) der Probanden erfolgte mit superparamagnetischen Partikeln. Praktisch wurde dies mit *AGOWA<sup>®</sup>mag Maxi DNA Isolation Kits* inkl. der zugehörigen Chemikalien und einem softwaregesteuerten Magnetseparator auf Pipettierrobotern durchgeführt. Dabei wurden für jede Probe folgende vier Schritte ausgeführt.

#### 2.3.1.1 *Lyse*

In jedes der Extraktionsgefäße, welche sich im Magnetseparator befanden, wobei die Magneten unterhalb der Gefäße waren, wurden gegeben:

- 200 µl Lysepuffer BLM
- 20 µl Proteaselösung
- 200 µl der Blutprobe.

Die Proben wurden gemischt und für 10 min bei 55°C inkubiert.

#### 2.3.1.2 *Binden der DNA an AGOWA<sup>®</sup>mag Particles*

Im Folgenden wurden hinzugegeben:

- 200 µl Ethanol
- 20 µl *AGOWA<sup>®</sup>mag Particles Suspension BLM*.

Die Proben wurden wiederum gemischt und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Magnet wurde dann nach oben gefahren, die Separation dauerte ca. 30 s. Während der Magnet am Reaktionsgefäß verblieb, wurde vollständig der Überstand entnommen.

#### 2.3.1.3 *Waschen*

Der Magnet wurde danach wieder weggefahren und es wurde hinzugefügt:

- 720 µl Waschpuffer BLM 1.

Die Magnetpartikel wurden durch 10-minütiges Bewegen durch den Waschpuffer gewaschen. Es

wurde unter Wechsel der Magnetposition ca. 30 s separiert, danach wurde erneut vollständig der Überstand entnommen. Der Waschvorgang wurde zweimal wiederholt mit

- 720 µl Waschpuffer BLM 2,

wobei der Waschprozess auch hier 10 min dauerte. Im Anschluss erfolgte eine 10-minütige Trocknung des Pellets bei 55°C, wobei sich der Magnet in der oberen Position befand.

#### 2.3.1.4 Elution

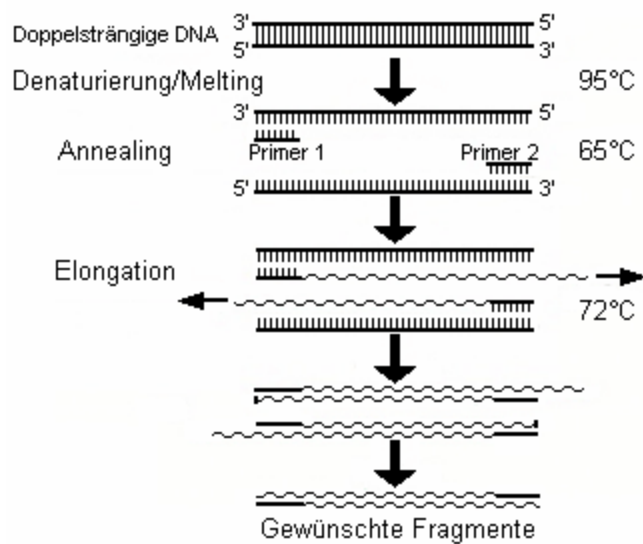
Es wurde hinzugefügt:

- 200 µl Elutionspuffer BLM.

Die Proben wurden für 10 min bei 55°C bei gleichzeitigem Seitenwechsel des Magneten inkubiert. Daraufhin wurde für 3 min separiert, während der Magnet an der Wand des Extraktionsgefäßes verweilte. Anschließend wurden 180 µl des Überstandes entnommen, der die aufgereinigte DNA enthielt. Dieser wurde für die PCR verwendet.

#### 2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine enzymatische Methode, welche die Amplifikation eines spezifischen DNA-Abschnittes ermöglicht. Dabei wird die DNA, welche die zu vervielfältigende Sequenz enthält, durch eine Temperaturerhöhung auf 95°C in ihre Einzelstränge denaturiert (*Melting*), wodurch Bindungsstellen für die Oligonukleotide geschaffen werden. Durch eine anschließende Temperaturniedrigung kommt es zur spezifischen Anlagerung (*Annealing*) der beiden Primer an komplementäre Sequenzen der DNA-Einzelstränge, welche die zu amplifizierende DNA-Sequenz einrahmen. Die dabei entstehenden kurzen doppelsträngigen DNA-Regionen sind Substrat für die *Taq*-DNA-Polymerase, ein thermostabiles 94 kDa-Polypeptid. Sie verlängert die Primer am 3' OH-Ende mit Desoxynukleotiden zu neuen DNA-Strängen (*Elongation*). Diese sind komplementär zu den jeweiligen DNA-Strängen der gesuchten Zielsequenz (**Abbildung 6**). Sie werden im folgenden Zyklus wieder aufgespalten und dienen als Matrize für die weitere DNA-Synthese, wodurch sich die Anzahl der DNA-Kopien mit jedem Zyklus verdoppelt. Durch mehrfaches Wiederholen der Zyklen kommt es somit zu einer exponentiellen Vervielfältigung.



**Abbildung 6:** PCR-Schema

Zur praktischen Durchführung wurde dabei ein Mastermix gemäß **Tabelle 4** hergestellt, von dem jeweils 48 µl vorgelegt und 2 µl DNA dazu pipettiert wurden. Dies erfolgte auf Eis. Danach wurde die 96er Microplatte mit PCR-Folie abgeklebt bzw. die Multiply<sup>®</sup>-Kette mit Deckel verschlossen und kurz abzentrifugiert. Die PCR erfolgte im Mastercycler<sup>®</sup> Gradient nach dem Programm gemäß **Tabelle 5**, wobei die Schritte (2) bis (4) 35-mal wiederholt wurden. Falls nicht die unverzügliche Weiterverarbeitung der PCR-Amplifikate möglich war, wurden die Proben bei -20°C gelagert.

**Tabelle 4:** PCR-Reaktionsmix

Lösungen	Ansatz für PCR (in µl)
PCR-Puffer 10x (-MgCl <sub>2</sub> )	5
dNTP-Mischung (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP)	1
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5
Primer-Mischung (je 10 µM Primer SmaI_F1 und SmaI_R1)	2,5
Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,15
1% W-1 Detergens (zur Verbesserung der Thermostabilität des Enzyms)	2,5
Sterilisiertes, destilliertes, nukleasefreies Reinstwasser	35,35
DNA	2



**Tabelle 5:** PCR-Temperatur-Zeit-Programm für die Amplifikation des 1.461 bp-Fragmentes des vWF-Gens

PCR-Schritt	Temperatur	Dauer
(1) Initiale Denaturierung	95°C	2 min
(2) Melting	95°C	30 s
(3) Annealing	65°C	30 s
(4) Elongation	72°C	90 s
(5) Elongation	72°C	2 min
(6) Ende	4°C	∞

Da Primer, freie Nukleotide und Proteine die folgende Digestion stören können, müssen die PCR-Produkte gereinigt werden.

Diese Reinigung erfolgte mittels NucleoFast<sup>®</sup> 96 PCR-Kits. Hierbei handelte es sich um 96er Platten mit Ultrafiltration-Membranen, auf welche die PCR-Produkte aufgetragen wurden. Durch wiederholtes Zentrifugieren und Waschen bei Raumtemperatur wurden Primer, Nukleotide, Salze und andere Verunreinigungen entfernt. Dies erfolgte nach folgendem Protokoll:

1. Auftragen der PCR-Proben (50 µl) auf die NucleoFast<sup>®</sup>-Platte
2. Zentrifugieren mit 4.500 g über 10 min
3. Waschen mit je 100 µl sterilisiertem, destilliertem Wasser
4. Zentrifugieren mit 4.500 g über 10 min
5. Waschen mit je 100 µl sterilisiertem, destilliertem Wasser
6. Zentrifugieren mit 4.500 g über 20 min.

Danach befanden sich auf der Membran die gewünschten Amplifikate, die nach Zugabe von 25 µl sterilisiertem, destilliertem Wasser und einer Inkubationszeit von 5 min weiterverarbeitet werden konnten.

### 2.3.3 Sma I-Digestion

Restriktionsenzyme sind in der Lage, doppelsträngige DNA an spezifischen, meist palindromischen Basensequenzen zu binden und durch Hydrolyse von Phosphodiesterbindungen zu spalten. Die entstehenden Restriktionsfragmente haben eine durch die Lage der Spaltstelle definierte Länge und lassen dadurch Rückschlüsse auf den zugrunde liegenden Genotyp zu. Das verwendete *Sma I*-Restriktionsenzym (Quelle: *Serratia marcescens*) schneidet Nukleotidstränge zwischen CCC- und GGG-Triplets. Unterschiedliche Fragmentgrößen, die auftreten, wenn man die DNA verschiedener Individuen mit demselben Restriktionsenzym schneidet, zeigen bei unterschiedlichen Basensequenzen einen vorhandenen Polymorphismus an (Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus, RFLP).

Dieses Prinzip wurde hier genutzt. Zur Restriktion wurden jeweils 25 µl des PCR-Produktes mit 1 µl des Enzyms (10 U/µl) und je 3,5 µl B5- und BSA-Puffer (1 mg/ml) versetzt und mit sterilisiertem, destilliertem, nukleasefreiem Wasser auf 35 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde nach Abkleben der Microplatte bzw. Aufsetzen der Deckel auf die Multiply<sup>®</sup>-Kette und kurzem Abzentrifugieren bei 25°C über 4 h im Mastercycler<sup>®</sup> Gradient restringiert. Danach wurde auf 4°C abgekühlt.

### 2.3.4 Gelelektrophorese

Durch die Elektrophorese können die DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt und visualisiert werden. Dabei nutzt man die negative Gesamtladung der DNA-Doppelhelix, die von den PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-Gruppen ausgeht und eine Wanderung im elektrischen Feld zur Anode hin bewirkt. Agarosegele dienen dabei als Träger, in denen die verschieden langen DNA-Moleküle unterschiedlich mobil sind. Die Größe der Fragmente kann durch den Vergleich mit einem Längenstandard bestimmt werden. Durch das Interkalieren des Ethidiumbromids (EtBr), das Einlagern zwischen benachbarte Basenpaare eines doppelsträngigen DNA-Moleküls ohne Sequenzspezifität, kann die DNA später sichtbar gemacht werden.

Es wurde 1,4%iges Agarosegel verwendet, zu dessen Herstellung die Agarose in einen Erlenmeyerkolben eingewogen und durch Aufkochen in der Mikrowelle in 1x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) gelöst wurde. Der gelösten Agarose wurde 0,04%ig EtBr hinzugefügt

(**Tabelle 6**). Nach dem Abkühlen wurde die Agaroselösung in die vorbereitete Gelkammer gegossen, in die Kämme eingesetzt wurden. Nach der Polymerisation wurden Kämme sowie Begrenzungsteile entfernt und das ausgehärtete Gel in die Elektrophoresekammer überführt, sodass die durch die Kämme entstandenen Taschen zur Kathode zeigten. Das Gel wurde mit 1x TAE-Puffer überschichtet, bis es ca. 2 mm von diesem bedeckt war. Je 15 µl Probenvolumen wurde mit 3 µl Probenpuffer (Ambion® Gel Loading Buffer II) versetzt und in die Auftragstaschen pipettiert. Zusätzlich wurde als Längenstandard 2 µl einer 1 kb-DNA-Leiter (200 ng/ml) in die erste Tasche pipettiert. Die DNA-Fragmente wurden bei einer Spannung von 100 V über 50 bis 60 min aufgetrennt.

**Tabelle 6:** Zur Elektrophorese verwendete Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Zusammensetzung</b>
50x TAE-Puffer	242 g Tris-Base 57,1 ml Essigsäure 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) ad 1 l H <sub>2</sub> O
1x TAE-Puffer	20 ml 50x TAE-Puffer ad 1 l H <sub>2</sub> O
EtBr-Lösung	1 mg/ml in Reinstwasser

Zur Fotodokumentation des Gels wird die UV-absorbierende Eigenschaft des EtBr genutzt, welches bei einer Wellenlänge von 312 nm fluoresziert und orangerotes Licht im Wellenlängenbereich von 590 nm emittiert. Die entsprechend aufleuchtenden Banden können dann fotografisch fixiert werden.

Das Agarosegel wurde nach Ablauf der Laufzeit der Kammer entnommen und auf den Fototisch des LAS-1000 gelegt. Ein EtBr-Filter wurde auf die Linse geschraubt und der Image Reader LAS-1000 gestartet. Nach Einstellung von Schärfe und Belichtungszeit wurden die durch Fluoreszenzanregung aufleuchtenden Banden sichtbar gemacht und als Fotografie festgehalten. Die Größe der DNA-Fragmente wurde mithilfe des parallel aufgetrennten Standards bestimmt. Danach konnten folgende Typen unterschieden werden (**Tabelle 7**):

**Tabelle 7:** Zuordnung der DNA-Fragmente zum Genotyp

Banden (bp)	Genotyp
857; 352; 252	C/C
1109; 857; 352; 252	C/T
1109; 352	T/T

### 2.3.5 Statistische Methoden

Die Ergebnisse wurden als Odds Ratio zusammen mit dem jeweiligen 95%-Konfidenzintervall angegeben. Gemäß **Tabelle 8** wurden die Odds Ratio (OR) mit der Formel

$$OR = \frac{a / c}{b / d} = \frac{ad}{bc}$$

und das Konfidenzintervall (KI) mit der Formel

$$KI = OR \left[ 1 \pm 1,96 \cdot \sqrt{\frac{(a + b)(c + d)(a + c)(b + d)}{(ad - bc)^2 n}} \right]$$

berechnet.

**Tabelle 8:** 2x2-Tafel für die Fall-Kontroll-Studie

	Fälle (Hirnfarkt)	Kontrollen (kein Hirnfarkt)	Gesamt
Merkmal vorhanden	a	b	a + b
Merkmal nicht vorhanden	c	d	c + d
Gesamt	a + c	b + d	n = a + b + c + d

Alle Kennziffern für die beschreibende Statistik wurden als Mittelwert  $\pm$ Standardabweichung, Median und Spannweite resp. als absolute und relative Häufigkeit angegeben. Die Genotypen (C/C, C/T, T/T) wurden durch Ablesen der Elektrophoresebanden bestimmt, die Allelfrequenzen wurden nach der üblichen Methode der Genzählung unter Verwendung der Formel

$$f(a) = \frac{2 \cdot \text{Homozygote} + 1 \cdot \text{Heterozygote}}{2n}$$

ermittelt. Hierbei bezeichnet  $f(a)$  die Häufigkeit des Allels  $a$ , *Homozygote* die Zahl der Homozygoten für das Merkmal, *Heterozygote* die Zahl der Heterozygoten und  $n$  die Gesamtzahl der untersuchten Individuen. Für die dadurch ermittelten beiden Allelfrequenzen  $p$  und  $q$  gilt:  $p + q = 1$ . Aus den Allelfrequenzen wurde für beide Gruppen die Häufigkeit der drei Phänotypen nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz

$$p^2 : 2pq : q^2$$

berechnet, die zum Vergleich erforderliche beobachtete Häufigkeit wurde durch Division der Anzahl der Personen einer Gruppe mit einem bestimmten Genotyp durch die Gesamtzahl aller Individuen eines Kollektivs ermittelt.

Die Signifikanzberechnung erfolgte mittels t-Test für metrisch skalierte bzw.  $\chi^2$ -Test für nominal skalierte Daten, wobei Unterschiede mit einem  $p$ -Wert  $<0,05$  als statistisch signifikant betrachtet wurden. Für die statistischen Analysen wurde SPSS für Windows Version 9 verwendet (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).