

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Verbrauchsmaterial

Artikel	Firma
96-well Optical Reaction Plates	Applied Biosystems
Einmalskalpelle	Feather
Latexhandschuhe DermaClean	Ansell
Optical Adhesive Cover	Applied Biosystems
Optical Cover Compression Pads	Applied Biosystems
Reaktionsgefäße Safe-Lock 0,2 ml; 0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml	Eppendorf
Röhrchen 12 ml	Sarstedt
Standardpipetten	Eppendorf
Standardtips 10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf

##### 3.1.2 Chemikalien

Substanz	Firma
100 bp-Leiter (1 µg/µl)	Gibco BRL
10x PCR-Puffer	Rapidozym, Promega
Agarose	Roth
Bromphenolblau, Natriumsalz	Merck
Chloroform	Sigma
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma
Dinatrium-EDTA-Dihydrat	Roth
dNTPs (2,5 mM)	Rapidozym, Promega
Essigsäure 100 %	Roth
Ethanol 100 %	J. T. Baker
Ethidiumbromid	Merck
First strand cDNA Kit	Fermentas
Glycerin	Roth
Isopropanol 100 %	J. T. Baker
Ketanest	Pfizer
Magnesiumchlorid (25 mM)	Rapidozym, Promega
Natriumdihydrogenphosphat-1-Hydrat	Merck
TaqMan 2x Universal PCR MasterMix	Applied Biosystems

Taq-Polymerase 5 u/μl	Rapidozym, Promega
Tris Base	Roth
Trizol	Gibco BRL
Xylencyanol FF	Merck

### 3.1.3 Lösungen und Puffer

<b>Puffer</b>	<b>Bestandteile</b>	<b>Konzentration</b>
DEPC-Wasser	DEPC	0,1% (w/v)
10x Laufpuffer	Glycerin Natriumdihydrogenphosphat-1-hydrat Bromphenolblau Xylencyanol FF	50% (v/v) 10,0 mM, pH 7,0 0,25% (w/v) 0,25% (w/v)
50x TAE	Tris Base Essigsäure 100 % Di-Natrium-EDTA-Dihydrat	2,0 M 5,71% (v/v) 50,0 mM

### 3.1.4 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Firma</b>
ABI Prism 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems
ABI Prism Sequenzer 3100 Advant Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Agarose-Gelkammer	Bio-Rad
Analysen-Waage BP 610	Sartorius
Kühlzentrifuge 5415 R	Eppendorf
Laborfuge 400	Heraeus
Magnetrührer IkaMagReo	Janke & Kunkell
Mikrowelle	Bosch
Multipette plus	Eppendorf
Photometer UV-1202	Shimadzu
Stromversorgungsgerät für Elektrophoresekammer	Biometra
Thermomixer 5436	Eppendorf
Thermocycler PTC-100	MJ Research, Inc.
Ultra Turrax T25	Janke & Kunkell
Vortexer VF2	Janke & Kunkell

## 3.1.5 Software

Name	Firma
ABI Prism 7000 SDS	Applied Biosystems
PrimerExpress Version 2.0.0	Applied Biosystems
SPSS 13.3	SPSS Inc.

## 3.1.6 Primer

Name	Sequenz	Produktlänge (bp)	Tm
9.352-sense	CATTGCAAAAAGGGCTCCTGAATAC	440	59
9.352-antisense	TGATAGGGGATGTCTTTTTGGCCA		59
CYP3A5-3-178-F	ACCCAGCTTAACGAATGCTCTACT	125	58
CYP3A5-3-280-R	GAAGGGTAATGTGGTCCAAACAG		59
CYP3A1-114-F	CTGGGTCTCCTGGCCAGTCCG	86	59
CYP3A1-175-R	CAGGAATCCCCTGTTTCTTGAAAAG		59
CYP3A1-134-F	TCCTGGTGCTCCTCTACGGAT	67	58
CYP3A1-200-R	CCAGGAATCCCCTGTTTCTTG		58
CYP3A1-932-F	ACAAAGAATCTCATACAGCCCTATCC	111	58
CYP3A1-1022-R	GTGCTGCTGGTGGGTTTCATAT		59
CYP3A2-898-F	GCTCATAATAATTCCAAAGACGAAGTG	145	58
CYP3A2-1042-R	GGTGAGTGGCCAGGAAATACAA		59
CYP3A2-ST-835-F	AAGGAAACCCGTCTGGATTCTAAG	533	60
CYP3A2-ST-1274-R	TGAAGAGCATATGTTGGAATCGTC		59
CYP3A9-1121-F	CCAAAGTCAAAGACTCTCATAAAGCAT	153	58
CYP3A9-1273-R	GCAGTTTCTTCTGTATATCAGGGTGAA		58
CYP3A9-ST-962-F	TCCTTACCCCACTATTTGAAGCA	449	59
CYP3A9-ST-1410-R	ACAGACCCTCTCAAGCCTTCC		58
CYP3A18-304-F	TGGCTATCATGGATCCAGAGATC	116	58
CYP3A18-428-R	ATCCTCAGACATGGTAATGGCC		59
CYP3A18-ST-191-F	AAGGAAACCCGTCTGGATTCTAAG	377	57
CYP3A18-ST-567-R	TGGGCTCCCCTTTTGCTT		58
Rat-PBGD-130-F	TGAAAACCTTGTACCCTGGCATA	118	59
Rat-PBGD-221-R	TCCAATCTTAGAGAGTGCAGTATCAAGA		59

### 3.1.7 Sonden

Name	Sequenz	Reporter	Tm
CYP3A5*3-A	TGTCCTTTCAaTATCTCTTC	6-FAM	69
CYP3A5*3-G	TGTCCTTTCAgTATCTCTT	VIC	69
CYP3A2-951	AATCATAGCCCAGTCAGTT	6-FAM	69
CYP3A9-1151	CCGATGTGGAGATTGTGGCCCA	6-FAM	69
CYP3A18-374	TCGGTGTTTTGGGCCAATGGGA	6-FAM	69
Rat-PBGD	TTGAAATCATTGCTATGTCCACCACAGG	6-FAM	69

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Untersuchte Studienpopulationen

#### 3.2.1.1 Nierentransplantationsstudie

Das untersuchte Kollektiv (n=399) wurde der Registerstudie aller transplantierten Patienten des Nierentransplantationszentrums des Campus Benjamin Franklin entnommen und bestand aus Patienten bei denen zwischen 1984 und 2000 eine Nierentransplantation durchgeführt wurde. Einschlusskriterium war ein anschließendes Cyclosporin-basiertes Medikationsregime für mindestens 10 Wochen.

Patienten, die mit anderen Immunosuppressiva behandelt oder auf andere Immunosuppressiva umgestellt wurden, wurden von der Studie ausgeschlossen.

Die Standarderhaltungstherapie bestand aus einer Tripel-Therapie mit Cyclosporin, sowie 5 mg/d Prednisolon und 50 mg/d Azathioprin oder 1000 bis 2000 mg/d Mycophenolatmofetil. Dabei erhielten die Patienten im Zeitraum von 1984 bis 1995 die Cyclosporin-Standardformulierung (Sandimmun®) und wurden nach 1995 auf die Mirkoemulsionsformulierung Neoral® umgestellt. Patienten, die nach 1995 ein Transplantat erhielten, wurden von Anfang an mit Neoral® behandelt.

Klinische Daten zu Cyclosporindosierung und -konzentration im Blut, Blutdruck, antihypertensive Medikation, sowie immunologische und präoperative Daten wurden den Patientenakten sowie der Datenbank der Collaborative Transplantat Study (CTS) entnommen [Kreutz et al., 2004]. Die Daten wurden aufgrund von Messungen erhalten, die während der Erhaltungstherapie zur Kontrolle durchgeführt wurden.

Aus den Patientenakten wurden ferner Angaben zu Faktoren entnommen, die ebenfalls einen möglichen Einfluss auf das Transplantat- und Patientenüberleben ausüben könnten.

Dazu gehörten u.a. das Alter der Empfänger sowie der Spender, die Anzahl der Patienten mit diabetischer Nephropathie und Nichtübereinstimmungen im HLA-System.

Die Bestimmung der Cyclosporin-Talspiegelkonzentration im Blut erfolgte durch einen Fluoreszenz-Polarisations-Immunoassay (FPIA) und wurde bis 1990 nach der Abbott TDx Methode und ab 1990 nach der Abbot IMx Methode durchgeführt [Kreutz et al., 2004; Lensmeyer et al., 1990; Yatscoff et al., 1990].

Zur Berechnung der mittleren individuellen Cyclosporindosis pro Tag (mg/d), der Dosis pro Körpergewicht (mg/kg) und der Talspiegelkonzentration von Cyclosporin (ng/ml) wurden alle verfügbaren Daten zu Einzeldosen und Talspiegelkonzentrationen, die während der Erhaltungstherapie aufgenommen wurden, gemittelt. Dosisadjustierte Talspiegelkonzentrationen wurden berechnet indem die Cyclosporin-Talspiegelkonzentration durch die korrespondierende tägliche Dosis auf einer mg/kg Basis dividiert wurde. Die tägliche Dosis wurde definiert als die Summe aus der morgendlichen Dosis, verabreicht nach Blutentnahme zur Talspiegelbestimmung und der letzten Dosis, die nach einem 12 h Intervall verabreicht wurde [Haufroid et al., 2004].

Die DNA wurde nach Standardprotokoll aus Blutproben der Patienten gewonnen.

Der Blutdruck der Patienten wurde während den ambulanten Besuchen von einer entsprechend ausgebildeten Schwester mit einem konventionellen Sphygmomanometer im Sitzen gemessen.

Die Untersuchung wurde durch die Ethikkommission des Campus Benjamin Franklin bewilligt. Alle teilnehmenden Patienten hatten eine schriftliche Einverständniserklärung abgegeben.

### **3.2.1.2 PREVEND-Population (Normalbevölkerung)**

Die untersuchte Population (n=6.777) war Bestandteil einer Kohorte, die im Rahmen der derzeit in Groningen, Niederlande laufenden PREVEND Studie (**P**revention of **RE**nal and **V**ascular **EN**d Stage **D**isease), aus der Allgemeinbevölkerung rekrutiert wurde [de Jong et al., 2003].

Dazu wurden alle Einwohner der Stadt Groningen im Alter von 28 bis 75 Jahren (n=85.421) gebeten eine Urinprobe abzugeben und einen Fragebogen zur ihrem demographischen und kardiovaskulären Hintergrund auszufüllen. Dieser wurde von n=40.856 Individuen beantwortet. Nach Ausschluss von Individuen mit insulin-abhängigen Diabetes und Schwangeren wurden alle Personen mit einer Albuminausscheidung von mehr als 10 mg/l

(n=7.768) zu einem weiteren Screening-Programm eingeladen, ebenso eine Kontrollgruppe zufällig ausgewählter Personen, deren Albuminausscheidung unter 10 mg/l lag (n=3.395). Das Screening-Programm bestand aus zwei Besuchen in einer ambulanten Klinik.

Bei beiden Besuchen wurde der Blutdruck in einer auf dem Rücken liegend Position über einen Zeitraum von 10 bzw. 8 min gemessen. Hypertonie wurde als ein systolischer Blutdruck von 140 mmHg und mehr und/oder als ein diastolischer Blutdruck von 90 mmHg oder mehr, berechnet aus den Mittelwerten der letzten zwei Messungen beider Tage, definiert.

Zusätzlich wurden die Teilnehmer gebeten an zwei aufeinander folgenden Tagen in der Woche vor ihrem zweiten Besuch über 24 h ihren Urin zu sammeln. Während des zweiten Besuchs wurde außerdem eine Blutprobe genommen, aus der die DNA nach Standardprotokoll extrahiert wurde. Das Screening Programm wurde von n=8.592 Individuen abgeschlossen.

Aus diesem Kollektiv wurde die Studienpopulation ausgewählt, wobei Nicht-Kaukasier, Personen bei denen der Verdacht einer renalen Erkrankung bestand und solche, die mit Antihypertensiva behandelt wurden, von der Untersuchung ausgeschlossen wurden, ebenso Personen deren Daten unvollständigen waren, so dass am Ende n=6.777 Individuen für die Untersuchung zur Verfügung standen.

Die Studie wurde von dem medizinischen Ethikkomitee bewilligt und in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Alle Teilnehmer hatten eine schriftliche Einverständniserklärung abgegeben.

### **3.2.1.3 NECOSAD-Population (Dialyse-Patienten)**

Die untersuchte Population (n=399) bestand aus Patienten die mittels Dialyse behandelt wurden und in der NECOSAD-Studie (**NE**therlands **CO**operative **S**tudy on the **A**dequacy of **D**ialysis) registriert waren [Termorshuizen et al., 2004].

Die NECOSAD Studie ist eine multi-zentrisch Kohortstudie, in die fortlaufend volljährige Patienten mit renalen Erkrankungen im Endstadium (ESRD) aufgenommen werden, sobald sie mit der Dialysebehandlung als erste renale Ersatztherapie beginnen.

Daten zur Demographie, primären Nierenerkrankungen und Komorbidität wurden beim Eintritt in die Studie aufgenommen. Daten zur verbleibenden renalen Funktion, Ernährungszustand, Biochemie und Dialysecharakteristika (Art der Dialyse, Dauer der

Dialyse, wöchentliche Anzahl der Dialysen) wurden 3 Monate nach Beginn der Dialyse aufgenommen und in 6-monatigen Intervallen aktualisiert.

Die Patienten verbleiben in der Studie bis zum Zeitpunkt einer Transplantation oder dem Eintritt des Todes.

Für die Überlebensanalyse wurden kaukasische Patienten mit renalen Erkrankungen im Endstadium untersucht, die eine chronische Dialyse als erste Ersatztherapie erhielten und verstarben bevor sie ein Transplantat erhielten. Patienten, die erst eine Dialyse erhielten und dann ein Transplantat wurden am Tag der Transplantation von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen.

Die Studie wurde von dem medizinischen Ethikkomitee bewilligt und in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Alle Teilnehmer hatten eine schriftliche Einverständniserklärung abgegeben.

### 3.2.2 TaqMan SNP Genotypisierung

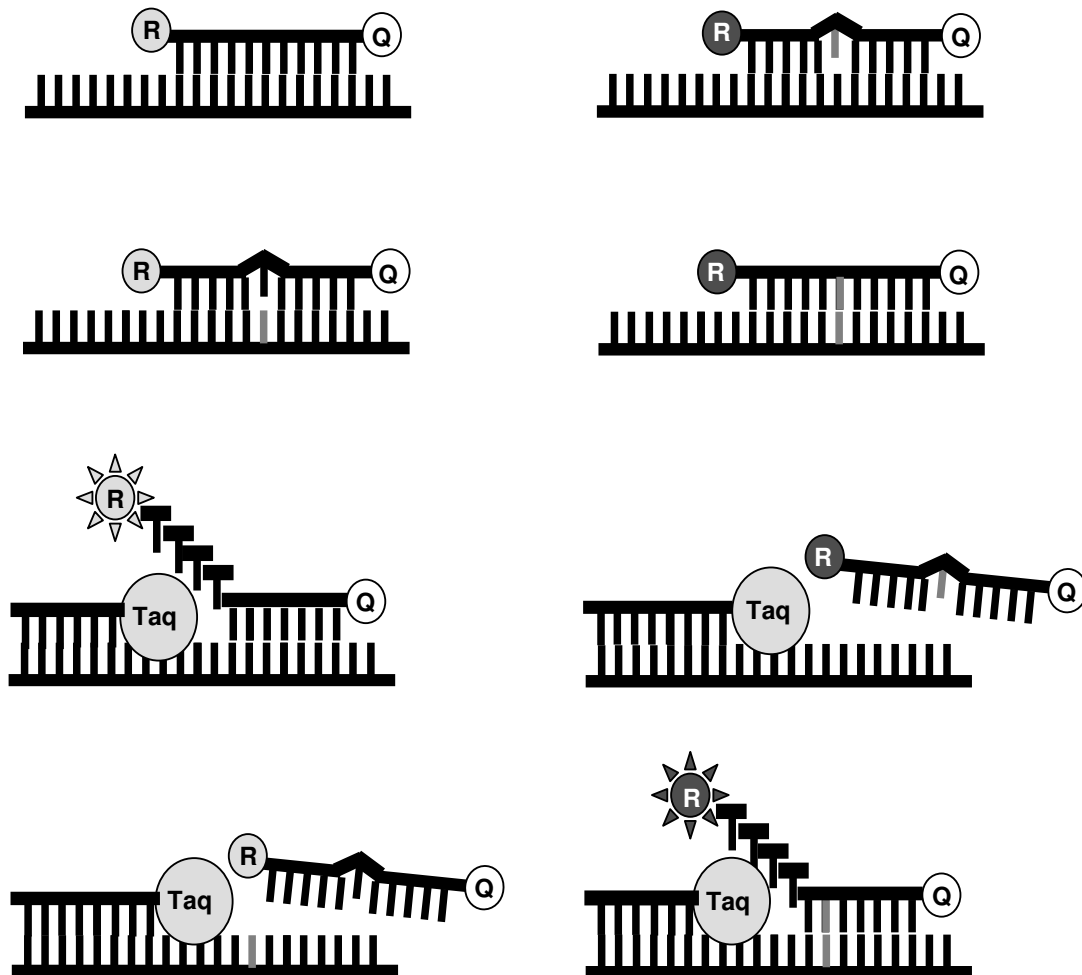
Die TaqMan SNP Genotypisierung ist eine PCR-basierte Methode zur Alleldiskriminierung von Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs).

Dabei werden die eingesetzten Primer so gewählt, dass sie einen maximal 150 bp langen Bereich flankieren, innerhalb dessen die zu untersuchende Punktmutation liegt. Zusätzlich werden zwei weitere Oligonukleotid-Sonden eingesetzt, die so gewählt wurden, dass die zu untersuchende Punktmutation innerhalb, am besten mittig der SONDENSEQUENZ liegt. Die Sonden sind am 5'-Ende mit zwei unterschiedlich fluoreszierenden Reporterfarbstoffen - 6-FAM und VIC - sowie am 3'-Ende mit einem Quencher markiert, der bei intakten Sonden durch Energieübertragung die Fluoreszenz der Reporterfarbstoffe unterdrückt.

Da die Effizienz der Anlagerung der Sonden durch Fehlpaarungen verringert ist, erfolgt eine vollständige Hybridisierung nur spezifisch in Abhängigkeit von der jeweils vorliegenden Punktmutation. Während der Amplifikation wird die am DNA-Strang hybridisierte Sonde durch die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase abgebaut, dabei entfernt sich der Quencher vom Reporter, dessen Fluoreszenz wird nicht mehr unterdrückt und es entwickelt sich ein Fluoreszenzsignal. Dagegen werden nicht vollständig hybridisierte Sonden durch die Taq-Polymerase lediglich verdrängt, bleiben aber intakt und erzeugen kein Fluoreszenzsignal (Abb. 6). Nach Beendigung der PCR-Reaktion wird die entstandene Fluoreszenz mit einem Detektionsgerät gemessen und ausgewertet (Abb. 7).

Zur Überprüfung des Assays wurden Proben jedes Genotyps sequenziert und die in den erhaltenen Sequenzen vorliegende Punktmutation mit dem Ergebnis des Assays verglichen.

Die Primer und die Sonde wurden mit Hilfe der PrimerExpress Software von Applied Biosystems erstellt. Die hierfür eingesetzte Nukleotidsequenz wurde der Genbank der publizierten genomischen DNA-Sequenzen des Servers des National Centers for Biotechnology (NCBI; [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) entnommen.

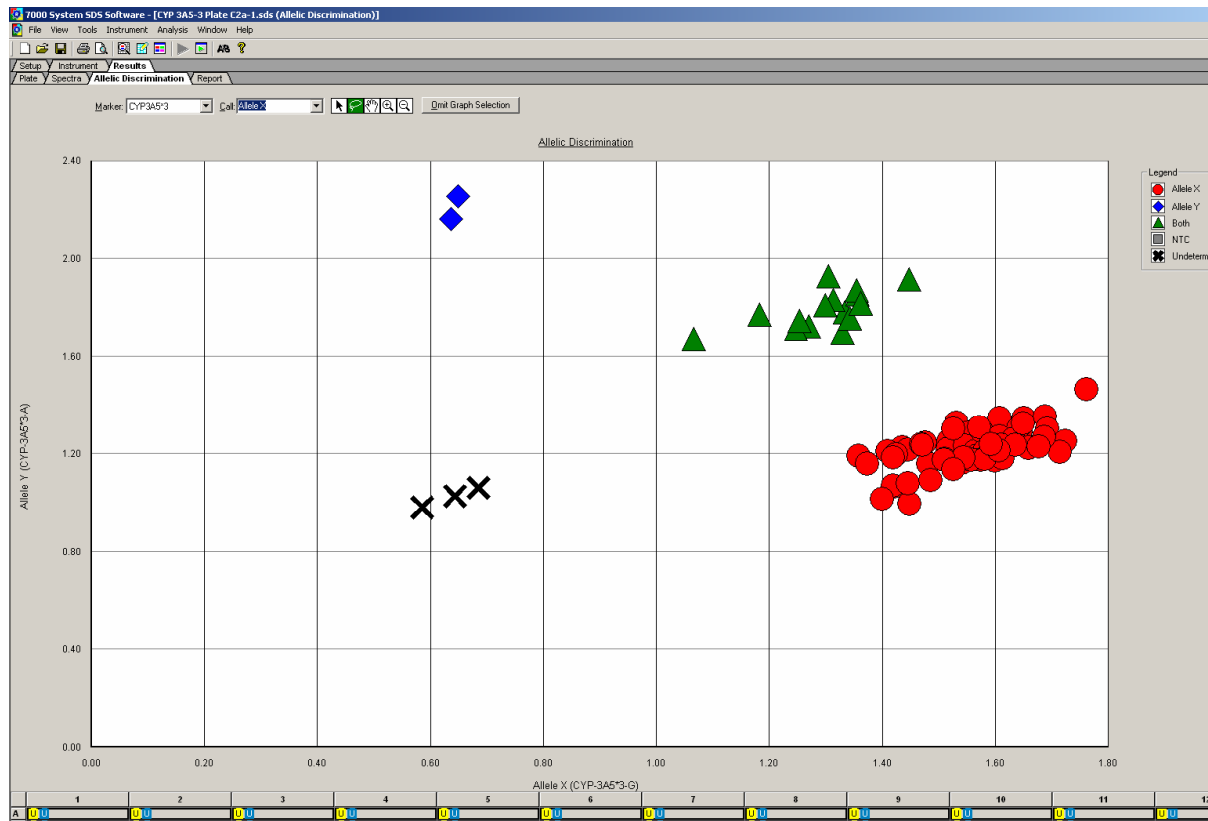


**Abb. 6**  
**Schematische Darstellung des Prinzips der TaqMan SNP Genotypisierung**

Zur Alleldiskriminierung wurden 50 ng DNA mit 10 µl TaqMan 2x Universal PCR MasterMix (Endkonzentration 1x), je 0,8 µl 10 µM sense- und antisense-Primer (Endkonzentration 400 nM), je 0,4 µl 10 µM Sonde Allel 1 und Sonde Allel 2 (Endkonzentration 200 nM) und nukleasefreies Wasser zu einem Gesamtvolumen von 20 µl gemischt.

Die PCR fand im ABI Prism 7000 Sequence Detection System von Applied Biosystems unter folgenden Reaktionsbedingungen statt: 2 min bei 50 °C, 10 min bei 95 °C gefolgt von 40 Zyklen mit 15 s bei 95 °C und 1 min bei 59 °C. Die Fluoreszenz wurde vor (Pre-Read) und nach (Post-Read) der PCR-Reaktion jeweils 1 min lang bei 60 °C gemessen. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels der ABI Prism 7000 SDS Software.





**Abb. 7**  
Darstellung des Ergebnisses eines TaqMan SNP Genotyping Assays (X = Negativ-Kontrollen, Kreis = homozygot „G“-Allel , Rhombus= homozygot „A“-Allel, Dreieck = heterozygot)

### 3.2.3 Untersuchungen im Tiermodell

#### 3.2.3.1 Tiere

Die Expression der CYP3A-Isoenzyme der Ratte wurde in Cortex und Leber von acht adulten SHR (Alter=14 Wochen) und sechs adulten WKY (Alter=16 Wochen) untersucht. Außerdem wurden Vergleiche der mRNA-Sequenzen und der Proteinsequenzen - soweit vorhanden - durchgeführt. Die entsprechenden Sequenzen wurden den Datenbanken des National Center for Biotechnology Information (NCBI, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) entnommen.

#### 3.2.3.2 Präparation der Tiere

Die Tiere wurden mit einer Mischung aus Ketanest (87 mg/kg KG) und Xylazin (13 mg/kg KG) durch i.p. Injektion in Narkose versetzt. Sofort nach Eröffnung des Abdomens wurde der Thorax geöffnet und das Herz entnommen. Anschließend erfolgte die Entnahme der Nieren und der Leber. Die gesamte rechte Niere und ein Leberstück wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren, die linke Niere wurde in Cortex und Medulla getrennt und ebenfalls eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

### **3.2.3.3 RNA-Isolierung**

Die Gesamt-RNA wurde mittels der Trizol-Methode aus dem tiefgefrorenen Gewebe isoliert. Dazu wurden 100 mg gefrorenes Gewebe in 1 ml eisgekühltem Trizol 3 x 30 s lang mit dem Ultra Turrax homogenisiert. Das Homogenisat wurde in ein 1,5 ml Eppendorf Tube überführt und anschließend zum Abtrennen von Zellresten 10 min lang bei 4 °C mit 5.000 Upm in einer Eppendorf Tischzentrifuge 5142, die auch für die weiteren Zentrifugationsschritte eingesetzt wurde, zentrifugiert.

Der Überstand wurde in ein 1,5 ml Eppendorf Tube abpipettiert und für ca. 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden 200 µl Chloroform zugefügt, durch Vortexen gemischt und für 2-3 min bei RT inkubiert. Danach wurde zur Phasenseparation 15 min lang bei 4 °C mit 12.000 Upm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase in der sich die RNA befand, wurde vorsichtig in ein 2,0 ml Eppendorf Tube abpipettiert, die organische Phase, in der DNA und Proteine enthalten waren, wurde verworfen. Zur Fällung der RNA wurde die wässrige Phase mit 500 µl Isopropanol versetzt und danach 10 min bei RT inkubiert. Die präzipitierte RNA wurde 10 min bei 4 °C mit 12.000 Upm zentrifugiert, der Überstand wurde dekantiert. Das erhaltene RNA-Pellet wurde mit 1 ml 75% eisgekühltem Ethanol gewaschen und 10 min bei 4 °C mit 4.900 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut dekantiert und das Pellet für ca. 10 min an der Luft getrocknet. Abschließend wurde die RNA in 50 µl DEPC- Wasser gelöst.

Die Konzentration wurde photometrisch bei 260 und 280 nm in einer Verdünnung von 1:200 gemessen. Die Qualität der RNA wurde durch einen Gellauf überprüft. Dazu wurden ca. 500 ng RNA - das entsprechende Volumen wurde über die vorher bestimmte Konzentration berechnet - mit 1 µl Laufpuffer versetzt und auf ein 1%iges Agarose-Ethidiumbromid-Gel, bestehend aus 30 ml 1% Agarose in 1x TAE und 3 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml), aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei einer Spannung von ca. 75 V und einer Stromstärke von ca. 200 mA über einen Zeitraum von ca. 40 min.

Die Lagerung der RNA bis zum Gebrauch erfolgte bei -80°C.

### **3.2.3.4 Reverse Transkription**

Die Reverse Transkription ist eine Methode mit der RNA durch ein virales Enzym, die reverse Transkriptase, in cDNA umgeschrieben wird.

Hierfür wurde ein Volumen, das einer Masse von 4 µg RNA entsprach mit DEPC-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt und mit 1 µl Random Hexamer Primer versetzt.

In einer PCR-Maschine wurde die Mischung 5 min bei 70°C inkubiert und anschließend 5 min lang bei 4°C gekühlt.

Danach wurden auf Eis 4 µl 5x Reaction Buffer, 1 µl RNase Inhibitor, 2 µl 10mM dNTP-Mix und zuletzt 2 µl reverse Transkriptase (M-MULV) zugegeben. Die RT-PCR fand in einer PCR-Maschine unter folgenden Bedingungen statt: 10 min lang bei 25 °C, gefolgt von der 60 min lang bei 37 °C, danach 10 min lang bei 70 °C und abschließend 10 min bei 4 °C. Die cDNA wurde bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

### **3.2.3.5 Qualitative Untersuchung der Expression der CYP3A-Enzyme**

Zur qualitativen Bestimmung der Expression wurde die cDNA mit enzyspezifischen Primern mittels einer einfachen PCR amplifiziert.

Die Primer hierfür wurden mit Hilfe der PrimerExpress Software von Applied Biosystems erstellt, die dafür genutzten Nukleotidsequenzen entstammen den publizierten mRNA-Sequenzen in der Gendatenbank auf dem Server des National Centers for Biotechnology (NCBI; [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Die Primer wurden so gewählt, dass sie eine Annealingtemperatur von 58 °C bis 60 °C und eine Primerlänge von mindestens 15 Basen aufwiesen. Außerdem wurden die Primer so gelegt, dass zwischen sense- und antisense-Primer mindestens eine Exon/Exon-Grenze lag, um ein falsch positives Signal durch eine mögliche Kontamination mit genomischer DNA zu vermeiden. Die Spezifität der Primer wurde durch Sequenzierung der erhaltenen PCR-Produkte bestätigt.

Für die PCR wurden 1 µl cDNA mit 2 µl 10x PCR-Puffer (Endkonzentration 1x), 0,2 µl 5 u/µl Taq-Polymerase (Endkonzentration 1 u), 1,6 µl 2,5 mM dNTPs (Endkonzentration 200 µM), 0,6 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub> (Endkonzentration 1,5 mM), je 2,0 µl 6 mM sense- und antisense-Primer (Endkonzentration 0,6 µM), und 10,6 µl Aqua bidest. zu einem Gesamtvolumen von 20 µl gemischt.

Die Bedingungen der Reaktion waren wie folgt: 3 min lang eine erste Denaturierung bei 94 °C, gefolgt von 30 Zyklen mit jeweils 94 °C 15 s lang, 1 min lang bei einer Primerspezifische Annealingtemperatur und 1 min lang bei 72 °C. Danach schloss 7 min lang eine finale Elongation bei 72 °C an.

Für den Gellauf wurden 5 µl des PCR-Produktes mit 1,2 µl Laufpuffer, bestehend aus Glycerin, Natriumdihydrogenphosphat-1-hydrat, Bromphenol und Xylenxanol, die einen optischen Anhaltspunkt für den Fortschritt der Elektrophorese gaben, versetzt und auf ein 2%iges Agarose-Ethidiumbromid-Gel, bestehend aus 100 ml 2% Agarose in 1x TAE und 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) aufgetragen. Ethidiumbromid lagert sich in die DNA-Doppelhelix ein, fluoresziert unter UV-Licht und macht somit die Position der PCR-Produkte im Gel sichtbar. Zusätzlich wurde eine 100 bp DNA-Leiter als Größenstandard im Gel mit aufgetrennt. Der Gellauf erfolgte bei einer Spannung von ca. 75 V und einer Stromstärke von ca. 200 mA über einen Zeitraum von ca. 40 min.

Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht (302 nm) betrachtet und fotografiert. Die Fragmente wurden miteinander verglichen und somit deren Größe bestimmt.

#### 3.2.4 Statistik

Die statistische Auswertung der Genotypisierung der Studienpopulationen erfolgte durch den Chi-Quadrat-Test, Varianzanalysen (ANOVA) und den Mann-Whitney-U-Test. Beobachtete und erwartete Allelhäufigkeiten wurden mittels Hardy-Weinberg-Equilibrium ausgewertet. Zur Untersuchung des Einfluss von mehreren Risikofaktoren wurde eine Cox-Regressions-Analyse durchgeführt. Der Zusammenhang zwischen Genotyp und Transplantat- bzw. Patientenüberleben wurde mittels Kaplan-Meier-Kurven untersucht. Die statistische Auswertung der Genexpression bei Ratten erfolgte durch Varianzanalysen (ANOVA).

Als Statistikprogramm wurde SPSS 11.1 verwendet.