

3 Material und Methoden

3.1 Proben

Die DNA-Proben von 107 Kindern unter 18 Jahren mit ALL-Ersterkrankung wurden untersucht. Die DNA stammt überwiegend aus dem Knochenmark und zum Teil aus dem Blut. Die Proben wurden im Rahmen der Initialdiagnostik gewonnen. Bei 102 Proben lag der Anteil leukämischer Blasten im Nativmaterial vor Anreicherung der mononukleären Zellen mittels Ficoll-Dichtegradienten bei über 70%, bei drei Proben zwischen 50 und 70%, bei einer bei 43 und bei einer weiteren bei mindestens 37%. Von 12 Patienten konnten Kontrollproben mit einem Blastenanteil unter 2% untersucht werden. Zusätzlich wurden DNA-Proben aus dem Blut von 104 Kontrollpersonen für den Abschnitt 1a sowie von 66 Kontrollpersonen für den Abschnitt 6 des Gens untersucht.

3.2 Geräte und Reagenzien

3.2.1 Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Thermocycler (PCR-Gerät)	GeneAmp PCR System 9600	Perkin Elmer Wellesley, USA
	GeneAmp PCR System 2400	Applied Biosystems Foster City, USA
Elektrophoresekammern	BRL HORIZON 11.14	Gibco, jetzt Invitrogen Karlsruhe, D
	BRL HORIZON 58	Gibco, jetzt Invitrogen
Spannungsgenerator für die Elektrophoresekammern	Electrophoresis Power Supply ST606T	Gibco, jetzt Invitrogen
Waage	BP 3100 S	Sartorius, Göttingen, D
Mikrowellengerät		Bosch, Gerlingen-

UV-Illuminator		Schilterhöhe, D
Videokamera zur Gelauswertung		Herolab, Wiesloch, D Herolab
Drucker für Gelfotos		Mitsubishi, Tokio, Japan
Fluoreszenzdetektor	Fluor Imager SI	Molecular, Dynamics, Sunnyval, USA
Schüttler (Vortexer)	Vibrofix VF 1 Electronic	Jahnke & Kunkel, Staufen, D
Aqua dest. Anlage		Millipore, Billerica, USA
DHPLC-Anlage	WAVE DNA Fragment Analysis System	Transgenomic, Omaha USA
Zentrifuge	Labofuge 400R	Heraeus Instruments Osterode, D
Tischzentrifuge	Centriguge 5415c	Eppendorf, Hamburg, D
Sequenzierer	ABI-PRISM 310 u. 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, s. o.
Pipetten	1µl, 2µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl	Eppendorf, Gibco, s. o. Abimed, Langenfeld, D

3.2.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Acetonitril	Roth, Karlsruhe, D
Agarose 1404	Serva, Heidelberg, D
Acrylamid	Serva
APS	Serva
Big Dye Terminator Mix	Applied Biosystems, s.o.
Big Dye Puffer	Applied Biosystems
Falcon Röhrchen (50ml)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
BSA	Sigma, Taufkirchen, D
SYBR Gold	Molecular Probes, Eugene, USA

Dephosphorylation buffer (10x)	Roche, Mannheim, D
dNTPs	InViTek, Berlin, D
DyEx 2,0 Spin Kit zur Reinigung der Sequenzier-PCR	Qiagen, Hilden, D
Ethanol	Merck, Whitehouse Station, USA
Ethidiumbromid	Boehringer Mannheim, Mannheim, D
Exonuklease I	New England BioLabs, Beverly, USA
Exo I buffer	New England BioLabs
HPLC analyzed H ₂ O	JT Baker, Deventer, Niederlande
1-kb-DNA-Marker	Gibco, jetzt Invitrogen, Karlsruhe, D
Orange G (Ladepuffer)	Merck, s. o.
Pasteurpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, D
PCR-Puffer (10x GenTherm buffer)	Rapidozym, Berlin, D
PCR-Purification Kit	Quiagen, s. o.
PCR-Tubes ultradünn 0,2 ml	Biozym, Oldendorf, D
Pipettenspitzen	Sarstedt, s. o.
Puffer 2	New England BioLabs, s. o.
Reagiergefäße (1,5ml)	Sarstedt
Restriktionsenzym MnlI	New England BioLabs, s.o.
SAP	Roche, s. o.
Taq.-DNA-Polymerase (50 U/μl)	Eppendorf, s. o.
Taq.-Polymerase-Puffer (10x)	Eppendorf
Temed	Bio-Rad, Hercules, USA
Thermopapier	Mitsubishi, s. o.
TEAA (Triethylammonium-Acetat, 2M pH 7,0)	Transgenomic, s. o.

3.2.3 Puffer

10 x TBE-Puffer	540 g	Tris-Base
	257 g	Borsäure
	46,5 g	EDTA
	ad 5 l	H ₂ O

Präzipitationsmix	4 ml	0,1 M EDTA
	500 µl	Natriumacetat (3 M, pH 5,3
	ad 50 ml	Ethanol (100%)
Puffer A (0,025% Acetonitril)	100 ml	2 M TEAA
	500 µl	Acetonitril
	ad 2 l	Millipore H ₂ O (18Ω)
Puffer B (25% Acetonitril)	100 ml	2 M TEAA
	500 ml	Acetonitril
	ad 2 l	Millipore H ₂ O (18Ω)
Puffer C (8% Acetonitril)	80 ml	Acetonitril
	ad 1 l	Millipore H ₂ O (18Ω)
Puffer D (75% Acetonitril)	750 ml	Acetonitril
	ad 1 l	Millipore H ₂ O (18Ω)

3.2.4 Primer

Das intronlose Gen für die DNA-Ligase IV wurde in 11 Abschnitte eingeteilt, da eine DHPLC-Analyse über mehr als 600 Basenpaare nicht möglich ist und auch die PCR über sehr lange Abschnitte schwierig wird. Sowohl für die normale als auch für die Sequenzier-PCR wurden folgende Primer (10 µM) der Firma Thermo Hybaid (Franklin, USA) verwendet:

Tabelle 1: Für PCR und Sequenzierung des DNA-Ligase-IV-Gens verwendete Primer

Primer	Sequenz	Basenpaare	Position
1aF 1aR	5'-GCC AGT TAA ACG AGA AGA TT-3' 5'-GGT TCT TAT GAA GAG CAT CA-3'	202	-33 - 169
1F 1R	5'-CAG AAA AAA TCA GAC ACT TC-3' 5'-GTA AAC ATC TTG GCT TCA AC -3'	318	98 - 415
2F 2R	5'-TGG AGA TGC TGG AGA CTT TGC-3' 5'-TGC AGT TGC CTA CAG ACT TT-3'	330	357 - 683
3F 3R	5'-AAC TCA GAG TTC AGC ACT TGA GC-3' 5'-GGA GAA GCA CCA AAC RGA TC-3'	393	525 - 917
4F 4R	5'-CAT AGA AAC CAA GCT AGA TG-3' 5'-TAC CAT AAT TCC CTC TTC TC -3'	487	807 - 1293
5F 5R	5'-CCAAT TCCAGGTAGA ATAG-3' 5'-TCA AAC CCA GAT CAT ACA GT-3'	379	1183 - 1561
6F 6R	5'-GGTGG AATG ATGTCTCATT T-3' 5'-TAA GTT GTT CTA GGT CGT CC-3'	379	1429 - 1807
7F 7R	5'-GTT CAGATT AAAGCAGCAG A-3' 5'-TTC TGC AAT TCT GTT CTC C-3	384	1669 - 2052
8F 8R	5'-TGCCCCAA AGATGAAGAA AGT-3' 5'-TGA ATC ATA AAG CGA GGC TG-3'	345	2163 - 2507
9F 9R	5'-AATC CAGGCC CAGA CACGTA-3' 5'-ACG AGT CCA AAT AAA CGG TG-3'	394	2074 – 2467
10F 10R	5'-TGAAGGA AGTATTCTCA GGA-3' 5'-CAA TGA GTC TGC CAG ATC AG-3'	463	2321 - 2783

3.2.5 Software

Programm

Anwendung

EASY Plus

Darstellung von Agarosegelen

Sequencing Analysis 3.4.1

Auswertung der Sequenzierergebnisse

WAVEMaker 3.4

Auswertung der DHPLC-Analyse

3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.3.1 Grundlagen

Die Polymerase-Kettenreaktion (eng. polymerase chain reaction; PCR) ist ein Verfahren, definierte DNA-Abschnitte exponentiell zu vervielfältigen. Hierbei macht man sich das Prinzip der in vivo stattfindenden DNA-Replikation zunutze. Erforderlich sind sehr reines Wasser, Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) als Bausteine der zu synthetisierenden DNA, eine DNA-Polymerase, Puffer sowie zwei sog. Primer, Oligonukleotide aus ca. 20 Basen, die zu den 3'-Enden des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes komplementär sind. Nach Zugabe einer geringen Menge Ausgangs-DNA wird der Reaktionsansatz zunächst für 5 Minuten auf 96°C erhitzt, um die DNA zu denaturieren, d.h. den Doppelstrang in zwei Einzelstränge aufzutrennen (engl. denaturation). Anschließend wird ein aus drei Schritten bestehender Zyklus ca. 35mal wiederholt: Denaturierung bei 96°C. Anlagerung (engl. annealing) der Primer an die Einzelstränge bei niedrigerer, individuell zu ermittelnder Temperatur. Ausgehend vom 3'-Ende der Primer wird bei 72°C ein neuer, zum Einzelstrang der Ausgangs-DNA komplementärer, DNA-Strang synthetisiert (eng. elongation). Als Enzym dient hierbei eine hitzestabile DNA-Polymerase aus dem in heißen Quellen lebenden Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq.-Polymerase).

Nach dem letzten Zyklus erfolgt eine finale Elongation bei 72°C für ca. 5-10 Minuten. Da bei jedem neuen Zyklus die alte und die neu gebildete DNA als Matrize dienen, erfolgt die Vervielfältigung exponentiell.

3.3.2 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung und Sichtbarmachung der DNA-Fragmente erfolgt mittels Agarosegelelektrophorese. Agarose ist ein pflanzliches Polysaccharid, das mit TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer) und einer geringen Menge Ethidiumbromid erhitzt wird und nach Erkalten ein Gel bildet. Je 5 µl des PCR-Produktes werden zusammen mit 4 µl Gelladepuffer (Orange G) in Taschen an einem Ende des Gels pipettiert und das Gel in eine Laufkammer mit TBE-Puffer gebracht. Nach Anlegen einer Spannung von 150 V wandern die negativ geladenen DNA-Moleküle entsprechend ihrer Größe in Richtung Anode, wobei kürzere Fragmente schneller wandern als längere. Je kleiner die PCR-

Produkte sind, desto höher konzentriert sollte das Gel sein. Für die vorliegende Arbeit hat sich eine Konzentration von 2% bewährt. Zur Größenbestimmung läuft parallel ein Gemisch aus DNA-Fragmenten definierter Länge als Standard. Ethidiumbromid ist ein interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, der sich zwischen die Basen der DNA schiebt, wodurch seine Fluoreszenz gesteigert wird. Auf einem UV-Transilluminator kann die DNA dann sichtbar gemacht werden. Die Dokumentation erfolgt durch Einscannen und Ausdrucken der Bilder.

3.3.3 Durchführung

Für die vorliegende Arbeit wurde folgendes PCR-Protokoll verwendet:

H ₂ O:	25 µl
Puffer (10X):	3 µl
Primer vorwärts:	1 µl
Primer rückwärts:	1 µl
dNTPs:	0,3 µl
Taq.-Polymerase:	0,1µl
DNA:	0,5-1,0µl

Programm:

96°C:	5 Minuten
96°C:	15 s
54°C:	30 s 35 Zyklen
72°C:	40 s
72°C:	10 Minuten

Dieses Protokoll mit der Annealingtemperatur von 54°C wurde für alle Teilabschnitte verwendet.

3.4 Denaturing High-Performance Liquid Chromatography (DHPLC, WAVE™)

Vor allem im Rahmen der genetischen Forschung, aber auch bei der Diagnose bestimmter genetisch bedingter Erkrankungen ist es erforderlich, große Mengen an DNA-Proben auf Mutationen und Polymorphismen zu untersuchen. Eine Möglichkeit, schnell eine große Zahl an Proben auf das Vorhandensein einer DNA-Veränderung zu überprüfen, bietet die Denaturing High-Performance Liquid Chromatography (DHPLC). Die Untersuchung erfolgt auf dem WAVE™-System von Transgenomic.

Als Ausgangsprodukt dient auch hier eine normale PCR. Ist ein Individuum heterozygot für den Austausch einer einzelnen Base (SNP; single nucleotide polymorphism), so liegen bei ihm zwei verschiedene DNA-Doppelstränge im Verhältnis 1:1 vor. Wird die DNA für 5 Minuten auf 95°C erhitzt, so kommt es zur Denaturierung, d.h. die DNA wird einzelsträngig. Beim Abkühlen der DNA bilden sich wieder Doppelstränge. Hierbei paaren sich erneut die beiden Wildtyp-Einzelstränge sowie die beiden veränderten Einzelstränge und bilden sog. Homoduplices. Daneben kommt es jedoch auch zur Paarung der beiden Wildtyp-Einzelstränge mit den komplementären Einzelsträngen der veränderten DNA, was zu sog. Heteroduplices führt. An der Stelle des Basenaustausches kann dabei keine Paarung erfolgen. Abb. 11 verdeutlicht dieses Prinzip:

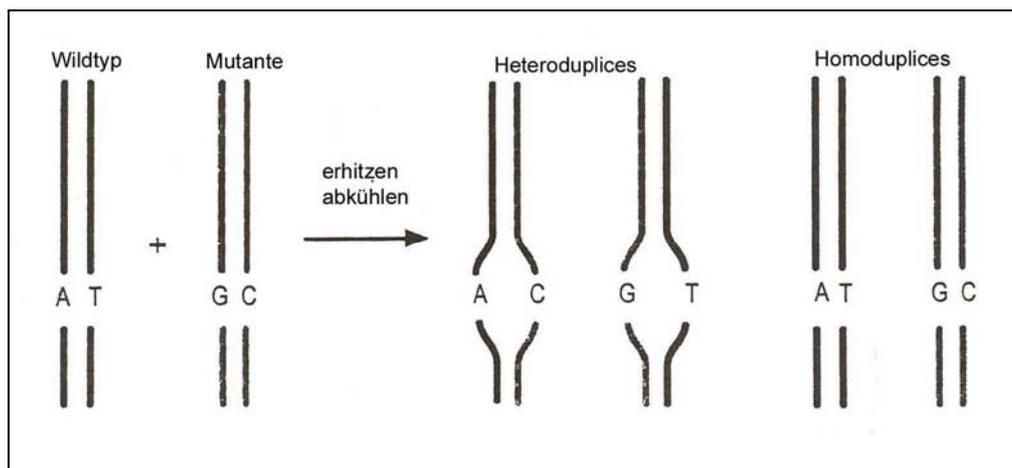


Abb. 11: Entstehung von Homo- und Heteroduplices. Abb. nach ⁷⁴

Mittels DHPLC können Homo- und Heteroduplices voneinander getrennt werden: Das WAVE™-System enthält als stationäre Phase eine Chromatographiesäule aus einem

Poly(styrene-divinylbenzen)-Copolymer. Da die DNA an die hydrophobe Oberfläche der Säule nicht direkt binden kann, erfolgt die Bindung über einen Puffer: Triethylammoniumacetat (TEAA) bindet mit seinen aliphatischen Ketten an das Polymer der Säule und mit seinem positiven Ammoniumion an das negative Phosphatrückgrat der DNA. Die Abbildungen 12 und 13 zeigen die Brückenfunktion des TEAA-Puffers:

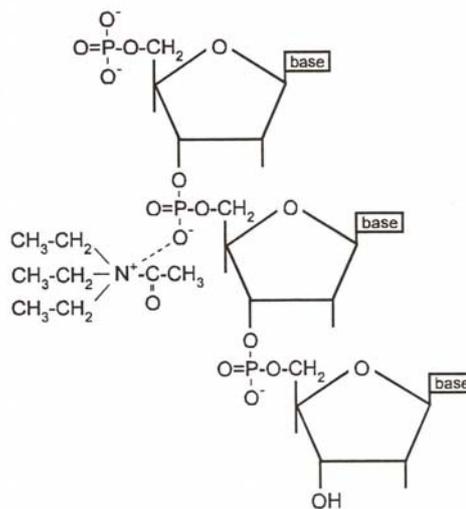


Abb. 12: Wechselwirkung zwischen TEAA u. DNA. Abb. aus ⁷⁵

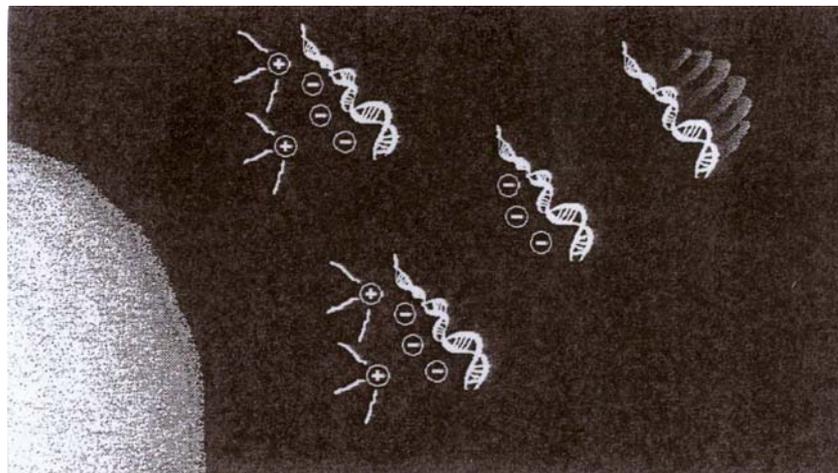


Abb. 13: TEAA bindet die DNA an die Chromatographiesäule
Abb. aus ⁷⁵

Die mobile Phase besteht aus einem Gemisch aus zwei Puffern mit unterschiedlichem Gehalt an Acetonitril (Methylcyanid, CH₃-CN). Puffer A enthält 0,05% Acetonitril, Puffer B 25% Acetonitril. Der Anteil von Puffer B steigt während des Laufes kontinuierlich bis auf 100% an. Durch Acetonitril wird die hydrophobe Wechselwirkung zwischen der

stationären Phase und dem TEAA verringert und die DNA somit von der Säule eluiert. Die DNA wird anschließend mit einem UV-Detektor bei 260nm registriert. Auch die Temperatur hat Einfluss auf die Bindung der DNA. Bei höherer Temperatur wird die DNA zunehmend einzelsträngig, wodurch ihre Bindung an TEAA und damit an die Säule verringert wird. Die DNA wird folglich bei geringerem Acetonitrilgehalt und damit zeitlich eher eluiert. Das DNA-Signal verschiebt sich nach links. Heteroduplices sind im Bereich des Basenaustausches, wo sie sich nicht paaren können, bereits einzelsträngig und denaturieren von dieser Stelle ausgehend bei gleicher Temperatur etwas stärker als Homoduplices. Folglich werden sie bei gleicher Temperatur auch eher von der Säule gelöst, wobei Duplices mit AC-Fehlpaarung etwas eher eluiert werden als jene mit GT-Fehlpaarung.⁷⁶ Etwas später werden die Homoduplices eluiert, wobei die mit AT-Basenpaar etwas eher gelöst werden als jene mit GC-Basenpaar. Die Abbildungen 14 u.15 stellen dieses Prinzip idealtypisch und real dar:

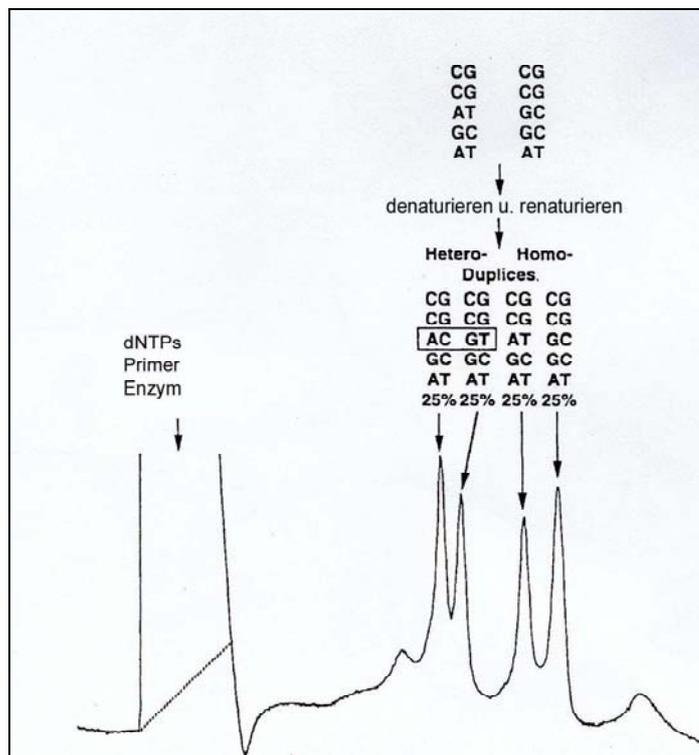


Abb. 14: Auftrennung von Hetero- und Homoduplices durch DHPLC. DNA-Signale über der Zeit. Abb. nach ⁷⁶

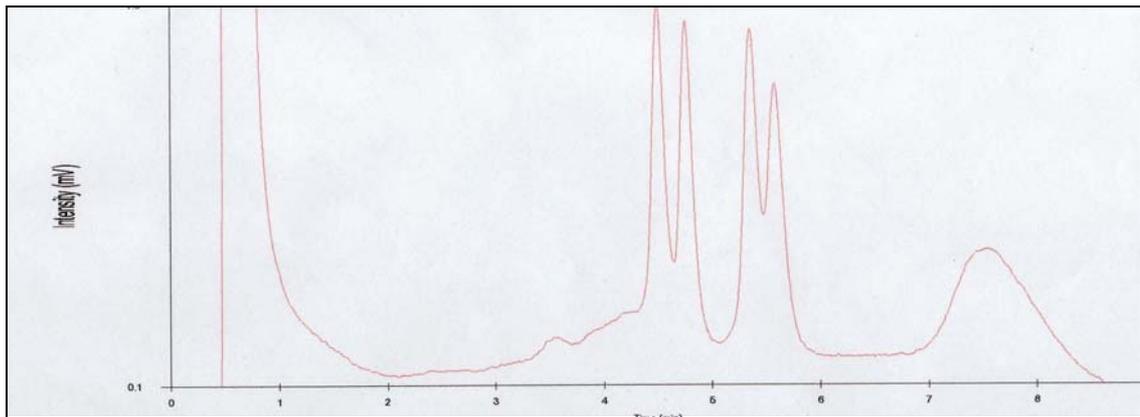


Abb. 15: Für die Kalibrierung des WAVE™-Systems verwendeter DNA-Standard. DNA-Signale über der Zeit.

Die Auftrennung erfolgt am besten bei der Temperatur, bei der die DNA gerade zu denaturieren beginnt. Da jedoch auch innerhalb der Sequenz eines PCR-Produktes das Schmelzverhalten unterschiedlich sein kann, ist es meistens erforderlich, die Analyse bei mehreren Temperaturen durchzuführen. Die Schmelzeigenschaften können anhand der DNA-Sequenz berechnet werden. Abb. 16 zeigt das Schmelzprofil für einen Abschnitt:

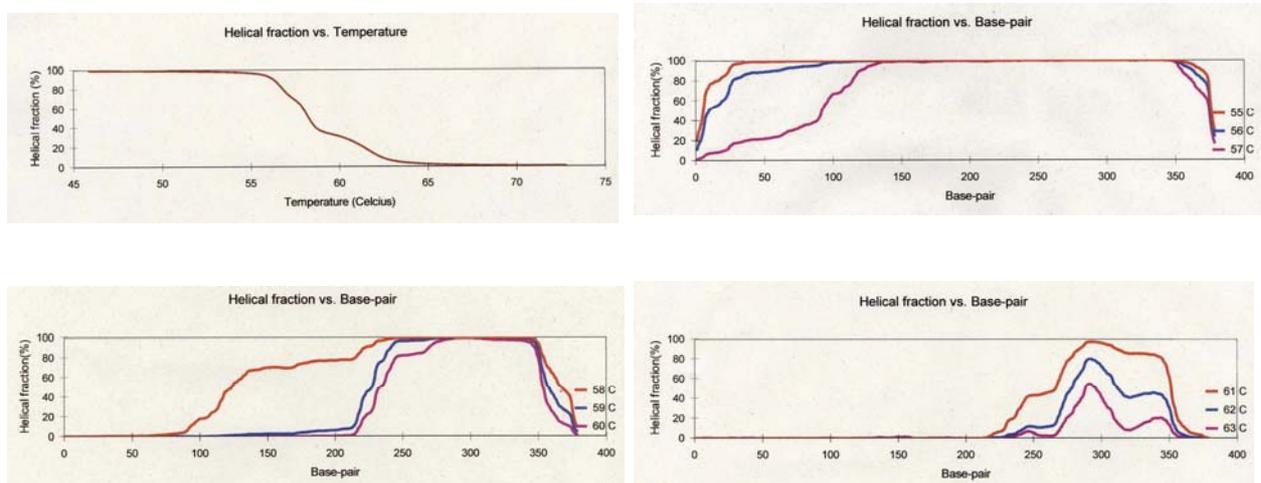


Abb. 16: Schmelzverhalten der DNA bei verschiedenen Temperaturen

Tatsächlich ist eine Unterscheidung von vier verschiedenen Fraktionen im Allgemeinen nicht möglich. Bei den meisten heterozygoten Proben sind nicht vier, sondern zwei aufeinander folgende Signale erkennbar. Dies geschieht gelegentlich bei mehreren Temperaturen, was die sichere Interpretation der Ergebnisse erleichtert. Die

Abbildungen 17 und 18 zeigen die Ergebnisse bei einer Wildtypprobe und einer heterozygot veränderten Probe über 11 verschiedene Temperaturen:

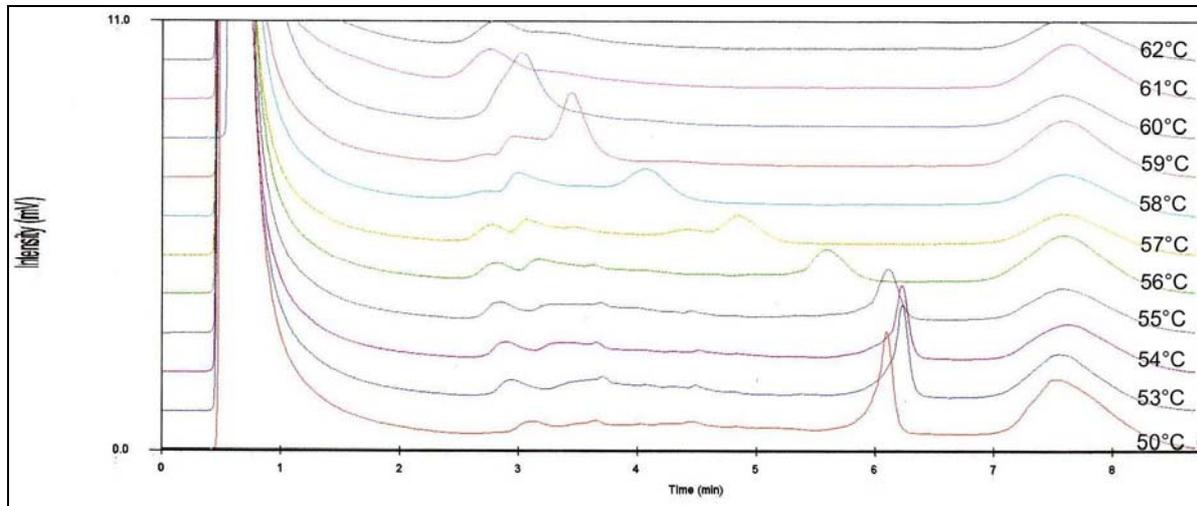


Abb. 17: DHPLC-Analyse: Wildtyp über 11 Temperaturen am Beispiel von Abschnitt 5 der *DNA-Ligase IV*. Bei jeder Temperatur erscheint ein DNA-Signal, das sich bei steigender Temperatur nach vorne verlagert.

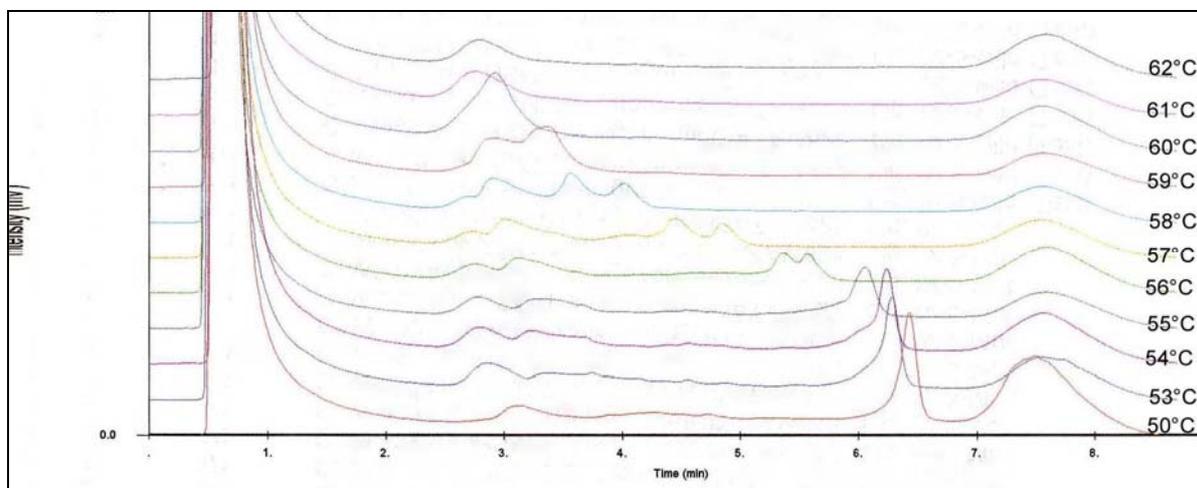


Abb. 18: DHPLC-Analyse: Mutation über 11 Temperaturen am Beispiel von Abschnitt 5 der *DNA-Ligase IV*. Bei 56, 57, 58 und 59°C sind jeweils zwei DNA-Signale erkennbar. Bei den Temperaturen, bei denen die DNA vollständig doppelsträngig oder vollständig einzelsträngig ist, erscheint ebenfalls nur ein Signal.

DNA-Proben, die für eine Veränderung homozygot sind, sind durch DHPLC nicht erkennbar. Um solche Veränderungen zu erkennen, müssen die Proben vorher im Verhältnis 1:1 mit Wildtyp-DNA gemischt und denaturiert werden. Bei der

anschließenden Renaturierung verhalten sie sich wie heterozygote Proben. Kommen sowohl heterozygote als auch homozygote Veränderungen in Betracht, müssen folglich zwei Läufe durchgeführt werden. Nach jeder Probe wird das Gerät mit 8%igem Acetonitrilpuffer durchgespült. In regelmäßigen Abständen erfolgt eine Spülung mit 75%igem Acetonitrilpuffer, um DNA-Reste von der Säule zu entfernen.

3.5 Sequenzierung

3.5.1 Grundlagen

Die genauesten Informationen über die Basenfolge der DNA liefert die Sequenzierung. Hier hat sich die Methode nach Sanger allgemein durchgesetzt. Grundlage bildet auch hier eine modifizierte Form der PCR, bei der das gereinigte Produkt einer normalen PCR als Ausgangs-DNA verwendet wird. Es wird jedoch nur ein Primer verwendet (vorwärts oder rückwärts). Außerdem werden neben den normalen dNTPs in geringer Konzentration auch Didesoxynukleotide (ddNTPs) verwendet, die sich von den dNTPs durch das Fehlen der Hydroxylgruppe auch in Position C₃ der Ribose unterscheiden. Dadurch können ddNTPs zwar mit ihrem 5'-Phosphatrest in einen wachsenden DNA-Strang eingebaut werden, führen aber zum Kettenabbruch, da ihnen die 3'-OH-Gruppe als Bindeglied zum nächsten Nukleotid fehlt. Da der Einbau eines ddNTPs anstelle eines dNTPs nach den Prinzipien der Statistik erfolgt, entstehen DNA-Fragmente, deren Länge sich um jeweils ein Nukleotid unterscheidet. Dieses Gemisch lässt sich, nachdem es erneut aufgereinigt wurde, in einer mit einem Polymer gefüllten Kapillare elektrophoretisch auftrennen. Da die vier ddNTPs, die das jeweils letzte Glied einer Sequenz bilden, unterschiedlich fluoreszenzmarkiert sind, lässt sich anhand von Position und Fluoreszenzsignal der einzelnen Fragmente die Basenfolge bestimmen.

3.5.2 Durchführung

Das PCR-Produkt wurde zunächst gereinigt. Dies erfolgte entweder mit dem DyeEx2,0 Spin Kit gemäß Herstellerangaben oder enzymatisch nach folgendem Protokoll:

5 µl PCR-Produkt
0,5 µl Exo I Puffer (10X)
5 µl SAP (1U/ µl)
0,45 µl dephosphorylation buffer
0,05 µl Exo I Enzym
3,5 µl H₂O

Inkubieren für 30 Minuten bei 37°C und für 15 Minuten bei 80°C.

Die anschließende Sequenzier-PCR erfolgte nach folgendem Protokoll:

Big Dye Mix:	1,0 µl	dH ₂ O:	1,0µl
Primer:	0,5 µl	PCR-Produkt:	1,5 µl
Big Dye Puffer (2,5x):	1,0 µl		

Programm:

25 Zyklen:

96°C: 5 s

50°C: 15 s

60°C: 4 Minuten

Die Aufreinigung der Produkte der Sequenzier-PCR erfolgte entweder mit DyeEx Spin Kit gemäß den Angaben des Herstellers oder mit Hilfe eines Präzipitationsmixes:

100 µl Präzipitationsmix auf das PCR-Produkt geben.

30 Minuten zentrifugieren bei 3000 rpm (Labofuge 400R)

Überstand abkippen

In saugfähiges Papier eingerollt umgekehrt kurz zentrifugieren bis ca. 400 rpm

200 µl 70%iges Ethanol dazugeben

8 Minuten zentrifugieren bei 3000 rpm

Überstand abkippen

Erneut kurz bis ca. 400 rpm zentrifugieren wie oben

10 Minuten trocknen in einer offenen PCR-Maschine bei 65°C
Zugabe von 20 µl HPLC-H₂O

Danach erfolgte die Auftrennung und Auswertung im DNA-Sequenzierer.

3.6 Single-Strand-Conformation Polymorphism (SSCP)

SSCP-Analyse ist ein Verfahren, DNA-Fragmente unterschiedlicher Basenfolge aufgrund ihres verschiedenen Laufverhaltens in Gelen zu unterscheiden. Unter renaturierenden Bedingungen bildet einzelsträngige DNA Sekundärstrukturen, die sich aus der Basenfolge ergeben. Ein PCR-Produkt, das durch Erhitzen denaturiert wurde, wird auf ein nichtdenaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen. Wird nun ein elektrisches Feld angelegt, so wird die Laufgeschwindigkeit der Fragmente vor allem durch die Sekundärstruktur und die Größe der DNA bestimmt. Bereits der Austausch einer einzigen Base kann durch Veränderung der Sekundärstruktur zu einem veränderten Laufverhalten führen. Die DNA-Fragmente können über Fluoreszenzfarbstoffe wie SYBR Gold sichtbar gemacht werden. Da das Laufverhalten auch von der Konzentration des Gels und der Temperatur abhängt, ist es erforderlich, bei der Suche nach noch unbekanntem Veränderungen verschiedene Konzentrationen, Temperaturen und Laufzeiten auszuprobieren. Zum Vergleich läuft je eine Probe mit Wildtyp-DNA und, wenn vorhanden, veränderter DNA als Standard mit.

Das Gel (10%) wurde wie folgt angesetzt:

Acrylamid (30%):	8 ml
TBE-Puffer (10x):	2,5 ml
APS:	500 µl
Temed:	7 µl
H ₂ O	14 ml

Die Auswertung erfolgt in einem Fluoreszenzdetektor.

3.7 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)

Viele Bakterien verfügen über sog. Restriktionsenzyme. Dies sind Endonukleasen, die beide Stränge eines DNA-Moleküls hydrolytisch spalten. Die zahlreichen verschiedenen bekannten Restriktionsenzyme unterscheiden sich dabei in ihrer oft palindromischen 4-8 Basen langen Erkennungssequenz sowie ihrer Schnittstelle, die sowohl inner- als auch außerhalb der spezifischen Erkennungsregion liegen kann. Durch Mutationen oder Polymorphismen können solche Sequenzen zerstört werden oder neu entstehen. Wird ein PCR-Produkt mit einem solchen Enzym inkubiert, so entstehen bei Vorhandensein einer entsprechenden Erkennungssequenz zwei (homozygot) bzw. drei (heterozygot) DNA-Fragmente. Diese lassen sich elektrophoretisch auftrennen und mit Ethidiumbromid sichtbar machen (s. o.).

Die RFLP-Analyse eignet sich daher gut zum einfachen Nachweis bereits bekannter Mutationen und Polymorphismen.

3.8 Statistik

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurden folgende Tests verwendet:

1. Mit dem Vierfeldertest (χ^2 -Test) lassen sich bei zwei unabhängigen Stichproben mit dichotomen Variablen Aussagen über den Zusammenhang zwischen der Zugehörigkeit zu einer Stichprobe und dem Vorhandensein eines Merkmals treffen. Die erwartete Häufigkeit sollte bei mindestens 5 liegen. Zumindest aber sollte der Anteil mit geringerer Häufigkeit bei unter 20% liegen.
2. Fischers exakter Test: Er wird anstelle des χ^2 -Tests durchgeführt, wenn die Häufigkeiten zu gering sind.
3. Wilcoxon-Rang-Test: Mit diesem Test lassen sich verbundene Stichproben mit quantitativen Merkmalen beschreiben, ohne dass die Stichproben normalverteilt sind.