
2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Autoklaven	Varioklav Typ 500, H+P Labortechnik München
Elektrophoresekammern	Multigel Long, Biometra, Göttingen S2, Gibco BRL, Eggenstein
Fotoausrüstung	Cu5 Land Camera, Polaroid, Frankfurt Leica R4, Leitz, Wetzlar
Geltrockner	Drygel Sr., Slab Gel Dryer, Modell Se 1 1660, Hofer, San Francisco
Laborwaage	Sartorius L 610, Göttingen
Magnetrührer	IKA RH 464995, Staufen i. Br.
PCR-Thermocycler	Perkin Elmer, Weiterstadt
Photometer	Spektrophotometer, Typ 150-20, Hitachi Ltd., Tokio
Spannungsgeber	Macrodrive 5, LKB, Freiburg Power-All 3000V/200mA, Serva, Heidelberg
UV-Lampe	Typ Chroma 4 und Typ UVK 12, Vetter GmbH, Wiesloch
Vortex-Mixer	Heidolph Reax 2000, München
Wasserbad	2219 Multitemp II, LKB Bromma GFL 1003, Burgwedel
Zentrifugen	Tischzentrifuge Typ 5414S. Eppendorf, Hamburg Biofuge A Minifuge GI, Heraeus, Osterode

2.2 Chemikalien

Es wurden nach Möglichkeit Chemikalien mit dem Reinheitsgrad p. a. verwendet.

Borsäure, Bromphenolblau, Chloroform, Ethanol, Glycerin, Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid, Na₂-EDTA, Natriumchlorid,
Natriumperchlorat, Succhrose, Tris-HCl pH 8,0 , Triton X

Isopropanol

Riedel de Haen, Seelze

Ethidiumbromid, SDS, TRIS

Serva, Heidelberg

Agarose

Eurobio, Les Ulis, Frankreich

DMSO

Sigma, München

2.3 Enzyme und Längenstandards

- 100 bp DNA Leiter

GIBCO BRL, Eggenstein

- dNTP Set

InViTek, Berlin

- Taq DNA Polymerase

- BstN I

New England BioLabs,

- Hpa II

Schwaibach/Ts

- Eag I

- Xmn I

- Hha I

- Proteinase K

Sigma-Chemie, Deisenhofen

2.4 Puffer

10x TBE-Puffer	890 mM TRIS
	890 mM Borsäure
	25 mM Na ₂ -EDTA
10x TE-Puffer, pH 7,5	100 mM TRIS
	10 mM Na ₂ -EDTA

2.5 Sonstiges

Filmmaterial 6677 Professional, Polaroid, Frankfurt

2.6 Synthetische Oligonukleotide

Alle Primer für die Assoziationsuntersuchungen wurden von der Firma TibMolBiol in Berlin synthetisiert. Ihre Sequenzen und Literaturangaben können der folgenden Tabelle entnommen werden.

Gen	Oligonukleotid -Sequenz	Literatur
GABA _B R1 Exon 1a1	F: 5'-GGG TGC GGG CCG CGC CG-3' R: 5'-AGA AAT GAG GAG ATG CAG GG-3'	Peters et al. (1998)
GABA _B R1 Exon 7	F: 5'-AAC AGT AAC ACA AAC CCA TCC-3' R: 5'-GCA TGT TTG TAG AAG GTG CC-3'	Peters et al. (1998)
GABA _B R1 Exon 11	F: 5'-ATT CTC TCT CCC TCT CAC C-3' R: 5'-GAG GAA GGG CAG AGA ATC AT-3'	Peters et al. (1998)
DRD ₂ Promoter	F: 5'-CAA CCC TTG GCT TCT GAG TCC-3' R: 5'-GAG CTG TAC CTC CTC GGC GAT C-3'	Arinami et al. (1997)
DRD ₂ Exon 8	F: 5'-GCC GTG CCT CCC CGG CTC TG-3' R: 5'-GGC AGT GAG GAG CAT GGA GCC AAG-3'	Finckh et al. (1996)

Tabelle 3: synthetische Oligonukleotide

2.7 Studienteilnehmer

Das Studienprotokoll wurde durch die Ethikkommission des Universitätsklinikums Rudolf Virchow der Freien Universität Berlin genehmigt. Alle Patienten, die an der Studie teilnahmen, gaben vor Beginn der Untersuchungen nach ausführlicher Aufklärung über Durchführung und Ziel der Studie ihre schriftliche Einwilligung. Die Rekrutierung der alkoholabhängigen Patienten für die Assoziationsuntersuchungen fand im Rahmen des Forschungsprojektes „Gemeinsame neurobiologische Mechanismen der Abhängigkeit“, eine von der deutschen Forschungsgemeinschaft geförderte klinische Forschergruppe (Leiter: Prof. Dr. med. H. Rommelspacher) statt.

2.7.1 alkoholabhängige Studienteilnehmer

Insgesamt wurden 350 Alkoholabhängige, die alle deutscher Herkunft waren, an drei verschiedenen Orten rekrutiert

- 1) Probanden der Ambulanz für Abhängigkeitskranke, Psychiatrische Klinik der Freien Universität Berlin (n = 175)
- 2) stationäre Patienten der Abteilung für Alkoholabhängigkeit der Wilhelm-Griesinger-Klinik Berlin (n = 124)
- 3) Probanden einer Studie zur Alkoholabhängigkeit und Wohnungslosigkeit in der City-Station der Stadtmission Berlin (n = 51)

Der Mittelwert des Alters der alkoholabhängigen Probanden (\pm SD) lag bei 42,7 (\pm 9,2) Jahren.

In dem Patientenkollektiv sind 270 frühere Studienteilnehmer, bei denen die Assoziation zwischen Alkoholismus und dem DRD2 TaqI-A-Polymorphismus untersucht wurde, enthalten aus einer Studie von Sander et al. (1995).

2.7.2 Kriterien für die Gruppe der Alkoholabhängigen

Das Alkoholabhängigkeitssyndrom wurde entsprechend der „International Classification of Diseases“, zehnte Ausgabe (ICD-10, World Health Organization) definiert (Tab.4). Personen, die drei der dort genannten acht Kriterien während des letzten Jahres erfüllten, wurden als alkoholabhängig diagnostiziert. Die für die Assoziationsanalysen ausgewählten alkoholabhängigen Probanden erfüllten mindestens sechs oder mehr Kriterien. Individuen, die primär an einer anderen psychiatrischen Haupterkrankung litten oder eine andere Substanzabhängigkeit als Alkohol hatten (außer Nikotin), wurden ausgeschlossen. Die Suchtanamnese und die Familiengeschichte wurden anhand eines strukturierten Interviews, basierend auf dem „Composite International Diagnostic Interview“ [Robins et al. (1988)] und einem soziodemographischen Fragebogen erhoben.

1	Ein starker Wunsch oder eine Art Zwang, Alkohol zu konsumieren.
2	Verminderte Kontrollfähigkeit bezüglich des Beginns, der Beendigung und der Menge des Alkoholkonsums.
3	Alkoholgebrauch mit dem Ziel, Entzugssymptome zu mildern, und der entsprechenden positiven Erfahrung.
4	Ein körperliches Entzugssyndrom.
5	Nachweis einer Toleranz. Um die ursprünglich durch niedrigere Dosen erreichten Wirkungen des Alkohols hervorzurufen, sind zunehmend höhere Dosen erforderlich.
6	Ein eingeeengtes Verhaltensmuster im Umgang mit Alkohol, wie z. B. die Tendenz, Alkohol an Werktagen wie an Wochenenden zu trinken und die Regeln eines gesellschaftlich üblichen Trinkverhaltens außer acht zu lassen.
7	Fortschreitende Vernachlässigung anderer Vergnügen oder Interessen zugunsten des Alkoholkonsums.
8	Anhaltender Alkoholkonsum trotz Nachweises eindeutiger schädlicher Folgen.

	Die schädlichen Folgen können körperlicher Art sein, wie z. B. Leberschädigung durch exzessives Trinken, oder sozial, wie Arbeitsplatzverlust durch alkoholbedingte Leistungseinbuße, oder psychisch, wie bei depressiven Zuständen nach massivem Alkoholkonsum.
--	--

Tabelle 4: Kriterien für die Alkoholabhängigkeit der WHO

Die Gruppe der Alkoholabhängigen wurde in 3 Subgruppen unterteilt:

- a) Alkoholabhängigkeit von einem oder beiden Elternteilen
- b) schwere Alkoholabhängigkeit bei Entzugssymptomatik mit Krämpfen oder Delirium
- c) Komorbidität einer dissozialen Persönlichkeitsstörung.

Die Klassifikation einer dissozialen Persönlichkeitsstörung basierte ebenfalls auf den diagnostischen Kriterien der ICD-10 (WHO).

2.7.3 Kontrollkollektiv

Das Kontrollkollektiv bestand aus insgesamt 234 gesunden Deutschen (131 männlichen und 103 weiblichen Personen) mit einem mittleren Alter von 40,3 (\pm 9,3) Jahren, die in einem Fragebogen angaben, dass sie noch nie an einer Sucht- oder psychiatrischen Krankheit erkrankt waren.

Zwischen Kontrollkollektiv und Patientenkollektiv bestanden keine signifikanten Unterschiede bezüglich Alter und Geschlecht.

2.8 DNA-Analyse

2.8.1 2.2.4.1 Isolierung und Aufbereitung menschlicher genomischer DNA

Jedem an der Studie teilnehmenden Probanden wurden 20 ml venöses Blut entnommen. Davon dienten 10ml Vollblut, versetzt mit dem Antikoagulans EDTA, der direkten Isolierung hochmolekularer, genomischer DNA. Die Extraktion der hochmolekularen DNA erfolgte nach standardisiertem Verfahren durch die NaCl-Aussalzmethode [Miller et al. (1988)].

Zehn ml EDTA-Blut wurden in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und mit 30 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer vermischt. Die Lösung wurde 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert und während dessen mehrere Male umgeschüttelt bzw. invertiert. Anschließend wurde die Lösung 10 min. mit 1500xg zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde das Röhrchen umgedreht und kopfüber auf einem Papierhandtuch austropfen gelassen, erneut 10 ml eiskalter Erythrozyten-Lyse-Puffer zugegeben, das Pellet gut suspendiert und die Lösung nochmals wie oben beschrieben zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder dekantiert und das umgedrehte Röhrchen auf einem Papierhandtuch austropfen gelassen. Das Pellet mit den kernhaltigen Zellen wurde in 160µl 5 x Proteinase K-Puffer resuspendiert und der daraus entstehende Ansatz in ein Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Zu diesem Ansatz wurden zugegeben: 40 µl Proteinase K-Lösung, 40 µl 20% SDS und 300 µl H₂O bidest. Der Ansatz wurde bei 37°C über Nacht inkubiert. Durch Hinzufügen von 200 µl 5 M NaCl-Lösung wurden die Proteine ausgefällt. Nach der Zugabe von NaCl wurde die Lösung 15 - 20 sec. auf dem „Vortex“ geschüttelt und anschließend bei Raumtemperatur für 15 min. mit 2500xg zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen überführt und die DNA mit zwei Volumina 100% Ethanol ausgefällt. Der ausgefallene DNA-Faden wurde mit einem sterilen Glashäkchen herausgefischt, einmal in 70 % Ethanol gewaschen und 10 - 20 min. in einem Mikrozentrifugenröhrchen bei Raumtemperatur getrocknet. Die DNA wurde schließlich in sterilem TE-Puffer über Nacht bei Raumtemperatur gelöst.

Reaktionszyklus mit hoher Ausbeute amplifiziert werden. Dazu werden einzelsträngige Oligonukleotide (*Primer*) benötigt, die komplementär zu den 3'-Enden einer definierten Sequenz der DNA-Matrize (*template*) sind. DNA-Polymerase verlängert unter den geeigneten Reaktionsbedingungen und in Gegenwart von Desoxynukleosidtriphosphaten (*dNTPs*) die an die Matrize angelagerten Primer am 3'-Ende entlang der einzelsträngigen denaturierten DNA-Matrize und synthetisiert so neue DNA-Stränge, deren Sequenz komplementär zur Matrize ist.

Die gesamte Reaktion basiert auf drei, zyklisch sich wiederholenden Teilschritten mit jeweils unterschiedlichen Temperaturen. Im ersten Schritt, der *Denaturierung* der DNA-Doppelstränge (ca. 90°C) wird die DNA in Einzelstränge aufgespalten. Beim *Annealing*, dem zweiten Schritt (primer-spezifisch zw. 50-74°C) hybridisieren die Oligonukleotidprimer mit den beiden DNA-Matrizensträngen und dienen damit im dritten Schritt, der *Polymerisation* (72°C), der DNA-Polymerase als Startmoleküle zur Kopierung der beiden Matrizenstränge. In jedem Zyklus verdoppelt sich die Menge des von den Startmolekülen eingerahmten Matrizenfragments und wird im folgenden Zyklus zum Ausgangsmaterial. Im nächsten Reaktionszyklus dienen auch die Produkte des vorangegangenen Zyklus als Matrizen für die DNA-Polymerase.

Die im ersten Reaktionszyklus synthetisierten DNA-Stränge haben noch keine definierte Länge, da die DNA-Polymerase so lange DNA synthetisiert, bis sie entweder von allein anhält oder vom Beginn des zweiten Zyklus unterbrochen wird. Im zweiten Reaktionszyklus dienen auch die Produkte des ersten Zyklus als Matrizen für die DNA-Polymerase. Die hierbei entstehenden DNA-Moleküle sind nunmehr in ihrer Länge durch die eingesetzten Primer definiert. Ab dem folgenden Zyklus vermehrt sich diese Zielsequenz exponentiell. Ihre Kopienzahl nach Abschluss der Reaktion lässt sich nach der Gleichung $c = (2^n - 2n)x$ berechnen. Dabei bedeutet: c = Anzahl der Kopien; n = Anzahl der Zyklen; $2n$ = Produkte des ersten und zweiten Zyklus, deren Länge nicht definiert ist; x = Anzahl der Kopien der ursprünglichen DNA-Matrize. Nach 20 Zyklen sollte die gewünschte DNA um den Faktor 2^{20} vermehrt sein. Allerdings sei hier einschränkend hinzugefügt, dass die Reaktionsausbeute im Schnitt bei ca. 85% liegt. Des Weiteren ist nach 20 – 25 Zyklen bei sinkender Effizienz nur noch eine lineare Zunahme der Amplifikate zu erwarten. Ursache dafür ist die im Reaktionsverlauf relativ zum Amplifikat

zunehmend geringer werdende Primerkonzentration mit der Folge der Renaturierung der DNA-Matrizen. Um einen vorzeitigen Start der PCR zu vermeiden, wurden alle Reaktionsansätze auf Eis pipettiert.

2.8.4 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP)

Restriktions-Endonukleasen des Typs III spalten DNA an ganz spezifischen, meist palindromischen Sequenzen. Wird durch Mutation eine Base in einer solchen Sequenz verändert, spaltet das betreffende Restriktionsenzym an dieser Stelle nicht mehr. Umgekehrt können durch Mutation neue Restriktionsstellen entstehen. Werden DNA-Abschnitten aus zwei genetisch nicht identischen Individuen mit Restriktions-Endonukleasen behandelt, ergeben sich häufig Restriktionsfragmente unterschiedlicher Länge, welche elektrophoretisch dargestellt werden können. Diese Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLPs) sind somit Indikatoren sequentieller Aberrationen in den Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme.

2.8.5 Gel-Elektrophorese von Nukleinsäuren

Grundprinzip aller elektrophoretischen Trennmethoden ist die Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld zu einer Elektrode umgekehrter Polarität. Elektrophoresen werden zumeist in einer elektrisch neutralen, halbfesten Gelmatrix aus Agarose oder Polyacrylamid (PAGE = Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese) durchgeführt.

Nukleinsäuren besitzen aufgrund der Phosphatgruppen im Molekül eine negative Nettoladung. In vorgefertigte Taschen eines Gels eingebracht, wandern Nukleinsäuren nach Anlage einer elektrischen Spannung zur Anode. Diese Wanderung erfolgt umso schneller, je kleiner die Nukleinsäure-Moleküle sind. Die dabei zurückgelegte Strecke ist umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichtes der entsprechenden Nukleinsäure [Helling et al. (1974)]

Agarose- und Polyacrylamid-Gele wirken wie molekulare Siebe. Die Größe der Poren begrenzt dabei die Geschwindigkeit der Wanderung des Nukleinsäure-Moleküls im Gel.

Während bei Agarosegelen die Agarosekonzentration die Porengröße bestimmt, kommt es bei den Polyacrylamid-Gelen auf das Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid und dem Grad der Vernetzung an.

2.8.6 Horizontale Agarose-Gel-Elektrophorese

Die Agarose-Gel-Elektrophorese ist die Standardmethode zur Trennung, Reinigung und Identifizierung von Nukleinsäuren und erlaubt die Trennung von DNA-Fragmenten mit einer Größe von 70 Basenpaaren bis zu 60 Kilobasen.

Für die Elektrophorese wurden Flachbettgelkammern der Firma Gibco/BRL benutzt. Die Agarosekonzentration im Gel betrug 3%. Der Gellauf erfolgte jeweils in 1x TBE-Puffer. Die Nukleinsäuren wurden mit Ethidiumbromid angefärbt. Dieses planare Molekül interkaliert in die DNA und verstärkt damit sein Fluoreszenzverhalten unter UV-Anregung bei 320 nm, so dass die angefärbten Molekülbanden erkennbar werden. Die Ethidiumbromid-Konzentration betrug 1 µl pro 50 ml Gel.

2.8.7 Vertikale Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Polyacrylamid-Gele wurden erstmals 1959 von Raymond und Weintraub für eine Elektrophorese eingesetzt. Diese Gele entstehen durch Polymerisation der Acrylamid-Monomere zu langen Ketten und der kovalenten Bindung eines Crosslink-Reagenz. Der gewöhnlich benutzte Crosslinker ist N,N'-Methylenbisacrylamid (Bis). Ammoniumpersulfat (APS) wird meist zur Bildung der drei zur Polymerisation notwendigen Radikale benutzt. N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED), als „Beschleuniger“ zugesetzt, fördert die Bildung von sauerstofffreien Radikalen und katalysiert in einem Gemisch aus APS, Acrylamid und Bis die Polymerisation.

Die Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese ist aufgrund ihrer höheren Trennschärfe besonders zur Auflösung von sehr kleinen Unterschieden in der Größe der Nukleinsäuren geeignet (10 – 250 Basenpaare). Es wurden Gelgrößen von 11 cm x 12 cm verwendet. Die Gelläufe

dauerten jeweils zwei Stunden. Die Detektion der DNA-Fragmente wurde durch Silberfärbung vorgenommen.

2.8.8 Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen

Zur Silberfärbung von Nukleinsäuren sind zahlreiche methodische Varianten entwickelt worden. Das nachstehend beschriebene Verfahren basiert auf einem Protokoll von Allen et al. (1989). Hierbei handelt es sich um ein einfaches, kostengünstiges, sensitives und vor allem schnelles Verfahren zur Sichtbarmachung von DNA-Fragmenten.

Vorgehensweise:

1. Fixierung	1% HNO ₃ -Lösung	10 min.
2. Färbung	0,2% AgNO ₃ -Lösung	20 min.
3. Spülen	Aqua bidest.	zweimalig 10 sec.
4. Entwicklung	30% Na ₂ CO ₃ mit 0,037% Formaldehyd	ca. 5 min. (bis die Banden gut sichtbar sind)
5. Stoppen	10% Essigsäure	3 min.
6. Spülen	Aqua bidest.	2 min.

Bei der Färbung lagern sich positiv geladene Silberionen an die negativ geladenen Phosphatreste der DNA an. Nicht gebundene Silberionen werden nach der Färbung ausgespült. Bei der Entwicklung dissoziiert Natriumcarbonat in Wasser zu folgenden Ionen: Na⁺, HCO₃⁻, OH⁻ und CO₃²⁻. Das Formaldehyd wird nun in Anwesenheit von Wasser, OH⁻-Ionen und einem reduzierbaren Stoff (Ag⁺) zu Ameisensäure oxidiert. Die Ameisensäure reduziert die Silberionen, die nach Aufnahme der Elektronen als elementare Silberatome ausfallen. Die Zugabe von Essigsäure stoppt diese Redoxreaktion durch Neutralisation der nötigen OH⁻-Ionen. Die gefärbten Gele können zu Dokumentationszwecken fotografiert und / oder nach Aufziehen auf einen Whatman-Filter getrocknet werden. Das Trocknen erfolgt bei 80°C mit einem Vakuumtrockner.

2.9 Kandidatengenpolymorphismen

Wie bereits in Kapitel 1 erläutert, nimmt das dopaminerge mesokortikolimbische Belohnungssystem eine zentrale Rolle in der Genese von Abhängigkeitskrankheiten ein. Vor diesem neurobiologischen Hintergrund wurden für die vorliegende Assoziationsuntersuchung solche DNA-Polymorphismen ausgewählt, die direkt (D₂-Rezeptor) oder indirekt (GABA_B-Rezeptor) an der dopaminergen Transmission in diesem System beteiligt sind. Diese Auswahl erfolgte unter Berücksichtigung der funktionellen Relevanz der Polymorphismen.

Die untersuchten Kandidatengenpolymorphismen sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Gen	Polymorphismus	Basenaustausch (Aminosäureaustausch)	Chromosom
DRD₂ – Exon 8	Hpa II - RFLP	A / G (nicht translatiert, 3'-UTR)	11q22-q23
DRD₂ - Promoter	BstN I - RFLP	-141C Insertion/Deletion (nicht translatiert, 5'-UTR)	11q22-q23
GABA_B – Exon 1a1	Hha I - RFLP	C / T (Ala20 / Val20)	6p21.3
GABA_B – Exon 7	Eag I - RFLP	G / A (Gly489 / Ser489)	6p21.3
GABA_B – Exon 11	Xmn I - RFLP	T / C (Phen658 / Phen658)	6p21.3

Tabelle 5: Kandidatengenpolymorphismen

2.9.1 DNA-Amplifikation

100 ng genomische DNA wurden als Template für die PCR eingesetzt. Die PCR Reaktionen erfolgten in einem Volumen von 20 µl und enthielten je 0,25 µM der Primer [Finckh et. al., 1996], 50mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200µM dNTPs, 1µl DMSO (unterbindet die Ausbildung von Sekundärstrukturen der Template-DNA) und 0,8 Units Taq-Polymerase sowie ein Zehntel des Gesamtvolumens im Ansatz 10x Polymerase-Puffer .

Nach initialer Denaturierung bei 95°C für 45 sec folgten 14 Zyklen mit je 15 sec Denaturierung bei 95°C, 30 sec Hybridisierung der Primer bei 80°C (in jedem nachfolgenden Zyklus je 1°C weniger) und 30 sec Synthese bei 72°C. Im Anschluss folgten 26 Zyklen mit je 20 sec Denaturierung bei 95°C, Annealing bei 65°C für 20 sec und Synthese bei 72°C für 20 sec gefolgt von der finalen Elongation bei 72°C für 10 min.

2.9.2 DNA-Verdau DRD₂ - Exon8-A/G-Polymorphismus

7 µl des PCR-Produkts wurden anschließend in einem Endvolumen von 17 µl mit 4 Units HPall-Enzym 90 Minuten bei 37°C im Wasserbad verdaut. Der bialleleische Polymorphismus resultiert aus einem Einzelbasenaustausch von A→G, 52 bp downstream des DRD2-Stop-Codons im Exon 8. Durch diese Basensubstitution ergibt sich, neben zwei konstanten, eine zusätzliche Schnittstelle beim G-Allel für die Restriktionsendonuklease HPall. Nach dem Verdau des 405 bp langen PCR-Produkts mit HPall entstehen beim A-Allel drei Fragmente (348, 45 und 12 bp), beim G-Allel vier Fragmente (283, 65, 45 und 12 bp). Die PCR-Produkte wurden mit einem 3%igen Agarosegel aufgetrennt und durch Ethidiumbromid gefärbt.

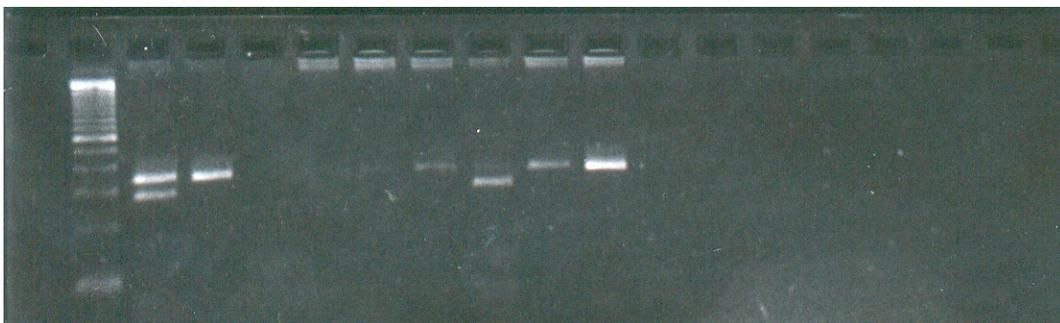


Abbildung 2: Gel-Elektrophorese für A/G-Polymorphismus

2.9.3 DNA-Verdau DRD₂ -141C Ins-/Del-Polymorphismus

Die Länge des ursprünglichen PCR-Produkts für den -141C-Polymorphismus betrug 207 bp. Nach Restriktionsverdau mit dem Enzym BstNI entstehen bei Vorliegen des -141C-Ins-Allels zwei Fragmente von 177 und 30 bp Länge. Das -141C-Del-Allel wird von der Restriktionsendonuklease BstNI nicht geschnitten.

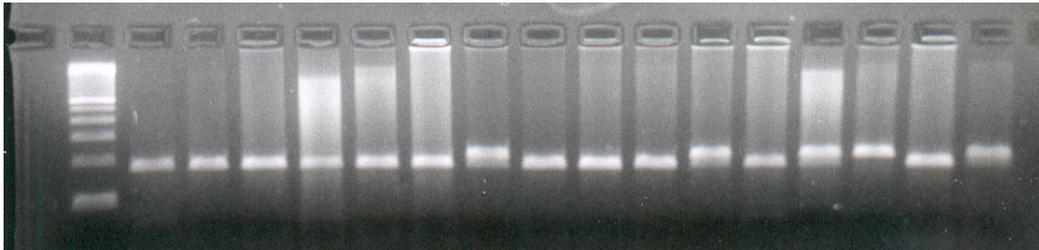


Abbildung 3: Gel-Elektrophorese für -141C-Polymorphismus

2.9.4 DNA-Verdau: GABA_B-Exon 1a1 - Ala20Val Substitutionspolymorphismus

Nach dem Verdau des 212 bp langen PCR-Produkts mit HhaI entstehen beim Ala20-Allel zwei Fragmente (97bp + 11 bp), beim Val20-Allel ein Fragmente (108 bp), sowie drei konstante Fragmente (67, 25 und 12 bp).

2.9.5 DNA-Verdau: GABA_B-Exon 7 - Gly489Ser Substitutionspolymorphismus

Für den GABA-B-Gly489Ser-Polymorphismus wurde das PCR-Produkt mit EagI verdaut. Aus dem 441 bp langen PCR-Produkt entstanden beim Gly489-Allel zwei Fragmente (258bp + 183 bp) während beim Ser489-Allel das PCR-Produkt nicht fragmentiert wurde.

2.9.6 DNA-Verdau: GABA_B-Exon 11 - T1974C Nucleotidaustausch

Beim Exon-11-Polymorphismus entstehen aus dem 279bp langen PCR-Produkt beim C1974-Allel zwei Fragmente (178bp+101bp) während beim T1974-Allel das Produkt nicht aufgetrennt wurde.

2.10 Statistische Analysen

Allelfrequenzen (Häufigkeiten von Allelen im untersuchten Kollektiv), Frequenzen von Allelträgern (Häufigkeiten von Individuen, die ein bestimmtes Allel tragen), χ^2 -Tests, Fishers Exakt Test, relative Risiken und Odds Ratios zusammen mit ihren 95%igen Konfidenzintervallen und der Test auf Hardy-Weinberg-Verteilung sind mit den Computerprogrammen SAS (SAS, 1988) und SPSS 11 (Statistical package for social sciences) berechnet worden.

2.10.1 Allel-Häufigkeiten und Hardy-Weinberg-Gleichgewicht:

Das Hardy-Weinberg Gleichgewicht entspricht der erwarteten Genotyp Verteilung, basierend auf der beobachteten Häufigkeit (p) für das Allel A und (q) für das Allel B.

Die Formel für die Berechnung lautet: $p^2+2pq+q^2=1$, mit

p^2 = erwartete Häufigkeit für den homozygoten Typ AA

q^2 = erwartete Häufigkeit für den homozygoten Typ BB

$2pq$ = erwartete Häufigkeit für den heterozygoten Genotyp AB

Würden die beobachteten Häufigkeiten im Kontrollkollektiv von den erwarteten Häufigkeiten abweichen, wäre dies ein Hinweis auf das Vorliegen eines Selektions-Bias. Abweichungen vom Hardy-Weinberg Gleichgewicht wurden mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests überprüft.

2.10.2 Kopplungs-Analysen

Als Kopplungsungleichgewicht wird ein Zustand bezeichnet, in welchem zwei Allele für zwei bestimmte Genloci des gleichen Chromosoms häufiger als dem Zufall entsprechend in einer Cis-Position assoziiert sind. Eine solche Assoziation kann entstehen, weil die Loci nahe beieinander auf dem Chromosom lokalisiert sind und nicht durch Rekombination getrennt werden, sowie durch einen Selektionsvorteil dieses Zustandes. Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten zweier Allele entspricht in diesem Fall $p_A * p_B + \Delta$, wobei Δ ein Maß für das sog. Linkage disequilibrium der beiden Allele A und B darstellt.

Die paarweisen Kopplungsanalysen wurden mit der Methode von Weir und Cockerham unter Verwendung des LD86-Computer-Programms berechnet [Suarez et al. (1994), Weir (1990)].

2.10.3 Haplotypen-Schätzung

Die Haplotypen der drei DRD2-Polymorphismen wurden mit dem PHASE-Programm berechnet, dem ein Bayesianischer Algorithmus zugrunde liegt [Stephens et al. (2001)].
