#### 5 Ergebnisse

## 5.1 Optimierung wesentlicher Schritte der universellen Multifluoreszenzunterstützten PCR-SSCP

Mit Hinsicht auf die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war zunächst die technischmethodische Entwicklung und Optimierung einzelner Verfahrensschritte der universellen Multifluoreszenzunterstützten PCR-SSCP erforderlich. Die entwickelten universellen Primer sollten als ein neues Instrument für eine schnelle, einfache und kostengünstige Amplifikation verwendet werden.

#### 5.1.1 Entwickeln von universellen Amplifikationsprimern

Für die Entwicklung und Etablierung von universellen Primern wurden zwei unterschiedliche Oligonukleotidbzw. Primer-Software-Programme eingesetzt. Durch permutative Veränderungen an verschiedenen Oligonukleotidsequenzen konnten mehrere Vorwärts- und Rückwärtsprimer gefunden werden. Die Sequenzen wurden als nächstes auf ihre Kompatibilität untereinander verglichen, um Primer-Dimer und Haarnadelstruktur-Bildung so klein wie möglich zu halten. Diese vorselektierten Primer wurden mit Datenbanken auf Vorhandensein von humanen Sequenzen getestet. Bei negativen Ergebnissen, d. h. bei hohen Anteilen an humanen DNA-Sequenzen innerhalb der Primer, wurden erneut durch permutative Vorgehensweise nach neuen universellen Primern gesucht. Ziel war es, zwei verschiedene Sequenzen zu finden, die eine gleiche Hybridisierungstemperatur besaßen und nicht auf der zu untersuchenden humanen genomischen DNA vorkamen (Abbildung 5). Es wurden zwei Sequenzen gefunden, die alle Eigenschaften erfüllten. Als universeller Vorwärtsprimer konnte die Sequenz 5'- GTG ACG TAC TAG CAA CG und als universeller Rückwärtsprimer die Sequenz 5'- TAG CAG GAT ACG ACT ATC etabliert werden. Diese Sequenzen wurden in regelmäßigen Abständen auf die Präsenz von humanen genomischen Sequenzen untersucht. Dies schien nicht unerheblich, da die Datenbanken mit humanen genomischen Sequenzen in Form von verschiedenen neuen Klonen oder auch als ESTs (Expressed Sequence Tags) abgeglichen werden.

S NCBI results of BLAST	S NCBI results of BLAST
BLASTN 2.2.6 [Apr-09-2003]	BLASTN 2.2.6 [Apr 09-2003]
<u>Reference</u> : Altachul, Stephen F., Thumas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Thang, Theng Thang, Webb Hiller, and David J. Lignan (1997), "Opped ELSA and FST-ELSA's new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Fes. 25:3309-3402.	Reference: Altechnij, Stephen F., Thoman L. Kndden, Alejandro A. Schhäffer, Jinghui Ihang, Ibeng Ihang, Webb Hiller, and David J. Lipman (1997), "Sapped DLAST and F3I-BLAST: a new genetation of protein database search programs", Nucleic Acide Res. 25:3388-3402.
RID: 1060283381-015763-24721	RID: 1060290811-029336-14695
Query= (17 letters)	Query= (18 letters)
Database: All GenBank+EKBL-DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, G33, or phase 0, 1 or 2 HTVG sequences) 1,873,470 sequences; 8,829,308,907 total letters	Dalabase: All GenEmakeKEEL+008J+PDE sequences (but no EST, STS, GSS, or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) 1,873,470 sequences; 8,829,308,907 total letters
If you have any problems or questions with the results of this search please refer to the $BLAST FAQu$	If you have any problems or questions with the results of this search please refer to the <u>BLAST FAQs</u>
Taxonomy reports	Taxonomy reports
Distribution of 1 Blast Hits on the Query Sequence	Distribution of 1 Blast Hits on the Query Sequence
Mouse over to show define and scores. Click to show alignments	Mouse-over to show define and scores. Click to show alignments
1,2740	1_1877
Sours E Sequences producing significant alignments: (Dits) Value <u>mil20000139[db:14F005004.11</u> Vibrio parabaemolyticus INA, ch <u>30</u> 7.0 Alignments	Sequences producing significant alignments: (bits) Value g1/20960341gb1AF047466.11 Notophthalmus viridescens hedgebo 20 7.0 Alignments
Getselected sequences Select all Deselect all	Get selected sequences Select all Deselect all
>gii28808138[db]1AF005084.1]     Ubrio paraheenolyticus DNA, chrumosome 2, complete sequence, 1/6       Length = 300600	> <u>gi120960341gb1AF097666.11</u> Notophthalmus viridescens bedgehog segment polarity homolog m6NA, complete eds Length = 1635
Soore = 30.2 bits (15, Expect = 7.0 Identities = 15/15 (1004) Strand = Plus / Himus	Score = 30.2 bits (15), Expect = 7.0 Identities = 15/15 (1004) Strand = Piug / Minus
Owery: 1 gtgacgtactapcas 15                Ebjet: 262100 gtgacgtactageas 262146	Query: 2 agraggatacgacta 16                 Sbjot: 1030 agraggatacgacta 1016
Getselected sequences Select all Deselect all	Get selected sequences Solect all Deselect all
Database: All GenBank+KHL+DDBJ+FDB sequences (but no EST, STS, GSS, or phose 0, 1 or 2 BTGS sequences) Posted date: awg 6, 2000 11:51 PH Number of Letters 11 database: -24,007,677 Number of sequences 11 database: 1,795,959	Database: All GenBank+ZEML+DDBJ+PDB mequences (but no EST, STS, GSS, or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) Posted date: Aug 5, 2003 11:53 PH Number of letters in database: -24,007,677 Number of sequences in database: 1,759,959
Leabda K II 1.37 0.711 1.31	Lanlida E H 1.37 0.711 1.31
Gapped Landda X H 1.37 0.711 1.31	Gapped Lambdn K H 1.37 0.711 1.31
Matrix: hlasts service: 5. Extension: 2 Gap Fenaltics: Existence: 5. Extension: 2 Number of firs to 10% 00% Dumber of extensions: 00% Dumber of extensions: 00% Dumber of extensions: 00% Dumber of extensions: 00% Dumber of EVF a sector than 10.0 without capping: 1 Number of EVF a sector than 10.0 without capping: 1 Number of EVF a sector than 10.0 without capping: 1 Number of EVF a sector than 10.0 without capping: 1 Number of EVF a sector than 10.0 without capping: 1 Hendth of capped (non-peclim): 1 length of database: 8,329,308,907 effective length of database: 8,739,308,907 effective length of database effective length of dat	<pre>Matrix: blastn matrix:1 -3 Gap Premaiters: Existence: 5, Extension: 2 Number of His to DB: 1487 Number of structures: 1077470 Number of succeastal extensions: 227 Number of succeastal extensions: 227 Number of succeastal extensions: 227 Number of Succeastal extensions: 10.0:0 Number of UEF's succeastally capyed in prelim test: 0 Number of UEF's succeastally capyed in prelim test: 0 Number of UEF's succeastally capyed in prelim test: 227 Number of UEF's succeastally capyed in prelim test: 227 Number of UEF's succeastally capyed in prelim test: 227 Number of UEF's succeastally capyed (non-prelim): 0 Encode UEF's test) Encode UEF's test) Encode UEF's test capyed (non-prelim): 0 Encode UEF's test) Encode UEF's test capyed (non-prelim): 0 Encode UEF's test) Encode UEF's test capyed (non-prelim): 0 Encode UEF's test capyed (non-prelim): 0 Encode UEF's test) Encode UEF's test capyed (non-prelim): 0 Encode UEF's test) Encode UEF's test capyed (non-prelim): 0 Encode UEF's test) Encode UEF's test capyed (non-prelim): 0 Encode UEF's test capyed (non-prelim): 0 Encode UEF's test) Encode UEF's test capyed (non-prelim): 0 Encode UEF's test) Encode UEF's test capyed (non-prelim): 0 Encode UEF's test capy</pre>

**Abbildung 5:** Darstellung einer BLAST-Datenbankabfrage der universellen Primer auf die Präsenz von humaner genomischer DNA mit den Einstellungen -All GenBank+RefSeq Nucleotides+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences). No longer "non-redundant"-. Links: Ergebnis für den Vorwärtsprimer 5'- GTG ACG TAC TAG CAA CG Rechts: Ergebnis für den Rückwärtsprimer 5'- TAG CAG GAT ACG ACT ATC.

#### 5.1.2 Entwickeln von spezifischen Amplifikationsprimern

Für die Untersuchung der universellen Multifluoreszenzunterstützten PCR-SSCP als Diagnostikverfahren bei der Familiären Hypercholesterinämie wurden spezifische Vorwärtsund Rückwärtsprimer für alle 18 Exons (einschließlich Promotor) des LDL-Rezeptor-Gens etabliert. Für die Untersuchung der Applikation als Nachweisverfahren zur Detektion von genetischen Variationen an den Long-QT-Syndrom-Genen wurden ebenfalls spezifische Vorwärts- und Rückwärtsprimer entwickelt. Dafür sind die Sequenzen der proteinkodierenden und nichttranslatierenden Regionen folgender Gene eingesetzt worden: KCNE1, KCNE2, HERG, SCN5A, KCNQ1. Es wurde versucht, alle spezifischen Primer zu generalisieren, um einen Hochdurchsatz zu realisieren. Die unter Punkt 5.1.1 aufgeführten universellen Primersequenzen sind an die jeweiligen 5'-Enden der spezifischen Primer gekoppelt und auch so eingesetzt worden.

#### 5.1.3 Fluoreszenzmarkierung von Amplifikaten

Die universellen nicht humanen Primer wurden auch für Fluoreszenzmarkierungen eingesetzt. Dafür wurden die universellen Vorwärts- und Rückwärtsprimer mit unterschiedlichen fluoreszierenden Farbstoffen gekoppelt, um die PCR-Produkte mittels Laser während des SSCP-Laufes detektieren und differenzieren zu können. Für die Markierung standen verschiedene Fluoreszenz-Moleküle zur Auswahl, von denen FAM, NED, HEX, VIC und PET zum Einsatz kamen. Andere Farbstoffe wie TET, TAMRA, ROX oder LIZ konnten in Kombinationen nicht benutzt werden, da der eingesetzte ABI 3100 Genetic Analyzer diese nicht unterstützte. Folgende Fluoreszenzmarkierungen wurden an die universellen Vorwärts– und Rückwärtsprimer gekoppelt (Tabelle 5):

 Tabelle 5: (i)-(v) Unterschiedlich Fluoreszenzfarbstoffmarkierte universelle Primer

	Fluoreszenzmarkierte Universelle Vorwärtsprimer		Fluoreszenzmarkierte Universelle Rückwärtsprimer
(i)	5'-FAM- GTG ACG TAC TAG CAA CG	(ii)	5'-NED- TAG CAG GAT ACG ACT ATC
(iii)	5'-VIC- GTG ACG TAC TAG CAA CG	(iv)	5'-PET- TAG CAG GAT ACG ACT ATC
		(v)	5'-HEX- TAG CAG GAT ACG ACT ATC

#### 5.1.4 Optimierung verschiedener SSCP Bedingungen

Für die Etablierung der SSCP als Hochdurchsatz-Applikation konnten verschiedene Bedingungen berücksichtigt werden. Es wurden unterschiedliche Temperaturen getestet, da in verschiedenen Veröffentlichungen gezeigt werden konnte, dass sie einen großen Einfluss auf die Wanderungsgeschwindigkeit ausübt (Moore *et al.* 2000; Hayashi *et al.* 2001). Neben der Temperatur hat die Zusammensetzung des Polymers einen wesentlichen Einfluss auf das Mobilitätsverhalten fluoreszenzmarkierter Amplifikate. Versuche mit unterschiedlichen Polymerkonzentrationen konnten ebenfalls berücksichtigt werden. Glycerinkonzentrationen wurden auf Empfehlung der Firma Applied Biosystems (Deutschland Support) nicht variiert.

#### 5.1.5 Einfluss von Temperatur und Polymer

Damit unterschiedlich große PCR-Fragmentelängen auf das Auflösungsverhalten im Polymer untersucht werden konnten, wurde ein fluoreszenzmarkierter Größenstandard eingesetzt. So konnte bestimmt werden, wann das Auflösungsverhalten ( $\Delta$ ) zwischen zwei Fragmenten am größten war (Abbildung 5.1).



Abbildung 5.1: Peakauflösung eines ROX-markierten Größenstandards (ROX-500), in einer 36 cm langen Kapillare, auf einem ABI 3100 Genetic Analyzer. Aufgetrennt wurde in einem 5 % igen nichtdenaturierendem GeneScan Polymer bei 35 °C. Die Nr. 1 bis 10 stellen unterschiedliche Fragmentgrößen dar, die nicht nach der Größe, sondern nach der Konformation getrennt wurden. Das Auflösungsverhalten ( $\Delta$ ) zwischen zwei Fragmenten (1 und 10) konnte durch die entsprechenden Scanpositionen eines Lasers bestimmt werden.

Um optimale SSCP-Bedingungen zu ermitteln, wurde mit einem ROX-markierten Größenstandard das Auflösungsverhalten ( $\Delta$ ) bei unterschiedlichen Temperaturen und Polymerbedingungen verglichen. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.2 dargestellt.



Abbildung 5.2: Darstellung des Auflösungsverhaltens ( $\Delta$ ) von zwei Fragmenten eines Fluoreszenzmarkiertern Größenstandards (ROX-500) in Abhängigkeit von der Temperatur (°C) bei drei unterschiedlichen Polymerbedingungen.

Das höchste Auflösungsverhalten ( $\Delta$ ) zwischen zwei Fragmenten zeigte eine GeneScan Polymerkonzentration von 5 % bei 35 °C. Bei einer Erniedrigung der GeneScan Polymerkonzentration auf 4 % bzw. 3 % nimmt ( $\Delta$ ) mit steigender Temperatur ab bzw. bleibt nahezu konstant. Zusätzlich wurde eine Kapillare mit 50 cm Länge eingesetzt. Das Ergebnis war für die längere Kapillare geringfügig schlechter bei längerer Laufzeit der Fragmente. Daher kamen für alle Untersuchungen die 36 cm Kapillaren zum Einsatz.

## 5.2 Etablierung der universellen Multifluoreszenzunterstützten PCR-SSCP als Diagnostikverfahren für die Familiäre Hypercholesterinämie

Zur Etablierung der universellen Multifluoreszenzunterstützten PCR-SSCP für die Diagnostik der Familiären Hypercholesterinämie wurde ein Ein-Schritt-PCR-System herangezogen. Zur Testung der Zuverlässigkeit des Verfahrens wurden bekannte Mutationen im LDL-Rezeptor-Gen eingesetzt. Für die Ein-Schritt-PCR sind spezifische Vorwärts- und Rückwärtsprimer, an den 5'-Enden verlängert durch universelle nicht humane Sequenzen, und fluoreszenzmarkierte universelle Vorwärts- und Rückwärtsprimer eingesetzt worden. Für eine schnelle Mutationsuntersuchung im LDL-Rezeptor-Gen schien diese Form der generalisierten Farbstoffmarkierung sinnvoll, weil es bei betroffenen Personen nur eine Mutation nachzuweisen galt.

#### 5.2.1 Etablierung einer Fluoreszenzmarkierten Ein-Schritt-PCR

Für eine erfolgreiche Amplifikation aller exonübergreifenden Primer des LDL-Rezeptors wurde eine asymmetrische PCR-Matrix durchgeführt, um die bestmögliche Ausbeute an fluoreszenzmarkierten PCR-Produkten zu erhalten. Gleichzeitig konnte ermittelt werden, ob eine PCR mir vier verschiedenen Primern für das Projekt realisierbar war. Für das PCR-Profil sind die spezifischen und die universellen Bereiche der Primer getrennt betrachtet worden, da es sich um eine serielle PCR handelte. Zunächst reichte eine kleine Menge an spezifischem PCR-Produkt, welches als Ausgangsmaterial für die nachfolgende universelle Amplifikation dienen sollte. Das Ergebnis der asymmetrischen Matrix ist in Abbildung 5.3 dargestellt. Da die PCR-Produkte mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert waren, konnten die Signale direkt auf dem Kapillar-SSCP-Analyzer, zwecks Auswertung detektiert werden. Wie aus Abbildung 5.3 ersichtlich, wird die maximale Fluoreszenz-Ausbeute bei einer spezifischen Primer-Paar-Konzentration von 33 nM und einer universellen Fluoreszenzmarkierten Primer-Paar-Konzentration von 166 nM erreicht. Eine unter denselben Bedingungen durchgeführte Amplifikation zwischen einer Wildtyp (WT) und einer DNA-Probe, die ein Mutationsträger (MT) ist, zeigt nicht nur eine gute Fluoreszenz-Ausbeute sondern auch eine hohe Diskriminierung (Abbildung 5.4).



Abbildung 5.3: Darstellung der absoluten Fluoreszenz-Ausbeute zwischen spezifischen unmarkierten und universellen farbstoffmarkierten Primern. Die PCR wurde als Kaskade unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 1 Zyklus bei 95 °C für 10 Minuten; 10 Zyklen bei 94 °C für 15 Sekunden. 58 °C für 15 Sekunden. 72 °C für 30 anschließend Sekunden: 30 Zyklen bei 94 °C für 15 °C, 58 °C für 15 Sekunden, 72 °C für 30 Sekunden; 1 Zyklus bei 72 °C für 10 Minuten. Das Produkt der Ein-Schritt-PCR ist in einem nichtdenaturierendem Polymer auf einem ABI 3100 Genetic Analyzer detektiert worden.

Eine hohe Fluoreszenz-Ausbeute und die Diskriminierungsfähigkeit zwischen einer Wildtypund einer Mutanten-Probe konnte für eine Ein-Schritt-PCR unter den oben aufgeführten Bedingungen etabliert werden.



Abbildung 5.4: Diskriminierung einer Wildtyp-DNA (WT) und DNA-Probe, einer die eine Mutation auf Exon 4 im LDL-Rezeptor trägt (MT). Die Amplifikation ist unter verschiedenen spezifischen und universellen Primer-Stoffmengen (nM) durchgeführt worden. Blau: FAM-markierter universeller Vorwärts Primer; Schwarz: NED-markierter universeller Rückwärtsprimer

Aufgrund der Ergebnisse der fluoreszenzmarkierten Ein-Schritt-PCR zeigte sich, dass die entwickelte Applikation eine geeignete Möglichkeit darstellt, um Mutationen im LDL-Rezeptor-Gen zu identifizieren. Zunächst wurde eine Ein-Schritt-PCR mit allen Primern vom LDL-Rezeptor durchgeführt. Diese wurden auf ein Agarosegel aufgetragen, um die Banden und die Fragmentgrößen auf Spezifität zu kontrollieren (Abbildung 5.5).



**Abbildung 5.5:** Ergebnis einer Ein-Schritt-PCR. Jeweils 3  $\mu$ l von der Amplifikation (von links nach rechts: Größenstandard = V; Promotor bis Exon 18) wurden auf ein 3 % iges Agarosegel aufgetragen.

Es zeigte sich, dass die Ein-Schritt-PCR sehr spezifisch war. Unspezifische Banden gab es nicht. Auch die Fragmentgrößen (siehe Tabelle 4.1) waren richtig. Einige Amplifikate wurden zwecks Bestätigung auch sequenziert, um eine höhere Sicherheit zu bekommen.

#### 5.2.2 Nachweis von genomischen Mutationen im LDL-Rezeptor-Gen

Der Mutationsnachweis im LDL-Rezeptor-Gen wurde mit 30 verschiedenen Mutationen untersucht, die in 15 Exons verteilt waren (Tabelle 5.1). Alle exonspezifischen fluoreszenzmarkierten Ein-Schritt-PCR-Reaktionen, einschließlich Promotor, wurden unter gleichen Konditionen durchgeführt, um eine hohe Generalisierung zu erreichen. Dies war für einen großen Durchsatz, einer mit 16 Kapillaren ausgestatteten SSCP-Einheit, sinnvoll. Das Verhältnis zwischen den verlängerten spezifischen und den fluoreszenzmarkierten Primerpaaren war 33 nM zu 166 nM. Für alle Amplifikationsreaktionen sind Negativ-Kontrollen eingesetzt worden. Bei allen Negativ-Kontrollen waren keine Banden erkennbar. Alle PCR-Amplifikationen hatten ein uniformes Profil, lediglich die spezifische

Hybridisierungstemperatur der Ein-Schritt-PCR war unterschiedlich. Die PCR wurde als Kaskade unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 1 Zyklus bei 95 °C für 10 Minuten; 10 Zyklen bei 94 °C für 15 Sekunden, spezifische Hybridisierungstemperatur (TM, Vergleich Tabelle 4.1) °C für 15 Sekunden, 72 °C für 30 Sekunden; anschließend 30 Zyklen bei 94 °C für 15 °C, 58 °C für 15 Sekunden, 72 °C für 30 Sekunden; 1 Zyklus bei 72 °C für 10 Minuten.

**Tabelle 5.1:** Zusammenfassung der eingesetzten Mutationskontrollen im LDL-Rezeptor-Gen zur Etablierung der universellen Multifluoreszenzunterstützten PCR-SSCP als Diagnostikverfahren für die Familiäre Hypercholesterinämie

LDL-Rezeptor Exon-Nr	Hybridisierungs-Temperatur (°C)	PCR-Produkt-Länge (bp)	GC-Gehalt <sup>1</sup> (%)	LDL-Rezeptor Mutationskontrollen
Prom.	60	252	52.8	-
1	60	250	61.6	-
2	60	218	53.2	W23X
3	60	262	55.0	C54X; C61Y; Q64X; W66G; 313+1G>A; 313+ 2T>C
4A	60	358	61.5	E119D; C146Y; C146X; E92X
4B	60	279	61.6	C163W; E207X
5	60	306	52.0	D245E; D245Y
6	60	358	52.2	<u>S285L;</u> E256K
7	60	315	61.0	Fs3003
8	64	336	62.8	C337S, 1123inGGC
9	60	372	61.0	V408M
10	64	321	58.6	D471G; Fs472
11	58	229	55.9	N543H
12	60	313	53.0	<u>S589C;</u> G571E
13	58	251	50.6	-
14	58	333	57.7	P678L; C660Y
15	60	404	56.5	T705I
16	58	208	60.1	-
17	60	277	54.9	del777-779
18	58	206	54.9	-

Für den Nachweis von genomischen Mutationen im LDL-Rezeptor-Gen wurde immer eine Wildtyp-DNA-Probe mit den zu untersuchenden Mutationskontrollen exonweise amplifiziert und vergleichend ausgewertet. Von den insgesamt 30 eingesetzten unterschiedlichen Mutationsträgern konnten durch vergleichende visuelle Auswertungen 28 nachgewiesen werden. War das Fluoreszenzmuster der beiden eingesetzten Farbstoffe nicht identisch, so handelte es sich bei der unbekannten Probe (Mutationsprobe) um einen Mutationsträger (Abbildung 5.6). Die beiden Mutationen S285L (Exon 6) und S589C (Exon 12) im LDL-Rezeptor-Gen konnten nicht nachgewiesen werden.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Der GC-Gehalt bezieht sich auf das PCR-Produkt einschließlich der universellen Oligonukleotide



Abbildung 5.6: Darstellung der Ein-Schritt-PCR Ergebnisse vom LDL-Rezeptor-Gen nach einer Kapillar-SSCP-Separation. Für jede angegebene Mutation ist pro Feld das Fluoreszenzmuster von drei verschiedenen DNA-Proben dargestellt. Oben Mutationsträger, Mitte und unten Wildtyp-DNA. FAM (blau) und NED (schwarz).

#### 5.2.3 Multiplex-Fluoreszenz-SSCP

Nachdem die Ein-Schritt-Fluoreszenzfarbstoffmarkierung erfolgreich etabliert wurde, bestand der nächste Schritt darin, auch mit weiteren Farbstoffen eine effiziente Diskriminierung zwischen einer Wildtyp-DNA-Probe und den zu untersuchenden Mutationskontrollen zu erreichen. Für die Fluoreszenzfarbstoff-Untersuchungen standen insgesamt fünf verschiedene Farbstoffe zur Verfügung (Tabelle 5), von denen FAM und NED bereits eingesetzt wurden. Die Ein-Schritt-PCR ist mit einigen Exons mit den Farbstoffkombinationen VIC und PET sowie FAM und HEX unter den Bedingungen wie in Kapitel 5.2.2 durchgeführt worden (Abbildung 5.7).



**Abbildung 5.7:** Fluoreszenzmuster einer DNA-Probe, die eine Mutation im Exon 15 (T7051) im LDLR-Rezeptor-Gen trägt (MT) und zwei verschiedenen Wildtyp-DNA-Proben (WT). Die DNA-Proben wurden einmal mit den Fluoreszenzfarbstoffen FAM (blau) und NED (schwarz) sowie VIC (rot) und PET (grün) durch den Einsatz der Ein-Schritt-PCR markiert. Die Fluoreszenzmuster beider Farbstoffkombinationen verhalten sich ähnlich.

Durch den Einsatz verschiedener Farbstoffkombinationen zeigten sich keine Auswirkung auf das SSCP Peakmuster für die gleichen Amplikons. Bei unterschiedlichen Farbstoffkombinationen waren die Muster der Peaks gleich bzw. ähnlich. Daher wurde auf eine universelle fluoreszenzmarkierte Multiplexreaktion, in der zwei separate Ein-Schritt-PCR-Produkte des gleichen Amplikons für einen Kapiller-SSCP-Lauf vereinigt werden, verzichtet.

#### 5.2.4 Sensitivität und Reproduzierbarkeit

Sensitivität Die und die Reproduzierbarkeit wurden nach Abschluss der Optimierungsreaktionen der universellen Multifluoreszenzunterstützten PCR-SSCP beurteilt und bewertet. Von 30 eingesetzten Mutationskontrollen konnten 28 nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Sensitivität von 93 %. Die fluoreszenzmarkierten Ein-Schritt-PCR-Produkte wurden mindestens zweimal in die gleiche oder andere Kapillare injiziert, um auch die Wiederholbarkeit des Versuches zu zeigen. Die Reproduzierbarkeit in einem zweiten oder dritten Ansatz zu bestätigen, konnte nicht durchgeführt werden, weil die aus verschiedenen Laboren zusammengetragenen DNA-Mengen für alle Mutationskontrollen nicht in ausreichenden Mengen zur Verfügung standen. Es hatte sich auch herausgestellt, dass die aus verschiedenen Laboren stammende DNA mit unterschiedlichen Präparationsmethoden isoliert worden war. Daher konnte eine zuverlässige Aussage zur Spezifität nicht getroffen werden. Für die Ein-Schritt-PCR wurden jedoch mindestens 15 bis 40 ng an humaner DNA, abhängig von der Präparation, benötigt, um eine Amplifikation und damit auch eine Detektion zu erzielen. Außerdem konnten auch in Abhängigkeit von der DNA-Präparationsmethode kleine Verzerrungen an den Peakmustern oder Schwankungen in den Signalausbeuten beobachtet werden.

# 5.3 Etablierung der universellen Multifluoreszenzunterstützten PCR-SSCP als Nachweisverfahren zur Detektion von genetischen Variationen an den Long-QT-Syndrom-Genen

Die universelle Multifluoreszenzunterstützte PCR-SSCP ist als Nachweisverfahren zur Detektion von genetischen Variationen der Long-QT-Syndrom-Gene eingesetzt worden. Hierfür wurde das Zwei-Schritt-PCR System verwendet. Für die Zwei-Schritt-PCR sind spezifische Vorwärts- und Rückwärtsprimer, an den 5'-Enden verlängert durch universelle nicht humane Sequenzen, eingesetzt worden. Das entstandene Produkt diente als "Ausgangsmaterial" für die anschließende universelle Amplifikation. In einem zweiten Schritt wurden zwei unterschiedliche universelle fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide benutzt, die komplementär zu den verlängerten Enden der Vorwärts- und Rückwärtsprimer waren, um die markierten PCR-Produkte auf einer Kapillar-SSCP detektierten zu können. Für eine schnelle und effiziente SNP-Untersuchung in den zu untersuchenden Long-QT-Syndrom-Genen schien diese Form der Vorgehensweise sinnvoll, weil jede eingesetzte DNA-Probe mehrere Polymorphismen haben könnte. Die so aus der spezifischen Amplifikation stammenden unmarkierten PCR-Produkte konnten daher durch den Einsatz unmarkierter universeller Primer direkt sequenziert werden.

# 5.3.1 Nachweis von genetischen Variationen an DNA-Proben der Normalpopulation

Für die Identifizierung von SNPs, die in der kaukasischen Population vorkommen, wurde genomische DNA in einem Kollektiv von insgesamt 30 Personen (60 Chromosomen) der Normalbevölkerung kaukasichen Ursprungs herangezogen. Die DNA-Proben stammten von gesunden angeheirateten Familienmitgliedern von Patienten, die in der Franz-Volhard-Klinik für verschiedene Projekte rekrutiert wurden. Um SNPs in den Long-QT-Genen zu finden, wurde das Fluoreszenzmuster der eingesetzten 30 DNA-Proben untereinander verglichen. War das Fluoreszenzmuster gleich, so gab es bei den eingesetzten Proben keine Polymorphismusträger. War das Muster bei einigen DNA Proben unterschiedlich, so war das ein Zeichen für das Vorhandensein von ein oder mehreren genetischen Variationen. Für den

Nachweis der SNPs sind die ursächlichen Gene des Long-QT-Syndroms untersucht worden. Dafür wurden die Sequenzen der proteinkodierenden und nichttranslatierenden Regionen von KCNE1, KCNE2, HERG, SCN5A und KCNQ1 analysiert. Jeweils zwei DNA-Proben aller Fluoreszenzmuster wurden zwecks Bestätigung und Verifizierung der SNPs sequenziert. Dafür wurden die jeweiligen aus der spezifischen Amplifikation stammenden unmarkierten PCR-Produkte durch den Einsatz unmarkierter universeller Primer direkt sequenziert (Abbildung 5.8). Mit verschiedenen Farbstoffkombinationen konnten für die SSCP unterschiedliche Amplikons als Duplex- bzw. Multiplex-Reaktion vereinigt werden, was zu einer Zeitersparnis führte. Hierfür wurden zwei unterschiedliche fluoreszenzmarkierte Zwei-Schritt-PCR-Produkte für die Kapillar-SSCP Detektion vereinigt und nach dem Lauf ausgewertet. Insgesamt konnten durch diese Vorgehensweise 29 verschiedene SNPs gefunden werden.



Abbildung 5.8: Vergleich von drei verschiedenen Fluoreszenzmustern für drei verschiedene Genotypen (A) und das Ergebnis der jeweiligen Sequenzierungsreaktionen (B). Abgebildet sind Ergebnisse einer mit VIC (grün) und PET (rot) markierten Zwei-Schritt-PCR die in einer Kapillar-SSCP detektiert wurden. Dargestellt sind die Genotypen für den SNP 16 (Vergleich Tabelle 5.3) im Intron 11 des KCNQ1 Gens.

### 5.3.2 Nachweis der identifizierten genetischen Variationen an Proben eines Zwillingskollektivs

Die Relevanz und der Einfluss der 29 gefundenen Polymorphismen wurde an einem Kollektiv von 48 dizygoten Zwillingspaaren (DZ) und 94 Einzelpersonen monozygoter Zwillinge (MZ) untersucht. Die eingesetzten Zwillingspaare stammen aus verschiedenen Teilen Deutschlands, die in der Franz-Volhard-Klinik rekrutiert wurden. Für den Nachweis und die Untersuchung der entdeckten Polymorphismen wurde ebenfalls die universelle Multifluoreszenzunterstützte PCR-SSCP an der DNA der Probanden eingesetzt, da das spezifische Fluoreszenzmuster des jeweiligen SNPs aus Kapitel 5.3.1 bekannt war. Das spezifische SSCP-Fluoreszenzmuster der jeweiligen SNPs stimmte nicht immer mit denen der Zwillinge überein. Zur Aufklärung wurden diese Zwillings-DNA-Proben sequenziert. Es hat sich herausgestellt, dass ein Polymorphismus vorhanden, jedoch der Genotyp unterschiedlich war oder dass sich im Amplikon eine weitere polymorphe Stelle befand. Dadurch kam es zu unterschiedlichen Konformationen und anderen Fluoreszenzmustern. So konnten weitere 6 neue SNPs im Zwillingskollektiv gefunden werden.

#### 5.3.3 Genotypisierung genetischer Variationen in Zwillingen

Um eine größere Sicherheit zu bekommen und falsch-negative bzw. falsch-positive Ergebnisse auszuschließen, sind alle SNPs, die durch die universelle Multifluoreszenzunterstützte PCR-SSCP gefunden wurden, mit einer Multiplex-Primer-Extension-Reaktion, an der DNA der Zwilligsprobanden genotypisiert worden. Hierfür wurden die unmarkierten spezifischen Amplifikationsprodukte der Zwei-Schritt-PCR direkt eingesetzt. Je 4 bis 6 zu genotypisierende SNPs wurden für eine Multiplex-Primer-Extension-Reaktion vereinigt (Abbildung 5.9).



Abbildung 5.9: Genotypisierung von Zwillings-DNA-Proben. Ausschnitt aus einer 5-Plex-Primer-Extension-Reaktion. Dargestellt sind 5 verschiedene SNP Reaktionen, die in einer Reaktion als Pool 7 (Vergleich Tabelle 4.4) zusammengefasst und in einer Kapillarelektrophorese nach ihrer Größe getrennt worden sind. Die Nummerierung auf den Peaks geben die durch die universelle Kapillar SSCP gefundenen SNPs an (SNP-Nr Vergleich mit Tabelle 5.3). S = Größenstandard. Alle Ergebnisse der Multiplex-Primer-Extension-Reaktionen wurden auch mit den entsprechenden Fluoreszenzmustern der identifizierten SNPs im Zwillingskollektv verglichen und so gegenkontrolliert.

#### 5.3.4 Phänotyp Darstellung

Bei den Zwillingsprobanden wurde in der Franz-Volhard-Klinik im Rahmen einer Studie zur Genetik kardiovaskulärer Erkrankungen unter anderem eine Echokardiographie durchgeführt und ein Elektrokardiogramm abgeleitet, aus dem die frequenzkorrigierten QT-Intervalle (QTc) berechnet wurden. Die Standard 12-Kanal-EKG-Untersuchung wurde mit einem CARDIOVITS CS-100 durchgeführt. Die Länge der QT- und RR-Intervalle wurden in Ableitung II gemessen. Das frequenzkorrigierte QT-Intervall (QTc) wurde anhand der Formel nach Bazett (Bazett 1920) in der Franz-Volhard-Klinik ermittelt. Die Zygotie der kaukasichen Zwillinge ist mit fünf verschiedenen Mikrosatelliten-Marker bestimmt worden (Becker *et al.* 1997). Die Häufigkeitsverteilung der an monozygoten (MZ) und dizygoten (DZ) Zwillingen gemessenen frequenzkorrigierten QT-Intervalle (QTc) sind gut an die Normalverteilung angepasst (Abbildung 5.1.0). Der Kolmogorov-Smirnov-Test (K-S) zeigt keine Abweichung von der Normalverteilung und ist in beiden Fällen daher nicht signifikant. Das arithmetische Mittel hat den Wert 415,52.



Abbildung 5.1.0: Verteilung der frequenzkorrigierten QT-Intervalle (QTc) für 188 Personen des eingesetzten Zwillingskollektivs.

Das Kollektiv setzte sich aus 56 Männern und 132 Frauen zusammen, die zwischen 15 und 69 Jahre Alt waren (Abbildung 5.1.1).



**Abbildung 5.1.1:** Darstellung der frequenzkorrigierten QT-Intervalle (QTc) des Gesamtkollektivs nach Alter (links) und Vergleich der mittleren QTc-Intervalle nach Geschlecht (rechts).

Wie aus Abbildung 5.1.1 ersichtlich, ist das frequenzkorrigierte QT-Interval (QTc) alters- und geschlechtsabhängig. Da vermutlich das Alter und Geschlecht die Assoziation zwischen QTc-Zeit und den gefundenen SNPs beeinflussen, wurden die Daten für diese Effekte korrigiert. Hierfür wurde ein allgemeines lineares Model (Alter und Geschlecht) aufgestellt, bei dem das Geschlecht als konstanter Faktor, das Alter als Kovariate und die QTc-Zeit als abhängige Variable eingesetzt wurde. Hiermit konnten über die SPSS-Software folgende Koeffizienten geschätzt werden (Tabelle 5.2).

Parameter	Koeffizienten	Signifikanz
Konstanter Term	406,79	0,000000
Alter	0,423	0,001399
Geschlecht Männer	-18,17	0,000004
Geschlecht Frauen	0	-

Tabelle 5.2: Geschätzte Koeffizienten für Alter und Geschlecht für die Berechnung der QTc-Residuen

Daraus ergibt sich in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht eine lineare Gleichung für das erwartete frequenzkorrigierte QT-Intervall (QTc) für Männer  $\hat{Q}Tc_{Manner}$  und für Frauen  $\hat{Q}Tc_{Frauen}$ :

$$\hat{Q}Tc_{Manner} = 406,79 - 18,17 + 0,423 \cdot Alter$$
  
 $\hat{Q}Tc_{Frauen} = 406,79 + 0,423 \cdot Alter$ 

Die Residuen  $\hat{Q}Tc_{Res}$ , d. h. die Differenzen zwischen QTc-Werten und den über das allgemeine lineare Model geschätzten Werten, zeigen keine signifikante Abhängigkeit von Geschlecht und Alter (Abbildung 5.1.2).



**Abbildung 5.1.2:** Darstellung der frequenzkorrigierten QT-Residuen ( $QTc_{Res}$ ) des Gesamtkollektivs nach Alter (links) und Vergleich der mittleren QTc-Residuen nach Geschlecht (rechts).

Die Residuen der frequenzkorrigierten QT-Intervalle  $(QTc_{Res})$  wurden für die Assoziationsstudien verwendet:

$$QTc_{Res} = QTc - \hat{Q}Tc_{Res}$$

#### 5.3.5 Spektrum und Frequenz der gefundenen SNPs in den Long-QT-Genen

Um das Variationsspektrum (Anzahl der SNPs) und die Variationsfrequenz (Allel-Häufigkeit) zu bestimmen, ist ermittelt worden, wie häufig die nachgewiesenen SNPs im untersuchten Zwillingskollektiv gefunden wurden. Die Datengrundlage bildeten Einzelpersonen. Bei den dizygoten Zwillingen wurde die DNA von 48 Paaren typisiert. Bei den monozygoten Zwillingen wurde die DNA von 94 Einzelpersonen analysiert. Somit liegen die SNP-Daten von 188 Personen vor. Insgesamt wurden 35 SNPs typisiert, von denen sich 10 auf KCNE1, 4 auf KCNE2, 6 auf HERG, 7 auf SCN5A und 8 auf KCNQ1 verteilten (Tabelle 5.3). Bei 11 SNPs hat der Polymorphism Information Content (PIC) (Statistitics in Human Genetics, ISBN: 0340662417, Seite 62 und 141) einen Wert  $\leq 0.1$ . Diese SNPs tragen nur geringe Information, da sie fast durchweg homozygot bezüglich des häufigen Allels sind. Insbesondere im Gen KCNE1 zeigen 6 der insgesamt 10 SNPs diese Eigenschaft.

**Tabelle 5.3:** Zusammenfassung der gefundenen SNPs in den untersuchten Long-QT-Genen für 30 DNA Proben eines Kontrollkollektivs kaukasichen Ursprungs und die Allelverteilung (P1 und P2) für 188 DNA-Proben aus dem eingesetzten Zwillingskollektiv. (Abkürzung: n.k. = nicht kodierend; syn = synonym; n. syn. = nicht synonym). Die Nomenklatur für die SNP-Position wurde nach Dunnen (den Dunnen *et al.* 2001) angewandt.

SNP-Nr.	Gen	Region	Base	Kodierend	SNP-Position	Datenbank-Name	HW CHI2 <sup>2</sup>	PIC <sup>3</sup>	P1	P2
1	KCNE1	Intron2	T/C	n. k.	IVS2-129 T>C	rs2236609	2,79	0,37	0,59	0,41
2	KCNE1	Intron2	G/A	n. k.	IVS2-128 G>A	-	0,05	0,03	0,98	0,02
3	KCNE1	Intron2	T/C	n. k.	IVS2-59 T>C	rs2236608	0,03	0,03	0,99	0,01
4	KCNE1	Exon3	G/A	syn. S28S	C.84 G>A	-	0,01	0,01	0,99	0,01
5	KCNE1	Exon3	A/G	n. syn. G38S	C.112 A>G	rs1805127	0,76	0,36	0,62	0,38
6	KCNE1	Exon3	G/A	n. syn. D85N	C.253 G>A	rs1805128	0,02	0,02	0,99	0,01
7	KCNE1	3'UTR	A/G	n. k.	C*124 A>G	rs2070357	1,72	0,37	0,50	0,50
8	KCNE1	3'UTR	A/G	n. k.	C*132 A>G	-	0,17	0,06	0,97	0,03
9	KCNE1	3'UTR	C/T	n. k.	C*456 C>T	rs2070356	1,72	0,37	0,50	0,50
10	KCNE1	3'UTR	G/C	n. k.	C*480 G>C	-	0,59	0,1	0,95	0,05
11	HERG	Exon6	C/T	syn. I489I	C.1467 C>T	rs740952	0,38	0,26	0,81	0,19
12	HERG	Exon6	C/T	syn. F513F	C.1539 C>T	rs1805120	0,51	0,26	0,81	0,19
13	HERG	Exon8	T/C	syn. T652T	C.1956 T>C	hCV3219494	0,32	0,37	0,57	0,43
14	HERG	Intron8	G/C	n. k.	IVS8+39 G>A	rs2072412	1,52	0,32	0,72	0,28
15	HERG	Intron8	G/A	n. k.	IVS8+40 G>A	rs2072413	1,52	0,32	0,72	0,28
16	HERG	Exon11	A/C	n. syn. K897T	C.2690 A>C	rs1805123	0,09	0,3	0,75	0,25
17	KCNQ1	Exon11	G/C	n. syn. S484T	C.1451 G>C	-	0,01	0,01	0,99	0,01
18	KCNQ1	Intron11	A/G	n. k.	IVS11+46 A>G	rs760419	2,95	0,37	0,56	0,44
19	KCNQ1	Intron11	C/G	n. k.	IVS11+50 C>G	-	0,01	0,01	0,99	0,01
20	KCNQ1	Intron12	T/C	n. k.	IVS12+14 T>C	-	0,33	0,18	0,89	0,11
21	KCNQ1	Exon13	G/A	syn. S546S	C.1638 G>A	rs1057128	0,05	0,27	0,80	0,20
22	KCNQ1	Intron13	G/A	n. k.	IVS13+36 G>A	rs163150	1,14	0,34	0,68	0,32
23	KCNQ1	Intron14	T/C	n. k.	IVS14+43 T>C	rs81204	4,68	0,28	0,78	0,22
24	KCNQ1	Intron15	G/T	n. k.	IVS15+32 G>T	-	1,22	0,13	0,93	0,07
25	KCNE2	5'-UTR	G/A	n. k.	C-77 G>A	-	1,31	0,13	0,92	0,08
26	KCNE2	Intron1	C/T	n. k.	IVS1-44 C>T	rs9305548	0,01	0,25	0,82	0,18
27	KCNE2	Intron1	A/G	n. k.	IVS1-16 A>G	-	0,48	0,09	0,95	0,05
28	KCNE2	Exon2	A/G	n. syn. T8A	C.22A>G	rs2234916	0,02	0,02	0,99	0,01
29	SCN5A	Exon2	G/A	syn. A29A	C.87 G>A	rs6599230	2,03	0,24	0,83	0,17
30	SCN5A	Intron9	C/A	n. k.	IVS9-3 C>A	-	0,58	0,21	0,86	0,14
31	SCN5A	Intron10	G/A	n. k.	IVS10-24 G>A	rs7428779	2,65	0,22	0,85	0,15
32	SCN5A	Exon12	A/G	n. syn. H558R	C.1673 A>G	re1805124	1,10	0,27	0,80	0,20
33	SCN5A	Exon17	G/A	syn. E1061E	C.3183 G>A	rs7430407	2,21	0,19	0,88	0,12
34	SCN5A	Intron24	T/C	n. k.	IVS24+53 T>C	-	0,33	0,1	0,94	0,06
35	SCN5A	Intron24	G/A	n. k.	IVS24+116 G>A	-	4,17	0,19	0,88	0,13

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Hardy-Weinberg-Chi<sup>2</sup> Test-Wert, bei 2 Allelen beträgt der kritische Wert 3.84 (95 % Konfindenzniveau)

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> PIC Polymorphism Information Content

Signifikante Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gesetz ( $Chi^2 > 3.84$ ) sind bei 2 SNPs aufgetreten, namentlich KNCQ1 (23) und SCN5A (35). Die Ursachen für diese Abweichungen konnten nicht geklärt werden.



Abbildung 5.1.3: Schematische Struktur der untersuchten Long-QT-Syndrom-Gene. Dargestellt sind die SNP-Positionen, die durch die universelle fluoreszenzunterstützte SSCP in dem eingesetzten kaukasischen Kollektiv gefunden wurden (roter Punkt) sowie durch die Datenbankabfrage der jeweiligen Amplikons (blauer Punkt). Blaue Kästchen: proteinkodierende Exons; Weiße Kästchen: nichttranslatierte Bereiche. Die Länge der Exons und Introns wurde vernachlässigt. Die Nummern (1-35) auf den jeweiligen Genen zeigen die relativen Positionen der SNPs (Vergleich mit Tabelle 5.3 bzw. 5.4).

Die gefundenen und genotypisierten genetischen Variationen sind auch mit öffentlichen Datenbanken verglichen worden (Abbildung 5.1.3). So konnte festgestellt werden, ob es sich um neue oder schon bekannte SNPs handelte. Die Datenbankabfrage wurde mit der DNA-Sequenz aller primerflankierenden Amplikons durchgeführt (Stichtag 01.03.2004).

#### 5.3.6 Assoziation von genetischen Variationen in Zwillingen

Der genetische Einfluss der SNPs auf die QTc-Werte wurde anhand der Residuen (siehe Kapitel 5.3.4) untersucht, weil so die Einflüsse von Geschlecht und Alter herausgerechnet werden. Die Abhängigkeit der QTc-Residuen ( $QTc_{Res}$ ) von den Genotypen der SNPs wurde mit ANOVA (<u>Analysis of variance</u>) untersucht. Für jeden SNP wurde geschätzt, ob sich die Mittelwerte der QTc-Residuen zwischen den Genotypen signifikant unterscheiden (Tabelle 5.4).

		Genotyp 11		Genotyp	12	Genotyp 22		ANOVA-
SNP-Nr.	Gen	Mittelwert QTc <sub>Res</sub>	Anzahl11	Mittelwert QTc <sub>Res</sub>	Anzahl <sub>12</sub>	Mittelwert QTc <sub>Res</sub>	Anzahl <sub>22</sub>	Signifikanz (p)
1	KCNE1	1,27	60	-2,52	102	7,00	26	0,172
2 *	KCNE1	0,71	182	-21,31	6	0	0	0,026
3 *	KCNE1	0,16	183	-5,49	5	0	0	0,604
4 *	KCNE1	0,40	186	-36,71	2	0	0	0,029
5	KCNE1	1,13	70	-1,90	94	4,18	24	0,48
6 *	KCNE1	-0,19	184	8,80	4	0	0	0,459
7	KCNE1	-1,79	43	0,75	103	0,03	42	0,845
8 *	KCNE1	-0,33	177	5,46	11	0	0	0,438
9	KCNE1	-1,79	43	0,75	103	0,03	42	0,845
10 *	KCNE1	-0,04	168	0,39	20	0	0	0,939
11	HERG	0,76	125	-1,03	55	-4,73	8	0,765
12	HERG	0,89	126	-1,35	54	-4,73	8	0,722
13	HERG	-5,19	59	1,67	96	4,47	33	0,111
14	HERG	2,38	95	-1,63	82	-8,30	11	0,268
15	HERG	2,38	95	-1,81	82	-6,97	11	0,312
16	HERG	2,07	105	-1,39	72	-10,57	11	0,205
17	KCNQ1	0,10	186	-8,39	2	0	0	0,62
18	KCNQ1	2,18	65	-0,44	81	-2,50	42	0,601
19 *	KCNQ1	-0,04	186	3,88	2	0	0	0,819
20	KCNQ1	1,27	150	-5,61	35	2,51	3	0,307
21	KCNQ1	-2,81	120	5,83	61	-2,37	7	0,069
22	KCNQ1	-2,96	89	3,07	76	-2,96	23	0,262
23	KCNQ1	0,26	120	-2,20	54	6,31	14	0,488
24 *	KCNQ1	-0,57	160	3,27	28	0	0	0,435
25 *	KCNE2	1,43	159	-7,80	29	0	0	0,056

**Tabelle 5.4**: Ergebnis der Varianzanalyse (ANOVA) unter Angabe der Signifikanz (p) für die Mittleren QTc Residuen (Mittelwert) in Millisekunden nach SNP und Genotyp (11; 12; 22). Bei den mit \* gekennzeichneten SNPs wurde ein t-Test angewandt.

26KCNE20,77126-1,5156-1,7960,82627 *KCNE2-0,291702,8418000,59928KCNE2-0,5718426,484000,02529SCN5A-0,671330,59477,7780,61730SCN5A0,34140-2,544312,6250,38931SCN5A-0,04139-1,834211,8970,375									
27*KCNE2-0,291702,8418000,59928KCNE2-0,5718426,484000,02529SCN5A-0,671330,59477,7780,61730SCN5A0,34140-2,544312,6250,38931SCN5A-0,04139-1,834211,8970,375	26	KCNE2	0,77	126	-1,51	56	-1,79	6	0,826
28         KCNE2         -0,57         184         26,48         4         0         0         0,025           29         SCN5A         -0,67         133         0,59         47         7,77         8         0,617           30         SCN5A         0,34         140         -2,54         43         12,62         5         0,389           31         SCN5A         -0,04         139         -1,83         42         11,89         7         0,375	27 *	KCNE2	-0,29	170	2,84	18	0	0	0,599
29SCN5A-0,671330,59477,7780,61730SCN5A0,34140-2,544312,6250,38931SCN5A-0,04139-1,834211,8970,375	28	KCNE2	-0,57	184	26,48	4	0	0	0,025
30         SCN5A         0,34         140         -2,54         43         12,62         5         0,389           31         SCN5A         -0,04         139         -1,83         42         11,89         7         0,375	29	SCN5A	-0,67	133	0,59	47	7,77	8	0,617
31 SCN5A -0,04 139 -1,83 42 11,89 7 0,375	30	SCN5A	0,34	140	-2,54	43	12,62	5	0,389
	31	SCN5A	-0,04	139	-1,83	42	11,89	7	0,375
32 SCN5A 1,98 122 -5,44 56 6,43 10 0,108	32	SCN5A	1,98	122	-5,44	56	6,43	10	0,108
33 SCN5A 0,50 147 -0,78 36 -8,89 5 0,675	33	SCN5A	0,50	147	-0,78	36	-8,89	5	0,675
34 * SCN5A 0,46 168 -4,41 19 8,10 1 0,666	34 *	SCN5A	0,46	168	-4,41	19	8,10	1	0,666
35 SCN5A 2,39 147 -7,63 35 -13,84 6 0,029	35	SCN5A	2,39	147	-7,63	35	-13,84	6	0,029

In den Fällen, in denen nur zwei Genotypen vorhanden waren, wurde die Hypothese der Gleichheit der Mittelwerte mit einem t-Test geprüft.

Da die dizygoten Zwillinge (DZ) als Paare untereinander ähnlichere QTc-Zeiten haben als die Einzelpersonen, müssen die geschätzten Signifikanzen (p-Werte) mit Vorsicht betrachtet werden. Diese Ähnlichkeiten bewirken möglicherweise eine Überschätzung der Signifikanz.