

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Deutsches Herzzentrum München,
Medizinische Klinik I des Klinikums rechts der Isar

Assoziation von Polymorphismen im Lymphotoxin- α Gen mit dem Myokardinfarkt

Eleni Evelyn Michou

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender :

Univ.- Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. A. Kastrati
2. Priv.-Doz. Dr. I. V. Deisenhofer

Die Dissertation wurde am 14.12.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 22.09.2010 angenommen.

Dissertation

Assoziation von Polymorphismen im
Lymphotoxin- α Gen mit dem Myokardinfarkt

Verfasserin: Eleni Evelyn Michou

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	2
Abkürzungsverzeichnis.....	4
1 Einleitung	6
1.1 Der Myokardinfarkt	6
1.1.1 Ätiologie und Risikofaktoren des Myokardinfarktes.....	8
1.1.2 Pathogenese der Arteriosklerose.....	9
1.2 Genetische Polymorphismen	11
1.3 Die BAT1-NFKBIL1-LTA-Region im Chromosom 6.....	12
1.3.1 Das BAT1-Gen und Protein	16
1.3.2 Das NFKBIL1-Gen und Protein.....	16
1.3.3 Das LTA-Gen und Lymphotoxin- α	17
1.4 Zielsetzung und Fragestellung	19
2 Methoden	21
2.1 Studienpopulation.....	21
2.2 Definitionen	22
2.3 DNA-Präparation	23
2.4 Die TaqMan-Reaktion.....	23
2.4.1 Prozess der Polymerasenkettenreaktion.....	23
2.4.2 Ablauf der TaqMan-Reaktion.....	26
2.5 Bestimmung der SNP-Genotypen mit der TaqMan Methode	28

2.5.1	<i>Beschreibung des Verfahrens</i>	30
2.5.2	<i>Kontrolle der Richtigkeit der SNP Genotypisierung</i>	32
2.5.3	<i>Verwendete Geräte und Materialien</i>	33
2.6	<i>Haplotypbestimmung</i>	34
2.7	<i>Statistische Analyse</i>	35
3	<i>Ergebnisse</i>	37
3.1	<i>Patientencharakteristika</i>	37
3.2	<i>Genotypverteilung der drei Polymorphismen</i>	39
3.3	<i>Ergebnisse der Haplotyp-Verteilung</i>	43
3.4	<i>Ergebnisse der Diplotyp-Verteilung</i>	45
4	<i>Diskussion</i>	47
4.1	<i>Vergleich zwischen der Kontroll- und der MI-Gruppe</i>	47
4.2	<i>Vergleich der kaukasischen Population mit anderen Populationen.</i>	49
4.3	<i>Ausblick</i>	53
5	<i>Zusammenfassung</i>	54
	<i>Literaturverzeichnis</i>	57

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ABI	Applied Biosystems GmbH
ATP	Adenosin 5'-Triphosphat
BAT1	HLA- <u>B</u> <u>A</u> ssociated <u>T</u> ranscript <u>1</u>
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CSF	Kolonienstimulierender Faktor
°C	Grad Celsius
d.h.	Das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure, Desoxyribonucleic acid
EM	Erwartungsmaximierung, expectation maximization
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
et al.	und andere
FRET	Fluoreszenz-Energietransfer, Fluorescence resonance energy transfer
G	Guanin
G-CSF	Granulozyten-stimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-stimulierender Faktor
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon Protein
IFN- α	Interferon alpha Protein
IFN- β	Interferon beta Protein
IFN- γ	Interferon gamma Protein
I κ B	<u>I</u> nhibitor of <u>K</u> appa <u>B</u> Protein
I κ BL	<u>I</u> nhibitor of <u>K</u> appa <u>B</u> - <u>L</u> ike Gen, siehe NFKBIL1
IL	Interleukin Protein
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KG	Kontrollgruppe
KHK	Koronare Herzkrankheit
LD	Linkage disequilibrium
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lymphotoxin alpha Gen
LTB	Lymphotoxin beta Gen
MGB	Minor groove binder
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	Major histocompatibility complex, Hauptkompatibilitätskomplex
MI	Myokardinfarkt
MLE	Maximum-likelihood estimation
mmHg	mm Quecksilbersäule
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
M-CSF	Makrophagen-stimulierender Faktor
NFKBIL1	<u>N</u> uclear <u>F</u> actor of <u>K</u> appa light polypeptide gene enhancer in <u>B</u> -cells <u>I</u> nhibitor- <u>L</u> ike- <u>1</u> Gen
NEB	New England Biolabs
NF κ B	<u>N</u> uclear <u>F</u> actor <u>K</u> appa <u>B</u> Protein

NFQ	Non fluorescent Quencher
P	Zufallswahrscheinlichkeit
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Platelet growth factor
PG	Patientengruppe
RNA	Ribonukleinsäure, Ribonucleic acid
SDS	Sequence Detection System
SNP	Single nucleotide polymorphism, Einzelnukleotid-Polymorphismus
T	Thymin
Ta	Primeranlagerungstemperatur, „annealing“ Temperatur
Tm	Schmelztemperatur
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha Protein
TNF- β	Tumor-Nekrose-Faktor beta Protein
TNFA	Tumor-Nekrose-Faktor alpha Gen
TNFB	Tumor-Nekrose-Faktor beta Gen
TNFR1	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 Protein
TNFR2	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 2 Protein
UV	Ultra-Violett
VCAM	Vascular adhesion molecule
WHO	Weltgesundheitsorganisation - World Health Organization
z.B.	Zum Beispiel

1 Einleitung

In vorliegender Arbeit wird eine mögliche Assoziation zwischen den Polymorphismen in der BAT-NFKBIL-LTA Gen-Region und einem erhöhten Risiko an Myokardinfarkt zu erkranken, untersucht. Speziell wird auf die Polymorphismen des Lymphotoxin- α Gens, auch als LTA bezeichnet, und deren Bedeutung als mögliche, genetisch bedingte Risikofaktoren für das Auftreten eines Herzinfarktes, eingegangen. Auch die Allelkombinationen dieser drei Gene, zu denen jeweils drei SNPs gehören, sind mit der Frage nach einer möglichen Assoziation mit dem MI konfrontiert worden. Die Art und das Maß des Einflusses dieser Polymorphismen werden im Fall des Myokardinfarkt-Erkrankungsprozesses weiterhin diskutiert.

1.1 *Der Myokardinfarkt*

In den westlichen Industrieländern nehmen die Zivilisationskrankheiten einen beachtlichen Stellenwert ein. Eine dieser Krankheiten ist der Myokardinfarkt. Der Myokardinfarkt gehört zu den häufigsten Todesursachen in den Industrieländern. Die Inzidenz in Deutschland und Österreich beträgt 300 Infarkte pro 100000 Einwohner im Jahr. Zum Tode führen davon ca. 30 Prozent [88].

Das Risiko einen Myokardinfarkt zu erleiden steigt mit zunehmendem Alter. Dieser Anstieg zeigt sich besonders in den Altersgruppen ab 50. Außerdem sind Zeitpunkt des Auftretens des Infarktes und dessen Auswirkungen geschlechtsabhängig [46]. Das Verhältnis der Wahrscheinlichkeit an einem Myokardinfarkt zu erkranken, ist bei Männern und Frauen 2:1. Frauen weisen jedoch eine schlechtere Prognose als Männer auf. Außerdem liegt die Mortalität nach einem akuten Myokardinfarkt bei den Frauen höher [27, 60, 82]. Dabei ist eine Interaktion von Geschlecht und Alter festzustellen [27, 60, 82].

Unter dem Begriff „Myokardinfarkt“ ist ein Zellzerfall des Myokards aufgrund einer Ischämie beschrieben. Meistens liegt die Ursache im Fortschreiten einer koronaren Herzkrankheit. Die Stenose einer oder mehrerer Koronararterien sowie mögliche Gefäßwandveränderungen verursachen eine Durchblutungsstörung des Herzmuskelgewebes. Damit wird ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und –bedarf im Myokard ausgelöst [28]. Weitere Ursachen einer Koronarinsuffizienz finden sich in der Beeinträchtigung der Myokardperfusion infolge von Druckbelastungen der Ventrikel oder infolge der Verkürzung der Diastolendauer aufgrund von ausgeprägten Tachykardien.

Irreversible Zellschädigungen im Myokard treten etwa nach 20 Minuten bei einem kompletten Verschluss der Koronararterie ein. Nach 24 Stunden hat sich die Nekrose von subendokardial nach subepikardial ausgebreitet [55]. Der Grad der Kollateralversorgung des Herzmuskelgewebes, der zeitliche Ablauf der Entwicklung des Gefäßverschlusses, die Intensität der Herzarbeit, der Funktionszustand des nicht betroffenen Herzmuskelgewebes und die Regulation im Koronarsystem bestimmen das Ausmaß der Ausbreitung des Infarktareals und dessen mögliche nachfolgende Komplikationen [8].

Die klinische Symptomatik des Myokardinfarktes äußert sich in stechenden oder brennenden Brustschmerzen, die von Fall zu Fall unterschiedlich in eine oder beide Schultern, den linken Arm, den Rücken, den Hals oder sogar den Bauchraum ausstrahlen können. Andere Anzeichen sind Dyspnoe, Tachykardie und Todesangst in Begleitung von kaltem Schweiß. Die Symptome können von Patient zu Patient variieren, es können sogar Übelkeit, Erbrechen und Magenschmerzen vorkommen.

Eine prägnante Ausdehnung des nekrotisierten Gewebes kann akut zu Komplikationen wie Wandrupturen oder Symptome einer Klappeninsuffizienz aufgrund eines Pappilarmuskelabrisses führen. Die Wandrupturen treten entweder am Ventrikelseptum auf - mit der Folge eines Links-Rechts-Shunts - oder an der Herzwand - mit einer resultierenden Herzbeutelamponade und Perikarditis. Als weitere Komplikation kann ein akutes

Lungenödem nicht ausgeschlossen werden. Dies ist die Folge bei einem Infarktbereich von 20-40 % des Herzmuskelgewebes, wodurch ein erhöhter Druck im kleinen Kreislauf durch die Verminderung der Kontraktilität des Myokards verursacht wird. Darüber hinaus führen bei einem Infarkt auftretende Herzrhythmusstörungen nicht selten durch den Kaliumverlust aus hypoxischen Herzmuskelzellen zum plötzlichen Herztod.

Spätere Komplikationen können durch die hinterlassene Narbe auftreten. Diese können z.B. Herzinsuffizienz oder Herzwandaneurysma sein, welche dann die Kammer durch vermehrtes Volumen belasten. Dabei tritt eine hypokinetische Wandmotilität in Erscheinung, die bis hin zur Akinesie oder Dyskinesie der Ventrikel aufgrund der fibrotischen Umwandlung des nekrotischen Bezirks reichen kann. Dabei wird das Risiko für Rhythmusstörungen und Embolien weiter erhöht [22, 28].

Im Fall des akuten Myokardinfarktes kann das Sterblichkeitsrisiko innerhalb eines Zeitraums von drei bis sechs Stunden nach dem Infarkt durch eine frühzeitige Reperfusion, z.B. durch Thrombolyse oder Fibrinolyse, gesenkt werden. Medikamentöse, interventionelle oder chirurgische Maßnahmen können eine Einschränkung der Koronardurchblutung reduzieren.

1.1.1 Ätiologie und Risikofaktoren des Myokardinfarktes

Arteriosklerose ist die häufigste Ursache eines Myokardinfarktes. Sie bewirkt die Verengung eines oder mehrerer Herzkranzgefäße, auf die dann ein Infarkt folgen kann. Sie stellt ein multifaktorielles Geschehen dar, bei dem verschiedene genetische Faktoren, sowie Umweltfaktoren eine Rolle spielen [12, 26, 48]. Arteriosklerose ist nach der Definition der WHO (1957), „eine variable Kombination von Intimaveränderungen der Arterien, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia“. Im chronischen Verlauf kommt es zum Verlust der Elastizität und zu

einer Verdickung und Verhärtung der Arterienwand [31, 75].

Andere mögliche Ursachen des Myokardinfarktes sind mangelhafte Sauerstoffversorgung des Myokards durch Embolie (Verschleppung eines Blutgerinnsels), Thrombose (lokale Bildung eines Blutgerinnsels) und Vasospasmus (Gefäßkrampf) [25].

Von den für den Myokardinfarkt relevanten Risikofaktoren werden insbesondere diejenigen beschrieben, die zu arteriosklerotischen Veränderungen der Herzkranzgefäße führen können. Diese Faktoren werden in beeinflussbare und nicht beeinflussbare Risikofaktoren unterschieden.

Zu den beeinflussbaren Risikofaktoren gehören Fettstoffwechselstörungen, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, metabolisches Syndrom, Nikotinabusus, eine erhöhte Lipoprotein(a)-Konzentration, Hyperfibrinogenämie, Hyperhomocysteinämie, Antiphospholipid-Antikörper-Syndrom, genetisch bedingte t-PA-Defekte, Bewegungsmangel und psychosoziale Risikofaktoren wie z.B. negativ wirkender Stress [28].

Zu den nicht beeinflussbaren Risikofaktoren gehören familiäre Disposition, Lebensalter und Geschlecht [28, 46]. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass genetische Polymorphismen mit dem Myokardinfarkt assoziiert sind [84].

1.1.2 Pathogenese der Arteriosklerose

Die Arteriosklerose ist eine Arteriensystemerkrankung mit langsam fortschreitenden chronischen Entzündungsprozessen [39]. Die Endothelzellschädigung ist die Ursache der entstehenden Entzündung, welche für das proliferative Geschehen der Arteriosklerose eine bedeutende Rolle spielt [66].

Die Ursachen für die Verletzung der Endothelzellschicht können einerseits durch die These der „Antwort auf Verletzungen“ [45, 69]. und andererseits durch die These der „Lipoprotein-

induzierten Atherosklerose“ [87] erklärt werden. Basierend auf die erste Theorie können Endothelzellschädigungen anhand von einer morphologischen Schädigung durch Trauma, mechanischen Verletzungen z.B. durch die arterielle Hypertonie sowie biochemischen Schädigungen durch bakterielle Toxine oder freigesetzte Toxine während des Rauchens, viralen Infektionen oder Antigen-Antikörper-Reaktionen, sowie biophysikalische Verletzungen auf molekularer Ebene hervorgerufen werden. Die zweite Hypothese beruht auf eine oxidative Modifizierung des Proteinanteils von LDL und dessen Aufnahme durch Makrophagen [18, 59].

Der Inflammationsvorgang der Arteriosklerose ist bei beiden Hypothesen identisch. Dabei werden zelluläre Adhäsionsmoleküle, wie VCAM-1 und ICAM-1, exprimiert, die inflammatorische Zellen an die geschädigte Stelle des Endothels anlocken [5, 47]. Diese Adhäsionsmoleküle und die endotheliale Dysfunktion bewirken eine erhöhte Permeabilität der Gefäßwand. Somit gelangen die in der Blutbahn vorhandenen Lipide, Monozyten und T-Lymphozyten in die Tunica intima der Gefäßwand [36]. Die Monozyten differenzieren sich weiter zu Makrophagen [35]. Makrophagen phagozytieren Lipide und transformieren zu Schaumzellen. Diese Zellen steigern das Inflammationsgeschehen durch die Sekretion von Tumornekrosefaktor (TNF) und Interferon (IFN).

Weiterhin lagern sich an der Oberfläche des Läsionsbereichs oder in der Läsion selber Thrombozyten an und sezernieren Prostaglandine, Leukotriene und den „platelet derived growth factor“ (PDGF). Dadurch werden Inflammation, Chemotaxis, Aktivierung von Leukozyten, Migration und Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen und Synthese der extrazellulären Matrix gefördert [6, 68]. Diese Synthese begünstigt ihrerseits wieder eine weitere Migration und Proliferation dieser Muskelzellen. Diese Zellen werden ebenfalls durch die Zerstörung des Endothels, die Interaktion der Thrombozyten mit der verletzten Gefäßwand und die Infiltration der Leukozyten zur Migration und Proliferation angeregt [65].

Im Weiteren setzen sich Kalkablagerungen, Fettstoffe und die oben genannten

entzündungsfördernden Zellen aus dem Blut an den Innenwänden der Arterien ab. Diese Ablagerungen heißen „Plaques“ [20]. Deren nekrotischer Lipidkern setzt sich aus den akkumulierten Schaumzellen, abgestorbenen Zellen und Lipidablagerungen zusammen [67]. Gleichzeitig bilden die migrierten glatten Muskelzellen und die extrazelluläre Matrix eine fibröse Kappe auf der Plaque [67]. Die fortschreitende Entzündung bewirkt die Expression von Proteinasen, welche eine Fibrinlösung der fibrösen Kappe verursachen und damit eine Plaque-Ruptur mit Auswirkungen bis hin zum Myokardinfarkt auslösen [37, 38, 41]. Gleichzeitig wird der Hämostasemechanismus aktiviert, welcher eine Thrombusbildung hervorrufen kann [40].

1.2 Genetische Polymorphismen

Zahlreiche Hinweise (epidemiologische Befunde, Familienanalysen) weisen darauf hin, dass die genetische Variabilität einen erheblichen Einfluss auf das Krankheitsrisiko ausübt. Auf den potentiellen Nutzen einfacher, diallelischer Polymorphismen für die Analyse komplexer Krankheiten wurde zuerst von Risch und Merikangas (1996) hingewiesen. Ein Polymorphismus liegt dann vor, wenn die Häufigkeit der Genvariation in der untersuchten Population mindestens ein Prozent beträgt. Andernfalls wird von einer Mutation gesprochen.

Die häufigsten Arten dieser Genvariation der DNA sind Einzelnukleotidpolymorphismen („single nucleotide polymorphisms“, SNP). Für den Menschen kommt ein SNP auf je 200 bis 1000 Basenpaare vor. Bei einem SNP ist ein einzelnes Nukleotid im DNA-Molekül gegen ein anderes ausgetauscht. SNPs können in genkodierenden Sequenzen, nicht genkodierenden Sequenzen oder in intergenischen Regionen vorkommen. Ein Aminosäureaustausch ist möglich, falls sich dieser SNP im Bereich einer kodierenden Gen-Sequenz befindet. Außerdem können SNPs Einfluss auf das Spleißen der mRNA [72], den Prozess der Transkription und die Expression des Gens [30] ausüben. Somit können Polymorphismen Änderungen in der Menge oder den Eigenschaften des jeweiligen Genproduktes

verursachen.

Genpolymorphismen sind unter anderem auch an kardiovaskulären Erkrankungen sowie der Entstehung des MI beteiligt. Einige Polymorphismen beeinflussen das atherosklerotische Geschehen [42] und können somit ein erhöhtes MI-Risiko darstellen [44, 92]. Der MI gehört zu den Erkrankungen, deren Pathogenese von genetischen Faktoren beeinflusst werden kann. Kandidatengene für den MI sind Gene, die an Inflammation, Koagulation und Lipidstoffwechsel beteiligt sind.

Gegenstand dieser Arbeit ist die Untersuchung der Assoziation der Polymorphismen der BAT1-NFKBIL1-LTA-Region des Chromosoms 6 mit dem Myokardinfarkt. Die Gene dieser Genregion sind an den Vorgängen der Entstehung der Arteriosklerose und des MI beteiligt. In den nächsten Kapiteln wird näher auf Polymorphismen der BAT1-NFKBIL1- und LTA-Gene hinsichtlich der MI-Pathogenese eingegangen. Die genomische Position und Struktur dieser Gene werden betrachtet und deren Einfluss auf die Entstehung des MI untersucht.

1.3 Die *BAT1-NFKBIL1-LTA-Region im Chromosom 6*

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex: MHC) ist ein stark gekoppelter Genkomplex, der sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 befindet und über 100 Gene enthält. Dieser Genkomplex erfüllt eine wichtige und bedeutende Aufgabe hinsichtlich der Immunerkennung, der Gewebeverträglichkeit (Histokompatibilität) bei Transplantationen, der immunologischen Individualität und Entzündungsprozessen. Die MHC-Region besteht aus drei nebeneinanderliegenden Regionen, die die Gene der Klassen I, II und III enthalten. Die meisten MHC-Gene liegen in mehreren Allelen vor und sind deshalb hochpolymorph.

Gene der Klassen I und II kodieren für Glykoproteine. Diese nennt man auch Hauptleukozytenantigene (HLA), da sie auf den Leukozyten nachgewiesen werden können.

Diese Proteine werden an Zelloberflächen exprimiert und präsentieren den T-Zellen fremde Peptide als Antigene. Die MHC-Moleküle sind für das Immunsystem von großer Bedeutung, weil sie eine Unterscheidung in Selbst und Nicht-Selbst ermöglichen.

MHC-Moleküle der Klasse I befinden sich auf allen kernhaltigen Zellen. Fragmente der endogenen Antigene, wie zum Beispiel intrazelluläre Erreger, werden vom MHC-I-Protein gebunden. Nach dem vesikulären Transport an die Zelloberfläche werden diese Proteinkomplexe von zytotoxischen CD8-T-Lymphozyten erkannt und die betroffene Zelle wird zerstört [76].

MHC-II-Moleküle sind als Antigen-präsentierende Zellen auf B-Lymphozyten, Makrophagen und Langerhans-Zellen des Immunsystems zu finden. Hier werden die zerlegten Peptide der exogenen Antigenstrukturen in MHC-II-Moleküle eingebunden. Durch den vesikulären Transport an die Zelloberfläche werden dann die Antigene CD4-Lymphozyten präsentiert [10]. Die Antikörperproduktion wird für die Bekämpfung der extrazellulären Pathogene stimuliert.

Die MHC-Gene der Klasse III liegen zwischen den Klasse-I- und den Klasse-II-Genen. Die Klasse-III-Region besitzt eine Länge von ungefähr 730 kb und besteht aus mindestens 62 Genen, von denen BAT1 und NOTCH4 die äußersten Gene darstellen. Unter den Genen der MHC-Klasse-III, kodieren einige für Proteine, die an der Komplementkaskade teilnehmen [86]. Andere Gene kodieren Zytokine, wie den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und die Lymphotoxine LTA und LTB, die in der Regulation des Immunsystems und in Entzündungsreaktionen involviert sind [89].

Aufgrund ihrer Relevanz für die vorliegende Arbeit wird im Folgenden auf die inflammatorischen Gene BAT1, NFKBIL1 und LTA der MHC-Klasse-III, wie in Abbildung 1-1 dargestellt, näher eingegangen und ihre Bedeutung bezüglich Entzündungsprozesse erläutert. In diesen Genen befinden sich zahlreiche SNPs. Für diese Arbeit relevante und verwertbare

SNPs sind drei in BAT1, drei in NFKBIL1 und drei in LTA.

Diese, in Tabelle 1-1 gezeigten SNPs, liegen auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 an der Position 6p23.1 in einem Haplotypblock, der eine Länge von etwa 50kb besitzt.

Tabelle 1-1 SNP der Gene BAT1, NFKBIL1 und LTA

SNP-Bezeichnung	refSNP-ID	Poly-morphismus	SNP-Position
BAT1-A	rs2075582	T/C	BAT1 3' nicht translatierte Region; 31602045
BAT1-B	rs2075580	C/G	BAT1 intron 5; 31608312
BAT1-C	rs2239527	C/G	BAT1 5' nicht translatierte Region; 31614098
NFKBIL1-A	rs2071592	T/A	NFKBIL1 5' nicht translatierte Region; 31619654
NFKBIL1-B	rs2239707	T/C	NFKBIL1 intron 2; 31629632
NFKBIL1-C	rs2516479	C/G	NFKBIL1 3' nicht translatierte Region; 31632639
LTA-A	rs1800683	G/A	LTA exon 1;31644375
LTA-B	rs909253	A/G	LTA intron 1; 31644617
LTA-C	rs1041981	C/A	LTA exon 3; 31645088

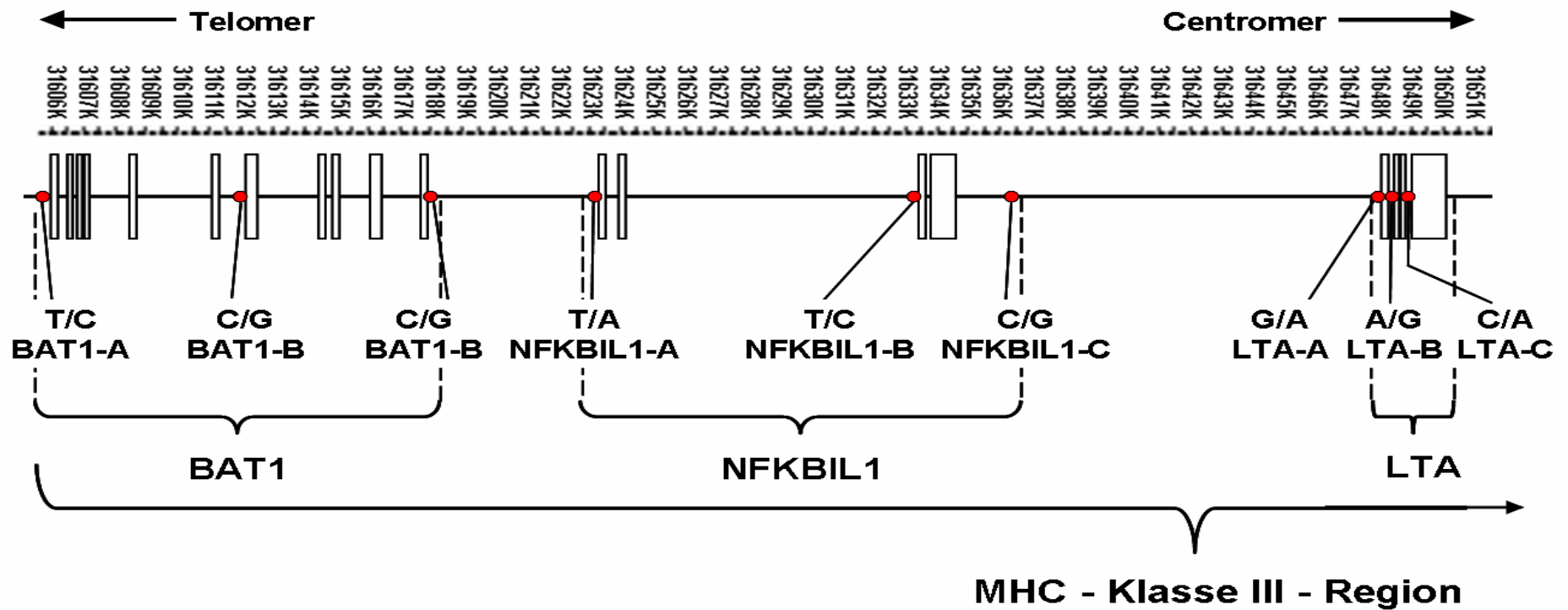


Abbildung 1-1 Darstellung der Lokalisation der untersuchten Gene und SNP auf Chromosom 6

1.3.1 Das BAT1-Gen und Protein

Das BAT1-Gen wird auch als „HLA-B associated transcript 1“ bezeichnet [73]. BAT1 gehört zur MHC-Klasse-III und liegt in einer Region im Zentrum von MHC zwischen TNF und HLA-B und in der Nähe von NFKBIL1. Dieses Gen ist, wie auch die in den folgenden Kapiteln beschriebenen Gene, an Funktionen des Immunsystems, an Autoimmunerkrankungen und damit auch an Entzündungsreaktionen beteiligt [15, 17, 89].

BAT1 ist polymorph, besteht aus 11 Exonen und erstreckt sich über 11,7kb. Dieses Gen wird in vielen unterschiedlichen Zellen, mit Schwerpunkt in Hepatozyten und Makrophagen, exprimiert [3]. Dieses Gen kodiert ein kernlokalisiertes Protein, das aus 428 Aminosäuren besteht und welches eine Ähnlichkeit zu einer nuklearen ATP-abhängigen RNA-Helikase der DEAD-Box Protein-Familie [29, 58] besitzt.

Als antinflammatorisches Gen beeinflusst BAT1, wie Studien gezeigt haben, die Regulierung inflammatorischer Zytokine und könnte ein Initiationsfaktor der Translation sein [3, 61, 89]. Er vermindert die Produktion von Akute-Phase-Zytokinen, wie TNF- α , IL-1 und IL-6 [4].

Wie schon erwähnt, sind im BAT1-Gen polymorphe Stellen vorhanden. Diese sind in der Promotorregion, auch für die Veränderung der Expression des Gens und seiner biologischen Funktion verantwortlich [4]. Dadurch könnte ein Zusammenhang mit MHC-assoziierten Erkrankungen erklärt werden. Von den gemäß Tabelle 1-1 hier vorzufindenden Polymorphismen BAT1-A, BAT1-B [17] und BAT1-C wird angenommen, dass der C/G SNP im BAT1-C mit dem MI assoziiert ist [57].

1.3.2 Das NFKBIL1-Gen und Protein

Das NFKBIL1-Gen ist auch als IKBL bekannt (NFKBIL1 : „encoding Nuclear Factor of Kappa

light polypeptide gene enhancer in B-cells, Inhibitor-Like-1“, IKBL : „Inhibitor of KappaB-Like“). Das NFKBIL1-Gen beinhaltet 4 Exonen und erstreckt sich über 11,2 kb. NFKBIL1 kodiert für ein Protein, das eine ähnliche Struktur mit den Mitgliedern der Inhibitoren-Proteinfamilie I κ B aufweist. NFKBIL1 beinhaltet, wie in Tabelle 1-1 gezeigt, die SNP NFKBIL1-A, NFKBIL1-B und NFKBIL1-C. Dabei ist schon für den T/A SNP des NFKBIL1-A Gens ein Zusammenhang mit dem MI in einer japanischen Population nachgewiesen worden [57]. Außerdem werden Polymorphismen dieses Gens auch mit rheumatoider Arthritis und Diabetes mellitus Typ 1 in Verbindung gebracht [53, 93].

NFKBIL1 nimmt eine besondere Stellung unter den Faktoren ein, die an den inflammatorischen Reaktionen [14, 89], an den Entwicklungsprozessen der Zelle, am Zellwachstum sowie am programmierten Zelltod beteiligt sind [24]. Das liegt einerseits daran, dass dieses Gen andere Gene beeinflusst, die wiederum Zytokine, Chemokine, Zelladhäsionsmoleküle und Akute-Phase-Proteine induzieren [13]. Daher kann NFKBIL1 als Transkriptionsfaktor für die Regulation der Genaktivität verantwortlich sein und eine stimulierende oder hemmende Funktion erfüllen. Andererseits wird vermutet, dass die Ähnlichkeit der von NFKBIL1 kodierten Proteine mit I κ B-Proteinen zu einer Regulation des Transkriptionsfaktors NF κ B führt.

1.3.3 Das LTA-Gen und Lymphotoxin- α

Das LTA-Gen befindet sich innerhalb der MHC-Klasse-III-Region neben NFKBIL1, enthält 4 Exonen und erstreckt sich über 2,01kb. Das LTA-Gen ist als möglicher genetischer Einflussfaktor für das Entstehen des MI [79], Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Arbeit.

Das LTA-Gen kodiert ein multifunktionelles, proinflammatorisch wirkendes Zytokin, Lymphotoxin- α , das zur TNF-Familie gehört. Das Lymphotoxin- α ist ein homotrimeres Protein, das sich jedoch mit Lymphotoxin- β auf Zelloberflächen zu Heterotrimeren verbinden

kann [7]. Lymphotoxin- α ist ein schweres Glykoprotein mit 21 bis 24kD [1, 54]. Lymphotoxin- α wird als Protein hauptsächlich aus aktivierten T-Zellen in geringen Mengen sezerniert. Seine Synthese wird bei schon vorhandenen Entzündungen von IL-2 und IFN unterstützt und verstärkt. Lymphotoxin- α nimmt bei Entzündungsprozessen eine aktive Stellung ein und wird bei atherosklerotischen Läsionen vermehrt produziert [50, 71].

In Zusammenhang mit einer möglichen Verknüpfung dieses Gens mit Entzündungsreaktionen war die Assoziation bestimmter Polymorphismen des LTA-Gens mit einer Anfälligkeit für koronare und zerebrale Atherosklerose, der Gegenstand kürzlich durchgeführter Studien [34, 81, 85]. Ebenfalls wurde eine Verbindung zwischen LTA und der MI-Pathogenese gefunden [56]. Eine weitere Korrelation mit dem MI wird aufgrund der, im Gen beinhalteten SNPs, LTA-A, LTA-B und LTA-C angenommen [57]. Diese Polymorphismen im inflammatorischen LTA Gen können auf seine Proteinfunktion sowohl quantitativ (mengenmäßig) als auch qualitativ (eigenschaftsmäßig) einwirken [77]. Ebenfalls ruft der C/A SNP LTA-C einen Austausch von Threonin mit Asparagin an der Aminosäureposition 26 beim Protein Lymphotoxin- α hervor. Dies beeinflusst über die mRNA die Synthese von Adhäsionsmolekülen, VCAM-1 auf Endothelzellen und Selectin E der Gefäß-Muskelzellen von Koronararterien [57]. VCAM-1 und Selectin E wurden mit den inflammatorischen Prozessen in Verbindung gebracht, die der Atherosklerose zugrunde liegen [5, 16].

1.4 Zielsetzung und Fragestellung

Das LTA-Gen ist mit Entzündungsreaktionen, koronaren sowie zerebralen Erkrankungen assoziiert worden. Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist eine Assoziationsstudie mit der Fragestellung, ob dieses Gen an der Auslösung des MI beteiligt ist. Das Ziel dieser Studie war es den Einfluss von Polymorphismen im LTA-Gen auf das Auftreten eines Myokardinfarkts zu untersuchen. Ein Zusammenhang kann zwischen diesen Polymorphismen und den am Atheroskleroseprozess mitbeteiligten inflammatorischen Reaktionen bestehen.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden als eine Fallkontrollstudie mit einer Kontrollgruppe von 1211 Individuen und einer MI-Gruppe von 3657 Individuen, in Zusammenarbeit des Deutschen Herzzentrums mit der 1. Medizinischen Klinik des Klinikums Rechts der Isar der Technischen Universität München durchgeführt.

Das LTA-Gen sowie die benachbarten Gene, BAT1 und NFKBIL1, wurden mittels des TaqMan Verfahrens, welches auf das Prinzip der Polymerasenkettenreaktion basiert, genotypisiert. Dabei wurden Primer als Startersequenzen und allelspezifische, Fluoreszenzfarbstoff-markierte DNA-Sonden verwendet. Die Daten von BAT1- und NFKBIL1-Genen wurden zur Bestimmung der Haplo- und Diplotypen zur Verfügung gestellt. Eine Haplo- und Diplotypanalyse wurde durchgeführt, weil somit ein möglicher Zusammenhang zwischen dem MI und der Allelkombination der einzelnen SNPs auf dem Chromosom 6 näher betrachtet werden konnte. Des Weiteren wurden die Genotyp-, Haplotyp- und Diplotypverteilungen in beiden Gruppen verglichen, um zu untersuchen, ob eine genetische Assoziation besteht.

Zusammenfassend sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Besteht eine Assoziation zwischen Polymorphismen des LTA-Gens und dem MI?

2. Gibt es einen Zusammenhang zwischen den Genotypen der LTA-SNPs und einem möglichen MI?
3. Besteht eine Assoziation zwischen den Haplotypen und dem MI?
4. Besteht eine Assoziation zwischen den Diplotypen und dem MI?
5. Falls Zusammenhänge nachweisbar sind, auf welche Art äußern sich diese und wie beeinflussen diese Polymorphismen die Entstehung des MI?

Haplotypen, deren Häufigkeiten und allelische Assoziationen bei den 9 SNPs wurden mit Hilfe eines Erwartungs- Maximierungs- und eines Monte Carlo- Algorithmus bestimmt. Im Weiteren wurden diese Verteilungen in der Kontroll- und MI-Ggruppe einer statistischen Analyse unterzogen.

2 Methoden

2.1 Studienpopulation

Für die Verwirklichung der vorliegenden Studie wurden 4868 Individuen untersucht. Die Studienteilnehmer stammen hauptsächlich aus dem süddeutschen Raum. Zwei Gruppen wurden zusammengestellt, eine Kontrollgruppe mit, in Hinsicht auf MI, gesunden Personen und eine Gruppe mit Myokardinfarktpatienten.

Die Kontrollgruppe bestand aus 1211 Personen, die weder in der Vergangenheit einen MI erlitten hatten noch Anzeichen auf einen akuten oder Verdacht auf einen möglichen MI aufzeigten. Der Ausschluss eines entsprechenden MI-Krankheitsbildes wurde zusätzlich durch Untersuchungen bekräftigt. Dabei zeigten die bildgebenden Verfahren für die angiographische Darstellung keine krankhaften Veränderungen der Koronararterien. Auch hat es bei den elektrokardiographischen Untersuchungen keinen Anhalt für Myokardinfarkt und keine Anzeichen für Abnormalitäten der regionalen Wandmotilität gegeben.

Die Gruppe der Patienten setzte sich aus 3657 Individuen zusammen. Auch hier wurden selbstverständlich jegliche Untersuchungen für die Bestätigungen dieses Krankheitsbildes durchgeführt. Eine ST-Elevation oder ein pathologisches Q im Elektrokardiogramm in Einbezug mit einem >20 Minuten lang anhaltenden Brustschmerz liefern positive Ergebnisse im Rahmen der Erfüllung der entsprechenden Bedingungen dieser Gruppe. Zur lokalisierten Infarktregion in der Abbildung des Elektrokardiogramms stehen im Verhältnis der angiographische Anhalt einer okklusivbedingten Verengung der Arterie in Zusammenhang mit dem Myokardinfarkt oder Abnormalitäten der Wandmotilität in dieser Region. Sogar beide Einflussfaktoren können zur selben Zeit disponibel sein.

Mithilfe der Institution der Ethikkommission wurde die Billigung für das Studienprotokoll

eingereicht. Alle an der Studie teilnehmenden Personen haben ein Aufklärungsblatt mit ihrer Einverständnisunterschrift vorgelegt, nachdem sie über die Studie aufgeklärt worden waren. Die anbringenden Studie und Forschung erfolgten gemäß der Prinzipien der Deklaration von Helsinki (<http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>)

2.2 Definitionen

Per Definition wird der arterielle Blutdruck dann als systemisch erhöht bezeichnet, wenn dessen Werte für den systolischen Blutdruck höher als 140 mm Hg und für den diastolischen Blutdruck höher als 90mmHg liegen [11]. Allerdings müssen diese Werte unter bestimmten Bedingungen, wie zum Beispiel während einer antihypertensiven Therapie oder unter mindestens 2 entsprechend wiederholten Messwertentnahmen erfasst worden sein.

Die Hypercholesterinämie gilt als Erkrankung und zugleich als kardiovaskulärer Risikofaktor. Sie liegt bei mehrmals gemessenen und erfassten Werten der Cholesterinkonzentration von mehr als 240 mg/ dl (bzw. 6,2 mmol/L) beim Patienten im nüchternen Zustand vor, oder wenn der Patient therapeutisch mit Medikamenteneinnahme zur Senkung seiner Cholesterinwerte behandelt wird.

Die Personen, die nicht nur gelegentlich, sondern regelmäßig in den vergangenen 6 Monaten Zigaretten konsumiert haben, wurden durch den Begriff „aktiver Raucher“ kenntlich gemacht.

Die Kennzeichnung mit dem Risikofaktor „Diabetes mellitus“ umfasst alle Patienten, bei denen eine Insulintherapie oder eine medikamentöse Therapie mit oralen Antidiabetika angewendet wurde. Unter Berücksichtigung der WHO Kriterien wurde den diätetisch eingestellten Diabetikern, den Patienten mit regelwidrigen erhöhten Blutzuckerwerten (≥ 140 mg/dl) im nüchternen Zustand, und/oder mit positivem Ergebnis beim

Glukosetoleranztest ebenfalls diese Diagnose zugeordnet [90].

2.3 DNA-Präparation

Genomische DNA wurde aus Leukozyten isoliert. Hierfür wurden speziell für derartige DNA-Präparation entwickelte Reagenzien der Hersteller Macherey–Nagel und Qiagen verwendet.

Die DNA-Gewinnung erfolgt durch Lyse der Zellen. Dabei wurde das Probenmaterial in einer chaotropischen Lösung mit Proteinase K bei Raumtemperatur inkubiert. Im Folgenden durchliefen die Proben einen reversiblen DNA-Bindungsprozess, der speziell für Nukleinsäuren geeignet ist. Hier binden sich ethanolreiche Puffer-Substanzen an das Lysat. Daraufhin wurde die DNA von jeglichen kontaminierenden Elementen in drei Schritten mit Ethanolpuffer gereinigt. Die reine DNA wurde isoliert und bis zur Verwendung bei -25°C gelagert.

2.4 Die TaqMan-Reaktion

Zur Bestimmung der Genotypen der SNPs wurde die auf der Polymerasenkettenreaktion basierende TaqMan Methode durchgeführt. Für die Auswahl der notwendigen Primern und Sonden, unter Bezugnahme auf die erwähnten Besonderheiten, wurde die Software „Primer Express“, verwendet.

2.4.1 Prozess der Polymerasenkettenreaktion

Mittels der Polymerasekettenreaktion (polymerase-chain-reaction, PCR), die in einem Thermocycler stattfindet, ist die Amplifikation eines DNA-Moleküls in kurzer Zeit durchführbar. Dabei haben die so genannten Primer eine bedeutende Funktion im Ablauf des PCR-Prozesses. Diese synthetischen Oligonukleotide werden als Startersequenzen

eingesetzt und sind zu je einem Strang des DNA-Abschnitts komplementär. Zusätzlich wird die Taq-Polymerase [70] benötigt. Dieses thermostabile Enzym ist für die Extension der Stränge während der PCR-Zyklen zuständig. Dabei werden gezielt ausgesuchte Bereiche exponentiell vervielfältigt. Hierfür sind 20 bis 40 Zyklen erforderlich.

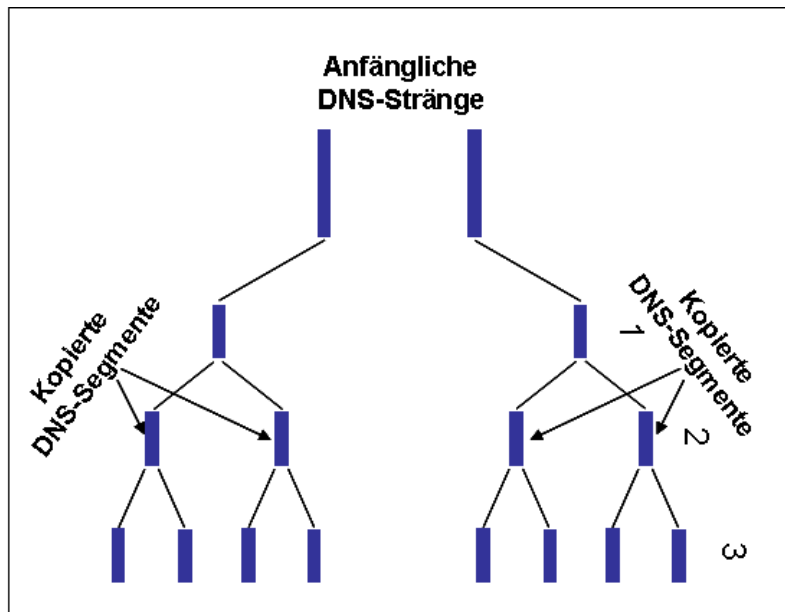


Abbildung 2-1 Schaubild der PCR-Zyklen

Jeder Zyklus ist eine Abfolge dreier Schritte, die im Weiteren erläutert werden. Alle Temperaturangaben entsprechen dem Standardprotokoll, wobei gewisse Abweichungen auftreten können.

1. Denaturierung:

Bei einer hohen Temperatur von 95°-96°C wird die Wasserstoffbrückenbindung zwischen den komplementären Strängen aufgebrochen. Auf diese Weise wird die spiralförmige DNA aufgedreht und die zwei Stränge werden voneinander getrennt, also die DNA denaturiert.

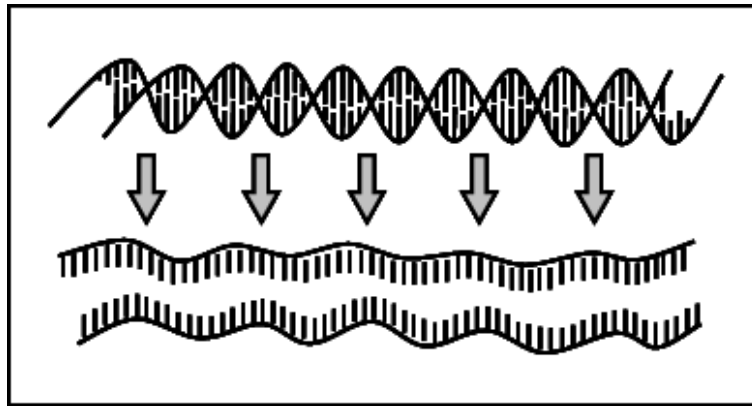


Abbildung 2-2 PCR – Prozess: Denaturierung

2. Hybridisierung (Annealing):

Hier sinkt die Temperatur, so dass sich die Primer spezifisch an den entsprechenden Stellen für das ausgewählte DNA-Segment anlagern können. Die Temperatur hängt während dieser Phase von den Primern ab und liegt normalerweise 25°C unter ihrem Schmelzpunkt, sonst besteht die Gefahr des Verlustes der Primer-Eigenschaften.

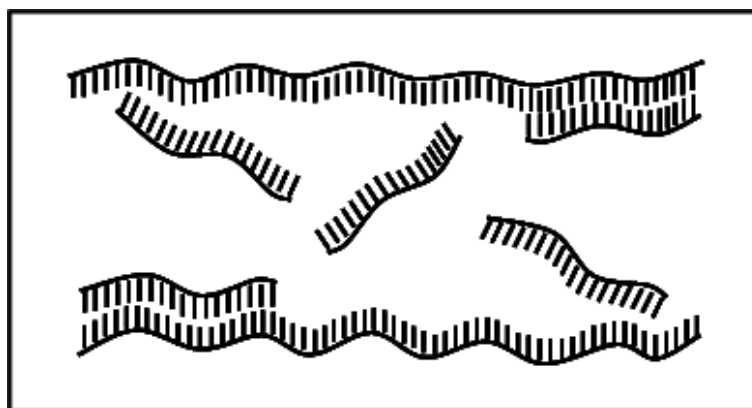


Abbildung 2-3 PCR – Prozess: Hybridisierung

3. Elongation / Verlängerung:

Die Primer legen den Startpunkt der DNA Synthese fest. Die DNA- Polymerase baut im Reaktionsmix vorhandene Nukleotide selektiv an die entstehenden DNA-Stränge an und katalysiert somit die Verlängerung der Primer. Die Dauer dieses Prozesses wird auch von

der Länge des DNA-Fragmentes, das mehrmals kopiert werden soll, beeinflusst. Die erforderliche Temperatur liegt zwischen 68°C und 72°C [52].

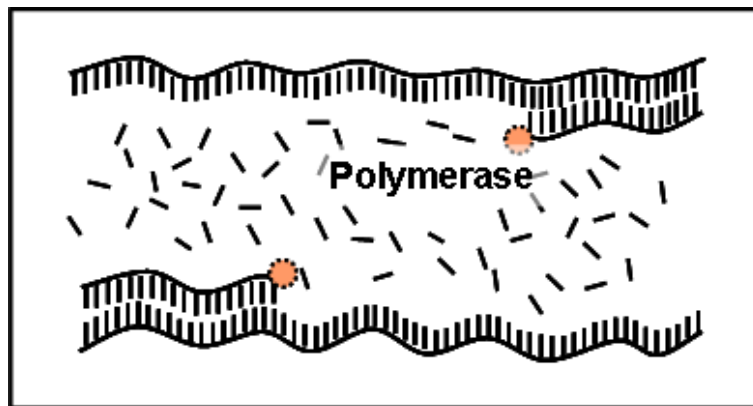


Abbildung 2-4 PCR – Prozess: Elongation

2.4.2 Ablauf der TaqMan-Reaktion

Die TaqMan Methode beruht auf der Fähigkeit der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der AmpliTaq DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) und der Verwendung von Primern, sowie allelspezifischen fluorogenen Sonden [43]. Ähnlich wie der Primer ist die TaqMan-PCR-Sonde ein Oligonukleotid. Sie verfügt zusätzlich über einen am 5'-Ende der Sonde verknüpften fluoreszierenden Reporter-Farbstoff und am 3'-Ende der Sonde aufgesetzten Quencher-Farbstoff (d.h. Löscher der Fluoreszenz). Der am 3'-Ende platzierte Quencher unterdrückt die Fluoreszenzfähigkeit (Quenching-Effekt) des am 5'-Ende positionierten Reporterfarbstoffs, solange beide Farbstoffe räumlich nicht getrennt werden. Nach einer geeigneten Lichtanregung emittieren diese Farbstoffe Licht einer spezifischen Wellenlänge.

Durch die räumliche Nähe von Reporter- und Quencher-Fluorophor kommt es nach Förster zu einem Fluoreszenz-Energietransfer (Fluorescence resonance energy transfer, FRET) [21]. Hierbei kann ein Energietransfer von einem Donorfluorophor (Reporter) zu einem Akzeptorfluorophor (Quencher) stattfinden. Je näher Reporter- und Quencher-Farbstoff zu einander liegen, desto größer ist das Maß der Effektivität des FRET und die Fluoreszenz des

Reporters bleibt im unterdrückten Zustand.

Die Abbildung 2-5 zeigt das Prinzip der TaqMan Methode.

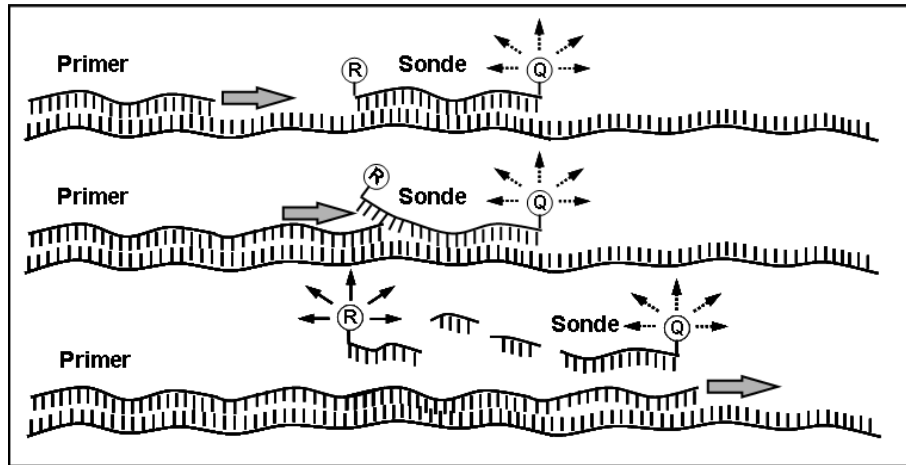


Abbildung 2-5 Darstellung des TaqMan PCR Verfahrens

Beim Ablauf dieses Verfahrens wird zuerst DNA denaturiert. Als nächstes hybridisieren Primer und Sonden unter bestimmten Temperaturbedingungen sequenzspezifisch mit dem DNA-Matrizenstrang. Die TaqMan-Polymerase bindet sich an den Primern und schreitet mit dem sich neu bildenden Strang so weit fort bis sie an die Sonden anstößt und diese dann verdrängt.

Durch die Verdrängung der Sonde erhält diese eine y-förmige Sekundärstruktur und es kommt zur Aktivierung der 5'-3'-Exonuklease der AmpliTaq DNA-Polymerase. Sie hydrolysiert und spaltet dabei die Sonde in einzelne Nukleotide, darunter auch den 5'-Reporter. Der Reporter emittiert dann Fluoreszenzlicht, da durch die nun erfolgte räumliche Trennung beider Farbstoffe, die Fluoreszenz des Reporters nicht mehr vom Quencher unterdrückt wird. Je mehr PCR Produkte sich mit jedem Zyklus aneinander akkumulieren, desto prägnanter und intensiver wirkt die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs.

Durch die Auswertung der allelspezifischen Fluoreszenzsignale werden die Genotypen bestimmt. Falls eine Hybridisierung der Sonden mit dem Matrizenstrang aufgrund eines Basenfehlers nicht stattfindet, werden die Sonden vom Anfang an verdrängt und nicht in

einzelne Nukleotide zerteilt, so dass der Quencher weiterhin die Fluoreszenzfähigkeit des Reporters unterdrückt. Damit wird eine Verfälschung der Ergebnisse vermieden.

2.5 Bestimmung der SNP-Genotypen mit der TaqMan Methode

Zur experimentellen Ermittlung der SNP-Genotypen wurden die relevanten Nukleotidsequenzen der Primer und TaqMan Sonden (siehe Tabelle 1-1) aus den Datenbanken des „European Molecular Biology Laboratory“ (EMBL) oder GenBank verwendet. Primers und Sonden wurden von Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland) synthetisiert. Detaillierte Daten über die Nukleotide und SNPs sind auf der Internetdatenbank des Nationalen Zentrums der Vereinigten Staaten für biotechnologische Informationen zu finden [51].

Für jedes der drei SNPs, LTA-A, LTA-B und LTA-C, fanden immer zwei Primer und zwei Sonden, wie Tabelle 2-1 zeigt, Verwendung. Diese Sonden waren jeweils für ein Allel spezifisch. Am Beispiel des LTA-B Polymorphismus sind die Allele A und G gegeben. Hier ist die eine Sonde für das Allel A mit dem FAM-Reporterfarbstoff (6-Carboxy-Fluorescein-Reporterfarbstoff) und die andere für das Allel G mit dem Reporterfarbstoff VIC (Applied Biosystems, Patent ausstehend) am 5'-Ende markiert. Am 3'-Ende der beiden Sonden war der Quencherfarbstoff TAMRA (6-Carboxytetramethylrhodamin) gebunden.

Das Verfahren wurde nach Ablauf von 40 Zyklen mit einem Denaturierungsprozess von einer konstant gehaltenen Temperatur von 95°C für 15s und einer Temperatur von 60°C für die Primer Hybridisierung und Extension für 1 min, erfolgreich abgeschlossen.

Tabelle 2-1 SNPs in BAT1, NFKBIL1 und LTA mit Nukleotidsequenzen der Primer und Sonden

SNP-Bezeichnung ^a	refSNP-ID	SNP-Position ^b	Primer (5' -> 3')	TaqMan Sonde (5' -> 3') ^c
BAT1-A	rs2075582	BAT1 3' benachbarte Region; 31602045 (T/C)	GGGTGGTGCCTGTATTTTCAGT CCAGAAGCTGAAGGAACAGATGA	FAM-AACTTAGGC <u>C</u> CTCCTCCAAGGCTCTC VIC-AACTTAGGC <u>C</u> CTCCTCCAAGGCT
BAT1-B	rs2075580	BAT1 intron 5; 31608312 (C/G)	CACCACCGTTTTTCATTATAGATTTCATATACT CCAGAAGGGTACTGTCTTCTCTTTCA	FAM-TTAGAATCTCC <u>C</u> CTATGACT VIC-TTAGAATCTCC <u>C</u> CTATGACT
BAT1-C	rs2239527	BAT1 5' benachbarte Region; 31614098 (C/G)	GGAGTAGAGGGGAAGCCTGCAA CTAAACAGGGAGAGCGCGTATG	FAM-AAGTGAAGGCA <u>G</u> ATTTCCCTCCTTCGT VIC-AAGTGAAGGCA <u>G</u> ATTTCCCTCCTTCG
NFKBIL1-A	rs2071592	NFKBIL1 5' benachbarte Region; 31619654 (T/A)	TCCAGGCTGGAGGAAATGG GTAACGCCCTCACAGTTCACT	FAM:TCCGTCCTCCACC <u>I</u> GCGTCTCT VIC-TCCGTCCTCCACC <u>A</u> GCGTCTCT
NFKBIL1-B	rs2239707	NFKBIL1 intron 2; 31629632 (T/C)	GGCAGAGCTGCCATCTTGAA GCCACCCTTCCATTGCTTTAA	FAM-TCCTGCTGGTCACTC <u>G</u> CTCCCT VIC-CCTGCTGGTCACTC <u>A</u> CTCCCTTGG
NFKBIL1-C	rs2516479	NFKBIL1 3'benachbarte Region; 31632639 (C/G)	CTGAGTCACCCCTTGGAATC GGCCCTGGCTTCTCTGA	FAM-CAGGCAGCA <u>G</u> GCATCCTGTCC VIC-CAGGCAGCA <u>G</u> GCATCCTGTCC
LTA-A	rs1800683	LTA exon 1;31644375 (G/A)	CCACTGCCGCTTCCCTCTATAAA GGTAGTCCAAAGCACGAAGCA	FAM-CCTGCTGTG <u>C</u> GGAGCCCCT VIC-ACCTGCTGTG <u>I</u> GGAGCCCCTG
LTA-B	rs909253	LTA intron 1; 31644617 (A/G)	CAGTCTCATTGTCTCTGTACACATTC GAAGAGACGTTTCAGGTGGTGTAT	FAM-TTTCTGCCATG <u>A</u> TTCTCTCTGTTCCC VIC-CTGTTTCTGCCATG <u>G</u> TTCTCTCTGTTCC
LTA-C	rs1041981	LTA exon 3; 31645088 (C/A)	CAGCACCCCAAGATGCATCT AGGTCAGGTGGATGTTTACCAATG	FAM-CACAGCA <u>C</u> CTCAAACCTGCTGC VIC-CACAGCAACCTCAAACCTGCTGCTC

^a Die SNPs sind in Richtung vom Telomer zum Zentromer des kurzen Arms von Chromosom 6 (6p21.3) geordnet dargestellt. ^b Zu beachten ist, dass die Orientierung von BAT1, vom Zentromer zum Telomer, entgegengesetzt der von NFKBIL1 und LTA ist. Die Nukleotidpositionen der SNPs auf Chromosom 6 sind aufgeführt (z.B. Nukleotid 31602045 im Fall des BAT1-A SNP). Das Nukleotid auf der linken Seite des Schreckstrichs ist das am häufigsten vorkommende Nukleotid in der polymorphischen Position. ^c FAM (6-carboxy-fluorescein) oder VIC (Farbstoff von Applied Biosystems) sind an den 5' Enden der Sonden-Oligonukleotide gebunden. Sonden-Sequenzen entsprechen dem kodierten Strang, mit Ausnahme der Sonden-Sequenzen, die für die Analysen der NFKBIL1-B und LTA-A SNPs verwendet wurden. Sie entsprechen dem nicht-kodierten Strang. Sonden, die für die Analyse von BAT1-B verwendet wurden, enthielten MGB Gruppen, die an ihren 3' Enden gebunden waren. Die allelspezifischen Nukleotide sind in der Sequenz jeder Sonde unterstrichen. In dieser Arbeit wurden nur Bestimmungen für die LTA-SNPs durchgeführt. Die Daten der restlichen SNPs wurden für die Haplo- und Diplotypbestimmungen zur Verfügung gestellt.

2.5.1 Beschreibung des Verfahrens

Zur Versuchsdurchführung wurden insgesamt 22µL an Reaktionsvolumen jeder der sechsundneunzig (96) Vertiefungen einer Mikrotiterplatte zugeführt. Diese Menge bestand, zusätzlich zu deionisiertem Wasser, aus 11 µL des 2x TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), einer 300 nmol/L Lösung jeweils vom Vorwärts- und Rückwärts-Primer, einer 50-200 nmol/L Lösung jeweils von den FAM und VIC Sonden (Applied Biosystems) und 2 µl mit gelösten 30-100 ng von der genomischen DNA oder weiteren 2µl Wasser als Negativkontrolle. Der Versuchsträger wurde mit einer Abdeckung versehen.

Die ersten 8 Stellen der Mikrotiterplatte wurden mit der Negativkontrolle belegt, die nächsten 8 mit Standard-DNA für Allel 1, 8 für Allel 2, gefolgt von den restlichen 72 Proben mit unbekanntem Genotyp.

Für die Durchführung des TaqMan PCR-Verfahrens wurden die GenAmp PCR Systeme 9600 beziehungsweise 9700 von Applied Biosystems oder des MultiCycler PTC 220 Dyad von Biozym Diagnostik GmbH aus Deutschland eingesetzt. Dabei wird die Fluoreszenz der jeweiligen Farbstoffe mit Hilfe dieser Real-time-PCR-Geräten im geschlossenen Reaktionsgefäß Zyklus für Zyklus erfasst.

Aus der anschließenden automatisierten Genotypanalyse und -bestimmung im ABI PRISM 7700 SDS (Sequence Detection System, Applied Biosystems) ergaben sich die gewünschten Ergebnisse. Ein anschauliches Beispiel für die Ausgabe von Ergebnissen im SDS, ist in Abbildung 2-6 dargestellt.

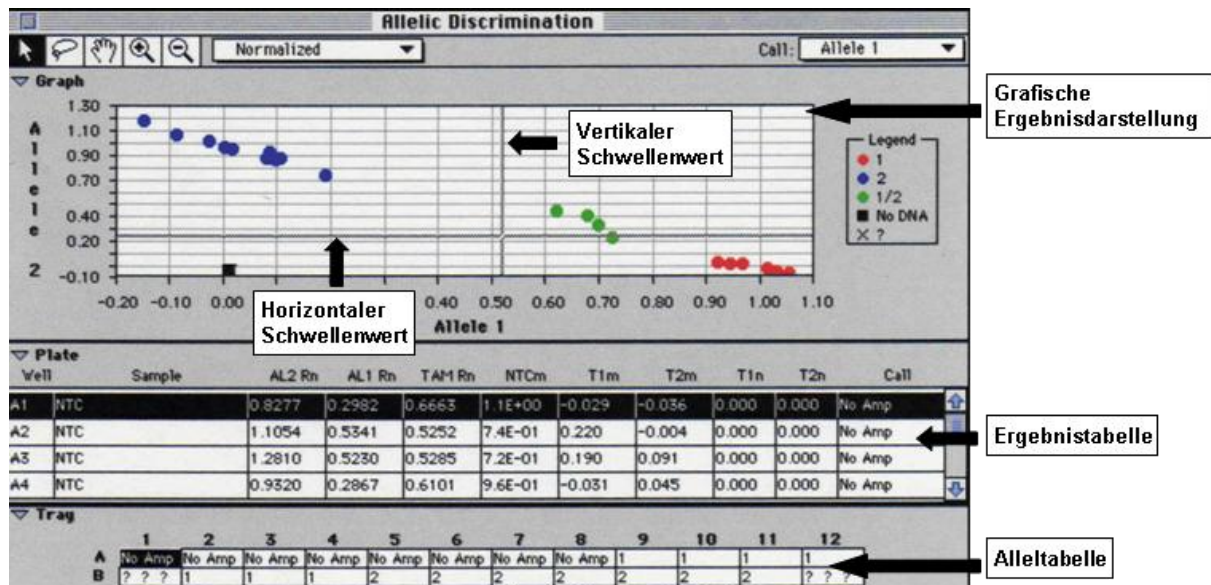


Abbildung 2-6 Darstellung der Allel-Diskrimination im SDS 7700

In der Ergebnistabelle aus Abbildung 2-6 sind alle Daten, die zur Allelbestimmung führen, wiedergegeben. In den Spalten AL1 Rn, AL2 Rn und TAM Rn sind die normalisierten Reporter-Werte der drei einzelnen Farbkomponenten aus den gemessenen Fluoreszenz-Rohdaten jeder Probe gezeigt. Die Fluoreszenz-Rohdaten werden dafür in ihre FAM (AL1)-, VIC (AL2)-, TAMRA (TAM)-Komponenten zerlegt und in vorliegender Arbeit auf die Fluoreszenz-Werte des Quencher-Farbstoffs TAMRA normalisiert.

Aus den gezeigten normalisierten Reporter-Werten und unter Verwendung der 24 Proben mit den drei Kontrollreaktionen NTC (Negativkontrolle), AL1 (Allel1) und AL2 (Allel2), wird ermittelt, inwieweit eine Probe mit unbekanntem Genotyp diesen Kontrollreaktionen entspricht. Das Ergebnis ist in der Ergebnistabelle aus den Spalten NTCm, T1m und T2m ersichtlich. Die Werte aus den Spalten T1m und T2m werden auf die Werte aus Spalte NTCm normalisiert und in den Spalten T1n und T2n jeweils ausgegeben. In der Spalte Call wird entweder der bestimmte Genotyp oder das Ausbleiben der Amplifikation angezeigt.

Die normalisierten Werte der Spalten T1n und T2n aus der Ergebnistabelle sind in der grafischen Ergebnisdarstellung, wie in Abbildung 2-6 zu sehen ist, angezeigt. Hier sind

ebenfalls die, aus der Verteilung der Tn-Werte berechneten Schwellenwerte zur automatischen Allelbestimmung zu sehen. Diese Schwellenwerte unterteilen das gezeigte Diagramm in vier Quadranten, die sich für die Allelbestimmung ergeben:

- Allel 1: Kleiner als der horizontale-, aber größer als der vertikale Schwellenwert
- Allel 2: Größer als der horizontale aber kleiner als der vertikale Schwellenwert
- Heterozygot 1/2: Größer als beide Schwellenwerte
- Sind die normalisierten Ergebnisse kleiner als beide Schwellenwerte, so erfolgt keine automatische Allelbestimmung.

Die Alleltabelle aus Abbildung 2-6 gibt das Ergebnis der Analyse für alle Proben auf einen Blick wieder.

2.5.2 Kontrolle der Richtigkeit der SNP Genotypisierung

Vor der Genotypisierung der neun SNPs mit dem TaqMan-Assay bei den 1211 Probanden wurden zur Kontrolle der korrekten Genotypbestimmung die PCR-Produkte mit Hilfe von Restriktionsenzymen wie Hin6I (für LTA-A, von MBI Fermentas), NcoI (für LTA-B, von Roche Applied Science), und HpyCH4III (für LTA-C, von New England Biolabs) und nach Auftrennung in PAA- Gelen analysiert.

2.5.3 Verwendete Geräte und Materialien

Geräte

PCR-Geräte:

Gene Amp PCR System 9600	Applied Biosystems , Weiterstadt
Gene Amp PCR System 9700	Applied Biosystems, Weiterstadt
Multicycler PTC 220 Dyad	Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf
ABI Prism 7700 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Weiterstadt

Zentrifugen:

Zentrifuge CR3-12	Jouan, St. Herblain, Frankreich
Zentrifuge A 14	Jouan, St. Herblain, Frankreich
Biofuge fresco	Instruments, Hanau

Mixer:

Vortexer	Genio2 TM Bender & H Obein AGV Zürich, Schweiz
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg

Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Primer und Sonden

Primer und Sonden für die TaqMan-Reaktionen	Applied Biosystems, Weiterstadt
---	---------------------------------

Reaktionslösung:

Taq Man Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Weiterstadt
----------------------------------	---------------------------------

PCR-Reaktionsplatten:

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Weiterstadt
MicroAmp Optical Caps (8 Caps/Strip)	Applied Biosystems, Weiterstadt

2.6 Haplotypbestimmung

Im Rahmen dieser Arbeit sind die drei Polymorphismen des LTA-Gens bestimmt worden. Für die Haplotypanalyse wurden die Daten der anderen sechs SNPs, BAT1-A, BAT1-B, BAT1-C, NFKBIL1-A, NFKBIL1-B und NFKBIL1-C, zur Verfügung gestellt. Die Berechnung der Haplotypen wurde von Dr. Arne Pfurfer (Institut für Genetik, GSF Forschungszentrum Neuherberg) durchgeführt.

Um eine mögliche paarweise Assoziation der Allele aus den ermittelten Daten der diploiden Genotypen bei den Kombinationen der 9 SNPs nachzuweisen, wurde ein Verfahren zur Bestimmung der maximalen Wahrscheinlichkeit (maximum-likelihood estimation, MLE) verwendet, das auf dem Erwartungs-Maximierungsalgorithmus (EM-Algorithmus) basiert.

Unter Anwendung dieses Algorithmus im Programm LDmax, das im GOLD-Softwarepaket [2] beinhaltet ist, wurden zwei Werte für die Koppelung zwischen Allelen, auch als „linkage disequilibrium“ (LD) bezeichnet, berechnet [49]. Einerseits wird der Lewontin's Disequilibrium Koeffizient D' bestimmt, welcher, wenn eine von den vier möglichen Nukleotidkombinationen zweier Polymorphismen nicht in Erscheinung tritt, seinen Maximalwert von 1 annimmt. Das andere resultierende Maß dieser Abhängigkeit der Allelen, der Parameter $|r|$, erreicht sein Maximum von 1, wenn zwei von den vier möglichen Nukleotidkombinationen zweier Polymorphismen nicht beobachtet wird. Um darüber hinaus einen Vergleich des mittleren Fehlers bei der Auswertung mit verschiedenen Verfahren zu gestatten, wurden diese Analyse auch mit einem „Markov Chain“-Monte Carlo Algorithmus, wie er in der Software PHASE implementiert wurde, durchgeführt [74]. Dabei werden Haplotypen numerisch „in silico“ rekonstruiert, die genetisch den beobachteten Haplotypen ähnlich sind.

Eine Abwandlung des Erwartungs-Maximierungsalgorithmus (EM-Algorithmus) mit der Bezeichnung „Partition Ligation EM“, wurde ausgewählt, um Haplotypen und Haplotyp-Häufigkeiten zu bestimmen und aus den Genotypdaten der SNPs auf das Haplotyp-Verteilungsschema zu schließen [19, 64]. Dabei wurde hauptsächlich die dafür geeignete Software PL-EM [64] verwendet. Auch hier wurde, parallel dazu, durch Anwendung der Programme LDmax und PHASE, eine qualitative Aussage über die resultierenden mittleren Fehler bei der Auswertung ermöglicht. Der Haplotypblock wurde gemäß den Kriterien von Gabriel [23] definiert.

2.7 Statistische Analyse

Die zwei Gruppen, die Kontroll- und Patientengruppe, wurden in Hinsicht auf die Bestimmung der Verteilung der Genotypen und der auftretenden Häufigkeit der jeweiligen Haplotypen statistisch analysiert und verglichen. Alle diskreten Variablen, die als Zahl und entsprechendem Prozentanteil erfasst wurden, verglich man mit Hilfe des Chi-Quadrat-

Anpassungstests. Dagegen hat man für die, als Mittelwert mit Standardabweichung (\pm SD) bestimmte kontinuierliche Variable des Alters der Personen, den nicht gepaarten, zweiseitigen t-Test angewandt. Für diese statistischen Auswertungen sind P-Werte unter 0,05 als signifikant deklariert worden.

Eine multiple logistische Regressionsanalyse wurde durchgeführt und die angepassten Wahrscheinlichkeitsquoten („odds ratios“) sowie deren 95%-tige Konfidenzintervalle (95% KI) wurden ermittelt.

Die Multivarianzanalyse wurde unter Berücksichtigung der potentiell interferierenden Faktoren, Alter, Geschlecht, arterielle Hypertension, Hypercholesterinämie, Rauchen, und Diabetes mellitus durchgeführt.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit steht die Bestimmung der drei LTA SNPs, LTA-A, LTA-B und LTA-C im Vordergrund. Die Daten der restlichen SNPs, BAT1-A, BAT1-B, BAT1-C, NFKBIL1-A, NFKBIL1-B und NFKBIL1-C, wurden für Haplo- und Diplotypanalysen zur Verfügung gestellt.

3.1 *Patientencharakteristika*

In der vorliegenden Studie wurden 4868 Individuen anhand der drei Polymorphismen, LTA-A, LTA-B und LTA-C, untersucht. 1211 Individuen der Population wurden als Kontrollgruppe bezeichnet, diese waren hinsichtlich eines Myokardinfarktes gesunde Individuen. Es wurde ein Vergleich mit einer Patientengruppe gezogen. Diese Gruppe setzte sich aus 3657 Patienten zusammen, die einen Myokardinfarkt in der Vergangenheit erlitten hatten oder Symptome eines akuten MI zeigten. Die klinischen Charakteristika der Individuen der Kontroll- und der Patientengruppe, wie sie in Tabelle 3-1 dargestellt sind, wurden für die folgende vergleichende Betrachtung herangezogen.

Unter den klinischen Eigenschaften der Kontrollgruppe und der Patienten mit MI ist zu vermerken, dass in der Gruppe der Myokardinfarktpatienten das mittlere Alter mit 64 Jahren höher als in der Kontrollgruppe (60,3) liegt. Im Weiteren ist der Anteil der Frauen in der Patientengruppe (24,2%) niedriger als in der Kontrollgruppe (49,4%)

In der Tabelle 3-1 fällt weiterhin ein erhöhter Anteil an arterieller Hypertension (61,4% vs. 48,6%), Hypercholesterinämie (56,5% vs. 49,7%), Nikotinabusus (50,6% vs. 15,2%) und Diabetes mellitus (20,6% vs. 5,4%) in der Myokardinfarktgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Diese klinischen Charakteristika zählen zu den Risikofaktoren für kardiovaskulären Erkrankungen.

Tabelle 3-1 Klinische Eigenschaften der Kontrollgruppe und der Patienten mit MI

	Kontrollgruppe (n=1211)	Patientengruppe mit Myokardinfarkt (n=3657)	p
Alter (Jahre)	60,3±11,9	64,0±12,0	<0,0001
Frauen	598 (49,4 %)	885 (24,2 %)	<0,0001
Arterielle Hypertension	589 (48,6 %)	2246 (61,4 %)	<0,0001
Hypercholesterinämie	602 (49,7 %)	2067 (56,5 %)	<0,0001
Aktiver Raucher	184 (15,2 %)	1849 (50,6 %)	<0,0001
Diabetes mellitus	65 (5,4 %)	754 (20,6 %)	<0,0001

Das Alter ist als Mittelwert mit resultierender Abweichung erfasst, während alle anderen Parameter sowohl in Anzahl als auch Prozentsatz dargestellt werden.

3.2 Genotypverteilung der drei Polymorphismen

Die Verteilung, der auf den drei Polymorphismen, aus der BAT1-NFKBIL1-LTA-Region, beruhenden Genotypen in der Kontroll- und der MI-Gruppe ist in Tabelle 3-2 dargestellt.

Bei den drei SNPs, LTA-A, LTA-B und LTA-C, liegt bei den seltenen Genotypen ein um ca. 2% höherer Anteil in der Kontrollgruppe im Verhältnis zur Patientengruppe vor. Umgekehrte Verhältnisse herrschen entsprechend für die häufigen Genotypen, die homozygoten Träger des häufigen Allels kommen tendentiell in der Patientengruppe öfters vor. Die Anteile der Heterozygoten sind in beiden Gruppen fast gleich. Die dabei resultierenden Signifikanzwerte liegen über dem Signifikanzniveau, so dass bei allen drei SNPs ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der MI- Gruppe nicht vorliegt. Der p- Wert liegt bei LTA-A und LTA- C bei 0,11. Ein p- Wert von 0,057 ist besonders beim SNP LTA-B nicht zu übersehen.

Weitergehend werden gesondert die auftretenden Häufigkeiten der seltenen Genotypen und die der dazugehörigen Allele, wie sie in der Kontroll- und der MI-Gruppe vorkommen, in Tabelle 3-3 gezeigt.

Der seltene Genotyp aller hier aufgeführten SNPs ist in der Kontrollgruppe häufiger anzutreffen als in der Patientengruppe. Dabei lässt sich beim Vergleich der zwei Gruppen ein größerer Unterschied von um die 2% bei der Verteilung des seltenen Genotyps von LTA-A, LTA-B und LTA-C nachweisen. Daraus resultieren Signifikanzwerte zwischen 0.045 und 0.02. Der niedrigste p-Wert tritt dabei mit 0,020 für den GG seltenen Genotyp des Polymorphismus LTA-B auf.

Bei der näheren Betrachtung der Verteilung der seltenen Allele für die drei SNPs wird festgestellt, dass das seltene Allel stärker in der Kontroll- als in der MI- Gruppe vertreten ist. Auch hier überwiegt der Anteil des seltenen Allels in der Kontrollgruppe mit ungefähr 2%

gegenüber dem Anteil in der MI-Gruppe. Hier macht sich das seltene Allel G des SNP LTA-B mit einem statistisch signifikanten Unterschied bemerkbar, der p-Wert liegt bei 0,048.

Die Genotyp- sowie Allelverteilung der restlichen 6 SNPs, BAT1-A, BAT1-B, BAT1-C, NFKBIL1-A, NFKBIL1-B und NFKBIL1-C wurde ebenfalls in den beiden Gruppen ermittelt, die Daten wurden zur Verfügung gestellt. Von den 6 SNPs weisen nur die zwei, nämlich BAT1-C und NFKBIL1-A, eine ähnliche Genotyp- und Allelverteilung wie die LTA-SNPs in der Kontroll- und Patientengruppe auf.

Auch bei diesen beiden SNPs war der Anteil des seltenen Genotyps stärker in der Kontrollgruppe präsent. Ebenfalls liegt hier eine Tendenz zugunsten der homozygoten Träger des häufigen Allels in der Patientengruppe. Der Anteil an Heterozyoten bleibt wie bei den LTA-SNPs gleich. Die Signifikanzwerte liegen bei BAT1-C und NFKBIL1-A über dem Signifikanzniveau. Bezüglich der Verteilung des seltenen Genotyps in beiden Gruppen ist eine auftretende Häufigkeit sowohl bei BAT1-C als auch bei NFKBIL1-A in der Kontrollgruppe festzustellen. Hierbei zeigen sich signifikante Werte, beim seltenen Genotyp GG von BAT1-C ein Wert von 0,024 und beim seltenen Genotyp AA von NFKBIL1-A ein Wert von 0,027. Auch die Verteilung des seltenen Allels in beiden Gruppen fällt mit dem erhöhten Anteil in der Kontrollgruppe im Vergleich zur Patientengruppe auf. Ein signifikanter Wert ist hierbei nicht vorhanden.

Die drei im Rahmen dieser Arbeit untersuchten SNPs, LTA-A, LTA-B und LTA-C, und die 6 weiteren SNPs, BAT1-A, BAT1-B, BAT1-C, NFKBIL1-A, NFKBIL1-B und NFKBIL1-C, deren Genotypdaten zur Verfügung gestellt wurden, bilden die Grundlage für die Haplo- und Diplotypanalyse der BAT1-NFKBIL1-LTA-Region, deren Resultate im Folgenden gezeigt werden.

Tabelle 3-2 Genotypverteilung der Kontroll- und der Patientengruppe in der BAT1-NFKBIL1-LTA Genregion

Polymorphismus	Genotyp	Kontrollgruppe (n=1211)	Patientengruppe mit Myokardinfarkt (n=3657)	p
LTA-A (rs1800683)	GG	560 (46,2 %)	1757 (48,0 %)	0,11
	GA	521 (43,0 %)	1580 (43,2 %)	
	AA	130 (10,7 %)	320 (8,8 %)	
LTA-B (rs909253)	AA	558 (46,1 %)	1760 (48,1 %)	0,057
	AG	521 (43,0 %)	1580 (43,2 %)	
	GG	132 (10,9 %)	317 (8,7 %)	
LTA-C (rs1041981)	CC	558 (46,1 %)	1758 (48,1 %)	0,11
	CA	523 (43,2 %)	1577 (43,1 %)	
	AA	130 (10,7 %)	322 (8,8 %)	

Die erfassten Variablen sind als Anzahl und Prozentanteil der Individuen mit entsprechendem Genotyp in der Kontroll- und der Patientengruppe aufgeführt.

Tabelle 3-3 Verteilung der seltenen Allele und Genotypen der Kontroll- und der Patientengruppe in der BAT1-NFKBIL1-LTA Genregion

Polymorphismus	Seltenes Allel	Kontrollgruppe (2422 Allele)	MI-Gruppe (7314 Allele)	Odds ratio (95% CI)	p	Seltener Genotyp	Kontrollgruppe (n=1211)	MI-Gruppe (n=3657)	Odds ratio (95% CI)	p
LTA-A	A	781 (32,2)	2220 (30,4)	0,92 (0,83-1,01)	0,080	AA	130 (10,7)	320 (8,8)	0,80 (0,64-0,99)	<u>0,039</u>
LTA-B	G	785 (32,4)	2214 (30,3)	0,91 (0,82-1,00)	<u>0,048</u>	GG	132 (10,9)	317 (8,7)	0,78 (0,63-0,96)	<u>0,020</u>
LTA-C	A	783 (32,3)	2221 (30,4)	0,91 (0,83-1,01)	0,070	AA	130 (10,7)	322 (8,8)	0,80 (0,65-1,00)	<u>0,045</u>

Die erfassten Variablen sind als Anzahl und Prozentanteil der Individuen mit entsprechendem Allel und Genotyp in der Kontroll- und der Patientengruppe aufgeführt. Signifikante p-Werte ($p < 0,050$) sind unterstrichen dargestellt.

3.3 Ergebnisse der Haplotyp-Verteilung

Nachdem die einzelnen Polymorphismen untersucht wurden, schließt sich hier die Betrachtung der unterschiedlichen Haplotypen an. Ein Haplotyp ist als eine Kombination der Allele von einzelnen SNPs auf einem Chromosom definiert. In dieser Arbeit werden jeweils 3 SNPs aus der BAT1-NFKBIL1-LTA-Region untersucht. Deren Allele liegen auf dem Watson Strang von Chromosom 6 (5'p→3'q) und wurden in der gleichen Weise geordnet, wie die entsprechenden Polymorphismen auf dem Chromosom 6. Es sind folgende SNPs der Reihe nach angeordnet: BAT1-A, BAT1-B, BAT1-C, NFKBIL1-A, NFKBIL1-B, NFKBIL1-C, LTA-A, LTA-B, LTA-C.

Die fünf häufigsten Haplotypen sind in Tabelle 3-4 dargestellt. Sie repräsentierten mehr als 90% der Individuen. Die restlichen vorkommenden Haplotypen wurden aufgrund ihres geringen Anteils in der Studienpopulation nicht betrachtet.

Der häufigste Haplotyp, Haplotyp 1, beinhaltet das seltene Allel der fünf SNPs, BAT1-C, NFKBIL1-A, LTA-A, LTA-B und LTA-C. Beim Vergleich zwischen den beiden Gruppen ist der relative Anteil des Haplotyps 1 in der Kontrollgruppe mehr als 2% größer als in der MI-Gruppe. Es ergibt sich dabei ein signifikanter p-Wert von 0,015.

Haplotyp 2 ist mit fast gleichen Prozentanteilen in beiden Gruppen vertreten, während Haplotyp 3 häufiger in der Kontrollgruppe zu finden ist. Ein Überwiegen der vorkommenden Häufigkeiten für die Haplotypen 4 und 5 ist auf Seite der Patientengruppe zu erkennen. Die bei den Haplotypen 2 bis 5 auftretenden Differenzen in der auftretenden Häufigkeit zwischen den beiden Gruppen sind kleiner als 1,1%. Haplotyp 2 beinhaltet nur das seltene Allel des SNP NFKBIL1-C, während bei Haplotyp 5 nur das seltene Allel von SNP NFKBIL1-B vorkommt. Haplotyp 3 enthält vier seltene Allele der SNPs BAT1-A, BAT1-B, NFKBIL1-B und NFKBIL1-C. Dagegen ist Haplotyp 4 die einzige Allelkombination, die sich nur aus häufigen

Allelen der neun SNPs zusammensetzt. Hierbei ist zu vermerken, dass keiner dieser vier Haplotypen seltene Allele der fünf, im Kapitel 3.2 mehrmals erwähnten SNPs BAT1-C, NFKBIL1-A, LTA-A, LTA-B und LTA-C enthält. Die sich ergebenden p-Werte der Haplotypen 2 bis 5 liegen weit oberhalb des signifikanten Grenzwertes.

Tabelle 3-4 Haplotypfrequenzen

Haplotyp		Kontrollgruppe	Gruppe mit MI	
Nr.	Allelkombination	2422 Haplo- typen	7314 Haplo- typen	p
1	T C G A T C A G A	718 (29,6)	1981 (27,1)	<u>0,015</u>
2	T C C T T G G A C	509 (21,0)	1544 (21,1)	0,92
3	C G C T C G G A C	489 (20,2)	1437 (19,6)	0,56
4	T C C T T C G A C	264 (10,9)	875 (12,0)	0,16
5	T C C T C C G A C	236 (9,7)	761 (10,4)	0,35

BAT1-A	BAT1-B	BAT1-C	NFKBIL1-A	NFKBIL1-B	NFKBIL1-C	LTA-A	LTA-B	LTA-C
--------	--------	--------	-----------	-----------	-----------	-------	-------	-------

Die erfassten Variablen sind als Anzahl und Prozentanteil der Individuen mit entsprechendem Haplotyp in der Kontroll- und der Patientengruppe dargestellt. Dabei sind die seltenen Allele gelb gekennzeichnet. Der signifikante p-Wert ($p < 0,050$) ist unterstrichen dargestellt.

3.4 Ergebnisse der Diplotyp-Verteilung

Als Nächstes wurde die Relation der Diplotypen mit dem Myokardinfarkt untersucht. Ein Diplotyp ist als die Kombination aus zwei Haplotypen definiert. Die Verteilung der 5 häufigsten Diplotypen in der Kontrollgruppe und MI- Gruppe wird in Tabelle 3-5 gezeigt.

Der Diplotyp I, kombiniert von Haplotyp 1 mit Haplotyp 1, ist in der Kontrollgruppe gegenüber der MI- Gruppe mit einem relativen Unterschied von mehr als 2% häufiger anzutreffen. Aus der Verteilung des Diplotyp I in den beiden Gruppen ergibt sich ein deutlich signifikanter Unterschied. Der signifikante p- Wert liegt bei 0,0047.

Die Diplotypen II und III zeigen geringfügige Differenzen in deren Verteilung in den beiden Gruppen. Die restlichen Diplotypen IV und V weisen eine annähernd gleich auftretende Häufigkeit in der Kontrollgruppe und MI- Gruppe auf. Es zeigen sich p-Werte, die zwischen 0,14 und 0,99 variieren, daraus ergibt sich kein signifikanter Unterschied bei der Diplotypverteilung zwischen beiden Gruppen und somit keine Assoziation mit dem MI.

Eine multiple logistische Regressionsanalyse zeigte, dass der Diplotyp I mit einem unabhängigen, protektiven Effekt gegen den MI assoziiert ist. (Genetischer Effekt 0,78;95%, Konfidenzintervall 0,62-0,99; $p= 0,043$). Die Multivarianzanalyse wurde unter Berücksichtigung der potentiell interferierenden Faktoren Alter, Geschlecht, arterielle Hypertension, Hypercholesterinämie, Nikotinabusus und Diabetes mellitus durchgeführt.

Tabelle 3-5 Verteilung der Diplotypen

Diplotyp	Haplotyp-Kombination	Kontrollgruppe (n = 1211)	Gruppe mit MI (n = 3657)	p
I	1-1	113 (9,3)	251 (6,9)	<u>0,0047</u>
II	1-2	154 (12,7)	451 (12,3)	0,73
III	1-3	139 (11,5)	365 (10,0)	0,14
IV	1-5	74 (6,1)	223 (6,1)	0,99
V	2-3	86 (7,1)	275 (7,5)	0,63

Die Variablen sind als Anzahl und Prozentanteil der Individuen in der Kontroll- und der Patientengruppe dargestellt. Der signifikante p-Wert ($p < 0,050$) ist unterstrichen dargestellt.

4 Diskussion

Die Genotypverteilung in der Kontroll- und Myokardinfarkt-Gruppe zeigt für den SNP LTA-B der drei untersuchten Polymorphismen des LTA-Gens einen annähernd signifikanten Wert. Bei der Betrachtung der Genotypen ergeben sich für die seltenen Homozygoten der SNPs, LTA-A, LTA-B und LTA-C, signifikante p-Werte hinsichtlich einer Assoziation mit dem MI. Das Gleiche ist auch für die SNPs BAT1-C und NFKBIL1-A zu beobachten. Dies folgt aus Daten für die Gene BAT1 und NFKBIL1, die zwecks Haplotyp- und Diplotypbestimmung zur Verfügung gestellt wurden. Bei der Untersuchung der seltenen Allele der drei LTA-SNPs erzielt nur das G Allel von LTA-B einen signifikanten p-Wert. Im Weiteren zeigt Haplotyp 1 bei der Haplotypverteilung ein signifikantes Ergebnis bezüglich einer Assoziation mit dem MI-Krankheitsbild. Dieser Haplotyp beinhaltet zugleich die seltenen Allele aller fünf zuvor erwähnten SNPs, BAT1-C, NFKBIL1-A, LTA-A, LTA-B und LTA-C. Auch Diplotyp I, zusammengesetzt aus Haplotyp1 und Haplotyp1, weist bei der Diplotypverteilung der untersuchten Individuen eine Signifikanz auf.

4.1 Vergleich zwischen der Kontroll- und der MI-Gruppe

Zu der vorliegenden Studie wurde eine grosse Population herangezogen. Um trotz der hohen Anzahl der Personen die Qualität zu erhalten, wurden bei der Auswahl der Individuen der Kontroll – und Patientengruppe rigorose Kriterien angewandt. Die Prüfung dieser Kriterien wurde unter anderem auch durch Koronarangiographien der untersuchten Personen unterstützt.

Ebenfalls zur Güte der Resultate trug die Anwendung des TaqMan-Verfahrens. wobei nicht die Notwendigkeit nach einer weiteren Verarbeitung der PCR Produkte nach dem Ablauf dieses Verfahrens besteht. Zusätzlich erlaubt die ABI PRISM 7700 Sequence Detection eine

schnelle Analyse von einer großen Anzahl von Proben. Jedoch gewährleistet das TaqMan Assay sowohl im Spektrum der Anwendungsmöglichkeiten als auch bei der Geschwindigkeit der Versuchsdurchführung, der Auswertung sowie der Güte der Ergebnisse sehr gute Leistungen.

In der resultierenden Genotypverteilung liegt der Schwerpunkt der vorkommenden Häufigkeit der seltenen Genotypen bei den drei LTA-SNPs, verstärkt in der Kontrollgruppe. Hierbei tritt eine eindeutige Signifikanz aus dem erwähnten Verhältnis der Individuenanteile zwischen Kontroll- und MI-Gruppe auf. Am deutlichsten gilt dies für den seltenen Genotyp des LTA-B SNPs mit dem höchsten Maß an Signifikanz. Daraus lässt sich schliessen, dass ein Zusammenhang dieser seltenen Genotypen mit einem protektiven Effekt hinsichtlich des MI bestehen könnte. Ebenfalls zeigt sich bei der Verteilung der seltenen Allele nur bei dem seltenen G-Allel des LTA-B SNPs ein signifikantes Ergebnis.

Bei der Auswertung der Haplotypen ist die Auswirkung der Kombination der seltenen Allele der fünf SNPs, BAT1-C, NFKBIL1-A, LTA-A, LTA-B und LTA-C, in Haplotyp1 ersichtlich. Denn nur bei diesem Haplotyp ist eine protektiv wirkende Assoziation mit dem MI aufgrund der sich ergebenden Signifikanz und der vergleichsweise höheren Anteile in der Kontrollgruppe zu beobachten. Diplotyp I, der sich aus zwei Haplotypen1 zusammensetzt, weist ebenfalls das einzig signifikante Resultat hinsichtlich eines Zusammenhangs zwischen den untersuchten Diplotypen und dem MI auf.

Daraus lässt sich folgern, dass die SNPs an sich keinen protektiven Effekt bezüglich des MI aufweisen, jedoch sind die seltenen Genotypen der fünf genannten SNPs mit einer protektiven Wirkung bezüglich des MI assoziiert. Unter den untersuchten Allelen der vorgenannten SNPs lässt sich diese Assoziation nur beim seltenen Allel des LTA-B SNPs finden, welcher ebenfalls gemäß den signifikanten Ergebnissen bei der Allelverteilung zwischen den beiden Gruppen eine protektive Wirkung bezüglich des MI aufweist. Während ein Zusammenhang mit dem MI bei dem alleinigen Vorkommen der seltenen Allele fast aller

SNPs fehlt, zeigt dessen Auftreten in deren Kombination in den seltenen Genotypen der fünf vorgenannten SNPs eine Assoziation mit dem protektiven Effekt. Daraus lässt sich schließen, dass das mehrfache Auftreten der seltenen Allele dieser fünf erwähnten SNPs verstärkt zu dieser Assoziation mit protektiver Wirkung führt. Diese Vermutung wird durch die Verteilung der Haplotypfrequenzen, speziell durch Haplotyp1 bestätigt. Eine weitere Indikation auf einen protektiv wirkenden Zusammenhang ergibt sich durch die Zusammensetzung des Diplotyp I. Als Fazit ergibt sich, dass die gleichzeitig auftretende Kombination der seltenen Allele dieser fünf SNPs mit einem protektiven Effekt assoziiert ist.

4.2 Vergleich der kaukasischen Population mit anderen Populationen.

Auch andere Studien haben sich mit Zusammenhängen zwischen den SNPs in der BAT1-NFKBIL1-LTA-Region und einem möglichen Myokardinfarkt befasst. [32, 57, 63, 78, 91] An dieser Stelle ist zum Beispiel die japanische Studie von Ozaki et al [57] zu erwähnen. Die Ergebnisse dieser Studie in der japanischen Population stimmen nicht mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie in der Population aus dem süddeutschen Raum überein. In der japanischen Studie ist eine Assoziation zwischen den BAT1-C, NFKBIL1-A, LTA-A, LTA-B und LTA-C SNPs mit einem gesteigerten Myokardinfarkttrisiko festgestellt worden. Die Homozygotität der seltenen Allele der fünf SNPs beeinflusst negativ den Erkrankungsprozess und deutet auf ein erhöhtes Risiko für einen Myokardinfarkt hin. Nachdem die vorliegende und die Studie von Ozaki [57] beim Vergleich der beiden Populationen unterschiedliche Ergebnisse über die Genotypverteilung der drei SNPs des LTA-Gens gezeigt haben, ist eine unterschiedliche Funktion und Bedeutung der SNPs in den beiden Populationen zu vermuten.

In der japanischen Studie [57] war bei der Haplotypverteilung Haplotyp A der am häufigsten vorkommende Haplotyp. Er ist dem Haplotyp1 in der vorliegenden Studie strukturell ähnlich

und beinhaltet wie dieser die seltenen Allele der BAT1-C, NFKBIL1-A, LTA-A, LTA-B und LTA-C SNPs. Um einen Vergleich zwischen dem Haplotyp A der japanischen Studie und Haplotyp 1 der vorliegenden Studie zu ermöglichen, wurden beim japanischen Haplotyp A Anpassungen vorgenommen (Abbildung 4-1). Es handelt sich um die Anordnung der SNPs des BAT1-Gens und um die Bezeichnung der Basen der SNPs im BAT1- und im NFKBIL1-Gen (BAT1-A, T/C → A/G, BAT1-B und BAT1-C C/G → G/C, NFKBIL1-B und NFKBIL1-C C/G → G/C). Der resultierende modifizierte Haplotyp erhält die Bezeichnung A*.

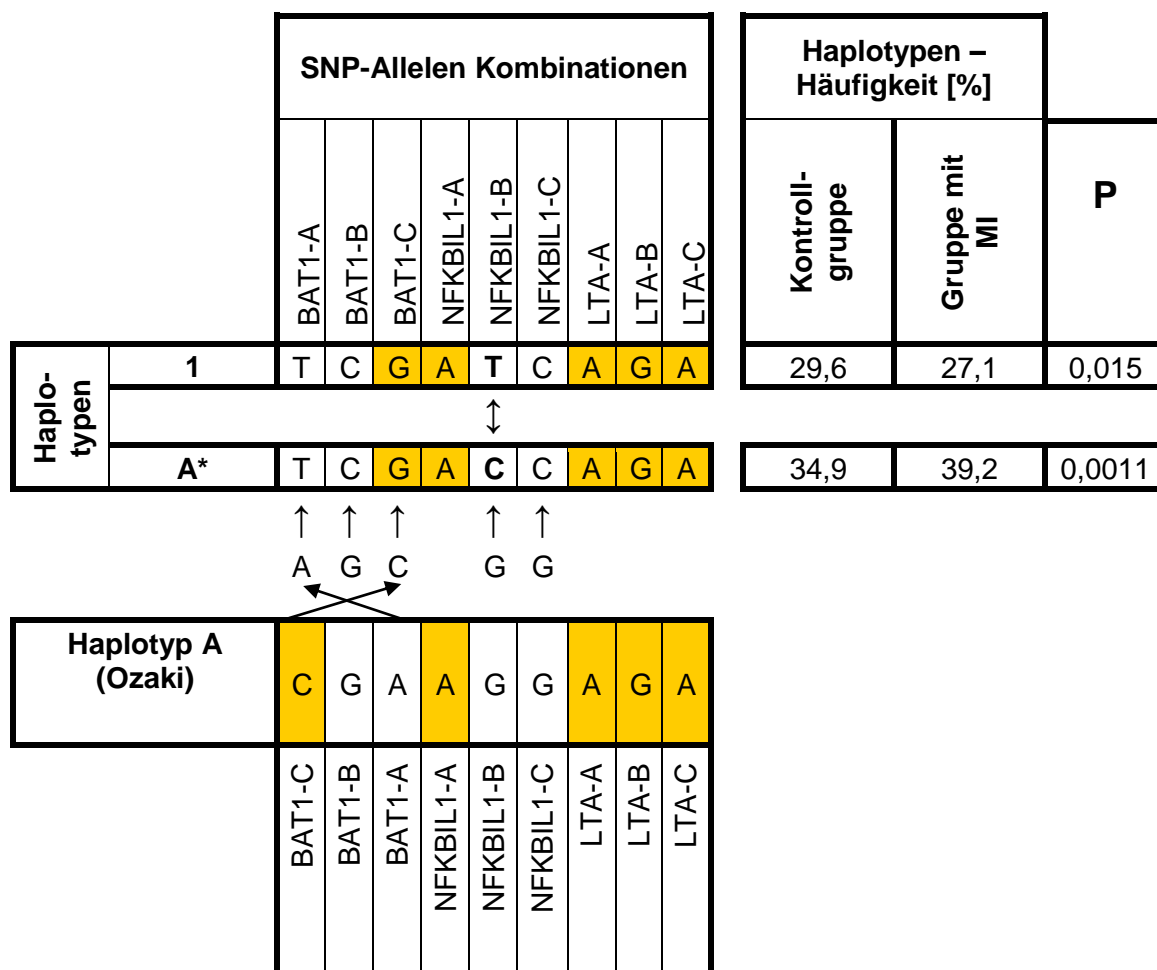


Abbildung 4-1 Vergleich der Haplotypen 1 und A (seltene Allele sind gelb gekennzeichnet)

BAT1 SNPs sind relativ zur Position der anderen SNPs auf dem Chromosom 6 geordnet. Bei dem BAT1-A SNP wurde T/C mit A/G, bei den BAT1-B und BAT1-C SNPs C/G mit G/C ersetzt. Bei NFKBIL1-B und NFKBIL1-C wurde C/G mit G/C ersetzt. Der Doppelpfeil (↕) deutet den Unterschied zwischen den Haplotypen 1 und A* an.

Durch die Anpassung des Haplotyps A an den Haplotyp 1 wurde ersichtlich, dass der Haplotyp 1 analog zum Haplotyp A aus der japanischen Referenz-Studie [57] war, mit Ausnahme des NFKBIL1-B-SNPs (siehe Abbildung 4-1). Hier tritt eine Base in Haplotyp 1 als T und in Haplotyp A* als C in Erscheinung und ist in beiden Fällen das häufige Allel. Jedoch liegt der entscheidende Unterschied in der größeren Häufigkeit des Haplotyps A* in der MI-Gruppe im Verhältnis zur Kontrollgruppe der japanischen Population. Im Gegensatz dazu liegt die grössere Häufigkeit bei Haplotyp 1 in der Kontrollgruppe vor. Dies deutet darauf hin, dass der Haplotyp A* in der japanischen Population das Risiko an MI zu erkranken, erhöht, anstatt -wie Haplotyp 1 in der vorliegenden Studie gezeigt- protektiv zu wirken.

Diese ähnlichen Haplotypen, 1 und A*, beinhalteten jeweils das seltene Allel der fünf SNPs, nämlich BAT1-C, NFKBIL1-A, LTA-A, LTA-B und LTA-C, bei beiden Studien. Dagegen ist eine derartige Allelkombination in keinem der restlichen am häufigsten vorkommenden Haplotypen, Haplotypen 2-5, wieder anzutreffen.

In der kaukasischen und der japanischen Population sind unterschiedliche Allelfrequenzen, Genotyp- und Haplotypverteilungen im Fall der neun erwähnten SNPs in der BAT1-NFKBIL1-LTA-Region vorhanden. Außerdem zeigen die seltenen Allele, seltene Genotypen und Haplotypen in beiden Populationen einen unterschiedlichen und entgegengesetzten Einfluss auf den MI-Krankheitsprozess.

Die PROCARDIS consortium Studie [63] untersuchte eine mögliche Assoziation von LTA-C SNP mit dem MI oder mit dem symptomatischen akuten koronaren Syndrom. Diese Studie umfasst weiße Europäer aus: Deutschland, Italien, Schweden und Großbritannien. Das seltene Allel, Allel A, des LTA-C SNP und dessen seltene Genotyp, Genotyp AA, waren in dieser Studie mit einem erhöhten MI-Risiko assoziiert. Dagegen weisen die Ergebnisse der vorliegenden Studie keine derartige Assoziation des seltenen A Allels oder des seltenen AA Genotyps des LTA-C SNP mit einem erhöhten MI-Risiko nach. Im Gegensatz zu der vorliegenden und der PROCARDIS Studie zeigen Ergebnisse aus der Studie von Tobin et al

[78] in zwei Zentren in Großbritannien keinen Hinweis auf eine Relation zwischen dem LTA-C SNP und dem MI. Die widersprüchlichen Ergebnisse der Studien in den kaukasischen Populationen könnten teilweise an den verschiedenen Studienvoraussetzungen liegen. Zum Beispiel ist die PROCARDIS consortium Studie eine familienbasierende Studie, die vorliegende Studie dagegen eine Fall-Kontrollstudie. Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit für die Bildung von Fall- oder Kontroll-Status eine koronare Angiographie zur Bestimmung der Patientengruppe angewendet, eine bessere Patientencharakterisierung ist damit erreicht. Eine entsprechende Voraussetzung bestand bei der PROCARDIS consortium Studie nicht. Somit liegen Diskrepanzen hinsichtlich der Studienvoraussetzungen vor [9].

In einer Studie von Iwanaga und seinen Kollegen [32] haben sich signifikante Resultate ergeben. Die NFKBIL-A, LTA-A, LTA-B und LTA-C SNPs waren mit dem MI in der japanischen Population assoziiert. Alle seltenen Allele, einschließlich der homozygoten und heterozygoten Genotypen, aber nicht die homozygoten Genotypen alleine, waren häufiger in der Patienten- als in der Kontrollgruppe vertreten. Die Ergebnisse in der Studie von Iwanaga et al zeigen Risikoeffekte der seltenen Allele bezüglich des MI-Risikos und stimmen mit den Ergebnissen der seltenen Allele in der von Ozaki et al [57] untersuchten japanischen Population nicht überein.

Im Gegensatz zu diesen Resultaten haben Yamada et al [91] keine Assoziation der LTA-B und LTA-C SNPs mit dem MI in einer anderen japanischen Population feststellen können. Die unterschiedlichen Ergebnisse innerhalb der japanischen Populationen könnten mit Verschiedenheiten in der Zusammensetzung der Kontrollgruppen zusammenhängen. Die Genotypverteilungen in den Kontrollgruppen waren auffallend und unterschiedlich. Die widersprüchlichen Ergebnisse könnten auch durch ungleiche Auswahlkriterien und Altersunterschiede erklärt werden.

4.3 Ausblick

Trotz des Vorliegens diskrepanter Studienergebnisse, weisen die bisher gewonnenen Daten darauf hin, dass eine Assoziation zwischen der BAT1-NFKBIL1-LTA Region und dem MI besteht. Die Risikofaktoren und deren Einfluss könnten auch in den verschiedenen Bevölkerungsgruppen variieren [66]. Dennoch sind solche Unterschiede schwer definierbar und auch nicht vollständig abgrenzbar. Zusätzlich ist auch eine Ätiologie dieser Unterschiede selten begründbar. Vielmehr gibt es Anzeichen von Ursachen, die Anlass für weitere Untersuchungen geben. In der Manifestation von unterschiedlichen Krankheiten, in dem Fall von KHK und MI, spielen multifaktorielle Komponenten eine entscheidende Rolle. Als Solche sind unter anderem, ethnische Unterschiede, unterschiedliche Umweltverhältnisse, Variationen in der Ernährung, Lebensweise, soziökonomischen und kulturellen Bedingungen [33, 80] zu nennen. Alle diese Faktoren könnten die unterschiedlichen Ergebnisse in beiden Populationen, in Weißen und in Japanern, erklären.

Einflüsse und Auswirkungen der neun SNPs und deren Allelkombination auf dem Haplotypblock müssen ausführlicher auf eine Prädisposition für einen MI untersucht werden. Zur Bestätigung der hier aufgeführten Ergebnisse sind jedoch weitere experimentelle und klinische Studien erforderlich, um protektiven oder progressiven Effekten der hier untersuchten SNPs bezüglich des Myokardinfarkts nachzugehen und weitere diesbezügliche Assoziationen anderer SNPs dieser Region zu prüfen. Die in dieser Studie für die Genotypisierung vorgestellte „TaqMan assays“-Methode kann in der Zukunft für ähnliche Studien von großem Nutzen sein.

Auch eine Korrelation der Haplotypen mit anderen sich manifestierenden Krankheiten, wie rheumatoide Arthritis [53] und Diabetes mellitus Typ1 [15], die ebenfalls mit dem Histokompatibilitätskomplex der Klasse III Region zusammenhängen, ist zu berücksichtigen. Bei diesen Krankheiten spielen genauso wie bei der Atherosklerose inflammatorische

Prozesse eine große Rolle, es sollten entsprechende Assoziationsstudien durchgeführt werden

5 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein möglicher Zusammenhang der drei SNPs des LTA-Gens in der BAT1-NFKBIL1-LTA-Region auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 mit dem Myokardinfarkt untersucht. Die Manifestation eines Myokardinfarkts basiert meistens auf einer chronisch entzündlichen Arteriosklerose. Die BAT1-, NFKBIL1- und LTA- Gene der genannten Region kodieren für Entzündungsproteine und könnten deshalb in der Arteriosklerose eine Rolle spielen. Ziel dieser Arbeit war es, den genetischen Einfluss der Polymorphismen, LTA-A, LTA-B und LTA-C, auf den Myokardinfarkt zu untersuchen. Jedoch wurden auch die SNPs des BAT1- und des NFKBIL1- Gens herangezogen, um eine Haplotyp- und Diplotypbestimmung in dieser Genregion zu ermöglichen. Diese Daten wurden für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt.

Die Studienpopulation umfasst 4868 Individuen. Zwei Gruppen wurden zusammengestellt, die Kontrollgruppe mit hinsichtlich des MI gesunden Individuen und die Patientengruppe, die einen MI in der Vergangenheit erlitten hatten oder Symptome für akuten MI zeigten. Bei allen Individuen wurden im Rahmen der Auswahlkriterien eine Koronarangiographie und weitere Untersuchungen durchgeführt.

Bei 1211 Individuen der Kontrollgruppe und 3657 Individuen der Patientengruppe wurden die Genotypen der BAT1-NFKBIL1-LTA SNPs durch die TaqMan Methode bestimmt. Durch diese Methode wird eine weitere Verarbeitung der PCR Produkte nach dem Ablauf des Verfahrens vermieden. Ein anderer Vorteil, den diese Methode bietet, ist eine möglichst schnelle gleichzeitige Analyse mehrerer Proben.

Ein wichtiges Ergebnis dieser Studie ist, dass die Verteilungen der seltenen Genotypen der

SNPs des LTA-Gens, LTA-A, LTA-B und LTA-C, in beiden Gruppen, auf eine Assoziation mit protektivem Effekt hinsichtlich des Myokardinfarkts hingewiesen haben. Das gleiche Resultat ist auch, gemäß zur Verfügung gestellter Daten, bei den SNPs BAT1-C und NFKBIL1-A zu beobachten. Bei der Fragestellung nach einer Relation zwischen dem seltenen Allel jedes SNPs mit dem MI, hat nur das seltene G-Allel des LTA-B SNPs ein signifikantes Ergebnis und damit seine positive Relation zum Krankheitsbild gezeigt. Bei den seltenen Allelen der anderen beiden SNPs des LTA-Gens ist keine Signifikanz zu erkennen.

Ebenfalls von Bedeutung sind die Ergebnisse der Haplotypverteilung. Hier umfasst Haplotyp1 alle seltenen Allele der fünf SNPs, BAT1-C, NFKBIL1-A LTA-A, LTA-B und LTA-C. Diese Ergebnisse zeigen, dass das gleichzeitige Vorkommen aller fünf seltenen Allele mit einem protektiven Effekt hinsichtlich des Myokardinfarkts assoziiert ist.

Als Schlussfolgerung ergibt sich aus dieser Studie, dass ein protektiver Effekt bezüglich dem Krankheitsbild des Myokardinfarkts sehr wahrscheinlich bei Individuen auftritt, die das seltene Allel von LTA-B oder eine Kombination der seltenen Allele, wie diese in Haplotyp1 vorkommt, besitzen.

Ein Ergebnisvergleich zwischen der untersuchten Bevölkerungsgruppe aus dem süddeutschen Raum mit anderen Populationen zeigte unterschiedliche Genotypverteilungen und dementsprechende mögliche Schlussfolgerungen in Hinblick auf die hier untersuchte Assoziation. Entgegengesetzte Ergebnisse sind zum Beispiel beim Vergleich mit der Studie von Ozaki et al [57] zu erkennen. Bei der dort untersuchten japanischen Population ist für den gleichen seltenen Genotyp des LTA-B SNPs ein erhöhtes Risiko hinsichtlich des Myokardinfarkts zu beobachten. Ebenfalls weist die Kombination der seltenen Allele der gleichen, oben genannten, fünf SNPs auf eine erhöhte Wahrscheinlichkeit an Myokardinfarkt zu erkranken hin. Mögliche Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse könnten ethnische und genetische Besonderheiten sein. Ebenfalls beeinflussen möglicherweise

unterschiedliche Umweltbedingungen und Ernährung das Myokardinfarkttrisiko.

Die Aussagekraft der Resultate der vorliegenden Studie wird durch die Größe der untersuchten Population und die rigorosen Kriterien bei der Auswahl der Individuen der Kontroll- und Patientengruppe gewährleistet. Zusätzlich bietet die Anwendung des TaqMan-Verfahrens Vorteile gegenüber anderen Methoden. Zur Bestätigung der hier aufgeführten Ergebnisse sind jedoch weitere experimentelle und klinische Studien erforderlich, um protektiven oder progressiven Effekten der hier untersuchten SNPs bezüglich des Myokardinfarkts nachzugehen und weitere diesbezügliche Assoziationen anderer SNPs dieser Region zu prüfen.

Literaturverzeichnis

1. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober J.S.
Immunologie
1996
2. Abecasis G.R., Cookson W.O.C.
GOLD- graphical overview of linkage disequilibrium.
Bioinformatics 2000; 16:182-3
3. Allcock R.J., Price P., Gaudieri S., Leelayuwat C., Witt C.S., Dawkins R.L.
Characterisation of the human central MHC gene, BAT1: genomic structure and expression.
Exp Clin Immunogenet. 1999;16(2):98-106.
4. Allcock R.J., Williams J.H., Price P.
The central MHC gene, BAT1, may encode a protein that down-regulates cytokine production.
Genes Cells. 2001 May;6(5):487-94.
5. Blankenberg S., Barbaux S., Tiret L.
Adhesion molecules and atherosclerosis.
Atherosclerosis. 2003 Oct;170(2):191-203.
6. Bornfeldt KE, Raines EW, Graves LM, Skinner MP, Krebs EG, Ross R.
Platelet-derived growth factor. Distinct signal transduction pathways associated with migration versus proliferation.
Ann N Y Acad Sci. 1995 Sep 7;766:416-30
7. Browning J.L., Miatkowski K., Griffiths D.A., Bourdon P.R., Hession C., Ambrose C.M., Meier W.
Preparation and characterization of soluble recombinant heterotrimeric complexes of human lymphotoxins alpha and beta.
J Biol Chem. 1996 Apr 12;271(15):8618-26.
8. Bühling K. J., Lepenies J., Witt K.
Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pathologie
2. Auflage, Herausgeber Urban & Fischer Verlag München-Jena, 2000
9. Cardon LR, Palmer LJ
Population stratification and spurious allelic association
Lancet 2003 Febr 15; 361:598-604
10. Casares S, Bona CA, Brumeanu TD
Modulation of CD4 T cell function by soluble MHC-II-peptide chimeras
Int Rev Immunol. 2001 Oct; 20 (5): 547-73

11. Chalmers J., MacMahon S., Mancia G., Whitworth J., Beilin L., Hansson L., Neal B., Rodgers A., Ni Mhurchu C., Clark T.
1999 World Health Organization-International Society of Hypertension Guidelines for the management of hypertension. Guidelines sub-committee of the World Health Organization.
Clin Exp Hypertens. 1999 Jul-Aug;21(5-6):1009-60
12. Chamberlain J.C., Galton D.J.
Genetic susceptibility to atherosclerosis.
British Medical Bulletin , 46, 4 (1990) : 917-940
13. Charles A., Travers J., Travers P.
Lehrbuch Immunologie
2.Auflage
14. Chen F., Demers L.M., Shi X.
Upstream signal transduction of NF-kappaB activation.
Curr Drug Targets Inflamm Allergy. 2002 Jun;1(2):137-49.
15. Cheong K.Y., Allcock R.J., Eerligh P., Witt C.S., Christiansen F.T., McCann V., Price P.
Localization of central MHC genes influencing type 1 diabetes.
Hum Immunol. 2001 Dec;62(12):1363-70
16. Cuff C.A., Schwartz J., Bergman C.M., Russell K.S., Bender J.R., Ruddle N.H.
Lymphotoxin alpha3 induces chemokines and adhesion molecules: insight into the role of LT alpha in inflammation and lymphoid organ development.
J Immunol. 1998 Dec 15;161(12):6853-60
17. Degli-Esposti M.A., Leelayuwat C., Dawkins R.L.
Ancestral haplotypes carry haplotypic and haplospecific polymorphisms of BAT1: possible relevance to autoimmune disease.
Eur J Immunogenet. 1992 Jun;19(3):121-7.
18. Dje N'Guessan P., Riediger F., Vardarov K, Scharf S., Eitel J., Opitz B., Slevogt H., Weichert W, Hocke AC., Schmeck B., Suttorp N., Hippenstiel S.,
Statins control oxidized LDL – mediated histone modifications and gene expression in cultured human endothelial cells
Arterioscler Thromb Vase Biol 2009 Mar; 29 (3): 380-6, Epub 2009 Jan. 2
19. Excoffier L., Slatkin M.
Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population.
Mol Biol Evol 1995; 12:921-7.
20. Finn AV, Kramer MC, Vorpahl M, Kolodgie FD, Virmani R.
Pharmacotherapy of coronary atherosclerosis.
Expert opin Pharmacother 2009 Jul; 10 (10); 1587-603.
21. Förster, V.Th.
Zwischenmolekulare Energie-Wanderung und Fluoreszenz.
Annals of Physics 2, 55-75, 1948.
22. Fröhlich A.
Glykogenphosphorylase BB – ein geeigneter Herzinfarktmarker?
Inaugural-Dissertation zur Erlangung des des Grades eines Doktors der Medizin,

23. Gabriel S.B., Schaffner S.F., Nguyen H., Moore J.M., Roy J., Blumenstiel B., Higgins J., DeFelice M., Lochner A., Faggart M., Liu-Cordero S.N., Rotimi C., Adeyemo A., Cooper R., Ward R., Lander E.S., Daly M.J., Altshuler D.
The structure of haplotype blocks in the human genome.
Science. 2002 Jun 21;296(5576):2225-9. Epub 2002 May 23
24. Gerondakis S., Grossmann M., Nakamura Y., Pohl T., Grumont R.
Genetic approaches in mice to understand Rel/NF-kappaB and IkappaB function: transgenics and knockouts.
Oncogene. 1999 Nov 22;18(49):6888-95.
25. gesundheit.de
Herzinfarkt: Definition, Ursachen, Merkmale, Diagnostik, Verlauf
Website - gesundheit.de
26. Gross R., Schölmerich P., Gerok W.
Die Innere Medizin
neubearbeitete Auflage. Stuttgart , New York : Schattauer , 1996.
27. Hanratty B., Lawlor D.A., Robinson M.B., Sapsford R.J., Greenwood D., Hall A.
Sex differences in risk factors, treatment and mortality after acute myocardial infarction: an observational study.
J Epidemiol Community Health. 2000 Dec;54(12):912-6.
28. Herold G.
Herold: Innere Medizin
Herausgeber Herold G., 2000
29. Heung L.J., Del Poeta M.
Unlocking the DEAD-box: a key to cryptococcal virulence?
J Clin Invest. 2005 Mar;115(3):593-5.
30. van't Hooft F.M., von Bahr S.J., Silveira A., Iliadou A, Eriksson P, Hamsten A.
Two common, functional polymorphisms in the promoter region of the beta-fibrinogen gene contribute to regulation of plasma fibrinogen concentration.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 19 (1999) 3063-70
31. Hornbostel H., Kaufmann W., Siegenthaler W.
Innere Medizin in Praxis und Klinik.
Hornbostel H. , Kaufmann W. , Siegenthaler W.
4. Auflage, Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag , 1992.
32. Iwanaga Y, Ono K, Takagi S, Terashima M, Tsutsumi Y, Mannami T, Yasui N, Goto Y, Nonogi H, Iwai N.
Association analysis between polymorphisms of the lymphotoxin- α gene and myocardial infarction in a Japanese population.
Atherosclerosis .2004 Jan: 172 :197-198
33. Lanza G. A.
Ethnic variations in acute coronary syndromes.
Heart. 2004 Jun;90(6):595-7.
34. Laxton R., Pearce E., Kyriakou T., Ye S.

- Association of the lymphotoxin-alpha gene Thr26Asn polymorphism with severity of coronary atherosclerosis.
Genes Immun. 2005 Sep;6(6):539-41.
35. Lehr HA, Sagban T. A., Kirkpatrick C. J.
Atherosclerosis-progression by nonspecific activation of the immune system
Med Klin (Munich) 2002 Apr 15;97(4):229-35
 36. Libby P.
Atherosclerosis: The Atherogenic Process
Congress Report, 70th Anniversary Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 24-26 March 2006
 37. Libby P.
Current concepts of the Pathogenesis of the acute coronary syndromes.
Circulation. 2001 Jul 17;104(3):365-72.
 38. Libby P., Sukhova G., Lee R.T., Galis Z. S.
Cytokines regulate vascular functions related to stability of the atherosclerotic plaque
J Cardiovasc. Pharmacol 1995;25 Suppl 2:S9-12 306
 39. Libby P., Sukhova G., Lee R.T., Liao J. K.
Molecular biology of atherosclerosis
Int J Cardiol. 1997 Dec 31; 62 Suppl 2:S23-9
 40. Libby P., Alkawa M., Jain M. K.
Vascular endothelium and atherosclerosis
Handb Exp Pharmacol. 2006; (176 Pt 2): 285-306
 41. Libby P.
What have we learned about the biology of atherosclerosis? The role of inflammation.
Am J Cardiol. 2001 Oct 11; 88 (7B):3J-6J.
 42. Liu P. Y., Li Y. H. , Wu H. L. , Chao T. H., Tsai L. M. , Lin L. J., Shi G. Y., Chen J. H.
Platelet-activating factor-acetylhydrolase A379V (exon 11) gene polymorphism is an independent and functional risk factor for premature myocardial infarction.
J Thromb Haemost. 2006 May;4(5):1023-8
 43. Livak K. J.
Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay.
Genet Analysis, 1999 Feb;14(5-6):143-9.
 44. Loew M, Hoffmann MM, Hahmann H, Maerz W, Brenner H, Rothenbacher D
Genotype combinations of plasminogen activator inhibitor-1 and angiotensin-converting enzyme genes and risk for early onset of coronary heart disease.
Eur J Cardiovasc Prev Rehabil. 2006 Jun;13(3):449-56
 45. Lowe G. D.
The relationship between infection, inflammation, and cardiovascular disease:an overview.
Ann Periodontol. 2001 Dec; 6(1):1-8
 46. Lüscher T.F., Barton M., Wight E., Espinosa E., Yang Z.
Wirkungen natürlicher Östrogene auf die Gefässwand: molekulare Mechanismen und klinische Implikationen.

Schweiz Med Wochenschr 1996;126:1748–1755.

47. Lusis A.J., Rotter J.I., Sparkes R.S.
Molecular genetics of coronary artery disease. Candidate genes and processes in atherosclerosis.
Monographs in human genetics; Vol. 14, Basel , Freiburg , Paris u.a.: Karger , 1992.
48. Miserez A.R., Braun J.R.
Anwendung genetischer Prinzipien zur Ursachenabklärung der Atherosklerose.
Therapeutische Umschau , 52, 12 (1995) : 835-843.
49. Morton N.E., Zhang W., Taillon-Miller P., Ennis S., Kwok P.Y., Collins A.
The optimal measure of allelic association
Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98:5217-21.
50. Naoum JJ, Chai H, Lin PH, Lumsden AB, Yao Q, Chen C
Lymphotoxin-alpha and cardiovascular disease: clinical association and pathogenic mechanisms
Med Sci Monit 2006 Jul;12(7):RA 121-4. Epub 2006 Jun 28
51. NCBI - Nationales Zentrum der Vereinigten Staaten für biotechnologische Informationen:
Internetdatenbank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
52. Newton C.R., Graham A.
PCR (Introduction to Biotechniques).
2d. ed. Oxford: BIOS Scientific Publishers Ltd., 1997.
53. Okamoto K., Makino S., Yoshikawa Y., Takaki A., Nagatsuka Y., Ota M., Tamiya G., Kimura A., Bahram S., Inoko H.
Identification of I kappa B as the second major histocompatibility complex-linked susceptibility locus for rheumatoid arthritis.
Am J Hum Genet. 2003 Feb;72(2):303-12. Epub 2002 Dec 31.
54. OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man™ Database, Johns Hopkins University
LYMPHOTOXIN-ALPHA; LTA
OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man™) Database, Johns Hopkins University
Nucleic Acids Res 1985; 13:6361-6373.
55. Overbeck P.
Herzinfarkte werden sprunghaft zunehmen - definitiv bedingt.
Ärzte Zeitung, Forschung und Praxis, 30.10.2000 – Website: www.aerztezeitung.de.
56. Ozaki K, Inoue K, Sato H, Iida A, Ohnishi Y, Sekine A, Sato H, Odashiro K, Nobuyoshi M, Hori M, Nakamura Y, Tanaka T.
Functional variation in LGALS2 confers risk of myocardial infarction and regulates lymphotoxin-alpha secretion in vitro.
Nature. 2004 May 6;429(6987):72-5.
57. Ozaki K, Ohnishi Y, Iida A, Sekine A, Yamada R, Tsunoda T, Sato H, Sato H, Hori M, Nakamura Y, Tanaka T.
Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction.
Nat Genet. 2002 Dec;32(4):650-4. Epub 2002 Nov 11.

58. Peelman L.J., Chardon P., Nunes M, Renard C, Geffrotin C, Vaiman M, Van Zeveren A, Coppieters W, van de Weghe A, Bouquet Y, et al.
The BAT1 gene in the MHC encodes an evolutionarily conserved putative nuclear RNA helicase of the DEAD family.
Genomics. 1995 Mar 20;26(2):210-8
59. Park YM., Febbraio M., Silverstein RL.
CD 36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima.
Expert Rev Cardiovasc Ther. 2009 Jun; 7 (6): 587 -90
60. Peltonen M, Lundberg V, Huhtasaari F, Asplund K.
Marked improvement in survival after acute myocardial infarction in middle-aged men but not in women. The Northern Sweden MONICA study 1985-94.
Peltonen M, Lundberg V, Huhtasaari F, Asplund K.
J Intern Med. 2000 May;247(5):579-87.
61. Price P, Wong AM, Williamson D, Voon D, Baltic S, Allcock RJ, Boodhoo A, Christiansen FT.
Polymorphisms at positions -22 and -348 in the promoter of the BAT1 gene affect transcription and the binding of nuclear factors.
Hum Mol Genet. 2004 May 1;13(9):967-74. Epub 2004 Mar 17.
62. Pristipino C, Beltrame JF, Finocchiaro ML, Hattori R, Fujita M, Mongiardo R, Cianflone D, Sanna T, Sasayama S, Maseri A.
Major racial differences in coronary constrictor response between Japanese and Caucasians with recent myocardial infarction.
Circulation. 2000 Mar 14;101(10):1102-8.
63. PROCARDIS consortium
A trio family study showing association of the lymphotoxin- α N26 (804A) allele with coronary artery disease.
Eur J Hum Genet. 2004 July; 12: 770-774
64. Qin Z.S., Qin T., Lin J.S.
Partition-ligation-expectation-maximization algorithm for haplotype inference with single-nucleotide-polymorphisms.
Am J Hum Genet. 2002; 71: 1242-1247.
65. Raines EW, Ross R:
Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis
Br Heart J. 1993 Jan;69(1 Suppl):S30-7
66. Ridker P.M.
Inflammation, atherosclerosis, and cardiovascular risk: an epidemiologic view.
Blood Coagul Fibrinolysis. 1999 Feb;10 Suppl 1
67. Ross R
Atherosclerosis- an inflammation disease
N Engl J Med. 340;1999 Jan,115-26
68. Ross R., Bowen-Pope DF., Raines EW
Platelet-derived growth factor and its role in health and disease
Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1990 Mar 12; 327(1239):155-69

69. Ross R, Glomset J, Harker L
Response to injury and atherogenesis
Am J Pathol. 1977 Mar;86(3):675-84
70. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.
Science. 1988 Jan 29;239(4839):487-91
71. Schreyer SA., Vick CM, LeBoeuf RC
Loss of lymphotoxin-alpha but not tumor necrosis factor-alpha reduces atherosclerosis
in mice
J Biol Chem. 2002 Apr 5; 277(14):12364-8.Epub 2002 Jan 23
72. Siffert W., Roskopf D., Siffert G., Busch S., Moritz A., Erbel R., Sharma A.M., Ritz E.,
Wichmann H.E., Jakobs K.H., Horsthemke B.
Association of a human G-protein $\beta 3$ subunit variant with hypertension
Nat Genet. 18 (1998) 45-8
73. Spies T, Blanck G, Bresnahan M, Sands J, Strominger JL.
A new cluster of genes within the human major histocompatibility complex.
Science. 1989 Jan 13;243(4888):214-7.
74. Stephens M, Smith NJ, Donnely P.
A new statistical method for haplotype reconstruction from population data.
Am J Hum Genet. 2001 Apr;68(4):978-89. Epub 2001 Mar 9.
75. Stobbe H. , Baumann G.
Innere Medizin, Grundlagen und Klinik innerer Krankheiten.
7. überarbeitete und erweiterte Auflage, Berlin/Wiesbaden, Ullstein Mosby , 1996.
76. Sun J., Leahy DJ, Kavathas PB
Interaction between CD8 and major histocompatibility complex (MHC) class I mediated
by multiple contact surfaces that include the alpha 2 and alpha 3 domains of MHC
class I
J Exp Med. 1995 Nov 1;182 (5): 1275-80
77. Tanaka T, Ozaki K
Inflammation as a risk factor for myocardial infarction
J Hum Genet. 2006; 51(7):595-604. Epub 2006 Jun 13
78. Tobin MD, Braund PS, Burton PR, Thompson JR, Steeds R, Channer K, Cheng S,
Lindpaintner K, Samani NJ
Genotypes and haplotypes predisposing to myocardial infarction: a multilocus case-
control study.
Eur Heart J. 2004 Mar; 25: 459-467
79. Topol EJ, Smith J, Plow EF, Wang QK
Genetic susceptibility to myocardial infarction and coronary artery disease.
Hum Mol Genet 2006 Oct 15: 15 Spec No 2: R117-23
80. Tunstall-Pedoe H., Kuulasmaa K., Amouyel P., Arveiler D., Rajakangas A.M., Pajak A.
Myocardial infarction and coronary deaths in the World Health Organization MONICA
Project. Registration procedures, event rates, and case-fatality rates in 38 populations
from 21 countries in four continents.

- Circulation. 1994 Jul;90(1):583-612.
81. Um J.Y., An N.H., Kim H.M.
TNF-alpha and TNF-beta gene polymorphisms in cerebral infarction.
J Mol Neurosci. 2003;21(2):167-71.
 82. Vaccarino V, Horwitz RI, Meehan TP, Petrillo MK, Radford MJ, Krumholz HM.
Sex differences in mortality after myocardial infarction: evidence for a sex-age interaction.
Arch Intern Med. 1998 Oct 12;158(18):2054-62.
 83. Vassalli G, Winkelmann BR.
Molecular genetics of myocardial infarction: many genes, more questions than answers.
Eur Heart J. 2004 Mar;25(6):451-3.
 84. Walter D.H., Zeiher A.M.
Genetische Risikofaktoren für den Myokardinfarkt
Herz 25 (2000) Heft 1
 85. Wang Q.
Molecular genetics of coronary artery disease.
Curr Opin Cardiol. 2005 May;20(3):182-8.
 86. Whitehead AS, Sackstein R.
Molecular biology of the human and mouse MHC class III genes: phylogenetic conservation, genetics and regulation of expression.
Immunol Rev. 1985 Oct; 87 : 185-208.
 87. Wikipedia - Freie Enzyklopädie
Artikel über Arteriosklerose, Wikipedia
Website: www.wikipedia.de
 88. Wikipedia - Freie Enzyklopädie
Artikel über Myokardinfarkt, Wikipedia
Website: www.wikipedia.de
 89. Wong AM, Allcock RJ, Cheong KY, Christiansen FT, Price P.
Alleles of the proximal promoter of BAT1, a putative anti-inflammatory gene adjacent to the TNF cluster, reduce transcription on a disease-associated MHC haplotype.
Genes Cells. 2003 Apr;8(4):403-12.
 90. World Health Organization
Diabetes mellitus. Report of a WHO Study Group
World Health Organization Technical Report Series 727, 1995
 91. Yamada A, Ichihara S, Murase Y, Kato T, Izawa H, Nagata K, Murohara T, Yamada Y, Yokota M.
Lack of association of polymorphisms of the lymphotoxin- α gene with myocardial infarction in Japanese.
J Mol Med. 2004 Jul; 82:477-483
 92. Yamada Y, Izawa H, Ichihara S, Takatsu F, Ishihara H, Hirayama H, Sone T, Tanaka M, Yokota M.
Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes.

N Engl J Med. 2002 Dec 12;347(24):1916-23.

93. Yamashita T, Hamaguchi K, Kusuda Y, Kimura A, Sakata T, Yoshimatsu H. IkBL promoter polymorphism is strongly associated with resistance to type 1 diabetes in Japanese.
Yamashita T, Hamaguchi K, Kusuda Y, Kimura A, Sakata T, Yoshimatsu H. Tissue Antigens. 2004 Mar;63(3):223-30

Danksagung

Es ist ein ziemlich langer Weg von der Entscheidung, eine Doktorarbeit schreiben zu wollen, ueber die Experimente, deren Auswertung zum Zusammenschreiben und zur endlichen Fertigstellung des Buches.

Fuer meine Doktorarbeit schulde ich sehr vielen Menschen einen herzlichen Dank. An erster Stelle gilt ein grosser Dank meinem Doktorvater, Herrn Univer..- Prof. Dr. A. Kastrati, fuer die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die es mir ermoeglichte, mich mit diesem wissenschaftlichen Thema zu beschaeftigen.

Ein besonderes Wort des Dankes moechte ich an meinen Betreuer, Herrn Dr. W. Koch, richten, ohne den ich niemals ein Licht am Ende der Doktorarbeit gesehen haette. Er sorgte mit wertvollen Ratschlaegen fuer das Gelingen der Arbeit und nahm sich stes Zeit, um mit mir Probleme zu diskutieren und mir viele Anregungen zur Arbeit gab.

Auch moechte ich den Laborassistenten, Marianne Eichinger und Wolfgang Latz, fuer das Einlernen in die Durchfuehrung der Experimente danken. Sie standen immer mit helfender Hand bereit.

Ausserdem moechte ich mich bei meinen Freunden und meiner Schwester bedanken, die mich bestaerkt haben, wenn ich an mir gezweifelt habe. Viel verdanke ich Nikolaos Deligiannidis, der mich mit allen ihm moeglichen Mitteln unterstuetzt und auch in schwierigen Situationen immer an mich geglaubt hat. Er hat nicht nur meine schlechte Laune und meine Zeiten der ueberstrapazierten Nerven geduldet und ueberstanden, sondern mit seiner konstruktiven Kritik und seinen vielen Ideen immer wieder einen noetigen Anschwung gegeben.

Ganz beosnders danken muss ich aber auch meinen Eltern, ohne die ein Studium und eine Doktorarbeit niemals moeglich geworden waere. Eure Liebe und die positive Art an Dinge heranzugehen, hat mir oft geholfen, auch tiefe Tiefen zu ueberstehen und fest an ein gutes Ende zu glauben.