

AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK II  
DER UNIVERSITÄT ZU LÜBECK  
DIREKTOR: PROF. DR. MED. H. SCHUNKERT

**Die Bedeutung des *MEF2A*-Gens für die Pathogenese des  
Myokardinfarktes**

Inauguraldissertation

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
**- Aus der Medizinischen Fakultät -**

vorgelegt von  
**Iris Borwitzky**  
aus Hamburg

Lübeck 2007

1. Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. med. Jeanette Erdmann  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Andreas Ziegler  
Tag der mündlichen Prüfung: 26.02.2008  
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 26.02.2008  
gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach  
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

## Inhaltsverzeichnis

|                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Einleitung .....                                                       | 5  |
| 1.1 Epidemiologie .....                                                   | 5  |
| 1.2 Risikofaktoren .....                                                  | 5  |
| 1.3 Pathogenese .....                                                     | 5  |
| 1.4 Genetik von KHK und Herzinfarkt .....                                 | 7  |
| 1.4.1 Kandidatengenanalysen .....                                         | 7  |
| 1.4.2 Genomweite Analysen .....                                           | 8  |
| 1.5 Autosomal-dominante Vererbung des Herzinfarktes .....                 | 8  |
| 1.6 Risikoabschätzung .....                                               | 11 |
| 1.7 <i>MEF2A</i> (Myocyte Enhancer Factor 2A) .....                       | 11 |
| 1.8 Ziel der vorliegenden Arbeit .....                                    | 12 |
| 2. Material und Methoden .....                                            | 13 |
| 2.1 Studiengruppen .....                                                  | 13 |
| 2.1.1 Herzinfarktkollektiv mit positiver Familienanamnese .....           | 13 |
| 2.1.1.1 Deutsche Herzinfarktfamilienstudie .....                          | 13 |
| 2.1.1.2 Herzinfarkt-Großfamilien .....                                    | 13 |
| 2.1.2 Sporadische Herzinfarktpatienten (KORA-B Herzinfarktregister) ..... | 14 |
| 2.1.3 Kontrollpopulationen .....                                          | 14 |
| 2.1.3.1 Ehepartner in der Herzinfarkt-Familienstudie .....                | 14 |
| 2.1.3.2 Augsburg MONICA echokardiographische Substudie .....              | 14 |
| 2.2 Methoden .....                                                        | 16 |
| 2.2.1 Berechnung des kardiovaskulären 10-Jahres-Risikos .....             | 16 |
| 2.2.2 Polymerase - Kettenreaktion (PCR) .....                             | 19 |
| 2.2.2.1 PCR-Programm .....                                                | 20 |
| 2.2.2.2 Oligonukleotidprimer .....                                        | 21 |
| 2.2.2.3 MasterMix .....                                                   | 21 |
| 2.2.2.4 Patienten-DNA .....                                               | 22 |
| 2.2.3 Agarosegelelektrophorese .....                                      | 22 |
| 2.2.4 DNA-Sequenzierung .....                                             | 23 |
| 2.2.5 5' Exonuklease Assay (TaqMan) .....                                 | 24 |
| 2.2.6 Statistische Analyse .....                                          | 25 |
| 2.2.7 Durchführung der Arbeiten .....                                     | 25 |
| 2.2.7.1 <i>MEF2A</i> Exon 1 bis 12, 5'UTR und 3'UTR .....                 | 26 |
| 2.2.7.2 <i>MEF2A</i> 21-bp-Deletion .....                                 | 26 |
| 2.2.7.3 (CAG) <i>n</i> -Repeat in Exon 12 von <i>MEF2A</i> .....          | 27 |
| 2.2.7.4 Genotyp-Frequenz für den <i>MEF2A</i> -P279L-Polymorphismus ..... | 27 |
| 3. Ergebnisse .....                                                       | 28 |
| 3.1 Berechnung des kardiovaskulären 10-Jahres-Risikos .....               | 28 |
| 3.2 Sequenzierung des <i>MEF2A</i> -Gens .....                            | 30 |
| 3.2.1 Optimierung der PCR .....                                           | 30 |
| 3.2.2 DNA-Sequenzierung .....                                             | 32 |
| 3.2.2.1 21-bp-Deletion .....                                              | 32 |
| 3.2.2.2 Polymorphismen im <i>MEF2A</i> Gen .....                          | 32 |
| 3.2.2.2.1 Intron 2 – 22 A/T .....                                         | 33 |
| 3.2.2.2.2 Intron 2 – 67 G/C .....                                         | 33 |
| 3.2.2.2.3 Intron 8 - 74 del T .....                                       | 34 |
| 3.2.2.2.4 Intron 9 + 82 G/A .....                                         | 34 |
| 3.2.2.2.5 Intron 10 – 101 T/G .....                                       | 35 |

|                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.2.2.6 Exon 10 .....                                                            | 35 |
| 3.2.2.2.7 Intron 11 + 50 C/G .....                                                 | 36 |
| 3.2.2.2.8 3'UTR.....                                                               | 36 |
| 3.2.2.2.9 3'UTR.....                                                               | 37 |
| 3.2.2.3 Genotypisierung des (CAG) <sub>n</sub> -Repeats im <i>MEF2A</i> -Gen ..... | 38 |
| 3.3 Genotyp-Frequenzen für den <i>MEF2A</i> -P279L-Polymorphismus.....             | 40 |
| 4. Diskussion .....                                                                | 43 |
| 5. Zusammenfassung .....                                                           | 49 |
| 6. Literaturverzeichnis .....                                                      | 50 |
| 7. Anhang .....                                                                    | 55 |
| 7.1 Materialien .....                                                              | 55 |
| 7.1.1 Geräte.....                                                                  | 55 |
| 7.1.2 Chemikalien .....                                                            | 55 |
| 7.2 Primersequenzen <i>MEF2A</i> .....                                             | 57 |
| 7.3 Berechnung des kardiovaskulären 10-Jahres-Risikos .....                        | 58 |
| 7.4 <i>MEF2A</i> -Sequenzierung .....                                              | 67 |
| 7.5 Stammbäume der Herzinfarkt-Großfamilien .....                                  | 69 |
| 7.6 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen.....                                  | 75 |
| 7.6.1 Tabellen .....                                                               | 75 |
| 7.6.2 Abbildungen.....                                                             | 75 |
| 8. Lebenslauf .....                                                                | 76 |
| 9. Danksagung .....                                                                | 77 |

## 1. Einleitung

Die Koronare Herzerkrankung und der Herzinfarkt gehören in unserer Gesellschaft zu den häufigsten Todesursachen.(36;53) Auch heute noch endet jeder zweite Herzinfarkt tödlich und trifft die Patienten oft unvermittelt, da nur bei etwa der Hälfte der Infarktpatienten im Vorfeld Beschwerden aufgetreten sind.(34)

### 1.1 Epidemiologie

Die Inzidenz des akuten Herzinfarktes zeigt große geographische Unterschiede: in Japan liegt sie unter 100/100.000 pro Jahr, in den Mittelmeerländern, Frankreich und der Schweiz bei 100-200/100.000/J, in Skandinavien bei 300-400/100.000/J und bei 400-500/100.000/J in England und Irland. In Deutschland (wie auch in Nordamerika) findet man eine Inzidenz von ca. 300-350/100.000 pro Jahr, d.h. es sind jährlich ca. 240.000-280.000 Menschen betroffen.(21) Zu beobachten ist ein zunehmend häufigeres Auftreten von Myokardinfarkten bei Frauen, auch ist deren Prognose nach einem stattgefundenen Infarkt im Vergleich zu Männern schlechter.(14;39;44) Dies liegt möglicherweise darin begründet, dass Frauenherzen im Vergleich zu Männerherzen einer anderen endokrinen Steuerung unterliegen.(40) Bei Frauen fällt nach der Menopause der für das Herz-Kreislauf- System wichtige Östrogenschutz weg und es kommt zu einem deutlichen Anstieg der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität.

### 1.2 Risikofaktoren

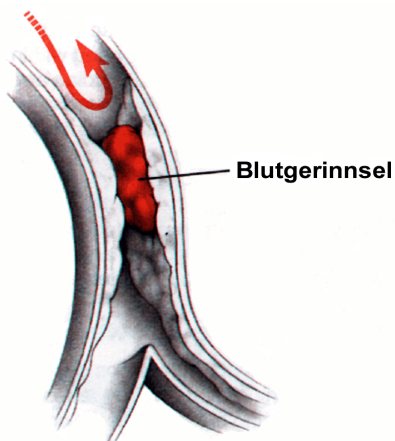
Unter dem Begriff *Koronare Herzkrankheit (KHK)* versteht man die Manifestation der Atherosklerose an den Herzkranzarterien. Die Ursachen hierfür sind vielschichtig. Einerseits wird die KHK durch die sog. klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren bedingt. Diese sind arterieller Hypertonus, Rauchen, Diabetes mellitus und Hyperlipidämie.(27) Zum anderen kommt erblichen Faktoren eine wesentliche Bedeutung zu. Mehrere Studien haben gezeigt, dass eine positive Familienanamnese bezüglich KHK bzw. Herzinfarkt einen unabhängigen Risikofaktor darstellt.(5;18;30)

### 1.3 Pathogenese

Insgesamt gesehen führen die genannten klassischen Risikofaktoren zu einer Schädigung des Endothels. Diese entsteht durch den erhöhten Gefäßinnendruck bei der arteriellen Hypertonie, eine ungünstig veränderte Zusammensetzung des Blutes durch Hyperlipidämie und Diabetes mellitus sowie ischämische Schäden bei lokalem Sauerstoffmangel durch Rauchen. Diese Veränderungen durch die verschiedenen Risikofaktoren spielen ineinander und führen zu einer Endothelschädigung mit anschließender Einlagerung von Lipiden in

die Arterienwand, der sog. Plaquebildung. Nach An-/Einlagerung von Thrombozyten entstehen intrainitmale Thromben und das Gefäßlumen stenosierte, woraus, v.a. unter Belastung, eine Minderdurchblutung des Herzmuskelgewebes resultiert.(29;41) Klinisch äußert sich diese Minderperfusion des Herzmuskels als anfallsweise auftretender Brustschmerz (Angina pectoris), welcher anfangs bei Anstrengung, bei zunehmender Gefäßverengung jedoch auch in Ruhe auftritt.

Die KHK ist die häufigste Ursache des *Myokardinfarktes (MI)*: Im Bereich der arteriosklerotisch veränderten Herzkranzarterie kommt es zum Gefäßverschluss (siehe Abb.1) mit fehlender Perfusion eines umschriebenen Areals im Herzmuskelgewebe und anschließender ischämischer Nekrosenbildung (41), dargestellt in Abb.2. Im nekrotischen Areal bildet sich im Verlauf eine Narbe mit deutlich verminderter funktioneller Aktivität. Klinisches Leitsymptom des akuten Herzinfarktes ist der meist länger als 30 min. anhaltende Glyceroltrinitrat-refraktäre thorakale Schmerz mit oder ohne Ausstrahlung in Schulter, Arm, Kiefer oder Abdomen. Im EKG unterscheidet man den ST-Elevationsinfarkt (STEMI), bei dem die ST-Strecke im akuten Stadium unmittelbar vom absteigenden R abgeht, und den Nicht-ST-Elevationsinfarkt (NSTEMI bzw. instabiles Koronarsyndrom), bei dem die ST-Hebung fehlt und der frische Myokardinfarkt nur durch die positive Serologie bewiesen werden kann.(21)



**Abb. 1: Darstellung eines durch Thromben verschlossenen Koronargefäßes**



**Abb.2: Nekrotisches Areal im Herzmuskel nach akutem Myokardinfarkt**

## **1.4 Genetik von KHK und Herzinfarkt**

Wie bereits erwähnt gibt es neben den klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren genetische Komponenten, welche die Entstehung eines Herzinfarktes beeinflussen und zur familiären Häufung dieser Erkrankung führen.(31;32) Eine elterlicherseits positive Anamnese bezüglich des Herzinfarktes führt zu einer deutlichen Steigerung des eigenen Herzinfarkt-Risikos. Hierbei ist das familiäre Risiko um so höher, je jünger die betroffenen Familienangehörigen bei der Erstmanifestation der Erkrankung waren.(5) Es konnte gezeigt werden, dass insgesamt vor allem die Hauptstammstenose bzw. die in den proximalen und weniger die in den distalen Gefäßabschnitten lokalisierte KHK erblich ist. (11) Die klinische Erfahrung hat deutlich gemacht, dass es sich bei der genetischen Komponente des Herzinfarktes wahrscheinlich um ein autosomal-dominantes Vererbungsmuster handelt, das in seltenen Fällen auftritt. Diesbezüglich sind bisher jedoch keine größeren Familien systematisch aufgearbeitet worden.

In der Genetik werden krankheitsverursachende Gendefekte und prädisponierende Genvarianten unterschieden. Bei den krankheitsverursachenden Gendefekten führt eine Mutation in einem Gen zu einer Erkrankung, da sie eine Funktionsveränderung nach sich zieht. Hierbei lässt sich anhand der genetischen Analyse eine eindeutige Diagnose stellen. Bei den prädisponierenden Genvarianten gestaltet sich die Bewertung der Genanalyse schwieriger, da bestimmte genetische Varianten zwar ein höheres Erkrankungsrisiko bedingen, die Erkrankung aber nicht zwingend herbeiführen.

Im Falle des Herzinfarktes ist anzunehmen, dass mehrere prädisponierende genetische Faktoren in einem oder mehreren Genen interagieren und im Zusammenspiel mit Umweltfaktoren zur Manifestation der Erkrankung führen. Es handelt sich also beim Herzinfarkt um eine multifaktorielle polygene Erkrankung, wobei der Effekt einer einzelnen genetischen Variante gering ist. Dies wiederum zieht enorme Schwierigkeiten für die Identifikation und klinische Gewichtung möglicher Gendefekte bzw. Genvarianten nach sich.

### **1.4.1 Kandidatengenanalysen**

Zur Identifizierung mit dem Herzinfarkt assoziierter Gendefekte gibt es einerseits die Möglichkeit, sog. genetische Assoziationsstudien oder Kandidatengenanalysen durchzuführen. Hierbei wird die Bedeutung von bekannten Polymorphismen in Kandidatengen untersucht, die in der Literatur einen signifikanten Einfluss auf einen Risikofaktor oder auf einen intermediären Phänotyp hatten.(19) Untersucht werden hier

vor allem das Renin-Angiotensin-System,(7) der Lipidstoffwechsel,(26) die Entzündungskaskade(8;15;23) sowie die Blutgerinnung und Fibrinolyse.(28) Die erste positive Assoziation für den Herzinfarkt wurde 1992 von Cambien und Mitarbeitern veröffentlicht.(7)

#### **1.4.2 Genomweite Analysen**

Ein zweiter Ansatz zur Untersuchung der genetischen Grundlagen des Herzinfarktes ist die Durchführung von systematischen Kopplungsanalysen in Familien mit mehreren Betroffenen. Durch die Analyse von genetischen Markern, die engmaschig das gesamte Genom überspannen, können Regionen identifiziert werden, in denen ein krankheitsverursachendes Gen mit hoher Wahrscheinlichkeit lokalisiert ist. Zum Beispiel können Kopplungsanalysen bei betroffenen Geschwisterpaaren durchgeführt werden, wobei für die untersuchten Genloci die Allelverteilung mit den Phänotypen der Familienangehörigen korreliert wird. Zeigt sich bei den Betroffenen ein bestimmtes Allel an einem Genlocus häufiger als eine zufällige Verteilung erwarten lassen würde, könnte ein gemeinsam mit diesem Locus vererbter Gendefekt für den entsprechenden Phänotyp (d.h. den Herzinfarkt) verantwortlich sein. Dieses Studiendesign ist für eine systematische genomweite Analyse geeignet, erfordert jedoch eine große Anzahl betroffener Geschwisterpaare. Die traditionelle Kopplungsanalyse ist vorteilhaft für die Untersuchung seltener familiärer Formen des Herzinfarktes. In entsprechend großen Familien läßt sich die Vererbung von Phänotyp und molekularem Marker über Generationen hinweg verfolgen. Problematisch ist allerdings die hohe Letalität des Herzinfarktes, welche das Auffinden geeigneter, ausreichend großer Familien sehr schwierig macht. Es besteht jedoch die Möglichkeit, den Genotyp von bereits verstorbenen Familienmitgliedern anhand des Genotyps von Ehepartner und Kindern zu rekonstruieren und so der genetischen Analyse zugänglich zu machen.

Diese genomweiten Kopplungsanalysen sind bereits von mehreren Arbeitsgruppen durchgeführt worden, um die genetische Komponente bei der Entstehung kardiovaskulärer Krankheiten zu untersuchen, wobei mehrere mit dem Herzinfarkt assoziierte Loci identifiziert wurden.(6;12;16;17;38;48)

#### **1.5 Autosomal-dominante Vererbung des Herzinfarktes**

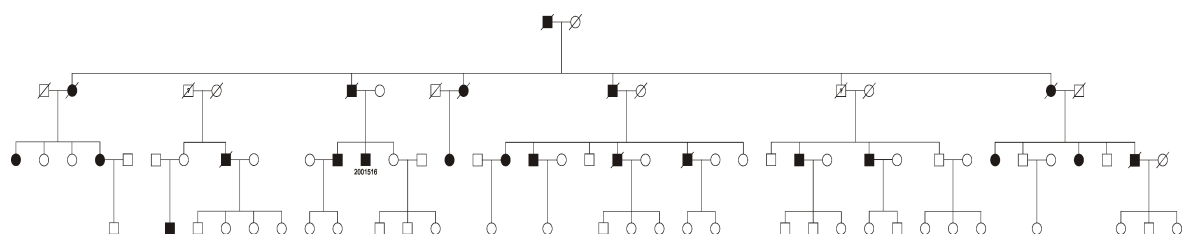
Die Untersuchungen bezüglich der Identifikation von Gendefekten bei autosomal-dominant vererbten Formen des Herzinfarktes sind in der Arbeitsgruppe von Prof. Schunkert an der Klinik für Innere Medizin II der Universität Regensburg begonnen



worden und werden seit Oktober 2002 hier an der Medizinischen Klinik II des UK S-H, Campus Lübeck fortgeführt. In der Arbeitsgruppe werden seit 1993 epidemiologische und genetische Forschungsprojekte zu kardiovaskulären Erkrankungen durchgeführt, seit 1996 liegt ein Forschungsschwerpunkt auf Untersuchungen zur Genetik des Herzinfarktes.

Im Rahmen der Herzinfarkt-Familienstudie wurden in der Zeit von Januar 1997 bis Juli 2001 in Zusammenarbeit mit 17 kardiologischen Rehabilitationskliniken deutschlandweit über 200.000 Krankenakten auf familiäre Häufung von kardiovaskulären Erkrankungen geprüft und Familien mit mindestens zwei lebenden betroffenen Geschwistern mit Herzinfarkt bzw. schwerer Koronarer Herzerkrankung identifiziert. Nach Kontaktaufnahme und weiterer Befragung dieser Familien erklärten sich insgesamt über 6000 Personen aus über 1400 Familien schriftlich zur Teilnahme bereit. Es wurden Blutentnahmen sowie eine standardisierte Befragung zum momentanen Gesundheitszustand und zum kardiovaskulären Risikoprofil durchgeführt.

Im Rahmen dieser Suche in mehr als 200.000 Krankenakten fanden sich über 100 Familien mit drei oder mehr vom Herzinfarkt betroffenen Angehörigen. Die Kriterien für eine Herzinfarkt-Großfamilie waren erfüllt, wenn neben drei betroffenen Geschwistern mindestens ein betroffener Cousin/Cousine am Leben waren und in die Teilnahme an der Untersuchung einwilligten. Ferner mußten beiderseits die Eltern der jeweiligen Linien anamnestisch vom Herzinfarkt betroffen gewesen sein. Auf diesem Wege konnten 19 Herzinfarkt-Großfamilien mit insgesamt 490 Probanden (114 HI-Patienten und 376 nicht betroffene Familienmitglieder) identifiziert und phänotypisiert werden. Die größte Familie bestand aus 65 lebenden Familienmitgliedern mit 22 HI-Patienten in fünf Generationen. Der Stammbaum einer dieser HI-Großfamilien ist beispielhaft in Abb.3 dargestellt.



**Abb. 3: Stammbaum einer Herzinfarkt-Großfamilie**

Männer sind mit Quadraten, Frauen mit Kreisen, Betroffene in schwarz, nicht Betroffene umrandet und Verstorbene durchgestrichen kodiert

Weiterhin zeigten sich Familien, in denen gehäuft Myokardinfarkte aufgetreten waren, die jedoch die oben genannten Kriterien für eine Herzinfarkt-Großfamilie nicht erfüllten. Aus einigen dieser Familien sollen im Rahmen dieser Doktorarbeit ebenfalls Probanden untersucht werden. Deutlich wird an den Herzinfarkt-Großfamilien das Problem der „late-onset“-Erkrankungen: Betroffene der Parentalgeneration sind meist bereits verstorben, wenn die Erkrankung bei den Kindern auftritt.

**Phänotypisierung:** Alle Personen der Herzinfarkt-Großfamilien wurden anhand eines standardisierten Fragebogens zum kardiovaskulären Risikoprofil phänotypisiert und alle anamnestischen Angaben zu einem Herzinfarkt anhand der Originalberichte der jeweiligen Behandlungen verifiziert. Dazu kam eine Blutentnahme für die Bestimmung von Cholesterinprofil und HbA1c-Spiegel sowie zur Extraktion von DNA für die genetische Analyse.

Der Vergleich dieser neuen HI-Großfamilien mit einem Kollektiv von Patienten mit sporadischen Herzinfarkten (KORA-Augsburg) und einem gesunden Kontrollkollektiv (Augsburg MONICA echokardiographische Substudie) zeigte leicht erhöhte systolische Blutdruckwerte in allen Familien, während Diabetes mellitus und Adipositas weniger häufig vorkamen. Neun der Familien hatten deutlich erhöhte Lipidwerte, die sich auch bei den Familienmitgliedern ohne HI zeigten.

**Genotypisierung:** An allen Personen aus den Herzinfarkt-Großfamilien wurde eine genomweite Kopplungsanalyse mit 385 Mikrosatellitenmarkern durchgeführt. Zum einen verwendete man die klassische Zweipunktanalyse. Hierbei wird die jeweilige Genotypinformation eines Mikrosatellitenmarkers mit dem Phänotyp korreliert und für jeden Marker ein Lod Score generiert. Zum anderen ist zusätzlich eine Mehrpunktanalyse durchgeführt worden, bei der die Genotypinformationen aller auf einem Chromosom typisierten Mikrosatellitenmarker in die Kalkulation miteinbezogen werden. Die Mehrpunktanalyse erlaubt eine Lod Score-Berechnung für jeden Punkt auf dem Chromosom, ferner kann auch ein nicht parametrischer Lod Score (NPL Score) berechnet werden.

Die genetische Analyse der HI-Großfamilien ergab den höchsten theoretischen LOD-Score unter der Annahme eines autosomal-dominanten Vererbungsmusters; dazu passt, dass fast die Hälfte aller Familienmitglieder zwischen 50 und 70 Jahren vom HI betroffen waren und nahezu 100% der HI-Patienten ebenfalls betroffene Eltern hatten.

## 1.6 Risikoabschätzung

Mit Hilfe des sog. PROCAM-Scores (Prospective Cardiovascular Münster)(2), der aus den Daten des 10-Jahres-Follow-up eines Münsteraner Kollektivs aus 5389 Männern ermittelt wurde, soll im Rahmen dieser Doktorarbeit das Risiko für das Auftreten akuter koronarer Ereignisse innerhalb der nächsten 10 Jahre für jede Person der oben beschriebenen Herzinfarkt-Großfamilien ermittelt und so eine weiterführende Phänotypisierung dieser Familien durchgeführt werden.

## 1.7 MEF2A (Myocyte Enhancer Factor 2A)

Im Jahr 2003 ist es der Arbeitsgruppe von Wang gelungen, die erste krankheitsverursachende Mutation in einer Familie mit einer autosomal-dominant vererbten Form der Koronaren Herzkrankheit bzw. des Myokardinfarktes zu identifizieren.(45) Diese Mutation befindet sich im *MEF2A*-Gen. Es handelt sich hierbei um eines der vier Mitglieder der Transkriptionsfaktor-Familie Myocyte Enhancer Factor 2, das auf Chromosom 15q26 lokalisiert ist und durch 12 Exons kodiert wird. Die *MEF2*-Gene kodieren für DNA-bindende Regulatorproteine, welche sich an bestimmten Regionen (*MEF2*-bindende Sequenz) vieler muskelspezifischer Gene anlagern und so Einfluss auf deren Expression nehmen.

*MEF2A*-cDNA konnte in der frühen Embryogenese von Mäusen in Blutgefäßen als früher Marker für Vaskulogenese-Prozesse nachgewiesen werden.(9) Mausmodelle für das Fehlen von *MEF2A* (*MEF2A*<sup>-/-</sup>) zeigten, dass die meisten dieser Mäuse in der ersten Lebenswoche starben. Es lag eine Erweiterung des rechten Ventrikels vor, die genaue Ursache für den plötzlichen Tod der *MEF2A*<sup>-/-</sup> blieb jedoch weitgehend unklar.(37)

Anfangs wurde das *MEF2A*-Gen als muskelspezifisches Gen identifiziert, ist später jedoch auch in hoher Expression im Gefäßendothel nachgewiesen worden.(10;45) Dies deutet darauf hin, dass *MEF2A* möglicherweise eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der Gefäßbildung bzw. der Gefäßmorphologie spielt, indem es die Differenzierung von glatten Muskelzellen beeinflusst und in der Endothelentwicklung von Bedeutung ist. Das Fehlen bzw. das verminderte Vorkommen von *MEF2A* würde zu einer abnormalen Endothelausprägung mit daraus resultierender Gefäßwandschwäche in den Koronararterien führen und dadurch entzündliche Prozesse und Thrombenbildung begünstigen, da die protektive Funktion des Endothels vermindert ist bzw. fehlt.(47)

Bei der von Wang und Mitarbeitern identifizierten Mutation handelt es sich um eine 21-bp-Deletion im Exon 12 des *MEF2A*-Gens, welche sich bei allen betroffenen Mitgliedern einer Familie mit autosomal-dominanter Form der Koronaren Herzerkrankung bzw. des

Herzinfarktes zeigte.(45) Bei den Nichtbetroffenen wurde dieser Gendefekt nicht gefunden. Die Arbeitsgruppe hatte zuvor im Rahmen einer genomweiten Analyse mit Mikrosatellitenmarkern einen hohen LOD-Score für die Region 15q26 erhalten und das *MEF2A*-Gen als erstes von ungefähr 93 Genen in dieser Region bei HI-Patienten sequenziert. Nach Angabe von Wang und Mitarbeitern wird durch diese funktionelle Mutation die Aktivität von *MEF2A* als Transkriptionsfaktor vermindert, sodass die Endothelentwicklung in den Koronararterien gestört, die Plaqueanlagerung begünstigt und damit zur Pathogenese des Herzinfarktes beigetragen wird.

Dieselbe Arbeitsgruppe beschrieb kurze Zeit später drei weitere Mutationen im Exon 8 des *MEF2A*-Gens (N236S, P279L und G283D), welche im Rahmen einer Untersuchung von 207 Patienten mit Koronarer Herzkrankheit/Myokardinfarkt bei vier Patienten identifiziert werden konnten und bei den 191 untersuchten gesunden Kontrollen nicht vorlagen (Prävalenz 1,9%).(4)

Weitere Arbeitsgruppen haben das *MEF2A*-Gen bei Patienten mit KHK bzw. HI auf das Vorliegen von krankheitsverursachenden Mutationen untersucht und kamen zu anderen Ergebnissen: die von Wang et al. beschriebene 21-bp-Deletion wurde auch bei gesunden Kontrollpersonen identifiziert.(51) Somit konnte die Hypothese der Krankheitskausalität nicht unterstützt werden und die Bedeutung dieser Mutation wird weiterhin diskutiert, sodass weiterführende Untersuchungen des *MEF2A*-Gens in größeren Kollektiven von Herzinfarkt-Patienten und gesunden Kontrollpersonen erforderlich sind(25;51)

### **1.8 Ziel der vorliegenden Arbeit**

Inhalt dieser Doktorarbeit ist zunächst die Berechnung des Risikos akuter koronarer Ereignisse für jedes Mitglied der Herzinfarkt-Großfamilien mit Hilfe des PROCAM-Scores. Anschließend folgt die Untersuchung des *MEF2A*-Gens auf mögliche Mutationen, die für die Entstehung von seltenen autosomal-dominant vererbten Herzinfarkten verantwortlich sind. Hierbei sollen alle 12 Exons mit den flankierenden Intronbereichen sowie die 5'- und 3'-UTR-Region von *MEF2A* bei einem Patientenkollektiv aus den Herzinfarkt-Großfamilien sequenziert werden. Das Vorliegen der von Wang identifizierten 21-bp-Deletion soll bei diesen Familien überprüft werden. Ausserdem soll die Typisierung von zwei genetischen Varianten, dem Polymorphismus P279L in Exon 8 sowie dem (CAG)<sub>n</sub>-Repeat in Exon 12 des *MEF2A*-Gens, in großen Kollektiven aus Patienten mit familiär gehäuft auftretenden sowie sporadischen Herzinfarkten im Vergleich mit gesunden Kontrollpersonen erfolgen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Studiengruppen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Assoziation des *MEF2A*-Gens in zwei großen Fall-Kontrollstudien untersucht, wobei auf ein Herzinfarkt-Kollektiv mit familiär gehäuften Infarkten und auf ein Kollektiv mit Herzinfarktpatienten ohne familiäre Belastung sowie zwei Kontrollpopulationen zurückgegriffen werden konnte. Die Kollektive werden nachfolgend näher beschrieben.

#### 2.1.1 Herzinfarktkollektiv mit positiver Familienanamnese

##### 2.1.1.1 Deutsche Herzinfarktfamilienstudie

In der Deutschen Herzinfarktfamilienstudie wurden in der Zeit von Januar 1997 bis Juli 2001 in Zusammenarbeit mit 17 Rehabilitationskliniken für Herz- und Kreislauferkrankungen deutschlandweit über 200.000 Krankenakten auf familiäre Häufung von kardiovaskulären Erkrankungen geprüft, um primär **Herzinfarktgeschwisterpaare** zu identifizieren. Wenn eine Familie mindestens zwei lebende betroffene Geschwister mit Herzinfarkt bzw. schwerer koronarer Herzerkrankung (KHK, definiert als PTCA oder Bypass-Operation) aufwies, wurde diese Familie kontaktiert und nach entsprechender Einwilligung ausführlich bezüglich kardiovaskulärer Risikofaktoren und Ereignisse sowie weiterer betroffener Familienmitglieder befragt. Insgesamt erklärten sich über 6000 Personen aus über 1400 Familien schriftlich zur Teilnahme an einer molekulargenetischen Studie zur Identifizierung genetischer Ursachen des Herzinfarktes bereit. Alle lebenden Mitglieder dieser Familien wurden einheitlich phänotypisch charakterisiert. Es folgte eine ausführliche körperliche Untersuchung sowie die Erhebung der kardiovaskulären Risikofaktoren (Hypertonie, Nikotinabusus, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie). Von allen Personen wurde DNA extrahiert. Die biochemischen Analysen zu Risikofaktoren erfolgten zentral in einem Labor.

##### 2.1.1.2 Herzinfarkt-Großfamilien

Neben Herzinfarkt-Geschwisterpaaren wurden in der Deutschen Herzinfarktfamilienstudie auch Herzinfarkt-Großfamilien mit mindestens fünf vom Herzinfarkt betroffenen Personen identifiziert. Für die Definition als Herzinfarkt-Großfamilie mussten in einer Familie folgende Kriterien erfüllt sein:

- mindestens drei betroffene Geschwister mit einem Herzinfarkt vor dem 60. Lebensjahr

- mindestens zwei betroffene Cousins/Cousinen mit Herzinfarkt vor dem 60. Lebensjahr

19 Familien erfüllten diese Kriterien und wurden als Herzinfarkt-Großfamilien klassifiziert. Es handelte sich insgesamt um 490 Probanden (114 HI-Patienten und 376 nicht betroffene Familienmitglieder). Die größte Familie bestand aus 65 lebenden Familienmitgliedern mit 22 Herzinfarkt-Patienten in fünf Generationen.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde bei jeweils einem repräsentativen Mitglied pro Großfamilie das *MEF2A*-Gen sequenziert.

### **2.1.2 Sporadische Herzinfarktpatienten (KORA-B Herzinfarktregister)**

Das KORA-B-Kollektiv (Cooperative Health Research in the Augsburg Area) besteht aus 609 Patienten mit Herzinfarkt vor dem 60. Lebensjahr aus dem Herzinfarktregister Augsburg, das im Rahmen des WHO-MONICA-Projektes (siehe unten) etabliert wurde. Die Diagnose des Herzinfarktes wurde nach den MONICA-Kriterien gestellt ([www.ktl.fi/publications/manual/index.htm](http://www.ktl.fi/publications/manual/index.htm)). Die Patienten wurden nach dem Protokoll der MONICA-Studie (körperliche Untersuchung, Labor, EKG, Echokardiographie, standardisierte Befragung) untersucht.(20)

In der vorliegenden Doktorarbeit wurden der (CAG)n-Repeat (n=543) und der P279L-Polymorphismus (n=533) des *MEF2A*-Gens bei diesen Herzinfarkt-Patienten genotypisiert.

### **2.1.3 Kontrollpopulationen**

#### **2.1.3.1 Ehepartner in der Herzinfarkt-Familienstudie**

Die gesunden Ehepartner der Patienten aus der Herzinfarkt-Familienstudie dienten als Kontrollpopulation für die familiär gehäuften Herzinfarkte. In der vorliegenden Doktorarbeit wurden 1021 dieser Kontrollpersonen für den P279L-Polymorphismus genotypisiert.

#### **2.1.3.2 Augsburg MONICA echokardiographische Substudie**

Als Kontrollgruppe für die sporadischen Herzinfarktpatienten dienten Teilnehmer der populationsbasierten echokardiographischen Substudie der Augsburg MONICA (Monitoring of Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Studie 1994/1995. Bei der MONICA-Studie handelt es sich um einen repräsentativen Bevölkerungsquerschnitt der Region Augsburg bestehend aus Individuen zwischen 25 und 74 Jahren, der ausführlich phänotypisch charakterisiert wurde. Es erfolgten eine körperliche Untersuchung, Elektrokardiogramm, Echokardiographie, verschiedene laborchemische

Blutuntersuchungen sowie standardisierte Interviews mit Fragen nach kardiovaskulären Risikofaktoren und den regelmäßig eingenommenen Medikamenten. Alle teilnehmenden Personen erklärten schriftlich ihr Einverständnis und das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission akzeptiert (Az. 02/042, Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Regensburg, 06.03.2002).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden der (CAG)<sub>n</sub>-Repeat (n=1055) und der P279L-Polymorphismus (n=1190) in diesem Kontrollkollektiv für die sporadische Herzinfarkte (KORA-B-Kollektiv) genotypisiert.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Berechnung des kardiovaskulären 10-Jahres-Risikos

Durch die PROCAM-Studie (2) wurde eine Möglichkeit entwickelt, das individuelle Risiko eines Probanden für das Auftreten akuter koronarer Ereignisse innerhalb der nächsten 10 Jahre zu bestimmen.

Die Basis dieser Risikoabschätzung ist das globale Risikoprofil eines Patienten, d. h. die Gesamtheit seiner kardiovaskulären Risikofaktoren. Der Score wurde aus den 10-Jahres-Follow-up-Daten einer Längsschnittuntersuchung an einem Münsteraner Kollektiv ermittelt.(2)

Im Zeitraum von 1979-1985 wurden 5389 Männer zwischen 35 und 65 Jahren für die Studie rekrutiert und im 10-Jahres-Follow-up bezüglich des Auftretens von akuten koronaren Ereignissen (plötzlicher Herztod bzw. durch EKG und/oder Herzenzyme nachgewiesener Herzinfarkt) beobachtet. Teilnehmer mit Herzinfarkt bzw. Schlaganfall in der Vorgeschichte bzw. mit EKG-Zeichen für kardiale Ischämie wurden vom Follow-up ausgeschlossen. Innerhalb des Beobachtungszeitraums von 10 Jahren traten insgesamt 325 akute koronare Ereignisse auf.

Für die Risikoberechnung wurden die folgenden Parameter herangezogen und jeweils in mehrere Kategorien unterteilt (siehe Tabelle 1): Alter, LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin, Triglyzeride, Rauchen, Diabetes mellitus, systolischer Blutdruck und Herzinfarkt in der Familienanamnese. Diesen Parametern wurden mit Hilfe des Cox-Modells (Regressionsmethode zur Analyse von Überlebensdaten, wenn gleichzeitig der Effekt mehrerer Einflussgrößen auf eine Zielvariable untersucht werden soll(55)) und Kaplan-Meier-Überlebenskurven Punktwerte als Gewichtung der Bedeutung der jeweiligen Einflussvariablen zugeordnet und anhand der Gesamtsumme dieser Punktwerte das Risiko für akute koronare Ereignisse in Prozent bestimmt (siehe Tabelle 2).



| Parameter               |         | Punktwert |
|-------------------------|---------|-----------|
| Alter (Jahre)           | 35-39   | 0         |
|                         | 40-44   | 6         |
|                         | 45-50   | 11        |
|                         | 50-54   | 16        |
|                         | 55-59   | 21        |
|                         | 60-65   | 26        |
|                         |         |           |
| LDL-Cholesterin (mg/dl) | <100    | 0         |
|                         | 100-129 | 5         |
|                         | 130-159 | 10        |
|                         | 160-189 | 14        |
|                         | >190    | 20        |
|                         |         |           |
| HDL-Cholesterin (mg/dl) | <35     | 11        |
|                         | 35-44   | 8         |
|                         | 45-54   | 5         |
|                         | >55     | 0         |
|                         |         |           |
| Triglyzeride (mg/dl)    | <100    | 0         |
|                         | 100-149 | 2         |
|                         | 150-199 | 3         |
|                         | >200    | 4         |
|                         |         |           |
| Rauchen                 | Nein    | 0         |
|                         | Ja      | 8         |
|                         |         |           |
| Diabetes mellitus       | Nein    | 0         |
|                         | Ja      | 6         |
|                         |         |           |
| HI in Familienanamnese  | Nein    | 0         |
|                         | Ja      | 4         |
|                         |         |           |
| Systol. RR (mmHg)       | <120    | 0         |
|                         | 120-129 | 2         |
|                         | 130-139 | 3         |
|                         | 140-159 | 5         |
|                         | >160    | 8         |

Tabelle 1: Parameter für den PROCAM-Score und zugeordnete Punktwerte

| Anzahl der Punkte | 10-Jahres-Risiko (%) |
|-------------------|----------------------|
| ≤ 20              | ≤ 1.0                |
| 21                | 1.1                  |
| 22                | 1.2                  |
| 23                | 1.3                  |
| 24                | 1.4                  |
| 25                | 1.6                  |
| 26                | 1.7                  |
| 27                | 1.8                  |
| 28                | 1.9                  |
| 29                | 2.3                  |
| 30                | 2.4                  |
| 31                | 2.8                  |
| 32                | 2.9                  |
| 33                | 3.3                  |
| 34                | 3.5                  |
| 35                | 4.0                  |
| 36                | 4.2                  |
| 37                | 4.8                  |
| 38                | 5.1                  |
| 39                | 5.7                  |
| 40                | 6.1                  |
| 41                | 7.0                  |
| 42                | 7.4                  |
| 43                | 8.0                  |
| 44                | 8.8                  |
| 45                | 10.2                 |
| 46                | 10.5                 |
| 47                | 10.7                 |
| 48                | 12.8                 |
| 49                | 13.2                 |
| 50                | 15.5                 |
| 51                | 16.8                 |
| 52                | 17.5                 |
| 53                | 19.6                 |
| 54                | 21.7                 |
| 55                | 22.2                 |
| 56                | 23.8                 |
| 57                | 25.1                 |
| 58                | 28.0                 |
| 59                | 29.4                 |
| ≥ 60              | ≥ 30                 |

Tabelle 2: Risiko für akute koronare Ereignisse assoziiert mit jedem Score

Anhand des oben beschriebenen Scores wurde für jedes Mitglied der 23 zu untersuchenden Herzinfarkt-Großfamilien das Risiko, innerhalb der nächsten 10 Jahre einen Herzinfarkt zu erleiden, ermittelt. Bei den Betroffenen, d.h. den Familienmitgliedern, die bereits einen Herzinfarkt gehabt hatten, wurden vom jeweiligen Manifestationsalter (Alter beim Auftreten des Herzinfarktes) fünf Jahre subtrahiert und somit ein ungefährender mittlerer Wert für das 10-Jahres-Risiko bestimmt.

Die auf die beschriebene Weise ermittelten PROCAM-Werte wurden als Auswahlkriterium für die Genotypisierung der einzelnen Patienten aus den Herzinfarkt-Großfamilien herangezogen. Die genetische Analyse des *MEF2A*-Gens erfolgte vor allem bei Patienten mit frühem Manifestationsalter des Herzinfarktes sowie einem geringen kardiovaskulären Risikoprofil und damit einem niedrigen PROCAM-Score. Hierdurch sollte das Phänomen der Phänokopie (Veränderung in der Merkmalbildung eines Genotyps durch Außenfaktoren, die zur Nachbildung eines anderen Genotyps führt) vermieden und eine höhere Wahrscheinlichkeit der genetischen Entstehung des Herzinfarktes bei diesen Patienten gewährleistet werden.

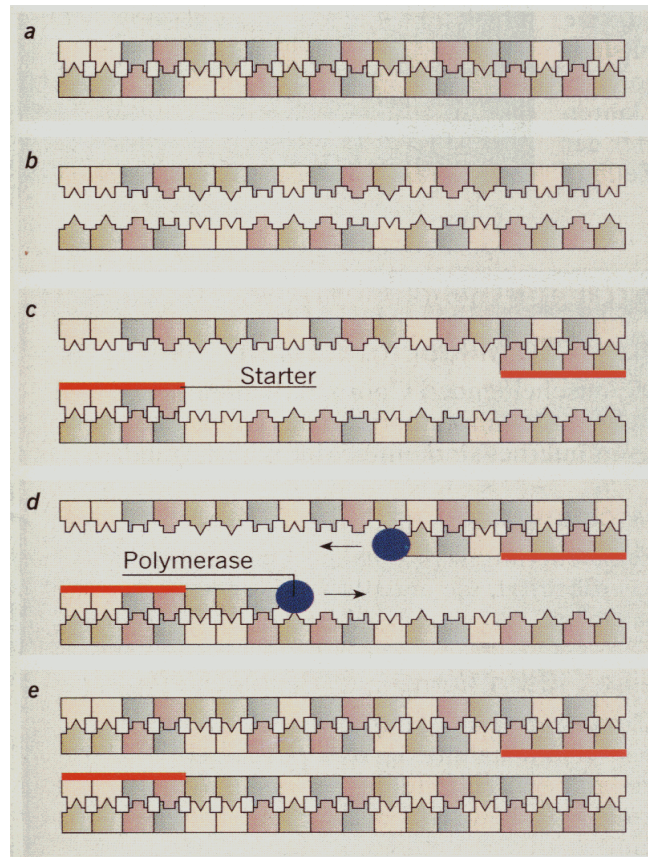
### 2.2.2 Polymerase - Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) handelt es sich um ein molekulargenetisches Verfahren, bei dem selektiv bestimmte DNA-Abschnitte exponentiell vervielfältigt werden.(35)

Standard-PCR: Benötigt werden Ausgangs-DNA (Template), eine thermostabile DNA-Polymerase, zwei passende Oligonukleotidprimer, Puffer und Nukleotide.

Am Anfang jedes PCR-Zyklus steht ein Denaturierungsschritt: Bei einer Temperatur von 94°C trennen sich die beiden Stränge der Template- DNA. In der anschließend folgenden Annealingphase wird die Temperatur auf Werte zwischen 55 und 65°C gesenkt und es kommt zur Hybridisierung der im Überschuss vorhandenen Oligonukleotidprimer an die nun einzelsträngige Template-DNA. Im dritten Schritt, der Elongationsphase, wird die Temperatur auf 72°C (Temperaturoptimum der Taq-Polymerase) erhöht und ausgehend von den Primern beginnt die DNA-Synthese, bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt, die identisch mit der ursprünglichen Template-DNA ist. Da die Synthese an beiden Strängen der DNA abläuft, wird in einem Zyklus die Zahl der Templates verdoppelt, nach zwei Zyklen vervierfacht usw., es findet also eine exponentielle Vervielfältigung der Ausgangs-DNA statt. Bei der Standard-PCR variiert die Anzahl der

Zyklen zwischen 30 und 40. In Abb.4 ist der Ablauf eines PCR-Zyklus‘ schematisch dargestellt.



**Abb. 4: Schematische Darstellung eines PCR-Zyklus‘ (aus: Facharbeit Biologie K.Thust, 2003)**

- a) Doppelstrang-DNA (Ausgangstemplate)
- b) Auftrennung in zwei Einzelstränge (Denaturierungsphase)
- c) Anlagerung der Oligonukleotidprimer (Annealingphase)
- d) DNA-Synthese ausgehend von den Primern (Elongationsphase)
- e) Vorliegen zweier neuer Doppelstrang-DNAs

### 2.2.2.1 PCR-Programm

Für die Untersuchung der Patienten-DNA bei den 23 ausgewählten Kandidaten aus den beschriebenen Herzinfarkt-Großfamilien auf krankheitsverursachende Mutationen in den einzelnen Exons des *MEF2A*-Gens wurde standardmäßig folgendes PCR-Programm verwendet:

| Temperatur | Zeit    | Anzahl der Zyklen |
|------------|---------|-------------------|
| 94°C       | 3 min.  | 1x                |
| 94°C       | 30 sec. |                   |
| 61°C       | 30 sec. | 3x                |
| 72°C       | 30 sec. |                   |
| 94°C       | 30 sec. |                   |
| 59°C       | 30 sec. | 3x                |
| 72°C       | 30 sec. |                   |
| 94°C       | 30 sec. |                   |
| 57°C       | 30 sec. | 3x                |
| 72°C       | 30 sec. |                   |
| 94°C       | 30 sec. |                   |
| 55°C       | 30 sec. | 30x               |
| 72°C       | 30 sec. |                   |
| 72°C       | 10 min  | 1x                |

**Tabelle 3: Touch down-Programm zur Durchführung der PCR**

#### 2.2.2.2 Oligonukleotidprimer

Die Primerpaare für die PCR der 12 Exons sowie der 5'- und 3'-UTR-Region von *MEF2A* wurden mit Hilfe des Primer3-Programms designt und bei der Firma Biotez bestellt. Die gelieferten Primer mussten auf eine Konzentration von 50pmol/μl verdünnt werden. Die einzelnen Primersequenzen sind in Tabelle 10 im Anhang dargestellt.

Nach der Verdünnung erfolgte das Austesten der Primer mit dem oben beschriebenen Touch down Programm und wenn nötig eine PCR-Optimierung durch Erhöhung bzw. Senkung der Annealing-Temperatur.

#### 2.2.2.3 MasterMix

Die weiteren erforderlichen Bestandteile des PCR-Ansatzes (siehe oben) wurden in Form eines MasterMix der Firma Eppendorf hinzugefügt. Es handelt sich um ein Reagenzgemisch (die genaue Zusammensetzung kann dem Anhang entnommen werden), das mit einer zusätzlichen Magnesiumlösung versehen ist und unter Zugabe von DNA, Oligonukleotidprimern und Wasser für die PCR verwendet wird.

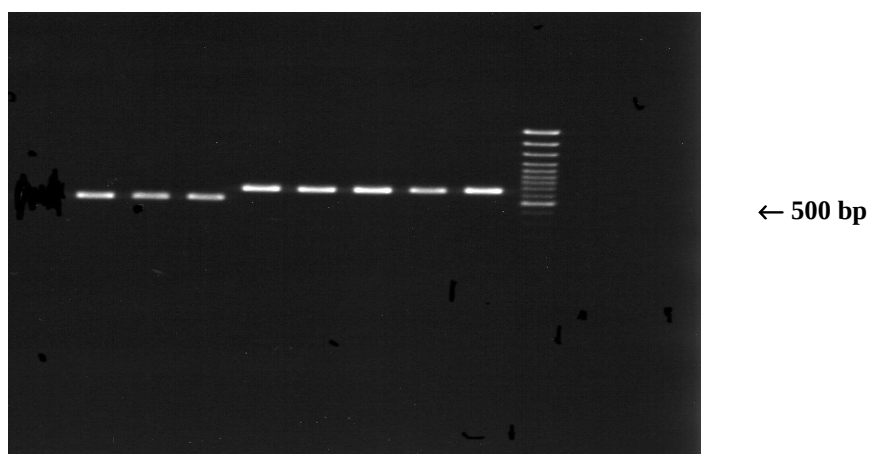
#### 2.2.2.4 Patienten-DNA

Für die PCR-Ansätze wurde die bereits im Kollektiv vorliegende DNA der 23 ausgewählten Patienten aus den Herzinfarkt-Großfamilien verwendet. Hierbei wurde auf eine Konzentration von 10 ng/µl verdünnt und jeder Ansatz enthielt zwischen 50 und 80 ng DNA.

#### 2.2.3 Agarosegelelektrophorese

Das Verfahren der Agarosegelelektrophorese dient dazu, DNA-Fragmente von 0.5 bis 25 kb Länge voneinander zu trennen und zu identifizieren.(33)

Prinzip: Agarose wird in Elektrophoresepuffer in der Mikrowelle aufgekocht, bis die Agarose gelöst ist. Die flüssige Agarose wird in einen Gelschlitten mit einem Kamm gegossen, sodass nach dem Abkühlen ein Gel mit Taschen entsteht. Das Gel wird in eine Elektrophoresekammer gegeben und diese mit Puffer aufgefüllt, sodass das Gel knapp bedeckt ist. Anschließend wird die DNA-Lösung in die Taschen pipettiert und eine Spannung angelegt (zwischen 50 und 150 Volt). Die Fragmente wandern durch das Gel, wobei kleine Fragmente schneller laufen als große. Ist die DNA ausreichend weit gelaufen, färbt man das Gel mit einem Farbstoff (bzw. fügt diesen bereits der DNA hinzu und pipettiert ihn mit in die Taschen), betrachtet es unter UV-Licht und hat die Möglichkeit zur fotografischen Dokumentation (siehe Abb.5). Tabelle 4 zeigt die Agarosekonzentrationen und die jeweiligen Fragmentlängentrennbereiche.



**Abb. 5: Exemplarische Darstellung eines Agarosegels**

Längenstandard: 100 bp DNA-Leiter (die 500 bp-Stufe ist mit einem Pfeil gekennzeichnet)

| Fragmentlänge (kb) | Agarosekonzentration (%) |
|--------------------|--------------------------|
| 1 – 30             | 0.5                      |
| 0.8 – 12           | 0.7                      |
| 0.5 – 7            | 1.0                      |
| 0.4 – 6            | 1.2                      |
| 0.2 – 3            | 1.5                      |
| 0.1 – 2            | 2.0                      |

**Tabelle 4: Agarosekonzentrationen und die jeweiligen Fragmentlängentrennbereiche (aus: Mülhardt, Molekularbiologie /Genomics, 4. Auflage, Spectrum Verlag)**

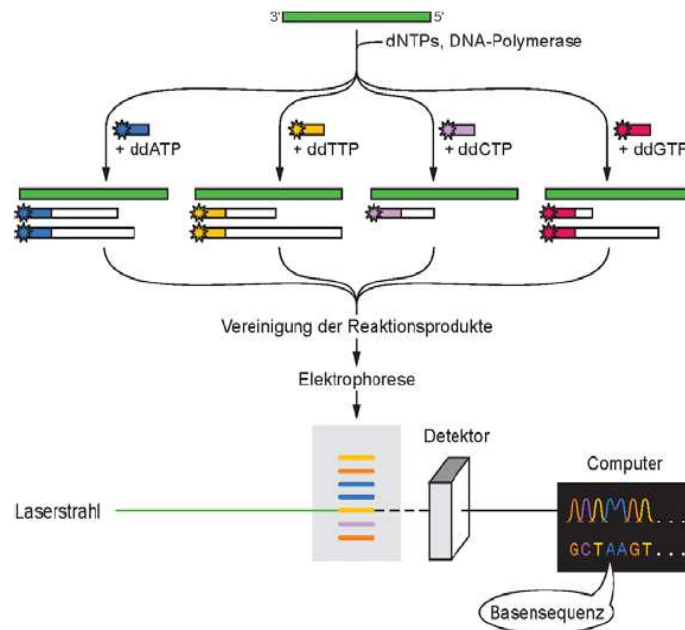
Anwendung: Für die Darstellung der PCR-Produkte aus der Patienten-DNA wurden überwiegend 1.5%ige Agarosegele verwendet. Als Puffer wurde 1xTBE (Tris-Borat-EDTA) benutzt und als Färbemethode der Farbstoff SYBR Green. Die Proben wurden mit Loading Dye versetzt. Zur Orientierung bzw. Größenbestimmung der Fragmente wurde immer zusätzlich ein Längenstandard (100 bp DNA-Leiter) aufgetragen. Die verwendete Spannung für die Gelelektrophorese betrug meist 117 Volt.

#### 2.2.4 DNA-Sequenzierung

Nach Durchführung von PCR und Gelelektrophorese wurden die Proben zu der Firma Sequiserve (Vaterstetten) bzw. Geneart (Regensburg) verschickt, um dort sequenziert zu werden.

Prinzip (siehe auch Abb.6): bei der automatischen Sequenzierung in Sequenziergeräten (Kapillar-Sequenzier) wird die DNA mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, die vom Gerät während der Elektrophorese mittels Laser angeregt und gemessen werden.<sup>(33)</sup> Hierbei liegt die Leseweite unter optimalen Bedingungen zwischen 500 und 1000 Nukleotiden. Die Markierung sitzt entweder im Primer oder an den Didesoxynukleotiden, wobei letztere Variante den Vorteil hat, dass vier verschiedene Farbstoffe verwendet werden können. Die Sequenzierungsreaktion wird dann in einem einzigen Gefäß durchgeführt und beansprucht auf dem Gel nur eine Spur je Sequenz.

Wichtig ist die Reinigung der Proben vor dem Auftragen, weil nicht eingebaute Nukleotide bzw. Primer zu einem starken Hintergrund führen können, der das Lesen der ersten Basen deutlich erschwert. Schließlich liegt dann das Ergebnis in Form eines vierfarbigen Ausdrucks vor, wobei jeder der vier Basen eine Farbe zugeordnet ist.



**Abb. 6: Automatische DNA-Sequenzierung (aus: Müller-Esterl, Biochemie, 2004 Elsevier GmbH)**

### 2.2.5 5' Exonuklease Assay (TaqMan)

Die TaqMan-Realtime-PCR beruht auf dem Prinzip der 5'-Nuklease-Aktivität der eingesetzten Polymerasen. Der PCR-Ansatz enthält neben den normalen Oligonukleotidprimern für eine PCR eine sequenzspezifische Oligonukleotid-Sonde, mit deren Hilfe der Verlauf der PCR beobachtet werden kann.<sup>(22;52)</sup> Diese Sonde ist am 5'-Ende mit einem fluorogenen Reporterfarbstoff (Farbstoff, der sich bei einer Wellenlänge von 488 nm anregen lässt) und am 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff (nimmt die Energie von angeregten Reportermolekülen auf und strahlt sie bei einer deutlich anderen Wellenlänge als der Reporter ab) versehen. Solange die Sonde intakt ist, wird die Fluoreszenzenergie vom Reporter auf den Quencher übertragen und von diesem resorbiert. Ablauf: Primer und Sonde binden an die DNA-Stränge. Die Taq-Polymerase beginnt an den 3'-Enden der Primer zu amplifizieren. Erreicht die Taq-Polymerase die Sonde, wird die 5'-Nuklease-Aktivität der Polymerase aktiviert, wodurch es zu einer Fragmentierung der Sonde kommt. Dadurch sind Reporter und Quencher räumlich weiter voneinander entfernt, der Energietransfer zwischen den Farbstoffmolekülen ist erschwert und die verstärkte Fluoreszenz des Reporters führt zur Entstehung eines Signals. Dieser Vorgang wiederholt sich bei jedem Zyklus und die gemessene Zunahme der Fluoreszenz ist direkt proportional zum entstandenen Amplifikat.



### 2.2.6 Statistische Analyse

Im ersten Schritt wurde überprüft, ob die Genotypen der Polymorphismen in den einzelnen Fall- und Kontrollgruppen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht abweichen. Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht wird in der Populationsgenetik verwendet, um die Beziehung zwischen Allelfrequenzen und Genotypfrequenzen darzustellen. Hierbei wird von einer nicht vorkommenden idealen Population (d.h. vollständige Durchmischung ohne Selektion, Mutation und Migration) ausgegangen, in der sich die relativen Häufigkeiten der Allele und Genotypen nicht ändern. Um auf Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht zu testen, wurden mittels eines  $\chi^2$ -Tests auf Anpassung erwartete und tatsächliche Genotypfrequenzen der Polymorphismen verglichen.(54)

Im zweiten Schritt wurde untersucht, ob die Polymorphismen signifikant mit dem Herzinfarkt assoziiert sind. Für den (CAG)<sub>n</sub>-Repeat wurden die Unterschiede der Genotypfrequenzen zwischen Herzinfarktpatienten und gesunden Kontrollpersonen mittels zweiseitigem Cochran-Armitage Trend Test für 2x3 Tafeln verglichen. Mit diesem Test wird überprüft, ob mit Zunahme der Anzahl des seltenen Allels auch das Risiko der Fälle im Vergleich zu den Kontrollen zunimmt. Beim P279L-Polymorphismus kommt in keiner der vorliegenden Studien das seltene Allel vor. Die Analyse reduziert sich somit auf eine 2x2 Tafel, in der die Felder der Heterozygoten nur schwach besetzt sind. Aus diesem Grund wird auf die Assoziation zwischen P279L-Polymorphismus und Herzinfarkt mit Hilfe des zweiseitigen exakten Tests nach Fisher getestet.(42) Eine Fehlerwahrscheinlichkeit von  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant betrachtet.

### 2.2.7 Durchführung der Arbeiten

Mit Hilfe der oben beschriebenen Methoden wurden die 23 ausgewählten HI-Patienten aus den Herzinfarkt-Großfamilien bezüglich Mutationen im *MEF2A*-Gen untersucht.

Allgemeiner Ablauf: Primerdesign und –bestellung für das jeweilige DNA-Fragment

Austesten der Primer, ggf. PCR-Optimierung

Durchführung der PCR

Agarosegelelektrophorese

DNA-Sequenzierung

Auswertung der Sequenzen

### 2.2.7.1 *MEF2A* Exon 1 bis 12, 5'UTR und 3'UTR

Bei den 23 ausgewählten HI-Patienten aus den Großfamilien wurden die 12 Exons mit den flankierenden Intronsequenzen sowie die 5'- und 3'- UTR-Region des *MEF2A*-Gens mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert.

PCR-Ansatz für Primertestung

pro Ansatz: 10 µl MasterMix  
12 µl Aqua dest.  
2 µl Primer (F- und R-Primer)  
1 µl Test-DNA  
Gesamtvolumen: 25 µl

Die Patienten-DNA wurde für die Durchführung der PCR nach dem oben dargestellten Schema in Mikrotiterplatten pipettiert.

pro Ansatz: 10 µl MasterMix  
8 µl Aqua dest.  
2 µl Primer (F- und R-Primer)  
5 µl DNA (10 ng/ml)  
Gesamtvolumen: 25 µl

Gelelektrophorese: Auftragen von 4 µl PCR-Produkt mit 2 µl Loading Dye und 1 µl SYBR GREEN auf 1.5 %ige Agarosegele, Laufdauer 1 h bei 117 V.

DNA-Sequenzierung: Verschicken der Proben, DNA-Sequenzierung und anschließende Auswertung der Sequenzen durch die jeweilige Firma; eigene Auswertung anhand der Elektropherogramme und Sequenzen.

### 2.2.7.2 *MEF2A* 21-bp-Deletion

Untersuchung aller Personen der Herzinfarkt-Großfamilien auf das Vorliegen der 2003 von Wang et al. beschriebenen 21-bp-Deletion im Exon 12 des *MEF2A*-Gens.

Hierfür wurde die DNA aller Probanden auf Mikrotiterplatten vorpipettiert und eingetrocknet, die übrigen Reagenzien hinzugegeben und die PCR nach dem standardmäßig verwendeten Touch-down Programm (siehe oben) durchgeführt.

pro Ansatz: 10 µl MasterMix  
8 µl Aqua dest.

2 µl Primer (F- und R-Primer)

10 µl DNA (10 ng/ml)

Gesamtvolumen: 20 µl

Anschließend Gelelektrophorese auf Acrylamidgelen, um eine gute Auflösung zu erreichen bzw. die unterschiedlich langen Fragmente (mit/ohne Deletion) auf dem Foto erkennen zu können. Es erfolgte die Sequenzierung dieser Region durch die Firma Geneart bzw. Sequiserve.

#### **2.2.7.3 (CAG)<sub>n</sub>-Repeat in Exon 12 von *MEF2A***

Im Exon 12 des *MEF2A*-Gens ist eine mehrfache Wiederholung der Basenreihenfolge (CAG)<sub>n</sub> bereits seit längerer Zeit beschrieben.<sup>(3)</sup> Dieser Trinukleotid-Repeat wurde auch im Rahmen der Sequenzierung des *MEF2A*-Gens bei den Mitgliedern der Herzinfarkt-Großfamilien gefunden. Zur genaueren Bestimmung der Verteilung der unterschiedlichen Anzahl von Wiederholungen und der Darstellung eines eventuellen Zusammenhangs einer bestimmten Anzahl von Repeats mit dem Auftreten von Myokardinfarkten folgte die diesbezügliche Untersuchung eines deutlich größeren Kollektivs von Herzinfarkt-Patienten (sporadische und familiär gehäuft auftretende Herzinfarkte) und gesunden Kontrollpersonen. Die Arbeiten wurden in Berlin (Charité-Universitätsmedizin Berlin, Abteilung Toxikologie) durchgeführt.

#### **2.2.7.4 Genotyp-Frequenz für den *MEF2A*-P279L-Polymorphismus**

Bei diesem Polymorphismus, der bereits von der Arbeitsgruppe von Gonzalez<sup>(13)</sup> beschrieben wurde, handelt es sich um eine seltene Variante in Exon 8 des *MEF2A*-Gens. Mit Hilfe der oben beschriebenen TaqMan-Methode wurden große Kollektive bestehend aus Patienten mit familiär gehäuften bzw. sporadisch auftretenden Herzinfarkten sowie gesunden Kontrollpersonen auf das Vorliegen dieses Polymorphismus untersucht.

Der Eigenanteil an der Durchführung der beschriebenen Arbeiten ist im Ergebnisteil (Seite 42) klar herausgestellt.

### 3. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde für die Sequenzierung des *MEF2A*-Gens die DNA eines Patientenkollektivs aus den bereits oben beschriebenen Herzinfarkt-Großfamilien verwendet. Die klinischen Charakteristika dieser Großfamilien sind als Übersicht in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

| Parameter                                | HI           | kein HI      |
|------------------------------------------|--------------|--------------|
| N                                        | 122          | 394          |
| Frauen (%)                               | 32,8         | 53,6         |
| Alter                                    | 62,6 ± 8,3   | 46,2 ± 14,0  |
| Alter beim ersten HI                     | 54,9 ± 8,8   |              |
| Systolischer Blutdruck, mm HG            | 145,5 ± 20,4 | 130,1 ± 19,2 |
| Diastolischer Blutdruck, mm HG           | 84,8 ± 9,7   | 80,9 ± 10,4  |
| Bluthochdruck, WHO (%)*                  | 92,6         | 34,3         |
| Cholesterin (total), mg/dl               | 236,8 ± 49,0 | 236,4 ± 43,1 |
| HDL Cholesterin, mg/dl                   | 52,4 ± 13,7  | 58,1 ± 14,8  |
| LDL Cholesterin, mg/dl                   | 155,5 ± 43,4 | 149,1 ± 34,1 |
| HbA1C, %                                 | 5,88 ± 0,82  | 5,54 ± 0,64  |
| Diabetes, HBA1C ≥ 6 (%)                  | 24,6         | 9,6          |
| Diabetes, anam. (%)                      | 10,9         | 3,6          |
| Rauchen, jemals (%)                      | 74,2         | 52,0         |
| Rauchen, derzeit (%)                     | 14,0         | 28,0         |
| Body Mass Index (BMI), kg/m <sup>2</sup> | 27,2 ± 3,3   | 26,1 ± 4,4   |
| BMI > 27,5 (%)                           | 50,0         | 33,0         |
| BMI > 30 (%)                             | 16,4         | 16,2         |

**Tabelle 5: Phänotypisierungsdaten der Herzinfarkt-Großfamilien**

Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung bei den kontinuierlichen Variablen und Häufigkeiten in % bei den binären Variablen

\* systolischer/diastolischer Blutdruck ≥140/90 oder Einnahme von Antihypertensiva

#### 3.1 Berechnung des kardiovaskulären 10-Jahres-Risikos

Es wurde das Risiko, innerhalb der nächsten 10 Jahre ein akutes koronares Ereignis (Herzinfarkt) zu erleiden, für alle Mitglieder der beschriebenen Herzinfarkt-Großfamilien nach dem PROCAM-Score bestimmt. Hierbei zeigte sich als auffällig, dass die Patienten mit Herzinfarkt zum Teil ein niedriges Manifestationsalter und wenig kardiovaskuläre

Risikofaktoren hatten, woraus sich rechnerisch ein geringes Herzinfarktrisiko ermitteln ließ. Andererseits ergab die Berechnung auch Personen mit einem hohen Risiko, d.h. deutlichen kardiovaskulären Risikofaktoren, die bis über das 70. Lebensjahr hinaus keinen Herzinfarkt erlitten hatten.

In Tabelle 6 sind die nach dem PROCAM-Score berechneten Risikowerte für die 23 ausgewählten Herzinfarkt-Patienten dargestellt. Die genauen Ergebnisse der Risikoberechnung für jede einzelne Person der Herzinfarkt-Großfamilien sind Tabelle 11 im Anhang zu entnehmen.

| ID      | Familie | Stammbaum | PROCAM [%] | Punktwert |
|---------|---------|-----------|------------|-----------|
| 8948502 | 8948    | 1         | 6,1        | 40        |
| 2001516 | 2001    | 2         | 8,0        | 43        |
| 8882503 | 8882    | 3         | 4,0        | 35        |
| 8622504 | 8622    | 4         | 1,0        | 19        |
| 8655503 | 8655    | 5         | 13,2       | 49        |
| 8502502 | 8502    | 6         | 5,7        | 39        |
| 4453501 | 4453    | 7         | 8,8        | 44        |
| 6486503 | 6486    | 8         | 7,4        | 42        |
| 6545504 | 6545    | 9         | 5,7        | 39        |
| 6556504 | 6556    | 10        | 8,0        | 43        |
| 6642502 | 6642    | 11        | 6,1        | 40        |
| 6686502 | 6686    | 12        | 5,1        | 38        |
| 6849509 | 6849    | 13        | 1,3        | 23        |
| 8409501 | 8409    | 14        | 4,2        | 36        |
| 8517504 | 8517    | 15        | 10,7       | 47        |
| 8662501 | 8662    | 16        | 4,0        | 35        |
| 8848506 | 8848    | 17        | 7,0        | 41        |
| 9011501 | 9011    | 18        | 1,3        | 23        |
| 8942527 | 8942    | 19        | 2,9        | 32        |
| 8826502 | 8826    | 20        | 6,1        | 40        |
| 8170501 | 8170    | 21        | 6,1        | 40        |
| 7429502 | 7429    | 23        | 10,2       | 45        |
| 7028506 | 7028    | 24        | 6,1        | 40        |

**Tabelle 6: PROCAM-Score für die 23 ausgewählten Herzinfarkt-Patienten**

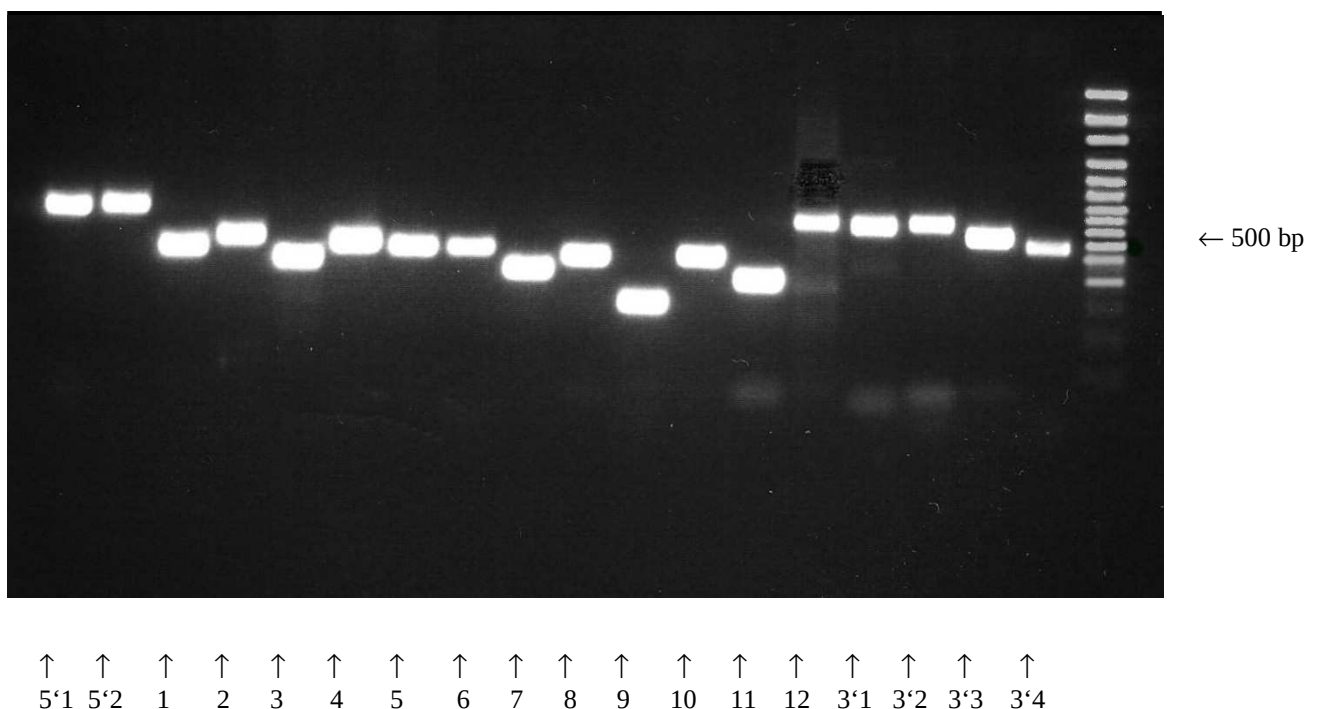
PROCAM (Prospective Cardiovascular Münster, 2002): Risiko eines Patienten, innerhalb der nächsten 10 Jahre ein akutes koronares Ereignis (Herzinfarkt) zu erleiden

### 3.2 Sequenzierung des *MEF2A*-Gens

#### 3.2.1 Optimierung der PCR

Bei 23 ausgewählten Herzinfarkt-Patienten aus den Großfamilien wurden die 12 Exons mit den flankierenden Intronabschnitten sowie die 5'- und 3'-UTR-Region von *MEF2A* sequenziert.

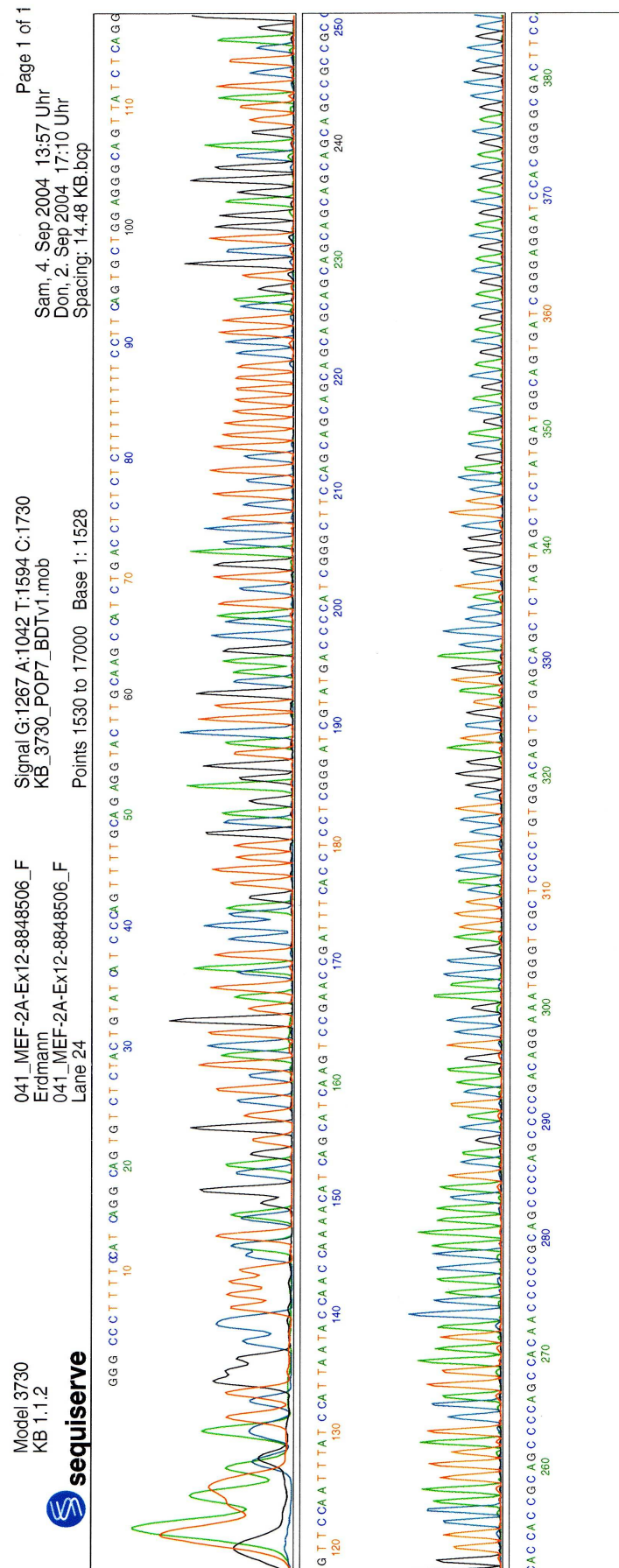
Die Primerpaare für die einzelnen Fragmente, die von der Firma Biotez synthetisiert worden waren, wurden zu Beginn der Arbeit ausgetestet, um optimale PCR-Produkte zu erhalten. Alle Primerpaare zeigten, wie in Abb.7 dargestellt, mit dem Standard-Touch-down-Programm (siehe Methodenteil) das beste Resultat.



**Abb. 7: Darstellung aller verwendeten *MEF2A*-Primer auf dem Agarosegel**

5'1 und 5'2 stehen für 5'UTR Fragment 1+2, 1-12 für Exon 1-12, 3'1-4 für 3'UTR Fragment 1-4  
 Längenstandard: 100 bp DNA-Leiter (die 500 bp-Stufe ist mit einem Pfeil gekennzeichnet)

Nach der PCR-Optimierung erfolgte die DNA-Sequenzierung bei der Firma Geneart (Regensburg) bzw. Sequiserve (Vaterstetten). Anschließend wurden die erhaltenen Sequenzen ausgewertet. Abb. 8 zeigt einen Ausschnitt aus einem Elektropherogramm.



### 3.2.2 DNA-Sequenzierung

#### 3.2.2.1 21-bp-Deletion

Im Rahmen der Sequenzierung des *MEF2A*-Gens bei den Herzinfarkt-Patienten und den gesunden Kontrollpersonen aus den Großfamilien konnte die von Wang und Mitarbeitern identifizierte 21-bp-Deletion in Exon 12 in diesem Patientenkollektiv nicht gefunden werden.

#### 3.2.2.2 Polymorphismen im *MEF2A* Gen

Weiterhin ergab die Sequenzierung von *MEF2A* bei den 23 ausgewählten HI-Patienten keine seltenen funktionellen genetischen Varianten mit einer Bedeutung für die Pathogenese des Herzinfarktes. Es wurden mehrere bereits bekannte Polymorphismen bestätigt und einige neue Polymorphismen identifiziert, die in der folgenden Tabelle dargestellt sind.

| Genomic Position<br>NM_005587 | Position<br><i>MEF2A</i> -Gen | Position cDNA<br>NM_005587 | Position Protein<br>NP_005587 | MAF         | Status    |
|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------|-------------------------------|-------------|-----------|
| g.54813 G>C                   | Intron 2 – 67 G/C             |                            |                               | 0,35        | Neu       |
| g.54859 A>T                   | Intron 2 – 22 A/T             |                            |                               | 0,37        | Neu       |
| g.137300 [T]6>[T]5            | Intron 8 – 74 del T           |                            |                               | [T]6 → 0,13 | Neu       |
| g.137484 G>A                  | Intron 9 + 82 G/A             |                            |                               | 0,13        | rs3730281 |
| g.140646 T>G                  | Intron 10 – 101 T/G           |                            |                               | 0,02        | rs325409  |
| g.140748 C>T                  | Exon 10                       | c.888 C>T                  | p.N297N                       | 0,15        | rs325408  |
| g.144827 C>G                  | Intron 11 + 50 C/G            |                            |                               | 0,22        | rs325403  |
| g.146522 [CAG]n               | Exon 12                       | c.1255-1287 (11)           | p.419-429                     | n=11 → 0,50 | rs3138597 |
|                               |                               | c.1255-1284 (10)           | p.419-428                     | n=10 → 0,15 |           |
|                               |                               | c.1255-1281 (9)            | p.419-427                     | n=9 → 0,35  |           |
| g.146941 [TGTG]n              | 3'UTR                         |                            |                               | n=1 → 0,57  | Neu       |
|                               |                               |                            |                               | n=2 → 0,43  |           |
| g.148537 T>C                  | 3'UTR                         |                            |                               | 0,35        | rs897074  |

**Tabelle 7: Identifizierte Polymorphismen im *MEF2A*-Gen**

MAF: minor allele frequency

Die in Tabelle 7 dargestellten Polymorphismen im *MEF2A*-Gen werden nun im einzelnen bezüglich Lokalisation, Allelfrequenz in dem untersuchten Patientenkollektiv und Bedeutung für die Pathogenese von Herzinfarkten beschrieben.



### 3.2.2.2.1 Intron 2 – 22 A/T

```

CTTTGAGAAATCTCCAAACTGCTGTGCACAGTGGCTAAACTAATTTACAT
TCTCAGCAACAATGTGTAAATATTCCCCTTGCTCTGTAACCTCACAAACA
[A/T]
CTTTTTTTTTTTTTTTTTGGGACATTGAGTCTCACTCTACCCCCCAGGC
TGAAGTGCAGTGGTGTGATCTCGGTTCACTGCAACCTCCGCCTCCAGGTT
CAAGTGATTCTCGTACCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGATTACAGGCGCC
TGCCACCATGCCTGGCTGATATTTATATTTTATAGTAGAGATGGAGTTTCA
CCATGTTGGCCAGGCTGGTCTCGAACTCTGGACCTCAGGTAATCTACCCT
CCTCGGCCTCCCAAAGCGCTGGGATTACAGGCGTGAGCCACTGCGCCTGG
CCAGCCTCACCAGATGTCTATCTACAGAATATTTAATAACAAAACCTAGAAC

```

**Abb. 9: DNA-Sequenz des Exon 2 von *MEF2A* und der flankierenden Intronabschnitte**

Die exonische Sequenz ist in schwarzen Großbuchstaben, die intronischen Sequenzen in grauen Großbuchstaben dargestellt. Der Polymorphismus ist in [ ] dargestellt

Der Polymorphismus aus Abb.9 liegt im Bereich des zweiten Introns von *MEF2A* und ist bisher noch nicht in der Literatur beschrieben worden. Die Allelfrequenz in dem untersuchten Kollektiv betrug für das A-Allel 63% und für das T-Allel 37%. Da die Variante außerhalb des kodierenden Bereiches lokalisiert ist, hat sie höchstwahrscheinlich keine Bedeutung für die Entstehung des Herzinfarktes bei diesen Patienten.

### 3.2.2.2.2 Intron 2 – 67 G/C

```

AGAAATCTCCAAACTGCTGTGCACAGTGGCTAAACTAATTTACATTCTCA
[G/C]
CAACAATGTGTAAATATTCCCCTTGCTCTGTAACCTCACAAACATCTTTT
TTTTTTTTTTTTTTTTGGGACATTGAGTCTCACTCTACCCCCCAGGCTGAAG
TGCAAGTGGTGTGATCTCGGTTCACTGCAACCTCCGCCTCCAGGTTCAAGT
GATTCTCGTACCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGATTACAGGCGCCTGCCA
CCATGCCTGGCTGATATTTATATTTTATAGTAGAGATGGAGTTTCACCATG
TTGGCCAGGCTGGTCTCGAACTCTGGACCTCAGGTAATCTACCCTCCTCG
GCCTCCCAAAGCGCTGGGATTACAGGCGTGAGCCACTGCGCCTGGCCAGC
CTCACCGATGTCTATCTACAGAATATTTAATAACAAAACCTAGAACTACAT

```

**Abb. 10: DNA-Sequenz des Exon 2 von *MEF2A* und der flankierenden Intronabschnitte**

Erläuterungen siehe Abb. 9

Bei Abb.10 handelt es sich ebenfalls um einen Polymorphismus im Intron 2 des *MEF2A*-Gens, der nicht innerhalb der kodierenden Sequenz liegt und deswegen keine funktionelle Bedeutung hinsichtlich des Herzinfarktes hat. In dem untersuchten Kollektiv war die Allelfrequenz 65% für das G-Allel und 35% für das C-Allel.

### 3.2.2.2.3 Intron 8 - 74 del T

```

AACTCAACAAGTAGAGACAAGTAATTTATATTTCTATCTGTTGTGTATAT
AATCGTCTCTTTAGAGTTCCAGACAGCTGCTAGTGTCCAAATATGTTTT
t
CTAAAGAAATATTTTGTGTTGTGAGTACCAACAGTCTTAGTAACCTCTTA
TCCCTCTTATGTGCTGAGTACAGTCGGAGGAAGAGGAATTGGAGTTGGTG
AGTGTGGGTTTCTGCTTGAAGGAAGTTGAAAAAGATGTAGAAAGTACTAA
TTCTCTTACGTGTTGTTATCTAACCAATGTTCCCTTTGTTACACAAATTT
TTTAAACACTATTCAAACACTTTGAATAAAGCAATCTACTGGTACTACA
GACTCTAGTTTTTCTATTTATAATTGTATGTGTTGACCCATTTTATTTGT

```

**Abb. 11: DNA-Sequenz des Exon 9 von *MEF2A* und der flankierenden Intronabschnitte**  
Erläuterungen siehe Abb. 9

Dieser 1-bp-Deletionspolymorphismus aus Abb.11 im Intron 8 an Position – 74 zeigte sich in dem untersuchten Kollektiv aus 23 HI-Patienten mit einer Häufigkeit von 13% und ist bisher noch nicht in der Literatur beschrieben worden. Eine Bedeutung dieser Variante für die Entstehung des Herzinfarktes bei den Patienten ist aufgrund der Position ebenfalls unwahrscheinlich.

### 3.2.2.2.4 Intron 9 + 82 G/A

```

CTAGTGTCCAAATATGTTTTTCTAAAGAAATATTTTGTGTTGTGAGTACC
AACAGTCTTAGTAACCTCTTATCCCTCTTATGTGCTGAGTACAGTCGGA
GGAAGAGGAATTGGAGTTGGTGAGTGTGGGTTTCTGCTTGAAGGAAGTTG
AAAAAGATGTAGAAAGTACTAATTCTCTTACGTGTTGTTATCTAACCAAT
[G/A]
TTCCCTTTGTTACACAAATTTTTTAAACACTATTCAAACACTTTGAATA
AAGCAATCTACTGGTACTACAGACTCTAGTTTTTCTATTTATAATTGTAT
GTGTTGACCCATTTTATTTGTTGGAGGGAACATTGGAATAGAGCCTTTAA
AAACAGTAGCTGTCCATGAGCATAGGATACTTGTTAATTTTTTTTTTAAG

```

**Abb. 12: DNA-Sequenz des Exon 9 von *MEF2A* und der flankierenden Intronabschnitte**  
Erläuterungen siehe Abb. 9

Es handelt sich in Abb.12 um eine bereits beschriebene Variante (rs3730281) im Intron 10 des *MEF2A*-Gens, die im Rahmen der Sequenzierung gefunden wurde (Allelfrequenz G-Allel 87%; A-Allel 13%). Aufgrund der Lokalisation außerhalb des kodierenden Bereiches ist eine funktionelle Bedeutung des Polymorphismus und damit ein Zusammenhang mit der Entstehung von Herzinfarkten äußerst unwahrscheinlich.

### 3.2.2.2.5 Intron 10 – 101 T/G

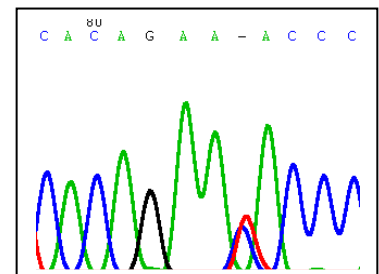
```
GGCATCAAGTCCTCATTGTTGTGCAACAAATAGAAGTGCTAATGCCTGTAA
CAGAAGTTCCTATTTTAACGTGGGGTGTCTGACARTAATCAACTATTTTA
AAAGAATTAATGTAAAAATAGGACCCTTCAAATTAATATTTAGTTATTC
TCACTAGTATTTTTGAAGTTTTACATCATCAGTGCTTCAGAAAATGACA
[T/G]
TCATATGAAACTGTGAAAAATGTCACCTAAATTGAAAGTGATTTTTAAGT
CAACATAAATACCACATCAGAACACATTTTCTCTTTTTTGATCTCACAGA
ARACCCAYAGGATCAGTAGTTCTCAAGCCACTCAACCTCTTGCTACYCCA
GTCGTGTCTGTGACAACCCCAAGCTTGCTCCGCAAGGACTTGTGTACTC
```

**Abb. 13: DNA-Sequenz von Teilen des Exon 10 von *MEF2A* und des vorhergehenden Intronbereiches**  
Erläuterungen siehe Abb. 9

Der Polymorphismus in Abb.13 befindet sich ebenfalls im Intron 10 von *MEF2A* und konnte bei der Sequenzierung bestätigt werden (rs325409). Die Allelfrequenz betrug bei den untersuchten Patienten 98% für das T-Allel und 2% für das G-Allel. Auch hier liegt keine funktionelle Bedeutung vor, weil sich der Polymorphismus nicht im Bereich der kodierenden Sequenz befindet.

### 3.2.2.2.6 Exon 10

```
AGAATTAATGTAAAAATAGGACCCTTCAAATTAATATTTAGTTATTCTC
ACTAGTATTTTTGAAGTTTTACATCATCAGTGCTTCAGAAAATGACAMT
CATATGAAACTGTGAAAAATGTCACCTAAATTGAAAGTGATTTTTAAGTC
AACATAAATACCACATCAGAACACATTTTCTCTTTTTTGATCTCACAGAA
[C/T]
ACCCAYAGGATCAGTAGTTCTCAAGCCACTCAACCTCTTGCTACYCCAGT
CGTGTCTGTGACAACCCCAAGCTTGCTCCGCAAGGACTTGTGTACTCAG
CAATGCCGACTGCCTACAACACTGGTGAGCCTGCTCTGGTGCCTTCCGTA
GGTTTTACCGCTCTCTGTTTTGTGATCAACGTGTGCTTCTGTGATTTTTT
```



**Abb. 14a: DNA-Sequenz des Exon 10 von *MEF2A* und der flankierenden Intronabschnitte**  
Erläuterungen siehe Abb. 9

**Abb. 14b: Darstellung des Polymorphismus in dem entsprechenden Elektropherogrammausschnitt**

In Abb.14 liegt ein Polymorphismus vor, der im Exon 10 von *MEF2A* lokalisiert ist. Auch diese Variante ist bereits beschrieben (rs325408) und ergab in dem untersuchten Kollektiv eine Allelfrequenz von 85% für das C-Allel und 15% für das T-Allel. Auch wenn die Variante mitten im Exon liegt, kommt es durch die veränderte Basensequenz zu keinem Aminosäuraustausch. Also besteht keine Veränderung im Genprodukt und es kann kein Zusammenhang zwischen der Variante und dem Auftreten von Herzinfarkten bei den untersuchten Patienten hergestellt werden.

### 3.2.2.2.7 Intron 11 + 50 C/G

```
GAGCCCTCTTGTCTTCCTTTGTAGATTATTCAGTACCAGCGCTGACCTG
TCAGCCCTTCAAGGCTTCAACTCGCCAGGAATGCTGTCGCTGGGACAGGT
GTCGGCCTGGCAGCAGCACCACTAGGACAAGCAGCCCTCAGCTCTCTTG
TGTGAGTAAGTAGAAGTTTTCCCTGCATCTTTACTCCTGGCCTACACACT
[C/G]
TCTTTTCCTATCAGTGACAGCCTTTTGCTCTGTTGAGTTTCGTGTGAGGA
ATCCTGTAATGATTCTTTTCAGGTAGATACAAGTGTGGGAGAAAATAT
TTTCTTACATGGCTCTAGACAGTAGCTTGGATACTGACAACTAGGCATT
CCTTGAAGGGATTGGGGAGCAAGGCTTCTCCCATAGGGACATCCTGAGG
```

**Abb. 15: DNA-Sequenz des Exon 11 von *MEF2A* und der flankierenden Intronabschnitte**

Erläuterungen siehe Abb. 9

Es handelt sich bei Abb.15 um einen Polymorphismus im Intron 12 des *MEF2A*-Gens. Im Rahmen der Sequenzierung ergab sich eine Allelfrequenz von 78% für das C-Allel und 22% für das G-Allel. Dieser bereits bekannte Polymorphismus (rs325403) hat ebenfalls keine funktionelle Bedeutung.

### 3.2.2.2.8 3'UTR

```
AAATGGCAAAATAGTAGATGAGCACAAAGGTTTTATAAGTGGTAAATGAT
TAGGGGAAAATAATCATGGGGAAAGGGATCTTTTTCTTGACCCTCTGA
AAACAGAACGATGCAGCTGGTTACAAAATCCTACCGTTATCAGCTCTTCT
GCACATTGCAGTGATGCTTTGGTATGCGGGAGAAACACTCTTAGGGTGC
[T/C]
GGTCCTTGGCATGACTCTTGCCATTCTAATTGGAATTAGTGCCACCCTCA
GCTTGGATTTTGAACAAGGCCTTATTCTTTAGGAAGACAATAATGGAT
GATAGCAAGTTCATCCACTTACTGGGCTTGTGCCATGAGCAAAATTCAA
GTCCTGTATATCTTTCATTGTAGATTTTAAATACTCCTTTTCCTAAAAA
```

**Abb. 16: DNA-Sequenz der 3'UTR-Region von *MEF2A***

Erläuterungen siehe Abb. 9

In der 3'UTR-Region von *MEF2A* konnte dieser Polymorphismus (Abb.16) bestätigt werden (rs897074). Es zeigte sich eine Allelfrequenz von 65% für das T-Allel und 35% für das C-Allel. Aufgrund seiner Lokalisation außerhalb der kodierenden Sequenz ist auch dieser Polymorphismus ohne Bedeutung bezüglich der Entstehung von Herzinfarkten.

### 3.2.2.2.9 3'UTR

```
ATTCTCCAATTGTGCTTGGCCGACCCCCAAACACTGAGGACAGAGAAAGC
CCTTCTGTAAAGCGAATGAGGATGGACGCGTGGGTGACCTAAGGCTTCCA
AGCTGATGTTTGTACTTTTGTGTTACTGCAGTGACCTGCCCTACATATCT
AAATCGGTAAATAAGGACATGAGTTAAATATATTTATATGTACATACATA
TATATATCCCTTTACATATATATGTATGTGGGTGTGAGTGTGTATGTGTG
[TGTG]
GGTGTGTGTTACATACACAGAATCAGGCACTTACCTGCAAACTCCTTGTA
GGTCTGCAGATGTGTGTCCCATGGCAGACAAAGCACCTGTAGGCACAGA
CAAGTCTGGCACTTCCTTGGACTACTTGTTTCGTAAAGATAACCAGTTTT
```

**Abb. 17: DNA-Sequenz der 3'UTR-Region von *MEF2A***

Erläuterungen siehe Abb. 9

Bei der Variante in Abb.17 handelt es sich um die Insertion von TGTG in der 3'UTR-Region von *MEF2A*, die mit einer Allelfrequenz von 43% für das [TGTG]<sub>2</sub>-Allel und 57% für das [TGTG]<sub>1</sub>-Allel in dem untersuchten Kollektiv vorkam. Die Insertion ist noch nicht in der Literatur beschrieben worden und steht höchstwahrscheinlich nicht im Zusammenhang mit dem Auftreten von Herzinfarkten bei diesen Patienten.

### 3.2.2.3 Genotypisierung des (CAG)<sub>n</sub>-Repeats im *MEF2A*-Gen

#### Exon 12 (CAG)<sub>n</sub>

```

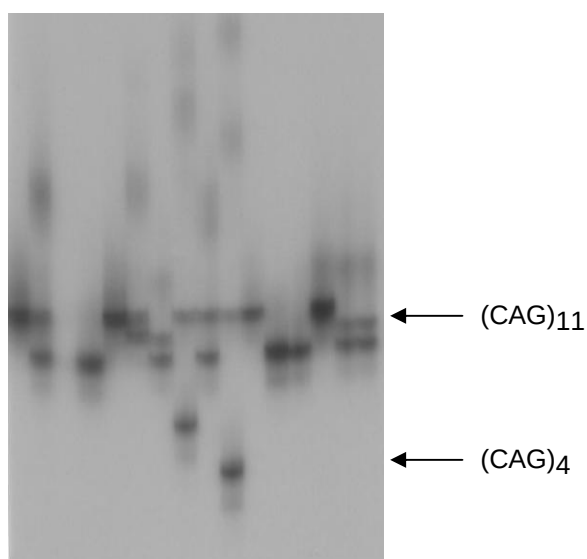
TCCTAGGAAGATGGGATTTCTTTTGTGCCAAGCACTGAAGGAAACGACC
CAAACCAAGTCTTGGGGAAGTCTGATAAGATTTCACTCTGGGCCCTTTT
CCATCAGGCAGTGTCTCTACTGTATCATCCAGTTTTGCAGAGGTACTTG
CAAGCCATCTGACCTCTCTCTTTTTTTTCTTCAGTGCTGGAGGGCAGTT
ATCTCAGGGTTCCAATTTATCCATTAATACCAACCAAAACATCAGCATCA
AGTCCGAACCGATTTACCTCCTCGGGATCGTATGACCCCATCGGGCTTC
CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG
CCGCCGCCACCACCGCAGCCCCAGCCACAACCCCCGAGCCCCAGCCCCG
ACAGGAAATGGGGCGCTCCCCTGTGGACAGTCTGAGCAGCTCTAGTAGCT
CCTATGATGGCAGTGATCGGGAGGATCCACGGGGCGACTTCCATTCTCCA
ATTGTGCTTGGCCGACCCCAAACACTGAGGACAGAGAAAGCCCTTCTGT
AAAGCGAATGAGGATGGACGCGTGGGTGACCTAAGGCTTCCAAGCTGATG
TTTGTACTTTTGTGTTACTGCACTGACCTGCCCTACATATCTAAATCGGT
AAATAAGGACATGAGTTAAATATATTTATATGTACATACA

```

**Abb. 18: DNA-Sequenz des Exon 12 von *MEF2A*, des vorhergehenden Intronbereiches und der sich anschließenden 3'UTR-Region**

Erläuterungen siehe Abb. 9; der CAG-Repeat ist blau dargestellt und fett gedruckt

Bei Abb.18 handelt es sich um eine Variante im Exon 12 des *MEF2A*-Gens, die aus einer unterschiedlichen Anzahl von Wiederholungen der Basenreihenfolge CAG besteht. Dieser (CAG)<sub>n</sub>-Repeat ist bereits in der Literatur beschrieben.(3;25;51) In dem Kollektiv der 23 untersuchten Patienten aus den Herzinfarkt-Großfamilien fand sich am häufigsten das Allel (CAG)<sub>11</sub> (Allelfrequenz 50%), gefolgt von (CAG)<sub>9</sub> (Allelfrequenz 35%) und (CAG)<sub>10</sub> (Allelfrequenz 15%). Abb.19 zeigt den CAG-Repeat in Exon 12.



**Abb. 19: Darstellung des (CAG)<sub>n</sub>-Repeat in Exon 12**

Um herauszufinden, ob die unterschiedlichen Varianten dieses (CAG)<sub>n</sub>-Repeats von Bedeutung für das Auftreten von Herzinfarkten bei den erkrankten Personen sind, wurde anschließend ein größeres Kollektiv auf diesen Polymorphismus hin untersucht. Dieses Kollektiv besteht aus 543 Herzinfarkt-Patienten (KORA: sporadisch aufgetretene Herzinfarkte vor dem 60. Lebensjahr, keine familiäre Häufung) und 1190 gesunden Kontrollen (Augsburg MONICA echokardiographische Substudie: repräsentativer Bevölkerungsquerschnitt als Kontrollpopulation). Die relevanten Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 8 dargestellt.

Aus dieser Tabelle geht hervor, dass sich die Allelfrequenzen der verschiedenen (CAG)<sub>n</sub>-Repeats bei Patienten mit Herzinfarkt gegenüber gesunden Kontrollpersonen nicht signifikant unterscheiden ( $p=0,94$ ). Auch in diesem Kollektiv zeigte sich am häufigsten das (CAG)<sub>11</sub>-Allel.

| Allele (CAG) <sub>n</sub>  | 9           | 10          | 11           | <9        | >11      | p    |
|----------------------------|-------------|-------------|--------------|-----------|----------|------|
| <b>HI-Patienten, n (%)</b> | 393 (36,2%) | 164 (15,1%) | 510 (47,0%)  | 15 (1,4%) | 4 (0,3%) | 0,94 |
| <b>Kontrollen, n (%)</b>   | 865 (36,3%) | 350 (14,7%) | 1132 (47,6%) | 26 (1,1%) | 7 (0,3%) |      |

**Tabelle 8: Häufigkeitsverteilung der Allele des (CAG)<sub>n</sub>-Repeat in Exon 12 von *MEF2A* bei Patienten mit Herzinfarkt (n=543) und gesunden Kontrollpersonen (n=1190)**

Die genauen Ergebnisse der Sequenzierung des *MEF2A*-Gens für jeden einzelnen der 23 ausgewählten Patienten aus den HI-Großfamilien können Tabelle 12 im Anhang entnommen werden.

### 3.3 Genotyp-Frequenzen für den *MEF2A*-P279L-Polymorphismus

Es handelt sich um eine genetische Variante in Exon 8 des *MEF2A*-Gens, welche bereits von der Arbeitsgruppe von Gonzalez beschrieben wurde.(13) Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass in einem Kollektiv aus spanischen Herzinfarkt-Patienten und gesunden Kontrollpersonen das 279L-Allel bei den Personen mit Herzinfarkt signifikant häufiger vorhanden war als bei den Kontrollen.

In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere große Kollektive aus Herzinfarktpatienten und gesunden Kontrollpersonen hinsichtlich des P279L-Polymorphismus genotypisiert. Bei diesen Kollektiven handelt es sich um die HI-Patienten aus der Deutschen Herzinfarkt-Familienstudie (familiäre Herzinfarkt-Häufung, n=1381), verglichen mit einem Kontrollkollektiv bestehend aus den gesunden Ehepartnern dieser HI-Patienten (n=1021) und das KORA-B-Kollektiv mit sporadischen Herzinfarkten (n=533), dem als gesunde Kontrollpopulation Personen aus der Augsburg MONICA echokardiographische Substudie (n=1055) gegenübergestellt wurden.

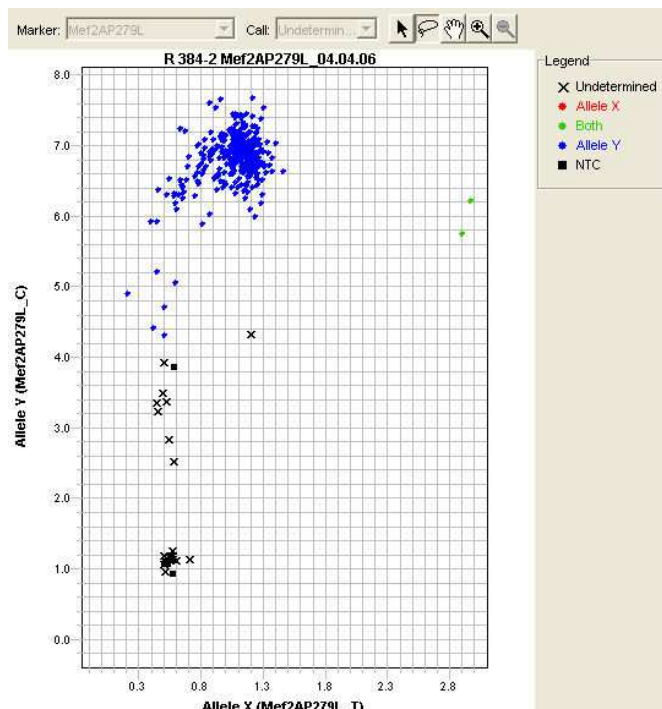
Wie Tabelle 9 zu entnehmen ist, zeigte sich in diesen Kollektiven bezüglich der Häufigkeit der Heterozygoten (279PL) kein signifikanter Unterschied zwischen Herzinfarkt-Patienten und gesunden Personen.

Abb. 20 und 21 stellen den P279L-Polymorphismus in *MEF2A* dar.

| Kollektiv             | HI-Patienten | Kontrollen   | p    |
|-----------------------|--------------|--------------|------|
| <b>Familiäre HI</b>   | n = 1381     | n = 1021     |      |
| CT (279PL)            | 3 (0,2%)     | 3 (0,3%)     | 0,71 |
| CC (279PP)            | 1378 (99,8%) | 1018 (99,7%) |      |
|                       |              |              |      |
| <b>Sporadische HI</b> | n = 533      | n = 1055     |      |
| CT (279PL)            | 1 (0,2%)     | 3 (0,3%)     | 0,73 |
| CC (279PP)            | 532 (99,8%)  | 1052 (99,7%) |      |

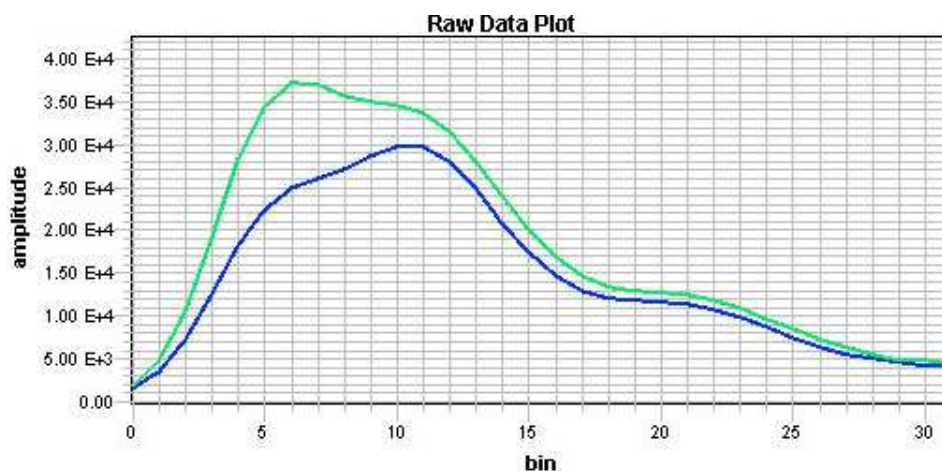
**Tabelle 9: Genotyp-Frequenzen für den *MEF2A*-P279L-Polymorphismus bei familiär gehäuften bzw. sporadischen Herzinfarkten und gesunden Kontrollpersonen**





**Abb. 20: Allelische Diskriminierung für den P279L-Polymorphismus in *MEF2A***

Da der Polymorphismus nur sehr selten in den von uns untersuchten Kollektiven vorkommt, ist mittels TaqMan keine sehr schöne Clusterbildung möglich. In der Abbildung sind zwei eindeutig heterozygote Proben (grün) erkennbar.



**Abb. 21: Darstellung des P279L-Polymorphismus in *MEF2A***

Die Rohdaten zeigen die eindeutige Diskriminierung zwischen heterozygoten (grün) und homozygoten Proben (blau).

Der Eigenanteil der von mir vorgelegten Dissertation war zunächst die Berechnung des kardiovaskulären 10-Jahres-Risikos mit Hilfe des PROCAM-Scores sowie die Identifikation von besonders geeigneten Patienten für die Mutationssuche im *MEF2A*-Gen unter Anleitung eines erfahrenen Kliniklers. Desweiteren habe ich die unter 2.2.2 – 2.2.5 (Seite 18-23) beschriebenen molekulargenetischen Methoden selbstständig durchgeführt.

Die Methoden zur Amplifikation der DNA-Abschnitte des *MEF2A*-Gens wurden von mir etabliert und falls notwendig für die anschließende DNA-Sequenzierung optimiert. Die Sequenzierung selbst erfolgte durch einen kommerziellen Anbieter, die Auswertung der DNA-Sequenzen habe ich jedoch eigenständig mit entsprechenden Programmen zur DNA-Auswertung durchgeführt (CHROMAS, DNA Staden Package). Die Genotypisierung mittels TaqMan-Assays wurde von mir unter Anleitung einer erfahrenen Laborassistentin selbstständig getätigt, ebenso die Auswertung der allelischen Diskriminierung. Die Genotypisierung des CAG-Repeat-Polymorphismus konnte am Campus Lübeck nicht durchgeführt werden, deshalb wurde dieser Teil der Studie im Rahmen einer Kooperation mit der Charite in Berlin durchgeführt.

Die statistischen Analysen wurden von Herrn Dr. W. Lieb (Institut für Humangenetik) durchgeführt. Die abschließende Bewertung der statistischen Analysen erfolgte selbstständig und nach Diskussion mit der Betreuerin der Dissertation, Frau PD Dr. J. Erdmann.

## 4. Diskussion

Bei der Koronaren Herzkrankheit bzw. dem Herzinfarkt handelt es sich um sog. komplexe Erkrankungen, welche einerseits durch klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren (Rauchen, arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie) bedingt sind,(27) denen andererseits jedoch auch eine genetische Komponente zugrunde liegt.(31;32) Das Auftreten von Herzinfarkten in der Familienanamnese bedeutet jeweils ein erhöhtes Risiko, selbst einen Herzinfarkt zu erleiden. Bezüglich der genetischen Ursachen für die Entstehung von Herzinfarkten sind bereits von mehreren Arbeitsgruppen Untersuchungen an Herzinfarkt-Patienten durchgeführt worden. Im Rahmen einer genomweiten Kopplungsanalyse erzielten Wang und Mitarbeiter einen hohen LOD Score für die Region 15q26, in der sich das *MEF2A*-Gen befindet. Die anschließende Sequenzierung dieses Gens in der gekoppelten HI-Familie zeigte eine 21-bp-Deletion in Exon 12, die bei allen 13 vom Herzinfarkt betroffenen Familienmitgliedern, jedoch nicht bei den gesunden Kontrollpersonen zu finden war.(45)

In der hier vorgelegten Doktorarbeit wurde ein Kollektiv von Patienten aus 23 HI-Großfamilien mit höchstwahrscheinlich autosomal-dominantem Vererbungsmodus untersucht. Zunächst ging es darum, mit Hilfe des PROCAM-Scores(2) für alle Mitglieder der beschriebenen 23 Herzinfarkt-Großfamilien das individuelle Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse innerhalb der nächsten 10 Jahre zu bestimmen. Hierdurch wurden die Patienten noch genauer bezüglich ihres kardiovaskulären Risikoprofils phänotypisiert, was später von Bedeutung für die Auswahl der Personen war, bei denen das *MEF2A*-Gen sequenziert werden sollte. Für die genetische Analyse waren vor allem die Patienten interessant, die trotz eines niedrigen kardiovaskulären Risikoprofils bereits früh einen Herzinfarkt erlitten hatten. Bei diesen Personen liegt die Vermutung nahe, dass ein genetischer Defekt an der Entstehung des Herzinfarktes beteiligt gewesen ist und die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen des Phänomens der Phänokopie (d.h. der Entstehung des Herzinfarktes durch kardiovaskuläre Risikofaktoren ohne genetische Veranlagung) ist gering.

Bei unserer genomweiten Kopplungsanalyse zeigte sich lediglich einer der von Wang und Mitarbeitern für den Locus 15q26 von *MEF2A* beschriebenen Marker (D15S966). Dennoch konnte nicht ausgeschlossen werden, dass auch in unserem Patientenkollektiv dieser Locus mit dem Phänotyp Herzinfarkt korreliert.

Nach der Risikoberechnung mit dem PROCAM-Score folgte die Sequenzierung der 12 Exons mit den flankierenden Intronsequenzen sowie der 5'- und 3'-UTR-Region von *MEF2A* bei den 23 ausgewählten Patienten aus den Herzinfarkt-Großfamilien. Hierbei ging es darum, genetische Varianten zu identifizieren, die möglicherweise verantwortlich für die Entstehung von Herzinfarkten sind. Aufgrund des oben erläuterten eventuellen Zusammenhangs zwischen der von Wang und Mitarbeitern beschriebenen 21-bp-Deletion und dem Phänotyp Herzinfarkt in unseren HI-Großfamilien sollte ferner geprüft werden, ob diese Mutation auch in dem untersuchten Patientenkollektiv zu finden ist.

Im Rahmen der Sequenzierungsarbeiten konnten keine mutmaßlich funktionellen genetischen Varianten gefunden werden und auch die von Wang beschriebene 21-bp-Deletion in Exon 12 lag in diesem Patientenkollektiv nicht vor. Der im Exon 12 gefundene Polymorphismus in Form einer unterschiedlichen Anzahl von Wiederholungen der Basenreihenfolge CAG (CAG-Längenpolymorphismus) zeigte in dem untersuchten Kollektiv aus 543 Herzinfarkt-Patienten und 1190 Kontrollen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Anzahl von CAG-Wiederholungen bei den HI-Patienten im Vergleich zu den Gesunden. Die Typisierung des P279L-Polymorphismus im *MEF2A*-Gen ergab weder bei den familiär gehäuften noch bei den sporadischen Herzinfarkten einen signifikanten Unterschied in der Häufigkeit des Vorkommens der Varianten bei den Herzinfarktpatienten gegenüber den gesunden Kontrollpersonen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Mutationen im *MEF2A*-Gen in dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kollektiv von 23 Patienten aus hochselektierten HI-Großfamilien sowie bei den zusätzlich untersuchten Patienten mit sporadischen Herzinfarkten keine Rolle in der Pathogenese des Herzinfarktes zu spielen scheinen.

Die Arbeitsgruppe von Wang identifizierte im Jahr 2003 die 21-bp-Deletion bei allen 13 vom Herzinfarkt betroffenen Mitgliedern einer Familie (21 Personen) mit autosomal-dominanter Form der Koronaren Herzerkrankung bzw. des Herzinfarktes, bei den Gesunden kam der Gendefekt nicht vor. Die Deletion führt dazu, dass die Koronararterienwände schwächer ausgebildet sind und damit die Plaquebildung begünstigen, wodurch letztlich Herzinfarkte ausgelöst werden können.(45)

Kurze Zeit später beschrieben Wang und Mitarbeiter drei weitere Mutationen im Exon 8 von *MEF2A*, die bei vier von 207 HI-Patienten vorlagen und bei den 191 Kontrollen nicht gefunden wurden.(4) Diese Mutationen reduzieren ebenfalls die Aktivität von *MEF2A* als Transkriptionsfaktor und könnten eine Rolle in der Pathogenese von Herzinfarkten spielen.

Der genannte (CAG)<sub>n</sub>-Repeat in Exon 12 von *MEF2A* wurde erstmals 1997 von Bachinski und Mitarbeitern beschrieben.(3) Die Arbeitsgruppe untersuchte Patienten mit autosomal-dominant vererbter hypertrophischer (HCM) bzw. dilatativer Kardiomyopathie (DCM) und gesunde Kontrollpersonen und konnte eine Expansion des Repeats als Ursache für Kardiomyopathien ausschließen.

Auch andere Arbeitsgruppen haben bereits Untersuchungen zur Funktion des *MEF2A*-Gens bei der Entstehung von Herzinfarkten durchgeführt. Weng et al. untersuchten 300 Patienten mit bestätigter KHK auf das Vorliegen der 21-bp-Deletion und konnten diese bei keiner der erkrankten Personen, jedoch bei einer der gesunden Kontrollen identifizieren.(51) Anschließend wurden in dieser Arbeitsgruppe weitere 1521 Personen ohne KHK hinsichtlich der Deletion gescreent, wobei sie sich bei zwei weiteren gesunden Personen zeigte, ohne in deren Familien mit Herzinfarkten zusammen aufzutreten. Der genannte (CAG)<sub>n</sub>-Repeat in Exon 12 wies in diesem Kollektiv keine Unterschiede zwischen Kranken und Gesunden auf.

Diese Studie deutet wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass die 21-bp-Deletion im *MEF2A*-Gen nicht ursächlich für die Entstehung von autosomal-dominant vererbten Herzinfarkten ist.

Die Arbeitsgruppe von Gonzalez untersuchte insgesamt 483 HI-Patienten und 1189 Kontrollen.(13) Bei keiner dieser Personen wurde die 21-bp-Deletion gefunden. Hinsichtlich des (CAG)<sub>n</sub>-Polymorphismus fanden sich keine Unterschiede in den Allelfrequenzen zwischen HI-Patienten und Gesunden. Es konnte jedoch ein seltener Polymorphismus, P279L, in Exon 8 identifiziert werden. Das 279L-Allel war bei den HI-Patienten signifikant häufiger vorhanden als bei den Kontrollen. 279L reduziert die Aktivität von *MEF2A* als Transkriptionsfaktor und führt damit möglicherweise zu einem erhöhten Risiko für Herzinfarkte.(13) Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kollektiven zeigte sich sowohl bei den familiär gehäuft auftretenden als auch bei den sporadischen Herzinfarkten kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit des 279L-Allels bei den HI-Patienten gegenüber den Gesunden; der *MEF2A*-P279L-Polymorphismus ist in unseren Kollektiven also nicht für die Entstehung von Herzinfarkten verantwortlich zu machen.

Auch Kajimoto et al. untersuchten ein Kollektiv aus 379 japanischen HI-Patienten und 589 Kontrollen bezüglich krankheitsassoziierter Polymorphismen im *MEF2A*-Gen.(25) Hierbei konnten sie keinen Zusammenhang zwischen der 21-bp-Deletion oder anderen krankheitsverursachenden Mutationen und der Entstehung von Herzinfarkten feststellen.

Der CAG-Längenpolymorphismus stand auch hier nicht in Zusammenhang mit gehäuft auftretenden Herzinfarkten.

Die Arbeitsgruppe von Horan konnte die von Wang und Mitarbeitern beschriebene 21-bp-Deletion im *MEF2A*-Gen in einem Kollektiv aus 1494 irischen Herzinfarktpatienten und gesunden Geschwistern als Kontrollpersonen nicht identifizieren und ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen dem (CAG)<sub>n</sub>-Repeat und dem gehäuftem Auftreten von Herzinfarkten herstellen.(24)

Schaut man sich die genannten Untersuchungen zum *MEF2A*-Gen in den Herzinfarktkollektiven der verschiedenen Arbeitsgruppen im Zusammenhang an, so lässt sich folgendes sagen: Die beschriebenen Ergebnisse werfen die Frage auf, ob es sich bei der von Wang et al. identifizierten 21-bp-Deletion im Exon 12 von *MEF2A* um eine krankheitsverursachende Mutation mit einem kausalen Zusammenhang zur Entstehung von autosomal-dominant vererbten Herzinfarkten handelt, oder ob es um einen seltenen Polymorphismus geht, der nicht mit gehäuft auftretenden Herzinfarkten in Familien einhergeht. Allgemeiner formuliert geht es darum, ob Varianten im *MEF2A*-Gen überhaupt eine Rolle bei der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen spielen. Die Tatsache, dass die 21-bp-Deletion durch die Arbeitsgruppe von Weng auch bei gesunden Personen ohne KHK/Herzinfarkt gefunden wurde, deutet eher darauf hin, dass es sich nicht um eine krankheitsverursachende Mutation handelt.

In ähnlicher Weise argumentieren auch Altshuler und Hirschorn in ihrem Kommentar zu den bisherigen Ergebnissen bezüglich von *MEF2A* und der Entstehung von Herzinfarkten.(1) Wichtig ist vor allem deren Forderung, die 21-bp-Deletion bzw. generell eine Variante im *MEF2A*-Gen müsse in mehreren Familien mit Herzinfarkten von mehreren Arbeitsgruppen unabhängig voneinander als krankheitsverursachende Mutation identifiziert werden. Hierbei sollte jeweils ein bestimmtes Allel bei den Erkrankten stärker vertreten sein als bei den Kontrollpersonen. Weiterhin wird das Problem genannt, dass von einer experimentell ermittelten verminderten Aktivität von *MEF2A* durch diese Deletion nicht unbedingt auf die klinische Folge der vermehrten Entstehung von KHK/Herzinfarkt geschlossen werden kann. Deutlich wird auch darauf hingewiesen, dass man bei einer genomweiten Suche nach Kandidatengenen, wie die Arbeitsgruppe von Wang sie durchgeführt hat, Hinweise auf bestimmte Regionen eines Chromosoms erhält, jedoch nicht auf ein bestimmtes Gen. Die Region 15q26 enthält ungefähr 93 Gene, von denen bisher nur das *MEF2A*-Gen untersucht wurde. Es könnte also durchaus sein, dass

nicht eine Mutation in *MEF2A*, sondern in einem anderen Gen aus dieser Region verantwortlich für die Entstehung von Herzinfarkten ist.(1)

Wang und Mitarbeiter haben auf die Untersuchungsergebnisse von Weng und den eben beschriebenen Kommentar von Altshuler ebenfalls mit einer Stellungnahme reagiert.(49) Hierin ist ein Hauptkritikpunkt an der Studie von Weng und Mitarbeitern, dass die gesunden Kontrollpersonen für die Sequenzierung des *MEF2A*-Gens nicht mittels Koronarangiographie auf das Vorliegen einer KHK untersucht, sondern anhand der Auswertung des Ruhe-EKGs und der fehlenden klinischen Symptomatik als gesund eingestuft wurden. Wang und Mitarbeiter hingegen hätten jeweils das Angiogramm als Kriterium für krank bzw. gesund verwendet und bemängeln daher die Phänotypisierung der Personen bei Weng als unzureichend. Weiterhin wird gesagt, dass bei der KHK bzw. dem Herzinfarkt durch die autosomal-dominant vererbte 21-bp-Deletion das Phänomen der verminderten Penetranz vorliegen könnte, wie sie auch bei anderen autosomal-dominanten Erkrankungen vorkommt. Dies würde erklären, warum diese genetische Variante auch bei gesunden Personen ohne die entsprechenden klinischen Symptome gefunden wurde. Zusammenfassend wird in dieser Stellungnahme geschrieben, dass die Ergebnisse von Weng und Mitarbeitern die Hypothese, dass es sich bei der 21-bp-Deletion im *MEF2A*-Gen um eine krankheitsverursachende Mutation handelt, nicht widerlegen könnten. Vielmehr sei durch sie die Inzidenz dieser genetischen Veränderung genauer bestimmbar und zusätzlich auf die Möglichkeit der inkompletten Penetranz hingewiesen worden.

Die Arbeitsgruppe von Weng hat diese Einwände wiederum zurückgewiesen und nochmals wiederholt, dass die momentan existierenden Untersuchungsergebnisse keinen Beweis für eine krankheitsverursachende Bedeutung der 21-bp-Deletion im *MEF2A*-Gen lieferten.(50)

Der Vorteil einer Kenntnis von krankheitsursächlichen Genveränderungen bezüglich von Koronarer Herzkrankheit oder Herzinfarkt wäre, dass neue Strategien in der Prävention, Diagnostik und Therapie akuter kardiovaskulärer Ereignisse entwickelt werden könnten. Durch die frühe, präsymptomatische Erkennung eines solchen Gendefektes in Familien mit gehäuft auftretenden Herzinfarkten wäre eine Anzahl von akuten koronaren Ereignissen vermeidbar bzw. zeitlich hinauszuzögern, wenn bereits früh präventive Maßnahmen wie zum Beispiel eine Änderung der Lebensgewohnheiten oder eine medikamentöse Therapie begonnen würden.(46) Die weitere Suche nach Gendefekten, die für die Entstehung von Herzinfarkten verantwortlich sind, scheint also durchaus sinnvoll, um diese in unserer

Gesellschaft sehr häufigen Erkrankungen wirkungsvoller behandeln bzw. verhindern zu können.

Insgesamt lässt sich an dieser Stelle sagen, dass die dargestellte kontroverse Diskussion mit den bis jetzt vorliegenden Ergebnissen, einschließlich denen aus der vorliegenden Doktorarbeit, zur Rolle des *MEF2A*-Gens in der Pathogenese von Herzinfarkten nicht zu lösen ist. Entscheidend werden weitere Studien mit einer noch größeren Anzahl von Herzinfarkt-Patienten und gesunden Kontrollpersonen sein, die möglicherweise eine der beiden dargestellten Hypothesen bestätigen können. Möglicherweise liegt die Bedeutung des *MEF2A*-Gens für die Genetik des Herzinfarktes in einer Mittelstellung zwischen den beiden gegensätzlichen Positionen.(43) Auch Wang fordert in einem aktuellen Artikel, dass seine Ergebnisse über *MEF2A* als erstes KHK- bzw. Herzinfarkt-verursachendes Gen in genetischen und molekularbiologischen Studien anderer Arbeitsgruppen weiter validiert werden müssen, da es sich bei der KHK wahrscheinlich um eine genetisch heterogene Erkrankung handelt und somit gegebenenfalls weitere ursächliche Gendefekte identifiziert werden können.(47)

Diese notwendigen weiterführenden Untersuchungen werden möglicherweise bald die Bedeutung des *MEF2A*-Gens für die Pathogenese des Herzinfarktes aufklären.



## 5. Zusammenfassung

In der westlichen Welt zählen die Koronare Herzkrankheit und der Herzinfarkt zu den häufigsten Todesursachen. Es handelt sich hierbei um komplexe Erkrankungen, die einerseits durch die klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren bedingt sind, denen andererseits jedoch auch eine genetische Komponente zugrunde liegt, wodurch es zur familiären Häufung dieser Erkrankungen kommt.

Wang und Mitarbeitern ist es kürzlich gelungen, die erste krankheitsverursachende Mutation in einer Familie mit einer autosomal-dominant vererbten Form des Herzinfarktes zu identifizieren. Nachfolgende Arbeiten über die Assoziation genetischer Varianten in diesem Gen mit dem HI-Risiko ergaben inkonsistente Befunde. Ziel der vorliegenden Doktorarbeit ist es, die Prävalenz von Mutationen im *MEF2A*-Gen in großen Kollektiven aus Patienten mit familiärem und sporadischem HI zu untersuchen.

**Methoden:** Mit Hilfe des PROCAM-Scores wurde für alle Personen aus den HI-Großfamilien das kardiovaskuläre 10-Jahres-Risiko bestimmt. Das *MEF2A*-Gen wurde in 23 Herzinfarkt-Großfamilien sequenziert. Außerdem wurden zwei genetische Varianten (P279L in Exon 8) bei 1381 HI-Patienten mit einer positiven Familienanamnese für HI/KHK und bei 533 Patienten mit sporadischem Herzinfarkten sowie in zwei Kontrollpopulationen (n=1021 und n=1055) genotypisiert. Ein (CAG)<sub>n</sub>-Repeat im Exon 12 wurde zudem bei 543 sporadischen HI-Patienten und 1190 Kontrollen typisiert.

**Ergebnisse:** In den HI-Großfamilien wurde keine kausale *MEF2A*-Mutation nachgewiesen. Die Genotypverteilung für P279L war weder unterschiedlich zwischen familiären HI-Patienten (CC: 99,8%, CT: 0,2%, TT 0%) und Kontrollen (CC: 99,7%, CT: 0,3%, TT 0%; p=0,71) noch zwischen sporadischen HI-Patienten (CC: 99,8%, CT 0,2%, TT 0%) und Kontrollen (CC: 99,7%, CT: 0,3%, TT 0%; p=0,73). Auch die Frequenzen der verschiedenen (CAG)<sub>n</sub>-Repeats war bei HI-Patienten (<9: 1,4%, 9: 36,2%, 10: 15,1%, 11: 47,0%, >11 0,3%) und Kontrollen (<9: 1,1%, 9: 36,3%, 10: 14,7%, 11: 47,6%, >11 0,3%) gleich (p=0,94).

**Schlussfolgerungen:** Mutationen im *MEF2A*-Gen scheinen in unserem großen Kollektiv aus hochselektierten Herzinfarkt-Großfamilien nicht von Bedeutung zu sein. Außerdem ergab die vorliegende Arbeit keinen Hinweis auf eine relevante Assoziation der P279L-Variante oder des (CAG)<sub>n</sub>-Repeats im *MEF2A*-Gen mit sporadischen oder familiären Herzinfarkten. Weiterführende Untersuchungen an anderen Patientenkollektiven sind notwendig, um die Bedeutung des *MEF2A*-Gens für den Herzinfarkt aufzuklären.

## 6. Literaturverzeichnis

1. ALTSHULER, D. and J. N. HIRSCHHORN. 2005. MEF2A sequence variants and coronary artery disease: a change of heart? *J.Clin.Invest* **115**: 831-833.
2. ASSMANN, G., P. CULLEN, and H. SCHULTE. 2002. Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Munster (PROCAM) study. *Circulation* **105**: 310-315.
3. BACHINSKI, L. L., A. ABCHEE, J. B. DURAND, R. ROBERTS, R. KRAHE, and G. M. HOBSON. 1997. Polymorphic trinucleotide repeat in the MEF2A gene at 15q26 is not expanded in familial cardiomyopathies. *Mol.Cell Probes* **11**: 55-58.
4. BHAGAVATULA, M. R., C. FAN, G. Q. SHEN, J. CASSANO, E. F. PLOW, E. J. TOPOL, and Q. WANG. 2004. Transcription factor MEF2A mutations in patients with coronary artery disease. *Hum.Mol.Genet.* **13**: 3181-3188.
5. BOER, J. M., E. J. FESKENS, W. M. VERSCHUREN, J. C. SEIDELL, and D. KROMHOUT. 1999. The joint impact of family history of myocardial infarction and other risk factors on 12-year coronary heart disease mortality. *Epidemiology* **10**: 767-770.
6. BROECKEL, U., C. HENGSTENBERG, B. MAYER, S. HOLMER, L. J. MARTIN, A. G. COMUZZIE, J. BLANGERO, P. NURNBERG, A. REIS, G. A. RIEGGER, H. J. JACOB, and H. SCHUNKERT. 2002. A comprehensive linkage analysis for myocardial infarction and its related risk factors. *Nat.Genet.* **30**: 210-214.
7. CAMBIEN, F., O. POIRIER, L. LECERF, A. EVANS, J. P. CAMBOU, D. ARVEILER, G. LUC, J. M. BARD, L. BARA, S. RICARD, and . 1992. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* **359**: 641-644.
8. CHIAPPELLI, M., C. TAMPIERI, E. TUMINI, E. PORCELLINI, C. M. CALDARERA, S. NANNI, A. BRANZI, D. LIO, M. CARUSO, E. HOFFMANN, C. CARUSO, and F. LICASTRO. 2005. Interleukin-6 gene polymorphism is an age-dependent risk factor for myocardial infarction in men. *Int.J.Immunogenet.* **32**: 349-353.
9. EDMONDSON, D. G., G. E. LYONS, J. F. MARTIN, and E. N. OLSON. 1994. Mef2 gene expression marks the cardiac and skeletal muscle lineages during mouse embryogenesis. *Development* **120**: 1251-1263.
10. FIRULLI, A. B., J. M. MIANO, W. BI, A. D. JOHNSON, W. CASSCELLS, E. N. OLSON, and J. J. SCHWARZ. 1996. Myocyte enhancer binding factor-2 expression and activity in vascular smooth muscle cells. Association with the activated phenotype. *Circ.Res.* **78**: 196-204.
11. FISCHER, M., U. BROECKEL, S. HOLMER, A. BAESSLER, C. HENGSTENBERG, B. MAYER, J. ERDMANN, G. KLEIN, G. RIEGGER, H. J.

- JACOB, and H. SCHUNKERT. 2005. Distinct heritable patterns of angiographic coronary artery disease in families with myocardial infarction. *Circulation* **111**: 855-862.
12. FRANCKE, S., M. MANRAJ, C. LACQUEMANT, C. LECOEUR, F. LEPRETRE, P. PASSA, A. HEBE, L. CORSET, S. L. YAN, S. LAHMIDI, S. JANKEE, T. K. GUNNESS, U. S. RAMJUTTUN, V. BALGOBIN, C. DINA, and P. FROGUEL. 2001. A genome-wide scan for coronary heart disease suggests in Indo-Mauritians a susceptibility locus on chromosome 16p13 and replicates linkage with the metabolic syndrome on 3q27. *Hum.Mol.Genet.* **10**: 2751-2765.
13. GONZALEZ, P., M. GARCIA-CASTRO, J. R. REGUERO, A. BATALLA, A. G. ORDONEZ, R. L. PALOP, I. LOZANO, M. MONTES, V. ALVAREZ, and E. COTO. 2005. The Pro279Leu variant in the transcription factor MEF2A is associated with myocardial infarction. *J.Med.Genet.* **43**: 167-169.
14. HANRATTY, B., D. A. LAWLOR, M. B. ROBINSON, R. J. SAPSFORD, D. GREENWOOD, and A. HALL. 2000. Sex differences in risk factors, treatment and mortality after acute myocardial infarction: an observational study. *J.Epidemiol.Community Health* **54**: 912-916.
15. HANSSON, G. K. 2001. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **21**: 1876-1890.
16. HARRAP, S. B., K. S. ZAMMIT, Z. Y. WONG, F. M. WILLIAMS, M. BAHLO, A. M. TONKIN, and S. T. ANDERSON. 2002. Genome-wide linkage analysis of the acute coronary syndrome suggests a locus on chromosome 2. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **22**: 874-878.
17. HAUSER, E. R., D. C. CROSSMAN, C. B. GRANGER, J. L. HAINES, C. J. JONES, V. MOOSER, B. MCADAM, B. R. WINKELMANN, A. H. WISEMAN, J. B. MUHLESTEIN, A. G. BARTEL, C. A. DENNIS, E. DOWDY, S. ESTABROOKS, K. EGGLESTON, S. FRANCIS, K. ROCHE, P. W. CLEVANGER, L. HUANG, B. PEDERSEN, S. SHAH, S. SCHMIDT, C. HAYNES, S. WEST, D. ASPER, M. BOOZE, S. SHARMA, S. SUNDSETH, L. MIDDLETON, A. D. ROSES, M. A. HAUSER, J. M. VANCE, M. A. PERICAK-VANCE, and W. E. KRAUS. 2004. A genomewide scan for early-onset coronary artery disease in 438 families: the GENECARD Study. *Am.J.Hum.Genet.* **75**: 436-447.
18. HAWE, E., P. J. TALMUD, G. J. MILLER, and S. E. HUMPHRIES. 2003. Family history is a coronary heart disease risk factor in the Second Northwick Park Heart Study. *Ann.Hum.Genet.* **67**: 97-106.
19. HENGSTENBERG, C., U. BROCKEL, S. HOLMER, B. MAYER, M. FISCHER, A. BAESSLER, J. ERDMANN, W. LIEB, H. LOWEL, G. RIEGGER, and H. SCHUNKERT. 2002. [Genetic factors in myocardial infarction--Results from a candidate gene and a genome-wide approach between beta blockers]. *Herz* **27**: 649-661.
20. HENGSTENBERG, C., H. SCHUNKERT, B. MAYER, A. DORING, H. LOWEL, H. W. HENSE, M. FISCHER, G. A. RIEGGER, and S. R. HOLMER. 2001. Association between a polymorphism in the G protein beta3 subunit gene (GNB3)

- with arterial hypertension but not with myocardial infarction. *Cardiovasc.Res.* **49**: 820-827.
21. HEROLD, G. 2005. *Innere Medizin*, Auflage 2005; 208-211 ed. Herold, G..
  22. HOLLAND, P. M., R. D. ABRAMSON, R. WATSON, and D. H. GELFAND. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**: 7276-7280.
  23. HOLLOWAY, J. W., I. A. YANG, and S. YE. 2005. Variation in the toll-like receptor 4 gene and susceptibility to myocardial infarction. *Pharmacogenet.Genomics* **15**: 15-21.
  24. HORAN, P. G., A. R. ALLEN, A. E. HUGHES, C. C. PATTERSON, M. SPENCE, P. G. MCGLINCHEY, C. BELTON, T. C. JARDINE, and P. P. MCKEOWN. 2006. Lack of MEF2A Delta7aa mutation in Irish families with early onset ischaemic heart disease, a family based study. *BMC.Med.Genet.* **7**: 65.
  25. KAJIMOTO, K., K. SHIOJI, N. TAGO, H. TOMOIKE, H. NONOGI, Y. GOTO, and N. IWAI. 2005. Assessment of MEF2A mutations in myocardial infarction in Japanese patients. *Circ.J.* **69**: 1192-1195.
  26. KOLOVOU, G., D. DASKALOVA, and D. P. MIKHAILIDIS. 2003. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Angiology* **54**: 59-71.
  27. KUULASMAA, K., H. TUNSTALL-PEDOE, A. DOBSON, S. FORTMANN, S. SANS, H. TOLONEN, A. EVANS, M. FERRARIO, and J. TUOMILEHTO. 2000. Estimation of contribution of changes in classic risk factors to trends in coronary-event rates across the WHO MONICA Project populations. *Lancet* **355**: 675-687.
  28. LANE, D. A. and P. J. GRANT. 2000. Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. *Blood* **95**: 1517-1532.
  29. LIBBY, P. and P. THEROUX. 2005. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation* **111**: 3481-3488.
  30. LLOYD-JONES, D. M., B. H. NAM, R. B. D'AGOSTINO, SR., D. LEVY, J. M. MURABITO, T. J. WANG, P. W. WILSON, and C. J. O'DONNELL. 2004. Parental cardiovascular disease as a risk factor for cardiovascular disease in middle-aged adults: a prospective study of parents and offspring. *JAMA* **291**: 2204-2211.
  31. LUSIS, A. J., R. MAR, and P. PAJUKANTA. 2004. Genetics of atherosclerosis. *Annu.Rev.Genomics Hum.Genet.* **5**: 189-218.
  32. MARENBERG, M. E., N. RISCH, L. F. BERKMAN, B. FLODERUS, and U. DE FAIRE. 1994. Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins. *N.Engl.J.Med.* **330**: 1041-1046.
  33. MÜLHARDT, C. 2003. *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*, 4. Auflage; 51-56, 168-178 ed. Spectrum Verlag.

34. MULLER, D. W., E. J. TOPOL, R. M. CALIFF, K. N. SIGMON, L. GORMAN, B. S. GEORGE, D. J. KEREIAKES, K. L. LEE, and S. G. ELLIS. 1990. Relationship between antecedent angina pectoris and short-term prognosis after thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. Thrombolysis and Angioplasty in Myocardial Infarction (TAMI) Study Group. *Am.Heart J.* **119**: 224-231.
35. MULLIS, K. B. 1990. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann.Biol.Clin.(Paris)* **48**: 579-582.
36. MURRAY, C. J. and A. D. LOPEZ. 1997. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet* **349**: 1436-1442.
37. NAYA, F. J., B. L. BLACK, H. WU, R. BASSEL-DUBY, J. A. RICHARDSON, J. A. HILL, and E. N. OLSON. 2002. Mitochondrial deficiency and cardiac sudden death in mice lacking the MEF2A transcription factor. *Nat.Med.* **8**: 1303-1309.
38. PAJUKANTA, P., M. CARGILL, L. VIITANEN, I. NUOTIO, A. KAREINEN, M. PEROLA, J. D. TERWILLIGER, E. KEMPAS, M. DALY, H. LILJA, J. D. RIOUX, T. BRETTIN, J. S. VIKARI, T. RONNEMAA, M. LAAKSO, E. S. LANDER, and L. PELTONEN. 2000. Two loci on chromosomes 2 and X for premature coronary heart disease identified in early- and late-settlement populations of Finland. *Am.J.Hum.Genet.* **67**: 1481-1493.
39. PELTONEN, M., V. LUNDBERG, F. HUHTASAARI, and K. ASPLUND. 2000. Marked improvement in survival after acute myocardial infarction in middle-aged men but not in women. The Northern Sweden MONICA study 1985-94. *J.Intern.Med.* **247**: 579-587.
40. REGITZ-ZAGROSEK, V. and E. LEHMKUHL. 2005. Heart failure and its treatment in women. Role of hypertension, diabetes, and estrogen. *Herz* **30**: 356-367.
41. RENZ-POLSTER, H. and J. BRAUN. 2001. *Basislehrbuch Innere Medizin*, 2. Auflage; 60-70 ed. Urban & Fischer; München, Jena.
42. SACHS, L. and J. HEDDERICH. 2006. *Angewandte Statistik: Methodensammlung mit R*, Auflage 12; 481, 516-519 ed. Springer Verlag.
43. STURM, A. C. 2004. Cardiovascular genetics: are we there yet? *J.Med Genet.* **41**: 321-323.
44. VOGELS, E. A., A. L. LAGRO-JANSSEN, and C. VAN WEEL. 1999. Sex differences in cardiovascular disease: are women with low socioeconomic status at high risk? *Br.J.Gen.Pract.* **49**: 963-966.
45. WANG, L., C. FAN, S. E. TOPOL, E. J. TOPOL, and Q. WANG. 2003. Mutation of MEF2A in an inherited disorder with features of coronary artery disease. *Science* **302**: 1578-1581.
46. WANG, Q. 2005. Advances in the genetic basis of coronary artery disease. *Curr.Atheroscler.Rep.* **7**: 235-241.
47. WANG, Q. 2005. Molecular genetics of coronary artery disease. *Curr.Opin.Cardiol.* **20**: 182-188.

48. WANG, Q., S. RAO, G. Q. SHEN, L. LI, D. J. MOLITERNO, L. K. NEWBY, W. J. ROGERS, R. CANNATA, E. ZIRZOW, R. C. ELSTON, and E. J. TOPOL. 2004. Premature myocardial infarction novel susceptibility locus on chromosome 1P34-36 identified by genomewide linkage analysis. *Am.J.Hum.Genet.* **74**: 262-271.
49. WANG, Q., S. RAO, and E. J. TOPOL. 2005. Miscues on the "lack of MEF2A mutations" in coronary artery disease. *J.Clin.Invest* **115**: 1399-1400.
50. WENG, L., J. C. COHEN, R. MCPHERSON, and L. A. PENNACCHIO. 2005. Response to Wang et al. *J.Clin.Invest* **115**: 1400.
51. WENG, L., N. KAVASLAR, A. USTASZEWSKA, H. DOELLE, W. SCHACKWITZ, S. HEBERT, J. C. COHEN, R. MCPHERSON, and L. A. PENNACCHIO. 2005. Lack of MEF2A mutations in coronary artery disease. *J.Clin.Invest* **115**: 1016-1020.
52. WHITCOMBE, D., J. BROWNIE, H. L. GILLARD, D. MCKECHNIE, J. THEAKER, C. R. NEWTON, and S. LITTLE. 1998. A homogeneous fluorescence assay for PCR amplicons: its application to real-time, single-tube genotyping. *Clin.Chem.* **44**: 918-923.
53. YUSUF, S., S. REDDY, S. OUNPUU, and S. ANAND. 2001. Global burden of cardiovascular diseases: part I: general considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. *Circulation* **104**: 2746-2753.
54. ZIEGLER, A. and I. R. KOENIG. 2006. *A Statistical Approach to Genetic Epidemiology: Concepts and Applications*, 1. Auflage; 33-38 ed. Wiley-VCH, Weinheim.
55. ZIEGLER, A., S. LANGE, and R. BENDER. 2007. [Survival analysis: Cox regression.]. *Dtsch.Med.Wochenschr.* **132 Suppl 1**: e42-e44.

## 7. Anhang

### 7.1 Materialien

#### 7.1.1 Geräte

|                          |                                |
|--------------------------|--------------------------------|
| Elektrophoresekammern    | Biometra                       |
| Geldokumentationsanlage  | Vilber Lourmat                 |
| Laborwaage               | Scaltec                        |
| Magnetrührer             | IKA big-squid                  |
| Mikrotiterplatten (96er) | Sorenson MultiRigidUltraPlates |
| Mikrowellengerät         | Siemens                        |
| PCR-Geräte               | PCR Hybaid                     |
| Photometer               | Eppendorf                      |
| Pipettensatz             | Eppendorf                      |
| Pipettenspitzen          | Sarstedt                       |
| Pipettierroboter         | Tecan                          |
| Schüttler                | Eppendorf Thermomixer 5436     |
| Spannungsgeräte          | Micro-Bio-Tec Brand            |
| TaqMan                   | HT7900 (Applied Biosystems)    |
| Vortex Mixer             | Peqlab Kombi spin              |
| Zentrifuge               | Eppendorf                      |

#### 7.1.2 Chemikalien

|                                        |                                 |
|----------------------------------------|---------------------------------|
| Agarose                                | Q-Biogene                       |
| Aqua ad injectabilia                   | Braun                           |
| Längenstandard                         | Peqlab                          |
|                                        | peqGOLD 100 bp DNA-Leiter Plus  |
| Loading Dye                            | Amersham Pharmacia Biotech Inc. |
|                                        | 95% Formamid mit Dextranblau    |
| MasterMix                              | Eppendorf                       |
| Bestandteile: Taq-Polymerase 62.5 U/ml |                                 |
| KCl 125 mM                             |                                 |
| Tris-HCl pH 8.3 75 mM                  |                                 |
| Mg <sup>2+</sup> 3.75 mM               |                                 |
| Igepal-CA630 0.25%                     |                                 |
| dNTPs jeweils 500 µM                   |                                 |

Primer

Sybr Green

Biotez

Molecular Probes

1:2000 in Dimethylsulfoxid

TBE-Puffer (10x): 121.1 g Tris

51.3 g Borsäure

3.7 g EDTA

mit H<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen

(Agarose-Ladepuffer: 1x TBE)



## 7.2 Primersequenzen *MEF2A*

| Oligonukleotid            | Oligonukleotidsequenz        | Primerlänge | Fragmentgröße |
|---------------------------|------------------------------|-------------|---------------|
| <i>MEF2A</i> -5'UTR_Fr1-F | GCCCGAAACTTCATTAGCAA         | 20 bp       | 662 bp        |
| <i>MEF2A</i> -5'UTR_Fr1-R | TCTGTACTGTGCGTATAGCCTATTG    | 25 bp       |               |
| <i>MEF2A</i> -5'UTR_Fr2-F | TTGAAATACAGGTATATTTTATGGTGA  | 27 bp       | 655 bp        |
| <i>MEF2A</i> -5'UTR_Fr2-R | CAATCTCACAAGAACAGCCTGA       | 22 bp       |               |
| <i>MEF2A</i> -Ex1-F       | GGCTGACGTTTTGTTTTATTCC       | 22 bp       | 433 bp        |
| <i>MEF2A</i> -Ex1-R       | TTACGCATTTCACCGAATTT         | 21 bp       |               |
| <i>MEF2A</i> -Ex2-F       | TGGTAGTTCTGTTTTAAGTTCTTTGA   | 26 bp       | 498 bp        |
| <i>MEF2A</i> -Ex2-R       | TGTATTGTTGTGGGTAGGAAAAA      | 23 bp       |               |
| <i>MEF2A</i> -Ex3-F       | TTGTAGAAAATTTTCTAGCTGTAGCC   | 24 bp       | 380 bp        |
| <i>MEF2A</i> -Ex3-R       | AAAGCAGATGATGAAAAGATACAA     | 24 bp       |               |
| <i>MEF2A</i> -Ex4-F       | TTGAAATCTGGCTCAGTATTAAGAA    | 25 bp       | 486 bp        |
| <i>MEF2A</i> -Ex4-R       | GAGTCGCCATACAGCAATCA         | 20 bp       |               |
| <i>MEF2A</i> -Ex5-F       | TCCAATTGTATTTTCTAGCTTTAAGAAA | 27 bp       | 462 bp        |
| <i>MEF2A</i> -Ex5-R       | TTGTTGTCATCACCCACTATAAAAA    | 25 bp       |               |
| <i>MEF2A</i> -Ex6-F       | TGGTTAAGAACCTATCCCTATCCTC    | 25 bp       | 482 bp        |
| <i>MEF2A</i> -Ex6-R       | TGATTCTTGCTCATCAAAGCA        | 21 bp       |               |
| <i>MEF2A</i> -Ex7-F       | CAGACTGAGCTAGTTTTTATTTTTGTG  | 27 bp       | 385 bp        |
| <i>MEF2A</i> -Ex7-R       | TTGGTAAGCAGGGAAGTTAGAGA      | 23 bp       |               |
| <i>MEF2A</i> -Ex8-F       | CACTTCTGGTCCCAAGCATT         | 20 bp       | 465 bp        |
| <i>MEF2A</i> -Ex8-R       | GATTCTACGGTGGCACAGAAA        | 21 bp       |               |
| <i>MEF2A</i> -Ex9-F       | CAGACAGCTGCTAGTGTCCAA        | 21 bp       | 285 bp        |
| <i>MEF2A</i> -Ex9-R       | CCAGTAGATTGCTTTATTCAAAGTG    | 25 bp       |               |
| <i>MEF2A</i> -Ex10-F      | TCAGTGCTTCAGAAAATGACA        | 21 bp       | 458 bp        |
| <i>MEF2A</i> -Ex10-R      | TCGCACTATCCACACTATCCA        | 21 bp       |               |
| <i>MEF2A</i> -Ex11-F      | GCTGGCCTCAATGTAGGAAC         | 20 bp       | 381 bp        |
| <i>MEF2A</i> -Ex11-R      | TCCCGACACTTGTATCTACCTG       | 22 bp       |               |
| <i>MEF2A</i> -Ex12-F      | CCAGTCTTGGGGAAGTCTGA         | 20 bp       | 699 bp        |
| <i>MEF2A</i> -Ex12-R      | CCCACACATACACACTCACACC       | 22 bp       |               |
| <i>MEF2A</i> -3'UTR_Fr1-F | CATTCTCCAATTGTGCTTGG         | 20 bp       | 647 bp        |
| <i>MEF2A</i> -3'UTR_Fr1-R | CACCCCTTTGCAACAGACAC         | 20 bp       |               |
| <i>MEF2A</i> -3'UTR_Fr2-F | TATTTTCCAACCTGGCATGG         | 20 bp       | 659 bp        |
| <i>MEF2A</i> -3'UTR_Fr2-R | CATAGGTACTTACATCAAAGGTGATAA  | 27 bp       |               |
| <i>MEF2A</i> -3'UTR_Fr3-F | AAATGTAAATTAAGTTGAGCCAAA     | 26 bp       | 598 bp        |
| <i>MEF2A</i> -3'UTR_Fr3-R | CCCCATGATTATTTTCCCCTA        | 21 bp       |               |
| <i>MEF2A</i> -3'UTR_Fr4-F | TTGCCTTTTGTGAGGAAAAA         | 20 bp       | 551 bp        |
| <i>MEF2A</i> -3'UTR_Fr4-R | CATAGAAATTGTAGGTAGCTGCTCA    | 25 bp       |               |

Tabelle 10: Auflistung aller verwendeten Primer für die Sequenzierung des *MEF2A*-Gens

### 7.3 Berechnung des kardiovaskulären 10-Jahres-Risikos

| ID      | Fam. Nr. | Stammbaum Nr. | HIFAM | PROCAM-Score | Punktwert |
|---------|----------|---------------|-------|--------------|-----------|
| 8948501 | 8948     | 1             | 1     | 19,6         | 53        |
| 8948502 | 8948     | 1             | 1     | 6,1          | 40        |
| 8948503 | 8948     | 1             | 1     | 21,7         | 54        |
| 8948504 | 8948     | 1             | 1     | 21,7         | 54        |
| 8948505 | 8948     | 1             | 1     | 10,2         | 45        |
| 8948522 | 8948     | 1             | 1     | 4,0          | 35        |
| 8948523 | 8948     | 1             | 1     | 10,5         | 46        |
| 8948524 | 8948     | 1             | 1     | 4,8          | 37        |
| 2001511 | 2001     | 2             | 1     | 15,5         | 50        |
| 2001513 | 2001     | 2             | 1     | 30,0         | 64        |
| 2001516 | 2001     | 2             | 1     | 8,0          | 43        |
| 2001517 | 2001     | 2             | 1     | 10,2         | 45        |
| 2001521 | 2001     | 2             | 1     | 29,4         | 59        |
| 2001529 | 2001     | 2             | 1     | 30,0         | 64        |
| 2001549 | 2001     | 2             | 1     | 30,0         | 72        |
| 2001567 | 2001     | 2             | 1     | 30,0         | 79        |
| 2001577 | 2001     | 2             | 1     | 30,0         | 74        |
| 8882501 | 8882     | 3             | 1     | 22,2         | 55        |
| 8882502 | 8882     | 3             | 1     | 16,8         | 51        |
| 8882503 | 8882     | 3             | 1     | 4,0          | 35        |
| 8882504 | 8882     | 3             | 1     | 30,0         | 60        |
| 8882506 | 8882     | 3             | 1     | 1,7          | 26        |
| 8882512 | 8882     | 3             | 1     | 8,8          | 44        |
| 8882513 | 8882     | 3             | 1     | 7,4          | 42        |
| 8882515 | 8882     | 3             | 1     | 2,3          | 29        |
| 8882532 | 8882     | 3             | 1     | 1,0          | 17        |
| 8973501 | 8973     | 3             | 1     | 30,0         | 62        |
| 8973502 | 8973     | 3             | 1     | 3,5          | 34        |
| 8973503 | 8973     | 3             | 1     | 25,1         | 57        |
| 8973504 | 8973     | 3             | 1     | 12,8         | 48        |
| 8973505 | 8973     | 3             | 1     | 8,0          | 43        |
| 8973506 | 8973     | 3             | 1     | 28,0         | 58        |
| 8973507 | 8973     | 3             | 1     | 12,8         | 48        |
| 8973508 | 8973     | 3             | 1     | 29,4         | 59        |
| 8622501 | 8622     | 4             | 1     | 6,1          | 40        |
| 8622502 | 8622     | 4             | 1     | 30,0         | 60        |
| 8622503 | 8622     | 4             | 1     | 2,4          | 30        |
| 8622504 | 8622     | 4             | 1     | 1,0          | 19        |
| 8622505 | 8622     | 4             | 1     | 30,0         | 66        |
| 8622507 | 8622     | 4             | 1     | 30,0         | 64        |
| 8622508 | 8622     | 4             | 1     | 10,7         | 47        |
| 8622509 | 8622     | 4             | 1     | 30,0         | 81        |
| 8622515 | 8622     | 4             | 1     | 1,9          | 28        |
| 8622516 | 8622     | 4             | 1     | 12,8         | 48        |

|         |      |   |   |      |    |
|---------|------|---|---|------|----|
| 8622519 | 8622 | 4 | 1 | 1,8  | 27 |
| 8622523 | 8622 | 4 | 1 | 3,3  | 33 |
| 8622524 | 8622 | 4 | 1 | 1,0  | 13 |
| 8655501 | 8655 | 5 | 1 | 8,0  | 43 |
| 8655502 | 8655 | 5 | 1 | 23,8 | 56 |
| 8655503 | 8655 | 5 | 1 | 13,2 | 49 |
| 8655504 | 8655 | 5 | 1 | 28,0 | 58 |
| 8655505 | 8655 | 5 | 1 | 5,7  | 39 |
| 8655507 | 8655 | 5 | 1 | 22,2 | 55 |
| 8655508 | 8655 | 5 | 1 | 7,4  | 42 |
| 8655509 | 8655 | 5 | 1 | 1,2  | 22 |
| 8502501 | 8502 | 6 | 1 | 6,1  | 40 |
| 8502502 | 8502 | 6 | 1 | 5,7  | 39 |
| 8502503 | 8502 | 6 | 1 | 12,8 | 48 |
| 8502504 | 8502 | 6 | 1 | 30,0 | 63 |
| 8502505 | 8502 | 6 | 1 | 25,1 | 57 |
| 8502511 | 8502 | 6 | 1 | 15,5 | 50 |
| 8502512 | 8502 | 6 | 1 | 17,5 | 52 |
| 8502513 | 8502 | 6 | 1 | 23,8 | 56 |
| 8502521 | 8502 | 6 | 1 | 1,2  | 22 |
| 4453501 | 4453 | 7 | 2 | 8,8  | 44 |
| 4453502 | 4453 | 7 | 2 | 1,4  | 24 |
| 4453503 | 4453 | 7 | 2 | 16,8 | 51 |
| 4453504 | 4453 | 7 | 2 | 4,8  | 37 |
| 4453506 | 4453 | 7 | 2 | 1,7  | 26 |
| 4453507 | 4453 | 7 | 2 | 10,5 | 46 |
| 4453509 | 4453 | 7 | 2 | 4,0  | 35 |
| 6486501 | 6486 | 8 | 2 | 10,7 | 47 |
| 6486502 | 6486 | 8 | 2 | 15,5 | 50 |
| 6486503 | 6486 | 8 | 2 | 7,4  | 42 |
| 6486504 | 6486 | 8 | 2 | 8,8  | 44 |
| 6486505 | 6486 | 8 | 0 | 4,8  | 37 |
| 6486506 | 6486 | 8 | 2 | 1,0  | 19 |
| 6486507 | 6486 | 8 | 2 | 8,0  | 43 |
| 6486509 | 6486 | 8 | 2 | 1,9  | 28 |
| 6486510 | 6486 | 8 | 2 | 2,9  | 32 |
| 6486514 | 6486 | 8 | 2 | 30,0 | 61 |
| 6486516 | 6486 | 8 | 2 | 22,2 | 55 |
| 6486520 | 6486 | 8 | 2 | 3,3  | 33 |
| 6545501 | 6545 | 9 | 2 | 30,0 | 69 |
| 6545502 | 6545 | 9 | 2 | 30,0 | 69 |
| 6545504 | 6545 | 9 | 2 | 5,7  | 39 |
| 6545505 | 6545 | 9 | 2 | 1,3  | 23 |
| 6545506 | 6545 | 9 | 2 | 22,2 | 55 |
| 6545507 | 6545 | 9 | 2 | 16,8 | 51 |
| 6545508 | 6545 | 9 | 2 | 4,8  | 37 |
| 6545510 | 6545 | 9 | 2 | 16,8 | 51 |
| 6545513 | 6545 | 9 | 2 | 30,0 | 60 |
| 6545514 | 6545 | 9 | 2 | 2,8  | 31 |

|         |      |    |   |      |    |
|---------|------|----|---|------|----|
| 6545515 | 6545 | 9  | 2 | 19,6 | 53 |
| 6545516 | 6545 | 9  | 2 | 30,0 | 65 |
| 6545517 | 6545 | 9  | 2 | 29,4 | 59 |
| 6545518 | 6545 | 9  | 2 | 30,0 | 84 |
| 6545520 | 6545 | 9  | 2 | 30,0 | 60 |
| 6545521 | 6545 | 9  | 2 | 2,8  | 31 |
| 6545523 | 6545 | 9  | 2 | 1,0  | 16 |
| 6545524 | 6545 | 9  | 2 | 1,1  | 21 |
| 6545525 | 6545 | 9  | 2 | 1,0  | 18 |
| 6545526 | 6545 | 9  | 2 | 4,2  | 36 |
| 6545527 | 6545 | 9  | 2 | 3,3  | 33 |
| 6545528 | 6545 | 9  | 2 | 1,0  | 19 |
| 6545529 | 6545 | 9  | 2 | 1,6  | 25 |
| 6545530 | 6545 | 9  | 2 | 4,2  | 36 |
| 6545531 | 6545 | 9  | 2 | 1,7  | 26 |
| 6545532 | 6545 | 9  | 2 | 23,8 | 56 |
| 6545534 | 6545 | 9  | 2 | 1,1  | 21 |
| 6545535 | 6545 | 9  | 2 | 1,7  | 26 |
| 6545537 | 6545 | 9  | 2 | 8,0  | 43 |
| 6545538 | 6545 | 9  | 2 | 1,1  | 21 |
| 6545539 | 6545 | 9  | 2 | 1,2  | 22 |
| 6545540 | 6545 | 9  | 2 | 1,0  | 17 |
| 6545541 | 6545 | 9  | 2 | 4,0  | 35 |
| 6545542 | 6545 | 9  | 2 | 1,0  | 17 |
| 6545543 | 6545 | 9  | 2 | 1,0  | 20 |
| 6545544 | 6545 | 9  | 2 | 1,0  | 9  |
| 6545545 | 6545 | 9  | 2 | 3,5  | 34 |
| 6545546 | 6545 | 9  | 2 | 3,3  | 33 |
| 6545550 | 6545 | 9  | 2 | 4,0  | 35 |
| 6545551 | 6545 | 9  | 2 | 2,8  | 31 |
| 6545552 | 6545 | 9  | 2 | 1,0  | 9  |
| 6545553 | 6545 | 9  | 2 | 1,0  | 9  |
| 6545554 | 6545 | 9  | 2 | 5,1  | 38 |
| 6545557 | 6545 | 9  | 2 | 1,2  | 22 |
| 6545559 | 6545 | 9  | 2 | 2,8  | 31 |
| 6545560 | 6545 | 9  | 2 | 3,5  | 34 |
| 6545561 | 6545 | 9  | 2 | 1,0  | 6  |
| 6545563 | 6545 | 9  | 2 | 6,1  | 40 |
| 6545564 | 6545 | 9  | 2 | 5,1  | 38 |
| 6545566 | 6545 | 9  | 0 | 3,5  | 34 |
| 6545569 | 6545 | 9  | 2 | 1,0  | 17 |
| 6545570 | 6545 | 9  | 0 | 1,0  | 15 |
| 6556501 | 6556 | 10 | 2 | 15,5 | 50 |
| 6556502 | 6556 | 10 | 2 | 22,2 | 55 |
| 6556503 | 6556 | 10 | 2 | 12,8 | 48 |
| 6556504 | 6556 | 10 | 2 | 8,0  | 43 |
| 6556507 | 6556 | 10 | 2 | 30,0 | 67 |
| 6556508 | 6556 | 10 | 2 | 13,2 | 49 |
| 6556509 | 6556 | 10 | 2 | 2,3  | 29 |

|         |      |    |   |      |    |
|---------|------|----|---|------|----|
| 6556510 | 6556 | 10 | 2 | 1,0  | 15 |
| 6556511 | 6556 | 10 | 2 | 2,9  | 32 |
| 6556512 | 6556 | 10 | 2 | 1,6  | 25 |
| 6556515 | 6556 | 10 | 2 | 4,0  | 35 |
| 6556516 | 6556 | 10 | 2 | 1,0  | 20 |
| 6556520 | 6556 | 10 | 2 | 2,4  | 30 |
| 6556521 | 6556 | 10 | 2 | 1,0  | 20 |
| 6556522 | 6556 | 10 | 2 | 7,0  | 41 |
| 6642501 | 6642 | 11 | 2 | 30,0 | 60 |
| 6642502 | 6642 | 11 | 2 | 6,1  | 40 |
| 6642503 | 6642 | 11 | 2 | 30,0 | 67 |
| 6642504 | 6642 | 11 | 2 | 30,0 | 70 |
| 6642505 | 6642 | 11 | 2 | 17,5 | 52 |
| 6642506 | 6642 | 11 | 2 | 16,8 | 51 |
| 6642507 | 6642 | 11 | 2 | 30,0 | 65 |
| 6642508 | 6642 | 11 | 2 | 30,0 | 60 |
| 6642509 | 6642 | 11 | 2 | 30,0 | 63 |
| 6642510 | 6642 | 11 | 2 | 15,5 | 50 |
| 6642511 | 6642 | 11 | 2 | 15,5 | 50 |
| 6642513 | 6642 | 11 | 2 | 28,0 | 58 |
| 6642514 | 6642 | 11 | 2 | 16,8 | 51 |
| 6642515 | 6642 | 11 | 2 | 2,8  | 31 |
| 6642516 | 6642 | 11 | 2 | 4,0  | 35 |
| 6642517 | 6642 | 11 | 2 | 2,3  | 29 |
| 6642518 | 6642 | 11 | 2 | 1,9  | 28 |
| 6642519 | 6642 | 11 | 2 | 10,2 | 45 |
| 6642520 | 6642 | 11 | 2 | 2,9  | 32 |
| 6642521 | 6642 | 11 | 2 | 2,9  | 32 |
| 6642522 | 6642 | 11 | 2 | 2,8  | 31 |
| 6642524 | 6642 | 11 | 2 | 1,4  | 24 |
| 6642525 | 6642 | 11 | 2 | 1,0  | 15 |
| 6642527 | 6642 | 11 | 2 | 8,0  | 43 |
| 6642528 | 6642 | 11 | 2 | 1,0  | 17 |
| 6642529 | 6642 | 11 | 2 | 30,0 | 64 |
| 6642530 | 6642 | 11 | 2 | 25,1 | 57 |
| 6642531 | 6642 | 11 | 2 | 8,0  | 43 |
| 6642532 | 6642 | 11 | 2 | 7,0  | 41 |
| 6642533 | 6642 | 11 | 2 | 1,0  | 14 |
| 6642534 | 6642 | 11 | 2 | 1,4  | 24 |
| 6642535 | 6642 | 11 | 2 | 3,5  | 34 |
| 6642537 | 6642 | 11 | 2 | 1,0  | 14 |
| 6642538 | 6642 | 11 | 2 | 4,2  | 36 |
| 6642539 | 6642 | 11 | 2 | 4,8  | 37 |
| 6642540 | 6642 | 11 | 2 | 13,2 | 49 |
| 6642541 | 6642 | 11 | 2 | 22,2 | 55 |
| 6642542 | 6642 | 11 | 2 | 10,2 | 45 |
| 6642544 | 6642 | 11 | 0 | 7,0  | 41 |
| 6642545 | 6642 | 11 | 2 | 7,0  | 41 |
| 6642546 | 6642 | 11 | 2 | 1,8  | 27 |

|         |      |    |   |      |    |
|---------|------|----|---|------|----|
| 6642547 | 6642 | 11 | 2 | 30,0 | 75 |
| 6686501 | 6686 | 12 | 2 | 17,5 | 42 |
| 6686502 | 6686 | 12 | 2 | 5,1  | 38 |
| 6686503 | 6686 | 12 | 2 | 30,0 | 63 |
| 6686505 | 6686 | 12 | 2 | 30,0 | 60 |
| 6849501 | 6849 | 13 | 2 | 30,0 | 65 |
| 6849504 | 6849 | 13 | 2 | 13,2 | 49 |
| 6849505 | 6849 | 13 | 2 | 30,0 | 63 |
| 6849506 | 6849 | 13 | 2 | 30,0 | 67 |
| 6849507 | 6849 | 13 | 2 | 19,6 | 53 |
| 6849508 | 6849 | 13 | 2 | 30,0 | 62 |
| 6849509 | 6849 | 13 | 2 | 1,3  | 23 |
| 6849510 | 6849 | 13 | 2 | 7,4  | 42 |
| 6849511 | 6849 | 13 | 2 | 4,2  | 36 |
| 6849512 | 6849 | 13 | 2 | 4,0  | 35 |
| 6849513 | 6849 | 13 | 2 | 30,0 | 60 |
| 6849514 | 6849 | 13 | 2 | 22,2 | 55 |
| 6849515 | 6849 | 13 | 2 | 30,0 | 65 |
| 6849516 | 6849 | 13 | 2 | 30,0 | 74 |
| 6849519 | 6849 | 13 | 0 | 21,7 | 54 |
| 6849520 | 6849 | 13 | 2 | 29,4 | 59 |
| 6849521 | 6849 | 13 | 2 | 1,0  | 15 |
| 6849522 | 6849 | 13 | 2 | 1,0  | 12 |
| 6849523 | 6849 | 13 | 2 | 1,6  | 25 |
| 6849528 | 6849 | 13 | 2 | 21,7 | 54 |
| 6849530 | 6849 | 13 | 2 | 28,0 | 58 |
| 6849531 | 6849 | 13 | 2 | 19,6 | 53 |
| 6849532 | 6849 | 13 | 2 | 16,8 | 51 |
| 6849535 | 6849 | 13 | 2 | 10,2 | 45 |
| 6849538 | 6849 | 13 | 2 | 4,8  | 37 |
| 6849539 | 6849 | 13 | 2 | 13,2 | 49 |
| 6849542 | 6849 | 13 | 2 | 30,0 | 63 |
| 6849543 | 6849 | 13 | 2 | 30,0 | 66 |
| 6849544 | 6849 | 13 | 2 | 1,2  | 22 |
| 6849545 | 6849 | 13 | 2 | 1,0  | 19 |
| 6849546 | 6849 | 13 | 2 | 8,0  | 43 |
| 6849547 | 6849 | 13 | 2 | 3,5  | 34 |
| 6849548 | 6849 | 13 | 2 | 1,7  | 26 |
| 6849549 | 6849 | 13 | 2 | 1,3  | 23 |
| 6849550 | 6849 | 13 | 2 | 1,4  | 24 |
| 6849551 | 6849 | 13 | 2 | 1,4  | 24 |
| 6849552 | 6849 | 13 | 2 | 1,0  | 19 |
| 6849553 | 6849 | 13 | 2 | 1,8  | 27 |
| 6849554 | 6849 | 13 | 2 | 2,9  | 32 |
| 6849555 | 6849 | 13 | 2 | 5,1  | 38 |
| 6849556 | 6849 | 13 | 2 | 4,8  | 37 |
| 6849557 | 6849 | 13 | 2 | 7,0  | 41 |
| 6849558 | 6849 | 13 | 2 | 1,6  | 25 |
| 6849559 | 6849 | 13 | 2 | 2,4  | 30 |

|         |      |    |   |      |    |
|---------|------|----|---|------|----|
| 6849564 | 6849 | 13 | 2 | 1,6  | 25 |
| 6849565 | 6849 | 13 | 2 | 1,0  | 14 |
| 6849566 | 6849 | 13 | 2 | 1,9  | 28 |
| 6849567 | 6849 | 13 | 2 | 16,8 | 51 |
| 6849568 | 6849 | 13 | 2 | 3,5  | 34 |
| 6849569 | 6849 | 13 | 2 | 1,0  | 18 |
| 6849573 | 6849 | 13 | 2 | 30,0 | 65 |
| 6849576 | 6849 | 13 | 2 | 1,1  | 21 |
| 6849577 | 6849 | 13 | 2 | 1,0  | 19 |
| 6849578 | 6849 | 13 | 2 | 1,0  | 60 |
| 6849580 | 6849 | 13 | 2 | 1,0  | 17 |
| 6849583 | 6849 | 13 | 2 | 7,4  | 42 |
| 8409501 | 8409 | 14 | 2 | 4,2  | 36 |
| 8409502 | 8409 | 14 | 2 | 13,2 | 49 |
| 8409503 | 8409 | 14 | 2 | 28,0 | 58 |
| 8409504 | 8409 | 14 | 2 | 2,3  | 29 |
| 8409507 | 8409 | 14 | 2 | 17,5 | 52 |
| 8409511 | 8409 | 14 | 2 | 19,6 | 53 |
| 8409512 | 8409 | 14 | 2 | 16,8 | 51 |
| 8409513 | 8409 | 14 | 2 | 15,5 | 50 |
| 8409514 | 8409 | 14 | 2 | 1,1  | 21 |
| 8409515 | 8409 | 14 | 2 | 6,1  | 40 |
| 8409516 | 8409 | 14 | 2 | 7,4  | 42 |
| 8409517 | 8409 | 14 | 2 | 1,2  | 22 |
| 8409518 | 8409 | 14 | 2 | 19,6 | 53 |
| 8409519 | 8409 | 14 | 2 | 1,0  | 14 |
| 8409520 | 8409 | 14 | 2 | 4,8  | 37 |
| 8409521 | 8409 | 14 | 2 | 1,0  | 20 |
| 8409522 | 8409 | 14 | 2 | 25,1 | 57 |
| 8409523 | 8409 | 14 | 2 | 25,1 | 57 |
| 8409524 | 8409 | 14 | 2 | 1,3  | 23 |
| 8409525 | 8409 | 14 | 2 | 21,7 | 54 |
| 8409526 | 8409 | 14 | 2 | 1,0  | 18 |
| 8409527 | 8409 | 14 | 2 | 16,8 | 51 |
| 8409528 | 8409 | 14 | 2 | 1,0  | 19 |
| 8409529 | 8409 | 14 | 2 | 10,2 | 45 |
| 8409530 | 8409 | 14 | 2 | 15,5 | 50 |
| 8517501 | 8517 | 15 | 2 | 1,9  | 28 |
| 8517502 | 8517 | 15 | 2 | 7,4  | 42 |
| 8517503 | 8517 | 15 | 2 | 7,4  | 42 |
| 8517504 | 8517 | 15 | 2 | 10,7 | 47 |
| 8517505 | 8517 | 15 | 2 | 1,0  | 17 |
| 8517506 | 8517 | 15 | 2 | 2,9  | 37 |
| 8517507 | 8517 | 15 | 2 | 1,2  | 22 |
| 8517509 | 8517 | 15 | 2 | 30,0 | 63 |
| 8517510 | 8517 | 15 | 2 | 7,0  | 41 |
| 8517511 | 8517 | 15 | 2 | 8,8  | 44 |
| 8517512 | 8517 | 15 | 2 | 7,4  | 42 |
| 8517514 | 8517 | 15 | 2 | 1,6  | 25 |

|         |      |    |   |      |    |
|---------|------|----|---|------|----|
| 8517515 | 8517 | 15 | 2 | 10,2 | 45 |
| 8517516 | 8517 | 15 | 2 | 1,0  | 15 |
| 8517517 | 8517 | 15 | 2 | 2,8  | 31 |
| 8517518 | 8517 | 15 | 2 | 15,5 | 50 |
| 8517522 | 8517 | 15 | 2 | 30,0 | 72 |
| 8517523 | 8517 | 15 | 2 | 21,7 | 54 |
| 8517524 | 8517 | 15 | 2 | 2,4  | 30 |
| 8517525 | 8517 | 15 | 2 | 8,0  | 43 |
| 8517526 | 8517 | 15 | 2 | 10,2 | 45 |
| 8517527 | 8517 | 15 | 2 | 1,9  | 28 |
| 8517528 | 8517 | 15 | 2 | 1,3  | 23 |
| 8517529 | 8517 | 15 | 2 | 2,3  | 29 |
| 8517530 | 8517 | 15 | 2 | 2,3  | 29 |
| 8517533 | 8517 | 15 | 2 | 1,4  | 24 |
| 8517534 | 8517 | 15 | 2 | 1,8  | 27 |
| 8517535 | 8517 | 15 | 2 | 5,7  | 39 |
| 8517536 | 8517 | 15 | 2 | 10,7 | 47 |
| 8517537 | 8517 | 15 | 2 | 2,9  | 32 |
| 8517538 | 8517 | 15 | 2 | 1,2  | 22 |
| 8517539 | 8517 | 15 | 2 | 2,3  | 29 |
| 8517540 | 8517 | 15 | 2 | 10,2 | 45 |
| 8662501 | 8662 | 16 | 2 | 4,0  | 35 |
| 8662502 | 8662 | 16 | 2 | 30,0 | 63 |
| 8662503 | 8662 | 16 | 2 | 10,7 | 47 |
| 8662504 | 8662 | 16 | 2 | 7,0  | 41 |
| 8662505 | 8662 | 16 | 2 | 30,0 | 60 |
| 8662507 | 8662 | 16 | 2 | 22,2 | 55 |
| 8662509 | 8662 | 16 | 2 | 1,0  | 15 |
| 8662510 | 8662 | 16 | 0 | 1,2  | 22 |
| 8662511 | 8662 | 16 | 2 | 5,1  | 38 |
| 8662513 | 8662 | 16 | 2 | 1,0  | 9  |
| 8662514 | 8662 | 16 | 2 | 3,3  | 33 |
| 8662516 | 8662 | 16 | 2 | 1,2  | 22 |
| 8662519 | 8662 | 16 | 2 | 10,7 | 47 |
| 8662520 | 8662 | 16 | 2 | 25,1 | 57 |
| 8662521 | 8662 | 16 | 2 | 8,0  | 43 |
| 8662522 | 8662 | 16 | 2 | 7,4  | 42 |
| 8662523 | 8662 | 16 | 2 | 1,0  | 20 |
| 8662524 | 8662 | 16 | 2 | 1,9  | 28 |
| 8662525 | 8662 | 16 | 2 | 1,9  | 28 |
| 8662527 | 8662 | 16 | 2 | 8,0  | 43 |
| 8848501 | 8848 | 17 | 2 | 28,0 | 58 |
| 8848502 | 8848 | 17 | 2 | 12,8 | 48 |
| 8848503 | 8848 | 17 | 2 | 8,4  | 44 |
| 8848504 | 8848 | 17 | 2 | 13,2 | 49 |
| 8848505 | 8848 | 17 | 2 | 30,0 | 65 |
| 8848506 | 8848 | 17 | 2 | 7,0  | 41 |
| 8848507 | 8848 | 17 | 2 | 29,4 | 59 |
| 8848508 | 8848 | 17 | 2 | 30,0 | 74 |



|         |      |    |   |      |    |
|---------|------|----|---|------|----|
| 8848509 | 8848 | 17 | 2 | 22,2 | 55 |
| 8848510 | 8848 | 17 | 2 | 7,4  | 42 |
| 8848511 | 8848 | 17 | 2 | 5,1  | 38 |
| 8848512 | 8848 | 17 | 2 | 12,8 | 48 |
| 8848513 | 8848 | 17 | 2 | 12,8 | 48 |
| 8848514 | 8848 | 17 | 2 | 30,0 | 67 |
| 8848516 | 8848 | 17 | 2 | 7,0  | 41 |
| 8848517 | 8848 | 17 | 2 | 16,8 | 51 |
| 8848519 | 8848 | 17 | 2 | 13,2 | 49 |
| 8848520 | 8848 | 17 | 2 | 30,0 | 60 |
| 8848521 | 8848 | 17 | 2 | 5,7  | 39 |
| 8848523 | 8848 | 17 | 2 | 10,7 | 47 |
| 8848524 | 8848 | 17 | 2 | 8,0  | 43 |
| 8848527 | 8848 | 17 | 2 | 4,2  | 36 |
| 8848528 | 8848 | 17 | 2 | 1,2  | 22 |
| 8848530 | 8848 | 17 | 2 | 15,5 | 50 |
| 8848533 | 8848 | 17 | 2 | 7,0  | 41 |
| 8848536 | 8848 | 17 | 2 | 1,0  | 15 |
| 8848537 | 8848 | 17 | 2 | 6,1  | 40 |
| 8848538 | 8848 | 17 | 2 | 2,9  | 32 |
| 8848539 | 8848 | 17 | 2 | 17,5 | 52 |
| 8848540 | 8848 | 17 | 2 | 2,8  | 31 |
| 8848541 | 8848 | 17 | 2 | 2,3  | 29 |
| 8848542 | 8848 | 17 | 2 | 1,4  | 24 |
| 8848543 | 8848 | 17 | 2 | 1,8  | 27 |
| 8848544 | 8848 | 17 | 2 | 2,4  | 30 |
| 8848545 | 8848 | 17 | 2 | 1,2  | 22 |
| 8848547 | 8848 | 17 | 2 | 1,2  | 22 |
| 8848548 | 8848 | 17 | 2 | 8,8  | 44 |
| 8848550 | 8848 | 17 | 2 | 1,2  | 22 |
| 8848552 | 8848 | 17 | 2 | 30,0 | 62 |
| 8848553 | 8848 | 17 | 2 | 10,2 | 45 |
| 9011501 | 9011 | 18 | 2 | 1,3  | 23 |
| 9011502 | 9011 | 18 | 2 | 15,5 | 50 |
| 9011503 | 9011 | 18 | 2 | 30,0 | 70 |
| 9011504 | 9011 | 18 | 2 | 30,0 | 65 |
| 8942501 | 8942 | 19 | 1 | 5,7  | 39 |
| 8942502 | 8942 | 19 | 1 | 15,5 | 50 |
| 8942503 | 8942 | 19 | 1 | 10,2 | 45 |
| 8942504 | 8942 | 19 | 1 | 13,2 | 49 |
| 8942505 | 8942 | 19 | 1 | 10,5 | 46 |
| 8942514 | 8942 | 19 | 1 | 30,0 | 60 |
| 8942527 | 8942 | 19 | 1 | 2,9  | 32 |
| 8942531 | 8942 | 19 | 1 | 5,1  | 38 |
| 8826501 | 8826 | 20 | 1 | 30,0 | 84 |
| 8826502 | 8826 | 20 | 1 | 6,1  | 40 |
| 8826504 | 8826 | 20 | 1 | 10,7 | 47 |
| 8170501 | 8170 | 21 | 1 | 6,1  | 40 |
| 8170502 | 8170 | 21 | 1 | 8,8  | 44 |

|         |      |    |   |      |    |
|---------|------|----|---|------|----|
| 8170503 | 8170 | 21 | 1 | 16,8 | 51 |
| 8170504 | 8170 | 21 | 1 | 15,5 | 50 |
| 8170505 | 8170 | 21 | 1 | 8,8  | 44 |
| 8170506 | 8170 | 21 | 1 | 5,7  | 39 |
| 8170507 | 8170 | 21 | 1 | 10,2 | 45 |
| 8170508 | 8170 | 21 | 1 | 4,2  | 36 |
| 8170509 | 8170 | 21 | 1 | 4,2  | 36 |
| 8170510 | 8170 | 21 | 1 | 4,2  | 36 |
| 8170511 | 8170 | 21 | 1 | 1,0  | 4  |
| 8170512 | 8170 | 21 | 1 | 1,0  | 14 |
| 8170513 | 8170 | 21 | 1 | 1,0  | 12 |
| 8170518 | 8170 | 21 | 1 | 7,0  | 41 |
| 8170529 | 8170 | 21 | 1 | 10,5 | 46 |
| 7429501 | 7429 | 23 | 2 | 21,7 | 54 |
| 7429502 | 7429 | 23 | 2 | 10,2 | 45 |
| 7429503 | 7429 | 23 | 2 | 2,9  | 32 |
| 7429510 | 7429 | 23 | 2 | 1,6  | 25 |
| 7028501 | 7028 | 24 | 2 | 29,4 | 59 |
| 7028504 | 7028 | 24 | 2 | 17,5 | 52 |
| 7028505 | 7028 | 24 | 2 | 23,8 | 56 |
| 7028506 | 7028 | 24 | 2 | 6,1  | 40 |
| 7028507 | 7028 | 24 | 2 | 30,0 | 66 |
| 7028508 | 7028 | 24 | 2 | 30,0 | 60 |
| 7028509 | 7028 | 24 | 2 | 1,0  | 11 |
| 7028510 | 7028 | 24 | 2 | 4,8  | 37 |
| 7028511 | 7028 | 24 | 2 | 5,1  | 38 |
| 7028512 | 7028 | 24 | 2 | 1,0  | 17 |
| 7028515 | 7028 | 24 | 2 | 1,2  | 22 |

**Tabelle 11: PROCAM-Score für alle Mitglieder der Herzinfarkt-Großfamilien**

Der PROCAM-Score wurde für alle Personen berechnet, für die die entsprechenden Daten vorlagen

## 7.4 MEF2A-Sequenzierung

| ID      | Exon 1 | Exon 2                       | Exon 3 | Exon 4 | Exon 5 | Exon 6 | Exon 7 |
|---------|--------|------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 8948502 | 0      | 0                            | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
| 2001516 | 0      | Intron2-67G/C; Intron2-22A/T | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
| 8882503 | 0      | Intron2-67G/C; Intron2-22A/T | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
| 8622504 | 0      | 0                            | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
| 8655503 | 0      | Intron2-67G/C; Intron2-22A/T | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
| 8502502 | 0      | Intron2-67G/C; Intron2-22A/T | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
| 4453501 | 0      | Intron2-67G/C; Intron2-22A/T | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
| 6486503 | 0      | Intron2-67G/C; Intron2-22A/T | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
| 6545504 | 0      | Intron2-67G/C; Intron2-22A/T | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
| 6556504 | 0      | Intron2-67G/C                | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
| 6642502 | 0      | Intron2-22A/T                | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
| 6686502 | 0      | Intron2-67G/C; Intron2-22A/T | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
| 6849509 | 0      | 0                            | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
| 8409501 | 0      | Intron2-67G/C; Intron2-22A/T | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
| 8517504 | 0      | Intron2-67G/C; Intron2-22A/T | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
| 8662501 | 0      | Intron2-67G/C; Intron2-22A/T | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
| 8848506 | 0      | 0                            | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
| 9011502 | 0      | Intron2-22A/T                | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
| 8942527 | 0      | Intron2-22A/T                | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
| 8826502 | 0      | Intron2-67G/C; Intron2-22A/T | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
| 8170501 | 0      | Intron2-67G/C; Intron2-22A/T | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
| 7429502 | 0      | Intron2-67G/C; Intron2-22A/T | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |
| 7028506 | 0      | 0                            | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      |

| ID      | Exon 8 | Exon 9                         | Exon 10 | Exon 11        | Exon 12      |
|---------|--------|--------------------------------|---------|----------------|--------------|
| 8948502 | 0      | 0                              | Ex10C/T | 0              | (CAG)n 9/11  |
| 2001516 | 0      | 0                              | 0       | 0              | (CAG)n 9/9   |
| 8882503 | 0      | 0                              | 0       | Intron11+50C/G | (CAG)n 9/11  |
| 8622504 | 0      | Intron9+82G/A; Intron 8-74delT | Ex10C/T | 0              | (CAG)n 10/11 |
| 8655503 | 0      | 0                              | 0       | Intron11+50C/G | (CAG)n 10/11 |
| 8502502 | 0      | 0                              | 0       | 0              | (CAG)n 9/11  |
| 4453501 | 0      | 0                              | 0       | 0              | (CAG)n 9/11  |
| 6486503 | 0      | Intron9+82G/A; Intron 8-74delT | 0       | Intron11+50C/G | (CAG)n 10/11 |
| 6545504 | 0      | Intron9+82G/A; Intron 8-74delT | 0       | Intron11+50C/G | (CAG)n 9/10  |
| 6556504 | 0      | Intron9+82G/A; Intron 8-74delT | 0       | 0              | (CAG)n 10/11 |
| 6642502 | 0      | 0                              | 0       | Intron11+50C/G | (CAG)n 9/11  |
| 6686502 | 0      | 0                              | 0       | 0              | (CAG)n 9/11  |
| 6849509 | 0      | 0                              | 0       | 0              | (CAG)n 11/11 |
| 8409501 | 0      | 0                              | Ex10C/T | 0              | (CAG)n 9/11  |
| 8517504 | 0      | 0                              | 0       | 0              | (CAG)n 11/11 |
| 8662501 | 0      | 0                              | Ex10C/T | Intron11+50C/G | (CAG)n 11/11 |
| 8848506 | 0      | Intron9+82G/A; Intron 8-74delT | 0       | 0              | (CAG)n 9/10  |
| 9011502 | 0      | Intron9+82G/A; Intron 8-74delT | Ex10C/T | 0              | (CAG)n 10/11 |
| 8942527 | 0      | 0                              | 0       | 0              | (CAG)n 9/11  |
| 8826502 | 0      | 0                              | 0       | Intron11+50C/G | (CAG)n 9/9   |
| 8170501 | 0      | 0                              | 0       | Intron11+50C/G | (CAG)n 11/11 |
| 7429502 | 0      | 0                              | 0       | Intron11+50C/G | (CAG)n 9/11  |
| 7028506 | 0      | 0                              | 0       | 0              | (CAG)n 9/11  |

| ID      | 5'UTR Fr1 | 5'UTR Fr2 | 3'UTR Fr1         | 3'UTR Fr2 | 3'UTR Fr3 | 3'UTR Fr4  |
|---------|-----------|-----------|-------------------|-----------|-----------|------------|
| 8948502 | 0         | 0         | [TGTG]1 / [TGTG]2 | 0         | 0         | 81400* T/C |
| 2001516 | 0         | 0         | 0                 | 0         | 0         | 0          |
| 8882503 | 0         | 0         | [TGTG]1 / [TGTG]2 | 0         | 0         | 81400* T/C |
| 8622504 | 0         | 0         | [TGTG]2           | 0         | 0         | 81400* T/C |
| 8655503 | 0         | 0         | [TGTG]1 / [TGTG]2 | 0         | 0         | 0          |
| 8502502 | 0         | 0         | [TGTG]1 / [TGTG]2 | 0         | 0         | 81400* T/C |
| 4453501 | 0         | 0         | 0                 | 0         | 0         | 0          |
| 6486503 | 0         | 0         | [TGTG]1 / [TGTG]2 | 0         | 0         | 81400* T/C |
| 6545504 | 0         | 0         | [TGTG]1 / [TGTG]2 | 0         | 0         | 0          |
| 6556504 | 0         | 0         | [TGTG]2 79819*    | 0         | 0         | 81400* T/C |
| 6642502 | 0         | 0         | [TGTG]1 / [TGTG]2 | 0         | 0         | 81400* T/C |
| 6686502 | 0         | 0         | [TGTG]1 / [TGTG]2 | 0         | 0         | 0          |
| 6849509 | 0         | 0         | 0                 | 0         | 0         | 81400* T/C |
| 8409501 | 0         | 0         | 0                 | 0         | 0         | 81400* T/C |
| 8517504 | 0         | 0         | [TGTG]1 / [TGTG]2 | 0         | 0         | 81400* T/C |
| 8662501 | 0         | 0         | [TGTG]2           | 0         | 0         | 81400* T/C |
| 8848506 | 0         | 0         | [TGTG]1 / [TGTG]2 | 0         | 0         | 0          |
| 9011502 | 0         | 0         | [TGTG]1 / [TGTG]2 | 0         | 0         | 81400* T/C |
| 8942527 | 0         | 0         | [TGTG]1 / [TGTG]2 | 0         | 0         | 81400* T/C |
| 8826502 | 0         | 0         | 0                 | 0         | 0         | 81400* T/C |
| 8170501 | 0         | 0         | [TGTG]1 / [TGTG]2 | 0         | 0         | 81400* T/C |
| 7429502 | 0         | 0         | 0                 | 0         | 0         | 0          |
| 7028506 | 0         | 0         | 0                 | 0         | 0         | 81400* T/C |

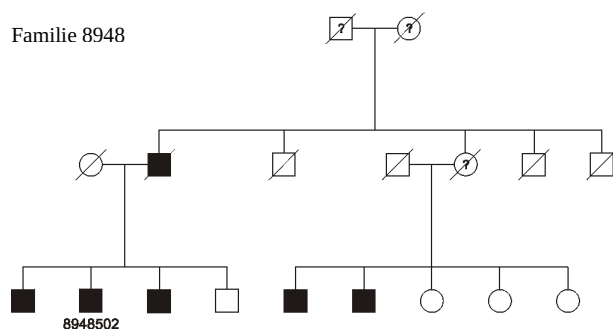
**Tabelle 12: Ergebnisse der *MEF2A*-Sequenzierung bei 23 Patienten aus den Herzinfarkt-Großfamilien**

Das Vorliegen der Wildtyp-Sequenz ist jeweils mit 0 bezeichnet; die 5'- und die 3'-UTR-Region sind jeweils in mehrere Fragmente unterteilt

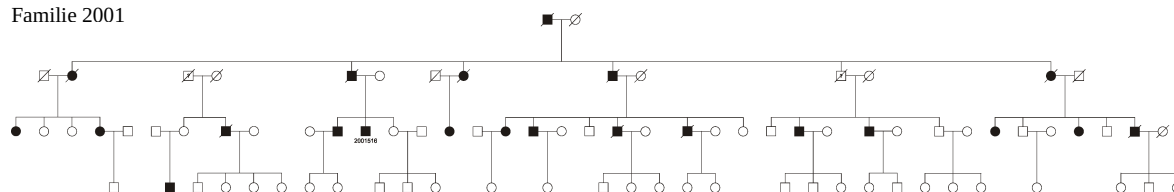
\* Zählweise nach <http://snpper.chip.org/bio/show-sequence/?TYPE=U&GENE=6846&CMD=abs>

## 7.5 Stammbäume der Herzinfarkt-Großfamilien

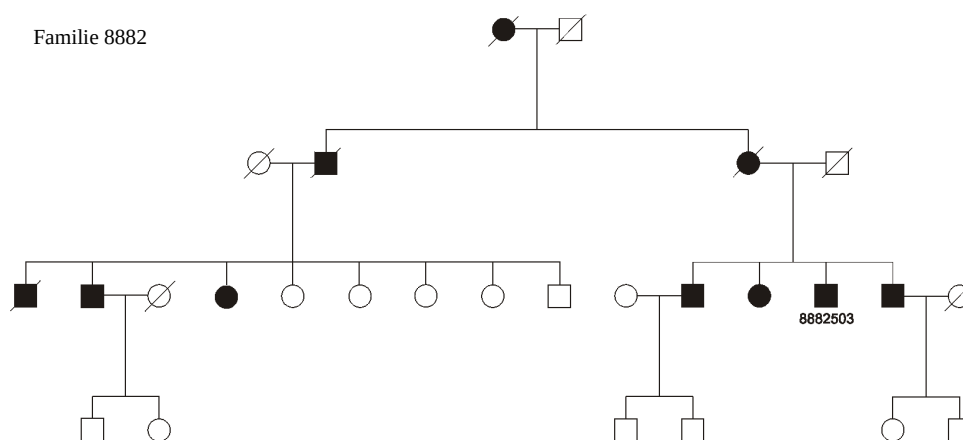
Familie 8948



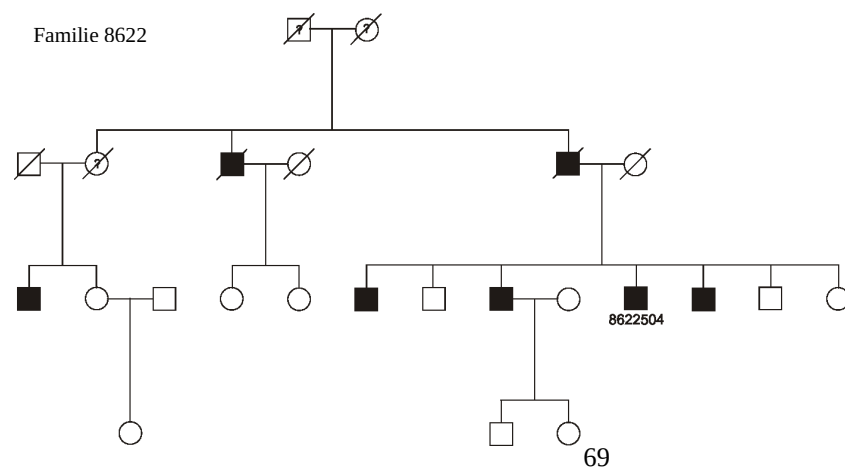
Familie 2001



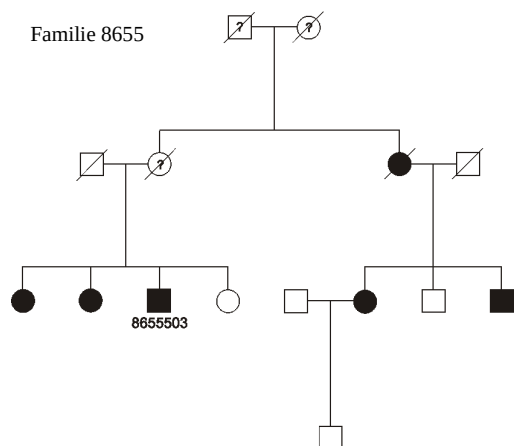
Familie 8882



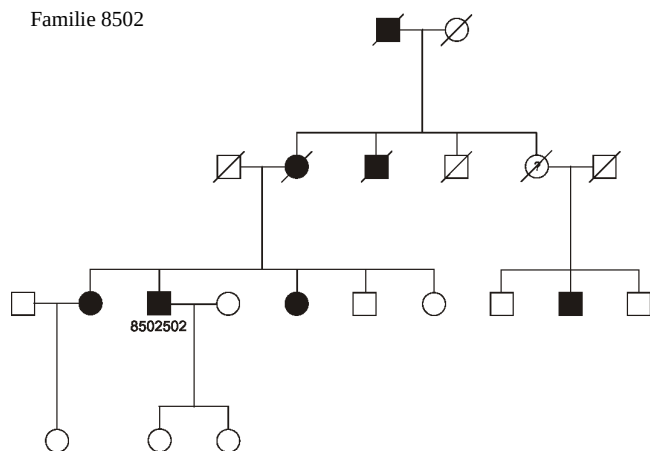
Familie 8622



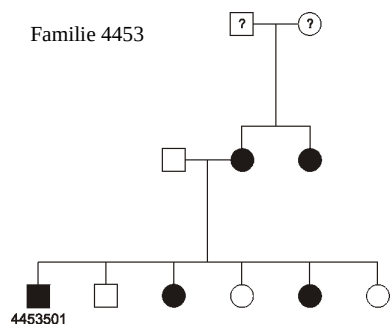
Familie 8655



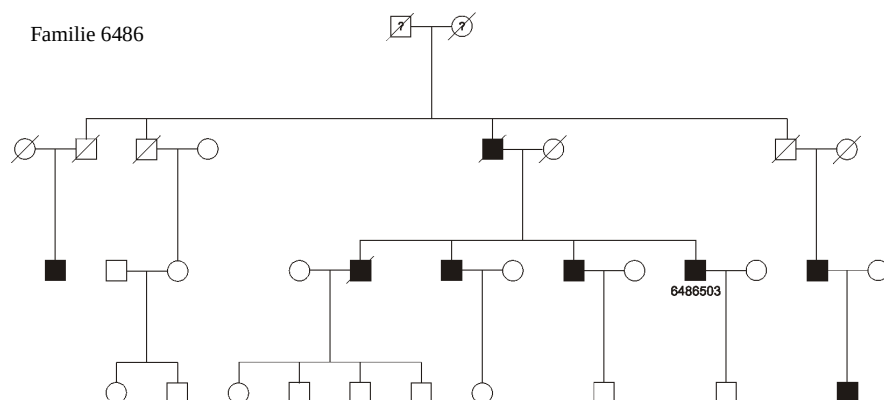
Familie 8502



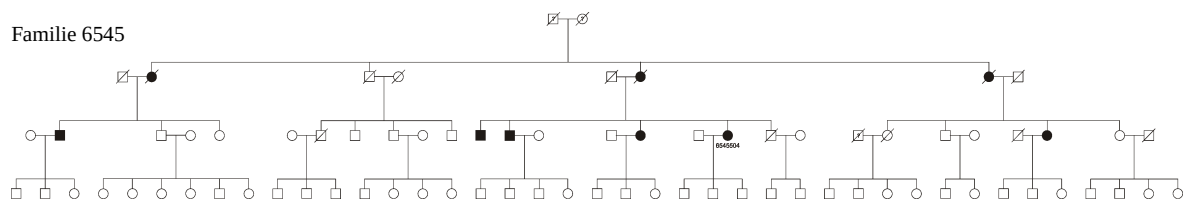
Familie 4453



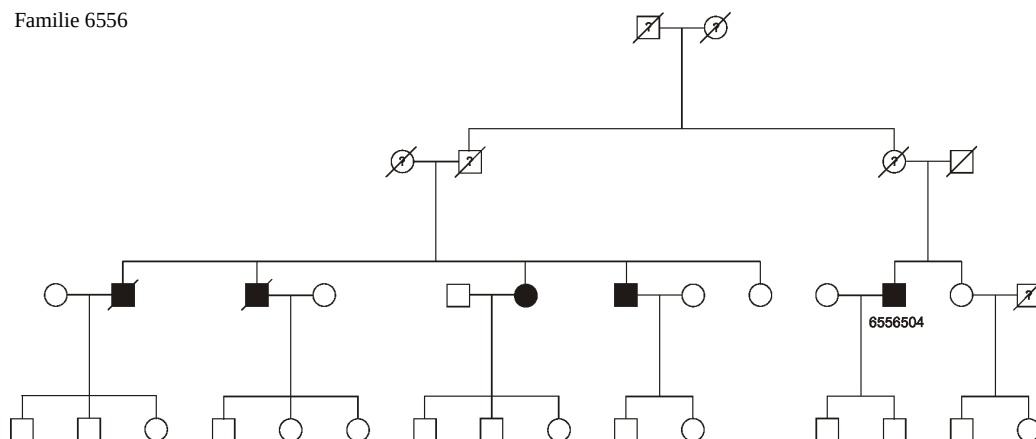
Familie 6486



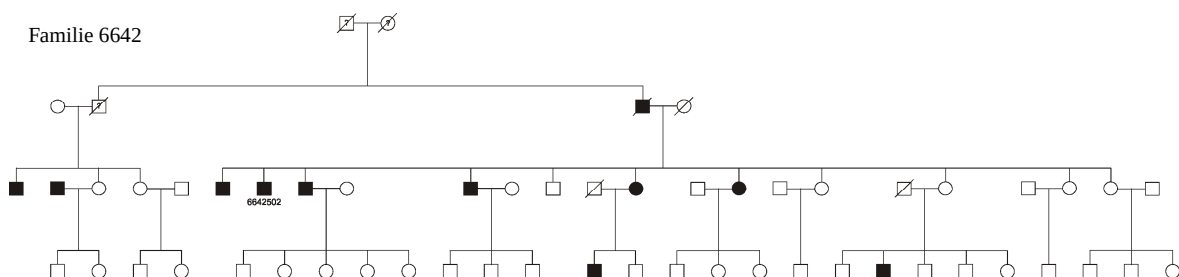
Familie 6545



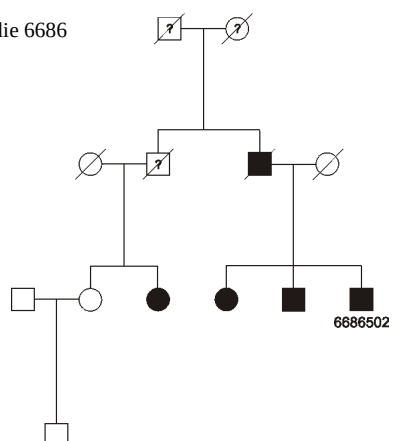
Familie 6556



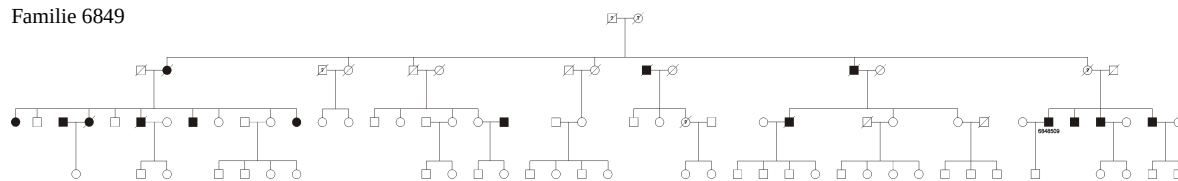
Familie 6642



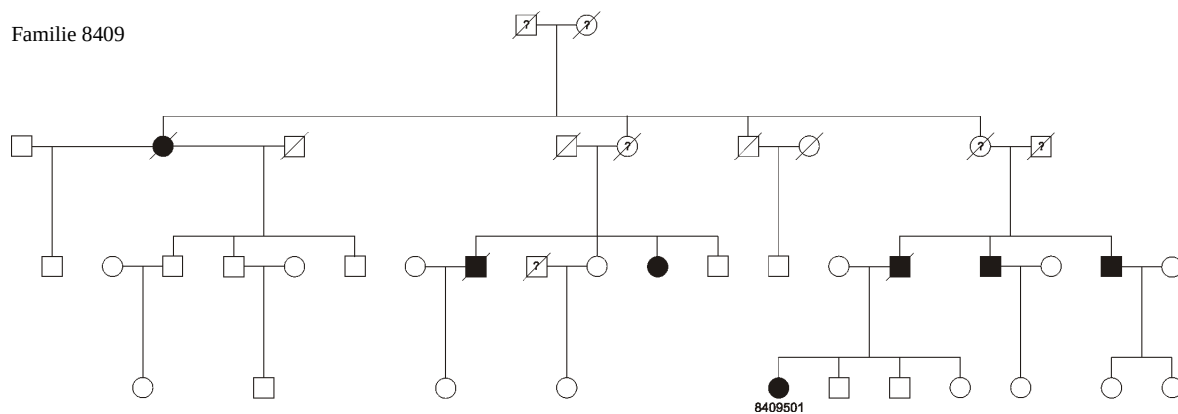
Familie 6686



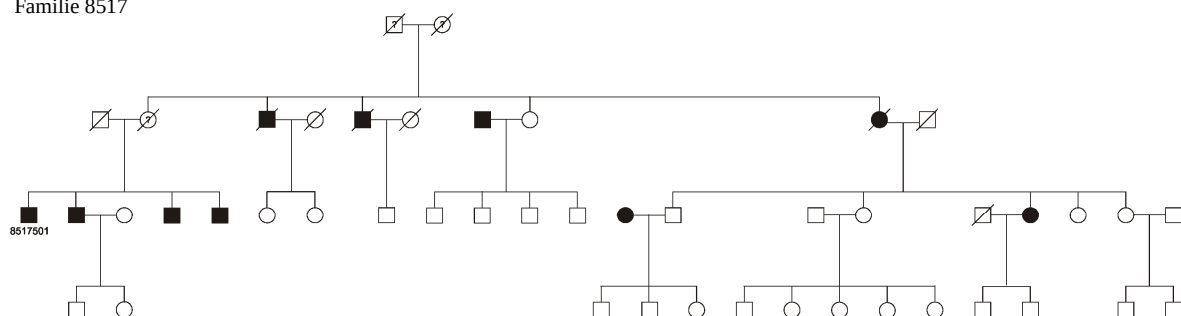
Familie 6849



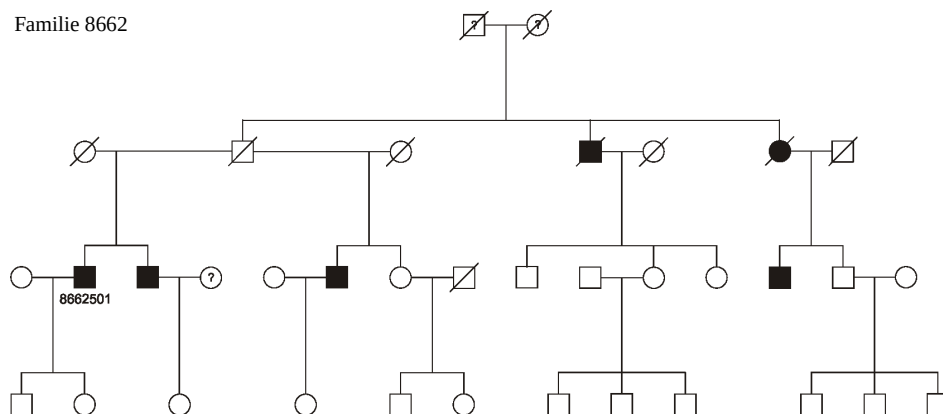
Familie 8409



Familie 8517

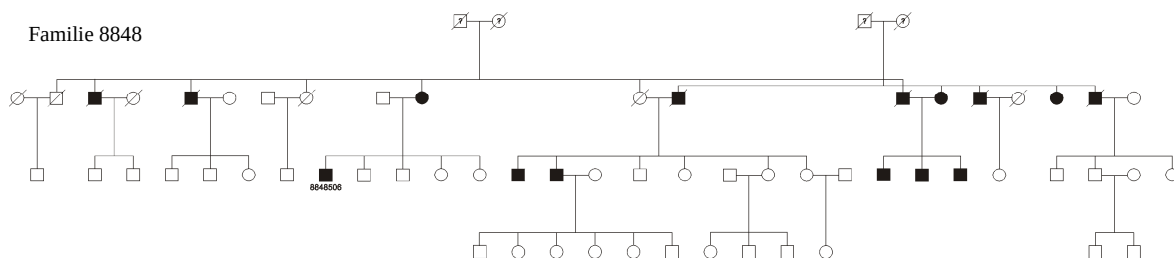


Familie 8662

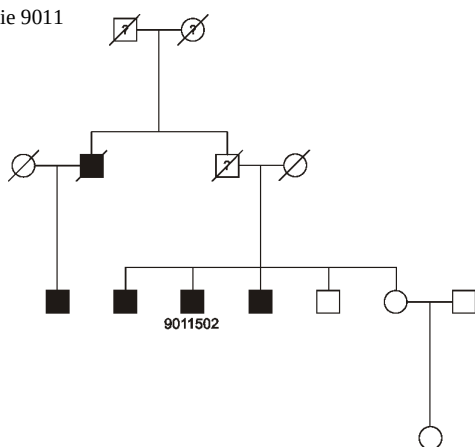




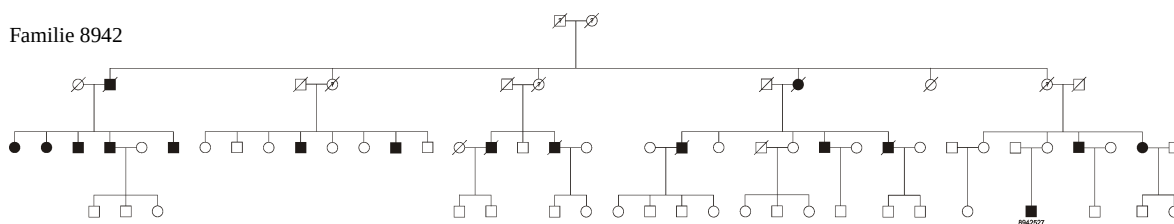
Familie 8848



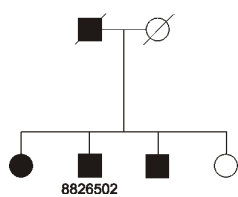
Familie 9011

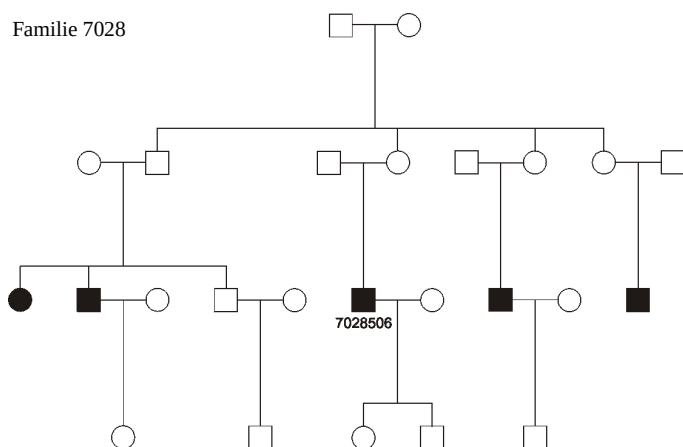
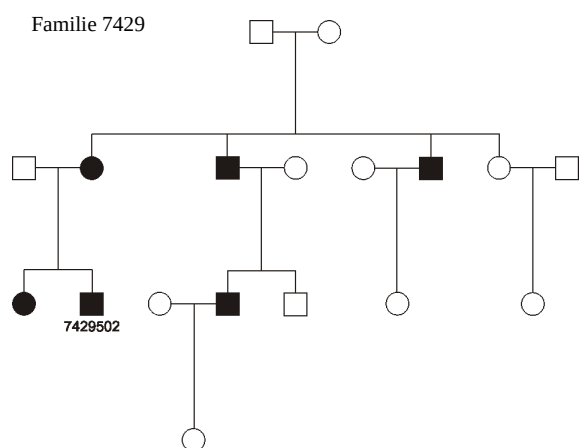
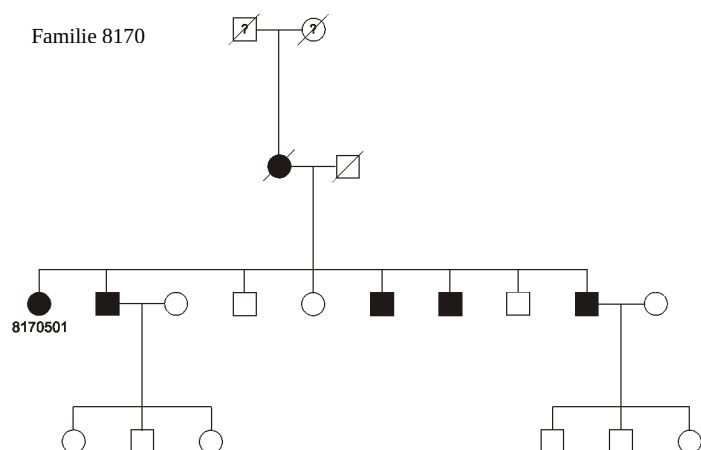


Familie 8942



Familie 8826





**Erläuterungen:** Männer sind mit Quadraten, Frauen mit Kreisen, Betroffene in schwarz, nicht Betroffene umrandet und Verstorbene durchgestrichen kodiert

## 7.6 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

### 7.6.1 Tabellen

|             |                                                                                                                                                         |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Tabelle 1:  | Parameter für den PROCAM-Score und zugeordnete Punktwerte                                                                                               |
| Tabelle 2:  | Risiko für akute koronare Ereignisse assoziiert mit jedem Score                                                                                         |
| Tabelle 3:  | Touch down-Programm zur Durchführung der PCR                                                                                                            |
| Tabelle 4:  | Agarosekonzentrationen und Fragmentlängentrennbereiche                                                                                                  |
| Tabelle 5:  | Phänotypisierungsdaten der Herzinfarkt-Großfamilien                                                                                                     |
| Tabelle 6:  | PROCAM-Score für die 23 ausgewählten Herzinfarkt-Patienten                                                                                              |
| Tabelle 7:  | Identifizierte Polymorphismen im <i>MEF2A</i> -Gen                                                                                                      |
| Tabelle 8:  | Häufigkeitsverteilung der Allele des (CAG) <sub>n</sub> -Repeat in Exon 12 von <i>MEF2A</i> bei Patienten mit Herzinfarkt und gesunden Kontrollpersonen |
| Tabelle 9:  | Genotyp-Frequenzen für den <i>MEF2A</i> -P279L-Polymorphismus                                                                                           |
| Tabelle 10: | Auflistung aller verwendeten Primer für die Sequenzierung des <i>MEF2A</i> -Gens                                                                        |
| Tabelle 11: | PROCAM-Score für alle Mitglieder der Herzinfarkt-Großfamilien                                                                                           |
| Tabelle 12: | Ergebnisse der <i>MEF2A</i> -Sequenzierung bei 23 Patienten aus den Herzinfarkt-Großfamilien                                                            |

### 7.6.2 Abbildungen

|            |                                                                               |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| Abb. 1:    | Darstellung eines durch Thromben verschlossenen Koronargefäßes                |
| Abb. 2:    | Nekrotisches Areal im Herzmuskel nach akutem Myokardinfarkt                   |
| Abb. 3:    | Stammbaum einer Herzinfarkt-Großfamilie                                       |
| Abb. 4:    | Schematische Darstellung eines PCR-Zyklus                                     |
| Abb. 5:    | Exemplarische Darstellung eines Agarosegels                                   |
| Abb. 6:    | Automatische DNA-Sequenzierung                                                |
| Abb. 7:    | Darstellung aller verwendeten <i>MEF2A</i> -Primer auf dem Agarosegel         |
| Abb. 8:    | Exemplarische Darstellung eines Elektropherogramms                            |
| Abb. 9-18: | DNA-Sequenzen <i>MEF2A</i> mit identifizierten Polymorphismen                 |
| Abb. 19:   | Darstellung des (CAG) <sub>n</sub> -Repeats in Exon 12 des <i>MEF2A</i> -Gens |
| Abb. 20:   | Allelische Diskriminierung für den P279L Polymorphismus in <i>MEF2A</i>       |
| Abb. 21:   | Darstellung des P279L-Polymorphismus in <i>MEF2A</i>                          |

## 8. Lebenslauf

Persönliche Daten: Iris Borwitzky,  
geb. 23.11.1980 in Hamburg, ledig

Anschrift: Rantzaustraße 102  
22041 Hamburg  
Tel.: +49(0)40-72967014  
E-mail: I.Borwitzky@gmx.de

Eltern: Rainer Borwitzky, geb. 11.11.1948 in Hamburg  
Beruf: Vorsitzender Richter am Landgericht Hamburg  
Barbara Borwitzky geb. Eckhoff, geb. 05.04.1951 in Hamburg  
Beruf: Medizinisch-technische Assistentin

Schulbildung: 1987-2000 Rudolf-Steiner-Schule HH-Nienstedten (Gesamtschule)  
Juni 2000 Abitur

Hochschulstudium: Oktober 2000 bis voraussichtlich Mai 2007  
Studium der Humanmedizin am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck

Physikum August 2002

1. Staatsexamen August 2003

2. Staatsexamen August 2005

Praktisches Jahr

Februar - Mai 2006 1. Tertial im Fach Innere Medizin in den Sana Kliniken Lübeck

Juni – September 2006 2. Tertial im Fach Chirurgie im Kantonsspital Aarau / Schweiz

Oktober 2006 – Januar 2007 3. Tertial im Wahlfach Neurologie an der Universitätsklinik Lübeck

3. Staatsexamen April 2007

## 9. Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. med. H. Schunkert herzlich für die freundliche Überlassung des Themas dieser Doktorarbeit, die hierfür gewährte großzügige Unterstützung sowie für die Benutzung der Laborräume der Med. Klinik II danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau PD Dr. rer. nat. J. Erdmann für ihre engagierte und tatkräftige Betreuung, die wissenschaftliche Anleitung bei der praktischen Durchführung dieser Arbeit und die Beratung und Unterstützung bei der Auswertung der Ergebnisse und Erstellung des Manuskripts. Ihre stets freundliche und aufmunternde Art haben mir in großem Maße geholfen, diese Dissertation zu erstellen.

In gleichem Maße danke ich Herrn Dr. med. B. Mayer und Herrn Dr. med. W. Lieb, die mir stets als Ansprechpartner bei allen inhaltlichen Fragen und Problemen zur Seite standen.

Mein Dank gilt ebenso Frau A. Götz für die Hilfestellung bei Fragen zur statistischen Auswertung.

Ganz besonders danke ich Frau A. Thiemig, Frau S. Wrobel, Frau P. Bruse und Herrn Dr. Z. Aherrarhou für die Einweisung und Unterstützung bei der praktischen Durchführung sowie die freundliche Hilfestellung bei Problemen im Laboralltag.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinem Freund S. Lefers bedanken, der mir bei der Anfertigung dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite stand. In gleicher Weise danke ich meinen Eltern, die mir durch ihre Unterstützung sowohl mein Studium als auch die Erstellung dieser Dissertation ermöglicht haben.