

**Aus der Medizinischen Klinik II
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. H. Schunkert**

**Bedeutung der Gene des Proteasoms und des Rel/Nuclear factor- κ B-Systems
für den Herzinfarkt**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Matthias Joachim Berndt
aus Lübeck

Lübeck 2010

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Jeanette Erdmann

2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. rer. nat.. Torsten Goldmann

Tag der mündlichen Prüfung: 11.01.2011

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 11.01.2011

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung und Fragestellung.....	1
1.1 Motivation für die Arbeit.....	1
1.2 Begriffserklärungen	1
1.3 Genetische Assoziationsstudien	3
1.4 Atherosklerose und KHK – Pathogenese des Herzinfarkts	4
1.5 Ubiquitin-Proteasom-System	6
1.5.1 Das Proteasom	6
1.5.2 Proteasom und Herzinfarkt.....	8
1.5.3 Das Rel/Nuclear factor-kappaB (NF-κB)-System.....	10
1.5.4 NF-κB und Herzinfarkt	12
1.6 Funktioneller SNP im <i>PSMA6</i> -Gen.....	13
1.7 Ziele der Arbeit.....	15
 II. Material und Methoden	 16
2.1 Internet-Datenbanken	16
2.2 Studienpopulationen	16
2.2.1 Deutsche Herzinfarktfamilienstudie 1 (GerMIFS I).....	17
2.2.2 Deutsche Herzinfarktfamilienstudie 2 (GerMIFS II)	18
2.2.3 KORA Survey 4	18
2.2.4 PopGen-Kontrollen.....	18
2.3 Molekulargenetische Methoden	19
2.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	19
2.3.2 Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System	19
2.3.3 Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0	22
2.4 Beschreibung der angewendeten Qualitätskriterien	23
2.4.1 „Minor allele frequency“ (MAF).....	23
2.4.2 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	23
2.4.3 Intensitätsplots für genotypisierte SNPs.....	24
2.5 Statistische Verfahren	25
2.5.1 Test auf Anpassung an Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.....	25
2.5.2 Test auf Trend.....	26
2.5.3 Berechnung der statistischen Trennschärfe	27
2.5.4 Imputation.....	28
2.6 Graphische Darstellung von SNPs	28
2.6.1 LD-Karten.....	28
2.6.2 Fancy plots.....	29
2.7 Replikation der Studie von Ozaki.....	30
2.7.1 SNP Auswahl.....	30
2.7.2 Genotypisierung	31
2.7.3 Qualitätskontrolle der Genotypisierung.....	33
2.7.4 Statistische Analyse.....	33
2.8 Hypothesen-bildende Studie zur Rolle des Proteasoms und NF-κB- Signaltransduktionswegs in der Pathogenese des Herzinfarkts.....	35
2.8.1 Multistage-Ansatz bei der Untersuchung eines Stoffwechselwegs.....	35
2.8.2 Vorgehen bei Hypothesen-bildenden Studien	35
2.8.4 Statistische Methoden.....	38

III. Ergebnisse	40
3.1 Genotypisierung von SNPs aus dem <i>PSMA6</i> -Gen	40
3.1.1 Qualitätskontrolle der Genotypisierung	40
3.1.2 Statistische Auswertung	42
3.2 Gene des Proteasom-Entzündungs-Signaltransduktionswegs	45
3.2.1 Repräsentation der Gene des Signaltransduktionswegs in Genotypisierungsdaten der Deutschen Herzinfarktfamilienstudien	45
3.2.2 Ergebnis der Untersuchung des Proteasom-Entzündungs-Signaltransduktionswegs	47
3.2.2.1 SNPs des <i>IKBKE</i> -Gens	48
3.2.2.2 SNPs des <i>PSMB8</i> -Gens	50
3.2.2.3 SNPs des <i>PSMD3</i> -Gens	51
3.2.3 Ergebnisse der Anfrage an WTCCC	52
IV. Diskussion	53
V. Zusammenfassung und Ausblick	59
VI. Literaturverzeichnis	60
VII. Anhang	67
7.1 Abkürzungsverzeichnis	67
7.2 Abbildungsverzeichnis	68
7.3 Tabellenverzeichnis	68
7.4 Tabellen und Graphiken	68
7.5 Verzeichnis der Internetdatenbanken	70
7.6 Labormaterialien und –geräte (Hersteller)	70
7.6.1 Geräte	70
7.6.2 Chemikalien	70
VIII. Danksagungen	71
IX. Lebenslauf	72

I. Einleitung und Fragestellung

1.1 Motivation für die Arbeit

Der Entzündung kommt in der Pathogenese der Atherosklerose und des Myokardinfarktes eine entscheidende Bedeutung zu. Das Ubiquitin-Proteasom-System ist maßgeblich in diesen entzündlichen Prozess involviert. Es ist u.a. zuständig für den Abbau von I κ B, einem Inhibitor von NF- κ B, welcher einen wichtigen Transkriptionsfaktor im Entzündungsprozess darstellt. Aktiviertes NF- κ B induziert die Transkription inflammatorischer Zytokine in eukaryoten Zellen und trägt somit den Entzündungsprozess.

Bis heute erfolgt die Identifizierung von „Hochrisiko“-Patienten für den Herzinfarkt durch die Bestimmung klassischer kardiovaskulärer Risikofaktoren, durch die allerdings nur etwa 50% des individuellen Risikos erklärt werden kann. Kenntnisse über genetische Risikofaktoren könnten helfen, Risikokollektive weiter einzugrenzen und für diese gezielt präventive Maßnahmen einzuleiten (37).

Innerhalb der letzten Jahre sind Kandidatengene für den Herzinfarkt gefunden worden, deren Genprodukte in den Entzündungsstoffwechsel eingebunden sind. Ozaki und Kollegen identifizierten in einer japanischen Population einen funktionellen „Single Nucleotide Polymorphism (SNP)“, der mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten des Herzinfarktes assoziiert ist (71).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist zunächst herauszufinden, ob dieser Effekt in einer großen Studie auch für deutsche Herzinfarktpatienten nachgewiesen werden kann. Darüber hinaus werden in einer Hypothesen-generierenden Studie weitere Polymorphismen innerhalb von Genen auf Assoziation mit dem Herzinfarkt in den sogenannten „Deutschen Herzinfarktfamilienstudien“ untersucht, die für das Proteasom und Proteine des NF- κ B-Stoffwechsels kodieren.

1.2 Begriffserklärungen

Bei der Erforschung der genetischen Grundlagen häufiger Erkrankungen spielen die „**Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)**“ eine wichtige Rolle. Als SNP bezeichnet man Positionen im Genom, an denen sich die Nukleotidsequenz von Individuen in nur einer Base unterscheidet. Ein solcher genetischer Polymorphismus besitzt per definitionem eine Häufigkeit von $\geq 1\%$. Beträgt sie $< 1\%$ spricht man von einer Mutation. Die auf über 10 Millionen geschätzte Anzahl an SNPs im humanen Genom lassen im Schnitt auf etwa

alle 300 Basenpaare einen Polymorphismus erwarten und machen einen Großteil der genetischen Diversität des Menschen aus. Viele der SNPs haben nur eine geringe Tendenz zum Auftreten von Mutationen und sind somit über Generationen stabil (66). Auf Grund des diploiden Chromosomensatzes existieren für einen SNP in autosomalen Zellen immer zwei Allele.

Inzwischen existiert im Internet eine frei zugängliche Datenbank des **Internationalen HapMap-Projektes**, die Informationen über humane genetische Sequenzvariation und damit über Millionen solcher Polymorphismen von Einzelbasen enthält. Auskunft über die Beziehung der SNPs untereinander gibt das **Linkage Disequilibrium (LD)**. Zwei polymorphe Allele befinden sich in LD oder auch Kopplungsungleichgewicht, wenn sie in einer Population miteinander korrelieren. Ein hohes LD bedeutet, dass eine Kombination von Allelen zweier SNPs überdurchschnittlich häufig gemeinsam vererbt wird. Dies ist auf Unterschiede in der Rekombinationsrate verschiedener chromosomaler Regionen während der Meiose zurückzuführen. Ist sie sehr stark ausgeprägt, spricht man von „recombination hot spots“. Als Maß für die Korrelation zwischen SNPs gilt der **LD-Koeffizient r^2** . Dieser beschreibt den Anteil der Beobachtungen, in denen die betrachteten SNPs gemeinsam auftreten bzw. den Anteil der Variation eines SNPs, die durch einen anderen erklärt werden kann. Mögliche Werte für r^2 bewegen sich zwischen $r^2 = 1$, bei dem die beiden Allelausprägungen stets gemeinsam vererbt werden, und $r^2 = 0$, bei der keine gemeinsame Vererbung stattfindet, wie z. B. an einem „recombination hot spot“ (94).

Der Begriff des **Haplotyps** beschreibt eine Kombination mehrerer Allelausprägungen innerhalb einer chromosomalen Region, die gemeinsam weiter vererbt wird. Innerhalb einer Population unterscheiden sich kurze Nukleotidsequenzen in Regionen mit geringer Rekombinationsrate nur an den wenigen Basenpositionen, an denen SNPs auftreten. Die Allele der Polymorphismen innerhalb der betrachteten Sequenz bezeichnet man als Haplotyp. Innerhalb einer bestimmten Sequenz existiert nur eine limitierte Zahl an Haplotypen, die den Großteil der dort vorhandenen Sequenzvariation beschreibt (94). Für diese Haplotypen können Frequenzen berechnet werden. Sind SNPs einer Region durch eine hohe LD miteinander korreliert, so spricht man von einem Haplotyp-Block (siehe Abbildung 1).

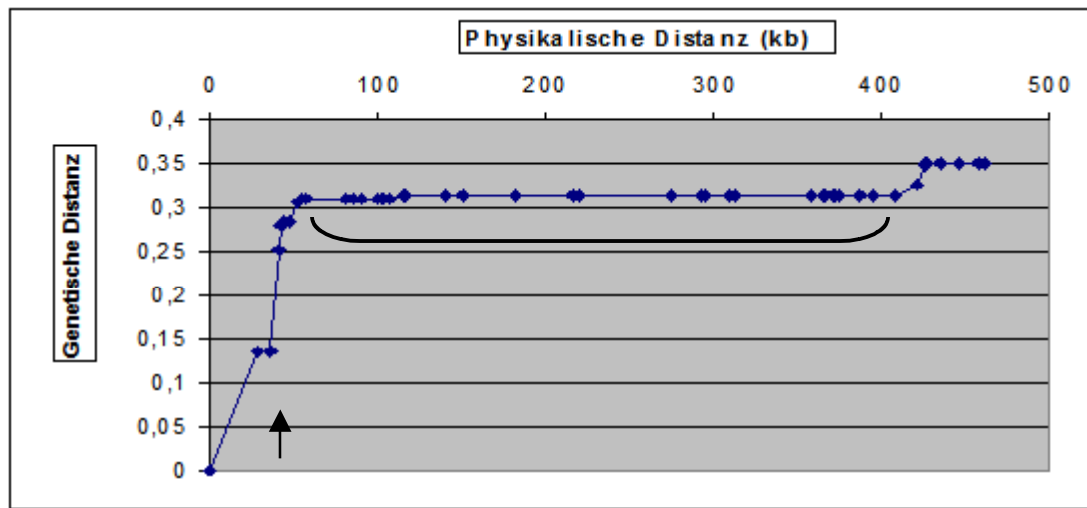


Abbildung 1: Haplotyp-Blöcke von PSMA6. Stufen im Diagramm stehen für Haplotyp-Blöcke innerhalb derer SNPs gemeinsam vererbt werden (Klammer). Diese existieren vor allem dort, wo eine geringe Rekombinationsrate zu finden ist. Sie werden durch „recombination hot spots“ voneinander getrennt (Pfeil) (94).

Kenntnisse über das Auftreten von LD und Haplotypen helfen bei der Auswahl von repräsentativen SNPs (tag SNPs). Ihre Genotypisierung gibt auch Aufschluss über Polymorphismen, die sich in hoher LD zum untersuchten Marker befinden und somit nicht selbst untersucht werden müssen.

1.3 Genetische Assoziationsstudien

Während auf Ebene der Nukleotidsequenz SNPs miteinander korrelieren, so können genetische Marker auch mit phänotypischen Merkmalen in Beziehung stehen. In Fall-Kontroll-Assoziationsstudien wird nach unterschiedlicher Allelfrequenz eines Markers (hier: SNP) in zwei Gruppen gesucht, die sich durch das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit eines Merkmals (hier: Erkrankung) unterscheiden. Lässt sich eine Assoziation nachweisen, so bestehen zwei Deutungsmöglichkeiten. Der untersuchte SNP könnte selbst mit der Erkrankung in kausaler Beziehung stehen. In diesem Fall spricht man von direkter Assoziation. Befindet sich der SNP jedoch nur in hoher LD mit dem eigentlich krankheitsauslösenden Marker, so handelt es sich um indirekte Assoziation. Ein gutes Maß für die Stärke der Assoziation ist die Odds Ratio (OR) (94).

Als Kandidatengenanalyse bezeichnet man die Untersuchung von Genen, für die Hinweise auf eine Beteiligung an der Pathogenese einer Erkrankung bestehen. In letzter Zeit haben genetische Assoziationsstudien durch erheblich verbesserte Genotypisierungsverfahren und die Erkenntnisse des internationalen HapMap-Projektes über die LD-Struktur des humanen Genoms eine völlig neue Dimension erreicht. Inzwischen werden genetische Marker

innerhalb des gesamten Genoms mittels genomweiter Assoziationsstudien (GWAs) hypothesenfrei auf Assoziation mit bestimmten Erkrankungen getestet. Im Rahmen des europäischen Cardiogenics-Projektes wurden so chromosomale Loci identifiziert, die für kardiovaskuläre Erkrankungen prädisponieren (81).

1.4 Atherosklerose und KHK – Pathogenese des Herzinfarkts

Atherosklerose (engl. atherosclerosis) ist eine entzündliche Erkrankung der arteriellen Gefäßwände, die verschiedene Stadien durchläuft und die Okklusion der betroffenen Gefäße mit daraus resultierender Ischämie und Infarzierung von Gewebe bewirken kann. Es sind vor allem die großen und mittleren Arterien vom elastischen und muskulären Typ betroffen, wie sie in der Hauptschlagader (Aorta) und in Organarterien zu finden sind. Die Atherosklerose manifestiert sich an verschiedenen Organsystemen, wo sie charakteristische Krankheitsbilder hervorruft. Am Gehirn können zerebrale Ischämien oder Schlaganfälle, an den inneren Organen viszerale Ischämien und Darminfarkte und an den Extremitäten eine periphere arterielle Verschlusskrankheit (paVK) sowie Gangrän die Folge sein. Atherosklerose an den Herzkranzarterien (Koronararterien) wird als koronare Herzkrankheit (KHK, engl. CAD: coronary artery disease) bezeichnet, die im Myokardinfarkt enden kann.

Zur Entstehung der Atherosklerose ist die „response-to-injury“-Hypothese allgemein anerkannt. Auslöser ist danach eine Funktionsstörung der innersten Schicht der Gefäßwand (endotheliale Dysfunktion). Als Ursache für die endotheliale Dysfunktion kommen hohe Spiegel an „Low density Lipoproteins (LDL)“ oder deren oxidierte Form, freie Radikale durch Rauchen und Diabetes, Bluthochdruck (arterieller Hypertonus) und turbulenter Blutfluss sowie erhöhte Konzentration von Homozystein im Blut in Frage.

Durch die initiale Schädigung des Endothels werden dessen Permeabilität verschlechtert und Adhäsionsmoleküle für die Leukozyten- und Thrombozytenadhäsion exprimiert. Zudem verschlechtern sich die antikoagulatorischen Eigenschaften der Gefäßinnenwand durch Expression von vasoaktiven Molekülen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Wird in diesem Stadium der auslösende Reiz nicht beseitigt, kommt es zur Bildung einer „intermediären Läsion“ durch Einwanderung und Proliferation von glatten Gefäßmuskelnzellen (engl. VSMC: vascular smooth muscle cells) aus den mittleren Gefäßschichten.

Im nächsten Stadium, dem „remodeling“, verdickt sich die arterielle Gefäßwand. Es entsteht eine entzündliche Reaktion, die von Monozyten aus dem Blut getragen wird. Monozyten werden z. B. von durch vaskuläre Zellen modifiziertem LDL chemotaktisch an den Ort der Läsion gelockt, dort in antigenpräsentierende Makrophagen umgewandelt und unter Einwirkung von Signalmolekülen wie dem „macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)“ zur Proliferation angeregt. Weitere Monozyten und auch T-Zellen werden durch Zytokine angezogen. Durch Aufnahme oxidierten LDLs (oxLDL) minimieren die Makrophagen zunächst die Effekte des modifizierten LDLs auf die Endothel- und Gefäßmuskelzellen. Dabei wandeln sie sich in „Schaumzellen“ um, werden aber durch das aufgenommene oxLDL zur Produktion weiterer inflammatorischer Zytokine (z. B. IL-1) angeregt. Diese Entzündungsmediatoren erhöhen die weitere Aufnahme von LDL in die atherosklerotische Läsion, indem sie u.a. die Expression des LDL-Rezeptors am Endothel und an der glatten Gefäßmuskulatur (VSMC) induzieren. Auf diese Weise wird die initiale Entzündungsreaktion weiter verstärkt.

Während weitere Entzündungszellen und VSMCs in die Läsion einwandern und dort proliferieren, kommt es zur Freisetzung von hydrolytischen Enzymen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren aus Makrophagen und Lymphozyten, wodurch sich eine fokale Nekrose entwickelt. Die VSMCs haben die Fähigkeit zur Bildung extrazellulärer Matrix (56), darunter auch Kollagen. Hierdurch wird der nekrotische Defekt zunächst gedeckt und es bildet sich eine fibröse Kappe.

In diesem fortgeschrittenen Stadium verliert die so entstandene Plaque durch Apoptose von Endothel, glatten Gefäßmuskelzellen und Makrophagen (56) an Stabilität. Glatte Gefäßmuskelzellen innerhalb atherosklerotischer Läsionen sind besonders anfällig für durch den Tumor-Suppressor p53 ausgelöste Apoptose (7). Experimentell konnte durch Erhöhung des p53-Spiegels die Apoptoserate dieser Zellen beschleunigt werden. Die Ausdünnung der fibrösen Kappe der Läsion und erhöhte Plaqueinstabilität waren die Folge (90).

Durch Freisetzung von Matrixproteasen (Kollagenasen, Elastasen) aus Makrophagen wird die schützende Bindegewebsschicht weiter ausgedünnt, sodass die atherosklerotische Plaque vor allem am nekrotischen Kern (56) und an ihren Randbereichen aufbricht.

Ist nun die für den Schutz vor Blutgerinnung notwendige endotheliale Schicht verletzt, kommen Thrombozyten in Kontakt mit Kollagen und weiteren Gewebsfaktoren. Dies führt zur Aggregation der Blutplättchen und Bildung eines expandierenden Thrombus. Daraus resultiert das klinische Bild des akuten Koronarsyndroms bzw. des Myokardinfarktes.

Potenziell gefährliche Läsionen sind oft angiographisch nicht nachweisbar, da sie häufig nicht durch ihren langsam zunehmenden okklusiven Effekt, sondern durch das plötzliche Aufbrechen mit nachfolgender Thrombusbildung in Erscheinung treten. In diesem Fall kommt es zum klinischen Bild des plötzlichen Myokardinfarktes, der mit einer hohen Mortalität behaftet ist.

1.5 Ubiquitin-Proteasom-System

Das Ubiquitin-Proteasom-System ist in viele physiologische Prozesse eingebunden. Als zentrale Säule der Degradation zellulärer Proteine übertrifft es bei weitem den intrazellulären Proteinabbau durch Proteasen und Lysosomen. Eine wichtige Funktion ist der Abbau oxidierter Proteine, die im Zellzyklus oder durch freie Radikale bei oxidativem Stress entstehen (33). Wilk und Orlowski (92) isolierten 1980 erstmals einen multikatalytischen Proteinasekomplex, der dem Proteasom entspricht (33).

Das System besteht aus dem Proteasom, einem Enzym, an dessen katalytischem Zentrum die Proteinspaltung stattfindet, sowie dem Markerprotein Ubiquitin, durch welches die abzubauenen Proteine gekennzeichnet werden. Auf diese Weise markierte Proteine werden durch spezifische Regionen am Proteasom erkannt und erhalten dann Zugang zum aktiven Zentrum. Oxydierte Proteine, wie sie bei oxidativem Stress in Zellen entstehen, können aber auch ohne Ubiquitin-Markierung direkt vom Proteasom abgebaut werden (84).

Auf diesem Wege werden etwa 80-90% der intrazellulären Proteine wieder zu Aminosäuren gespalten. Unter den vielen Substraten des Ubiquitin-Proteasom-Systems befinden sich auch der Transkriptionsfaktor NF- κ B (39).

1.5.1 Das Proteasom

Das multimere eukaryotische Proteasom besteht aus zwei Proteinkomplexen, einem zentralen 20S- und sowie dem 19S-Proteasom. Der 20S-Komplex, der die zur Proteolyse befähigten aktiven Zentren enthält, ist aus vier Ringen mit jeweils sieben Untereinheiten zusammengesetzt. In Publikationen wird heute in der Regel die Nomenklatur von Baumeister verwendet (5). Danach werden die Moleküle der zwei inneren Ringe als β_{1-7} , die der beiden äußeren als α_{1-7} bezeichnet.

Die proteolytische Aktivität ist an die β -Untereinheiten β_1 (Kaspase-ähnlich), β_2 (Trypsin-ähnlich) und β_5 (Chymotrypsin-ähnlich) gebunden. Die β -UE werden zu beiden Seiten von

jeweils einem Ring aus α -UE flankiert. Deren Aufgabe liegt im „Gating“, also der Regulation des Zuganges zum Proteasom im nicht aktivierten Zustand. Während der Aktivierung des Proteasoms kommt es zu einer Konformationsänderung innerhalb des α -Ringes, sodass der Zugang zu den katalytischen β -Untereinheiten freigegeben wird (20, 32).

Eine weitere Kontrolle des Proteasoms erfolgt durch den regulatorischen 19S-Komplex. Die Untereinheiten werden nach ATPase- und Non-ATPase-Aktivität unterteilt. Rpt₁₋₆ (Regulatory particle triple-A protein) und Rpn₁₋₁₂ (Regulatory particle non-ATPase protein) sind nach der Größe ihres Molekulargewichts durchnummeriert (24).

Der 19S-Komplex ist aus zwei Untereinheiten („Base“ und „Lid“) zusammengesetzt. Die „base“ besteht aus den sechs ATPasen (Rpt₁₋₆) sowie den zwei größten Non-ATPasen (Rpn₁₋₂). Ihre Funktion ist die

- ATP-abhängige Entfaltung von zu degradierenden Proteinen
- Aktivierung und Konformationsänderung innerhalb der α -UE des 20S-Proteasoms.

Für die Identifizierung abbauwürdiger Proteine ist die „Lid“-UE zuständig. Über Rpn₁₀ wird die Polyubiquitinierung von Proteinen detektiert, Rpn₁₁ ist zur Deubiquitinierung befähigt (5, 20).

Abbildung 2 zeigt den Aufbau des humanen 26S-Proteasoms (75).

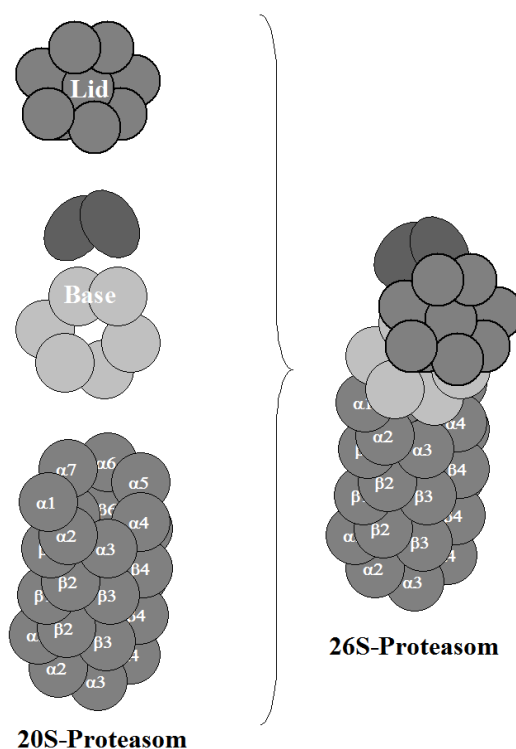


Abbildung 2: Das humane 26S-Proteasom setzt sich aus dem katalytischen 20S-Proteasom und dem regulatorischen 19S-Komplex zusammen. Letzterer besteht aus dem „Lid“, das abzubauen Proteine anhand ihrer Polyubiquitinkette erkennt, sowie der „Base“, die für die Interaktion mit dem 20S-Proteasom und Entfaltung von abzubauen Proteinen zuständig ist (umgezeichnet nach (75)).

1.5.2 Proteasom und Herzinfarkt

Seit einigen Jahren ist die Rolle des Proteasoms in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen in den Fokus der Wissenschaft gerückt. Bulteau et al. fanden eine proteasomale Dysfunktion in Form verminderter Proteaseaktivität während myokardialer Ischämie (14). In weiteren Studien konnte der Reperfusionsschaden nach experimenteller Okklusion der LAD durch Proteasominhibition in Schweinen reduziert werden. Neben geringerer Infarktgröße und besserer myokardialer Funktion waren die Freisetzung von Kreatin-Kinase und Troponin I sowie die NF- κ B-Aktivierung geringer als bei den Kontrolltieren (76). Neben der positiven Wirkung im Rahmen des myokardialen Reperfusionsschadens scheint die Hemmung des Proteasoms Einfluss auf den Verlauf vieler anderer inflammatorischer (22) aber auch maligner hämatologischer Erkrankungen sowie solider Tumore zu nehmen (65). Darunter finden sich Asthma, Multiple Sklerose und Psoriasis sowie das Multiple Myelom, Lymphome, Leukämie sowie Pankreas- und Kolonkarzinome. Die Hauptmechanismen scheinen in der verminderten Aktivierung des NF- κ B-Signaltransduktionswegs und des reduzierten Abbaus des Apoptoseinduktors p53 zu liegen.

Herrmann et al. fanden in einer Studie an Patienten nach letal verlaufenem Herzinfarkt vermehrt mit Ubiquitin markierte Proteine sowie CD3-positive T-Zellen und neointimale Zellen an Regionen von Koronararterien, die lichtmikroskopisch als atherosklerotisch eingestuft wurden. Ein besonders starker Ubiquitin-Nachweis war in Proben aus der fibrösen Kappe der Läsion möglich. An dieser Stelle waren auch der Apoptoseinduktor p53 und apoptotische Zellen vermehrt nachweisbar. Diese Beobachtung stützt die These, dass dem Ubiquitin-Proteasom-System eine Bedeutung unter anderem im fortgeschrittenen Stadium der Atherosklerose bei der Entwicklung der instabilen atherosklerotischen Läsion zukommt (40). Ein Substrat des Proteasoms ist nämlich p53 (39). Verminderte Proteasomaktivität könnte über eine verlängerte Halbwertszeit von p53 den Zelltod begünstigen und die Entwicklung der instabilen atherosklerotischen Plaque im fortgeschrittenen Stadium der Atherosklerose fördern (40), da gerade hier die Gefäßmuskulatur sensibel für durch p53 vermittelte Apoptose ist (7). Im Atherosklerosemodell am Schwein machte die Arbeitsgruppe um Herrmann allerdings die vermehrte Entstehung von Ubiquitin-Protein-Konjugaten unter oxidativem Stress und nicht eine verminderte Proteasomaktivität als Ursache für den starken Nachweis von Ubiquitin aus (41).

Es zeigte sich, dass oxidativer Stress die proteasomale Aktivität steigert (21), und die Inhibition des Proteasoms einen Anstieg von Parametern oxidativen Stresses in den Zellen bewirkt. Damit sind diese anfälliger für externe schädigende Einflüsse (60). Dies führt zu einer erhöhten Menge an freien Radikalen in der Zelle sowie vermehrten Protein- und DNS-Schäden (61).

Untersuchungen an Koronararterien von Schweinen mit experimenteller Hypercholesterinämie belegen die Bedeutung dieses Prozesses in atherosklerotischen Plaques. Die Verabreichung eines Proteasom-Inhibitors bewirkte eine Anhäufung ubiquitinerter und oxidierten Proteine in der Plaque, Makrophagen-Akkumulation und Schaumzellbildung sowie die Erhöhung des Intima-Media-Verhältnisses, eines frühen Markers für Atherosklerose. Die Makrophagen-Akkumulation korrelierte mit einer signifikant höheren Expression von vaskulären Adhäsionsfaktoren wie VCAM-1 und E-Selektin, deren Expression durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B reguliert wird (42).

Beim Abbau oxidierten zellulärer Proteine, darunter auch oxidiertes LDL (oxLDL), ist das Proteasom von entscheidender Bedeutung. Oxidativer Stress und oxidierte Proteine sind für die Zelle ab einer bestimmten Konzentration potentiell toxisch (8, 23, 34). Setzt man Endothelzellen in vitro einer nur geringen, unschädlichen oxLDL-Konzentration aus, sind keine toxischen Effekte zu beobachten. Die Zugabe eines Proteasom-Inhibitors führt in diesen Zellen jedoch nach kurzer Zeit zur Induktion der Apoptose, wie sie auch im Komplikationsstadium der Atherosklerose beobachtet wird. Dies legt eine Beteiligung des Proteasoms auch an der Abwehr von oxLDL-induzierter Zytotoxizität nahe (89).

Die Auswirkungen der experimentellen Proteasominhibition auf die Koronargefäße zeigen, dass eine veränderte Aktivität des Ubiquitin-Proteasom-Systems bei der Entstehung und Progression atherosklerotischer Läsionen eine Rolle spielen könnte. Einen möglichen pathophysiologischen Mechanismus für die Beteiligung des Proteasoms an der Entstehung der Atherosklerose zeigt Abbildung 3.

Polymorphismen innerhalb von beteiligten Genen könnten über veränderte Genexpression oder Beeinflussung der Proteasom-Aktivität Auswirkungen auf koronararterielle Zellen oder Entzündungszellen haben und damit die Entstehung der KHK und des Myokardinfarktes begünstigen.

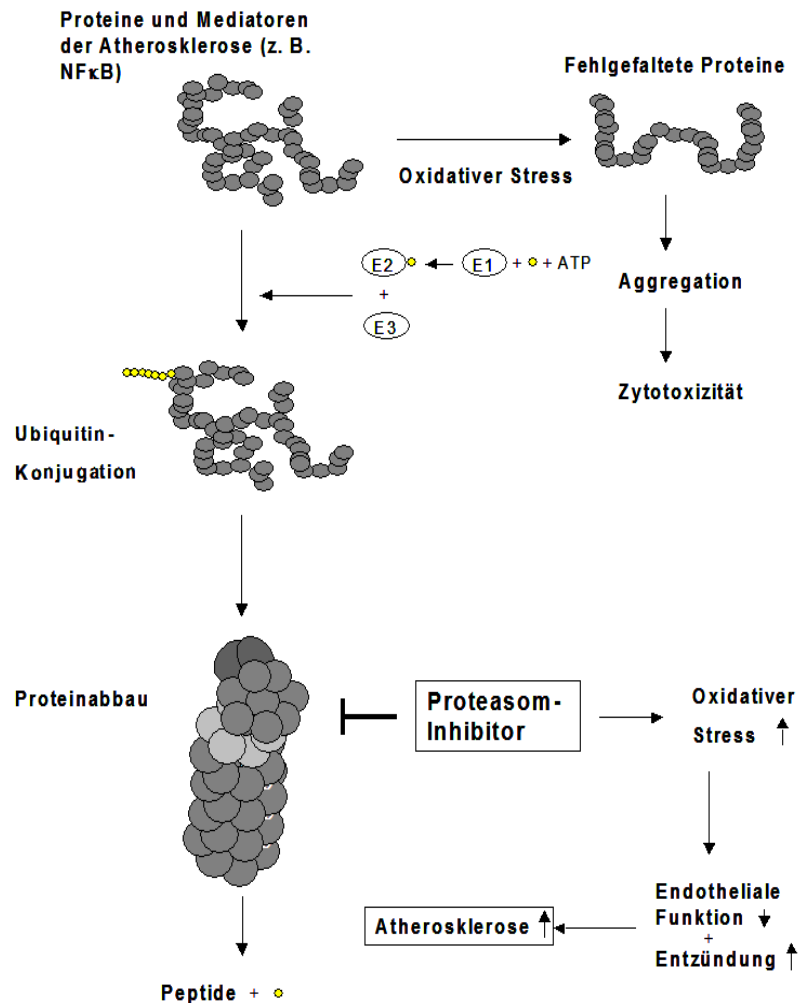


Abbildung 3: Das Ubiquitin-Proteasom-System in der Pathogenese der Atherosklerose (nach ((28)). Zellmediatoren, die eine Rolle in der Atherosklerose spielen, und oxidierte Proteine werden über das ubiquitinaktivierende Enzym (E1), das Ubiquitin-Trägerprotein (E2) und die Ubiquitin-Protein Ligase (E3) mit Ubiquitinmolekülen konjugiert. Die ubiquitinierten Proteine werden durch das 26S-Proteasom hydrolysiert. Durch chronische Hemmung des Proteasoms erhöht sich der oxidative Stress, wodurch vermehrt Proteine oxidiert und die Endothelfunktion behindert wird. Entzündungsprozesse führen zur Progression der Atherosklerose. Übersteigt die Menge der oxidierten Proteine die Abbaukapazität des Proteasoms, kommt es zur Bildung zytotoxischer Proteinaggregate.

1.5.3 Das Rel/Nuclear factor-kappaB (NF-κB)-System

Die Transkriptionsfaktoren der Rel/Nuclear factor kappa B (NF-κB)-Familie wurden zunächst als Regulatoren der Genexpression von Immunglobulin-κ-Leichtketten in B-Zellen beschrieben, die durch bakterielle Lipopolysaccharide induziert werden können (83). Es zeigte sich aber, dass es sich nicht nur um einen einzelnen Faktor, sondern um eine ganze Familie von Transkriptionsfaktoren handelt. Diese lässt sich in zwei Subgruppen einteilen: Die NF-κB-Gruppe umfasst NF-κB1 und NF-κB2, zwei Moleküle, die jeweils als inaktive Vorstufe p105 bzw. p100 synthetisiert und dann durch das Ubiquitin-Proteasom-System mittels limitierter Proteolyse zu den aktiven Formen p50 bzw. p52

gespalten werden (30, 72, 74). Die Rel-Gruppe besteht aus den Molekülen c-Rel, RelA (p65) und RelB (74).

Grundsätzlich bilden Transkriptionsfaktoren dieser Familie Homo- oder Heterodimere, die häufig nur kurz als NF- κ B bezeichnet werden. Sie liegen in praktisch allen Körperzellen vor (53). Eine Auswahl an möglichen Dimeren und ihre Fähigkeit zur spezifischen Expression von Zielgenen zeigt Tabelle 1 (15).

Rel Protein	Dimerisationspartner	Ausgewählte Zielgene
RELA	RELA--RELA	<i>IL8, ICAM1</i>
	RELA--p50	<i>IKBA, IL8, IL6, TNFa, GM-CSF</i>
	RELA--c-Rel	<i>IL2Ra, MCP1</i>
c-REL	c-REL--c-REL	<i>IL8</i>
	c-REL--p50	<i>IL2Ra</i>
p50	p50--p50	<i>TNFa, IL6</i>

Tabelle 1: Zielgene bestimmter NF- κ B-Dimere: *IL* (Interleukin), *ICAM1* (intercellular adhesion molecule-1); *TNFa* (tumor necrosis factor a); *GM-CSF* (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor); *IL2Ra* (interleukin-2-receptor-a); *MCP1* (monocyte chemoattractant protein-1); (nach (15)).

Kristallographisch gut erforscht ist die Interaktion von I κ B α mit dem NF- κ B1/RelA-Heterodimer (p50/p65), welches u.a. in der glatten Gefäßmuskulatur nachgewiesen wurde (10). Zunächst erkennt I κ B α die „Rel-homology-domain“ an den NF- κ B –Komplexpartnern und bindet dann so an das Heterodimer, dass die NLS-Region (engl. nuclear localisation site) von RelA (p65) blockiert wird. Zusammen mit einer Konformationsänderung am RelA- (p65-) Molekül sowie der Inhibition der basischen DNS-Bindungsdomäne durch eine saure Sequenz am I κ B α (PEST-Domäne: Prolin-, Glutamat-, Serin-, Threonin-reiche Region) wird verhindert, dass NF- κ B an die DNS bindet (49). Es wurde gezeigt, dass eine Veränderung der PEST-Region, z. B. durch Phosphorylierung, Einfluss auf die Stärke des inhibitorischen Effekts von I κ B α hat (67).

Die Translokation des inaktiven NF- κ B1/RelA/I κ B α -Komplexes in den Zellkern findet ständig statt. Eine „nuclear export sequence“ (NES) am I κ B α sorgt allerdings für den Rücktransport des Komplexes ins Cytosol. Auf diese Weise entsteht ein Gleichgewicht, bei dem der größte Anteil der Komplexe im Cytosol lokalisiert ist (48, 51).

Auf äußere Reize wie UV-Bestrahlung, oxidiertes LDL (oxLDL), Cytokine, bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) oder Viren reagiert die Zelle mit Aktivierung der I κ B-Kinase (IKK). Diese setzt sich aus den katalytischen Untereinheiten IKK α , IKK β sowie der regulatorischen IKK γ (NEMO: NF- κ B essential modifier) (58) zusammen. Die Kinase

phosphoryliert das inhibitorische I κ B, wodurch das Molekül für den Ubiquitin-Ligase-Komplex markiert wird (12, 74). Dieser hängt dem Protein nun schrittweise Ubiquitinmoleküle an. Die so entstehende Polyubiquitinkette wird von einer regulatorischen Untereinheit des Proteasoms erkannt, sodass I κ B proteolysiert wird. Von seinem Inhibitor befreit kann jetzt NF- κ B in den Zellkern gelangen und dort seine proinflammatorische Wirkung entfalten. Zu den exprimierten Genprodukten gehören Zelladhäsionsmoleküle (VCAM-1, ICAM-1, E-Selektin), hämatologische Proliferationsfaktoren (M-CSF, GM-CSF, G-CSF), Cytokine (IL-1, IL-8, INF- β , TNF α), Akute-Phase-Proteine (Angiotensinogen, Komplementfaktoren), Metalloproteinasen (MMP-2, MMP-9), Transkriptionsfaktoren sowie deren Inhibitoren (p105, I κ B α). Einige dieser Moleküle sind bereits für ihren Einfluß auf die Entstehung von Atherosklerose bekannt (80).

Neben dem Abbau von I κ B gibt es eine weitere Verbindung zwischen dem Ubiquitin-Proteasom-System und dem NF- κ B-Signaltransduktionsweg, nämlich die Ubiquitin-abhängige Prozessierung der NF- κ B Vorläuferproteine p105 und p100 zu den aktiven Untereinheiten p50 (72) und p52 (39).

1.5.4 NF- κ B und Herzinfarkt

Es sind bereits einige Assoziationen von Polymorphismen innerhalb der *NF- κ B*- sowie *I κ B*-Gene mit verschiedenen inflammatorischen Erkrankungen beschrieben worden. Diese umfassen entzündliche Darmerkrankungen (Colitis Ulcerosa, M. Chron), Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises (Rheumatoide Arthritis, systemischer Lupus erythematosus, Psoriasis-Arthritis (21)), Diabetes mellitus Typ I (36), Multiple Sklerose, Zöliakie, Morbus Parkinson und die Prädisposition für verschiedene Karzinome sowie das Multiple Myelom (87).

Für den Herzinfarkt sind genetische Polymorphismen ermittelt worden, die in der Pathophysiologie der Entzündungsreaktion bedeutsam sind. So war das Risiko für einen akuten Myokardinfarkt bei den Trägern des selteneren Allels eines Polymorphismus im Promotor des *Interleukin-6*-Gens (*IL-6*) in einer nordeuropäischen Population geringer als bei den Träger des häufigeren Allels (57). Bei der Untersuchung von acht am Entzündungsstoffwechsel beteiligten Genen (*IL-1 β* , *IL-6*, *CRP*, *IL-10*, *IL-18*, *LT- α* , *TNF- α* , *LT- β*) konnte allerdings nur eine Assoziation eines Polymorphismus im *IL-18*-Gen mit dem Myokardinfarkt nachgewiesen werden (9). Ein erhöhtes Risiko für das Auftreten des Herzinfarktes

zeigte sich ebenfalls für zwei Polymorphismen im *Lymphotoxin- α* -Gen (70) und einen Haplotyp im *Metalloproteinase-9*-Gen (*MMP-9*) (46).

Weiterhin ist auch der pathophysiologische Einfluss von NF- κ B auf die Entstehung der Atherosklerose untersucht worden. Schon seit einigen Jahren ist die Präsenz von aktiviertem NF- κ B in atherosklerotischen Läsionen bekannt. Brand et al. fanden erstmals aktiviertes NF- κ B in fibrotisch verdickter Intima und atheromatösen Regionen sowie in glatten Muskelzellen, Makrophagen und endothelialen Zellen. Im Gegensatz dazu wurde in Gefäßen, die nicht von Atherosklerose betroffen waren, nur eine geringe NF- κ B-Aktivität nachgewiesen (11). In einem Kaninchen-Modell akzellerierter Atherosklerose durch Endothelverletzung und atherogene Diät wurde bei den Versuchs- im Vergleich zu den Kontrolltieren eine siebenfach erhöhte NF- κ B-Aktivität festgestellt (38). In Tierversuchen an Schweinen mit cholesterinreicher Diät konnten Wilson et al. in Regionen von Koronararterien, die eine beginnende intimale Proliferation aufwiesen, die aktivierte Form von NF- κ B vermehrt nachweisen (93).

Der positive Einfluss von NF- κ B-Inhibition auf die Atherosklerose konnte ebenfalls im Tiermodell gezeigt werden. Im Mausmodell der Atherosklerose durch Apoprotein E- und LDL-Rezeptor-Knockout (apoE/LDLR-Knockout) waren die atherosklerotischen Läsionen bei Tieren, denen zu einer Atherosklerose-fördernden Diät zusätzlich ein Inhibitor von NF- κ B gefüttert wurde, signifikant kleiner als bei den Kontrolltieren (50). Derselbe Effekt wurde auch bei apoE-Knockout-Mäusen beobachtet, denen Lipopolysaccharide (LPS; Endotoxine aus der Wand gramnegativer Bakterien) als chronisch-inflammatorischer Reiz verabreicht wurden (19). Alleinige Injektion von LPS verstärkte die Bildung atherosklerotischer Läsionen. Bei zusätzlicher Applikation eines NF- κ B-Inhibitors war die Läsionsgröße im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant kleiner.

Die Erkenntnisse aus diesen Studien legen eine Bedeutung des NF- κ B-Signaltransduktionswegs bei der Entstehung der Atherosklerose nahe. Viele der Zielgene von NF- κ B sind von Relevanz für die Pathophysiologie der Gefäßwand, darunter Cytokine, Chemokine und Adhäsionsmoleküle (16).

1.6 Funktioneller SNP im *PSMA6*-Gen

Im Jahr 2006 genotypisierten Ozaki et al. 450 japanische Herzinfarktpatienten und 450 Kontrollprobanden auf Polymorphismen in den Genen, die für die proteasomalen Unter-

einheiten kodieren. Innerhalb dieser Regionen seien 169 SNPs mit einer „minor allele frequency“ (MAF) $> 10\%$ in der Datenbank des International HapMap Projektes identifiziert worden, durch die die meisten Haplotypen der Gene der Untereinheiten des Proteasoms abgedeckt gewesen seien. Von diesen wurden tagSNPs mit einem r^2 -Wert $> 0,8$ ausgewählt, durch die $> 90\%$ der Allele in den jeweiligen Genregionen abgedeckt gewesen seien. Es wurde eine signifikante Assoziation eines SNPs (rs1048990, Exon 1 – 8C/G) in der 5'-UTR (engl. untranslated region) des Exon 1 der $\alpha 6$ -Untereinheit des Proteasoms im *PSMA6*-Gen mit dem Herzinfarkt entdeckt ($p < 0,01$).

In einer Replikationsstudie durch Genotypisierung von 2.592 bzw. 867 Herzinfarktpatienten und 2.851 bzw. 1.104 Kontrollprobanden wurde dieses Ergebnis bestätigt. Es stellte sich heraus, dass der SNP rs1048990 ein unabhängiger Risikofaktor für den Herzinfarkt in der japanischen Population ist. Das Chancenverhältnis (Odds Ratio) als Maß für die Effektgröße, bei vorhandenem G-Allel am Herzinfarkt zu erkranken, betrug 1,21.

Bei der Untersuchung der biologischen Auswirkungen des Polymorphismus wurde für das seltenere krankheitsfördernde G-Allel eine 1,5- bis 1,7-fach erhöhte Transkription des *PSMA6*-Gens beobachtet. In einem weiteren Experiment unter Verwendung von siRNA (short interfering RNA) zur Suppression der Transkription von *PSMA6* und damit der Biosynthese der proteasomalen $\alpha 6$ -Untereinheit konnte eine ausbleibende NF- κ B-Aktivierung u.a. in koronararteriellen Endothelzellen gezeigt werden. Dies macht die möglichen Auswirkungen einer veränderten Proteasom-Aktivität auf den Entzündungsstoffwechsel deutlich. Ozaki et al. resümierten, eine höhere *PSMA6* Expression, wie sie beim G-Allel des SNPs rs1048990 auftrat, könne über den Abbau von I κ B α und die daraus resultierende Aktivierung von NF- κ B zur Auslösung von Entzündungsprozessen und der Pathogenese des Herzinfarktes beitragen (71).

In einer Validierungsstudie in einer weiteren japanischen Population konnten Takashima et al. die Beobachtung von Ozaki et al. allerdings nicht replizieren. In der Studie an 433 Herzinfarktpatienten und 2.186 Kontrollpersonen zeigte sich keine Assoziation des untersuchten SNPs 1048990 (C/G⁸) mit dem Herzinfarkt, allerdings fand sich ein erhöhtes mittleres Intima-Media-Verhältnis, bei dessen Entstehung der Polymorphismus eine Rolle spielen könnte (88).

Während unserer Untersuchung der Rolle des Polymorphismus im *PSMA6*-Gen in einer deutschen Population wurden die Ergebnisse von Sjakste et al. aus einer britischen Population publiziert. Auch hier konnte keine Assoziation mit dem Herzinfarkt nachgewiesen

werden. Eine weitere Studie an der lettischen Bevölkerung ergab allerdings eine signifikant höhere Frequenz des selteneren G-Allels bei Patienten mit Nicht-Insulin-pflichtigem Diabetes mellitus (engl. non insulin-dependent diabetes mellitus, NIDDM) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Haplotyp C⁻¹¹⁰/G⁻⁸ war im Vergleich zu C⁻¹¹⁰/C⁻⁸ mit einem höheren Risiko für NIDDM behaftet (OR 2,5; 95% KI [1,2-5,0]; p = 0,01) (85). Ein Einfluss des Proteasoms auf die Insulinaktivität ist bereits vorher beschrieben worden (79). Bennett et al. gelang in einer Untersuchung von 6946 Myokardinfarktpatienten und 2720 Kontrollprobanden aus Großbritannien ebenfalls keine Replikation der Ergebnisse von Ozaki. Eine zusätzlich durchgeführte Metaanalyse aller bis zu dem Zeitpunkt publizierten Daten zu dem Thema unter Einbezug auch der initialen Hypothesen-bildenden Studie von Ozaki et al. ergab selbst bei Annahme verschiedener genetischer Modelle keine signifikante Assoziation mit dem Herzinfarkt (6).

Für eine Bewertung der Bedeutung dieses Polymorphismus fordern Bennett et al. weitere (Meta-)Analysen mit sehr großen Fall- und Kontrollgruppen mit jeweils bis zu 10.000 Teilnehmern. Prinzipiell messen sie dem GG-Genotyp in der europäischen Bevölkerung aber auf Grund seiner niedrigen Prävalenz nur eine geringe Bedeutung zu.

1.7 Ziele der Arbeit

Da der Einfluss eines häufigen Allels auf die Pathogenese des Myokardinfarktes relativ klein zu sein scheint und Assoziationsstudien zu vielen falsch positiven Ergebnissen führen, ist eine Validierung dieser Studien nötig. Bisher ist keine Studie veröffentlicht worden, in der die Rolle des SNPs rs1048990 in der deutschen Population untersucht worden ist. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist deshalb herauszufinden, ob der in der japanischen Population nachgewiesenen Assoziation dieses Polymorphismus mit dem Herzinfarkt in der Deutschen Herzinfarktfamilienstudie eine Bedeutung zu kommt.

Weiterhin wollen wir in einem zweiten Schritt der Frage nachgehen, ob SNPs aus Genen des Proteasom-Entzündungs-Signaltransduktionswegs mit dem Herzinfarkt assoziiert sein könnten. Dieser Stoffwechselweg war von Ozaki et al. als mögliche pathophysiologische Grundlage für die gefundene Assoziation des SNPs rs1048990 aus dem *PSMA6*-Gens mit dem Myokardinfarkt benannt worden. Eine Vielzahl von Studien deutet auf eine mögliche Beteiligung dieses Signalwegs an der Entstehung und Progression der Atherosklerose hin (11, 16, 21, 28, 38-40, 42, 50, 60, 61, 89, 93). Denkbar sind Polymorphismen in Promotor-, Exon- oder Intronregionen der Gene, die über eine veränderte Genexpression oder durch einen Aminosäureaustausch Änderungen in der Proteinaktivität bewirken könnten.

II. Material und Methoden

2.1 Internet-Datenbanken

Das **Internationale HapMap Projekt** wurde 2002 gestartet und stellt Daten zu genomweiter humaner Sequenzvariation bereit. Diese stammen aus der systematischen Genotypisierung ausgewählter SNPs von 270 Referenzprobanden aus vier ethnisch verschiedenen Populationen (66). Eine dieser Populationen besteht aus Individuen mit europäischen Wurzeln (CEU). Mit der zweiten Phase des Projekts sind die Allelfrequenzen von 25-35% der geschätzt über 10 Millionen SNPs innerhalb des humanen Genoms bestimmt und lange Segmente hoher LD identifiziert worden. Die SNP-Dichte des HapMap-Projekts in Phase II beträgt etwa einen SNP pro 1000 Basenpaare (18). Außerdem wurden Angaben zur Häufigkeitsverteilung von Haplotypen in den Populationen und der Lokalisation von „recombination hot spots“ gemacht (17).

Auf der Homepage des National Center of Biotechnology Information (**NCBI**) sind über die Datenbanken **ENTREZ GENE** und **dbSNP** detaillierte Informationen zu Genen und SNPs zu finden (91).

Das Online-Portal **SNPper** kombiniert die Daten von dbSNP mit denen vom „human gene browser“ der University of South California. Es lassen sich Informationen über die Lokalisation von SNPs (Exon/Intron/Promoter/ect.) bzw. Genen, Allelfrequenzen und etwaigen Aminosäureaustausch eines SNPs (funktioneller SNP) gewinnen. Eine hohe Qualität der Daten wird durch Abgleich der SNP-Positionen, -Bezeichnungen und -Allele zwischen den beiden Quellen gewährleistet (78). Für die graphische Darstellung von SNPs in bestimmten chromosomalen Regionen empfiehlt sich der **UCSC Genome Browser** (55). Es lassen sich auch Informationen aus anderen Datenbanken in die Abbildungen des Genome Browsers integrieren.

Eine Übersicht über Stoffwechselwege gewährt die **Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)** (52).

2.2 Studienpopulationen

Bei der Durchführung genetischer Assoziationsstudien zur Identifizierung von Kandidatengenen für Erkrankungen wie den Herzinfarkt, geht man mehrstufig vor. In initialen Untersuchungen wird ein Studiendesign gewählt, bei dem der Effekt einer genetischen Variante am besten zur Geltung kommt. Gut geeignet hierfür sind Fall-Kontroll-Studien, bei denen

der Erkrankungsstatus der Teilnehmer bereits bekannt ist. Darüber hinaus können die betroffenen Patienten nach Kriterien ausgewählt werden, die auf eine genetische oder familiäre Ursache der Erkrankung hinweisen. Darunter fallen ein früher Erkrankungsbeginn oder eine positive Familienanamnese. Auf diese Weise lässt sich der Anteil der Patienten mit potentiell krankheitsfördernden Sequenzvarianten in der Studienpopulation erhöhen (94). Potentielle Effekte können so leichter aufgedeckt werden. Im Folgenden sind die in unseren Studien untersuchten Kollektive beschrieben. Alle Teilnehmer gaben ihr schriftliches Einverständnis zur genetischen Untersuchung ihrer Blutproben.

2.2.1 Deutsche Herzinfarktfamilienstudie 1 (GerMIFS I)

Für die Deutsche Herzinfarktfamilienstudie 1 (GerMIFS I) wurden im Zeitraum von 1997 bis 2000 durch Studium von über 200.000 Krankenakten an kardiologischen Rehabilitationszentren innerhalb Deutschlands Index-Patienten mit familiär gehäuften Herzinfarkt identifiziert. Diese hatten vor dem 60. Lebensjahr einen Herzinfarkt erlitten (13, 25). Wenn mindestens ein Geschwister vor dem 70. Lebensjahr ebenfalls von einem Herzinfarkt oder schwerer Koronarer Herzkrankheit (definiert als PTCA oder Z. n. koronararterieller Bypass-Op) betroffen war, wurde die Kernfamilie (Index-Patient, noch lebende Eltern sowie alle betroffenen oder nicht betroffenen Geschwister) kontaktiert und um Teilnahme an der Studie gebeten. Alle Studienteilnehmer beantworteten einen standardisierten Fragebogen über ihre Krankheitsgeschichte, kardiale Risikofaktoren, Medikamenteneinnahme und stattgefunden kardiovaskuläre Ereignisse. Darüber hinaus wurden Angaben zu Körpermaßen und sozioökonomischem Hintergrund erhoben. Diese Informationen wurden durch retrospektive Auswertung vorliegender Krankenakten validiert. Zusätzlich wurden Risikofaktoren für den Herzinfarkt wie Gesamtcholesterin, -Subfraktionen, Lipoprotein a und HbA1C laborchemisch bestimmt und eine DNS-Extraktion durchgeführt. Als Kontrollgruppe dienten gesunde eingeheiratete Ehepartner der Herzinfarktpatienten. Nach schriftlicher Zustimmung zur molekulargenetischen Suche nach Herzinfarktgenen wurde jedem Studienteilnehmer eine Identifikationsnummer zugeteilt, anhand derer in allen nachfolgenden Untersuchungen die anonymisierte Zuordnung von DNS-Probe und zugehörigem Datensatz möglich war. Das Studienprotokoll wurde vom Ethikkomitee der Universität Regensburg genehmigt. Für die Replikation der Studie von Ozaki et al. wurden 2234 nicht blutsverwandte Individuen (1073 Frauen, 1161 Männer) aus der Deutschen Herzinfarktfamilienstudie 1 per Zufall ausgewählt. Insgesamt sind in unserer Studie 1211 Herzinfarktpatienten und 1023 Kontrollprobanden eingeschlossen.

2.2.2 Deutsche Herzinfarktfamilienstudie 2 (GerMIFS II)

Die Deutsche Herzinfarktfamilienstudie 2 (GerMIFS II) ist eine Fall-Kontroll-Studie und umfasst 1222 Herzinfarktpatienten sowie 1298 Kontrollprobanden. Einschlusskriterien für die Studie war ein erlittener Herzinfarkt mit vermutlich genetischer Komponente, die durch ein frühes Erkrankungsalter (< 60 Jahre) definiert wurde. In 726 Fällen (59,4%) konnte eine positive Familienanamnese für den Herzinfarkt erhoben werden. Die Patienten wurden nach Krankenhausaufnahme zur Akut-Behandlung eines Herzinfarktes oder in kardiologischen Rehabilitationskliniken für die Studie rekrutiert. Die Genotypisierung der Probanden-DNS wurde mit dem Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 durchgeführt (81).

2.2.3 KORA Survey 4

Das KORA-Register (Kooperative Gesundheitsforschung im Raum Augsburg) stellt einen Pool von Studienteilnehmern aus der Region Augsburg u.a. für Fall-Kontroll-Studien zur Genetik des Herzinfarktes zur Verfügung. Die Fallgruppe besteht aus Patienten mit einem Herzinfarkt vor dem 60. Lebensjahr, die bei Krankenhauseinweisung wegen der Akutbehandlung eines Herzinfarktes rekrutiert wurden. Zufällig ausgewählte deutsche Einwohner der Region bilden die Kontrollgruppe. 1.636 der insgesamt 3.276 Kontrollprobanden sind Teilnehmer des MONICA/KORA Augsburg Survey S4 (1999-2001) (45).

2.2.4 PopGen-Kontrollen

Das PopGen-Projekt (Population Genetic Cohort) wurde im Jahr 2002 von verschiedenen Instituten des UK-SH ins Leben gerufen. Ziel ist die Bestimmung populations-spezifischer Genotypisiken für kardiovaskuläre, neuropsychiatrische und chronisch entzündliche Erkrankungen. Blutproben von Einwohnern Nord-Schleswig-Holsteins, die die entsprechende Erkrankung aufweisen, wurden in einer DNS-Datenbank gespeichert. Diese ist Mitgliedern des Nationalen Genomforschungsnetzwerks (NGFN) zugänglich. Darüber hinaus enthält die Datenbank DNS-Proben gesunder Einwohner von Kiel und Umgebung, die über das Einwohnermeldeamt identifiziert wurden und als Kontrollgruppe dienen.

Die Rekrutierungsprozesse sowie das Datenmanagement wurden durch das Ethik-Komitee der Medizinischen Fakultät der Universität Kiel sowie den Datenschutzbeauftragten des UK-SH genehmigt (59).

2.3 Molekulargenetische Methoden

2.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion, kurz PCR (**p**olymerase-**c**hain-**r**eaction), wurde 1983 von Kary Mullis entwickelt. Sie ist von grundlegender Bedeutung für die molekulargenetische Forschung und ermöglicht die selektive Vermehrung einer bestimmten DNS-Sequenz (Matrize/ Template). Zwei Oligonukleotid-Primer flankieren diesen Bereich und sind Angriffspunkte für ein bakterielles Enzym, die Taq-Polymerase, welche die neuen DNS-Abschnitte synthetisiert.

Für die Reaktion wird neben einer hitzestabilen Polymerase (z. B. Taq-Polymerase) und sequenzspezifischen Primern eine äquimolare Menge aller vier Desoxynukleotid-Triphosphate (dNTP) benötigt. Ein Puffer sorgt für optimale Reaktionsbedingungen. Zunächst wird der DNS-Doppelstrang bei hohen Temperaturen ($> 90^{\circ}\text{C}$) denaturiert, damit sich im folgenden Schritt Primer an die DNS-Einzelstränge anlagern können („annealing“, ca. $50-65^{\circ}\text{C}$). In der anschließenden Polymerisationsphase synthetisiert die Polymerase einen zum Template komplementären kurzen DNS-Einzelstrang. Dieser dient im nächsten Zyklus aus Annealing und Polymerisation neben dem ursprünglichen Template selbst als Vorlage für die Polymerase. Der Beginn der PCR ist von exponentieller Amplifikation der Template-DNS geprägt, die mit zunehmender Zykluszahl durch abnehmende Konzentrationen der benötigten Desoxynukleotide in lineare Vermehrung und schließlich eine Plateauphase übergeht, in der keine weitere Amplifikation mehr stattfindet.

Für unsere Assoziationsstudien wird die PCR genutzt, um die Bereiche der DNS zu amplifizieren, in denen die zu untersuchenden SNPs liegen. Die anschließende Genotypisierung erfolgt nicht mehr an hochmolekularer DNS, sondern nur an den exponentiell vermehrten kurzen Sequenzen. Je geringer allerdings die Menge an eingesetzter DNS, desto mehr Zyklen müssen ablaufen, um eine ausreichende Menge an PCR-Endprodukt zu erhalten (82). In unserer Studie erfolgte die PCR auf dem „7900HT Fast Real-Time PCR System“ von Applied Biosystems.

2.3.2 Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System

Bei der Genotypisierung eines SNPs werden die Basen identifiziert, die ein Individuum im Bereich des Polymorphismus auf den homologen Chromosomen trägt. Die beiden sogenannten Allele bilden gemeinsam den Genotyp. Ein etabliertes Verfahren zur Bestimmung

von Genotypen ist die Allelische Diskriminierung (AD). In dieser Arbeit verwenden wir das „7900HT Fast Real-Time PCR System“ (TaqMan®) von Applied Biosystems. Es ermöglicht die Durchführung der PCR eines DNS-Templates und die anschließende Genotypisierung der Amplifikate mittels allelischer Diskriminierung.

Während der PCR werden zusätzlich zu den oben beschriebenen Standardreagenzien zwei DNS-Sonden eingesetzt, deren Basensequenz komplementär zum DNS-Abschnitt um den untersuchten SNP ist. Diese weisen an der Basenposition, die mit dem SNP hybridisieren soll, eine dem jeweiligen Allel komplementäre Base auf. Jede Sonde besitzt so die Fähigkeit zur Hybridisierung mit einem der beiden SNP-Allele. Die Sonden sind jeweils durch einen mit unterschiedlicher Wellenlänge fluoreszierenden Reporterfarbstoff (VIC® bzw. FAM™) markiert, dessen Aktivität unterdrückt wird, solange der sogenannte „Quencher“ an die Sonde gebunden ist. In Abbildung 4 sind ein PCR-Zyklus des „7900HT Fast Real-Time PCR Systems“ sowie die verwendeten Reagenzien schematisch dargestellt.

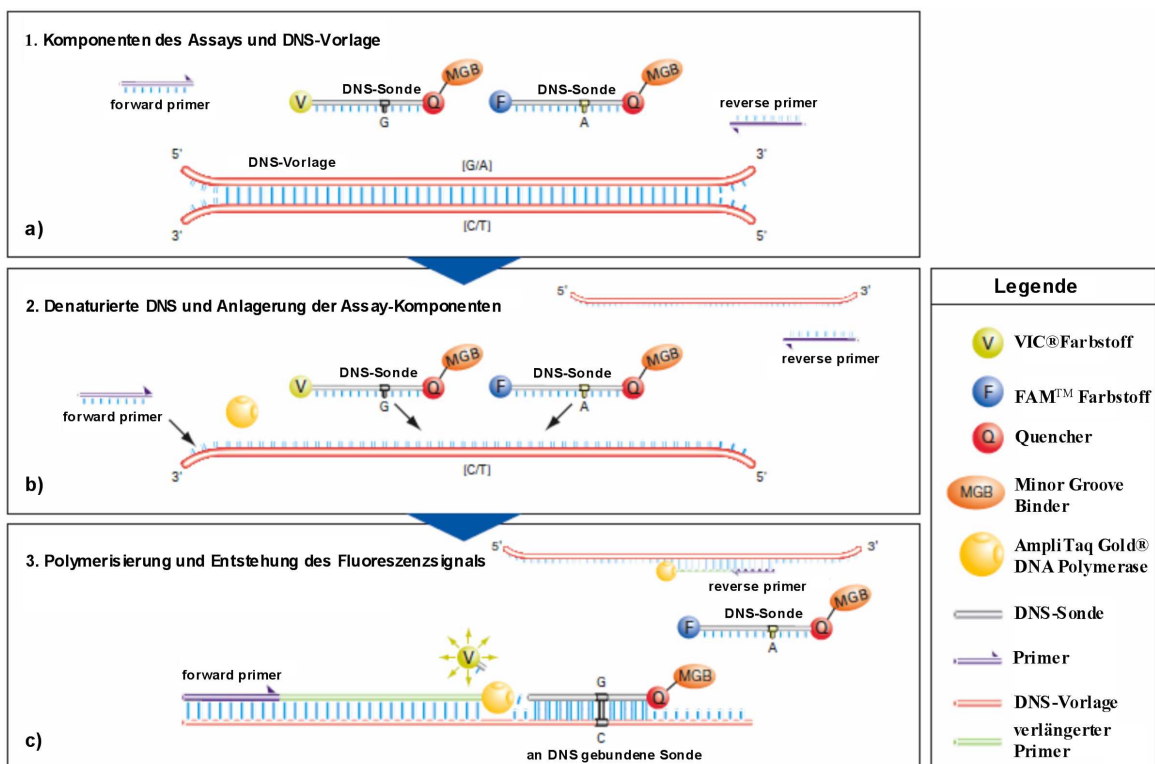


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines PCR-Zyklus und der verwendeten Reagenzien (a). Nach Denaturierung der DNS folgt das Primerannealing und die Anlagerung der allelspezifischen DNS-Sonde (b). Im Verlauf der Polymerisationsphase verdrängt die Ampli-Taq Gold DNS-Polymerase die hybridisierte DNS-Sonde vom Matrizenstrang und baut diese vom 5'-Ende her ab. Dadurch wird der Reporterfarbstoff räumlich vom „Quencher“ getrennt und beginnt zu fluoreszieren (aus (2)).

Mit steigender Zahl an PCR-Zyklen kommt es zur Zunahme der Konzentration des freien Farbstoffs. Der Anstieg des Fluoreszenzsignals wird vom „7900HT Fast Real-Time PCR-System“ aufgezeichnet und zeigt eine erfolgreiche Amplifikation der Zielregion an (siehe Abbildung 5).

Anschließend wird bei der allelischen Diskriminierung das Fluoreszenzsignal beider Farbstoffe für jede der 384 Reaktionskammern der Mikrotiterplatte gemessen. Detektiert der Scanner in einer Kammer nur das Signal eines der beiden Reporterfarbstoffe, so ist das untersuchte Individuum homozygot für Allel 1 oder 2 (je nach emittierter Wellenlänge des detektierten Farbstoffs VIC® bzw. FAM™). Für das Vorliegen eines heterozygoten SNPs spricht der Nachweis beider Fluoreszenzsignale. Die Signalintensitäten werden graphisch in Signalintensitätsplots dargestellt, die eine Kontrolle und eventuelle Änderung der Ergebnisse der allelischen Diskriminierung möglich machen.

Auf jeder Mikrotiterplatte befinden sich neben den Proben auch Negativkontrollen (NTC, non template control). In diesen Reaktionsansätzen fehlt die Ziel-DNS, sodass keine Amplifikation stattfinden kann. Dieses Vorgehen ist nötig, um eine eventuelle Kontamination eines der verwendeten Reagenzien mit Fremd-DNS zu erkennen. Außerdem dienen die NTCs dem „7900HT Fast Real-Time PCR System“ bei der allelischen Diskriminierung als Referenzwert zur Messung der Fluoreszenzsignalintensitäten. Darüber hinaus wird die Genotypisierung von 10% der Proben in unabhängigen PCR-Reaktionen wiederholt. Der Abgleich von Genotypisierungsergebnissen doppelt untersuchter Proben ermöglicht die Aufdeckung von Fehlern bei der allelischen Diskriminierung.

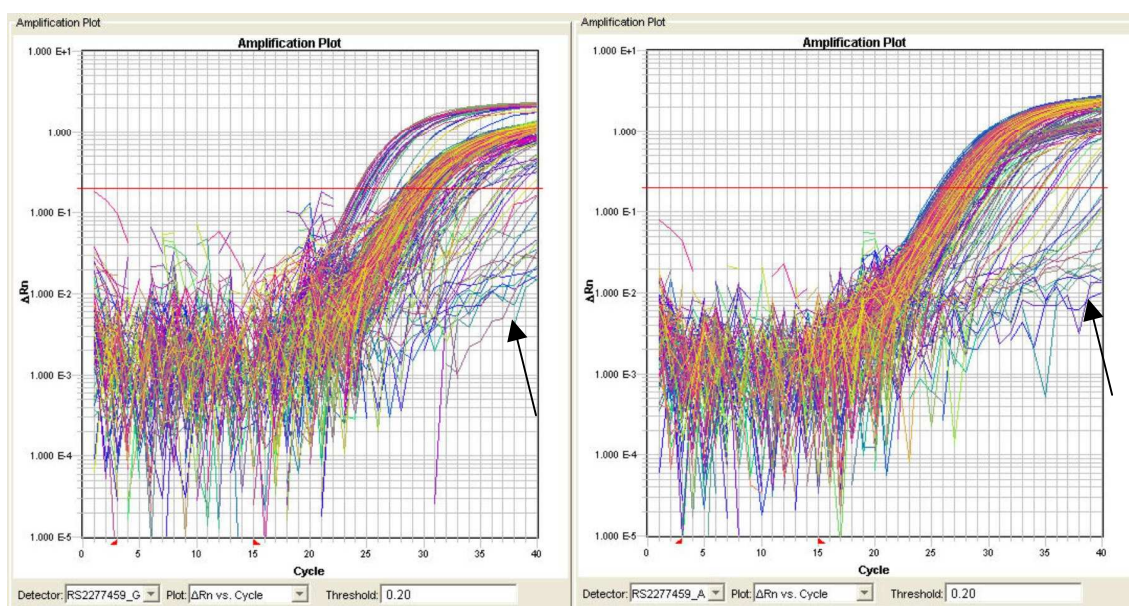


Abbildung 5: Exemplarische Darstellung der Fluoreszenz-Intensität (x-Achse: ΔRn) im Verlauf der PCR-Zyklen (y-Achse: Cycle) für die Proben auf einer 384er Mikrotiterplatte. PCR und Genotypisierung des SNPs rs2277459 mit den Allelen G und A wurden auf dem 7900HT von Applied Bio-

systems durchgeführt. Jede farbige Kurve innerhalb der Graphen spiegelt die Signalintensität des entsprechenden Farbstoffs in einer Probe im Verlauf der 40 PCR-Zyklen wider (linker Graph: VIC®-markiertes G-Allel, rechter Graph: FAMTM-markiertes A-Allel). Prinzipiell erkennt man während der PCR einen exponentiellen Anstieg des Fluoreszenzsignals der Proben, der sich mit zunehmender Zykluszahl wegen sinkender Konzentration an benötigten freien Nukleotiden abschwächt und schließlich in ein Plateau übergeht. Erreicht die Kurve einer Probe den Intensitätsschwellenwert für den jeweiligen Farbstoff (rote horizontale Linie), so wird ihr automatisch das entsprechende Allel zugeordnet. Je früher eine Kurve den Schwellenwert erreicht, desto erfolgreicher ist in diesem Reaktionsansatz die PCR verlaufen. Kurven, die keinen harmonischen Verlauf zeigen (Pfeile) und den Schwellenwert nicht erreichen, lassen auf Probleme während der PCR schließen. Die entsprechenden Proben werden als „unbestimmt“ gekennzeichnet. Proben, deren Kurven am Ende der PCR knapp den Schwellenwert verpasst haben, können nachträglich im Signalintensitätsplot aufgesucht werden und eventuell unter Berücksichtigung ihrer Position im Plot und des Kurvenverlaufs des Fluoreszenzsignals während der PCR manuell einem Allel zugeordnet werden.

2.3.3 Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0

In Analogie zur DNS-Mikroarray-Technik kann mittels SNP-Arrays ein Großteil humaner genetischer Variabilität eines Individuums in einer einzigen Reaktion untersucht werden (im Jahr 2008 > 900.000 SNPs). Dies stellt einen großen Vorteil im Vergleich zur Genotypisierung mit dem „7900HT Fast Real-Time PCR System“ dar. Hierbei werden pro Reaktion nur die Allele eines SNPs bestimmt. Dies ist vor allem für die seit einiger Zeit durchgeführten genomweiten Assoziationsstudien (GWAs) von Bedeutung, in denen das Genom möglichst engmaschig auf Assoziationen mit genetischen Erkrankungen untersucht wird. Bei der Auswahl der SNPs, die mit dem Affymetrix Genome-Wide Human SNP Arrays 6.0 genotypisiert werden können, wurden deshalb vor allem tagSNPs aus dem HapMap-Projekt, SNPs an Regionen mit hoher Rekombinationsrate und neu identifizierte SNPs aus der dbSNP-Datenbank berücksichtigt (1).

Das Prinzip des SNP-Arrays beruht auf der Hybridisierung von fragmentierter Fluoreszenz-markierter Probanden-DNS (Target-DNS) mit SNP-spezifischen Sonden, die auf einem Trägermaterial (Array) fixiert sind. Für jedes Allel eines zu typisierenden SNPs findet sich an einer definierten Stelle auf dem Array eine spezifische Sonde, die 100% komplementär zu dem Polymorphismus ist. Für jedes untersuchte Individuum benötigt man einen SNP-Array.

Zunächst spalten Restriktionsenzyme die Target-DNS in größtenteils 200 – 1.100 Basenpaare (bp) lange Fragmente, deren Enden mit einem Adaptor ligiert werden. In der anschließenden PCR wird ein zum Adaptor komplementärer Primer eingesetzt, mit dessen Hilfe alle Fragmente amplifiziert werden. Auf diese Weise erhöht sich die Menge an Ausgangs-DNS. Nachdem die Amplifikate mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert worden sind, füllt man sie in die Reaktionskammer des Affymetrix Genome-Wide Human

SNP Array 6.0, wo es zur Hybridisierung von Target-DNS mit den spezifischen Sonden kommt. Dort, wo eine Hybridisierung stattgefunden hat, sind nach mehreren Reinigungsschritten noch Fluoreszenzsignale vorhanden, die durch einen Scanner detektiert werden. Der Calling-Algorithmus Bioseed berechnet daraus für jeden der > 900.000 SNPs den entsprechenden Genotyp.

Aus den Genotypisierungsdaten mehrerer Individuen lässt sich ein Signalintensitätsplot (Clusterplot) generieren, der dem oben beschriebenen Clusterplot ähnelt und anhand dessen eine Aussage über die Qualität der Genotypisierung getroffen werden kann (siehe Abbildung 6 auf Seite 26).

2.4 Beschreibung der angewendeten Qualitätskriterien

Bei der Untersuchung von SNPs auf Assoziation mit Erkrankungen gibt es eine Reihe von Fehlerquellen. Viele können zu falsch positiven oder falsch negativen Ergebnissen führen. Möglich sind z. B. falsche Genotypisierung oder das Übersehen von Assoziationen in Regionen von Genen, die nur unvollständig durch die genotypisierten SNPs abgedeckt sind. Eine sorgfältige Qualitätskontrolle der einzelnen Schritte ist notwendig. Im folgenden Abschnitt werden die in dieser Arbeit angewendeten Qualitätskriterien sowie die ihnen zu Grunde liegenden Prinzipien erläutert.

2.4.1 „Minor allele frequency“ (MAF)

Als „minor allele frequency“ (MAF) bezeichnet man die Häufigkeit des selteneren Allels einer Sequenzvariation in einer Population. Die strenge Definition für „Single Nucleotide Polymorphisms“ fordert eine $MAF \geq 1\%$. Ist dieses Kriterium nicht erfüllt, spricht man, wie oben erwähnt, von einer Mutation. In der Praxis wird allerdings eine Sequenzvariation, die mit einer Frequenz von $< 1\%$ einhergeht, häufig ebenfalls als SNP bezeichnet (z. B. in dbSNP-Datenbank).

Je häufiger ein Allel vorkommt (höhere MAF), desto größer ist sein potentiell krankheitsfördernder Effekt. In unseren Studien betrachten wir ausschließlich SNPs mit einer $MAF \geq 1\%$ in der deutschen Population.

2.4.2 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Zur Untersuchung, ob Fehler bei der Genotypisierung der SNPs stattgefunden haben, wird ein χ^2 -Test auf Anpassung der Allelfrequenzen eines jeden SNPs an das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (engl. Hardy-Weinberg equilibrium) bei den Kontrollprobanden durchge-

führt. Neben der Wiederholung der Genotypisierung einzelner Proben gibt die Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht in der Kontrollgruppe einen Hinweis auf Genotypisierungsfehler (z. B. falsches Calling: Zuweisung des falschen Genotyps zu einem Individuum) (94).

Der Zusammenhang von Genotyp- und Allelfrequenzen in einer ausreichend großen Population wurde 1908 unabhängig voneinander von Godfrey Harold Hardy und Wilhelm Weinberg entdeckt. Diese Entdeckung ermöglicht die Umrechnung von Allel- in Genotypfrequenzen. Der Zusammenhang lässt sich durch folgende Formeln ausdrücken:

$p^2 + 2pq + q^2 = 1$ mit $p + q = 1$	p^2 = Genotypfrequenz (A_1A_1) q^2 = Genotypfrequenz (A_2A_2)	p = Allelfrequenz A_1 q = Allelfrequenz A_2
--	--	--

Als Voraussetzung für die Gültigkeit des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts müssen gelten:

- Uneingeschränkte Panmixie (jedes Individuum kann mit jedem anderen der Population Nachkommen hervorbringen).
- Es finden keine Selektion, Mutation oder Populationsstratifikation statt.
- Die Population ist angemessen groß.

Befindet sich eine Population im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, so können für bekannte Genotypfrequenzen die Allelfrequenzen berechnet werden. Es gilt:

$p = P(A_1A_1) + \frac{1}{2} * P(A_1A_2)$ $q = P(A_2A_2) + \frac{1}{2} * P(A_1A_2)$	p = Allelfrequenz A_1 q = Allelfrequenz A_2	$P(A_xA_x)$: Genotypfrequenz
--	--	-------------------------------

Der χ^2 -Test auf Anpassung wird nur für die Kontrollprobanden durchgeführt. In der Gruppe der Herzinfarktpatienten könnte nämlich das krankheitsfördernde Allel prinzipiell eine Selektion durch eine erhöhte Mortalität in dieser Gruppe bewirkt haben und damit ein Grund für Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht sein. Bei den Kontrollprobanden nimmt man eine Normalverteilung des Allels an.

2.4.3 Intensitätsplots für genotypisierte SNPs

Sowohl bei der Genotypisierung mittels des „7900HT Fast Real-Time PCR Systems“ von Applied Biosystems als auch bei Verwendung des Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 werden Signalintensitäten von Fluoreszenzfarbstoffen gemessen. Daraus können durch die entsprechende Software sogenannte Signalintensitäts- oder Clusterplots generiert werden, in denen die Signalintensität des einen Farbstoffs (x-Achse) gegen die des anderen aufgetragen ist (y-Achse). Jeder Punkt im Graphen spiegelt die gemessenen Fluoreszenzintensitäten beider Farbstoffe für eine Probe auf der 384er Mikrotiterplatte

wider. Bei erfolgreicher Genotypisierung aller Proben im Graphen lassen sich mehrere verschiedenfarbige Punktwolken (Cluster) abgrenzen, von denen jede einem bestimmten Genotyp zugeordnet werden kann. Abweichungen der Punkte eines Clusters entlang der x- oder y-Achse kommen durch unterschiedlich erfolgreiche Amplifikation des DNS-Templates während der PCR zustande (z. B. abweichende initiale DNS-Konzentration in Reaktionsansätzen). Dies führt zu verminderter Intensität des Fluoreszenzsignals. Punkte, die sehr stark von den Punktwolken abweichen, können keinem Cluster zugeordnet werden und sind durch ein x gekennzeichnet. Ursächlich kommt hierfür das Auftreten mehrerer SNP-Allele (multiallelischer SNP) oder Sequenzduplikationen bei dem entsprechenden Individuum in Frage. Durch Auswertung der Intensitätsplots der SNPs lässt sich also ein Eindruck über die Qualität der Genotypisierung gewinnen. Folgende graphische Charakteristika zeigen Probleme bei der Genotypisierung eines SNPs an:

- > 3 oder < 2 Punktwolken abgrenzbar (zusätzlich zum Referenzcluster der Negativkontrollen)
- Überlappung von Clustern
- Viele fehlende Werte
- Mehrere Genotypen in einem Cluster dargestellt (Cluster mit verschiedenen Farben)
- Mehrere Cluster enthalten denselben Genotyp

SNPs, deren Signalintensitätsplots eines dieser Kriterien erfüllen, werden von weiteren Analysen ausgeschlossen. Abbildung 6 (Seite 26) zeigt beispielhaft Charakteristika eines guten und einen schlechten Signalintensitätsplots.

2.5 Statistische Verfahren

2.5.1 Test auf Anpassung an Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Ob die Verteilung der Genotypen mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht übereinstimmt, wird entweder mittels eines Pearson χ^2 -Test bzw. eines Monte Carlo χ^2 -goodness-of-fit Tests geprüft. Die Hypothesen für den Test lauten:

H_0 : Genotypfrequenzen des SNPs ist im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

H_A : Genotypfrequenzen des SNPs ist nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Das Signifikanzniveau des Tests liegt bei $p = 10^{-4}$. Beträgt der berechnete Wert $p \leq 10^{-4}$, wird H_0 abgelehnt und die Alternativhypothese H_A einer Abweichung des Markers vom

Hardy-Weinberg-Gleichgewicht angenommen. In diesem Fall wird der betrachtete SNP von weiteren Analysen ausgeschlossen. Ist $p > 10^{-4}$, kann H_0 nicht abgelehnt werden. Das SNP wird als im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befindlich angesehen.

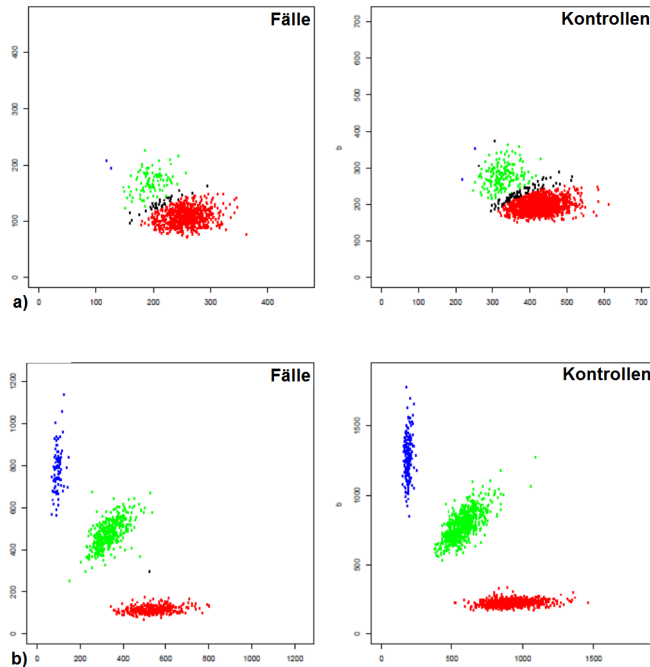


Abbildung 6: Gezeigt sind Beispiele für einen schlechten (a) und einen guten (b) Signalintensitätsplot jeweils für die Fall- und Kontrollgruppe. Auf der x- und y-Achse sind die Signalintensitäten der beiden verwendeten Farbstoffe aufgetragen. Jeder Punkt stellt eine untersuchte Probe dar. Der Signalintensitätsplot für den SNP rs4648006 aus dem *NFKB1*-Gen zeigt im Wesentlichen zwei farblich markierte Cluster, die nicht sicher voneinander abgrenzbar sind (a). Im Gegensatz dazu sind für den SNP rs2292117 aus dem *PSMA4*-Gen drei Punktwolken eindeutig abgrenzbar (b). In der roten und blauen Punktwolke sind Proben mit homozygotem, im grünen Cluster Proben mit heterozygotem Genotyp zu finden. Die Clusterplots wurden generiert durch Dr. rer. hum. Biol. Arne Schillert.

2.5.2 Test auf Trend

Zum Test auf Assoziation eines Marker-Allels mit dem Herzinfarkt werden die ermittelten Genotypfrequenzen von Patienten und gesunden Kontrollprobanden mittels eines zweiseitigen Cochran-Armitage-Trend-Test verglichen, da für die SNPs nicht bekannt ist, ob sie die Entstehung des Herzinfarkts eventuell begünstigen oder vermindern.

Ein Grund für den Vergleich der Genotypfrequenzen liegt darin, dass diese das direkte Ergebnis der Genotypisierung sind. Soll die Assoziation von Allel und Herzinfarkt getestet werden, so ist zunächst die Umrechnung der Genotyp- in die Allelfrequenz nötig. Besteht für einen SNP kein perfektes Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, so schleichen sich bei Umrechnung der Frequenzen Fehler ein (94).

Die Hypothesen für den Test lauten:

H_0 : Genotypfrequenzen in Patienten- und Kontrollgruppe unterscheiden sich nicht.

H_A : Genotypfrequenzen in Patienten- und Kontrollgruppe unterscheiden sich.

Die Analyse wird für die Genotypen aller betrachteten SNPs durchgeführt und die entsprechenden p-Werte berechnet. Als statistisch signifikant gelten p-Werte $< 0,05$, die zur Ablehnung der Nullhypothese und zur Annahme der Alternativhypothese führen. Für

solche SNPs nehmen wir an, dass sich die Genotypfrequenzen zwischen Patienten- und Kontrollgruppe signifikant unterscheiden und eine Assoziation zum Herzinfarkt besteht. Diese SNPs werden in weiteren Schritten untersucht.

Das Ausmaß einer Assoziation wird gut durch das Chancenverhältnis, die „odds ratio“ (OR), mit den zugehörigen 95%-Konfidenzintervallen angegeben. In Fall-Kontroll-Studien ist im Gegensatz zu prospektiven Kohortenstudien die Angabe eines relativen Risikos (RR) aus statistischen Gründen nicht möglich, da die Studienteilnehmer im Bezug auf ihren Erkrankungsstatus, also retrospektiv, rekrutiert wurden. Deshalb ist keine Aussage zur Inzidenz der Erkrankung in der Allgemeinbevölkerung zulässig, die für die Angabe des relativen Risikos benötigt wird.

Diese Berechnungen werden im Institut für Medizinische Biometrie und Statistik durch Dipl.-Statistikerin Anika Großhenning durchgeführt unter Verwendung des Statistikprogramms „StatXact 8“.

2.5.3 Berechnung der statistischen Trennschärfe

Der α -Fehler (p_α), bei dem die fälschliche Ablehnung der Nullhypothese zu falsch positiven Studienergebnissen führt, kann über die Höhe des Signifikanzniveaus (p-Wert) kontrolliert werden (hier $p \leq 0,05$). Im Gegensatz dazu lässt sich der β -Fehler (p_β), der durch fälschliches Beibehalten der Nullhypothese mit falsch negativen Ergebnissen einher geht, nicht leicht beherrschen. Zur Abschätzung des β -Fehlers in einer Studie dient die statistische Trennschärfe (Power). Sie ist komplementär zum β -Fehler und ergibt sich aus:

$$\text{Power} = 1 - p_\beta \qquad p_\beta: \beta\text{-Fehler}$$

Die Power einer genetischen Assoziationsstudie beschreibt die Wahrscheinlichkeit, mit der eine wirklich existierende Assoziation von SNP und Erkrankung auch durch die Studie statistisch signifikant nachgewiesen werden kann. Sie ist von vier Faktoren abhängig (26):

1. Effektgröße: Diese wird durch das Chancenverhältnis (Odds ratio) angegeben.
2. α -Fehler: Je höher der akzeptierte Anteil falsch positiver Ergebnisse, desto größer wird auch die Power.
3. Anzahl der Fall- und Kontrollprobanden.
4. Charakteristika der Studie: Allelfrequenzen des SNPs, Prävalenz der betrachteten Erkrankung in der Allgemeinbevölkerung, vermutetes Vererbungsmodell.

Mit Hilfe des Statistikprogramms „Quanto“ können die Power oder die benötigte Zahl an Fall-Kontroll-Paaren für eine Studie abgeschätzt werden. In der Regel wird eine Power von 80% gefordert, die einem β -Fehler von 20% entspricht. Je geringer die Power einer

Studie, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, eine existierende Assoziation zu übersehen.

2.5.4 Imputation

Auch bei nicht verwandten Individuen existieren kurze DNS-Abschnitte, in denen kaum Rekombination stattfindet und von denen verschiedene Haplotypen vorliegen. Das internationale HapMap-Projekt liefert Genotypisierungs- und Haplotypinformationen von Referenzpopulationen, u.a. aus einer Population europäischer Abstammung. Untersucht man eine Chromosomenregion, genügt die Genotypisierung weniger ausgesuchter SNPs, um ein Individuum einem bekannten Haplotyp der Referenzpopulation zuzuordnen. So erlangen wir Informationen über SNPs, die selbst gar nicht genotypisiert worden sind (63). Dieser Vorgang wird als Imputation bezeichnet. Die hierfür nötigen Berechnungen sind für die Deutschen Herzzinfarktfamilien-Studien mit Hilfe des Programms „MACH 1.0“ durchgeführt worden (62). In Validierungsstudien schnitten die Programme „MACH“ und „IMPUTE“ im Vergleich zu anderen am besten ab (73).

2.6 Graphische Darstellung von SNPs

2.6.1 LD-Karten

Zur Veranschaulichung der LD-Beziehung und graphischen Darstellung von Haplotypen kann die von Morton auf der Basis der „Malecot equation“ entwickelte metrische LDU-Karte verwendet werden. Morton zeigte, dass im Falle einer sehr geringen Rekombinationsrate ein Zusammenhang zwischen dem genetischen (in cM) und dem physikalischen Abstand (in kb) zweier Marker auf einem Chromosom besteht.

Unter bestimmten Voraussetzungen fällt die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen von LD zwischen SNPs (η : Wahrscheinlichkeit, dass zwischen zwei Markern seit einer imaginären Urpopulation keine Rekombination stattgefunden hat) mit zunehmendem physikalischem Abstand der betrachteten Polymorphismen exponentiell ab. Das Ausmaß dieses Abfalls wird durch den Faktor ϵ bestimmt. Betrachtet man mehrere Polymorphismen, so muss für jedes Intervall zwischen benachbarten Markern der Faktor ϵ geschätzt werden. Auf dieser Grundlage lässt sich eine LD-Skala erstellen. Aus dem Produkt der physikalischen Länge eines Intervalls (kb) und des hierfür geschätzten Faktors ϵ ergibt sich der sogenannte LDU-Wert (engl. Linkage disequilibrium unit). Dieser kann für die SNPs einer chromosomalen

Region graphisch auf der y-Achse gegen eine physikalische Skala auf der x-Achse aufgetragen werden.

In dieser Darstellung bedeutet ein zur x-Achse paralleler Kurvenverlauf eine hohe LD zwischen den dort abgebildeten Markern. Ein solcher Bereich entspricht einem Haplotyp-Block, dessen SNPs gemeinsam vererbt werden. Bereiche mit stufenförmigem Kurvenanstieg markieren Regionen hoher Rekombinationsrate („recombination hot spots“).

Für die Generierung einer LDU-Karte benötigt man Informationen über die in der untersuchten Population auftretenden Haplotypen. Diese sind über die HapMap-Datenbank u.a. für eine Population mit europäischen Vorfahren (CEU) erhältlich. Die Berechnung der LDU-Werte findet im Institut für Medizinische Biometrie und Statistik an der Universität zu Lübeck statt.

In unserer Hypothesen-bildenden Studie wird die LDU-Darstellung genutzt, um Haplotyp-Blöcke innerhalb der untersuchten Gene zu visualisieren. Anhand der LDU-Karte berechnen wir dann den prozentualen Anteil eines Gens, über den unsere Genotypisierungsdaten eine Aussage erlauben. Dafür wird die Anzahl der Haplotyp-Blöcke, die durch mindestens einen qualitätsgeprüften SNP aus der GerMIFS II abgedeckt sind, durch die Gesamtzahl der im Gen vorhandenen Haplotyp-Blöcke geteilt. So können wir näherungsweise eine Aussage über den Anteil eines Gens treffen, für den eine genetische Variabilität in unserer Studie detektiert werden kann.

2.6.2 Fancy plots

Die sogenannten „Fancy plots“ dienen der graphischen Darstellung von definierten chromosomalen Regionen. Durch sie werden LD-Beziehungen von SNPs und Ergebnisse der Trend-Test-Analyse veranschaulicht.

Auf der x-Achse sind die physikalische Länge der betrachteten Region (in kb) sowie die dortige Rekombinationsrate (cM/Mb) aufgetragen. Die y-Achse zeigt den negativen Logarithmus des p-Trend-Werts. Eine Hilfslinie markiert das Signifikanzniveau von 0,05. Jeder untersuchte SNP wird anhand seiner physikalischen Position und seines p-Trend-Werts im Graphen als Kreis oder Raute dargestellt. Alle Formen, die oberhalb der Hilfslinie gelegen sind, stehen für SNPs mit einem signifikanten p-Trend-Wert.

Im Fokus eines jeden Fancy plots steht der sogenannte „lead SNP“. Er dient als Referenzpunkt für die Darstellung der LD und ist durch eine blaue Raute sowie seine rs-Nummer und den zugehörigen p-Trend-Wert gekennzeichnet. Als lead SNP wird ein SNP gewählt, der einen geringen p-Trend-Wert in der Assoziationsstudie aufweist.

Darüber hinaus stehen Kreise für imputierte, Rauten für genotypisierte SNPs. Ihre LD-Beziehung zum lead SNP ist farblich kodiert. Die Farbe Rot bedeutet eine hohe LD ($r^2 \geq 0,8$), während Orange für mittlere ($0,5 < r^2 < 0,8$), Gelb für geringe ($0,2 < r^2 < 0,5$) und Weiß für fehlende LD ($r^2 < 0,2$) verwendet wird.

Die über der x-Achse dargestellten Informationen zu den in der Region liegenden Genen entstammen dem UCSC Genome Browser. Rekombinationsraten werden gemäß des von McVean beschriebenen Algorithmus berechnet (68).

Im Fancy plot sollten SNPs, die sich in hoher LD zum lead SNP befinden, ebenfalls einen signifikanten p-Trend-Wert besitzen. Solche SNPs sind oberhalb der Hilfslinie aufgetragen. Liegen sie unterhalb dieser Linie, so handelt es sich bei dem gewählten lead SNP vermutlich um ein falsch positives Ergebnis der Assoziationsanalyse.

2.7 Replikation der Studie von Ozaki

Für die Replikation der Studie von Ozaki et al. wurden SNPs aus dem *PSMA6*-Gen aus der DNS von Patienten und Kontrollprobanden der Deutschen Herzinfarktfamilienstudie 1 genotypisiert, um diese auf mögliche Assoziationen mit dem Herzinfarkt zu untersuchen.

2.7.1 SNP Auswahl

Im Vordergrund unserer Analyse steht der SNP 1048990, der in einer japanischen Population mit dem Herzinfarkt assoziiert war und von funktioneller Bedeutung zu sein scheint (71). Die Frequenz des G-Allels der Referenzpopulation in HapMap (CEU) für Individuen europäischer Herkunft ist geringer als die der japanischen Studienpopulation von Ozaki (11,7% vs. 30,7%). Für diese Allelfrequenz besitzt unsere Studie nur eine Power von 55,4%, einen mit dem der in der Studie von Ozaki et al. bestimmten Effekt zu replizieren. Deshalb entschieden wir uns, weitere SNPs mit höherer Allelfrequenz in der deutschen Population aus dem *PSMA6*-Gen auszuwählen, um die Rolle dieses Gens für das Auftreten des Herzinfarktes in unserer Studienpopulation weiter zu beleuchten. Die Verteilung der SNPs über das *PSMA6*-Gen ist schematisch in Abbildung 8 gezeigt.

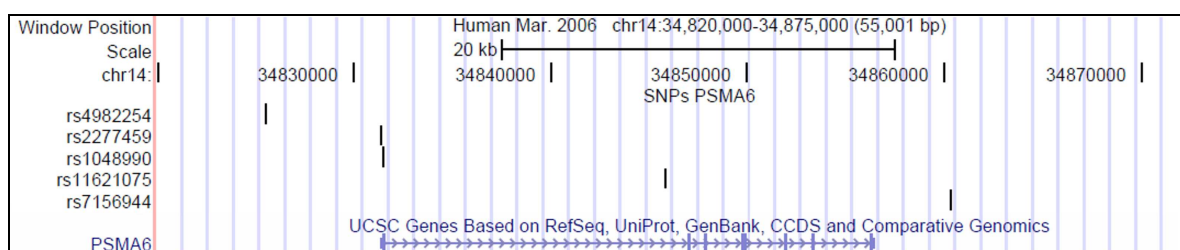


Abbildung 8: Lage der untersuchten SNPs innerhalb des *PSMA6*-Gens (Quelle: Genome Browser).

2.7.2 Genotypisierung

Die Regionen um die fünf zu untersuchenden SNPs aus dem *PSMA6*-Gen (rs4982254 in der Promotorregion, rs2277459 in Exon 1, rs1048990 in Exon 1, rs11621075 in Intron 1, rs7156944 in der 3'-UTR) werden zunächst mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) vervielfacht und anschließend mit Hilfe des 5'-Exonuklease-Assays (TaqMan®) auf dem 7900HT (Applied Biosystems, Darmstadt) genotypisiert. Dabei wird für jeden SNP ein spezifischer TaqMan® SNP genotyping assay von Applied Biosystems verwendet. Detaillierte Informationen über die einzelnen Assays sind in Anhang 1 zu finden. Grundsätzlich bestehen die Assays aus:

- Zwei spezifischen Primern zur Amplifikation der interessierenden polymorphen Region.
- Zwei durch die Farbstoffe VIC ® bzw. FAMTM markierte allelspezifische DNS-Sonden (TaqMan® MGB [Minor Groove Binder]) zur Detektion von Allel 1 bzw. 2.

PCR und allelische Diskriminierung erfolgen auf Mikrotiterplatten, die Platz für die gleichzeitige Untersuchung von 384 DNS-Proben (384-well plates) haben. Diese wurden durch einen GENESIS Freedom Pipettier-Roboter von TECAN (Krailsheim) mit 50µl DNS (entspricht 10 ng) befüllt.

Um Unterschiede im Gesamtreaktionsvolumen durch Verdunstung von Wasser aus der DNS-Probe auszuschließen und damit gleiche Konzentrationen aller Reaktionspartner in allen Ansätzen zu gewährleisten, lassen wir die DNS nach dem Pipettiervorgang zunächst eintrocknen. Hierdurch wird ebenfalls der Umgang mit den Platten vereinfacht. Die für die PCR benötigten Reagenzien sind im Universal PCR Master Mix von Applied Biosystems enthalten, das sich folgendermaßen zusammensetzt:

- AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Thermostabile 5'-3' DNS-Polymerase)
- Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) mit dUTP
- Passive Referenz
- optimierter Puffer.

Es ergibt sich ein Gesamtreaktionsvolumen von 5 µl pro Reaktion auf der Mikrotiterplatte, die mit einer Plastikmembran verschlossen wird, um Verdunstung während der PCR-Schritte zu verhindern.

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wird auf dem Applied Biosystems „7900HT Fast Real-Time PCR System“ oder MBS-Cyclern von Hybaid mit dem in Abbildung 9 dargestellten Protokoll durchgeführt.

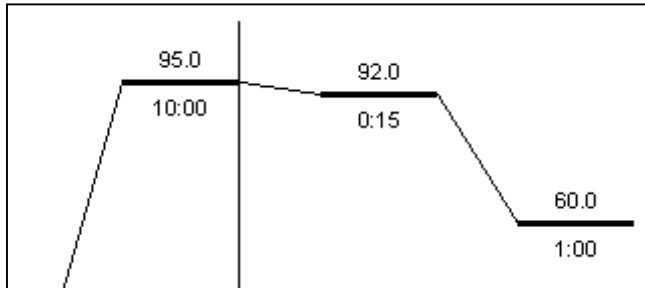


Abbildung 9: Protokoll des PCR-Zyklus. An die initiale 10-minütige Denaturierungsphase schließt sich die 15-sekündige Primerhybridisierung an. Es folgt die einminütige Elongationsphase.

Bei der allelischen Diskriminierung durch den „ABI Prism 7900HT“ (Applied Biosystems) bestimmt die „Sequence Detection Systems 2.1“-Software aus den gemessenen Fluoreszenzsignalintensitäten automatisch die SNP-Genotypen der Proben (Konfidenzlevel für Autocalling 95%). Eine Zusammenfassung der Arbeitsschritte zeigt Abbildung 10.

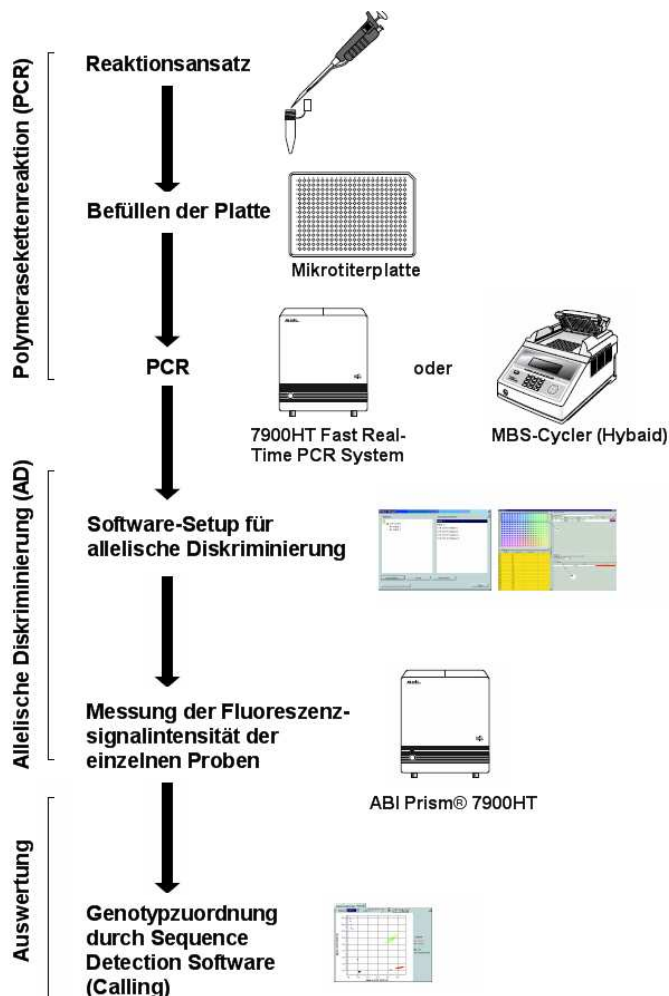


Abbildung 10: Arbeitsschritte bei der Genotypisierung mit dem 5'-Exonuklease-Assay (TaqMan®) auf einem 7900HT (umgezeichnet nach (3)). Zunächst werden die benötigten Reagenzien (siehe oben) gemischt und in die Mikrotiterplatte eingefüllt, die bereits mit Probanden-DNS versehen ist. Es folgt die PCR auf dem 7900HT Fast Real-Time PCR System von Applied Biosystems oder MBS-Cyclern von Hybaid. Im Anschluss wird die allelische Diskriminierung mit dem ABI Prism® 7900HT durchgeführt. Die „Sequence Detection Software“ wandelt die gemessenen Fluoreszenzsignalintensitäten der einzelnen Proben in Genotypen um. Dies wird als Calling bezeichnet.

2.7.3 Qualitätskontrolle der Genotypisierung

10 % der Proben sind aus Gründen der Qualitätskontrolle auf den Mikrotiterplatten doppelt aufgetragen. Die Ergebnisse der Genotypisierung der Proben werden später abgeglichen. So stellen wir sicher, dass die Qualität der Genotypisierung innerhalb und zwischen den einzelnen Durchgängen gleich ist und eventuelle systematische Genotypisierungsfehler erkannt werden. Außerdem fügen wir pro Platte vier Ansätzen keine DNS (NTCs) hinzu, um einen Referenzwert für die Hintergrundfluoreszenz der beiden Farbstoffe VIC® bzw. FAMTM zu erhalten. Dieser ist für die Messung der Signalintensitäten in den einzelnen Reaktionsansätzen während der allelischen Diskriminierung von Bedeutung. Darüber hinaus würde die Zunahme des Fluoreszenzsignals in den NTC-Reaktionsansätzen eine Kontamination der Probenansätze mit Fremd-DNS anzeigen.

Zur Qualitätskontrolle des Autocalling-Algorithmus werten wir die Signalintensitätsplots aus der allelischen Diskriminierung für jede Mikrotiterplatte aus. Dabei wird auf Abweichung von den oben beschriebenen Qualitätskriterien und die sinnvolle Zuordnung der Proben in die drei Genotyp-Cluster sowie die Punktwolke der Negativkontrollen (NTCs) geachtet. Bei graphisch eindeutig falscher Zuordnung eines Individuums wird der entsprechende Punkt im Signalintensitätsplot entweder als ungültig markiert oder einem anderen Cluster zugeordnet. Für einige Mikrotiterplatten erfolgte die PCR auf dem „7900HT Fast Real-Time PCR System“. Bei Auswertung der Genotypen dieser Platten stehen zusätzlich Informationen über den Anstieg des Fluoreszenzsignals während der PCR (Real-time-PCR) zur Verfügung. Diese helfen bei der Bewertung, ob eine unzureichende Amplifikation des DNS-Template dem Autocalling-Algorithmus bei der allelischen Diskriminierung Probleme bereitet hat.

2.7.4 Statistische Analyse

Zunächst wird die Power für den Nachweis einer existierenden Assoziation durch unsere Studie mit Hilfe des Computerprogramms „Quanto“ berechnet (Power-Analyse). Bei der Analyse gehen wir von folgenden Annahmen aus:

- erwartete Effektgröße (Odds Ratio): 1,21 (entspricht dem in der Studie von Ozaki gefundener Effekt)
- α -Fehler (zweiseitig): 0,05
- Anzahl Fall- und Kontrollprobanden: 1211 bzw. 1023
- Charakteristika der Studie:
 - a. MAF: Ergebnis der Genotypisierung für den jeweiligen SNP

- b. Basisrisiko der Bevölkerung: 0,1
- c. additives Vererbungsmodell.

Die Anpassung der gefundenen SNP-Genotypfrequenzen an das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht wird in der Kontrollgruppe getestet. Dafür verwenden wir einen Pearson χ^2 -Test, der über das Internetportal des Helmholtz-Zentrums München (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>) durchführbar ist. Die Hypothesen für den Test lauten:

H_0 : Keine Abweichung der Genotypfrequenzen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

H_1 : Abweichung der Genotypfrequenzen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Das Signifikanzniveau liegt bei $p = 10^{-4}$. Für $p \geq 10^{-4}$ kann die Nullhypothese nicht abgelehnt werden. Damit gilt das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht als erfüllt.

Um die Frage zu beantworten, ob signifikante Unterschiede der „minor allele frequency“ (MAF) des SNPs rs1048990 zwischen der japanischen und der von uns genotypisierten deutschen Population bestehen, wird ein zweiseitiger Fisher Exact Test mit folgenden Hypothesen durchgeführt:

H_0 : MAF unterscheidet sich nicht zwischen beiden Populationen.

H_A : MAF unterscheidet sich zwischen beiden Populationen.

Für $p \leq 0,05$ wird H_0 abgelehnt und H_A angenommen.

Schließlich werden die Genotypfrequenzen der Fall- und Kontrollgruppe durch einen zweiseitigen Cochran-Armitage-Trend-Test verglichen.

H_0 : Genotypfrequenzen in Patienten- und Kontrollgruppe unterscheiden sich nicht.

H_A : Genotypfrequenzen in Patienten- und Kontrollgruppe unterscheiden sich.

Als statistisch signifikant gelten p-Werte $\leq 0,05$. Sie führen zur Ablehnung der Nullhypothese und Annahme der Alternativhypothese. Dies erfolgt im Institut für medizinische Biometrie und Statistik der Universität zu Lübeck durch Dipl.-Statistikerin Anika Großhenning unter Verwendung des Statistikprogramms „StatXact 8“. Die Ablehnung von H_0 im Test für p-Trend-Werte kleiner 0,05 gibt einen Hinweis auf eine Assoziation des SNPs mit dem Herzinfarkt.

2.8 Hypothesen-bildende Studie zur Rolle des Proteasoms und NF- κ B-Signaltransduktionswegs in der Pathogenese des Herzinfarkts

2.8.1 Multistage-Ansatz bei der Untersuchung eines Stoffwechselwegs

In unserer Hypothesen-bildenden Studie werden SNPs innerhalb von am Proteasom-Entzündungs-Signaltransduktionsweg beteiligten Genen systematisch anhand der Genotypisierungsdaten aus der Deutschen Herzinfarktfamilienstudie 1 und 2 (German MIFS I bzw. II) untersucht. Zusätzliche Kontrollprobanden entstammen dem KORA Survey 4 (n = 820) aus Augsburg und der PopGen-Studie (Population Genetic Cohort) aus Schleswig-Holstein (n = 478).

Da Assoziationsstudien zu falsch positiven Ergebnissen tendieren, verfolgen wir einen mehrstufigen Ansatz (44). Zunächst wird ein Screening der entsprechenden Genloci auf mögliche Assoziation von SNPs mit dem Herzinfarkt durchgeführt, wobei ein großzügiger p-Wert für die Annahme einer hypothetischen Assoziation angewendet wird. Wir nehmen dabei in Kauf, dass eine gewisse Anzahl falsch positiver SNPs diesen ersten Schritt überdauert. Diese gilt es, in den folgenden Schritten herauszufiltern. Die erste Stufe dient also der Generierung von Hypothesen für mögliche Assoziationen genetischer Marker mit dem Herzinfarkt.

In der zweiten Stufe werden die identifizierten SNPs in einer unabhängigen Population getestet. Hier wird ein strengerer Grenzwert (p-Wert) für eine signifikante Assoziation angewendet. Je mehr SNPs aus der initialen Hypothesen-bildenden Studie in dieser Phase untersucht werden, desto höher muss das Signifikanzniveau sein, damit ein SNP als signifikant mit dem Herzinfarkt assoziiert bezeichnet werden kann. Dies bezeichnet man als Korrektur für Multiples Testen.

Wenn hierbei zur Genotypisierung eine andere Methode als in Stufe 1 durchgeführt wird, lässt sich die Wahrscheinlichkeit für falsch positive Ergebnisse reduzieren, die z. B. durch technische Artefakte entstehen (94).

2.8.2 Vorgehen bei Hypothesen-bildenden Studien

Am Anfang steht die Suche nach relevanten Genen, die an der Bildung des Proteasoms, NF- κ Bs und an dessen Signaltransduktionsweg beteiligt sind. Als Quelle hierfür dienen die Übersichtsarbeiten von Powell (75) (Proteasom), Gilmore (30) und Gosh (29) (NF- κ B) sowie Karin (54) (IKK, NIK) und Perkins (74). Zusätzlich werden über die Internetdatenbank KEGG der Stoffwechselweg und beteiligte Proteine dargestellt und auf Vollständig-

keit überprüft (52). Da für die Gene des Signaltransduktionswegs in den Publikationen teilweise unterschiedliche Nomenklaturen Verwendung finden, werden die Gene in der Internetplattform „EntrezGene“ des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI, USA) aufgesucht, in der die Genbezeichnungen in den verschiedenen Nomenklaturen aufgelistet sind.

Prinzipiell können auch SNPs in den Promotorregionen von Genen über eine Veränderung der Transkriptionsrate Einfluss auf den Signaltransduktionsweg nehmen, weshalb wir im Folgenden auch diese sowie untranslatierte Regionen am 3'-Ende der Gene in unsere Untersuchung einbeziehen. Die chromosomale Position der Gene bestimmen wir mit Hilfe der Datenbank SNPper (77).

Um einen Überblick über die LD-Struktur der Gene, also die Beziehung der SNPs untereinander, zu erlangen, betrachten wir die Daten des internationalen HapMap-Projektes (data release 23a/phase II, März 2008, basierend auf NCBI B36 assembly, dbSNP b 126) zu den jeweiligen Regionen im Programm Haploview (4). Als Datenquelle für Haploview dienen die „SNP genotype data“, die über die HapMap-Datenbank herunter geladen werden (http://www.hapmap.org/cgi-perl/gbrowse/hapmap_B36/). Mit Hilfe des Programms lassen sich eine LD-Karte und die durch das International HapMap-Projekt ermittelten Allelfrequenzen für die SNPs eines chromosomalen Abschnitts darstellen.

Im nächsten Schritt werden aus den Haplotyp-Informationen aus dem HapMap-Projekt LDU-Karten für die einzelnen Gene erstellt. Grundlage hierfür sind Daten zu den „phased haplotypes“, die ebenfalls über die HapMap-Datenbank herunter geladen werden. Die Berechnung der LDU-Werte erfolgt im IMBS durch Dipl.-Statistikerin Anika Großhenning. Aus dem Kurvenverlauf der LDU-Karten werden Haplotyp-Blöcke abgeleitet, mit deren Hilfe wir später die prozentuale Abdeckung der Gene des Proteasom-Entzündungs-Signaltransduktionswegs durch die Genotypisierungsdaten aus der Deutschen Herzinfarktfamilienstudie 2 berechnen.

Nun wird eine Abfrage der GerMiFS I- und GerMiFS II-Datenbanken des Instituts für Medizinische Biometrie und Statistik (IMBS) der Universität zu Lübeck für die Gene des Proteasom-Entzündungs-Stoffwechsels durchgeführt. Die hier verzeichneten SNPs sind mittels eines Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 genotypisiert bzw. mit Hilfe des Programms „MACH 1.0“ imputiert worden.

Die SNPs aus dem Proteasom-Entzündungs-Signaltransduktionswegs werden auf folgende Qualitätskriterien hin überprüft:

- Häufigkeit des seltenen Allels (MAF) $\geq 0,01$
- Keine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ($P_{\text{HWD_unaff}} > 10^{-4}$)
- Nur für imputierte SNPs: $\text{RSqMean } r^2 > 0,7$ (Maß für die Übereinstimmung von wahren und imputierten Genotypen).

SNPs, die diese Kriterien nicht erfüllen, werden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Für genotypisierte Polymorphismen werden die Intensitäts-Clusterplots erstellt, um die Qualität der Genotypisierung bewerten zu können. Erfüllt ein Clusterplot nicht die oben genannten Kriterien, so wird der entsprechende SNP verworfen.

Nun wird durch Abgleich der Haplotyp-Blöcke innerhalb der LDU-Karten mit den qualitätskontrollierten SNPs die prozentuale Abdeckung der einzelnen Gene durch die Genotypisierungsdaten der GerMiFS I und –II berechnet. Ist innerhalb eines Haplotyp-Blocks ein SNP in unseren Daten vorhanden und erfüllt dieser die geforderten Qualitätskriterien, gilt dieser Block als abgedeckt. Die prozentuale Abdeckung des betrachteten Gens ergibt sich aus der Anzahl der abgedeckten Haplotyp-Blöcke dividiert durch die Gesamtzahl der Blöcke innerhalb der Region.

Anschließend kommt ein weiteres Qualitätskriterium zum Einsatz: SNPs, die beim Vergleich der Genotypfrequenzen zwischen Herzinfarktpatienten und Kontrollgruppe mittels des Cochran-Armitage-Trend-Tests einen p-Trend-Wert größer 0,05 aufweisen, sind von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen. Für sie kann die Nullhypothese (H_0 : Es besteht kein Unterschied der Genotypfrequenzen zwischen Fall- und Kontrollgruppe) nicht abgelehnt werden. Unter den noch verbliebenen SNPs gelten die Polymorphismen, die sowohl in der GerMiFS I- als auch GerMiFS II-Datenbank einen p-Trend-Wert $\leq 0,05$ aufweisen, als mögliche Kandidaten für eine Assoziation mit dem Herzinfarkt. Mit Hilfe der NCBI-Datenbank wird überprüft, ob bereits eine Assoziation für diese SNPs bekannt ist.

Die so identifizierten SNPs werden mittels ihrer rs-Nummer in der SNPper-Datenbank aufgesucht, um Informationen zu ihrer Funktion im Gen zu gewinnen.

Im nächsten Schritt werden falsch positive Ergebnisse herausgefiltert. Dazu nutzen wir die Fancy plots, in denen SNPs, die möglicherweise mit dem Herzinfarkt assoziiert sind, als lead SNP verwendet werden. Ihre Generierung erfolgt im Institut für Biometrie und Statistik durch Dipl.-Bioinformatikerin Christina Willenborg. So wird die LD-Beziehung zwischen lead SNP und allen SNPs der Region, die die initialen Qualitätskriterien erfüllt haben, visualisiert. Befinden sich in der Nachbarschaft eines lead SNPs weitere SNPs mit

einem p-Trend-Wert $< 0,05$ (entsprechend der graphischen Darstellung oberhalb der Hilfslinie), die in hoher LD zu diesem stehen, so hat dieser lead SNP die Screening Phase überstanden. Die Wahrscheinlichkeit für ein falsch positives Ergebnis ist für solche lead SNPs nämlich geringer, als für lead SNPs, die in der entsprechenden Region alleine einen p-Trend-Wert $< 0,05$ aufweisen.

Im anschließenden Replikationsstadium werden die in der Screening-Phase auffälligen SNPs in weiteren Myokardinfarkt-Kollektiven auf Assoziation mit dem Herzinfarkt überprüft. Dafür ist die Berechnung der benötigten Anzahl an Fall- und Kontrollprobanden für eine ausreichende Studienpower nötig. Wir verwenden erneut das Programm „Quanto“.

2.8.4 Statistische Methoden

Die Anpassung der Genotypfrequenzen an das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht wird mittels des Monte Carlo χ^2 goodness-of-fit Tests im IMBS geprüft.

Die Hypothesen für den Test lauten:

H_0 : Genotypfrequenz des SNPs ist im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

H_A : Genotypfrequenz des SNPs ist nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Die Ergebnisse dieser Analyse werden für jeden SNP in der Datenbank angezeigt. Das Signifikanzniveau liegt bei $p = 10^{-4}$. Für $p > 10^{-4}$ kann H_0 nicht abgelehnt werden und damit keine signifikante Abweichung der Genotypfrequenz des genotypisierten SNPs vom Hardy-Weinberge-Gleichgewicht nachgewiesen werden.

Um die Größe der Fall- und Kontrollgruppen für die anschließende Replikationsstudie zu berechnen, verwenden wir das Programm „Quanto“ mit folgenden Grundannahmen:

- Effektgröße (Odds Ratio): 0,8
- α -Fehler (einseitig und korrigiert für multiples Testen): 0,0167 (0,05/Anzahl der untersuchten SNPs, $n = 3$).
- Angestrebte Power: 0,8
- Charakteristika der Studie:
 - a. MAF = 0,2
 - b. Basisrisiko der Bevölkerung = 0,1
 - c. additives Vererbungsmodell.

In der Replikation sollen die in der Hypothesen-bildenden Studie gefundenen Effekte bestätigt werden. Deshalb wird der p-Trend-Test nur einseitig durchgeführt und der α -Fehler ebenfalls nur einseitig angegeben. Die Korrektur für Multiples Testen nach

Bonferroni findet statt, um die Wahrscheinlichkeit für falsch positive Ergebnisse auf Grund von Zufallsschwankungen zu verringern (26, 94). Die Formel lautet:

$$\alpha_p = \alpha_G / G$$

α_p : Lokales Signifikanzniveau

α_G : Globales Signifikanzniveau

G: Anzahl der durchgeführten Tests

Die weiteren statistischen Methoden werden, wie auf Seite 33 beschrieben, durchgeführt.

III. Ergebnisse

3.1 Genotypisierung von SNPs aus dem *PSMA6*-Gen

Im Rahmen des ersten Teils dieser Doktorarbeit wurden fünf SNPs aus dem *PSMA6*-Gen in einem Patientenkollektiv der Deutschen Herzinfarktfamilienstudie 1 genotypisiert. Als Übersicht sind die klinischen Charakteristika des untersuchten Kollektivs in Tabelle 2 dargestellt.

Parameter	Herzinfarkt-Patienten	Kontrollprobanden
N	1211	1023
Männer (%)	782 (64.6)	379 (37.0)
Alter, Jahre	58.16 $\pm$ 8.56	56.81 $\pm$ 9.91
Body mass index, kg/m ²	27.45 $\pm$ 3.66	26.69 $\pm$ 4.17
Blutdruck systolisch mmHg	137.99 $\pm$ 19.68	134.04 $\pm$ 17.51
Blutdruck diastolisch mmHg	82.41 $\pm$ 10.27	82.07 $\pm$ 9.78
Cholesterin gesamt, mg/dl	227.73 $\pm$ 45.96	238.30 $\pm$ 42.32
HDL Cholesterin, mg/dl	50.63 $\pm$ 13.28	60.52 $\pm$ 15.27
LDL Cholesterin, mg/dl	151.13 $\pm$ 42.54	147.49 $\pm$ 34.48
Raucherstatus (%)	822 (67.9)	515 (50.4)
Diabetes (%)	197 (16.3)	56 (5.5)

Tabelle 2: Basisdaten der Population der Deutschen Herzinfarktfamilienstudie 1 aufgeteilt nach Herzinfarktpatienten und Kontrollprobanden. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung bei den kontinuierlichen Variablen und Häufigkeiten in % bei den binären Variablen.

3.1.1 Qualitätskontrolle der Genotypisierung

Inklusive der doppelt bestimmten Proben und der Negativkontrollproben (NTCs) wurden insgesamt 2832 Genotypisierungsreaktionen durchgeführt (Frauen: 1248 Reaktionen, Männer: 1584 Reaktionen). Erfolg und Qualität von PCR und Genotypisierung wurden anhand der oben beschriebenen Kriterien überprüft, um Unregelmäßigkeiten zu erkennen und fehlerhafte Genotypisierungen wiederholen zu können.

3.1.1.1 Bewertung von Fluoreszenzsignalkurven und Signalintensitätsplots

Aus der Zunahme der Fluoreszenzsignalintensität in den auf dem 7900HT durchgeführten PCRs lässt sich ableiten, dass eine ausreichende Amplifikation der Zielregion während der PCR für einen Großteil der Proben auf den Mikrotiterplatten stattgefunden hat. In Abbildung 5 ist das im Laufe der PCR-Zyklen ansteigende Fluoreszenzsignal beispielhaft für eine Mikrotiterplatte dargestellt.

Für einige Proben, die durch das „Sequence Detection System 2.1“ des 7900HT keinem Genotyp zugeordnet werden konnten, wurde der Genotyp manuell festgelegt. Dies erfolgte unter Berücksichtigung der Verlaufs des Fluoreszenzsignals während der PCR sowie der Signalintensitätsplots, die bei der allelischen Diskriminierung generiert wurden. Beispiele für die nachträgliche Bewertung der Signalintensitätsplots zeigt Abbildung 12.

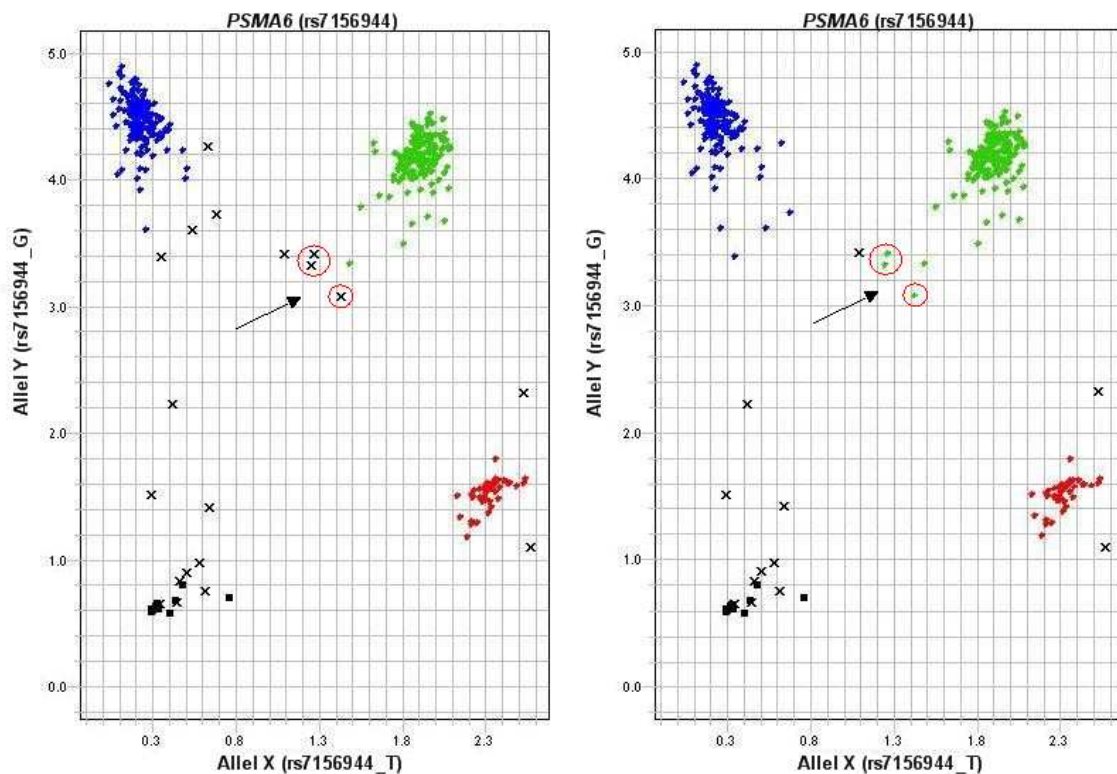


Abbildung 12: Signalintensitätsplots der allelischen Diskriminierung des SNPs rs7156944 vor (links) und nach (rechts) manueller Korrektur der Genotypzuordnung (Pfeile). Die Fluoreszenzsignalintensitäten der allelspezifischen Farbstoffe sind gegeneinander aufgetragen (x- bzw. y-Achse). Jeder Punkt im Graphen steht für eine untersuchte Probe. Aufgrund der räumlichen Nähe zur grünen Punktwolke sowie anhand des Verlaufs ihrer Fluoreszenz-Intensität während der PCR wurden die markierten Proben (rote Kreise) der heterozygoten Genotypgruppe zugeordnet.

Die absoluten und relativen Häufigkeiten der manuellen Änderung der Genotypzuordnung für die untersuchten SNPs sind getrennt für Männer und Frauen in Tabelle 3 dargestellt.

SNP	Männer	Prozent	Frauen	Prozent
rs4982254	824	52,0%	245	19,6%
rs2277459	703	44,4%	717	57,5%
rs1048990	21	1,3%	18	1,4%
rs11621075	23	1,5%	2	0,2%
rs7156944	21	1,3%	4	0,3%
Proben (gesamt)	1584		1248	

Tabelle 3: Manuelle Änderung der Genotypzuordnung der SNPs. Dargestellt sind absolute und relative (%) Häufigkeit getrennt nach Männern und Frauen. Die relativen Häufigkeiten beziehen sich auf die Gesamtzahl der durchgeführten Genotypisierungsreaktionen (inklusive doppelt bestimmten und NTC-Proben).

Auffällig sind die relativ häufigen Korrekturen der Genotypzuordnung für die SNPs rs2277459 (Männer: 703 [44,4%]; Frauen: 717 [57,5%]) und rs4982254 (Männer: 824 [52,0%]; Frauen: 245 [19,6%]) sowohl bei Männern als auch bei Frauen, wogegen diese bei den übrigen SNPs unter 2% liegt.

3.1.1.2 Abgleich des Ergebnisses doppelt genotypisierter Proben sowie NTCs

Bei einem Herzinfarktpatienten kam es bei der automatischen Genotypzuordnung zu einem diskrepanten Ergebnis zwischen den Doppelwerten (rs11621075 & rs7156944, ID 8918501, Platte 2R bzw. 3R). In einem weiteren Fall entstand durch manuelle Änderung der Genotypzuordnung eine Diskrepanz der Doppelwerte (rs2277459, ID 7538701, Platte 2RF L006 und 4RF K006). Beide Proben wurden von der weiteren Auswertung ausgeschlossen.

3.1.2 Statistische Auswertung

3.1.2.1 Genotypisierung von fünf SNPs aus dem *PSMA6*-Gen

Insgesamt konnte bei 32 Herzinfarktpatienten und drei Kontrollprobanden keiner der fünf SNPs genotypisiert werden. Die Ausfallquote (Missing frequency) für die einzelnen SNPs findet sich in Anhang 3.

Die Ergebnisse der Genotypisierung der SNPs rs4982254, rs 2277459, rs1048990, rs11621075 und rs7156944 sowie die jeweiligen Genotypfrequenzen sind in Tabelle 5 dargestellt.

3.1.2.2 Anpassung der Genotypfrequenzen an das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Die Genotypfrequenzen der Kontrollgruppen testeten wir mit Hilfe eines internetbasierten Pearson χ^2 -Test auf Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Für alle Gruppen liegen die p-Werte oberhalb des Signifikanzniveaus ($p \geq 10^{-4}$), weshalb die Nullhypothese (H_0 : Keine Abweichung der Genotypfrequenzen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht) nicht abgelehnt werden kann und das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht für die Kontrollgruppe als erfüllt angesehen wird (siehe Anhang 2). Die Umrechnung von Genotypfrequenzen in Allelfrequenzen ist damit möglich. Diese sind in Tabelle 5 dargestellt.

3.1.2.3 Vergleich der Genotypfrequenzen zwischen Fall- und Kontrollgruppe (Cochrane-Armitage-Trend-Test)

Im Cochrane-Armitage-Trend-Test ergibt sich für keinen der untersuchten SNPs ein signifikanter Unterschied der Genotypfrequenzen zwischen Fall – und Kontrollgruppe ($p > 0,05$). Deshalb wird die Nullhypothese (H_0 : Genotypfrequenzen in Patienten- und Kontrollgruppe unterscheiden sich nicht.) nicht abgelehnt. In unserer Studie zeigen die untersuchten SNPs also keine Assoziation mit dem Herzinfarkt. Die Ergebnisse der Genotypisierung sowie die p-Werte des Cochrane-Armitage-Trend-Tests sind in Tabelle 5 gezeigt.

3.1.2.5 Berechnung der Power unserer Studie

Für den SNP rs1048990 ergab sich in unserer Studie unter den Kontrollprobanden der Deutschen Herzinfarktfamilienstudie 1 eine MAF von 16,2 % für das G-Allel (siehe Tabelle 5). Im zweiseitigen Fisher Exact Test zeigte sich, dass der Unterschied der Frequenz des G-Allels im Vergleich zwischen der deutschen (16,2%, $n = 949$) und der von Ozaki et al. untersuchten japanischen Kontrollpopulation (30,3%, $n = 2,851$) statistisch signifikant ist ($p < 10^{-4}$).

In Anbetracht der geringeren MAF von 16,2% und der Größe des untersuchten Kollektivs weist unsere Studie bei einem erwarteten genetischen Effekt von 1,21 (Odds Ratio in der japanischer Population) eine Power von 66,7% auf, eine Assoziation zwischen dem betrachteten SNP und dem Herzinfarkt in unserem deutschen Kollektiv nachzuweisen.

Bei deutlich höherer MAF ergab die Berechnung mit dem Programm „Quanto“ eine Power von mehr als 80% für die SNPs rs11621075 (81,0%) und rs7156944 (84,9%). Eine Übersicht über die Ergebnisse der Power-Analyse gibt Tabelle 4.

SNP	MAF (Kontrollgruppe)	OR	Power
rs4982254	23,8%	1,21	78,5%
rs2277459	3,8%	1,21	23,0%
rs1048990	16,2%	1,21	66,7%
rs11621075	26,3%	1,21	81,0%
rs7156944	32,0%	1,21	84,9%

Tabelle 4: Ergebnis der Power-Analyse für die untersuchten SNPs aus dem *PSMA6*-Gen unter Berücksichtigung ihrer MAF (minor allele frequency) und einer erwarteten Effektstärke (Odds Ratio), wie sie in der Studie von Ozaki et al. (71) für den SNP rs1048990 gefunden wurde.

SNP (Lage)	Genotyp	Anzahl und Genotypfrequenz			
		Fälle	Prozent	Kontrollen	Prozent
RS4982254 (Promotor)	CC	643	57,0%	569	57,8%
	CT	426	37,8%	361	36,7%
	TT	59	5,2%	54	5,5%
	Gesamt	1128		984	
	Allelfrequenz T (MAF)	24,1%		23,8%	
	p-Trend-Wert	0,8285			
RS2277459 (Exon 1)	GG	1018	91,9%	886	92,7%
	GA	87	7,9%	67	7,0%
	AA	3	0,3%	3	0,3%
	Gesamt	1108		956	
	Allelfrequenz A (MAF)	4,2%		3,8%	
	p-Trend-Wert	0,5436			
RS1048990 (Exon 1)	CC	778	68,7%	663	69,9%
	GC	325	28,7%	264	27,8%
	GG	29	2,6%	22	2,3%
	Gesamt	1132		949	
	Allelfrequenz G (MAF)	16,9%		16,2%	
	p-Trend-Wert	0,5473			
RS11621075 (Intron 1)	AA	657	58,5%	539	54,6%
	AG	395	35,1%	376	38,1%
	GG	72	6,4%	72	7,3%
	Gesamt	1124		987	
	Allelfrequenz G (MAF)	24,0%		26,3%	
	p-Trend-Wert	0,0811			
RS7156944 (3' UTR)	TT	511	46,1%	457	47,2%
	TG	497	44,9%	404	41,7%
	GG	100	9,0%	108	11,1%
	Gesamt	1108		969	
	Allelfrequenz G (MAF)	31,5%		32,0%	
	p-Trend-Wert	0,7096			

Tabelle 5: Dargestellt sind die absoluten und relativen Genotyphäufigkeiten der einzelnen SNPs getrennt nach Fall- und Kontrollgruppe. Weiterhin sind die berechneten Allelfrequenzen für die seltenen Allele sowie die p-Trend-Werte aus dem Vergleich der Genotypfrequenzen von Fall- und Kontrollgruppe mittels Cochran-Armitage-Trend-Test gezeigt. Keiner der untersuchten SNPs zeigt einen signifikanten Unterschied der Genotypfrequenzen zwischen Fall- und Kontrollgruppe. Sämtliche p-Trend-Werte erreichen nicht das Signifikanzniveau von 0,05. Deshalb wird die Nullhypothese (H_0 : Genotypen in Patienten- und Kontrollgruppe unterscheiden sich nicht.) nicht abgelehnt. Es findet sich keine Assoziation der untersuchten SNPs mit dem Myokardinfarkt.

3.2 Gene des Proteasom-Entzündungs-Signaltransduktionswegs

Um neue Hypothesen für die Assoziation mit dem Herzinfarkt zu generieren, wurden mittels der Genotypisierungsdaten aus der Deutschen Herzinfarktfamilienstudie 1 und 2 SNPs aus insgesamt 52 Genen untersucht, die im Proteasom-Entzündungs-Signaltransduktionsweg eine Rolle spielen. Nach Durchlaufen der oben genannten Analysestufen konnten drei SNPs identifiziert werden, die möglicherweise mit dem Herzinfarkt assoziiert sind. Darunter befinden sich zwei SNPs aus der Promotorregion des *IKBKE*-Gens auf Chromosom 1 (rs11576488, rs9429769) sowie ein weiterer SNP aus der Promotorregion des *PSMD3*-Gens (rs921651), das auf Chromosom 17 lokalisiert ist. Diese SNPs wurden anschließend in einer unabhängigen Population des Welcome Trust Case Control Consortiums (WTCCC) auf Assoziation mit dem Herzinfarkt getestet.

3.2.1 Repräsentation der Gene des Signaltransduktionswegs in Genotypisierungsdaten der Deutschen Herzinfarktfamilienstudien

Um eine Aussage darüber treffen zu können, wie vollständig die genetische Variabilität innerhalb der Gene des Proteasom-Entzündungs-Signaltransduktionswegs in dieser Arbeit erfasst wurden, überprüfen wir zunächst die Abdeckung der Haplotyp-Blöcke der beteiligten Gene durch mindestens einen SNP aus den Genotypisierungsdaten der Deutschen Herzinfarktfamilienstudie 2, der die Kriterien der 1. Stufe Analyse erfüllt hat. Die im Rahmen dieser Doktorarbeit untersuchten Gene sowie deren prozentuale Abdeckung sind in Tabelle 6 dargestellt.

Protein	Gen	Synonym	Chromosom	Haplotyp-Block-Abdeckung
Proteasom 20S-UE	<i>PSMA1</i>	UE alpha 1	chr11p15.1	vollständig
	<i>PSMA2</i>	UE alpha 2	chr7p13	vollständig
	<i>PSMA3</i>	UE alpha 3	chr14q23	vollständig
	<i>PSMA4</i>	UE alpha 4	chr15q25.1	vollständig
	<i>PSMA5*</i>	UE alpha 5	chr1p13	vollständig
	<i>PSMA6</i>	UE alpha 6	chr14q13	vollständig
	<i>PSMA7</i>	UE alpha	chr20q13.33	75%
	<i>PSMA8</i>	UE alpha 7	chr18q11	vollständig
Proteasom 20S-UE	<i>PSMB1</i>	UE beta 1	chr6q27	vollständig
	<i>PSMB2</i>	UE beta 2	chr1p34.2	vollständig
	<i>PSMB3</i>	UE beta 3	chr17q12	vollständig
	<i>PSMB4*</i>	UE beta 4	chr1q21	gering
	<i>PSMB5</i>	UE beta 5	chr14q11.2	75%
	<i>PSMB6*</i>	UE beta 6	chr17p13	gering
	<i>PSMB7</i>	UE beta 2	chr9q34.11	vollständig
	<i>PSMB8</i>	UE beta 5i	chr6p21.32	vollständig
	<i>PSMB9</i>	UE beta 1i	chr6p21.3	vollständig
	<i>PSMB10*</i>	UE beta 2i	chr16q22.1	vollständig

Protein	Gen	Synonym	Chromosom	Haplotyp-Block-Abdeckung
Proteasom 19S-UE	<i>PSMC1</i>	Rpt2	chr14q32.11	vollständig
	<i>PSMC2</i>	Rpt1	chr7q22.1	vollständig
	<i>PSMC3</i>	Rpt5	chr11p12	vollständig
	<i>PSMC4</i>	Rpt3	chr19q13	75%
	<i>PSMC5*</i>	Rpt6	chr17q23	vollständig
	<i>PSMC6</i>	Rpt4	chr14q22	vollständig
Proteasom 19S-UE	<i>PSMD1</i>	Rpn2	chr2q37.1	vollständig
	<i>PSMD2</i>	Rpn1	chr3q27.1	vollständig
	<i>PSMD3</i>	Rpn3	chr17q12	vollständig
	<i>PSMD4</i>	Rpn10	chr1q21.2	vollständig
	<i>PSMD5*</i>	regulat. UE 5	chr9q33.2	vollständig
	<i>PSMD6</i>	Rpn7	chr3p14.1	vollständig
	<i>PSMD7</i>	Rpn8	chr16q23	vollständig
	<i>PSMD8</i>	Rpn12	chr19q13.2	vollständig
	<i>PSMD9</i>	Rpn4	chr12q24.31	vollständig
	<i>PSMD10*</i>	regulat. UE p28	chrXq22.3	gering
	<i>PSMD11</i>	Rpn6	chr17q11.2	vollständig
	<i>PSMD12</i>	Rpn5	chr17q24.2	vollständig
	<i>PSMD13</i>	Rpn9	chr11p15.5	vollständig
	<i>PSMD14</i>	Rpn11	chr2q24.2	vollständig
Rel/NF-κB-Familie	<i>NFKB1</i>	p105/p50	chr4q24	vollständig
	<i>NFKB2*</i>	p100/p49	chr10q24.32	vollständig
	<i>REL*</i>	<i>c-Rel</i>	chr2p13	vollständig
	<i>RELA</i>	p65	chr11q13	vollständig
	<i>RELB</i>		chr19q13.32	20%
Inhibitor of NF-κB-Familie	<i>NFKBIA*</i>	IKBA	chr14q13.2	gering
	<i>NFKBIB</i>	IKBB	chr19q13.2	~67%
	<i>NFKBIE</i>	IKBE	chr6p21.1	vollständig
	<i>BCL-3</i>		chr19q13.31	vollständig
Inhibitor of NF-κB-Kinase	<i>IKBKA*</i>	CHUK	chr10q24.2	vollständig
	<i>IKBKB</i>		chr8p11	vollständig
	<i>IKBKG*</i>	NEMO	chrXq28	gering
	<i>IKBKE</i>	IKKI/IKKE	chr1q32	vollständig
NF-κB-inducing Kinase	<i>NIK</i>	MAP3K14	chr17q21	vollständig

Tabelle 6: Abdeckung der untersuchten Gene des Proteasom-Entzündungs-Signaltransduktionswegs durch die Genotypisierungsdaten der Deutschen Herzinfarktfamilienstudien. Dargestellt sind ebenfalls die Bezeichnungen der Gene und ihre Lokalisation. Die Haplotyp-Block-Abdeckung für jedes Gen errechnet sich aus der Anzahl an Haplotyp-Blöcken, die durch mindestens einen qualitätsgeprüften SNP aus der Deutschen Herzinfarktfamilienstudie 2 repräsentiert werden, dividiert durch die Gesamtzahl der Haplotyp-Blöcke des Gens (UE: Untereinheit, *:Gene, für die keine LDU-Karte generiert werden konnte).

Insgesamt zehn Gene sind nicht vollständig in unseren Daten repräsentiert. Für einige Gene konnten aus den HapMap-Daten keine LDU-Karten erstellt werden (siehe Tabelle 6).

3.2.2 Ergebnis der Untersuchung des Proteasom-Entzündungs-Signaltransduktionswegs

Aus den Genotypisierungsdaten der beiden Deutschen Herzinfarktfamilienstudien 1 und 2 verblieben nach der initialen Qualitätskontrolle 1194 bzw. 1496 SNPs (1. Stufe). Einen p-Trend-Wert $\leq 0,05$ wiesen noch 202 bzw. 82 SNPs auf (2. Stufe der Analyse). Beim Abgleich der verbleibenden SNPs beider Studien fanden sich 6 SNPs aus 3 Genen, die in beiden Herzinfarktfamilienstudien im Cochrane-Armitage-Trend-Test einen p-Wert $\leq 0,05$ aufweisen. Für sie besteht ein Hinweis auf eine Assoziation mit dem Herzinfarkt. Einen Überblick über den Studienverlauf gibt Abbildung 13.

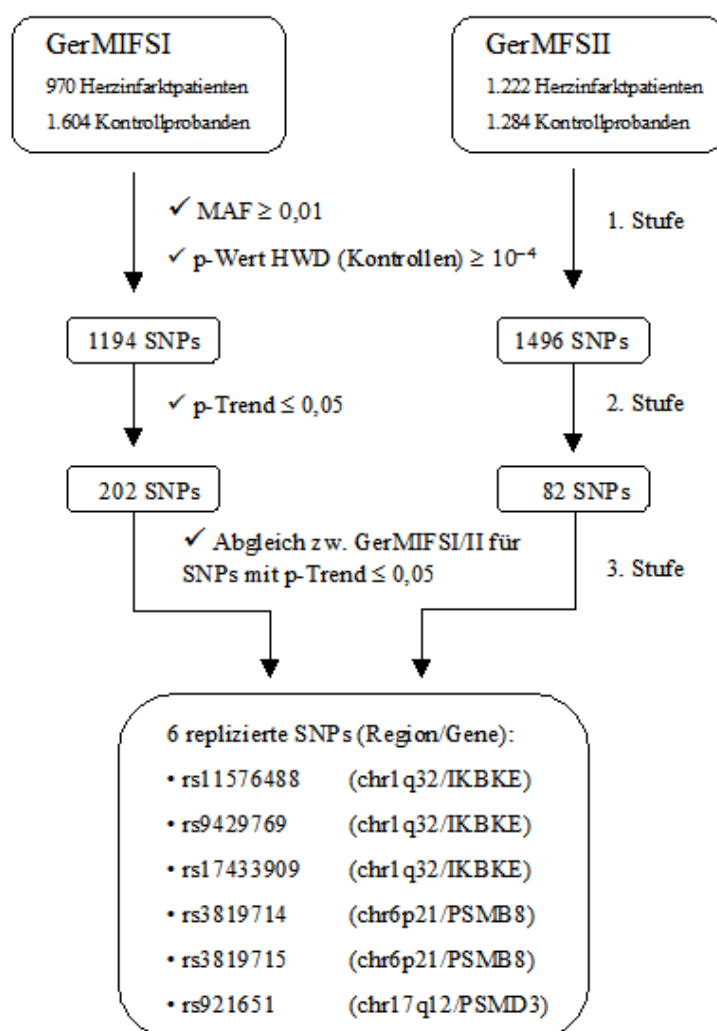


Abbildung 13: Flussdiagramm zum Studienablauf der Analyse des Proteasom-Entzündungs-Signaltransduktionswegs mit Hilfe der Genotypisierungsdaten der Deutschen Herzinfarktfamilienstudie 1 bzw. 2 (GerMIFS I/II). Gezeigt ist die Anzahl an SNPs, die nach den einzelnen Stufen der Untersuchung in der Analyse verbleiben. Schließlich sind die sechs SNPs aus insgesamt drei Genen dargestellt, die in beiden Studien einen p-Trend-Wert $< 0,05$ aufweisen und potentiell mit dem Herzinfarkt assoziiert sind.

Die Genotypisierungs- bzw. Imputationsergebnisse für diese SNPs sind in Tabelle 7 dargestellt. Im Folgenden werden das *IKBKE*- sowie das *PSMB8*- und *PSMD3*-Gen näher beleuchtet.

RS-ID	CHR	BP	MAF	L95	OR	U95	p-Trend	Gen	Funktion	GerMIFS
rs11576488	1	204702193	22,10%	0,763	0,873	0,998	4,22E-02	IKBKE	Promotor	II
rs11576488	1	204702193	20,00%	0,738	0,851	0,982	2,92E-02	IKBKE	Promotor	I
rs9429769	1	204704589	22,30%	0,742	0,848	0,969	1,39E-02	IKBKE	Promotor	II
rs9429769	1	204704589	20,00%	0,739	0,853	0,984	3,10E-02	IKBKE	Promotor	I
rs17433909	1	204718348	6,30%	0,295	0,381	0,491	3,51E-14	IKBKE	Intron	II
rs17433909	1	204718348	2,00%	0,329	0,517	0,814	4,05E-03	IKBKE	Intron	I
rs3819714	6	32912195	36,30%	1,013	1,136	1,275	3,28E-02	PSMB8	DS	II
rs3819714	6	32912195	35,80%	0,781	0,879	0,989	3,05E-02	PSMB8	DS	I
rs3819715	6	32912197	36,30%	1,016	1,14	1,279	2,84E-02	PSMB8	DS	II
rs3819715	6	32912197	35,70%	0,779	0,877	0,987	2,78E-02	PSMB8	DS	I
rs921651	17	35387448	16,90%	0,727	0,843	0,978	2,35E-02	PSMD3	Promotor	II
rs921651	17	35387448	16,90%	0,71	0,828	0,965	1,49E-02	PSMD3	Promotor	I

Tabelle 7: SNPs mit signifikantem p-Trend-Wert im Cochrane-Armitage-Trend-Test (p-Trend) in GerMIFS I und II. Gezeigt sind chromosomale Position (CHR) und Basenposition (BP) der SNPs, „minor allele frequency“ (MAF), Odds Ratio (OR) mit unterer (L95) und oberer (U95) Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, zugehörige Gene sowie die Funktion der entsprechenden Region im Gen (3'-UTR: 3'-untranslated region, DS: downstream). Orange markiert sind die diskrepanten „Odds Ratios“ in GerMIFS I bzw. II für die SNPs rs3819714 und rs3819715.

3.2.2.1 SNPs des *IKBKE*-Gens

Das *IKBKE*-Gen (inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase epsilon) ist auf Chromosom 1 lokalisiert und besteht aus 22 Exons sowie 21 Introns. Nach der initialen Qualitätskontrolle verblieben 48 SNPs, von denen 15 SNPs einen p-Trend-Wert < 0,05 aufwiesen. Für drei von ihnen war dies in beiden Kollektiven der Fall. Sie liegen innerhalb der Promotorregion (rs11576488, rs9429769) sowie in einem Intron (rs17433909) und sind potentiell mit dem Herzinfarkt assoziiert (siehe Tabelle 7). Abbildung 14 gibt einen Überblick über das *IKBKE*-Gen und die Lokalisation der untersuchten SNPs.

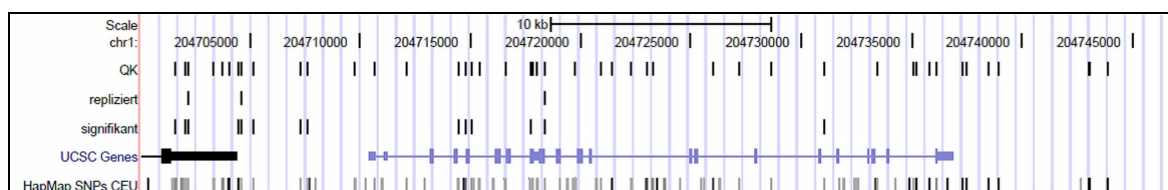


Abbildung 14: Visualisierung des *IKBKE*-Gens im UCSC Genome Browser (55). Markiert sind die Lokalisationen der verbliebenen SNPs nach den einzelnen Stufen der Qualitätskontrolle (1. Stufe: QK, 2. Stufe: signifikant, 3. Stufe: repliziert), sowie die Positionen der HapMap-SNPs der Region (CEU-Population).

Die SNPs rs11576488 und rs9429769 befinden sich in hoher LD zueinander. In der GerMIFS I liegen weitere SNPs in hoher LD zu beiden und überschreiten ebenfalls das Signifikanzniveau (Abbildung 15 a)-d)). Beide SNPs weisen sowohl in der GerMIFS I als auch II bei einer vergleichbaren MAF (rs11576488: 20,0 bzw. 22,1% ; rs9429769: 20,0 bzw. 22,3%) eine Odds Ratio von 0,851-0,873 auf. Die beiden SNPs werden deshalb in einem nächsten Schritt gezielt auf Assoziation mit dem Herzinfarkt getestet.

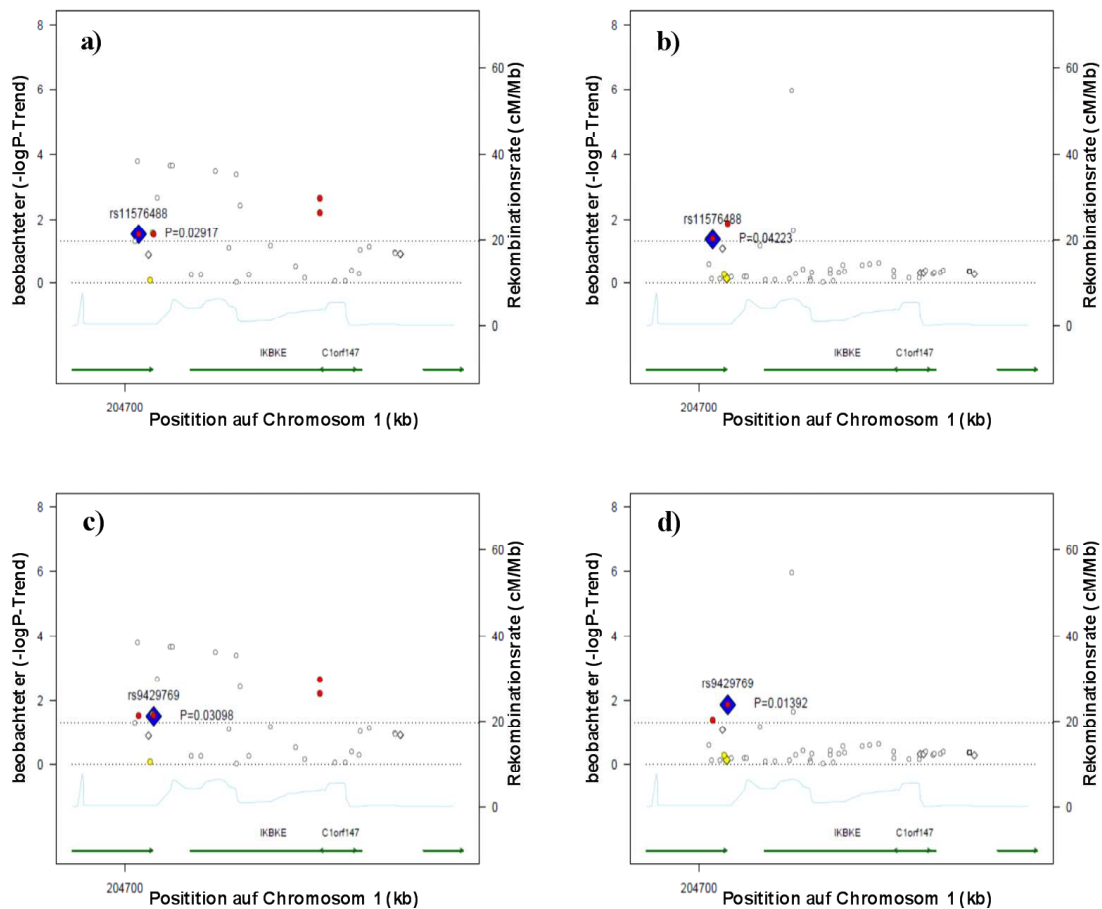


Abbildung 15: Fancy plots für die SNPs rs11576488 (oben) und rs9429769 im Promotor des *IKBKE*-Gens für die Deutsche Herzinfarktfamilienstudie 1 (a,c) bzw. 2 (b,d). Die physikalische Position der SNPs in kb (x-Achse) ist gegen den negativen Logarithmus des ermittelten p-Trend-Werts aufgetragen (y-Achse). Die blaue Raute symbolisiert den lead SNP, Kreise stellen imputierte, kleine Rauten genotypisierte SNPs dar. Die LD-Beziehung zum lead SNP ist farbkodiert (rot: hoch/ $r^2 \geq 0,8$; orange: mittel/ $0,5 < r^2 < 0,8$; gelb: gering/ $0,2 < r^2 < 0,5$; weiß: keine/ $r^2 < 0,2$). Die grünen Pfeile zeigen die Positionen der Gene an. Darüber hinaus ist die lokale Rekombinationsrate (in cM/Mb) aufgetragen.

Der SNP rs17433909, der in der GerMIFS II einen sehr niedrigen p-Trend-Wert aufwies (p-Trend-Wert = $3,51E^{-14}$), wurde von der weiteren Analyse ausgeschlossen, da in den Fancy plots für beide Kollektive sämtliche in hoher LD befindlichen SNPs eindeutig unterhalb des Signifikanzniveaus lagen (siehe Abbildung 16 a) bzw. b)).

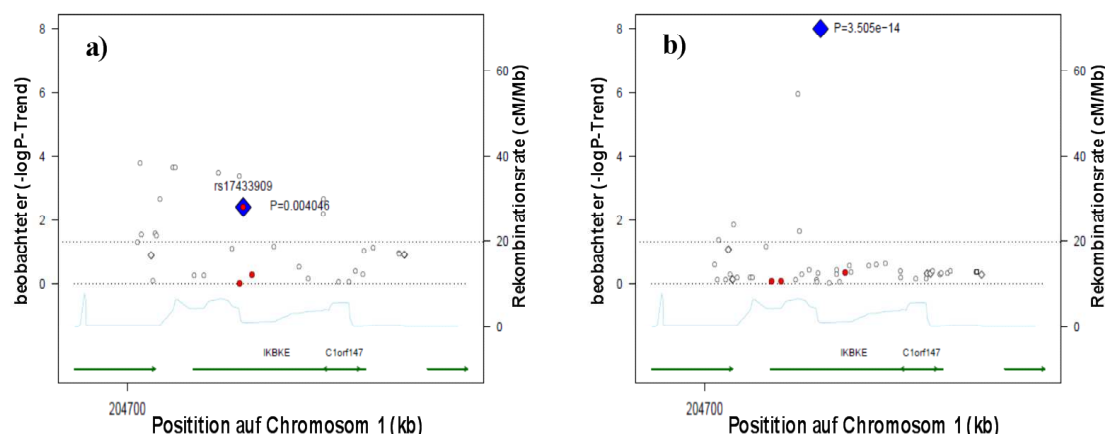


Abbildung 16: Fancy plots des SNPs rs17433909 für die Deutsche Herzinfarktfamilienstudie 1 (a) bzw. 2 (b). Legende siehe Abbildung 15. Trotz des sehr geringen p-Trend-Werts des SNPs in (b) wird er von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen, da die p-Werte der in hoher LD befindlichen SNPs in beiden Deutschen Herzinfarktfamilienstudien deutlich unterhalb des Signifikanzniveaus liegen.

3.2.2.2 SNPs des *PSMB8*-Gens

Das *PSMB8*-Gen kodiert für die β_8 -Untereinheit des humanen 20S-Proteasoms und besteht aus 6 Exons sowie 5 Introns. Die erste Stufe der Qualitätskontrolle überstanden 68 SNPs, von denen 21 einen p-Trend-Wert unterhalb des Signifikanzniveaus aufwiesen (siehe Abbildung 17). Für zwei SNPs (rs3819714 und rs3819715) aus der Promotorregion ergaben sich in beiden Kollektiven p-Trend-Werte $\leq 0,05$, wobei allerdings Diskrepanzen des genetischen Effekts zwischen den beiden Studien auftraten (siehe Tabelle 7). In der GerMIFS I lag die OR bei 0,879 (rs3819714) bzw. 0,877 (rs3819715), wodurch ein Herzinfarkt-protektiver Effekt suggeriert wird. In der GerMIFS II beträgt die OR dagegen 1,136 bzw. 1,140, die dem untersuchten Allel eine Herzinfarkt-fördernde Wirkung zuschreibt. Aus diesem Grund schließen wir beide SNPs von der weiteren Analyse aus.

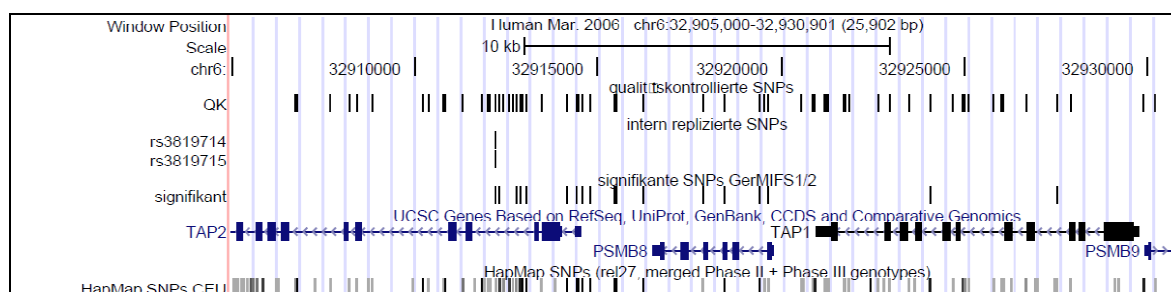


Abbildung 17: Visualisierung des *PSMB8*-Gens im UCSC Genome Browser (55). Legende siehe Abbildung 14.

3.2.2.3 SNPs des *PSMD3*-Gens

Das *PSMD3*-Gen kodiert für die Non-ATPase Untereinheit 3 des humanen 19S-Proteasoms und besteht aus 12 Exons sowie 11 Introns. In unserer Untersuchung verblieben 27 SNPs nach der ersten und 19 SNPs nach der zweiten Stufe der Analyse. Einen Überblick über die Lage der SNPs innerhalb des Gens gibt Abbildung 18.

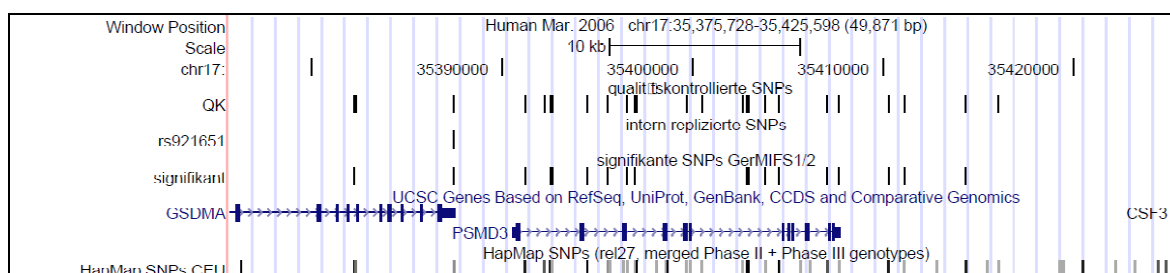


Abbildung 18: Visualisierung des *PSMD3*-Gens im UCSC Genome Browser (55). Legende siehe Abbildung 14.

Der SNP rs921651 weist in beiden Kollektiven eine MAF von 16,9% und einen p-Trend-Wert kleiner 0,05 auf (GerMIFS I: p-Trend-Wert = 1,49E-02, GerMIFS II: p-Trend-Wert = 2,35E-02). Die Odds Ratio liegt bei 0,828 (GerMIFS I) bzw. 0,843 (GerMIFS II), womit dem Allel ein Infarkt-protectiver Effekt zukäme. Im einem Fancy plot weisen mehrere SNPs, die in hoher LD zu rs921651 liegen, ebenfalls einen p-Trend-Wert unter 0,05 auf (Abbildung 19 b). Deshalb ist auch dieser SNP potentiell mit dem Herzinfarkt assoziiert.

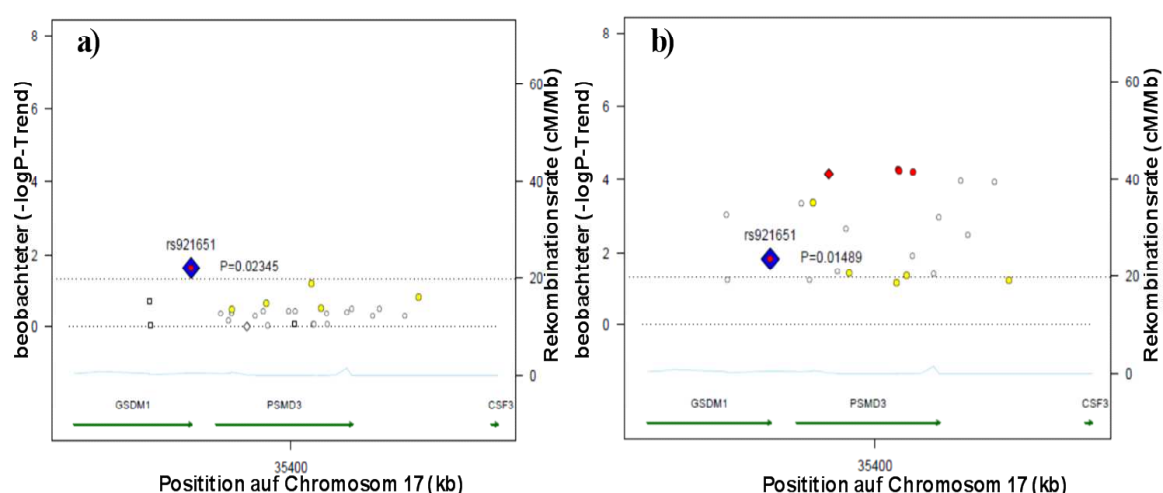


Abbildung 19: Fancy plots des SNPs rs921651 im Promotor des *PSMD3*-Gens für die Deutsche Herzinfarktfamilienstudie 1 (a) bzw. 2 (b). Legende siehe Abbildung 15. SNPs, die sich in hoher LD zum lead SNP befinden, weisen in (b) ebenfalls p-Trend-Werte unter 0,05 auf. In der Deutschen Herzinfarktfamilienstudie 1 existieren keine SNPs, die in hoher LD zum lead SNP liegen (a). Stattdessen finden sich SNPs in mittlerer LD zu rs921651, die sich in der Nähe des Signifikanzniveaus befinden.

3.2.3 Ergebnisse der Anfrage an WTCCC

Wir berechneten mit Hilfe des Programms „Quanto“ die Anzahl an Patienten und Kontrollprobanden, die für eine Power von 80% in einer Replikationsstudie benötigt werden. Die Parameter für die Berechnung sind oben (2.5.3 Berechnung der statistischen Trennschärfe) beschrieben. Es ergab sich eine Patientenzahl von mindestens 977 und eine Kontrollprobandenzahl von 1490.

Im Folgenden übergaben wir die in unserer Studie potentiell mit dem Herzinfarkt assoziierten SNPs dem Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC) zur Überprüfung einer möglichen Assoziation anhand unabhängiger Datensätze aus einer GWA-Studie mit 1926 Patienten und 3004 Kontrollen (81).

In der nun durchgeführten Analyse konnte eine mögliche Assoziation der übermittelten SNPs mit dem Myokardinfarkt nicht bestätigt werden, da für keinen der SNPs ein p-Trend-Wert $< 0,05$ gefunden und somit die Nullhypothese (H_0 : keine Assoziation) nicht abgelehnt werden konnte. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 dargestellt.

SNP	CHR	BP	MAF	L95	OR	U95	p-Trend	Gen	Funktion
rs11576488	1	204702193	20,8%	0,86	0,953	1,055	0,352	IKBKE	Promotor
rs9429769	1	204704589	20,8%	0,86	0,953	1,055	0,352	IKBKE	Promotor
rs921651	17	35387448	10,8%	0,927	1,081	1,26	0,321	PSMD3	Promotor

Tabelle 8: Ergebnis der Datenabfrage des WTCCC für Assoziation der in unserer Studie potentiell mit dem Herzinfarkt assoziierten SNPs. Gezeigt sind chromosomale Position (CHR) und Basenposition (BP) der SNPs, „minor allele frequency“ (MAF), Odds Ratio (OR) mit unterer (L95) und oberer (U95) Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, zugehörige Gene sowie die Funktion der entsprechenden Region im Gen. Kein p-Trend-Wert liegt unterhalb von 0,05, sodass die Nullhypothese nicht abgelehnt wird.

IV. Diskussion

Ausgangspunkt für die vorliegende Doktorarbeit ist die Untersuchung von Ozaki et al., die in einer japanischen Population eine Assoziation des SNPs rs1048990 im *PSMA6*-Gen mit dem Herzinfarkt fanden. Die Arbeitsgruppe konnte eine funktionelle Bedeutung des seltenen G-Allels im Sinne erhöhter *PSMA6*-Transkription zeigen. Experimentelle Blockade der *PSMA6*-Transkription durch siRNA (short interfering RNA) verhinderte eine NF- κ B-Aktivierung durch verminderten Abbau von I κ B. Ozaki und Kollegen folgerten, dass im Umkehrschluss gesteigerte *PSMA6*-Expression über eine erhöhte Aktivität des Ubiquitin-Proteasom-Systems und die Aktivierung von NF- κ B entzündungsfördernd wirken und damit den Herzinfarkt begünstigen könnte (71). Weitere Assoziationsstudien in asiatischen Populationen lieferten allerdings inkonsistente Ergebnisse (43, 64, 88).

In europäischen Populationen konnte bisher keine eindeutige Assoziation eines SNPs aus dem *PSMA6*-Gen mit dem Myokardinfarkt nachgewiesen werden. In sämtlichen Studien an Europäern bezüglich des SNP rs1048990, die während unserer Untersuchung veröffentlicht wurden, wies der potentiell krankheitsfördernde GG-Genotyp eine deutlich niedrigere Prävalenz als im asiatischen Raum auf.

Auch in unserer Studie fanden wir einen signifikanten Unterschied in den Allelfrequenzen des selteneren G-Allels (Ozaki et al.: 30,3%, n = 2851; hier: 16,2%, n = 949; p < 0,0001). Hierdurch ergab sich ein Verlust an Studienpower von 16,2%-Punkten (von 82,9% auf 66,7%) um genetischer Effekte nachweisen zu können, die dem der Studie von Ozaki entsprechen (OR = 1,21) (71). Generell wird bei Assoziationsstudien eine Power von 80% gefordert, um eine vorhandene Assoziation nicht zu übersehen.

Aus diesem Grund können wir eine Assoziation des funktionellen SNP rs1048990 mit dem Herzinfarkt nicht sicher ausschließen. Allerdings stützt die Tatsache, dass weder die Untersuchung der Einzel-SNPs rs4982254, rs2277459, rs1048990, rs11621075 und rs7156944 noch die intern durchgeführte Haplotypanalyse eine signifikante Assoziation aufdecken konnten, die These, dass genetische Polymorphismen im *PSMA6*-Gen keine wesentlichen Risikofaktoren für den Herzinfarkt in der deutschen Bevölkerung darstellen.

Eine neue Studie in einer chinesischen Population hat wiederum eine signifikante Assoziation des SNP rs1048990 mit dem Myokardinfarkt zeigen können (64). Der genetische

Effekt des G-Allels war vergleichbar mit dem von Ozaki et al. beobachteten Effekt (Liu et al.: OR 1,22; Ozaki et al.: OR 1,21) (64, 71).

Somit könnte sich die Bedeutung des SNPs für die Herzinfarktentsstehung vor allem auf den asiatischen Raum beschränken. Es obliegt weiteren Studien, die Rolle des SNPs in anderen asiatischen Populationen zu untersuchen. Generell unterscheiden sich die Allelfrequenzen für krankheitsassoziierte SNPs zwischen verschiedenen Populationen nicht häufiger als die zufällig ausgewählter SNPs. Dennoch konnten Myles und Kollegen deutliche Unterschiede in der Allelfrequenz für SNPs nachweisen, die mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Diabetes mellitus Typ 1 und 2 und Koronarer Herzerkrankung einhergehen (69). Genetische Polymorphismen im *PSMA6*-Gen könnten also in verschiedenen Bevölkerungen durchaus unterschiedliche Bedeutungen in der Pathogenese von Erkrankungen haben.

Im Fall des SNPs rs1048990 ist eine Assoziation mit dem Herzinfarkt in europäischen Populationen aufgrund der geringen Prävalenz des pathogenetisch potentiell bedeutsamen G-Allels allerdings nur durch Studien mit noch größeren Patientenzahlen nachweisbar bzw. auszuschließen.

Zu bedenken ist aber, dass der SNP nicht nur durch seine Auswirkungen auf den NF- κ B-Signaltransduktionsweg, sondern auch durch seinen Einfluss auf die Proteasomfunktion für den sonstigen zellulären Proteinabbau bedeutsam zu sein scheint. Erkrankungen, die auf veränderter proteasomaler Aktivität beruhen, könnten zu frühzeitiger Morbidität und Mortalität führen, sodass die Koronare Herzerkrankung und deren Komplikationen phänotypisch gar nicht in Erscheinung treten. So fanden Freilinger et al. eine Assoziation des SNP rs1048990 mit dem ischämischen Schlaganfall in einer deutschen Population (27).

Auf diese Weise könnte eine Selektion erfolgen hin zu einem Patientenkollektiv mit geringerer Prävalenz des kausalen Allels, wodurch sich das jeweilige Gen der systematischen Untersuchung auf Assoziation mit dem Herzinfarkt entzieht.

Vorstellbar ist auch, dass dem SNP rs1048990 sehr wohl eine Rolle in Frühstadien der Atherosklerose zukommt, andere Faktoren aber maßgeblich für das Komplikationsstadium (z. B. Myokardinfarkt) sind. Hierzu passt die Beobachtung von Takashima et al., dass der GG-Genotyp trotz fehlender Assoziation mit dem Herzinfarkt mit einer signifikanten Vergrößerung der mittleren Intima-Media-Dicke einherging ($n = 433$; $p = 0,025$). Die Verfasser vermuten deshalb einen Beitrag des Allels zur Entstehung der Atherosklerose

(88). Eine Möglichkeit für nachfolgende Studien wäre daher, als Endpunkt statt des klinisch relevanteren Myokardinfarkts die Frühstadien der Atherosklerose zu definieren und als Maß hierfür die Intima-Media-Dicke zu bestimmen.

Ozaki und Mitarbeiter wiesen bei ihrer Untersuchung der biologischen Auswirkungen einer Blockade der *PSMA6*-Transkription eine verminderte NF- κ B-Aktivierung in koronararteriellen Endothelzellen nach. Dies zeigt den funktionellen Zusammenhang zwischen Proteasomaktivität und dem NF- κ B-Signaltransduktionsweg (71).

Deshalb untersuchten wir auf der Basis der Daten der Deutschen Herzinfarktfamilienstudien, ob sich Hinweise auf eine weitere mögliche direkte oder indirekte Assoziation von Polymorphismen innerhalb des Proteasoms oder des nachgeschalteten NF- κ B-Signaltransduktionswegs mit dem Myokardinfarkt ergeben.

Der Großteil der von uns untersuchten Gene ist durch unsere Daten gut repräsentiert (siehe Tabelle 6), allerdings lässt sich keine vollständige Aussage über die Gene *PSMB4*, *PSMB6*, und *PSMD10* des Proteasoms sowie *NFKBIA* (*IKBA*) der NF- κ B-Inhibitor-Familie und *IKBKG* (*NEMO*) treffen. Generell erscheint uns die SNP-Dichte und damit die Abdeckung der Gene durch die SNPs aus der Genotypisierung der Teilnehmer der Deutschen Herzinfarktfamilienstudien mittels des Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 ausreichend, um Stoffwechselwege wie den Proteasom-Entzündungs-Signaltransduktionswegs zu untersuchen. Kandidatengene können kostengünstig anhand bestehender Daten auf mögliche Assoziation mit dem Herzinfarkt getestet und die so gewonnenen Hypothesen mit kostenintensiveren Methoden überprüft werden. Ein Vorteil dieses Vorgehens ist, dass in den späteren Replikationsstudien eine geringere Anzahl an SNPs untersucht werden muss. Beim Anpassen des Signifikanzniveaus aufgrund des multiplen Testens wird dann ein weniger strenger Wert für eine signifikante Assoziation gefordert als bei der initialen Studie, in der eine viel größere Zahl an Markern getestet wurde.

Zur weiteren Erhöhung der Genabdeckung nutzten wir die Imputation von Genotypen. Referenz für die Berechnung der imputierten Genotypen waren dabei die HapMap-Daten für die CEU-Referenzpopulation. Diese können mit hoher Präzision als Referenz bei der Imputation für europäische Kollektive genutzt werden, wie die Untersuchungen von Huang und Mitarbeitern belegen (47). Pei et al. untersuchten die Genauigkeit der Imputationsmethoden der verschiedenen Statistikprogramme, wobei „IMPUTE“ und das von uns verwendete „MACH“ ab besten abschnitten (73).

Die drei von uns identifizierten SNPs aus dem *IKBKE*- und *PSMD3*-Gen, die im WTCCC-Kollektiv auf Assoziation mit dem Herzinfarkt geprüft wurden, liegen alle im Promotorbereich des jeweiligen Gens. Damit besteht die Möglichkeit, dass die Polymorphismen zu einer verstärkten oder verminderten Transkription der jeweiligen Gene und zur Veränderung der Aktivität der Biosynthese der Genprodukte führen. Durch den oben beschriebenen potentiellen Einfluss dieser Proteine auf die NF- κ B-Aktivierung könnte so die NF- κ B-Signalkaskade in Gang gesetzt werden und die Entstehung der Atherosklerose begünstigt sein. Auch können indirekte Assoziationen mit dem Herzinfarkt bestehen, bei denen pathogenetisch bedeutsame Mutationen oder funktionelle Polymorphismen mit den untersuchten SNPs in hoher LD stehen.

Anzumerken ist, dass weder der von Ozaki et al. beschriebene SNP rs1048990 noch andere SNPs aus dem *PSMA6*-Gen in unserer Studie die dritte Analysestufe überstanden haben, weshalb sich auch hier kein Hinweis auf eine Bedeutung des Gens für den Herzinfarkt in der deutschen Bevölkerung ergibt.

Die SNPs rs11576488 und rs9429769 aus dem *IKBKE*-Gen weisen in der Untersuchung des WTCCC eine ähnliche „minor allele frequency“ auf, wie in unserer Studie (WTCCC: 20,8%; GerMIFS: 20,0-22,3%). Beide SNPs befinden sich in diesem Kollektiv in hoher LD zueinander und der genetische Effekt weist in dieselbe Richtung ($OR < 1$). Eine Assoziation mit dem Herzinfarkt kann allerdings nicht nachgewiesen werden (p-Trend-Wert = 0,352).

Im Gegensatz dazu weist der SNP rs921651 aus dem *PSMD3*-Gen zwischen unserer Studie und der des WTCCC einen entgegengesetzten genetischen Effekt auf (WTCCC: $OR = 1,081$; KI: 0,927-1,26; GerMIFS I: $OR = 0,828$; KI: 0,710-0,965; GerMIFS II: $OR = 0,843$, KI: 0,727-0,978), wobei sich die Konfidenzintervalle der OR überschneiden. Auch hier ist keine Assoziation mit dem Herzinfarkt nachweisbar (p-Trend-Wert = 0,321).

Unsere Studie erlaubt keine Aussagen über seltene Polymorphismen ($MAF < 0,01$), die bereits in der ersten Qualitätskontrolle herausgefiltert wurden. Für den Nachweis der Assoziation eines SNPs mit einer $MAF \geq 0,1$ und einem erwarteten genetischen Effekt von $OR \geq 1,3$ liegt die Power unserer Studie über der geforderten Marke von 80%. SNPs mit einer geringeren MAF oder OR werden nicht abgebildet. Unter diesen Voraussetzungen wurden im ersten Hypothesen-generierenden Schritt drei SNPs identifiziert, die potentiell mit dem Herzinfarkt assoziiert sind (rs11576488, rs9429769, rs921651). Außer für diese

SNPs, die für die Replikation an das Welcome Trust Case Control Consortium (WTCCC) weitergeleitet wurden, ergibt sich aus den Daten der Deutschen Herzinfarktfamilienstudien für die häufigen SNPs ($MAF > 0,01$) der in Tabelle 6 genannten Gene des Proteasom-Entzündungs-Signaltransduktionswegs kein Hinweis auf eine Assoziation mit dem Herzinfarkt.

Die Tatsache, dass die SNPs rs11576488, rs9429769 und rs921651 im WTCCC-Kollektiv keine Assoziation zum Herzinfarkt zeigen, kann nach Healy (35) neben tatsächlich nicht vorhandener Assoziation weitere Ursachen haben:

- a) Inadäquate Power: Aufgrund einer Fallzahl von 1926 kann im Kollektiv des WTCCC für eine „minor allele frequency“ von 17% bei einem erwarteten genetischen Effekt von $OR = 0,83$ eine Power $> 80\%$ erreicht werden. Für die mögliche Replikation des SNPs rs921651 ist also eine ausreichende Power gegeben, für die übrigen SNPs (rs11576488 und rs9429769) wird diese trotz höherer MAF wegen der geringeren erwarteten OR nicht erreicht. Hinzu kommt, dass sich die von uns bestimmten p-Trend-Werte für die SNPs nur wenig unterhalb des Signifikanzniveaus von 0,05 befinden. Nach Gorroochurn et al. ist dies ein häufiges Phänomen, das zu einem „Pseudo-Versagen“ bei der Replikation führen kann, wenn ähnliche Fallzahlen wie in der initialen Studie verwendet werden (31). Deshalb kann trotz der ausbleibenden Replikation im WTCCC-Kollektiv die Assoziation dieser SNPs mit dem Herzinfarkt nicht sicher ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund sind weitere Genotypisierungen an größeren Kollektiven wünschenswert.
- b) Phänotyp-Heterogenität: Die Diagnose Herzinfarkt lässt sich anhand eindeutiger Marker stellen (EKG, Herzenzyme) und stellt einen definierten Krankheitszustand dar. Deshalb ist die Phänotyp-Heterogenität zwischen den Daten der Deutschen Herzinfarktfamilienstudien und denen des WTCCC vermutlich keine Ursache für die fehlende Replikation unserer Studienergebnisse.
- c) Multiples Testen: In unserer Hypothesen-bildenden Studie haben wir zunächst bewusst auf das Adjustieren für Multiples Testen verzichtet, um keine möglichen Assoziationen zu übersehen. Im Folgenden haben wir mit verschiedenen Kriterien die Anzahl falsch positiver SNPs stark reduziert und nur die SNPs, die sowohl in den GerMIFS I als auch II einen p-Trend-Wert $< 0,05$ aufwiesen, wurden weiter untersucht. Schließlich erhielten wir drei SNPs, für die wir in der WTCCC-Replikation einen strengeren p-Trend-Wert für eine signifikante Assoziation anlegten (Bonferroni-Correction: α -

Fehler/n; $\alpha = 0,05$; $n = 3$). Es ist allerdings möglich, dass trotz der angewandten Qualitätskontrolle falsch positive Ergebnisse entstanden, die dann im WTCCC-Kollektiv nicht repliziert werden konnten.

d) Publikations-Bias

- e) Populationsstratifikation: Die Populationsstratifikation beschreibt die Existenz mehrerer Subgruppen innerhalb einer untersuchten Population, die sich in der Prävalenz eines genetischen Markers oder eines krankheitsfördernden Allels sowie dem Risiko für die Entstehung dieser Erkrankung unterscheiden. In Fall-Kontroll-Assoziationsstudien kann nun in einer der beiden Gruppen (Fall- oder Kontrollgruppe) eine Subgruppe mit ihrem spezifischen Krankheitsrisiko und der ihr eigenen Genotypfrequenz für den untersuchten Marker überrepräsentiert sein, wodurch sich falsch positive Ergebnisse zeigen (44) oder reale Assoziationen übersehen werden können. In Folge dessen verringert sich die Power der Studie, einen genetischen Effekt aufzudecken (94). Darum ist es für unsere Studie günstig, wenn nur geringe genetische Unterschiede zwischen den untersuchten deutschen Populationen bestehen.

In früheren Studien wurde intensiv die Populationsstratifikation der deutschen Bevölkerung untersucht. Zwischen Nord- und Süddeutschland sowie zwischen Süd- und Ostdeutschland ist die genetische Variabilität gering. Assoziationsstudien komplexer Erkrankungen können also an der deutschen Bevölkerung durchgeführt werden (86). In Bezug auf die drei potenziell mit dem Herzinfarkt assoziierten SNPs rs11576488, rs9429769 und rs921651 in dem deutschen Kollektiv halten wir es für unwahrscheinlich, dass sich die beobachteten möglichen Assoziationen durch die Populationsstratifikation erklären lassen, da der genetische Effekt hierdurch verstärkt wird.

V. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Doktorarbeit untersuchten wir Polymorphismen in Genen, die für das humane Proteasom und Proteine der NF- κ B-Aktivierungskaskade kodieren, auf mögliche Assoziation mit dem Myokardinfarkt.

Bei der Überprüfung der Studienergebnisse von Ozaki et al., die eine Assoziation des funktionellen SNP rs1048990 aus dem *PSMA6*-Gen mit dem Herzinfarkt in einer japanischen Population zeigten, ergaben sich keine Hinweise auf eine solche Assoziation in unserem deutschen Kollektiv (71). Auch vier weitere SNPs, die über das *PSMA6*-Gen verteilt liegen, ließen eine Assoziation vermissen.

In der anschließenden Hypothesen-generierenden Studie untersuchten wir anhand der Daten der Deutschen Herzinfarktfamilienstudien systematisch SNPs aus Genen, die für das Proteasom und den NF- κ B-Signalweg kodierenden, auf mögliche Assoziation mit dem Herzinfarkt. Dabei identifizierten wir drei SNPs, die wir zur Replikation an das WTCCC weiterleiteten. In diesem Kollektiv war allerdings keiner der SNPs signifikant mit dem Herzinfarkt assoziiert.

Insgesamt ergeben sich in der vorliegenden Arbeit keine Hinweise auf eine wesentliche Rolle des Proteasom-Entzündungs-Signaltransduktionswegs für das Auftreten des Myokardinfarkts in der deutschen Bevölkerung. Dies deckt sich mit der derzeitigen Studienlage für die europäischen Populationen, insbesondere in Bezug auf den SNP rs1048990 aus dem *PSMA6*-Gen.

In der Bedeutung des SNP rs1048990 galt das Interesse bisher vor allem asiatischen und europäischen Kollektiven, jeweils mit diskrepanten Ergebnissen (6, 43, 64, 85, 88). Interessant wäre die Untersuchung anderer ethnischer Gruppen, um die globale Bedeutung dieses funktionellen Polymorphismus zu klären.

Um einen Einfluss der untersuchten Gene in der Pathogenese des Herzinfarktes sicher auszuschließen, ist allerdings die Genotypisierung größerer Patientenkollektive nötig. Nur so wäre eine ausreichende Power zu erreichen, damit die initialen Beobachtungen mit hinreichender Wahrscheinlichkeit repliziert werden können.

VI. Literaturverzeichnis

1. Affymetrix: Affymetrix® Genome-Wide Human SNP Array 6.0 data sheet. 2007
2. Applied_Biosystems: TaqMan® Universal PCR Master Mix Protocol. 2002
3. Applied_Biosystems: TaqMan® SNP Genotyping Assays Protocol. 2006
4. Barrett J, Fry B, Maller J, Daly M: Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. 2005
5. Baumeister W, Walz J, Zuhl F, Seemuller E: The proteasome: Paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 92, 367-380 (1998)
6. Bennett DA, Xu P, Clarke R, Zondervan K, Parish S, Palmer A, et al.: The exon 1-8C/G SNP in the PSMA6 gene contributes only a small amount to the burden of myocardial infarction in 6946 cases and 2720 controls from a United Kingdom population. *European Journal of Human Genetics* 16, 480-486 (2008)
7. Bennett MR, Littlewood TD, Schwartz SM, Weissberg PL: Increased Sensitivity of Human Vascular Smooth Muscle Cells From Atherosclerotic Plaques to p53-Mediated Apoptosis. *Circulation Research* 81, 591-599 (1997)
8. Berlett BS, Stadtman ER: Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* 272, 20313-20316 (1997)
9. Bis JC: Variation in inflammation-related genes and risk of incident nonfatal myocardial infarction or ischemic stroke. *Atherosclerosis* 198, 166-173 (2008)
10. Bourcier T, Sukhova G, Libby P: The Nuclear Factor kappa -B Signaling Pathway Participates in Dysregulation of Vascular Smooth Muscle Cells in Vitro and in Human Atherosclerosis. *The Journal of Biological Chemistry* 272, 15817-15824 (1997)
11. Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandl R, Knuechel R, et al.: Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *Journal of Clinical Investigation* 97, 1715-1722 (1996)
12. Brivanlou AH, Darnell JE: Transcription - Signal transduction and the control of gene expression. *Science* 295, 813-818 (2002)
13. Broeckel U, Hengstenberg C, Mayer B, Holmer S, Martin LJ, Comuzzie AG, et al.: A comprehensive linkage analysis for myocardial infarction and its related risk factors. *Nat Genet* 30, 210-214 (2002)
14. Bulteau AL, Lundberg KC, Humphries KM, Sadek HA, Szweda PA, Friguet B, et al.: Oxidative modification and inactivation of the proteasome during coronary occlusion/reperfusion. *Journal of Biological Chemistry* 276, 30057-30063 (2001)
15. Chen L-F, Greene WC: Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5, 392-401 (2004)

16. Collins T, Cybulsky MI: NF-kappa B: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *Journal of Clinical Investigation* 107, 255-264 (2001)
17. Consortium TIH: A haplotype map of the human genome. *Nature* 437, 1299-1320 (2005)
18. Consortium TIH: A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 449, 851-861 (2007)
19. Cuaz-Pérolin C, Billiet L, Baugé E, Copin C, Scott-Algara D, Genze F, et al.: Antiinflammatory and Antiatherogenic Effects of the NF-[kappa]B Inhibitor Acetyl-11-Keto-[beta]-Boswellic Acid in LPS-Challenged ApoE^{-/-} Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 28, 272-277 (2008)
20. DeMartino GN: Purification of PA700, the 19S regulatory complex of the 26S proteasome. *Ubiquitin and Protein Degradation, Part A* 398, 295-306 (2005)
21. Dieguez-Gonzalez R, Akar S, Calaza M, Perez-Pampin E, Costas J, Torres M, et al.: Genetic variation in the NF{[kappa]}B pathway in relation to susceptibility to rheumatoid arthritis. *ARD Online First*, (2008)
22. Elliott PJ, Zollner TM, Boehncke WH: Proteasome inhibition: a new anti-inflammatory strategy. *Journal of Molecular Medicine* 81, 235-245 (2003)
23. Escargueil-Blanc I, Meilhac, O., Pieraggi, M. T., Arnal, J. F., Salvayre, R., and Nègre-Salvayre, A.: Oxidized LDL induce massive apoptosis of cultured human endothelial cells through a calcium-dependent pathway. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 17, 331-339 (1997)
24. Finley D, Tanaka K, Mann C, Feldmann H, Hochstrasser M, Vierstra R, et al.: Unified nomenclature for subunits of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome regulatory particle. *Trends in Biochemical Sciences* 23, 244-245 (1998)
25. Fischer M, Broeckel U, Holmer S, Baessler A, Hengstenberg C, Mayer B, et al.: Distinct Heritable Patterns of Angiographic Coronary Artery Disease in Families With Myocardial Infarction. *Circulation* 111, 855-862 (2005)
26. Fletcher SWF, Robert H.; Wagner, Edward H. : *Klinische Epidemiologie*. 1 Aufl., Haerting, Johannes; Rink, Christoph, Wiebaden, 1999
27. Freilinger T, Bevan S, Ripke S, Gschwendtner A, Lichtner P, Muller-Myhsok B, et al.: Genetic Variation in the Lymphotoxin-Alpha Pathway and the Risk of Ischemic Stroke in European Populations. *Stroke* 40, 970-972 (2009)
28. Fukui T: Targeting proteasome worsens atherosclerosis. *Circulation Research* 101, 859-861 (2007)
29. Ghosh S, May MJ, Kopp EB: NF-κB AND REL PROTEINS: Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses. *Annual Review of Immunology* 16, 225-260 (1998)
30. Gilmore TD: The Rel/NF-kappa B signal transduction pathway: introduction. *Oncogene* 18, 6842-6844 (1999)

31. Gorroochurn P, Hodge SE, Heiman GA, Durner M, Greenberg DA: Non-replication of association studies: “pseudo-failures” to replicate? *Genetics In Medicine* 9, 325-331 (2007)
32. Groll M, Huber R: Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35, 606-616 (2003)
33. Grune T, Reinheckel T, Davies KJ: Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB Journal* 11, 526-534 (1997)
34. Halliwell BaG, J. M. C. : *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford Press. 246+350, Oxford, 1999
35. Healy DG: Case-control studies in the genomic era: a clinician's guide. *The Lancet Neurology* 5, 701-707 (2006)
36. Hegazy D, O'Reilly D, Yang B, Hodgkinson A, Millward B, Demaine A: NFkappaB Polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes. *Genes and Immunity* 2, 304-308 (2001)
37. Hengstenberg C, Bröckel U, Holmer S, Mayer B, Fischer M, Baessler A, et al.: Genetische Einflüsse beim Herzinfarkt. *Herz* 27, 649-661 (2002)
38. Hernandez-Presa M, Bustos C, Ortego M, Tunon J, Renedo G, Ruiz-Ortega M, et al.: Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition Prevents Arterial Nuclear Factor- κ B Activation, Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression, and Macrophage Infiltration in a Rabbit Model of Early Accelerated Atherosclerosis. 95, 1532-1541 (1997)
39. Herrmann J, Ciechanover A, Lerman LO, Lerman A: The ubiquitin-proteasome system in cardiovascular diseases - a hypothesis extended. *Cardiovascular Research* 61, 11-21 (2004)
40. Herrmann J, Edwards WD, Holmes DR, Shogren KL, Lerman LO, Ciechanover A, et al.: Increased ubiquitin immunoreactivity in unstable atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndromes. *Journal of the American College of Cardiology* 40, 1919-1927 (2002)
41. Herrmann J, Gulati R, Napoli C, Woodrum JE, Lerman LO, Rodriguez-Porcel M, et al.: Oxidative stress-related increase in ubiquitination in early coronary atherogenesis. *FASEB Journal* 17, 1730-1732 (2003)
42. Herrmann J, Saguner AM, Versari D, Peterson TE, Chade A, Olson M, et al.: Chronic proteasome inhibition contributes to coronary atherosclerosis. *Circulation Research* 101, 865-874 (2007)
43. Hinohara K, Nakajima T, Sasaoka T, Sawabe M, Lee B-S, Ban J, et al.: Replication studies for the association of PSMA6 polymorphism with coronary artery disease in East Asian populations. *J Hum Genet* 54, 248-251 (2009)
44. Hirschhorn JN, Daly MJ: Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nature Reviews Genetics* 6, 95-108 (2005)

45. Holle R, Happich M, Löwel H, Wichmann HE: KORA - A Research Platform for Population Based Health Research. *Gesundheitswesen*, 19-25 (2005)
46. Horne B, Camp NJ CJ, Muhlestein JB, Kolek MJ, Nicholas ZP, Anderson JL.: Multiple-polymorphism associations of 7 matrix metalloproteinase and tissue inhibitor metalloproteinase genes with myocardial infarction and angiographic coronary artery disease. *American Heart Journal* 154, 751-758 (2007)
47. Huang SJ, Patterson E, Yu XC, Garrett MW, De AOs I, Kem DC: Proteasome inhibition 1 h following ischemia protects GRK2 and prevents malignant ventricular tachyarrhythmias and SCD in a model of myocardial infarction. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 294, H1298-H1303 (2008)
48. Huang TT, Kudo N, Yoshida M, Miyamoto S: A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of I κ B α controls cytoplasmic localization of inactive NF- κ B/I κ B α complexes *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 97, 1014-1019 (2000)
49. Huxford T, Huang D-B, Malek S, Ghosh G: The Crystal Structure of the I[kappa]B[alpha]/NF-[kappa]B Complex Reveals Mechanisms of NF-[kappa]B Inactivation. *Cell* 95, 759-770 (1998)
50. Jawien J, Gajda M, Mateuszuk, Olszanecki R, Jakubowski A, Szlachcic A, et al.: Inhibition of nuclear factor-kappaB attenuates atherosclerosis in apoE/LDLR - double knockout mice. *Journal of Physiology and Pharmacology* 56, 483-489 (2005)
51. Johnson C, Van Antwerp D, Hope TJ: An N-terminal nuclear export signal is required for the nucleocytoplasmic shuttling of I κ B α . *The EMBO Journal* 18, 6682–6693 (1999)
52. Kanehisa M, Araki M, Goto S, Hattori M, Hirakawa M, Itoh M, et al.: KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic Acids Research* 36, D480-D484 (2008)
53. Karin M, Ben-Neriah Y: Phosphorylation meets ubiquitination: The control of NF-kappa B activity. *Annual Review of Immunology* 18, 621-623 (2000)
54. Karin M, Delhase M: The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling. *Seminars in Immunology* 12, 85-98 (2000)
55. Karolchik D, Kuhn RM, Baertsch R, Barber GP, Clawson H, Diekhans M, et al.: The UCSC Genome Browser Database: 2008 update. *Nucleic Acids Research* 36, D773-779 (2008)
56. Kavurma MM, Bhindi R, Lowe HC, Chesterman C, Khachigian LM: Vessel wall apoptosis and atherosclerotic plaque instability. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 3, 465-472 (2005)
57. Kelberman D, Hawe E, Luong LA, Mohamed-Ali V, Lundman P, Tornvall P, et al.: Effect of interleukin-6 promoter polymorphisms in survivors of myocardial infarction and matched controls in the North and South of Europe. *Thrombosis and Haemostasis* 92, 1122-1128 (2004)

58. Krappmann D, Hatada EN, Tegethoff S, Li J, Klippel A, Giese K, et al.: The Ikappa B Kinase (IKK) Complex Is Tripartite and Contains IKKgamma but Not IKAP as a Regular Component. *Journal of Biological Chemistry* 275, 29779-29787 (2000)
59. Krawczak M, Nikolaus S, von Eberstein H, Croucher PJP, El Mokhtari NE, Schreiber S: PopGen: Population-Based Recruitment of Patients and Controls for the Analysis of Complex Genotype-Phenotype Relationships. *Community Genetics* 9, 55-61 (2006)
60. Lee M, Hyun D, Jenner P, Halliwell B: Effect of proteasome inhibition on cellular oxidative damage, antioxidant defences and nitric oxide production. *Journal of Neurochemistry* 78, 32-41 (2002)
61. Lee MH, Dong-Hoon; Jenner, Peter; Halliwell, Barry Effect of proteasome inhibition on cellular oxidative damage, antioxidant defences and nitric oxide production. *Journal of Neurochemistry* 78, 32-41 (2001)
62. Li Y, Abecasis GR: Rapid Haplotype Reconstruction and Missing Genotype Inference. *American Journal of Human Genetics*, (2006)
63. Li Y, Willer C, Sanna S, Abecasis G: Genotype Imputation. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 10, 387-406 (2009)
64. Liu X, Wang X, Shen Y, Wu L, Ruan X, Lindpaintner K, et al.: The functional variant rs1048990 in PSMA6 is associated with susceptibility to myocardial infarction in a Chinese population. *Atherosclerosis* 206, 199-203 (2009)
65. Ludwig H, Khayat D, Giaccone G, Facon T: Proteasome inhibition and its clinical prospects in the treatment of hematologic and solid malignancies. *Cancer* 104, 1794-1807 (2005)
66. Manolio TA, Brooks LD, Collins FS: A HapMap harvest of insights into the genetics of common disease. *Journal of Clinical Investigation* 118, 1590-1605 (2008)
67. Mc Elhinny J, Trushin SA, Bren GD, Chester N, Paya CV: Casein Kinase II Phosphorylates IkBa at S-283, S-289, S-293, and T-291 and Is Required for Its Degradation. *Molecular and cellular biology* 16, 899-906 (1996)
68. McVean GAT, Myers SR, Hunt S, Deloukas P, Bentley DR, Donnelly P: The Fine-Scale Structure of Recombination Rate Variation in the Human Genome. *Science* 304581, 581-584 (2004)
69. Myles S, Davison D, Barrett J, Stoneking M, Timpson N: Worldwide population differentiation at disease-associated SNPs. *BMC Medical Genomics* 1, 22 (2008)
70. Ozaki K, Ohnishi Y, Iida A, Sekine A, Yamada R, Tsunoda T, et al.: Functional SNPs in the lymphotoxin- α gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nature Genetics* 32, 650-654 (2002)
71. Ozaki K, Sato H, Iida A, Mizuno H, Nakamura T, Miyamoto Y, et al.: A functional SNP in PSMA6 confers risk of myocardial infarction in the Japanese population. *Nature Genetics* 38, 921-925 (2006)

72. Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T: The Ubiquitin-Proteasome Pathway Is Required for Processing the Nf-Kappa-B1 Precursor Protein and the Activation of Nf-Kappa-B. *Cell* 78, 773-785 (1994)
73. Pei Y, Li J, Zhang L, Papasian C, Deng H: Analyses and Comparison of Accuracy of Different Genotype Imputation Methods. *PLoS ONE* 3, e3551 (2008)
74. Perkins ND: Integrating cell-signalling pathways with NF-kappa B and IKK function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 49-62 (2007)
75. Powell SR: The ubiquitin-proteasome system in cardiac physiology and pathology. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 291, H1-H19 (2006)
76. Pye J, Ardeshirpour F, McCain A, Bellinger DA, Merricks E, Adams J, et al.: Proteasome inhibition ablates activation of NF-kappa B in myocardial reperfusion and reduces reperfusion injury. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 284, H919-H926 (2003)
77. Riva A, Kohane IS: SNPper: retrieval and analysis of human SNPs. *Bioinformatics* 18, 1681-1685 (2002)
78. Riva A, Kohane IS: A SNP-centric database for the investigation of the human genome. *Bmc Bioinformatics* 5, 33 (2004)
79. Rome SM, E.; Vidal, H.: Proteasome Pathway is a New Partner for the Control of Insulin Signaling. *Curr Opin in Clin Nutr Metab Care* 7, 249-254 (2004)
80. Ross R: Mechanisms of disease - Atherosclerosis - An inflammatory disease. *New England Journal of Medicine* 340, 115-126 (1999)
81. Samani NJ, Erdmann J, Hall AS, Hengstenberg C, Mangino M, Mayer B, et al.: Genomewide Association Analysis of Coronary Artery Disease. *New England Journal of Medicine* 357, 443-453 (2007)
82. Schild TA: Einführung in die Real-Time TaqMan PCR-Technologie. 2004
83. Sen R, Baltimore D: Inducibility of [kappa] immunoglobulin enhancer-binding protein NF-[kappa]B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47, 921-928 (1986)
84. Shringarpure R, Grune T, Mehlhase J, Davies KJA: Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome. *Journal of Biological Chemistry* 278, 311-318 (2003)
85. Sjakste T, Poudziunas I, Ninio E, Perret C, Pirags V, Nicaud V, et al.: SNPs of the PSMA6 gene: Investigation of possible association with myocardial infarction and type 2 diabetes mellitus. *Russian Journal of Genetics* 43, 444-450 (2007)
86. Steffens M, Lamina C, Illig T, Bettecken T, Vogler R, Entz P, et al.: SNP-Based Analysis of Genetic Substructure in the German Population. *Human Heredity* 62, 20-29 (2006)
87. Sun X, Zhang H: NFKB and NFKBI polymorphisms in relation to susceptibility of tumour and other diseases. *Histology and Histopathology* 22, 1387-1398 (2007)

88. Takashima N, Shioji K, Kokubo Y, Okayama A, Goto Y, Nonogi H, et al.: Validation of the association between the gene encoding proteasome subunit alpha type 6 and myocardial infarction in a Japanese population. *Circulation Journal* 71, 495-498 (2007)
89. Vieira O, Escargueil-Blanc I, Jurgens G, Borner C, Almeida L, Salvayre R, et al.: Oxidized LDLs alter the activity of the ubiquitin-proteasome pathway: potential role in oxidized LDL-induced apoptosis. *FASEB Journal* 14, 532-542 (2000)
90. von der Thusen JH, van Vlijmen BJM, Hoebe RC, Kockx MM, Havekes LM, van Berkel TJC, et al.: Induction of Atherosclerotic Plaque Rupture in Apolipoprotein E-/- Mice After Adenovirus-Mediated Transfer of p53. *Circulation* 105, 2064-2070 (2002)
91. Wheeler DL, Barrett T, Benson DA, Bryant SH, Canese K, Chetvernin V, et al.: Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research* 35, D5-12 (2007)
92. Wilk S, and Orłowski, M: Cation-sensitive neutral endopeptidase: Isolation and specificity of the bovine pituitary enzyme. *Journal of Neurochemistry* 35, 1172-1182 (1980)
93. Wilson SH, Caplice NM, Simari RD, Holmes Jr. DR, Carlson PJ, Lerman A: Activated nuclear factor-kappaB is present in the coronary vasculature in experimental hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 148, 23-30 (2000)
94. Ziegler A, König IR: *A Statistical Approach to Genetic Epidemiology*. Weinheim, 2006

VII. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

5'/3'UTR	Nicht-translatierte Regionen eines Gens (engl. untranslated region)
bp	Basenpaare
CAD	Coronary Artery Disease
cM	Centi-Morgan: Einheit der chromosomalen Rekombinationsrate zwischen zwei Markern (1cM entspricht einer Rekombinationsrate von 1%)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
KHK	Koronare Herzkrankheit: Manifestation der Atherosklerose am Herzen
KORA	Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg
MONICA	Monitoring of Trends and Determinants in Cardiovascular Mortality
NIDDM	Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus
LD	Kopplungsungleichgewicht (engl. linkage disequilibrium): Bestimmte genetische Informationen werden häufiger gemeinsam vererbt als andere. SNPs, die sich in hoher LD befinden, werden während der Mitose und Meiose seltener voneinander getrennt als SNPs mit geringer LD.
OR	Chancenverhältnis (engl. odds ratio)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. Polymerase-chain-reaction)
SNP	Single Nucleotide Polymorphism: Sequenzvariation an einer Basenposition im Genom mit einer Frequenz von $> 1\%$ in der Bevölkerung, bei einer Frequenz $\leq 1\%$ spricht man von einer Mutation.

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Haplotyp-Blöcke von <i>PSMA6</i> .	3
Abbildung 2: Das humane 26S-Proteasom.	7
Abbildung 3: Das Ubiquitin-Proteasom-System in der Pathogenese der Atherosklerose...	10
Abbildung 4: Schematische Darstellung eines PCR-Zyklus	20
Abbildung 5: Exemplarische Darstellung der Fluoreszenz-Intensität im Verlauf der PCR-Zyklen	21
Abbildung 6: Beispiele für einen schlechten (a) und einen guten (b) Signalintensitätsplot	26
Abbildung 7: Lage der untersuchten SNPs innerhalb des <i>PSMA6</i> -Gens.	30
Abbildung 8: Protokoll des PCR-Zyklus	32
Abbildung 9: Arbeitsschritte bei der Genotypisierung.	32
Abbildung 10: Signalintensitätsplots der allelischen Diskriminierung des SNPs rs7156944	41
Abbildung 11: Flussdiagramm zum Studienablauf der Analyse des Proteasom-Entzündungs-Signaltransduktionswegs	47
Abbildung 12: Visualisierung des <i>IKBKE</i> -Gens im UCSC Genome Browser	48
Abbildung 13: Fancy plots für die SNPs rs11576488 (oben) und rs9429769	49
Abbildung 14: Fancy plots des SNPs rs17433909 für die Deutsche Herzinfarktfamilienstudie 1 (a) bzw. 2 (b).	50
Abbildung 15: Visualisierung des <i>PSMB8</i> -Gens im UCSC Genome Browser	50
Abbildung 16: Visualisierung des <i>PSMD3</i> -Gens im UCSC Genome Browser	51
Abbildung 17: Fancy plots des SNPs rs921651	51

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zielgene bestimmter NF- κ B-Dimere	11
Tabelle 2: Basisdaten der Population der Deutschen Herzinfarktfamilienstudie	40
Tabelle 3: Manuelle Änderung der Genotypzuordnung der SNPs	42
Tabelle 4: Ergebnis der Power-Analyse für die untersuchten SNPs aus dem <i>PSMA6</i> -Gen	43
Tabelle 5: Absolute und relative Genotyphäufigkeiten der einzelnen SNPs	44
Tabelle 6: Abdeckung der untersuchten Gene des Proteasom-Entzündungs-Signaltransduktionswegs durch die Genotypisierungsdaten den Deutschen Herzinfarktfamilienstudien	46
Tabelle 7: SNPs mit signifikantem p-Trend-Wert in GerMIFS I und II.	48
Tabelle 8: Ergebnis der Datenabfrage des WTCCC	52

7.4 Tabellen und Graphiken

SNP	Assay ID	Assay Mix	Reporter	Reporter	Kontext-Sequenz	Design
rs1048990	C_11599359_10	40x	VIC=G	FAM=C	TAGTGCTT[C/G]TACCAACA	Reverse
rs11621075	C_505266_10	20x	VIC=A	FAM=G	CAGCAGCT[A/G]GAAGTGCA	Forward
rs2277459	C_15884375_20	40x	VIC=G	FAM=A	CCCCGGAA[A/G]CAGTCGCT	Reverse
rs7156944	C_461500_10	40x	VIC=T	FAM=G	TAGGTCAA[G/T]TGTGGTGG	Reverse
rs4982254	C_28018279_10	40x	VIC=T	FAM=C	TGGAAAAA[C/T]AAGAAATA	Reverse

Anhang 1: Beschreibung der einzelnen Taqman Assays (Bestellnummer, etc.).

SNP	p-Wert
rs4982254	0,74
rs2277459	0,15
rs1048990	0,48
rs11621075	0,56
rs7156944	0,19

Anhang 2: p-Werte des Pearson χ^2 -Test auf Abweichung der Genotypfrequenzen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

SNP	Ausfallquote	
	Fälle	Kontrollen
rs4982254	6,85%	3,81%
rs2277459	8,51%	6,55%
rs1048990	6,52%	7,23%
rs11621075	7,18%	3,52%
rs7156944	8,51%	5,28%
Proben gesamt	1211	1023

Anhang 3: Ausfallquoten bei der Genotypisierung der SNPs nach Herzinfarktpatienten (Fälle) und Kontrollgruppe (Kontrollen).

7.5 Verzeichnis der Internetdatenbanken

International HapMap Projekt (23a/phase II März 2008, basierend auf NCBI B36 assembly, dbSNP b126):

http://www.hapmap.org/cgi-perl/gbrowse/hapmap_B36/ (letzter Zugriff: 09.10.2008)

SNPper:

<http://snpper.chip.org/> (letzter Zugriff: 18.08.2010)

dbSNP (build 129):

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/> (letzter Zugriff: 18.08.2010)

Genome browser der University of California Santa Cruz (assembly May 2006):

<http://genome.ucsc.edu/> (letzter Zugriff: 18.08.2010)

Ensembl genome browser:

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/index.html (letzter Zugriff: 18.08.2010)

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG):

<http://www.genome.jp/kegg/genes.html> (letzter Zugriff: 18.08.2010)

Tests für Abweichung von Hardy-Weinberg-Gleichgewicht and Assoziation (online tool):

<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hw1.pl> (letzter Zugriff: 18.08.2010)

7.6 Labormaterialien und –geräte (Hersteller)

7.6.1 Geräte

Mikrotiterplatten (384er)	384-well multiply PCR Plates
PCR-Geräte	MBS (Multi block system) Cyclor (Hybaid)
Pipettensatz	Eppendorf research
Pipettenspitzen	Sarstedt
Pipettierroboter	GENISIS Freedom 150 (Tecan)
Real-time quantitatives PCR-Gerät	TaqMan 7900HT (Applied Biosystems)
Vortex Mixer	Peqlab Kombi
Zentrifuge	ROTANA 460 R (Hettich)

7.6.2 Chemikalien

PCR-MasterMix: TaqMan® Universal PCR Master Mix

- AmpliTaq Gold DNA Polymerase
- dNTPs
- Passive Reference

Optimierter Puffer

KCl 125 mM

Tris-HCl pH 8.3 75 mM

Mg²⁺ 3.75 mM

Igepal-CA630 0.25%

DNase freies Wasser

Genotyping Assay: TaqMan® SNP Genotyping Assays

VIII. Danksagungen

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

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. rer. nat. Jeanette Erdmann für ihre zuverlässige und tatkräftige Betreuung, die wissenschaftliche Anleitung bei der Planung und praktischen Durchführung dieser Arbeit sowie die Beratung und Unterstützung bei der Auswertung der Ergebnisse und der Erstellung des Manuskripts bedanken. Ihre stets freundliche und aufmunternde Art haben mir in großem Maße geholfen, diese Dissertation zu erstellen.

Mein Dank gilt ebenso Frau Dipl.-Statistikerin Anika Großhenning und Frau Dipl.-Bioinformatikerin Christina Willenborg für die Hilfestellung bei der statistischen Auswertung und für die Erstellung der Cluster- und Fancy plots.

Ganz besonders danke ich Frau Petra Bruse für die Einweisung und Unterstützung bei der praktischen Durchführung sowie die freundliche Hilfestellung bei Problemen im Laboralltag. Ebenfalls danken möchte ich Herrn Dr. Zouhair Aherrarhou, der mir weitere Einblicke in die Laborarbeit ermöglichte.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Freundin Christina Maren Petersen bedanken für ihre Unterstützung und Geduld während der Anfertigung dieser Arbeit. Ganz herzlich danke ich meinen Eltern, die mir nicht nur bei der Erstellung dieser Dissertation immer mit Rat und Tat zur Seite standen sondern mir auch mein Studium ermöglicht haben.

IX. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Matthias Joachim Berndt
geb. am 22.05.1984 in Lübeck



Schulbildung

08/1996-05/2003 Abitur (Note 1,7), Gymnasium
Unserer Lieben Frau, Cloppenburg

Hochschulstudium

10/2003-05/2010 Medizinstudium, Universität zu Lübeck
09/2005 1. Staatsexamen (Physikum), Note 1,0
05/2010 2. Staatsexamen, Note 1,33

Stipendium

03/2006-03/2010 Stipendiat der Studienstiftung des Deutschen Volkes

Promotion

01/2007-2010 Experimentelle Arbeit an der Universität zu Lübeck zur Rolle
des Proteasoms bei der Entstehung des Herzinfarkts,
Medizinische Klinik II (Kardiologie), AG Kardiovaskuläre
Genetik, Leitung: Frau Prof. Dr. rer. nat. J. Erdmann.

Aktuell

Seit 05/2010 Praxisassistent im Fach Allgemeinmedizin, Cloppenburg

Praktisches Jahr

12/2008-03/2009 Sana Kliniken Ostholstein, Klinik Eutin, Abteilung für
Chirurgie
03/2009-07/2009 Sana Kliniken Ostholstein, Klinik Eutin, Abteilung für Innere
Medizin und Intensivmedizin
08/2009-10/2009 University of California, San Francisco, Kalifornien, USA,
Department of Anesthesia and Perioperative Care
10/2009-12/2009 Universität zu Lübeck, Klinik für Anästhesiologie und
Intensivmedizin

Famulaturen

02/2006-03/2006	Kardiologie , Christliches Krankenhaus Quakenbrück
09/2006	Viszeral- und Thoraxchirurgie, St. Franziskus-Hospital, Flensburg
02/2007	Unfallchirurgie, St. Josef-Hospital, Cloppenburg
08/2007	Universität zu Lübeck, Interdisziplinäre Liegendaufnahme
09/2007	Universität zu Lübeck, Klinik für Pathologie
10/2007	Pädiatrie, Praxis Dr. med. B. Poggemann, Cloppenburg
03/2008	Allgemeinmedizin, Praxisgemeinschaft Dr. med. J. Berndt/ V. Schubert/T. Penner, Cloppenburg

Weitere Tätigkeiten

2000-2003	Jugendgruppenleiter, Kirchengemeinde St. Josef, Cloppenburg
2004/2005	Studentische Hilfskraft (Tutor), Makroskopische Anatomie des Menschen (Präparierkurs), Institut für Anatomie, Universität zu Lübeck, Kursleiter: Prof. Dr. L.C. Busch
2005-2009	Dozent bei englischsprachigen Anatomieschulungen für internationale Firmen, Institut für Anatomie, Universität zu Lübeck und Zentrum für Klinische Anatomie, Christian- Albrechts-Universität Kiel, Leitung: Prof. Dr. med. J. Sievers, Prof. Dr. med. T. Wedel, Prof. Bodo Kurz

Fremdsprachen

Englisch	Abitur Leistungskurs Englisch Sprachschule Hilderstone College, Broadstairs, England Dozent bei englischsprachigen Schulungen Zweimonatiger PJ-Aufenthalt in San Francisco, USA Fließend in Wort und Schrift
----------	--

Verschiedenes

Musik	Klavier, Gitarre
Studium	Teilnehmer Masterclass Innere Medizin, Med.Klinik I der Universität zu Lübeck, Leitung: Prof. Dr. med. H. Lehnert