

Aus der medizinischen Klinik II
der Universität zu Lübeck
Direktor: Professor Dr. med. Heribert Schunkert

Mutationssuche in Großfamilien mit Herzinfarkt

Inauguraldissertation

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

vorgelegt von
Hajrullah Ahmeti
aus Skenderaj/Kosovo

Lübeck 2011

1. Berichterstatterin: Professor Dr. rer. nat. Jeanette Erdmann
2. Berichterstatterin: Professor Dr. rer. nat. Christine Zühlke

Tag der mündlichen Prüfung: 02.10.2012

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 02.10.2012

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Einführung	1
1.2 Positive Familienanamnese als Risiko für KHK und Herzinfarkt	2
1.3 Genetik von KHK und Herzinfarkt	5
1.3.1 Allgemeines	5
1.3.2 Identifikation von Genloci	6
1.4 Identifikation von Herzinfarktfamilien mit starker familiärer Häufung	8
1.5 Fragestellung	12
 2. Material und Methoden	 14
2.1 Probanden	14
2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	14
2.3 Etablierung der PCR	15
2.3.1 PCR-Protokoll	15
2.3.1.1 Reagenzien	15
2.3.1.2 Durchführung	16
2.3.2 Elektrophorese	16
2.3.2.1 Reagenzien	17
2.3.2.2 Durchführung	17
2.4 DNA-Amplifizierung	17
2.4.1 Reagenzien	17
2.4.2 Durchführung	18
2.5 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismusanalyse	19
2.5.1 Prinzip	19
2.5.2 Reagenzien	19
2.5.3 Durchführung	19
2.6 Auswertung	20
2.6.1 Allgemeines	20
2.6.2 Durchführung	20

2.7 Konservierungsgrad der identifizierten Varianten	22
2.7.1 Allgemeines	22
2.7.2 Durchführung	22
2.8 Schematische Darstellung der praktischen Vorgehensweise bei dieser Promotionsarbeit	22
3. Ergebnisse	23
3.1 Sequenzanalysen für das <i>TRPS1</i> Gen	23
3.1.1 rs2737218	23
3.1.2 rs1180628	23
3.2 Sequenzanalysen für das <i>EXT1</i> Gen und Restriktionsanalyse	23
3.2.1 rs7835605, rs7835956, rs6469721, rs34016643	24
3.2.2 Genetische Variante C > T, g.119191483	25
3.2.3 rs17452694	26
3.2.4 rs17439875	28
3.2.5 rs17439693	28
3.2.6 rs7837891	28
3.3 Sequenzanalysen für das <i>c-MYC</i> Gen	29
3.3.1 rs4645943	29
3.3.2 Genetische Variante A > C, g.128817086	29
3.3.3 rs4645958	31
3.3.4 rs2070583	31
3.3.5 Genetische Variante A > G, g.128823032	31
3.4 Übersicht der nachgewiesenen genetischen Varianten	34
4. Diskussion	36
4.1 Erörterung der Ergebnisse	36
4.1.1 Genetische Varianten im <i>TRPS1</i> Gen	36
4.1.2 Genetische Varianten im <i>EXT1</i> Gen	37
4.1.3 Genetische Varianten im <i>c-MYC</i> Gen	38
4.2 Abschließende Betrachtung	40
5. Zusammenfassung	43

6. Literaturverzeichnis	45
7. Anhang	55
7.1 Abbildungsverzeichnis	55
7.2 Tabellenverzeichnis	56
8. Danksagung	58
9. Lebenslauf	59

1. Einleitung

1.1 Einführung

Die koronare Herzerkrankung (KHK) und der Herzinfarkt sind die häufigste Todesursache in den Industrienationen. In den Vereinigten Staaten sterben mehr als 300.000 Menschen jedes Jahr an einer kardialen Ursache (1, 2). Laut statistischem Bundesamt waren in Deutschland im Jahr 2008 Erkrankungen des Herz- und Kreislaufsystems die häufigste Todesursache. Dabei erlagen 60.732 Menschen einem Herzinfarkt. Davon waren 55% Männer und 45% Frauen (3).

Koronare Herzerkrankungen sind die wichtigste Ursache des plötzlichen kardialen Todes. Mehr als 80% der Todesfälle durch einen plötzlichen Herztod sind durch atherosklerotische Herzkranzgefäße bedingt. Die restlichen 20% der Ursachen sind auf andere Erkrankungen einschließlich Kardiomyopathien, linksventrikuläre Hypertrophie, langes QT-Syndrom, Aortenklappenerkrankungen usw. zurückzuführen (4).

Die Vorstellungen von der Pathogenese der KHK haben sich über viele Jahre entwickelt. In den 70-iger Jahren wurde festgestellt, dass Mutationen im LDL Rezeptor zu Hypercholesterinämie führen (1). Daraus wurde auf eine enge Verbindung von Lipiden und der KHK geschlossen. So wurde die KHK als eine Erkrankung des Lipidmetabolismus betrachtet. In den 80-iger Jahren wurden im klinischen Alltag häufig Restenosen in den Herzgefäßen beobachtet. Die KHK und der Herzinfarkt wurden als Erkrankungen der glatten Muskelzellen angesehen. Erst die Entdeckung der Entzündungszellen und Entzündungsmoleküle in Plaques bei Patienten in den 90-iger Jahren führte zu der Ansicht, die auch heute vertreten wird, dass die KHK und der Herzinfarkt Erkrankungen der entzündlichen und immunen Reaktion sind (1).

Seit Jahrzehnten sind Risikofaktoren, die zur KHK und zum Herzinfarkt führen, z.B. Bluthochdruck, fortgeschrittenes Alter, männliches Geschlecht, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie und erniedrigte HDL-Werte, bekannt (5-11). Aufgrund der Komplexität der Pathogenese der KHK und des Herzinfarkts und auch im Hinblick auf das Auftreten der KHK und des Herzinfarkts bei Patienten, die keine dieser Risikofaktoren

haben, können diese Risikofaktoren die Entstehung der KHK und des Herzinfarkts nicht allein erklären. Hier wird vielmehr eine genetische Ursache angenommen.

1.2 Positive Familienanamnese als Risiko für KHK und Herzinfarkt

Unter den Risikofaktoren für die KHK und den Herzinfarkt ist die positive Familienanamnese für die Angina pectoris, die KHK und den Herzinfarkt ein signifikanter unabhängiger Risikofaktor (5, 12). Dies konnte durch diverse Studien belegt werden. Die 1990 veröffentlichte Framingham-Studie zur Bedeutung der positiven Familienanamnese für die KHK ergab, dass eine positive Familienanamnese bei den Eltern wie auch Geschwistern ein unabhängiger Risikofaktor für die KHK ist. Laut dieser Studie haben Personen mit einer positiven Familienanamnese ein um 29% erhöhtes Risiko für die KHK (13, 14).

Um die Kriterien für eine familiäre Prädisposition zu erfüllen, muss mindestens ein männlicher Verwandter 1. Grades vor dem 55. Lebensjahr oder eine weibliche Verwandte 1. Grades vor dem 65. Lebensjahr einen Herzinfarkt erlitten haben oder bei diesen eine signifikante Stenosierung der Koronargefäße festgestellt werden (15).

In Utah (USA) wurde eine Datenbank mit über 2,2 Mio. Probanden, die während der letzten 100 Jahre registriert wurden, ausgewertet. Diese Untersuchung zeigte ein erhöhtes Risiko für einen Herzinfarkt sogar dann, wenn Verwandte 2. Grades vor dem 65. Lebensjahr von einem Herzinfarkt betroffen waren. Diese Risikoerhöhung war aber nicht so stark wie in den Fällen, bei denen Verwandte 1. Grades betroffen waren (16).

In der Second Northwick Park Heart Studie (NPHS-II), an der ca. 3.000 Männer im Alter um 50 Jahre teilnahmen, fand sich bei etwa einem Drittel der Teilnehmer eine positive Familienanamnese für koronare Herzerkrankungen. Diese Studie beschrieb bei Personen mit einer positiven Familienanamnese eine Risikoerhöhung für koronare Herzerkrankungen um den Faktor 1,65. Auch nachdem die restlichen Risikofaktoren adjustiert wurden, blieb diese Risikoerhöhung unverändert bestehen (17, 18).

Zu ähnlichen Ergebnissen kommt auch die Reykjavik Cohort Studie, in der 10.062 Frauen und 9.328 Männer untersucht wurden (19).

Weitere Erkenntnisse über die Erbllichkeit des Herzinfarkts brachte eine schwedische Zwillingsstudie. Es wurde das 10-Jahresrisiko für das Auftreten des Herzinfarkts in der Zukunft von eineiigen und zweieiigen Zwillingen untersucht (20). Dabei sollte geklärt werden, ob und wenn ja, wie hoch das relative Risiko für den gesunden Zwillingspartner steigt, wenn der andere am Herzinfarkt verstorben war. In der Studie hatten zweieiige Zwillinge eine Risikoerhöhung von 2,6. Dies entsprach ungefähr dem Risiko für Geschwister. Bei den eineiigen Zwillingen hingegen ergab sich ein Anstieg des Risikos auf den Faktor 8,1 (Abbildung 1).

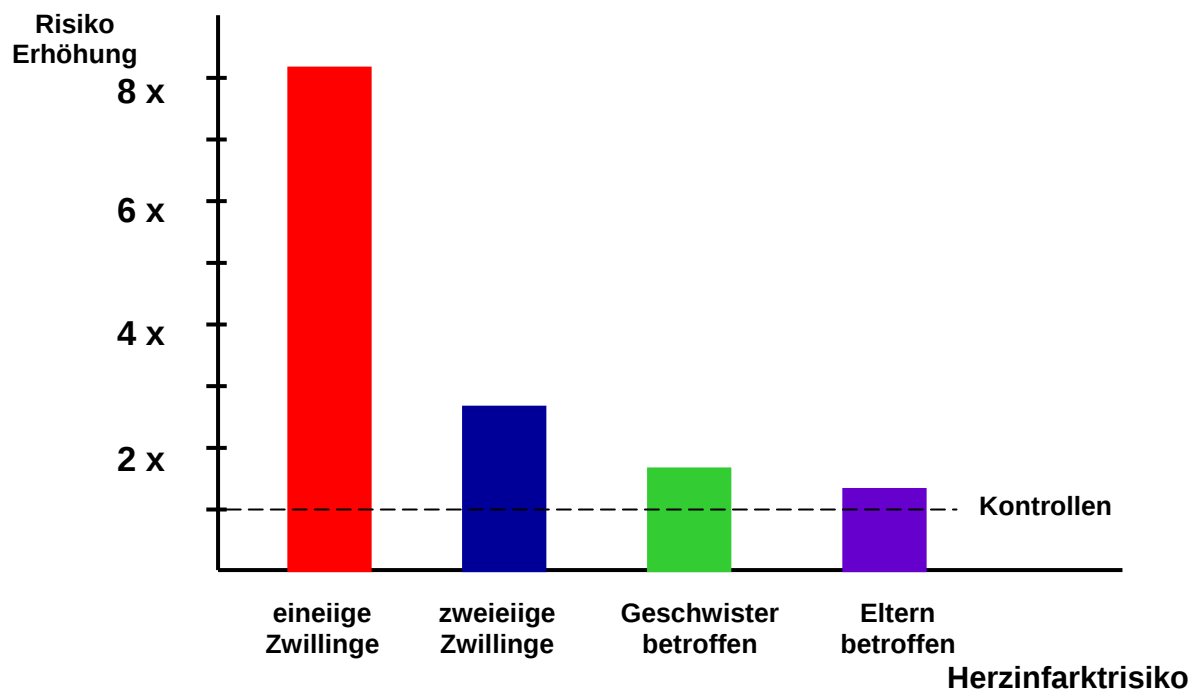


Abbildung 1. Relative Risikoerhöhung für den Herzinfarkt/ die koronare Herzerkrankung in Abhängigkeit von unterschiedlichen familiären Dispositionen (15).

Die Abbildung 2 zeigt die Koronarangiogramme von zwei monozygoten Zwillingen, die im Alter von 41 bzw. 47 Jahren einen Herzinfarkt erlitten. In der Abbildung sind die Stenosen in den Koronargefäßen mit Pfeilen markiert.

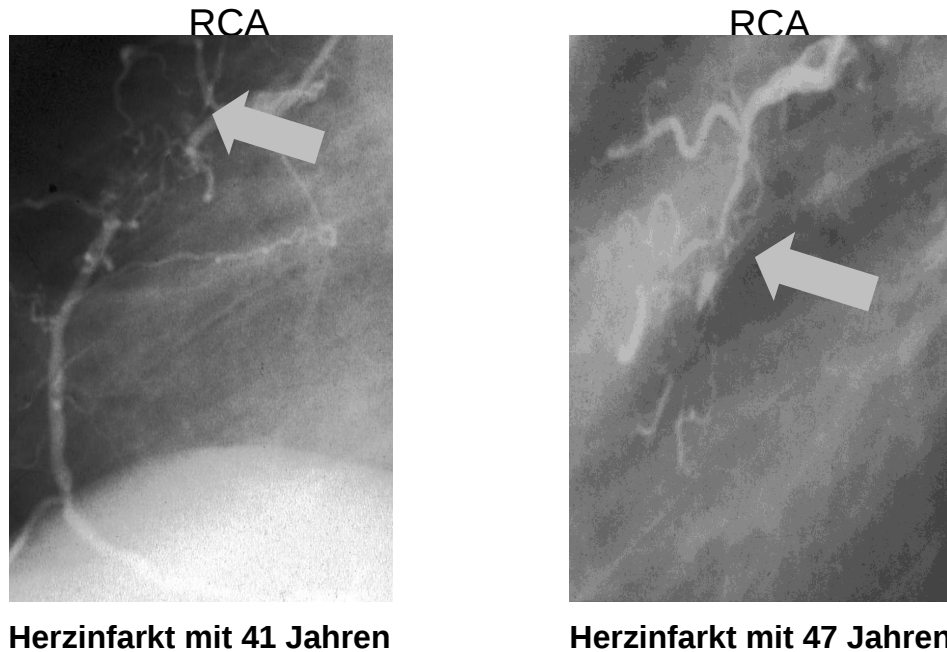


Abbildung 2. Koronarangiogramme von monozygoten Zwillingen. RCA: rechte Koronararterie (21).

Die Arbeitsgruppe um Professor Dr. rer. nat. Jeanette Erdmann und Professor Dr. med. Heribert Schunkert vom Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck konnte eine Erblichkeit der Hauptstammstenose und proximal lokalisierter Koronarstenosen bei betroffenen Geschwisterpaaren belegen (22). Es konnte eine signifikante Heritabilität mit einem Wert von $h^2 = 0,32$ und $p = 0,008$ für die Hauptstammstenose sowie $h^2 = 0,30$ und $p = 0,01$ für proximal lokalisierte Koronarstenosen nachgewiesen werden. In den distalen Koronargefäßen zeigte sich keine relevante Erblichkeit.

Die oben genannten Studien heben noch einmal die Bedeutung der positiven Familienanamnese in der Epidemiologie der KHK und des Herzinfarkts hervor.

1.3 Genetik von KHK und Herzinfarkt

1.3.1 Allgemeines

In der Genetik werden krankheitsverursachende Gendefekte („disease-causing-genes“) und prädisponierende Genvarianten („susceptibility-genes“) unterschieden (1, 15).

Um **krankheitsverursachende Gendefekte** handelt es sich, wenn das Auftreten des Gendefektes zur Entstehung einer Krankheit führt. Die Mutationen in krankheitsverursachenden Genen bewirken im Organismus eine Funktionsveränderung der Proteine. Dadurch kommt es am Ende der pathologischen Kette zur Krankheitsentstehung (15). Ein Beispiel für krankheitsverursachende Gendefekte ist die familiäre hypertrophe Kardiomyopathie, bei der es zu einer Verdickung der Herzmuskulatur kommt. Die familiäre hypertrophe Kardiomyopathie ist eine monogene Erkrankung, die in der Hälfte der Fälle autosomal dominant vererbt wird (23). Es sind 12 Gene, die durch Mutationen in diesen Genen zu der familiären hypertrophen Kardiomyopathie führen können, bekannt. Alle diese Gene kodieren Proteine für das Sarkomer der Herzmuskulatur. Die Sarkomere sind wesentliche Bestandteile der Herzmuskelzelle. Sie bestehen aus dünnen Filamenten, Aktin, und dicken Filamenten, Myosin. Eines dieser Gene ist z.B. das *MYH7* Gen (β -myosin heavy chain). Das *MYH7* Gen kodiert Proteine für die dicken Filamente und ist auf dem Chromosom 14 lokalisiert (24).

Prädisponierende Genvarianten sind sowohl bei kranken als auch bei gesunden Individuen vorhanden. Im Gegensatz zu genetischen Varianten mit krankheitsverursachender Wirkung kommen prädisponierende Genvarianten häufiger vor. Prädisponierende Genvarianten erhöhen oder erniedrigen das Erkrankungsrisiko (15). Wenn prädisponierende Genvarianten zu einer Risikoerhöhung für eine Erkrankung führen, muss es trotzdem nicht automatisch zu einer Krankheitsentstehung kommen. Die Einwirkung der prädisponierenden Genvarianten auf die Risikoerhöhung für eine Erkrankung wird vielmehr durch andere genetische und nicht-genetische Faktoren moduliert (15).

1.3.2 Identifikation von Genloci

Einige genetische Abschnitte, Genloci, können mit bestimmten Erkrankungen assoziiert werden. Für die Lokalisation derartiger Genloci werden in der Genetik zwei Untersuchungsmethoden angewandt: genomweite Kopplungsanalysen und genomweite Assoziationsstudien.

Genomweite Kopplungsanalysen werden in betroffenen Familien durchgeführt. Hier werden meist Mikrosatelliten analysiert. Heutzutage können Kopplungsanalysen aber auch mit Single Nucleotide Polymorphism (SNP) durchgeführt werden. Es wird nach genetischen Abschnitten, die bei den betroffenen Familienmitgliedern und nicht bei den nicht-betroffenen vorkommen, gesucht. Dadurch werden genetische Abschnitte, die zu der Erkrankung bei diesen Familienmitgliedern führen, lokalisiert. Danach erfolgt eine Sequenzierung dieser Abschnitte. Die Anwendung von Kopplungsanalysen wird bei Verdacht auf monogene Erkrankungen eingesetzt.

Dahingegen werden **genomweite Assoziationsstudien (GWA)** bei komplexen Erkrankungen angewandt (25-27). Dabei werden genetische Marker, Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), bei Patienten und bei gesunden Kontrollen analysiert. Wenn eine Assoziation zwischen einer Erkrankung und einem bestimmten Marker gefunden wird, wird eine krankheitsassoziiierende genetische Variante in dieser Region vermutet. So können Regionen, in denen mögliche krankheitsassoziiierende Gene mit hoher Wahrscheinlichkeit liegen, lokalisiert werden (15). Mit Hilfe von genomweiten Assoziationsstudien wurden in den letzten Jahren mehr als 30 Genloci, die eine Assoziation mit der koronaren Herzerkrankung und dem Herzinfarkt zeigen, identifiziert (28, 29, 64, 65, 66, 67, 68).

Die Abbildung 3 (Seite 7) zeigt die Lokalisation der bislang mittels GWA identifizierten Genloci, die mit einem erhöhten KHK-, bzw. Herzinfarkttrisiko assoziiert sind.

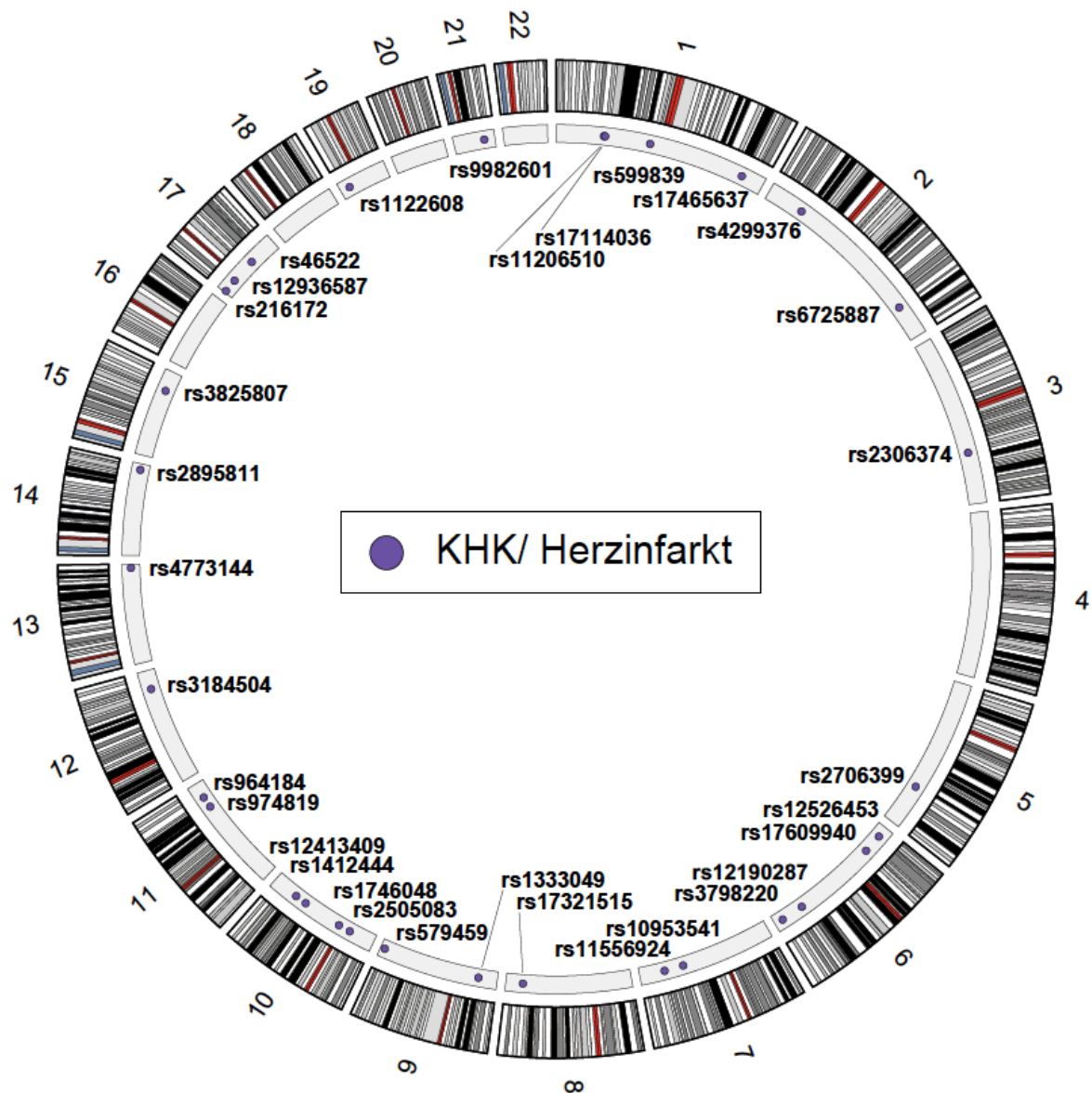


Abbildung 3. Ergebnisse der GWAs. Bei diesem zirkulär aufgetragenen GWAs-Plot (Circos Plot, (<http://www.circos.ca>)) sind alle Chromosomen und die genomweit signifikanten SNPs für die KHK und den Herzinfarkt aufgetragen. Weiterhin wird die Komplexität des Genoms verdeutlicht, indem die krankheitsspezifischen SNPs über das gesamte Genom verteilt sind.

1.4 Identifikation von Herzinfarktfamilien mit starker familiärer Häufung

Die Arbeitsgruppe um Professor Dr. rer. nat. Jeanette Erdmann und Professor Dr. med. Heribert Schunkert vom Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck hat in den letzten Jahren 19 Herzinfarkt-Großfamilien, die ein autosomal dominantes Vererbungsmuster vermuten lassen, identifiziert. Pro Familie waren mindestens drei lebende Geschwister und mindestens eine lebende Cousine oder ein lebender Cousin betroffen. Insgesamt enthielten die 19 Großfamilien 117 lebende Betroffene und 405 lebende Nicht-Betroffene. Das Durchschnittsalter der betroffenen Personen war 55 Jahre. Dahingegen lag das Alter der meisten gesunden Personen zwischen 30 und 45 Jahren. Da die meisten gesunden Personen zum Zeitpunkt der Untersuchung jünger als die Betroffenen waren, wird davon ausgegangen, dass die Anzahl der betroffenen Personen in diesen Familien in der Zukunft weiter ansteigt.

In der Abbildung 4 sind die Stammbäume von drei der 19 Großfamilien dargestellt. Sie sind beispielhaft für die unterschiedliche Größe der identifizierten Familien.

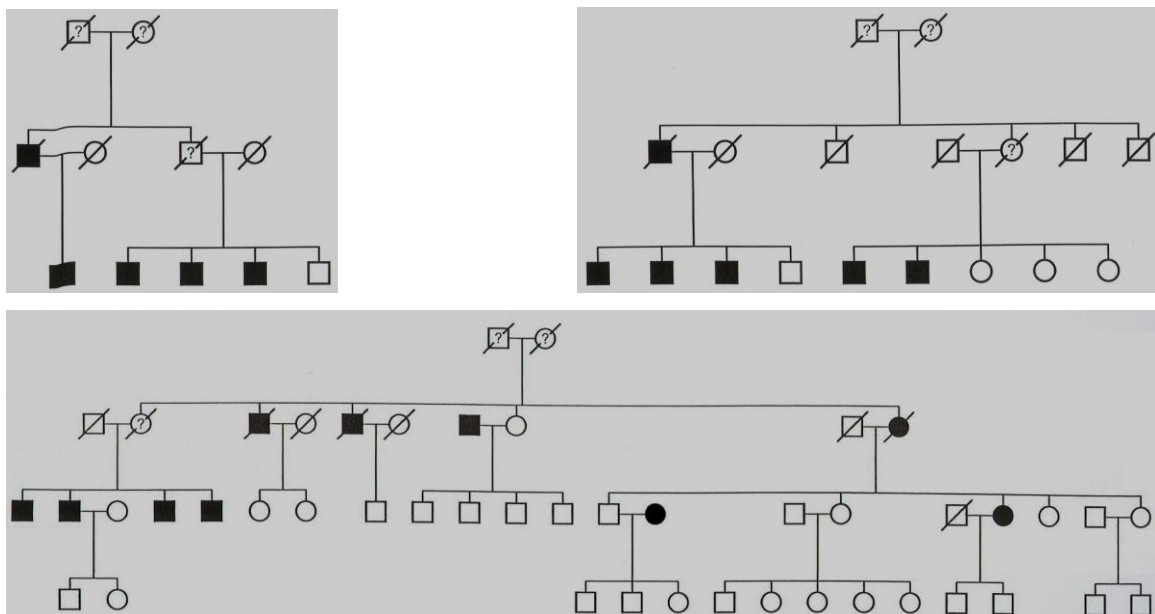


Abbildung 4. Drei Stammbäume als Beispiel. Dargestellt sind Männer als Quadrate, Frauen als Kreise, Betroffene in schwarz und Verstorbene durchgestrichen.

In den 19 Großfamilien wurden modellbasierte und modellfreie Kopplungsanalysen durchgeführt. Das Ziel war, chromosomale Regionen, die mit der Erkrankung in den Familien gekoppelt sind, zu identifizieren (30). Dazu erfolgte zuerst die Einschätzung der Heritabilitäten für den Herzinfarkt, den Body Mass Index (BMI), den Blutdruck und die Lipide. Ein Überblick darüber findet sich in Tabelle 1. Diese Tabelle zeigt auch die 95%-Konfidenzintervalle und die p-Werte für die einzelnen Parameter.

Phänotyp	N	h^2	95% CI	P-Wert
Herzinfarkt	490	74.7	72.4 - 76.9	< 0.01
Größe	488	31.8	30.8 - 32.8	< 0.01
Gewicht	488	36.2	35.1 - 37.3	< 0.01
BMI	488	31.5	30.4 - 32.6	< 0.01
SBP	436	29.9	28.3 – 31.4	0.014
Cholesterin	445	33.2	32.1 – 34.2	< 0.01
LDL	445	28.3	27.2 – 29.4	< 0.01
HDL	445	38.9	37.7 – 40.1	< 0.01
Triglyceride	445	32.3	31.4 – 33.2	< 0.01

Tabelle 1. Heritabilitätsschätzung h^2 , 95%-Konfidenzintervalle (95% CI) und p-Werte für Herzinfarkt, Größe, Gewicht, BMI, systolischer Blutdruck (SBP) und Lipidparameter (HDL, LDL und Triglyceride).

Die Untersuchungen in diesen Familien ergaben eine Heritabilität von 74.7% für den Herzinfarkt.

Die Kopplungsanalysen zeigten, wie erwartet, eine Heterogenität der Familien, d.h. in verschiedenen Familien wurden unterschiedliche Kopplungsintervalle festgestellt.

Interessanterweise fand sich aber ein Kopplungsbefund auf dem Chromosom 8q23.3-8q24.4 mit einem logarithm of the odds-Score (LOD-Score) von 2.8 in zwei unverwandten Familien (Abbildung 5, Seite 10).

a)



b)

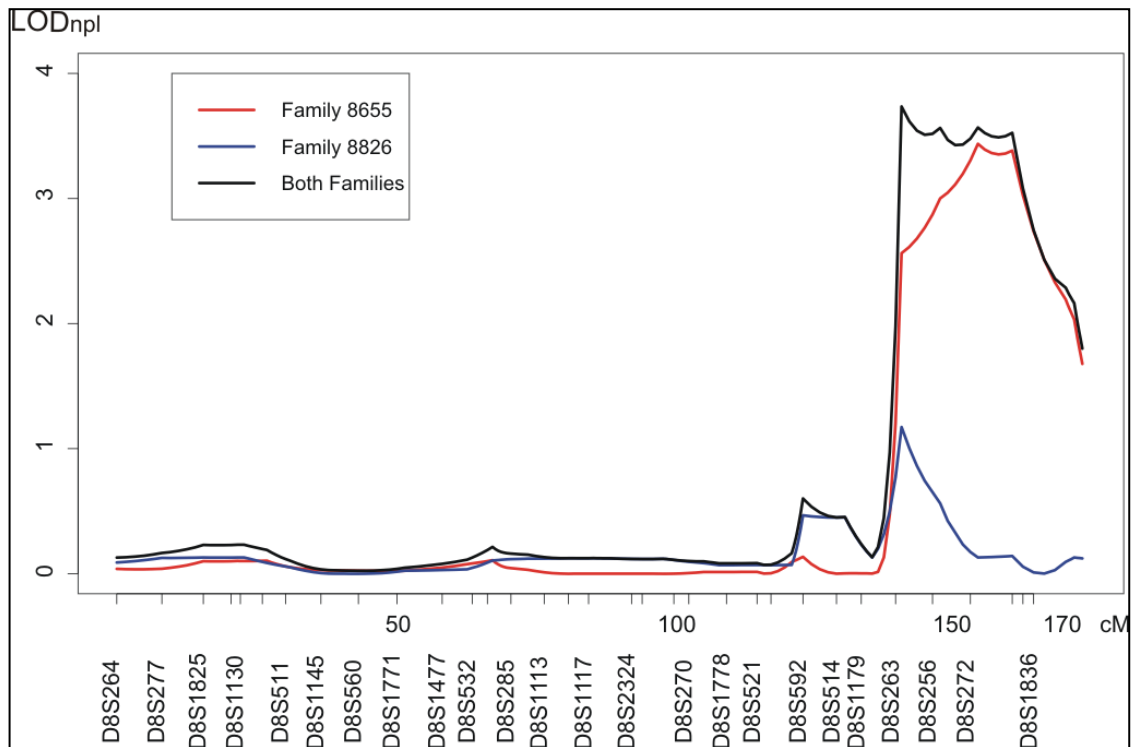


Abbildung 5. a) Schematische Darstellung von Chromosom 8. Genlokus als rotes Viereck, b) Genlokus auf Chromosom 8q23.3-8q24.4 in zwei Herzinfarkt-Familien (30).

Die bislang in der Arbeitsgruppe vorliegenden Befunde lassen vermuten, dass innerhalb der 18,9-centiMorgan (cM) Genregion auf dem Chromosom 8q23.3-8q24.4 der mutmaßliche Gendefekt, der in den beiden Familien krankheitsrelevant ist, gefunden werden kann. Aus diesem Grund wurde beschlossen, in diesem Abschnitt des Chromosoms 8 nach potentiell funktionell relevanten Genvarianten zu suchen. Da diese Region mehr als 70 Gene enthält, müssen für die zeit- und kostenintensive Sequenzierung die zu untersuchenden Gene priorisiert werden.

Für die vorliegende Promotionsarbeit wurden nach intensiver Literaturrecherche drei Gene, nämlich das *TRPS1* Gen (zinc-finger transcription factor *TRPS1*), das *EXT1* Gen (exostosin 1) und das *c-MYC* Gen (myc proto-oncogene protein) aus dieser Region ausgesucht.

Das **TRPS1 Gen** befindet sich auf dem langen Arm des Chromosoms 8, (8q23.3, chr 8: 116489900-116750402). Es besteht aus 7 Exonen und kodiert einen Zinc-Finger Transkriptionsfaktor, der unter anderem GATA-regulierte Gene hemmt. GATA bildet eine Familie von Transkriptionsfaktoren. GATA 4, 5 und 6 sind Zinc-Finger Transkriptionsfaktoren, die während der Herzentwicklung exprimiert werden. Später im adulten Herz werden nur GATA 4 und 6 exprimiert. Insbesondere GATA 4 ist essential für die kardiale Morphogenese. Es hemmt die Apoptose der Herzmuskelzellen und unterstützt somit deren Überleben. Die Apoptose der Herzmuskelzellen spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung verschiedener kardialen Erkrankungen, auch des Herzinfarkts (69-71).

Die Abkürzung *TRPS* erhält das Gen von dem Tricho-Rhino-Phalangeal-Syndrom (TRPS). Bei diesem Syndrom kommt es zu kraniofacialen und skelettalen Abnormitäten (31, 32). Es entsteht durch Mutationen im *TRPS1* Gen (31-33). Drei Typen des Tricho-Rhino-Phalangeal-Syndroms, Typ I, II und III, werden unterschieden. Interessant ist die Ursache für TRPS Typ II, das auch Langer-Giedion-Syndrom genannt wird. TRPS Typ II entwickelt sich durch Mutationen im *TRPS1* Gen und *EXT1* Gen. Patienten mit diesem Syndrom-Typ haben zusätzlich zu den kraniofacialen und skelettalen Abnormitäten auch multiple kartilaginäre Exostosen (31).

Das zweite aus der o.g. Region untersuchte Gen ist das **EXT1 Gen**. Es enthält 11 Exone. Das *EXT1* Gen liegt auch auf dem langen Arm des Chromosoms 8, (8q24.11, chr8: 118880783-119193239). Das Protein des *EXT1* Gens bildet zusammen mit dem Protein des *EXT2* Gens, das auf dem Chromosom 11 liegt, einen Proteinkomplex. Dieser Proteinkomplex katalysiert die Polymerisation von Heparansulfat (34). Heparansulfat ist als Co-Faktor in der Ossifikation und in der Signaltransduktionskaskade ein wichtiger Bestandteil für die Differenzierung und Apoptose der Chondrozyten (35). Heparansulfat moduliert die Aktivität von verschiedenen Liganden, unter anderem von Subtypen des Fibroblast-Growth-Faktors (FGF) (72). Es sind 23 Subtypen des FGFs bekannt. Die Fibroblast-Growth-Faktoren erfüllen eine wichtige Funktion in der Zell-Proliferation und Zell-Differenzierung. Vor allem FGF 1 und 2 fördern die Angiogenese und führen dadurch bei Patienten mit einer KHK und einem Herzinfarkt zu einer verbesserten Herzperfusion und einer Reduktion der Symptome (73).

Durch Mutationen im *EXT1* Gen, aber auch im *EXT2* Gen, wird die Biosynthese der dazugehörigen Proteine vorzeitig abgebrochen. Das Genprodukt ist dann unvollständig und dadurch funktionsunfähig (35). Mutationen in *EXT* Genen führen bisher zur multiplen

kartilaginären Exostose, auch als hereditäre multiple Exostose bekannt. Sie ist eine autosomal dominante Erkrankung (36, 37).

Das für diese Promotionsarbeit ausgesuchte **c-MYC** Gen ist auf dem Chromosom 8, (8q24.21, chr8: 128817498-128822854) lokalisiert und besteht aus 3 Exonen. Das *c-MYC* Gen spielt eine wichtige Rolle in der Zell-Proliferation, der Zell-Differenzierung, im Zell-Wachstum, im Zell-Zyklus und in der Apoptose (38).

Einige Studien haben gezeigt, dass eine erhöhte Expression des *c-MYC* Gens die Proliferation der glatten Muskelzellen steigert. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die Reduzierung der *c-MYC* Genexpression durch Oligonukleotid-Antikörper eine signifikante Wachstumshemmung der menschlichen glatten Muskelzellen bewirkt (39). In einer Studie wurde die Verteilung des *c-MYC* Genproduktes in gesunden und atherosklerotisch veränderten humanen Karotiden verglichen (40). Diese Untersuchung ergab, dass die glatten Muskelzellen von Karotiden-Plaques deutlich mehr *c-MYC* Genprodukte aufwiesen als die glatten Muskelzellen von gesunden Karotiden (40). Das *c-MYC* Gen erfüllt auch wichtige regulatorische Funktionen in Zellereignissen während der Initiierung und Progression von venösen Bypass-Transplantaterkrankungen (41).

Die *c-MYC* Genüberexpression ist eine häufige genetische Veränderung (42). Sie wurde auch bei mehreren Typen von menschlichen Tumoren beobachtet (43-45). Ein Beispiel dafür sind gastrale Neoplasien (46-49).

1.5 Fragestellung

Nach dem heutigen Wissensstand ist der Herzinfarkt eine multifaktorielle polygene Erkrankung. Es stellt sich die Frage, ob insbesondere bei betroffenen Personen mit einem familiär auftretenden Herzinfarkt genetische Varianten mit einem autosomal dominanten Vererbungsmuster zu finden sind.

Die Aufgabe dieser Promotionsarbeit ist es, nach Mutationen für den Herzinfarkt mit einem autosomal dominanten Vererbungsmuster in zwei Familien mit zuvor nachgewiesenem Kopplungssignal auf dem Chromosom 8q23.3-8q24.4 zu suchen. Die Identifizierung solcher Mutationen würde viele neue Wege sowohl in der Diagnostik als auch in der Therapie der KHK und des Herzinfarkts eröffnen.

Trotz aller therapeutischen Maßnahmen versterben ca. 40% der Patienten mit einem Herzinfarkt im Akutstadium (2). Eine frühzeitige Identifizierung und prophylaktische Behandlung von Risikopersonen würde daher die Sterberate deutlich senken können.

2. Material und Methoden

2.1 Probanden

Für diese Arbeit wurden aus 19 Großfamilien, für die durch Selektionsstudien eine Heritabilität für den Herzinfarkt nachgewiesen werden konnte, drei Großfamilien mit den Nummern 8622, 8655 und 8826 ausgewählt. Als Einschlusskriterium für die Teilnahme der Familien an der Familienstudie mussten mindestens drei lebende betroffene Geschwister und eine lebende betroffene Cousine oder ein lebender betroffener Cousin in der Familie vorhanden sein. Für die molekulargenetischen Studien liegt ein positives Ethikvotum vor. Die Familienmitglieder haben schriftlich ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie gegeben.

In den Familien mit den Nummern 8655 und 8826 wurde mit Hilfe von modellbasierten und modellfreien Kopplungsanalysen ein Kopplungsbefund auf dem langen Arm des Chromosoms 8 auf der Position 8q23.3-8q24.4 lokalisiert (Abbildung 5, Seite 10). Die Familie mit der Nummer 8622 wurde als Kontrolle ausgewählt. In diesen Familien (Nr.: 8622, 8655 und 8826) wird nach Mutationen auf dem Chromosom 8 gesucht. Von jeder Familie soll jeweils ein Familienmitglied untersucht werden. Die Identifizierungsnummern dieser Probanden sind 8622503, 8655501 und 8826501. Ihre DNA wird ebenfalls nummeriert: Proband 8622503 hat die DNA-Nummer 1, Proband 8655501 die DNA-Nummer 2 und Proband 8826501 die DNA-Nummer 3.

Die Blutentnahme und die DNA-Isolierung erfolgten durch das Laborpersonal. Die Probanden-DNA wurde im Kühlschrank bei einer Temperatur von -26°C aufbewahrt.

2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bahnbrechend in der Geschichte der Genetik war die Erfindung der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) durch Kary Mullis im Jahr 1983 (50). Seit 1985 wird sie erfolgreich für die DNA-Amplifizierung eingesetzt (51). Die PCR findet Anwendung in unterschiedlichen Feldern wie zum Beispiel in der Humangenetik, aber

auch in der Kriminalistik. So konnten in der Kriminalistik in den letzten Jahren viele Straftaten noch nach Jahrzehnten mit Hilfe der PCR aufgeklärt werden.

Bei der PCR wird in drei Schritten vorgegangen: Im ersten Schritt wird die DNA durch Erhitzen bei ca. 93-95°C denaturiert.

Danach erfolgt im zweiten Schritt die Abkühlung und die Anheftung der Primer (Oligonukleotide) an komplementäre DNA-Stränge bei 50-60°C.

Im dritten Schritt findet die DNA-Synthese, die durch eine hitzestabile DNA-Polymerase gesteuert wird, bei Temperaturen von 70-75°C statt.

Diese drei Schritte werden mehrfach wiederholt, so dass nach etwa 30-40 Zyklen eine ausreichend lange DNA, die dann leicht analysiert werden kann, erhalten ist.

2.3 Etablierung der PCR

Die Mutationssuche erfolgte in drei Genen: *TRPS1*, *EXT1* und *c-MYC*. Dafür wurden Primer, die die Gene komplett abdecken, bestellt. Dies waren 29 Primerpaare für das *TRPS1* Gen, 16 Primerpaare für das *EXT1* Gen und 9 Primerpaare für das *c-MYC* Gen. Diese Primer lieferten die Firmen Applied Biosystems und Hölle & Hüttner AG. Die Primer werden bis zur Verwendung bei einer Temperatur von -26°C im Kühlschrank aufbewahrt. Sie werden vor der Verwendung auf ihre Funktionsfähigkeit getestet.

2.3.1 PCR-Protokoll

2.3.1.1 Reagenzien

Test-DNA, Gold Master Mix (Ampli Taq Gold® PCR Master Mix), 50%-iges Glycerol, H₂O (destilliertes Wasser), Primer. Die Primer für die Gene *TRPS1* und *EXT1* wurden bei der Firma Applied Biosystems (VariantSEQR™ Resequencing System) bestellt. Diese Firma liefert die Primer, aber keine Sequenzen hierzu. Für das *c-MYC* Gen wurden drei Primer ebenfalls von der Firma Applied Biosystems verwendet. Die restlichen sechs Primer für das *c-MYC* Gen stammen von der Firma Hölle & Hüttner AG, die auch Sequenzen von Primern (Tabelle 2, Seite 16) mitliefert.

Primer	Primersequenzen	Länge
MYC-Ex1-1 F	5'-GAGCAGCAGAGAAAGGGAGA-3'	20bp
MYC-Ex1-1 R	5'-GCTGCTATGGGCAAAGTTTC-3'	20bp
MYC-Ex1-2 F	5'-TCGGGGCTTTATCTAACTCG-3'	20bp
MYC-Ex1-2 R	5'-GTTTTCCCTCTGCCTTCTCC-3'	20bp
MYC-Ex2 F	5'-GCCGATTTTCGATTCCTCTG-3'	19bp
MYC-Ex2 R	5'-GGGTTCGCAGATGAAACTCTG-3'	20bp
MYC-Ex3 F	5'-ACGTCTCCACACATCAGCAC-3'	20bp
MYC-Ex3 R	5'-ACTCAGCCAAGGTTGTGAGG-3'	20bp
MYC-3'UTR-1 F	5'-CAAATTGGACTTTGGGCATAA-3'	21bp
MYC-3'UTR-1 R	5'-TAACCCATGGACAGGACTGG-3'	20bp
MYC-3'UTR-2 F	5'-GCAGGTGAGAAGGTGAGAGG-3'	20bp
MYC-3'UTR-2 R	5'-GAGGTGGCTTGGACAGGTTA-3'	20bp

Tabelle 2. Darstellung der Bezeichnung, der Sequenzen und der Länge der sechs Primerpaare des c-MYC Gens. Vorwärtssequenzen = F (forward), Rückwärtssequenzen = R (reverse).

2.3.1.2 Durchführung

Für die Testung der Primer wurden 10µl Ansätze angefertigt. Hierzu werden pro Ansatz 1µl Test DNA mit 5µl Gold Master Mix (Ampli Taq Gold® PCR Master Mix), 1,6µl 50%-iges Glycerol, 0,4µl H₂O und 2µl Primer versetzt. Neben diesen Proben wurden auch zwei Leerproben angesetzt. Sie bestanden aus jeweils 5µl Gold Master Mix, 1,6µl 50%-igem Glycerol, 1,4µl H₂O und 2µl Primer. Die DNA wird hier nicht zugesetzt, sondern stattdessen wird 1µl H₂O mehr hinzugefügt.

Alle Proben werden zentrifugiert. Anschließend wird die PCR gestartet.

Das PCR-Programm wurde wie folgt gewählt: In der ersten Stufe läuft ein Zyklus 5 Minuten lang bei einer Temperatur von 96°C. Danach erfolgen in der zweiten Stufe 44 Zyklen: Pro Zyklus soll das Programm 30 Sekunden bei 94°C, 45 Sekunden bei 60°C und 45 Sekunden bei 72°C laufen. In der dritten und letzten Stufe gibt es einen Zyklus von 10 Minuten bei einer Temperatur von 72°C. Danach werden die Proben auf 4°C gehalten.

2.3.2 Elektrophorese:

Nach der Amplifizierung der Test-DNA wurde eine Elektrophorese für die PCR-Produkte durchgeführt. Auf dem Elektrophoresegel konnten dann die Banden untersucht werden. Es wurde geprüft, ob Banden für alle getesteten Primer vorhanden sind und ob die Banden ausreichend stark oder zu schwach sind.

2.3.2.1 Reagenzien

Agarose (Meta Phor® Agarose), 1%-iger Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer, Loading Dye, Sybr Green I und PCR-Produkt. Der TBE-Puffer enthält 890 mmol/l Trisbase, 890 mmol/l Borsäure, 20 mmol/l EDTA und destilliertes Wasser.

2.3.2.2 Durchführung

Als erstes wurde pro Gen ein Elektrophoresegel angefertigt. Das Elektrophoresegel besteht aus Agarose und einem 1%-igen TBE-Puffer. Auf 100ml 1%-iger TBE-Puffer kommt 1,5g Agarose. Die Größe des Gels und die dabei verwendete Menge von Agarose und TBE-Puffer hängen von der Anzahl der Proben pro Gen ab.

Die Mischung wurde solange erhitzt und vermischt, bis die Agarose gut in der Flüssigkeit, TBE-Puffer, gelöst war. Anschließend wurde das Gel in einem Kühlschrank so lange gekühlt, bis es fest war. Eine Kühlung ist auch unter Raumtemperatur möglich.

Parallel zu der Kühlung des Gels wurden die Proben für die Elektrophorese vorbereitet. Hierzu wurden zum PCR-Produkt 2µl Loading Dye und 1µl Sybr Green I hineingegeben. Die Proben wurden gut vermischt und zentrifugiert. Danach wurden sie in das gekühlte Gel pipettiert, und die Elektrophorese wurde gestartet. Diese lief dann 55 Minuten bei 115 Volt. Anschließend wurden die auf dem Gel vorhandenen Banden fotografiert. Primer, die bei der Elektrophorese-Auswertung keine oder nur schwache Banden zeigten, wurden erneut getestet bzw. neu bestellt.

2.4 DNA-Amplifizierung

Nachdem durch die Tests sichergestellt werden konnte, dass die Primer funktionsfähig sind, erfolgte die Amplifizierung der Probanden-DNAs. Hierfür wurden Proben mit 50µl Ansätzen bereitet. Die Konzentration der DNA betrug 10ng/µl.

2.4.1 Reagenzien

Probanden-DNA, Gold Master Mix (Ampli Taq Gold® PCR Master Mix), 50%-iges Glycerol, destilliertes Wasser (H₂O), 29 Primerpaare für das *TRPS1* Gen, 16 Primerpaare für das *EXT1* Gen und 9 Primerpaare für das *c-MYC* Gen.

2.4.2 Durchführung

Vor Ansatz der PCR wurden die Primer mit dem Pipettier-Roboter (Genesis Freedom 150) in die dafür vorgesehenen Platten pipettiert. Dieser Vorgang wurde von der MTA Anette Thiemig durchgeführt.

Die Proben wurden 24 Stunden unter Raumtemperatur getrocknet. Um eine Verschmutzung der Proben zu verhindern, wurden sie abgedeckt. Jeder Probe wurde nach der Trocknung 25µl Gold Master Mix, 8µl 50%-iges Glycerol, 12µl H₂O und 5µl Probanden-DNA hinzugefügt. Jede einzelne Probanden-DNA wurde jeweils mit allen Primern angesetzt. Zusätzlich zu den Probanden-Proben sind auch zwei Leerproben angefertigt worden. Die Leerproben enthalten jeweils 25µl Gold Master Mix, 8µl 50%-iges Glycerol, 17µl H₂O und einen 24 Stunden vorher pipettierten Primer. Sie enthalten keine DNA. Die PCR-Programmeinstellung wurde so vorgenommen wie in der Tabelle 3 dargestellt.

Stufe 1: 1 Zyklus	Stufe 2: 44 Zyklen	Stufe 3: 1 Zyklus
96°C für 5 Min.	Pro Zyklus: 94°C für 30 s, 60°C für 45 s, 72°C für 45 s	72°C für 10 Min.

Tabelle 3. PCR-Programmeinstellung. In der Tabelle sind die Anzahl der Zyklen, die Temperaturen und die Zeit pro Zyklus angegeben.

Nachdem die Amplifizierung abgeschlossen war, wurde das PCR-Produkt entweder im PCR-Gerät bei 4°C oder im Kühlschrank bei 3°C gehalten.

Mit Hilfe der Elektrophorese wird geprüft, ob in jeder Probe ausreichend PCR-Produkt vorhanden ist. Für die Elektrophorese wurden aus jeder Probe 5µl PCR-Produkt entnommen und in neue Tubs pipettiert. Das Ganze wurde mit 2µl Loading Dye und 1µl Sybr Green I vermischt und anschließend zentrifugiert.

Das Elektrophoresegel wurde mit 1,5g Agarose-Pulver pro 100ml 1%-igem TBE-Puffer angefertigt. Nach seiner Kühlung wurden die Elektrophorese-Proben in die Taschen des Gels pipettiert und danach die Elektrophorese gestartet. Das Gerät arbeitete 55 Minuten auf 115 Volt. Wenn das Programm beendet war, wurden die Banden auf dem Gel fotografiert. Proben mit keinen und zu schwachen Banden wurden wiederholt.

Die restlichen 45µl PCR-Produkte wurden im Kühlschrank bei 3°C aufbewahrt, bis sie schließlich nach Berlin zur Firma SEQLAB zum Sequenzieren geschickt wurden. Sie wurden unter Kühlung dorthin transportiert.

2.5 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismusanalyse

Eine einfache und genaue Methode der Mutationsanalyse ist die Restriktionsfragment-Längenpolymorphismusanalyse (RFLP-Analyse oder Restriktionsanalyse). Die Restriktionsanalyse wurde nur beim *EXT1* Gen für den Abschnitt des Primers 16 eingesetzt. Hier sollte eine fragliche Mutation bestätigt oder ausgeschlossen werden.

2.5.1 Prinzip

Für die Durchführung der Restriktionsanalyse werden Restriktionsenzyme eingesetzt. Sie schneiden die DNA, die untersucht werden soll, an spezifischen Stellen in Fragmente. Dabei haben die Restriktionsenzyme eine hohe Spezifität für ihre Schnittstellen.

Wenn im Bereich der Schnittstelle eine Mutation liegt, wird die Funktion der Restriktionsenzyme gestört. Dadurch wird der Restriktionsprozess unterbrochen.

In der Elektrophorese werden dann die Bandenmuster von Kontroll- und zu untersuchender DNA miteinander verglichen. Abweichungen im Bandenmuster sind Hinweise für Mutationen.

2.5.2 Reagenzien

Für PCR: 2,5 Eppendorf® Master Mix, Probanden- und Kontroll-DNA mit einer Verdünnung von 5ng/µl, Primer F (forward) und R (reverse) auf 10pmol/µl verdünnt.

Für Restriktionsanalyse: 10x NEB4, 100x BSA, H₂O, 20U/µl HhaI (Restriktionsenzym) und PCR-Produkt.

Für Elektrophorese: Agarose (Meta Phor® Agarose), 1%-iger TBE-Puffer, Loading Dye, Sybr Green I und Restriktionsanalyseprodukt.

2.5.3 Durchführung

Als erstes wurde die DNA unserer drei Probanden und 90 angefertigter Kontrollen amplifiziert. Dafür wurden 20µl Ansätze erstellt. Hierfür wurden 10µl DNA mit 8µl 2,5

Eppendorf Master Mix, 1µl Primer F (forward) und 1µl Primer R (reverse) versetzt. Zusätzlich zu den Normalproben wurden auch drei Leerproben angesetzt.

Die PCR-Programmeinstellung ist die gleiche wie bei der „DNA-Amplifizierung“ (siehe „DNA-Amplifizierung“, Durchführung, Seite 18).

Nach der DNA-Vervielfältigung wurde die Restriktionsanalyse durchgeführt. Hierzu wurde jedem PCR-Produkt (10µl) noch 2,5µl 10x NEB4-Puffer, 0,25µl 100x BSA, 12,15µl H₂O und 0,1µl HhaI (Restriktionsenzym) hinzugefügt. Der gesamte Inhalt pro Ansatz betrug 25µl. Die Restriktionsanalyse lief 10 Stunden bei 37°C und anschließend 15 Minuten bei einer Temperatur von 65°C.

Danach erfolgte die Elektrophorese. Bis die Elektrophorese durchgeführt wurde, wurden die Proben bei 3°C im Kühlschrank gelagert. Die Elektrophorese wurde durchgeführt, wie unter Seite 16 beschrieben. Die durch die Elektrophorese erhaltenen DNA-Banden wurden für die Auswertung fotografisch dokumentiert.

2.6 Auswertung

2.6.1 Allgemeines

Die Sequenzen wurden mit dem Programm Staden Package ausgewertet. Staden Package ist ein Computerprogramm, das im Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology in Cambridge in England entwickelt wurde. Mit ihm lassen sich Sequenzen analysieren und miteinander vergleichen.

2.6.2 Durchführung

Bevor mit der Auswertung der Daten begonnen werden konnte, musste die Datei (Sequenzen) in das Programm integriert werden.

Der erste Schritt war die Umbenennung der Datei in ABI Trace, da das Programm nur Daten in ABI Trace erkennt. Nach der Umbenennung der Datei wurde das Programm geöffnet. Durch einen Klick auf den Link „Pregap4“ wurde das Fenster „Pregap4 version 1.4b1“ geöffnet. Danach konnten die Daten mit einem weiteren Klick auf „Add files“ angezeigt und anschließend in das Fenster „Pregap4 version 1.4b1“ übertragen werden.

Danach wurde der Link „Configure Modules“ geöffnet. In der linken Leiste dieses Fensters mussten die Elemente „Quality Clip“, „Sequencing Vector Clip“, „Screen For Unclipped Vector“ und „Cloning Vector Clip“ per Klick auf das Symbol [x] entfernt werden. Anschließend wurde „Gap4 shotgun assembly“ durch das Anklicken des Symbols [x] eingeführt. Auf der rechten Leiste wurde unter „Gap4 database name“ der Name des gewünschten Ordners, in dem die Daten gespeichert werden sollen, angegeben. Der vorletzte Schritt war das Anklicken der „Create new database“. Danach konnte durch den Link „Run“ unten auf der linken Seite des Fensters mit der Integrierung der Daten in das Programm begonnen werden.

Zur Auswertung wurde das Programm über den Ordner, in dem die Daten gespeichert wurden, geöffnet. Auf dem Computerbildschirm erschienen die Fenster „GAP v4.8b1“ und „Contig Selector“.

Auf dem „Contig Selector“ Fenster ist eine horizontale Linie, die durch vertikale Striche unterteilt ist, zu sehen. Durch einen Klick mit der rechten Maustaste auf der horizontalen Linie und einem weiteren Klick mit der linken Maustaste auf „Edit Contig“ wird das Fenster „Contig Editor“, in dem die Sequenzen als Text zu finden sind, erreicht. Mit einem Doppelklick auf einem der Basenbuchstaben konnte das Elektropherogramm „Trace display“ geöffnet werden. Dabei wurden die Sequenzen nach Mutationen wie Basenaustausch, Einschub oder Verlust von einer oder mehreren Basen untersucht. Diese Mutationen manifestieren sich als Überlappungen, Überschuss oder Fehlen einer oder mehrerer Basen im Elektropherogramm.

Es wurden die Elektropherogramme aller Abschnitte der Primer untersucht. Durch Einstellungen im „Contig Editor“ über „Settings“ und „By background colour“ können die Varianten auch im Text sichtbar gemacht werden. Der Hintergrund der Varianten wird dann zum Beispiel mit einer Farbe markiert.

Die gefundenen Genvarianten wurden anschließend in dem dazugehörenden Gen lokalisiert. Lag eine Variante im Exon, wurde zusätzlich überprüft, in welchem Proteinbereich sie sich befindet und ob es dadurch zu einem Aminosäureaustausch kommt.

2.7 Konservierungsgrad der identifizierten Varianten

2.7.1 Allgemeines

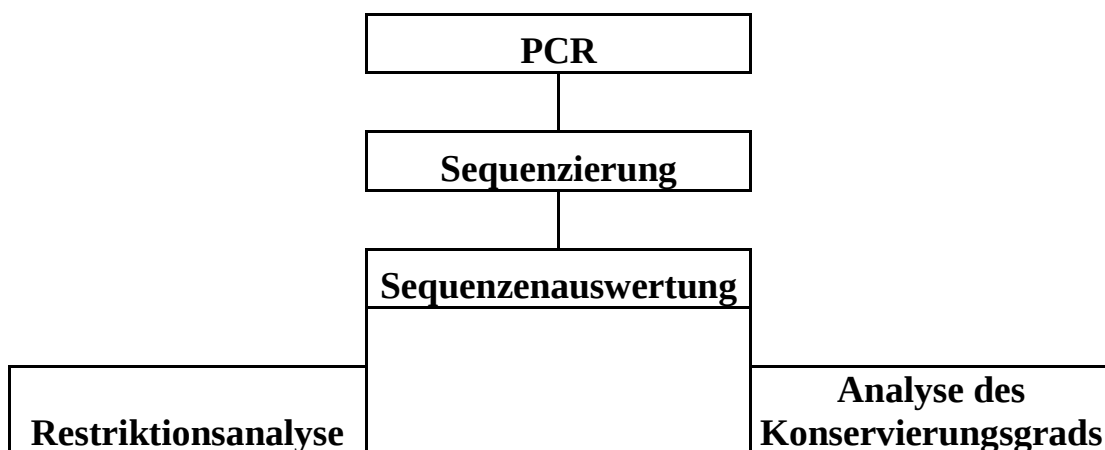
Bestimmte DNA-Abschnitte kommen bei mehreren Spezies vor. Dies wird als Konservierung der genetischen Sequenzen bezeichnet. Je mehr Spezies den gleichen DNA-Abschnitt besitzen, umso konservierter ist dieser DNA-Abschnitt.

2.7.2 Durchführung

Der Konservierungsgrad wurde für alle Genregionen, in denen eine genetische Variante gefunden wurde, ermittelt. Zur Ermittlung des Konservierungsgrads stehen mehrere Internetplattformen zur Verfügung. Für diese Dissertation wurde „Human BLAT Search“ (<http://genome.csdb.cn/cgi-bin/hgBlat>) verwendet. Als erstes wurden ca. 20 Basen up- und downstream der gefundenen genetischen Variante notiert. Danach wurden diese Basen in das dafür vorgesehene Fenster auf „Human BLAT Search“ eingegeben. Es erscheint eine grafische Darstellung, aus der sich der Konservierungsgrad der eigenen Daten ablesen lässt (siehe zum Beispiel Abbildung 7, Seite 27).

2.8 Schematische Darstellung der praktischen Vorgehensweise bei dieser Promotionsarbeit

Hier werden die einzelnen praktischen Schritte bei dieser Promotionsarbeit kurz schematisch dargestellt:



3. Ergebnisse

3.1 Sequenzanalysen für das *TPRS1* Gen

Zur Mutationssuche im *TPRS1* Gen wurde das gesamte Gen mit 29 Primerpaaren abgedeckt. In diesem Gen konnten bei unseren Probanden zwei genetische Varianten gefunden werden.

3.1.1 rs2737218

rs2737218 ist die Identifikationsnummer für die erste Variante, die im Intron 3 auf der Position g.116700453 bei dem Probanden mit der DNA-Nummer 3 identifiziert wurde. Der Proband zeigte die Variante A > G. Bei einer erneuten Amplifizierung und Sequenzierung dieses DNA-Abschnittes wurde die Variante nicht nur bei dem Probanden mit der DNA-Nummer 3, sondern auch bei dem Probanden mit der DNA-Nummer 2 gefunden. Die Region, in der sie liegt, ist nicht konserviert. Diese genetische Variante ist laut Datenbankeinträgen bereits bekannt. Die Allelfrequenz in der europäischen Population liegt bei 0.25 für das G-Allel und 0.75 für das A-Allel.

3.1.2 rs1180628

Auch die zweite im *TPRS1* Gen gefundene genetische Variante, rs1180628, liegt im Intron. Sie wurde im Intron 5 auf der Position g.116500037 lokalisiert. Die Variante G > T konnte in zwei Familien, nämlich bei den Probanden mit der DNA-Nummer 1 und der DNA-Nummer 2, gefunden werden. Es zeigte sich, dass die Variante in einem hochkonservierten Bereich lokalisiert ist. Auch diese Variante ist aber bereits beschrieben. Die Allelfrequenz in der europäischen Population liegt bei 0.23 für das T-Allel und 0.77 für das G-Allel.

3.2 Sequenzanalysen für das *EXT1* Gen und Restriktionsanalyse

Zur Mutationssuche im *EXT1* Gen wurden 16 Primerpaare verwendet. Es konnten in diesem Gen insgesamt neun genetische Varianten nachgewiesen werden.

3.2.1 rs7835605, rs7835956, rs6469721, rs34016643

Im 5`UTR-Bereich wurde im Sequenzierungsabschnitt der Primer 6 und 8 die Variante C > T, g.119194082, entdeckt. Diese genetische Variante konnte bei den DNAs mit den Nummern 1 und 3 gezeigt werden. Sie wurde vom Auswertungsprogramm (Staden Package) als solche nicht erkannt. Erst durch eine händische Auswertung der Elektropherogramme konnte sie nachgewiesen werden. Diese genetische Variante, rs7835605, ist bekannt. Diese Genregion ist nicht konserviert. Die Allelfrequenz in der europäischen Population liegt bei 0.49 für das T-Allel und 0.51 für das C-Allel.

Auf der Genposition g.119194005 im 5`UTR-Bereich konnte im Sequenzierungsabschnitt der Primer 6 und 8 bei den DNAs mit den Nummern 1 und 3 eine schon bekannte Variante, rs7835956, nachgewiesen werden. Diese Region um die genetische Variante C > T ist nicht konserviert. Die Allelfrequenz in der europäischen Population liegt bei 0.49 für das T-Allel und 0.51 für das C-Allel.

Im Sequenzierungsabschnitt des Primers 6 wurde im 5`UTR-Bereich, g.119193750, bei den DNAs mit den Nummern 1 und 3 die Variante C > G, die bereits beschrieben ist, festgestellt, rs6469721. Auch diese Variante wurde vom Auswertungsprogramm nicht erkannt, sondern erst durch die Untersuchung der Elektropherogramme gefunden. Der DNA-Abschnitt, in der die Variante geortet wurde, ist nicht konserviert. Die Allelfrequenz in der europäischen Population liegt bei 0.49 für das G-Allel und 0.51 für das C-Allel.

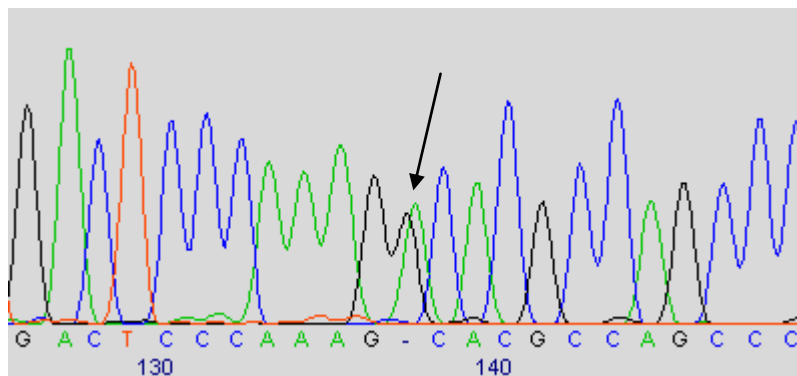
Ebenfalls im Sequenzierungsabschnitt des Primers 6 konnte die genetische Variante C > G bei dem Probanden mit der DNA-Nummer 2 auf der Genposition g.119193624 identifiziert werden. Der DNA-Abschnitt, in dem diese Variante liegt, befindet sich im 5`UTR-Bereich. Diese Genregion ist nicht konserviert. Die Identifikationsnummer für diese genetische Variante ist rs34016643. Die Allelfrequenz in der europäischen Population liegt bei 0.04 für das G-Allel und 0.96 für das C-Allel.

Alle beschriebenen genetischen Varianten wurden durch Resequenzierung noch einmal bestätigt.

3.2.2 Genetische Variante C > T, g.119191483

In einer ersten Sequenzierung wurde eine genetische Variante im Sequenzierungsabschnitt des Primers 16 vermutet. Sie wurde bei dem Probanden mit der DNA-Nummer 3 registriert. Die genetische Variante lag im Exon 1 auf der Genposition g.119191547 und betraf das Kodon CAC, c.920. Hiervon war das Nukleotid Adenin betroffen. Durch diese genetische Variante wäre das Nukleotid Adenin gegen Guanin ausgetauscht worden, so dass aus CAC > CGC entstehen würde. Der Variantenabschnitt war sehr stark konserviert. Um diese genetische Variante weiter zu klären, wurde eine Restriktionsanalyse durchgeführt. Neben den Probanden-DNAs waren auch 90 Kontrollen in die Untersuchung eingeschlossen. Die Restriktionsanalyse konnte jedoch die vermutete genetische Variante nicht bestätigen. Zusätzlich wurde dieser DNA-Abschnitt noch einmal sequenziert. Auch die erneute Sequenzierung ergab keine Variante in dieser Genposition. Mit den Resequenzen konnte aber eine andere, in den ersten Sequenzen nicht eindeutige, genetische Variante bestätigt werden: die Variante C > T, g.119191483. Sie wurde bei der DNA-Nummer 2 beobachtet (Abbildung 6, Seite 25 und 26) und liegt direkt hinter dem Exon 1 im Intron 1. Sie wurde bis heute nicht beschrieben und ist somit eine neue genetische Variante.

a)



b)

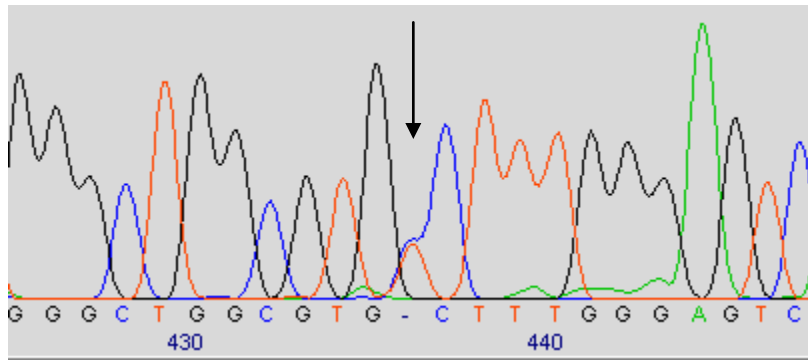


Abbildung 6. Elektropherogramme mit genetischer Variante in der DNA-Nummer 2. Die genetische Variante ist mit einem Pfeil markiert. a) Vorwärtssequenz, b) Rückwärtssequenz.

Die Genposition, in der diese genetische Variante nachgewiesen wurde, ist nicht konserviert (Abbildung 7, Seite 27).

3.2.3 rs17452694

Im Sequenzierungsabschnitt des Primers 7 konnte im Intron 2, g.118918327, eine genetische Variante bei den Probanden mit der DNA-Nummer 1 und DNA-Nummer 2 nachgewiesen werden. Es zeigte sich die genetische Variante T > C. Diese Variante, rs17452694, ist bei anderen Personen schon beschrieben worden. Durch eine Resequenzierung dieses DNA-Abschnittes konnte die Variante noch einmal bestätigt werden. Der DNA-Abschnitt ist nicht konserviert. Die Allelfrequenz in der europäischen Population liegt bei 0.49 für das C-Allel und 0.51 für das T-Allel.

Abbildung 7. Darstellung des Konservierungsgrads des genetischen Abschnittes, in dem die genetische Variante $C > T$, g119191483 im *EXT1* Gen lokalisiert ist. Der obere Pfeil rechts zeigt die Position der Variante auf dem Chromosom 8 an, der obere Pfeil links die genetische Variante. Mit den Pfeilen links seitlich (von oben nach unten) sind der Konservierungsgrad der Sequenzen sowie die Spezies markiert (52).

3.2.4 rs17439875

Im Sequenzierungsabschnitt des Primers 11 wurde eine Variante im Exon 3 lokalisiert. Diese Variante T > C wurde bei einem einzigen Probanden, in der DNA-Nummer 3 beobachtet. Die dazugehörige Genposition ist g.118916963. In der genomischen DNA liegt diese Variante in der Position c.1065. Das betroffene Kodon ist TGC. Dabei kommt es zu einem Austausch des dritten Nukleotids im Kodon. Der Proband hat die Kodon-Konstellation TGT statt der „normalen“ Konstellation TGC. Die Genregion ist sehr stark konserviert. Die Variante ist vor Kurzem auch durch andere Arbeitsgruppen identifiziert worden, rs17439875. Die Allelfrequenz in der europäischen Population liegt bei 0.19 für das C-Allel und 0.81 für das T-Allel.

3.2.5 rs17439693

Bei dem Probanden mit der DNA-Nummer 2 konnte im Sequenzierungsabschnitt des Primers 4 eine Variante im Exon 6 gefunden werden. Sie ist seit Kurzem bekannt, rs17439693. Unser Proband zeigte die Variante T > C in der Genposition g.118901201. Die Kodon-Konstellation war hier CCT anstatt der „normalen“ CCC. Es kommt also zu einem Austausch des dritten Nukleotids. In der genomischen DNA liegt die Variante in der Position c.1431. Die Region, in der sich diese genetische Variante befindet, ist sehr stark konserviert. Die Allelfrequenz in der europäischen Population liegt bei 0.13 für das C-Allel und 0.87 für das T-Allel.

3.2.6 rs7837891

Die letzte genetische Variante, die im *EXT1* Gen identifiziert wurde, liegt im Exon 9. Diese Variante im Sequenzierungsabschnitt des Primers 2 wurde in der DNA-Nummer 1 beobachtet. Hier ist ein Nukleotidaustausch vorhanden. Bei dem betroffenen Probanden wurde das Nukleotid Adenin anstelle von Guanin in der Position g.118888759 gefunden. Dadurch hat der Proband das Triplet GAA statt des „normalen“ Triplets GAG, c.1761. Diese Variante ist bekannt, rs7837891. Die Position ist stark konserviert. Die Allelfrequenz in der europäischen Population liegt bei 0.37 für das G-Allel und 0.63 für das A-Allel.

3.3 Sequenzanalysen für das *c-MYC* Gen

Das *c-MYC* Gen wurde mit insgesamt 9 Primerpaaren komplett auf genetische Varianten untersucht. Es konnten fünf Varianten nachgewiesen werden.

3.3.1 rs4645943

Bei dem Probanden mit der DNA-Nummer 3 befand sich im Sequenzierungsabschnitt des Primers 2 eine genetische Variante im 5'UTR-Bereich: T > C. Sie liegt auf der Genposition g.128816653 und wurde auch durch andere Arbeitsgruppen beschrieben, rs4645943. Die Region ist nicht konserviert. Die Allelfrequenz in der europäischen Population liegt bei 0.19 für das C-Allel und 0.81 für das T-Allel.

3.3.2 Genetische Variante A > C, g.128817086

Ebenfalls im 5'UTR-Bereich konnte im Sequenzierungsabschnitt des Primers 3 eine bisher nicht bekannte genetische Variante identifiziert werden: A > C. Die Variante war nur bei dem Probanden mit der DNA-Nummer 3 vorhanden (Abbildung 8). Die Genregion g.128817086, in der sie liegt, ist nicht konserviert (Abbildung 9, Seite 30).

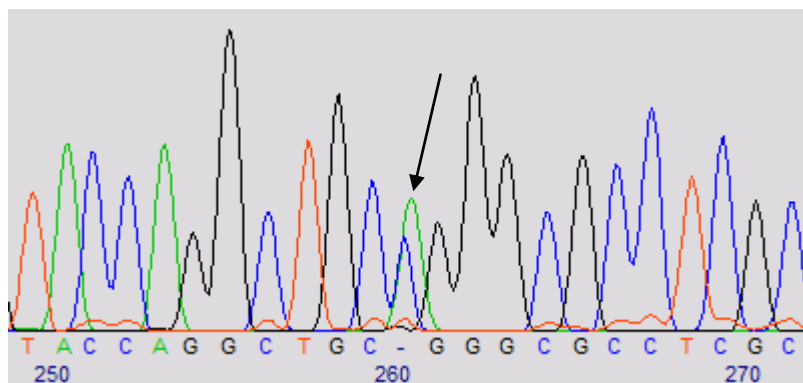


Abbildung 8. Elektropherogramm mit genetischer Variante in der Rückwärtssequenz der DNA-Nummer 3. Die genetische Variante ist mit einem Pfeil markiert.

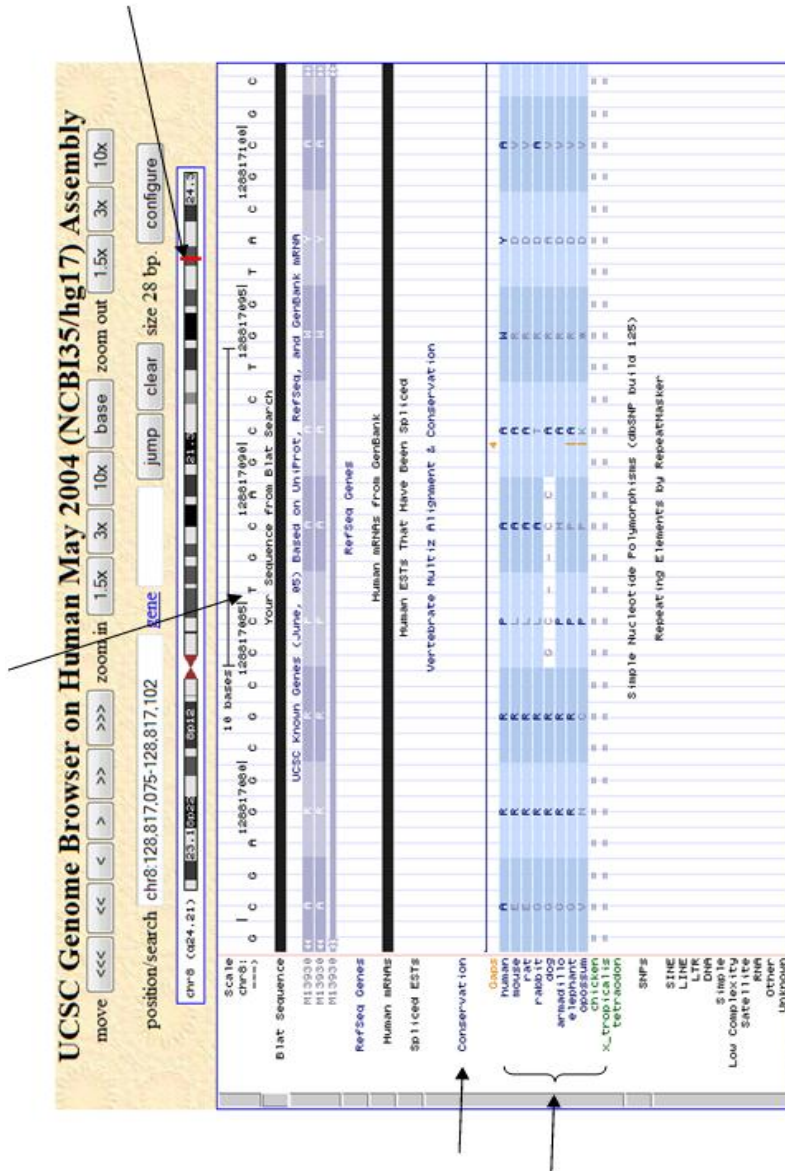


Abbildung 9. Darstellung des Konservierungsgrads des genetischen Abschnittes, in dem die genetische Variante A > C, g128817086 im c-MYC Gen lokalisiert ist. Der obere Pfeil rechts zeigt die Position der Variante auf dem Chromosom 8 an, der Pfeil oben in der Mitte die genetische Variante. Hier ist die Base Thymin (T) zu sehen, da das Programm die Vorwärtssequenz angibt. Die genetische Variante lag in der Rückwärtssequenz. Mit den Pfeilen links seitlich (von oben nach unten) sind der Konservierungsgrad der Sequenzen sowie die Spezies dargestellt (53).

3.3.3 rs4645958

Im Sequenzierungsabschnitt des Primers Ex 2 wurde bei den drei Probanden die gleiche genetische Variante, G > C, gefunden. Die Variante liegt im Intron 1, g.128819595. Sie ist bekannt, rs4645958. Dieser DNA-Abschnitt ist nicht konserviert. Die Allelfrequenz in der europäischen Population liegt bei 0.17 für das C-Allel und 0.83 für das G-Allel.

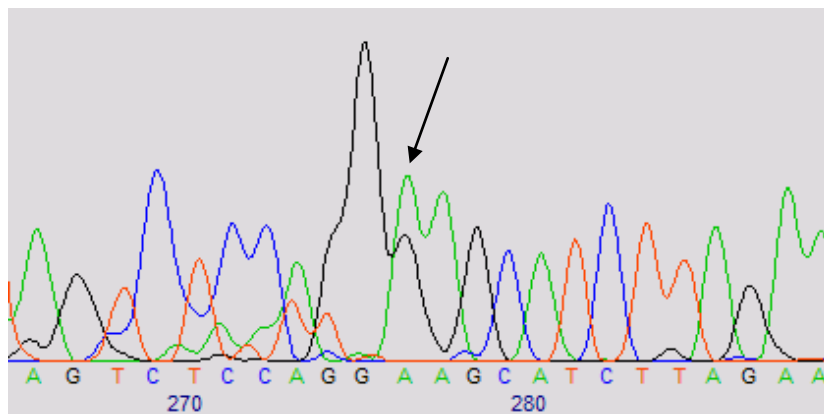
3.3.4 rs2070583

Im Intron 3 an der Grenze zu Exon 3 konnte eine genetische Variante in der DNA-Nummer 1 und DNA-Nummer 3 geortet werden. Die Variante G > A wurde in der Genposition g.128822436 identifiziert. Sie wurde auch von anderen Arbeitsgruppen nachgewiesen, rs2070583. Die Genregion ist nicht konserviert. Die Allelfrequenz in der europäischen Population liegt bei 0.06 für das A-Allel und 0.94 für das G-Allel.

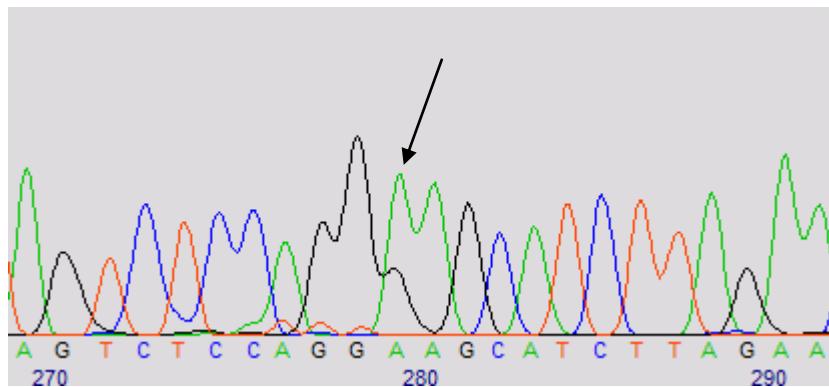
3.3.5 Genetische Variante A > G, g.128823032

Im Sequenzierungsabschnitt des Primers U 1 wurde eine genetische Variante im 3'UTR-Bereich nachgewiesen. Die Variante A > G wurde in allen drei DNAs lokalisiert (Abbildung 10, Seite 31 und 32). Die Variante wurde vom Auswertungsprogramm nicht erkannt. Erst durch die Auswertung der Elektropherogramme konnte sie entdeckt werden. Sie liegt auf der Genposition g.128823032 und war bis heute noch nicht bekannt.

a)



b)



c)

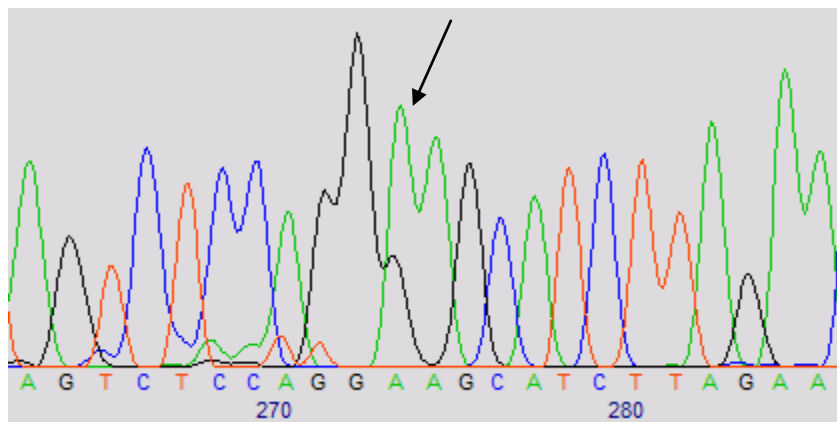


Abbildung 10. Elektropherogramme mit genetischer Variante in den Rückwärtssequenzen der DNA-Nummer 1, 2 und 3. Die genetische Variante ist mit einem Pfeil markiert. a) DNA-Nummer 1, b) DNA-Nummer 2 und c) DNA-Nummer 3.

Die Region, in der diese genetische Variante lokalisiert wurde, ist sehr stark konserviert (Abbildung 11, Seite 33).

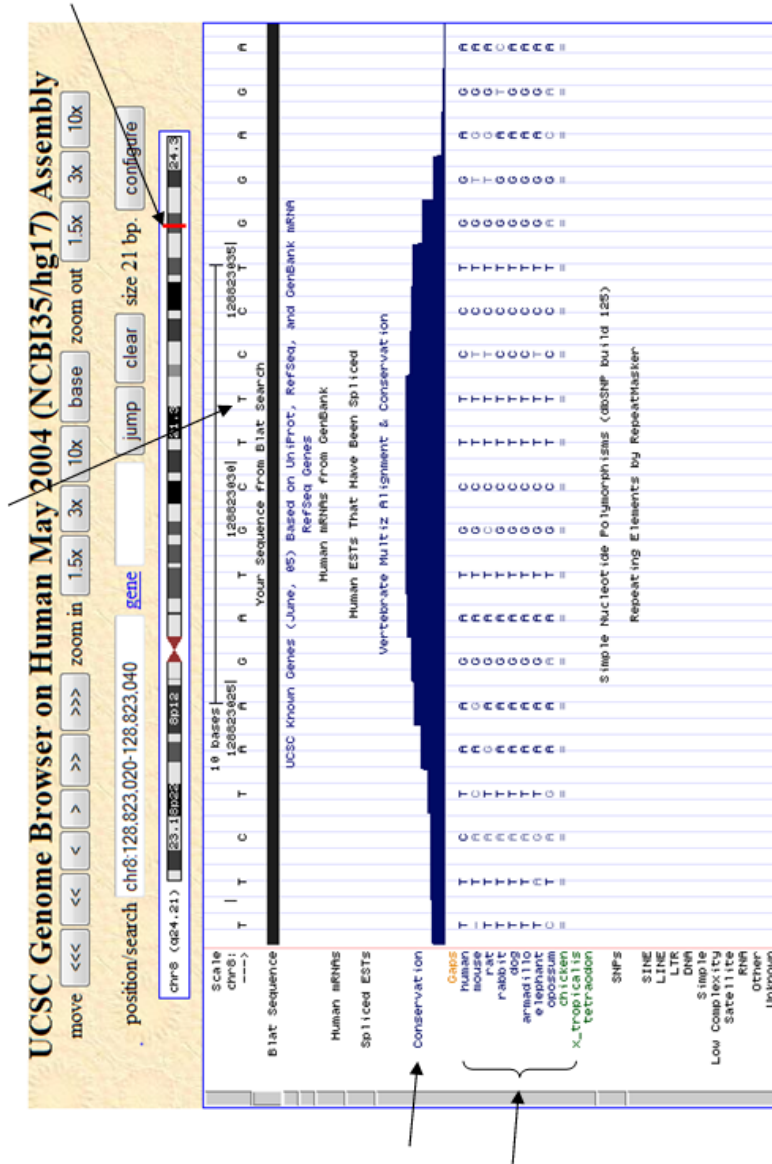


Abbildung 11. Darstellung des Konservierungsgrads des genetischen Abschnittes, in dem die genetische Variante $A > G$, g128823032 im c-MYC Gen lokalisiert ist. Der obere Pfeil rechts zeigt die Position der Variante auf dem Chromosom 8 an, der Pfeil oben in der Mitte die genetische Variante. Hier ist die Base Thymin (T) zu sehen, da das Programm die Vorwärtssequenz angibt. Die genetische Variante lag in der Rückwärtssequenz. Mit den Pfeilen links seitlich (von oben nach unten) sind der Konservierungsgrad der Sequenzen sowie die Spezies dargestellt (54).

3.4 Übersicht der nachgewiesenen genetischen Varianten

Genomische Position	Position	cDNA-Position	Protein-Position	Status
NM014112	TRPS1 Gen	NM 014112	NM014112	
g.116700453 A>G	Intron 3 + 81 A/G			rs2737218
g.116500037 G>T	Intron 5 – 181 G/T			rs1180628
Genomische Position	Position	cDNA-Position	Protein-Position	Status
NM000127	EXT1 Gen	NM 000127	NM 000127	
g.119194082 C>T	5'UTR – 843 C/T			rs7835605
g.119194005 C>T	5'UTR – 766 C/T			rs7835956
g.119193750 C>G	5'UTR – 551 C/G			rs6469721
g.119193624 C>G	5'UTR – 385 C/G			rs34016643
g.119191483 C>T	Intron 1 + 22 C/T			neu
g.118918327 T>C	Intron 2 + 201 T/C			rs17452694
g.118916963 T>C	Exon 3	c.1065 T>C	p.C355C	rs17439875
g.118901201 T>C	Exon 6	c.1431 T>C	p.P477P	rs17439693
g.118888759 A statt G	Exon 9	c.1761 A statt G	p.E587E	rs7837891

Fortsetzung auf Seite 35

Genomische Position	Position	cDNA Position	Protein Position	Status
NM 002467	<i>c-MYC Gen</i>	NM 002467	NM 002467	
g.128816653 T>C	5'UTR – 845 T/C			rs4645943
g.128817086 A>C	5'UTR – 412 A/C			neu
g.128819595 G>C	Intron 1 – 81 G/C			rs4645958
g.128822436 G>A	Intron 3 G/A			rs2070583
g.128823032 A>G	3'UTR + 179 A/G			neu

Tabelle 4. Übersicht der nachgewiesenen genetischen Varianten. In der Tabelle sind alle genetischen Varianten mit deren genomischen Positionen in den drei Genen angegeben. Bei den genetischen Varianten in den Exonen wurde zusätzlich die cDNA- und die Protein-Position ermittelt. Bei bekannten genetischen Varianten ist die Identifikationsnummer angezeigt.

4. Diskussion

Die koronare Herzkrankheit (KHK) und der Herzinfarkt sind trotz bisheriger enormer Fortschritte in der Medizin weiterhin die häufigste Todesursache in den Industrienationen. Neben den klassischen Risikofaktoren wie Bluthochdruck, fortgeschrittenes Alter, männliches Geschlecht, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie und erniedrigte HDL-Werte, ist die positive Familienanamnese für die KHK und den Herzinfarkt ein unabhängiger Risikofaktor. Die Bedeutung der positiven Familienanamnese als Risikofaktor für die KHK und den Herzinfarkt wurde durch mehrere Studien belegt (13, 14, 16, 17, 18, 19, 20). Dies wiederum verdeutlicht die genetische Beteiligung in der Entstehung der KHK und des Herzinfarkts.

Die Aufgabe der vorliegenden Dissertationsarbeit war es, nach Gendefekten, die direkt mit dem Auftreten des Herzinfarkts in Verbindung stehen könnten und ein autosomal dominantes Vererbungsmuster zeigen, zu suchen. Hierfür wurden drei Herzinfarkt-Großfamilien, nämlich zwei Familien mit einem Kopplungsbefund auf dem Chromosom 8q23.3-8q24.4 und eine Familie als Kontrolle, ausgewählt. Aus jeder Familie wurde ein betroffenes Familienmitglied auf genetische Varianten im *TRPS1* Gen, *EXT1* Gen und *c-MYC* Gen auf dem Chromosom 8 untersucht. Es wurden insgesamt 16 genetische Varianten identifiziert. Bei allen diesen genetischen Varianten handelt es sich um Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs).

4.1 Erörterung der Ergebnisse

4.1.1 Genetische Varianten im *TRPS1* Gen

Die beiden gefundenen genetischen Varianten im *TRPS1* Gen befinden sich im Intron. Die Varianten rs2737218 (DNA-Nummer 2 und 3, Intron 3) und rs1180628 (DNA-Nummer 1 und 2, Intron 5), für die die Probanden homozygot sind, bewirken wegen ihrer Lage im Intron keine Funktionsveränderung des Genprodukts. Literaturhinweise für eine Beteiligung dieser genetischen Varianten in der Pathogenese des Herzinfarkts liegen bisher nicht vor.

4.1.2 Genetische Varianten im *EXT1* Gen

Von den neun genetischen Varianten im *EXT1* Gen befinden sich vier im 5`UTR-Bereich, zwei im Intron und drei im Exon.

Die genetischen Varianten rs7835605, rs7835956 und rs6469721 (DNA-Nummer 1 und 3) sowie die genetische Variante rs34016643 (DNA-Nummer 2) sind im 5`UTR-Bereich lokalisiert. Für diese vier genetischen Varianten waren die betroffenen Probanden heterozygot. Die Bedeutung der genetischen Varianten rs7835605, rs7835956 und rs6469721 ist nicht bekannt. Für die genetische Variante rs34016643 wird eine Mitwirkung in der Pathogenese der multiplen Osteochondrome (multiple hereditäre Exostosen) vermutet (55). Ein Zusammenhang dieser genetischen Varianten mit dem Herzinfarkt in den Großfamilien kann nicht angenommen werden. Diese Varianten sind zu häufig, um den Effekt in den Großfamilien zu erklären.

Die genetischen Varianten C > T, g.119191483, (DNA-Nummer 2) und rs17452694 (DNA-Nummer 1 und DNA-Nummer 2) sind im Intron 1 und Intron 2 lokalisiert. Die betroffenen Probanden sind hierfür homozygot. Die genetische Variante rs17452694 war vorher bekannt. Eine klinische Bedeutung von ihr konnte bisher nicht belegt werden.

Die erste in einem Exon gefundene genetische Variante rs17439875 (DNA-Nummer 3) liegt im Exon 3. Der Proband ist für diese genetische Variante heterozygot. Hier kommt es zu einem Nukleotidaustausch in der dritten Position, so dass der Proband das Kodon TGT anstelle des Kodons TGC besitzt. Beide Kodone kodieren für die Aminosäure Cystein. Cystein gehört zu den bedingt essentiellen Aminosäuren. Cystein ist eine Aminosäure mit polaren, ungeladenen Seitenketten. Durch Bildung von Disulfidbindungen erfüllt Cystein eine wichtige Funktion bei vielen Proteinen.

Bei der genetischen Variante rs17439693 (DNA-Nummer 2) im Exon 6 handelt es sich um einen Austausch des dritten Nukleotids im Kodon CCC. Dadurch besitzt der betroffene Proband, der hierfür heterozygot ist, das Kodon CCT. Die Kodone CCC und CCT kodieren für die Aminosäure Prolin. Prolin ist eine nichtessentielle Aminosäure. Mit seiner starren Konfiguration verleiht Prolin den Polypeptidketten, die Prolin enthalten, eine eingeschränkte strukturelle Flexibilität.

Die im Exon 9 lokalisierte genetische Variante rs7837891 (DNA-Nummer 1) ist der Nukleotidaustausch Adenin anstelle von Guanin. Der Proband ist hierfür heterozygot. Es entsteht auch hier kein Aminosäurenaustausch. Das „normale“ Kodon GAG und das Kodon GAA des betroffenen Probanden kodieren für die gleiche Aminosäure Glycin.

Glycin gehört zu den Aminosäuren mit unpolaren, hydrophoben Seitenketten. Es besitzt die einfachste Struktur unter den Aminosäuren. Es ist eine nichtessentielle Aminosäure.

Alle in den Exonen nachgewiesenen genetischen Varianten im *EXT1* Gen führen zu keinem Aminosäurenaustausch. Sie haben somit keinen funktionellen Einfluss auf das Genprodukt. Sie können daher die Manifestation des Herzinfarkts in den untersuchten Großfamilien nicht erklären.

Im *EXT1* Gen wurde bei der ersten Sequenzierung im Exon 1 eine genetische Variante $G > A$ g.119191547, (DNA-Nummer 3) festgestellt. Der Proband war hierfür heterozygot. In diesem Exon wäre das Kodon CAC betroffen. Das Kodon CAC kodiert für Histidin. Histidin ist eine essentielle Aminosäure und gehört zu den Aminosäuren mit positiv geladenen Seitenketten. Histidin ist ein wichtiger Faktor in vielen enzymkatalytischen Reaktionen. Im Gegensatz zu den drei oben beschriebenen genetischen Varianten in den Exonen wäre in diesem Fall das zweite Nukleotid im Kodon betroffen. Durch den Nukleotidaustausch im Kodon CAC wäre es zu einer anderen Kodonkonstellation gekommen. Es würde das Kodon CGC entstehen. Das Kodon CGC kodiert für die Aminosäure Arginin. Arginin besitzt ebenfalls eine positiv geladene Seitenkette. Es ist aber im Gegenteil zu Histidin eine nichtessentielle Aminosäure. Durch diesen Aminosäurenaustausch wäre eine Funktionsveränderung der Proteine möglich. Vor allem könnten Proteine mit enzymkatalytischen Funktionen davon betroffen sein. Diese genetische Variante konnte jedoch bei der Resequenzierung nicht bestätigt werden. Auch eine Restriktionsfragment-Längenpolymorphismusanalyse konnte diese genetische Variante nicht bestätigen. Sie ist daher als Artefakt zu bewerten.

4.1.3 Genetische Varianten im *c-MYC* Gen

Von den fünf identifizierten genetischen Varianten im *c-MYC* Gen lagen zwei im 5'UTR-Bereich, zwei im Intron und eine im 3'UTR-Bereich.

Für die beiden genetischen Varianten rs4645943 und $A > C$, g.128817086, (DNA-Nummer 3) im 5'UTR-Bereich ist der Proband heterozygot. Diese genetischen Varianten erklären wegen ihrer Position im 5'UTR-Bereich den Herzinfarkt in den Großfamilien nicht. Für die bekannte genetische Variante rs4645943 existieren in der Literatur keine Berichte über eine Mitwirkung in der Pathogenese des Herzinfarkts.

Die genetischen Varianten rs4645958 (DNA-Nummer 1, 2 und 3) und rs2070583 (DNA-Nummer 1 und 3) fanden sich im Intron 1 und 3. Für die genetischen Varianten rs4645958 und rs2070583 waren die Probanden 1 und 3 homozygot. Der Proband 2 war für die genetische Variante rs4645958 heterozygot. Eine Verbindung zwischen diesen genetischen Varianten und dem Herzinfarkt in den Großfamilien lässt sich nicht herstellen. Für einen derartigen Zusammenhang fehlen ebenfalls Hinweise in der Literatur.

Die genetische Variante A > G, g.128823032, (DNA-Nummer 1, 2 und 3) im 3'UTR-Bereich wurde bislang nicht beschrieben. Die Probanden sind hierfür heterozygot. Auch diese genetische Variante erklärt wegen ihrer Position im 3'UTR-Bereich den Herzinfarkt in den Großfamilien nicht.

Aus den Ergebnissen dieser Promotionsarbeit ergeben sich folgende Erkenntnisse:

1.) Alle in den drei Genen dieser Probanden nachgewiesenen genetischen Varianten verursachen keine Funktionsveränderung des Genprodukts. Daher kann durch sie das familiäre Auftreten des Herzinfarkts bei diesen Probanden nicht erklärt werden. Somit lässt sich eine für den Herzinfarkt relevante genetische Variante in den drei untersuchten Genen dieser Großfamilien ausschließen.

2.) Durch die anfangs vermutete genetische Variante G > A im Exon 1, g.119191547, konnte gezeigt werden, dass Artefakte bei der Sequenzierung möglich sind. Identifizierte genetische Varianten sollten daher unbedingt durch weitere Untersuchungen noch einmal bestätigt werden.

3.) Das Auswertungsprogramm Staden Package hat die genetischen Varianten rs7835605 und rs6469721 im 5'UTR-Bereich im *EXT1* Gen sowie A > G, g.128823032, im 3'UTR-Bereich im *c-MYC* Gen nicht als solche erkannt. Erst durch die Auswertung der Elektropherogramme konnten sie festgestellt werden. Aufgrund dieser Erfahrung sollten immer die einzelnen Elektropherogramme ausgewertet werden.

4.2 Abschließende Betrachtung

Kandidatengen-Analysen wie in der vorliegenden Dissertationsarbeit wurden in den letzten Jahren in Herzinfarktfamilien weltweit durchgeführt. Das Ziel war die Identifikation von genetischen Varianten, sog. Herzinfarktgenen, die die Manifestation des Herzinfarkts in den betroffenen Familien erklären. So zum Beispiel untersuchten Topol und seine Arbeitsgruppe 398 von Herzinfarkt betroffene Familien. Es wurden drei genetische Varianten, SNPs, in drei verschiedenen Thrombospondin (*TSP*) Genen, Gen 1, 2 und 4 abgeleitet. In dieser Studie wurde eine Assoziation zwischen diesen SNPs und den Vorstufen des Herzinfarkts dargelegt (56). Thrombospondin ist ein multifunktionales Glykoprotein. Es nimmt in vielen biologischen Prozessen, wie zum Beispiel in Zell-Migration, Zell-Proliferation, Angiogenese und Tumorgenese teil (57). In einer späteren Übersichtsarbeit von Stenina, Topol und Plow über die Bedeutung dieser *TSP* Polymorphismen in der kardiovaskulären Pathogenese wird erläutert, dass eine direkt kausale Rolle dieser *TSP* Polymorphismen in der Pathogenese der KHK und des Herzinfarkts schwierig nachzuweisen sei. Vielmehr wird dieser Zusammenhang anhand der experimentellen Erkenntnisse über die Struktur und Funktion der *TSP* Polymorphismen angenommen (58). Im Jahr 2011 wurde von Ashokkumar und seinen Mitarbeitern eine Studie über eine Assoziation von Polymorphismen in *TSP* 1 und 2 mit der KHK sowie dem Herzinfarkt bei Süd-Indern veröffentlicht. In dieser Studie wurde keine kausale Verknüpfung zwischen den Polymorphismen in *TSP* 1 und 2 und der KHK sowie dem Herzinfarkt in diesem Kollektiv festgestellt (59).

Ein sehr intensiv auf seine Bedeutung in der Entstehung des Herzinfarkts untersuchtes Gen ist das *MEF2A* Gen. *MEF2A* ist ein Transkriptionsfaktor, der wichtige Funktionen in mehreren zellulären Prozessen sowie in der vaskulären Morphogenese erfüllt (60). Wang und seine Mitarbeiter erforschten eine Herzinfarkt-Großfamilie mit 13 betroffenen Familienmitgliedern. Sie fanden bei den betroffenen Familienmitgliedern eine Deletion von 21bp, 7 Aminosäuren, im Exon 11 des *MEF2A* Gens heraus. Diese Mutation zeigte eine autosomal dominante Vererbung. Dies wurde als das erste Herzinfarktgen beschrieben (60). Die Arbeitsgruppe um Professor Dr. rer. nat. Jeanette Erdmann und Professor Dr. med. Heribert Schunkert vom Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck sequenzierte das *MEF2A* Gen in 23 Herzinfarkt-Großfamilien. In keiner dieser Familien konnte eine Mutation im *MEF2A* Gen entdeckt werden (61). Guella et al. analysierten das

MEF2A Gen bei 2.008 italienischen Herzinfarkt-Patienten und 2.008 Kontroll-Personen. Es konnte keine Relevanz des *MEF2A* Gens in der Entwicklung des Herzinfarkts in diesem italienischen Kollektiv bewiesen werden (62). Auch in einer Studie von Altshuler und Hirschhorn wurde kein kausaler Zusammenhang des *MEF2A* Gens mit der Entstehung der KHK und des Herzinfarkts festgestellt (63). Alle diese Studien zum *MEF2A* Gen widerlegen die Annahme, dass es sich bei dem *MEF2A* Gen um ein Herzinfarktgen handelt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bis heute keine relevante genetische Variante für den Herzinfarkt mittels Familienstudien nachgewiesen wurde. Die bisherige Erfolglosigkeit der Kandidatengen-Analyse in Familien lässt sich unter anderem dadurch erklären, dass es sich bei dem Herzinfarkt um eine multifaktorielle polygene Erkrankung handelt. Viele genetische Faktoren, die sich in einem oder mehreren Genen befinden, können sich gegenseitig beeinflussen. Außerdem können sie durch Wechselwirkungen mit Umweltfaktoren zu der Entstehung der KHK und/ oder des Herzinfarkts führen (Abbildung 12). Zudem sind bislang Sequenzierungsarbeiten in Kopplungsregionen häufig an dem großen Finanz- und Zeitaufwand gescheitert.

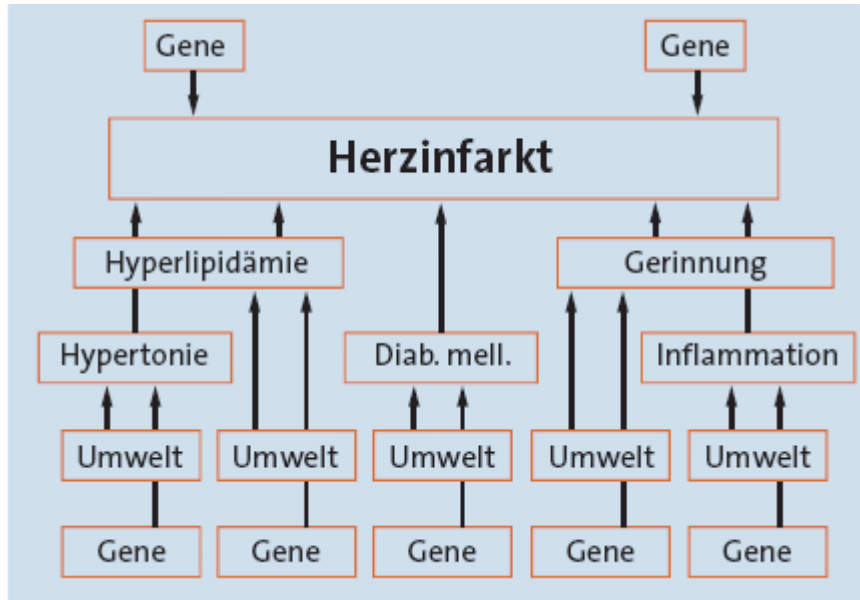


Abbildung 12. Multifaktorielle Genese des Herzinfarkts (15).

Wie schon in den oben beschriebenen Studien konnte auch bei dieser vorliegenden Dissertationsarbeit keine für den Herzinfarkt relevante genetische Variante nachgewiesen werden. Allerdings können mit dieser Dissertationsarbeit relevante genetische Varianten für den Herzinfarkt lediglich in den drei Genen dieser drei Großfamilien ausgeschlossen werden.

Aufgrund der methodischen Weiterentwicklung der Sequenzierungstechnologien in den letzten Jahren ist heute nicht nur das Sequenzieren einzelner Kandidatengene in Kopplungsregionen möglich, sondern das Sequenzieren kompletter Exone, d.h. aller kodierender Genbereiche einer Person, durchführbar. Diese als „whole exome“ Sequenzierung bezeichnete Methode ist derzeit möglicherweise der Schlüssel, um in den hier beschriebenen Großfamilien die dem Herzinfarkt zugrunde liegenden Mutationen zu identifizieren.

Die vorliegende Dissertationsarbeit zeigt deutlich, in welcher relativ kurzer Zeit methodische Entwicklungen die Wissenschaft revolutionieren können. Zu Beginn der vorliegenden Dissertationsarbeit war das Sequenzieren von Kandidatengenen die Methode der Wahl und verhältnismäßig zeit- und kostenintensiv. Innerhalb weniger Jahre sind wir heute mit einem deutlich geringeren Zeit- und Kostenaufwand fähig, ganze Genome zu sequenzieren.

5. Zusammenfassung

Die Aufgabe dieser Promotionsarbeit war es, nach genetischen Varianten, die möglicherweise für das Auftreten des Herzinfarkts verantwortlich sein könnten, zu suchen. Dafür wurden drei Großfamilien (zwei Familien mit einem Kopplungsbefund auf dem Chromosom 8q23.3-8q24.4 und eine Familie als Kontrolle), in denen Herzinfarkte familiär aufgetreten waren, ausgewählt. Aus jeder Familie wurde jeweils die DNA eines betroffenen Familienmitglieds untersucht und zwar die drei Gene: *TRPS1*, *EXT1* und *c-MYC* auf Chromosom 8. Mit 29 Primerpaaren für das *TRPS1* Gen, 16 Primerpaaren für das *EXT1* Gen und 9 Primerpaaren für das *c-MYC* Gen konnten diese drei Gene komplett abgedeckt werden. Die DNA dieser Probanden wurde mit Hilfe von PCR amplifiziert. Anschließend wurde das PCR-Produkt mit Hilfe der Elektrophorese geprüft und danach sequenziert. Für die Auswertung der Sequenzen wurde das Computerprogramm Staden Package benutzt. Es konnten zwei genetische Varianten im *TRPS1* Gen, neun im *EXT1* Gen und fünf im *c-MYC* Gen nachgewiesen werden. Die beiden genetischen Varianten im *TRPS1* Gen lagen in Intronen und haben somit keinen Einfluss auf die genomische DNA. Von den neun genetischen Varianten im *EXT1* Gen befanden sich vier im 5'UTR-Bereich, zwei in Intronen und drei in Exonen. Die drei genetischen Varianten in Exonen führten zu keinem Aminosäurenaustausch und beeinflussen somit, genau wie die anderen vier genetischen Varianten im 5'UTR-Bereich und die zwei in Intronen, die kodierende DNA nicht. Von den fünf im *c-MYC* Gen gefundenen genetischen Varianten lagen zwei im 5'UTR-Bereich, eine im 3'UTR-Bereich und zwei in Intronen. Auch hier kommt es zu keiner Veränderung des genomischen Produkts. Von den insgesamt 16 bei dieser Promotionsarbeit nachgewiesenen genetischen Varianten in den drei Genen sind drei neu. Zwei dieser drei genetischen Varianten befanden sich im 5'UTR- und 3'UTR-Bereich des *c-MYC* Gens und eine im Intron des *EXT1* Gens.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass alle hier gefundenen genetischen Varianten das familiäre Auftreten des Herzinfarkts in diesen Großfamilien nicht erklären können, da es durch sie zu keiner Funktionsveränderung der Proteine kommt. Mit den Ergebnissen dieser Promotionsarbeit können relevante genetische Varianten für den Herzinfarkt lediglich in diesen drei Genen ausgeschlossen werden. Nicht ausgeschlossen werden kann, dass diese Probanden in anderen Genen auf dem Chromosom 8 oder auf

anderen Chromosomen genetische Varianten für den Herzinfarkt besitzen. Daher sollten in der Zukunft auch die anderen Gene molekulargenetisch auf solche genetische Varianten hin untersucht werden, idealerweise mittels „whole-exome“ Sequenzierung.

6. Literaturverzeichnis

1. Wang Q: Molecular genetics of coronary artery disease. *Curr Opin Cardiol* 20: 182-188, 2005.
2. Giannitsis E, Krautzig S, Kurowski V, Renz-Polster H, Schwabe K, Stierle U: Herz. In: Renz-Polster H, Krautzig S, Braun J: *Basislehrbuch Innere Medizin*. 3. Aufl., 28-190, Urban & Fischer, München, 2004.
3. <http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Navigation/Statistiken/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.psml> (Tag des Zugriffs: 14.12.2010).
4. Zipes DP, Wellens HJ: Sudden cardiac death. *Circulation* 98: 2334-2351, 1998.
5. Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH: A prospective study of parental history of myocardial infarction and coronary heart disease in women. *Am J Epidemiol* 123: 48-58, 1986.
6. Lewis D, Wang Q, Topol EJ: Ischaemic heart disease. *Nat Encyclopedia Life Sci* 10: 508-515, 2002.
7. Shen G, Archacki SR, Wang Q: The molecular genetics of coronary artery disease and myocardial infarction. *Acute Coron Syndrome* 6: 129-141, 2004.
8. Slack J, Evans KA: The increased risk of death from ischaemic heart disease in first degree relatives of 121 men and 96 women with ischaemic heart disease. *J Med Genet* 2: 239-257, 1966.
9. Wang Q, Pyeritz RE: Molecular genetics of cardiovascular disease. In: Topol EJ: *Textbook of cardiovascular medicine*. 1. Aufl., 1-12, Lippincott Williams & Wilkins, New York, 2000.

10. Wang Q, Chen Q: Cardiovascular disease and congenital defects. *Nat Encyclopedia Life Sci* 3: 646-657, 2000.
11. Wang Q, Chen Q: Cardiovascular disease and congenital heart defects. *Nat Encyclopedia Hum Genome* 1: 396-411, 2003.
12. Schildkraut JM, Myers RH, Cupples LA, Kiely DK, Kannel WB: Coronary risk associated with age and sex of parental heart disease in the Framingham Study. *Am J Cardiol* 64: 555-559, 1989.
13. Myers RH, Kiely DK, Cupples LA, Kannel WB: Parental history is an independent risk factor for coronary artery disease: the Framingham Study. *Am Heart J* 120: 963-969, 1990.
14. Murabito JM, Pencina MJ, Nam BH, D'Agostino RB, Wang TJ, Lloyd-Jones D, Wilson PW, O'Donnell CJ: Sibling cardiovascular disease as a risk factor for cardiovascular disease in middle-aged adults. *JAMA* 294: 3117-3123, 2005.
15. Mayer B, Erdmann J, Schunkert H: Genetics and heritability of coronary artery disease and myocardial infarction. *Clin Res Cardiol* 96: 1-7, 2007.
16. Horne BD, Camp NJ, Muhlestein B, Cannon-Albright LA: Identification of excess clustering of coronary heart diseases among extended pedigrees in a genealogical population database. *Am Heart J* 152: 305-311, 2006.
17. Hawe E, Talmud PJ, Miller GJ, Humphries SE: Family history is a coronary heart disease risk factor in the Second Northwick Park Heart Study. *Ann Hum Genet* 67: 97-106, 2003.
18. Boer JM, Feskens EJ, Verschuren WM, Seidell JC, Kromhout D: The joint impact of family history of myocardial infarction and other risk factors on 12 year coronary heart disease mortality. *Epidemiology* 10: 767-770, 1999.

19. Andresdottir MB, Sigurdsson G, Sigvaldason H, Gudnason V: Fifteen percent of myocardial infarctions and coronary revascularizations explained by family history unrelated to conventional risk factors. The Reykjavik Cohort Study. *Eur Heart J* 23: 1655-1663, 2002.

20. Marenberg ME, Risch N, Berkman LF, Floderus B, de Faire U: Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins. *N Engl J Med* 330: 1041-1046, 1994.

21. Frings A, Mayer B, Bocker W, Hengstenberg C, Willemsen D, Riegger G, Schunkert H: Comparative coronary anatomy in six twin pairs with coronary artery disease. *Heart* 83: 47-50, 2000.

22. Fischer M, Broeckel U, Holmer S, Baessler A, Hengstenberg C, Mayer B, Erdmann J, Klein G, Riegger G, Jacob HJ, Schunkert H: Distinct heritable patterns of angiographic coronary artery disease in families with myocardial infarction. *Circulation* 111: 855-862, 2005.

23. Kellera D, Osswalda S, Brink M: Familiäre hypertrophe Kardiomyopathie: Genetik und molekulare Mechanismen. *Schweiz Med Forum* 5: 90-93, 2005.

24. Paul M, Zumhagen S, Stallmeyer B, Koopmann M, Spieker T, Schulze-Bahr E: Genes causing inherited forms of cardiomyopathies. A current compendium. *Herz* 34: 98-109, 2009.

25. Wagner AK, Schunkert H, Erdmann J: Genetik des Herzinfarktes. Der lange Weg von der positiven Familienanamnese zum Gen. *Chem Unserer Zeit* 43: 288-295, 2009.

26. Schunkert H, Erdmann J, Samani NJ: Genetics of myocardial infarction: a progress report. *Eur Heart J* 31: 918-925, 2010.

27. Hengstenberg C, Bröckel U, Holmer S, Mayer B, Fischer M, Baessler A, Erdmann J, Lieb W, Löwel H, Riegger G, Schunkert H: Genetische Einflüsse beim Herzinfarkt. Ergebnisse eines Kandidatengen- und eines genomweiten Ansatzes. *Herz* 27: 649-661, 2002.
28. Schunkert H, König IR, Erdmann J: Molecular signatures of cardiovascular disease risk: potential for test development and clinical application. *Mol Diagn Ther* 12: 281-287, 2008.
29. O'Donnell CJ, Nabel EG: Genomics of cardiovascular disease. *N Engl J Med* 365: 2098-2109, 2011.
30. Anika Großhennig: Genetisch-epidemiologische Methoden zur Analyse komplexer kardiovaskulärer Phänotypen. Med. Diss. Lübeck, 2009.
31. Lüdecke HJ, Schaper J, Meinecke P, Momeni P, Groß S, von Holtum D, Hirche H, Abramowicz MJ, Albrecht B, Apacik C, Christen HJ, Claussen U, Devriendt K, Fastnacht E, Forderer A, Friedrich U, Goodship THJ, Greiwe M, Hamm H, Hennekam RC, Hinkel GK, Hoeltzenbein M, Kayserili H, Majewski F, Mathieu M, McLeod R, Midro AT, Moog U, Nagai T, Niikawa N, Ørstavik KH, Plöchl E, Seitz C, Schmidtke J, Tranebjærg L, Tsukahara M, Wittwer B, Zabel B, Gillessen-Kaesbach G, Horsthemke B: Genotypic and phenotypic spectrum in tricho-rhino-phalangeal syndrome types I and III. *Am J Hum Genet* 68: 81-91, 2001.
32. Kaiser FJ, Brega P, Raff ML, Byers PH, Gallati S, Kay TT, de Almeida S, Horsthemke B, Lüdecke HJ: Novel missense mutations in the TRPS1 transcription factor define the nuclear localization signal. *Eur J Hum Genet* 12: 121-126, 2004.
33. Kaiser FJ, Möröy T, Chang GT, Horsthemke B, Lüdecke HJ: The RING finger protein RNF4, a co-regulator of transcription, interacts with the TRPS1 transcription factor. *J Biol Chem* 278: 38780-38785, 2003.

34. Duncan G, McCormick C, Tufaro F: The link between heparin sulfate and hereditary bone disease: finding a function for the EXT family of putative tumor suppressor proteins. *J Clin Invest* 108: 511-516, 2001.
35. Heinritz W, Pretzsch M, Koall S, Matzen PF, Froster UG: Hereditäre multiple Exostosen. Molekulargenetische Analyse des EXT1-Gens in einer ungewöhnlichen Familie. *Orthopäde* 34: 470-476, 2005.
36. Wuyts W, Van Hul W, De Boulle K, Hendrickx J, Bakker E, Vanhoenacker F, Mollica F, Lüdecke HJ, Sayli BS, Pazzaglia UE, Mortier G, Hamel B, Conrad EU, Matsushita M, Raskind WH, Willems PJ: Mutations in the EXT1 and EXT2 genes in hereditary multiple exostoses. *Am J Hum Genet* 62: 346-354, 1998.
37. Francannet C, Cohen-Tanugi A, Le Merrer M, Munnich A, Bonaventure J, Legeai-Mallet L: Genotype-phenotype correlation in hereditary multiple exostoses. *J Med Genet* 38: 430-434, 2001.
38. Kim JH, Paek KY, Choi K, Kim TD, Hahm B, Kim KT, Jang SK: Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C modulates translation of c-myc mRNA in a cell cycle phase-dependent manner. *Mol Cell Biol* 23: 708-720, 2003.
39. Shi Y, Hutchinson HG, Hall DJ, Zalewski A: Downregulation of c-myc expression by antisense oligonucleotides inhibits proliferation of human smooth muscle cells. *Circulation* 88: 1190-1195, 1993.
40. Marin ML, Gordon RE, Veith FJ, Tulchin N, Panetta TF: Distribution of c-myc oncoprotein in healthy and atherosclerotic human carotid arteries. *J Vasc Surg* 18: 170-176, 1993.
41. Hilker M, Tellmann G, Buerke M, Moersig W, Oelert H, Lehr HA, Hake U: Expression of the proto-oncogene c-myc in human stenotic aortocoronary bypass grafts. *Pathol Res Pract* 197: 811-816, 2001.

42. Calcagno DQ, Leal MF, Seabra AD, Khayat AS, Chen ES, Demachki S, Assumpção PP, Faria MH, Rabenhorst SH, Ferreira MV, de Arruda Cardoso Smith M, Burbano RR: Interrelationship between chromosome 8 aneuploidy, *C-MYC* amplification and increased expression in individuals from northern Brazil with gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 12: 6207-6211, 2006.
43. Little CD, Nau MM, Carney DN, Gazdar AF, Minna JD: Amplification and expression of the *c-myc* oncogene in human lung cancer cell lines. *Nature* 306: 194-196, 1983.
44. Escot C, Theillet C, Lidereau R, Spyrtos F, Champeme MH, Gest J, Callahan R: Genetic alteration of the *c-myc* protooncogene (*MYC*) in human primary breast carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 4834-4838, 1986.
45. Wang ZR, Liu W, Smith ST, Parrish RS, Young SR: *c-Myc* and chromosome 8 centromere studies of ovarian cancer by interphase FISH. *Exp Mol Pathol* 66: 140-148, 1999.
46. Han S, Kim HY, Park K, Cho HJ, Lee MS, Kim HJ, Kim YD: *c-Myc* expression is related with cell proliferation and associated with poor clinical outcome in human gastric cancer. *J Korean Med Sci* 14: 526-530, 1999.
47. Ishii H, Gobé G, Kawakubo Y, Sato Y, Ebihara Y: Interrelationship between Epstein-Barr virus infection in gastric carcinomas and the expression of apoptosis-associated proteins. *Histopathology* 38: 111-119, 2001.
48. Xu AG, Li SG, Liu JH, Gan AH: Function of apoptosis and expression of the proteins Bcl-2, p53 and *C-myc* in the development of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 7: 403-406, 2001.
49. Zhang GX, Gu YH, Zhao ZQ, Xu SF, Zhang HJ, Wang HD, Hao B: Coordinate increase of telomerase activity and *c-Myc* expression in *Helicobacter pylori*-associated gastric diseases. *World J Gastroenterol* 10: 1759-1762, 2004.

50. Nelson D, Cox M: DNA-Rekombinationstechnik. In: Nelson D, Cox M: Lehninger Biochemie. 3. Aufl., 1219-1258, Springer, Berlin, 2001.

51. Passarge E: Molekulare Grundlagen. In: Passarge E: Taschenatlas der Genetik. 3. Aufl., 16-49, Thieme, Stuttgart, 2008.

52. http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?position=chr8:119191476-119191502&db=hg17&ss=../trash/hgSs/hgSs_genome_4e48_e622b0.pslx+../trash/hgSs/hgSs_genome_4e48_e622b0.fa&hgsid=226935755 (Tag des Zugriffs: 06.12.2011).

53. http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?position=chr8:128817075-128817102&db=hg17&ss=../trash/hgSs/hgSs_genome_5685_e14f70.pslx+../trash/hgSs/hgSs_genome_5685_e14f70.fa&hgsid=226895001 (Tag des Zugriffs: 06.12.2011).

54. http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?position=chr8:128823020-128823040&db=hg17&ss=../trash/hgSs/hgSs_genome_5a50_e6a3d0.pslx+../trash/hgSs/hgSs_genome_5a50_e6a3d0.fa&hgsid=226935755 (Tag des Zugriffs: 06.12.2011).

55. Jennes I, Zuntini M, Mees K, Palagani A, Pedrini E, De Cock G, Fransen E, Vanden Berghe W, Sangiorgi L, Wuyts W: Identification and functional characterization of the human EXT1 promoter region. *Gene* 492: 148-159, 2012.

56. Topol EJ, McCarthy J, Gabriel S, Moliterno DJ, Rogers WJ, Newby LK, Freedman M, Metivier J, Cannata R, O'Donnell CJ, Kottke-Marchant K, Murugesan G, Plow EF, Stenina O, Daley GQ: Single nucleotide polymorphisms in multiple novel thrombospondin genes may be associated with familial premature myocardial infarction. *Circulation* 104: 2641-2644, 2001.

57. Frazier WA: Thrombospondins. *Curr Opin Cell Biol* 5: 792-799, 1991.

58. Stenina OI, Topol EJ, Plow EF: Thrombospondins, their polymorphisms, and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:1886-1894, 2007.

59. Ashokkumar M, Anbarasan C, Saibabu R, Kuram S, Raman SC, Cherian KM: An association study of thrombospondin 1 and 2 SNPs with coronary artery disease and myocardial infarction among South Indians. *Thromb Res.* 128: 49-53, 2011.
60. Wang L, Fan C, Topol SE, Topol EJ, Wang Q: Mutation of MEF2A in an inherited disorder with features of coronary artery disease. *Science* 302: 1578-1581, 2003.
61. Lieb W, Mayer B, König IR, Borwitzky I, Götz A, Kain S, Hengstenberg C, Linsel-Nitschke P, Fischer M, Döring A, Wichmann HE, Meitinger T, Kreutz R, Ziegler A, Schunkert H, Erdmann J: Lack of association between the MEF2A gene and myocardial infarction. *Circulation* 117: 185-191, 2008.
62. Guella I, Rimoldi V, Asselta R, Ardissino D, Francolini M, Martinelli N, Girelli D, Peyvandi F, Tubaro M, Merlini PA, Mannucci PM, Duga S: Association and functional analyses of MEF2A as a susceptibility gene for premature myocardial infarction and coronary artery disease. *Circ Cardiovasc Genet* 2: 165-172, 2009.
63. Altshuler D, Hirschhorn JN: MEF2A sequence variants and coronary artery disease: a change of heart? *J Clin Invest* 115: 831-833, 2005.
64. Erdmann J, Grosshennig A, Braund PS, König IR, Hengstenberg C, Hall AS, Linsel-Nitschke P, Kathiresan S, Wright B, Trégouët DA, Cambien F, Bruse P, Aherrahrou Z, Wagner AK, Stark K, Schwartz SM, Salomaa V, Elosua R, Melander O, Voight BF, O'Donnell CJ, Peltonen L, Siscovick DS, Altshuler D, Merlini PA, Peyvandi F, Bernardinelli L, Ardissino D, Schillert A, Blankenberg S, Zeller T, Wild P, Schwarz DF, Tiret L, Perret C, Schreiber S, El Mokhtari NE, Schäfer A, März W, Renner W, Bugert P, Klüter H, Schrezenmeir J, Rubin D, Ball SG, Balmforth AJ, Wichmann HE, Meitinger T, Fischer M, Meisinger C, Baumert J, Peters A, Ouwehand WH, Deloukas P, Thompson JR, Ziegler A, Samani NJ, Schunkert H: New susceptibility locus for coronary artery disease on chromosome 3q22.3. *Nat Genet* 41: 280-282, 2009.

65. Samani NJ, Erdmann J, Hall AS, Hengstenberg C, Mangino M, Mayer B, Dixon RJ, Meitinger T, Braund P, Wichmann HE, Barrett JH, König IR, Stevens SE, Szymczak S, Tregouet DA, Iles MM, Pahlke F, Pollard H, Lieb W, Cambien F, Fischer M, Ouwehand W, Blankenberg S, Balmforth AJ, Baessler A, Ball SG, Strom TM, Braenne I, Gieger C, Deloukas P, Tobin MD, Ziegler A, Thompson JR, Schunkert H: Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N Engl J Med* 357: 443-453, 2007.
66. McPherson R, Pertsemlidis A, Kavaslar N, Stewart A, Roberts R, Cox DR, Hinds DA, Pennacchio LA, Tybjaerg-Hansen A, Folsom AR, Boerwinkle E, Hobbs HH, Cohen JC: A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science* 316: 1488-1491, 2007.
67. Schunkert H, Götz A, Braund P, McGinnis R, Tregouet DA, Mangino M, Linsel-Nitschke P, Cambien F, Hengstenberg C, Stark K, Blankenberg S, Tiret L, Ducimetiere P, Keniry A, Ghorri MJ, Schreiber S, El Mokhtari NE, Hall AS, Dixon RJ, Goodall AH, Liptau H, Pollard H, Schwarz DF, Hothorn LA, Wichmann HE, König IR, Fischer M, Meisinger C, Ouwehand W, Deloukas P, Thompson JR, Erdmann J, Ziegler A, Samani NJ: Repeated replication and a prospective meta-analysis of the association between chromosome 9p21.3 and coronary artery disease. *Circulation* 117: 1675-1684, 2008.
68. Trégouët DA, König IR, Erdmann J, Munteanu A, Braund PS, Hall AS, Grosshennig A, Linsel-Nitschke P, Perret C, DeSuremain M, Meitinger T, Wright BJ, Preuss M, Balmforth AJ, Ball SG, Meisinger C, Germain C, Evans A, Arveiler D, Luc G, Ruidavets JB, Morrison C, van der Harst P, Schreiber S, Neureuther K, Schäfer A, Bugert P, El Mokhtari NE, Schrezenmeir J, Stark K, Rubin D, Wichmann HE, Hengstenberg C, Ouwehand W, Ziegler A, Tiret L, Thompson JR, Cambien F, Schunkert H, Samani NJ: Genome-wide haplotype association study identifies the SLC22A3-LPAL2-LPA gene cluster as a risk locus for coronary artery disease. *Nat Genet* 41: 283-285, 2009.
69. Pikkarainen S, Tokola H, Kerkelä R, Ruskoaho H: GATA transcription factors in the developing and adult heart. *Cardiovasc Res* 63: 196-207, 2004.

70. Suzuki YJ, Evans T: Regulation of cardiac myocyte apoptosis by the GATA-4 transcription factor. *Life Sci* 74: 1829-1838, 2004.

71. Aries A, Paradis P, Lefebvre C, Schwartz RJ, Nemer M: Essential role of GATA-4 in cell survival and drug-induced cardiotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 6975-6980, 2004.

72. Osterholm C, Barczyk MM, Busse M, Grønning M, Reed RK, Kusche-Gullberg M: Mutation in the heparan sulfate biosynthesis enzyme EXT1 influences growth factor signaling and fibroblast interactions with the extracellular matrix. *J Biol Chem* 284: 34935-34943, 2009.

73. Stegmann TH, Hoppert TH, Schneider A, Popp M, Strupp G, Ibing R, Hertel A: Therapeutic angiogenesis: intramyocardial growth factor delivery of FGF-1 as sole therapy in patients with chronic coronary artery disease. *CVR* 1: 259–267, 2000.

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. *Relative Risikoerhöhung für den Herzinfarkt/die koronare Herzerkrankung in Abhängigkeit von unterschiedlichen familiären Dispositionen (15).* Seite 3

Abbildung 2. *Koronarangiogramme von monozygoten Zwillingen. RCA: rechte Koronararterie (21).* Seite 4

Abbildung 3. *Ergebnisse der GWAs. Bei diesem zirkulär aufgetragenen GWAs-Plot (Circos Plot, (<http://www.circos.ca>)) sind alle Chromosomen und die genomweit signifikanten SNPs für die KHK und den Herzinfarkt aufgetragen. Weiterhin wird die Komplexität des Genoms verdeutlicht, indem die krankheitsspezifischen SNPs über das gesamte Genom verteilt sind.* Seite 7

Abbildung 4. *Drei Stammbäume als Beispiel. Dargestellt sind Männer als Quadrate, Frauen als Kreise, Betroffene in schwarz und Verstorbene durchgestrichen.* Seite 8

Abbildung 5. *a) Schematische Darstellung von Chromosom 8. Genlokus als rotes Viereck, b) Genlokus auf Chromosom 8q23.3-8q24.4 in zwei Herzinfarkt-Familien (30).* Seite 10

Abbildung 6. *Elektropherogramme mit genetischer Variante in der DNA-Nummer 2. Die genetische Variante ist mit einem Pfeil markiert. a) Vorwärtssequenz, b) Rückwärtssequenz.* Seite 25 und 26

Abbildung 7. *Darstellung des Konservierungsgrads des genetischen Abschnittes, in dem die genetische Variante C > T, g119191483 im EXT1 Gen lokalisiert ist. Der obere Pfeil rechts zeigt die Position der Variante auf dem Chromosom 8 an, der obere Pfeil links die genetische Variante. Mit den Pfeilen links seitlich (von oben nach unten) sind der Konservierungsgrad der Sequenzen sowie die Spezies markiert (52).* Seite 27

Abbildung 8. Elektropherogramm mit genetischer Variante in der Rückwärtssequenz der DNA-Nummer 3. Die genetische Variante ist mit einem Pfeil markiert. Seite 29

Abbildung 9. Darstellung des Konservierungsgrads des genetischen Abschnittes, in dem die genetische Variante $A > C$, g128817086 im c-MYC Gen lokalisiert ist. Der obere Pfeil rechts zeigt die Position der Variante auf dem Chromosom 8 an, der Pfeil oben in der Mitte die genetische Variante. Hier ist die Base Thymin (T) zu sehen, da das Programm die Vorwärtssequenz angibt. Die genetische Variante lag in der Rückwärtssequenz. Mit den Pfeilen links seitlich (von oben nach unten) sind der Konservierungsgrad der Sequenzen sowie die Spezies dargestellt (53). Seite 30

Abbildung 10. Elektropherogramme mit genetischer Variante in den Rückwärtssequenzen der DNA-Nummer 1, 2 und 3. Die genetische Variante ist mit einem Pfeil markiert. a) DNA-Nummer 1, b) DNA-Nummer 2 und c) DNA-Nummer 3. Seite 31 und 32

Abbildung 11. Darstellung des Konservierungsgrads des genetischen Abschnittes, in dem die genetische Variante $A > G$, g128823032 im c-MYC Gen lokalisiert ist. Der obere Pfeil rechts zeigt die Position der Variante auf dem Chromosom 8 an, der Pfeil oben in der Mitte die genetische Variante. Hier ist die Base Thymin (T) zu sehen, da das Programm die Vorwärtssequenz angibt. Die genetische Variante lag in der Rückwärtssequenz. Mit den Pfeilen links seitlich (von oben nach unten) sind der Konservierungsgrad der Sequenzen sowie die Spezies dargestellt (54). Seite 33

Abbildung 12. Multifaktorielle Genese des Herzinfarkts (15). Seite 41

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Heritabilitätsschätzung h^2 , 95%-Konfidenzintervalle (95% CI) und p-Werte für Herzinfarkt, Größe, Gewicht, BMI, systolischer Blutdruck (SBP) und Lipidparameter (HDL, LDL und Triglyceride). Seite 9

Tabelle 2. *Darstellung der Bezeichnung, der Sequenzen und der Länge der sechs Primerpaare des c-MYC Gens. Vorwärtssequenzen = F (forward), Rückwärtssequenzen = R (reverse).* Seite 16

Tabelle 3. *PCR-Programmeinstellung. In der Tabelle sind die Anzahl der Zyklen, die Temperaturen und die Zeit pro Zyklus angegeben.* Seite 18

Tabelle 4. *Übersicht der nachgewiesenen genetischen Varianten. In der Tabelle sind alle genetischen Varianten mit deren genomischen Positionen in den drei Genen angegeben. Bei den genetischen Varianten in den Exonen wurde zusätzlich die cDNA- und die Protein-Position ermittelt. Bei bekannten genetischen Varianten ist die Identifikationsnummer angezeigt.* Seite 34 und 35

8. Danksagung

Bei Herrn Professor Dr. med. Heribert Schunkert bedanke ich mich herzlich für die Vermittlung der Promotionsarbeit und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und des Materials in seiner Klinik.

Frau Professor Dr. rer. nat. Jeanette Erdmann danke ich sehr für die Überlassung dieses interessanten Themas. Vielen Dank für Ihre fachliche und organisatorische Betreuung!

Für die Einarbeitung und die weitere Betreuung während meiner Arbeit im Labor möchte ich mich bei den MTAs Sandra Wrobel, Anette Thiemig und Petra Bruse bedanken.

Einen besonderen Dank für ihre fachlichen Informationen und praktischen Tipps möchte ich dem wissenschaftlichen Mitarbeiter des Labors Zuher Aherrahrou und der MTA Sandra Wrobel aussprechen. Sie waren zu jeder Zeit für mich ansprechbar und hilfsbereit. Vielen herzlichen Dank!

Die Friedrich-Ebert-Stiftung hat mit einem Stipendium mein Studium und damit auch den Beginn meiner Promotionsarbeit gefördert. Ich danke ihr hierfür ganz herzlich.

Last but not least einen herzlichen Dank an meine Familie im Kosovo und meine „Pflegemutter“ in Deutschland, die mich während der ganzen Zeit nach besten Kräften unterstützt haben.

9. Lebenslauf

Personalien:

Vor- und Zuname: Hajrullah Ahmeti
Geburtsdatum : 15.09.1978
Geburtsort : Skenderaj / Kosovo
Familienstand : ledig

Schule:

09/1993 - 05/1997 Gymnasium „Ramiz Sadiku,, in Skenderaj/Kosovo
Abschluss: Diplom (Abitur)

Studium:

10/1997 - 06/1998 Universität Prishtina/Kosovo: Biologie
10/1998 - 03/1999 Universität Prishtina/Kosovo: Humanmedizin
04/1999 - 03/2000 Studienunterbrechung wegen Kriegsausbruch im Kosovo,
Flucht nach Mazedonien, Aufenthalt in Hamburg als
Kontingent-Flüchtling
04 - 07/2000 Besuch des Lektorats „Deutsch für Ausländer,, an der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
10/2000 Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der
Universität zu Lübeck (vom ersten Semester an begonnen)
10/2002 - 02/2003 Tutor im Präparierkurs Anatomie
03/2003 Physikum
03/2004 1. Staatsexamen (freiwillige Teilnahme)
07/2004 - 06/2011 Promotionsarbeit: 07/2004 - 07/2007 experimenteller Teil
07/2007 - 06/2011 schriftlicher Teil
(lange Dauer wegen großem zeitlichem Aufwand für die
Vorbereitung auf 2. Staatsexamen und spätere Tätigkeit als
Assistenzarzt)
02/2006 - 12/2006 Praktikum Notfallmedizin, ca. 100 Einsätze auf dem
Notarzteinsetzfahrzeug

02/2006 - 01/2007	Student im „Praktischen Jahr„: Wahlfach Neurochirurgie
04/2007 u. 06/2007	2. Staatsexamen: 04/2007 schriftlicher Teil 06/2007 mündlicher Teil
10/2007 - 03/2008	Genehmigungsverfahren für die Aufnahme einer ärztlichen Tätigkeit in Deutschland
Seit 03/2008	Assistenzarzt in der Klinik für Neurochirurgie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

Sonstiges:

04/2000 - 06/2007	Stipendiat der Friedrich-Ebert-Stiftung
Seit 02/2005	Mitgliedschaft im Arbeiter-Samariter-Bund (ASB), Bereich Auslandshilfe

Forschung:

Seit 04/2011	Tumorstammzellforschung im Forschungslabor der Klinik für Neurochirurgie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, ermöglicht durch einen Förderpreises 2011 der „Familie Mehdorn Stiftung“ zur Forschung im Thema: „Expression der Stammzellmarker WNT-1, PARD6A, SOX- 1, NOTCH1 und APC im Glioblastom bei Erstdiagnose und Rezidiv sowie ihre Bedeutung in der Tumorprogression und der Bildung der Chemotherapieresistenzen“
--------------	--