

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik für Herz- und Kreislauferkrankungen,
Deutsches Herzzentrum München des Freistaates Bayern

Assoziation des Melanoma inhibitory activity 3-Gens mit dem Myokardinfarkt

Hannah Veronika Wolferstetter

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

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. A. Kastrati
2. Priv.-Doz. Dr. T. Ibrahim

Diese Dissertation wurde am 03.06.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 16.10.2013 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	2
Abkürzungsverzeichnis.....	4
Abbildungsverzeichnis.....	5
Tabellenverzeichnis.....	6
1. Einleitung.....	7
1.1 Koronare Herzkrankheit (KHK).....	7
1.1.1 Pathogenese der Atherosklerose und Thrombusbildung.....	7
1.1.2 Angina pectoris und MI.....	9
1.1.3 Epidemiologie der KHK.....	11
1.1.4 Risikofaktoren der KHK.....	12
1.2 Melanoma inhibitory activity 3(MIA3)-Gen.....	15
1.2.1 MIA3 und die Kollagensekretion.....	16
1.2.2 MIA3 als Tumorsuppressorgen.....	17
1.2.3 MIA3 und die KHK.....	18
1.3 Genetische Faktoren der KHK.....	19
1.4 Stand der Forschung zu MIA3-Polymorphismen und der KHK.....	23
1.5 Ziel der Arbeit.....	24
2. Methoden.....	25
2.1 Patienten und Kontrollpersonen.....	25
2.2 Definitionen zu den Charakteristika der Fall- und Kontrollgruppe.....	25
2.3 DNA-Proben und Polymorphismen.....	27
2.4 Genotypisierung.....	29
2.5 Statistische Analyse.....	34
3. Ergebnisse.....	35
3.1 Charakteristika der Fall- und Kontrollgruppe.....	35
3.2 Sechs SNPs in MIA3 und ihre Assoziation mit dem MI.....	36
3.2.1 Genotypverteilung in der Fall- und Kontrollgruppe.....	38
3.2.2 rs3002142: Genotypverteilung in der Fall- und Kontrollgruppe.....	40
3.2.3 rs904323: Genotypverteilung in der Fall- und Kontrollgruppe.....	41
3.2.4 rs17011666: Genotypverteilung in der Fall- und Kontrollgruppe.....	42
3.2.5 rs3002145: Genotypverteilung in der Fall- und Kontrollgruppe.....	43
3.2.6 rs17465637: Genotypverteilung in der Fall- und Kontrollgruppe.....	44
3.2.7 rs17011681: Genotypverteilung in der Fall- und Kontrollgruppe.....	45

4. Diskussion.....	46
4.1 Genotypverteilung weiterer vier SNPs in der Fall- und Kontrollgruppe.....	49
4.1.1 rs2088514: Genotypverteilung in der Fall- und Kontrollgruppe.....	49
4.1.2 rs35822937: Genotypverteilung in der Fall- und Kontrollgruppe.....	50
4.1.3 rs17163384: Genotypverteilung in der Fall- und Kontrollgruppe.....	51
4.1.4 rs1053316: Genotypverteilung in der Fall- und Kontrollgruppe.....	52
4.2 Untersuchungen zur Assoziation von MIA3-Polymorphismen mit dem MI..	53
4.3 Haplotypen des MIA3-Locus.....	60
4.4 Einschränkung der Studie.....	63
5. Zusammenfassung.....	64
6. Literaturverzeichnis.....	65
7. Danksagung.....	74

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
COPII	Coat protein II
DNA	Desoxyribonukleinsäure
HDL	„High-density“-Lipoprotein
HWE	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht
kDa	Kilodalton
KHK	koronare Herzkrankheit
KI	Konfidenzintervall
LDL	„Low-density“-Lipoprotein
mg dl ⁻¹	Milligramm pro Deziliter
MI	Myokardinfarkt
MIA	Melanoma inhibitory activity
MIA2	Melanoma inhibitory activity 2
MIA3	Melanoma inhibitory activity 3
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mmol l ⁻¹	Millimol pro Liter
MONICA	Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease
µl	Mikroliter
nmol l ⁻¹	Nanomol pro Liter
OR	Odds ratio
OTOR	Otoraplin
PCR	Polymerasekettenreaktion
SNP	Single nucleotide polymorphism
TANGO1	Transport and golgi organisation 1
WHO	World health organization

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Pathogenetische Reaktion der Atherosklerose.....	9
Abbildung 2:	Struktur des MIA-Proteins	16
Abbildung 3:	Struktur des MIA3-Proteins	17
Abbildung 4:	Genorte, die in genomweiten Assoziationsstudien	
	als Kandidatengene der KHK identifiziert wurden	20
Abbildung 5:	Intron-Exon-Struktur der MIA3-Region und Positionen	
	der SNPs in und um MIA3 auf dem Chromosom 1q41.....	28
Abbildung 6:	TaqMan-Reaktion.....	31
Abbildung 7:	Intron-Exon-Struktur der MIA3-Region und Positionen der sechs.....	
	untersuchten SNPs in und um MIA3 auf dem Chromosom 1q41 ...	37
Abbildung 8:	Prozentuale Verteilung der rs3002142-Genotypen	
	in der Fall- und Kontrollgruppe	40
Abbildung 9:	Prozentuale Verteilung der rs904323-Genotypen	
	in der Fall- und Kontrollgruppe	41
Abbildung 10:	Prozentuale Verteilung der rs17011666-Genotypen	
	in der Fall- und Kontrollgruppe	42
Abbildung 11:	Prozentuale Verteilung der rs3002145-Genotypen	
	in der Fall- und Kontrollgruppe	43
Abbildung 12:	Prozentuale Verteilung der rs17465637-Genotypen	
	in der Fall- und Kontrollgruppe	44
Abbildung 13:	Prozentuale Verteilung der rs17011681-Genotypen	
	in der Fall- und Kontrollgruppe	45
Abbildung 14:	Prozentuale Verteilung der rs2088514-Genotypen	
	in der Fall- und Kontrollgruppe	49
Abbildung 15:	Prozentuale Verteilung der rs35822937-Genotypen	
	in der Fall- und Kontrollgruppe	50
Abbildung 16:	Prozentuale Verteilung der rs17163384-Genotypen	
	in der Fall- und Kontrollgruppe	51
Abbildung 17:	Prozentuale Verteilung der rs1053316-Genotypen	
	in der Fall- und Kontrollgruppe	52
Abbildung 18:	Frequenzen der neun häufigsten Haplotypen in der Fallgruppe.....	62
Abbildung 19:	Frequenzen der neun häufigsten Haplotypen	
	in der Kontrollgruppe	62

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Hauptrisikofaktoren der Atherosklerose	13
Tabelle 2:	Risikoloci für die KHK und den MI aus der Arbeit von Samani und Kollegen und zugehörige SNPs.....	22
Tabelle 3:	Primer und Sonden für die TaqMan-Reaktionen	32
Tabelle 4:	Reaktionsmix für 100 TaqMan-Ansätze	33
Tabelle 5:	Charakteristika der Fall- und Kontrollgruppe	35
Tabelle 6:	Genotypverteilung von sechs SNPs in der MIA3-Region in der Fall- und Kontrollgruppe	39
Tabelle 7:	Verteilung der Genotypen des Polymorphismus' rs3002142 in der Fall- und Kontrollgruppe	40
Tabelle 8:	Verteilung der Genotypen des Polymorphismus' rs904323 in der Fall- und Kontrollgruppe	41
Tabelle 9:	Verteilung der Genotypen des Polymorphismus' rs17011666 in der Fall- und Kontrollgruppe	42
Tabelle 10:	Verteilung der Genotypen des Polymorphismus' rs3002145 in der Fall- und Kontrollgruppe	43
Tabelle 11:	Verteilung der Genotypen des Polymorphismus' rs17465637 in der Fall- und Kontrollgruppe	44
Tabelle 12:	Verteilung der Genotypen des Polymorphismus' rs17011681 in der Fall- und Kontrollgruppe	45
Tabelle 13:	Genotypverteilung von zehn SNPs in der MIA3-Region in der Fall- und Kontrollgruppe	48
Tabelle 14:	Verteilung der Genotypen des Polymorphismus' rs2088514 in der Fall- und Kontrollgruppe	49
Tabelle 15:	Verteilung der Genotypen des Polymorphismus' rs35822937 in der Fall- und Kontrollgruppe	50
Tabelle 16:	Verteilung der Genotypen des Polymorphismus' rs17163384 in der Fall- und Kontrollgruppe	51
Tabelle 17:	Verteilung der Genotypen des Polymorphismus' rs1053316 in der Fall- und Kontrollgruppe	52
Tabelle 18:	Assoziation des C-Allels des SNPs rs17465637 in MIA3 mit der KHK . in vorausgehenden und der aktuellen Studie.....	55
Tabelle 19:	Assoziation zwischen den neun häufigsten Haplotypen der MIA3-Region und dem MI.....	61

1. Einleitung

1.1 Koronare Herzkrankheit (KHK)

1.1.1 Pathogenese der Atherosklerose und Thrombusbildung

Eine Reihe von Gefäßerkrankungen bewirken durch Wandverdickung eine Verfestigung der Arterienwand mit konsekutivem Elastizitätsverlust sowie eine Lumeneinengung (Böcker et al., 2008). Die bedeutendste Form dieser Gefäßerkrankungen stellt die Atherosklerose dar (Böcker et al., 2008). Der Begriff Atherosklerose ist die von der „World health organisation“ (WHO) vorgeschlagene Bezeichnung der Schlagaderverkalkung. Die WHO definiert die Atherosklerose als „eine variable Kombination von Veränderungen zunächst der Intima, bestehend aus einer herdförmigen Ansammlung von Fettsubstanzen, komplexen Kohlenhydraten, Blut, Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia“ (Riede et al., 2009).

Die Atherosklerose beschreibt eine von der Intima auf die Media übergreifende Erkrankung der großen und mittelgroßen Arterien vom elastischen und muskulären Typ. Sie geht mit progressiven Lipideinlagerungen (Namensteil „Athero-“) und diffuser Kollagenfaservermehrung (Namensteil „-sklerose“) einher und wird durch eine chronische Entzündungsreaktion geprägt (Riede et al., 2004).

Die resultierenden Veränderungen an der Arterienwand verlaufen nach folgender pathogenetischer Reaktion (Abbildung 1): Am Anfang steht eine Schädigung des Endothels (Typ-1-Läsion). Als mögliche Ursachen werden hierfür Risikofaktoren wie zum Beispiel die Hypercholesterinämie oder das Rauchen und Wirbelbildungen an Gefäßverzweigungen diskutiert. Daraufhin bildet das Endothel Chemokine und Adhäsionsmoleküle für Monozyten und Lymphozyten. Sie schütten proinflammatorische Zytokine aus und tragen dadurch zur Ausdifferenzierung der Monozyten zu Makrophagen bei. Die Produktion von Stickstoffmonoxid wird gedrosselt und somit eine Vasokonstriktion bewirkt. Durch die initiale Endothelläsion, kombiniert mit einem Überangebot an dem im Blut zirkulierenden „Low-density“-Lipoprotein (LDL), gelangt LDL in den Subintimaraum. Dort wird es durch freie Radikale der Endothelzelle und durch Makrophagen oxidiert. Über den Scavenger-Rezeptor wird dieses oxidierte LDL in die Makrophagen aufgenommen und die Cholesterinester in Lysosomen gespalten. Bei einem Überangebot an Cholesterinestern findet jedoch eine Reveresterung statt. Durch vakuoläre

Ablagerungen wandeln sich dann die Makrophagen in sogenannte Schaumzellen um, die sich in der Intima ansammeln und morphologisch als gelblich erhabene, streifenförmige Herde („fatty streaks“, Typ-2-Läsion) auf der Arterieninnenseite imponieren. Die entstandenen Schaumzellen besitzen nicht die erforderlichen Enzyme, um das Cholesterin zu verdauen, sodass es auskristallisiert. Da zudem zytotoxische T-Lymphozyten Perforine ausschütten, gehen die Schaumzellen apoptotisch zugrunde. Durch das vielfache „Absterben“ der Schaumzellen bildet sich in der Subintima ein instabiler Lipidplaque („Atherom“, Typ-3/4-Läsion) – ein flüssiger Fettbrei mit Cholesterinkristallen. Durch proinflammatorisches Endothelin-1 und Interleukin-1 sowie durch Wachstumsfaktoren, die von noch funktionstüchtigen Makrophagen abgegeben werden, werden Mediamyozyten vor Ort zur Proliferation angeregt. Die ebenfalls stimulierten Endothelzellen locken durch ihren Plättchenaktivierungsfaktor Thrombozyten an, die über den Myofibroblasten-Wachstumsfaktor „Platelet Derived Growth Factor“ die Fibrosierung („Fibroatherom“, Typ-5-Läsion) gleichsam fördern. Letztlich kommt es zur Verkalkung. Die Zellen des Fibroatheroms bilden Matrixmetalloproteasen, welche die Deckplatte der Plaque erweichen. Daraufhin kann die Plaque rupturieren und embolisieren. Desweiteren bilden diese Zellen vermehrt den prokoagulatorischen „Tissue Factor“. Blutet es nun in die Plaque ein und treffen Gerinnungsfaktoren auf das thrombogene Material, formiert sich ein „nonokklusiver Thrombus“ (Typ-6-Läsion). Im Fall eines ungünstigen Gleichgewichts zwischen prothrombotischen Stimuli und Fibrinolyse kann ein „okklusiver Thrombus“ entstehen, zum Verschluss des Gefäßes führen und so beispielsweise einen Myokardinfarkt (MI) bedingen (Riede et al., 2004).

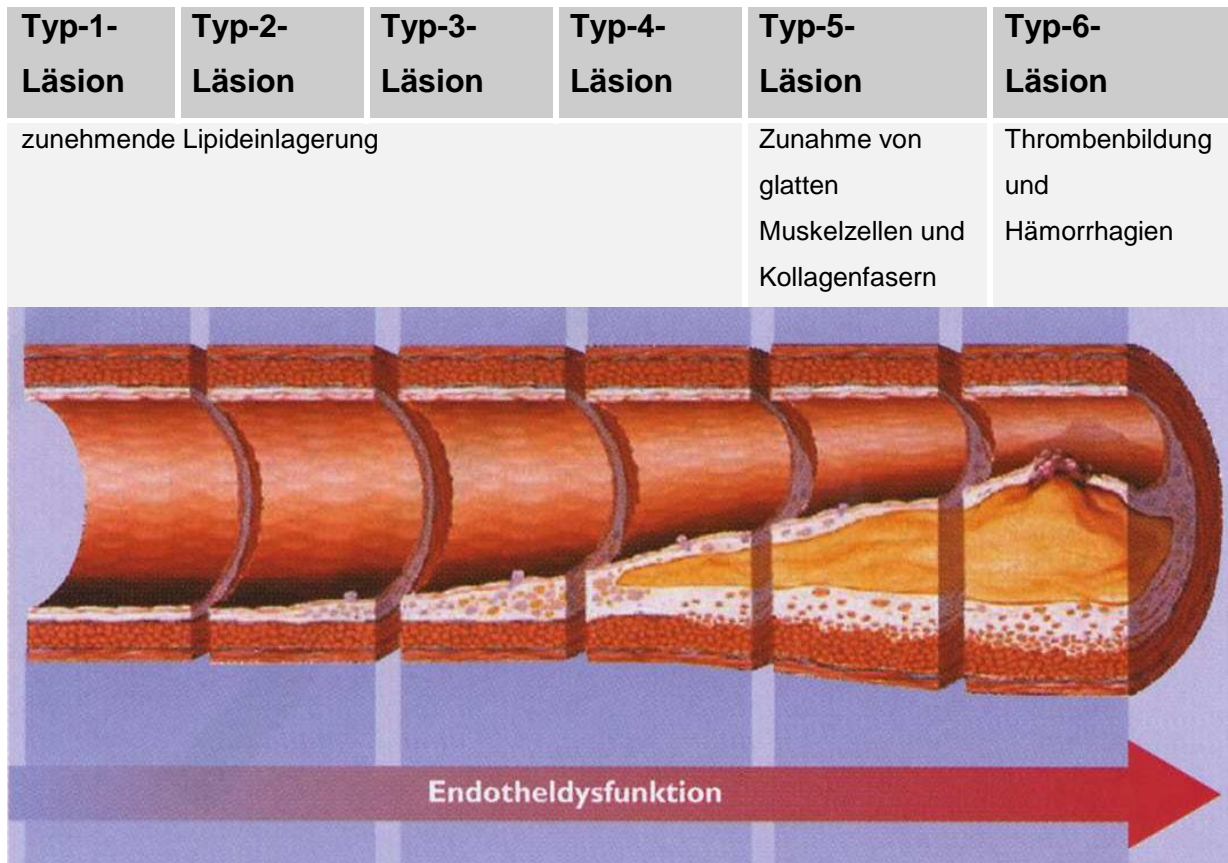


Abbildung 1: Pathogenetische Reaktion der Atherosklerose

(Stary et al., 1995)

1.1.2 Angina pectoris und MI

Die KHK ist die Manifestation der Atherosklerose in den Herzkranzarterien (Herold et al., 2010). Hochgradige Stenosen in diesen Arterien behindern den Blutfluss und verursachen folglich eine Koronarinsuffizienz – ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot im Myokard (Herold et al., 2010). Entsprechend der prozentualen Verminderung des Gefäßdurchmessers teilt man die Koronarstenosen in verschiedene Schweregrade ein (Herold et al., 2010):

- Grad I: 25-49% hämodynamisch nicht signifikante Stenose
- Grad II: 50-74% hämodynamisch signifikante Stenose
- Grad III: 75-99% kritische Stenose
- Grad IV: 100% kompletter Verschluss

Regionale Perfusionsstörungen des Myokards sind erst zu erwarten, wenn das Gefäßlumen mehr als 50% eingengt ist (hämodynamisch signifikante Stenose). Sind mehr als 75% des Lumens einer Koronararterie durch atherosklerotische Läsionen verschlossen (kritische Stenose), ist die Koronarreserve (Differenz zwischen maximal möglicher Koronardurchblutung und Koronardurchblutung in Ruhe) erschöpft. Dann ist bei erhöhter Sauerstoffanforderung des Arbeitsmyokards wie beispielsweise unter körperlicher Belastung nicht mehr mit einer ausreichenden Blutversorgung zu rechnen. Bei einer 90%igen Stenose tritt dies bereits in Ruhe ein (Herold et al., 2010, Böcker et al., 2008).

Die Angina pectoris ist das Leitsymptom der Koronarinsuffizienz und tritt mit retrosternal lokalisierten Schmerzen in Erscheinung. Typischerweise empfinden die Patienten den Schmerz als einengend, drückend, stechend oder brennend und er kann in den Hals, in den Unterkiefer, in die Schultergegend, in den Oberbauch oder in den linken (beziehungsweise rechten) Arm bis in die ulnaren Fingerspitzen ausstrahlen. Dieses Symptom hat meist einen Crescendo-Decrescendo-Charakter (Dietel et al., 2009). Man unterscheidet zwei Formen der Angina pectoris: Bei der stabilen Angina pectoris haben die Patienten über eine lange Zeit die gleichen, stabilen Beschwerden. Diese treten reproduzierbar bei körperlicher oder psychischer Belastung auf, dauern fünf bis zehn Minuten an und reagieren in ein bis zwei Minuten regredient auf die sublinguale Nitroglyceringabe (Herold et al., 2010). Die instabile Angina pectoris kann sowohl bei Zunahme an Intensität und Frequenz aus der stabilen Form hervorgehen als auch erstmalig oder in Ruhe auftreten. Als instabile Angina pectoris gilt jede Erstangina sowie eine Angina pectoris, die mit zunehmenden Schmerzen, mit zunehmender Dauer oder mit zunehmender Häufigkeit auftritt. Es besteht ein akutes Infarktisiko (Herold et al., 2010; Gerok et al., 2007).

Ein MI ist eine ischämische Myokardnekrose, die meist auf dem Boden einer KHK auftritt (Herold et al., 2010). Ein MI tritt in der Regel auf, wenn eine vulnerable Plaque rupturiert, eine atherosklerotisch veränderte Koronararterie daraufhin thrombotisch verschlossen und somit die Koronardurchblutung abrupt gedrosselt wird. Der Schmerz dabei ähnelt in seinem Charakter dem der Angina pectoris, tritt jedoch meist in Ruhe auf, ist schwerwiegender und von längerer Dauer (Dietel et al., 2009).

Die Diagnose MI wird bei einem über 20 Minuten anhaltenden Ruheschmerz mit ST-Strecken-Hebungen im Elektrokardiogramm oder erhöhten serologischen Markern

für nekrotische Kardiomyozyten gestellt (Troponin T oder Troponin I, Kreatinkinase-Isoenzym) (Siegenthaler et al., 2006).

1.1.3 Epidemiologie der KHK

Gemäß den Angaben der WHO ist die KHK derzeit die häufigste Todesursache auf der Welt. Im Jahr 2009 führte die KHK in Deutschland die Todesursachenstatistik mit 15,8% aller Todesursachen an (Statistisches Bundesamt Deutschland, 2010). Insgesamt erleiden in Deutschland pro Jahr circa 300 von 100.000 Menschen einen akuten MI und rund 400 von 100.000 Patienten werden mit der klinischen Symptomatik einer instabilen Angina pectoris behandelt. Mit ihren verschiedenen klinischen Manifestationsformen (Angina pectoris, MI, plötzlicher Herztod, Herzinsuffizienz) ist die KHK in den westlichen Industrienationen die bedeutendste Ursache für Arbeitsunfähigkeit, vorzeitige Invalidität und Tod (Gerok et al., 2007).

In den ersten vier Wochen nach einem MI sterben circa 50% aller Infarktpatienten, wie das Ergebnis einer weltweiten Studie der WHO, die die Bezeichnung Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease(MONICA)-Projekt trägt, zeigte (Herold et al., 2010). Innerhalb von zwei Jahren nach dem MI erleiden weitere 5-10% aller Infarktpatienten einen plötzlichen Herztod (Herold et al., 2010).

Die Inzidenz eines Koronarereignisses steigt im Alter stark an, wobei Männer statistisch zehn bis 20 Jahre früher an sklerosierten Koronararterien leiden als Frauen. Jedoch nähert sich die Inzidenz der KHK bei Frauen mit zunehmendem Alter derjenigen bei Männern an. Die Inzidenz der KHK in der Altersgruppe von 65 bis 94 Jahren im Vergleich zur Altersgruppe von 35 bis 64 Jahren ist bei Männern doppelt und bei Frauen dreimal so hoch. Zudem ist die Mortalität der KHK für Männer im jüngeren Lebensalter von 25 bis 34 Jahren dreimal so hoch (mit 74 bis 84 Jahren 1,6 mal so hoch) wie für Frauen (Wilson et al., 2010).

Seit 1975 konnte ein Rückgang der Mortalität der KHK um mehr als 24% in den meisten europäischen Ländern und in den USA verzeichnet werden. Dieser Trend ist vor allem in Regionen mit einem fortschrittlichen Gesundheitssystem ersichtlich. Die Gründe dafür sind zu einer Hälfte in Verbesserungen der Therapie der KHK zu finden. Die restlichen 50% werden einer Reduktion der Risikofaktoren, vor allem dem Rückgang des Rauchens und der Behandlung der Hypercholesterinämie, zugeschrieben (Wilson et al., 2010).

Angesichts einer älter werdenden Bevölkerung und gleichzeitig steigender Inzidenz der KHK im Alter ist zu erwarten, dass die Erkrankung weiterhin entsprechend häufig auftritt (Herold et al., 2010).

1.1.4 Risikofaktoren der KHK

Die Risikofaktoren der Koronarsklerose entsprechen denen der allgemeinen Atherosklerose. Als Risikofaktoren werden jene Faktoren angesehen, welche die Pathogenese einer Erkrankung statistisch begünstigen können. Zum einen können dies eine genetische Prädisposition und zum anderen Umwelteinflüsse und risikofördernde Verhaltensweisen wie beispielsweise das Rauchen sein (Böcker et al., 2008). Nach ihrer Bedeutung für die Progression der Atherosklerose werden sie in Risikofaktoren erster Ordnung (zum Beispiel Hypercholesterinämie, Hypertonie, Nikotinabusus, Diabetes mellitus, Alter und Geschlecht) und zweiter Ordnung (zum Beispiel Adipositas, Bewegungsmangel, Stress, Hyperurikämie und hormonelle Faktoren) eingeteilt (Böcker et al., 2008). Eine hohe Gefährdung geht von der genetisch determinierten familiären Belastung aus (Walter et al., 2000). Insbesondere bei Auftreten eines akuten MI bei sehr jungen Patienten wird die genetische Prädisposition als der führende kausale Risikofaktor diskutiert (Walter et al., 2000). Tabelle 1 zeigt die Hauptrisikofaktoren der Atherosklerose.

Tabelle 1: Hauptrisikofaktoren der Atherosklerose

Alter und Geschlecht:	Das Risiko an einer KHK zu versterben ist für Männer und Frauen ähnlich hoch. Männer erleben Atherosklerose-Manifestationen jedoch in einem jüngeren Lebensalter als Frauen (Kreuzer et al., 2003). Frauen haben erst nach der Menopause ein signifikant gesteigertes Risiko an der Atherosklerose zu erkranken - wahrscheinlich wegen des Abfalls der schützend wirkenden Östrogene im Blut (Steffel et al., 2011). Im hohen Lebensalter gleichen sich die Inzidenzen beider Geschlechter an (Kreuzer et al., 2003).
Lipidprofil:	Ein dauerhaft hoher LDL-Wert und ein niedriger „High-density“-Lipoprotein(HDL)-Wert des Blutes begünstigt die Entstehung der Atherosklerose. Oxidiertes LDL fördert eine Entzündungsreaktion in der Gefäßwand. HDL hingegen wirkt der Atherogenese entgegen, indem es Cholesterin aus peripheren Geweben zur Weiterverarbeitung in der Leber abtransportiert (Kreuzer et al., 2003).
Nikotin:	Zigarettenrauchen steigert das KHK-Risiko erheblich - mit täglichem Rauchen einer Packung Zigaretten etwa um 70 bis 80% gegenüber dem KHK-Risiko von Nichtrauchern. Es fördert unter anderem die LDL-Oxidation sowie die Lipideinlagerung in die Gefäßwand (Kreuzer et al., 2003).

- Hypertonie:** Durch eine anhaltende Hypertonie verändert sich die Regulation der Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen. Ein Ungleichgewicht der Bildung von Vasodilatoren und Vasokonstriktoren durch das Endothel führt zu einer Erhöhung des systemischen Blutdrucks und zu atheromatösen Läsionen. Die endotheliale Dysfunktion stellt das Bindeglied zwischen der Hypertonie und der Atherosklerose dar (Quaschnig et al., 2004).
- Diabetes mellitus:** Die beim Diabetes mellitus auftretende Hyperglykämie führt zur gesteigerten Glykosilierung von Proteinen. Dies erleichtert die LDL-Oxidation und -Einlagerung in die Gefäßwand sowie die Monozytenchemotaxis. Zudem fördert es die Inflammation der Gefäßwandzellen sowie die Endotheldysfunktion (Kreuzer et al., 2003).
- Adipositas:** Die Adipositas verursacht vor allem einen Hypertonus, einen Diabetes mellitus oder eine Hypercholesterinämie und wirkt somit über andere Risikofaktoren atherogen (Kreuzer et al., 2003).
- Genetische Faktoren:** Eine genetische Prädisposition ist hauptsächlich an der Familienanamnese ablesbar. Ein gesteigertes genetisch bedingtes Atheroskleroserisiko kann vorliegen, wenn ein Verwandter ersten Grades vor dem 60. Lebensjahr ein vaskuläres Ereignis erlebt (Kreuzer et al., 2003).
-

1.2 Melanoma inhibitory activity 3(MIA3)-Gen

Die vorliegende Arbeit untersucht im Rahmen einer Assoziationsstudie den Zusammenhang zwischen Einzelnukleotidpolymorphismen des MIA3-Gens und dem MI. Das MIA3-Gen wurde während einer genetischen Untersuchung von Drosophila-Zelllinien entdeckt, in welcher Transportmoleküle und weitere Proteine im Zusammenhang mit der Proteinsekretion und Golgiorganisation identifiziert werden sollten (Bard et al., 2006). Das menschliche MIA3-Gen, das auch als Transport and golgi organisation 1(TANGO1)-Gen bezeichnet wird, ist ein Mitglied der Melanoma inhibitory activity(MIA)-Genfamilie. Es kodiert ein 14kDa-Protein aus 103 Aminosäuren von nicht vollständig geklärt Funktion. Zusammen mit den homologen Genen MIA, Otoraplin (OTOR) und Melanoma inhibitory activity 2 (MIA2) teilt es wichtige strukturelle Eigenschaften wie beispielsweise die SH3-Domäne (Arndt et al., 2006, 2007). Eine SH3-Domäne findet man an Proteinen der molekularen Signalgebung; sie wirkt als Adaptor für weitere Proteine, um auf diese Weise Wechselwirkungen zu ermöglichen (Karp et al., 2005). Die vier kodierten Proteine MIA3, MIA, OTOR und MIA2 stimmen in 34 bis 45% ihrer Aminosäuresequenz überein. Interessanterweise weist aber MIA3 im Gegensatz zu den anderen MIA-Vertretern ein breiteres Expressionsmuster auf (Arndt et al., 2006, 2007): Bosserhoff und Kollegen zeigten an menschlichem Gewebe, dass MIA3 in der Prostata, im Hoden, im Herz, in der Leber und in der Milz exprimiert wird. Für MIA wurde hingegen nur in Knorpelgeweben, für OTOR nur in der Cochlea, im Auge und in Knorpelgeweben und für MIA2 nur in der Leber eine Expression beobachtet (Bosserhoff et al., 2004). Abbildung 2 zeigt die Struktur des MIA-Proteins. MIA3 besitzt neben der SH3-Domäne am Aminoende zwei Doppelwendel, zwei Transmembrandomänen - mit welchen es die Zellmembran durchzieht - und eine Prolin-reiche Domäne als Ligand für die Bindung an andere Proteine wie zum Beispiel Integrin CD11c (Bard et al., 2006, Arndt et al., 2007).

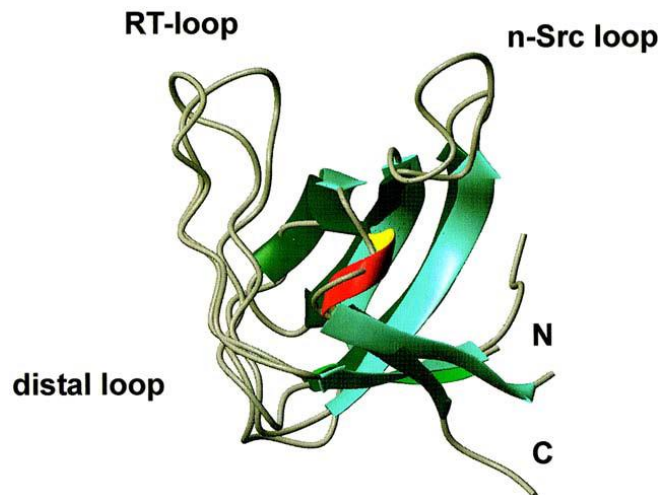


Abbildung 2: Struktur des MIA-Proteins

(Stoll et al., 2001)

N: N-Terminus

C: C-Terminus

1.2.1 MIA3 und die Kollagensekretion

Das MIA3-Protein spielt eine bedeutende Rolle in der Proteinsekretion (Wilson et al., 2011). MIA3 wird in allen Zellen, ausschließlich solcher hämatopoetischen Ursprungs, exprimiert (Saito et al., 2009). MIA3 ist ein integrales Membranprotein des endoplasmatischen Retikulums. Abbildung 3 zeigt die Struktur des MIA3-Proteins. Die SH3-Domäne befindet sich luminal und bindet Kollagen VII, um es anschließend aus dem endoplasmatischen Retikulum zu transportieren. Dies wird durch die Prolin-reiche Domäne des MIA3-Proteins unterstützt, die an der dem Zytoplasma zugewandten Oberfläche des endoplasmatischen Retikulums liegt. Sie bindet spezifische Untereinheiten des Proteins COPII (Coat protein II), auf welches anschließend das Kollagen VII von der SH3-Domäne übertragen wird. Das Protein COPII dient als Transportvesikel, welches das Kollagen VII ummantelt und zum Golgi-Apparat der Zelle weiterleitet. In Zellen, die nicht Kollagen VII sezernieren, könnten andere Moleküle durch MIA3 zur Weiterleitung an den Golgi-Apparat verfrachtet werden (Saito et al., 2009). Die Erkenntnisse von Saito und Kollegen zu der Transportfunktion von MIA3 wurden in einer weiterführenden Studie von Wilson und Kollegen bestätigt und ausgeweitet: Sie zeigten, dass in Mäusen, denen das MIA3-Protein fehlt, die Kollagene I, II, III, IV, IIV und IX durch Chondrozyten,

Fibroblasten, Endothelzellen und murale Zellen nicht sezerniert werden können. Dadurch bedingt war die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix abnorm und das Kollagen sammelte sich intrazellulär an. Ist MIA3 in seiner Funktion durch Ribonukleinsäuren-Interferenz ausgeschaltet, so wird der Export von Kollagen VII aus dem endoplasmatischen Retikulum verhindert (Wilson et al., 2011).



Abbildung 3: Struktur des MIA3-Proteins

(Wilson et al., 2011)

SP: Signalpeptid

SH3: „Src-homology-3“-Domäne

TM: Transmembrandomäne,

PRD: Prolin-reiche Domäne

1.2.2 MIA3 als Tumorsuppressorgen

Es wurde gezeigt, dass MIA3 in Melanomzelllinien im Vergleich zu normalen Melanozyten in seiner Replikation herabreguliert oder sogar ausgeschaltet ist. Zellverbände, in denen keine Expression des MIA3 stattfand, wiesen ein fortgeschrittenes Tumorstadium auf. Ebenso konnte bei gutartigen und atypischen Nävi eine verminderte MIA3-Genexpression festgestellt werden. In Experimenten führte die Behandlung von Zelllinien des Kolonkarzinoms und des hepatozellulären Karzinoms mit rekombinantem MIA3 zu einer reduzierten Beweglichkeit dieser Zelllinien (Arndt et al., 2007). Unbehandelte Tumorzellen exprimierten MIA3 kaum und wiesen im Vergleich zu nicht entarteten Zellen eine gesteigerte Migration auf (Arndt et al., 2007). Dies spricht dafür, dass eine reduzierte MIA3-Genexpression zur Tumorprogression beiträgt und somit dem MIA3-Gen die Rolle eines Tumorsuppressors im menschlichen Melanom, Kolonkarzinom und hepatozellulären Karzinom zukommt (Arndt et al., 2006, 2007).

1.2.3 MIA3 und die KHK

Die einzigen Zellen, die physiologisch nicht MIA3 exprimieren, sind Zellen des hämatopoetischen Systems (Saito et al., 2009, Arndt et al., 2007). Einer der Unterschiede zwischen reifen hämatopoetischen Zellen und anderen Gewebszellen ist das fehlende Adhäsionsvermögen (Arndt et al., 2007). Dies gilt jedoch nur solange, wie diese Zellen sich im Blutstrom befinden (Arndt et al., 2007). Während der entzündlichen Reaktion bei der Atherogenese wandern Monozyten aus dem Blutstrom durch die endotheliale Barriere (Böcker et al., 2008). Die Transmigration benötigt eine koordinierte Interaktion von Adhäsionsrezeptoren auf der Oberfläche der Monozyten und den Endothelzellen (Arndt et al., 2007). Der Ablauf dieser Extravasation vom Blutgefäß in das Gewebe folgt einer definierten Abfolge: reversible Bindung, „Rolling“, Adhäsion und Diapedese (Arndt et al., 2007). Während des „Rolling“-Vorgangs senden die Leukozyten Chemokine und andere Stimulatoren aus, die sie dazu aktivieren, durch verschiedene Integrine eine feste Bindung mit der Endothelzelle einzugehen (Arndt et al., 2007). In diesem Zusammenhang wurde beobachtet, dass menschliche Monozyten das MIA3-Gen exprimieren, wenn sie sich an ein Gewebe anhaften (Arndt et al., 2007). Das MIA3-Protein interagiert dann mit dem Leukozyten-spezifischen β 2-Integrin CD11c/CD18 und ist somit für die Leukozytentransmigration während der Atherogenese von Bedeutung (Arndt et al., 2007, Imhof et al., 2004). Daher scheint es einen funktionellen Zusammenhang zwischen MIA3 und der Formation von atherosklerotischen Plaques zu geben, welche instabil werden und thrombotische Komplikationen - zum Beispiel einen MI - verursachen können.

1.3 Genetische Faktoren der KHK

Das genetische Risiko der KHK wurde in einer schwedischen Studie untersucht. Dabei wurden die Daten von rund 10.500 Zwillingspaaren erhoben. Die schwedische Arbeitsgruppe um Marenberg stellte fest, dass das Risiko, an der KHK zu sterben, für einen männlichen monozygoten Zwilling um den Faktor 8,1 stieg, wenn dessen Zwilling Bruder vor dem 55. Lebensjahr an der KHK starb. Das Risiko für einen monozygoten weiblichen Zwilling war sogar um das 15-Fache erhöht, wenn deren Zwillingsschwester vor dem 65. Lebensjahr an einer KHK starb. Die Untersuchung zeigte, dass vor allem in jungen Jahren das Risiko der KHK für Männer und Frauen stark von der genetischen Disposition beeinflusst wird (Marenberg et al., 1994).

Für zahlreiche Gene wurde eine Assoziation mit der KHK postuliert (Zeller et al., 2011). Zu diesen Kandidatengenen gehören in erster Linie solche, für deren Proteinprodukte eine Beteiligung an der Blutdruckregulation, an dem Lipidmetabolismus, an der Endothelfunktion, an der Thrombusbildung und an der Gerinnungskaskade nachgewiesen wurde oder angenommen wird (Helgadottir et al., 2007, McPherson et al., 2007, Samani et al., 2007, Erdmann et al., 2009). Abbildung 4 zeigt Gene, die in genomweiten Assoziationsstudien als Kandidatengene der KHK identifiziert wurden (Zeller et al., 2011).

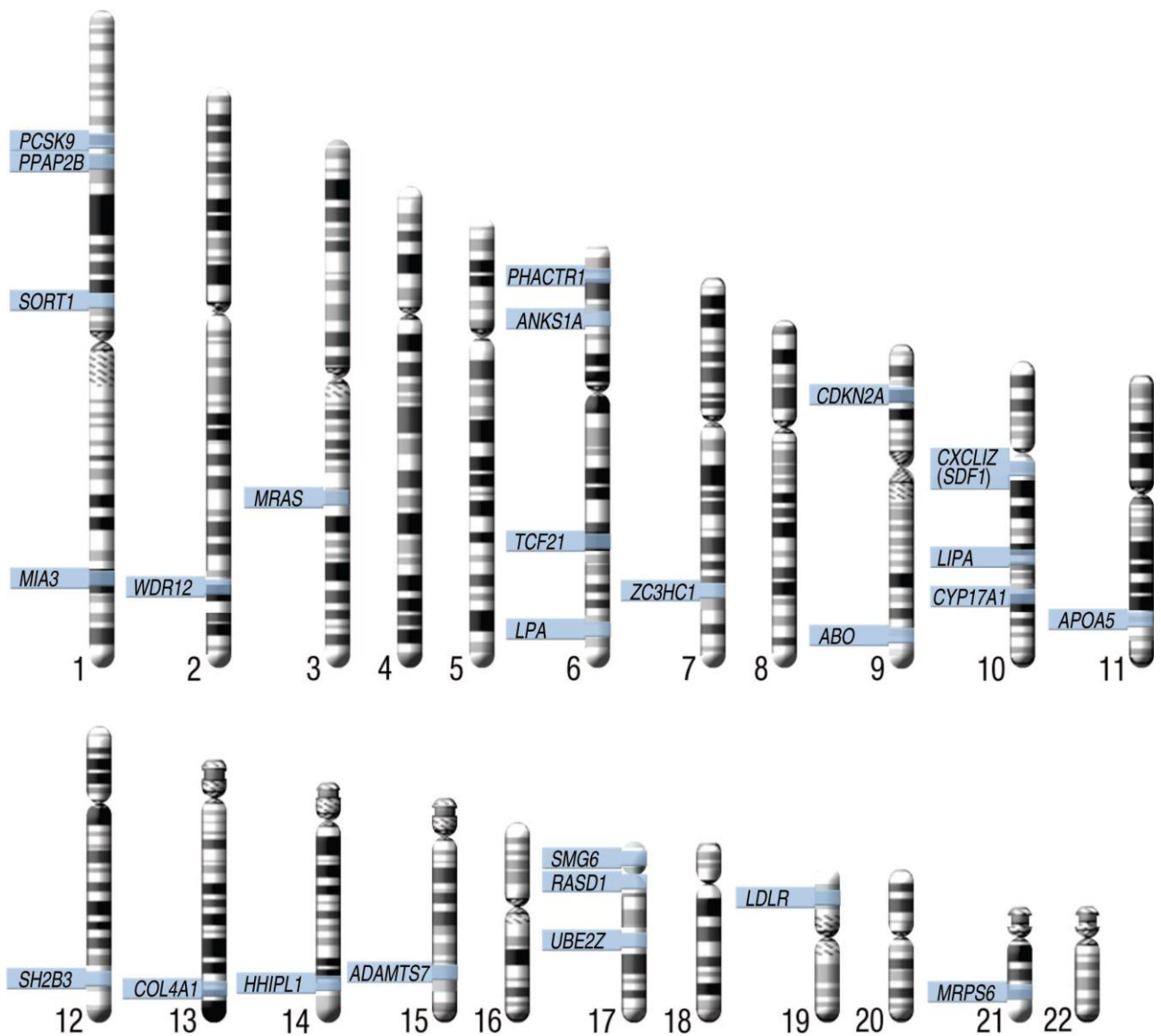


Abbildung 4: Genorte, die in genomweiten Assoziationsstudien als Kandidatengene der KHK identifiziert wurden

(Zeller et al., 2011)

Abbildung 4 zeigt einen haploiden Chromosomensatz.

Auf dem Chromosom 1 ist die Position von MIA3 angegeben.

PCSK9: „proprotein convertase subtilisin/kexin type 9“

PPAP2B: „phosphatidic acid phosphatase type 2B“

SORT1: „sortilin 1“

WDR12: „WD repeat domain 12“

MRAS: „muscle RAS oncogene homolog“

PHACTR1: „phosphatase and actin regulator 1“

ANKS1A: „ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing 1A“

TCF21: „transcription factor 21“
 LPA: „lipoprotein, Lp(a)“
 ZC3HC1: „zinc finger, C3HC-type containing 1“
 CDKN2A: „cyclin-dependent kinase inhibitor 2A“
 ABO: „ABO blood group (transferase A, alpha 1-3-N-acetylgalactosaminyltransferase; transferase B, alpha 1-3 galactosyltransferase)“
 CXCL12: „chemokine (C-X-C motif) ligand 12“
 LIP: „lipase A, lysosomal acid, cholesterol esterase“
 CYP17A1: „cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1“
 APOA5: „apolipoprotein A-V“
 SH2B3: „SH2B adaptor protein 3“
 COL4A1: „collagen, type IV, alpha 1“
 HHIPL1: „HHIP-like 1“
 ADAMTS7: „ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 7“
 SMG6: „smg-6 homolog, nonsense mediated messenger ribonucleic acid decay factor“
 RASD1: „RAS, dexamethasone-induced 1“
 UBE2Z: „ubiquitin-conjugating enzyme E2Z“
 LDLR: „low density lipoprotein receptor“
 MRPS6: „mitochondrial ribosomal protein S6“

Der technische Fortschritt ermöglicht es seit einigen Jahren, genomweite Assoziationsstudien zur KHK und anderen Krankheiten durchzuführen und damit Kandidatengene auch unabhängig von der Kenntnis ihrer biologischen Funktion zu identifizieren. Dies ermöglicht eine vorurteilsfreie Vorgehensweise. Abbildung 4 beruht auf derartige genomweite Assoziationsstudien (Zeller et al., 2011) und auch die Bedeutung von MIA3 für die KHK und den MI wurde durch eine genomweite Assoziationsstudie entdeckt (Samani et al., 2007).

Genomweite Assoziationsstudien führten zur Identifikation einer Vielzahl von Genloci für die KHK und den MI (Helgadottir et al., 2007, McPherson et al., 2007, Samani et al., 2007, Erdmann et al., 2009). Neben dem zuerst entdeckten Locus (Chromosom 9p21.3), dessen Assoziation mit der KHK und dem MI inzwischen in über 50 Studien bestätigt wurde, wurden unter anderem assoziierte Loci in den chromosomalen Regionen 1p13.3, 1q41, 2q36.3, 6q25.1, 10q11.21 und 15q22.33 nachgewiesen (Samani et al., 2007). Es fällt auf, dass kaum einer dieser Loci zuvor mit der KHK oder dem MI in Zusammenhang gebracht worden war. Die oben erwähnte Region 1q41 enthält das MIA3-Gen, über dessen Assoziation mit dem MI in dieser Arbeit eine Feinuntersuchung durchgeführt wurde.

Als Marker werden in genetischen Assoziationsstudien hauptsächlich Einzelnukleotidpolymorphismen („Single nucleotide polymorphisms“, SNPs) verwendet. SNPs sind erbliche Variationen, die auf dem Austausch einzelner Basenpaare in einem Desoxyribonukleinsäure(DNA)-Doppelstrang beruhen (zum Beispiel A-T für G-C) und in einer Population mit einer Häufigkeit von mindestens einem Prozent auftreten (Wrba et al., 2007, Strachan et al., 2005). Im haploiden menschlichen Genom, das 3×10^9 Basenpaare umfasst, wurden mehr als drei Millionen verschiedene SNPs identifiziert. Statistisch betrachtet findet sich also ein SNP alle 1000 Basenpaare, wobei der tatsächliche Abstand von SNP zu SNP große Unterschiede aufweisen kann (Knippers et al., 2006; The International HapMap Consortium, 2007). Die oben genannten Risikoloci für die KHK und den MI aus der Arbeit von Samani und Kollegen und die zugehörigen SNPs zeigt Tabelle 2.

Tabelle 2: Risikoloci für die KHK und den MI aus der Arbeit von Samani und Kollegen und zugehörige SNPs

Genlocus	SNP	seltenes Allel	Risikoallel	OR (95% KI)
1p13.3	rs599839	G	A	1,29 (1,18 – 1,40)
1q41	rs17465637	A	C	1,20 (1,12 – 1,30)
2q36.3	rs2943634	A	C	1,08 (0,90 – 1,31)
6q25.1	rs6922269	A	A	1,23 (1,01 – 1,50)
9p21.3	rs1333049	C	C	1,28 (1,07 – 1,53)
10q11.21	rs501120	C	T	1,33 (1,20 – 1,48)
15q22.33	rs17228212	C	C	1,21 (1,13 – 1,30)

(Samani et al., 2007)

Der SNP rs17465637 liegt in der MIA3-Region.

KI: Konfidenzintervall

OR: Odds ratio

1.4 Stand der Forschung zu MIA3-Polymorphismen und der KHK

In einer genomweiten Assoziationsstudie für die KHK und den MI untersuchten Samani und Kollegen 377.857 SNPs in der Population der Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC)-Studie, einer Genanalyse zu sieben verschiedenen Erkrankungen einschließlich der KHK (Samani et al., 2007). Daraufhin untersuchten Samani und Kollegen 272.602 SNPs in der Deutschen-MI-Familienstudie - einer weiteren genomweiten Assoziationsstudie (Samani et al., 2007). Sie verglichen Ergebnisse zu den Genloci, die in der Population der WTCCC-Studie eine starke Assoziation zur KHK aufwiesen, mit Daten aus der Deutschen-MI-Familienstudie. Durch Kombination der statistischen Daten dieser beiden Studien wurde unter anderem für die SNPs rs17465637 und rs3008621 in der MIA3-Region auf dem Chromosom 1q41 eine Assoziation mit der KHK und dem MI festgestellt (Samani et al., 2007). Zudem wurden die Genloci 9p21.3, 1p13.3, 2q36.3, 6q25.1, 10q11.21 und 15q22.33 identifiziert, die in Assoziation mit der KHK und dem MI stehen (Samani et al., 2007).

1.5 Ziel der Arbeit

Das Ziel der Arbeit war der Nachweis einer möglichen Assoziation zwischen bestimmten Variationen des MIA3-Gens und dem MI.

Die Gesamtvariation des MIA3-Genlocus' wird durch eine spezifische Kombination von neun SNPs repräsentiert, die als Grundlage für eine Haplotypanalyse dienen können („haplotype-tagging“ SNPs oder „tag“-SNPs). Bei diesen SNPs handelt es sich um rs3002142, rs904323, rs17011666, rs3002145, rs17465637, rs2088514, rs35822937, rs17163384 und rs1053316. Aufgabe dieser Arbeit war es, die Assoziation von fünf der „tag“-SNPs (rs3002142, rs904323, rs17011666, rs3002145 und rs17465637) sowie des SNPs rs17011681, der als Replikations-SNP für den SNP rs17465637 diente, mit dem MI zu untersuchen. Die Genotypisierung der weiteren vier „tag“-SNPs (rs2088514, rs35822937, rs17163384 und rs1053316) wurde außerhalb dieser Arbeit im Labor durchgeführt.

Vor dem Beginn der Arbeit war - als ein Resultat einer genomweiten Analyse - die Assoziation eines der oben genannten MIA3-SNPs (rs17465637) mit dem MI bereits publiziert worden. Eine Validierung dieses Ergebnisses sowie eine Haplotypanalyse - also eine Feinanalyse - der gesamten MIA3-Region standen jedoch noch aus. Zu diesen beiden Aufgaben sollte diese Arbeit entscheidende Beiträge leisten.

Zum Nachweis der Assoziation der SNPs mit dem MI dienten DNA-Proben von 3.657 MI-Patienten und 1.211 Kontrollpersonen ohne MI aus dem süddeutschen Raum, die genotypisiert werden sollten. Die Genotypisierung sollte unter Verwendung allelspezifischer DNA-Sonden mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) erfolgen (TaqMan-Technik). Mit den Genotypdaten sollte einerseits geprüft werden, ob die hier untersuchten MIA3-SNPs je für sich mit dem MI assoziiert sind, und es andererseits möglich sein - unter Einschluss der Daten der weiteren „tag“-SNPs - eine Haplotypanalyse des gesamten MIA3-Gens für den MI durchzuführen.

2. Methoden

2.1 Patienten und Kontrollpersonen

In dieser Fall-Kontrollstudie wurden 3.657 Patienten mit einem akuten oder vorausgegangenem MI sowie 1.211 Kontrollpersonen aus dem süddeutschen Raum untersucht. Bei allen Studienteilnehmern war eine Koronarangiographie indiziert, der sie sich am Deutschen Herzzentrum München oder an der ersten Medizinischen Klinik des Klinikums rechts der Isar unterzogen. Sie wurden im Zeitraum von 1993 bis 2002 fortlaufend für diese Studie erfasst. Sämtliche Probanden erklärten ihre schriftliche Zustimmung zu der genetischen Analyse. Die Ethikkommission des Klinikums rechts der Isar hat das dazu vorgelegte Studienprotokoll genehmigt. Die Untersuchungen im Rahmen dieser Studie standen im Einklang mit den Richtlinien der Deklaration von Helsinki (<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>, Stand: 22.10.2010).

2.2 Definitionen zu den Charakteristika der Fall- und Kontrollgruppe

Die Kontrollpersonen zeigten angiographisch unauffällige Koronararterien oder Stenosen, die den Gefäßinnendurchmesser nicht um mehr als zehn Prozent verringerten. Desweiteren wiesen sie keine regionalen Wandbewegungsstörungen des Myokards auf. Sie hatten bisher keinen MI erfahren und zeigten weder auf einen MI hinweisende klinische Symptome noch MI-Zeichen im Elektrokardiogramm. Die Koronarangiographie erfolgte bei ihnen zur Abklärung pektanginöser Beschwerden. Die Fallpersonen wiesen entweder einen akuten oder vorausgegangenem MI auf. Ein akuter MI wurde bei anhaltenden retrosternalen Schmerzen über eine Dauer von 20 Minuten und gleichzeitiger ST-Hebung oder pathologischer Q-Welle im Elektrokardiogramm diagnostiziert. Patienten, die einen MI erlitten hatten, zeigten entweder angiographisch eine verschlossene, dem Infarktgebiet zugehörige Koronararterie oder regionale Wandbewegungsstörungen entsprechend der elektrokardiographisch dargestellten Infarktlokalisation oder auch beide dieser pathologischen Befunde.

Systolische Blutdruckwerte von über 140 mmHg und diastolische Blutdruckwerte von über 90 mmHg (Chalmers et al., 1999) in mindestens zwei Messungen oder eine aktuelle antihypertensive Behandlung definierten einen arteriellen Bluthochdruck. Eine Hypercholesterinämie wurde bei einem dokumentierten Gesamtcholesterinwert

im Serum (nüchtern) von über 240 mg dl^{-1} ($6,2 \text{ mmol l}^{-1}$) oder bei einer derzeitigen Behandlung mit cholesterinsenkender Medikation diagnostiziert. Als Raucher wurden diejenigen Probanden angesehen, welche regelmäßiges Rauchen in den letzten sechs Monaten angaben. Diabetes mellitus wurde diagnostiziert, wenn die Testperson insulinpflichtig war oder orale Antidiabetika einnehmen musste. Gemäß den Kriterien der WHO wurde diese Diagnose ebenfalls für diätisch behandelte Testpersonen mit einem zu schnellen Anstieg der Blutglukose oder einem pathologischen Glukosetoleranztest vergeben.

2.3 DNA-Proben und Polymorphismen

Sämtliche DNA-Proben zur Genanalyse wurden zur Verfügung gestellt. Die verwendete genomische DNA war aus Leukozyten des peripheren Blutes mit den Reagenzien Nucleo-Spin Blood Quick Pure (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) oder QIAamp DNA Blood Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) extrahiert und bei -25°C gelagert worden.

Ein Satz aus neun haplotypspezifischen SNPs und einem Replikations-SNP des MIA3-Genlocus' -,der zwischen den Positionen 220,850,000 und 220,920,000 auf Chromosom 1 gelegen ist (Abbildung 5),- wurde anhand der HapMap-Datenbank außerhalb dieser Arbeit bestimmt (National Center for Biotechnology Information, B36 assembly, SNP database build 126, 2/2009, <http://www.hapmap.org>, Stand: 22.10.2010). Der von Samani und Kollegen (2007) ursprünglich verwendete SNP rs17465637 befand sich unter diesen zehn SNPs. Sie wurden basierend auf den Daten der „CEU“-Population - einer Population von Bewohnern des amerikanischen Bundesstaates Utah mit nord- und westeuropäischer Abstammung aus dem „Centre d'Etude du Polymorphisme Humain“-Kollektiv der HapMap-Datenbank - und begrenzt auf einen paarweisen r^2 -Kopplungswert von maximal 90% sowie einer Allelfrequenz von mindestens 10% gewonnen. Abbildung 5 zeigt die Intron-Exon-Struktur der MIA3-Region und die Positionen der SNPs in und um MIA3 auf dem Chromosom 1q41. Der in der Abbildung 5 vorkommende SNP rs17011681 wurde nicht in der Haplotypanalyse verwendet; er diente als Replikations-SNP für den SNP rs17465637 ($r^2 = 1$). Die SNPs rs17011681 und rs17465637 liegen relativ nahe beieinander (Abbildung 5).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden im gesamten Studienkollektiv Genotypisierungen für die SNPs rs3002142, rs904323, rs17011666, rs3002145, rs17465637 und den Replikations-SNP rs17011681 durchgeführt. Ergänzt mit den Genotypdaten von vier weiteren SNPs - rs2088514, rs35822937, rs17163384 und rs1053316 - wurde außerhalb dieser Arbeit eine Haplotypanalyse des MIA3 durchgeführt, deren Resultate in Abschnitt 4.2 beschrieben werden.

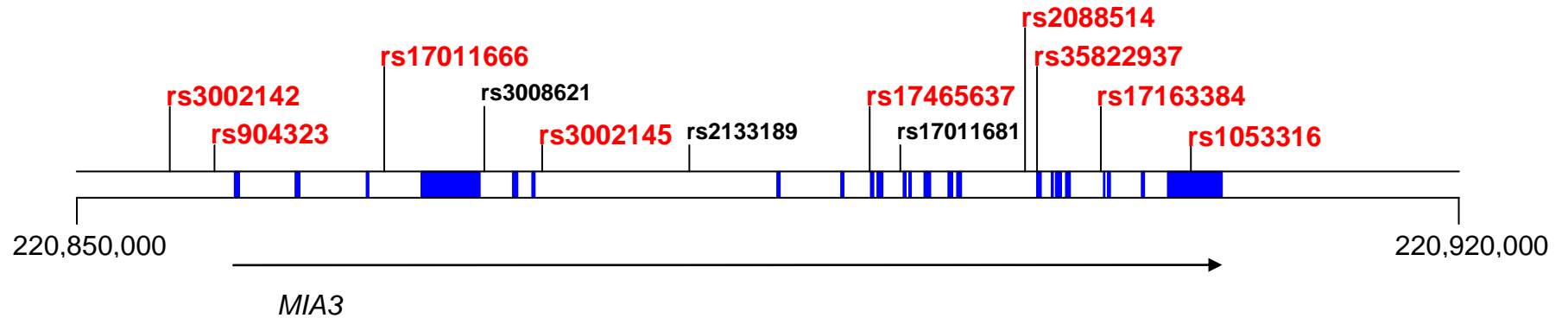


Abbildung 5: Intron-Exon-Struktur der MIA3-Region und Positionen der SNPs in und um MIA3 auf dem Chromosom 1q41

Der Graph zeigt die Anordnung der Exons (blaue vertikale Linien und Boxen) sowie die dazwischenliegenden Introns des MIA3-Gens auf dem Chromosom 1 (Abschnitt q41). Die Positionen spezifischer SNPs in und um MIA3 sind gekennzeichnet. Die sogenannten „tag“-SNPs sind rot dargestellt.

Der SNP rs3008621 wurde bereits in vorausgehenden Studien untersucht (Samani et al., 2007, Coronary Artery Disease Consortium, 2009). Dieser SNP ist vollkommen mit dem „tag“-SNP rs3002145 assoziiert.

Für den SNP rs2133189 wurde vor dieser Studie eine vollkommene allelische Assoziation mit dem SNP rs17465637 entdeckt (Samani et al., 2007). Er wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

Der SNP rs17011681 wurde als Replikations-SNP für den SNP rs17465637 verwendet.

Der abgebildete Graph wurde gemäß Daten entworfen, die im Internet von dem International HapMap Consortium zur Verfügung gestellt worden sind (<http://www.hapmap.org>, Stand 22.10.2010).

2.4 Genotypisierung

Für die Genotypisierung in dieser Arbeit wurde die TaqMan-Technik verwendet (Livak et al., 1999). Dieses Verfahren basiert auf der PCR, in der ein bestimmter genomischer DNA-Abschnitt amplifiziert wird, und auf der 5'-Nuklease-Reaktion (Abbildung 6).

Während der PCR durchläuft der Ansatz 40 Amplifikationszyklen, wobei in jedem Zyklus die Zielsequenz verdoppelt wird und sich somit exponentiell anreichert. Im ersten Schritt eines Zyklus werden die DNA-Doppelstränge auf 95°C erhitzt, um sie in Einzelstränge zu trennen (Denaturierung). Aus diesem Grund wird für die PCR eine thermostabile DNA-Polymerase verwendet – nämlich die aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase). Anschließend wird die Temperatur auf 60°C abgesenkt, um die Bindung der PCR-Primer an die Template-DNA zu ermöglichen (Annealing). Bei der gleichen Temperatur katalysiert die Taq-Polymerase unter Verwendung der im Reaktionsansatz enthaltenen Desoxiribonukleosidtriphosphate die Verlängerung der Primer komplementär zur Template-Sequenz (Amplifikation).

Für die 5'-Nuklease-Reaktion werden zwei allelspezifische DNA-Sonden verwendet. DNA-Sonden sind einzelsträngige Oligonukleotide (15-25 Basen lang), deren Sequenz zu derjenigen Region der Template-DNA komplementär ist, die die polymorphe Position enthält. Die beiden verwendeten Sonden sind an ihrem 5'-Ende mit je einem von zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gekennzeichnet: FAM (6-Carboxifluoreszein) beziehungsweise VIC (Fluoreszenzfarbstoff der Firma Applied Biosystems), die als Reporterfarbstoffe dienen. Am 3'-Ende befindet sich ein nicht fluoreszierender Quencherfarbstoff. Liegt die fluorogene Sonde in einem intakten Zustand vor, unterdrückt die räumliche Nähe des Quenchers zum Reporter die Fluoreszenz durch einen Resonanzenergietransfer. Während der PCR hybridisieren die Sonden und Primer zunächst an den Matrizenstrang. Die Taq-Polymerase besitzt eine 5'→3'-Exonukleaseaktivität, die während der Primer-Extension die an den DNA-Strang hybridisierte, vollkommen komplementäre Sonde (Allel 1) hydrolysiert – nicht jedoch die unvollständig komplementäre Sonde (Allel 2), die freigesetzt wird und intakt bleibt. Durch den Abbau der passgenauen Sonde kommt es zur räumlichen Trennung des Quenchers und Reporters dieser Sonde und damit zu einer für die Messung relevanten Zunahme der Fluoreszenzintensität des Reporters (Abbildung 6).

Die DNA-Sonden wurden für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Sie waren zuvor mittels der „Primer Express Software“ (Version 2.0.0; Applied Biosystems) ermittelt worden. Die Informationen zu den Abfolgen dieser Oligonukleotide waren aus der Gen-Bank entnommen worden. Tabelle 3 zeigt die Basensequenzen der verwendeten Primer und die für die verschiedenen Allele jeweils verwendeten Sonden der TaqMan-Reaktionen.

Es wurden Sonden mit einer „minor groove binder group“ verwendet (Kutyavin et al., 2000). Die „minor groove binder group“ ist ein sichelförmiges Molekül, das sich bei korrekter Hybridisierung von Sonde und DNA-Matrize in die kleine Furche der DNA-Doppelhelix einlagert und die Basenpaarung stabilisiert. Bei einer Basenfehlpaarung kommt keine Stabilisierung zustande. Solche „minor groove binder“-Sonden erleichtern die Differenzierung einer zusammenpassenden Basenpaarung von einer Basenfehlpaarung.

Die PCR wurde in den Thermocyclern des Typs „GeneAmp PCR System 9600“ und „GeneAmp PCR System 9700“ (Applied Biosystems, Darmstadt) sowie in dem MultiCycler PTC 220 Dyad (MJ Research, Waltham, Massachusetts, USA) durchgeführt. Abschließend wurden in dieser Studie die allelspezifischen Fluoreszenzsignale mit dem „ABI Prism 7700 Sequence Detection System“ (Applied Biosystems) automatisch ausgewertet und dem entsprechenden Genotyp zugeordnet.

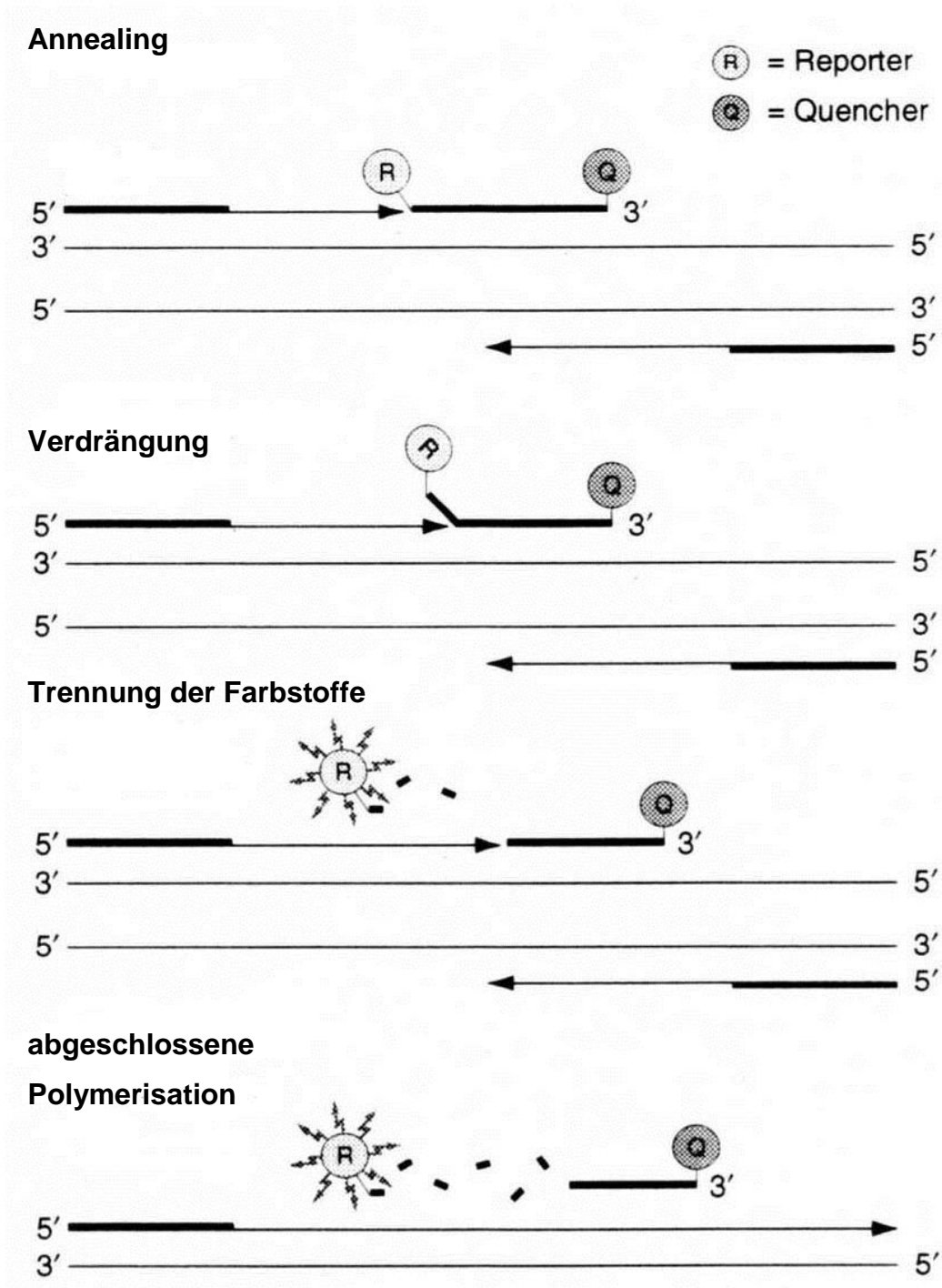


Abbildung 6: TaqMan-Reaktion

(Livak et al. 1999)

Schematische Darstellung eines TaqMan-PCR-Zyklus nach einer Abbildung im Protokoll für den „TaqMan Universal PCR Master Mix“ (Applied Biosystems).

Tabelle 3: Primer und Sonden für die TaqMan-Reaktionen

SNP*	Allele	Primer (5'→3')	TaqMan Sonden** (5'→3')
rs3002142	T>C	ACCAGGCTTGTCAATATCTTTTTAAGAA CAA <u>A</u> ACTCCAACATGATCTAATCGAA	FAM-CCTATAAAAATCTA <u>T</u> ACACTTAAGT VIC-CTATAAAAATCTA <u>C</u> ACACTTAAG
rs904323	G>A	GCTTCCCTGCTCAGAAAGAAAGTAC CGCACCTTAGAGTAGTAGGTCTATTATG	FAM-ACTACCTGGG <u>T</u> TTTGAAT VIC-ACTACCTGG <u>A</u> TTTGAATC
rs17011666	A>G	CAGAAATGCAA <u>A</u> CTTACAAAGGTTTTTC TCCTTCTAGTCACGAAGCCATTG	FAM-TTTCAGGT <u>A</u> AGGTCCAGTC VIC-TTTCAGGT <u>G</u> AGGTCCAGT
rs3002145	C>T	GAAGAGAAGTATTTACCTGATGGTAGAACAA CTGAATGTGTTATTTCTTCTGCCTGA	FAM-ATCTCTTT <u>C</u> AATCTGCTTA VIC-CATCTCTTT <u>C</u> AATCTGCTTA
rs17465637	C>A	CACAGAACCAAACCATATCACTTTTTAA TCAGCAGCAAAGACATGTTATCTTG	FAM-CTGAGAAGTT <u>C</u> TTTTTTGT VIC-CTGAGAAGTT <u>A</u> TTTTTTGTCATA
rs17011681	G>C	CTTTTCTTTACCTTTTAGTCTGGTCAT CAAGAACTTAAAGAGGTAAGGGAAAATAATC	FAM-CACATTTTATT <u>G</u> TAACCAGG VIC-ACCACATTTTATT <u>C</u> TAACCAG

* SNP Identifikationsnummer („National Center for Biotechnology Information SNP database“, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>, Stand: 22.10.2010).

** FAM (6-Carboxyfluoreszein) oder VIC (Farbstoff der Firma Applied Biosystems) wurden als allel-spezifische Fluoreszenzmarker an das 5'-Ende der Sonden angefügt. Die Sequenzen der Sonden zur Analyse von rs3002142, rs904323, rs17011666, rs17465637, und rs17011681 waren komplementär zu dem kodierenden Strang. Die allelspezifischen Nukleotide sind unterstrichen.

Der Ansatz einer TaqMan-Reaktion setzte sich aus dem Q-PCR Mastermix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), einem „Forward“-Primer, einem „Reverse“-Primer und den beiden Sonden mit den Reporterfarbstoffen FAM beziehungsweise VIC zusammen. In Tabelle 4 ist die Zusammensetzung eines Reaktionsmixes für 100 TaqMan-Ansätze angegeben. Von diesem Reaktionsmix wurden je Ansatz 15 µl in eine Vertiefung einer 96-Loch-Platte pipettiert. Im Anschluss daran wurden 2 µl DNA-Lösung oder - bei den beiden Negativkontrollen einer jeden Platte - deionisiertes Wasser dazugegeben. Die Belegung einer 96-Loch-Platte war folgende: 90 Positionen für Patientenproben mit unbekanntem Genotyp, vier Positionen für DNA mit bekanntem Genotyp als Referenzen (je zwei pro Genotyp) und zwei Negativkontrollen.

Jede fünfte DNA-Probe wurde außerhalb dieser Arbeit zur Überprüfung der Handhabung und Datenerhebung auf Korrektheit nochmals genotypisiert. Jene Proben waren randomisiert ausgewählt und zuvor von den originalen Blutproben isoliert worden. Die Ergebnisse der Kontrolluntersuchungen wurden für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Die Genotypisierung erfolgte ohne Kenntnis von klinischen oder laborchemischen Daten der Probanden.

Tabelle 4: Reaktionsmix für 100 TaqMan-Ansätze

Bestandteile	Menge (100 Reaktionen)
H ₂ O (deionisiert)	565 µl
Q-PCR Master Mix	850 µl
„Forward“-Primer	25,5 µl (75 nmol l ⁻¹)
„Reverse“-Primer	25,5 µl (75 nmol l ⁻¹)
FAM-markierte Sonde	17 µl (75 nmol l ⁻¹)
VIC-markierte Sonde	17 µl (75 nmol l ⁻¹)
insgesamt	1.500 µl

2.5 Statistische Analyse

Sämtliche Daten der statistischen Analyse wurden für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Die diskreten Variablen, zum Beispiel die Hypercholesterinämie, wurden als Anzahl (Prozent) ausgewiesen und mit dem Chi-Quadrat-Test zwischen Fall- und Kontrollgruppe verglichen. Das Alter der Probanden wurde als Mittelwert mit der durchschnittlichen Standardabweichung angegeben und anhand des ungepaarten zweiseitigen t-Tests in der Fall- und Kontrollgruppe betrachtet.

Mit dem Cochran-Armitage-Trend-Test wurden Unterschiede in der Genotypverteilung zwischen Fall- und Kontrollgruppe erfasst. Mit dem Chi-Quadrat-Test wurde die Genotypverteilung in der Kontrollgruppe auf eine mögliche Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht untersucht.

Eine durchgeführte multiple logistische Regressionsanalyse gab Aufschluss über die Unabhängigkeit der genetischen Assoziation von konventionellen Risikovariablen (Alter, Geschlecht, arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, Rauchen und Diabetes mellitus). Die Berechnung der adjustierten Odds ratios (ORs) und der 95%-Wald-Konfidenzintervalle (KIs) basierte auf dieser Regression.

Die Haplotypen wurden aus Genotypen-Daten mit der Software „PHASE“ rekonstruiert (Stephens et al., 2001). Die daraus resultierenden Haplotypwahrscheinlichkeiten der einzelnen Studienteilnehmer dienten zur Prüfung der Assoziation mit dem MI sowie zur Berechnung der Haplotypfrequenzen (Zaykin et al., 2002). Die Auswirkung der verschiedenen Haplotypen auf das MI-Risiko wurde sowohl univariat als auch multivariat unter Einbeziehung von Alter und Geschlecht berechnet.

3. Ergebnisse

3.1 Charakteristika der Fall- und Kontrollgruppe

Die Daten zu den Charakteristika der Fallgruppe (n = 3.657) und der Kontrollgruppe (n = 1.211) wurden für diese Arbeit zur Verfügung gestellt (Tabelle 5).

Das Durchschnittsalter der Fallgruppe war höher als das der Kontrollgruppe ($64,0 \pm 12,0$ versus $60,3 \pm 11,9$, $P < 0,0001$). Der Anteil an Frauen war in der Fallgruppe geringer als in der Kontrollgruppe (24,2% versus 49,4%, $P < 0,0001$). Zudem wiesen die Patienten der Fallgruppe zahlreicher eine arterielle Hypertonie (61,4% versus 48,6%, $P < 0,0001$), eine Hypercholesterinämie (56,5% versus 49,7%, $P < 0,0001$) und einen Diabetes mellitus (20,6% versus 5,4%, $P < 0,0001$) auf als die Probanden in der Kontrollgruppe. Desweiteren gab es mehr aktive Raucher in der Fallgruppe als unter den Kontrollpersonen (50,6% versus 15,2%, $P < 0,0001$).

Zusammenfassend lagen für alle untersuchten Charakteristika signifikante Unterschiede zwischen der Fall- und Kontrollgruppe vor (Tabelle 5).

Tabelle 5: Charakteristika der Fall- und Kontrollgruppe

	Fallgruppe (n = 3.657)	Kontrollgruppe (n = 1.211)	P-Wert
Alter (Jahre)	64,0 ± 12,0	60,3 ± 11,9	< 0,0001
Frauen	885 (24,2)	598 (49,4)	< 0,0001
arterielle Hypertonie	2.246 (61,4)	589 (48,6)	< 0,0001
Hypercholesterinämie	2.067 (56,5)	602 (49,7)	< 0,0001
aktive Raucher	1.849 (50,6)	184 (15,2)	< 0,0001
Diabetes mellitus	754 (20,6)	65 (5,4)	< 0,0001

Das Alter der Patienten ist als Mittelwert ± Standardabweichung angeführt. Alle anderen Variablen sind als absolute und (in Klammern) als relative Zahlen angezeigt.

3.2 Sechs SNPs in MIA3 und ihre Assoziation mit dem MI

In dieser Arbeit wurden fünf „tag“-SNPs und ein Replikations-SNP aus der MIA3-Region untersucht. Unter diesen SNPs war der SNP rs17465637, welcher in der Studie von Samani und Kollegen mit dem MI assoziiert war. Der SNP rs17011681 wurde als Replikations-SNP für den SNP rs17465637 verwendet, da diese beiden SNPs relativ nahe beieinander gelegen und assoziiert sind. So konnte die Genauigkeit der Genotypisierung beurteilt werden: Bei korrekter Vorgehensweise waren für diese beiden SNPs aufgrund ihrer Assoziation ähnliche Ergebnisse zu erwarten.

Außerhalb dieser Arbeit wurden zur Kontrolle in Stichproben DNA-Sequenzierungen zu den sechs untersuchten SNPs durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten neben der Eignung des TaqMan-Verfahrens für die Genotypisierung, dass in der Untersuchung keine weiteren Variationen - neben den untersuchten SNPs - in den Sondenbindenden Bereichen vorlagen. Dies senkt die Wahrscheinlichkeit für eine falsche Genotypzuordnung, die bei einem TaqMan-Ansatz mit einer oder mehreren Variationen in der Sondenbindenden Region vorkommen könnte (Teupser et al., 2001).

Abbildung 7 zeigt die Intron-Exon-Struktur von MIA3 auf dem Chromosom 1q41 und die Positionen der sechs hier untersuchten Polymorphismen in dieser Region. In den Abschnitten 3.2.1 bis 3.2.7 wird die Genotypverteilung der sechs untersuchten SNPs aus MIA3 in der Fall- und Kontrollgruppe erläutert.

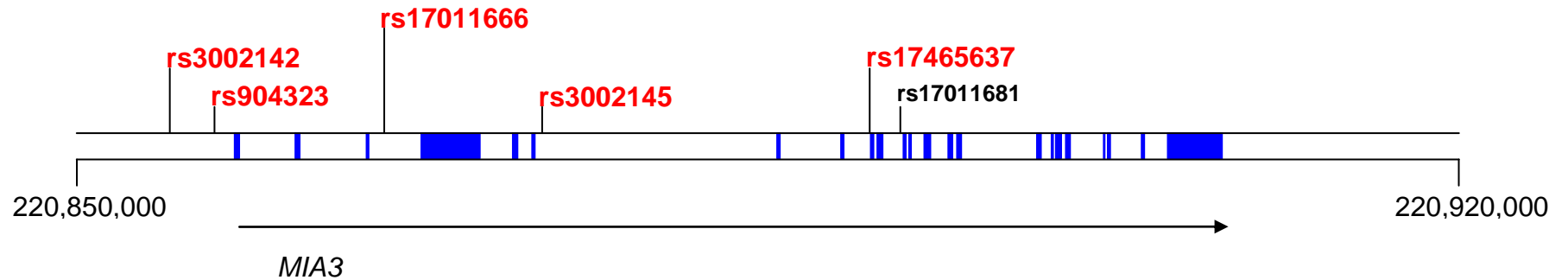


Abbildung 7: Intron-Exon-Struktur der MIA3-Region und Positionen der sechs untersuchten SNPs in und um MIA3 auf dem Chromosom 1q41

Der Graph zeigt die Anordnung der Exons (blaue vertikale Linien und Boxen) sowie die dazwischenliegenden Introns des MIA3-Gens auf dem Chromosom 1 (Abschnitt q41). Die Positionen der sechs untersuchten SNPs in und um MIA3 sind gekennzeichnet. Die sogenannten „tag“-SNPs sind rot dargestellt. Der SNP rs17011681 wurde als Replikations-SNP für den SNP rs17465637 verwendet. Der abgebildete Graph wurde gemäß Daten entworfen, die im Internet von dem International HapMap Consortium zur Verfügung gestellt worden sind (<http://www.hapmap.org>, Stand: 22.10.2010).

3.2.1 Genotypverteilung in der Fall- und Kontrollgruppe

Anhand der Genotypisierungsdaten für die fünf „tag“-SNPs und den Replikations-SNP wurde die Genotypverteilung in der Fall- und Kontrollgruppe bestimmt.

Unter den „tag“-SNPs war in der vorliegenden Stichprobe nur der SNP rs17465637 mit dem MI assoziiert. Das durch das C-Allel dieses SNPs bedingte MI-Risiko lag unter Berücksichtigung der Einflussfaktoren Alter und Geschlecht bei 1,14 (95%-KI 1,02-1,27). Nach Korrekturen für die kardiovaskulären Risikofaktoren Alter, Geschlecht, Bluthochdruck, Hypercholesterinämie, Rauchen und Diabetes mellitus zeigten logistische Regressionsanalysen übereinstimmende Ergebnisse: im Vergleich zu den Nichtträgern des C-Allels lag ein gesteigertes Risiko bei den Trägern von einem (OR 1,17, 95%-KI 1,04-1,32) oder zwei (OR 1,37, 95%-KI 1,08-1,74) C-Allelen vor.

Der SNP rs17011681 war als Replikations-SNP für rs17465637 ebenfalls mit dem MI assoziiert. Für die SNPs rs3002142, rs904323, rs17011666 und rs3002145 konnte keine unterschiedliche Genotypverteilung in der Fall- und Kontrollgruppe festgestellt werden. Sie waren daher in dieser Arbeit nicht mit dem MI assoziiert.

Eine Übersicht der Genotypverteilung der sechs SNPs in der MIA3-Region in der Fall- und Kontrollgruppe zeigt Tabelle 6. Dort sind jeweils die Anzahl an homozygoten Trägern des häufigen beziehungsweise des seltenen Allels und die Anzahl an heterozygoten Trägern angegeben. In der Kontrollgruppe wurde bei keinem SNP eine signifikante Abweichung der Genotypverteilung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht beobachtet (Tabelle 6). In den Abschnitten 3.2.2 bis 3.2.7 werden die Resultate für die sechs untersuchten SNPs beschrieben.

Tabelle 6: Genotypverteilung von sechs SNPs in der MIA3-Region in der Fall- und Kontrollgruppe

SNP	Allele	Fallgruppe (n = 3.657)			Kontrollgruppe (n = 1.211)			P _{HWE} *	P _{Trend}
		Maj	Het	Min	Maj	Het	Min		
rs3002142	T>C	2.884 (78,9)	725 (19,8)	48 (1,3)	952 (78,6)	239 (19,7)	20 (1,7)	0,268	0,693
rs904323	G>A	2.493 (68,2)	1.047 (28,6)	117 (3,2)	799 (66,0)	377 (31,1)	35 (2,9)	0,233	0,293
rs17011666	A>G	2.348 (64,2)	1.169 (32,0)	140 (3,8)	742 (61,3)	417 (34,4)	52 (4,3)	0,492	0,070
rs3002145	C>T	2.726 (74,5)	861 (23,5)	70 (1,9)	895 (73,9)	293 (24,2)	23 (1,9)	0,863	0,701
rs17465637	C>A	2.026 (55,4)	1.385 (37,9)	246 (6,7)	640 (52,8)	469 (38,7)	102 (8,4)	0,224	0,041
rs17011681	G>C	2.020 (55,2)	1.389 (38,0)	248 (6,8)	636 (52,5)	473 (39,1)	102 (8,4)	0,292	0,036

Die Daten sind als Zahlen (Prozentzahlen) der Fälle und Kontrollen dargestellt.

Maj: Frequenz der Patienten, die homozygot für das häufige Allel sind.

Het: Frequenz der heterozygoten Patienten.

Min: Frequenz der Patienten, die homozygot für das seltenere Allel sind.

*Eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE) wurde mit dem Chi-Quadrat-Test getestet.

3.2.2 rs3002142: Genotypverteilung in der Fall- und Kontrollgruppe

Es bestand kein signifikanter Unterschied in der Genotypverteilung für rs3002142 zwischen der Fall- und Kontrollgruppe (Tabelle 7, Abbildung 8). Der SNP rs3002142 war in dieser Arbeit nicht mit dem MI assoziiert.

Tabelle 7: Verteilung der Genotypen des Polymorphismus' rs3002142 in der Fall- und Kontrollgruppe

Genotyp	Fallgruppe	Kontrollgruppe	*P _{HWE}	P _{Trend}
TT	2.884 (78,9%)	952 (78,6%)	0,268	0,693
TC	725 (19,8%)	239 (19,7%)		
CC	48 (1,3%)	20 (1,7%)		

*P_{HWE}: P-Wert für das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE) in der Kontrollgruppe

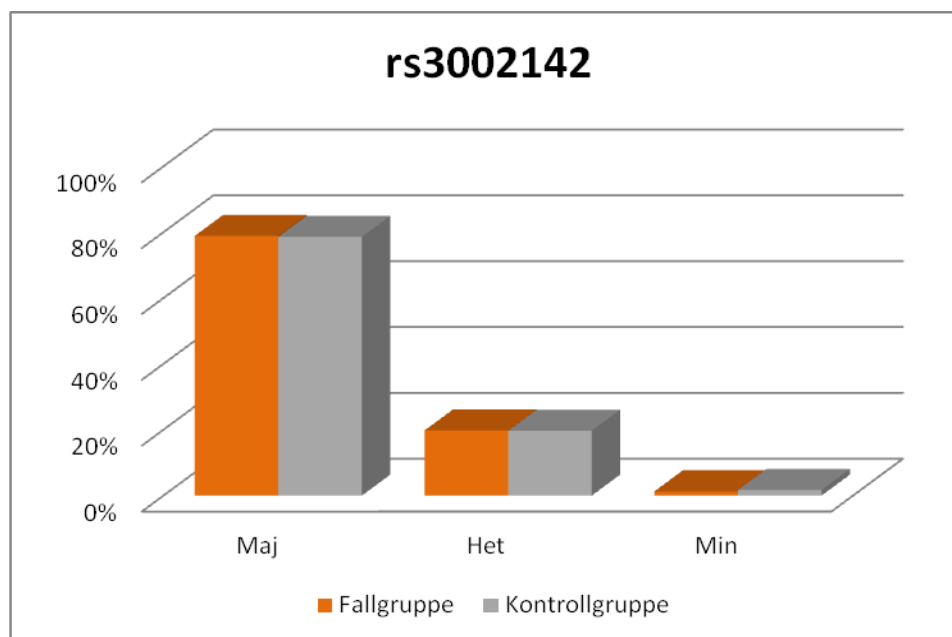


Abbildung 8: Prozentuale Verteilung der rs3002142-Genotypen in der Fall- und Kontrollgruppe

3.2.3 rs904323: Genotypverteilung in der Fall- und Kontrollgruppe

Es bestand kein signifikanter Unterschied in der Genotypverteilung für rs904323 zwischen der Fall- und Kontrollgruppe (Tabelle 8, Abbildung 9). Der SNP rs904323 war in dieser Arbeit nicht mit dem MI assoziiert.

Tabelle 8: Verteilung der Genotypen des Polymorphismus' rs904323 in der Fall- und Kontrollgruppe

Genotyp	Fallgruppe	Kontrollgruppe	*P _{HWE}	P _{Trend}
GG	2.493 (68,2%)	799 (66,0%)	0,233	0,293
GA	1.047 (28,6%)	377 (31,1%)		
AA	117 (3,2%)	35 (2,9%)		

*P_{HWE}: P-Wert für das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE) in der Kontrollgruppe

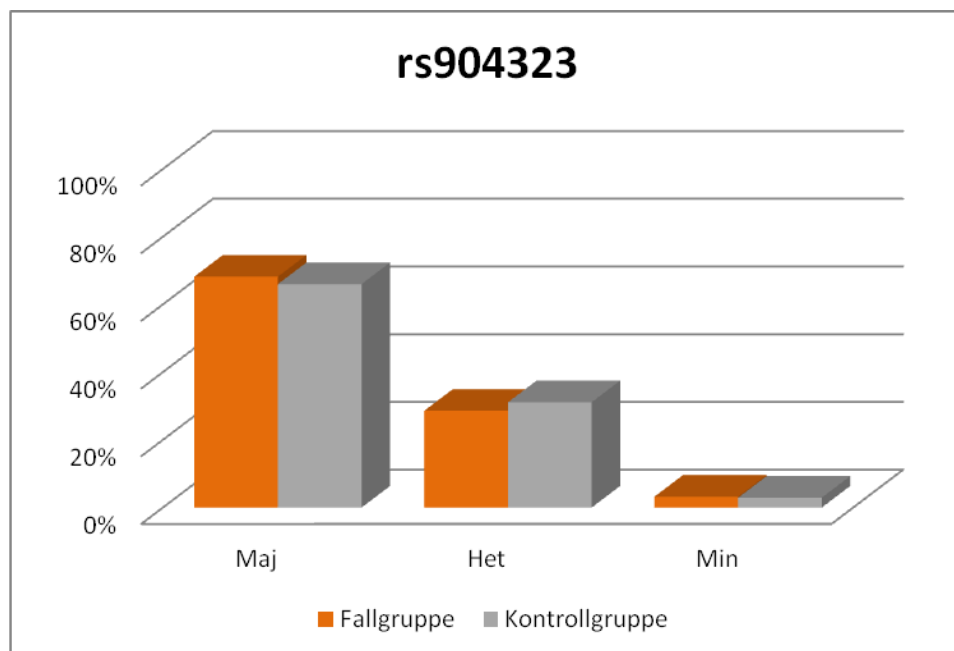


Abbildung 9: Prozentuale Verteilung der rs904323-Genotypen in der Fall- und Kontrollgruppe

3.2.4 rs17011666: Genotypverteilung in der Fall- und Kontrollgruppe

Es bestand kein signifikanter Unterschied in der Genotypverteilung für rs17011666 zwischen der Fall- und Kontrollgruppe (Tabelle 9, Abbildung 10). Der SNP rs17011666 war in dieser Arbeit nicht mit dem MI assoziiert.

Tabelle 9: Verteilung der Genotypen des Polymorphismus' rs17011666 in der Fall- und Kontrollgruppe

Genotyp	Fallgruppe	Kontrollgruppe	*P _{HWE}	P _{Trend}
AA	2.348 (64,2%)	742 (61,3%)	0,492	0,070
AG	1.169 (32,0%)	417 (34,4%)		
GG	140 (3,8%)	52 (4,3%)		

*P_{HWE}: P-Wert für das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE) in der Kontrollgruppe

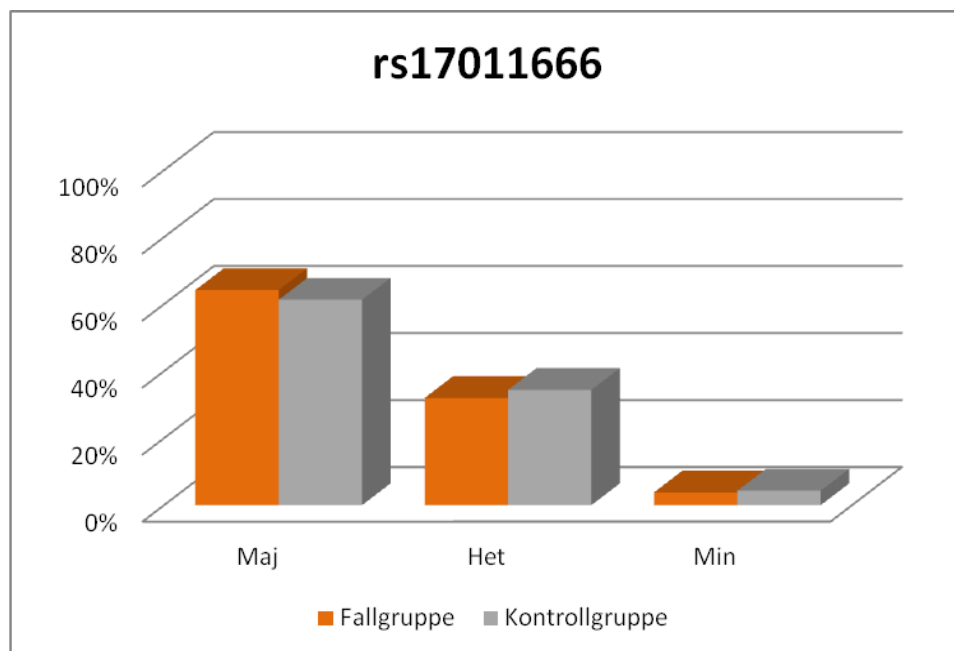


Abbildung 10: Prozentuale Verteilung der rs17011666-Genotypen in der Fall- und Kontrollgruppe

3.2.5 rs3002145: Genotypverteilung in der Fall- und Kontrollgruppe

Es bestand kein signifikanter Unterschied in der Genotypverteilung für rs3002145 zwischen der Fall- und Kontrollgruppe (Tabelle 10, Abbildung 11). Der SNP rs3002145 war in dieser Arbeit nicht mit dem MI assoziiert.

Tabelle 10: Verteilung der Genotypen des Polymorphismus' rs3002145 in der Fall- und Kontrollgruppe

Genotyp	Fallgruppe	Kontrollgruppe	*P _{HWE}	P _{Trend}
CC	2.726 (74,5%)	895 (73,9%)	0,863	0,701
CT	861 (23,5%)	293 (24,2%)		
TT	70 (1,9%)	23 (1,9%)		

*P_{HWE}: P-Wert für das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE) in der Kontrollgruppe

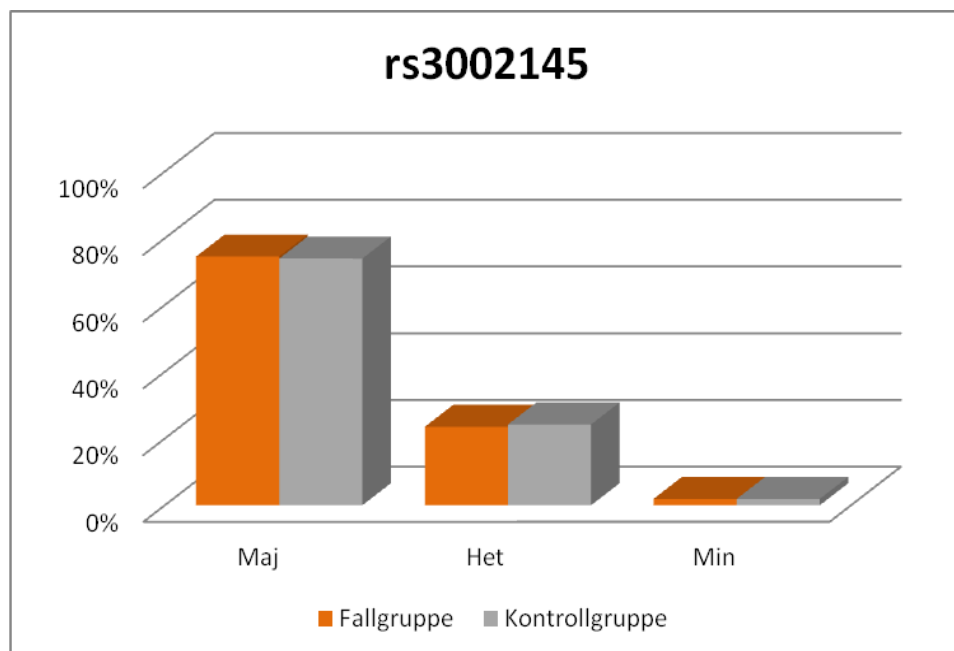


Abbildung 11: Prozentuale Verteilung der rs3002145-Genotypen in der Fall- und Kontrollgruppe

3.2.6 rs17465637: Genotypverteilung in der Fall- und Kontrollgruppe

Es bestand ein signifikanter Unterschied in der Genotypverteilung für rs17465637 zwischen der Fall- und Kontrollgruppe (Tabelle 11, Abbildung 12). Der SNP rs17465637 war in dieser Arbeit mit dem MI assoziiert.

Tabelle 11: Verteilung der Genotypen des Polymorphismus' rs17465637 in der Fall- und Kontrollgruppe

Genotyp	Fallgruppe	Kontrollgruppe	*P _{HWE}	P _{Trend}
CC	2.026 (55,4%)	640 (52,8%)	0,224	0,041
CA	1.385 (37,9%)	469 (38,7%)		
AA	246 (6,7%)	102 (8,4%)		

*P_{HWE}: P-Wert für das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE) in der Kontrollgruppe

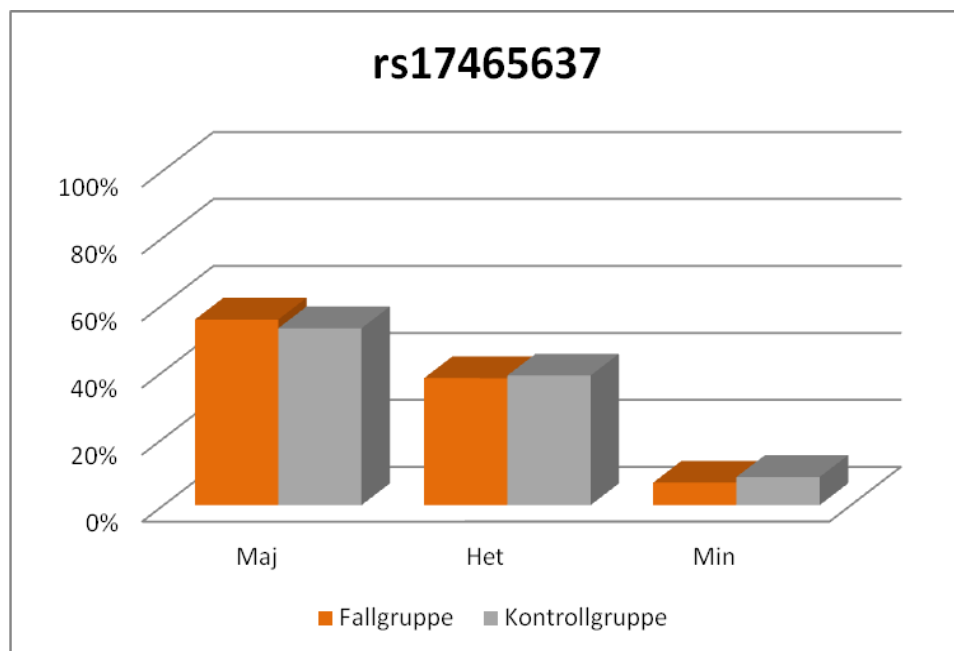


Abbildung 12: Prozentuale Verteilung der rs17465637-Genotypen in der Fall- und Kontrollgruppe

3.2.7 rs17011681: Genotypverteilung in der Fall- und Kontrollgruppe

Es bestand ein signifikanter Unterschied in der Genotypverteilung für rs17011681 zwischen der Fall- und Kontrollgruppe (Tabelle 12, Abbildung 13). Der SNP rs17011681 war in dieser Arbeit mit dem MI assoziiert.

Tabelle 12: Verteilung der Genotypen des Polymorphismus' rs17011681 in der Fall- und Kontrollgruppe

Genotyp	Fallgruppe	Kontrollgruppe	*P _{HWE}	P _{Trend}
GG	2.020 (55,2%)	636 (52,5%)	0,292	0,036
GC	1.389 (38,0%)	473 (39,1%)		
CC	248 (6,8%)	102 (8,4%)		

*P_{HWE}: P-Wert für das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE) in der Kontrollgruppe

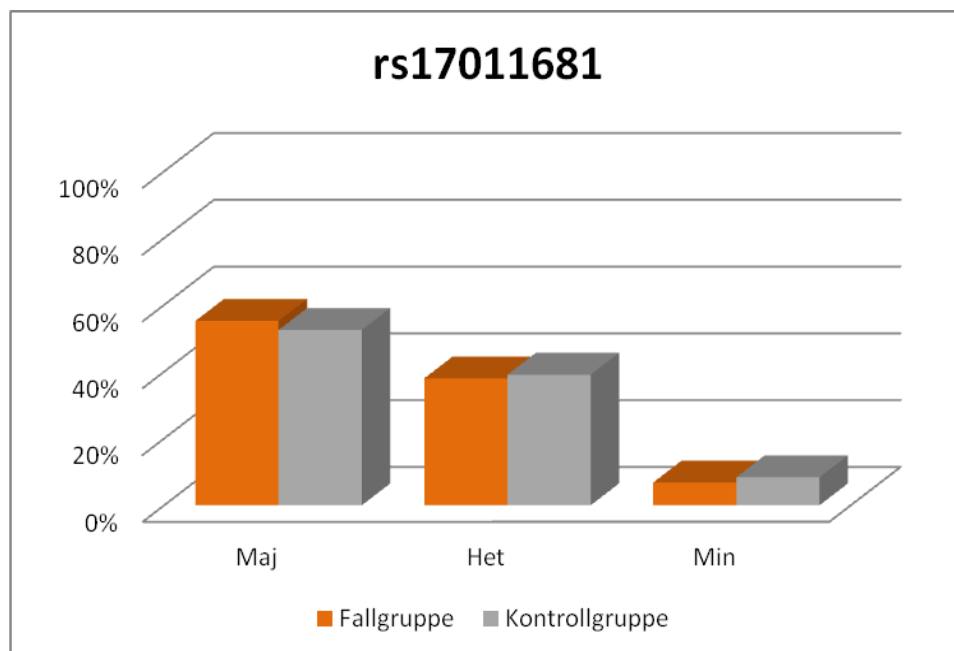


Abbildung 13: Prozentuale Verteilung der rs17011681-Genotypen in der Fall- und Kontrollgruppe

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde innerhalb eines Kollektivs von 3.657 Fällen und 1.211 Kontrollen untersucht, ob die sechs SNPs rs3002142, rs904323, rs17011666, rs3002145, rs17465637 und rs17011681 in der MIA3-Region mit dem MI assoziiert sind. Das Ergebnis zeigt: Die Genotypverteilung von vier dieser Polymorphismen weist zwischen der Fall- und Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied auf. Für den SNP rs17465637 als auch für dessen Replikations-SNP rs17011681 konnte jedoch eine signifikant unterschiedliche Genotypverteilung in diesen beiden Gruppen festgestellt werden. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Samani und Kollegen (Samani et al., 2007) wurde in dieser Arbeit eine Assoziation zwischen dem C-Allel des SNPs rs17465637 in MIA3 und dem MI beobachtet.

Der Zusammenhang zwischen dem Replikations-SNP rs17011681 mit dem MI war ähnlich dem des SNPs rs17465637 mit dieser Erkrankung, wie es aufgrund der engen lokalen Korrelation dieser beiden SNPs zu erwarten war. In einer Untersuchung außerhalb dieser Arbeit konnte eine Allelassoziation zwischen den SNPs rs17011681 und rs17465637 nachgewiesen werden. Dies wurde durch wiederholte Genotypisierung bestätigt und spricht für die Exaktheit der Genotypisierung des SNPs rs17465637 (und des SNPs rs17011681).

Für den SNP rs2133189 wurde bereits von Samani und Kollegen belegt, dass er in perfekter allelischer Assoziation zu dem SNP rs17465637 steht. Weil der SNP rs2133189 mit dem SNP rs17465637 korreliert ist (Samani et al., 2007), wurde er in dieser Arbeit nicht im Besonderen untersucht.

Neben dem SNP rs17465637 wurde für den SNP rs3008621 in der MIA3-Region der Zusammenhang mit der KHK in der Studie von Samani und Kollegen festgestellt (Samani et al., 2007). In einer Untersuchung außerhalb dieser Arbeit, deren Ergebnisse für die folgende Erläuterung zur Verfügung gestellt wurden, konnte jedoch keine Assoziation des SNPs rs3008621 mit dem MI nachgewiesen werden. Diese Aussage kann getroffen werden, obwohl die Genotypisierung für den SNP rs3008621 nicht in der gesamten Studienpopulation durchgeführt wurde. Der SNP rs3002145 steht in perfekter allelischer Assoziation mit dem SNP rs3008621: Außerhalb dieser Arbeit wurden 150 Proben für den SNP rs3008621 per DNA-Sequenzierung bestimmt und festgestellt, dass er mit dem „tag“-SNP rs3002145 zu 100% korreliert. Da der SNP rs3002145 das MI-Risiko nicht nachweislich erhöhte

(Tabelle 13), erscheint ein Zusammenhang zwischen dem SNP rs3008621 und der KHK oder dem MI als unwahrscheinlich.

Die in Abschnitt 4.3 beschriebene Haplotypanalyse beruht auf den Ergebnissen der in dieser Arbeit untersuchten fünf „tag“-SNPs und vier weiterer „tag“-SNPs der MIA3-Region, nämlich rs2088514, rs35822937, rs17163384 und rs1053316. Diese sind in Abschnitt 4.1 beschrieben und wurden für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Tabelle 13 zeigt die Genotypverteilung von zehn Polymorphismen in der MIA3-Region, die - bis auf den SNP rs17011681 - für die Haplotypanalyse herangezogen wurden.

Tabelle 13: Genotypverteilung von zehn SNPs in der MIA3-Region in der Fall- und Kontrollgruppe

SNP	Allele	Fallgruppe (n = 3.657)			Kontrollgruppe (n = 1.211)			P _{HWE} *	P _{Trend}
		Maj	Het	Min	Maj	Het	Min		
rs3002142	T>C	2.884 (78,9)	725 (19,8)	48 (1,3)	952 (78,6)	239 (19,7)	20 (1,7)	0,268	0,693
rs904323	G>A	2.493 (68,2)	1.047 (28,6)	117 (3,2)	799 (66,0)	377 (31,1)	35 (2,9)	0,233	0,293
rs17011666	A>G	2.348 (64,2)	1.169 (32,0)	140 (3,8)	742 (61,3)	417 (34,4)	52 (4,3)	0,492	0,070
rs3002145	C>T	2.726 (74,5)	861 (23,5)	70 (1,9)	895 (73,9)	293 (24,2)	23 (1,9)	0,863	0,701
rs17465637	C>A	2.026 (55,4)	1.385 (37,9)	246 (6,7)	640 (52,8)	469 (38,7)	102 (8,4)	0,224	0,041
rs17011681	G>C	2.020 (55,2)	1.389 (38,0)	248 (6,8)	636 (52,5)	473 (39,1)	102 (8,4)	0,292	0,036
rs2088514	A>G	2.575 (70,4)	993 (27,2)	89 (2,4)	833 (68,8)	341 (28,2)	37 (3,1)	0,770	0,193
rs35822937	A>G	2.480 (67,8)	1.056 (28,9)	121 (3,3)	816 (67,4)	348 (28,7)	47 (3,9)	0,199	0,579
rs17163384	A>C	3.143 (85,9)	491 (13,4)	23 (0,6)	1.025 (84,6)	177 (14,6)	9 (0,7)	0,655	0,255
rs1053316	G>A	2.991 (81,8)	624 (17,1)	42 (1,1)	966 (79,8)	229 (18,9)	16 (1,3)	0,563	0,122

Die Daten sind als Zahlen (Prozentzahlen) der Fälle und Kontrollen dargestellt.

Maj: Frequenz der Patienten, die homozygot für das häufige Allel sind. Het: Frequenz der heterozygoten Patienten. Min: Frequenz der Patienten, die homozygot für das seltenere Allel sind.

*Eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE) wurde mit dem Chi-Quadrat-Test geprüft.

4.1 Genotypverteilung weiterer vier SNPs in der Fall- und Kontrollgruppe

4.1.1 rs2088514: Genotypverteilung in der Fall- und Kontrollgruppe

Es bestand kein signifikanter Unterschied in der Genotypverteilung für rs2088514 zwischen der Fall- und Kontrollgruppe (Tabelle 14, Abbildung 14). Der SNP rs2088514 war in dieser Arbeit nicht mit dem MI assoziiert.

Tabelle 14: Verteilung der Genotypen des Polymorphismus' rs2088514 in der Fall- und Kontrollgruppe

Genotyp	Fallgruppe	Kontrollgruppe	*P _{HWE}	P _{Trend}
AA	2.575 (70,5%)	833 (68,8%)	0,770	0,193
AG	993 (27,2%)	341 (28,2%)		
GG	89 (2,4%)	37 (3,1%)		

*P_{HWE}: P-Wert für das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE) in der Kontrollgruppe

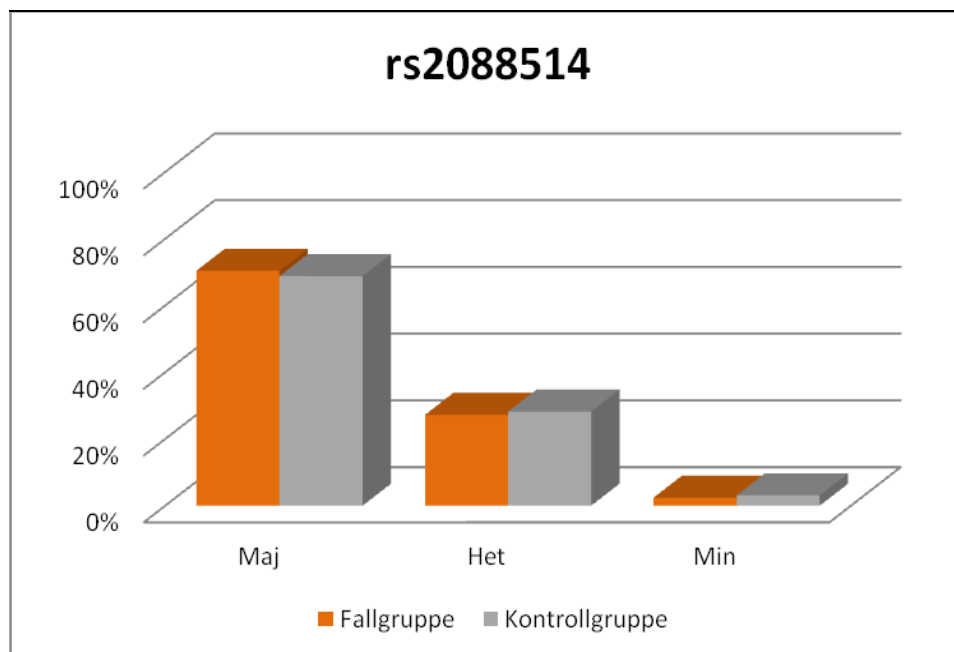


Abbildung 14: Prozentuale Verteilung der rs2088514-Genotypen in der Fall- und Kontrollgruppe

4.1.2 rs35822937: Genotypverteilung in der Fall- und Kontrollgruppe

Es bestand kein signifikanter Unterschied in der Genotypverteilung für rs35822937 zwischen der Fall- und Kontrollgruppe (Tabelle 15, Abbildung 15). Der SNP rs35822937 war in dieser Arbeit nicht mit dem MI assoziiert.

Tabelle 15: Verteilung der Genotypen des Polymorphismus' rs35822937 in der Fall- und Kontrollgruppe

Genotyp	Fallgruppe	Kontrollgruppe	*P _{HWE}	P _{Trend}
AA	2.480 (67,8%)	816 (67,4%)	0,199	0,579
AG	1.056 (28,9%)	348 (28,7%)		
GG	121 (3,3%)	47 (3,9%)		

*P_{HWE}: P-Wert für das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE) in der Kontrollgruppe

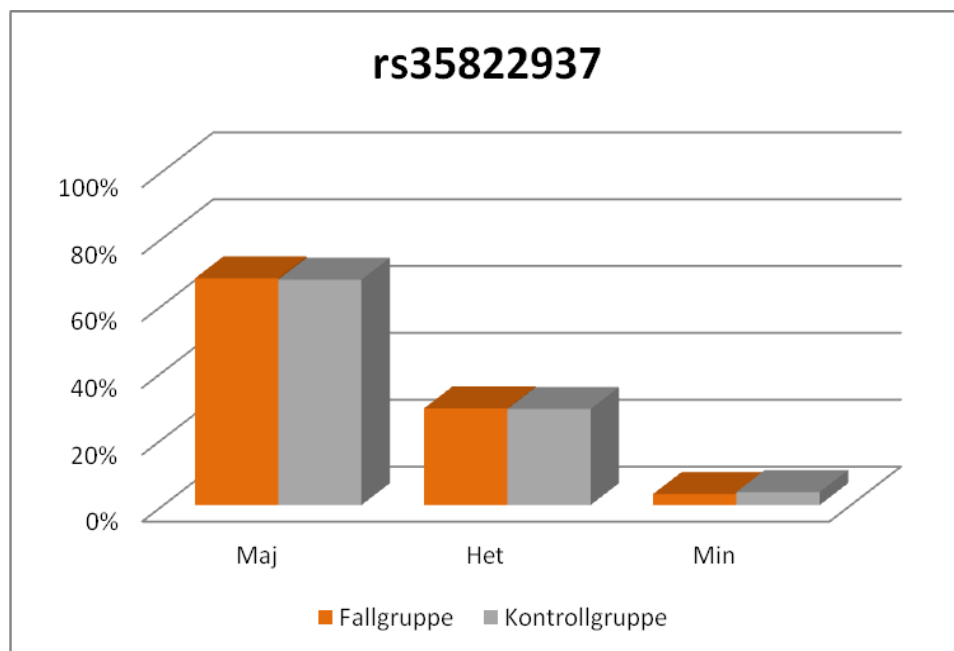


Abbildung 15: Prozentuale Verteilung der rs35822937-Genotypen in der Fall- und Kontrollgruppe

4.1.3 rs17163384: Genotypverteilung in der Fall- und Kontrollgruppe

Es bestand kein signifikanter Unterschied in der Genotypverteilung für rs17163384 zwischen der Fall- und Kontrollgruppe (Tabelle 16, Abbildung 16). Der SNP rs17163384 war in dieser Arbeit nicht mit dem MI assoziiert.

Tabelle 16: Verteilung der Genotypen des Polymorphismus' rs17163384 in der Fall- und Kontrollgruppe

Genotyp	Fallgruppe	Kontrollgruppe	*P _{HWE}	P _{Trend}
AA	3.143 (85,9%)	1.025 (84,6%)	0,655	0,255
AC	491 (13,4%)	177 (14,6%)		
CC	23 (0,6%)	9 (0,7%)		

*P_{HWE}: P-Wert für das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE) in der Kontrollgruppe

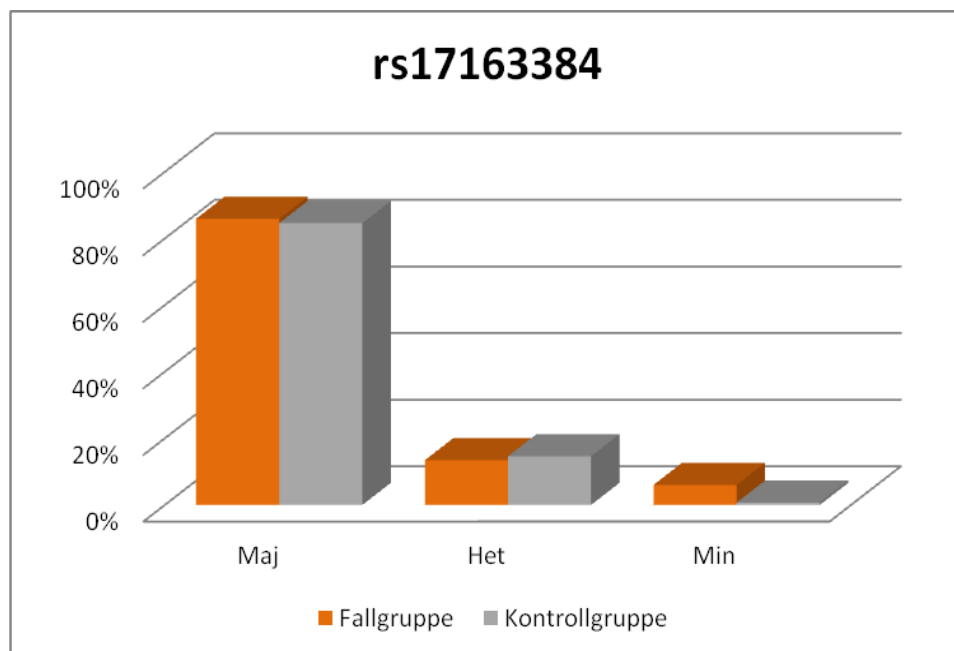


Abbildung 16: Prozentuale Verteilung der rs17163384-Genotypen in der Fall- und Kontrollgruppe

4.1.4 rs1053316: Genotypverteilung in der Fall- und Kontrollgruppe

Es bestand kein signifikanter Unterschied in der Genotypverteilung für rs1053316 zwischen der Fall- und Kontrollgruppe (Tabelle 17, Abbildung 17). Der SNP rs1053316 war in dieser Arbeit nicht mit dem MI assoziiert.

Tabelle 17: Verteilung der Genotypen des Polymorphismus' rs1053316 in der Fall- und Kontrollgruppe

Genotyp	Fallgruppe	Kontrollgruppe	*P _{HWE}	P _{Trend}
GG	2.991 (81,8%)	966 (79,8%)	0,563	0,122
GA	624 (17,1%)	229 (18,9%)		
AA	42 (1,1%)	16 (1,3%)		

*P_{HWE}: P-Wert für das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE) in der Kontrollgruppe

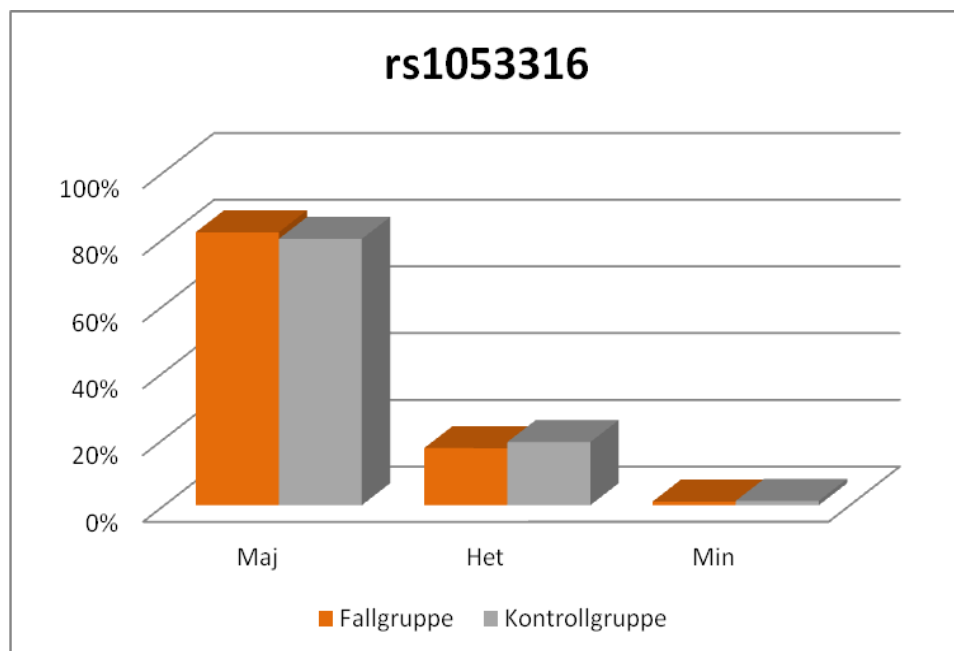


Abbildung 17: Prozentuale Verteilung der rs1053316-Genotypen in der Fall- und Kontrollgruppe

4.2 Untersuchungen zur Assoziation von MIA3-Polymorphismen mit dem MI

Eine Assoziation des SNPs rs17465637 mit dem MI konnte in dieser wie auch in anderen Arbeiten gezeigt werden (Tabelle 18; Samani et al., 2007, Hiura et al., 2008, Myocardial Infarction Genetics Consortium, 2009, Karvanen et al., 2009, Coronary Artery Disease Consortium, 2009). In den meisten Studien an Probanden von europäischem oder asiatischem Ursprung ließ sich ein Zusammenhang zwischen dem C-Allel des SNPs rs17465637 und einem erhöhten MI-Risiko nachweisen (Samani et al., 2007, Hiura et al., 2008, Myocardial Infarction Genetics Consortium, 2009, Karvanen et al., 2009). In der genomweiten Assoziationsstudie von Samani und Kollegen wurde die Assoziation des SNPs rs17465637 mit dem MI für ein gemischtes Kollektiv aus MI-Patienten und Patienten mit erfolgter Revaskularisation einer Koronararterie („Wellcome Trust Case Control Consortium“), für eine Gruppe von MI-Patienten mit KHK in der Familienanamnese („German Myocardial Infarction Family Study I“) und für die Kombination beider Kollektive gezeigt (Tabelle 18, Samani et al., 2007). Diese Ergebnisse wurden in einer Untersuchung einer Kohorte aus Japan bestätigt („Suita Study“, Hiura et al., 2008). Folglich besteht eine Assoziation des SNPs rs17465637 mit dem MI in Populationen von europäischem und asiatischem Ursprung, obwohl deren Genotypverteilungen und Allelfrequenzen deutlich voneinander abweichen: Zum Beispiel betrug die C-Allel-Frequenz in der Kontrollgruppe aus Japan 53,8% (Hiura et al., 2008) und in der Kontrollgruppe der vorliegenden Studienpopulation 72,2% ($P < 0,0001$). In einer genomweiten Assoziationsstudie an Patienten aus Schweden, Finnland, Spanien, Italien und den USA wurden die getesteten Sequenzvarianten stufenweise von circa zweieinhalb Millionen in der ersten Stufe zu 13 in der vierten Stufe reduziert (Myocardial Infarction Genetics Consortium, 2009). Die Assoziation des SNPs rs17465637 mit dem MI war statistisch signifikant in den Stufen eins (sechs Studienpopulationen) und drei (sechs Studienpopulationen) aber nicht in den Stufen zwei (zwei Studienpopulationen) und vier (eine Studienpopulation) (Tabelle 18, Myocardial Infarction Genetics Consortium, 2009). Einen engen Zusammenhang des SNPs rs17465637 mit dem MI ergab eine Metaanalyse von Stufe eins bis vier, die über 12.000 Fälle und 12.000 Kontrollen europäischen (16 Studienpopulationen und eine Untergruppe) beziehungsweise südasiatischen Ursprungs (eine Untergruppe) umfasste (Tabelle 18, Myocardial Infarction Genetics Consortium, 2009). Karvanen und Kollegen belegten in einem Kollektiv von 918 Fällen und 4.695 Kontrollen aus

Nord- und Westeuropa ebenfalls die Assoziation des SNPs rs17465637 mit dem MI (Tabelle 18, Karvanen et al., 2009). Im Gegensatz zu den oben genannten Studienergebnissen wurde für den SNP rs17465637 keine Assoziation mit dem MI in einer Metaanalyse von neun Studien mit über 10.000 Fällen und über 10.000 Kontrollen nordeuropäischen Ursprungs festgestellt (Tabelle 18, Coronary Artery Disease Consortium, 2009). In dieser Studie wurde jedoch die von Samani und Kollegen entdeckte Assoziation des SNPs rs3008621 mit dem MI bestätigt (Coronary Artery Disease Consortium, 2009).

Tabelle 18: Assoziation des C-Allels des SNPs rs17465637 in MIA3 mit der KHK in vorausgehenden und der aktuellen Studie

Studie	Studientyp	Stichprobensatz	Fälle/Kontrollen	OR (95% KI)	P-Wert
Samani et al., 2007	GWAS	WTCCC ^a	1.924/2.936	1,23 (1,12–1,34)	0,000010
	GWAS	GerMIFS I ^b	857/1.631	1,15 (1,01–1,32)	0,038
		kombiniert	2.781/4.567	1,20 (1,12–1,30)	0,0000013
Hiura et al., 2008	Replikation	Suita Study ^c	579/2.433	1,45 (1,15–1,82)	0,002
Myocardial Infarction Genetics Consortium, 2009	GWAS	Stufe 1 ^d	2.967/3.075	1,17 (1,08–1,27)	0,00015
		Stufe 2 ^e	835/915	1,09 (0,90–1,33)	0,38
		Stufe 3 ^f	4.321/4.321	1,11 (1,04–1,19)	0,003
		Stufe 4 ^g	1.503/1.503	1,11 (0,98–1,25)	0,10
		Stufe 1, 2, 3 + 4 ^h	9.626/9.814	1,13 (1,08–1,18)	0,000000015
		Stufe 1, 2, 3 + 4 ⁱ	12.713/12.821	1,14 (1,10–1,19)	0,0000000014

Fortsetzung auf der folgenden Seite

Tabelle 18: Fortsetzung (1)

Studie	Studientyp	Stichprobensatz	Fälle/Kontrollen	OR	(95% KI)	P-Wert
Karvanen et al., 2009	Replikation	MORGAM ^j	918/4.695	1,18	(1,03–1,33)	x
Coronary Artery Disease						
Consortium, 2009	Replikation	9 Studien ^k	10.708/10.878	1,04	(0,99–1,09)	0,089
			(CAD study)			
			X (MI study)	1,01	(0,96–1,07)	0,64
aktuelle Studie	Replikation	München	3.657/1.211	1,14	(1,02–1,27)	0,017

GWAS: „genome-wide association study“

CAD: „coronary artery disease“

X: Daten nicht verfügbar

Fortsetzung auf der folgenden Seite

Tabelle 18: Fortsetzung (2)

- a „Wellcome Trust Case Control Consortium“: Fälle: europäische Kaukasier mit MI oder koronarer Revaskularisierung vor dem 67. Lebensjahr (Bypass-Operation oder perkutane transluminale koronare Angioplastik); Kontrollen: europäische Kaukasier der „British 1958 Birth Cohort“ und gesunde Blutspender.
- b „German Myocardial Infarction Family Study I“; Fälle: Kaukasier deutschen Ursprungs mit MI vor dem 60. Lebensjahr und einem erstgradig Verwandten mit MI oder perkutaner transluminaler koronarer Angioplastik beziehungsweise Bypass-Operation.
- c „Suita Study“: Fälle: randomisiert ausgewählte Patienten mit MI; Kontrollen: Patienten ohne KHK, Fälle und Kontrollen stammen aus derselben Region in Japan.
- d Stufe 1 bestand aus Fällen mit frühzeitig eingetretenem MI und Kontrollen aus sechs Studien an europäischen Probanden: „Italian Atherosclerosis Thrombosis and Vascular Biology (IATVB)“; „Heart Attack Risk in Puget Sound (HARPS)“; „Registre Gironi del COR (Gerona Heart Registry or REGICOR)“; „Massachusetts General Hospital Premature Coronary Artery Disease (MGHPCAD)“; „FINRISK; Malmo Diet and Cancer Study (MDC)“.
- e Stufe 2 bestand aus Fällen mit frühzeitig eingetretenem MI und Kontrollen aus vier Studien an europäischen Probanden: „WTCCC MI Study“; „GerMIFS I“; „PennCATH“; „MedSTAR“. Teilnehmer der Studie von Samani und Kollegen - WTCCC MI [WTCCC auf Fälle mit MI begrenzt; Samani und Kollegen (Samani et al., 2007) definierten MI-Fälle großzügiger] und GerMIFS I - wurden aus dieser Analyse ausgeschlossen.
- f Stufe 3 bestand aus MI-Fällen und Kontrollen aus sechs Studien. Alle Teilnehmer waren europäischen Ursprungs ausschließlich einer südasiatischen Gruppe in der Studie „INTERHEART“. Die sechs Studien waren: „Acute Myocardial Infarction (AMI) Gene Study/Dortmund Health Study“; „Verona Heart Study“; „Mid-America Heart Institute“; „Irish Family Study“; „GerMIFS II“; „INTERHEART“.
- g Stufe 4 bestand aus Fällen mit frühzeitig eingetretenem MI und Kontrollen ohne Koronarereignis aus Island.

Fortsetzung auf der folgenden Seite

Tabelle 18: Fortsetzung (3)

- h Stufen 1, 2, 3 und 4 ausschliesslich der Studie von Samani und Kollegen (WTCCC MI und GerMIFS I).
- i Stufen 1, 2, 3 und 4 einschliesslich der Studie von Samani und Kollegen (WTCCC MI und GerMIFS I).
- j Das MORGAM-Projekt („MONICA, Risk, Genetics, Archiving, and Monograph“) umfasste repräsentative Kohorten aus definierten Regionen Europas. Die Studie kombinierte fünf Stichproben aus Finnland („ATBC“, „FINRISK“), Schweden („northern Sweden“), Grossbritannien („PRIME/Belfast“), und Frankreich („PRIME/France“) und beschäftigte sich unter anderem mit MI-Befunden in einer Fall-Kontroll-Studie.
- k Die Untersuchung umfasste neun Studien aus Europa mit belegten KHK-Fällen und entsprechenden Kontrollen: „Academic Medical Center Amsterdam Premature Atherosclerosis Study (AMC-PAS)“; „Etude Cas-Te'moins sur l'infarctus du Myocarde Study (ECTIM)“; „European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Study (EPIC-Norfolk)“; „GerMIFS“ [ausschließlich Fälle, die sich nicht mit der Studie GWAS (Samani et al., 2007) deckten]; „Cooperative Health Research in the Region of Augsburg Study (KORA/GOC)“; „Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study (LURIC)“; „MORGAM Study“; „Population-based northern German cross-sectional study (PopGen)“; „UKMI Study“. Fast alle Teilnehmer waren nordeuropäischen Ursprungs.

Die vorliegende Arbeit zeigte eine Effektgröße von 1,14 für das Verhältnis des C-Allels des SNP rs17465637 zu dem MI-Risiko - ähnlich beziehungsweise identisch zu Effektgrößen, die in vorhergehenden Studien beobachtet wurden: 1,15 in der „German Myocardial Infarction Family Study I“ (Samani et al., 2007), 1,13 in einer Metaanalyse mit vier Stufen ausschließlich der Studie von Samani und Kollegen (Myocardial Infarction Genetics Consortium, 2009) und 1,14 in der Metaanalyse in vier Stufen einschließlich dieser Studie (Tabelle 18, Myocardial Infarction Genetics Consortium, 2009). Die Übereinstimmung zwischen den aktuellen und publizierten Effektgrößen unterstreicht die Eignung des hier herangezogenen Kollektivs und insbesondere der Kontrollgruppe, die keine Gruppe gesunder Kontrollen repräsentierte, da bei diesen Individuen eine Koronarangiographie indiziert war.

Neben dem SNP rs17011681, der als Replikations-SNP für den SNP rs17465637 diente, wurde für einen weiteren SNP - rs2133189 - eine perfekte allelische Assoziation mit dem SNP rs17465637 und dem MI nachgewiesen (Samani et al., 2007). Folglich stellen die MI-assoziierten SNPs rs2133189, rs17465637 und rs17011681 zusammen eine Kopplungsgruppe dar, welche sich über 9.000 Basenpaare erstreckt - einschließlich dem Intron sechs bis zum Intron zehn der MIA3-Region (Abbildung 5). Wahrscheinlich steht diese MIA3-Region eher als andere Abschnitte des Gens in Beziehung mit der KHK und dem MI.

4.3 Haplotypen des MIA3-Locus

Die Ergebnisse der Haplotypanalyse wurden für die nachfolgende Erläuterung zur Verfügung gestellt. Die neun häufigsten Haplotypen (Frequenz > 1%) wurden aus den Genotypen mit Hilfe der Software „PHASE“ rekonstruiert (Stephens et al., 2001). Tabelle 19 zeigt die identifizierten Allelkonstellationen der Haplotypen, ihre Frequenzen in der Fall- und Kontrollgruppe, nicht adjustierte und adjustierte P-Werte und ORs mit den jeweiligen 95%-KIs.

Ein Trend-Regressions-Test zeigte keine signifikante Gesamtassoziation der Haplotypen mit dem MI, deutete aber einen Trend dahingehend an (P-Wert: 0,085). Der in der Studienpopulation am häufigsten vertretene TGACCAAAG-Haplotyp (48%) und der relativ seltene CGACCAAAG-Haplotyp (2%) sind signifikant häufiger in der Fall- als in der Kontrollgruppe vertreten (Tabelle 19, Abbildungen 18 und 19). Keiner der anderen sieben Haplotypen zeigte eine Assoziation mit dem MI (Tabelle 19).

Die Auswirkung des TGACCAAAG-Haplotyps auf das MI-Risiko erwies sich als gering (zehn Prozent Steigerung des MI-Risikos im Vergleich zu anderen Haplotypen) und die statistische Signifikanz dafür lag im Grenzbereich (adjustierter P-Wert 0,046). Aufgrund der niedrigen Frequenz des CGACCAAAG-Haplotyps ist die Einschätzung seiner Auswirkung auf das MI-Risiko mit einer erheblichen Unsicherheit behaftet.

Der Effekt des TGACCAAAG- und CGACCAAAG-Haplotyps war nicht mehr statistisch signifikant, nachdem Korrekturen für die Anzahl an getesteten SNPs und Haplotypen vorgenommen worden waren. Zur Klärung der Frage einer Assoziation von MIA3-Haplotypen mit dem MI sind deshalb weitere Studien erforderlich.

Tabelle 19: Assoziation zwischen den neun häufigsten Haplotypen der MIA3-Region und dem MI

Haplotyp*	Frequenz		P ₁	P ₂	OR	(95% KI)
	Fälle	Kontrollen				
Hap1 T G A C C A A A G	0,490	0,469	0,072	0,046	1,102	(1,002–1,212)
Hap2 T G A C C A G A G	0,171	0,173	0,820	0,922	0,994	(0,877–1,126)
Hap3 T A G T A G A A G	0,108	0,111	0,753	0,535	0,953	(0,819–1,109)
Hap4 C G A C A A A C A	0,061	0,066	0,385	0,283	0,900	(0,743–1,091)
Hap5 T A A C C A A A G	0,034	0,036	0,655	0,410	0,894	(0,684–1,168)
Hap6 T G G C A G A A G	0,031	0,039	0,054	0,045	0,766	(0,591–0,994)
Hap7 C G G C A A A A A	0,022	0,025	0,372	0,379	0,871	(0,640–1,185)
Hap8 C G A C C A A A G	0,022	0,016	0,054	0,019	1,574	(1,077–2,298)
Hap9 T A G T C A A A G	0,013	0,014	0,794	0,876	0,967	(0,637–1,468)

P₁: P-Wert nicht adjustiert. P₂: P-Wert adjustiert für Alter und Geschlecht.

Die ORs sind für Alter und Geschlecht adjustiert und verdeutlichen das jeweilige Vorkommen der einzelnen Haplotypen im diploiden Organismus. Die Ergebnisse zu den Haplotypfrequenzen und den ORs sowie die Ergebnisse der Assoziationstests stützen sich auf die individuellen Haplotypwahrscheinlichkeiten, die mittels der Software „PHASE“ berechnet wurden (Stephens et al., 2001).

* Die Anordnung der Allele in den Haplotypen stimmt mit den entsprechenden chromosomalen Positionen der SNPs überein (von links nach rechts): rs3002142, rs904323, rs17011666, rs3002145, rs17465637, rs2088514, rs35822937, rs17163384, rs1053316.

Die Basensequenzen der Haplotypen liegen auf dem kodierenden Strang der MIA3-DNA.

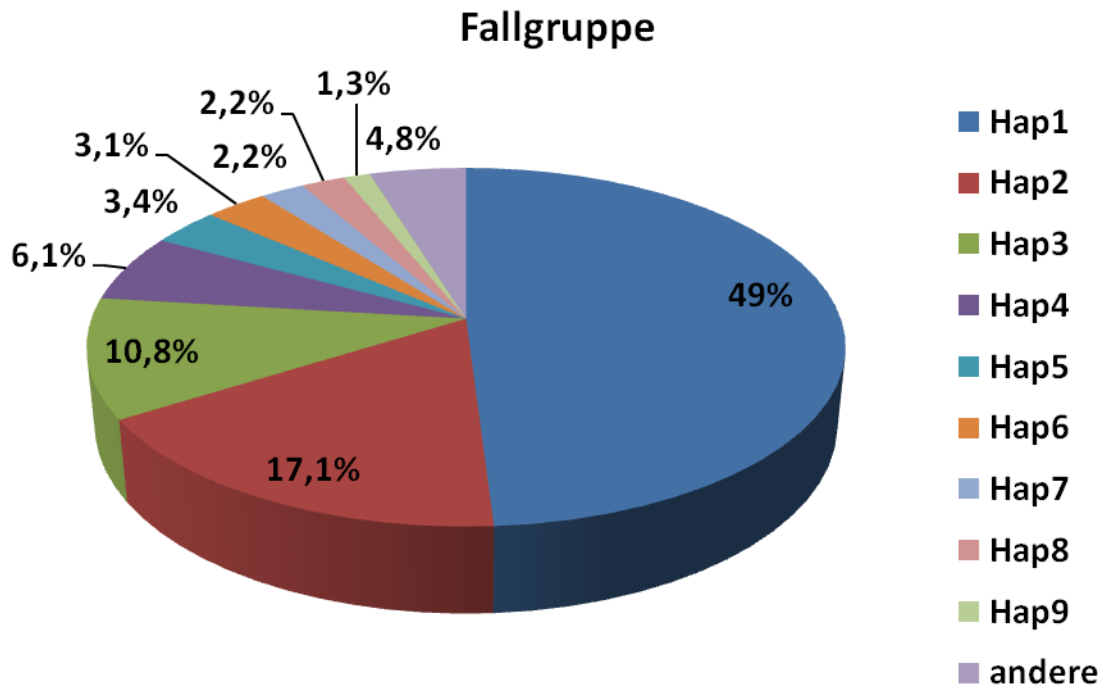


Abbildung 18: Frequenzen der neun häufigsten Haplotypen in der Fallgruppe

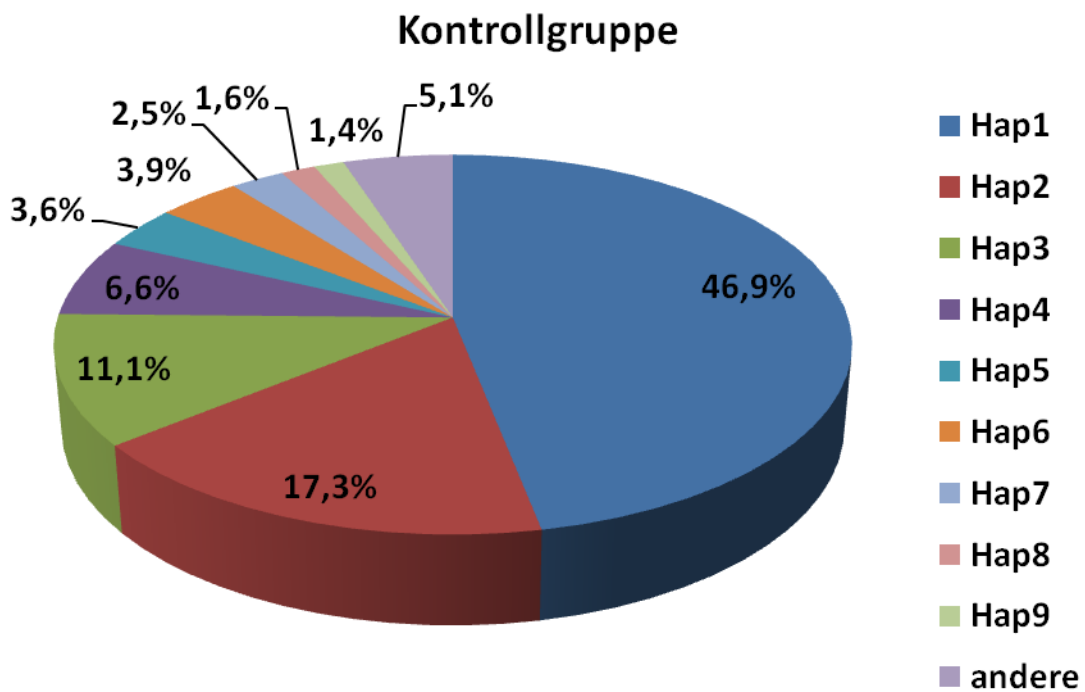


Abbildung 19: Frequenzen der neun häufigsten Haplotypen in der Kontrollgruppe

4.4 Einschränkung der Studie

Nahezu 30% der Patienten, welche ein akutes Koronareignis entwickeln, sterben vor der Ankunft im Krankenhaus (Topol et al., 1998). Deshalb ist anzunehmen, dass eine beachtliche Anzahl an studienrelevanten Patienten mit akutem MI nicht in der Studie erfasst worden ist. Somit stellt die Unterrepräsentation von potentiellen risikoreichen Allelen oder Genotypen eine Selektionsbias dar, welche das Ergebnis bei der Bewertung der Assoziation genetischer Faktoren mit dem MI beeinflussen kann.

5. Zusammenfassung

In genomweiten Assoziationsstudien wurden Kandidatengene identifiziert, die bei der Blutdruckregulation, im Lipidmetabolismus, bei der Endothelfunktion, bei der Thrombusbildung, in der Gerinnungskaskade oder in der interventionellen Kardiologie eine Rolle spielen (Helgadottir et al., 2007, McPherson et al., 2007, Samani et al., 2007, Erdmann et al., 2009). Samani und Kollegen fanden Genvariationen, die bedeutsam für die Entstehung der KHK scheinen (Samani et al., 2007) - unter anderem den SNP rs17465637 im MIA3-Gen auf dem Chromosom 1q41. Das MIA3-Gen war bis dahin als Tumorsuppressorgen in der Pathogenese von malignen Erkrankungen bekannt (Arndt et al., 2006, 2007), jedoch noch nicht in einen Zusammenhang mit der KHK und dem MI gestellt worden.

In dieser Arbeit wurden mehrere Polymorphismen der MIA3-Region auf ihre Assoziation mit dem MI untersucht. Die Studienpopulation bestand aus 3.657 Patienten mit MI und 1.211 Kontrollpersonen ohne MI. Zur Genotypisierung wurde die TaqMan-Technik verwendet. Der SNP rs17465637 und sein Replikations-SNP rs17011681 waren mit dem MI assoziiert, nicht jedoch acht weitere SNPs, die zusammen mit rs17465637 als "tag"-SNPs in einer Haplotypanalyse verwendet wurden. Die Genotypisierung von vier der „tag“-SNPs sowie die Haplotypanalyse wurde außerhalb dieser Arbeit durchgeführt. Die hier gezeigte Assoziation von rs17465637 mit dem MI stimmt mit publizierten Daten zur KHK und dem MI gut überein (Samani et al., 2007, Hiura et al., 2008, Myocardial Infarction Genetics Consortium, 2009, Karvanen et al., 2009, Coronary Artery Disease Consortium, 2009).

Um die Funktion der MI-assoziierten Kandidatengene in der Pathogenese der KHK besser verstehen zu können, bedarf es bioinformatisch unterstützter Metaanalysen genomweiter Assoziationsstudien, epigenetischer Analysen und experimenteller Verlaufsstudien (Glazer et al., 2011, Wang et al., 2011). Dabei könnten neu entwickelte technische Verfahren wie beispielsweise die Exom-Sequenzierung angewandt werden (Zeller et al., 2011).

6. Literaturverzeichnis

1. Arndt, S., Bosserhoff, A. K.
TANGO is a tumor suppressor of malignant melanoma.
Int. J. Cancer. 119 (2006) 2812-2820

2. Arndt, S., Bosserhoff, A. K.
Reduced expression of TANGO in colon and hepatocellular carcinomas.
Oncol. Rep. 18 (2007) 885-891

3. Arndt, S., Melle, C., Mondal, K., Klein, G., von Eggeling, F., Bosserhoff, A. K.
Interactions of TANGO and leukocyte integrin CD11c/CD18 regulate the migration of human monocytes.
J. Leukoc. Biol. 82 (2007) 1466-1472

4. Bard, F., Casano, L., Mallabiabarrena, A., Wallace, E., Saito, K., Kitayama, H., Guizzunti, G., Hu, Y., Wendler, F., DasGupta, R., Perrimon, N., Malhotra, V.
Functional genomics reveals genes involved in protein secretion and Golgi organization.
Nature 439 (2006) 604–607

5. Böcker, W., Denk, H., Heitz, P. U., Moch, H.
Kardiovaskuläres System.
In: „Pathologie“
Urban & Fischer Verlag, München, 2008, 4. Auflage, 498, 473, 499, 500

6. Bosserhoff, A. K., Moser, M., Buettner, R.
Characterization and expression pattern of the novel MIA homolog TANGO.
Gene Expr. Patterns. 4 (2004) 473-479
7. Chalmers, J., MacMahon, S., Mancia, G., Whitworth, J., Beilin, L., Hansson, L., Neal, B., Rodgers, A., Ni Mhurchu, C., Clark, T.
1999 World Health Organization-International Society of Hypertension Guidelines for the management of hypertension.
Guidelines sub-committee of the World Health Organization.
Clin. Exp. Hypertens. 21 (1999) 1009-1060
8. Coronary Artery Disease Consortium
Large scale association analysis of novel genetic loci for coronary artery disease.
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 29 (2009) 774-780
9. Dietel, M., Suttorp, N., Zeitz, M.
Kardiovaskuläre Erkrankungen - Gefäßkrankheiten.
In: „Harrisons Innere Medizin“
ABW Wissenschaftsverlag GmbH, Berlin, 2009, 17. Auflage, Band 1, 1867, 1887, 1888
10. Erdmann, J., Schunkert, H.
Genomweite Assoziationsstudien zu koronarer Herzkrankheit und Herzinfarkt.
Der Kardiologe 1 (2007) 187-189
11. Gerok, W., Huber, C., Meinertz, T., Zeidler, H.
Krankheiten des Herzens und der Gefäße.
In: „Die Innere Medizin“
Schattauer Verlag, Stuttgart, 2007, 11. Auflage, 142, 141, 138
12. Glazer, N. L.
Moving beyond genome-wide association studies.
Circ. Cardiovasc. Genet. 4 (2011) 91-93

13. Helgadóttir, A., Thorleifsson, G., Manolescu, A., Gretarsdóttir, S., Blondal, T., Jonasdóttir, A., Jonasdóttir, A., Sigurdsson, A., Baker, A., Palsson, A., Masson, G., Gudbjartsson, D. F., Magnusson, K. P., Andersen, K., Levey, A. I., Backman, V. M., Matthiasdóttir, S., Jonsdóttir, T., Palsson, S., Einarsdóttir, H., Gunnarsdóttir, S., Gylfason, A., Vaccarino, V., Hooper, W. C., Reilly, M. P., Granger, C. B., Austin, H., Rader, D. J., Shah, S. H., Quyyumi, A. A., Gulcher, J. R., Thorgeirsson, G., Thorsteinsdóttir, U., Kong, A., Stefansson, K.
A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction.
Science 316 (2007) 1491-1493
14. Herold, G.
Koronare Herzkrankheit.
In: „Innere Medizin“
Gerd Herold und Mitarbeiter, Köln, 2010, 226-228, 239, 249
15. Hiura, Y., Fukushima, Y., Yuno, M., Sawamura, H., Kokubo, Y., Okamura, T., Tomoike, H., Goto, Y., Nonogi, H., Takahashi, R., Iwai, N.
Validation of the association of genetic variants on chromosome 9p21 and 1q41 with myocardial infarction in a Japanese population.
Circ. J. 72 (2008) 1213-1217
16. Imhof, B. A., Aurrand-Lions, M.
Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes.
Nat. Rev. Immunol. 4 (2004) 432-444
17. Karp, G.
Die chemischen Grundlagen des Lebens.
In: „Molekulare Zellbiologie“
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2005, 4. Auflage, 79

18. Karvanen, J., Silander, K., Kee, F., Tiret, L., Salomaa, V., Kuulasmaa, K., Wiklund, P.-G., Virtamo, J., Saarela, O., Perret, C., Perola, M., Peltonen, L., Cambien, F., Erdmann, J., Samani, N., Schunkert, H., Evans, A., for the MORGAM-project.
The impact of newly identified loci on coronary heart disease, stroke and total mortality in the MORGAM prospective cohorts.
Genetic Epidemiol. 33 (2009) 237-246
19. Knippers, R.
Genomik.
In: „Molekulare Genetik“
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2006, 9. Auflage, 510
20. Kreuzer, J., Tiefenbacher, C.
Risikofaktoren.
In: „Atherosklerose“
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2003, 1. Auflage, 6-16
21. Kutyavin, I. V., Afonina, I. A., Mills, A., Gorn, V. V., Lukhtanov, E. A., Belousov, E.S., Singer, M. J., Walburger, D. K., Lokhov, S. G., Gall, A. A., Dempcy, R., Reed, M. W., Meyer, R. B., Hedgpeth, J.
3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures.
Nucl. Acids. Res. 28 (2000) 655-661
22. Livak, K. J.
Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay.
Genet. Anal. 14 (1999) 143-149
23. Marenberg, M. E., Risch, N., Berkman, L. F.
Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins.
N. Engl. J. Med. 330 (1994) 1041-1046

24. Mc Pherson, R., Pertsemlidis, A., Kavaslar, N., Stewart, A., Roberts, R., Cox, D. R., Hinds, D. A., Pennacchio, L. A., Tybjaerg-Hansen, A., Folsom, A. R., Boerwinkle, E., Hobbs, H. H., Cohen, J. C.
A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease.
Science 316 (2007) 1488-1491

25. Myocardial Infarction Genetics Consortium
Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants.
Nat. Genet. 41 (2009) 334-341

26. Quaschnig, T., Lüscher, T.F.
Mechanismen für Entstehung von Hochdruckfolgeschäden.
In: „Arterielle Hypertonie“
Herausgeber: Rosenthal, J., Kolloch, R.
Springer Verlag, Heidelberg, 2004, 4. Auflage, 511-512

27. Riede, U. N., Drexler, H., Ihling, C., Kaiserling, E., Müntefering, H.
Kardiovaskuläres System.
In: „Allgemeine und spezielle Pathologie“
Herausgeber: Riede, U. N., Werner, M., Schäfer, H. E.
Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart, 2004, 5. Auflage, 423-427

28. Riede, U. N., Freudenberg, N.
Kreislauf: Leitungssystem.
In: „Basiswissen Allgemeine und Spezielle Pathologie“
Herausgeber: Riede, U. N., Werner, M., Freudenberg N.
Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2009, 1. Auflage, 203

29. Samani, N. J., Erdmann, J., Hall, A. S., Hengstenberg, C., Mangino, M., Mayer, B., Dixon, R. J., Meitinger, T., Braund, P., Wichmann, H. E., Barrett, J. H., König, I. R., Stevens, S. E., Szymczak, S., Tregouet, D. A., Iles, M. M., Pahlke, F., Pollard, H., Lieb, W., Cambien, F., Fischer, M., Ouwehand, W., Blankenberg, S., Balmforth, A. J., Baessler, A., Ball, S. G., Strom, T. M., Brænne, I., Gieger, C., Deloukas, P., Tobin, M. D., Ziegler, A., Thompson, J. R., Schunkert, H. for the WTCCC and the Cardiogenics Consortium
Genomewide association analysis of coronary artery disease.
N. Engl. J. Med. 357 (2007) 443-453
30. Saito, K., Chen, M., Bard, F., Chen, S., Zhou, H., Woodley, D., Polischuk, R., Schekman, R., Malhotra, V.
TANGO1 facilitates cargo loading at endoplasmic reticulum exit sites.
Cell. 136 (2009) 891-902
31. Schunkert, H., Hense, H. W.
Molekulare Genetik kardiovaskulärer Erkrankungen.
Deutsche Medizinische Wochenschrift 120 (1995) 533-539
32. Stary, H. C., Chandler, A. B., Dinsmore, R. E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., Rosenfeld, M. E., Schwartz, C. J., Wagner, W. D., Wissler, R. W.
A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis.
Circulation 92 (1995) 1355-1374
33. Statistisches Bundesamt Deutschland
Todesursachen in Deutschland.
In: „Gesundheit“
Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, 2010, Fachserie 12, Reihe 4, 11
https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen2120400097004.pdf?__blob=publicationFile
Stand: 18.10.2010

34. Steffel, J., Lüscher, T. F.
Atherosklerose und Folgeerkrankungen.
In: „Herz-Kreislauf“
Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2011, 1. Auflage, 47
35. Stephens, M., Smith, N. J., Donnelly, P.
A new statistical method for haplotype reconstruction from population data.
Am. J. Hum. Genet. 68 (2001) 978-989
36. Stoll, R., Renner, C., Zweckstetter, M., Bruggert, M., Ambrosius, D., Palme, S.,
Engh, R.A., Golob, M., Breibach, I., Buettner, R., Voelter, W., Holak, T.A.,
Bossert, A.K.
The extracellular human melanoma inhibitory activity (MIA) protein adopts an
SH3 domain-like fold.
Embo. J. 20 (2001) 340-349
37. Strachan, T., Read, A. P.
„Human Molecular Genetics“
Garland Science, New York, 2005, 3. Auflage, 316
38. Teupser, D., Rupprecht, W., Lohse, P., Thiery, J.
Fluorescence-based detection of the CETP TaqIB polymorphism: false
positives with the TaqMan-based exonuclease assay attributable to a
previously unknown gene variant.
Clin. Chem. 47 (2001) 852-857
39. The International HapMap Consortium
A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs.
Nature 449 (2007) 851-861
40. Topol, E. J., Van de Werf, F. J.
Acute myocardial infarction. Early diagnosis and management.
Textbook of Cardiovascular medicine.
Lippincott-Raven, Philadelphia, 1998, 395-435

41. Walter, D.H., Zeiher, A.M.
Genetische Risikofaktoren für den Myokardinfarkt.
Herz 25 (2000) 7-14
42. Wang, X., Bram P. Prins, B. P., Söber, S., Laan, M., Snieder, H.
Beyond genome-wide association studies: new strategies for identifying genetic determinants of hypertension.
Curr. Hypertens. Rep. 13 (2011) 422-451
43. Wilson, D. G., Phamluong, K., Li, L., Sun, M., Cao, T. C., Liu, P. S., Modrusan, Z., Sandoval, W. N., Rangell, L., Carano, R. A. D., Peterson, A. S., Solloway, M. J.
Global defects in collagen secretion in a Mia3/TANGO1 knockout mouse.
J. Cell. Biol. 193 (2011) 935-951
44. Wilson, P. W. F., Douglas, P. S.
Epidemiology of coronary heart disease.
UpToDate, 2010:
http://www.uptodate.com/contents/epidemiology-of-coronary-heart-disease?source=search_result&search=Epidemiology+of+coronary+heart+disease.&selectedTitle=1~150
Stand: 05.11.2010
45. World Health Organization
Diabetes mellitus. Report of the WHO study group.
World Health Organ. Tech. Rep. Ser. 727 (1985) 1-113
46. Wrba, F., Dolznig, H., Mannhalter, C.
DNA-Sequenzierung.
In: „Genetik verstehen“
Facultas Universitätsverlag, Wien, 2007, 1. Auflage, 151

47. Zaykin, D. V., Westfall, P. H., Young, S. S., Karnoub, M. A., Wagner, M. J., Ehm, M. G.
Testing association of statistically inferred haplotypes with discrete and continuous traits in samples of unrelated individuals.
Hum. Hered. 53 (2002) 79–91

48. Zeller, T., Blankenberg, S., Diemert, P.
Genome-wide association studies in cardiovascular disease - an update 2011.
Clin. Chem. 58 (2012) 4

7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Albert Schömig, Direktor der Medizinischen Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München und des Deutschen Herzzentrums München, danke ich für die Möglichkeit, die vorliegende Dissertation durchführen zu können.

Herrn Dr. Werner Koch danke ich sehr herzlich für seine ausführliche und präzise methodische Beratung sowie für die kritisch konstruktive Begleitung.

Großer Dank gilt dem gesamten Team des Labors: Marianne Eichinger, Claudia Ganser, Wolfgang Latz und Ulrike Weiss. Insbesondere möchte ich Frau Eichinger, die mich im Labor eingearbeitet hat, für ihre Geduld und ihren Zuspruch danken.