

Aus dem Lehrstuhl für Innere Medizin II
Direktor: Prof. Dr. med. G. A. J. Riegger
der medizinischen Fakultät der Universität Regensburg

EINFLUSS AUSGEWÄHLTER POLYMORPHISMEN IM C3-GEN DES
KOMPLEMENTSYSTEMS AUF DIE PRÄDISPOSITION ZUM
MYOKARDINFARKT

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER MEDIZIN
DER
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von Daniel Marold aus Büchlberg

2005

Dekan:	Prof. Dr. med. Michael Nerlich
1. Berichterstatterin:	PD Dr. rer. nat. Jeanette Erdmann
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Ralf Wagner
Tag der mündlichen Prüfung:	03. Februar 2006

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Zusammenfassung	8
1. Einleitung	9
1.1 Der Herzinfarkt	9
1.1.1 Epidemiologie und allgemeine Angaben zum Herzinfarkt	9
1.1.2 Risikofaktoren	11
1.1.2.1 Klassische Risikofaktoren	11
1.1.2.2 Relevanz der Risikoanamnese und Prävention	13
1.1.3 Genetik des Myokardinfarkts	14
1.1.3.1 Variabilität des menschlichen Genoms	14
1.1.3.2 Strategien zur Aufklärung komplexer Erkrankungen am Beispiel Myokardinfarkt	15
1.1.3.3 Neue Strategien zur genomweiten Suche krankheitsrelevanter Merkmale. Kopplungsungleichgewicht und Blockstruktur des menschlichen Genoms	19
1.2 Das Komplementsystem	21
1.2.1 Physiologische Grundlagen und Aufgaben im Organismus	21
1.2.2 Genetische und molekulare Grundlagen des C3-Komplementkomponente	23
1.2.3 Atherosklerose	24
1.2.3.1 Pathophysiologie bei der Entstehung der Atherosklerose	24
1.2.3.2 Komplementsystem und Atherosklerose	26
1.2.3.3 Komplementinhibition – eine therapeutische Chance?	27
1.2.4 Genetische Varianten im C3-Gen und ihre pathogenetische Bedeutung	27
1.3 Ziel der Arbeit	30
2.1 Materialien	31
2.1.1 Patientenkollektive und DNS	31
2.1.1.1 Darstellung der Patienten- und Kontrollkollektive	31
2.1.1.2 Extraktion der genomischen Probanden-DNS	32
2.1.2 Gelelektrophorese: Materialien und Geräte	33
2.1.3 DNS-Amplifikation, PCR: Materialien und Geräte	33
2.1.3.1 Materialien für die PCR	33
2.1.3.2 Primerauswahl	34
2.1.4 Enzymverdau: Materialien und Geräte	34
2.1.5 Fragmentlängenanalyse: Materialien und Geräte	35
2.2 Methoden	36
2.2.1 Gelelektrophorese	36
2.2.1.1 Prinzip der Gelelektrophorese	36
2.2.1.2 Agarosegele: Herstellung und Eigenschaften	36
2.2.1.3 Elektrophorese der Amplifikationsprodukte	36
2.2.1.4 Auswertung und Dokumentation der Gelelektrophorese	37

	Seite	
2.2.2	Polymersase-Ketten-Reaktion, PCR	37
2.2.2.1	Prinzip der PCR	37
2.2.2.2	PCR-Protokolle für die ausgewählten Primerpaare	38
2.2.3	Restriktionsenzymverdau	39
2.2.3.1	Prinzip des Restriktionsenzymverdaus	39
2.2.3.2	Protokolle für die Enzymverdaue	39
2.2.4	Fragmentlängenanalyse mit ABI PRISM® 3100	40
2.2.4.1	Prinzip der Fragmentlängenanalyse mit ABI PRISM® 3100	40
2.2.4.2	Vorbereitung und Protokoll für die Fragmentlängenanalyse	42
2.2.4.3	Analyserate des Geräts	42
2.2.4.4	Analyse des C3-Promotor- und C3-Intron-26-Repeatpolymorphismus	43
2.2.5	Verwaltung und Kontrolle der Einzelergebnisse	44
3.	Ergebnisse	45
3.1	Charakterisierung der Kollektive	45
3.2	Optimierung der PCR-Bedingungen	47
3.3	Auswertung der Restriktionsenzymverdaue	48
3.4	Auswertung der Fragmentlängenanalyse	49
3.5	Bezeichnung der untersuchten Allele	50
3.6	Berechnung der Allelfrequenzen in den Kontrollkollektiven	50
3.7	Berechnung des paarweisen Kopplungsungleichgewichts D' für die untersuchten Polymorphismen	51
3.8	Haplotypstruktur im C3-Gen	55
3.9	Berechnung der Haplotypfrequenzen	56
3.9.1	Haplotypanalyse im Augsburger Herzinfarktregister	57
3.9.2	Haplotypanalyse im Regensburger Herzinfarktregister	58
3.9.3	Graphische Darstellung der Ergebnisse	59
4.	Diskussion	60
5.	Literaturverzeichnis	65
6.	Anhang	71

Zusammenfassung:

In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluss von vier ausgewählten genetischen Polymorphismen aus dem C3-Gen des Komplementsystems auf die Prädisposition zum Myokardinfarkt untersucht. Als Studienpopulationen dienen zwei Stichproben aus dem Augsburger Herzinfarktregister und dem Regensburg-Lübeck Herzinfarkt Familienregister. Insgesamt wurden 1.256 Probanden (703 Herzinfarktpatienten und 553 gesunde Kontrollpersonen) an folgenden vier Markern im C3-Gen genotypisiert: Repeat-Polymorphismus im C3-Promotor (-854(CA)_n), SNP im C3-Exon 3 (C3-S / C3-F), SNP im C3-Exon 9 (HAV 4-1 - / HAV 4-1 +) und Repeat-Polymorphismus im C3-Intron 26 (+28.614(GT)_n). Die Hypothese, dass Träger der seltenen C3-F-Variante ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen aufweisen, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht eindeutig bestätigt werden.

1. Einleitung

1.1 Der Herzinfarkt

1.1.1 Epidemiologie und allgemeine Angaben zum Herzinfarkt

Die koronare Herzkrankheit (KHK) ist nach wie vor die häufigste Todesursache in den westlichen Industrieländern; in Deutschland ist jeder fünfte Todesfall auf sie zurückzuführen (1). Die Prävalenz steigt bei Männern von ca. 25 % im mittleren Lebensalter auf ca. 50 % bei über 65jährigen. Frauen haben bis zur Menopause ein wesentlich geringeres Risiko, an einer KHK zu erkranken ($m : w = 2-3 : 1$), wobei sich das Verhältnis im hohen Alter jedoch angleicht (2).

Man unterscheidet zwischen latenter (asymptomatischer) und manifester KHK. Nach der Framingham-Studie sind in den folgenden Tabellen ihre klinischen Erstmanifestationen zusammengefasst:

Altersgruppe	Gesamt	Männer	Frauen
18-29	-	-	-
30-39	2,1	4,1	-
40-49	6,2	12,3	-
50-59	26,9	39,9	14,2
60-69	59,2	79,9	40,5
70-79	93,6	146,3	64,2
insgesamt	24,5	32,7	16,7

Tabelle 1: Lebenszeitprävalenz an Zuständen nach Herzinfarkt je 1000 Einwohner der BRD (Erst- und Reinfarkte). Modifiziert nach (3).

	Männer	Frauen
Akuter Myokardinfarkt	50 %	35 %
Stabile Angina pectoris	31 %	48 %
Instabile Angina pectoris	5 %	6 %
Plötzlicher Herztod	11 %	9 %
sonstige	4 %	3 %

Tabelle 2: Klinische Erstmanifestationen der koronaren Herzerkrankung bei Frauen und Männern. Angaben in Prozent. Modifiziert nach (3).

Wesentliche Ursache der KHK ist die durch Atherosklerose verursachte Stenosierung der Herzkranzarterien und die dadurch bedingte Koronarinsuffizienz. In Ruhe kann eine Gefäßlumeneinengung von bis zu 90 % toleriert werden; die für Belastung benötigte Koronarreserve reduziert sich jedoch wesentlich früher. Diese Tatsache bedingt das klinische Leitsymptom der Angina pectoris, den belastungsabhängigen Thoraxschmerz. Die instabile Angina pectoris zeichnet sich durch Schmerzen in Ruhe und zunehmender Schwere, Dauer und Häufigkeit der Schmerzanfälle, sowie durch Steigerung der antianginösen Bedarfsmedikation aus. Dabei besteht ein kritisches Infarktisiko von ca. 20 % (4).

Der akute Myokardinfarkt (MI) definiert sich als ischämische Myokardnekrose durch Verschluss oder kritische Einengung einer Herzkranzarterie. Die Inzidenz des MI liegt in Deutschland bei 300 Infarkten / 100.000 / Jahr, wobei sich große geographische Unterschiede zeigen (z.B. Japan < 100; Irland, Schottland, Finnland > 500). Aufgrund besserer Präventionsmöglichkeiten und gesteigertem Gesundheitsbewusstsein der Bevölkerung ist in den westlichen Ländern die Inzidenz und Mortalität in den letzten 20-30 Jahren rückläufig (5). Letztere beträgt trotzdem noch ca. 30 % während der ersten Stunde nach dem Infarktgeschehen, während des ersten Monats versterben 10 – 20 %, nach einem Jahr weitere 5 – 10 % (Ergebnisse des MONICA-Projektes: monitoring trends and determinants in cardiovascular diseases (6)). Ursachen hierfür sind die häufig letal verlaufenden Komplikationen wie maligne Herzrhythmusstörungen, plötzlicher Herztod, myogen bedingte Herzinsuffizienz, kardiogener Schock, Mitralsuffizienz, Herzwandruptur, Ventrikelaneurysma, Thrombembolien (Lungenembolie, Apoplex), Reinfarkt u. a.. Eine schnellstmöglich eingeleitete präklinische und klinische Therapie unmittelbar nach den ersten Symptomen ist wesentliche Voraussetzung für eine bessere Prognose der Patienten.

1.1.2 Risikofaktoren

1.1.2.1 klassische Risikofaktoren

Bei den traditionellen kardiovaskulären Risikofaktoren kann zwischen beeinflussbaren und nicht zu beeinflussenden Risikofaktoren unterschieden werden. Zu ersteren zählen familiäre Disposition, Lebensalter und männliches Geschlecht im mittleren Lebensalter, zu den beeinflussbaren Risikofaktoren z. B. arterieller Hypertonus, Hypercholesterinämie und Rauchen.

In Tabelle 3 sind die klassischen Risikofaktoren für KHK und MI zusammengestellt: Die RAP (rate advancement period) bezeichnet die mittlere Zeitperiode, um die das Herzinfarkttrisiko bei Vorliegen des Risikofaktors vorverlegt wird. Ein kombiniertes Vorkommen von klassischen Risikofaktoren erhöht das Risiko um ein Vielfaches (siehe Abbildung 1). Insgesamt können über die Hälfte aller auftretenden Infarkte auf diese zurückgeführt werden (7).

Risikofaktor	Eigenschaften
Störungen des Lipidstoffwechsels (RAP: 5,8 Jahre)	<p>Norm: Triglyceride: < 200 mg/dl Cholesterin: < 200 mg/dl LDL-Cholesterin: < 130 mg/dl HDL-Cholesterin: > 40 mg/dl Lipoprotein (a): > 30 mg/dl</p>
	<p>Die angegebenen Normwerte beziehen sich auf die Primärprävention bei Patienten mit Risikofaktoren für Atherosklerose. Für die Sekundärprävention von KHK-Patienten müssen niedrigere obere Normgrenzen definiert werden. 1% höheres Serumcholesterin erhöht das KHK-Risiko um 1%. GRIPS-Studie (Göttinger Risiko-, Inzidenz- und Prävalenz-Studie): Reinfarktrate erhöht bei persistierend hohen Cholesterinwerten: LDL > 160 mg/dl: 50 % Reinfarkte in 5 Jahren LDL > 190 mg/dl: fast 100 % Reinfarkte in 5 Jahre</p>
	>140 / >90 mmHg
	Gefahr der Angiopathie und Polyneuropathie (häufig Ursache für asymptomatische Myokardinfarkte)
	Kombination aus Lipidstoffwechselstörung, arterieller Hypertonie, Typ 2-Diabetes, Adipositas
Nikotinabusus (RAP: 11,4 – 15,8 Jahre)	Steigerung der kardiovaskulären Mortalität um 18 % bei Männern und um 31 % bei Frauen pro 10 Zigaretten täglich.
Lipoprotein (a)	> 30 mg/dl
Hyperfibrinogenämie	> 300 mg/dl
Hyperhomocysteinämie	> 12 µmol/l
Antiphospholipid-Antikörper	Folge: Hyperkoagulabilität
t-PA-Defekte	Genetisch bedingt
Bewegungsmangel	
Psychosoziale Faktoren	Dysstress, niedriger sozialer Status

Tabelle 3: KHK-Risikofaktoren 1. und 2. Ordnung. Modifiziert nach (4, 8)

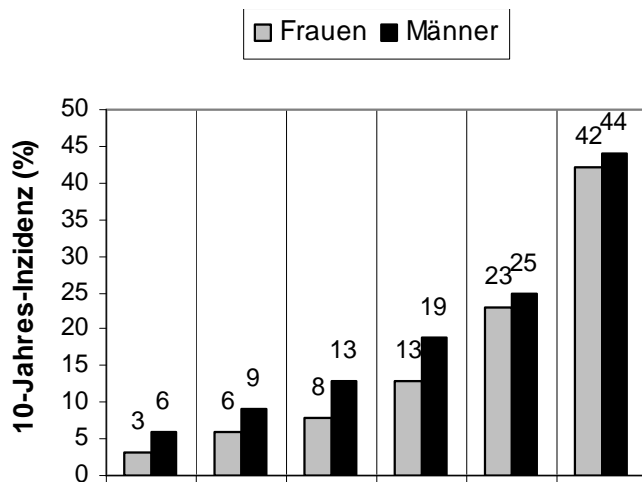


Abbildung 1:

10-Jahres-Wahrscheinlichkeit, an einer KHK zu erkranken, im Hinblick auf gemeinsames Vorkommen verschiedener Risikofaktoren (getrennt nach Geschlecht). Modifiziert nach (8).

160	160	160	160	160	160	sys. Blutdruck
-	+	+	+	+	+	HDL: 35 – 38 mg/dl
-	-	+	+	+	+	Chol.: 240 – 262 mg/dl
-	-	-	+	+	+	RaucherIn
-	-	-	-	+	+	DiabetikerIn
-	-	-	-	-	+	LVH-Zeichen im EKG

1.1.2.2 Relevanz der Risikoanamese und Prävention

Trotz aller derzeit verfügbaren Therapiemöglichkeit für den akuten Myokardinfarkt liegt die Mortalität noch immer bei ca. 50 % innerhalb des ersten Jahres. Man geht davon, dass durch konsequente Erhebung aller Risikofaktoren und frühzeitige therapeutische Intervention die KHK-Sterblichkeit um bis auf die Hälfte reduziert werden könnte (9). Gerade bei jüngeren Patienten mit positiver Familienanamnese müssen Erkrankungen wie art. Hypertonie, Hypercholesterinämie und Diabetes mellitus optimal therapiert werden (10)

1.1.3 Genetik des Myokardinfarkts

1.1.3.1 Variabilität des menschlichen Genoms

Mit Initiierung des Humangenomprojekts im Jahre 1990 konnte innerhalb von zehn Jahren die Struktur des 3,2 Milliarden Basenpaare umfassenden menschlichen Genoms weitestgehend aufgeklärt werden. Die interindividuelle Variabilität in der Basenabfolge beträgt im Vergleich des Erbguts zweier Menschen nur etwa 0,1 %. Man geht davon aus, dass krankheitsrelevante Genorte in diesen variablen DNS-Abschnitten lokalisiert sind und das Vorhandensein einer Mutation die Entstehung einer Erkrankung bzw. deren Ausprägung in unterschiedlichem Ausmaß determiniert (11).

Grundsätzlich lassen sich vier Typen genetischer Variabilität unterscheiden:

- Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen (RFLP) oder single nucleotide polymorphisms (SNP): Austausch eines einzelnen Basenpaars. SNPs machen ca. 90 % der interindividuellen genetischen Variabilität aus (12). Ihre Gesamtzahl wird auf ca. 11 Millionen geschätzt, wobei bis heute mehr als 2,1 Millionen bekannt und in Datenbanken verzeichnet sind (13).
 - Mikrosatelliten (STR: short tandem repeats): Basensequenzen von 1 – 11 bp wiederholen sich mehrfach nacheinander. Sie machen ca. 0,5 % des menschlichen Genoms aus.
 - Minisatelliten (VNTR: variable number of tandem repeats): Basensequenzen von 12 – 500 bp wiederholen sich mehrfach nacheinander.
- Insgesamt besteht das Genom in mehr als der 50 % aus repetitiven Sequenzen (14).
- Insertionen bzw. Deletionen: Basensequenzen unterschiedlicher Länge sind an definierten Genorten zusätzlich vorhanden bzw. fehlen dort.

Nach Aufklärung der Intron-Exon-Struktur von Genen befasste man sich bisher vorrangig mit Genveränderungen in den kodierenden Erbgutabschnitten. Interessant sind dabei vor allem diejenigen Polymorphismen, die in den kodierenden Exons oder in regulatorischen Sequenzen (Promotor, 3'UTR, 5'UTR) lokalisiert sind. Nach der Transkription können solche Polymorphismen zu einer funktionellen Veränderung des Genprodukts führen, sei es im Hinblick auf die Proteinstruktur und -funktion, Rezeptoranomalien oder auf veränderte Plasmaspiegel. Neuere Untersuchungen beschreiben ebenso funktionelle Varianten in den nicht-kodierenden Intron-Abschnitten, wobei die hier zugrunde liegenden Mechanismen noch nicht eindeutig geklärt sind. Von allen bisher bekannten Polymorphismen sind allerdings die meisten ohne funktionelle Relevanz; sie stellen also keine Mutation im eigentlichen Sinn dar.

1.1.3.2 Strategien zur Aufklärung komplexer Erkrankungen am Beispiel Myokardinfarkt

Nicht alle Herzinfarkt-Patienten zeigen ein ausgeprägtes klassisches Risikoprofil, wie es in Tabelle 3 beschrieben ist. In dieser Gruppe spielt jedoch eine positive Familienanamnese eine große Rolle. Unabhängig von klassischen Risikofaktoren geht man in bis zu 30 % aller Herzinfarkte ursächlich von einer erblichen Genese aus (15). Die Suche nach genetisch determinierten Ursachen für die Pathogenese des MI ist Gegenstand aktueller Forschung. Problematischerweise zeichnen sich kardiovaskuläre Erkrankungen durch ihre multifaktorielle Genese aus, d. h. die Pathogenese ist in variablem Ausmaß sowohl durch exogene als auch genetische Einflüsse bedingt. Zudem können auch die Phänotypen, d. h. die Krankheitsmerkmale, welche durch kardiovaskuläre Erkrankungen verursacht werden, ausgesprochen heterogen sein. Für die moderne Genetik stellen solche multifaktoriellen, komplexen Krankheiten wie der Myokardinfarkt eine besondere Herausforderung dar, da das Vererbungsmuster meist nicht in ein monogenes Vererbungsschema passt. Man geht vielmehr davon aus, dass solcherlei Erkrankungen jeweils auf mehreren – möglicherweise auf deutlich mehr als 10 oder 20 – noch unbekanntem Gendefekten basieren. Dies stellt quantitativ hohe Ansprüche an die Entschlüsselung der zugrunde liegenden Genetik. Die Identifizierung der genetischen Faktoren in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen bietet allerdings auch einen kaum abzuschätzenden Nutzen. So können neue diagnostische Verfahren zur Früherkennung eines individuellen Risikos entwickelt werden. Zudem lassen sich aus der

physiologischen Funktion der betroffenen Gene auch neue Prinzipien in der Krankheitsentstehung und idealerweise auch neue therapeutische Ansätze formulieren. Gerade dieser Anspruch hat eine große gesundheitspolitische Bedeutung – kardiovaskuläre Erkrankungen stehen bei den Gesundheitskosten nach wie vor an erster Stelle.

Die Aufklärung der zugrundeliegenden genetischen Ursachen gestalten sich aufgrund der vielen Einflussfaktoren schwierig. Konzeptionell können Studien zur Genetik des Herzinfarktes durch zwei verschiedene Strategien erfolgen:

Auf der einen Seite findet sich ein epidemiologisches Vorgehen, das der Frage nach der Assoziation eines Markers mit einer Erkrankung nachgeht (Fall-Kontroll-Studie, Assoziationsstudie). Solche Studien werden zur Identifikation von Allelen herangezogen, die qualitativ einen kleinen pathogenetischen Beitrag leisten, aber aufgrund der Allelfrequenz populationsgenetisch sehr bedeutsam sein können. Dabei beschränkte man sich bisher vorwiegend auf Polymorphismen in Genen, welche für Genprodukte kodieren, die ihrerseits als intermediäre Phänotypen ursächlich mit einem erhöhten Infarktisiko einhergehen. Beispielsweise interessieren genetisch bedingte Anomalien von Rezeptor-, Plasma-, Struktur- und Regulatorproteinen im Renin-Angiotensin-Aldosteron-, Lipidstoffwechsel- oder im Gerinnungssystem (siehe Tabelle 4).

Auf der anderen Seite stehen die Analysemöglichkeiten der Genetik, die den Fragen der Vererbbarkeit, der Art des Erbgangs und der Kopplung zwischen einem Marker und der Erkrankung nachgeht (Kopplungsanalyse).

Bei komplexen Erkrankungen scheint sich eine Kombination von Kopplungsansatz in betroffenen Geschwisterpaarkollektiven und anschließender Assoziationsuntersuchung mittels sog. SNPs (single nucleotide polymorphism) in der gekoppelten Region als die erfolgsversprechendste Strategie heraus zu kristallisieren. Diesbezüglich lassen sich als erfolgreiche Beispiele Morbus Crohn (16), Asthma bronchiale (17) und Diabetes mellitus (18) nennen.

In den vergangenen Jahren wurden eine Reihe von Assoziationsstudien zur Genetik des Herzinfarktes durchgeführt. Um die Frage nach der Assoziation einer Erkrankung mit einem Marker zu klären, wird dessen Allelfrequenz bzw. Genotyp bei Erkrankten und gesunden Probanden verglichen. Eine positive bzw. negative Assoziation liegt vor, wenn im Vergleich der beiden Gruppen das Auftreten des Markers bei den Erkrankten statistisch signifikant erhöht bzw. erniedrigt ist. Dieser Vergleich erlaubt dann eine Risikoeinschätzung.

System	Polymorphismem im Gen für...	Quelle.
Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	Angiotensin-converting enzym	(19)
	Angiotensinogen	(20,21)
	Angiotensin II Rezeptor Typ 1 und 2	(22)
Fettstoffwechsel	Apolipoprotein (a), Lp(a)	(23)
	Apolipoprotein E, apoE	(24,25)
	Paraoxonoase, PON1	(26,27)
Gerinnungssystem	Gerinnungsfaktoren V, VII, XIII	(28,29,30)
	Plasminogenaktivator-Inhibitor	(31)
	β Fibrinogen	(32)
Gefäßregulation	Alpha2B- und β 2-Adrenozeptor	(33,34)
	NO-Synthase	(35)
	Prostacyclin-Synthase	(36)
Immunsystem	Tumornekrosefaktor alpha	(37)
	<i>Lymphotoxin alpha*</i>	(38)

Tabelle 4: ausgewählte, mit erhöhtem Infarktisiko assoziierte Polymorphismen

**Lymphotoxin alpha spielt hier eine besondere Rolle, da dieses Gen nicht in einem Kandidatengen-Approach, sondern erstmalig durch eine genomweite Assoziationsuntersuchung gefunden wurde.*

Ein einzelner Polymorphismus verändert allerdings nur unwesentlich das Herzinfarktisiko (häufig nur +/-10%). Außerdem wurden viele dieser Assoziationen nicht in allen Populationen reproduziert. In der Konsequenz gibt es heute keine genetischen Marker, deren klinischer Einsatz für die Abschätzung des Herzinfarktiskos empfohlen werden kann.

Bei der Aufklärung der genetischen Ursachen komplexer Erkrankung stehen aber auch Methoden der Kopplungsanalyse zur Verfügung. In der Regel können zwar keine großen Familienstammbäume untersucht werden, da aufgrund des recht hohen Manifestationsalters der Erkrankung keine älteren Familienmitglieder zur Verfügung stehen und Aussagen über den Krankheitsstatus bei Kindern und Enkeln nicht valide sind. Um diesem Dilemma zu entgehen wurde die sog. „affected sib pair“ Analyse entwickelt. Bei dieser Art der Kopplungsanalyse beschränkt man sich auf die Untersuchung von betroffenen Geschwisterpaare (39). Unter Verwendung hochpolymorpher Marker wird versucht, den chromosomalen DNS-Abschnitt zu identifizieren, der überdurchschnittlich häufig auf die erkrankten Geschwister vererbt wird. Man geht dann davon aus, dass dieser das krankheitsrelevante Gen trägt. Ein Nachteil dieser Methode gegenüber einer Kopplungsanalyse innerhalb großer Familienstammbäumen ist die wesentlich größere Zahl von Geschwisterpaaren, die untersucht werden müssen.

So konnte in einem großen Kollektiv betroffener Geschwisterpaare aus der Regensburger Herzinfarktstudie mittels Kopplungsanalyse weltweit erstmalig ein chromosomaler Lokus für den Herzinfarkt auf dem menschlichen Chromosom 14 identifiziert werden (40).

Ein weiterer Meilenstein bei der Erforschung kardiovaskulärer Erkrankungen gelang Wang und Mitarbeitern durch die Identifizierung des Gens MEF2A mittels Kopplungsanalysen in einer Familie mit einer seltenen autosomal-dominant vererbten Form des Herzinfarkts. Zum ersten Mal wurde damit ein Gen identifiziert, das beim Menschen die koronare Herzkrankheit verursacht. Eine 21-bp Deletion im MEF2A-Gen hat schwächere und damit die Plaqueanlagerung begünstigende Koronararterienwände zur Folge, was letztlich zu Herzinfarkt oder akutem Herztod führen kann (41). Darüber hinaus wurde in zwei größeren Kollektiven unverwandter Probanden erstmals ein Gendefekt (im ALOX5AP-Gen) beschrieben, der mit einem zweifach erhöhten Risiko für Herzinfarkt und Schlaganfall assoziiert ist (42).

1.1.3.3 Neue Strategien zur genomweiten Suche krankheitsrelevanter Merkmale. Kopplungsungleichgewicht und Blockstruktur des menschlichen Genoms

Die dargestellten Probleme gaben Anlass zur Suche nach neuen Strategien bei der Suche nach krankheitsassoziierten Genorten und Mutationen. Bisher untersuchte man vorrangig den Einfluss bereits bekannter funktioneller Polymorphismen auf die Pathophysiologie ausgewählter Erkrankungen. Sicherlich sind es aber nicht nur diese wenigen Polymorphismen, die über die Pathogenese komplexer Erkrankungen wie z. B. den Myokardinfarkt gänzlich Aufschluß geben könnten. Vielmehr spielen dabei eine Vielzahl auch bisher unbekannter Mutationen und deren gegenseitige Interaktion eine große Rolle.

Aus wirtschaftlichen Gründen ist das genomweite Screening aller bisher bekannten Marker bei der Suche nach krankheitsrelevanten Genen wenig sinnvoll. Es wurden deshalb in den letzten zehn Jahren Studiendesigns entwickelt, welche ein sequenzielles Vorgehen bei Assoziationsstudien erlauben: So können entweder systematisch Markerkarten im Rahmen eines Genomscans verdichtet oder Stichproben im Laufe mehrerer Studienstufen vergrößert werden. Diese Ansätze sind sowohl bei der systematischen Analyse von Kandidatengenen als auch im Rahmen von Genomscans möglich und führen zu deutlichen Reduktionen in den erforderlichen Fallzahlen (43).

Die kürzliche Entdeckung der Blockstruktur des menschlichen Genoms zeigt sich als weitere erfolgsversprechende Grundlage für die Ökonomisierung genetischer Untersuchungen (44, 45). Definierte Allele verschiedener Polymorphismen auf einem Chromosom werden in ihrer Kombination als Haplotypen bezeichnet. In solchen Genblöcken werden sie häufiger gemeinsam vererbt, als es der Zufall vermuten ließe. Je geringer die Distanz zweier Marker auf dem Genom ist, desto häufiger werden sie auch abhängig vererbt und nicht durch crossing over während der Meiose voneinander getrennt. Diese Abhängigkeit charakterisiert das Kopplungsungleichgewicht (linkage disequilibrium, LD). Befinden sich also mehrere Marker in einem starken LD zueinander, so werden sie als Haplotypblock gemeinsam vererbt. Ein solcher kann sich über sehr weite genomische Distanzen (bis zu 40 kb) erstrecken (46). Zwischen den einzelnen Blöcken liegen oftmals chromosomale Regionen mit einer sehr hohen Rekombinationsrate, sog. Hotspots. Mit der Kenntnis der Haplotyp-Blockstruktur des menschlichen Genoms könnten große Genabschnitte durch wenige ausgewählte Marker charakterisiert werden, was das genomweite Screening krankheitsassoziiierter Gene erheblich erleichtern würde (47,48). Aktuell bemüht man sich, die Blockstruktur des menschlichen Genoms weiter aufzuklären und in Datenbanken verfügbar zu machen (49).

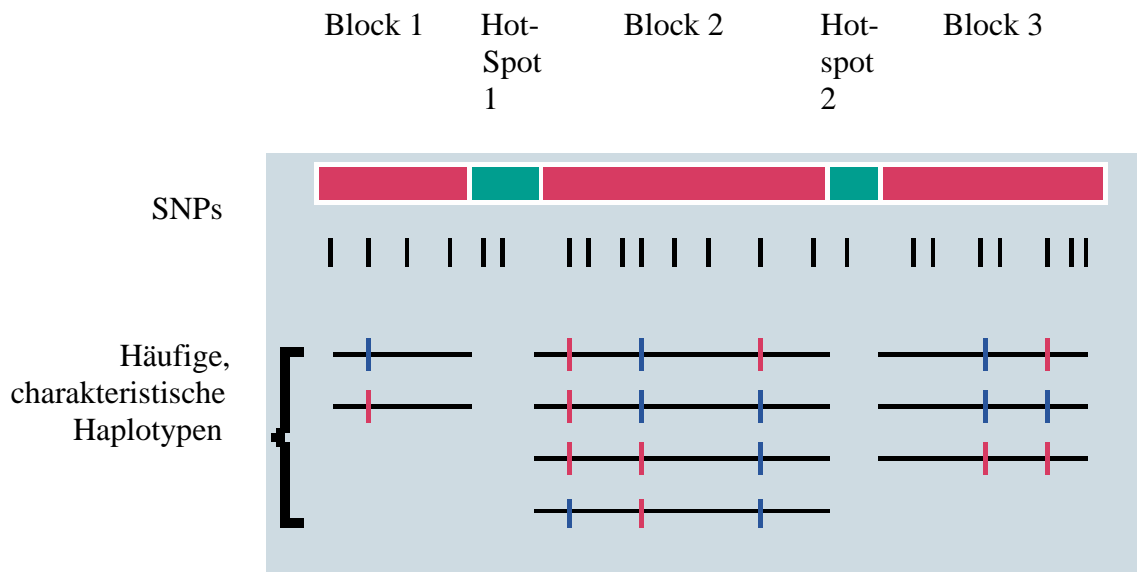


Abbildung 2: Blockstruktur des menschlichen Genoms. Modifiziert nach (50)

Die Grafik veranschaulicht die Blockstruktur des menschlichen Genoms. In einem Block befinden sich viele genetische Marker (z.B. SNPs) in einem starken Kopplungsungleichgewicht. Durch die Auswahl weniger repräsentativer SNPs innerhalb des Haplotyp-Blocks (sog. tagging SNPs) kann dieser in seiner Ausprägung charakterisiert werden. Hotspots bezeichnen die dazwischenliegenden hochvariablen Regionen. Für die Analyse großer Kandidatenregionen werden inzwischen Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) anstelle von Mikrosatelliten aufgrund ihrer Häufigkeit, geringen Mutationsrate und der Möglichkeit zur Hochdurchsatz-Genotypisierung bevorzugt eingesetzt.

1.2 Das Komplementsystem

1.2.1 Physiologische Grundlagen und Aufgaben im Organismus

Das Komplementsystem als Teil des unspezifischen Immunsystems besteht unter anderem aus 9 Plasmaproteinen (C1-C9), welche in Leber, Niere, Gehirn, Darmepithelien, Makrophagen und im Fettgewebe gebildet werden. Es wird neben Serumamyloid-A-Protein, saures alpha1-Antichymotrypsin, alpha1-Antitrypsin, Haptoglobin, Coeruloplasmin und Fibrinogen zu den Akute-Phase-Proteinen gezählt. Neben der unspezifischen Immunabwehr spielt es eine Rolle bei der Induktion von Entzündungsreaktionen sowie bei der Chemotaxis.

Bei der Komplementaktivierung wird ein klassischer und ein alternativer Aktivierungsweg unterschieden. Ersterer wird durch Antigen-Antikörper-Komplexe, der alternative Aktivierungsweg durch bakterielle Wirkstoffe induziert. Als dritte Möglichkeit der Komplementaktivierung wird der Lectin-Weg beschrieben, bei dem Mannose-bindendes-Protein an membranständige Zucker von Mikroorganismen bindet und dadurch die Aktivierungskaskade initiiert (51). Alle drei Wege münden in die Aktivierung der C3-Komponente und die darauf folgende Bildung des lytischen Komplexes (MAC = membran attack complex) aus C5b – C9. Aktivierte Faktoren besitzen enzymatische Aktivität und aktivieren wiederum mit Unterstützung von diversen Regulatorproteinen die jeweils folgenden Komponenten. Die bei der Aktivierung von C3 und C5 abgespaltenen kleineren Fragmente (mit a gekennzeichnet) spielen bei der Chemotaxis eine große Rolle und unterhalten die Entzündungsreaktion. Der MAC schädigt die Membran von antikörpermarkierten Pathogenen und tötet sie damit ab. Desweiteren erkennen Makrophagen und polymorphkernige Leukozyten mittels Oberflächenrezeptoren die komplementmarkierten Keime (52, 53).

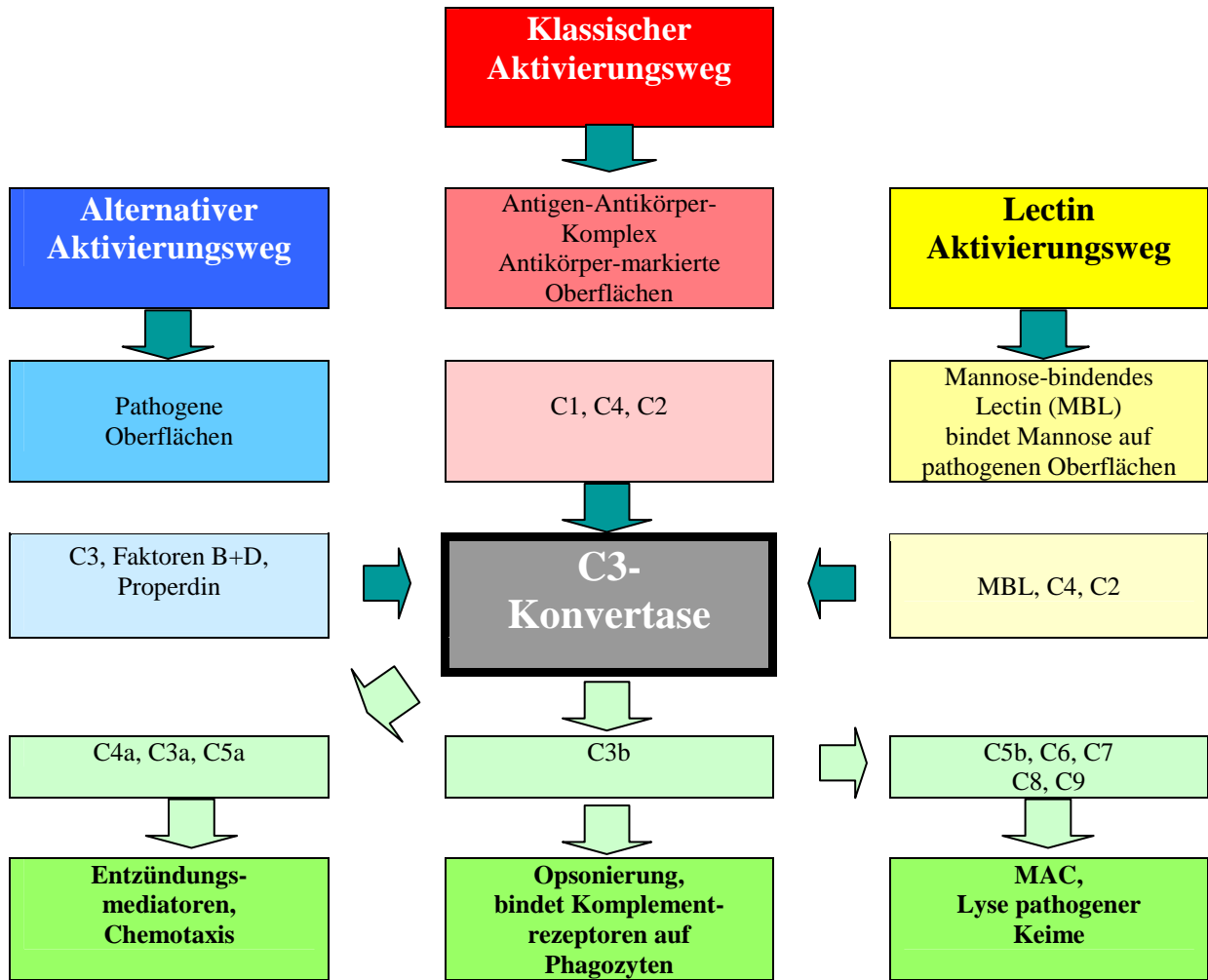


Abbildung 3 (oben): unterschiedliche Wege der Komplementaktivierung.

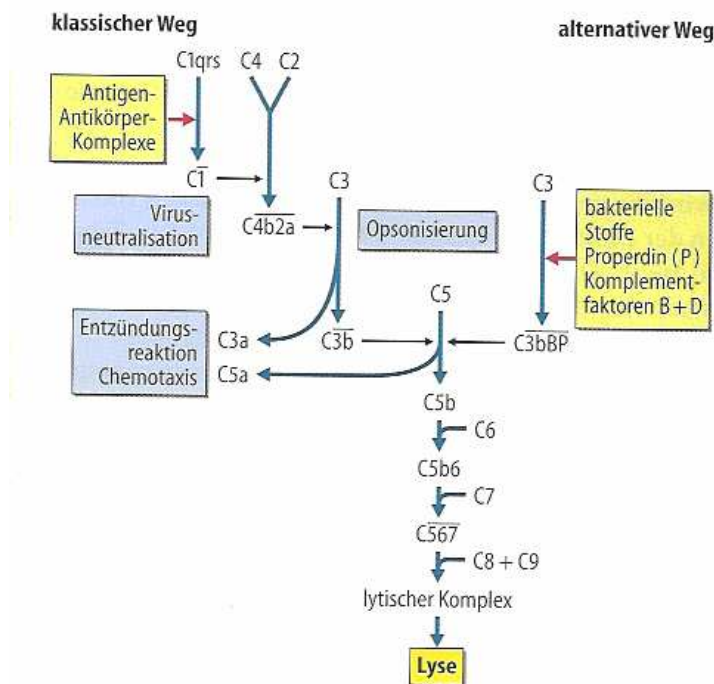


Abbildung 4 (links): Aktivierungskaskade des klassischen und des alternativen Komplement-Aktivierungsweges. Aus (52).

1.2.2 Genetische und molekulare Grundlagen der C3-Komplementkomponente

Eine zentrale Rolle im Komplementsystem wird der Komponente C3 zugeschrieben. Das C3-Gen ist auf dem menschlichen Chromosom 19p13.3 lokalisiert (54).

Chromosom 19: Lokalisation des C3-Gens

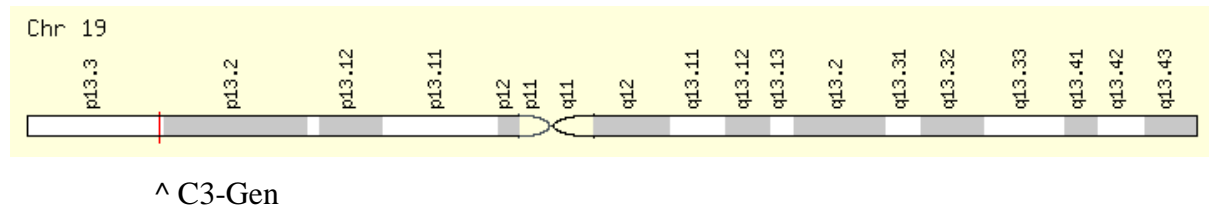


Abbildung 5: Chromosomale Lokalisation des C3-Gens. Aus (55)

C3-Gen: Exon/Intron-Organisation

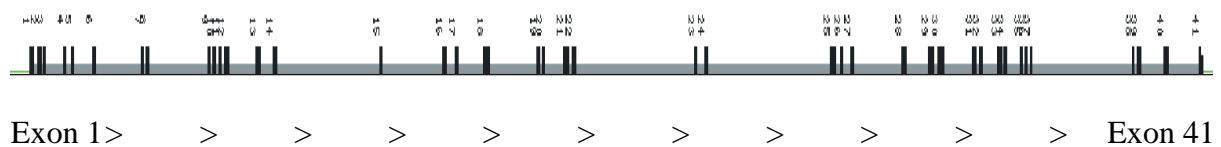


Abbildung 6: Exon/Intron-Genstruktur im C3-Gen. Aus (56)

Das C3-Gen ist 41 kb groß und besteht aus 41 Exonen mit einer Länge von 52 – 213 Basenpaaren und 40 Introns. Die Sequenz der C3-Primärproteinstruktur besteht aus 1.663 Aminosäuren (inkl. eines 22 Aminosäuren langen Signalpeptids). Nach posttranslationalen Proteinmodifikationen besteht humanes C3 aus zwei Proteinketten, der größeren alpha- und der kleineren beta-Kette, welche durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Die beta-Kette ist auf den Exonen 1 – 16 kodiert (13 kb), die alpha-Kette auf 16 – 41 (28 kb) (57 – 60).

Folgende Tabelle stellt physikalische und biologische Eigenschaften des C3-Proteins zusammen:

Serumkonzentration	1,2 mg/dl
Molekulargewicht:	
- gesamt	185.000
- alpha-Kette	110.000
- beta-Kette	75.000
Aminosäuren	1.637
Isoelektrischer Punkt	5,7
Extinktionskoeffizient (280 nm, 1 %, 1 cm)	9,7
Thioesterhydrolyserate (%/min)	0,005

Tabelle 5: Physikalische und biologische Eigenschaften des C3-Proteins. Modifiziert nach (59).

1.2.3 Atherosklerose

1.2.3.1 Pathophysiologie bei der Entstehung der Atherosklerose

Bei der Entstehung der Atherosklerose geht man von einer entzündlich-fibroproliferativen Reaktion aus (61, 62). Prädisponierend für deren Entstehen gelten in Analogie zum Herzinfarkt Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, Rauchen u. a. als Risikofaktoren. Durch anfänglich kleine Intimaläsionen gelangt LDL (low density lipoprotein, =Cholesterintransportpartikel) in die subendotheliale Gefäßschicht. Um dieses extrazellulär abgelagerte LDL aufzunehmen wandern Gewebsmakrophagen in die Läsion ein, phagozytieren LDL und wandeln sich zu sog. Schaumzellen um. Unter physiologischen Bedingungen wird überschüssig gespeichertes Cholesterin durch HDL (high density lipoproteins) aufgenommen und zurück zur Leber transportiert. Ist dieser Transportmechanismus überlastet, so setzen die Schaumzellen und eingewanderte immunkompetente Zellen Entzündungsmediatoren frei, welche u. a. zur Proliferation glatter Muskelzellen, Fibrose der Interzellulärsubstanz und nekrotischen Arealen führen. Es entstehen wachsende Gefäßwandplaques und –stenosen, deren Stabilität vom komplexen Zusammenspiel von Adhäsionsmolekülen, Monozyten, Immunzellen, Endothelzellen,

Zytokinen, Transmittern, Proteinasen und Nekrose abhängt. Eine Plaqueruptur kann durch lokale Thrombosierung ein akutes myokardiales Syndrom auslösen (63 - 66).

Bis heute unbeantwortet bleibt jedoch die Frage, warum LDL als körpereigenes Substrat in atherosklerotischen Plaques zu einer chronischen Inflammationsreaktion führt. Vor ca. 20 Jahren postulierte Steinberg et al., dass LDL durch oxidative Veränderungen zu einem entzündungsauslösenden Molekül umgewandelt wird (ox-LDL) (67). In etlichen klinischen Studien konnte die Wirksamkeit von Antioxidantien als KHK-Therapeutika jedoch nicht bestätigt werden (68). Mittlerweile favorisiert man die Hypothese einer subendothelialen enzymatischen Modifikation von LDL (E-LDL). Dieser enzymatische Umbau legt Bindungsstellen für CRP (Complement-reaktives Protein) frei; vermittelt durch den klassischen Aktivierungsweg des Komplementsystems folgt eine Entzündungsreaktion (69, 70).

Die folgende Abbildung stellt die ox-LDL- und die E-LDL-Hypothese gegenüber:

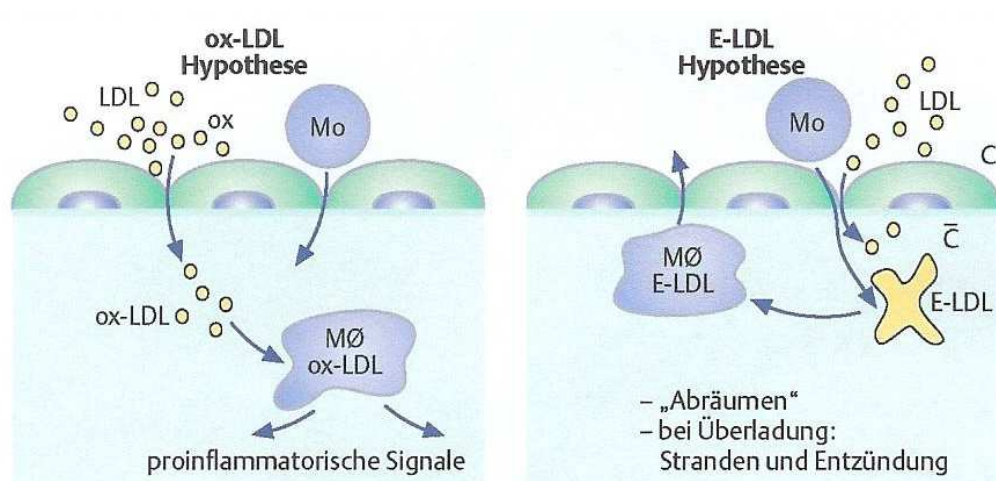


Abbildung 7: schematische Gegenüberstellung der ox-LDL- und der E-LDL-Hypothese.

Mo: Monozyt; MØ: Makrophage; C: Komplementfaktoren. Aus (63).

1.2.3.2 Komplementsystem und Atherosklerose

Mittels monoklonaler spezifischer Antikörper gegen enzymatisch modifiziertes LDL konnte dessen Existenz in allen atherosklerotischen Läsionen gemeinsam mit CRP und Komplement nachgewiesen werden (71, 72). Inwieweit die Aktivierung des Komplementsystem bei der Pathogenese der Atherosklerose eine Rolle spielt, konnte tierexperimentell veranschaulicht werden: Bei Complement-defizienten Kaninchen zeigten sich nach Cholesterinfütterung signifikant geringere atherosklerotische Veränderungen als bei gesunden (73). Weiter konnte gezeigt werden, dass die unspezifische artifizielle Aktivierung des Immunsystems von Kaninchen zu einer Beschleunigung der Atherosklerose führt (74).

Davon abgesehen stellt das Komplementsystem einen wesentlichen Faktor für die Immunkompetenz eines Organismus dar. Ein erworbenes oder angeborenes Fehlen von Komplementfaktoren kann z. B. zu Glomerulonephritis, Vaskulitiden und zu rezidivierenden eitrigen Infektionen durch *H. influenzae*, *S. pneumoniae* und *N. meningitidis* führen (75, 76). Mittlerweile scheint ein Zusammenhang zwischen der Aktivität des Komplementsystems und dem Myokardinfarkt ebenfalls sehr wahrscheinlich:

Es konnte gezeigt werden, dass neben anderen Entzündungsmediatoren sowohl CRP als auch Komplementfaktoren nicht nur innerhalb atherosklerotischer Plaques, sondern auch in infiziertem Myokardgewebe gebildet werden und dort nachgewiesen werden können (72, 77, 78). Dieser Sachverhalt bestätigte sich ebenfalls im Tierexperiment. In Kaninchenherzen stieg die lokale Komplementkonzentration im Ischämieversuch eindeutig an (79). Eine andere Studie findet in humanem Infarktareal einen signifikanten Anstieg von CRP- und Komplementkonzentrationen während der ersten Stunden nach Myokardinfarkt (70).

Darüber hinaus häufen sich in den letzten Jahren Hinweise auf einen direkten Zusammenhang von systemisch erhöhten CRP- und Komplement-Plasmaspiegeln mit Atherosklerose und Herzinfarkt (80 - 83). Zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass erhöhte CRP- und C3-Serumkonzentration mit den wichtigsten Risikofaktoren für die Atherosklerose und den Myokardinfarkt korrelieren (84). Weiter wurde ein direkter unabhängiger Zusammenhang zwischen hohen C3-Konzentrationen und dem Herzinfarkttrisiko beschrieben (85). Ebenfalls wurde der CRP-Serumspiegel als unabhängiger kardiovaskulärer Risikofaktor beschrieben (81).

Inwiefern diese Erkenntnisse für die individuelle Evaluation des Risikoprofils eines Patienten oder für die weiterführende Diagnostik einer Myokardischämie relevant sind, bleibt allerdings abzuwarten.

1.2.3.3 Komplementinhibition – eine therapeutische Chance?

Die komplementinduzierten Gewebeschäden, insbesondere der gesteigerte Reperfusionsschaden nach Myokardinfarkt, geben Anlass zu Studien über therapeutische Interventionsmöglichkeiten am Komplementsystem. Um seine zytopathologischen Effekte zu mindern, erprobt man verschiedene Möglichkeiten der Komplementinhibition, sei es durch rekombinante Regulatorproteine, monoklonale Anti-Komplement-Antikörper oder durch Rezeptorantagonisten (86). In Tierversuchen konnten z. B. durch die Applikation von C1-Inhibitoren und C3- und C5-Konvertase-Inhibitoren, durch Gabe von Compstatin als C3-Inhibitor, monoklonalen Antikörpern gegen C5 und Mannose-bindendes Lectin, bis hin zur totalen Komplementinhibition positive Effekte auf den Myokardinfarkt und die Infarktgröße nachgewiesen werden (87 - 92).

1.2.4 Genetische Varianten im C3-Gen und ihre pathogenetische Bedeutung

Durch Protein-SDS-Gelelektrophorese konnte gezeigt werden, dass das C3-Protein in zwei unterschiedlichen Formen vorkommt: das C3-F (fast) und das C3-S (slow). Botto et al. beschrieb 1990 erstmals die genetische Grundlage für diesen beiden Varianten: Eine Einzelbasenmutation von C nach G in Exon 3, Nukleotidposition 364, führt auf Proteinebene zu einem Austausch eines Arginin (C3-S) zu einem Glycin (C3-F). Für eine zweite 1986 entdeckte C3-Proteinvariante, HAV 4-1+/ HAV 4-1-, konnte er ebenfalls die genetische Grundlage in Exon 9, Kodon 314, lokalisieren. Durch einen Einzelbasenaustausch von C nach T kommt es auf Aminosäureebene zu einem Austausch eines Leucin (HAV 4-1+) zu einem Prolin (HAV 4-1-) (93, 94).

In einigen Studien konnten Assoziationen der selteneren C3-F-Variante mit verschiedenen Erkrankungen gezeigt werden. So zeigten sich positive Korrelationen mit Colitis ulcerosa (95), Morbus Crohn (96), systemischer Vaskulitis (97) ANCA-positiver Vaskulitis (98) und der Osteoarthritis bei Migränepatienten (99).

Desweiteren konnte bisher ein Zusammenhang der selteneren C3-F Variante mit einem erhöhten KHK-Risiko bei Patienten mit essentieller Hypertonie nachgewiesen werden (100, 101). Eine Untersuchung unter Kindern, von denen beide Eltern oder ein Eltern- und ein Großelternanteil vor dem 45. Lebensjahr einen Herzinfarkt erlitten haben, war eine signifikant höhere Anzahl an C3-F-Allelträger zu finden (102). Császár et al. zeigt darüber hinaus eine direkte Korrelation des C3-F-Phänotyps mit dem Myokardinfarkt beim Vergleich von gesunden Kontrollpersonen mit Patienten, welche einen Herzinfarkt überlebt hatten (103). Diese Tatsache konnte jedoch zuvor von Golabi et al. nicht bestätigt werden (104).

In der vorliegenden Arbeit wurden neben diesen Einzelbasensubstitution, die beide Auswirkungen auf die C3-Proteinstruktur haben, noch zwei weitere bisher unbekannte Repeatpolymorphismen im C3-Gen untersucht.

In der Genübersicht sind die vier untersuchten Polymorphismen im C3-Gen nach ihrer Lokalisation eingezeichnet:

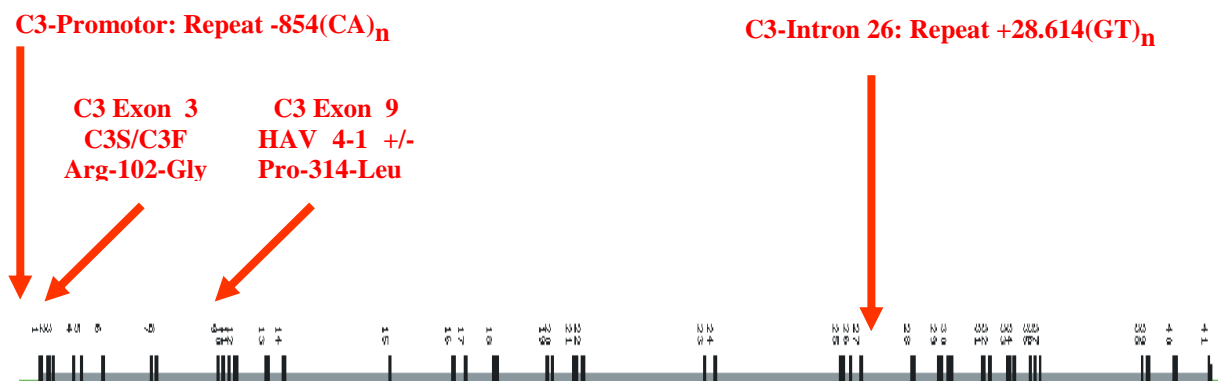


Abbildung 8: Lokalisation der ausgewählten genetischen Marker im C3-Gen.

1.3 Ziel der Arbeit

Es konnte gezeigt werden, dass das Komplementsystem mit seiner wichtigsten Serumkomponente C3 bei der Pathogenese der Atherosklerose und des Myokardinfarkts eine zentrale Rolle spielt. Lokale und systemische Erhöhung des Serumspiegels wirken sich ungünstig auf die Prognose der KHK aus.

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Polymorphismen im C3-Gen untersucht: Repeat-Polymorphismus im C3-Promotor (-854(CA)_n), SNP im C3-Exon 3 (C3-S / C3-F), SNP im C3-Exon 9 (HAV 4-1 - / HAV 4-1 +) und Repeat-Polymorphismus im C3-Intron 26 (+28.614(GT)_n). Anhand zweier Fall-Kontroll-Kollektive (Augsburger Herzinfarktregister und Regensburg-Lübeck Herzinfarkt Familienregister) soll mittels Haplotypanalyse auf deren Assoziation zum Myokardinfarkt geprüft werden. Insbesondere soll die Hypothese bestätigt werden, dass Träger des seltenen C3-F-Variante im C3-Exon 3 ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko aufweisen.

2.1. Materialien

2.1.1 Patientenkollektive und DNS

In der vorliegenden Arbeit wurden vier Polymorphismen in zwei Herzinfarktkollektiven sowie zwei Kontrollkollektiven untersucht.

2.1.1.1 Darstellung der Patienten- und Kontrollkollektive

Das Augsburger Herzinfarktregister (KORA Herzinfarktstudie 1996/97, n=612) besteht aus Patienten (w/m, 31-71 Jahre) mit einem ohne familiäre Häufung sporadisch aufgetretenen Herzinfarkt vor dem 60. Lebensjahr. Als zugeordnetes Kontrollkollektiv (n=1.675) diente der dritte Augsburg MONICA Survey 1994/95, welcher einen repräsentativen Bevölkerungsquerschnitt aus der Region Augsburg darstellt.

Das Regensburg-Lübeck Herzinfarkt Familienregister (gesamt n=7.536) setzt sich aus Herzinfarktpatienten mit familiär gehäuften Herzinfarkttrisiko zusammen. Damit die entsprechende Familie in die Studie eingeschlossen wurde, musste der Index-Patient bis zum 60. Lebensjahr und mindestens ein Geschwister bis zum 70. Lebensjahr einen Herzinfarkt oder eine Koronarintervention (ACVB oder PTCA) aufweisen. Das zugeordnete Kontrollkollektiv (n=1.469) setzte sich aus den nicht-betroffenen Ehepartnern der Indexpatienten zusammen. Dieses Kollektiv wurde durch Screening von über 200.000 Krankenakten in 15 deutschen Reha-Kliniken identifiziert.

Alle Patienten und Kontrollpersonen wurden ausführlich phänotypisch charakterisiert. Hierzu wurde eine genaue Anamnese erhoben, die insbesondere auf die Erfassung des kardiovaskulären Risikoprofils (Bluthochdruck, Hypercholesterinämie, Rauchen), auf eine detaillierte Erfassung kardiovaskulärer Ereignisse in der Familie sowie auf die jeweilige aktuelle Medikation abzielte. Nach standardisierten Protokollen wurden von geschultem Personal folgende Parameter erhoben: Ruhe-Blutdruck in mm Hg, Größe in m, sowie Gewicht in kg. Darüber hinaus wurden bestimmte laborchemische Analysen durchgeführt (Gesamtcholesterin, LDL-, HDL-Cholesterin, Triglyzeride, HbA1c, Glucose). Die Kontrollen des dritten Augsburg MONICA Survey 1994/95 wurden darüber hinaus echokardiographisch charakterisiert. Alle Patienten und Kontrollen willigten schriftlich in die Untersuchungen ein. Die Ethikkommission der Universität Regensburg hat dem Studienprotokoll zugestimmt.

Als repräsentative Stichprobe wurden für die vorliegende Arbeit insgesamt 1.763 Herzinfarktpatienten und Kontrollpersonen aus dem Augsburger Herzinfarktregister und Regensburg-Lübeck Herzinfarkt Familienregister untersucht. Komplette phänotypische Daten und genotypische Haplotypsätze liegen bei 1.256 (=71,24%) Probanden vor. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht:

	Augsburger Herzinfarktregister KORA-cases/MONICA-controls		Regensburg-Lübeck Herzinfarkt Familienregister	
Anzahl	Herzinfarkte	Kontrollen	Herzinfarkte	Kontrollen
		371	265	332
Gesamt	536		620	
	1.256			

2.1.1.2 Extraktion der genomischen Probanden-DNS

Die Patienten-DNS wurde aus Leukozyten aus EDTA-Blut isoliert (Pure Gene DNA Kit®, Gentron, USA). Mittels spektrometrischer Messung bei 260 und 280 nm wurde anschließend die Konzentration und Reinheit der DNA festgestellt.

Zur Konservierung wird die gewonnene DNS zur Langzeitlagerung bei -80°C , ansonsten bei -20°C eingefroren.

Für die Analyseschritte werden die Proben in genormten 96-well-plates positioniert und unmittelbar vor der weiteren Verwendung aufgetaut.

2.1.2 Gelelektrophorese: Materialien und Geräte

TBE-Puffer:	
- 108 g Tris Base	USB US 75825
- 55 g Borsäure	Merck
- 7,44 g EDTA	Sigma
Agarose	NEEO Ultra Qualität 2267,4, Roth
Ethidiumbromid	Molecular Probes Europe BV
Laborwaage	Sartorius 1712004
Erlenmayerkolben Weithals (500 ml)	Merck 214Q1174
Mikrowellengerät	Privileg 9023
Magnetrührer	Heidolph MR 3001#
Elektrophoresekammer	OWL Separation Systems
Spannungsquelle	Biometra Power Pack P25
Geldokumentationsanlage	BioDoc 2000, Biometra

2.1.3 DNS-Amplifikation, PCR: Materialien und Geräte

2.1.3.1 Materialien für die PCR

10x PCR-Puffer	
- 250 ml KCl (1M)	Merck
- 50 ml Tris HCl (1 M, pH 8,3)	Merck
- 7,5 ml MgCl ₂ (1 M)	Merck
- ad 500 ml aqua dest.	Braun (Aqua für Injektionszwecke)
- + 0,5 g Gelatine	Merck
dNTPs	Promega U1240
Taq-Polymerase	Panscript DNS Polymerase
Mastermix (für C3 Intron 26)	Eppendorf
Pipettenspitzen	ART DNase & RNase Free
96-well-plate	Costar 1401001
PCR-Gerät	Gene Amp PCR System 9600, Perkin Elmer
Zentrifuge	Megafuge 1,0, Heraeus

2.1.3.2 Primerauswahl

Die ausgewählten Primerpaare flankieren den zu untersuchenden DNS-Abschnitt und werden computergestützt ausgewählt und anschließend experimentell optimiert.

C3-Promotor R	BioTeZ (5') – TTT TCC AAG GAG GCT CCC – (3')
C3-Promotor F	(5') – <u>6-FAM</u> –ATA TGC TGT CAA CAG GGA TGG – (3'), fluoreszenzmarkiert
C3-Promotor F	(5') – <u>HEX</u> –ATA TGC TGT CAA CAG GGA TGG – (3'), fluoreszenzmarkiert
C3 Exon 3 R	BioTeZ (5') – GAC AAA GAG GCC TCG TGA GA – (3')
C3 Exon 3 F	(5') – AAG AAT AAT GGG CAG GCA AG – (3'),
C3 Exon 9 R	BioTeZ (5') – CAC TCT GAG CCT CCC TCC TTA GAC – (3')
C3 Exon 9 F	(5') – ATA GAC GGA GGC CGC TTT GAT – (3'),
C3 Intron 26 R	Qiagen (5') – GGA GGT TGC AGT GAG CCA AG – (3')
C3 Intron 26 F	(5') – <u>6-FAM</u> –CAA AAC ATA TTC TGA GAC CGG ACC – (3'), fl.-markiert

2.1.4 Enzymverdau: Materialien und Geräte

Der Enzymverdau wurde in 96-well-plates in PCR-Geräten bei konstanter Temperatur von 37,0 °C durchgeführt.

C3 Exon 3 Hha I	New England BioLabs	5'...GCG [^] C...3' 3'...C [^] GCG...5'
C3 Exon 9 Ava I	New England BioLabs	5'...C [^] PyCGPuG...3' 3'...GPuGCPy [^] C...5'

2.1.5 Fragmentlängenanalyse: Materialien und Geräte

Alle Materialien und Geräte von ABI (Applied Biosystems):

Analysegerät	ABI PRISM® 3100
96-well-plate	Optical plate 96
Probenpuffer	Hi-Di™ Formamid
Längenstandard	GeneScan™-500 size standard
Elektrodenpuffer	Buffer (10x) with EDTA
Polymer	ABI PRISM 3100 Performance Optimized Polymer™, POP 6
Filterset	3100 Matrix Standard Set CS-30

2.2. Methoden

2.2.1 Gelelektrophorese

2.2.1.1 Prinzip der Gelelektrophorese

Gele dienen als Trennsystem für unterschiedlich große Moleküle. Bestandteile einer Probe können ihrer Größe nach aufgetrennt und bei Bedarf einzeln weiterverarbeitet werden. Im elektrischen Feld wandern sie gemäß ihrer Eigenladung zur Anode bzw. Kathode, wobei große Moleküle weniger weit wandern als kleine. Durch Vergleich mit Längenstandards kann die Größe des Moleküls abgeschätzt werden.

2.2.1.2 Agarosegele: Herstellung und Eigenschaften

Bei der Herstellung wird die Agarose in 1x TBE-Puffer gelöst und bis zum Sieden und Aufklaren erhitzt (hier: 1,5%ige Lösung: 4,5 g Agarose / 300 ml TBE). Unter ständigem Rühren kühlt die Agarose auf ca. 40°C ab. Nach Zugabe von Ethidiumbromid (hier 10 µl/300 ml Agarosegel) gießt man das Gel zum Erstarren in ein Tray und bildet Probenaschen mittels Kämmen.

Durch Variation der Agarosekonzentration von 0,5 %ig bis 3,0 %ig können DNS-Fragmente zwischen 0,05 kb und 30 kb gut voneinander getrennt werden.

2.2.1.3 Elektrophorese der Amplifikationsprodukte

In den Elektrophoresekammern werden die Gele mit 1x TBE-Puffer überschichtet. Die PCR-Produkte sinken – im Verhältnis 1:2 gemischt mit einem Laufpuffer höheren spezifischen Gewichts als Wasser – in die Probenaschen. Durch Anlegen einer Spannung von 120 V für etwa 45 min. wandern die negativ geladenen DNS-Fragmente gemäß ihrer Größe zur Anode des elektrischen Feldes.

2.2.1.4 Auswertung und Dokumentation der Gelelektrophorese

Ethidiumbromid interkaliert in die doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure und lässt die DNS unter UV-Licht fluoreszieren. Moleküle gleicher Größe werden somit als Banden im Gel sichtbar und das Ergebnis kann mittels einer Kamera dokumentiert und ausgewertet werden.

2.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion, PCR

2.2.2.1 Prinzip der PCR

Die PCR dient zur spezifischen Amplifikation definierter DNS-Sequenzen.

Zur vorgelegten Template-DNS werden die vier Nucleotide, das ausgewählte Primerpaar, die thermostabile Taq-Polymerase (isoliert aus dem Bakterium Thermus aquaticus) und PCR-Puffer gegeben. Letzterer gewährleistet die Stabilität des pH-Wertes (pH~8) und liefert die nötigen Salzkonzentrationen für die Reaktion.

Durch zyklische Veränderung der Reaktionstemperatur werden die jeweils optimalen Bedingungen für die drei Schritte Denaturierung (92°C), Annealing der Primer (50 – 65°C) und Elongation (72°C) erreicht. Dieser Zyklus wird bis zu 40 mal wiederholt, wobei sich theoretisch die Anzahl der DNS-Moleküle jeweils verdoppeln müsste. Durch Zunahme der Reaktionsprodukte gegen Ende der Reaktion lässt sich jedoch nur ein mittlerer Multiplikationsfaktor von ca. 1,6 erreichen.

2.2.2.2 PCR-Protokolle für die ausgewählten Primerpaare

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die PCR-Protokolle der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primerpaare:

	C3 Promotor -854(CA)_n	C3 Exon 3 C3-F / C3-S	C3 Exon 9 HAV 4-1 +/-	C3 Intron 26 +28.614(GT)_n
DNS-Menge	100 ng	100 ng	100 ng	100 ng
PCR-Mastermix	2,5 µl Puffer 4,0 µl dNTP 1,0 µl Primer F 1,0 µl Primer R 0,2 µl Taq-P. <u>16,3 µl aqua dest.</u> 25,0 µl/Ansatz	2,5 µl Puffer 4,0 µl dNTP 0,5 µl Primer F 0,5 µl Primer R 0,2 µl Taq-P. <u>17,3 µl aqua dest.</u> 25,0 µl/Ansatz	2,5 µl Puffer 4,0 µl dNTP 0,5 µl Primer F 0,5 µl Primer R 0,2 µl Taq-P. <u>17,3 µl aqua dest.</u> 25,0 µl/Ansatz	1,0 µl Primer F 1,0 µl Primer R 10,0 µl Mastermix (Eppendorf) 1,0 µl Mg-Lösung <u>12,0 µl aqua dest.</u> 25,0 µl/Ansatz
PCR-Protokoll	95° 5' 94° 30'' \\ *55° 30'' 35x 72° 30'' / 72° 10' 16° forever	95° 5' 94° 30'' \\ *61° 30'' 38x 72° 30'' / 72° 10' 16° forever	95° 5' 94° 30'' \\ *57° 30'' 35x 72° 30'' / 72° 10' 16° forever	95° 5' 94° 30'' \\ *57° 30'' 38x 72° 30'' / 72° 10' 16° forever

* Die optimalen annealing-Temperaturen für die jeweiligen Primerpaare wurden durch Gradienten-PCRs ermittelt. In verschiedenen Test-PCR-Ansätzen werden dabei die Annealing-Temperaturen z. B. von 50°C bis 65°C aufsteigend eingestellt.

Als Zwischenkontrolle des PCR-Ergebnisses eignet sich die Gelelektrophorese. Dazu werden 5µl PCR-Produkt mit 10 µl Ladepuffer vermischt und aufgetragen. Hier kann die Qualität und die erwartete Größe des Produkts mittels Längenstandard qualitativ erfasst werden.

2.2.3 Restriktionsenzymverdau

2.2.3.1 Prinzip des Restriktionsenzymverdaus

Durch ein aus Bakterien isoliertes Enzym wird innerhalb eines DNS-Stranges eine spezifische Basensequenz erkannt und an definierter Stelle geschnitten. Dieses Prinzip kann man sich bei der Detektion von bestimmten Einzelbasensubstitutionen, sog. RFLPs (restriction fragment length polymorphisms), zu nutze machen. Dabei wählt man das Enzym gemäß der normalen Basensequenz oder gemäß der die Mutation enthaltende Sequenz aus.

2.2.3.2 Protokolle für die Enzymverdaue

	C3 Exon 3 (C3-F / C3-S)	C3 Exon 9 (HAV 4-1 +/-)
Enzym	<i>Hha</i> I (aus <i>Haemophilus haemolyticus</i>)	<i>Ava</i> I (aus <i>Anabaena variabilis</i>)
Schnittstelle (mit ^ gekennzeichnet G: Base Guanin C: Base Cytosin Pu: Purinbase Py: Pyrimidinbase)	5'...GCG^C...3' 3'...C^GCG...5'	5'...C^PyCGPuG...3' 3'...GPuGCPy^C...5'
Polymorphismus	C / G	C / T
Genotypen	CC homozygot geschnitten häufiges Allel CG heterozygot GG homozygot nicht geschnitten seltenes Allel	CC homozygot geschnitten häufiges Allel CT heterozygot TT homozygot nicht geschnitten seltenes Allel
Protokoll	0,5 µl Enzym (10 u/Ansatz) 1,5 µl NE Buffer 4 (10x) 0,15 µl BSA 5,85 µl aqua dest. <u>7,0 µl PCR-Produkt</u> 15 µl / Ansatz Inkubation: 37°C für 3 h Elektrophorese: 10 µl Verdauprodukt + Laufpuffer 1,5%iges Agarosegel 45 min Elektrophorese bei 120 V	1,0 µl Enzym (10 u/Ansatz) 1,5 µl NE Buffer 4 (10x) 5,5 µl aqua dest. <u>7,0 µl PCR-Produkt</u> 15 µl / Ansatz Inkubation: 37°C für 3 h Elektrophorese: 10 µl Verdauprodukt + Laufpuffer 1,5%iges Agarosegel 45 min Elektrophorese bei 120 V

2.2.4 Fragmentlängenanalyse mit ABI PRISM® 3100

Die Größe von PCR-Produkten kann im Vergleich mit Längenstandards nur abgeschätzt werden.

Im Genom finden sich häufig repetitive Regionen, in welchen sich z. B. Basendupletts oder –tripletts immer wieder wiederholen. Durch Deletion oder Insertion von solchen Nukleotidstücken im Genom entwickelten sich im Laufe der Evolution unterschiedlich lange repetitive Sequenzen im Erbgut der verschiedenen Individuen.

Die Detektion solcher Repeat-Längenpolymorphismen (Mikrosatelliten) benötigt eine Methode, welche die Länge des Fragments auf wenige Basenpaare genau bestimmen kann.

Diese Möglichkeit bietet in hochtechnisierter Funktionsweise der ABI PRISM® 3100.

2.2.4.1 Prinzip der Fragmentlängenanalyse mit ABI PRISM® 3100

Das Funktionsprinzip des Geräts gleicht dem der Gelelektrophorese. Eine mit Gelmatrix beladene Kapillare taucht zuerst mit dem einen Ende in eine Lösung des zu analysierenden PCR-Produkts ein. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung wandern die Fragmente durch die Gelmatrix (ABI PRISM® 3100 Performance Optimized Polymer™, POP). Analog zur herkömmlichen Gelelektrophorese wandern große Fragmente weniger weit als kleine. Mittels eines Laserstrahls werden die fluoreszenzmarkierten DNS-Stücke detektiert und in ihrer Größe mit einem mitlaufenden Längenstandard verglichen.

Die Datenauswertung erfolgt mittels eines Computerprogramms und erlaubt die genaue Bestimmung der Basenpaaranzahl eines DNS-Fragments.

Mit Verwendung der fluoreszenzmarkieren Primer wird während der PCR jedes amplifizierte DNS-Stück an einem Ende mit dem Farbstoff markiert:



Abbildung 9: Fluoreszenzmarkierung der Amplifikationsprodukte. Schematische Abbildung aus (105).

Zwei 96-well-plates können gleichzeitig vollautomatisch im Gerät analysiert werden:

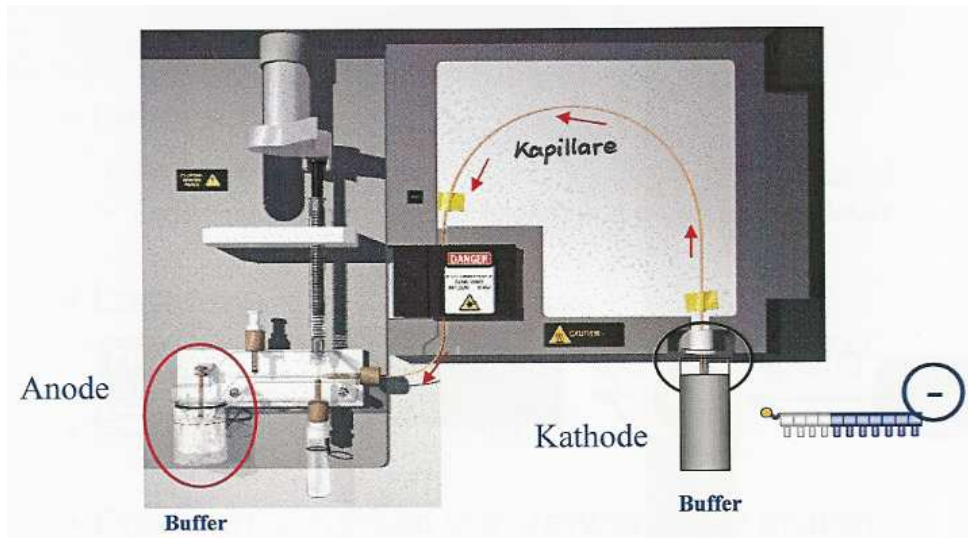


Abbildung 10: Schemazeichnung des prinzipiellen Aufbaus des ABI PRISM® 3100. Aus (105).

Der prinzipielle Aufbau des Detektionssystems ist im folgenden Bild dargestellt:

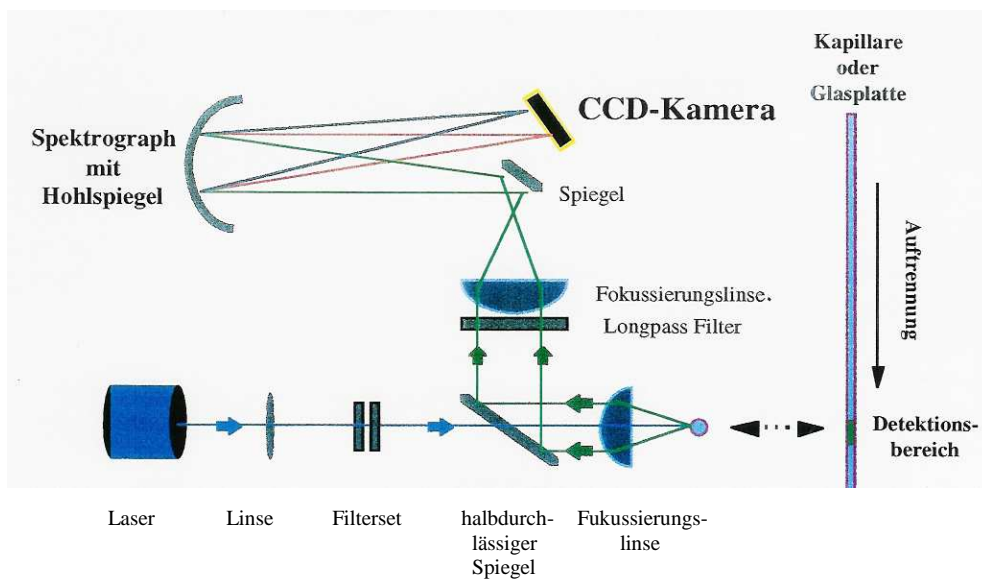


Abbildung 11: schematische Darstellung des Detektionssystems im ABI PRISM® 3100. Aus (105).

2.2.4.2 Vorbereitung und Protokoll für die Fragmentlängenanalyse

Zur Amplifikation des betreffenden DNS-Abschnitts können Standard-PCR-Programme verwendet werden (s. o.). Die beiden Primer sollen den Repeat-Polymorphismus an beiden Enden flankieren, wobei einer der beiden an einem Ende mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert wird. Auf diese Weise ist nach der PCR jedes einzelne DNS-Fragment fluoreszenzmarkiert. Vor der weiteren Verarbeitung des Produkts soll die PCR mittels Gelelektrophorese kontrolliert werden.

In einer für das Gerät genormten 96-well-plate werden pro Ansatz 10 µl Hi-Di™Formamid und 0,5 µl GeneScan™-500 size standard ROX vorgelegt. Das PCR-Produkt wird 1:100 mit aqua dest. verdünnt und davon 5 µl in die jeweilige Plattenposition pipettiert. Durch zu niedrige Verdünnungen der DNS und damit zu hohen Salzkonzentrationen aus dem PCR-Ansatz wird die Analyse gestört und die Ergebnisse unbrauchbar. Unmittelbar vor der Analyse im Gerät wird die DNS bei 92°C für 2 min zu einzelsträngiger DNS denaturiert.

2.2.4.3 Analyserate des Geräts

Eine Fragmentanalyse dauert je nach Größe eine knappe Stunde. Durch die 16-Kapillar-Technik können ebenso viele Proben gleichzeitig laufen. Die Analyse von 192 Ansätzen wird vollautomatisch binnen 10 Stunden durchgeführt und gespeichert.

Das Gerät bietet die Möglichkeit, bis zu drei unterschiedlich markierte DNS-Fragmente pro Ansatz gleichzeitig zu analysieren. Als Farbstoffe kommen TAMRA, HEX, JOE, NED, 5-FAM, 6-FAM, TET oder ROX in Frage. Mit letzterem sind die erhältlichen Größenstandards markiert. Bei der Detektion mittels Argonlaser (Wellenlängenbereich: 488 – 514,5 nm) und Kamera (charge-coupled device camera) können verschiedene Filter vorgeschaltet werden, welche die Unterscheidung der unterschiedlichen Farbstoffe ermöglicht. Je nach Filterset können vier dieser Farbstoffe miteinander kombiniert werden. Durch dieses DNS-Pooling kann die Analyserate auf maximal 60 Genotypisierungen pro Stunde gesteigert werden.

2.2.4.4 Analyse des C3-Promotor- und C3-Intron-26-Repeatpolymorphismus

Nachfolgende Tabelle gibt das Vorgehen und die Geräteeinstellungen für die beiden untersuchten Fragmentlängenpolymorphismus wieder:

Primer	C3-Promotor (C3 CA F/R)	C3 Intron 26	
Floureszenzmarkierung	C3 CA F 6-FAM C3 CA F HEX C3 CA R unmarkiert	C3 Intron 26 F 6-FAM C3 Intron 26 R unmarkiert.	
Repeatpolymorphismus	...CACACACA...	...GTGTGTGT...	
Längenstandard	GeneScan™-500 size standard ROX (35 50 75 100 139 150 160 200 250 300 340 350 400 450 490 500 bp)		
Pipettierschema	9,5 µl Hi-Di-Puffer 0,5 µl Standard ROX 2,5 µl PCR-Produkt (1:50) (6-FAM-markiert) 2,5 µl PCR-Produkt (1:50) (HEX-markiert) hier werden zwei unterschiedlich floureszenzmarkierte in einem Ansatz gepoolt und später gleichzeitig im Gerät analysiert.	9,5 µl Hi-Di-Puffer 0,5 µl Standard ROX 5,0 µl PCR-Produkt (1:100) (6-FAM-markiert) In diesem Fall werden die Proben aufgrund besserer Analyseergebnisse nicht gepoolt.	
Geräteeinstellungen	Identische Einstellungen: die run-modules sind für Standard-Fragmentanalysen vom Hersteller optimiert und im Gerät voreingestellt:		
	Run-module Run temperature Cap fill volume Current tolerance Run current Voltage Tolerance Pre Run voltage Pre Run time Injection voltage Injection time Run voltage number of steps voltage step interval Data delay time Run time	60 184 100 100 0,6 15 180 1 22 15 10 60 1 2100	Intervalle: 18-65°C 1-200 steps 1-100 µAmps 1-200 µAmps 0,25-2,0 kVolts 0-15 kVolts 1-1000 sec 1-15 kVolts 1-600 sec 0-15 kVolts 1-100 steps 1-60 sec 1-3600 sec 300-14000 sec

Geräteeinstellungen	Polymer: ("Gel")	ABI PRISM® 3100 Performance Optimized Polymer™ POP-6™	
	Filterset:	Dye-Set D Mit diesem Filterset können die Farbstoffe <u>6-FAM</u> , <u>HEX</u> , <u>NED</u> und <u>ROX</u> kombiniert werden. Es genügt somit den Anforderung der vorliegenden Protokolls.	
Vorhandene Allele	C3-Promotor: 8 Allele		C3 Intron 26: 8 Allele
	274 bp		191 bp
	276 bp		193 bp
	282 bp		195 bp
	284 bp		197 bp
	286 bp		199 bp
	290 bp		201 bp
	292 bp		203 bp
	294 bp		205 bp

2.2.5 Verwaltung und Kontrolle der Einzelergebnisse

Die Einzelergebnisse aller Genotypisierungen wurden gemäß ihrer Position auf den 96-well-plates den Patientenidentifikationsnummern in einer Datenbank zugeordnet.

384 Patientenproben wurden auf unterschiedlichen Plattenpositionen doppelt analysiert, wobei die Ergebnisse aller Doppelbestimmungen übereinstimmten. Als weitere interne Kontrolle muss auf die stets negativen Ergebnisse der Leerwerte geachtet werden.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Kollektive

Insgesamt wurden 1.763 Personen aus dem Regensburg-Lübeck Herzinfarkt-Familienregister und aus dem Augsburger Herzinfarktregister untersucht. Komplette phänotypische Daten und genotypische Haplotypsätze liegen bei 1.256 (=71,24%) Probanden vor. Die Zahl der eliminierten Fälle/Kontrollen erklären sich zum einen durch die unterschiedliche Qualität des DNS-Materials und der labortechnischen Methodik und zum anderen dadurch, dass für die folgenden Berechnungen ausschließlich eindeutige Analyseergebnisse berücksichtigt wurden, damit ein hohes Maß an Reliabilität der Testwerte erreicht werden konnte. Um diesem Anspruch Rechnung zu tragen wurden bei 384 zufällig ausgewählten Fällen die Ergebnisse doppelt bestimmt.

Die nachfolgende Tabelle wurde unter Zuhilfenahme des Programms SPSS 12.0 für Windows® erstellt und gibt eine Übersicht über phänotypische Daten des gesamten Untersuchungskollektivs:

zur Erklärung: *)

Hypertonie: falls RR (diastolisch) ≥ 95 mmHg und/oder RR (systolisch) ≥ 160 mmHg und/oder Patient erhält antihypertensive Therapie.

Diabetes: falls anamnestisch Diabetes bekannt und/oder Patient erhält antidiabetische Therapie.

Rauchen: aktuell: zur Zeit der Evaluation
jemals: positive Raucheranamnese

	Herzinfarktpatienten		gesunde Kontrollpersonen		Alle Probanden
	Regensburg	Augsburg	Regensburg	Augsburg	
Anzahl [n]	703		553		1256
Geschlecht Frauen [%]	18,5		20,3		19,3
Alter [Jahre]	58,2 ± 7,4		59,0 ± 9,3		58,5 ± 8,3
body-mass-index [kg/m ²]	28,0 ± 3,8		27,2 ± 3,5		27,6 ± 3,7
Cholesterin, gesamt [mg/dl]	227,2 ± 44,8		239,1 ± 42,0		232,0 ± 44,0
LDL [mg/dl]	140,1 ± 38,5		150,4 ± 36,6		144,6 ± 38,0
HDL [mg/dl]	49,1 ± 14,0		53,3 ± 14,6		51,0 ± 14,4
Hypertonie* [%]	94,2		45,0		72,5
Hypertonie Therapie [%]	92,0		30,6		65,0
Diabetes* [%]	15,2		3,4		10,0
Rauchen* aktuell [%]	16,1		20,6		18,1
Rauchen* jemals [%]	76,2		62,2		70,1

3.2 Optimierung der PCR-Bedingungen

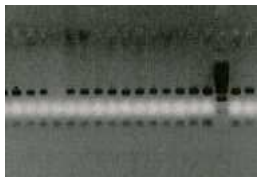
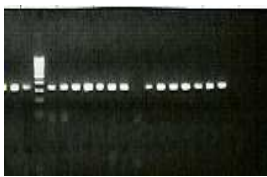
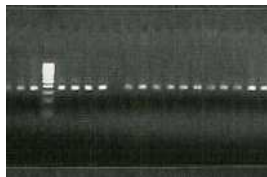
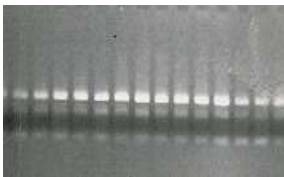
Um während der PCR optimale Bedingungen schaffen zu können sind folgende Voraussetzungen von wesentlicher Bedeutung:

- getrennte, speziell dafür gestaltete Arbeitsbereiche für prä- und post-PCR
- Einhalten strenger Hygienevorschriften, Verunreinigungen vermeiden
- qualitativ hochwertige Chemikalien für den PCR-Ansatz
- Bearbeiten mehrerer PCR-Ansätze gleichzeitig mit am besten automatischen Pipettiersystemen
- standardisierte Amplifikation in PCR-Geräten (hier: Gene Amp PCR System 9600®, Perkin Elmer), standardisierte PCR-Protokolle
- Eindeutige Probenbezeichnung, -archivierung und Ergebnisdokumentation, Verwechslungen vermeiden

Sowohl durch Variation der Menge der Template-DNS und der Konzentrationen der eingesetzten Chemikalien im Mastermix, als auch durch Veränderungen im PCR-Protokoll (Zyklusanzahl, Zykluszeiten, Annealing-Temperaturen), können die Ergebnisse der Amplifikationsreaktion mittels verschiedener Testansätze optimiert werden.

Die optimalen Annealing-Temperaturen für die jeweiligen Primerpaare wurden durch Gradienten-PCRs ermittelt. Dabei werden in verschiedenen Test-PCR-Ansätzen die Annealing-Temperaturen während der PCR z. B. von 50°C bis 65°C aufsteigend eingestellt (automatisiert im PCR-Gerät Gene Amp PCR System 9600®, Perkin Elmer). Derjenige Testansatz, welcher in der Elektrophorese augenscheinlich das beste Ergebnis liefert, bestimmt die optimale annealing-Temperatur.

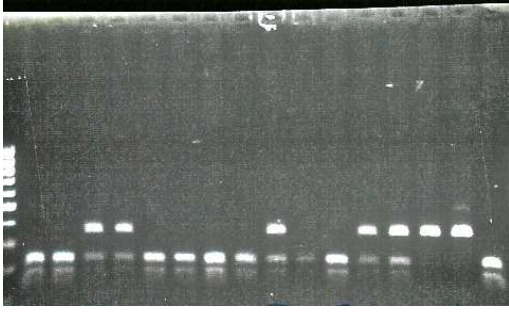
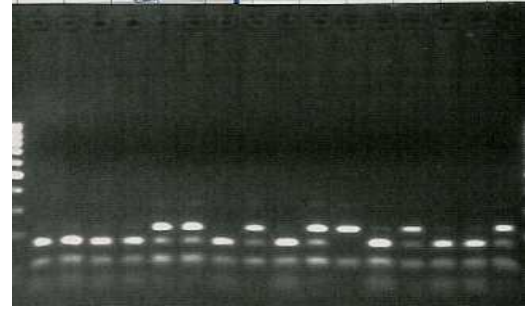
Die Gelelektrophorese eignet sich als Zwischenkontrolle der PCR-Ergebnisse. Dazu werden 5µl PCR-Produkt mit 10 µl Ladepuffer vermischt und aufgetragen. Hier kann die Qualität und die erwartete Größe des Produkts mittels Längenstandard qualitativ erfasst werden.

C3 Promotor -854(CA)_n	C3 Exon 3 C3-F / C3-S	C3 Exon 9 HAV 4-1 +/-	C3 Intron 26 +28.614(GT)_n
			

3.3 Auswertung der Restriktionsenzymverdaue

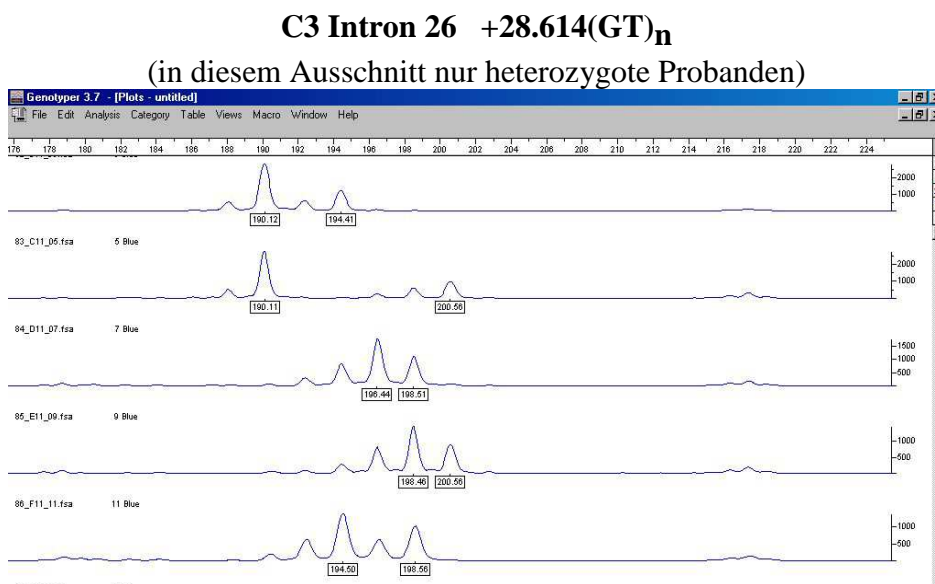
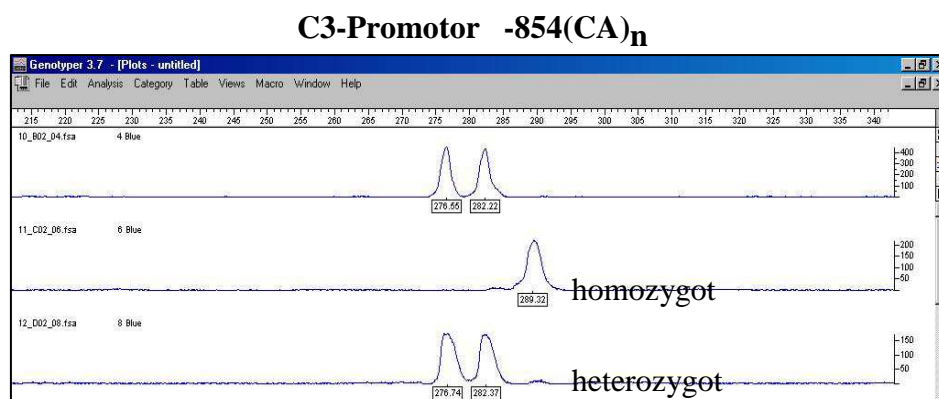
Nach dem anschließenden Enzymverdau wird das verdaute PCR-Produkt elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei ergeben sich für jeden Genotyp charakteristische Bandenmuster:

Schneidet das Enzym das PCR-Produkt vollständig, so ergeben sich zwei Banden. Dies entspricht einem homozygoten Merkmalsträger. DNS-Sequenzen, welche den seltenen Genotyp (Mutation) aufweisen, werden in den vorliegenden beiden Fällen unter Verwendung obiger Enzyme nicht geschnitten. Hier bleibt also das ursprünglich große DNS-Molekül erhalten, welches in der Gelelektrophorese weniger weit wandert und nur zu einer Bande führt. Heterozygote Anlageträger tragen beide Allele und zeigen somit alle drei Banden. Besitzt ein Enzym im ausgewählten Amplifikationsprodukt noch eine konstante Schnittstelle, so ergibt sich ein weiteres mehr oder weniger kleines Fragment, welches zu einer zusätzlichen Bande führt (hier: 53 bp großes Fragment nach Verdau mit Ava I).

C3 Exon 3, Hha I				C3 Exon 9, Ava I			
							
Fragmentgrößen nach Verdau				Fragmentgrößen nach Verdau			
nicht verdaut	CC	CG	GG	nicht verdaut	CC	CT	TT
344 bp	201 bp 143 bp	344 bp 201 bp 143 bp	344 bp	320 bp	169 bp 98 bp 53 bp	222 bp 169 bp 98 bp 53 bp	222 bp 98 bp 53 bp

3.4 Auswertung der Fragmentlängenanalyse

Die Steuerung des Geräts und Datenspeicherung erfolgt mittels der 3100 Data Collection Software®. Bei der Auswertung der Ergebnisse hilft das GeneScan®- und Genotyper®-Programm. Die Signalintensitäten werden dabei durch farbige Peaks in einem Intensität-Fragmentlängen-Diagramm dargestellt. Die Analyseparameter können im Analysemodul angepasst werden.



Während der PCR kommt es bei der Amplifikation dieses Repeat-Polymorphismus im Intron 26 zu Fehlern durch die Taq-Polymerase. Manchmal werden während der Elongation Repeat-Stücke (hier 2 Nukleotide) übersprungen. Die jeweils 2 Basenpaare kürzeren DNS-Fragmente bedingen die niedrigeren, für die Auswertung unzutreffenden Peaks.

3.5 Bezeichnung der untersuchten Allele

Nachfolgende Tabelle gibt eine Übersicht über die im Folgenden verwendeten Bezeichnungen für die gefundenen Allele:

	C3 Promotor -854(CA)_n	C3 Exon 3 C3-F / C3-S	C3 Exon 9 HAV 4-1 +/-	C3 Intron 26 +28.614(GT)_n
1	274 bp	C3-S	HAV 4-1+	191 bp
2	276 bp	C3-F	HAV 4-1-	193 bp
3	282 bp			195 bp
4	284 bp			197 bp
5	286 bp			199 bp
6	290 bp			201 bp
7	292 bp			203 bp
8	294 bp			205 bp

3.6 Berechnung der Allelfrequenzen in den Kontrollkollektiven

Bei der Berechnung der Allelfrequenzen wurden die Kontrollgruppen der beiden Herzinfarktregister, dem dritten Augsburg MONICA-Survey 1994/95 und dem Regensburg-Lübeck Herzinfarkt Familienregister, verwendet.

Von allen Kontrollpersonen liegen insgesamt 553 komplette Haplotypsätze, d. h. alle vier untersuchten Polymorphismen, vor.

Verwendetes Programm: Dprime – Version 0.5 Beta®
(von Linda E. Green, Ethan M. Lange, Carl D. Langefeld)

	C3 Promotor -854(CA)_n	C3 Exon 3 C3-F / C3-S	C3 Exon 9 HAV 4-1 +/-	C3 Intron 26 +28.614(GT)_n
1	0,0008	0,8215	0,8278	0,1863
2	0,4143	0,1785	0,1722	0,0181
3	0,2626			0,0739
4	0,1965			0,2068
5	0,0031			0,3270
6	0,1203			0,1258
7	0,0016			0,0550
8	0,0008			0,0071

Die berechneten Allelfrequenzen aus dem Regensburger und Augsburgener Kontrollkollektiven spiegeln die Häufigkeiten aus der Allgemeinbevölkerung wieder.

Es zeigen sich *keine* signifikanten Unterschiede weder zu den untersuchten Herzinfarktgruppen, noch zu bereits publizierten Ergebnissen.

3.7 Berechnung des paarweisen Kopplungsungleichgewichts D' für die untersuchten Polymorphismen

Die folgenden Tabellen zeigen die paarweisen Haplotyphäufigkeiten der vier untersuchten Polymorphismen auf. Auch hier dienen als Berechnungsgrundlage die 553 Kontrollpersonen, die die Haplotyphäufigkeiten als repräsentativer Querschnitt der Allgemeinbevölkerung widerspiegeln.

Darüber hinaus ist jeweils der Wert D' angegeben, der ein Parameter für das Kopplungsungleichgewicht (LD) ist und Werte zwischen 0 und 1 annimmt. Ein hoher Wert bedeutet, dass die Marker stark gekoppelt sind.

C3-Promotor mit C3 Exon 3	
Haplotyp	Frequenz
1 - 1	0,0008
1 - 2	0,0000
2 - 1	0,4120
2 - 2	0,0023
3 - 1	0,2600
3 - 2	0,0026
4 - 1	0,0237
4 - 2	0,1728
5 - 1	0,0031
5 - 2	0,0000
6 - 1	0,1196
6 - 2	0,0007
7 - 1	0,0016
7 - 2	0,0000
8 - 1	0,0008
8 - 2	0,0000

D' = 0,9607

C3-Promotor mit C3 Exon 9	
Haplotyp	Frequenz
1 - 1	0,0008
1 - 2	0,0000
2 - 1	0,4118
2 - 2	0,0025
3 - 1	0,2561
3 - 2	0,0065
4 - 1	0,0341
4 - 2	0,1624
5 - 1	0,0031
5 - 2	0,0000
6 - 1	0,1196
6 - 2	0,0007
7 - 1	0,0016
7 - 2	0,0000
8 - 1	0,0008
8 - 2	0,0000

D' = 0,9295

C3 Exon 3 mit C3 Intron 26	
Haplotyp	Frequenz
1 - 1	0,1501
1 - 2	0,0179
1 - 3	0,0685
1 - 4	0,1957
1 - 5	0,2459
1 - 6	0,0971
1 - 7	0,0428
1 - 8	0,0036
2 - 1	0,0363
2 - 2	0,0001
2 - 3	0,0054
2 - 4	0,0111
2 - 5	0,0811
2 - 6	0,0287
2 - 7	0,0123
2 - 8	0,0035

D' = 0,2847

C3 Exon 9 mit C3 Intron 26	
Haplotyp	Frequenz
1 - 1	0,1481
1 - 2	0,0179
1 - 3	0,0686
1 - 4	0,1964
1 - 5	0,2527
1 - 6	0,0962
1 - 7	0,0436
1 - 8	0,0043
2 - 1	0,0383
2 - 2	0,0002
2 - 3	0,0053
2 - 4	0,0103
2 - 5	0,0743
2 - 6	0,0296
2 - 7	0,0114
2 - 8	0,0028

D' = 0,2796

C3 Exon 3 mit C3 Exon 9	
Haplotyp	Frequenz
1 - 1	0,8128
1 - 2	0,0088
2 - 1	0,0151
2 - 2	0,1634

D' = 0,9379

C3-Promotor mit C3 Intron 26										
Haplotyp	Frequenz		Haplotyp	Frequenz		Haplotyp	Frequenz		Haplotyp	Frequenz
1-1	0,0008		3-1	0,0039		5-1	0,0006		7-1	0,0000
1-2	0,0000		3-2	0,0079		5-2	0,0000		7-2	0,0000
1-3	0,0000		3-3	0,0121		5-3	0,0000		7-3	0,0000
1-4	0,0000		3-4	0,0426		5-4	0,0013		7-4	0,0000
1-5	0,0000		3-5	0,0437		5-5	0,0000		7-5	0,0008
1-6	0,0000		3-6	0,0331		5-6	0,0013		7-6	0,0008
1-7	0,0000		3-7	0,0092		5-7	0,0000		7-7	0,0000
1-8	0,0000		3-8	0,0000		5-8	0,0000		7-8	0,0000
2-1	0,0193		4-1	0,0435		6-1	0,0082		8-1	0,0000
2-2	0,0063		4-2	0,0026		6-2	0,0005		8-2	0,0008
2-3	0,0520		4-3	0,0044		6-3	0,0054		8-3	0,0000
2-4	0,1354		4-4	0,0114		6-4	0,0161		8-4	0,0000
2-5	0,1482		4-5	0,0838		6-5	0,0506		8-5	0,0000
2-6	0,0320		4-6	0,0361		6-6	0,0224		8-6	0,0000
2-7	0,0179		4-7	0,0128		6-7	0,0151		8-7	0,0000
2-8	0,0031		4-8	0,0020		6-8	0,0020		8-8	0,0000

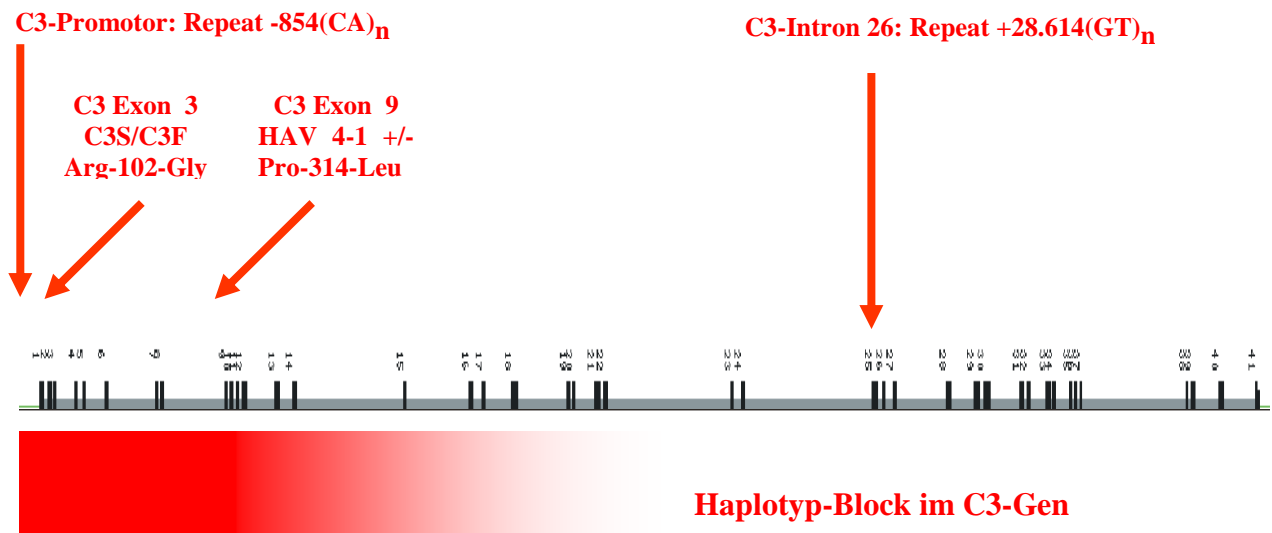
$$D' = 0,3313$$

Übersicht der LD-Parameter D':

D'	C3 Promotor -854(CA) _n	C3 Exon 3 C3-F / C3-S	C3 Exon 9 HAV 4-1 +/-	C3 Intron 26 +28.614(GT) _n
	Basenposition - 854	Basenposition + 2.264	Basenposition + 7.398	Basenposition + 28.614
C3 Promotor		0,9607	0,9295	0,3313
C3 Exon 3			0,9379	0,2847
C3 Exon 9				0,2796

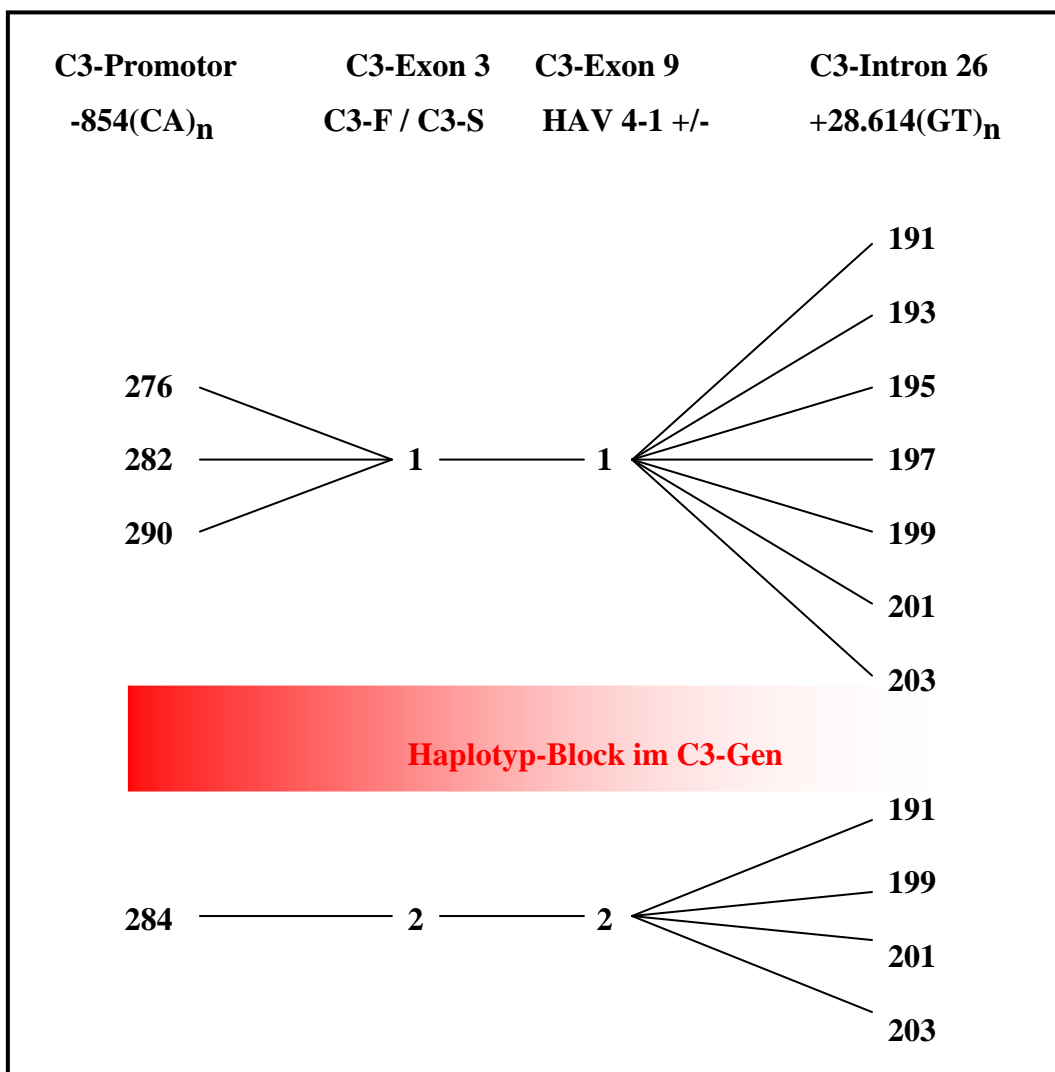
Die Marker im C3-Promotor, C3-Exon 3 und C3-Exon 9 stehen in einem starken Kopplungsungleichgewicht zueinander (D' -Werte nahe 1; siehe Tabelle). Sie befinden sich auf einem Genabschnitt von ca. 8 kb Länge und werden überzufällig häufig gemeinsam als Haplotypblock vererbt. Im Gegensatz dazu bildet sich zwischen dem weiter entfernten Repeat-Polymorphismus im C3 Intron 26 ein Kopplungsgleichgewicht mit allen anderen Markern aus, zu erkennen an deutlich geringeren D' -Werten zwischen 0,2796 (mit dem Exon 9 Polymorphismus) und 0.3313 (mit dem C3 Promotor Polymorphismus).

Nachfolgende Grafik veranschaulicht den Sachverhalt:



3.8 Haplotypstruktur im C3-Gen

Die Graphik repräsentiert die Haplotypstruktur im C3-Gen. Dabei zeigt sich ein enger genetischer Zusammenhang zwischen den Markern im C3-Promotor, C3-Exon3 und C3-Exon 9, sie werden also häufig miteinander gekoppelt vererbt. Erst durch weitere Untersuchungen im C3-Intron 26 konnten die Gruppen stärker unterteilt werden, um eventuelle Einflüsse auf die Entstehung eines Herzinfarkts aufspüren zu können.



3.9 Analyse von Haplotypfrequenzen

In den beiden untersuchten Kollektiven zeigen sich zwischen Herzinfarktpatienten und der gesunden Bevölkerung keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Allelhäufigkeiten im C3-Promotor, C3-Exon 3 und C3-Exon 9. Das dargestellte starke Kopplungsungleichgewicht D' zwischen diesen drei Markern gibt eine hinreichende Erklärung für diesen Sachverhalt.

Unter Hinzunahme des vierten Markers im C3-Intron 26, welcher mit den anderen drei in einem schwachen Kopplungsungleichgewicht steht, ergeben sich folgende Haplotypfrequenzen.

Zur Auswertung wurde das Programm COCAPHASE® von Frank Durbridge verwendet. Es erlaubt Fall-Kontroll-Vergleiche und die Analyse von multi-allelischen Markern. Von der Berechnungen von sehr seltenen Haplotypen (Frequenz < 0,05) wurde hierbei aus Gründen der Verlässlichkeit und Genauigkeit der Testergebnisse abgesehen.

In folgenden Tabellen gelten die folgenden Haplotypbezeichnung:

Beispiel: **276 – 1 – 1 – 195:**

- 276** der Proband ist im C3-Promotor homozygoter oder heterozygoter Träger des Merkmals 276
- 1** der Proband ist im C3-Exon 3 homozygoter oder heterozygoter Träger des Merkmals C3-S
- 1** der Proband ist im C3-Exon 9 homozygoter oder heterozygoter Träger des Merkmals HAV 4-1 +
- 195** der Proband ist im C3-Intron 26 homozygoter oder heterozygoter Träger des Merkmals 195

(weitere Allelbezeichnungen siehe auch Kapitel 3.5)

3.9.1 Haplotypanalyse im Augsburger Herzinfarktregister

Augsburger Herzinfarktregister (KORA-MONICA)				
Haplotypen	Herzinfarkte	Frequenz	Kontrollen	Frequenz
276-1-1-195	21,35	0,05084	35,55	0,09821
276-1-1-197	66,54	0,15840	61,64	0,17030
276-1-1-199	75,10	0,17880	61,81	0,17070
276-1-1-201	34,00	0,08095	26,00	0,07182
282-1-1-191	52,11	0,12410	45,03	0,12440
282-1-1-197	23,95	0,05701	25,61	0,07076
282-1-1-199	33,94	0,08082	24,36	0,06728
290-1-1-199	26,84	0,06391	20,81	0,05748
284-2-2-191	26,89	0,06402	18,97	0,05240
284-2-2-199	43,11	0,10260	32,03	0,08848
		0,96145		0,97183

Augsburger Herzinfarktregister (KORA-MONICA)		
Haplotyp	p-Wert	
276-1-1-195	0,01234245	eher protektiv gegen Herzinfarkt
284-2-2-191	0,31731051	eher prädisponierend für Herzinfarkt

Alle anderen Testpaare zeigen keine signifikanten Unterschiede.

3.9.2

Haplotypanalyse im Regensburger Herzinfarktregister

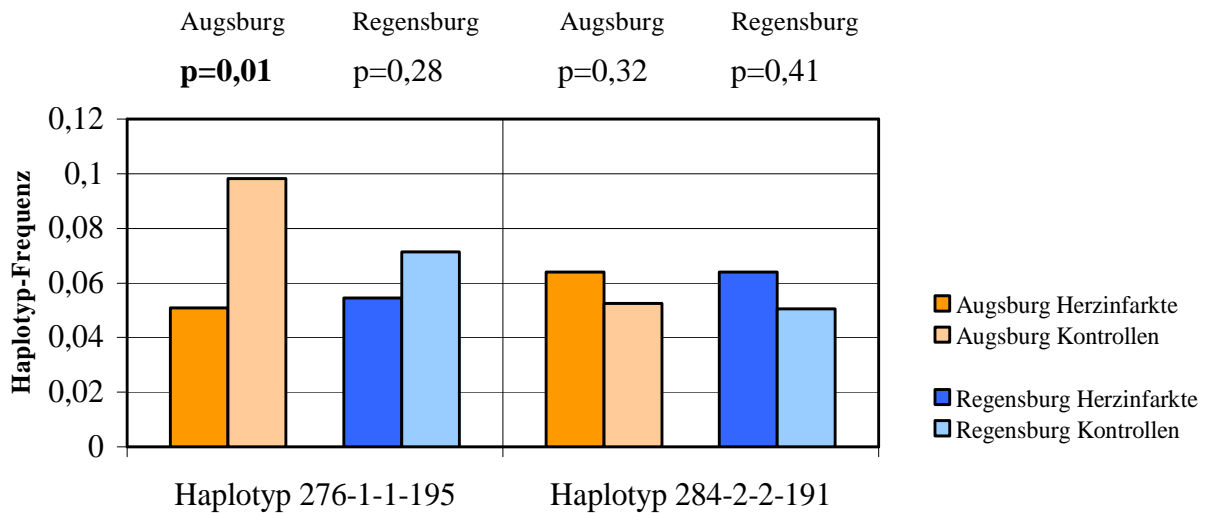
Regensburger Herzinfarktregister				
Haplotypen	Herzinfarkte	Frequenz	Kontrollen	Frequenz
276-1-1-195	22,00	0,05446	23,00	0,07143
276-1-1-197	72,03	0,17830	48,32	0,15010
276-1-1-199	76,95	0,19050	69,54	0,21590
276-1-1-201	21,92	0,05425	18,75	0,05822
282-1-1-191	55,03	0,13620	47,32	0,14690
282-1-1-197	34,97	0,08655	23,68	0,07355
282-1-1-199	-	(<0,05)	-	(<0,05)
290-1-1-199	32,92	0,08148	18,75	0,05822
284-2-2-191	25,87	0,06403	16,28	0,05057
284-2-2-199	42,13	0,10430	28,72	0,08919
		0,95027		0,91408

Regensburger Herzinfarktregister		
Haplotyp	p-Wert	
276-1-1-195	0,27776353	eher protektiv gegen Herzinfarkt
284-2-2-191	0,40548494	eher prädisponierend für Herzinfarkt

Alle anderen Testpaare zeigen keine signifikanten Unterschiede.

3.9.3 Graphische Darstellung der Ergebnisse

Das folgende Diagramm zeigt die Frequenzen der Haplotypen 276-1-1-195 und 284-2-2-191. Ersterer zeigt unter den Augsburger Herzinfarktpatienten und Kontrollpersonen einen signifikanten Unterschied ($p=0,01$); im Regensburg-Lübeck Herzinfarkt Familienregister ist jedoch lediglich der gleiche Trend sichtbar. Haplotyp 284-2-2-191 findet sich in den Infarktgruppen häufiger; aufgrund zu geringer Unterschiede und zu geringer Fallzahlen kann ein Zusammenhang mit dem Herzinfarkt nur vermutet werden.



4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Polymorphismen im C3-Gen auf eine Assoziation mit dem Herzinfarkt untersucht:

Repeat-Polymorphismus im C3-Promotor (-854(CA)_n),
SNP im C3-Exon 3 (C3-S / C3-F),
SNP im C3-Exon 9 (HAV 4-1 - / HAV 4-1 +) und
Repeat-Polymorphismus im C3-Intron 26 (+28.614(GT)_n).

Der akute Myokardinfarkt als häufigste Todesursache der westlichen Welt tritt bei etwa der Hälfte der Patienten ohne Vorwarnung auf (106,107). Im klinischen Alltag beschränkt man sich nach wie vor auf die alleinige Analyse der klassischen Risikofaktoren wie atherogenes Lipidprofil, arterieller Hypertonus, Nikotinkonsum und Diabetes mellitus, um das individuelle Infarktisiko abschätzen und evtl. notwendige Präventivmaßnahmen einleiten zu können. Auf diese Weise können jedoch nur etwa die Hälfte aller auftretenden Infarkte erklärt werden. Als polyätiologisch bedingtes Krankheitsbild schreibt man dem Myokardinfarkt immer mehr ein erblich bedingtes Risiko zu. Gegenstand aktueller Forschung sind folglich Studien zur Identifikation von genetischen Markern, welche überdurchschnittlich häufig mit dem Auftreten eines MI assoziiert sind. Dabei zeigten sich in den letzten Jahren häufig falsch positive und inkonsistenten Studienergebnisse. Als Ursachen dafür diskutiert man zu niedrige Fallzahlen (häufig nur ca. 100 - 300), inhomogene Studienpopulationen und die Tatsache, dass neben den klassischen Risikofaktoren eine sehr große Anzahl an genetischen Markern eine Rolle spielen. Jeder einzelne assoziierte Polymorphismus an sich erhöht dabei das individuelle Infarktisiko nur um wenige Prozentpunkte.

Aus diesem Grund steigen die Anforderungen an Kandidatengenuntersuchungen immer mehr (108):

Zu ihnen gehören

- ein gutes Studiendesign
- ein klares Studienresultat
- ein hohes Signifikanzniveau
- ein biologisch nachvollziehbarer Hintergrund mit einem physiologisch bedeutsamen Effekt eines genetischen Markers auf ein Genprodukt.
- die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in mehreren Populationen (als Familienstudie und als populationsbezogene Studie)

Um diesen Forderungen Rechnung zu tragen, wählten wir bei der vorliegenden Assoziationsstudie o. g. Polymorphismen aus dem Gen für die Komplementkomponente C3, wobei für die bekannteste Variante C3-F und C3-S im Hinblick auf das Infarktisiko bereits positive Korrelationen beschrieben wurden (103). Diese vier genetischen Marker wurden bei insgesamt 1.256 Probanden aus je einer repräsentativen Stichprobe aus dem Augsburger Herzinfarktregister (sporadische Form des MI) und aus dem Regensburg-Lübeck Herzinfarkt Familienregister (familiäre Form des MI) untersucht.

Die Atherosklerose als wesentlicher pathologischer Mechanismus bei einer progredienten KHK und beim Herzinfarkt zeigt sich als entzündlich-proliferative Erkrankung des Gefäßendothels (62). Eine große Bedeutung besitzt dabei neben anderen Entzündungsmediatoren das Komplementsystem mit seiner wichtigsten Komponenten C3. 1990 beschrieb Botto et al. zwei unterschiedliche C3-Proteinvarianten, C3-F und C3-S, denen eine Einzelbasenmutation auf Exon 3 zugrunde liegt (93).

Es konnte bisher ein Zusammenhang der selteneren C3-F Variante mit einem erhöhten KHK-Risiko bei Patienten mit essentieller Hypertonie nachgewiesen werden (100, 101). Eine Untersuchung unter Kindern, von denen beide Eltern oder ein Eltern- und ein Großelternanteil vor dem 45. Lebensjahr einen Herzinfarkt erlitten haben, war eine signifikant höhere Anzahl an C3-F-Allelträger zu finden (102). Császár et al. zeigt darüber hinaus eine direkte Korrelation des C3-F-Phänotyps mit dem Myokardinfarkt beim Vergleich von gesunden Kontrollpersonen mit Patienten, welche einen Herzinfarkt überlebt hatten (103). Diese Tatsache konnte jedoch zuvor von Golabi et al. nicht bestätigt werden (104).

Eine signifikante Häufung der C3-F-Allelfrequenz fand sich ebenso bei Erkrankungen wie Colitis ulcerosa (95), Morbus Crohn (96), systemischer Vaskulitis (97), ANCA-positiver Vaskulitis (98) und Osteoarthritis bei Migränepatienten (99). Allen gemeinsam ist der immunologisch-entzündliche Aspekt während ihrer Pathogenese. Desweiteren schreibt man C3-F-Allelträgern eine erhöhte Rupturgefahr intrakranieller Aneurysmen zu (109).

Im Hinblick auf die dargestellten krankheitsfördernden Effekte von C3-F bleibt jedoch die Frage nach einem biologisch nachvollziehbaren Hintergrund weitgehend offen. Untersuchungen zur Genexpression, Funktionalität und unterschiedliche Einflüsse auf andere Stoffwechselwege von C3-F bzw. C3-S stehen weitestgehend aus. Bisher konnte lediglich Bartok et al. nachweisen, dass die beiden Allele vergleichbar gute Bindungseigenschaften an die unterschiedlichen Komplementrezeptortypen besitzen (110), was also keinen Erklärungsansatz für die beobachteten Phänomene liefert.

Im Hinblick auf das Herzinfarkttrisiko untersuchten wir in zwei großen bayerischen Herzinfarktkollektiven neben dem C3-F/S-Polymorphismus eine weitere bereits beschriebene Einzelbasenmutation im Exon 9, HAV 4-1+ und HAV 4-1-, welche auf Proteinebene ebenfalls zu einem Aminosäureaustausch führt. Bisher liegen keine Assoziationsuntersuchungen dieser Variante mit anderen Erkrankungen vor. Die beiden untersuchten Repeatpolymorphismen in der C3-Promotorregion und im Intron 26 sind in der Literatur bisher ebenfalls nicht beschrieben worden.

In der vorliegenden Arbeit ergeben sich in den Kontrollgruppen, welche einen repräsentativen Bevölkerungsquerschnitt für die Regionen Augsburg und Regensburg darstellen, für die beiden untersuchten Einzelbasenmutationen (SNPs) im C3 Exon 3 und C3 Exon 9 folgende Allelfrequenzen:

C3 Exon 3: C3-S = 0,8215; C3-F = 0,1785

C3 Exon 9: HAV 4-1+ = 0,8278; HAV 4-1- = 0,1722

Verglichen mit den Häufigkeiten unter den Herzinfarktgruppen ergaben sich hier keine signifikanten Unterschiede. Die Darstellung von Császár et al., dass die seltenere C3-F-Variante häufiger unter Herzinfarktpatienten nachzuweisen wäre (103), konnten wir in unseren Untersuchungen nicht eindeutig, wohl aber im gleichen Trend bestätigen. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei der Analyse der anderen Genvariante im C3 Exon 9.

Um die kleinere Gruppe der C3-F- bzw. HAV 4-1--Allelträger auf der Suche nach dem vermuteten „krankheitsauslösenden“ Genort weiter einzugrenzen, wurde ein multi-allelischer Marker (Repeat-Polymorphismus) in der C3-Promotorregion untersucht. Es zeigte sich, dass die C3-F- bzw. HAV 4-1--Variante fast ausschließlich gemeinsam mit dem Allel 284 auftritt, wodurch sich keine neuen Erkenntnisse ergaben.

Berechnungen zum Kopplungsungleichgewicht (LD) erklären diesen Sachverhalt: Hohe paarweise D' -Werte (0,9295 - 0,9607) zwischen den Markern im C3-Promotor, C3 Exon 3 und C3 Exon 9 lassen auf einen bestehenden Haplotypblock in dieser Region im C3-Gen schließen.

Der zweite Repeat-Polymorphismus im C3 Intron 26 liegt außerhalb des gefundenen Haplotypblocks (paarweises D' zwischen 0,2796 und 0,3313) und wird daher weitgehend unabhängig von den drei anderen vererbt. Die Gruppe der Träger der seltenen Varianten im C3 Exon 3 und C3 Exon 9 konnte jetzt in folgende zwei Haplotypgruppen weiter unterteilt werden: 284-2-2-191 und 284-2-2-199. Obwohl sowohl im Augsburger als auch im Regensburger Kollektiv jeweils mehr Herzinfarktpatienten den Haplotyp 284-2-2-191 tragen, konnten auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen erkrankten und gesunden Probanden erhoben werden ($p=0,32$ bzw. $p=0,41$).

Ein eher herzinfarktprotektiver Effekt zeigt sich für den Haplotyp 276-1-1-195. Er kommt bei ca. 0,5 – 1,0 % aller Untersuchten vor und kennzeichnet Träger der häufigen Allele C3-S und HAV 4-1+. Dabei ergab sich im Augsburger Herzinfarktregister ein signifikanter Unterschied zwischen Herzinfarkten (aus KORA) und Kontrollen (aus MONICA) mit einem p -Wert von 0,012. Im Regensburger Familienkollektiv konnte dieser Trend bestätigt werden ($p=0,278$).

Das Komplementsystem mit seiner wichtigsten Komponente C3 spielt bei der Entstehung der Atherosklerose und des Myokardinfarkt eine nachgewiesene zentrale Rolle. Inwiefern jedoch dieser Pathomechanismus durch genetische Einflüsse beeinflusst wird, bleibt Gegenstand aktueller Forschung. Es zeigten sich diesbezüglich erste Hinweise auf ein erhöhtes Risiko für Träger der Variante C3-F. Welche pathophysiologische Rolle diese genetische Variante für die Funktionfähigkeit des Komplementsystems spielt, bleibt bis heute ungewiss.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Hypothese, dass Träger des seltenen C3-F-Gens für das Auftreten eines Herzinfarkts prädisponiert seien, nicht eindeutig bestätigt werden. Um seltene genetische Varianten - wie auch hier im Falle des C3-Gens - hinsichtlich eines Erkrankungsrisikos analysieren zu können, wären umfangreichere Untersuchungen anzuraten. Zum einen könnte ein genweites Screening mittels mehrerer regelmäßig über das C3-Gen

verteilter Marker die vermutete krankheitsrelevante Region näher eingrenzen und die Suche fokussieren. Zum anderen würden größere Kollektive genauere statistische Analysemöglichkeiten in den kleinen Haplotypuntergruppen bieten.

Die rapide Entwicklung der Gentechnik wird in naher Zukunft solche großangelegten Studien möglich machen.

5. Literaturverzeichnis

- 1) Statistisches Bundesamt (2000) Statistisches Jahrbuch 2000, Metzler Poeschel, Stuttgart, S. 422f.
- 2) Lloyd-Jones DM, Larson MG, Beiser A, Levy D: Lifetime risk of developing coronary heart disease. *Lancet* 353:89-92, 1999.
- 3) Wiesner G, Grimm J, Bittner E, Zum Herzinfarktgeschehen in der Bundesrepublik Deutschland: Prävalenz, Inzidenz, Trend, Ost-West-Vergleich, Robert-Koch-Institut, Gesundheitswesen 61 (1999), Sonderheft 2, S72 ff.
- 4) Hausmann D, Mügge A, Daniel WG, Koronare Herzkrankheit; in: TIM, Thiemes Innere Medizin, 1. Auflage, 1999, S. 1096 ff.
- 5) Yusuf S, Srinath R, Öunpuu S, Anand S (2001) Global burden of cardiovascular disease. Part II: Variations in cardiovascular disease by specific ethnic groups and geographic regions and prevention strategies. *Circulation* 104:2855-2864
- 6) Lowel H, Meisinger C, Heier M, Hormann A, Kuch B, Gostomzyk J, Koenig W, Sex specific trends of sudden cardiac death and acute myocardial infarction: results of the population-based KORA/MONICA-Augsburg register 1985 to 1998, *Dtsch Med Wochenschr.* 2002 Nov 2; 127(44):2311-6
- 7) Heidrich J, Wellmann J, Hense HW, Siebert E, Liese AD, Lowel H, Keil U, Classical risk factors for myocardial infarction and total mortality in the community – 13-year follow-up of the MONICA Augsburg cohort study, *Z Kardiol.* 2003 Jun; 92(6):445-54
- 8) Lloyd-Jones DM, Kannel WB, Coronary Risk Factors: An Overview: in: *Cardiovascular Medicin*, S 2193 ff.
- 9) Critchley JA, Capewell S. Substantial potential for reductions in coronary heart disease mortality in the UK through changes in risk factor levels. *J Epidemiol Community Health.* 2003 Apr;57(4):243-7.
- 10) Burke LA. Primary prevention in patients with a strong family history of coronary heart disease. *J Cardiovasc Nurs.* 2003 Apr-Jun;18(2):139-43. Review.
- 11) Cichon S, Freudenberg J, Propping P, Nöthen MM: Variabilität im menschlichen Genom. Bedeutung für die Krankheitsforschung. *Dtsch Arztebl* 2002; 99: A 3091-3101 [Heft 46]
- 12) Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A: A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Res* 1998; 8: 1229-1231.
- 13) The International SNP Map Working Group: A map of the human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001; 409: 928-933.
- 14) Venter JC, Adams MD, Myers EW et al.: The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291: 1304-1351.
- 15) Assmann G, Cullen P, Schulte H. Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Munster (PROCAM) study. *Circulation.* 2002 Jan 22;105(3):310-5. Erratum in: *Circulation* 2002 Feb19;105(7):900.
- 16) Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H et al.: Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 599-603.
- 17) Eerdewegh P Van, Little RD, Dupuis J et al.: Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature* 2002; 418: 426-430.
- 18) Horikawa Y, Oda N, Cox NJ, Li X, Orho-Melander M, Hara M, Hinokio Y, Lindner TH, Mashima H, Schwarz PE, del Bosque-Plata L, Horikawa Y, Oda Y, Yoshiuchi I, Colilla S, Polonsky KS, Wei S, Concannon P, Iwasaki N, Schulze J, Baier LJ, Bogardus C, Groop L, Boerwinkle E, Hanis CL, Bell GI. Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet.* 2000 Dec;26(4):502.
- 19) Danser AH, Schalekamp MA, Bax WA, van den Brink AM, Saxena PR, Riegger GA, Schunkert H. Angiotensin-converting enzyme in the human heart. Effect of the deletion/insertion polymorphism. *Circulation.* 1995 Sep 15;92(6):1387-8.

- 20) Rodriguez-Perez JC, Rodriguez-Esparragon F, Hernandez-Perera O, Anabitarte A, Losada A, Medina A, Hernandez E, Fiuza D, Avalos O, Yunis C, Ferrario CM. Association of angiotensinogen M235T and A(-6)G gene polymorphisms with coronary heart disease with independence of essential hypertension: the PROCAGENE study. *Prospective Cardiac Gene. J Am Coll Cardiol.* 2001 May;37(6):1536-42.
- 21) Fernandez-Arcas N, Dieguez-Lucena JL, Munoz-Moran E, Ruiz-Galdon M, Espinosa-Caliani S, Aranda-Lara P, Rius-Diaz F, Gaitan-Arroyo MJ, De Teresa-Galvan E, Reyes-Engel A. Both alleles of the M235T polymorphism of the angiotensinogen gene can be a risk factor for myocardial infarction. *Clin Genet.* 2001 Jul;60(1):52-7.
- 22) Aoki S, Mukae S, Itoh S, Sato R, Nishio K, Ueda H, Iwata T, Katagiri T. Genetic background in patients with acute myocardial infarction. *Jpn Heart J.* 2001 Jan;42(1):15-28.
- 23) Holmer S, Hengstenberg C, Kraft HG, Mayer B, Pöll M, Kürzinger S, Fischer M, Löwel H, Klein G, Riegger G, Schunkert H. Association of polymorphisms of the apolipoprotein(a) gene with lipoprotein(a) levels and myocardial infarction. *Circulation.* 2003 Feb 11;107(5):696-701.
- 24) Kolovou G, Yiannakouris N, Hatzivassiliou M, Malakos J, Daskalova D, Hatzigeorgiou G, Cariolou MA, Cokkinos DV. Association of apolipoprotein E polymorphism with myocardial infarction in Greek patients with coronary artery disease. *Curr Med Res Opin.* 2002;18(3):118-24.
- 25) Brscic E, Bergerone S, Gagnor A, Colajanni E, Matullo G, Scaglione L, Cassader M, Gaschino G, Di Leo M, Brusca A, Pagano GF, Piazza A, Trevisan G. Acute myocardial infarction in young adults: prognostic role of angiotensin-converting enzyme, angiotensin II type I receptor, apolipoprotein E, endothelial constitutive nitric oxide synthase, and glycoprotein IIIa genetic polymorphisms at medium-term follow-up. *Am Heart J.* 2000 Jun;139(6):979-84.
- 26) Costa LG, Cole TB, Jarvik GP, Furlong CE. Functional genomics of the paraoxonase (PON1) polymorphisms: effects on pesticide sensitivity, cardiovascular disease, and drug metabolism. *Annu Rev Med.* 2003;54:371-92. Epub 2001 Dec 03. Review.
- 27) Leviev I, Poirier O, Nicaud V, Evans A, Kee F, Arveiler D, Morrisson C, Cambien F, James RW. High expressor paraoxonase PON1 gene promoter polymorphisms are associated with reduced risk of vascular disease in younger coronary patients. *Atherosclerosis.* 2002 Apr;161(2):463-7.
- 28) Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, Stampfer MJ, Eisenberg PR, Miletich JP. Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in apparently healthy men. *N Engl J Med.* 1995 Apr 6;332(14):912-7.
- 29) Girelli D, Russo C, Ferraresi P, Olivieri O, Pinotti M, Friso S, Manzato F, Mazzucco A, Bernardi F, Corrocher R. Polymorphisms in the factor VII gene and the risk of myocardial infarction in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2000 Sep 14;343(11):774-80.
- 30) Reiner AP, Frank MB, Schwartz SM, Linenberger ML, Longstreth WT, Teramura G, Rosendaal FR, Psaty BM, Siscovick DS. Coagulation factor XIII polymorphisms and the risk of myocardial infarction and ischaemic stroke in young women. *Br J Haematol.* 2002 Feb;116(2):376-82.
- 31) Yamada Y, Izawa H, Ichihara S, Takatsu F, Ishihara H, Hirayama H, Sone T, Tanaka M, Yokota M. Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes. *N Engl J Med.* 2002 Dec 12;347(24):1916-23.
- 32) Behague I, Poirier O, Nicaud V, Evans A, Arveiler D, Luc G, Cambou JP, Scarabin PY, Bara L, Green F, Cambien F. β fibrinogen gene polymorphisms are associated with plasma fibrinogen and coronary artery disease in patients with myocardial infarction. *Circulation* 1996;93:440-449
- 33) Snapir A, Mikkelsen J, Perola M, Penttila A, Scheinin M, Karhunen PJ. Variation in the alpha2B-adrenoceptor gene as a risk factor for prehospital fatal myocardial infarction and sudden cardiac death. *J Am Coll Cardiol.* 2003 Jan 15;41(2):190-4.
- 34) Heckbert S, Hindorff L, Edwards K, Psaty B, Lumley T, Siscovick D, Tang Z, Durda P, Kronmal R, Tracy R. β 2-adrenergic Receptor polymorphisms and risk of incident cardiovascular events in the elderly. *Circulation* 2003; 107:2021
- 35) Kunnas TA, Ilveskoski E, Niskakangas T, Laippala P, Kajander OA, Mikkelsen J, Goebeler S, Penttila A, Perola M, Nikkari ST, Karhunen PJ. Association of the endothelial nitric oxide synthase gene

- polymorphism with risk of coronary artery disease and myocardial infarction in middle-aged men. *J Mol Med.* 2002 Sep;80(9):605-9. Epub 2002 Jul 03.
- 36) Nakayama T, Soma M, Saito S, Honye J, Yajima J, Rahmutula D, Kaneko Y, Sato M, Uwabo J, Aoi N, Kosuge K, Kunimoto M, Kanmatsuse K, Kokubun S. Association of a novel single nucleotide polymorphism of the prostacyclin synthase gene with myocardial infarction. *Am Heart J.* 2002 May;143(5):797-801.
 - 37) Bernard V, Pillois X, Dubus I, Benchimol D, Labouyrie JP, Couffignal T, Coste P, Bonnet J. The -308 G/A tumor necrosis factor-alpha gene dimorphism: a risk factor for unstable angina. *Clin Chem Lab Med.* 2003 Apr;41(4):511-6.
 - 38) Ozaki K, Ohnishi Y, Iida A, Sekine A, Yamada R, Tsunoda T, Sato H, Sato H, Hori M, Nakamura Y, Tanaka T. Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nat Genet.* 2002 Dec;32(4):650-4. Erratum in: *Nat Genet.* 2003 Jan;33(1):107..
 - 39) Hengstenberg C, Bröckel U, Holmer S, Björn M, Fischer M, Baessler A, Erdmann J, Lieb W, Löwel H, Riegger G, Schunkert H. Genetische Einflüsse beim Herzinfarkt. Ergebnisse eines Kandidatengen- und eines genomweiten Ansatzes. *Herz* 2002;27:649-61.
 - 40) Broeckel U, Hengstenberg C, Mayer B, Holmer S, Martin LJ, Comuzzie AG, Blangero J, Nurnberg P, Reis A, Riegger GA, Jacob HJ, Schunkert H. A comprehensive linkage analysis for myocardial infarction and its related risk factors. *Nat Genet.* 2002 Feb;30(2):210-4.
 - 41) Wang L, Fan C, Topol SE, Topol EJ, Wang Q. (2003): Mutation of MEF2A in an inherited disorder with features of coronary artery disease. *Science*, 302:1578-81.
 - 42) Helgadóttir A, Manolescu A, Thorleifsson G, Gretarsdóttir S, Jonsdóttir H, Thorsteinsdóttir U, Samani NJ, Gudmundsson G, Grant SF, Thorgeirsson G, Sveinbjornsdóttir S, Valdimarsson EM, Matthiasson SE, Johannsson H, Gudmundsdóttir O, Gurney ME, Sainz J, Thorhallsdóttir M, Andresdóttir M, Frigge ML, Topol EJ, Kong A, Gudnason V, Hakonarson J, Gulcher JR, Stefansson K. (2004): The gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke. *Nat Genet.* 6:233-9.
 - 43) König IR, Schäfer H, Ziegler A, Müller HH. (2003): Reducing sample sizes in genome scans: group sequential study designs with futility stops. *Genet Epidemiol*, 25:339-349.
 - 44) Daly MJ, Rioux JD, Schaffner SF et al.: High-resolution haplotype structure in the human genome. *Nat Genet* 2001; 29: 229-232.
 - 45) Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H et al.: The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 2002; 296: 2225-2229.
 - 46) Reich DE, Cargill M, Bolk S et al.: Linkage disequilibrium in the human genome. *Nature* 2001; 411: 199-204.
 - 47) Dawson E, Abecasis GR, Bumpstead S et al.: A first-generation linkage disequilibrium map of the human chromosome 22. *Nature* 2002; 418: 544-548.
 - 48) Johnson GC, Esposito L, Barrat BJ et al.: Haplotype tagging for the identification of common disease genes. *Nat Genet* 2001; 29: 233-237.
 - 49) Couzin J: Genomics. New mapping project splits the community. *Science* 2002; 296: 1391-1393.
 - 50) Freudenberg J, Cichon S, Nöthen MM, Propping P: Blockstruktur des menschlichen Genoms: Ein Organisationsprinzip der genetischen Variabilität. *Dtsch Arztebl* 2002; 99: A 3190-3195 [Heft 47]
 - 51) Wallis R. Structural and functional aspects of complement activation by mannose-binding protein. *Immunobiology.* 2002 Sep;205(4-5):433-45. Review.
 - 52) Weiss Ch, Jelkmann W, Abwehrfunktion des Blutes; in: Schmidt RF, Thews G, *Physiologie des Menschen*, 27. Auflage, 1997, S. 441f.
 - 53) Petrides PE, Komplement-System; in: Löffler G, Petrides PE, *Biochemie und Pathobiochemie*, 6. Auflage, 1998, S. 1078 ff.
 - 54) Whitehead AS, Solomon E, Chambers S, Bodmer WF, Povey S, Fey G. Assignment of the structural gene for the third component of human complement to chromosome 19. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982 Aug;79(16):5021-5.
 - 55) Abbildung aus <http://bioinfo.weizmann.ac.il/cards-bin/carddisp?C3&search=C3&suff=txt>
 - 56) Abbildung aus <http://snpper.chip.org/bio/show-gene/9534>

- 57) de Bruijn MH, Fey GH. Human complement component C3: cDNA coding sequence and derived primary structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 Feb;82(3):708-12.
- 58) Vik DP, Amiguet P, Moffat GJ, Fey M, Amiguet-Barras F, Wetsel RA, Tack BF. Structural features of the human C3 gene: intron/exon organization, transcriptional start site, and promoter region sequence. *Biochemistry*. 1991 Jan 29;30(4):1080-5.
- 59) Sahu A, Lambris JD. Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity. *Immunol Rev*. 2001 Apr;180:35-48. Review.
- 60) Fong KY, Botto M, Walport MJ, So AK. Genomic organization of human complement component C3. *Genomics*. 1990 Aug;7(4):579-86.
- 61) Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999 Jan 14;340(2):115-26. Review.
- 62) Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002 Dec 19-26;420(6917):868-74. Review.
- 63) Bhakdi S: Immunpathogenese der Atherosklerose – Die Mainzer Hypothese. *Dtsch Med Wochenschrift* 2002; 127:390-394
- 64) Libby P. What have we learned about the biology of atherosclerosis? The role of inflammation. *Am J Cardiol*. 2001 Oct 11;88(7B):3J-6J.
- 65) Corti R, Fuster V, Badimon JJ. Pathogenetic concepts of acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol*. 2003 Feb 19;41(4 Suppl S):7S-14S. Review.
- 66) Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, Yan ZQ. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res*. 2002 Aug 23;91(4):281-91. Review.
- 67) Steinber D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL: Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989; 320:915-924
- 68) Brown BG, Zhao XQ, Chait A et al.: Simvastatin and niacin, antioxidant vitamins, or the combination for the prevention of coronary disease. *N Engl J Med* 2001; 345:1583-1592
- 69) Bhakdi S, Torzewski M, Klouche M, Hemmes M. Complement and atherogenesis: binding of CRP to degraded, nonoxidized LDL enhances complement activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 Oct;19(10):2348-54.
- 70) Nijmeijer R, Lagrand WK, Lubbers YT, Visser CA, Meijer CJ, Niessen HW, Hack CE. C-reactive protein activates complement in infarcted human myocardium. *Am J Pathol*. 2003 Jul;163(1):269-75.
- 71) Torzewski M, Klouche M, Hock J et al.: Immunohistochemical demonstration of enzymatically modified human LDL in its colocalization with the terminal complement complex in the early atherosclerotic lesion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:369-378
- 72) Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL. Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol*. 2001 Mar;158(3):1039-51.
- 73) Schmiedt W, Kinscherf R, Deigner HP et al.: Complement C6 deficiency protects against diet-induced atherosclerosis in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 1790-1795
- 74) Lehr HA, Sagban TA, Ihlig C et al.: Immunopathogenesis of atherosclerosis Endotoxin accelerates atherosclerosis in rabbits on hypercholesterolemic diet. *Circulation* 2001; 104: 914-920
- 75) Botto M, Walport MJ. Hereditary deficiency of C3 in animals and humans. *Int Rev Immunol*. 1993;10(1):37-50. Review.
- 76) Homann C, Varming K, Hogasen K, Mollnes TE, Graudal N, Thomsen AC, Garred P. Acquired C3 deficiency in patients with alcoholic cirrhosis predisposes to infection and increased mortality. *Gut*. 1997 Apr;40(4):544-9.
- 77) Frangiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2002 Jan;53(1):31-47. Review.
- 78) Lagrand WK, Niessen HW, Wolbink GJ, Jaspars LH, Visser CA, Verheugt FW, Meijer CJ, Hack CE. C-reactive protein colocalizes with complement in human hearts during acute myocardial infarction. *Circulation*. 1997 Jan 7;95(1):97-103.
- 79) Yasojima K, Kilgore KS, Washington RA, Suchesi BR, McGeer PL. Complement gene expression by rabbit heart: upregulation by ischemia and reperfusion. *Circ Res*. 1998 Jun 15;82(11):1224-30.

- 80) Willerson JT. Systemic and local inflammation in patients with unstable atherosclerotic plaques. *Prog Cardiovasc Dis.* 2002 May-Jun;44(6):469-78. Review.
- 81) Lagrand WK, Visser CA, Hermens WT, Niessen HW, Verheugt FW, Wolbink GJ, Hack CE. C-reactive protein as a cardiovascular risk factor: more than an epiphenomenon? *Circulation.* 1999 Jul 6;100(1):96-102. Review.
- 82) Clark DJ, Cleman MW, Pfau SE, Rollins SA, Ramahi TM, Mayer C, Caulin-Glaser T, Daher E, Kosiborod M, Bell L, Setaro JF. Serum complement activation in congestive heart failure. *Am Heart J.* 2001 Apr;141(4):684-90.
- 83) Robert-Offerman SR, Leers MP, van Suylen RJ, Nap M, Daemen MJ, Theunissen PH. Evaluation of the membrane attack complex of complement for the detection of a recent myocardial infarction in man. *J Pathol.* 2000 May;191(1):48-53.
- 84) Muscari A, Bastagli L, Poggiopollini G, Tomassetti V, Massarelli G, Cappelletti O, Plate L, Boni P, Puddu P. Different associations of C-reactive protein, fibrinogen and C3 with traditional risk factors in middle-aged men. *Int J Cardiol.* 2002 Apr;83(1):63-71.
- 85) Muscari A, Bozzoli C, Puddu GM, Sangiorgi Z, Dormi A, Rovinetti C, Descovich GC, Puddu P. Association of serum C3 levels with the risk of myocardial infarction. *Am J Med.* 1995 Apr;98(4):357-64.
- 86) Sherman SK, Collard CD. Role of the complement system in ischaemic heart disease: potential for pharmacological intervention. *BioDrugs.* 2001;15(9):595-607. Review.
- 87) Furlong ST, Dutta AS, Coath MM, Gormley JJ, Hubbs SJ, Lloyd D, Mauger RC, Strimpler AM, Sylvester MA, Scott CW, Edwards PD. C3 activation is inhibited by analogs of compstatin but not by serine protease inhibitors or peptidyl alpha-ketoheterocycles. *Immunopharmacology.* 2000 Jul 20;48(2):199-212.
- 88) Kirschfink M, Mollnes TE. C1-inhibitor: an anti-inflammatory reagent with therapeutic potential. *Expert Opin Pharmacother.* 2001 Jul;2(7):1073-83. Review.
- 89) Salerno CT, Kulick DM, Yeh CG, Guzman-Paz M, Higgins PJ, Benson BA, Park SJ, Shumway SJ, Bolman RM 3rd, Dalmaso AP. A soluble chimeric inhibitor of C3 and C5 convertases, complement activation blocker-2, prolongs graft survival in pig-to-rhesus monkey heart transplantation. *Xenotransplantation.* 2002 Mar;9(2):125-34.
- 90) Vakeva AP, Agah A, Rollins SA, Matis LA, Li L, Stahl GL. Myocardial infarction and apoptosis after myocardial ischemia and reperfusion: role of the terminal complement components and inhibition by anti-C5 therapy. *Circulation.* 1998 Jun 9;97(22):2259-67.
- 91) Lazar HL, Bao Y, Gaudiani J, Rivers S, Marsh H. Total complement inhibition: an effective strategy to limit ischemic injury during coronary revascularization on cardiopulmonary bypass. *Circulation.* 1999 Sep 28;100(13):1438-42.
- 92) Jordan J, Montalto M, Stahl G. Inhibition of mannose-binding lectin reduces postischemic myocardial reperfusion injury. *Circulation* 104(12):1413
- 93) Botto M, Fong KY, So AK, Koch C, Walport MJ. Molecular basis of polymorphisms of human complement component C3. *J Exp Med.* 1990 Oct 1;172(4):1011-7.
- 94) Koch C, Behrendt N. A novel polymorphism of human complement component C3 detected by means of a monoclonal antibody. *Immunogenetics.* 1986;23(5):322-5.
- 95) Archimandritis A, Koumentakos P, Douvara M, Scandalis N, Fertakis A. GC and C3 serum groups in ulcerative colitis. *Hum Hered.* 1995 Jul-Aug;45(4):215-8.
- 96) Elmgreen J, Sorensen H, Berkowicz A. Polymorphism of complement C3 in chronic inflammatory bowel disease. Predominance of the C3F gene in Crohn's disease. *Acta Med Scand.* 1984;215(4):375-8.
- 97) Finn JE, Zhang L, Agrawal S, Jayne DR, Oliveira DB, Mathieson PW. Molecular analysis of C3 allotypes in patients with systemic vasculitis. *Nephrol Dial Transplant.* 1994;9(11):1564-7.
- 98) Persson U, Truedsson L, Westman KW, Segelmark M. C3 and C4 allotypes in anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody (ANCA)-positive vasculitis. *Clin Exp Immunol.* 1999 May;116(2):379-82

- 99) Peroutka SJ, Price SC, Jones KW. The comorbid association of migraine with osteoarthritis and hypertension: complement C3F and Berkson's bias. *Cephalalgia*. 1997 Feb;17(1):23-6.
- 100) Kristensen BO, Petersen GB. Association between coronary heart disease and the C3F-gene in essential hypertension. *Circulation*. 1978 Oct;58(4):622-5
- 101) Schaadt O, Sorensen H, Krogsgaard AR. Association between the C3F-gene and essential hypertension. *Clin Sci (Lond)* 1981 Dec;61 Suppl 7:363s-365s
- 102) Szamosi T, Mihai K, Peto J, Makary A, Kramer J. Potential markers of the atherosclerotic process in high-risk children. *Clin Biochem*. 1991 Apr;24(2):185-7.
- 103) Császár A, Duba J, Melegh B, Kramer J, Szalai C, Prohászka Z, Karádi I, Kovács M, Méhes K, Romics L, Füst G. Increased frequency of the C3*F allele and the Leiden mutation of coagulation factor V in patients with severe coronary heart disease who survived myocardial infarction. *Exp Clin Immunogenet* 2001;18:206-212
- 104) Golabi P, Kshatriya GK, Kapoor AK. Association of genetic markers with coronary heart disease (myocardial infarction) – a case-control study. *J Indian Med Assoc* 1999 Jan; 97(1):6-7
- 105) Abbildung aus ABI PRISM® 3100 und ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer, Grundlagen-Kurs Fragmentanalyse ©2003 Applied Biosystems.
- 106) Murray CJ, Lopez AD, Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease study., *Lancet* 1997;349:1436-42.
- 107) Muller DW, Topol EJ, Califf RM, Sigmon KN, Gorman L, George BS, et. al.. Relationship between antecedent angina pectoris and short-term prognosis after thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. Thrombolysis and Angioplasty in Myocardial infarction (TAMI) Study Group. *Am Heart J* 1990;119:224-31
- 108) Anonymous. Freely associating [editorial comment]. *Nat Genet* 1999;22:1-2
- 109) Ostergaard RJ, Bruun-Peterson G, Kristensen BO: The C3-F gene in patients with intracranial saccular aneurysms. *Acta Neurol Scand* 1986;74:356-359
- 110) Bartok I, Waport MJ. Comparison of the binding of C3S and C3F to complement receptors types 1, 2, and 3. *J Immunol*. 1995 May 15;154(10):5367-75

6. Anhang

Eidesstattliche Erklärung

Gemäß § 3 Abs. 4 und 5 der Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Universität Regensburg erkläre ich hiermit ehrenwörtlich,

- dass ich den Doktorgrad der Medizin nicht schon an einer Hochschule der Bundesrepublik Deutschland erworben habe,
- dass ich nicht an anderer Stelle zu einem Promotionsverfahren zum Erwerb des medizinischen Doktorgrades zugelassen bin,
- dass ich die medizinische Doktorprüfung nicht schon an einer Hochschule der Bundesrepublik Deutschland endgültig nicht bestanden habe,
- dass mir keine Tatsachen bekannt sind, die mich zur Führung eines akademischen Grades im Sinne des Gesetzes über die Führung akademischer Grade unwürdig erscheinen lassen,
- dass ich die Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel benutzt habe und
- dass ich die Dissertation nicht bereits an anderer Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht habe.

Büchlberg, den 03. Februar 2006



Daniel Marold

Danksagung

Zum Schluss meiner Doktorarbeit möchte ich diese – wohl wichtigste Seite der Doktorarbeit – all denjenigen Menschen widmen, die mir im Laufe der letzten drei Jahre während der Entstehung dieser Dissertation mit Rat und Tat zur Seite standen:

Für das Überlassen des Themas und die Bereitstellung der notwendigen Einrichtungen und Materialien des molekulargenetisch-kardiologischen Forschungslabors der Universität Regensburg bedanke ich mich bei Herrn Ärztlichen Direktor Prof. Dr. Riegger, Herrn Prof. Dr. Hengstenberg und Herrn Prof. Dr. Schunkert. Teile der Arbeiten wurden mit materieller Unterstützung durch das Institut für klinische Chemie angefertigt, mein Dank gilt hier Herrn Prof. Dr. Schmitz und Herrn Prof. Dr. Aslanidis. Während meiner Tätigkeit im Labor freute ich mich über die Tipps und Tricks der medizinisch-technischen Assistentinnen und Assistenten Susanne, Melanie, Astrid, Georg und Josef, die mir bei Problemen immer hilfsbereit zur Seite standen.

Mein Dank gilt Herrn Dr. Wolfgang Lieb, der meine Arbeit mit seinem Engagement und seinem Wissen in freundschaftlicher Weise sehr bereichern konnte.

Vom ersten Tag im Labor am Klinikum Regensburg bis zur abschließenden mündlichen Prüfung am Universitätsklinikum Lübeck stand mir meine Doktormutter, Frau PD Dr. rer. nat. Jeanette Erdmann, mit außerordentlich großem Einsatz zur Seite. Mit ihrer freundlichen, zuverlässigen und unkomplizierten Art unterstützte sie mich durch ihre große methodische und wissenschaftliche Erfahrung sowohl im Labor, als auch während dem Verfassen meiner Dissertation; sowohl tagsüber, als auch manchmal in den späten Abendstunden. Dafür möchte ich Ihnen, liebe Frau Erdmann, auf diesem Wege nochmals herzlich danken und Ihnen für Ihre berufliche und private Zukunft alles Gute wünschen.

Ich bedanke mich ebenfalls beim zweiten Berichterstatter und Prüfer, Herrn Prof. Dr. Ralf Wagner vom Institut für Mikrobiologie und Hygiene, bei Herrn Dekan Prof. Dr. Nerlich und beim Dekanat für den reibungslosen Ablauf beim Vollzug der Promotion.

Zum Schluß gilt mein besonderer Dank all meinen Lieben, Verwandten, Freunden und Bekannten, ohne deren Unterstützung mein Studium und meine Promotion nicht möglich gewesen wäre. Danke meiner Mutter für die Vervielfältigung des Manuskripts.

Zurückblickend erinnere ich mich mit meiner Doktorarbeit an einen der schönsten Abschnitte meines Studiums. Ich bin mir sicher, dass ich in Zukunft von den vielen unterschiedlichen Eindrücken profitieren werde.

Daniel Marold

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: **Daniel Marold**
Geburtstag: 30.01.1978
Geburtsort: Passau
Postanschrift: Freihofer Straße 11, 94124 Büchlberg
Familienstand: ledig
Religion: römisch-katholisch
Eltern: Heidi Marold, Druckereiangestellte
Norbert Marold, Bürgermeister der Gemeinde Büchlberg
Geschwister: Nina Marold, Auszubildende

Schulbildung:

1984 – 89: Volksschule Büchlberg
1989 – 98: Johannes-Gutenberg-Gymnasium Waldkirchen
06/1998: Abiturprüfung

Zivildienst:

07/98 – 08/99: Zivildienst beim BRK Kreisverband Passau, Ambulante Pflege

Studium:

seit 11/99: Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
08/2001: Ärztliche Vorprüfung
08/2002: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/2004: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

03/2002 4wöchige Famulatur: Kardiologie, Uni-Klinik Regensburg,
04/2002 4wöchige Famulatur: Anästhesie, Klinikum Passau,
09/2002 4wöchige Famulatur: Chirurgie, Klinikum Passau,
08/2003 2wöchige Famulatur: Institut für Transfusionsmedizin, Rgbg.,
09/2003 2wöchige Famulatur: Allgemeinarztpraxis, Büchlberg,

10/04 – 02/05: erstes PJ-Tertial: Innere Medizin an der Uni-Klinik Regensburg
02/05 – 05/05: zweites PJ-Tertial: Anästhesie am Klinikum Passau
05/05 – 09/05: drittes PJ-Tertial: Chirurgie am Klinikum Weiden/Opf

10/2005: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2005: Erteilung der ärztlichen Approbation

Dissertation:

seit 10/2002: experimentelle Doktorarbeit am Forschungslabor für molekular-genetische Kardiologie der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II der Universität Regensburg, Direktor: Prof. Dr. Riegger
Thema: „Einfluss ausgewählter Polymorphismen im C3-Gen des Komplementsystems auf die Prädisposition zum Myokardinfarkt“
Betreuerin: PD Dr. Jeanette Erdmann, Universitätsklinikum Lübeck

Publikation:

11/2004: M. Fischer et al.:
„Lack of association of a 9 bp insertion/deletion polymorphism within the bradykinin 2 receptor gene with myocardial infarction”.
Clin Sci (Lond). 2004 Nov;107(5):505-11.
05/03 – 10/03: Beschäftigung als wissenschaftliche Hilfskraft im Forschungslabor

Beruf

seit 01/2006: Assistenzarzt in Weiterbildung zum Facharzt für Anästhesiologie am Klinikum Passau, Chefarzt Dr. med. Johann Nußer
08/1999: Rettungssanitäterprüfung beim BRK, Jettingen
04/2001: Prüfung zum Rettungsassistenten in Werdau /Sachsen
11/2001: Berufsanerkennung „Rettungsassistent“
07/99 – 03/03: Beschäftigung in der Rettungsleitstelle Passau als Telefonist
06/03 – 09/05: Beschäftigung beim Blutspendedienst des BRK, mobile Blutspende Institut für Transfusionsmedizin Regensburg

Aktivitäten:

seit 1984 Mitgliedschaft beim DLRG-Ortsverband Büchlberg
seit 1996 Rettungsbootsführer der DLRG
seit 1999 Mitgliedschaft beim BRK Hauzenberg
seit 11/2003: Mitarbeit in der studentischen Arbeitsgruppe Notfallmedizin. Organisation und bis heute dreimaliges Durchführen des Projekts: „Notfallwochenende für Medizinstudenten“ in Zusammenarbeit mit der Klinik für Anästhesie der Uni Regensburg und dem BRK-Landesverband



