

Medizinische Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie
Direktor: Prof. Dr. med. Ivar Roots

**Bedeutung funktioneller genetischer Polymorphismen
für das akute Koronarsyndrom**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doctor rerum medicarum
der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von Jacqueline Schöfelder
aus Weimar

Referent: Prof. Dr. med. Martin Paul

Korreferent: Prof. Dr. med. Markus van der Giet

Gedruckt mit der Genehmigung der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am 23.03.2007

INHALTSVERZEICHNIS

1	VERZEICHNISSE.....	6
1.1	Abkürzungsverzeichnis.....	6
1.2	Abbildungsverzeichnis.....	8
1.3	Protokollverzeichnis.....	8
1.4	Tabellenverzeichnis.....	8
2	DANKSAGUNG	9
3	EINLEITUNG	10
3.1	Definition, Ätiologie und Relevanz des akuten Koronarsyndroms	10
3.2	Pathogenese des akuten Koronarsyndroms / Atherosklerose	10
3.2.1	Thrombozytenaggregation.....	11
3.3	Molekulargenetische Grundlagen des akuten Koronarsyndroms	14
3.3.1	Genetische Polymorphismen und Mutationen	14
3.3.2	Genetik akuter Koronarsyndrome	16
3.4	Kandidatengene des akuten Koronarsyndroms	17
3.4.1	Der Kandidatengenansatz	17
3.4.2	Auswahl von Kandidatengen.....	18
3.5	Bedeutung des Fibrinogens für das ACS.....	19
3.5.1	Genetische und peptidische Struktur des Fibrinogens.....	21
3.5.2	Molekulargenetische Bedeutung des Fibrinogens	22
3.6	Bedeutung der Neutrophilen Elastase für das ACS.....	23
3.6.1	Serinproteasen	23
3.6.2	Neutrophile Elastase	24
3.6.3	Neutrophile Elastase und das ACS	26
3.6.4	Neutrophile Elastase und Thrombozytenaggregation	26
3.6.5	Molekulargenetische Bedeutung der Neutrophilen Elastase	28
4	FRAGESTELLUNG	29
5	MATERIAL UND METHODEN	30
5.1	Materialliste und Bezugsquellen.....	30
5.1.1	Chemikalien.....	30
5.1.2	Lösungen und Puffer	32
5.1.3	Medien	33
5.1.4	Gele	33
5.1.5	Molekularbiologische Kits	34
5.1.6	Zellkultur	34
5.1.7	Bakterien	36

5.1.8	Enzyme.....	36
5.1.9	Vektoren	36
5.1.10	Geräte.....	36
5.2	Das Patientenkollektiv	38
5.2.1	Die ECTIM-Studie.....	38
5.3	Molekularbiologische Methoden.....	39
5.3.1	Probengewinnung.....	39
5.3.2	Die Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	39
5.3.3	Die Agarose-Gelelektrophorese	44
5.3.4	Die SSCP-Analyse (Single Strand Conformation Polymorphism).....	45
5.3.5	Die Sequenzierung.....	47
5.3.6	Die Allel spezifische Oligonukleotid-Hybridisierung	48
5.3.7	Statistische Analyse	50
5.3.8	Subklonierungen.....	51
5.4	Zellkultur	54
5.4.1	Passagieren von Zellen	55
5.4.2	Gewinnung von konditioniertem Medium für die murine Zell-Linie 32d	55
5.4.3	Transfektion mittels Elektroporation	55
5.4.4	Zellernte.....	56
5.4.5	Bestimmung der Transfektionseffizienz	56
5.4.6	Bestimmung der Galactosidase-Aktivität.....	57
5.4.7	Bestimmung der Luziferase-Aktivität.....	57
5.5	RNA-Experimente.....	58
5.5.1	RNA-Isolierung aus HL60 Zellen.....	58
5.5.2	Synthese von cDNA durch reverse Transkription	58
5.6	Nomenklatur identifizierter Polymorphismen.....	60
6	ERGEBNISSE	61
6.1	Genetische Struktur und genetische Varianten im Gen für α -Fibrinogen	61
6.2	Genetische Struktur und genetische Varianten im Gen für γ -Fibrinogen.....	61
6.3	Genetische Struktur und genetische Varianten im Gen für ELA2.....	62
6.3.1	Genotypisierung	64
6.3.2	Häufigkeitsverteilung des Promotorpolymorphismus G-761A.....	65
6.3.3	Auswertung des Polymorphismus Ser173Ser (C/A)	66
6.3.4	Weitere Varianten im ELA2 Gen	68
6.3.5	Vorversuche zur Kultivierung der 32d Zell-Linie	70
6.3.6	Elektroporation der 32d Zellen mit den unterschiedlichen Promotorkonstrukten.....	74
6.3.7	Optimierung der Transfektionsbedingungen für HL60 Zellen	75
6.3.8	Elektroporation von HL60 mit unterschiedlichen Promotorkonstrukten	76
6.3.9	RNA-Experimente.....	78
7	DISKUSSION	79
7.1	Sensitivität der SSCP-Analyse für den Nachweis genetischer Varianten.....	79
7.2	Genetische Varianten in den drei untersuchten Genen	80
7.3	Fibrinogen.....	80
7.4	α -Fibrinogen	81

7.5	γ -Fibrinogen	82
7.6	Neutrophile Elastase	82
7.6.1	ELA2 und ACS	83
7.6.2	Der S173S Polymorphismus im ELA2-Gen.....	84
7.6.3	G-761A Polymorphismus.....	86
7.6.4	Seltene Mutationen im ELA2 Gen	87
7.6.5	Promotorstudien	88
7.6.6	Bewertung der Deletion des REP53 Elementes	89
7.7	Einfluss posttranskriptioneller Mechanismen	91
7.8	Bedeutung der Genotypisierung für die Prädiktion, Prävention und Therapie von Patienten mit akutem Koronarsyndrom	92
8	ZUSAMMENFASSUNG	95
9	LITERATURVERZEICHNIS.....	97
10	VERÖFFENTLICHUNGEN.....	104
11	LEBENS LAUF	108

1 Verzeichnisse

1.1 Abkürzungsverzeichnis

µF	Mikrofahrrad
ACC	Accession Nummer
ACE	Angiotensin-Konvertierungsenzym
ACS	Akutes Koronarsyndrom [engl. acute coronary syndrome]
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest	destilliertes Wasser
ASO	Allel spezifische Oligonukleotide
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
CI	Konfidenzintervall
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
ECE	Endothelin-Konvertierungsenzym
ECTIM	Etude Cas-Temoins sur l'Infarctus du Myocarde
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELA2	Neutrophile Elastase
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetales Kälberserum
FGA	α-Fibrinogen
FGB	β-Fibrinogen
FGG	γ-Fibrinogen
g	gramm
GFP	Green Fluorescent Protein
GPIIb/IIIa	Glykoprotein IIb und IIIa
kDa	Kilodalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
kV	Kilovolt
L	Liter
M	Molar
MONICA	MONitoring trends and determinants In Cardiovascular disease
min	Minute
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OR	Odds Ratio
PAA	Polyacrylamid
PAF	Platelet Activating Factor,
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor 1
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion [engl. Polymerase chain reaction]
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PIA2	Variante des GPIIIA Gen (PIA1/PIA2 Polymorphismus)
RLU	Relative Light Units
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
SAS	Statistical Analysis System
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSC	Saline-Sodium Citrate Puffer
SSCP	Single Strand Conformational Polymorphism

Taq	DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamid
U/min	Umdrehungen pro Minute
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
vWF	von Willebrand-Faktor
WHO	Weltgesundheitsorganisation

1.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Aktivierung von Thrombozyten	13
Abb. 2: Schematische Darstellung der Thrombozytenaggregation.....	14
Abb. 3: Schematische Darstellung des dimeren Glykoproteinrezeptors GPIIb/IIIa	20
Abb. 4: Transkriptionsreihenfolge der Fibrinogene	21
Abb. 5: Aufbau des ELA2-Promotors	25
Abb. 6: Schematische Darstellung der Aktivierung von GPIIb/IIIa durch ELA 2.....	27
Abb. 7: Beispiel für PCR und Agarosegelelektrophorese.....	45
Abb. 8: Exemplarische SSCP-Analyse nach Silbernitratfärbung.....	47
Abb. 9: Exemplarische Sequenzanalyse.....	48
Abb. 10: Exemplarische ASO von 3 Patienten.....	50
Abb. 11: Prinzip der DNA-Amplifikation mittels Ankerprimer	51
Abb. 12: Aufbau des Reportergens mit der Schnittstelle für das Promotorfragment.....	52
Abb. 13: Prinzip der Lichtemission von Luziferin	58
Abb. 14: schematischer Aufbau und identifizierte Varianten im α -Fibrinogen	61
Abb. 15: schematischer Aufbau und identifizierte Varianten im γ -Fibrinogen.....	62
Abb. 16: Sequenz für humane Neutrophile Elastase	63
Abb. 17: Das REP53 Element im Promotor der ELA2 Sequenz.....	69
Abb. 18: Darstellung des fehlenden REP53-Element im Agarose-Gel	69
Abb. 19: Wachstumskurve WEHI-3b Zellen (n=1)	70
Abb. 20: Wachstumskurve 32d Zellen.....	71
Abb. 21: Optimierung der Transfektion	72
Abb. 22: DNA-Menge	73
Abb. 23: Zellernte-Zeitpunktes	74
Abb. 24: Vergleich der Promotoraktivität der zwei Promotoren	75
Abb. 25: Zellernte-Zeitpunktes	76
Abb. 26: Vergleich der Promotoraktivität verschiedener Promotoren	77
Abb. 27: Vergleich der Promotoraktivität der zwei Promotoren	77
Abb. 28: RT-PCR.....	78
Abb. 29: Umweltfaktoren und genetische Disposition.....	93

1.3 Protokollverzeichnis

Protokoll 1: genomische PCR	40
Protokoll 2: Kinasierung	49
Protokoll 3: Verdau	53
Protokoll 4: Ligation.....	53
Protokoll 5: DNase-Dau.....	59
Protokoll 6: Reverse Transkription	59

1.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primersequenzen und Amplifikationsbedingungen für das Gen α -Fibrinogen	42
Tabelle 2: Primersequenzen und Amplifikationsbedingungen für das Gen γ -Fibrinogen	43
Tabelle 3: Primersequenzen und Amplifikationsbedingungen für das Gen ELA2	44
Tabelle 4: Häufigkeit und Position gefundener Varianten im Gen für ELA2	64
Tabelle 5: Haplotypenfrequenz zwischen den Varianten -761 und Ser173.....	65
Tabelle 6: Häufigkeit G-761A in Glasgow	65
Tabelle 7: Häufigkeit G-761A in Belfast	66
Tabelle 8: Häufigkeit G-761A in Straßburg	66
Tabelle 9: Häufigkeit G-761A in allen Zentren	66
Tabelle 10: Häufigkeit Ser173Ser in allen Zentren	67
Tabelle 11: Häufigkeit Ser173Ser in Glasgow	67
Tabelle 12: Häufigkeit Ser173Ser in Belfast	67
Tabelle 13: Häufigkeit Ser173Ser in Straßburg	67

2 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Martin Paul als Direktor des Instituts für Klinische Pharmakologie und Toxikologie sei für die guten Forschungsbedingungen gedankt, die diese Arbeit ermöglichten.

Herrn Prof. Dr. Stefan-Martin Brand-Herrmann danke ich für die Überlassung des Themas und die Betreuung dieser Promotion.

Bei Frau Katrin Kossatz und Frau Gabriele Riedel sowie bei Frau Brigitte Egbers möchte ich mich ganz herzlich für ihre vielfältige technische Hilfe und die unentbehrlichen Tipps bei dem Erlernen von Methoden und für die gute Zusammenarbeit im Labor bedanken.

Allen Doktoranden und wissenschaftlichen Mitarbeitern der Abteilung danke ich für die ausgesprochen freundschaftliche Zusammenarbeit, ihre Hilfsbereitschaft und die vielen Aufmunterungen. Im Besonderen seien die genannt, die dabei zu Freunden geworden sind: Kathinka Judith, Sebastian Schwind, Judith Westerkamp, Verena Brink-Spalink und vielen mehr, die ich hier nicht vollständig aufzählen kann. Ganz besonders herzlich danke ich aber meinem Mitdoktoranden und guten Freund Andreas Nonnenmacher. Dr. Juliane Bolbrinker sei darüber hinaus gedankt für das gemeinsame Erlernen von Techniken, die geduldige Korrektur dieser Arbeit und viele interessante Stunden innerhalb und außerhalb des Institutes.

Meinem Mann Gilbert möchte ich für seine unendliche Geduld, sein Vertrauen und seine zuverlässige Hilfe bei der Korrektur der Arbeit danken.

Ein besonderer Dank gilt dem Team der Teltow-Apotheke in Berlin, das mich immer wieder zum Durchhalten ermutigt und mir durch freundschaftliche Ratschläge viel Unterstützung geleistet hat.

Den Kollegen und Freunden von GSK Dresden gilt meine Dankbarkeit für ihre Aufmunterung und Unterstützung bezüglich der Fertigstellung der Arbeit.

Meinen Eltern und meinem Bruder danke ich für ihre unentwegte Teilnahme, Motivation und Unterstützung sowohl im Verlauf dieser Arbeit als auch während meiner gesamten beruflichen Ausbildung.

8 Zusammenfassung

Das akute Koronarsyndrom (ACS), welches die instabile Angina pectoris, den Myokardinfarkt und den plötzlichen Herztod umfasst, ist als kardiovaskuläre Erkrankung eine der häufigsten Todesursachen in Deutschland und der westlichen Industriestaaten. Ursache des ACS ist ein Gefäßverschluss bei der Atherosklerose, der wiederum verursacht wird durch Thrombozytenaggregation in den betroffenen Gefäßen.

Für die Bindung von Faktoren bei der Thrombozytenaggregation stellt der Glykoproteinrezeptor GPIIb/IIIa hierbei einen Schlüsselrezeptor dar. Bei der Stimulation von Thrombozyten werden auf den Oberflächen äußerst viele Fibrinogen-Bindungsstellen in Form des GPIIb/IIIa-Rezeptorkomplexes gebildet. Fibrinogen ist verantwortlich für die Vernetzung und damit die Aggregation von Thrombozyten in verletzten Gefäßen.

Ein zusätzlicher Faktor zur Förderung Thrombozytenaggregation ist die Neutrophile Elastase (ELA2), eine Serinprotease, die in der Lage ist, durch Proteolyse den GPIIb/IIIa-Rezeptorkomplex in einen aktiven Zustand zu überführen.

Im Ganzen ist das ACS eine komplexe Erkrankung, die durch verschiedene genetische Faktoren, posttranskriptionelle Mechanismen und Umwelteinflüsse determiniert wird. Um die genetischen Faktoren an dieser Stelle näher zu beleuchten, wird der Kandidatengenansatz herangezogen, bei dem Gene bzw. deren Produkte definiert werden, welche direkt oder indirekt an der Thrombozytenaggregation beteiligt sind.

Genetische Varianten einzelner Kandidatengenen könnten somit allein oder in Kombination einen Einfluss auf die Thrombozytenaggregation haben und damit an der Pathogenese des ACS beteiligt sein.

In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb die Gene für α -Fibrinogen, γ -Fibrinogen und Neutrophile Elastase als Kandidatengene identifiziert und mittels verschiedener molekular- und zellbiologischer Methoden systematisch auf genetischen Varianten untersucht. Neu identifizierte genetische Polymorphismen wurden in großen Populationen auf Assoziationen mit dem ACS geprüft.

Insgesamt konnten durch PCR-gestützte SSCP-Analyse und Sequenzierung 13 neue Varianten in den drei Genen identifiziert werden, von denen zwei im ELA2 häufige Varianten darstellen. Nur eine Variante – Serin173Serin – zeigt bei dem seltenen A-Allel ein signifikant häufigeres Auftreten bei Patienten in Großbritannien. In Populationen anderer geografischer Herkunft konnte dies nicht bestätigt werden.

Bei dem zweiten Polymorphismus konnte indes kein Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen in sämtlichen Gruppen festgestellt werden.

Aufgrund der funktionellen Eigenschaften und des Auftretens bei einem sehr jungen Patienten mit Myokardinfarkt und positiver Familienanamnese wurde die 53 bp Deletionsvariante im Promotor von ELA intensiv untersucht. Subklonierungen und die Transfektionen in geeignete Zell-Linien ergab allerdings keinen Unterschied der Konstrukte in der Promotoraktivität.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass insgesamt genetische Varianten in den drei untersuchten Genen nur wenige Rückschlüsse auf die Assoziation mit ACS zulassen. Möglicherweise hängt dies auch mit der Größe der untersuchten Populationen zusammen, sicherlich aber auch an der Vielschichtigkeit der Pathophysiologie des ACS. Die Ergebnisse der Untersuchungen und deren Einfluss auf Phänotypen des ACS sind sehr vielfältig, da das ACS nicht monogenetisch ist, sondern durch den Einfluss sehr vieler Gene und deren Interaktion mit der Umwelt geprägt wird.

Gleichwohl liefert die vorliegende Arbeit erste Hinweise auf genetische Varianten in Kandidatengenen für das ACS, was zu einem besseren Verständnis der genetischen Einflüsse dieser Genprodukte auf die Pathophysiologie und Ausbildung des ACS beitragen kann.

11 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Erklärung

Ich, Jacqueline Schönfelder, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Bedeutung funktioneller genetischer Polymorphismen für das akute Koronarsyndrom“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den 16. Oktober 2006