

7 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde das polymorphe Spektrum von Kandidatengenen charakterisiert, deren Proteine einen entscheidenden Einfluss auf die Thrombozytenaggregation haben. ELA2 sowie α - und γ -Fibrinogen wurden mittels PCR-SSCP-Analysen untersucht und es konnten neue genetische Varianten in allen drei Genen identifiziert werden. In den Genen für α - und γ -Fibrinogen konnte jeweils eine neue Variante in nicht-funktionellen Regionen identifiziert werden. Im Gen für ELA2 wurden insgesamt 11 neue genetische Varianten in allen Bereichen des Gens lokalisiert werden.

7.1 Sensitivität der SSCP-Analyse für den Nachweis genetischer Varianten

Zum Zeitpunkt der Untersuchungen war die Sequenzierung der DNA die sensitivste Methode zum Nachweis genetischer Varianten. Sie ist jedoch sehr arbeitsaufwendig und kostenintensiv und somit für die Charakterisierung einer großen Risikopopulation nicht geeignet. Unerlässlich ist die Sequenzierung jedoch zur genauen qualitativen Identifizierung und Lokalisierung neuer genetischer Varianten. Fehler sind gleichwohl auch bei dieser Methode möglich.

Der Vorteil der hier genutzten SSCP-Analyse besteht im Wesentlichen darin, dass ein Gen auch bei nicht bekannter Struktur effizient analysiert werden kann. Die Genauigkeit der SSCP-Analyse ist dabei abhängig von der Länge des Fragmentes, der Temperatur während der Auftrennung und der ionischen Kraft⁷¹. Die Wahrscheinlichkeit, eine genetische Variante mittels SSCP-Analyse zu determinieren, liegt zwischen 69 und 94%⁷²⁻⁷⁵. Daher ist es möglich, vorhandene Mutationen und Polymorphismen zu übersehen. Um dieses Risiko gering zu halten, wurde die Anzahl der für das Screening benutzen Hochrisikopatienten auf 95 festgelegt, was einer Allelzahl von 190 entspricht. Im Vergleich zu anderen Untersuchungen⁷⁶ ist diese Anzahl hoch gewählt, kann aber trotzdem nicht absolut verhindern, dass eventuelle genetische Unterschiede nicht erkannt werden.

7.2 Genetische Varianten in den drei untersuchten Genen

Dass genetische Varianten einen Einfluss auf die Thrombozytenaggregation und damit auf die Prävalenz des ACS haben können, konnte in zahlreichen Publikationen gezeigt werden^{25,36,77,78}.

Grant berichtet beispielsweise in einer Zusammenfassung⁷⁹, dass genetische Polymorphismen im Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), Faktor VII und β -Fibrinogen in verschiedenen Studien untersucht wurden, um ihre Assoziation zu kardiovaskulären Erkrankungen aufzuzeigen. In den untersuchten Studien konnte gezeigt werden, dass das jeweils seltene Allel mit kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert ist. Bei dem untersuchten Polymorphismus *BcI* im β -Fibrinogen wurde gezeigt, dass die Interaktion zwischen Rauchen und dem vaskulärem Risiko vom genetischen Hintergrund abhängt³⁶.

Andere Untersuchungen weisen auf den Zusammenhang zwischen genetischen Varianten im thrombozytären Rezeptors GPIIb/IIIa und die Prävalenz für Myokardinfarkt hin. Grove et al.⁸⁰ zeigten einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Leu33Pro Polymorphismus, ein Polymorphismus in der Glykoprotein-Rezeptor Untereinheit IIIa und der erhöhten Aggregabilität von Plättchen auf. Patienten, die den Polymorphismus tragen, zeigen eine erhöhte Inzidenz für Myokardinfarkt.

Ebenso verhält es sich mit dem -5C/T Polymorphismus im GPIb- α -Gen. Träger des C-Allels weisen innerhalb einer Population mit ACS signifikant häufiger einen Myokardinfarkt auf, als Träger des -5T-Allels⁸¹.

Fasst man die einzelnen Daten zusammen, so kann gezeigt werden, dass besonders Varianten von Genen, die bei der Thrombozytenaggregation beteiligt sind, eine Assoziation zu Phänotypen des ACS aufweisen⁷⁶.

7.3 Fibrinogen

Hohe Plasma-Fibrinogenspiegel stellen einen eigenständigen Risikofaktor für das ACS dar. Die physiologische und pathophysiologische Rolle des Fibrinogens wurde in den letzten Jahren ausführlich untersucht und in Meta-Analysen bestätigt⁸²⁻⁸⁴.

Es ist bekannt, dass Fibrinogenspiegel vielseitig durch Umweltfaktoren beeinflusst werden können. So steigen sie mit zunehmendem Alter, in der Schwangerschaft, bei Übergewicht und in der Menopause. Erhöhte Fibrinogenspiegel treten auch bei Patienten mit Hypertonie, Diabetes mellitus und bei Rauchern auf.

Ferner ist bekannt, dass genetische Varianten in den drei Genen, die für α , γ und β -Fibrinogen kodieren, die Plasmaspiegel des Fibrinogens beeinflussen⁸⁵⁻⁸⁹. Insgesamt sind 16 genetische Varianten⁷⁸ in den drei Genen bekannt. Die größte genetische Varianz zeigt dabei das β -Fibrinogen-Gen, in dem 12 Polymorphismen identifiziert wurden.

Da die β -Kette die Synthese von reifem Fibrinogen limitiert, wird vermutet, dass Polymorphismen, die die Produktion dieser β -Kette beeinflussen, einen Effekt auf die Fibrinogenspiegel haben könnten²⁸.

Die einzelnen Studien zeigen jedoch, dass die gefundenen Polymorphismen keinen direkten Einfluss auf Fibrinogenspiegel haben, sondern eher eine Verbindung mit umweltbedingten Konditionen auf den Phänotypen vermitteln. Fibrinogen-Genotypen konnten assoziiert werden mit Rauchen, Geschlecht und physischer Aktivität⁹⁰⁻⁹². Es ist daher offensichtlich, dass in zukünftigen Untersuchungen diese Gen-Umwelt-Interaktionen näher beleuchtet werden müssen, um die Rolle der identifizierten Varianten und deren Risiko für Erkrankungen besser zu verstehen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Schwerpunkt auf die Charakterisierung von genetischen Varianten im α - und γ -Fibrinogen gelegt. Außerdem wurde versucht, ein Zusammenhang zwischen dem ACS und gefundenen Varianten herzustellen, da bei den bisherigen Untersuchungen nur kleine Populationen von Hochrisikopatienten für das ACS untersucht wurden.

7.4 α -Fibrinogen

Mittels PCR-SSCP wurde die gesamte kodierende Region, außerdem 20 bp des Promotors und 135 bp in der 3'-UTR im Gen für α -Fibrinogen auf genetische Varianten untersucht. Die Exon-flankierenden Abschnitte der jeweiligen Introns wurden ebenfalls untersucht. Bei diesem Screening mit 95 Hochrisikopatienten für Myokardinfarkt wurde eine genetische Variante im vierten Intron identifiziert: T+37/In4A (siehe auch <http://ecgene.net/genecanvas/>). Diese neu identifizierte

Variante wurde bei den 95 Hochrisikopatienten nur einmal detektiert. Es wurde auf eine weitere Charakterisierung dieses Polymorphismus verzichtet, da er sich in einem nicht-funktionellen Bereich für die Gentranslation bzw. -transkription befindet.

Im Gegensatz zu Polymorphismen im β -Fibrinogen scheinen genetische Varianten im Gen für α -Fibrinogen eine untergeordnete Rolle für den Plasmafibrinogenspiegel zu spielen. Oft wurde der Polymorphismus α TaqI⁹³ in der 3'-Region des α -Fibrinogens untersucht, der aufgrund eines Einzelbasenaustausches die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym TaqI zerstören kann. Das Auftreten dieses SNPs war aber nicht assoziiert mit Plasmaspiegeln von Fibrinogen noch mit Myokardinfarkt⁹⁴. Ebenfalls ergab die Untersuchung des Polymorphismus G-58A im Promotor des α -Fibrinogens keine signifikanten Assoziationen zu Plasmafibrinogenspiegeln oder anderen Erkrankungen⁷⁸.

7.5 γ -Fibrinogen

Ebenfalls mittels PCR-SSCP wurde die gesamte kodierende Region, ein 82 bp großer Teil der 5'-Region und 213 bp in der 3'-UTR für γ -Fibrinogen auf genetische Varianten untersucht. Bei derselben Studienpopulation wie für das α -Fibrinogen konnte wieder nur eine genetische Variante, hier in der untranslatierten Region am 3' Ende des Gens identifiziert werden: StopA+2C. Diese Variante mit einer Allelhäufigkeit von ca. 1% wurde aufgrund des geringen Vorkommens und der nicht-funktionellen Lokalisierung nicht weiter charakterisiert.

In keiner bisherigen Publikation konnten Varianten im γ -Fibrinogen mit Phänotypen des ACS assoziiert werden. Eine Variante im Promotor von γ -Fibrinogen, A-649G, zeigt eine Allelfrequenz von 0,55 und konnte nicht mit entsprechenden Phänotypen in Zusammenhang gebracht werden.

7.6 Neutrophile Elastase

Genmutationen in ELA2 sind bereits bekannt bei Patienten mit kongenitaler (auch Kostmann Syndrom genannt) und zyklischer Neutropenie^{55,70,95,96}. Bei diesen Patienten zeigt das Knochenmark einen selektiven Defekt in der Formation von

Neutrophilen mit vielen Promyelozyten aber relativ wenigen Myelozyten, Metamyelozyten und neutrophilen Granulozyten, so dass es zu einem Reifestopp in der Promyelozytenausbildung kommt.

In der vorliegenden Arbeit wurden im Gen für ELA2 insgesamt 1041 nicht miteinander verwandte Patienten und Kontrollen der ECTIM-Studie mittels PCR-SSCP untersucht. 11 bisher nicht bekannte Varianten konnten identifiziert werden. Davon sind nur G-761A und S173S häufige Varianten. Die übrigen Varianten (-852/53bp repeat, R49H, N81N, G93V, D222Y, P228P, C+29/ln3T, C+149/ln3T, C+137/ln4T) erwiesen sich als seltene Mutationen, die jeweils nur bei einem bzw. zwei Patienten der gesamten Studie nachgewiesen wurden (Allelfrequenz kleiner als 0,6 %).

Vor Abfassung dieser Arbeit sind bereits genetische Varianten im ELA2 Gen beschrieben worden. Die Arbeitsgruppe um Marshall Horwitz konnte zeigen, dass bei 22 von 25 Patienten mit zyklischer Neutropenie Mutationen an verschiedenen Positionen im Gen für ELA2 vorhanden sind⁶¹. Allerdings zeigen die meisten der Patienten ein sehr individuelles Mutationsschema, das keine Rückschlüsse auf Anzahl der Neutrophilen im Blut oder den klinischen Verlauf zulässt⁹⁵. Einzig das Risiko aufgrund einer veränderten Myeloiddifferenzierung eine akute myeloische Leukämie zu entwickeln, scheint bei den Patienten mit ELA2 Mutationen erhöht zu sein.

Die in dieser Arbeit gefunden genetischen Varianten bei den Patientenkollektiven mit ACS stimmen nicht mit denen bei der zyklischen Neutropenie überein. Das heißt, dass keine der genetischen Varianten, die bei Patienten mit zyklischer Neutropenie gefunden wurden, identisch ist mit denen, die bei den vorliegenden Untersuchungen identifiziert wurden.

7.6.1 ELA2 und ACS

Atherosklerose ist eine inflammatorische Erkrankung^{6,98}, bei der ELA2 bedeutend an der Infiltration von humanen polymorphkernigen Granulozyten (PMN) in entzündete Gefäße, bei der Degradierung von Membrankomponenten, an der Erhöhung der endothelialen Adhäsion und Permeabilität sowie an der Ödembildung im Gewebe beteiligt ist⁹⁹.

ELA2 greift in das Geschehen der Thrombozytenaggregation ein, indem es zu einer Aktivierung von neutrophiler Granulozyten kommt, die zu einer Ausschüttung von ELA2 gemeinsam mit der Serinprotease Cathepsin G führt. Cathepsin G bewirkt eine Proteolyse der GPIIb-Untereinheit des Plättchenrezeptors GPIIb/IIIa. Diese wird verstärkt durch ELA2. Es folgt eine Rezeptoraktivierung und damit eine Potenzierung der Thrombozytenaggregation. Eine erhöhte Thrombozytenaggregation führt im betroffenen Gefäß zu einer Thrombusformation, die mit ACS einhergehen kann. Genetische Varianten im Gen für ELA2 können daher zu folgenschweren Modifikationen der Thrombozytenaggregation führen.

Eine Untersuchung genetischer Varianten im ELA2 Gen hinsichtlich der Assoziation mit ACS ist auch deshalb von Bedeutung, da in verschiedenen Untersuchungen ein direkter Zusammenhang zwischen Plasmaspiegeln von ELA2 und kardiovaskulären Phänotypen gezeigt werden konnte⁵⁵. Erhöhte Plasmawerte von ELA2 wurden bei Patienten mit instabiler Angina pectoris und akutem Myokardinfarkt im Vergleich zu Kontrollen ohne koronare Herzkrankheit gemessen. Solche Patienten weisen besonders hohe Spiegel an ELA2 und sehr komplexe koronare Plaques auf⁹⁷.

7.6.2 Der S173S Polymorphismus im ELA2-Gen

Eines der Hauptergebnisse der vorliegenden Untersuchungen war die signifikante Assoziation des weniger frequenten Allels A des Polymorphismus ELA2 S173S mit Myokardinfarkt in der englischen Population der ECTIM-Studie. Dieses Ergebnis war unabhängig von den Faktoren Rauchen, Geschlecht und Alter. Ebenso konnten keine Assoziationen zu den anderen Phänotypen der ECTIM-Studie (siehe „Material und Methoden“) beobachtet werden.

Es bleibt dabei die Frage offen, welchen Einfluss diese Mutation S173S auf den Phänotypen Myokardinfarkt hat, da es nicht zu einem Austausch der Aminosäure kommt. Um einen Hinweis auf mögliche Ursachen hierfür zu bekommen, werden im Folgenden verschiedene Ansätze näher betrachtet.

Die Bedeutung dieses gefundenen Polymorphismus S173S erklärt sich aus der Eigenschaft des Serin173. Dieser Polymorphismus betrifft die funktionelle katalytische Trias His41-Asp88-Ser173 im ELA2 Protein, wobei die Stelle Ser173 dabei nach Aktivierung mit den Zielsubstraten interagiert. In einer Publikation wird bei

der Untersuchung zum Einfluss zahlreicher Mutationen auf die Aktivität der ELA2 ein Ser173Ala Konstrukt als Negativkontrolle, d.h. dass dieses Protein keine Aktivität zeigt, verwandt. Dies zeigt die Bedeutung dieser Aminosäure auf Protein- und auf genetischer Ebene⁷⁰.

Weitergehende Untersuchungen dieses Polymorphismus im Institut für Atheroskleroseforschung, Universität Münster, zeigen keine Stabilitätsunterschiede der allelen Transkripte. Ebenso zeigen Western Blot Analysen in HEK293T Zellen keine Unterschiede der Translationseffizienz respektive Genexpression der beiden (C/A) Transkripte von ELA2¹⁰⁰.

Einen weiteren möglichen Hinweis liefern Fields und Somero in einer Untersuchung^{101,102}, bei der Proteine, die die identische Aminosäuresequenz und Primärstrukturaufweisen, sich aber in der Nukleotidsequenz unterscheiden, funktionelle Unterschiede aufweisen.

Die Autoren verglichen dabei A4-Laktat-Dehydrogenasen der zwei Spezies von *Gillichthys seta* und *Gillichthys mirabilis* (Fische aus der Klasse der Strahlenflosser). Sie konnten feststellen, dass alle Nukleotidsubstitutionen auf mRNA-Ebene zu stillen Mutationen ohne Änderung der Aminosäuresequenz führten. Auch eine Matrix-unterstützte Laserdesorptions-/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-TOF)-Analyse ergab, dass beide Proteine die gleiche Masse aufzeigen. Die Verfasser postulierten daher, dass es sich bei den beiden Enzymen um verschiedene Konformationen der gleichen Primärstruktur handelt.

Experimente zur Stabilität und funktionellen Eigenschaften der Enzyme wurden durchgeführt und ergaben Unterschiede in der Kinetik und der thermalen Stabilität zwischen den beiden Dehydrogenasen. Man führte dies auf die tatsächliche Existenz von unterschiedlichen Konformationen zurück.

Vor diesem Hintergrund scheint es möglich, dass die unterschiedliche Sekundärstruktur der mRNA, hervorgerufen durch stille Mutationen, die Transkription, die Prozessierung oder die Translation beeinflussen kann. Aus den Ergebnissen anderer Spezies dürfen natürlich keine Rückschlüsse auf humane Daten gezogen werden, sie geben aber einen ersten Anhalt auf Ursachen und Erklärungen gegenwärtiger Fragen.

Ein weiterer Erklärungsansatz zur funktionellen Bedeutung stiller Mutationen ist, dass S173S in einem Kopplungsungleichgewicht (Linkage Disequilibrium) mit möglichen,

bisher nicht identifizierten, funktionellen Varianten liegt, die sich in der Nähe des ELA2 Locus befinden, welches die Assoziation mit Myokardinfarkt erklären kann. Ein Kopplungsungleichgewicht wird definiert als ein überhäufiges Auftreten von Allelen als bei zufälliger Verteilung zu erwarten wäre. Solche Assoziationen sind in genetischer Nähe von untersuchten Varianten und auf demselben Chromosom zu erwarten¹³. Gene, die für solche Überlegungen in der genetischen Nähe von ELA2 in Frage kommen, sind beispielsweise Azurocidin, Proteinase-3, Granzyme M sowie *endothelial differentiation gene 6*. Außerdem ist ein Cluster von Genen für Serinproteasen auf Chromosom 19 lokalisiert⁵¹, die eventuell funktionelle Varianten aufweisen, die sich in Assoziation mit den gefundenen genetischen Varianten von ELA2 befinden. Da zum Zeitpunkt der Ausarbeitung dieser Arbeit keine Daten zu genetischen Varianten dieser Gene in bestimmten Patientenkollektiven vorhanden waren, bleibt diese Überlegung rein theoretisch und kann nicht weiter belegt werden.

Zusätzlich zu den rein genetischen und molekularbiologischen Aspekten, die einen Hinweis auf die Bedeutung der Variante S173 in bestimmten Populationen geben könnten, kommen noch epidemiologische hinzu. Die Beobachtung, dass sich das Auftreten des S173S A-Allels nur auf Personen mit kardiovaskulärem Risiko auf die Populationen in Großbritannien beschränkt ist, kann unter anderem damit erklärt werden, dass die Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen in Großbritannien um ein dreifaches höher liegt als in Frankreich. Erste Untersuchungen bestätigen, dass ein geographisch auftretender genetischer Hintergrund hierbei eine große Rolle spielen kann^{102,103}.

7.6.3 G-761A Polymorphismus

Der vorliegende Polymorphismus G-761A liegt mit einer Häufigkeit des seltenen A-Allels von ca. 22% in den Patienten und Kontrollen der ECTIM Studie vor. Es konnten keine Assoziationen zwischen den einzelnen Phänotypen der ECTIM-Studie und dem G-761A Genotypen gezeigt werden. Es ist deswegen aufschlussreich, Publikationen nach genetischen Varianten im ELA2 Gen zu analysieren und mit den gefundenen Daten zu vergleichen.

Interessanterweise wurde in einer 2002 veröffentlichten Arbeit von Taniguchi et al.¹⁰⁴ der gleiche Polymorphismus - hier allerdings mit einer anderen Nomenklatur als -741 bezeichnet - bei Patienten und Kontrollen mit Lungenkrebs identifiziert und

quantifiziert. Die vorliegende Allelfrequenz des seltenen A-Allels beträgt in dieser Studie 37,6%. Taniguchi et al.¹⁰⁴ führten daraufhin eine Untersuchung der Promotoraktivität in A549 Zellen, einer Lungenkarzinomzell-Linie, in Abhängigkeit vom Genotypen durch, und erkannten, dass die transkriptionelle Aktivität der unterschiedlichen allelen Promotoren nicht verschieden war. Allerdings konnten sie zeigen, dass die Luziferaseaktivität um das ca. 2fache zunahm, wenn sie zusätzlich einen zweiten Polymorphismus (T-903G) in das Konstrukt einbrachten. Dieser Austausch wurde in der vorliegenden Arbeit und in der zur Verfügung stehenden Studienpopulation jedoch nicht identifiziert.

7.6.4 Seltene Mutationen im ELA2 Gen

Drei der insgesamt sechs neu identifizierten Varianten (Arg50His, Gly93Val, Asp222Tyr) in der kodierenden Region sind Missense-Mutationen, führen also zu einer Änderung der Proteinsequenz. Dabei stellt nur die Mutation Asp222Tyr eine nicht-konservative Substitution dar. Obwohl in der Natur die meisten Aminosäureaustausche konservativ sind, bedeutet dies keineswegs, dass diese Mutationen nicht auch funktional sein können. Am Beispiel von Fibrinogen Baltimore I lässt sich die Bedeutung von konservativen Aminosäureaustauschen erklären: Baltimore I führt zu einem angeborenen, abnormalem Fibrinogen^{55,105}, da es durch den konservativen Austausch Gly292Val in der γ -Kette des Fibrinogens zu einem nicht funktionsfähigen Protein kommt.

Durch konservative Aminosäureaustausche kann z. B. die Thermostabilität von Proteinen betroffen sein. Imanaka et al.¹⁰⁶ zeigten, dass eine gesteigerte Thermostabilität der thermostabilen, neutralen Protease von *Bacillus stearothermophilus* ein Ergebnis des konservativen Aminosäureaustausches Glycin nach Alanin ist. Dieser Effekt wird auf ein verbessertes Potential, hydrophobe Interaktionen im Alanin-tragenden Protein durchzuführen, zurückgeführt. Auch hier sind Ergebnisse anderer Spezies nicht ohne Vorsicht auf humane Daten zu übertragen, zeigen aber erste Ansätze zur Erklärung der vorliegenden Daten auf.

7.6.5 Promotorstudien

7.6.5.1 Geringe Aktivität des ELA2 Promotors in HL60 Zellen

In dieser Arbeit haben sich an die genetischen Untersuchungen Zellkulturexperimente zur Analyse des ELA2 Promotors angeschlossen. Obwohl HL60 Zellen für solche Experimente am ehesten geeignet wären (vgl. Kapitel „Ergebnisse“), konnte leider nur eine sehr geringe Aktivität dieses Promotors hier nachgewiesen werden. Hierfür kann es verschiedene Ursachen geben, die im Folgenden erörtert werden.

In den reifen Neutrophilen wird die Protease nur gespeichert während die Expression von ELA2 auf das Stadium der frühen Myelozyten innerhalb der Granulozytenreifung limitiert ist¹⁰⁷. Es stellt sich daher als erstes die Frage, ob ELA2 in den verwendeten Zellen überhaupt gebildet wird, was mittels RT-PCR bestätigt werden konnte.

Trotzdem war eine Transfektion des ELA2 Promotors in diese Zell-Linie nicht erfolgreich. Die Ursache hierfür liegt allerdings nicht in einer mangelnden Transfektionseffizienz oder in technischen Problemen, da ein starker Kontrollpromotor (ECE1c) auswertbare Luziferaseaktivitäten zeigte. Die Erklärung für dieses Phänomen ist eher in einer zu schwachen *in vitro* Aktivität des ELA2-Promotors in der beschriebenen Zell-Linie zu suchen. Und tatsächlich zeigen bereits frühere Publikationen, dass die Promotoraktivität von ELA2 in den HL60 Zellen nur gering ist.

Bereits Yoshimura et al.⁶⁹ konnte gezeigt werden, dass die Transfektion dieser Zell-Linie mit dem ELA2-Promotor auf dem Differenzierungsstatus der Vorläuferzellen nur sehr geringe Promotoraktivität zeigt. Differenzierung der Zellen in Richtung Myelozyten mittels Dimethylsulfoxid führt zu erhöhten Expressionsraten. Diese gingen allerdings verloren, wenn man die Zellen in Richtung von Monozyten differenzierte.

Auch zwei Jahre nach dieser Veröffentlichung konnten Yoshimura und Kollegen⁵² keine Promotorstudien für ELA2 in HL60 Zellen durchführen. Es wird beschrieben, dass zahlreiche unterschiedliche Transfektionsmethoden nur zu einer unzureichenden Reproduzierbarkeit der Ergebnisse führten.

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit von vornherein mit zwei verschiedenen Zell-Linien gearbeitet und zusätzlich zu der humanen HL60 die murine Myelozyten-Zell-Linie 32d verwendet.

Auch Horwitz et al.^{61,70} benutzten in ihren Untersuchungen die murine Zell-Linie 32d zur Durchführung von transienten Transfektionen aus Ermangelung einer entsprechenden humanen Zell-Linie. Die Verwendung einer Zell-Linie von *Mus musculus* ist insofern für diese *in vitro* Experimente zulässig, da die Homologie der murinen ELA2 mit der humanen 73,21% beträgt (vergl. NCBI UniGene Cluster Hs.99863 für ELA2).

Die Transfektion von ELA2-Promotor in den 32d Zell-Linien führte zu transient transfizierten Zellen, die in der Auswertung eine stabile und hohe Aktivität des Promotors zeigen.

7.6.6 Bewertung der Deletion des REP53 Elementes

Ein wichtiges Ergebnis in der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung einer 53 bp großen Deletion an Position -852 vom Translationsstartpunkt im ELA2 Gen.

Diese Deletion konnte ich bei nur einem Patienten mit einem sehr frühen Myokardinfarkt im Alter von 28 Jahren und einer interessanten Familienanamnese nachweisen. Leider konnte ich aus rechtlich-ethischen Gründen sowie Datenschutzaspekten nicht nachvollziehen, ob die entsprechende Deletion des repetitiven Elements im Promotor von ELA2 paternal oder maternal vererbt ist. Diese Frage ist insofern von Interesse, als dass die Mutter dieses Patienten ebenfalls einen sehr frühen Myokardinfarkt erlitt. Der Studienplan der ECTIM-Studie sah bei Rekrutierung der Patienten und Kontrollen keine Rückverfolgbarkeit auf die Individuen und schon gar nicht auf Familienangehörige vor.

Nichtsdestoweniger muss diskutiert werden, ob die identifizierte Deletion tatsächlich eine funktionelle Bedeutung für Myokardinfarkt hat oder ob diese eventuell genetisch unbedeutend ist und nur zufällig mit diesem Phänotypen korreliert werden konnte. Um diese Fragen näher zu beleuchten, wurden verschiedene Untersuchungen am Promotor von ELA2 durchgeführt.

Genetisch betrachtet betrifft die Deletion ein transkriptionell funktionelles repetitives 53/52 bp (REP53) Element, das aus sechs wiederholenden Elementen besteht und eine potentielle Bindungsstelle für ein Helix-Loop-Helix Basisprotein zwischen den Stellen -1032 und -716 beinhaltet⁵². Bisher bleibt die Rolle dieses REP53 Elements weithin unbekannt.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in der murinen myeloischen Zell-Linie 32d die Deletion eines REP53 Elements im Promotor von ELA2 keinen Einfluss auf die Promotoraktivität hat, obwohl bekannt ist, dass dieses REP53 Element als ein nicht zellspezifischer Verstärker der Transkription fungiert, welches in der Lage ist, heterologe Promotoraktivität hochzuregulieren⁵².

In der Arbeit von Yoshimura et al. wurde jeweils eines der repetitiven Element von ELA2 in einen pAZ1037 Vektor vor einen heterologen Promotor (hier β -Actin vom Huhn) sowohl in sense- als auch in antisense-Richtung subkloniert und in K-562 (Leukämiezell-Linie) sowie HeLa-Zellen (humane Zervixkarzinomzell-Linie) transfiziert. Obwohl diese Zellen normalerweise keine ELA2 exprimieren beschreiben die Autoren eine zwei- bis dreifach höhere Aktivität der Konstrukte mit REP53 gegenüber der Negativkontrolle ohne REP53. Allerdings gibt es keinen Unterschied der Aktivitäten zwischen der sense und der antisense-Ausrichtung des REP53.

Diese Untersuchungen geben daher keine sinnvollen Hinweise auf eine geänderte Promotoraktivität bei Fehlen nur eines dieser 53bp Elemente in myeloischen Zellen, das normalerweise 6fach wiederholten vorliegt. Außerdem ist die Aussagefähigkeit dieser Ergebnisse ohnehin beschränkt, da zum einen ein heterologer Promotor mit einer nicht nachvollziehbaren Synthese von humaner und nicht-humaner DNA für diese Untersuchungen genutzt wurde. Zum anderen ist die Transfektion von Zellen, die das entsprechende Protein nicht exprimieren nur bedingt bedeutungsvoll.

Bereits 1991 wiesen jedoch Han et al.¹⁰⁸ darauf hin, dass in ihren Untersuchungen in HepG2 Zellen, einer Leberkarzinomzell-Linie, die Anwesenheit der 53 bp Tandemrepeats keinen Effekt auf die ELA2 Promotor-abhängige Aktivität hat. In dieser Arbeit wurde die Regulation der Transkription in Abhängigkeit von der ELA2 Promotorlänge in myeloischen und nicht-myeloischen Zellen untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass der ELA2-Promotor keine Aktivität in nicht-myeloischen Zellen aufweist.

Zur Klärung der Bedeutung des REP53 Elementes im ELA2 gibt die Promotoranalyse ähnlicher Gene möglicherweise einen Aufschluss. In anderen Genen, deren Expression ebenso auf das frühe Stadium der Myeloiddifferenzierung limitiert ist, wie beispielsweise Myeloperoxidase und Cathepsin G, fehlt allerdings dieses REP53 Element. Man postuliert daher im Zusammenhang mit seinen Ergebnissen, dass das REP53 die Funktion des ELA2 Promotors nicht moduliert. Es ist trotzdem möglich, dass das REP53 eine Rolle bei der Promyelozyten-spezifischen Expression von ELA2 spielt⁵².

Da es zum Zeitpunkt meiner Transfektionsexperimente noch keine Erkenntnisse über den Einfluss des REP53 Elements in myeloischen Zellen gab, habe ich versucht, die Aktivität des ELA2 Promotors in 32d Zellen und HL60 Zellen nachzuweisen.

Die Ergebnisse in den murinen 32d Zellen weisen jedoch nicht darauf hin, dass eine Deletion des Elementes zu einer geringeren Aktivität des Promotors führt. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass das fehlende REP53 Element bei dem Patienten mit dem frühen Myokardinfarkt, zumindest keinen Einfluss auf die Promotoraktivität von ELA2 in den vorliegenden *in vitro* Experimenten hat.

Es ist jedoch durchaus möglich, dass die getesteten Promotorvarianten in humanen myeloischen Zellen oder anderen pathophysiologisch relevanten Zelltypen einen Unterschied zeigen würden. Wie bereits aufgeführt, ist die Transfektion bzw. Auswertung in den bisher zur Verfügung stehenden Zell-Linien jedoch nicht möglich. Von daher sind solche Untersuchungen bedingt artifiziell, da die physiologische Umgebung in der Zellkultur nur schwer nachzuahmen ist, die Bewertung solcher Ergebnisse bleibt daher schwierig.

7.7 Einfluss posttranskriptioneller Mechanismen

Die vorliegenden Ergebnisse aus Korrelation von Polymorphismen mit Phänotypen sowie die Promotoraktivität unterschiedlich alleler Promotoren, wurden nicht hinsichtlich posttranskriptioneller bzw. epigenetischer Effekte untersucht. Diese Ereignisse sind aber prinzipiell bei der Untersuchung genetischer Erkrankungen nicht außer Acht zu lassen.

Eine Steuerung der Genaktivität durch beispielsweise Methylierung kann entsprechend weitreichende Resultate nach sich ziehen. Möglicherweise spielen auch posttranskriptionelle Mechanismen im Rahmen der Regulation der

Proteinsynthese *in vivo* eine entscheidendere Rolle als Polymorphismen, die beim ACS möglicherweise eine untergeordnete Bedeutung besitzen.

Auch andere posttranskriptionelle Effekte wie beispielshalber Spleißen oder RNA-Transport wurden in dieser Arbeit nicht untersucht, können aber aufgrund ihrer gravierenden Eingriffe relevante Ergebnisse bringen.

Da diese epigenetischen Einflüsse eine große Bedeutung auf die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse haben könnten, sollten sie in weiterführenden Studien untersucht werden.

7.8 Bedeutung der Genotypisierung für die Prädiktion, Prävention und Therapie von Patienten mit akutem Koronarsyndrom

Die Ergebnisse der Untersuchungen von Genen und deren Einfluss auf Phänotypen des akuten Koronarsyndroms sind sehr vielfältig. Einfache Genotyp-Phänotyp Assoziationen sind für eine große Anzahl von monogenetischen Erkrankungen gezeigt worden. Dagegen steht die Tatsache des ACS, dass es nicht monogenetisch ist sondern durch den Einfluss sehr vieler Gene und deren Interaktion mit der Umwelt geprägt wird.

Nur bei sehr wenigen Erkrankungen lassen sich aufgrund genetischer Muster Rückschlüsse auf Verlauf und Therapie ziehen. In der Regel ist dies nur bei monogenetischen Erkrankungen möglich.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen aber deutlich, dass mit den identifizierten genetischen Mutationen und Polymorphismen nur ein sehr kleiner Teil dessen erklärt werden kann, was das ACS verursacht. Dies liegt notwendigerweise daran, dass die Genese des Phänotypen ACS derart vielschichtig ist und dadurch bedingt, neben den Umweltfaktoren, der Einfluss sehr vieler Gene hier zum Tragen kommt^{3,109,110}. Das individuelle Risiko für ein ACS resultiert aus einem bislang nur unzureichend aufgeklärten Zusammenwirken von Umweltfaktoren und genetischer Disposition.

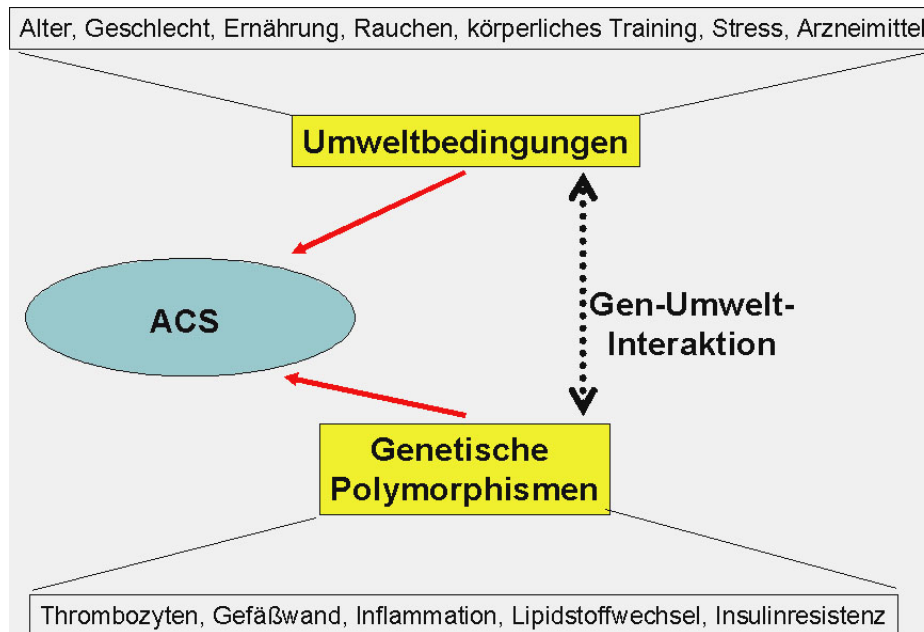


Abb. 29: Umweltfaktoren und genetische Disposition sowie deren Interaktion als Risikofaktoren für die akuten Koronarsyndrome. Adaptiert nach Hellstern et al.¹¹¹

Der hohe Stellenwert der positiven Familienanamnese für das ACS verdeutlicht, dass genetische Faktoren im Rahmen der multifaktoriellen Ätiologie und der komplexen Pathogenese eine wesentliche Rolle spielen.

Es ist zu erwarten, dass in näherer Zukunft weitere Kandidatengene und genetische Varianten für das ACS im speziellen und kardiovaskuläre Erkrankungen im allgemeinen entdeckt werden, die zur Aufklärung der Genese und des persönlichen Risikos beitragen können. Indessen bleibt die Frage weiterhin offen, ob es in der nächsten Zeit möglich sein wird, anhand von gezielten Genotypisierungen ein Krankheitsrisiko für bestimmte Personen zu entwickeln.

Ein weiteres wichtiges Ziel dieser zukünftigen Untersuchungen ist dabei auch eine verbesserte Effizienz pharmakotherapeutischer Interventionen, die durch genetische Faktoren wesentlich mitbestimmt wird und daher eine individualisierte Therapie erfordert.

Neben einer Primärprävention bietet dieser Ansatz bei manifester KHK bzw. Zustand nach Myokardinfarkt auch eine innovative Möglichkeit der Sekundärprävention. Mit der Identifizierung von Genen für das ACS könnte ein erheblicher Beitrag zur Effizienzsteigerung in der Gesundheitsvorsorge geleistet werden, da Hochrisiko-Patienten identifiziert und so bei diesen präventive Maßnahmen gezielt und kosteneffizient eingesetzt werden könnten.

Zudem zeigen die verschiedenen bei akut koronaren Ereignissen intravenös applizierbaren GPIIb/IIIa-Antagonisten interindividuell sehr unterschiedliche therapeutische Erfolge, was wahrscheinlich genetisch bedingt ist¹¹². Ziel der so genannten Pharmakogenomik ist es, die genetischen Unterschiede zu erforschen, die der individuell unterschiedlichen Ansprechbarkeit auf Therapeutika zugrunde liegen¹¹³. Langfristig soll dadurch die Arzneimitteltherapie verbessert und individuell optimiert werden. Für die Pharmakogenomik sind vor allem solche genetischen Varianten von großer Bedeutung, die potenziell Einfluss auf die Struktur, Funktion und Regulation der Expression von Proteinen haben¹¹⁴. Bis zur tatsächlichen flächendeckenden Durchführung solcher individualisierten Therapien bedarf es allerdings der Entwicklung ausreichend effizienter und kostengünstiger Hochdurchsatz-Technologien, entsprechender Bioinformatik-Algorithmen und die Bereitstellung gut charakterisierter Patientenkohorten in hinreichender Anzahl und die Generierung der notwendigen Datenmengen. Es ergibt sich dabei die Notwendigkeit der Validierung von Ergebnissen durch funktionelle Analysen und die Frage der Umsetzbarkeit durch pharmazeutisch-industrielle Programme.

Am Ende steht allerdings die Problematik, wie zurzeit mit identifizierten und assoziierten genetischen Varianten umgegangen werden soll. Auch nachgewiesene Mutationen und Polymorphismen lassen bisher keine Rückschlüsse auf Therapie oder Risiko zu. Lediglich auf eine Änderung der Lebensführung zur Reduktion der umweltbedingten Risikofaktoren kann hingewiesen werden. Somit sollten Genotypisierungen von Patienten mit großer Vorsicht und nicht obligat durchgeführt werden¹¹⁵⁻¹¹⁷.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die genetischen Varianten in den untersuchten Kandidatengenen Fibrinogen und ELA2 für die Thrombozytenaggregation zumindest für Hochrisikopopulationen in Verbindung mit kardiovaskulären Erkrankungen stehen könnten. Die durchgeführten Untersuchungen lassen Rückschlüsse auf die Bedeutung der untersuchten Gene und deren genetische Varianten bezüglich des Risikos für das ACS zu. Um die vorliegenden Daten besser interpretieren zu können, müssten weiterreichende Untersuchungen unternommen werden, damit die molekularen und zellulären Mechanismen des potenziellen Einflusses dieser genetischen Varianten auf kardiovaskuläre Phänotypen aufgeklärt werden.