

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Sportmedizin
Molekulare Genetik kardiovaskulärer Erkrankungen
Abteilungsleiter: Univ.-Prof. Dr. Dr. med. Stefan-Martin Brand, PhD

**Untersuchung des *Phospholipase-C- γ -2*-Gens auf genetische
Variabilität**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Quindt, Eduard

Frunse/UdSSR

-2014-

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-
Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. med. Stefan-Martin Brand, PhD

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Hermann-Joseph Pavenstädt

Tag der mündlichen Prüfung: 24.01.2014

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Sportmedizin
Molekulare Genetik kardiovaskulärer Erkrankungen
Abteilungsleiter und Referent: Univ.-Prof. Dr. Dr. med. Stefan-Martin Brand, PhD
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Hermann-Joseph Pavenstädt

ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchung des *Phospholipase-C-γ-2*-Gens auf genetische Variabilität

Quindt

Eduard

Das Enzym Phospholipase-C-γ-2 (PLCγ2) spielt eine zentrale Rolle bei der Signaltransduktion von Adhäsionsglycoproteinen der Thrombozytenadhäsion und -aggregation. Dieser Arbeit liegt die Frage zugrunde, ob und in welcher Form das Gen für die *PLCγ2* variabel ist.

Die *PLCγ2* wurde in 95 Hochrisikopatienten der Etude Cas-Témoins sur l'Infarctus du Myocarde (ECTIM-Studie) mittels Single Strand Confirmation Polymorphism (SSCP) auf genetische Varianten untersucht. Die hierbei detektierten genetischen Varianten wurden anschließend mittels Sequenzierung validiert.

Wir identifizierten 58 genetische Varianten, davon 26 im Bereich des Promotors, 14 in kodierenden und 18 in exonflankierenden, intronischen Bereichen. Wir kategorisierten die genetischen Varianten im Promotor und den exonischen Bereichen um mögliche Kandidaten für eine anschließende funktionelle Analyse zu identifizieren.

Im Rahmen inflammatorischer Prozesse scheint die Genexpression der *PLCγ2* und damit ihre Aktivität vor allem durch die Transkriptionsfaktoren der Aktivator Protein 1 (AP-1)- und Nuclear factor `kappa-light-chain-enhancer` of activated B-cells (NF-kappaB) Familien reguliert zu werden. Die Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) A80369511G (rs4494534) und T80369776C (rs4500720) verändern die Vorhersage für Transkriptionsfaktorbindungsstellen (TFBS) der NF-kappaB-Familie. Die neu beschriebenen Varianten A80370272G und C80370273G liegen im *PLCγ2*-Promotorbereich mit nachgewiesener hoher Aktivität. In unmittelbarer Nähe einer AP-1- und NF-kappaB-TFBS befindet sich die neu beschriebene Variante T80368661G sowie die bereits veröffentlichten Varianten G80368898C (rs7198003), C80369484A (rs56704282), G80369737A (rs4273032) und A80369893G (rs4401042).

In den kodierenden Bereichen wurden die genetischen Varianten A80377177T (rs61749044), A80480282T (rs45443101), C80480314T (rs17537869) sowie die neu beschriebene Variante C80510742T als Missensevarianten identifiziert. Die Varianten A80480282T (rs45443101) und C80480314T (rs17537869) befinden sich in der phosphoinositolspezifischen EF-hand-like-Domäne der *PLCγ2* und könnten zu einer veränderten Kalziumionenaffinität des Proteins führen.

Die oben genannten genetischen Varianten im Promotorbereich könnten über eine veränderte Regulation der *PLCγ2*-Expression, die genetischen Varianten im exonischen Bereich über eine mögliche Änderung der Proteinstruktur einen Einfluss auf die Proteinfunktionalität der *PLCγ2* haben.

Die hier aufgeführten Ergebnisse sollen als Grundlage für weitere molekular- und zellbiologische Analysen der funktionellen Bedeutung genetischer Varianten im *PLCγ2*-Gen dienen.

Tag der mündlichen Prüfung: 24.01.2014

Eidesstattliche Erklärung

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel

Untersuchung des *Phospholipase-C- γ -2*-Gens auf genetische Variabilität

im Institut für Sportmedizin, Molekulare Genetik kardiovaskulärer Erkrankungen
der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

unter der Anleitung von

Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. med. Stefan-Martin Brand, PhD

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Halle (Westf.), 27.01.2014

Eduard Quindt

Meiner Familie

1.0	Einleitung	10
1.1	Epidemiologische Bedeutung von Herz-Kreislaufkrankungen	10
1.2	Definition und Pathogenese der Arteriosklerose	10
1.3	Definition und Pathogenese der koronaren Herzkrankheit (KHK) und des akuten Koronarsyndroms (ACS)	12
1.4	Risikofaktoren des ACS	12
1.5	Thrombozytenadhäsion und -aggregation	13
1.6	Molekulargenetik und kardiovaskuläre Erkrankungen	16
1.7	Kandidatengene des ACS	18
1.7.1	Der Kandidatengenansatz	18
1.7.2	Genomweite Assoziationsstudien (GWA)	18
1.7.3	Auswahl der Kandidatengene	18
1.8	Die Phospholipase-Familie	19
1.8.1	Phospholipase-C- γ -2 (PLC γ 2)	19
1.8.2	Genom- und Peptidstruktur der PLC γ 2	19
1.8.3	Bedeutung der PLC γ 2 für das ACS	21
1.9	Ziel der Arbeit	24
2.0	Material und Methoden	25
2.1	Materialliste und Bezugsquellen	25
2.1.1	Chemikalien	25
2.1.2	Puffer	25
2.1.3	Gele	26
2.1.4	Enzyme	26
2.1.5	Geräte	26
2.1.6	Weiterer Laborbedarf	27
2.2	Methoden	27
2.2.1	ECTIM Studie	27

2.2.2	Die Polymerase Kettenreaktion (PCR)	28
2.2.2.1	Primerdesign	29
2.2.2.2	Bedingungen für den PCR-Reaktionsansatz	29
2.2.3	Die Agarosegelelektrophorese	30
2.2.3.1	Herstellung des Agarosegels und Durchführung der Agarosegelelektrophorese	31
2.2.4	Die SSCP-Analyse	32
2.2.4.1	Durchführung der SSCP-Analyse	32
2.2.5	Die Sequenzierung	33
2.2.6	Auswertung und Nomenklatur	34
2.2.7	<i>In silico</i> Promotoranalyse	35
3.0	Ergebnisse	36
3.1	Systematische Analyse des <i>PLCγ2</i> -Gens	36
3.2	Identifizierte Varianten im <i>PLCγ2</i> -Gen	48
3.3	Übersichtstabelle der <i>PLCγ2</i> -Varianten	54
3.4	<i>PLCγ2</i> -Genkarte mit detektierten genetischen Varianten	59
3.5	Genetische Varianten im <i>PLCγ2</i> -Promotorbereich	67
3.6	<i>In silico</i> Analyse der <i>PLCγ2</i> -Promotorregion	68
3.7	Genetische Varianten im kodierenden Bereich der <i>PLCγ2</i>	76
3.8	Einfluss der Varianten auf die <i>PLCγ2</i> - Aminosäuresequenz	78
4.0	Diskussion	80
4.1	Sensitivität der SSCP-Analyse für den Nachweis genetischer Varianten	80
4.2	Genetische Varianten im <i>PLCγ2</i> -Gen	81
4.3	Der Promotorbereich	81

4.4	Der kodierende Bereich	83
4.4.1	Aminosäureaustausch Leucin statt Methionin im Exon 2	84
4.4.2	Aminosäureaustausch Leucin statt Histidin im Exon 10	84
4.4.3	Aminosäureaustausch Tryptophan statt Arginin im Exon 10	85
4.4.4	Aminosäureaustausch Isoleucin statt Tryptophan im Exon 20	85
4.5	Zusammenfassung	86
5.0	Ausblick	87
6.0	Literaturverzeichnis	89
7.0	Verzeichnis der Tabellen, Abbildungen und Schemata	96
8.0	Lebenslauf	98
9.0	Danksagung	100
10.0	Anhang	I
10.1	<i>PLCγ2</i> -Primerpaare und PCR-Bedingungen	I
10.2	Aminosäuren und deren Abkürzungen	III
10.3	Tripletts und korrespondierende Aminosäuren	IV
10.4	Ergebnis der AliBaba 2.1 <i>in silico</i> Analyse	V

1.0 Einleitung

1.1 Epidemiologische Bedeutung von Herz-Kreislaufkrankungen

Im Jahr 2010 starben in Deutschland insgesamt 858.768 Personen. Mit einem Anteil von 41,1% waren die häufigsten Todesursachen, wie in den Vorjahren, Erkrankung des Herz-Kreislaufsystems (Tabelle 1). Die wichtigste spezifische Todesursachengruppe war dabei die der ischämischen Herzkrankheit (133.126 Sterbefälle), darunter insbesondere der akute sowie der rezidivierende Myokardinfarkt mit insgesamt 59.107 Todesfällen (57).

Tabelle 1: Die zehn häufigsten Todesursachen 2010 (Quelle: Statistisches Bundesamt Deutschland [57]).

Todesursachen	Todesfälle Frauen	Todesfälle Männer
Chronisch ischämische Herzkrankheit	38.888	33.846
Akuter Myokardinfarkt	24.890	30.651
Herzinsuffizienz	32.490	15.816
Bösartige Neubildung der Bronchien und der Lunge	13.615	29.357
Sonstige chronische obstruktive Lungenkrankheit	10.945	14.730
Schlaganfall, nicht als Blutung oder Infarkt bezeichnet	15.253	8.422
Hypertensive Herzkrankheit	15.151	5.453
Pneumonie, Erreger nicht bezeichnet	9.656	8.735
Bösartige Neubildung der Brustdrüse	17.466	147
Bösartige Neubildung des Dickdarms	8.682	8.479

1.2 Definition und Pathogenese der Arteriosklerose

Die Arteriosklerose ist eine progressive Erkrankung der großen und mittleren Gefäße. Dabei kommt es zu einer variablen Veränderung der Intima und der Media mit Bildung einer Plaque, bestehend aus einer Ansammlung von Low-Density-Lipoprotein-Cholesterin (LDL-Cholesterin), komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, sowie Bindegewebe und Kalziumablagerungen (28).

Ausgehend von der endothelialen Dysfunktion kommt es zur Einschwemmung von LDL-Cholesterin in die Intima sowie zur Einwanderung von Monozyten, die, vermittelt durch Zytokine wie Interferone, zu Makrophagen differenzieren und das LDL-Cholesterin integrieren. Nach Umwandlung der Makrophagen in Schaumzellen, sezernieren diese unter anderem Interleukin-1beta (IL-1 β) und den Tumornekrose-

faktor- α (TNF- α). Es kommt zur Anlagerung von Thrombozyten, die zusammen mit den Schaumzellen den platelet-derived growth factor (PDGF) sezernieren. Hierdurch angeregt, proliferieren glatte Muskelzellen und bilden u.a. Kollagen und Proteoglykane wie Biglykan und Dekorin. Des Weiteren können sich Kalkspangen bilden, die zur Wandstarre der Gefäßwand führen. In der betroffenen Arterie entsteht eine muskelfaserhaltige Plaque mit einer fibrotischen Kappe (63).

Atherosklerotische Plaques können verschiedene hämodynamische Auswirkungen haben. Zum einen kann es zu einem Elastizitätsverlust der Gefäßwand und hierdurch zu einer veränderten Strömungseigenschaft, von laminarer zur turbulenten Blutströmung, kommen. Zum anderen kann eine Plaque zu einer Einengung des Gefäßlumens mit nachfolgender Ischämie führen (9).

Ein Akutereignis stellt die physikalische Ruptur einer instabilen Plaque dar. Die Stabilität einer atherosklerotischen Plaque ist abhängig von seiner Elastizität, vor allem bestimmt durch den Grad der Kalkeinlagerung, von der mechanischen Eigenschaft der fibrotischen Kappe und von der Größe des Lipidkerns (63).

Im Rahmen der Ruptur einer instabilen Plaque kommt es zum Kontakt von zirkulierenden Koagulationsfaktoren aus dem Blut mit dem thrombogenen Material aus dem Kern der Plaque. Dieser Kontakt führt zur Bildung eines Thrombus, der im Gefäß an einer nachfolgenden Stelle zum Gefäßverschluss führen kann (9).

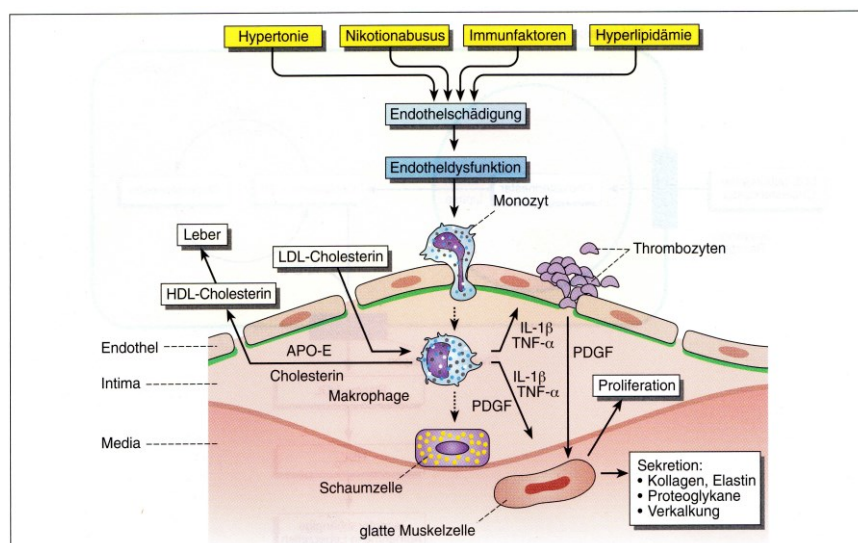


Abb. 1.: Entstehung einer atherosklerotischen Plaque (Quelle: Böcker W, Denk H, Heitz PU. Pathologie [9]. Genehmigt durch den Urban & Fischer Verlag).

1.3 Definition und Pathogenese der koronaren Herzkrankheit (KHK) und des akuten Koronarsyndroms (ACS)

Die KHK ist die Manifestation der Arteriosklerose in den Herzkranzarterien. Die zunehmende Lumeneinengung der Koronararterie führt zu einer Abnahme des Perfusionsdruckes im poststenotischen Bereich, es entsteht ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und -angebot im Herzmuskel. Der zunehmende Sauerstoffmangel im Myokard führt zum Leitsymptom der Koronarinsuffizienz, der Angina pectoris (9). Während die stabile Angina pectoris regelmäßig durch bestimmte Mechanismen, zum Beispiel körperliche Anstrengung oder seelischen Stress ausgelöst wird und gut auf die Gabe von Nitraten anspricht, ist die instabile Angina pectoris durch eine zunehmende Schwere, Dauer und Häufigkeit der Schmerzanfälle charakterisiert (28).

Die durch die Abnahme der poststenotischen Perfusion hervorgerufene Myokardischämie hat verschiedene Manifestationsformen. Grundsätzlich wird die asymptomatische KHK (stumme Ischämie) von der symptomatischen KHK unterschieden. Zu der Letzteren zählen die Angina pectoris, die ischämisch bedingten Herzrhythmusstörungen, der plötzliche Herztod, die ischämische Herzmuskel-schädigung bei Linksherzinsuffizienz, sowie der Myokardinfarkt (28).

Das ACS wird definiert als instabile Angina pectoris, Nicht-ST-Hebungsinfarkt (NSTEMI) oder ST-Hebungsinfarkt (STEMI). Ursache des akuten Ereignisses ist eine kritische Reduktion des Blutflusses, bedingt durch die Ausbildung eines Thrombus nach Plaqueruptur oder Plaqueerosion (19).

Die Häufigkeit des ACS als Erstmanifestation der KHK beträgt etwa 40% (19). Ein klinisch relevantes Problem ist, dass 30-40% der KHK-Patienten prähospital versterben (59). Zur Verbesserung der Prävention ist das Verständnis der Pathogenese des ACS außerordentlich wichtig.

1.4 Risikofaktoren des ACS

Verschiedene Risikofaktoren, sowohl umweltbedingt als auch genetisch, beeinflussen das individuelle Risiko für die Ausbildung des ACS. Die bekannten Risikofaktoren für die Atherosklerose und damit für die Ausbildung eines ACS sind Diabetes mellitus, Nikotinabusus, arterielle Hypertonie, Dyslipoproteinämie (LDL-Cholesterinerhöhung, High-density-Lipoprotein-Cholesterin-Erniedrigung), Lebensalter (Männer > 45 Jahre und Frauen > 55 Jahre) sowie Übergewicht (28).

Im Hinblick auf die Sekundärprävention konnte im Rahmen der Multicenter Studien European Action on Secondary Prevention through Intervention to Reduce Events I und II (EUROASPIRE) gezeigt werden, dass vor allem die Risikofaktoren inhalatives Rauchen und Diabetes mellitus mit der Mortalität des ACS assoziiert sind (48).

Des Weiteren stellt die familiäre genetische Prädisposition einen Risikofaktor dar, wenn Familienangehörige ersten Grades vor dem 55. Lebensjahr (m) bzw. 65. Lebensjahr (w) ein ACS erlitten hatten (28).

Aber auch singuläre genetische Varianten können mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert sein. Ein Beispiel für ein solches Risiko-Allel stellt die Insertions/Deletions Variante (I/D) im *Angiotensin-Converting Enzyme* (ACE) dar. Der DD-Genotyp wurde in einer von Cambien et al. im Jahr 1992 veröffentlichten Studie mit Myokardinfarkt assoziiert (12).

1.5 Thrombozytenadhäsion und -aggregation

Die Rolle der Thrombozyten in der Pathophysiologie des ACS ist essenziell, da der Ruptur einer koronaren Plaque die Aktivierung, Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten folgt. Hieraus resultiert die Bildung eines okklusiven oder nicht okklusiven koronaren Thrombus (20).

Die Thrombozytenadhäsion und -aggregation ist Teil der physiologischen Hämostase, aber auch der pathologischen Entstehung eines Thrombus und damit des Gefäßverschlusses. Physiologisch zirkulieren Thrombozyten einzeln im Blut ohne dass Interaktionen untereinander oder mit anderen Zelltypen stattfinden. Im Falle der Verletzung der Gefäßwand führen primäre und sekundäre Hämostase zur Bildung eines Thrombus aus Thrombozyten und Fibrin (9).

Die Thrombozytenmembran besitzt zahlreiche Komponenten, die den Kontakt mit subepithelialen Strukturen bzw. dem Endothel nach Gefäßverletzungen fördern. Auf ihrer Außenfläche trägt die Thrombozytenmembran eine Formation aus Glykoproteinen. Diese dienen hauptsächlich als Rezeptoren für die Induktion der hämostatischen Aktivität der Thrombozyten. Die Aktivierung der Thrombozyten durch Agonisten findet durch Bindung an diese Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche statt (21).

Die thrombozytären Glycoproteine werden nach ihrer Molekularmasse in unterschiedliche Fraktionen unterteilt: Ia, Ib, IIa, IIb, IIIa, IIIb. Es handelt sich dabei um Superfamilien von Rezeptorproteinen für die adhäsiven Proteine, an denen Fibrinogen als intrazelluläres Adhäsionsmolekül und die Substratadhäsionsmoleküle Von- Wille-

brand Faktor (vWF), Fibronectin, Vitronectin und vor allem Kollagen spezifisch gebunden werden (35). Integrine sind heterodimere Glycoproteine, bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit. Durch die unterschiedliche Kombination der Untereinheiten werden ca. 24 Integrine generiert. Die Molekularmasse der Integrine kann zwischen 90 und 160 kDa variieren (35). Sie dienen als Zelloberflächenrezeptoren der Kommunikation mit der extrazellulären Matrix. Dabei werden zwei Wege unterschieden (Abb. 2). Das *inside-out-Modell* beschreibt eine Änderung der Liganden-Affinität nach Bindung von Rezeptor-Agonisten. Das *outside-in-Modell* beschreibt die Signaltransduktion in die Zelle nach Ligandenbindung an den spezifischen Rezeptor (55). Für die Adhäsion der Thrombozyten an die extrazelluläre Matrix sind die beiden Glycoproteine GP Ia/IIa (entspricht dem Integrin $\alpha_2\beta_1$) und das Glykoprotein GP Ib/X von Bedeutung. Ein weiteres Glycoprotein, das Glycoprotein GP IIb/IIIa (entspricht dem Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$) trägt wesentlich zur Thrombozytenaggregation über die Vernetzung mit Fibrinogen bei. Das Glykoprotein VI ist für die Adhäsion der Thrombozyten an die extrazelluläre Matrix essenziell (43).

Die Verletzung der Gefäßwand führt zu einer raschen Vasokonstriktion. Dieser Effekt beruht auf Reaktionen der glatten Gefäßmuskulatur (myogene Reaktion) und vasomotorischer Nerven auf die Traumatisierung (9). Bedeutsam sind ebenso lösliche Mediatoren, die aus den Thrombozyten und dem Endothel freigesetzt werden. Durch die Gefäßverletzung kommt es zum Kontakt der Thrombozyten mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix wie z.B. Kollagen, Proteoglykanen und anderen adhäsiven Glykoproteinen. Infolge der Thrombozytenadhäsion werden diese Bestandteile der extrazellulären Matrix über die spezifischen Rezeptoren der Thrombozyten erkannt. Diese Rezeptoren aktivieren die Thrombozyten am Ort des Gefäßdefektes und stellen daher die Schlüsselreaktion der Thrombozytenadhäsion und -aggregation dar. Initiiert wird die Bindung der Thrombozyten an das subendotheliale Kollagen über das Glycoprotein GPIb-V-IX, unter Anwesenheit des von vWF. Die Bindung ist die initiale Vernetzung und essenziell, da in den kleinen Arterien und Arteriolen hohe Scherkräfte herrschen. Der Gefäßdefekt wird durch einen zunächst einschichtigen Rasen von adhärierenden Thrombozyten gedeckt (17). Die Adhäsion an die veränderte Intima wird dadurch erleichtert, dass die Hemmwirkung des Endothels, vermittelt durch Mediatoren wie Prostazyklin und *endothelium-derived relaxing factor* (ERDF) aus dem Endothel, auf Thrombozyten infolge des Endotheldefektes entfällt (34). Durch die Adhäsion werden die Thrombozyten aktiviert und sezernieren eine Vielzahl von Mediatoren, u.a.

Adenosin Diphosphat (ADP), Fibrinogen, Fibronectin, vWF und Thromboxan A₂. Zur Festigung der Thrombozytenadhäsion werden weitere Bindungen an die extrazelluläre Matrix benötigt (17). Dieses setzt die Konversion von Integrinen (GPIa/IIa und GPIIb/IIIa), von einem niedrigen Affinitätslevel in ein hohes Affinitätslevel, voraus (*inside-out-signaling*) (55). Entscheidend für die Konversion ist die Bindung des GP VI-Rezeptors der Thrombozyten an eine spezifische Sequenz des subendothelialen Kollagens (43). Nach Konversion des GPIa/IIa binden die Thrombozyten auch über diese Glykoproteine an die extrazelluläre Matrix. Die gesamte Thrombozytenbindung erhält dadurch Stabilität. Zusätzliche Stabilität wird durch die Konversion des Glykoproteins GPIIb/IIIa erreicht, welches jetzt lösliche Liganden und vWF binden kann. Durch Bindung von Fibrinogen an die GP-IIb/IIIa-Rezeptoren benachbarter Thrombozyten kommt es zur Bildung größerer Aggregate. Eine verstärkte Wirkung auf die Aggregatbildung haben das aus den α -Granula freigesetzte Thrombospondin, ADP und Kalzium. Unter dem Einfluss weiterer Induktoren, z.B. ADP, *platelet activating factor* (PAF) etc., verlieren die Thrombozyten ihre diskoide Form und nehmen eine sphäroide Form an. Es kommt zur Extrusion von Filopodien (*outside-in-signaling*) (55). Infolge der Thrombozytenaggregation kommt es, entsprechend dem „Schneeballsystem“, dazu, dass sich vermehrt Thrombozyten aus dem strömenden Blut an die adhärenen Thrombozyten anlagern. Es bildet sich ein Thrombus (17).

Die Phospholipase-C- γ -2 (PLC γ 2) findet sich in einigen Signalwegen der Adhäsionsglycoproteine, die für die Erkennung und die Adhäsion der Thrombozyten an die extrazelluläre Matrix wichtig sind (41, 43, 49).

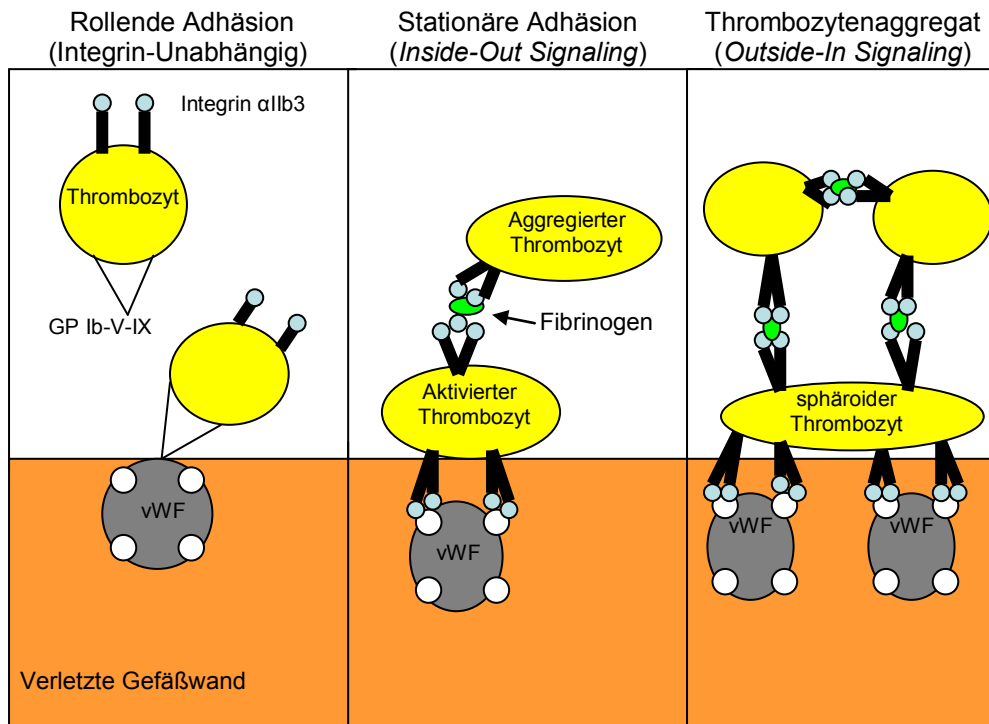


Abb.2: Integrine und Signaltransduktion, verändert nach Shattil et al. (55).

Linke Abbildung: Die Thrombozytenadhäsion an der verletzten Gefäßwand wird durch die Bindung von GP Ib-V-IX an den vWF initialisiert.

Mittlere Abbildung: Die Verstärkung der Adhäsion und die primäre Thrombozytenaggregation erfolgt über einen *inside-out* Signalweg, vermittelt durch $\alpha_{IIb}\beta_3$ Integrine (GPIIb/IIIa).

Rechte Abbildung: Zunahme der Thrombozytenaggregation und Entstehung eines Thrombozytenpropfes als Folge eines *outside-in*-Signalweges, vermittelt durch $\alpha_{IIb}\beta_3$ Integrine (GPIIb/IIIa).

1.6 Molekulargenetik und kardiovaskuläre Erkrankungen

Das humane Genom besteht aus ca. 3 bis 3,5 Milliarden Nukleotiden. Die Ratiostruktur des Genoms beschreibt eine Aufteilung von 70% intergenischem Bereich zu 30% genomischem Bereich. Letzterer besteht zu 90% aus Introns und zu 10% aus Exons, von denen nur ca. 3% für kodierende Gene und deren flankierende regulatorische Sequenzen verwendet werden (33).

Sequenzvarianten treten etwa alle 1000 Basen in kodierenden oder regulatorischen Sequenzen auf (14). Die meisten stabilen genetischen Varianten zeigen sich in Form von Einzelbasenaustauschen (*single nucleotide polymorphism*, SNP). Diese stellen

90% der gesamten Variationen im Genom dar. Die übrigen 10% zeigen sich als Insertion, Deletion und Variablen von Repeat-Elementen (14).

Man bezeichnet eine genetische Variante als „Polymorphismus“, wenn die Allelfrequenz des seltenen Allels größer als 1% in einer „Normalbevölkerung“ ist. Varianten, deren Allel-Frequenzen unter 1% liegen, werden als Mutationen bezeichnet (11).

Bei SNPs in kodierenden Regionen wird zwischen Transition und Transversion unterschieden. Die häufigste Form ist die Transition, wobei es zum Austausch von Pyrimidinbasen (z.B. G►C) oder Purinbasen (z.B. T►A) kommt. Seltener ist die Form der Transversion, wobei eine Purin- durch eine Pyrimidinbase, oder umgekehrt, ersetzt wird (33). Cambien et al. konnten ein Verhältnis von Transition zu Transversion von 2,3:1 nachweisen (13).

Polymorphismen sind regelmäßig in der „Normalbevölkerung“ nachweisbar, wenn auch mit unterschiedlicher Allelfrequenz in verschiedenen ethnischen Gruppen. Im Unterschied zu den seltenen Mutationen, die zu monogenen oder oligogenen Erkrankungen führen können, sind genetische Polymorphismen häufig. Es wird angenommen, dass sie bei einzelnen Individuen das Risiko für die Ausbildung bestimmter kardiovaskulärer Phänotypen deutlich erhöhen, insbesondere wenn mehrere Risikoallele zusammentreffen (33). Systematische Untersuchungen zeigten, dass Kandidatengene für kardiovaskuläre Erkrankungen polymorph sind (58).

Andererseits kann ein wenig frequentes Allel auch eine protektive Funktion haben, wie das Beispiel des Pro715-Allels im P-Selektin-Gen gezeigt hat. Dieses Allel ist häufiger bei gesunden Kontrollen als bei Patienten mit Myokardinfarkt zu finden (32).

Funktionelle genetische Polymorphismen können verschiedene Regionen des Gens betreffen. Dieses kann vorteilhafte oder nachteilige phänotypische Auswirkungen zur Folge haben. Genetische Varianten in kodierenden Regionen können zu einer veränderten Basentriplett-Sequenz führen. Dadurch ist eine Verschiebung oder eine Änderung des Leserasters mit einer veränderten Aminosäuresequenz möglich. Hieraus kann eine veränderte Proteinfunktion resultieren.

Genetische Varianten in regulatorischen Bereichen (Promotor, Introns, 3`-Region) können die Funktionalität über die Verfügbarkeit eines Gens und dessen Produktes beeinflussen. Polymorphismen im 3`-Bereich eines Gens können zu Veränderungen der mRNA-Stabilität und translationellen Blockade führen (2).

1.7 Kandidatengene des ACS

1.7.1 Der Kandidatengenansatz

Das ACS ist eine komplexe Erkrankung, die durch verschiedene genetische Faktoren und Umweltfaktoren determiniert ist. Die Identifizierung von Genen, die in die Genese dieser Erkrankung involviert sind, ist daher von großer Bedeutung.

Der Kandidatengenansatz basiert auf dem aktuellen Kenntnisstand der biologischen Signalwege und metabolischen Interaktionen, welche eine Rolle in der Pathophysiologie des ACS spielen, wobei zunehmend die inflammatorische Komponente im Vordergrund steht (10).

Zum Zeitpunkt dieser Arbeit ist der Kandidatengenansatz die etablierte Methode zur systematischen Suche nach genetischen Varianten in Kandidatengen, sowie die Assoziation einzelner Varianten mit dem Kandidatenphänotyp.

1.7.2 Genomweite Assoziationsstudien (GWA)

Aktuell werden zunehmend GWAs durchgeführt. Diese hypothesenfreien Studien untersuchen genetische Varianten über das gesamte menschliche Genom. Mit Hilfe von DNA-Chips wird an Stichproben von Patienten und gesunden Kontrollpersonen die Allelfrequenz einer Vielzahl von Polymorphismen statistisch verglichen. Kommen Marker an einem Chromosomenabschnitt in deutlich unterschiedlicher Häufigkeit vor, wird dieser Befund in weiteren Stichproben repliziert. Wenn sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen Fällen und Kontrollen ergibt, geht man von einem relevanten Befund aus (24).

In GWAs konnte die *PLCY2* bisher in Verbindung mit Bipolaren Erkrankungen (6,45) und einem erniedrigten Plasmaspiegel des High-density lipoprotein (HDL) gebracht werden (16).

1.7.3 Auswahl der Kandidatengene

Kandidatengene werden nach verschiedenen methodischen Aspekten ausgewählt. Für die Thrombozytenadhäsion und -aggregation, als pathophysiologischem Aspekt, kommen prinzipiell alle Gene in Betracht, deren Genprodukte direkt oder indirekt an der Thrombozytenadhäsion und -aggregation beteiligt sind. Hierzu zählen alle Gene, deren Produkte an der Rezeptorbindung sowie an der Signaltransduktionskaskade und damit verbundenem inside-out und outside-in signaling beteiligt sind (55). Da die

PLC γ 2 einen wichtigen Bestandteil der intrazellulären Signalkaskade der Integrine darstellt (29), könnte eine veränderte PLC γ 2-Aktivität zu einer veränderten Thrombozytenaggregation führen.

1.8 Die Phospholipase-Familie

Die Familie der Phospholipasen, auch bezeichnet als Phosphoinositidasen, setzt sich aus 11 Isoenzymen zusammen. Diese werden in drei Gruppen eingeteilt. Bekannt sind drei Isoenzyme der β -Gruppe, zwei Isoenzyme der γ -Gruppe und vier Isoenzyme der δ -Gruppe, sowie die diskutierte ε -Gruppe mit einem Isoenzym (50).

Ihre enzymatische Aktivität dient der Weiterleitung von extrazellulären Signalen in das Zellinnere. Diese lipidhydrolysierenden Enzyme spalten Phosphatidylinositol-4,5-bis-phosphat (PIP $_2$) aus der Zellmembran in die second messenger Inositoltriphosphat (IP $_3$) und Diacylglycerin (DAG). IP $_3$ bewirkt anschließend eine Freisetzung von Ca $^{++}$ -Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum. DAG und die Ca $^{++}$ -Ionen aktivieren unter anderem die Proteinkinase C (PKC) und induzieren so die zelluläre Antwort (50).

1.8.1 Phospholipase-C- γ -2 (PLC γ 2)

Die Signaltransduktion erfolgt bei den verschiedenen Isoenzymgruppen auf unterschiedliche Weise. Während die Signaltransduktion in der β -Gruppe an G-Proteine gekoppelt ist, erfolgt sie bei den beiden Isoenzymen der γ -Gruppe, γ 1 und γ 2, durch Rezeptor-Tyrosinkinasen (50).

Die Bindung des Liganden an eine Rezeptortyrosinkinase führt zur Aktivierung der cytoplasmatischen Tyrosinkinasedomäne mit der Konsequenz der Autophosphorylierung cytoplasmatischer Tyrosylreste des Rezeptors. Die resultierenden Phosphotyrosinmotive sind spezifische Bindungsstellen für Proteine mit Src homologe Domänen (SH-Domänen). Die auf diese Weise an den Rezeptor rekrutierten Proteine aktivieren die weiteren Signalkaskaden (50).

1.8.2 Genom -und Peptidstruktur der PLC γ 2

Die Recherche hinsichtlich der Genlokalisierung und -struktur erfolgte auf dem Server des National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Der für die PLC γ 2 kodierende Genabschnitt liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 16, im Segment 24 (16q24.1) (Abb. 3). Der kodierende Bereich setzt sich aus 33 Exons zusammen.

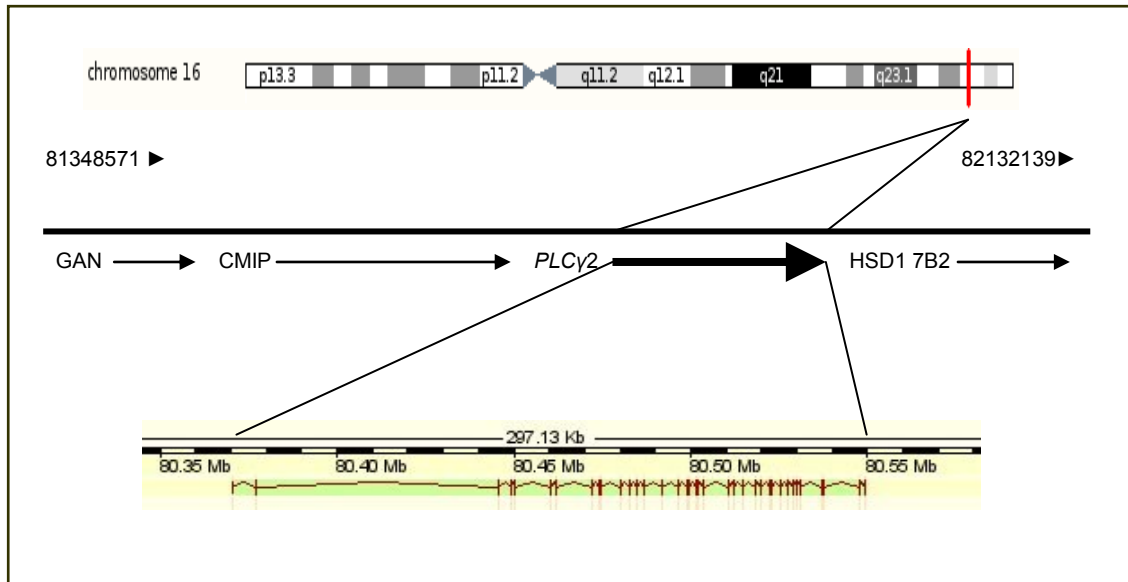


Abb. 3 *PLCy2*-Genlocus, verändert nach NCBI.

PLCy2 ist ein einzelnes Polypeptid, bestehend aus 1265 Aminosäuren. Abbildung 4 zeigt eine Übersicht über die Domänenstruktur auf Proteinebene. Es enthält zwei Regionen mit hoch sequentieller Homologie (40-60% Identität), die mit X und Y gekennzeichnet sind und die katalytische Domäne der *PLCy2* ausmachen. Eine Pleckstrin Homology-Domäne (PH-Domäne) befindet sich in der N-terminalen Region, welche der X-Domäne vorausgeht. *PLCy2* besitzt eine lange Sequenz von ca. 400 Aminosäuren, welche als SH-Domänen fungieren (zwei SH2 und eine SH3). Des Weiteren enthält die *PLCy2* eine zusätzliche PH-Domäne, welche sich zwischen den SH-Domänen befindet. PH, SH2 und SH3-Domänen sind Proteinmodule, die einen funktionell wichtigen Bestandteil darstellen. Die PH-Domäne ist für die Interaktion mit der Membranoberfläche über die Bindung von PIP_2 verantwortlich. Die SH-Domänen fungieren als Bindungsstellen für andere Proteine. Die Bindung erfolgt an phosphorylierte Tyrosinreste (SH2) oder an prolinreiche Sequenzen (SH3) (50). Das Gesamtprotein zeigt des Weiteren zwei akzessorische Module, eine EF-hand-Domäne und eine C2-Domäne. Diese sind für die kalziumabhängige Bindung an die Lipidvesikel verantwortlich. Die Aktivität aller eukaryoten Phospholipasen ist kalziumabhängig (50).

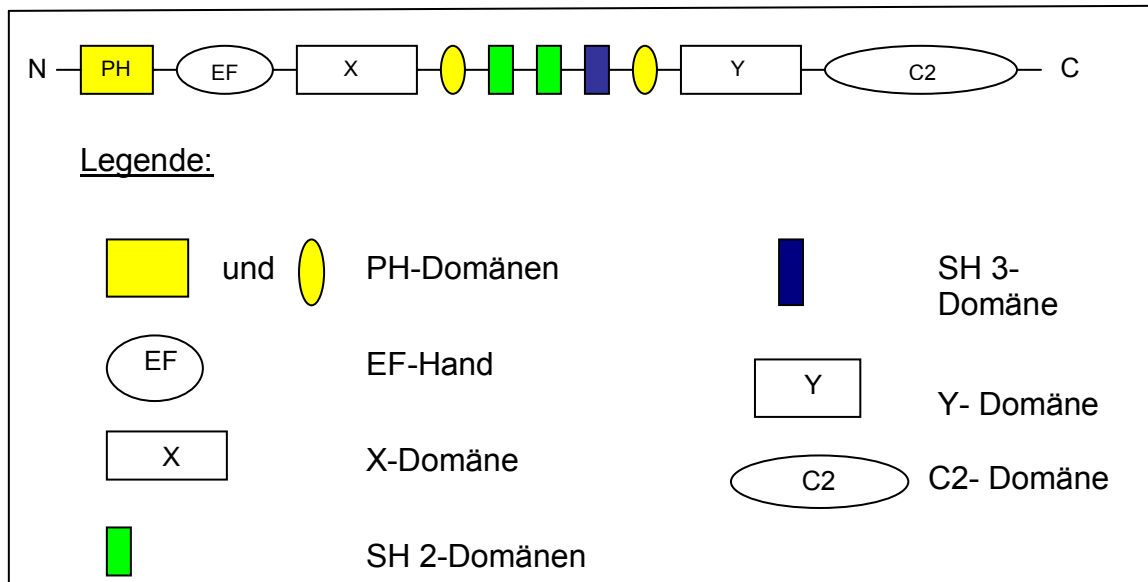


Abb. 4 PLC γ 2-Domänenstruktur, verändert nach Rhee et al. (50).

1.8.3 Bedeutung der *PLC γ 2* für das ACS

Die Bedeutung des *PLC γ 2*-Signalweges in der Ausbildung arterieller Thromben wurde anhand von Knock-out-Mausmodellen (*PLC γ 2*^{-/-}) nachgewiesen. Hierbei wurde Blut von *PLC γ 2*^{-/-} Mäusen, deren Thrombozyten keine *PLC γ 2* bilden können, zum einen über eine Kollagenmatrix, zum anderen über die Arterienwand von Mesenterialgefäßen geführt. In dem genannten zweiten Versuchsteil wurden der Gefäßinnenwand Läsionen mittels Nitrogen dye Laser beigebracht. Dabei kam es zu einer deutlich verminderten Thrombozytenaggregation an den Läsionen (44).

Weiterhin zeigten die *PLC γ 2*-defizienten Mäuse phänotypisch Thrombozytendefekte, die sich in spontanen subcutanen Hämorrhagien während der Embryogenese und in gastrointestinalen und intraperitonealen Blutungen im Erwachsenenalter äußerten (62). Die *PLC γ 2* findet sich in einigen Signalwegen der Adhäsionsglycoproteinen, die für die Erkennung und die Adhäsion der Thrombozyten an die extrazelluläre Matrix wichtig sind. Dazu gehören die Adhäsionsglycoproteine GP Ib-V-IX, die Integrine $\alpha_2\beta_1$ (GPIa/IIa) und $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) (48), sowie der zur Adhäsion der Thrombozyten wichtigste Adhäsionsrezeptor für das Kollagen GP VI (43).

Die Bedeutung der oben genannten Rezeptoren wurde in Studien mit *PLC γ 2*-defizienten Thrombozyten demonstriert. Hierbei kam es zu einer unzureichenden Aktivierung der Thrombozyten über den GPIb-V-IX-Rezeptor des vWF, über den GP VI-Rezeptor des Kollagens und über Integrin-spezifische Liganden der Integrine $\alpha_2\beta_1$ (GPIa/IIa) und $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) (37, 38).

Den entscheidenden Beitrag zur Bildung eines stabilen Thrombus scheint die *PLC γ 2* durch die Aktivierung des Glykoproteins GPIIb-IIIa und die Änderung der Thrombozytenmorphologie zu leisten (Abb. 5). An diesem Prozess scheinen aber auch andere Phospholipase-Isoformen beteiligt zu sein (49).

Eine Arbeit von Abe et al. konnte im Mausmodell zeigen, dass eine einzige Mutation im Exon 16 der *PLC γ 2* zu einem inflammatorisch, arthritischen Phänotyp führt (1). Hierdurch wird die Bedeutung von einzelnen genetischen Varianten auf den Phänotyp einer Erkrankung deutlich.

Die oben beschriebene Bedeutung der *PLC γ 2* bei der Signaltransduktion in den Thrombozyten sowie die Kenntnis, dass einzelne Varianten eine Auswirkung auf den Phänotyp haben können, führt zur Hypothese, dass genetische Varianten der *PLC γ 2* zu einer veränderten Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten beim ACS führen können. Die *PLC γ 2* wird hierdurch zu einem Kandidatengen.

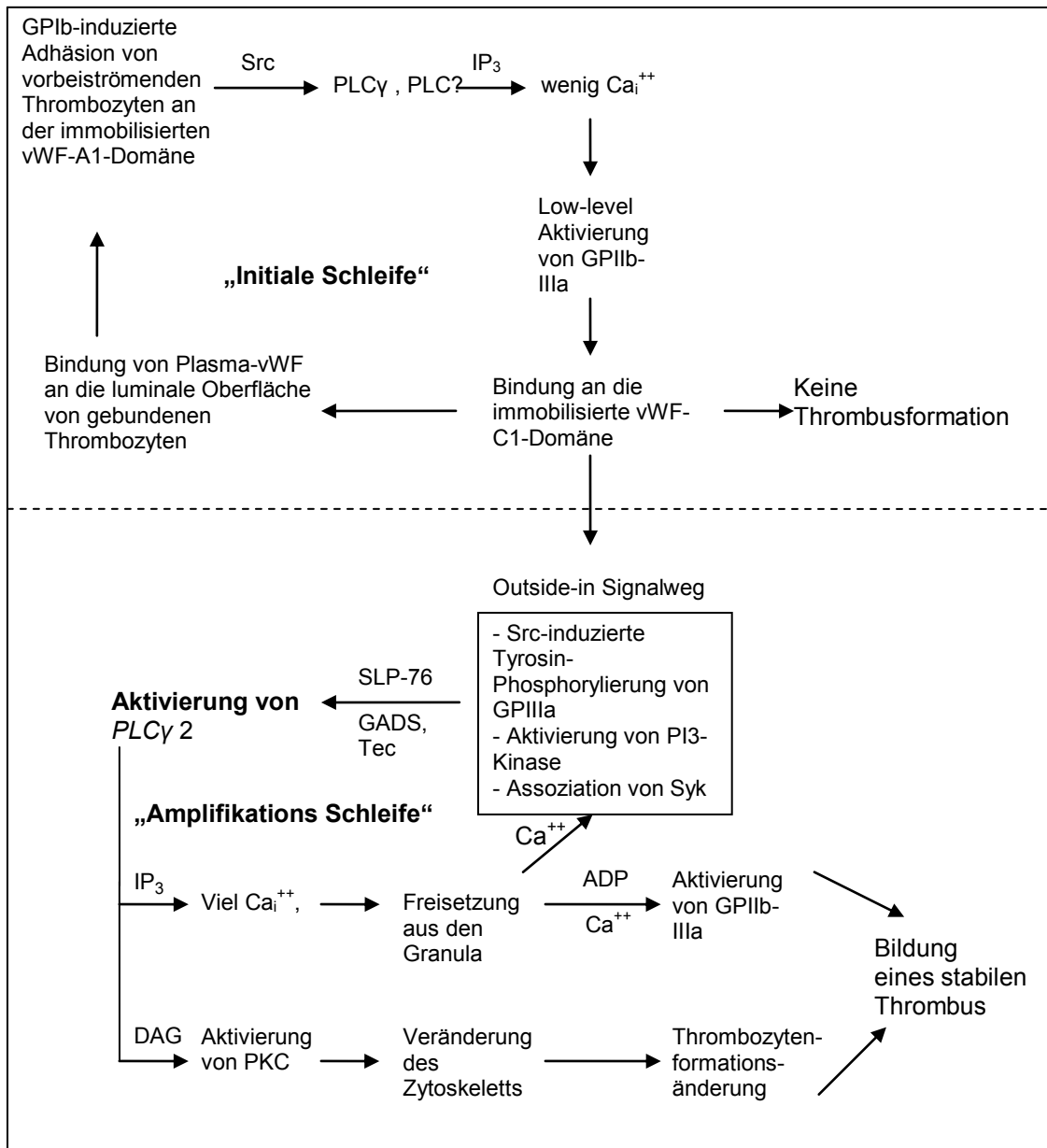


Abb. 5 *PLCγ2* und Thrombusformation, verändert nach Rathore et al. (49).

Abkürzungen: Adenosine diphosphate (ADP), Grb2-related adapter protein2 (GADS), Protein Kinase C (PKC), Lymphocyste cytosolic protein 2 (SLP-76), Proto-oncogene-tyrosin kinase Src (Src), Spleen tyrosine kinase (Syk), Tyrosineprotein kinase Tec (Tec).

1.9 Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die *PLCy2* als Kandidatengen für kardiovaskuläre Erkrankungen auf genetische Varianten zu untersuchen und diese zu kategorisieren. Hierzu wurde zunächst ein DNA-Screening von 95 Hochrisikopatienten für Myokardinfarkt der Etude Cas-Témoins sur l'Infarctus du Myocarde (ECTIM-Studie) durchgeführt. Sequenzen funktionell wichtiger Bereiche wie der Promotorbereich, die Exons und die 3'-flankierende Region sollten in einem ersten Schritt mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und anschließend mittels Single-Strand Confirmation Polymorphism-Analyse (SSCP) untersucht werden. Fragmente mit unterschiedlichem Migrationsverhalten bei der SSCP-Analyse wurden nachfolgend sequenziert und genetische Varianten so nachgewiesen.

Eine Kategorisierung der genetischen Varianten erfolgte je nach Lokalisierung. Genetische Varianten im Promotorbereich wurden mittels *in silico* Analyse auf potentiell veränderte Transkriptionsfaktorbindungsstellen (TFBS) überprüft. Genetische Varianten in exonischen Bereichen sollten auf die kodierten Aminosäuren überprüft werden. Veränderungen in den Eigenschaften der Aminosäuren wurden annotiert.

Die aus der Arbeit resultierende Listung und Bewertung der detektierten Varianten soll es zukünftig ermöglichen, entsprechende funktionelle Analysen zu planen und durchzuführen.

2.0 Material und Methoden

2.1 Materialliste und Bezugsquellen

2.1.1 Chemikalien

100 bp DNA-Marker	Invitrogen, Karlsruhe
Acrylamid	Merck, Darmstadt
Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
Bisacrylamid, 2% (BAA)	Merck, Darmstadt
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Promega, Mannheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ficoll	Fluka Riedel-de Haën, Seelze
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Salpetersäure	Merck, Darmstadt
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe
N [^] , N [^] , N [^] , N [^] -Tetramethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Hydroxymethyl-Aminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt

2.1.2 Puffer

10 x Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE) (pH 8,3-8,5)	1 M Tris 900 mM Borsäure 1 mM EDTA (pH 8,0)
10 x Taq-Polymerase-Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot

5 x ABI Sequencing Buffer
Applied Biosystems, Carlsbad, Californien
(USA)

2.1.3 Gele

1% Agarosegel
100 mL 1 x TBE
1 g Agarose
2,5 µL Ethidiumbromid (1%ige Lösung)

SSCP-Gel
245 mL 40% Acrylamid
100 mL Bisacrylamid
50 mL 10 x TBE
605 mL dd-H₂O
1 mL TEMED

2.1.4 Enzyme

Taq-Polymerase
Fermentas, St. Leon-Rot
ABI BigDye
Applied Biosystems, Carlsbad, Californien
(USA)

2.1.5 Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Typenbezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Autoklav	FVS-2	Fedegari, Albuzzano Italien
Entwickler	System VX-75	System, Wettenberg
	Optimax	Protec, Oberstenfeld
Gelelektrophoresekammer (Agarose)	StarPhoresis	Starlab, Ahrensburg
pH-Meter	Calimatic 766	Knick, Dülmen
Schüttler	GFL 3006	GFL, Großburgwedel

Sequenzier	ABI PRISM 3730	Apllied Biosystems, Carlsbad, Kalifornien, (USA)
Spannungsquelle	PowerPackBasic	BioRad, München
Thermocycler	PTC-225, PTC-240 DNA Engine Tetrad (2)	MJ Research, Miami, USA
UV-Tisch	Transilluminator	Intas, Göttingen
Vortex	VortexGenie2	Bender&Hobein, Zürich, Schweiz
Waage	Sartorius excellence	Sartorius, Göttingen
Zentrifuge	Multifuge 3SR	Heraeus, Hanau
	Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
	Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
	Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg

2.1.6 Weiterer Laborbedarf

Pipettenspitzen 0,1 µL-1000 µL	Sarstedt, Nürnberg Starlab, Ahrensburg
Reaktionsgefäße 0,2 mL-2mL	Eppendorf, Hamburg Biozym, Hess. Oldendorf
PCR-Platten, Mikrotiterplatten	Abgene, Hamburg

2.2 Methoden

2.2.1 ECTIM Studie

Die erstmals 1992 von Parra (Parra et al. 1992) beschriebene ECTIM Studie ist eine retrospektive Fall-Kontrollstudie (47). Sie nutzt Daten von Myokardinfarktpatienten und Kontrollen aus Regionen, die von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) im Rahmen der *Monitoring trends and determinants in Cardiovascular disease Studie* (MONICA) registriert und gemonitort werden. Bis zum Jahr 1999 stammten die Daten von Studienteilnehmern aus Strasburg (Frankreich), im selben Jahr wurde die Studienpopulation durch Individuen aus Belfast (Nord Irland) und Glasgow (Schottland)

erweitert (32). Insgesamt wurden 1110 Fälle 3 bis 9 Monate nach dem Index-Infarkt untersucht. In Frankreich wurden ausschließlich Männer untersucht, wohingegen die Studienteilnehmer aus Belfast und Glasgow aus Männern und Frauen bestanden. Davon waren 27,47% Frauen im Alter zwischen 25 und 69 Jahren und 72,52% Männer im Alter zwischen 25 und 64 Jahren. Das mittlere Alter der Frauen betrug 60,13 Jahre, das der Männer 54,5 Jahre. In Frankreich erfolgte die Auswahl der Kontrollen vergleichbaren Alters ohne klinische Zeichen einer koronaren Herzerkrankung aus Wählerlisten, in Großbritannien aus Karteien von Allgemeinmedizinern aus der gleichen Region (32,47).

Nach Erhebung einer ausführlichen Anamnese (Familienanamnese, kardiovaskuläre Risikofaktoren, Medikamentenanamnese usw.) und der körperlichen Untersuchung wurde eine Blutprobe der Probanden auf biochemische Marker wie zum Beispiel Cholesterin, Triglyceride, Lipoproteinfraktionen und Apolipoprotein untersucht.

2.2.2 Die Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (engl.: *Polymerase Chain Reaction*, PCR) ist eine *in-vitro* Technik mit der man definierte doppelsträngige DNA-Abschnitte vervielfältigen kann (42). Notwendige Komponenten sind eine Matrix (DNA), Primer (Oligonukleotide), Desoxynucleotidtriphosphate (dNTPs) und Mg^{2+} , sowie die thermostabile DNA-Polymerase. Die Amplifikation erfolgt in den drei Reaktionsschritten Denaturierung (Strangtrennung), Annealing (Anlagerung sequenzspezifischer DNA-Oligonukleotide) und Elongation (DNA-Polymerasereaktion). Durch Erhitzen auf über $95^{\circ}C$ werden die beiden Stränge der DNA voneinander getrennt. Das Absenken der Temperatur führt zur Anlagerung der Primer. Bei $68-72^{\circ}C$ synthetisiert die DNA-Polymerase in Anwesenheit von dNTPs und Mg^{2+} -Ionen den komplementären DNA-Strang in 5'-3'-Richtung, entsprechend der Basen der Template-DNA. Die unten aufgeführte Abbildung 6 zeigt einen typischen Polymerasezyklus. Durch die Wiederholung der Reaktionsschritte liegt nach Abschluss der PCR eine, für die Analyse im SSCP-Gel oder der Sequenzierung, ausreichende Menge an spezifischen DNA-Doppelsträngen vor.

Die Spezifität der Reaktion sowie die optimale Annealing-Temperatur werden unter anderem von der Sequenz der Primer bestimmt. Die Reaktionstemperatur ist enzyspezifisch und liegt für die meisten kommerziellen Polymerasen bei $68-72^{\circ}C$.

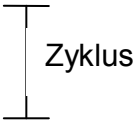
95°C	5 min	initiale Denaturierung	
95°C	1 min	Denaturierung	
Temp. variabel	1 min	Annealing	
68-72°C	1 min	Elongation	
→ 25-35 Wiederholungen des Zyklus			
72°C	10 min	terminale Elongation	

Abbildung 6: Standard-PCR-Programm.

2.2.2.1 Primerdesign

Zur Auswahl der Nukleotidsequenz der verwendeten Primer wurde die für *PLCy2* publizierte genomische Sequenz (Accessionnummer BC007565_0) in der GenBank auf dem Server des National Centers for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) genutzt. Da vor allem funktionell wichtige Bereiche wie der Promotorbereich, die Exons und die 3'-flankierende Region der *PLCy2* untersucht werden sollten, wurden die Primer so gewählt, dass diese Bereiche amplifiziert werden konnten. Folgende Richtlinien wurden für das Primerdesign eingehalten:

- Fragmentgröße: 250-900 Basenpaaren (bp)
- Primerlänge: 15-30 bp
- ausgewogenes Verhältnis zwischen Purin- und Pyrimidinbasen
- am 3'-Ende der Primer möglichst eine Guanin- oder Cytosinbase, um eine möglichst starke Bindung des Primers an die DNA zu gewährleisten
- keine inter- oder intramolekular komplementären Sequenzen
- Differenz der Schmelztemperatur zwischen Forwardprimer und Reverseprimer maximal 4°C, Optimum 60°C

Auf dieser Grundlage wurden die in der Tabelle 6 (siehe Anhang 10.1) aufgeführten Primerpaare ermittelt. Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte durch die Firma Eurofins MWG Operon (<http://www.operon.com>). Die Primer wurden auf eine Konzentration von 25 µM eingestellt.

2.2.2.2 Bedingungen für den PCR-Reaktionsansatz

Um die optimalen PCR-Bedingungen zu ermitteln, wurde die PCR mit variablen Konzentrationen der Zusätze an MgCl₂ und DMSO unter variablen Annealing-temperaturen durchgeführt. Tabelle 2 zeigt die PCR-Ansätze zur Bedingungs-optimierung.

Tabelle 2: PCR-Mix zur Bedingungsoptimierung (Angegeben sind die upper primer mit Primer U und lower primer mit Primer L).

PCR-Ansatz	a	b	c	d
dd-H ₂ O	102 µL	86 µL	92 µL	76 µL
10 x Taq-Polymerase-Puffer (15 mM MgCl ₂)	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL
MgCl ₂ [25 mM]	4 µL	20 µL	4 µL	20 µL
DMSO [100 %]	0 µL	0 µL	10 µL	10 µL
dNTPs [je 2,5 mM]	16 µL	16 µL	16 µL	16 µL
Primer U [25 µM]	4 µL	4 µL	4 µL	4 µL
Primer L [25 µM]	4 µL	4 µL	4 µL	4 µL
gesamt	150 µL	150 µL	150 µL	150 µL
PCR-Mix (aus den o.g. 150 µL)	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL
+ TaqPolymerase [5 Units/µL]	0,75 µL	0,75 µL	0,75 µL	0,75 µL
+ DNA [5 ng/µL]	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
gesamt	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL

Da die Annealingtemperatur eine Variable bei der PCR darstellt, wurde zunächst die Schmelztemperatur durch die Wallace-Regel (Formel 1) errechnet und die PCR mit -2°C, +2°C, -4°C und +4°C der errechneten Temperatur durchgeführt.

Kapitel 10.1 des Anhangs zeigt eine Übersicht über die Primerpaare mit den jeweiligen optimalen Bedingungen.

$$4^{\circ}\text{C} \times n \text{ Guaninbasen} + \text{Cytosinbasen}) + 2^{\circ}\text{C} \times n \text{ Adeninbasen} + \text{Thyminbasen}) = T_m$$

Formel 1: Formel zur Ermittlung der optimalen Schmelztemperatur (Wallace-Regel).

2.2.3 Die Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Methode um DNA-Fragmente voneinander zu trennen. Die zu analysierenden DNA-Proben werden auf das Agarosegel aufgetragen und eine elektrische Spannung angelegt. Im elektrischen Feld laufen die DNA-Moleküle, gemäß ihrer negativen Ladung, vom Minuspol (Kathode) zum Pluspol (Anode). Die Wanderungsgeschwindigkeit des Moleküls ist dabei abhängig von seiner Ladung, seiner Größe, der Stärke des elektrischen Feldes und der Porengröße des Gels.

Zum Nachweis der DNA wurde Ethidiumbromid verwendet. Ethidiumbromid interkaliert mit den DNA-Strängen und verändert dabei sein Absorptionsspektrum gegenüber UV-

Licht. Hierdurch kann der Erfolg der PCR kontrolliert werden. Ein DNA-Größenstandard erlaubt die Länge der detektierten DNA-Fragmente abzuschätzen.

2.2.3.1 Herstellung des Agarosegels und Durchführung der Agarosegelelektrophorese

Zur Herstellung des 1%igen Agarosegels wurde die entsprechende Menge Agarose in 1 x TBE durch Erhitzen gelöst. Nach Erkalten auf 65°C wurde Ethidiumbromid (0,25 µg/mL) zugesetzt. Anschließend wurde die flüssige Agarose in einen mit Kämmen versetzten Gelschlitten gegossen. Durch die platzierten Kämmen entstanden die Taschen, in die später die DNA-Proben pipettiert wurden. Nun benötigte das Gel 30 min bei Raumtemperatur um zu aggregieren.

Die PCR-Produkte wurden im elektrischen Feld bei 160 Volt für 30 min aufgetrennt. Als molekularer Massenstandard wurde ein 100 Basenpaar-DNA-Größenmarker verwendet. Abbildung 7 zeigt beispielhaft die Agarosegelelektrophorese für das Fragment *PLCy2-38*.

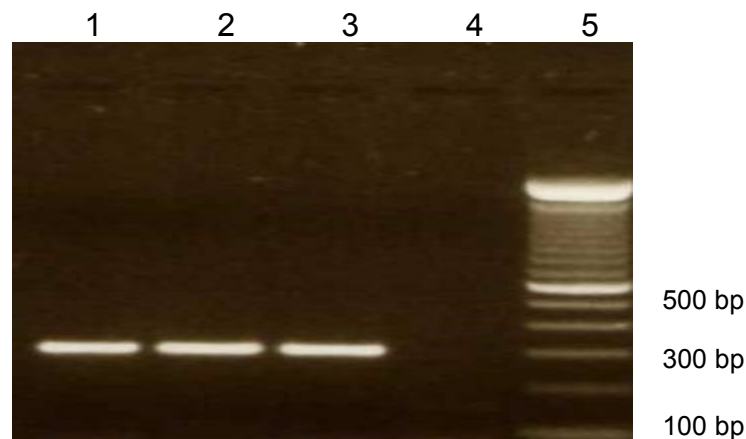


Abb. 7: PCR und Agarosegelelektrophorese.

- Spalten 1-3: PCR-Produkte mit einer Größe von ca. 300 bp (Fragment *PLCy2-38*)
- Spalte 4: Wasserprobe als Kontrolle
- Spalte 5: Basenpaar-DNA-Größenmarker

2.2.4 Die SSCP-Analyse

Die SSCP-Analyse ist ein auf PCR basierendes Verfahren zum Nachweis von genetischen Varianten (22,46). Sie beruht auf dem Prinzip, dass die elektrophoretische Beweglichkeit eines Moleküls in der Gelmatrix von seiner Größe, Ladung und Konformation abhängt.

Ein einziger Unterschied in der Basensequenz zweier Nukleotideinzelstränge führt zu einer Änderung der Konformation und damit zu unterschiedlichen Laufeigenschaften.

2.2.4.1 Durchführung der SSCP-Analyse

Nach erfolgreicher Amplifikation einzelner Fragmente wurden die DNA-Stränge denaturiert. Während des raschen Abkühlens auf Eis bilden die Einzelstränge, aufgrund intramolekularer Basenpaarungen, spezifische Sekundärstrukturen. Zur Erhöhung der Detektionsgenauigkeit erfolgte die SSCP-Elektrophorese jeweils bei 50 Volt und Raumtemperatur sowie bei 100 Volt und 4°C.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung erfolgte eine Silberfärbung der Gele (5). Hierbei interagieren die positiv geladenen Silberionen mit der negativ geladenen DNA. Durch Reduktion der Silberionen zu elementarem Silber werden die DNA-Banden sichtbar.

Die Färbung erfolgte in Glasschalen auf dem Schüttler in folgenden Schritten:

1. Fixierung in Ethanol für 5 min
2. Inkubation in 1%iger Salpetersäure für 2 min
3. Inkubation in 0,2%iger Silbernitratlösung für ca. 45 min
4. dreimaliges Waschen in dd-H₂O
5. zweimaliges kurzes Waschen in einer Entwicklerlösung (Na₂CO₃/ Formaldehyd-Lösung [600 mL/300µL], dann bis zur ausreichenden Färbung
6. Fixierung in 10%iger Essigsäure für 10 min

Die gefärbten Gele wurden in Folie verpackt, beschriftet, ausgewertet und archiviert.

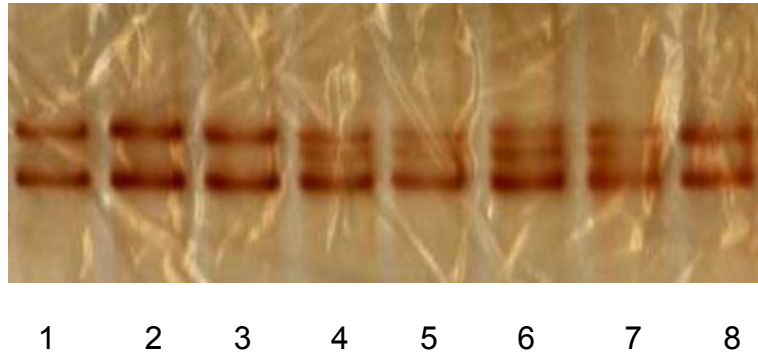


Abb. 8: SSCP-Gel nach Silbernitratfärbung.
 Primäres Kriterium der Analyse ist die
 Veränderung des Bandenmusters
 Muster 1 (1,2,3,8)
 Muster 2 (4,5,6,7)

2.2.5 Die Sequenzierung

Die Sequenzierung dient der Determinierung der genauen Basenabfolge eines DNA-Stranges. Hierdurch lassen sich genetische Varianten genau lokalisieren. Alle Fragmente mit unterschiedlichem Migrationsverhalten in der SSCP-Analyse wurden nachfolgend sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte nach dem Kettenabbruchprinzip bzw. der Didesoxymethode nach Sanger (52).

PCR-Produkte wurden mittels Iso-Propanol-Fällung für die Sequenzierung aufgereinigt:

1. Zugabe von 20 μL dd- H_2O und 60 μL Iso-Propanol (100%) zum PCR-Produkt (20 μl)
2. Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur
3. Zentrifugation für 30 min bei 14000 x g bei 4°C, Überstand abnehmen
4. Pellet in 150 μL Ethanol (70%) waschen
5. Zentrifugation für 10 min bei 14000 x g bei 4°C, Überstand abnehmen
6. Trocknen des Pellets bei Raumtemperatur
7. Resuspension des Präzipitates in 20 μL dd- H_2O (pH 8,0)

Der Erfolg der Aufreinigung wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Aufgereinigte PCR-Produkte wurden entweder mit Upper-Primern (U) oder Lower-Primern (L) sequenziert. Tabelle 3 zeigt den entsprechenden Ansatz zur Sequenzierung.

Tabelle 3: Ansatz zur Sequenzierung.

Ansatz zur Sequenzierung	
Primer U oder L [25 µM]	0,4 µL
dd-H ₂ O	3,1 µL
ABI 5 x Sequencing Buffer (inkl. dNTPs)	1,5 µL
ABI Big Dye Terminator v3.1	1,0 µL
aufgereinigtes PCR-Produkt	4,0 µL
gesamt	10,0 µL

In der nachfolgenden Amplifikation kommt es durch zufälligen Einbau der fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide zum Kettenabbruch, da die 3'-OH-Gruppe zur weiteren Kettenverlängerung fehlt.

Die Ermittlung der Basensequenz der DNA-Fragmente erfolgte mittels Polyacrylamid-Kappillarelektrophorese und direkter automatischer Sequenzierung (ABI PRISM 3730, Applied Biosystems).

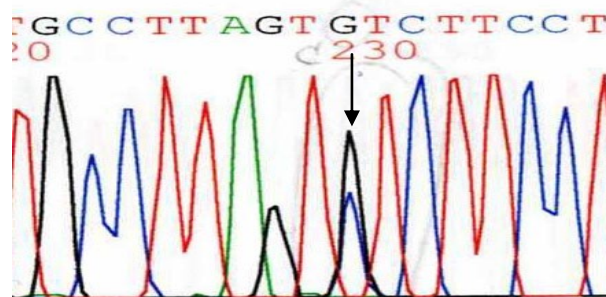


Abb. 9:
Lokalisierung eines Polymorphismus mittels
Sequenzierung (G80445738C im Intron 3).

Farbschema:

Blau: Cytosin

Schwarz: Guanin

Rot: Thymin

Grün: Adenin

2.2.6 Auswertung und Nomenklatur

Die durch die Sequenzierung erhaltene Basensequenz der genomischen Patienten-DNA wurde unter zu Hilfenahme der Software Sequencing Analysis Software v5.4 der Firma Applied Biosystems® mit der Referenzsequenz (Accessionnummer BC007565_0) verglichen. Somit konnten einzelne Basenaustausche, sowie Insertionen und Deletionen identifiziert werden. Die Polymorphismen wurden so codiert, dass an erster Stelle die Base der Referenzsequenz genannt wurde, dann die genaue Basen-

position im Gen, bezogen auf die oben genannte Accessionnummer und anschließend die mutierte(n) Base(n).

Bsp.: A80370562G betrifft einen Austausch von Adenin nach Guanin an der Position 80370562 der genomischen DNA für das untersuchte Gen.

Bei einer Deletion steht dem Code ein „Del“, bei einer Insertion ein „Ins“ vor. Anschließend folgt die Position der Deletion / Insertion in der genomischen DNA.

Bsp.: DelC80460232 betrifft eine Deletion von Cytosin an der Position 80460232 der genomischen DNA.

Da aus einem Basenaustausch im codierenden Bereich der DNA eine Änderung der Aminosäuresequenz resultieren kann, wurde die Basensequenz der exonischen Bereiche in die Aminosäuresequenz übersetzt. Dieses erfolgte unter Verwendung der bekannten Triplets für die 23 Aminosäuren. Als Start-Codon ist das Triplet AUG, als Stop-Codon die Triplets UAA, UAG und UGA bekannt. Kapitel 10.2 des Anhangs gibt einen Überblick über die bekannten Aminosäuren und deren Abkürzungen. Kapitel 10.3 des Anhangs zeigt die möglichen Triplets der 23 Aminosäuren.

2.2.7 *In silico* Promotoranalyse

Die Analyse potentieller TFBS im Promotorbereich der *PLCy2* erfolgte unter Verwendung der Datenbank AliBaba 2.1 (<http://www.gene-regulation.com/cgi-bin/pub/programs/alibaba2/webbaba2.cgi>) (Einstellungen: Min. matrix conservation: 75%, Matrix width in bp: 10, Pairsim to know site: 50). Dieser Algorithmus vergleicht die Sequenz mit den gesammelten TFBS der Datenbank TRANSFAC 7.0.

Die Ergebnisse der AliBaba 2.1-Analyse wurden anschließend unter Verwendung der Datenbank PROMO 3.0.2 (http://alggen.1si.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3) und stringenteren Einstellungen verifiziert (Einstellung: Min. matrix conservation: 95%). PROMO 3.0.2 greift zudem auf eine jüngere Version der TRANSFAC Datenbank, auf die Version 8.3 (<http://www.gene-regulation.com/cgi-bin/pub/database/transfac/search.cgi>), zurück.

3.0 Ergebnisse

3.1 Systematische Analyse des *PLCy2*-Gens

Um die folgenden Analyse durchführen zu können, wurden zunächst zwanzig Fragmente der genomischen DNA von 95 Individuen der ECTIM-Studie mittels PCR amplifiziert. Anschließend wurden die Produkte, wie im Kapitel 2.2.4 beschrieben, mittels SSCP analysiert. Sechshundert und einundzwanzig Proben wurden anhand des abweichenden Laufverhaltens in der SSCP-Analyse als potentiell polymorph identifiziert. Diese Proben wurden im Anschluss mittels Kapillarsequenzierer analysiert, um genetische Varianten zu identifizieren.

Durch direkte Sequenzierung konnten 58 Polymorphismen bestätigt werden, von denen 26 im Bereich des Promotors, 18 in intronischen und 14 in exonischen Bereichen lokalisiert sind (Abbildungen 11 bis 65).

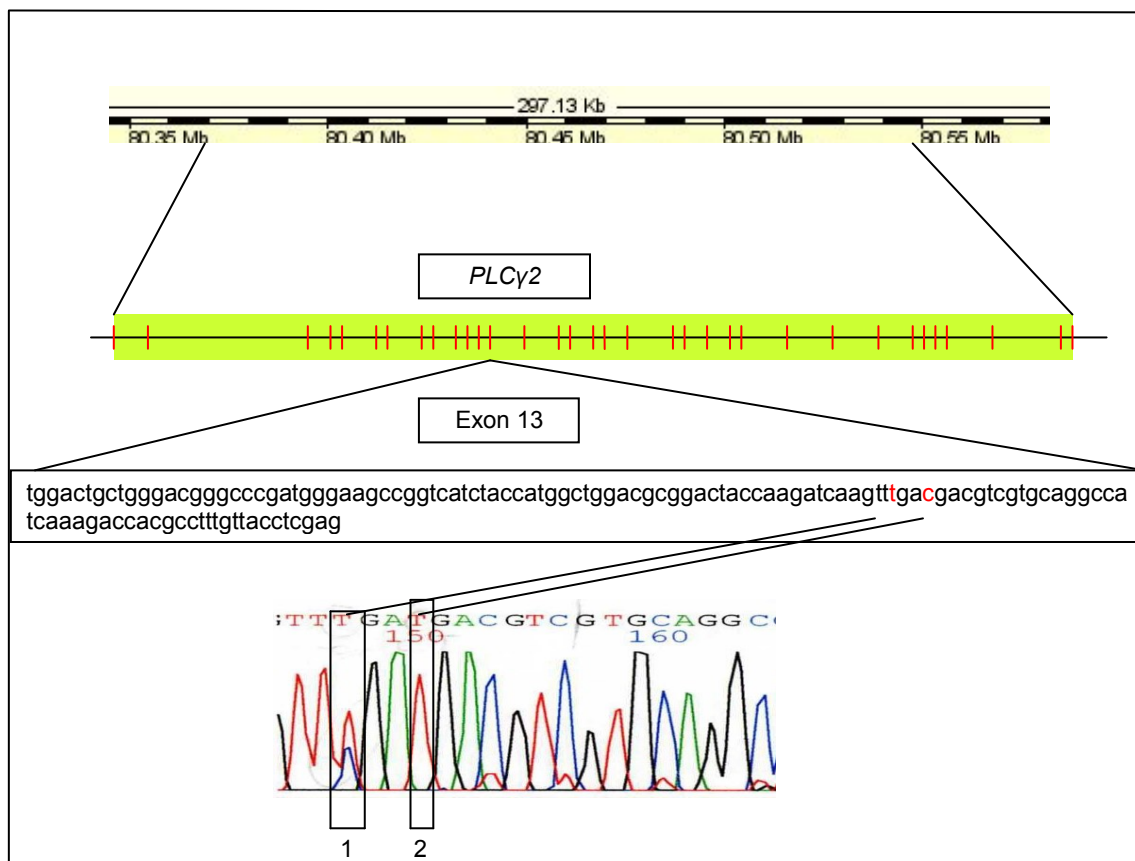


Abb. 10: Exemplarische Darstellung der Sequenzierungsergebnisse zweier Polymorphismen im Exon 13 des *PLCy2*-Gens.

1. Austausch von Thymin durch Cytosin T80486986C
2. Austausch von Cytosin durch Thymin C80486989T

Promotor

Fragment *PLCy2-1*

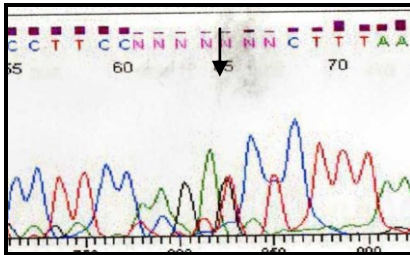


Abb. 11
T►G, T80368661G (heterozygot)

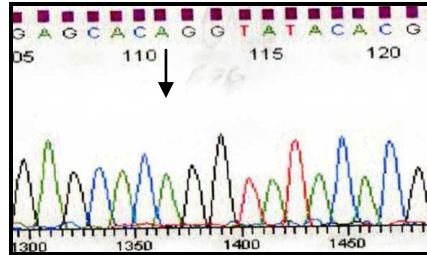


Abb. 12
C►G, C80368709G (homozygot)

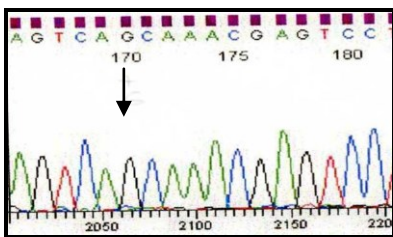


Abb. 13
Ins G, 80368765-6 (homozygot)

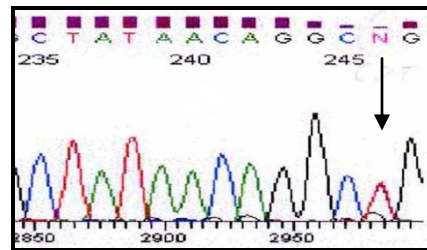


Abb. 14
C►T, C80368843T (heterozygot)

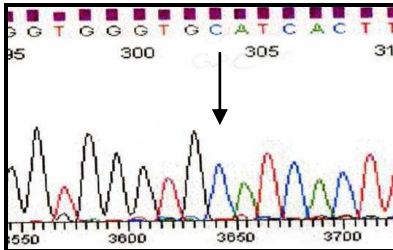


Abb. 15
G►C, G80368898C (homozygot)

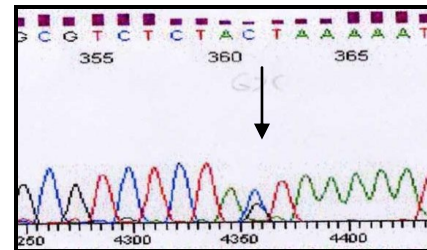


Abb. 16
G►C, G80368958C (heterozygot)

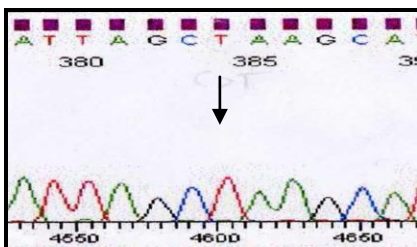


Abb. 17
C►T, C80368979T (homozygot)

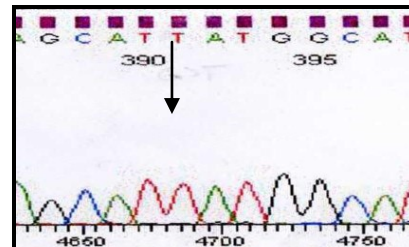


Abb. 18
G►T, G80368986T (homozygot)

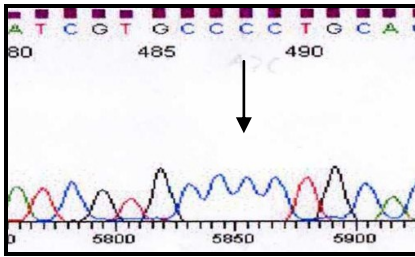


Abb. 19
A►C, A80369083C (homozygot)

Fragment *PLCy2-2*:

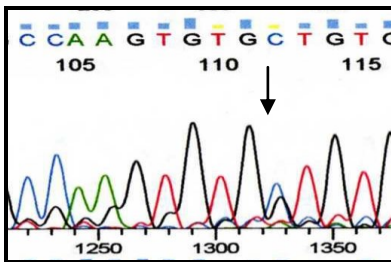


Abb. 20
G►C, G80369343C (heterozygot)

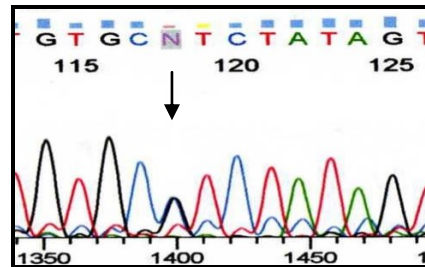


Abb. 21
C►G, C80369349G (heterozygot)

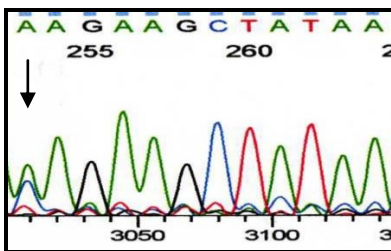


Abb. 22
C►A, C80369484A (heterozygot)

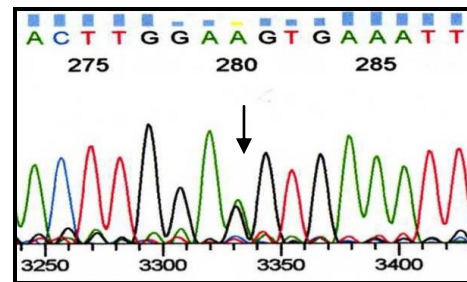


Abb. 23
A►G, A80369511G (heterozygot)

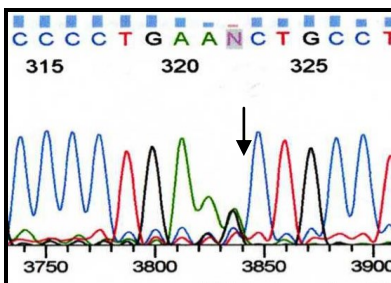


Abb. 24
A►G, A80369553G (heterozygot)

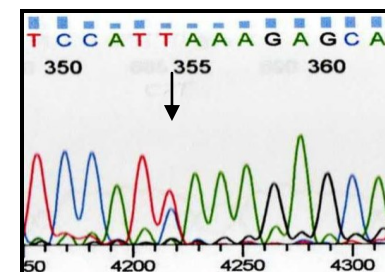


Abb. 25
C►T, C80369585T (heterozygot)

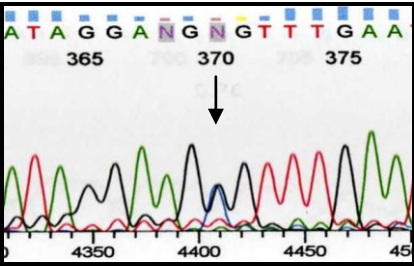


Abb. 26
G>C, G80369601C (heterozygot)

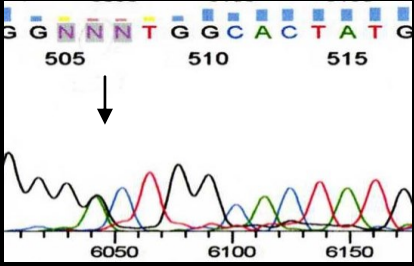


Abb. 27
G>A, G80369737A (heterozygot)

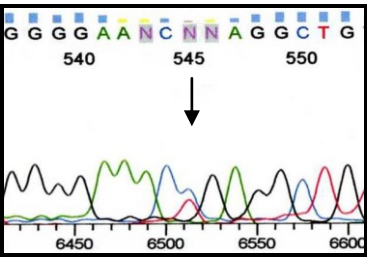


Abb. 28
T>C, T80369776C (heterozygot)

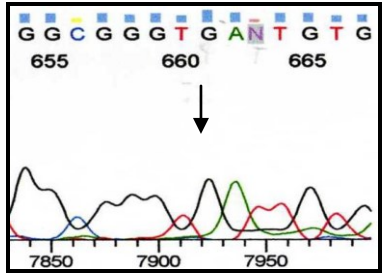


Abb. 29
A>G, A80369893G (homozygot)

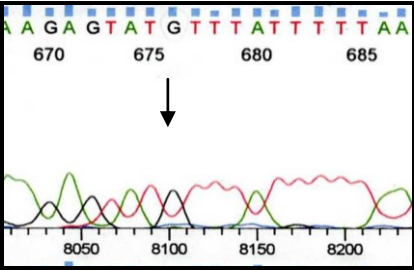


Abb. 30
A>G, A80369908G (homozygot)

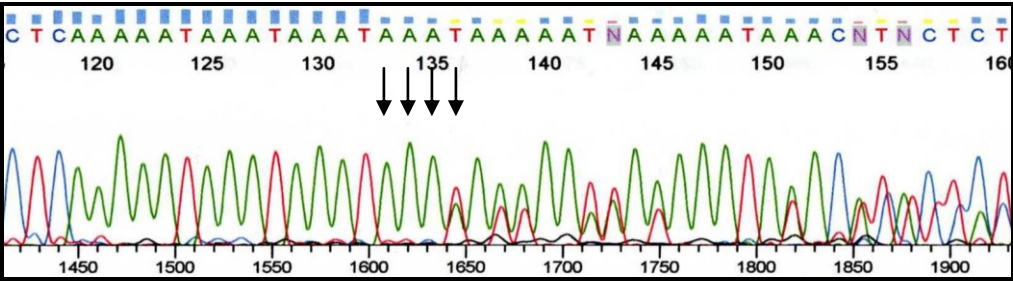


Abb. 31
Ins ATTT 80369921 (heterozygot) (minus Strang)

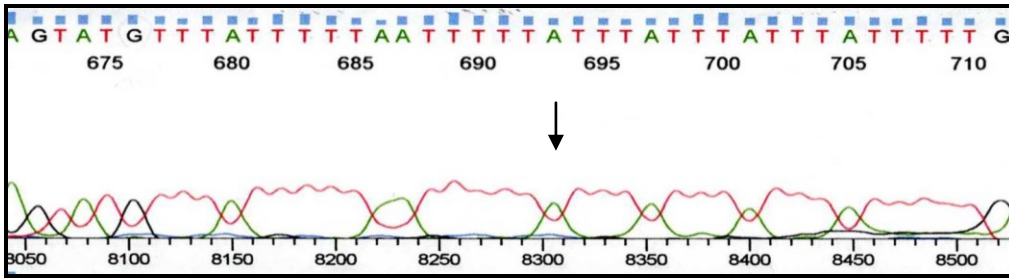


Abb. 32
Ins ATTT 80369932 (homozygot)

Fragment *PLC γ 2-3*:

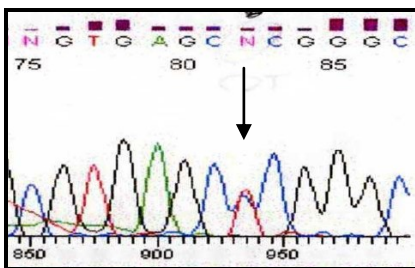


Abb. 33
C►T, C80370053T (heterozygot)

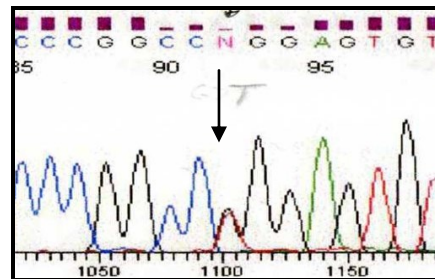


Abb. 34
G►T, G80370067T (heterozygot)

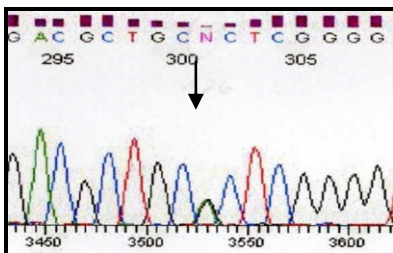


Abb. 35
A►G, A80370272G (heterozygot)

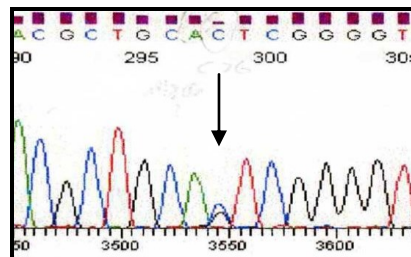


Abb. 36
C►G, C80370273G (heterozygot)

Intron 1

Fragment *PLC γ 2-9*:

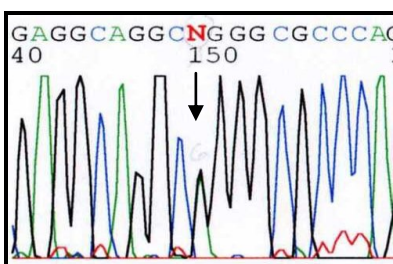


Abb. 37
A►G, A80370561G (heterozygot)

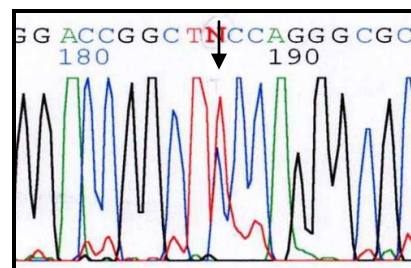


Abb. 38
C►T, C80370598T (heterozygot)

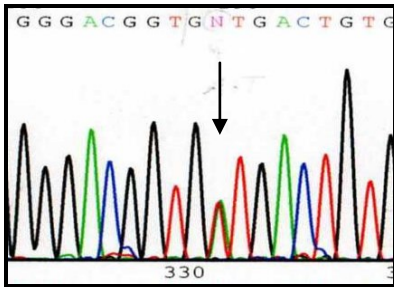
Exon 2Fragment *PLCy2*-10:

Abb. 39
A►T, A80377177T (heterozygot)

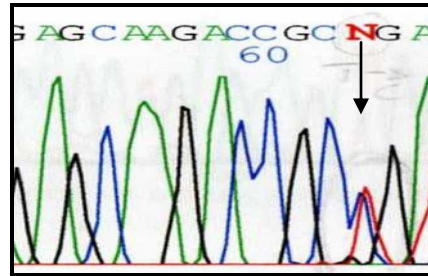


Abb. 40
C►T, C80377269T (heterozygot)

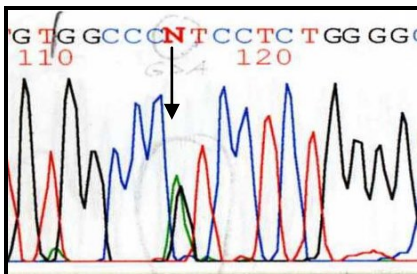
Intron 2Fragment *PLCy2*-11:

Abb. 41
G►A, G80377321A (heterozygot)

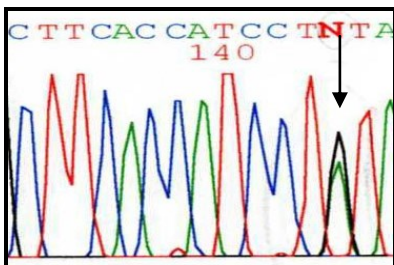
Exon 3Fragment *PLCy2*-12:

Abb. 42
A►G, A80445653G (heterozygot)

Intron 3

Fragment *PLCy2*-12:

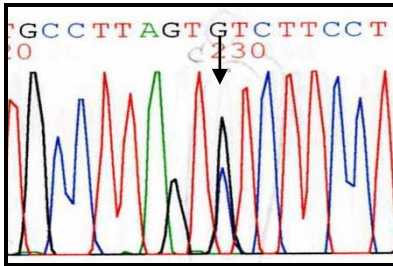


Abb. 43
G►C, G80445738C (heterozygot)

Intron 4

Fragment *PLCy2*-13:

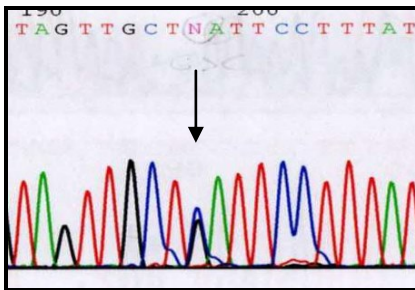


Abb. 44
G►C, G80449499C (heterozygot)

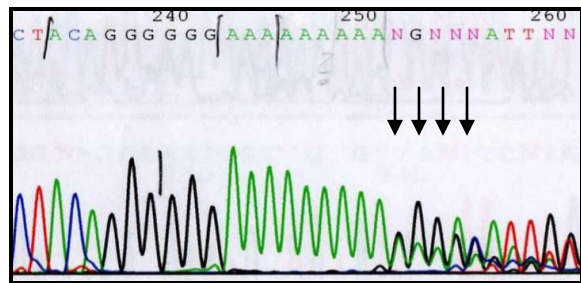


Abb. 45
Del AAAA80449545-80449557

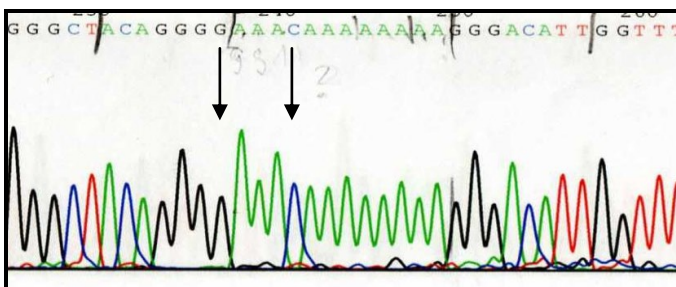


Abb. 46
1. Del GGA 80449543-80449545 (linker Pfeil)
2. A►C, 80449549 (homozygot) (rechter Pfeil)

Intron 5

Fragment *PLCy2-15*:

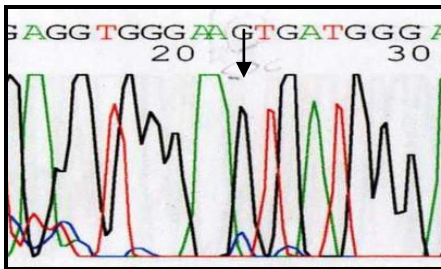


Abb. 47
C►G, C80450297G (homozygot)

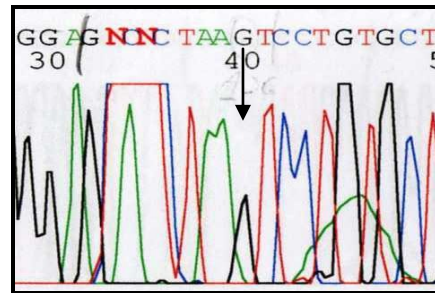


Abb. 48
A►G, A80450314G (homozygot)

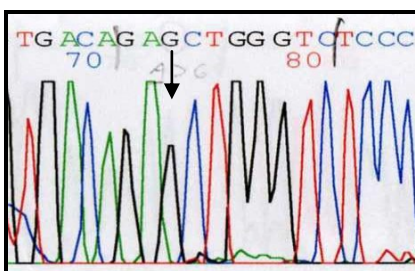


Abb. 49
A►G, A80450348G (homozygot)

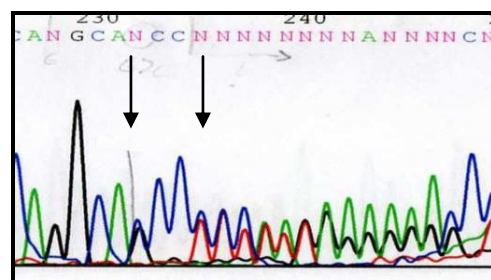


Abb. 50
(minus Strang)
1. C►G, C80450281G (heterozygot)
2. DelG80450278

Exon 6

Fragment *PLCy2-15*:

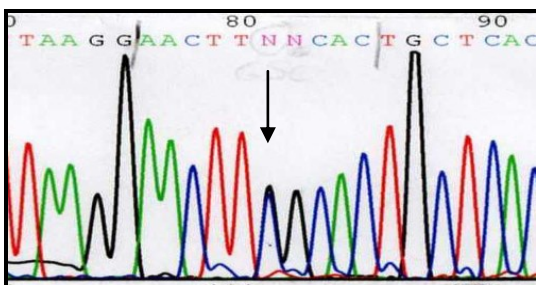


Abb. 51
(negativer Strang)
C►G, C80460380G (heterozygot)

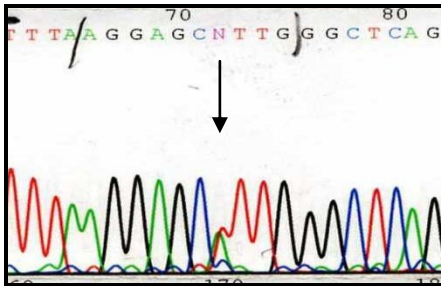
Exon 10Fragment *PLCy2*-19:

Abb. 52
A►T, A80480282T (heterozygot)

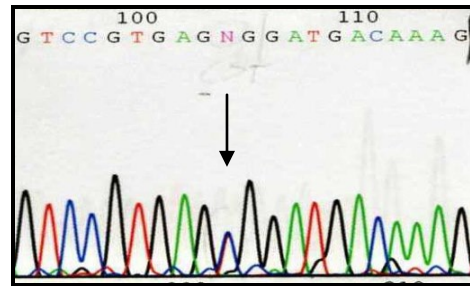


Abb. 53
C►T, C80480314T (heterozygot)

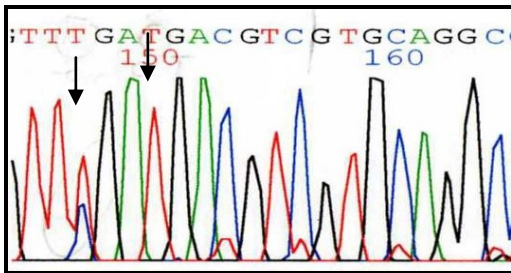
Exon 13Fragment *PLCy2*-22:

Abb. 54
T►C, T80486986C (heterozygot) und
C►T, C80486989T (homozygot)

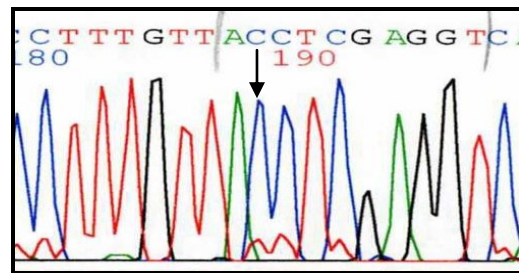


Abb. 55
G►C, G80487028C (homozygot)

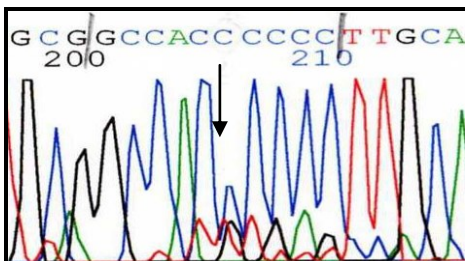
Intron 15Fragment *PLCy2*-24:

Abb. 56
G►C, G80496651C (heterozygot)

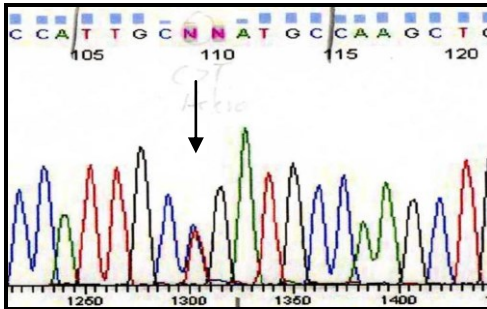
Exon 16Fragment *PLCy2-25*:

Abb. 57

C►T, C80498820T (heterozygot)

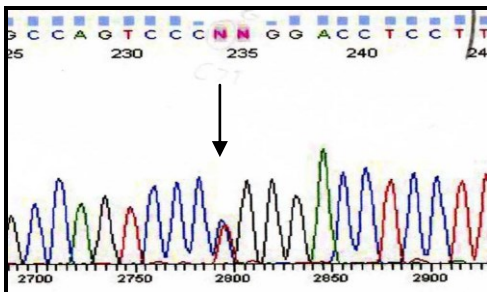
Intron 16Fragment *PLCy2-25*:

Abb. 58

C►T, C80498945T (heterozygot)

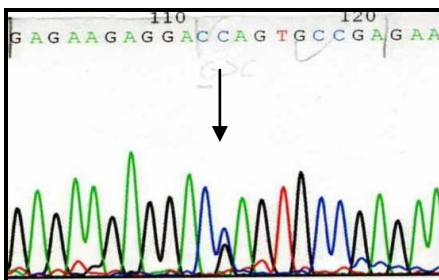
Exon 17Fragment *PLCy2-26*:

Abb. 59

G►C, G80499587C (heterozygot)

Intron 19

Fragment *PLCy2*-28:

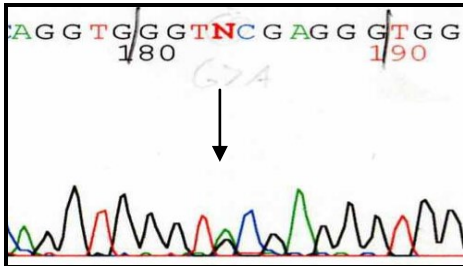


Abb. 60

G►A, G80503829A (heterozygot)

Exon 20

Fragment *PLCy2*-29:

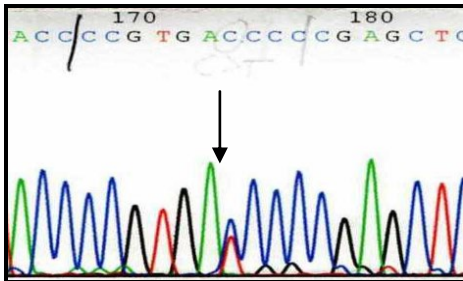


Abb. 61

C►T, C80510742T (heterozygot)

Intron 20

Fragment *PLCy2*-30:

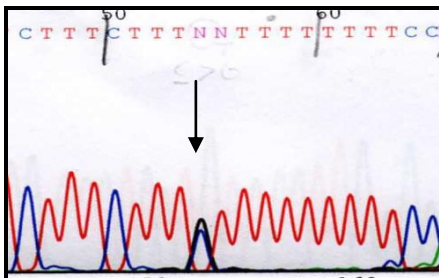


Abb. 62

C►G, C80510790G (heterozygot)

Intron 25

Fragment *PLCy2*-35:

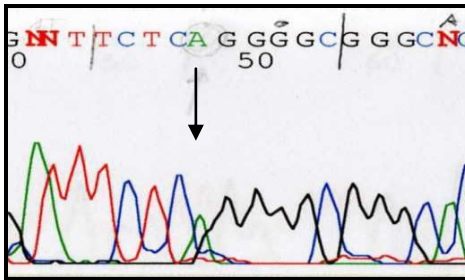


Abb. 63
G►A, G80525500A (homozygot)

Exon 28

Fragment *PLCy2*-37:

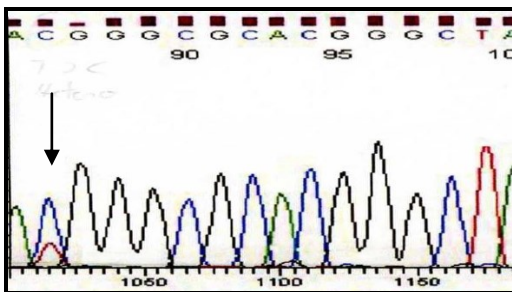


Abb. 64
C►T, C80528904T (heterozygot)

Exon 33/3'UTR

Fragment *PLCy2*-42:

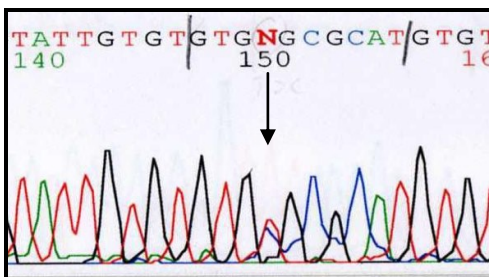


Abb. 65
T►C, T80549139C (heterozygot)

Legende:

- Adenin = Grün
- Thymin = Rot
- Guanin = Schwarz
- Cytosin = Blau

3.2 Identifizierte Varianten im *PLCy2*-Gen

In der folgenden Auflistung sind alle genetischen Varianten im Promotorbereich, in den exonflankierenden intronischen Bereichen, in den exonischen Bereichen sowie in dem untranslationierten 3'-Bereich dargestellt.

Accession-Nr: BC007565_0

> Chr16: range 80368431 bp bis 80370430 bp

> - 2000 bp bis - 148 bp vor dem Transkriptionsstartpunkt (TSP)

Promotor

ataataaatt	atacatatat	atgactgaac	taatataatta	tgtactttat	
ataacacata	ctaaaacaaa	agtgtgaaaa	agattgggtg	aaataaatac	
aagctgaagt	tctaaaaaaaa	aaaaaaaaaaa	aaaagtggagg	caaaggaatt	
gcccctagat	gtagtcatatt	tctctgggga	attggcccaa	tgacttcaag	
tggttgatgt	cataatgagt	ccttccaaga	tctctttaa	aaattgatgt	T>G
gttaagtgat	ctgtgggtgat	gagcacagct	atacacgcca	gttgggagtg	C>G
ctgaaagaaa	tgaatccaca	gatcttgtga	agtcaaaac	gagtcctatg	Ins. G
gcttgggata	caacattgac	agtgagagtg	atattcctca	atataaaaaac	
gctataacag	gcgggtgca	gtggctcatg	cctgtaatcc	cagcactttg	C>T
ggaggccaag	gtgggtggat	cacttgaggt	caggagtttg	agaccaatct	G>C
ggccaacata	gtgaaaccgc	gtctctagta	aaaatacaaa	aaattagcca	G>C, C>T
agcatgatgg	catacaccta	taatcccagc	tactcaggag	gctgaggcag	G>T
gagaatcgct	taaacctggg	aggtggaggt	tgcagtgagc	cgagatcggt	
ccactgcact	ccagcctggg	caagagagca	agactttgtc	tcaaaaaaaaa	A>C
aaaaaaaaaca	aaaaaaaaaca	aaaaaaaaaaa	caaaaaaaaaac	caaaaacaca	
cacacacaaa	aaaaacgcta	taacagacca	gtggcacatg	cctgtgatcc	
cagtgcctttg	ggaggtagag	gcaggaggat	tgcttgaggt	caggagttca	
agaacagcct	gggacacata	gtgagacctc	atgtcgaaaa	aagagaaaat	
tagccaagtg	tggtgtgcct	ctatagtccc	agctcttcag	gaggcagaag	G>C, C>G
caggaggatc	gcttgagtc	cggagttcga	ggatgtggtg	agctatgatg	
gcaccactgc	actccagcct	gggtgacaga	gtgagaccct	gcctcttaga	
aaacagaagc	tataactcaa	gcaacttggg	agtgaaattc	aagtgcctga	C>A, A>G
cagctgtcta	gggtgccctg	aaactgcctc	tagtcacaac	aaagatacct	A>G
ccatcaaaaga	gcataggaag	ggtttgaatc	agatagcttc	atgcaacaca	C>T, G>C
cgaacggaaa	aataaaatctc	ttaaagaaca	tattagcttc	ttcccatgag	
atcagggaata	cgggacatca	attgtctggg	gttctttgct	cctgactccc	
tttgggctg	gcactatggt	gatcacggtt	tacagatggg	gaaactgagg	G>A, T>C
ctgtcgggtt	ttaagtggtc	tgcttaaggt	agcagtaagg	gttgggtctga	
ctcccggtca	gcctcaacga	gggcttcaaa	ttagggccat	gaattggcaa	
ttctctggcgg	gtaattgtga	agagtataatt	tatttttaat	tittttattat	A>G, A>G, Ins. ATTT Ins. ATTT
ttattttttga	gacggagtg	ctctcggcca	cacccatcct	agctcattgc	
tgtctcgaac	tctcgagctc	agacgatcct	cccgtctagg	cttcccaaag	
agctgggatg	acaggcgtga	gcggggcgc	cggccggga	gtgtgttaag	C>T, G>T
tatacgcaaa	acacctggac	tgcgccggc	tctccaggaa	tgccatgata	
ttggggaatt	ccctttgcac	ctggccaagt	ggcctcgggc	aggtagcctc	
ccctcgggtt	gcctcagttt	cttctttggc	acgcagaggc	ggggctccag	
gcctggggccg	ctccatggcg	gggagggcgc	ggggacgctg	caactcgggt	A>G, C>G
gcgctccgag	aggcggaccc	ggctggggcg	gctggggcg	gggcgaggcg	
gggcgaggct	gggcgggtgcg	gggggcggcc	cccgaggatc	acgtggcgcg	
gcgccgcggc	cgaagcagaa	gtagcgagcg	ccggcggcgg	agggcgtgag	

> Chr16: range 80370431 bp bis 80370530 bp

> - 147 bp bis - 47 bp vor dem TSP

Exon 1

cggcgctgag tgacccgagt cgggacgcgg gctgcgcgcg cgggaccccg

gagcccaaac cgggggcagg cgggcagctg tgcccgggcg gcacggccag

> Chr16: range 80370531 bp bis 80377048 bp

gtgagctgcc cggccgggag cgaggcaggc agggcgcca gggacctgcg
 ccccgcgggg accggctcc agggcgctgc gtccgagggg gtctgcgtcc

 gccctttcag

Intron 1

A>G
 C>T

> Chr16: range 80377049-80377288

> - 47 bp bis + 190 bp um den TSP

cttcctgatt tctcccgatt ctttccttct ccttggagcg gccgacaatg
 tccaccacgg tcaatgtaga ttcccttgcg gaatatgaga agagccagat
 caagagagcc ctggagctgg ggacggtgat gactgtgttc agcttccgca
 agtccacccc cgagcggaga accgtccagg tgatcatgga gacgcggcag
 gtggcctgga gcaagaccgc cgacaagatc gagggcttct

Exon 2

Start-Codon

A>T

C>T

> Chr16: range 80377289 bp bis 80445549 bp

gtgagtactc gctgggtggg gcagtgtggc ccgtcctctg gggccctggc

 ttcattttag

Intron 2

G>A

> Chr16: range 80445550 bp bis 80445693 bp

> + 191 bp bis + 335 bp nach dem TSP

tggatatcat ggaaataaaa gaaatccgcc caggaagaa ctccaaagat
 ttcgagcggag caaaagcagt tcgccagaaa gaagactgct gcttcacat
 cctatatggc actcagttcg tcctcagcac gctcagcttg gcag

Exon 3

A>G

> Chr16: range 80445694 bp bis 80449368 bp

gtaggtgcat gtttctgtgc ctttctcctt cctgtgcct tagtctcttc

 tccactccag

Intron 3

G>C

> Chr16: range 80449369 bp bis 80449462 bp

> + 336 bp bis + 430 bp nach dem TSP

ctgact ctaaagagga tgcagttaac tggctctctg gcttgaaaat
 cttacaccag gaagcgatga atgctccac gccaccatt atcgagag

Exon 4

> Chr16: range 80449463 bp bis 80450221

gtagttggct tttgcctggt gatttgcgta gttgctgatt cttttattct
 gctgccttta gccaacatgg gctacaggg ggaaaaaaaa aaaaaaggac

Intron 4

G>C
 Del. GGA,
 A>C,
 Del. AAAA

.....
 ttctttccag

> Chr16: range 80450222 bp bis 80450269 bp

> + 431 bp bis + 479 bp nach dem TSP

tt ggctgagaaa gcagatatat tctgtggatc aaaccagaag
 aaacag

Exon 5

> Chr16: range 80450270 bp bis 80460319

gtaagagtca

 ctcatagagg gctgcctgag gtgggaactg atgggagcag ctaaatcctg

 tgctgttgaa aacctcaag gtgacagaac tgggtctccc tcttttcag

Intron 5

Del. G, C>G,
 C>G,
 A>G
 A>G

> Chr16: range 80460320 bp bis 80460404 bp > + 480 bp bis + 565 bp nach dem TSP catc agtctccgag agttgaagac catcttgccc ctgatcaact ttaaagtgag cagtgc ca ag ttccttaaag ataagtttgt g	Exon 6 C>G
> Chr16: range 80460405 bp bis 80461957 bp gtaagtttca cattcttacg gtggacatca aaaatcatgt ggtcactttt ttcataattta cag	Intron 6
> Chr16: range 80461958 bp bis 80462041 bp > + 566 bp bis + 650 bp nach dem TSP gaaatagga gcacacaaag atgagctcag ctttgaacag ttccatctct tctataaaaa acttatgttt gaacagcaaa aatcg	Exon 7
> Chr16: range 80462042 bp bis 80472015 bp gtaagatgat tccatttcag	Intron 7
> Chr16: range 80472016 bp bis 80472059 > + 651 bp bis + 695 bp nach dem TSP attct cgatgaattc aaaaaggatt cgccctgtgt catcctggg	Exon 8
> Chr16: range 80472060 bp bis 80474374 bp gtgaggcagc ccgaggatag	Intron 8
> Chr16: range 80474375 bp bis 80474447 bp > + 696 bp bis + 769 bp nach dem TSP g aacactgaca ggccggatgc ctctgctgtt tacctgcgtg acttccagag gtttctcata catgaacagc ag	Exon 9
> Chr16: range 80474448 bp bis 80480277 bp gtgagagcac tcattttaag	Intron 9
> Chr16: range 80480278 bp bis 80480379 bp > + 770 bp bis + 872 bp nach dem TSP gagc at tg ggctcaggat ctgaacaaag tccgtgag cg gatgacaaag ttcattgatg acaccatgcg tgaaactgct gagcctttct tgtttggtgga tgag	Exon 10 A>T, C>T
> Chr16: range 80480380 bp bis 80482577 bp gtgagtaggc actcttttag	Intron 10
> Chr16: range 80482578 bp bis 80482696 bp > + 873 bp bis + 992 bp nach dem TSP ttcctc acgtacctgt tttcacgaga aaacagcatc tgggatgaga agtatgacgc ggtggacatg caggacatga acaacccccct gtctcattac tggatctcct cgtcacataa cac	Exon 11
> Chr16: range 80482697 bp bis 80484814 bp gtgagtttca tctcctgcag	Intron 11
> Chr16: range 80484815 bp bis 80484900 bp > + 993 bp bis + 1079 bp nach dem TSP gtacctt acaggtgacc agctgcggag cgagtcttcc ccagaagctt acatccgctg cctgcgcatg ggctgtcgtc gcattgaac	Exon 12

> Chr16: range 80484901 bp bis 80486912 bp
gtgagtagct ctccctgtag

Intron 12

> Chr16: range 80486913 bp bis 80487033 bp
> + 1080 bp bis + 1201 bp nach dem TSP

t ggactgctgg gacgggcccg atgggaagcc ggtcatctac
catggctgga cgcggactac caagatcaag ttgacgacg tcgtgcaggc
catcaaagac cacgcctttg ttacgtcgag

Exon 13

T>C, C>T
G>C

> Chr16: range 80487034 bp bis 80491717 bp
gtcagttggc ctgcctgcag

Intron 13

> Chr16: range 80491718 bp bis 80491886 bp
> + 1202 bp bis + 1371 bp nach dem TSP

cttcccagtg atcctgtcca tcgaggagca ctgcagcgtg gagcaacagc
gtcacatggc caaggccttc aaggaagtat ttggcgacct gctggtgacg
aagcccacgg aggccagtgc tgaccagctg ccctcgccca gccagctgcg
ggagaagatc atcatcaag

Exon 14

> Chr16: range 80491887 bp bis 80496508 bp
gtaggcaccc ttcccctcag

Intron 14

> Chr16: range 80496509 bp bis 80496613 bp
> + 1372 bp bis + 1477 bp nach dem TSP

c ataagaagct gggccccga ggcgatgtg atgtcaacat
ggaggacaag aaggacgaac acaagcaaca gggggagctg tacatgtggg
attccattga ccag

Exon 15

> Chr16: range 80496614 bp bis 80498790 bp
gtgggccttg gtcccttccc gtagccactg cggccacgcc ccttgcaget
.....
cactttctag

Intron 15

G>C

> Chr16: range 80498791 bp bis 80498880 bp
> + 1478 bp bis + 1568 bp nach dem TSP

aatgg actcggcact actgcgccat tgcgatgcc aagctgtcct
tcagtgatga cattgaacag actatggagg aggaagtgcc ccag

Exon 16

C>T

> Chr16: range 80498881 bp bis 80499521 bp

gtagggggac accctagcca catagggagg aggtccccag gaaccccag
gaccagccag tcccgggac ctccctcca tgtggcttct ctggccggct
.....
tgcggcccag

Intron 16

C>T

> Chr16: range 80499522 bp bis 80499697 bp
> + 1569 bp bis + 1745 bp nach dem TSP

gatata cccctacag aactacattt tggggagaaa tggttccaca
agaaggtgga gaagaggac agtgccgaga agttgctgca ggaatactgc
atggagacgg ggggcaagga tggcaccttc ctggttcggg agagcgagac
cttccccaat gactacaccc tgtccttctg

Exon 17

G>C

> Chr16: range 80499698 bp bis 80501625 bp
gtaatgcccc ctccccgcag

Intron 17

> Chr16: range 80501626 bp bis 80501826 bp
> + 1746 bp bis + 1947 bp nach dem TSP

gcggtcaggc cgggtccagc actgccgat ccgctccacc atggagggcg
ggaccctgaa atactacttg actgacaacc tcaccttcag cagcatctat

Exon 18

gccctcatcc agcactaccg cgagacgcac ctgcgctgcg ccgagttcga
gctgcggctc acggaccctg tgcccaacct caacccccac gagtccaagc
c

> Chr16: range 80501827 bp bis 80503702 bp
gtacgtgtct tgtgccgag

Intron 18

> Chr16: range 80503703 bp bis 80503822 bp
> + 1948 bp bis + 2068 bp nach dem TSP

gtggtaacta tgacagcctg agccgcggag aggcagagga catgctgatg
aggattcccc gggacggggc cttcctgatc cggaagcgag aggggagcga
ctcctatgcc atcaccttca g

Exon 19

> Chr16: range 80503823 bp bis 80510589 bp

gtgggtgca ggggtgggag cacatgctct acagaggggc ttggcaagga
.....
cctgctccag

Intron 19

G>A

> Chr16: range 80510590 bp bis 80510770 bp
> + 2086 bp bis + 2249 bp nach dem TSP

ggctagggg caaggtaaag cattgtcgca tcaaccggga cggccggcac
tttgtgctgg ggacctccgc ctattttgag agtctggtgg agctcgtcag
ttactacgag aagcattcac tctaccgaaa gatgagactg cgctaccccc
tgacccccga gctcctggag cgctacaata tg

Exon 20

> Chr16: range 80510771 bp bis 80512303 bp
gtaggtggtg

Intron 20

.....
ttattccatt tctttctttc tttttttttc cag

C>G

> Chr16: range 80512304 bp bis 80512375 bp
> + 2250 bp bis + 2322 bp nach dem TSP

gaaagaga tataaactcc ctctacgacg tcagcagaat gtagtggtg
cccagtgaaa tcaatccgtc catg

Exon 21

> Chr16: range 80512376 bp bis 80514590 bp
gtacggtgcc tccctgaaag

Intron 21

> Chr16: range 80514591 bp bis 80514700 bp
> + 2323 bp bis + 2433 bp nach dem TSP

cctcag agaaccgtga aagctctgta tgactacaaa gccaaagcga
gcgatgagct gagcttctgc cgtggtgcc tcatccacaa tgtctccaag
gagccccggg gctg

Exon 22

> Chr16: range 80514701 bp bis 80518187 bp
gtaaggctga tcttatccag

Intron 22

> Chr16: range 80518188 bp bis 80518284 bp
> + 2434 bp bis + 2531 bp nach dem TSP

gtggaa aggagactat ggaaccagga tccagcagta cttcccatcc
aactacgtcg aggacatctc aactgcagac ttcgaggagc tagaaaagca
g

Exon 23

> Chr16: range 80518285 bp bis 80519663 bp
gtgagtcccc ttcttcacag

Intron 23

> Chr16: range 80519664 bp bis 80519730 bp
> + 2532 bp bis + 2599 bp nach dem TSP

attattgaa gacaatccct tagggtctct ttgcagagga atattggacc

Exon 24

tcaataccta taacgtcg

> Chr16: range 80519731 bp bis 80522602 bp
gtacgtgcac ttacccaag

Intron 24

> Chr16: range 80522603 bp bis 80522760 bp
> + 2600 bp bis + 2759 bp nach dem TSP

tg aaagcccctc agggaaaaaa ccagaagtcc tttgtcttca
tcctggagcc caagcagcag ggctatcctc cggtaggagtt tgccacagac
agggtggagg agctctttga gtggtttcag agcatccgag agatcacctg
gaagattgac accaag

Exon 25

> Chr16: range 80522761 bp bis 80525534 bp
gtaggcacct

Intron 25

.....
aggaaaaatg cagggcgagc tgggaagatg ggatttctcg ggggcgggca
ctaaagacag tgaactccaa acag

G▶A

> Chr16: range 80525535 bp bis 80525637 bp
> + 2759 bp bis + 2863 bp nach dem TSP

gaga acaacatgaa gtactgggag aagaaccagt ccacgcacat
cgagctctct gacctggttg tctactgcaa accaaccagc aaaaccaagg
acaacttag

Exon 26

> Chr16: range 80525638 bp bis 80527274 bp
gtaacatctt ctgtgtgcag

Intron 26

> Chr16: range 80527275 bp bis 80527484 bp
> + 2863 bp bis + 3073 bp nach dem TSP

a aaatcctgac ttccgagaaa tccgctcctt tgtggagacg
aaggctgaca gcatcatcag acagaagccc gtcgacctcc tgaagtacaa
tcaaaagggc ctgacctcgc tctaccctaaa gggacaaaga gttgactctt
caaaactacga ccccttccgc ctctggctgt gcggttctca gatggtggca
ctcaatttcc agacggcag

Exon 27

> Chr16: range 80527485 bp bis 80528863 bp
gtaaaggccg tccttcccag

Intron 27

> Chr16: range 80528864 bp bis 80529009 bp
> + 3074 bp bis + 3220 bp nach dem TSP

a taagtacatg cagatgaatc acgcattggt ttctctcaac
gggcgcacgg gctacgttct gcagcctgag agcatgagga cagagaaata
tgacccgatg ccacccgagt ccagaggaa gatcctgatg acgctgacag
tcaag

Exon 28

C▶T

> Chr16: range 80529010 bp bis 80529906 bp
gtaaagccag ggtgtcccag

Intron 28

> Chr16: range 80529907 bp bis 80530021 bp
> + 3221 bp bis + 3336 bp nach dem TSP

gttct cggtgctcgc catctcccca aactggagc aagtattgcc
tgtccctttg tagaagtgga gatctgtgga gccgagtatg acaacaacia
gttcaagacg acggttgtga

Exon 29

> Chr16: range 80530022 bp bis 80530997 bp
gtaagtcagt ctcttcccag

Intron 29

> Chr16: range 80530998 bp bis 80531165 bp
> + 3337 bp bis + 3505 bp nach dem TSP

Exon 30

```
atgataatgg cctcagccct atctgggctc caacacagga gaaggtgaca
tttgaaatth atgacccaaa cctggcattt ctgcgctttg tggtttatga
agaagatatg ttcagcgatc ccaactttct tgctcatgcc acttacccca
ttaagcagt caaatcag
```

> Chr16: range 80531166 bp bis 80537280 bp
gtaagaggca tctgcttcag

Intron 30

> Chr16: range 80537281 bp bis 80537369 bp
> + 3506 bp bis + 3595 bp nach dem TSP

```
ga ttcaggtccg ttcctctgaa gaatgggtac agcgaggaca
tagagctggc ttcctcctg gttttctgtg agatgcggcc agtcctg
```

Exon 31

> Chr16: range 80537370 bp bis 80547800 bp
gtgagtgagg catcctccag

Intron 31

> Chr16: range 80547801 bp bis 80547985 bp
> + 3596 bp bis + 3781 bp nach dem TSP

```
gag agcgaagagg aactttactc ctctgtcgc cagctgagga
ggcggcaaga agaactgaac aaccagctct ttctgtatga cacacaccag
aacttgcgca atgccaaccg ggatgccctg gttaaagagt tcagtgttaa
tgagaaccag ctccagctgt accaggagaa atgcaacaag ag
```

Exon 32

> Chr16: range 80547986 bp bis 80549061 bp
gtaggtcagc tttatttcag

Intron 32

> Chr16: range 80549062 bp bis 80549399 bp
> + 3782 bp bis + 4138 bp nach dem TSP

```
gttaagag agaagagagt cagcaacagc aagttttact catagaagct
ggggtatgtg tgtaagggtg ttgtgtgtgE gcgcatgtgt gtttgcattg
aggagaacgt gccctattca cactctggga agacgctaata ctgtgacatc
ttttcttcaa gcctgccaatc aaggacattt cttaaagacc aactggcatg
agttggggta atttcctatt attttcatct tggacaactt tcttaactta
tattctttat agaggattcc ccaaaaatgtg ctctcattt ttggcctctc
atgttccaaa cctcattgaa taaaagcaat gaaaaccttg aaaaaaaaaa
aaaaaaaaa -> Poly-A-Schwanz
```

Exon 33

Stop-Codon

T>C

Legende

atg Start-Codon

xx SNP im Promotor

xx SNP in einem Intron

xx SNP in einem Exon

tag Stopp-Codon

3.3 Übersichtstabelle der *PLCy2*-Varianten

Tabelle 4 zeigt eine Übersicht der identifizierten genetischen Varianten. Zur Überprüfung des Veröffentlichungsstatus wurden die Datenbanken Ensembl (<http://ensembl.org/>) und NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) genutzt. Von den 58 detektierten Polymorphismen waren 14 zum gegebenen Zeitpunkt nicht veröffentlicht. Bei den bereits veröffentlichten genetischen Varianten ist die Identifikationsnummer (rs-Nummer) aufgeführt.

Tabelle 4: Übersichtstabelle der *PLCy2*-Varianten

Fragment	Region	Genetische Varianten	Frequenz des minderen Allels	Hetero/Homozygot	Allele	Triplett	Aminosäure-Austausch	Triplett-Nr	rs-Nummer
<i>PLCy2-1</i>	Promotor	T80368661G	19%	18/0	T►G				
-	Promotor	C80368709G	19%	16/2	C►G	-	-	-	rs 7198995
-	Promotor	InsG 80368765/6	14%	12/2	Ins G	-	-	-	rs11415278
-	Promotor	C80368843T	6%	0/6	C►T	-	-	-	rs60780862
-	Promotor	G80368898C	7%	0/7	G►C	-	-	-	rs7198003
-	Promotor	G80368958C	7%	1/6	G►C	-	-	-	rs7198169
-	Promotor	C80368979T	2%	0/2	C►T	-	-	-	rs7199605
-	Promotor	G80368986T	2%	0/2	G►T	-	-	-	rs7198191
-	Promotor	A80369083C	2%	0/2	A►C	-	-	-	rs58271299
<i>PLCy2-2</i>	Promotor	G80369343C	11%	8/3	G►C	-	-	-	rs11643356
-	Promotor	C80369349G	12%	8/4	C►G	-	-	-	rs11643670
-	Promotor	C80369484A	17%	7/9	C►A	-	-	-	rs56704282
-	Promotor	A80369511G	11%	6/5	A►G	-	-	-	rs4494534
-	Promotor	A80369553G	13%	9/4	A►G	-	-	-	rs4494535
-	Promotor	C80369585T	13%	10/3	C►T	-	-	-	rs4587966

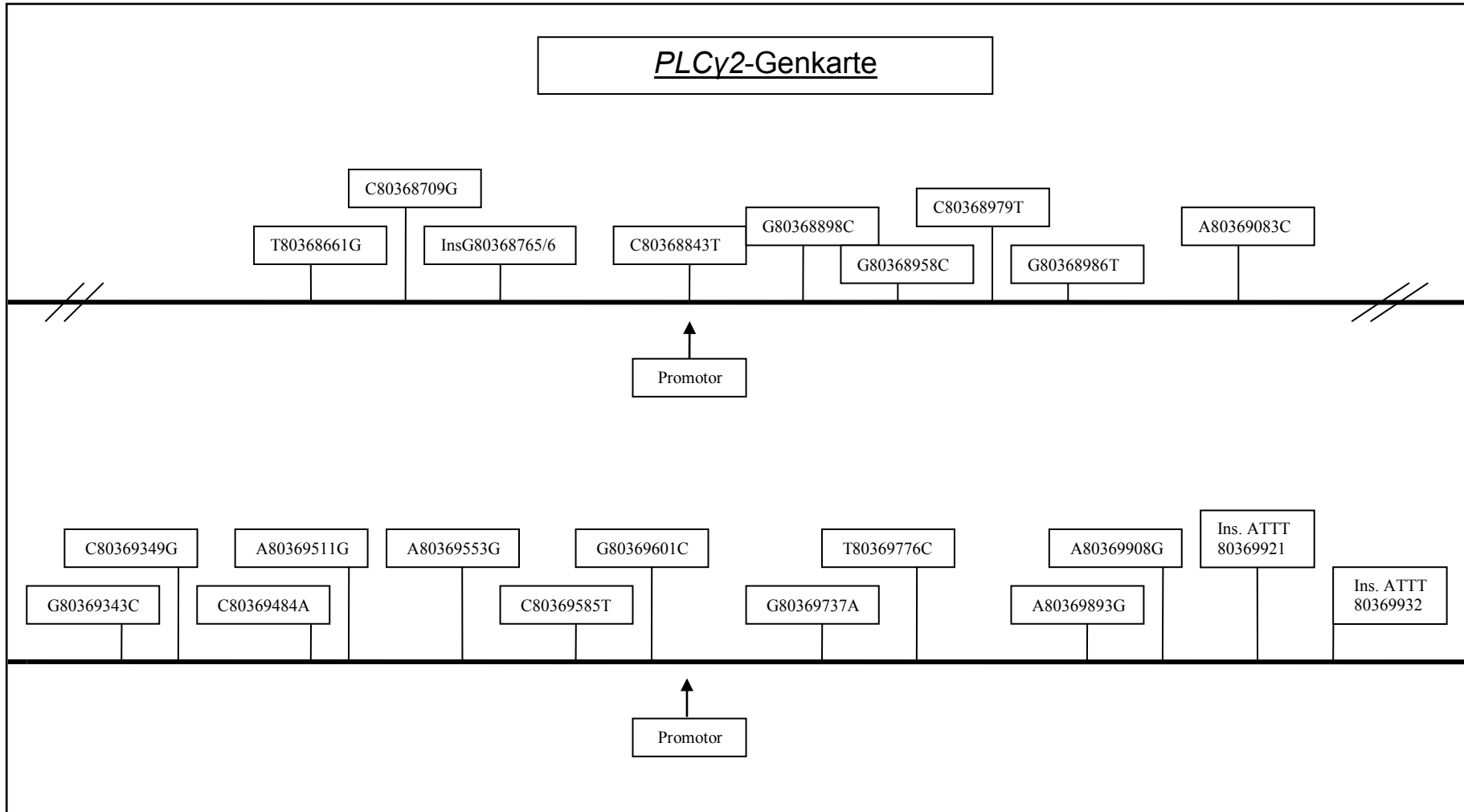
-	Promotor	G80369601C	11%	9/2	G►C	-	-	-	rs4312300
-	Promotor	G80369737A	2%	1/1	G►A	-	-	-	rs4273032
-	Promotor	T80369776C	10%	7/3	T►C	-	-	-	rs4500720
-	Promotor	A80369893G	7%	5/2	A►G	-	-	-	rs4401042
-	Promotor	A80369908G	7%	6/1	A►G	-	-	-	rs4496135
-	Promotor	Ins ATTT 80369921	8%	6/2	Ins ATTT	-	-	-	rs5818351
-	Promotor	Ins ATTT 80369932	9%	6/3	Ins ATTT	-	-	-	-
PLCy2-3	Promotor	C80370053T	22%	18/3	C►T	-	-	-	rs4511521
-	Promotor	G80370067T	10%	10/0	G►T	-	-	-	rs62046428
-	Promotor	A80370272G	22%	19/2	A►G	-	-	-	-
-	Promotor	C80370273G	6%	4/2	C►G	-	-	-	-
PLCy2-9	Intron 1	A80370561G	12%	10/2	A►G	-	-	-	rs62046429
-	Intron 1	C80370598T	19%	14/4	C►T	-	-	-	rs62046430
PLCy2-10	Exon 2	A80377177T	4%	3/1	A►T	atg►uug	Met►Leu / M►L	M28L	rs61749044
-	Exon 2	C80377269T	5%	3/2	C►T	gcc►gcu	Ala►Ala/ A=A	A58A	rs4586425
PLCy2-11	Intron 2	G80377321A	6%	4/2	G►A	-	-	-	rs4294811

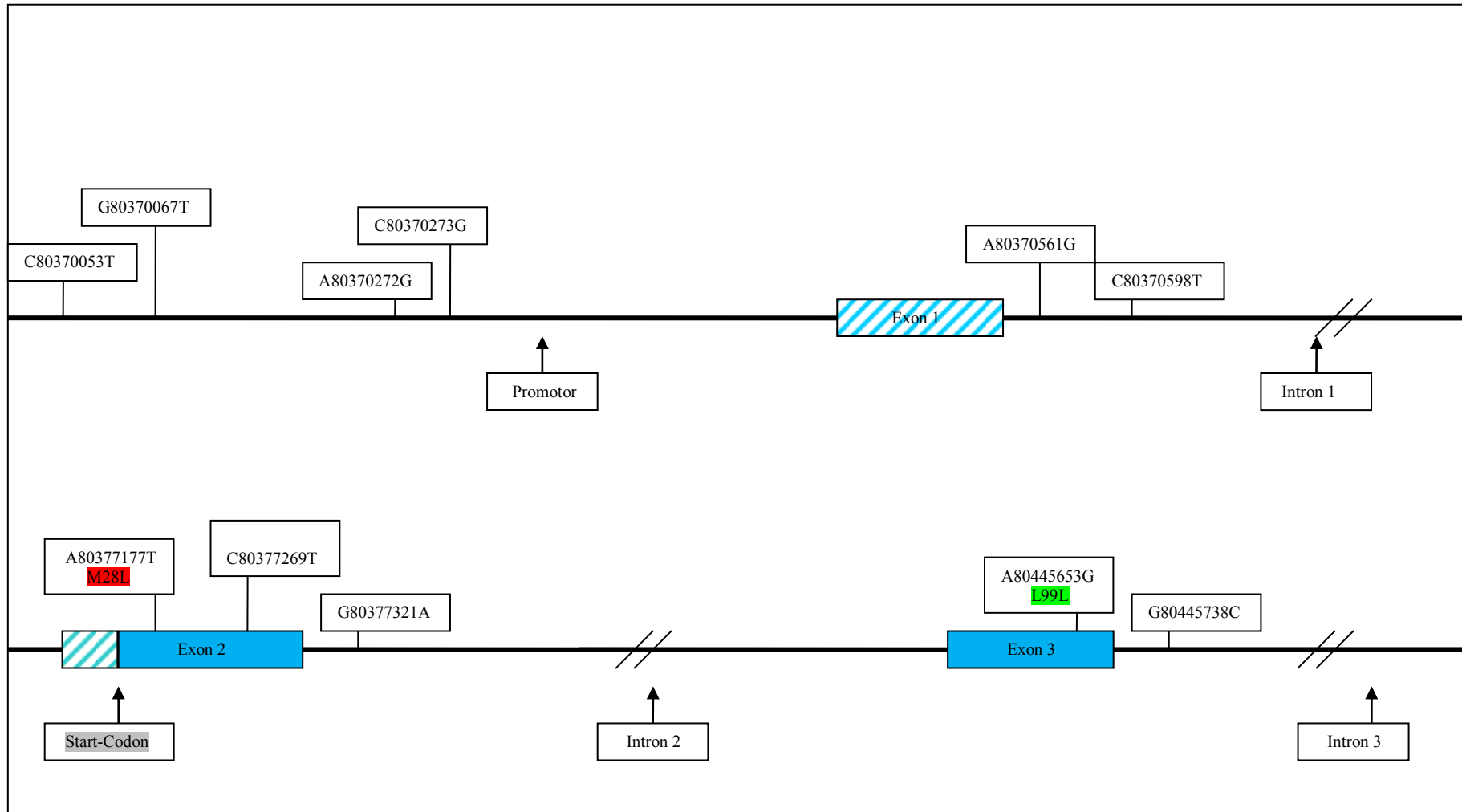
PLCy2-12	Exon 3	A80445653G	4%	1/3	A►G	cta►cug	Leu=Leu / L=L	L99L	rs1143686
-	Intron 3	G80445738C	4%	2/2	G►C	-	-	-	rs4072828
PLCy2-13	Intron 4	G80449499C	5%	2/3	G►C	-	-	-	rs4341734
-	Intron 4	80449543-80449545	5%	3/2	Del GGA	-	-	-	rs5818357
-	Intron 4	A80449549C	4%	2/2	A►C	-	-	-	rs5016604
-	Intron 4	80449545-80449557	5%	3/2	Del AAAA	-	-	-	-
PLCy2-15	Intron 5	DelG80460228	2%	2/0	Del G	-	-	-	-
-	Intron 5	C80460231G	4%	2/2	C►G	-	-	-	-
-	Intron 5	C80460247G	5%	3/2	C►G	-	-	-	rs41301799
-	Intron 5	A80460264G	8%	3/5	A►G	-	-	-	rs56070867
-	Intron 5	A80460298G	4%	3/1	A►G	-	-	-	rs12445580
-	Exon 6	C80460380G	5%	3/2	C►G	gcc►gcg	Ala=Ala / A=A	A180A	-
PLCy2-19	Exon 10	A80480282T	4%	4/0	A►T	cat►cuu	His►Leu / H►L	H257L	rs45443101
-	Exon 10	C80480314T	4%	4/0	C►T	cgg►ugg	Arg►Trp / R►W	R268W	rs17537869

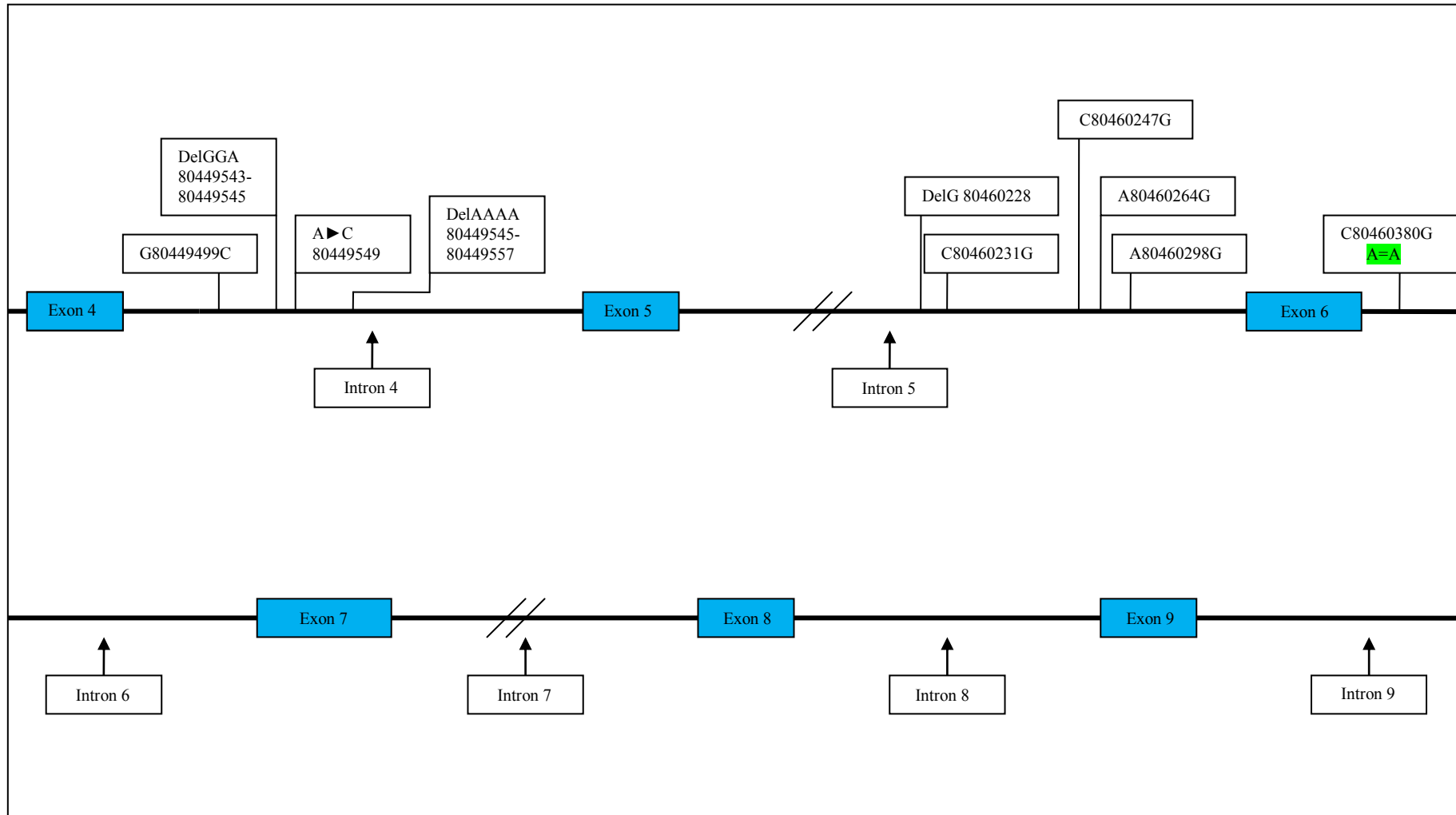
PLCy2-22	Exon 13	T80486986C	5%	3/1	T►C	ttt►uuc	Phe=Phe / F=F	F382F	-
-	Exon 13	C80486989T	3%	1/3	C►T	gac►gau	Asp=Asp / D=D	D383D	rs1143688
-	Exon 13	G80487028C	4%	2/2	G►C	acg►acc	Thr=Thr / T=T	T396T	rs13333716
PLCy2-24	Intron 15	G80496651C	25%	8/16	G►C	-	-	-	rs4435248
PLCy2-25	Exon 16	C80498820T	23%	8/14	C►T	gcc►gcu	Ala=Ala / A=A	A499A	rs1143689
-	Intron 16	C80498945T	11%	10/1	C►T	-	-	-	-
PLCy2-26	Exon 17	G80499587C	5%	4/1	G►C	acg►acc	Thr=Thr / T=T	T541T	-
PLCy2-28	Intron 19	G80503829A	7%	3/4	G►A	-	-	-	-
PLCy2-29	Exon 20	C80510742T	6%	2/4	C►T	acc►auc	Thr►Ile / T►I	T736I	-
PLCy2-30	Intron 20	C80512290G	5%	2/3	C►G	-	-	-	rs12446127
PLCy2-35	Intron 25	G80525500A	2%	2/0	G►A	-	-	-	-
PLCy2-37	Exon 28	C80528904T	26%	12/13	C►T	aac►aau	Asn=Asn / N=N	N1031N	rs1071644
PLCy2-42	3' UTR Exon33	T80549139C	2%	1/1	T►C	-	-	-	rs45554137

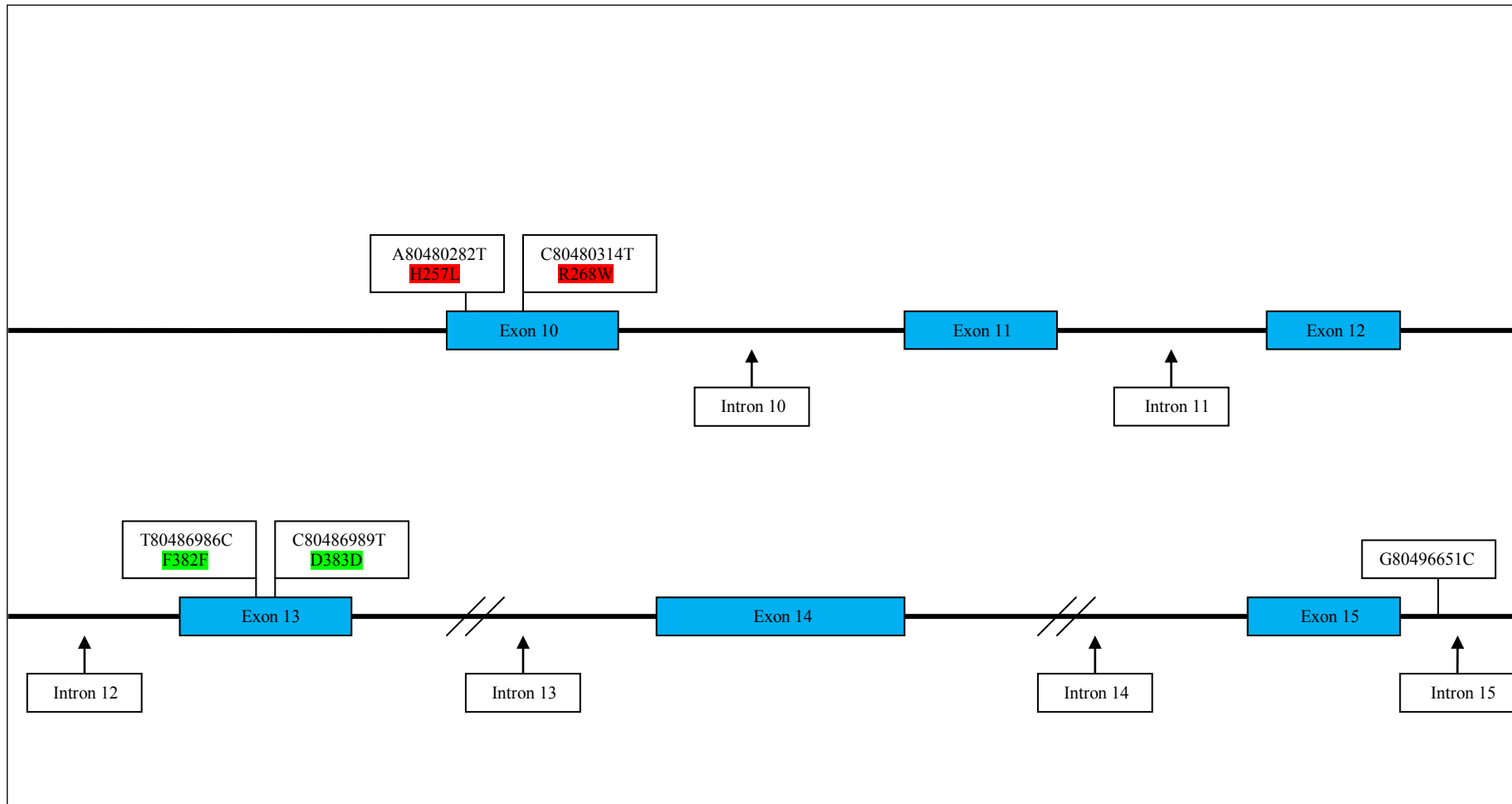
3.4 *PLCy2*-Genkarte mit detektierten genetischen Varianten

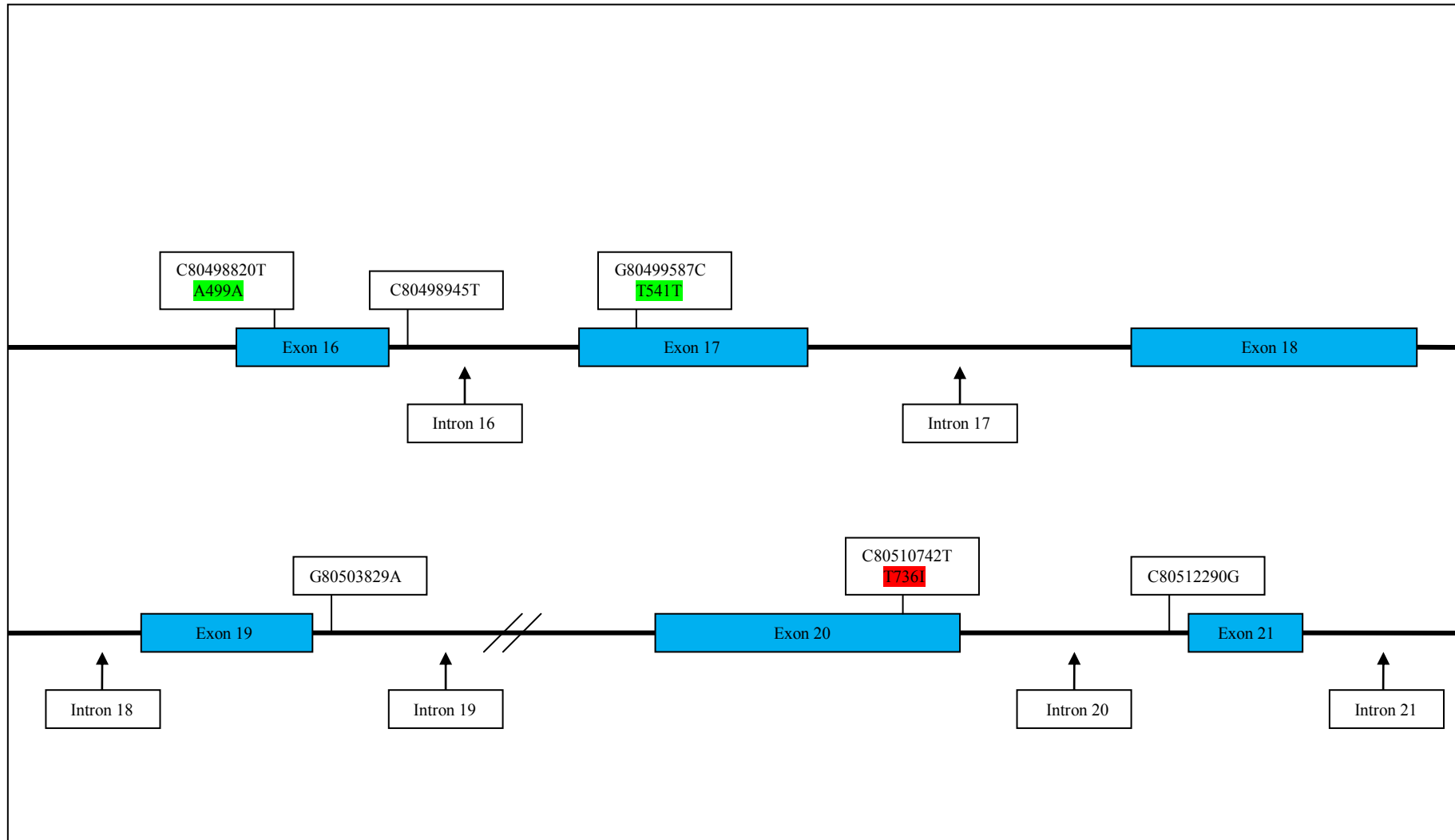
Aufgeführt sind die identifizierten, genetischen Varianten sowie eine mögliche Änderung der Aminosäure.

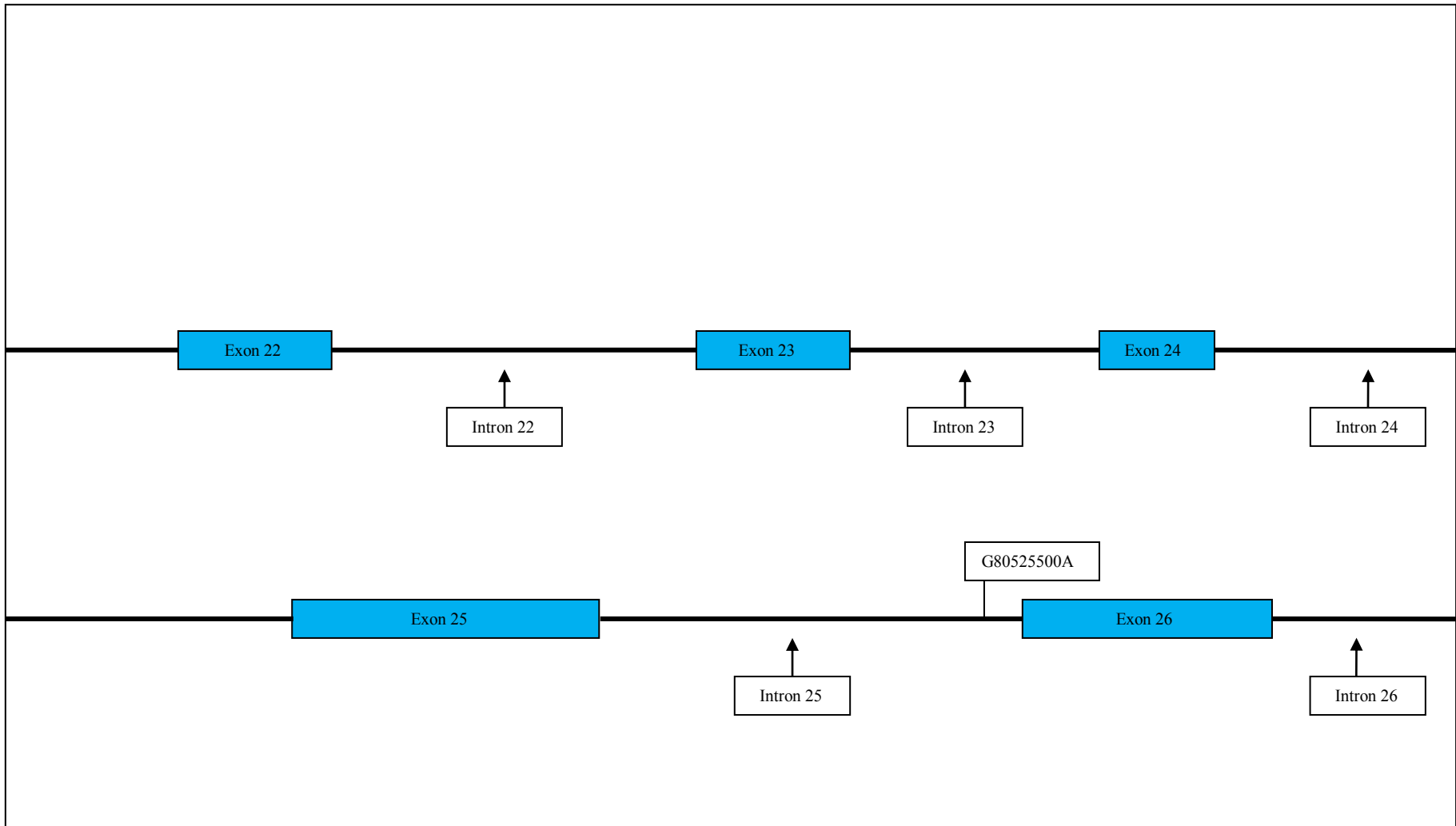


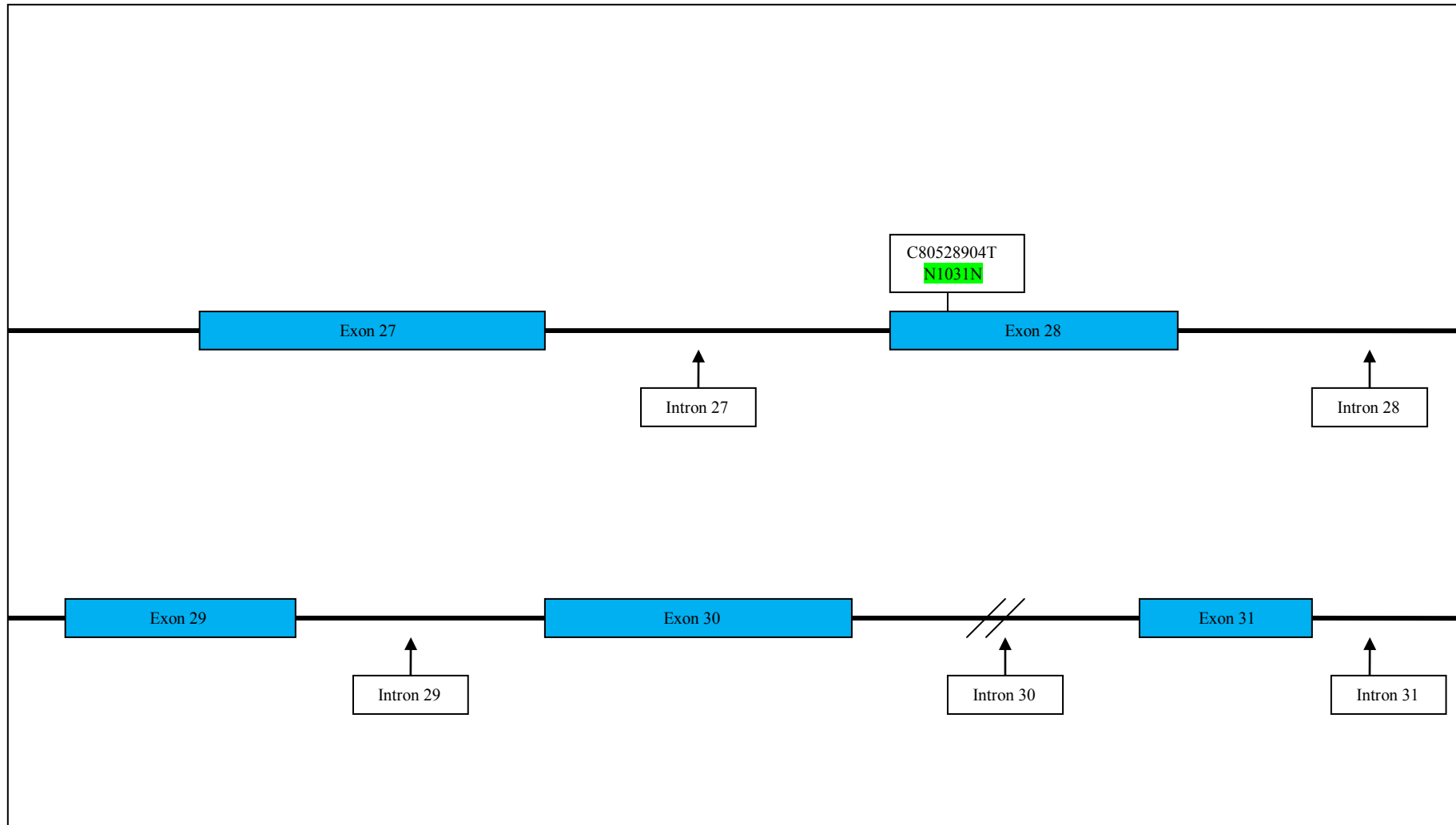


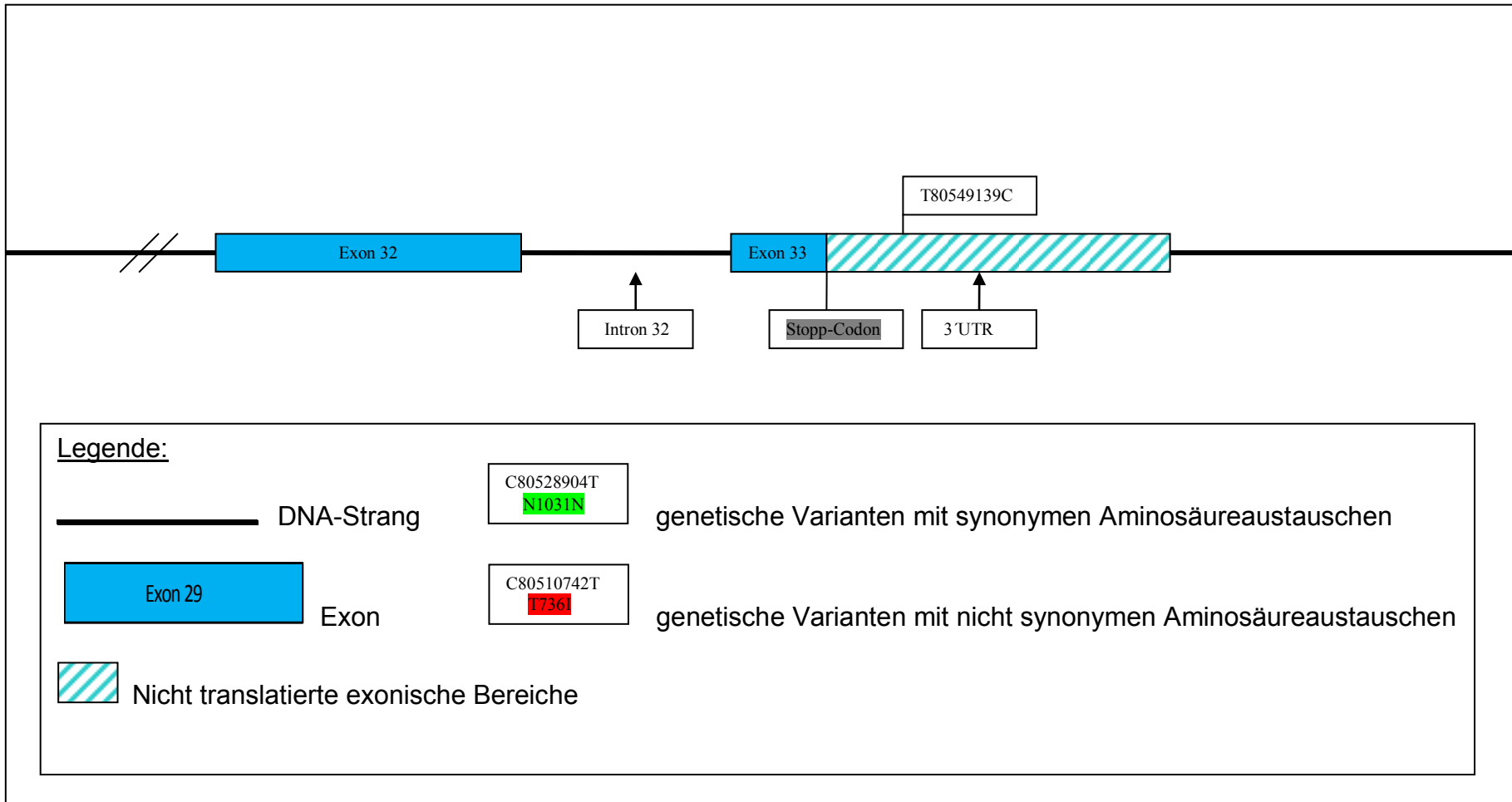












3.5 Genetische Varianten im *PLC γ 2*-Promotorbereich

In einer Arbeit von Kang et al. konnte in verschiedenen Zelllinien gezeigt werden, dass der proximale 5'-flankierende Bereich der *PLC γ 2* ausreichende Transkriptionsaktivität besaß. Zelltypunabhängig befindet sich der basale Promotor der *PLC γ 2* offenbar innerhalb der ersten 200 bp vor dem Transkriptionsstartpunkt. In einigen Zelllinien, vor allem in den Raji-Zelllinien, wurden zusätzliche transkriptionsaktive Promotorbereiche in der distalen 5'-flankierenden Region (bis Position -895) nachgewiesen. Bei diesen Bereichen handelt es sich vermutlich um Regionen mit zelltypabhängigen *cis*-aktiven Elementen (30).

Da transkriptionsaktive Promotorbereiche in ihrem Ausmaß, vor allem auch in Abhängigkeit des exprimierenden Gewebes und der (patho-)physiologischen zellulären Situation, variieren können, haben wir zusätzlich zur publizierten transkriptionsaktiven Promotorregion den 5'-flankierenden Bereich der *PLC γ 2* bis zur Position -2000 bp vor dem Transkriptionsstartpunkt auf genetische Varianten untersucht.

Bei der Betrachtung von Signaltransduktionskaskaden, in welche die *PLC γ 2* eingebunden ist, fiel auf, dass die Aktivierung der *PLC γ 2* über Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) zur Bindung von Transkriptionsfaktoren der Aktivator protein 1 (AP-1)- und Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF-kappaB) Familien an ihre Konsensussequenzen führt (39). Die Regulation der *PLC γ 2*-Expression könnte durch einen negativen Feedbackmechanismus über eben diese Transkriptionsfaktoren gesteuert werden. Über die Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie ist bekannt, dass sie sowohl als Aktivator, als auch als Repressor der Genexpression wirken können. Zur heterogenen Gruppe der AP-1-Faktoren zählen die Transkriptionsfaktoren der Avian sarcoma virus 17 oncogene homolog (Jun), FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog (Fos), Musculoaponeurotic fibrosarcoma (Maf) und Activating transcription factor (ATF) Familie (56). Diese sind unter anderem an pathophysiologischen Prozessen und der Apoptose beteiligt.

Die Familie der NF-kappaB-Transkriptionsfaktoren spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Immunantwort, der Zellproliferation und der Apoptose. Hauptsächlich wirken diese Transkriptionsfaktoren als Aktivatoren, können jedoch, je nach Dimerzusammensetzung, auch die Genexpression reprimieren (31,54). Bei der *in silico* Analyse des Promotors mittels AliBaba 2.1 und PROMO 3.0.2 wurde daher ein besonderes Augenmerk auf die oben beschriebenen Transkriptionsfaktoren gelegt.

3.6 *In silico* Analyse der *PLCy2*-Promotorregion

Die mittels *in silico* Analyse detektierten TFBS sind im Anhang (siehe Kapitel 10.4) aufgeführt. Die Darstellung zeigt neben den TFBS die detektierten genetischen Varianten. Neben einer Vielzahl von TFBS befinden sich darunter auch TFBS der AP-1-Familie und NF-kappa-Familie. In der untersuchten Promotorregion bis -2000 bp vor den Transkriptionsstartpunkt konnten sieben potentielle NF-kappaB-Bindungsstellen und elf AP-1-Bindungsstellen vorausgesagt werden. Drei AP-1- und eine NF-kappaB-TFBS liegen im Bereich mit beschriebener hoher Promotoraktivität. Um die Ergebnisse zu validieren wurde ein weiterer Suchalgorhythmus mit stringenteren Sucheinstellungen verwendet. In Tabelle 5 sind die Ergebnisse der PROMO 3.0.2 *in silico* Analyse im Bezug auf die Transkriptionsfaktorfamilien AP-1 und NF-kappaB aufgeführt. Auch bei stringenterer Einstellung wurden die Ergebnisse der Alibaba 2.1 Analyse im Hinblick auf mögliche TFBS der Transkriptionsfaktorfamilien AP-1 und NF-kappaB durch die PROMO 3.0.2 *in silico* Analyse bestätigt.

Tabelle 5: Ergebnisse der PROMO 3.0.2-Analyse des *PLCy2*-Promotorbereiches.
RE query: Wert für die statistische Wahrscheinlichkeit, eine TFBS in einer Sequenz mit der vorliegenden Basenkombination zu identifizieren.

Faktor	Übereinstimmung	Sequenz	RE query
NF-kappaB1	98,5	GGGGAATTCCC	0,006
c-Fos	100	CTCCTGACTC	0,013
c-Fos	97	GGTCTGACTC	0,057
AP-1	95	TGACTCCCT	0,083
AP-1	95	TGACTCCCT	0,083
AP-1	95	TGACTCCAG	0,083
c-Jun	96	TGACTGA	0,123

Durch eine veränderte Basensequenz kann es zu einer veränderten Bindungsaffinität von Transkriptionsfaktoren im Promotorbereich kommen. Wir haben daher die Varianten mittels *in silico* Analyse bezüglich einer möglichen veränderten Transkriptionsfaktorbindungsaffinität im Promotorbereich überprüft.

Die Varianten C80368709G, G80368898C, G80368986T, G80369343C, C80369349G, A80369553G, G80369601C hatten unter den gewählten Einstellungen keine veränderte Transkriptionsfaktorbindungsaffinität zur Folge.

Im Folgenden sind die genetischen Varianten aufgeführt, die die TFBS veränderten.

Variante: T80368661G: Verlust einer NFK-1-Bindungsstelle

```
seq( 0.. 59)      aatgacttcaagtggttgatgtcataatgagtccttccaagat/gctctttaaaaaattgat
Segments:
1.1.3.0         18   27           =C/EBPalp=
1.1.1.1         23   32           ===c-Jun==
1.1.3.0         49   58           ==NF-1==
9.9.51          52   61           =C/EBPalp=
                52   61           ===ATF=
=====
seq( 60.. 119)   gtgttaagtgatct
Segments:
9.9.51          52   61           ==
```

T►G

Variante InsG80368765/6: Verlust einer CRE-Bindungsstelle, dafür GR (Glukokortikoidrezeptor)

```
seq( 0.. 59)      ctgaaagaaatgaatccacagatcttgtgaagtgcacaaacgagtcctatggcttgggat
Segments:
2.1.1.1         30   39           =====GR=====
9.9.539         43   52           ==CRE-BP1=
                43   52           =====NF-1==
```

Ins G

Variante C80368843T: Verlust einer AP-2alpha-Bindungsstelle

```
seq( 0.. 59)      atattcctcaattaaacgctataacaggcc/tgggtgcagtggtcatgcctgtaa
Segments:
2.3.1.0         33   42           =====Sp1=====
                33   42           =AP-2alph=
```

C►T

Variante G80368898C: Verlust einer SP1-Bindungsstelle

```
seq( 0.. 59)      cagcactttgggaggccaaggtgggtgg/catcacttgaggtcaggagtttgagaccaat
Segments:
2.3.1.0         10   20           =====Sp1=====
                10   20           ==Sp1==
```

G►C

<u>3.5.3.0</u>	28	37	===IRF-1==	
<u>9.9.29</u>	29	38	====AP-1==	
<u>2.3.3.0</u>	33	42	=CPE bind=	
<u>1.1.1.6</u>	34	43	=ATF-3del=	
<u>2.1.2.2</u>	34	43	==RXR-beta	
<u>9.9.721</u>	35	44	==RAR-beta	
<u>1.1.3.0</u>	52	61		<u>C/EBPal</u>

Variante C80368979T: Verlust von Bindungsstellen von Oct-1, CP1, C/EBPalp und NF-1, dafür MCM1

seq(0.. 59)	ccgcgtctctagtaaaaaatacaaaaaattagcc/taagcat		
Segments:			
<u>3.3.2.0</u>	15	24	===HNF-3==
<u>1.1.3.0</u>	19	28	=C/EBPgam=
<u>2.3.2.2</u>	20	29	====Hb====
<u>4.3.1.3</u>	25	34	====MCM1==
			====Oct-1==
			====CP1====
			=C/EBPalp=
			====NF-1==

C▶T

Variante A80369083C: Entstehung einer zusätzlichen Sp1-Bindungsstelle

seq(0.. 59)	taaacctgggaggtggaggttgagcagtgagccgagatcgtgcc/cctgcact		
Segments:			
<u>2.2.1.1</u>	19	28	===GATA-1=
<u>1.1.3.0</u>	32	41	=C/EBPalp=
<u>2.3.1.0</u>	41	50	====Sp1====

A▶C

Variante C80369484A: Verlust einer NF-EM5-Bindungsstelle, dafür TBP und SP1

```
seq( 0.. 59) gagaccctgcctcttagaaaac/aagaagctataactcaagcaacttgga
Segments:
3.3.2.0 15 24      ===HNF-3==
4.5.1.0 15 24      =====TBP=====
2.3.1.0 17 26      =====Sp1=====
                               ===NF-EM5=
                               =====AP-1==
                               =C/EBPgam=
9.9.29      28 37
1.1.3.0     32 41
```

C▶A

Variante A80369511G: Verlust von Bindungsstellen von ICSBP und Oct-1, dafür SP1 und NF-kappa

```
seq( 0.. 59) gaagctataactcaagcaacttgga/ggtgaaattcaagtgcctga
Segments:
                               ===ICSBP==
                               ===Oct-1==
2.3.1.0 20 29      =====Sp1=====
4.1.1.0 26 35      =NF-kappa=
1.6.1.0 39 48      =AP-2alph=
```

A▶G

Variante C80369585T: Zusätzlich eine Ubx-Bindungsstelle

```
seq( 0.. 59) tctagtcacaacaaagatacctccatc/taaagagcatagga
Segments:
3.1.1.2     21 30      =====Ubx=====
```

C▶T

Variante G80369737A: Verlust einer Sp1-Bindungsstelle

```
seq( 0.. 59)      cgggacatcaattgtctgggggttctttgctcctgactccctttgggg/actggcactatggt
Segments:
2.3.3.0      12  21          ====MIG1==
4.6.1.0      18  27          ====SRY===
2.3.1.0      29  38          ====Sp1====      ====Sp1====
9.9.29       29  38          ====AP-1==
9.9.539      47  56          ====NF-1==
```

G▶A

Variante T80369776C: Verlust einer ICSBP-Bindungsstelle, dafür NF-kappa und IRF

```
seq( 0.. 59)      gatcacgttttacagatggggaaact/cgaggctgtcggtttttaagtggctgcctaaggt
Segments:
9.9.592      16  25          ====ICSBP==
3.5.3.0      18  27          =NF-kappa=
          ====IRF-1==
```

T▶C

Variante A80369893G: Zusätzlich eine C/EBPbeta-Bindungsstelle

```
seq( 0.. 59)      gaattggcaattcctggcgggta/gattgtgaagagta
Segments:
1.1.3.0      18  27          =C/EBPbeta
```

A▶G

Variante A80369908G: Verlust einer NF-ATc3-Bindungsstelle,dafür zusätzlich GATA-1 und SGF-1

```
seq( 0.. 59)      gaattggcaattcctggcgggtaattgtgaagagtata/gtttatttttaatttttatttat
Segments:
2.2.1.1      36  45          ====NF-ATc3=
3.3.2.0      36  45          ====GATA-1=
1.1.3.0      37  46          ====SGF-1==
          =C/EBPalp=
```

A▶G

<u>3.1.1.2</u>	39	48
<u>4.3.1.1</u>	39	48
<u>4.3.1.2</u>	39	48
<u>4.3.1.1</u>	45	54
<u>3.1.2.2</u>	47	61
<u>1.1.3.0</u>	48	57
<u>3.3.2.0</u>	49	58

```

====Antp==
====MEB-1==
====GLO====
====MEB-1==
====Oct-1==
=C/EBPalp=
====HNF-3B=
    
```

Variante InsATTT 80369921: Verlust einer MEB-1-Bindungsstelle, zusätzlich Antp und Hb

seq(0.. 59) gaattggcaattcctggcgggtaattgtgaagagtatatattttttaattattttttat

Ins ATT

Segments:

<u>3.1.1.2</u>	35	44
<u>3.1.2.2</u>	35	44
<u>4.1.3.0</u>	35	44
<u>1.1.3.0</u>	36	45
<u>4.3.1.1</u>	39	48
<u>4.3.1.2</u>	39	48
<u>3.1.1.2</u>	47	56
<u>3.1.2.1</u>	51	60
<u>1.1.3.0</u>	52	61
<u>2.3.2.2</u>	52	61
<u>3.3.2.0</u>	53	62

```

====Antp==
====Oct-1==
==NF-ATc3=
=C/EBPalp=
====MEB-1==
====GLO====
====Antp==
====Pit-1a
=C/EBPal
====Hb==
====HNF-p=
====MEB-1==
    
```

Variante Ins ATTT 80369932: Verlust einer Pit-1a-Bindungsstelle

seq(0.. 59) aattttttattttatttttttttgagacggagtgtctctcgccacaccatcct

Ins ATTT

Segments:

<u>3.1.2.2</u>	10	19
<u>1.1.3.0</u>	14	23
<u>3.3.2.0</u>	16	25

```

====Pit-1a=
====Oct-1==
=C/EBPalp=
====HNF-3B=
    
```

<u>4.3.1.1</u>	17	26	<u>====MEB-1==</u>	
<u>2.3.1.0</u>	24	33	<u>====Sp1===</u>	
<u>2.3.1.0</u>	42	52		<u>=====Sp1===</u>

Variante C80370053T: Verlust einer Sp1-Bindungsstelle

seq(0.. 59) cgatcctcccgtctaggcttcccaaagagctgggatgacagggcgtgagcc/tcggggcgcccg
 Segments: ====Sp1===

<u>1.6.1.0</u>	15	24	<u>=AP-2alph=</u>	
<u>2.3.2.2</u>	30	39		<u>====Odd===</u>

C▶T

Variante G80370067T: Verlust einer Sp1-Bindungsstellen

seq(0.. 59) gcccgggcgcccggccg/tggagtgtgttaagtatacggcaaacacctggactgcgggccggc
 Segments: ====Sp1=====

<u>2.3.1.0</u>	8	17	<u>====Sp1===</u>	
<u>2.3.1.0</u>	51	60		<u>====Sp1==</u>

G▶T

Variante A80370272G: Verlust einer Sp1-Bindungsstellen

seq(0.. 59) ggcgcggggacgctgca/gctcggggtgctcggag
 Segments: ====Sp1===

<u>2.3.1.0</u>	19	29	<u>====Sp1===</u>	
----------------	----	----	-------------------	--

A▶G

Variante C80370273G: Verlust einer Sp1-Bindungstellen

seq(0.. 59) ggcgcggggacgctgcaC/gtcgggggtgcgctccgag

C►G

Segments:

2.3.1.0 19 28

====Sp1====
 =====
 =====

Einstellungen: Min. matrix conservation: 75%, sowie Matrix width in bp: 10 gewählt.

Legende:

XXX Additive TFBS

XXX Verlust von TFBS

3.7 Genetische Varianten im kodierenden Bereich der *PLC γ 2*

Im Folgenden werden die identifizierten Varianten im kodierenden, exonischen Bereich dargestellt. Die Sequenz wurde zwischen dem Start- und Stopcodon in Triplets aufgeführt. Schema 10.3 (Anhang) ermöglicht eine Zuordnung der korrespondierenden Aminosäure zum Triplet. Rechtsseitig ist der Basenaustausch, das veränderte Triplet sowie eine mögliche Änderung der Aminosäure dargestellt.

```

cggcgctgag tgacccgagt cgggacgcgg gctgcgcgcg cgggaccccg
gagcccaaac ccggggcagg cgggcagctg tgcccgggcg gcacggccag
cttcctgatt tctcccgatt ccttccttct ccttggagcg gccgaca
atg tcc acc acg gtc aat gta gat tcc ctt
gcg gaa tat gag aag agc cag atc aag aga
gcc ctg gag ctg ggg acg gtg atg act gtg a>t atg>uug M>I
ttc agc ttc cgc aag tcc acc ccc gag cgg
aga acc gtc cag gtg atc atg gag acg cgg
cag gtg gcc tgg agc aag acc gcc c>t gcc>gcu A=A
atc gag ggc ttc ttg gat atc atg gaa ata
aaa gaa atc cgc cca ggg aag aac tcc aaa
gat ttc gag cga gca aaa gca gtt cgc cag
aaa gaa gac tgc tgc ttc acc atc ctg a>g cta>cug L=L
ggc act cag ttc gtc ctc agc acg ctc agc
ttg gca gct gac tct aaa gag gat gca gtt
aac tgg ctc tct ggc ttg aaa atc tta cac
cag gaa gcg atg aat gcg tcc acg ccc acc
att atc gag agt tgg ctg aga aag cag ata
tat tct gtg gat caa acc aga aga aac agc
atc agt ctc cga gag ttg aag acc atc ttg
ccc ctg atc aac ttt aaa gtg agc agt gcc c>g gcc>gcg A=A
aag ttc ctt aaa gat aag ttt gtg gaa ata
gga gca cac aaa gat gag ctc agc ttt gaa
cag ttc cat ctc ttc tat aaa aaa ctt atg
ttt gaa cag caa aaa tcg att ctc gat gaa
ttc aaa aag gat tcg tcc gtg ttc atc ctg
ggg aac act gac agg ccg gat gcc tct gct
ggt tac ctg cgt gac ttc cag agg ttt ctc
ata cat gaa cag cag gag cat tgg gct cag a>t cat>cuu H>I
gat ctg aac aaa gtc cgt gag cgg atg aca c>t cgg>ugg R>W
aag ttc att gat gac acc atg cgt gaa act
gct gag cct ttc ttg ttt gtg gat gag ttc
ctc acg tac ctg ttt tca cga gaa aac agc
atc tgg gat gag aag tat gac gcg gtg gac
atg cag gac atg aac aac ccc ctg tct cat
tac tgg atc tcc tcg tca cat aac acg tac
ctt aca ggt gac cag ctg cgg agc gag tcg
tcc cca gaa gct tac atc cgc tgc ctg cgc
atg ggc tgt cgc tgc att gaa ctg gac tgc
tgg gac ggg ccc gat ggg aag ccg gtc atc
tac cat ggc tgg acg cgg act acc aag atc
aag ttg gac gac gtc gtg cag gcc atc aaa t>c ttt>uuc F=F, c>t gac>gau D=D
gac cac gcc ttt gtt acg tcg agc ttc cca g>c acg>acc T=T
gtg atc ctg tcc atc gag gag cac tgc agc
gtg gag caa cag cgt cac atg gcc aag gcc

```

```

ttc aag gaa gta ttt ggc gac ctg ctg ttg
acg aag ccc acg gag gcc agt gct gac cag
ctg ccc tcg ccc agc cag ctg cgg gag aag
atc atc atc aag cat aag aag ctg ggc ccc
cga ggc gat gtg gat gtc aac atg gag gac
aag aag gac gaa cac aag caa cag ggg gag
ctg tac atg tgg gat tcc att gac cag aaa
tgg act cgg cac tac tgc gcc att gcc gat C>T gcc>gcu A=A
gcc aag ctg tcc ttc agt gat gac att gaa
cag act atg gag gag gaa gtg ccc cag gat
ata ccc cct aca gaa cta cat ttt ggg gag
aaa tgg ttc cac aag aag gtg gag aag agg
acc agt gcc gag aag ttg ctg cag gaa tac G>C acc>acc T=T
tgc atg gag acg ggg ggc aag gat ggc acc
ttc ctg gtt cgg gag agc gag acc ttc ccc
aat gac tac acc ctg tcc ttc tgg cgg tca
ggc cgg gtc cag cac tgc cgg atc cgc tcc
acc atg gag ggc ggg acc ctg aaa tac tac
ttg act gac aac ctc acc ttc agc agc atc
tat gcc ctc atc cag cac tac cgc gag acg
cac ctg cgc tgc gcc gag ttc gag ctg cgg
ctc acg gac cct gtg ccc aac ccc aac ccc
cac gag tcc aag ccg tgg tac tat gac agc
ctg agc cgc gga gag gca gag gac atg ctg
atg agg att ccc cgg gac ggg gcc ttc ctg
atc cgg aag cga gag ggg agc gac tcc tat
gcc atc acc ttc agg gct agg ggc aag gta
aag cat tgt cgc atc aac cgg gac ggc cgg
cac ttt gtg ctg ggg acc tcc gcc tat ttt
gag agt ctg gtg gag ctc gtc agt tac tac
gag aag cat tca ctc tac cga aag atg aga
ctg cgc tac ccc gtg acc ccc gag ctc ctg C>T acc>auc T>I
gag cgc tac aat atg gaa aga gat ata aac
tcc ctc tac gac gtc agc aga atg tat gtg
gat ccc agt gaa atc aat ccg tcc atg cct
cag aga acc gtg aaa gct ctg tat gac tac
aaa gcc aag cga agc gat gag ctg agc ttc
tgc cgt ggt gcc ctc atc cac aat gtc tcc
aag gag ccc ggg ggc tgg tgg aaa gga gac
tat gga acc agg atc cag cag tac ttc cca
tcc aac tac gtc gag gac atc tca act gca
gac ttc gag gag cta gaa aag cag att att
gaa gac aat ccc tta ggg tct ctt tgc aga
gga ata ttg gac ctc aat acc tat aac gtc
gtg aaa gcc cct cag gga aaa aac cag aag
tcc ttt gtc ttc atc ctg gag ccc aag cag
cag ggc tat cct ccg gtg gag ttt gcc aca
gac agg gtg gag gag ctc ttt gag tgg ttt
cag agc atc cga gag atc acc tgg aag att
gac acc aag gag aac aac atg aag tac tgg
gag aag aac cag tcc atc gcc atc gag ctc
tct gac ctg gtt gtc tac tgc aaa cca acc
agc aaa acc aag gac aac tta gaa aat cct
gac ttc cga gaa atc cgc tcc ttt gtg gag
acg aag gct gac agc atc atc aga cag aag
ccc gtc gac ctc ctg aag tac aat caa aag
ggc ctg acc cgc gtc tac cca aag gga caa
aga gtt gac tct tca aac tac gac ccc ttc

```

```

cgc ctc tgg ctg tgc ggt tct cag atg gtg
gca ctc aat ttc cag acg gca gat aag tac
atg cag atg aat cac gca ttg ttt tct ctc
aac ggg cgc acg ggc tac gtt ctg cag cct C>T aac>aau N=N
gag agc atg agg aca gag aaa tat gac ccg
atg cca ccc gag tcc cag agg aag atc ctg
atg acg ctg aca gtc aag gtt ctc ggt gct
cgc cat ctc ccc aaa ctt gga cga agt att
gcc tgt ccc ttt gta gaa gtg gag atc tgt
gga gcc gag tat gac aac aac aag ttc aag
acg acg gtt gtg aat gat aat ggc ctc agc
cct atc tgg gct cca aca cag gag aag gtg
aca ttt gaa att tat gac cca aac ctg gca
ttt ctg cgc ttt gtg gtt tat gaa gaa gat
atg ttc agc gat ccc aac ttt ctt gct cat
gcc act tac ccc att aaa gca gtc aaa tca
gga ttc agg tcc gtt cct ctg aag aat ggg
tac agc gag gac ata gag ctg gct tcc ctc
ctg gtt ttc tgt gag atg cgg cca gtc ctg
gag agc gaa gag gaa ctt tac tcc tcc tgt
cgc cag ctg agg agg cgg caa gaa gaa ctg
aac aac cag ctc ttt ctg tat gac aca cac
cag aac ttg cgc aat gcc aac cgg gat gcc
ctg gtt aaa gag ttc agt gtt aat gag aac
cag ctc cag ctg tac cag gag aaa tgc aac
aag agg tta aga gag aag aga gtc agc aac
agc aag ttt tac tca tag aagct
ggggtatgtg tgtaagggta ttgtgtgtg ggcgatgtgt gtttgcattg T>C
aggagaacgt gccctattca cactctggga agacgctaata ctgtgacatc
ttttcttcaa gctgccaatc aaggacattt cttaagacc aactggcatg
agttggggta atttcctatt attttcatct tggacaactt tcttaactta
tattctttat agaggattcc caaaatgtg ctctcattt ttggcctctc
atgttccaaa cctcattgaa taaaagcaat gaaaaccttg aaaaaaaaa
aaaaaaaa -> Poly-A-Schwanz

```

atg

Start-Codon

tag

Stopp-Codon

XXX

Triplett ohne Aminosäureaustausch

XXX

Triplett mit Aminosäureaustausch

XX

Exonischer Polymorphismus im 3'-Bereich

3.8 Einfluss der Varianten auf die PLC γ 2-Aminosäuresequenz

Um Auswirkungen von exonischen Varianten auf das Protein der PLC γ 2 analysieren zu können, wurde der kodierende Bereich in die Aminosäuresequenz übersetzt (Schema 10.3 im Anhang).

Insgesamt konnten 13 Polymorphismen im Bereich der exonischen DNA nachgewiesen werden. Davon haben vier Polymorphismen eine Änderung der Aminosäure zur Folge (missense), bei den übrigen neun Polymorphismen bleibt die Aminosäure identisch (synonym).

Proteinsequenz des PLCy2: BC007565_0

MSTTVNVDSLAEYEKSSQIKRALELGTVMTVFSFRKSTPERRTVQVIMETRQVAWSKTA^{M28I}DK^{A58A}
IEGFLDIMEIKEIRPGKNSKDFERAKAVRQKEDCCFTI^{L99I}LYGTQFVLSTLSLAADSKEDAV
NWLSSGLKILHQEAMNASTPTIIESWLRKQIYSVDQTRRNSISLRELKTILPLINFKVSSA^{A180A}
KFLKDKFVEIGAHKDELSFEQFHLFYKKLMFEQQKSILDEFKKDSSVFILGNTDRPDASA
VYLRDFQRFLIHEQQE^{H257I}HWAQDLNKVRE^{R268W}MTKFIDDTMRETAEPFLFVDEFLLTYLFSRENS
IWDEKYDAVDMQDMNNPLSHYWISSSHNTYLTGDQLRSESSPEAYIRCLRMGCRCIELDC
WDGPDGKPVIIYHGWRTRTKIK^{F382F}^{D383D}FDV^{T396T}VQAIKDHAFTSSFPVILSIEEHCSVEQQRHMAKA
FKEVFGDLLLTKPTEASADQLPSPSQLREKIIKHKKLGPRGDVDVNMEDKKDEHKQOGE
LYMWDSIDQKWTRHYCAIA^{A499A}DAKLSFSDDIEQTMEEV^{T541T}QDIPPELHFGEKWFHKKVEKR
TSAEKLLQEYCMETGGKDGTFVRESE^TFPNDYTL^TSFWRSGRVQHCRIRSTMEGGTLKYY
LTDNLTFSSIIYALIQHYRETHLRCAEFELRLTDPVNPNPHE^TSKPWYYDSL^TSRGEAEDML
MRIPRDGAF^TLIRKREGSDSYAITFRARGKV^TKHCRINRDGRHFV^TLGTSAYFESLVELVSY
EKHSLYRK^TMRLRYPV^TPELLERYNMERDINS^TLYDVSRMYVDPSEINPSMPQRTVKALYDY
KAKRSELSFCRGALIHNV^TSKEPGGWWKGDY^TGTRIQQYFPSNYVEDISTADFEELEKQII
EDNPLGSLCRGILD^TLN^TY^TNVV^TKAPQ^TGKNQ^TKS^TFV^TFILEPK^TQQGY^TPPVEFATDRVEELFEWF
QSIREITWKIDTKEN^TNM^TKY^TWEKN^TQ^TSI^TAIE^TLS^TDL^TV^TVY^TCK^TPT^TSK^TTK^TDN^TLEN^TPDF^TRE^TIR^TS^TF^TVE
TKADSIIRQ^TK^TP^TVD^TLL^TK^TYN^TQ^TKL^TTR^TV^TPK^TG^TQR^TVD^TSS^TNY^TDP^TF^TRL^TWL^TCG^TS^TQM^TVAL^TN^TF^TQT^TAD^TK^TY
MQMNH^TAL^TFS^TLN^TG^TRT^TGY^TVL^TQ^TPE^TSM^TR^TTE^TK^TY^TDP^TMP^TPE^TS^TQR^TK^TIL^TM^TTL^TTV^TK^TVL^TG^TAR^TH^TLP^TKL^TGR^TSI
ACPFVEVEICGAEYDNNKFKTTVVNDNGLSPIWAPTQEKVTFEIYDPNLAF^TLR^TF^TV^TYEED
MFSDPNFLAHATYPIKAVKSGFRSVPLKNGYSEDIELASLLVFCEMRPVLESEEELYSSC
RQLRRRQEELNNQLFLYDTHQNLNRNANRDALVKEFSVNENQLQLYQEKCNKRLREKRVSN
SKFYS

✘ = nicht synonymer Aminosäureaustausch

✔ = synonymer Aminosäureaustausch

4.0 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde das polymorphe Spektrum des Kandidatengens *PLC γ 2*, dessen Genprodukt entscheidend zur Thrombozytenaggregation beiträgt, mittels PCR-SSCP-Analyse charakterisiert. Hierbei konnten bisher unbekannte genetische Varianten identifiziert werden.

Einfache Genotyp/-Phänotyp-Assoziationen sind für eine Vielzahl von monogenetischen Erkrankungen gezeigt worden. Ein Beispiel hierfür ist die Delta-F-508-Mutation im *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator-Gen (CFTR)*, welches zum Phänotyp der Zystischen Fibrose führt (28). Beim ACS hingegen handelt es sich um eine multifaktorielle Erkrankung, welche durch den Einfluss vieler Gene geprägt ist. In einer aktuellen Metaanalyse von 14 GWAs konnten 13 Loci identifiziert werden, die mit dem ACS assoziiert sind. Interessanterweise zeigten nur drei Loci eine signifikante Assoziation mit den bekannten Risikofaktoren für das ACS (zwei Loci mit einem veränderten Serumspiegel an Apolipoproteinen oder des Gesamtcholesterins sowie ein Locus mit der arteriellen Hypertonie), während die übrigen Loci bislang nicht mit der Pathogenese des ACS in Verbindung gebracht worden waren (53).

Es besteht die Möglichkeit, dass Zusammenhänge zwischen einzelnen, seltenen Varianten mit geringem Effekt und dem ACS, oder den bekannten Risikofaktoren des ACS, aus Gründen zu kleiner Studienpopulationen bisher nicht in GWAs identifiziert werden konnten. Ein Zusammenhang zwischen genetischen Varianten der *PLC γ 2* und dem ACS kann daher nicht ausgeschlossen werden. Neben einfachen Varianten/-Phänotyp-Assoziationen sollte, bei multifaktorieller Entstehung des ACS, zudem ein synergistischer oder additiver Effekt der genetischen Varianten, der Lebensweise und der Umwelteinflüsse berücksichtigt werden.

4.1 Sensitivität der SSCP-Analyse für den Nachweis genetischer Varianten

Die sensitivste Methode zum Nachweis genetischer Varianten ist die Sequenzierung der genomischen DNA. Der Vorteil der hier genutzten SSCP-Analyse besteht im Wesentlichen darin, dass ein Gen auch bei nicht bekannter Struktur effizient auf Variationen untersucht werden kann. Die Genauigkeit der SSCP-Analyse ist dabei abhängig von der Länge des Fragmentes, der Temperatur während der Auftrennung

und der ionischen Kraft (25). Die Wahrscheinlichkeit eine genetische Variante mittels SSCP-Analyse zu determinieren liegt zwischen 69% und 94% (23,26). Die Wahrscheinlichkeit eine sehr seltene Variante mit einem Vorkommen von 1% in der Gesamtbevölkerung mittels SSCP-Analyse zu detektieren würde, in dem hier untersuchten Kollektiv mit 95 Patienten, bei 63,2% liegen, wenn man eine Detektionswahrscheinlichkeit der SSCP-Analyse von etwa 70% annimmt.

4.2 Genetische Varianten im *PLC γ 2*-Gen

Mittels PCR-SSCP wurde die gesamte kodierende Region der *PLC γ 2*, die Promotorregion und ein Teil der 3'-UTR auf genetische Varianten untersucht. Dabei wurden die exonflankierenden Abschnitte der jeweiligen Introns ebenfalls mit eingeschlossen. Bei dem Screening von 95 Hochrisikopatienten mit ACS wurden 58 genetische Varianten identifiziert. Vierzehn dieser Varianten waren in den Datenbanken Ensembl und NCBI nicht veröffentlicht.

Im Folgenden werden vor allem die genetischen Varianten im Promotorbereich und den exonischen Bereichen diskutiert, da diese für die Verfügbarkeit und die Funktionalität des Genproduktes entscheidend sein können.

4.3 Der Promotorbereich

Da der Promotorbereich für die Regulation der Expression eines Gens verantwortlich ist, stellt die Promotorsequenz einen essenziellen Bestandteil eines Gens dar. Im Promotorbereich (-2000 bp vor dem Transkriptionsstartpunkt) der *PLC γ 2* konnten 26 genetische Varianten identifiziert werden. Unter diesen befinden sich 23 Einzelbasenaustausche und 3 Insertionen.

Die Genexpression wird durch Transkriptionsfaktoren, welche an spezifische Konsensussequenzen der DNA binden, gesteuert. Hierdurch ist nicht nur die basale Regulation gewährleistet. Auch hormonelle oder reaktive Einflüsse, zum Beispiel entzündlicher Genese, werden durch Transkriptionsfaktoren in eine Veränderung der Genexpression übersetzt. Eine Arbeit von Mao et al. konnte zeigen, dass die Aktivierung der *PLC γ 2* über RANKL zur Bindung von Transkriptionsfaktoren der AP-1- und NF-kappaB-Familien an ihre Konsensussequenzen führt. Hierbei wird über die *PLC γ 2* die RANKL-induzierte Osteoklastogenese vermittelt (39). Die Regulation der *PLC γ 2*-Expression könnte durch einen negativen Feedbackmechanismus über eben diese Transkriptionsfaktoren gesteuert werden. Angel et al. konnten zeigen, dass

Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie die Expression und Funktion von Zellzyklus-Regulatoren erhöhen (4). Die AP-1-Aktivität wird neben Wachstumsfaktoren, Neurotransmittern, Polypeptidhormonen, Zell/-Matrix-Interaktionen, körperlichem oder toxischem Stress auch durch bakterielle und virale Infektionen sowie Zytokinen induziert (56). Die Induktion der AP-1-Aktivität könnte zu einer vermehrten Aktivierung des *PLC γ 2*-Promotors über Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie und somit zu einer vermehrte *PLC γ 2*-Expression und damit Aktivität führen.

Interessanterweise wurde eine verstärkte Expression der *PLC γ 2* nach Infektion von humanen B-Lymphozyten mit dem Epstein-Barr Virus im Jahr 2012 von der Gruppe um Dai gezeigt (15).

Die Aktivität der Transkriptionsfaktoren der NF-kappaB-Familie konnte bei der Expression einer Vielzahl von Genen, die an der zellulären Antwort im Rahmen von Infektionen, Inflammation und anderen Stresssituationen beteiligt sind, nachgewiesen werden. Vor allem scheinen die Zytokine TNF- α und Interleukin-1 die NF-kappaB-Aktivität zu beeinflussen (31).

Im Rahmen inflammatorischer Prozesse, die bei der Entstehung der Arteriosklerose und des ACS eine wesentliche Rolle spielen, könnten die Transkriptionsfaktoren der AP-1- und NF-kappaB-Familien die *PLC γ 2*-Expression beeinflussen.

Kang et al. konnten eine basale Promotoraktivität im Bereich -189 bis +78 bp um den Transkriptionsstartpunkt der *PLC γ 2* in allen verwendeten B-lymphozytären Zelllinien nachweisen. In einigen Zelllinien, vor allem in Raji-Zelllinien, reichte die Promotoraktivität in distalere Bereiche der 5'-Region, zwischen -662 bis -293 bp (30). In der vorliegenden Arbeit konnten mehrere AP-1-Konsensussequenzen und NF-kappaB-Bindungsstellen in der transkriptionsaktiven Region der *PLC γ 2* identifiziert werden.

Daher werden die genetischen Varianten wie folgt kategorisiert:

1. Potentielle Auswirkung der genetischen Varianten auf die Affinität der AP-1- und NF-kappaB-Bindung:

Die genetischen Varianten A80369511G (rs4494534) und T80369776C (rs4500720) bewirken möglicherweise eine Änderung der Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren der NF-kappaB-Familie. Beide SNPs könnten hierdurch zu einer veränderten Expression der *PLC γ 2* führen. Polymorphismen, die potentiell zu einer veränderten Bindungsaffinität von Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie führen, konnten nicht identifiziert werden.

2. Lage der genetischen Varianten im Bereich der nachgewiesenen hohen Promotoraktivität:

Genetische Varianten in diesem Promotorbereich könnten die Genexpression potentiell stärker beeinflussen. Hierzu zählen die SNPs A80370272G und C80370273G. Beide SNPs liegen direkt nebeneinander und könnten so einzeln oder als Haplotyp die Affinität von Transkriptionsfaktoren variieren.

3. Lage der genetischen Varianten in der Nähe (± 15 Basenpaare) einer AP-1- und NF-kappB-Bindungsstelle:

Benachbarte Bereiche einer möglichen TFBS können über eine veränderte Elektrodynamik der DNA eine Auswirkung auf die lokale Bindungsaffinität von Transkriptionsfaktoren haben (33). Da die Konsensusmotive eine Länge von ca. 10 Basen haben, wurde der flankierende Bereich einer möglichen AP-1- und NF-kappaB-Bindungsstelle mit ± 15 Basenpaare definiert. Fünf SNPs lagen in einem benachbarten Bereich einer AP-1- und NF-kappaB-Bindungsstelle.

Hierzu zählen T80368661G, G80368898C (rs7198003), C80369484A (rs56704282), G80369737A (rs4273032) sowie A80369893G (rs4401042).

4.4 Der kodierende Bereich

Im Folgenden werden die genetischen Varianten in den exonischen Bereichen der *PLCY2* diskutiert, da diese für die Funktionalität des Proteins entscheidend sein könnten.

Bei dem Screening von 95 Individuen wurden 14 genetische Varianten in exonischen Bereichen der *PLCY2* identifiziert. Allen lag ein einzelner Basenaustausch zu Grunde. Vier von diesen genetischen Varianten wurden in den Datenbanken Ensemble und NCBI zum gegebenen Zeitpunkt noch nicht aufgeführt. Vier der 14 genetischen Varianten führten zu einem Aminosäureaustausch. Bei neun genetischen Varianten änderte sich die Aminosäure nicht, eine genetische Variante befand sich in der 3'-UTR Region von Exon 33.

Die Variante T80549139C befindet sich in der zuletzt genannten untranslatierten Region des Exon 33. Durch die Änderung der Basensequenz ist eine veränderte Bindungsaffinität von Proteinen möglich, welche die Stabilität und den Transport der mRNA beeinflussen. Hierdurch wäre eine translationelle Blockade möglich (2, 40).

Eine mögliche Änderung der Aminosäuresequenz kann zu einer Änderung der Proteinstruktur und auch zu einer veränderten Funktionalität eines Proteins führen. Daher wird ein gesondertes Augenmerk darauf gelegt, ob sich ein möglicher Aminosäureaustausch in einer der bekannten Proteindomänen der PLC γ 2 befindet. Zur Recherche der Proteindomänen wurde die Datenbank Ensembl genutzt. Im Weiteren werden daher die genetischen Varianten, die zu einem möglichen Aminosäureaustausch führen, beschrieben und hinsichtlich ihrer denkbaren Auswirkung diskutiert.

4.4.1 Aminosäureaustausch Leucin statt Methionin im Exon 2

An der Position 80377177 im genetischen Kontext konnte ein Basenaustausch von Adenin nach Thymin nachgewiesen werden (rs61749044). Dieser Basenaustausch hätte eine Änderung des Triplets von ATG nach TTG zur Folge. ATG kodiert für die Aminosäure Methionin, während TTG für die Aminosäure Leucin kodiert. Dieser mögliche Aminosäureaustausch betrifft die 28. Aminosäure im PLC γ 2-Proteinkontext. Bis auf die Tatsache, dass Methionin eine schwefelhaltige Aminosäure ist, zeigen beide Aminosäuren sehr ähnliche Eigenschaften. Ihnen ist die Unpolarität der aliphatischen Aminosäurenreste gemeinsam. Hierdurch wird die schlechte Wasserlöslichkeit beider Aminosäuren erklärt. Ebenso sind die Säure-Basenverhalten der Seitenketten neutral (7,35).

Die Datenbank Ensembl gibt an, daß diese Variante nicht in eine regulatorische Region der PLC γ 2 fällt.

4.4.2 Aminosäureaustausch Leucin statt Histidin im Exon 10

Im Exon 10 konnte an der Position 80480282 ein Basenaustausch von Adenin nach Thymin nachgewiesen werden (rs45443101). Dieser Basenaustausch hätte eine Änderung des Triplets von CAT nach CTT zur Folge. CAT kodiert für die Aminosäure Histidin, während CTT für die Aminosäure Leucin kodiert. Dieser mögliche Aminosäureaustausch betrifft die 257. Aminosäure im PLC γ 2-Proteinkontext. Während Histidin zu den basischen, positiv geladenen und damit hydrophilen Aminosäuren zählt, ist Leucin durch seine Seitenketten insgesamt hydrophob (7,35). Hier würde es zu einem Austausch von Aminosäuren mit konträren Eigenschaften kommen. Charakteristisch für Histidin ist, dass sie durch einen Imidazolring zu den aromatischen Aminosäuren zählt (7). Folglich würde also eine aromatische Aminosäure durch eine nicht aromatische Aminosäure ersetzt. Nach Zuordnung der

genetischen Variante in die Domänenstruktur anhand der Datenbank Ensembl, befindet sich diese in der phosphoinositolspezifischen EF-hand-like-Domäne, welche für die Funktionalität des Enzyms essenziell ist. Die Domäne ist, laut Datenbank der European Molecular Biology Laboratory/European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) (<http://www.ebi.ac.uk/>), für die Bindung von Kalziumionen zuständig. Eine veränderte Aminosäuresequenz könnte zu einer veränderten Kalziumionenaffinität und damit zu einer veränderten Enzymfunktionalität führen.

4.4.3 Aminosäureaustausch Tryptophan statt Arginin im Exon 10

Durch den singulären Basenaustausch von Cytosin nach Thymin an der Position 80480314 (rs17537869) könnte es zu einer Änderung des Triplets von CCG nach TGG kommen.

Folgt daraus ein Austausch der Aminosäure Arginin durch Tryptophan. Dieser mögliche Aminosäureaustausch betrifft die 268. Aminosäure im PLC γ 2-Proteinkontext. Arginin ist hydrophil und alkalisch, sie ist daher eine basische Aminosäure. Dahingegen ist Tryptophan, als Aminosäure mit aromatischem Indol-Ringsystem, lipophil (7,35).

Diese genetische Variante befindet sich ebenfalls in der phosphoinositolspezifischen EF-hand-like-Domäne der PLC γ 2 (Ensembl).

4.4.4 Aminosäureaustausch Isoleucin statt Tryptophan im Exon 20

Im Exon 20 kann der Basenaustausch von Cytosin nach Thymin an der Position 80510742 zu einem veränderten Triplett von ACC nach ATC führen. Hieraus würde ein Austausch von Tryptophan durch Isoleucin an der 736. Position im Proteinkontext resultieren.

Wie bereits oben beschrieben enthält Tryptophan einen aromatischen Indol-Ring, welcher eine Lipophilie bewirkt. Auch Isoleucin zählt zu den lipophilen Aminosäuren, beinhaltet allerdings keine aromatische Seitenkette (7,35).

Diese Variante betrifft keine regulatorische Region der PLC γ 2 (Ensembl). Die hier beschriebene genetische Variante wurde in den Datenbanken Ensembl und NCBI zum gegebenen Zeitpunkt noch nicht aufgeführt.

4.5 Zusammenfassung

Zusammenfassend konnten bei der PCR-SSCP-Analyse von *PLC γ 2* sowohl in dem regulatorischen Abschnitt (Promotorregion), als auch im exonischen Bereich eine Vielzahl genetischer Varianten detektiert werden.

Im Bereich der exonischen Region konnten vier Aminosäueraustausche detektiert werden. Die Varianten A80480282T (rs45443101) und C80480314T (rs17537869) liegen im Bereich der phosphoinositolspezifischen EF-hand-like-Domäne und könnten so zu einer veränderten Kalziumionenaffinität und damit Proteinfunktion der *PLC γ 2* führen.

Polymorphismen im Bereich einer TFBS im Promotorbereich könnten einen Einfluss auf die Genexpression und damit auf die Bioverfügbarkeit des *PLC γ 2*-Genproduktes haben.

Die hier aufgeführten Ergebnisse können als Grundlage für weitere molekular -und zellbiologische Analysen zur funktionellen Bedeutung genetischer Varianten der *PLC γ 2* dienen. Um die vorliegenden Daten besser interpretieren zu können, sind weiterreichende Untersuchungen nötig, damit die molekularen und zellulären Mechanismen des potentiellen Einflusses dieser genetischen Varianten auf kardiovaskuläre Phänotypen aufgeklärt werden.

5.0 Ausblick

In der vorliegenden Untersuchung haben wir eine Vielzahl genetischer Varianten im Gen der *PLCy2* identifizieren können. Das individuelle Risiko für ACS resultiert aus einem bislang unzureichend aufgeklärtem Zusammenwirken bekannter Risikofaktoren sowie Umweltfaktoren und genetischer Prädisposition (27) (Abb. 66). Der hohe Stellenwert einer positiven Familienanamnese für das ACS verdeutlicht, dass genetische Faktoren, im Rahmen der multifaktoriellen Ätiologie und der komplexen Pathogenese, eine wesentliche Rolle spielen könnten.

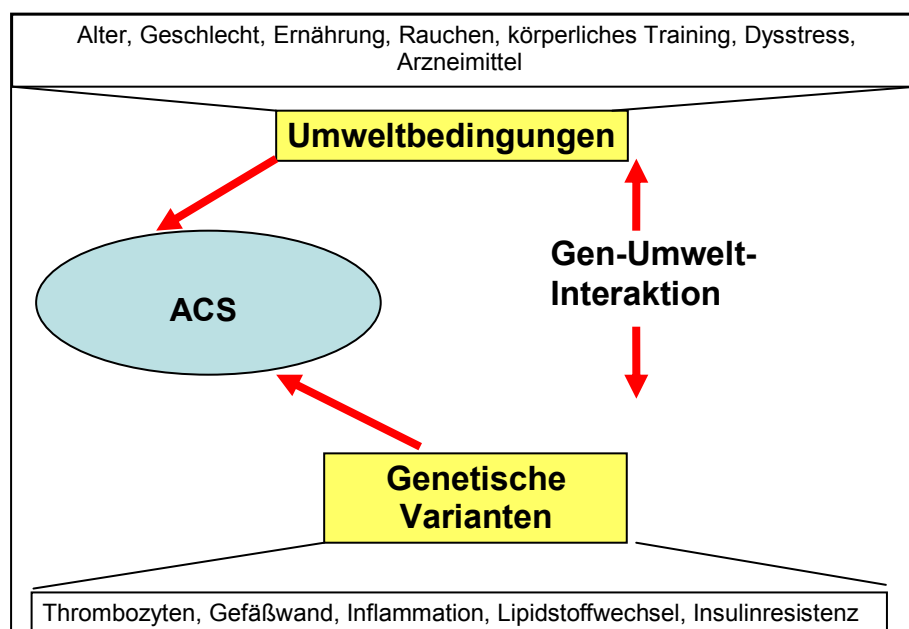


Abb. 66: Umweltfaktoren und genetische Disposition für das ACS, verändert nach Hellstern (27).

Trotz einer steigenden Zahl von analysierten Kandidatengenomen konnte aufgrund der Vielschichtigkeit und Komplexibilität der Pathophysiologie eine genaue Aufklärung der Entstehung und der Entwicklung des ACS nicht erfolgen.

In den letzten Jahren wurden zunehmend GWAs durchgeführt, die große Datenmengen von prospektiven und retrospektiven Kohorten nutzten und somit einen weiteren Einblick in die Komplexibilität der Erkrankung bringen konnten, indem sie signifikante Assoziationen von genetischen Varianten mit der Entstehung und Progression des ACS zeigten. Jedoch sind die molekularen Mechanismen der identifizierten Variationen nicht grundlegend verstanden und können daher noch nicht

zur Entwicklung therapeutischer Strategien oder zur Risikostratifizierung für ein Individuum herangezogen werden. Daher ist das Verständnis der Funktionalität der menschlichen Genregulation und der individuellen Genstrukturvariabilität, insbesondere der Promotorregion, nach wie vor Bestandteil weiterer Untersuchungen. Ein weiteres Ziel zukünftiger Untersuchungen ist eine verbesserte Effizienz pharmakotherapeutischer Interventionen, die durch genetische Faktoren wesentlich mitbestimmt werden und daher eine individuell optimierte Therapie erfordern (51). Ziel der so genannten Pharmakogenomik ist es, die genetischen Unterschiede zu erforschen, die der individuell unterschiedlichen Ansprechbarkeit auf Therapeutika zugrunde liegen. Langfristig soll dadurch die Arzneimitteltherapie verbessert und individuell optimiert werden. Für die Pharmakogenomik sind vor allem solche genetischen Varianten von großer Bedeutung, die einen potenziellen Einfluss auf die Struktur, Funktion und Regulation von Proteinen haben (41). Bis zur tatsächlichen flächendeckenden Durchführung solcher individualisierten Therapien bedarf es allerdings noch der Entwicklung von effektiver und effizienter Hochdurchsatz-Technologien sowie entsprechender bioinformatischer Modelle, basierend auf gut charakterisierten Patientenkohorten, mit hoher Sensitivität und Spezifität. Es ergibt sich zusätzlich die Notwendigkeit der Validierung von Ergebnissen durch funktionelle Analysen und die Frage der Umsetzbarkeit durch pharmazeutisch-industrielle Programme.

Da wir gerade erst begonnen haben die variable Struktur des Genoms und die Veränderungen der epigenetischen Prozesse während der individuellen Lebensspanne zu verstehen, scheint die vollständige Aufklärung dieser Prozesse mit den gegenwärtig verfügbaren Ressourcen unerreichbar. Es ist jedoch zu erwarten, dass in naher Zukunft weitere Gene und genetische Varianten für die Prädisposition des ACS beschrieben werden, die zur Aufklärung der Genese und des persönlichen, genetisch determinierten Risikos beitragen könnten.

Die Identifikation von genetischen Varianten in Genen, wie hier in dieser Arbeit anhand der *PLCY2* präsentiert, sollen als Grundlage für weitere molekular- und zellbiologische Analysen zur Aufklärung der Entstehung des ACS dienen. Zukünftiges Ziel sollte es sein, die Auswirkung der Varianten in der zellspezifischen Genregulation hinsichtlich pathophysiologischer Prozesse genauer zu betrachten.

6.0 Literaturverzeichnis

1. Abe K, Fuchs H, Boersma A, Hans W, Yu P, Kalaydjiev S, Klaften M, Adler T, Calzada-Wack J, Mossbrugger I, Arthkolb B, Rozman J, Prehn C, Maraslioglu M, Kametani Y, Shimada S, Adamski J, Busch DH, Esposito I, Klingenspor M, Wolf E, Wurst W, Gailus-Durner V, Katan M, Marschall S, Soewarto D, Wagner S, de Angelis MH. (2011) A novel N-ethyl-N-nitrosourea-induced mutation in phospholipase C γ 2 causes inflammatory arthritis, metabolic defect, and male infertility in vitro in a murine model. *Arthritis and Rheumatism*; 63(5):1301-11.
2. Agarwal AK, Giacchetti G, Lavery G, Nikkila H, Palermo M, Ricketts M, McTernan C, Bianchi G, Manunta P, Strazullo P, Mantero F, White PC, Stewart PM. (2000) CA-Repeat polymorphism in intron 1 of HSD11B2: effects on gene expression and salt sensitivity. *Hypertension*; 36(2):187-94.
3. Aikawa M, Libby P. (2001) Vascular inflammation and activation: new targets for lipid lowering. *European Heart Journal supplements*; 3:B3-B11.
4. Angel P, Karin M. (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1072(2-3):129-57.
5. Bassam BJ, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM. (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytic Biochemistry*; 196(1):80-3.
6. Baum AE, Akula N, Cabanero M, Cardona I, Corona W, Klemens B, Schulze TG, Cichon S, Rietschel M, Nöthen MM, Georgi A, Schumacher J, Schwarz M, Abou Jamra R, Höfels S, Propping P, Satagopan J, Detera-Wadleigh SD, Hardy J, McMahon FJ. (2008) A genome-wide association study implicates diacylglycerol kinase eta (DGKH) and several other genes in the etiology of bipolar disorder. *Molecular Psychiatry*; 13(2):197-207.
7. Beyer H, Walter W. (2004) Lehrbuch der organischen Chemie, S. Hirzel Verlag Stuttgart, Leipzig, 24. Auflage.
8. Biesalki HK, Fürst P, Kasper H, Kluthe R, Pöler W, Puchstein C, Stähelin HB. (2004) Ernährungsmedizin, Thieme-Verlag Stuttgart, 3. Auflage.
9. Böcker W, Denk H, Heitz PU. (2000) Pathologie, Urban & Fischer Verlag, München, Jena, 2. Auflage.
10. Brand-Herrmann SM. (2008) Where do we go for atherothrombotic disease genetics? *Stroke*; 39(4):1070-5.

11. Buselmaier W, Tariverdian G. (2004) Humangenetik, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 4. Auflage.
12. Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D, Luc G, Bard JM, Bara L, Ricard S, Tiret L, Amouyel P, Alhenc-Gelas F, Soubrier F. (1992) Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature*; 359(6396):641-4.
13. Cambien F, Poirier O, Nicaud V, Herrmann SM, Mallet C, Ricard S, Behague I, Hallet V, Blanc H, Loukaci V, Thillet J, Evans A, Ruidavets JB, Arveiler D, Luc G, Tiret L. (1999) Sequence diversity in 36 candidate genes for cardiovascular disorder. *American Journal of Human Genetics*; 65(1):183-91.
14. Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K, Patil N, Shaw N, Lane CR, Lim EP, Kalyanaraman N, Nemesh J, Ziaugra L, Friedland L, Rolfe A, Warrington J, Lipshutz R, Daley GQ, Lander ES. (1999) Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nature Genetics*; 22(3):231-8.
15. Dai Y, Tang Y, He F, Zhang Y, Cheng A, Gan R, Wu Y. (2012) Screening and functional analyses of different expressed genes in EBV-transformed lymphoblasts. *Virology Journal*; 9:77.
16. Dastani Z, Pajukanta P, Marcil M, Rudzicz N, Ruel I, Bailey SD, Lee JC, Lemire M, Faith J, Platko J, Rioux J, Hudson TJ, Gaudet D, Engert JC, Genest J. (2010) Fine mapping and association studies of a high-density lipoprotein cholesterol linkage region on chromosome 16 in French-Canadian subjects. *European Journal of Human Genetics*; 18(3):342-7.
17. Deetjen P, Speckmann EJ. (1999) Physiologie, Urban & Fischer Verlag, 3. Auflage.
18. Doris PA. (2002) Hypertension genetics, single nucleotide polymorphisms, and the common disease: common variant hypothesis. *Hypertension*; 39(2):323-31.
19. Fox KAA, Birkhead J, Wilcox R, Knight C, Barth J. (2004) British Cardiac Society Working Group on the definition of myocardial infarction. *Heart*; 90(6): 603-9.
20. Fox SC, Sasae R, Janson S, May JA, Heptinstall S. (2004) Quantitation of platelet aggregation and microaggregate formation in whole blood by flow cytometry. *Platelet*; 15(2):85-93.

21. Fuster V, Stein B, Mabrose JA, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. (1990) Atherosclerotic plaque rupture and thrombosis. Evolving concepts. *Circulation*; 82:1147-59.
22. Gasser RB, Hu M, Chilton NB, Campell BE, Jex AJ, Otranto D, Cafarchia C, Beveridge I, Zhu X (2006) Single-strand polymorphism (SSCP) for the analysis of genetic variation. *Nature Protocols*; 1(6):3121-8.
23. Gross E, Arnold N, Goette J, Schwarz-Boeger U, Kiechle M. (1999) A comparison of BRCA1 mutation analysis by direct sequencing, SSCP and DHPLC. *Human Genetics*; 105(1-2):72-8.
24. Hardy J, Singleton A. (2009) Genomewide Association Studies and Human Disease. *The New England Journal of Medicine*; 360 (17):1759-68.
25. Hayashi K. (1991) PCR-SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in genomic DNA. *PCR Methods Application*; 1(1):34-8.
26. Hayashi K, Yandell DW. (1993) How sensitive is PCR-SSCP ? *Human Mutation*; 2(5):338-46.
27. Hellstern P, Bach J, Heubelt H, Preiss A, Winkelmann BR, Senges J. (2001) Genpolymorphismen der Hämostase und Koronarrisiko. *Medizinische Klinik*; 96 (4):217-27.
28. Herold G und Mitarbeiter. Innere Medizin, Gerd Herold Verlag, Auflage 2011.
29. Inoue O, Suzuki-Inoue K, Dean WL, Frampton J, Watson SP. (2003) Integrin $\alpha_2\beta_1$ mediates outside-in regulation of platelet spreading on collagen through activation of Src kinases and PLC γ_2 . *The Journal of Cell Biology*; 160(5):769-80.
30. Kang JS, Kohlhuber F, Hug H, Marmé D, Eick D, Ueffing M. (1996) Cloning and functional analysis of the hematopoietic cell-specific phospholipase $c\gamma_2$ promotor. *FEBS Letters*; 399(1-2):14-20.
31. Karin M, Ben-Neriah Y. (2000) Phosphorylation Meets Ubiquitination: The Control of NF- κ B Activity. *Annual Reviews Immunology*; 18:621-63.
32. Kee F, Morrison C, Evans AE, McCrum E, McMaster D, Dallongeville J, Nicaud V, Poirier O, Cambien F. (2000) Polymorphisms of the P-selectin gene and risk of myocardial infarktion in men and woman in the ECTIM extension study. *Heart*; 84(5):548-52.

33. Knippers R. (2006) Molekulare Genetik, Thieme Verlag Stuttgart, 9. Auflage.
34. Libby P, Ridker P, Maseri A. (2002) Inflammation and Artherosclerosis. *Circulation*; 105:1135-43.
35. Löffler G, Petrides PE. (1997) Biochemie und Pathobiochemie, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 5. Auflage.
36. Lusis AJ. (2000) Atherosclerosis. *Nature*; 407(6801):233-41.
37. Mangin P, Nonne C, Eckly A, Ohlmann P, Freund M, Nieswandt B, Cazenave JP, Gachet C, Lanza F. (2003) A PLC gamma 2-independent platelet collagen aggregation requiring functional association of GPVI an intergin alpha2beta1. *FEBS Letters*; 542(1-3):53-9.
38. Mangin P, Yuan Y, Goncalves I, Eckly A, freund M, Cazenave JP, Gachet C, Jackson SP, Lanza F. (2003) Signaling role for phospholipase C gamma 2 in platelet glycoprotein Ib alpha calcium flux and cytoskeletal reorganization. Involvement of a pathway distinct from FcR gammachain an Fc gamma RIIA. *Journal of Biological Chemistry*; 278(35):32880-91.
39. Mao D, Epple H, Uthgenannt B, Novack DV, Faccio R. (2006) PLC γ 2 regulates osteoclastogenesis via its interaction with ITAM proteins and GAB2. *The Journal of Clinical Investigation*; 116(11):2869-79.
40. Mazumber B, Seshadri V, Fox P. (2003) Translational control by the 3'UTR: the ends specify the means. *Trends in biochemical sciences*; 28(2):91-8.
41. McCarthy JJ, Hilfiker R. (2000) The use of single-nucleotide polymorphism maps in pharmacogenomic. *Nature Biotechnology*; 18(5):505-8.
42. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*; 51(1):263-73.
43. Nieswandt B, Watson SP. (2003) Platelet-collagen interaction: Is GPVI the central receptor? *Blood*; 102(2):449-61.
44. Nonne C, Lenain N, Hechler B, Mangin P, Cazenave JP, Gachet C, Lanza F. (2005) Importance of Platelet Phospholipase C γ 2 Signaling in Arterial Thrombosis as a Function of Lesion Severity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*; 25:1293-98.

45. Ollila HM, Soronen P, Silander K, Palo OM, Kieseppä T, Kaunisto MA, Lönnqvist J, Peltonen L, Partonen T, Paunio T. (2009) Findings from bipolar disorder genom-wide association studies replicate in a Finnish bipolar family-cohort. *Molecular Psychiatry*; 14(4):351-3.
46. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 86(8):2766-70.
47. Parra HJ, Arveiler D, Evans AE, Cambou JP, Amouyel P, Bingham A, McMaster D, Schaffer P, Douste-Blazy P, Luc G et al (1992) A case-control study of lipoprotein particles in two populations at contrasting risk for coronary heart disease. The ECTIM Study. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*; 12(6):701-7.
48. Prugger C, Wellmann J, Heidrich J, Brand-Herrmann SM, Keil U. (2008) Cardiovascular risk factors and mortality in patients with coronary heart disease. *European Journal of Epidemiology*; 23(11):731-7.
49. Rathore V, Wang D, Newman DK, Newman PJ. (2004) Phospholipase Cgamma2 contributes to stable thrombus formation on VWF. *FEBS Letters*; 573(1-3):26-30.
50. Rhee SG, Bae YS. (1997) Regulation of Phosphoinositide-specific Phospholipase C Isozymes. *The Journal of Biological Chemistry*; 272(24): 15045-8.
51. Sadée W, Dai Z. (2005) Pharmacogenetics/genomics and personalized medicine. *Human Molecular Genetics*; 14:R207-14.
52. Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocombe PM, Smith M (1977) Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature*; 265(5596):687-95.
53. Schunkert H, König IR, Kathiresan S, Reilly MP, Assimes TL, Holm H, Preuss M, Stewart AFR, Barbalic M, Gieger C, Absher D, Aherrahrou Z, Allayee H, Altshuler D, Anand SS, Andersen K, Anderson JL, Ardissino D, Ball SG, Balmforth AJ, Barnes TA, Becker DM, Becker LC, Berger K, Bis JC. (2011) Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease. *Nature Genetics*; 43(4):333-8.
54. Sen R., Baltimore D. (1986) Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. *Cell*; 47(6):921-8.

55. Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N. (1998) Integrin Signaling: The Platelet Paradigm. *Blood*; 91(8):2645-57.
56. Shaulian E, Karin M. (2002) AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nature Cell Biology*; 4(5):E131-6.
57. Statistisches Bundesamt Deutschland, Wiesbaden 2012, Fachserie 12 Reihe 4
58. Tired L, Poirier O, Nicaud V, Barbaux S, Herrmann SM, Perrat C, Raoux S, Francomme C, Lebard G, Trégouët D, Cambien F. (2002) Heterogeneity of linkage disequilibrium in human genes has implications for association studies of common diseases. *Human Molecular Genetics*; 11(4):419-29.
59. Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Amouyel P, Arveiler D, Rajakangas A, Pajak A. (1994) Myocardial Infarction and Coronary Death in the World Health Organisation MONICA Projekt. *Circulation*; 90(1):583-612.
60. Wallace RB, Schaffer J, Murphy RF, Bonner J, Hirose T, Itakura K. (1979) Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acids Research*; 6(11):3543-57.
61. Wang D, Boylin EC, Minegishi Y, Wen R, Smith CIE, Ihle JN, Conley ME. (2001) Variations in the human phospholipase C γ 2 gene in patients with B-cell defects of unknown etiology. *Immunogenetics*; 53:550-56.
62. Wang D, Feng J, Wen R, Marine JC, Sangster MY, Parganas E, Hoffmeyer A, Jackson CW, Cleveland JL, Murray PJ, Ihle JN. (2000) Phospholipase C γ 2 is essential in the function of B cell and several Fc receptors. *Immunity*; 13(1):25-35.
63. Wick G, Grundtmann C (2012). Inflammation and Artherosclerosis, Springer Verlag, Wien, New York, 1. Auflage.

Elektronische Datenquellen :

ALGGEN – PROMO (release 3.0.2)

http://alggen.1si.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3

(letzter Zugriff 17.10.2012)

AliBaba (release 2.1)

<http://www.gene-regulation.com/cgi-bin/pub/programms/alibaba2/webbaba2.cgi>

(letzter Zugriff 15.10.2012)

Ensembl Genome Browser

<http://ensembl.org/>

(letzter Zugriff 12.01.2013)

Eurofins MWG Operon

<http://www.operon.com>

(letzter Zugriff 14.02.2007)

European Molecular Biology Laboratory/European Bioinformatics Institute
(EMBL-EBI)<http://www.ebi.ac.uk/>

(letzter Zugriff 21.11.2012)

National Center for Biotechnology Information (NCBI)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

(letzter Zugriff 12.01.2013)

TRANSFAC (release 8.3)

<http://www.gene-regulation.com/cgi-bin/pub/database/transfac/search.cgi>

(letzter Zugriff 17.10.2012)

7.0 Verzeichnis der Tabellen, Abbildungen, Formeln und Schemata

<u>Tabellen</u>		Seite(n)
Tabelle 1	Die zehn häufigsten Todesursachen 2010	10
Tabelle 2	PCR-Mix zur Bedingungsoptimierung	30
Tabelle 3	Ansatz zur Sequenzierung	34
Tabelle 4	Übersichtstabelle der <i>PLCy2</i> -Varianten	55-58
Tabelle 5	Ergebnisse der PROMO 3.0.2-Analyse des <i>PLCy2</i> -Promotorbereiches	68
Tabelle 6	<i>PLCy2</i> -Primerpaare und PCR-Bedingungen	I-II
 <u>Abbildungen</u>		
Abbildung 1	Entstehung einer atherosklerotischen Plaque	11
Abbildung 2	Integrine und Signaltransduktion	16
Abbildung 3	<i>PLCy2</i> -Genlocus	20
Abbildung 4	<i>PLCy2</i> -Domänenstruktur	21
Abbildung 5	<i>PLCy2</i> und Thrombusformation	23
Abbildung 6	Standard-PCR-Programm	29
Abbildung 7	PCR und Agarosegelelektrophorese	31
Abbildung 8	SSCP-Gel nach Silbernitratfärbung	33
Abbildung 9	Lokalisierung eines Polymorphismus mittels Sequenzierung	34
Abbildung 10	Exemplarische Darstellung der Sequenzierungsergebnisse zweier Polymorphismen im Exon 13 des <i>PLCy2</i> -Gens	36
Abbildung 11-65	Sequenzanalysen	37-47
Kapitel 3.4	<i>PLCy2</i> -Genkarte	59-66

Abbildung 66	Umweltfaktoren und genetische Disposition für das ACS	87
--------------	--	----

Formeln

Formel 1:	Formel zur Ermittlung der optimalen Schmelztemperatur	30
-----------	--	----

Schemata

Schema 1	Aminosäuren und deren Abkürzungen	III
Schema 2	Tripletts und korrespondierende Aminosäuren	IV

8.0 Lebenslauf

9.0 Danksagung

In erster Linie bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Brand für die Überlassung des Themas. Weiterer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Dr. Brand, Herrn Dr. Schmidt-Petersen, Herrn Dr. Telgmann, sowie Herrn Dr. Schmitz für die Betreuung während des experimentellen und des schriftlichen Teils.

Meinen Eltern danke ich, da sie mir eine unvergesslich schöne Studienzeit in Münster ermöglicht haben.

Besonderer Dank gilt meiner Frau.

10.0 Anhang

10.1 Tabelle 6: *PLCy2*-Primerpaare und PCR-Bedingungen.

Nr.	Name des Fragmentes	Primerpaar 1. upper primer sequenz 2. lower primer sequenz	Bereich	Basen- paare	Mix	Annealing- Temperatur
1.	<i>PLCy2-1</i>	GTGAGGCAAAGGAATTGCC CATGAGGTCTCACTATGTGT	Promotor	749	a	55°C
2.	<i>PLCy2-2</i>	GTTTGCCGTATACTTACAC CTATAACAGACCAGTGGCAC	Promotor	895	a	64°C
3.	<i>PLCy2-3</i>	CGGAGTGTCTCTCGGCCACAC CGGCTGAGCCAGGACGCAG	Promotor	654	c	67°C
4.	<i>PLCy2-9</i>	GCCGAAGCAGAAGTAGCGAG CGGCTGAGCCAGGACGCAG	Exon 1	250	c	64°C
5.	<i>PLCy2-10</i>	ACATGAGACAGGATTTTGGTTC CATGATCACCTGGACGGTTC	Exon 2	270	a	62°C
6.	<i>PLCy2-11</i>	TCAGCTTCCGCAAGTCCAC TCATCAGAGATCCACACAAAC	Exon 2	260	b	64°C
7.	<i>PLCy2-12</i>	GTGGCTGCATCCTCAGGTG CATTCTGCTATTAGCGAACTTC	Exon 3	285	a	64°C
8.	<i>PLCy2-13</i>	AGGCTTCTCCCATCTTCGTG CATTGCATACAAGACACTCAAC	Exon 4	320	a	62°C
9.	<i>PLCy2-14</i>	CTTTTGTGCACATTCCGTAG CTCCCGACAAGTCATGCTC	Exon 5	230	a	58°C
10.	<i>PLCy2-15</i>	ACTGTTGACCAGGCTCTCTC CCACGGAAC TCAAAGGCAAG	Exon 6	290	a	66°C
11.	<i>PLCy2-16</i>	TATTCTATAAATAGCATGGAG AAATGGAGATTCAACTTTC	Exon 7	265	a	56°C
12.	<i>PLCy2-17</i>	TTAATGATCTTGTTCATCTGAC CCTGCACACACAGGCATCC	Exon 8	250	a	60°C
13.	<i>PLCy2-18</i>	CTGGCATCTCCTCTCGACTC CTCTGGCATCTGGCAGACTG	Exon 9	290	c	66°C
14.	<i>PLCy2-19</i>	TGGTTGATGTTTCAGTCTTCG CATCATAACAGCAAAGTTCTCC	Exon 10	300	a	58°C
15.	<i>PLCy2-20</i>	CAGACCAGAAACAAGCAGAC GCTTCACAACAGGGCTCAC	Exon 11	291	c	60°C
16.	<i>PLCy2-21</i>	TCTACATGGAAGAACTCAGAG CGAAAGAAAACATGGAGCAAC	Exon 12	296	a	64°C
17.	<i>PLCy2-22</i>	GTCTAGTAACTGAACTGGTG GCCTTCCCGCATTTGGAG	Exon 13	331	c	58°C
18.	<i>PLCy2-23</i>	TGGGGCAGATGCAGAGGTG GGACATAGA ACTTGGTGAACG	Exon 14	320	c	56°C
19.	<i>PLCy2-24</i>	CTGGGAAGAGGCAGATGAAG CCAGCAGGGCTCCAAGAAG	Exon 15	262	d	66°C
20.	<i>PLCy2-25</i>	GGGAAAGCACATCCATAG AGTATCAACAGCTTCTTCAG	Exon 16	339	a	58°C

21.	PLC γ 2-26	TCAGGGTGAGACAGAAGGAC	Exon 17	346	c	60°C
		CCTGCCTGAGCTAGAACCAC				
22.	PLC γ 2-27	CAATGGCCTGGCCTGCGTTC	Exon 18	321	a	68°C
		GCCAGCTTCTCTGCCTGGTG				
23.	PLC γ 2-28	TCACTGGTGCCATTATCTTGTC	Exon 19	317	a	64°C
		GCAGGGCACTGCAGGTGAG				
24.	PLC γ 2-29	TTGTTTGGCCACCAGGATC	Exon 20	305	a	58°C
		AATTCATGAACAGATGAGTTAC				
25.	PLC γ 2-30	TCAAAGGATAGGTAACCATAAG	Exon 21	291	b	60°C
		TGGCCAGGTTTTCCAAAGTC				
26.	PLC γ 2-31	GCTCCCCAATGAGAAGAACC	Exon 22	292	a	66°C
		CTTGGCCAGCACCTGAGTC				
27.	PLC γ 2-32	ATCAGAATTGAGCCAGCAG	Exon 23	283	a	58°C
		AAAAATTCACCCACTGAGATG				
28.	PLC γ 2-33	AGGCAGTATCTCTGCTAAACG	Exon 24	276	a	66°C
		CTGGCATTCAAGACAGGACC				
29.	PLC γ 2-34	GGTGCAGTCTGGTCTTTGTG	Exon 25	323	a	62°C
		CTGCTCATCCTGCTGCCTG				
30.	PLC γ 2-35	ATATTAAGATCCGAGTGTG	Exon 26	295	a	58°C
		TGAAAATATCAGACTCTAAAG				
31.	PLC γ 2-36	CATTAAGAAAATGCACAGATGAG	Exon 27	306	a	60°C
		CTTGCAGGGACGGGACTAC				
32.	PLC γ 2-37	TCCCCACCTAGAAACTCCTG	Exon 28	312	a	66°C
		ATGGGTTCCCTGCTCTCAAG				
33.	PLC γ 2-38	CCAGCTGCAATCCACGCTAG	Exon 29	298	b	68°C
		AAACCCTGGGACAACCTAAAGAG				
34.	PLC γ 2-39	ACAGCTGAAGGATGCGGAG	Exon 30	318	a	64°C
		TGAAGCCAGCAGCCAAACC				
35.	PLC γ 2-40	ACTGACTTCTCTACCCTTTG	Exon 31	273	a	62°C
		TCACGGGCCGTTTCTACC				
36.	PLC γ 2-41	GCTTGTGAGATGCCAGGTTT	Exon 32	323	a	66°C
		CATCATCACCGTGCCTAGAG				
37.	PLC γ 2-42	CCATCCAGCTATGAATGAC	Exon 33	285	a	60°C
		TCCTTGATGGCAGGCTTG				
38.	PLC γ 2-43	TGGGAAGACGCTAATCTGTG	Exon 33	293	b	62°C

10.2 Schema 1: Aminosäuren und deren Abkürzungen.

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartat	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutamat	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

10.3 Schema : Triplets und korrespondierende Aminosäuren.

	U		C		A		G	
U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys
	UUC		UCC		UAC		UGC	
	UUA	Leu	UCA		UAA	STOP	UGA	STOP
	UUG		UCG		UAG		UGG	Trp
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg
	CUC		CCC		CAC		CGC	
	CUA		CCA		CAA	Gln	CGA	
	CUG		CCG		CAG		CGG	
A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser
	AUC		ACC		AAC		AGC	
	AUA		ACA		AAA	Lys	AGA	
	AUG	Met	ACG		AAG		AGG	Arg
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly
	GUC		GCC		GAC		GGC	
	GUA		GCA		GAA	Glu	GGA	
	GUG		GCG		GAG		GGG	

10.4 Ergebnis der AliBaba 2.1 *in silico* Analyse

Sequence seq_243

```

=====
=====
seq( 0.. 59)
Beginn mit - 2000 bp vor dem (TLS)
ataataaattatacatatatatgactgaactaatatattatgtactttatataacacata
Segments:
4.5.1.0      12   21      =====TBP=====
3.1.2.2      13   22      =====Oct-1=====
1.1.3.0      35   44      =C/EBPalp=
4.5.1.0      45   54
=====TBP=====
3.3.2.0      59   68
=
=
=====
=====
seq( 60.. 119)
ctaaacaaaagtgtgaaaaagattggttgaataaatacaagctgaagttctaaaaaaaa
Segments:
3.3.2.0      59   68      ==HNF-3==
9.9.150      82   91      =====CP1=====
1.1.3.0      90   99      =C/EBPalp=
4.3.1.1      112  121
===MEB-1
2.3.2.2      114  123
=====H
=====
=====
seq( 120.. 179)
aaaaaaaaaaaaaagtggaggcaaggaattgccctagatgtagtcatttttctgggga
Segments:
4.3.1.1      112  121      ==
2.3.2.2      114  123      b=====
3.3.2.0      125  134      =====HNF-3B=
9.9.590      144  153      =NF-kappaB
1.1.1.5      161  170      =====GCN4=====
3.1.1.2      161  170      =====Zen-1=====
1.1.3.0      162  171
=C/EBPalp=
4.1.1.0      166  175      =NF-
kappa=
9.9.590      173  182
=Nf-kap
1.2.8.0      174  183
===Olf
=====
=====
seq( 180.. 239)
attggcccaatgacttcaagtgttgatgtcataatgagtcctccaagatctctttaa
Segments:
9.9.590      173  182      paB
1.2.8.0      174  183      -1==
1.1.3.0      206  215      =C/EBPalp=

```

```

1.1.1.1      211  220
9.9.539     219  228
1.1.3.0     237  246
=C/
=====
=====
seq( 240.. 299)
aaattgatgtgtaagtgatctgtggtgatgagcacagctatacacgccagttgggagt      C►G
Segments:
1.1.3.0      237  246      EBPalp=
9.9.51       240  249      ====ATF====
2.3.1.0     294  303
====Sp
1.1.3.0     298  307
=C
=====
=====
seq( 300.. 359)
ctgaaagaaatgaatccacagatcttgtgaagt|caciaacgagtcctatggcttgggata      Ins. G
Segments:
2.3.1.0     294  303      1====
1.1.3.0     298  307      /EBPalp=
1.1.1.6     326  335      ==CRE-BP1=
9.9.539     342  351      ====NF-
1==
=====
=====
seq( 360.. 419)
caacattgacagtgagagtgatattcctcaattaaacgctataacaggccgggtgca      C►T
Segments:
2.2.1.1     373  382      ====GATA-1=
3.1.1.2     387  396      ====Ftz====
3.1.2.2     387  396      ==Oct-2.1=
2.3.1.0     406  415
====Sp1====
1.6.1.0     409  418
=AP-2alph=
=====
=====
seq( 420.. 479)
gtggctcatgctgtaatcccagcactttgggaggccaaggtgggtgatcacttgaggt      G►C
Segments:
9.9.539     428  437      ====NF-1==
1.1.3.0     434  443      =C/EBPalp=
2.3.1.0     448  457      ====Sp1====
2.3.1.0     461  470      ====Sp1====
3.5.3.0     465  474
====IRF-1====
9.9.29      469  478
====AP-1====
2.3.3.0     473  482
=CPE bi
1.1.1.6     474  483
=ATF-3
2.1.2.2     474  483
==RXR-

```

```

9.9.721      475  484
==RAR
=====
seq( 480.. 539)
caggagtgttgagaccaatctggccaacatagtgaaccgcgtctctagtaaaaatacaaa      G▷C
Segments:
2.3.3.0      473  482      nd=
1.1.1.6      474  483      del=
2.1.2.2      474  483      beta
9.9.721      475  484      -beta
9.9.539      498  507      =====NF-1==
3.3.2.0      531  540
===HNF-3=
1.1.3.0      535  544
=C/EB
2.3.2.2      536  545
=====
=====
seq( 540.. 599)
aaattagccaagcatgatggcatacacctataatcccagctactcaggaggctgaggcag      C▷T, G▷T
Segments:
3.3.2.0      531  540      =
1.1.3.0      535  544      Pgam=
2.3.2.2      536  545      =Hb===
3.1.2.2      540  549      ===Oct-1==
9.9.150      541  550      =====CP1===
1.1.3.0      543  552      =C/EBPalp=
9.9.539      545  554      =====NF-1==
1.1.3.0      570  579      =C/EBPalp=
1.1.3.0      587  596
=C/EBPalp=
1.6.1.0      587  596      =AP-
2alph=
2.3.1.0      587  596
=====Sp1===
1.2.1.0      594  603
=====E
1.2.2.0      594  603
=====My
=====
=====
seq( 600.. 659)
gagaatcgcttaaacctgggaggtggaggttgacgtgagccgagatcgtgccactgcact      A▷C
Segments:
1.2.1.0      594  603      1===
1.2.2.0      594  603      oD===
2.3.1.0      618  629      =====Sp1=====
2.2.1.1      629  638      ===GATA-1=
1.1.3.0      641  650      =C/EBPalp=
=====
=====
seq( 660.. 719)
ccagcctgggcaagagagcaagactttgtctcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
Segments:
2.3.2.2      698  707      =====Hb=====
3.3.2.0      701  710      =====HNF-3=====

```


seq(900.. 959)

tagccaagtgtggtgtgacctctatagctcccagctcttcaggaggcagaagcaggaggatc G>C, C>G

Segments:

<u>3.1.2.2</u>	896	905	<u>ct-1==</u>		
<u>9.9.150</u>	897	906	<u>=CP1===</u>		
<u>9.9.539</u>	901	910	<u>====NF-1==</u>		
<u>2.3.1.0</u>	927	936		<u>====Sp1===</u>	
<u>2.3.1.0</u>	939	948			<u>====Sp1===</u>
<u>1.2.2.0</u>	947	956			
<u>===CeMyoD=</u>					

seq(960.. 1019)

gcttgagtcccggaggttcgaggatgtggtgagctatgatggcaccactgcactccagcct

Segments:

<u>2.3.1.0</u>	980	989		<u>====Sp1===</u>	
<u>1.1.2.0</u>	995	1004			<u>==CREMtau=</u>
<u>2.3.1.0</u>	1002	1011			
<u>====Sp1===</u>					
<u>2.3.1.0</u>	1009	1018			
<u>====Sp1===</u>					
<u>1.3.1.2</u>	1017	1026			
<u>===</u>					

seq(1020.. 1079)

gggtgacagagtgcagaccctgcctcttagaaaa cagaagctataactcaagcaacttgg

C>A

Segments:

<u>1.3.1.2</u>	1017	1026	<u>=USF===</u>		
<u>2.1.2.3</u>	1021	1030	<u>=T3R-alpha</u>		
<u>2.2.2.0</u>	1021	1030	<u>====Ttx===</u>		
<u>2.3.1.0</u>	1036	1045		<u>====Sp1===</u>	
<u>3.5.3.0</u>	1048	1057			<u>===NF-EM5=</u>
<u>9.9.29</u>	1060	1069			<u>====AP-1==</u>
<u>1.1.3.0</u>	1064	1073			
<u>=C/EBPgam=</u>					
<u>3.5.3.0</u>	1077	1086			
<u>===</u>					
<u>3.1.2.2</u>	1078	1087			
<u>==</u>					

seq(1080.. 1139)

agtgaaattcaagtgcctgacagctgtctaggtgccctgaaactgcctctagtcacaac

A>G, A>G

Segments:

<u>3.5.3.0</u>	1077	1086	<u>ICSBP==</u>		
<u>3.1.2.2</u>	1078	1087	<u>=Oct-1==</u>		
<u>1.2.2.0</u>	1100	1109		<u>====MRF4==</u>	
<u>3.5.1.2</u>	1104	1113		<u>====RAP1==</u>	
<u>1.1.1.5</u>	1130	1139			
<u>====CPC1==</u>					

seq(1140.. 1199)

aaagatacctccatcaaagagcataggaagggttgaatcagatagcttcatgcaacaca

C>T, G>C

Segments:
2.2.1.1 1179 1188 ===GATA-1=
3.1.2.2 1186 1195
===Oct-1==

seq(1200.. 1259)
cgaacggaaaaataaatttcttaaagaacatattagcttcttcccatgagatcaggaaaa

Segments:
2.3.2.2 1201 1210 ===LyF-1==
1.1.3.0 1207 1217 =C/EBPalph
4.1.3.0 1209 1218 ==NF-ATc3=
3.1.1.12 1210 1219 ===HNF-1C=
1.1.3.0 1214 1227 ===C/EBPalph=
2.1.1.1 1224 1233 ====GR====
2.1.1.2 1224 1233 ====PR====
3.1.2.2 1229 1240 ====Oct-1====
1.1.1.1 1240 1249 ===c-Jun==
2.1.2.2 1247 1256
==RXR-beta
3.1.1.12 1248 1257
===HNF-1==
2.2.1.1 1250 1259
===GATA-1=
4.1.1.0 1251 1260
=====Dl==

seq(1260.. 1319)
cgggacatcaattgtctgggggttctttgctcctgactcccttggggctggcactatgtt **G▶A**

Segments:
4.1.1.0 1251 1260 =
2.3.3.0 1272 1281 ====MIG1==
4.6.1.0 1278 1287 ====SRY====
9.9.29 1289 1298 ====AP-1==
2.3.1.0 1289 1299 ====Sp1====
2.3.1.0 1302 1311
====Sp1====
9.9.539 1305 1316
====NF-1==

seq(1320.. 1379)
gatcacgttttacagatggggaaactgaggctgtcggtttttaagtggctgcctaaggt **T▶C**

Segments:
3.5.3.0 1340 1349 ===ICSBP==

seq(1380.. 1439)
agcagtaagggttggtctgactccagcgcagcctcaacgagggttcaaattaggccat

Segments:
2.3.1.0 1395 1404 ====Sp1====
9.9.29 1397 1406 ====AP-1==
3.1.2.2 1423 1432 ===Oct-
1=
9.9.539 1433 1442
====NF-

```
=====
seq( 1440.. 1499)
gaattggcaattcctggcgggtaattgtgaagagtataattatatttttaatttttatttat A>G, A>G,
Ins. ATTT
```

Segments:

<u>9.9.539</u>	1433	1442	<u>1==</u>	
<u>1.1.3.0</u>	1440	1449	<u>=C/EBPalp=</u>	
<u>9.9.539</u>	1443	1452	<u>====NF-1==</u>	
<u>9.9.590</u>	1445	1454	<u>=NF-kappaB</u>	
<u>3.1.1.2</u>	1475	1484		<u>====Antp==</u>
<u>4.1.3.0</u>	1475	1484		<u>==NF-ATc3=</u>
<u>1.1.3.0</u>	1476	1485		<u>=C/EBPalp=</u>
<u>4.3.1.1</u>	1479	1488		<u>====MEB-1==</u>
<u>4.3.1.2</u>	1479	1488		<u>====GLO====</u>
<u>4.3.1.1</u>	1485	1494		
<u>====MEB-1==</u>				
<u>3.3.2.0</u>	1490	1499		
<u>====HNF-3B=</u>				
<u>3.1.2.2</u>	1493	1502		
<u>====Oct-</u>				
<u>3.1.2.1</u>	1495	1504		
<u>====Pi</u>				
<u>1.1.3.0</u>	1496	1505		
<u>=C/E</u>				

```
=====
seq( 1500.. 1559)
ttatattttgagacggagtgtctctcggccacacccatcctagctcattgctgtctcgaac Ins. ATTT
```

Segments:

<u>3.1.2.2</u>	1493	1502	<u>1==</u>	
<u>3.1.2.1</u>	1495	1504	<u>t-1a=</u>	
<u>1.1.3.0</u>	1496	1505	<u>BPalp=</u>	
<u>4.3.1.1</u>	1500	1509	<u>====MEB-1==</u>	
<u>2.3.1.0</u>	1507	1516	<u>====Sp1====</u>	
<u>2.3.1.0</u>	1525	1535		<u>====Sp1====</u>

```
=====
seq( 1560.. 1619)
tctcgagctcagacgatcctcccgtctaggcttcccaaagagctgggatgacaggcgtga
```

Segments:

<u>2.3.1.0</u>	1573	1582	<u>====Sp1====</u>	
<u>1.6.1.0</u>	1588	1597		<u>=AP-2alph=</u>
<u>2.3.2.2</u>	1603	1612		
<u>====Odd====</u>				
<u>2.3.1.0</u>	1618	1632		
<u>==</u>				

```
=====
seq( 1620.. 1679)
gccgggcccggccgggagtgtgtaagtatacggcaaacacctggactgcccggc C>T, G>T
```

Segments:

<u>2.3.1.0</u>	1618	1632	<u>====Sp1====</u>	
<u>2.3.1.0</u>	1626	1639	<u>====Sp1====</u>	
<u>2.3.1.0</u>	1633	1642	<u>====Sp1====</u>	
<u>1.6.1.0</u>	1677	1686		
<u>===</u>				

```

=====
=====
seq( 1680.. 1739)
tctccaggaatgccatgatattggggaattccctttgcacctggccaagtggcctcgggc
Segments:
1.6.1.0      1677 1686  =AP-2==
1.1.3.0      1699 1708  =C/EBPalp=
9.9.213      1702 1711  ===EBP-1==
9.9.594      1702 1711  ====RelA==
4.1.1.0      1702 1712  ====c-Rel==
9.9.590      1702 1712  ==NF-kappaB
9.9.588      1703 1712  =NF-kappaB
9.9.592      1703 1712  =NF-kappaB
1.2.2.0      1713 1722  ===Myf-3==
9.9.537      1719 1728  ====NF-1==
9.9.539      1719 1728  ====NF-1==
2.3.1.0      1728 1737
====Sp1====
1.6.1.0      1730 1739
=AP-2alph=
3.5.2.0      1737 1746
=====
=====
seq( 1740.. 1799)
aggtagcctcccctcgggttgccctcagtttcttctttggcacgcagaggcggggctccag
Segments:
3.5.2.0      1737 1746  Erg-1==
9.9.726      1741 1750  =represso=
2.3.1.0      1745 1754  ====Sp1====
1.1.3.0      1756 1765  =C/EBPalp=
3.5.3.0      1760 1769  ===ICSBP==
3.1.2.2      1768 1777  ===Oct-1==
9.9.539      1775 1784  ====NF-1==
2.3.1.0      1784 1795
====Sp1====
2.3.1.0      1799 1809
=
=====
=====
seq( 1800.. 1859)
gcctgggccgctccatggcggggagggcgcggggacgctgcactcggggtgcgctccag  A>G, C>G
Segments:
2.3.1.0      1799 1809  ====Sp1====
1.6.1.0      1800 1809  =AP-2alph=
2.3.1.0      1811 1824  ====Sp1====
2.3.1.0      1817 1829  ====Sp1====
9.9.270      1819 1828  ====ETF====
2.3.2.1      1819 1833  ====Krox-20===
2.3.1.0      1823 1833  ====Sp1====
2.3.1.0      1829 1838  ====Sp1====
2.3.1.0      1835 1844  ====Sp1====
2.3.1.0      1856 1867
=====
=====

```



```

=====
seq( 1860.. 1919)
aggcggacccggctgggcgcgcctggggcgggcgaggcggggcgaggctgggcggtgcg
Segments:
2.3.1.0      1856 1867  =Sp1=====
2.3.1.0      1869 1881  =====Sp1=====
2.3.1.0      1875 1884  =====Sp1=====
1.6.1.0      1880 1889  =AP-2alph=
9.9.561      1882 1891  ==NF-muE1=
2.3.2.1      1883 1892  ==Krox-20=
2.3.1.0      1883 1894  =====Sp1=====
9.9.270      1885 1894  =====ETF=====
2.3.1.0      1892 1904  =====Sp1=====
9.9.270      1897 1906  =====ETF=====
2.3.1.0      1901 1910  =====Sp1=====
2.3.1.0      1909 1918  =====Sp1=====
=====Sp1=====
2.3.1.0      1918 1932
==
=====

```

```

=====
seq( 1920.. 1979)
ggggcgggccccgaggatcacgtggcgcggcgccgcgccgaagcagaagttagcgagcg
Segments:
2.3.1.0      1918 1932  =====Sp1=====
9.9.561      1924 1933  ==NF-muE1=
3.1.2.2      1927 1936  ==Oct-1==
1.3.1.2      1938 1947  =====USF=====
1.1.5.2      1939 1948  ==EmBP-1=
2.3.1.0      1942 1955  =====Sp1=====
9.9.561      1949 1958  ==NF-muE1=
2.3.1.0      1950 1960  =====Sp1=====
2.3.1.0      1977 1989
===
1.6.1.0      1978 1987
=A
9.9.726      1978 1987
=r
=====

```

```

=====
seq( 1980.. 2039)
ccggcgggcgaggcgtgagcgcgctgagtgacccgagtcgggacgcgggctgcgcgcg
Segments:
2.3.1.0      1977 1989  ===Sp1=====
1.6.1.0      1978 1987  P-2alph=
9.9.726      1978 1987  espresso=
2.3.1.0      1984 1995  =====Sp1=====
2.3.1.0      1996 2005  =====Sp1=====
1.1.1.1      2003 2012  ==c-Jun==
1.1.1.2      2003 2012  ==Fra-1==
9.9.29       2003 2012  ==AP-1==
2.1.1.4      2005 2014  =====ER=====
2.1.2.3      2008 2017  =T3R- alph=
2.3.1.0      2020 2033
=====Sp1=====
2.3.1.0      2035 2046
=====
=====

```

```

=====
seq( 2040.. 2099)
cgggaccccgagcccaaacccggggcaggcgggcagctgtgcccgggcggcacggccag
Segments:
2.3.1.0      2035 2046  Sp1=====
1.6.1.0      2044 2053  =====AP-2==
2.3.1.0      2045 2054  =====Sp1====
2.3.3.0      2056 2065  =====MIG1==
3.5.1.2      2058 2067  =====REB1==
2.3.1.0      2058 2071  =====Sp1=====
3.1.2.2      2060 2069  ====Oct-1==
2.3.1.0      2064 2074  =====Sp1====
2.3.1.0      2079 2092  =====Sp1=====
2.3.1.0      2086 2095  =====Sp1====
2.3.1.0      2093 2102  =====YY1
3.5.2.0      2097 2106  =====YY1=====
=c-
=====
=====
seq( 2100.. 2159)      cttcctgatttctcccgattccttccttctccctggagcggccgacaatg
Segments:
2.3.1.0      2093 2102  ===
3.5.2.0      2097 2106  Ets-1 =
2.3.1.0      2133 2142  =====YY1=====

```

XXX TFBS für die Transkriptionsfaktoren der AP-1- und NF-kappa-Familien