

Untersuchungen zur androgenetischen Alopezie:

Feinkartierung des Suszeptibilitätslokus auf Chromosom 2q37

und

Expressionsanalyse des Kandidatengens *HDAC4*

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Tilmann Kleppi
aus Bergisch Gladbach

2012

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Markus M. Nöthen
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Thomas Tüting

Tag der Mündlichen Prüfung: 06. Juni 2012

Aus dem Institut für Humangenetik der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. Markus M. Nöthen

Meinen Großvätern

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1 EINLEITUNG	10
2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN	12
2.1 Die Entwicklung des menschlichen Haares	12
2.2 Die androgenetische Alopezie (AGA)	13
2.2.1 Klinik und Klassifikation	14
2.2.2 Pathophysiologie der AGA	15
2.2.3 Therapie der AGA	18
2.2.4 Assoziation der AGA mit anderen Erkrankungen.....	20
2.2.5 Formal- und Molekulargenetik der AGA.....	21
2.2.6 Das <i>HDAC4</i> -Gen, ein interessantes Kandidatengen für die AGA	26
2.3 Zielsetzung der Arbeit	29
3 MATERIAL UND METHODEN.....	30
3.1 Geräte.....	30
3.2 Verwendete Chemikalien, Lösungen.....	31
3.3 Ergänzende Materialien zur Analyse von Nukleinsäuren	32
3.4 Spezifische Plastik- und Einwegmaterialien	32
3.5 Kommerzielle Systeme (Kits) und Materialien	32
3.6 Software und Datenbanken	33
3.7 Probandenmaterial.....	34
3.8 Gewinnung von Nukleinsäuren	35
3.8.1 Isolierung von DNA	35
3.8.2 Isolierung von RNA	36

3.8.3 Die Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	40
3.9 Analyse von Nukleinsäuren	41
3.9.1 Qualitäts- und Quantitätsbestimmung von RNA und DNA	41
3.9.2 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	42
3.9.3 Aufarbeitung genetischer Suszeptibilitätsloki	43
3.9.4 Genotypisierung ausgewählter SNPs mittels Sequenom-Technologie	44
3.9.5 Genotypisierung ausgewählter SNPs mittels quantitativer Real-Time PCR	50
3.9.6 Genexpressionsanalyse mittels quantitativer Real-Time PCR	52
3.10 Statistische Analysen	55
4 ERGEBNISSE	58
4.1 Feinkartierung des Suszeptibilitätslokus auf Chr. 2q37	58
4.2 Gewebespezifische Expressionsanalyse des Kandidatengens <i>HDAC4</i>	62
4.3 Allelspezifische Expressionsanalyse des Kandidatengens <i>HDAC4</i>	64
5 DISKUSSION	69
6 ZUSAMMENFASSUNG	76
7 ANHANG	77
8 LITERATURVERZEICHNIS	82
DANKSAGUNG	99
LEBENS LAUF	100

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
ABI	Applied Biosystems
AGA	Androgenetische Alopezie
ANA	Kollektiv der androgenetischen Alopezie
AR	Androgenrezeptor
ATT	Cochran-Armitage-Trend-Test
bp	Basenpaare
C	Celsius
C	Cytosin
CAG	Aminosäure Glutamin
cDNA	<i>copy desoxyribonucleic acid</i> (copy-Desoxyribonukleinsäure)
Chr	Chromosom
CI	<i>confidence interval</i> (Konfidenzintervall)
cm ²	Quadratzentimeter
CNV	<i>copy number variation</i> (Kopienzahl-Variante)
Ct	<i>cycle threshold</i> (Zyklus-Schwellenwert)
Cyc	Cyclophilin
Da	Dalton
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
dest.	destilliert
DHT	Dihydrotestosteron
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDA2R	Ectodysplasin-A2-Rezeptor
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat (Ethylendiamintetraessigsäure)
eQTL	<i>expression quantitative trait locus</i> (Lokus eines quantitativen Merkmals)
EST	<i>expressed sequence tag</i> (exprimierte Sequenz ohne bekannte Genfunktion)

EtOH	Ethanol
F	<i>forward</i> (vorwärts)
FOXA2	Forkhead Box A2
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
G	Guanin
GGN	Aminosäure Glycin
GWAS	<i>genome-wide association study</i> (Genomweite Assoziationsstudie)
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HAT	Histon-Acetyltransferase
HDAC	Histon-Deacetylase
HDAC4	Histon-Deacetylase 4
HDAC9	Histon-Deacetylase 9
HSK	Haarspenderkontrollen
HWE	<i>Hardy-Weinberg-Equilibrium</i> (Hardy-Weinberg-Gleichgewicht)
kb	Kilobasenpaare
LD	<i>linkage disequilibrium</i> (Kopplungsungleichgewicht)
LOD	<i>logarithmic odds ratio</i>
M	Molar
MAF	<i>minor allele frequency</i> (Frequenz des selteneren Allels)
MALDI-ToF	<i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight</i>
Mb	Megabasenpaare
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> (Boten-Ribonukleinsäure)
MS	Massenspektrometrie

n	Individuenzahl
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
NT	Nicht transmittiert
OD	Optische Dichte
oligo(dT)	Oligonukleotid-Primer
OR	<i>odds ratio</i>
P	Wahrscheinlichkeit
PAX1	Paired Box 1
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
R	<i>reverse</i> (rückwärts)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
rpm	<i>rotations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkription-PCR
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
SBE	<i>single base extension</i> (Einzelbasen-Verlängerung)
sec	Sekunden
SNP	<i>single-nucleotide-polymorphism</i> (Einzelbasenaustausch)
T	Thymin
T	Transmittiert
TDT	<i>Transmission Disequilibrium Test</i>
UEP	<i>unextended primer</i> (nicht verlängerter Primer)

1 EINLEITUNG

Die genetische Variabilität ist - neben einem möglichen Einfluss von Umweltfaktoren - die Grundlage für die Vielseitigkeit von Lebewesen einer Art. Als genetische Variabilität wird hierbei die Unterschiedlichkeit von Individuen hinsichtlich ihrer genetischen Sequenz, der Desoxyribonukleinsäure (*desoxyribonucleic acid*, DNA), verstanden. Insbesondere im Bereich der Humangenetik ist die genetische Variabilität von außerordentlichem Interesse, da sie maßgeblich an der Entstehung von Krankheiten beteiligt ist und somit in den Fokus genetischer Untersuchungen rückt.

Es gibt eine Vielzahl von Möglichkeiten, wodurch genetische Variabilität entstehen kann. Die häufigste Ursache genetischer Varianten sind Fehler während der Replikation und Reparatur der DNA (Cooper, 1992; Duret, 2009). Bei den genetischen Varianten werden numerische Chromosomenaberrationen, bei denen ein Verlust oder Überschuss ganzer Chromosomen oder Chromosomensätze vorliegt, von kleineren genetischen Varianten unterschieden: Einzelbasenaustausche (SNPs), Insertionen und Deletionen, repetitive Polymorphismen (*variable number of tandem repeats*, VNTR) sowie Kopienzahl-Varianten (*copy number variants*, CNV). Zu SNPs werden auch Insertionen und Deletionen von einem Basenpaar gezählt. SNPs machen einen Anteil von 80-90 % der genetischen Variabilität aus (Chorley et al., 2008; Haff und Smirnov, 1997; The International HapMap Consortium, 2003; Wang et al., 1998).

Neben monogen vererbten Erkrankungen, die in der Regel nach den Mendelschen Regeln vererbt werden, gibt es genetisch komplexe Erkrankungen, bei denen mehrere Gene an der Krankheitsentstehung beteiligt sind. Kommen zusätzlich nicht-genetische Faktoren hinzu, spricht man auch von multifaktoriellen Erkrankungen. Obwohl bei genetisch komplexen Erkrankungen ein Erbgang nach Mendel nicht erkennbar ist, sprechen Zwillings- und Adoptionsuntersuchungen sowie das Auftreten einer familiären Häufung für einen genetischen Ursprung. Die androgenetische Alopezie (AGA; erblich bzw. hormonell bedingter Haarausfall; MIM 109200, MIM 300710, MIM 612421) ist den genetisch komplexen Erkrankungen zuzuordnen (Hillmer et al., 2008b; Küster und Happle, 1984; Nyholt et al., 2003). Zwei genetische Loci auf den Chromosomen Xq11-12 und 20p11 konnten bisher zweifelsfrei als Suszeptibilitätsloki für eine AGA identifiziert werden (Brockschmidt et al., 2010; Ellis und Harrap,

2001; Hayes et al., 2005; Hillmer et al., 2005; Hillmer et al., 2008a; Hillmer et al., 2008b; Hillmer et al., 2009; Levy-Nissenbaum et al., 2005; Prodi et al., 2008; Richards et al., 2008; Sawaya und Shalita, 1998). In einer kürzlich durchgeführten Metaanalyse zu genomweiten Assoziationsdaten bei der AGA, in der die genetischen Daten von insgesamt 12.806 Individuen europäischer Abstammung ausgewertet wurden, konnten sechs neue Suszeptibilitätsloki auf den Chromosomen 1p36.22, 2q37.3, 7p21.1, 7q11.22, 17q21.31 und 18q12.3 mit genomweiter Signifikanz identifiziert werden (MAAN, eingereicht). Die Aufarbeitung dieser neu identifizierten Suszeptibilitätsloki und die Identifizierung der kausalen Varianten sind Voraussetzung für ein besseres Verständnis der Pathophysiologie der AGA und können langfristig zu einer Verbesserung der Therapie der AGA führen.

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

2.1 Die Entwicklung des menschlichen Haares

Haare stellen ein fadenförmiges Hautanhangsorgan dar und bilden sich durch Verhornung aus den Haarfollikeln der Epidermis. Durch die komplexe Interaktion epidermaler und mesenchymaler Strukturen, die zur Entwicklung von Haarfollikeln führen, beginnt die Haarentwicklung bereits um die 10. Schwangerschaftswoche (Botchkarev und Kishimoto, 2003). Das Haarwachstum verläuft in verschiedenen Phasen, die sich zeitlebens in asynchronen Zyklen wiederholen (Ellis et al., 2002; Hibberts et al., 1998; Kligman, 1959), nämlich die Wachstums- (Anagen), Übergangs- (Katagen) und Ruhephase (Telogen). Das Ausfallen des Haares zum Ende des Telogens wird als unabhängige vierte Phase diskutiert, das sogenannte Exogen (Higgins et al., 2009; Milner et al., 2002; Stenn, 2005). Zu Beginn eines Haarzyklus bildet sich im Anagen, das etwa drei bis sechs Jahre dauert, ein Haar durch andauernde mitotische Aktivität der Haarmatrixzellen. Das Haar besteht dabei aus Mark, Rinde, Kutikula und innerer Wurzelscheide. Mit zunehmender Zeit verlängert sich das Haar, es wächst. Die anschließende Katagenphase dauert nur wenige Tage bis Wochen. Sie stellt eine Übergangsphase dar und ist durch morphologische Umbau- und Apoptosevorgänge gekennzeichnet (Cotsarelis und Millar, 2001). Dabei stellen die Haarmatrixzellen ihre Proliferation ein und verhornen bis auf wenige undifferenzierte Epithelzellen der Dermalpapille. Der Bulbus löst sich zunehmend von der Papille und nähert sich infolgedessen der Hautoberfläche an. Dadurch verliert er seine Wurzelscheide, welche für die ursprünglich feste Verankerung des Haares in der Kopfhaut verantwortlich war. In der abschließenden drei- bis viermonatigen Telogenphase ist der Haarfollikel bis kurz unter die Talgdrüsenmündung des Haarschaftes vorgerückt. Sie endet damit, dass das Haar ausfällt und ein neuer Zyklus beginnen kann (Stenn und Paus, 2001). Die Phasen des physiologischen Haarzyklus werden in Abbildung 1 (Abb. 1) schematisch dargestellt.

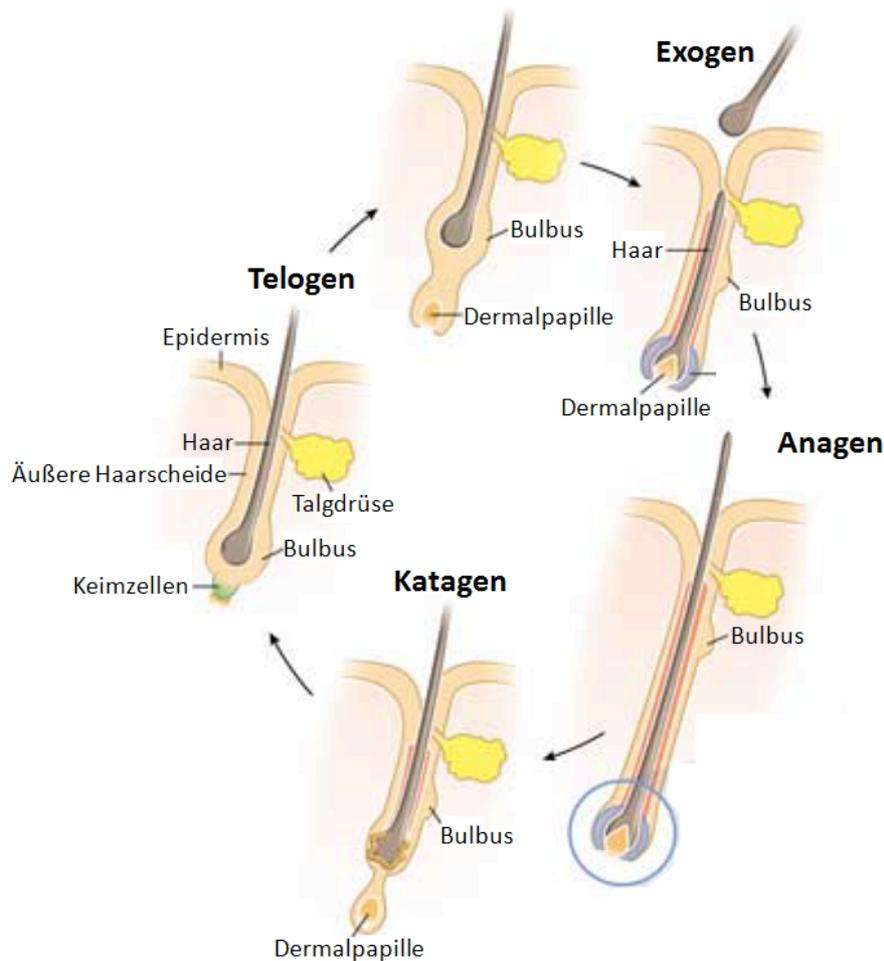


Abb. 1: Der Haarzyklus. In der Wachstumsphase (Anagen) steht die andauernde Haarmatrixzellproliferation im Vordergrund. Während der anschließenden Übergangsphase (Katagen) wird die Haarmatrixzellproliferation eingestellt und die Zellen verhornen mit Ausnahme weniger undifferenzierter Epithelzellen der Dermalpapille. Durch die Annäherung des Bulbus an die Hautoberfläche und den Verlust der Wurzelscheide lässt die feste Verankerung des Haares in der Kopfhaut nach. In der Ruhe- bzw. Endphase (Telogen) differenzieren die Dermalpapillenzellen erneut, so dass ein neuer Haarzyklus beginnen kann. Das alte Haar fällt aus (Exogen). Modifiziert nach Cotsarelis (2006).

2.2 Die androgenetische Alopezie (AGA)

Die androgenetische Alopezie (AGA; erblich bzw. hormonell bedingter Haarausfall; MIM 109200, MIM 300710, MIM 612421) stellt die häufigste Form des männlichen Haarverlustes dar (Hamilton, 1951; Rexbye et al., 2005). Die Diagnose erfolgt klinisch, wobei evidenzbasierte Empfehlungen bzgl. der Diagnosestellung kürzlich veröffentlicht wurden (Blume-Peytavi et al., 2011a). Die ätiologischen Grundlagen sind der hormonelle Status und die genetische Veranlagung (Hamilton, 1942; Hamilton, 1951; Hibberts et al., 1998; Lucky, 1985). Es sind keine

Umweltfaktoren bekannt, die einen Beitrag zur Entstehung einer AGA leisten (Nyholt et al., 2003; Severi et al., 2003). Dass Nikotinkonsum einen Beitrag leisten könnte, wurde zwar diskutiert, eine kausale Verbindung konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Mosley und Gibbs, 1996). Im Hinblick auf die ätiologischen Grundlagen kann die AGA von Alopezien unterschieden werden, bei denen der Haarausfall kein eigenes Krankheitsbild darstellt, sondern Symptom einer anderen Grunderkrankung ist. Das polyzystische Ovariensyndrom (Stein-Leventhal-Syndrom, MIM 160900) ist ein solches Beispiel (Carey et al., 1993). Auch wenn medikamentöse Therapieansätze die Lebensqualität verbessern können (Yamazaki et al., 2011), stellt sich für einen Teil der Betroffenen die Entwicklung einer AGA zunehmend als psychische Belastung heraus und kann damit einen erheblichen Einfluss auf die Lebensqualität haben (Cash, 1992; Sinclair, 1998; Stough et al., 2005).

2.2.1 Klinik und Klassifikation

Als häufigste Form des männlichen Haarverlustes tritt die AGA bei mehr als 45 % aller 49-jährigen europäischen Männer und bei ca. 70-80 % aller 80-jährigen europäischen Männer auf (Hamilton, 1951; Norwood, 1975; Nyholt et al., 2003). Sie beginnt meistens in der Pubertät (Stough et al., 2005). Die Prävalenz ist bei asiatischen, amero-indianischen und afroamerikanischen Männern deutlich geringer (Hoffmann, 2002). Nur 40 % aller 70-jährigen chinesischen Männer und älter zeigen eine AGA (Wang et al., 2010). Bei einer AGA erfolgt der Haarausfall nach einem charakteristischen Muster, das in eine von Hamilton (1951) entwickelte und durch Norwood (1975) modifizierte Klassifikation eingeteilt werden kann (Abb. 2). Zunächst lässt sich ein zunehmender Haarverlust frontoparietal (sogenannte „Geheimratsecken“; Stadium I-III) und im Bereich des Vertex (Stadium III vertex) feststellen. Als dann kann der Haarverlust im Vertexbereich fortschreiten, so dass betroffene Areale konfluieren können (Stadium IV-VI), bis schließlich nur noch ein schmaler Haarkranz im Okzipitalbereich bleibt (Stadium VII) (Hamilton, 1951; Norwood, 1975).

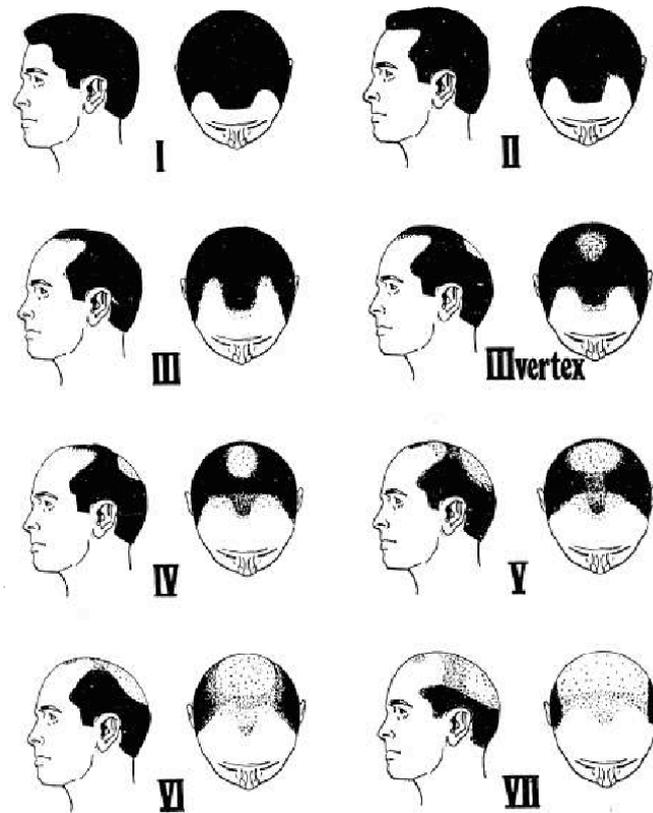


Abb. 2: Phänotypische Klassifikation der AGA beim Mann nach Hamilton (1951) und Norwood (1975). Der Haarausfall beim Mann ist in sieben Stadien unterteilt. Zunächst kommt es zur Entwicklung von Geheimratsecken (Stadium I-III), gefolgt vom Haarausfall im Vertexbereich (Stadium III vertex). Im weiteren Verlauf breitet sich der Haarverlust so weit aus (Stadium IV-VI), dass nur noch ein schmaler Haarkranz im Okzipitalbereich bestehen bleibt (Stadium VII). Entnommen aus Norwood (1975).

Auch Frauen können von einer AGA betroffen sein. Sie tritt bei rund 5 % aller 50-jährigen Frauen und bei über 30 % aller 70-jährigen Frauen auf (Birch et al., 2001; Norwood, 2001), womit sie deutlich seltener als bei Männern vorkommt. Der Haarausfall bei Frauen folgt nach einem von Männern abweichenden Muster. Unter Erhalt der frontalen Haarlinie kommt es entlang der Stirnhaargrenze zu einer parietalen, diffusen Ausdünnung des Haares. Der Haarverlust wird hier in drei Stadien klassifiziert, dem sogenannten Schema nach Ludwig (Ludwig, 1977; Norwood, 2001).

2.2.2 Pathophysiologie der AGA

Der Haarausfall bei AGA-Betroffenen lässt sich auf einen im Vergleich zu nicht von einer AGA betroffenen Männern veränderten Haarzyklus zurückführen (Courtois et al., 1994). Die

Wachstumsphase (Anagen), die normalerweise zwischen drei und sechs Jahre andauert, verkürzt sich auf wenige Monate, wohingegen sich die Ruhe- bzw. Endphase (Telogen), die normalerweise drei bis vier Monate andauert, auf bis zu mehrere Jahre verlängert (Courtois et al., 1994; Kaufman, 2002). Dies führt dazu, dass das neu wachsende Haar durch die Verkürzung der Wachstumsphase nicht mehr die Oberfläche der Kopfhaut erreichen kann und damit nicht mehr sichtbar in Erscheinung tritt. Zudem miniaturisieren sich Haarfollikel und Dermalpapille, womit lediglich eine sichtbare Pore zurückbleibt (Randall, 2007; Sinclair, 1998; Whiting, 2001), die für den noch vorhandenen Haarfollikel steht. Aufgrund der veränderten Phasendauer sind deutlich weniger Haare in der Anagenphase als in der Telogenphase feststellbar (Whiting 1993; 1998). Als Konsequenz dieser Umstände verringert sich die Haardichte und der Haarverlust wird sichtbar (Ellis et al., 2002).

Die Ursachen für diese Änderungen im Haarzyklus sind androgenbedingt (Braun-Falco und Bergner, 1989; Hamilton, 1942). Die für die AGA relevanten Androgene sind die Hormone Testosteron bzw. Dihydrotestosteron (DHT) (Olsen et al., 2005). Sie entfalten ihre Wirkung indirekt durch die spezifische Bindung an den Androgenrezeptor (AR). Das zirkulierende Testosteron diffundiert zunächst durch die Zellmembran einer Zelle. Dort erfolgt im Zytoplasma durch das Enzym 5- α -Reduktase die Umwandlung in DHT. Derzeit sind zwei Isoformen der 5- α -Reduktase bekannt: Während Typ I in zahlreichen Geweben vorkommt, wird Typ II hauptsächlich in androgenabhängigen Geweben wie z.B. dem Haarfollikel oder der Prostata exprimiert (Olsen et al., 2005). Die 5- α -Reduktase wandelt das biologisch weniger aktive Testosteron in die aktivere Form des DHT um (Chen et al., 2005; Ellis und Harrap, 2001), welches eine 10-fach höhere Affinität zum AR hat (Tran und Sinclair, 1999; Zhou et al., 1995). Der AR befindet sich ohne einen gebundenen Liganden (Testosteron oder DHT) zunächst inaktiv ebenfalls im Zytoplasma. Nach Bindung von Testosteron oder DHT an den AR erfolgt eine Konformationsänderung des Proteins, womit der AR samt gebundenen Liganden in den Zellkern translozieren kann, wo er als Transkriptionsfaktor fungiert (Lee und Chang, 2003; Pawlowski et al., 2002; Randall, 1994; Tyagi et al., 2000; Wang et al., 2004). Hierbei erfolgt die Interaktion zwischen DNA und AR über Androgen-responsive Elemente. Durch diesen Mechanismus und durch Unterstützung weiterer Proteine der Transkriptionsmaschinerie kann so die Expression von androgenabhängigen Genen gesteuert werden (Lee und Chang, 2003; Randall, 2007).

Die Entstehung einer AGA ist unter Berücksichtigung dieses Pathomechanismus vom Androgenspiegel mitbestimmt (Braun-Falco und Bergner, 1989; Hamilton, 1942). Eunuchen oder Jungen vor der Pubertät, bei denen kein oder nur wenig Testosteron vorliegt, zeigen beispielsweise keine AGA. Ändert sich in der Pubertät der Hormonhaushalt durch eine verstärkte Bildung von Testosteron, kann dies zu einem beginnenden Haarausfall führen (Stough et al., 2005). Bei Eunuchen entwickelt sich keine AGA, da durch das Fehlen der Hoden, in denen die Androgene überwiegend hergestellt werden, nahezu keine Androgene mehr produziert werden können. Applizierte man aber Testosteron an Eunuchen, in deren Familien zuvor Fälle von AGA dokumentiert werden konnten, konnte wiederum eine AGA induziert werden (Hamilton 1942, 1951). Die zentrale Rolle des Androgens DHT wird dadurch verdeutlicht, dass Pseudohermaphroditen, die keine funktionierende 5- α -Reduktase Typ II besitzen, keine AGA entwickeln (Andersson et al., 1991; Imperato-McGinley et al., 1974). Während im Speichel von AGA-Betroffenen erhöhte Testosteronspiegel festgestellt werden konnten, wurden im Serum unauffällige Werte beobachtet (Cipriani et al., 1983; Pitts, 1987). Im Gegensatz zur 5- α -Reduktase sind Aromatasen Enzyme, die Testosteron zu Estradiol metabolisieren. Im Vergleich zu Frauen zeigten Männer eine verminderte Aktivität der Aromatase in der Kopfhaut (Hoffmann et al., 2002), was bei Frauen - abgesehen von der grundsätzlich geringeren Testosteronkonzentration - zu einer verminderten DHT-Konzentration führt. Dies wird auch als Grund dafür angesehen, dass Frauen deutlich seltener von einer AGA betroffen sind (Bergfeld, 1995). Darüber hinaus ist sowohl die Androgengrundlage als auch die genetische Prädisposition bei der AGA der Frau umstritten (Cousen und Messenger, 2010; Sinclair et al., 2005).

In Dermalpapillen haarloser Kopfhaut konnte eine vermehrte Expression des *AR* im Vergleich zur behaarten Kopfhaut festgestellt werden (Hibberts et al., 1998; Sawaya und Price, 1997). Bei Fehlen oder funktioneller Veränderung des *ARs*, wie z.B. beim Goldberg-Maxwell-Morris-Syndrom (Androgenresistenz-Syndrom, MIM 300068), zeigt sich phänotypisch kein Haarverlust an der frontalen Stirnhaargrenze (Griffin und Wilson, 1989). Das Zusammenspiel aus hormonellen (Testosteron und DHT) und genetischen Faktoren (z.B. funktionaler *AR*) wird dadurch für die Entstehung einer AGA verdeutlicht (Hamilton, 1942; Kaufman, 2002). Dennoch zeigen sich Widersprüche bei der Rolle der Androgene für die Entwicklung einer AGA: Während das Barthaar androgeninduziert wächst (Rutberg et al., 2006), führen Androgene im Frontal-

und Vertexbereich des Kopfes zum Haarausfall (Hamilton, 1951; Randall, 2007; Winiarska et al., 2006), obwohl sie über das gleiche Enzymsystem verfügen. Zudem ist unklar, wieso die Okzipitalhaare des Kopfes nicht der androgeninduzierten Miniaturisierung und dem Haarausfall unterliegen. Obwohl die endogen produzierte Testosteronmenge mit steigendem Alter abnimmt (Hamilton, 1951), nimmt die androgeninduzierte Haarlosigkeit mit dem Alter zu (Birch und Messenger, 2001), was ebenfalls widersprüchlich erscheint. Grundsätzlich lässt sich festhalten, dass die Anwesenheit von Androgenen existenziell für die Entwicklung der AGA ist. In welchem Maße Androgene hinsichtlich Auftreten und Verlauf die interindividuellen Unterschiede bestimmen, ist bisher jedoch unklar.

2.2.3 Therapie der AGA

Die derzeit zur Verfügung stehenden Therapieoptionen können lediglich das Fortschreiten des Haarverlustes verzögern bzw. aufhalten, eine vollständige Wiederherstellung der ausgefallenen Haare ist bislang jedoch nicht möglich. Der Ansatz, mit Antiandrogenen die Umwandlung von Testosteron in das aktivere Dihydrotestosteron (DHT) zu hemmen (Brooks et al., 1981), war aufgrund des beschriebenen Pathomechanismus naheliegend. Eine systemische Gabe ist aber aufgrund der zu erwartenden Nebenwirkungen wie Gynäkomastie oder erektile Dysfunktion nicht möglich (Braun-Falco und Bergner, 1989). Ein Behandlungsansatz mit Östrogenderivaten und Progesteron sowie Östrogen-Rezeptor-Antagonisten zeigte nicht den erwarteten Erfolg (Gassmueller et al., 2008; Orentreich und Orentreich, 1987; Tromovitch et al., 1985). Die kürzlich veröffentlichten S3-Richtlinien für die Behandlung einer AGA zeigen mit Finasterid und Minoxidil zwei Präparate, die evidenzbasiert eine Wirkung zeigen und zur Behandlung einer AGA zugelassen sind (European Dermatology Forum, 2011). Im Vordergrund der Behandlung steht dabei der frühe therapeutische Beginn, denn insbesondere dadurch werden wünschenswerte Ergebnisse erzielt (Rathnayake und Sinclair, 2010). Finasterid (z.B. Propecia®) entfaltet seine Wirkung als selektiver Inhibitor der 5- α -Reduktase Typ II und war zunächst für die Behandlung der gutartigen Prostatahyperplasie vorgesehen (Gormley et al., 1992). Es hemmt damit die Umwandlung von Testosteron in die aktivere Form DHT. Wegen seiner Ähnlichkeit zum Testosteron bindet Finasterid irreversibel an die 5- α -Reduktase Typ II, inaktiviert damit die

Enzymwirkung und senkt so die Konzentration von DHT (Dallob et al., 1994; Kaufman et al., 1998; Ryu et al., 2006). Finasterid wird als 1 mg-Dosis in Tablettenform per os eingenommen. In zahlreichen Studien hinsichtlich der Therapie mit Finasterid konnten verschiedene, jedoch ähnliche Ergebnisse gezeigt werden: Kaufman et al. (1998) zeigten in ihrer zweijährigen Studie an 1.553 Männern zwischen 18 und 41 Jahren, dass bei zwei Drittel aller mit dem Wirkstoff behandelten Männer eine Finasterid-Therapie wirkungsvoll war. In einer placebokontrollierten 48-wöchigen Doppelblind-Studie von van Neste et al. (2000) konnte gezeigt werden, dass bei einer täglichen Einnahme von 1 mg Finasterid die Haarzahl AGA-Betroffener um 8,3 % zunimmt. In einer Studie von „*The Finasteride Male Pattern Hair Loss Study Group*“ (2002) konnte die Zunahme der Haarzahl nach einer einjährigen Behandlung mit Finasterid jedoch nicht beobachtet werden. In verschiedenen Studien konnte für Dutasterid, ein Inhibitor der 5- α -Reduktase Typ I und Typ II, ebenso eine Auswirkung auf die Senkung der DHT-Konzentration gezeigt werden (Eun et al., 2010; Olsen et al., 2006; Stough, 2007). In einer sechsmonatigen, randomisierten und placebokontrollierten Doppelblind-/Phase-III-Studie von Eun et al. (2010) wurde im Placebovergleich für Dutasterid eine signifikant höhere Effizienz nachgewiesen, indem die Haaranzahl nach Wirkstoffaufnahme um 12,2/cm² zunahm (im Vergleich zu 4,7/cm² bei Placeboaufnahme). Olsen et al. (2006) zeigten in einer 24-wöchigen, randomisierten und placebokontrollierten Studie eine Zunahme der Anzahl der Haare von 21,5/cm² bei einer täglichen Einnahme von 2,5 mg Dutasterid im Vergleich zu 14,8/cm² bei einer täglichen Einnahme von 5 mg Finasterid. Derzeit besteht jedoch kein Grund für die Verschreibung von Dutasterid, da 0,5 mg Dutasterid etwa 5 mg Finasterid entsprechen und damit höhere Dosen Dutasterid benötigt werden, um eine vergleichbare Effizienz zu erreichen (European Dermatology Forum, 2011). Minoxidil (z.B. Regaine®) wurde zunächst als Reserveantihypertonikum genutzt. Dabei berichten Dargie et al. (1977), dass die Behandlung mit Minoxidil bei einigen Patienten mit Haarwachstum oder zumindest mit Erhalt des aktuellen Haarstatus einherging. Diese Beobachtung konnte durch Dawber und Rundegren (2003) bestätigt werden. Im Gegensatz zu Finasterid wird Minoxidil als Lösung lokal auf die Kopfhaut aufgetragen. Der genaue Wirkmechanismus ist nicht bekannt. Man geht davon aus, dass Minoxidil als Kaliumkanal-Öffner über seinen in der Leber gebildeten Metabolit Minoxidil-Stickstoffmonoxid-Sulfat als peripherer Vasodilatator wirkt (Bienova et al., 2005; Olsen et al.,

2005). Aktuell zeigt eine Studie, dass Minoxidil möglicherweise durch die Aktivierung der β -Katenin-Aktivität in Dermalpapillenzellen die Anagenphase des Haarzyklus verlängert (Kwack et al., 2011). In randomisierten und placebokontrollierten Doppelblind-Studien werden zudem auch andere Therapieansätze untersucht: So zeigt sich eine signifikante Wirkung einer Kombinationstherapie des Ingwergewächses *Curcuma aeruginosa* (ein botanisches 5- α -Reduktase-Inhibitor-Derivat als 5 % Hexanextrakt) mit 5 % Minoxidil im Sinne eines langsameren Haarverlustes und gesteigertem Haarwachstums (Pumthong et al., 2011). Blume-Peytavi et al. (2011b) konnten nach einer 24-wöchigen, topischen Anwendung von 0,1 % Latanoprost einen signifikanten Effekt auf die Haardichte zeigen. Bei Latanoprost handelt es sich um ein Prostaglandin-Analogon, das unter anderem zur Behandlung eines erhöhten Augeninnendrucks zugelassen ist, indem es den Kammerwasserabfluss erhöht (Toris et al., 2008).

Neben den medikamentösen Ansätzen haben Betroffene die Möglichkeit eines chirurgischen Eingriffs, indem Haarfollikel meist aus dem okzipitotemporalen Bereich autolog in die betroffenen Bereiche transplantiert werden (Unger und Unger, 2003). Diese Lösung zeigt im Vergleich zur medikamentösen Behandlung die besten Langzeitresultate (Gho und Neumann, 2011). Aufgrund der Tatsache, dass ein solcher operativer Eingriff mit hohen Kosten verbunden ist, ist dieser Ansatz jedoch keine wirkliche Alternative für eine Mehrheit der betroffenen Männer.

2.2.4 Assoziation der AGA mit anderen Erkrankungen

Die AGA ist mit zahlreichen anderen Erkrankungen assoziiert. Grundlage dafür ist, dass gemeinsame genetische Faktoren zur Krankheitsentstehung beitragen. Zwei Studien konnten einen Zusammenhang zwischen AGA und Prostatahyperplasie berichten. So zeigten in einer Studie Männer mit AGA ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer gutartigen Prostatahyperplasie (Oh et al., 1998). Eine frühe Form der AGA kann darüber hinaus einen frühen Marker für die Entwicklung einer gutartigen Prostatahyperplasie darstellen (Arias-Santiago et al., 2011). Einige Arbeiten berichten einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer AGA und einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Prostatakarzinoms (Giles et al., 2002; Hawk et al., 2000; Yassa et al., 2011), die Ergebnisse sind diesbezüglich aber

widersprüchlich (Cremers et al., 2010; Wright et al., 2010). Darüber hinaus konnten in verschiedenen Studien Assoziationen zu Erkrankungen berichtet werden, die auch unter dem Oberbegriff des metabolischen Syndroms zusammengefasst werden können: Matilainen et al. (2000) sowie Su und Chen (2010) konnten Assoziationen zu arteriellem Hypertonus, Hyperinsulinämie, Insulinresistenzkrankungen (z.B. Adipositas) und Dyslipidämie zeigen. Die Assoziationen zu Insulinresistenz und arteriellem Hypertonus wurden zudem unabhängig bestätigt (Ahouansou et al., 2007; Hirsso et al., 2006). Bezüglich der Insulinresistenz gibt es aber auch widersprüchliche Ergebnisse (Abdel Fattah und Darwish, 2011). Während Ellis et al. (2001b) keine Assoziation zwischen AGA und kardiovaskulären Risikofaktoren feststellen konnten, zeigten zahlreiche Studien Assoziationen zwischen AGA und kardiovaskulären Erkrankungen: Im Rahmen der „*Copenhagen City Heart Study*“ konnten Schnohr et al. (1995) bei frontalem Haarverlust eine Assoziation zum Myokardinfarkt feststellen. Herrera et al. (1995) stellten in der „*Framingham Heart Study*“ bei Männern unter 55 Jahren einen Zusammenhang zwischen schnell fortschreitender AGA und der koronaren Herzerkrankung fest. Eine Assoziation mit der Sterblichkeit durch die Entwicklung einer koronaren Herzerkrankung konnten Ford et al. (1996) im Rahmen der „*First National Health and Nutrition Examination Survey*“ zeigen. Lotufo et al. (2000) konnten bei Männern mit Haarverlust im Vertexbereich ein erhöhtes Risiko für einen Myokardinfarkt feststellen. Matilainen et al. (2001) zeigten, dass das Risiko für die Entwicklung einer koronaren Herzerkrankung bei Auftreten einer AGA vor dem 36. Lebensjahr erhöht ist. Hirsso et al. (2007) zeigten in ihrer Studie eine Assoziation zwischen AGA und erhöhten inflammatorischen Markern für kardiovaskuläre Erkrankungen.

2.2.5 Formal- und Molekulargenetik der AGA

Die genetischen Ursachen der AGA sind - wie bei nahezu allen genetisch komplexen Erkrankungen - bisher nicht geklärt. Osborn (1916) ging zunächst von einer monogenen Vererbung der AGA aus. Wegen des offensichtlichen Geschlechtsunterschiedes hinsichtlich der Prävalenz einer AGA zwischen Männern und Frauen wurde von einem dominanten Erbgang bei Männern und einem rezessiven Erbgang bei Frauen ausgegangen. In einer unabhängigen Familienstudie wurde diese Ansicht zunächst bestätigt (Harris, 1946). Küster und Happle (1984)

konnten dieses Mendelsche Modell jedoch nicht aufrechterhalten. Sie veröffentlichten eine Übersichtsarbeit über die von 1895 bis 1983 veröffentlichte Literatur hinsichtlich der Vererbungsmechanismen der AGA, die die Autoren dazu veranlasste, von einer polygenen Vererbung auszugehen. Die hohe Prävalenz, die quantitativ unterschiedliche Ausprägung hinsichtlich des Phänotyps und die Beobachtung, dass mit steigender Anzahl betroffener Familienmitglieder auch die Wahrscheinlichkeit für die frühe Erkrankung an einer AGA steigt, sprechen dafür. Diese Ansicht wird durch zahlreiche Studien unterstützt und ist heute als Vererbungsmechanismus anerkannt (Ellis et al., 1998; Hillmer et al., 2008b; Nyholt et al., 2003; Rexbye et al., 2005).

Aufgrund des androgenabhängigen Pathomechanismus der AGA war das *Androgenrezeptor*-Gen (*AR*) zunächst ein naheliegender Kandidat, da es die Wirkung der Androgene vermittelt. Es besteht aus 8 Exons, in denen 917 Aminosäuren kodiert sind. Das Gen erstreckt sich über eine Länge von 180 kb auf Chromosom Xq11-q12. Das AR-Protein besitzt vier funktionelle Domänen: eine N-terminale Transaktivierungsdomäne, eine DNA-Bindungsdomäne, eine Gelenkregion und eine C-terminale Steroid-Bindungsdomäne. Darüber hinaus sind zwei Isoformen bekannt (Cude et al., 1999).

Als erster Assoziationsbefund zwischen AGA und dem *AR* wurde die in Exon 1 des *AR* lokalisierte Glutamin-Wiederholung (CAG-Repeat) berichtet (Sawaya und Shalita, 1998). Ellis et al. (2001a) konnten eine Assoziation zwischen der AGA und einer Kombination von kurzen CAG- und Polyglycin (GGN)-kodierenden Repeatallelen zeigen, zudem berichteten sie die Assoziation eines ebenfalls in Exon 1 des *AR* lokalisierten Restriktionspolymorphismus (*StuI* (=rs6152)). Letzterer Assoziationsbefund wurde in einer Vielzahl von Studien unabhängig bestätigt (Brockschmidt et al., 2010; Ellis et al., 2007; Hayes et al., 2005; Hillmer et al., 2005; Levy-Nissenbaum et al., 2005; Prodi et al., 2008). In der Studie von Hillmer et al. (2005) wurden insgesamt 42 Varianten in und um den *AR* untersucht, darunter die kodierenden CAG- und GGN-Repeats. Der polymorphe GGN-Repeat zeigte als einzige kodierende Variante eine Assoziation mit AGA und wurde damit als potenziell kausale Variante berichtet. Zudem konnte in anderen Studien ein GGN-repeatlängenabhängiger Effekt auf die Funktion des AR gezeigt werden, auch wenn die Befunde in Bezug auf die Effekttendenz, also verminderte oder vermehrte *AR*-Transaktivierungsfähigkeit, widersprüchliche Ergebnisse zeigten (Brockschmidt et al., 2007; Ding et al., 2005; Lundin et al.,

2007). Ellis et al. (2007) konnten in einem australischen Kollektiv den Befund für den GGN-Repeat nicht bestätigen, zudem identifizierte eine sardische Studie, in der genomweite SNP-Daten am *AR*-Lokus analysiert wurden, das stärkste Assoziationssignal für rs1385699 ($P = 3,9 \times 10^{-19}$) (Prodi et al., 2008), einer kodierenden Variante im zentromerisch gelegenen Nachbarn des *ARs*, dem *Ectodysplasin-A2-Rezeptor-Gen (EDA2R)*. Bei dieser Variante handelt es sich um eine Missense-Mutation (Arg57Lys). Die Autoren postulierten, dass es sich bei dieser Variante um die eigentlich kausale Variante für die AGA handelt, auch wenn der *AR* aufgrund seiner Funktion als Kandidatengen nicht ausgeschlossen werden kann. Brockschmidt et al. (2010) führten die bislang umfangreichste Analyse am *AR/EDA2R*-Lokus durch. In einer Feinkartierung einer 2,8 Mb großen Region wurde der komplette *AR/EDA2R* Lokus analysiert. Hierzu wurden alle zuvor als mit AGA assoziiert berichteten Varianten in dieser Region eingeschlossen (Ellis et al., 2001; Hayes et al., 2005; Hillmer et al., 2005; Hillmer et al., 2008a; Levy-Nissenbaum et al., 2005; Prodi et al., 2008) und in 673 AGA-Betroffenen, 248 Nicht-Betroffenen und einem familienbasierten Kollektiv mit 357 Familien analysiert. In der Fall-Kontroll-Analyse wurde mit rs12558842 (Chr.X: 66.398.525 bp; NCBI build36) die stärkste Assoziation gefunden ($P = 2,03 \times 10^{-25}$; odds ratio (OR) = 7,84; 95%-Konfidenzintervall (CI) [5,09-12,06]). Eine Stratifikationsanalyse mit den Fall-Kontroll-Daten zeigte zudem, dass diese Variante alleine das Assoziationssignal an diesem Lokus erklären kann. Sowohl der GGN-Repeat, als auch der von Prodi et al. (2008) berichtete SNP rs1385699 schieden damit als potenziell kausale Varianten aus. In der familienbasierten Analyse wurde dieser Befund bestätigt, nach Stratifikation für rs12558842 zeigte nur rs5918801 (Chr.X: 67.125.660 bp; NCBI build36; $P = 5,03 \times 10^{-9}$, OR = 0,38 [0,27-0,53]) noch ein unabhängiges Assoziationssignal. Eine Haplotypanalyse mit rs12558842 und rs5918801 in den Fall-Kontroll- und Familiendaten wies darauf hin, dass die vermutlich noch unbekannte kausale Variante auf einem Haplotyp liegt, der durch diese beiden Varianten charakterisiert ist. Eine Assoziation von Kopienzahl-Varianten am *AR*-Lokus konnte durch Cobb et al. (2009) nicht gezeigt werden. Der *AR* wird als erstes gesichertes Gen betrachtet, das einen Einfluss auf die Entwicklung der AGA hat. Die kausale Variante und die genaue Konsequenz dieser Variante sind jedoch noch nicht identifiziert. Durch zwei genomweite Assoziationsstudien (GWAS) konnte ein neuer Suszeptibilitätsloкус für die AGA auf Chromosom 20p11 identifiziert werden (Hillmer et al., 2008a; Richards et al., 2008).

Hillmer et al. (2008a) berichten in ihrer Untersuchung das stärkste Assoziationssignal an diesem Locus für rs2180439 (Chr.20: 21.801.100 bp; NCBI build36; $P = 2,7 \times 10^{-15}$; OR = 3,72 [2,18-6,34]), in der Studie von Richards et al. (2008) ist die Variante rs1160312 (Chr.20: 21.998.503 bp; NCBI build36; $P = 3,2 \times 10^{-10}$; OR = 1,79 [1,49-2,15]) als stärkstes Assoziationssignal berichtet. Der assoziierte Bereich ist durch einen Block mit hohem Kopplungsungleichgewicht (*linkage disequilibrium*, LD) charakterisiert. Die assoziierte Region wird von zwei ESTs (*expressed sequence tags*, exprimierte Sequenzen ohne bekannte Genfunktion), BQ013595 und BE789145, überspannt. Eine Expressionsanalyse in den AGA-Zielgeweben Kopfhaut, Haut und Haarschaft zeigte keine (BE789145) bzw. in Kopfhaut und Haut eine schwache Expression (BQ013595). Das nächstgelegene Gen *PAX1* (*Paired Box 1*, Chr.20: 21.634.297 - 21.644.620 bp, NCBI build36) zeigt hingegen eine moderate Expression im AGA-Zielgewebe Kopfhaut, wodurch Hillmer et al. (2008a) folgern, dass *PAX1* ein vielversprechendes Kandidatengen für die AGA darstellt. Aufgrund seiner Funktion als Transkriptionsfaktor (Wang et al., 2002) spekulieren Richards et al. (2008) in ihrer Arbeit auch einen möglichen Einfluss des 511 Kilobasen (kb) zentromerisch vom Assoziationslocus gelegenen Gens *FOXA2* (*Forkhead Box A2*, Chr.20: 22.509.642 - 22.513.101 bp, NCBI build36), ohne jedoch weiterführende Analysen durchgeführt zu haben. Eine Interaktion zwischen dem X-chromosomalen *AR*-Locus und dem Locus auf Chr. 20p11 konnte nicht nachgewiesen werden (Hillmer et al., 2008a), so dass die Effekte dieser Loci hinsichtlich einer AGA wahrscheinlich über unabhängige Mechanismen vermittelt werden. Der Assoziationsbefund auf Chr. 20p11 konnten jüngst durch Cobb et al. (2010) nochmals unabhängig repliziert werden. Der Suszeptibilitätslocus auf Chr. 20p11 gilt als zweiter gesicherter Locus für die AGA, die kausale Variante oder das beitragende Gen scheinen aber noch nicht zweifelsfrei identifiziert zu sein.

In einer genomweiten Kopplungsanalyse an 95 Familien konnte ein weiterer genomweit signifikanter Suszeptibilitätslocus identifiziert werden (Hillmer et al., 2008b). Zunächst konnten 14 genomische Regionen mit nominell-signifikanter Kopplung ($P < 0,05$) identifiziert werden, wobei die höchsten Werte neben dem bereits bekannten *AR/EDA2R*-Locus bei vier autosomalen Regionen detektiert werden konnten: Chr. 3q26, 11q22, 18q11 und 19p13. Bei einer anschließenden Feinkartierung dieser Regionen in einem erweiterten Kollektiv von insgesamt 125 Familien konnte der Befund auf Chr. 3q26 weiter gestützt werden. Für den Marker D3S2425

wurde mit einem P-Wert von 0,00055 genomweite Signifikanz erzielt. Nicht zuletzt wegen der mangelnden Auflösung von Kopplungsuntersuchungen und des Fehlens eines naheliegenden Kandidatengens in der Region konnte bislang keine kausale Variante in 3q26 identifiziert werden. Kürzlich konnte in einer erweiterten GWAS der Gruppe von Hillmer und Kollegen ein neuer Suszeptibilitätslokus auf Chr. 7p21 identifiziert werden (Brockschmidt et al., 2011). Das erweiterte Kollektiv umfasste insgesamt 581 schwer von einer AGA Betroffene und 617 Kontrollen, die sich aus 270 Nicht-Betroffenen über 60 Jahre (sogenannten Superkontrollen) und 347 populationsbasierten Kontrollen (Frauen und Männer) zusammensetzten. Hier konnte neben den bereits bekannten Loki auf Chr. X und Chr. 20 der neue Assoziationsbefund auf Chr. 7 identifiziert werden. Der beste Assoziationsbefund an diesem Locus wurde für den SNP rs756853 (Chr.7: 18.856.525 bp; NCBI build36) gefunden ($P = 1,64 \times 10^{-7}$; OR = 1,53 [1,30-1,80]). Der SNP liegt intronisch im *Histon-Deacetylase 9 (HDAC9)*-Gen (Chr.7: 18.501.894 - 19.003.517 bp, NCBI build36). Eine Feinkartierung dieses neuen Locus in den 581 initial in der GWAS verwendeten Betroffenen und den 270 Superkontrollen sowie einem familienbasierten Kollektiv von 310 Familien zeigte, dass rs2249817 (Chr.7: 18.862.536 bp; NCBI build36) nach Stratifikation das Assoziationssignal am besten erklären kann, zudem konnte die Assoziation für rs2249817 in einem australischen Kollektiv von 58 schwer Betroffenen und 114 Superkontrollen unabhängig repliziert werden ($P = 0,026$; OR = 1,65 [1,05-2,61]) (Brockschmidt et al., 2011). In einer biologischen Netzwerkanalyse wurden 39 Proteine identifiziert, die direkt mit *HDAC9* interagieren. Wurde das Netzwerk erweitert, konnten 3.581 Proteine als indirekte Interaktionspartner identifiziert werden. Interessanter Weise fand sich auch der AR unter den indirekten Interaktionspartnern, so dass nach Ansicht der Autoren *HDAC9* durch Interaktion mit dem AR einen Beitrag zur Entstehung der AGA leisten könnte (Brockschmidt et al., 2011).

In einer zeitgleich durchgeführten Metaanalyse, in die die Daten aus sieben GWAS mit insgesamt 3.891 AGA-Betroffenen und 8.915 Kontrollen europäischer Abstammung eingeflossen sind, konnten sieben genomweit signifikante Befunde detektiert werden, wobei das X-Chromosom mit dem *AR/EDA2R*-Locus als theoretisch achter genomweit signifikanter Locus nicht Bestandteil dieser Analyse war (MAAN, eingereicht). Die Metaanalyse konnte den Locus auf Chr. 20p11 (*PAX1/FOXA2*) (rs6047844, Chr.20: 21.985.575 bp; NCBI build36; $P = 1,71 \times 10^{-39}$; OR = 1,60 [1,49-1,82]) bestätigen und identifizierte auch den Locus auf Chr.

7p21 (*HDAC9*) (rs2073963, Chr.7: 18.844.399 bp; NCBI build36; $P = 1,08 \times 10^{-12}$; OR = 1,29 [1,20-1,38]). Zudem wurden weitere Kandidatengenregionen auf Chr. 1p36 (rs12565727, Chr.1: 10.955.669 bp; NCBI build36; $P = 9,07 \times 10^{-11}$; OR = 1,33 [1,22-1,45]), Chr. 2q37 (rs9287638 Chr.2: 239.359.379 bp; NCBI build36; $P = 1,01 \times 10^{-12}$; OR = 1,31 [1,21-1,41]), Chr. 7q11 (rs6945541 Chr.7: 68.249.896 bp; NCBI build36; $P = 1,71 \times 10^{-9}$; OR = 1,27 [1,18-1,38]), Chr. 17q21 (rs12373124 Chr.17: 41.279.999 bp; NCBI build36; $P = 5,07 \times 10^{-10}$; OR = 1,33 [1,21-1,45]) und Chr. 18q12 (rs10502861, Chr.18: 41.054.146 bp; NCBI build36; $P = 2,62 \times 10^{-9}$; OR = 1,28 [1,18-1,39]) identifiziert. In zukünftigen Analysen muss nun nach der funktionell relevanten Mutation an den neu identifizierten Loci gesucht werden und das beitragende Gen in einen funktionellen Zusammenhang zur Pathophysiologie der AGA gestellt werden.

2.2.6 Das *HDAC4*-Gen, ein interessantes Kandidatengen für die AGA

In der Metaanalyse (MAAN, eingereicht) wurde neben dem *PAX1/FOXA2*-Lokus auf Chr. 20 und dem *HDAC9*-Lokus auf Chr. 7 ein Locus auf Chr. 2q37 identifiziert. Dieser Locus ist der am stärksten assoziierte, neu identifizierte Suszeptibilitätslokus der Metaanalyse. Das beste Assoziationssignal wird hier durch den SNP rs9287638 ($P = 1,01 \times 10^{-12}$; Chr.2: 239.359.379 bp; NCBI build36) erzielt, wobei insgesamt acht weitere SNPs an diesem Locus genomweite Signifikanz ($P < 5 \times 10^{-8}$) erreichen. Das 275 kb zentromerisch lokalisierte *Histon-Deacetylase 4* (*HDAC4*)-Gen ist ein interessantes Kandidatengen, da mit dem *HDAC9*-Gen, welches in der GWAS von Brockschmidt et al. (2011) als Kandidatengen identifiziert wurde, ein weiteres Gen aus dieser Genfamilie (Martin et al., 2009; Verdin et al., 2003) in Zusammenhang mit AGA identifiziert wurde. Das *HDAC4*-Gen liegt auf dem langen Arm des Chr. 2 (2q37.3) und erstreckt sich über einen Bereich von etwa 353 kb. Es besteht aus 27 Exons und kodiert mit der HDAC4 ein Enzym aus der Familie der Histondeacetylasen (HDAC), deren Mitglieder für die Modifizierung von Histonen verantwortlich sind (Strachan und Read, 2005). Proteine der HDAC-Familie sind Bestandteil der Genregulation. Sie regulieren den Zugang von Transkriptionsfaktoren zu der im Zellkern um Histone gewickelten und eng verpackten DNA (de Rooter et al., 2003; Fu et al., 2004; Haberland et al., 2009; Pazin und Kadonaga, 1997; Wolffe, 1997). Histone dienen dabei der strukturellen Organisation der Chromosomen. Aufgrund der

positiven Ladung der Histone durch basische Aminosäuren haben sie eine hohe Affinität zu negativ geladener DNA und können diese daher binden. Durch die Bindung an Histone und dieser eng verpackten Form ist die DNA biologisch nicht aktiv, da aufgrund der schlechten Zugangsmöglichkeit für Transkriptionsfaktoren die Transkription von Genen gehemmt wird (Knezetic und Luse, 1986; Lorch et al., 1987). Grundlagen für die regulatorische Funktion der Transkription sind posttranskriptionale Modifikationen von Histonen, die in Form von Acetylierung, Deacetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung oder ADP-Ribosylierung vorkommen (Cheung et al., 2000; Grant, 2001; Spotswood und Turner, 2002). Die Acetylierung von Histonen wird durch die Histon-Acetyltransferasen (HAT) katalysiert. Sie übertragen Acetylreste von Acetyl-CoA auf die Aminogruppe eines Lysinrestes. Durch die Acetylierung kann die Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren erleichtert werden, indem die Bindung durch die elektrische Ladung zwischen DNA und Histonen reduziert wird und dadurch die Auflockerung des Chromatins ermöglicht wird (Bauer et al., 1994; Grant und Berger, 1999; Lee et al., 1993; Roth et al., 2001; Ruthenburg et al., 2007). Gegenspieler der HAT sind die HDACs, die in vier verschiedenen Klassen vorkommen (I, IIa, IIb und IV). Sie sind für die Deacetylierung der Lysinreste zuständig und führen zu einer positiven Ladung des Lysinrestes und damit zu einer kompakten Packung der DNA und Blockierung der Transkription (de Ruiter et al., 2003; Fu et al., 2004; Haberland et al., 2009; Pazin und Kadonaga, 1997; Wolffe, 1997) (Abb. 3).

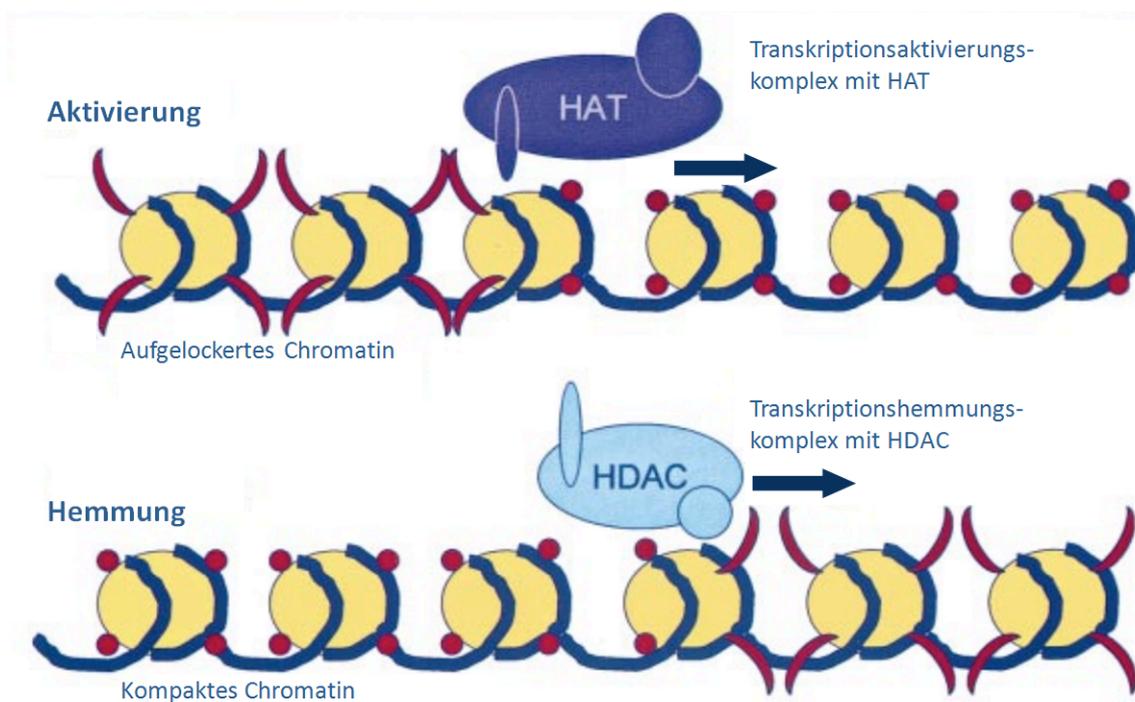


Abb. 3: Schematische Darstellung der Transkriptionsaktivierung und -hemmung durch Histon-Acetyltransferasen und Histon-Deacetylasen. Die gelben Kreise stellen die Kernhistone dar, die von DNA (blau) umwunden werden. In der Abbildung werden die acetylierten Histonchwänze als rote Sicheln dargestellt, während die deacetylierten Histonchwänze als rote Kreise dargestellt werden. Die Pfeile zeigen die Richtung an, in die sich der jeweilige Komplex bewegt. Die Abbildung stellt den Prozess dar, wie das Chromatin durch HAT aufgelockert bzw. durch HDAC verpackt wird. Darüber hinaus sind diverse Kofaktoren notwendig, die als Kreise bzw. Ellipsen in den jeweiligen Komplexen abgebildet sind. Abkürzungen: HAT = Histon-Acetyltransferase; HDAC = Histon-Deacetylase (modifiziert nach de Ruijter et al. (2003)).

HDACs der Klasse IIa, zu denen HDAC4 sowie HDAC9 zählen (Fischle et al., 2001; Parra und Verdin, 2010), dienen im Zusammenspiel mit Transkriptionsfaktoren der MEF2-Familie als Transkriptionskorepressoren durch Deacetylierung der nukleären Histone (Martin et al., 2007; Wang et al., 1999). In diesem Zusammenhang berichten Wyce et al. (2010) auch über eine funktionelle Interaktion zwischen dem Transkriptionsfaktor MEF2C und dem AR im Skelettmuskel. HDAC4 besitzt eine zentrale Rolle in der Skelettentwicklung, indem es die Hypertrophie von Chondrozyten während der Skeletogenese kontrolliert (Vega et al., 2004). Ebenso ist eine nukleare Anhäufung von HDAC4 mit Einschränkung der Androgensensitivität in hormonrefraktären Prostatakarzinomen vergesellschaftet (Halkidou et al., 2004). Jeong et al. (2004) berichteten, dass der Transkriptionsfaktor ARR19 HDAC4 rekrutiert, um die androgen-regulierte Genexpression zu hemmen. Darüber hinaus konnten Suh et al. (2008) zeigen, dass HDAC4 an der CRIF1-vermittelten Hemmung der AR-Transaktivierung beteiligt ist. Kürzlich konnten Yang et al. (2011) zeigen, dass HDAC4 mit dem AR interagiert, indem es die AR-Aktivität

durch Rezeptor-Sumoylierung, einer posttranskriptionalen Modifikation, hemmt. Durch den Assoziationsbefund am *HDAC4*-Lokus (MAAN, eingereicht) und der Erkenntnis, dass HDAC4 über verschiedene Transkriptionsfaktoren mit dem AR interagiert (Jeong et al., 2004; Suh et al., 2008; Wyce et al., 2010; Yang et al., 2011) sowie der Tatsache, dass mit *HDAC9* ein weiteres Gen der HDAC-Familie hinsichtlich AGA assoziiert gefunden wurde (Brockschmidt et al., 2011; MAAN, eingereicht), stellt *HDAC4* ein interessantes Kandidatengen für die AGA dar.

2.3 Zielsetzung der Arbeit

Durch die Metaanalyse des MAAN-Konsortiums (MAAN, eingereicht) wurden sechs neue Suszeptibilitätsloki für die AGA identifiziert. Der stärkste neue Assoziationsbefund wurde hier auf Chr. 2q37 identifiziert (bester Assoziationsbefund für rs9287638), an dem auch ein vielversprechendes Kandidatengen, das *HDAC4*-Gen lokalisiert ist. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diesen neuen Suszeptibilitätslokus weiter aufzuarbeiten. Zu diesem Zweck sollte eine genetische Feinkartierung dieses Lokus mittels Sequenom-Technologie in einem Kollektiv von 763 schwer von einer AGA betroffenen Männern und 272 Superkontrollen durchgeführt werden. Zusätzlich sollte die gleiche Feinkartierung in einem familienbasierten Kollektiv mit 390 Familien erfolgen. Diese Analysen sollten weitere Hinweise auf die dem Assoziationssignal zugrundeliegende kausale Variante (bzw. das kausale Gen) liefern. Anschließend sollte eine Expressionsanalyse auf RNA-Ebene mittels quantitativer Real-Time PCR durchgeführt werden und das Expressionsprofil des favorisierten Kandidatengens *HDAC4* in verschiedenen Geweben näher charakterisiert werden, zu denen auch die AGA-Zielgewebe Haarschaft, Kopfhaut und Haut gehören. Darauf aufbauend sollte der mögliche Einfluss assoziierter Varianten auf die Expression von *HDAC4* mittels quantitativer Real-Time PCR untersucht werden. Dazu sollte ein bereits bestehendes Kollektiv von Haarspendern zunächst vergrößert werden und für den besten SNP der Feinkartierung genotypisiert werden. Anschließend sollten aus Haarschaften isolierte RNAs der Haarspender allel- und genotypspezifisch analysiert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten neue Erkenntnisse auf den zugrundeliegenden Pathomechanismus zur AGA liefern.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Geräte

Autoklav

- Systec D-150, Systec GmbH
- Varioklav® 135 S Dampfsterilisator, H + P Labortechnik GmbH

DNA-Bank/Verwaltung

- 2D CYPHER™ Tubes, ABgene Ltd.
- 2DCYPHER™ 1,2ml Cluster Tube Racks, ABgene Ltd.
- 2D CYPHER™ SmartScan Solo, ABgene Ltd.
- SmartScan™ 96, ABgene Ltd.

Eismaschine

- AF100, Scotman

DNA/RNA-Analyseinstrumente/Thermocycler

- MassARRAY™ Compact Analyzer, Bruker Daltonics Inc. für Sequenom® GmbH
- ABI Prism® 7900HT Fast Real Time PCR System (TaqMan), Applied Biosystems (Life Technologies) GmbH
- PTC-200, MJ Research

Nanodispenser

- MassARRAY™ Nanodispenser, SAMSUNG Techwin Co. Ltd. für Sequenom® GmbH

Nicht elektrische Geräte

- Med. Nadelhalter EN 11H, Everhards GmbH

Nukleinsäure-Isolierung

- Magnetic Separation Module I, Chemagen Biopolymer-Technologie AG

Nukleinsäure-Messgeräte

- NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer, Peqlab Biotechnology GmbH

Pipettierhilfen

- Biomek® NX MC, Laboratory Automation Workstation, Beckman Coulter GmbH
- Biomek® NX S8G Laboratory Automation Workstation, Beckman Coulter GmbH
- Multipette® plus, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH

- Transferpette®, BRAND GmbH & Co. KG
- Transferpette®-8, BRAND GmbH & Co. KG
- Transferpette®-8/-12 electronic, BRAND GmbH & Co. KG
- micro-classic Pipettierhelfer, BRAND GmbH & Co. KG
- Finnpipette® 16-Kanal, Thermo Electron Corp. über VWR International GmbH
- Cell Mate II, Matrix Technologies Corp., Thermo Fisher Scientific Inc.

Schüttel-, Misch- und Heizgeräte

- REAX 2, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
- UNIMAX 1010, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
- Vortex Genie 2, Scientific Industries Inc.
- Thermomixer comfort, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH

Trockenschrank

- T 20 P, Heraeus GmbH

Zentrifugen

- Megafuge 1.0 R, Heraeus GmbH
- Biofuge stratos, Heraeus GmbH
- Biofuge pico, Heraeus GmbH

3.2 Verwendete Chemikalien, Lösungen

Soweit möglich, wurden Chemikalien mit der Qualitätsbezeichnung „pro analysis“ verwendet.

- Ethanol absolut (C₂H₅OH) (EtOH), AppliChem GmbH
- Frischblutlysispuffer: 155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0,1 mM EDTA (pH 7,0)
- Isopropanol (C₃H₈O), AppliChem GmbH
- Kernlysispuffer: 10 mM Tris/HCl (pH 8,0), 400 mM NaCl, 2 mM EDTA (pH 8,0)
- Natriumchlorid (NaCl), Merck KGaA
- 13 % Natriumhypochlorit (NaOCl), AppliChem GmbH
- 0,4 % Natriumhypochlorit: 15,4 ml NaOCl, 484,6 ml H₂O dest.
- 10% Sodiumdodecylsulfat (C₁₂H₂₅NaO₄S) (SDS), Bio-Rad Laboratories GmbH
- Titriplex III (C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈ * 2 H₂O) (EDTA), Merck KgaA
- Tris, ICN Biomedicals
- Tris-EDTA (TE⁻⁴): 0,1 mM EDTA, 10 mM Tris-Cl pH 8,0

3.3 Ergänzende Materialien zur Analyse von Nukleinsäuren

- dNTPs [10mM], Labomedic GmbH
- HotStar Taq DNA Polymerase [5 U/μl], Qiagen GmbH
- MgCl₂ [25mM], Qiagen GmbH
- PCR Puffer (10x) mit MgCl₂ [15 mM], Qiagen GmbH
- Pronase E, Roche Molecular Biochemicals
- Proteinase K, Qiagen GmbH
- RNAlater™, Qiagen GmbH
- RNase-Zap-Lösung, Qiagen GmbH
- Oligonukleotid-Primer, Metabion GmbH

3.4 Spezifische Plastik- und Einwegmaterialien

- Luer-Adapter, Sarstedt AG & Co.
- Multifly® Set, Sarstedt AG & Co.
- OMNISCAN 40 (1,0 ml) Insulinspritzen U-40 (0,30x12 mm), B. Braun Melsungen AG
- RNase-freie Filter-Pipettenspitzen, MAXYMum Recovery durch Axygen, Inc.
- S-Monovette EDTA-Röhrchen, Sarstedt AG & Co.
- Vacutainer-Adapter, Becton Dickinson GmbH

3.5 Kommerzielle Systeme (Kits) und Materialien

- Chemagic DNA Blood Kit special, Chemagen Biopolymer-Technologie AG
- iPLEX™ Gold Reagent Kit, Sequenom® GmbH
- Human Multiple-Tissue cDNA (MTC™) Panels I/II, (Takara Bio Europe/Clontech)
- PAXgene™ Blood RNA Tubes, PreAnalytix durch Qiagen GmbH
- PAXgene™ Blood RNA Kit, PreAnalytix durch Qiagen GmbH
- RNeasy® Micro Kit, Qiagen GmbH

- RNase-free DNase Set, Qiagen GmbH
- SpectroCHIP® Arrays & Clean Resin Kit, Sequenom® GmbH
- SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR, Invitrogen (Life Technologies) GmbH
- TaqMan Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems (Life Technologies) GmbH
- TaqMan® Gene Expression Master Mix, Applied Biosystems (Life Technologies) GmbH
- TaqMan® Gene Expression Assay “Hs00195814_m1” (HDAC4), Applied Biosystems (Life Technologies) GmbH
- TaqMan® Endogenous Control Assay Human Cyc “4326316E” (Cyclophilin), Applied Biosystems (Life Technologies) GmbH

3.6 Software und Datenbanken

- Assay Design 3.1, Sequenom® GmbH
- Biomek® Software 3.2, Beckman-Coulter GmbH
- 2D CYPHER™ Pilot Databases, ABgene Ltd.
- Haploview 4.2 (<http://www.broadinstitute.org/scientific-community/science/programs/medical-and-population-genetics/haploview/haploview>)
- <http://www.1000genomes.org>
- <http://genome.ucsc.edu>
- <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>
- <https://mysequenom.com>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- MassARRAY™ Nanodispenser v2.10, SAMSUNG Techwin Co. Ltd. für Sequenom® GmbH
- mRNA by SNP Browser 1.0.1 (1/3/2008)
- NanoDrop® ND-100 v3.3.0, Peqlab Biotechnology GmbH
- R (Version 2.10.1), The R Foundation for Statistical Computing (<http://www.r-project.org>)
- RT-Workstation 3.3, Sequenom® GmbH
- SDS 2.2.2, Applied Biosystems (Life Technologies) GmbH

- SpectroACQUIRE, v3.3.1.3, Sequenom® GmbH
- Typer 3.4 und 4.0, Sequenom® GmbH

3.7 Probandenmaterial

Im Rahmen der Probandenrekrutierung lagen für alle Kollektive Genehmigungen der Ethikkommissionen Bonn und Düsseldorf vor, zudem hatte jeder Proband sein schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an der Studie erklärt.

Probandenkollektiv für die Feinkartierung

Das „Kollektiv der androgenetischen Alopezie“ (ANA) bestand zum Zeitpunkt der Analysen aus insgesamt 1.965 Individuen, die über mehrere Jahre hinweg rekrutiert wurden. Um ein ethnisch möglichst homogenes Kollektiv zu erhalten, wurden ausschließlich gesunde und deutschstämmige Probanden rekrutiert, wobei die Herkunft der Großeltern für die Deutschstämmigkeit ausschlaggebend war. Um möglichst schwerbetroffene Probanden zu rekrutieren, wurden nur Betroffene bis 30 Jahre in den Hamilton-Norwood-Stadien IV-VII und bis 40 Jahre in den Stadien V-VII rekrutiert. Anhand dieser Kriterien wurden die 10 % der am schwersten von einer AGA betroffenen der entsprechenden Altersklassen rekrutiert. Soweit möglich wurden die Eltern der betroffenen Personen (Indexpatienten) sowie vorhandene, ebenfalls betroffene Geschwister der Indexpatienten rekrutiert. Das Kollektiv setzte sich final aus 373 Einzelbetroffenen ohne Familienanhang und 390 Familien mit zum Teil weiteren betroffenen Geschwistern der Indexpatienten zusammen. Als Kontrollen wurden Männer im Alter von > 60 Jahren ohne AGA rekrutiert (Hamilton-Norwood Status I; n = 272). Dabei handelt es sich um die 20 % der am wenigsten von einer AGA betroffenen Männer, welche im Folgenden als „Superkontrollen“ bezeichnet werden.

Die Rekrutierung des ANA-Kollektivs erfolgte in der Klinik für Dermatologie des Universitätsklinikum Düsseldorf, wo neben einer dermatologischen Beurteilung des Hamilton-Norwood-Status der Teilnehmer der gegenwärtige Zustand des Haupthaars fotografisch dokumentiert wurde. Alle Probanden wurden anonymisiert in eine Datenbank aufgenommen.

Für die Gewinnung von DNA im ANA-Kollektiv wurden jedem Probanden 30 ml Blut in Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Röhrchen entnommen.

Probandenkollektiv für die Untersuchung der Genexpression

Die Rekrutierung der Haarspenderkontrollen (HSK) erfolgte im Institut für Humangenetik des Universitätsklinikum Bonn und umfasste zum Zeitpunkt der hier durchgeführten Analysen 188 Männer und 55 Frauen. Voraussetzung für die Aufnahme in das Kollektiv war ein Alter zwischen 20 und 40 Jahren und eine deutsche Abstammung bis einschließlich zur Großelterngeneration. Der Haarstatus spielte bei der Rekrutierung keine Rolle. Alle Probanden wurden anonymisiert in eine Datenbank aufgenommen. Für die Gewinnung von DNA-Material im HSK-Kollektiv wurden den Probanden 9 ml venöses EDTA-Blut entnommen. Die Lagerung der für die DNA-Isolation vorgesehenen Proben erfolgte bei 4°C zur weiteren Verarbeitung. Im Falle eines längeren Lagerungszeitraums wurden die Proben bei -20°C gelagert. Zur RNA-Extraktion wurden allen Probanden 5 ml Vollblut in kommerziell erworbene PAXgene™ Blood RNA -Tubes entnommen und den männlichen Probanden zusätzlich etwa 30-50 Haare aus dem Okzipitalbereich ausgerissen. Die Lagerung der PAXgene™ Blood RNA -Tubes erfolgte nach Entnahme für 2 h bei Raumtemperatur (RT) zur weiteren Verarbeitung bzw. im Falle eines längeren Lagerungszeitraums bei -20°C.

3.8 Gewinnung von Nukleinsäuren

3.8.1 Isolierung von DNA

Die für die Analysen verwendete DNA wurde aus kernhaltigen Leukozyten der Probandenblutproben extrahiert. Durch die Verwendung von EDTA sollte eine Koagulation verhindert werden, indem EDTA als Chelatbildner das in der Blutgerinnungskaskade notwendige Ca^{2+} irreversibel komplexiert. Die Extraktion der DNA erfolgte durch die Aussalzmethode nach Miller et al. (1988) oder mittels Chemagen Magnetic Separation Modul I. Bei der Aussalzmethode werden 10 ml Frischblut mit 30 ml Frischblutlysispuffer versetzt. Es folgt ein mehrfaches Invertieren, 15 min Lyse auf Eis und Zentrifugieren des Reaktionsgemisches für

15 min bei 4°C und 1.500 rpm. Anschließend wird der Überstand dekantiert. Es folgt das vorsichtige zweimalige Waschen des verbliebenen Leukozytenpellet mit je 5 ml Kernlysispuffer und eine Resuspension in 10 ml Kernlysispuffer. Daraufhin wird das Reaktionsgemisch mit 660 µl 10 % Sodiumdodecylsulfat (SDS) und 500 µl Pronase E (20 mg/ml) versetzt und über Nacht bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von 3,2 ml NaCl-Lösung (6 M) und kräftiges Schütteln des Reaktionsgemisches. Dann wird das Reaktionsgefäß 10 min bei 4.000 rpm zentrifugiert, mehrfach invertiert und 10 min bei 4.000 rpm und RT zentrifugiert. Anschließend wird das Proteinpellet verworfen. Der Überstand wird daraufhin mit 1 Volumen 100 % Isopropanol versetzt und bis zum Ausfallen der DNA geschwenkt. Anschließend wird die DNA mit Hilfe eines sauberen Glashakens aus der Lösung „gefischt“ und mittels 70 % Ethanol (EtOH) in 500 µl Tris-EDTA (TE⁻⁴) gelöst.

Beim Chemagen Magnetic Separation Modul I handelt es sich um ein automatisiertes System, bei dem die DNA aus dem Blut durch selektive Bindung an magnetische Kügelchen (Beads) aufgereinigt wird. Zunächst ist es notwendig, die Zellkerne der Leukozyten zu öffnen, um die im Zellkern lokalisierte DNA zu mobilisieren. Dieser Vorgang geschieht durch einen Kernlysepuffer. Die nun freigewordene DNA kann anschließend an die Beads binden. Hierbei handelt es sich um magnetische Beads, die spezifische Eigenschaften besitzen, um DNA selektiv zu binden. Im Anschluss daran können die Beads samt gebundener DNA aufgrund ihrer magnetischen Eigenschaft aus der Reaktionslösung entnommen werden. In folgenden Waschvorgängen wird die DNA von störenden Blutkomponenten wie Proteinen, Salzen, Thrombozyten oder sonstigen Zelltrümmern gereinigt. Abschließend erfolgt die Trennung der gereinigten DNA von den Beads durch gezieltes Abschalten der magnetischen Wirkung und eine Eluierung der DNA in TE⁻⁴. Die extrahierte DNA wurde als Stocklösung bei -80°C eingelagert.

3.8.2 Isolierung von RNA

Arbeiten mit RNA erfordern grundsätzlich besondere Vorsicht und Sorgfalt. Aufgrund der Stabilität von RNasen, die auch nach Autoklavierung schnell renaturieren können (Madabusi et al., 2006; Sela et al., 1957), besteht die Gefahr des enzymatischen Abbaus sowie spontaner Hydrolyse von RNA. Für den experimentellen Umgang ist es daher unumgänglich, einen

möglichst RNase-freien Arbeitsbereich zu schaffen. Dies betrifft neben dem Arbeitsplatz auch die genutzten Chemikalien sowie die eingesetzten Geräte. Aufgrund des Temperaturoptimums von RNasen bei etwa 37°C und ihrem ubiquitären Vorkommen, ist es notwendig, RNA-Arbeiten auf Eis durchzuführen und Handschuhe zu tragen. Handschuhe, Pipetten und der Arbeitsplatz wurden vor RNA-Arbeiten mit 70 % EtOH oder mit RNase-Zap-Lösung behandelt. Für Pipettierarbeiten wurden RNase-freie Filter-Pipettenspitzen sowie RNase-freies Wasser genutzt. Die Extraktion von RNA aus humanen Vollblutproben erfolgte mittels kommerziell erworbenen PAXgene™ Blood RNA-System (Qiagen GmbH). Die für die Blutentnahme vorgesehenen Tubes, die jeweils 2,5 ml Blut aufnehmen können, enthalten zusätzlich eine bereits vorgelegte Reagenz, die die RNA vor dem Abbau durch RNasen schützt und darüber hinaus Änderungen der Genexpression nach der Blutentnahme weitestgehend reduziert. Nach Blutentnahme wurden die Tubes manuell mehrfach invertiert und anschließend für ca. 2 Stunden bei RT inkubiert. Prinzip des folgenden Isolierungsverfahrens ist die Bindung von RNA an eine Silica-Gel-Membran. Der Ablauf der RNA-Extraktion erfolgte im Detail nach folgendem, vom Hersteller empfohlenem Schema:

1. Zentrifugieren der PAXgene™ Blood RNA Tubes für 10 min bei 3.500 rpm.
2. Vorsichtiges Entfernen des Überstands durch Dekantieren.
3. Resuspension durch Hinzugeben von 4 ml RNase-freiem Wasser zum Pellet und Zentrifugieren für 10 min bei 3.500 rpm.
4. Verwerfen des Überstands und Lösen des Pellet in 350 µl Resuspensionspuffer (BR1).
5. Überführen der Probe in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß und hinzugeben von 300 µl Bindungspuffer (BR2) und 40 µl Proteinase K.
6. Vortexen der Probe und Inkubation für 10 min bei 55°C im Thermomixer bei 1.000 rpm.
7. Pipettieren des Lysats in eine PAXgene™ Homogenisier-Spinsäule und Zentrifugieren für 3 min bei 13.000 rpm.
8. Überführen des Überstands in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß und hinzugeben von 350 µl 100 % EtOH. Anschließend kurzes Mischen und Anzentrifugieren für 1-2 sec.
9. Pipettieren von 700 µl der Probe in eine PAXgene™ RNA-Spinsäule und Zentrifugieren für 1 min bei 13.000 rpm. Sammelgefäß samt Durchfluss verwerfen.
10. Pipettieren der restlichen Probe auf die - mit neuem Sammelgefäß versehene - Säule und Zentrifugieren für 1 min bei 13.000 rpm. Sammelgefäß samt Durchfluss verwerfen.

11. Hinzugeben von 350 µl Waschpuffer 1 (BR3) auf die - mit neuem Sammelgefäß versehene - Säule und Zentrifugieren für 1 min bei 11.000 rpm. Sammelgefäß samt Durchfluss verwerfen.
12. 10 µl DNase I und 70 µl DNA-Verdaupuffer zusammen in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettieren und vorsichtig mischen.
13. Gemisch aus Schritt 12. auf die Membran der mit neuem Sammelgefäß versehenen Säule pipettieren und anschließend 15 min bei RT inkubieren.
14. Hinzugeben von 350 µl Waschpuffer 1 (BR3) auf die Säule und Zentrifugieren für 1 min bei 11.000 rpm. Sammelgefäß samt Durchfluss verwerfen.
15. Hinzugeben von 500 µl Waschpuffer 2 (BR4) auf die mit neuem Sammelgefäß versehene Säule und Zentrifugieren für 1 min bei 11.000 rpm. Sammelgefäß samt Durchfluss verwerfen.
16. Wiederholung des Waschschrilles 15. und Zentrifugieren für 3 min bei 11.000 rpm. Sammelgefäß samt Durchfluss verwerfen.
17. Zentrifugieren der mit neuem Sammelgefäß versehenen Säule für 1 min bei 11.000 rpm.
18. Überführen der Säule in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß.
19. Zur Elution der RNA Hinzugeben von 70 µl Elutionspuffer (BR5) direkt auf die Membran und Zentrifugieren für 1 min bei 10.000 rpm. Zur Steigerung der Ausbeute das gewonnene Eluat erneut direkt auf die Membran auftragen und abermals für 1 min bei 10.000 rpm zentrifugieren.
20. Anschließend Inkubation des Eluats für 5 min bei 65°C im Thermomixer und abschließende sofortige Überführung auf Eis.

Die gewonnene RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Neben der Blutentnahme wurden den HSK-Probanden, die auf ihre Genexpression hin untersucht wurden, Haare aus dem Okzipitalbereich des Kopfes mittels eines medizinischen Nadelhalters ausgerissen. Aus diesem AGA-Zielgewebe wurde zum Zwecke der Expressionsuntersuchung RNA isoliert. Hierfür wurde der Nadelhalter vor jeder Probenexzision mit 100 % EtOH gereinigt, um eine Degradierung der RNA durch RNasen weitestgehend zu vermeiden. Aufgrund der Expressionsvariabilität im Tagesverlauf (Harms et al., 2004) wurde das Ausreißen der Haare ausschließlich vormittags durchgeführt. Hierfür wurden nach dem Ausreißen die proximalen Haarschäfte mit einer Schere abgeschnitten und in ein Gefäß überführt, das mit 500 µl RNeasy Lysis Solution (Qiagen GmbH) gefüllt war. RNeasy Lysis Solution ermöglicht eine Stabilisierung der RNA *ex vivo*, womit die Qualität und Quantität der RNA sichergestellt

wird. Die Extraktion von RNA aus proximalen Haarschäften erfolgte mittels kommerziell erworbenen RNeasy® Micro Kit (Qiagen GmbH) nach folgendem vom Hersteller empfohlenen, aber modifizierten Schema:

1. Zentrifugieren der in RNAlater™ gelagerten Haarschäfte für 5 min bei 13.000 rpm.
2. Vorsichtiges Entfernen des RNAlater™-Überstandes.
3. Hinzugeben von 300 µl RLT-Pufferlösung zur Lyse des Gewebes.
4. Vortexen des Gemisches für ca. 1 min.
5. Hinzugeben von 590 µl RNase-freiem Wasser.
6. Hinzugeben von 20 µl Proteinase K Solution (20 mg/ml) und vermischen mittels Pipette.
7. Inkubation des Reaktionsgemisches für 10-15 min bei 55°C im Thermomixer bei 500 rpm.
8. Zentrifugieren des Reaktionsansatzes für 3 min bei 13.000 rpm.
9. Überführung des Überstandes (ca. 900 µl) in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß.
10. Hinzugeben von 450 µl 96-100 % EtOH (Hälfte des Überstand-Volumen aus Schritt 9.) zum gesäuberten Lysat und vorsichtiges vermischen mittels Pipette.
11. Auftragen von 700 µl der Lösung auf ein RNeasy® mini column (2 ml Sammelröhrchen) und zentrifugieren für 15 sec bei 11.000 rpm. Der Durchlauf wird verworfen.
12. Wiederholung von Schritt 11 mit dem Rest der Probe.
13. Hinzugeben von 350 µl RW1-Puffer auf die Säule und zentrifugieren für 15 sec bei 11.000 rpm. Der Durchlauf wird verworfen.
14. Hinzugeben von 80 µl DNase-Inkubationsmix (10 µl DNase I-Lösung und 70 µl RDD-Puffer) direkt auf die Silica-Gel-Membran und Inkubation der DNase-Verdau-Reaktion für 15 min bei RT.
15. Hinzugeben von 350 µl RW1-Puffer auf die Säule zum Stopp des DNase-Verdau und zentrifugieren für 15 sec bei 11.000 rpm. Das Sammelröhrchen wird samt Durchfluss verworfen.
16. Überführen der Säule in ein neues 2 ml-Sammelgefäß und hinzugeben von 500 µl RPE-Puffer auf die Säule. Abschließend zentrifugieren für 15 sec bei 11.000 rpm. Der Durchfluss wird verworfen.
17. Hinzugeben von 500 µl RPE-Puffer auf die Säule und Zentrifugieren für 2 min bei 11.000 rpm.
18. Überführen der Säule in ein neues 2 ml-Sammelgefäß und Zentrifugieren für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zur Entfernung von Pufferresten auf der Silica-Gel-Membran.
19. Überführung der Säule in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß und Pipettieren von 75 µl RNase-freien Wasser auf die Silica-Gel-Membran zur Elution der RNA. Anschließend verschließen der Säule und Zentrifugieren für 1 min bei 11.000 rpm.

20. Aufnahme des Eluat mittels Pipette und erneutes Auftragen auf die Säule zur Steigerung der Gesamtausbeute und Zentrifugieren für 1 min bei 11.000 rpm.
21. Inkubation der gewonnenen RNA für 5 min bei 65°C im Thermomixer. Anschließend Lagerung auf Eis.

Bis zur weiteren Verwendung in den Expressionsuntersuchungen wurde die isolierte RNA bei -80°C gelagert.

3.8.3 Die Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Um eine RNA im Rahmen von Expressionsuntersuchungen zu analysieren, wird sie zunächst in eine DNA-Kopie (*copy-DNA*, cDNA) umgeschrieben, da diese stabiler ist und keiner RNase-Degradation unterliegt. Dies wird mit dem Enzym Reverse Transkriptase katalysiert. Bei der cDNA handelt es sich um einen einzelsträngigen, zur RNA komplementären DNA-Strang. Der ganze Prozess wird als Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) bezeichnet. Neben der Reversen Transkriptase spielt der RNase-Inhibitor „*RNaseOut*“ eine wesentliche Rolle, der den Abbau der RNA verhindern soll. Für eine RT-PCR wurde das „*SuperScript™ III First Strand Synthesis System for RT-PCR*“ gemäß Protokoll der Herstellerfirma Invitrogen (Life Technologies) verwendet:

1. Zusammenpipettieren von folgendem RNA/Primer-Mix:

Tab. 1: Pipettierschema für den RNA-Primer-Mix. Abkürzungen: oligo(dT) = Oligonukleotid-Primer; dNTP = Desoxyribonukleosidtriphosphat; H₂O = Wasser; dest. = destilliert.

Reagenz	Mengenangabe pro Reaktionsansatz [µl]
50 µM oligo(dT) Primer	1
10 mM dNTP Mix	1
RNA + H ₂ O dest. je nach RNA-Ausgangskonzentration	8
Gesamtvolumen	10

2. Der Ansatz wird 5 min bei 65°C inkubiert und anschließend mindestens für 1 min auf Eis gestellt.
3. Der cDNA Synthese-Mix wird pro Ansatz nach folgendem Schema hergestellt:

Tab. 2: Pipettierschema für den cDNA Synthese-Mix. Abkürzungen: MgCl₂ = Magnesiumchlorid; DTT = Dithiothreitol; RNaseOut = RNase-Inhibitor.

Reagenz	Mengenangabe pro Reaktionsansatz [μl]
10x RT Puffer	2
25 mM MgCl ₂	4
0,1 M DTT	2
RNaseOut [40 U/μl]	1
SuperScript III™ Reverse Transkriptase [200	1
Gesamtvolumen	10

4. Der cDNA Synthese-Mix wird zum RNA/Primer-Mix hinzupipettiert, vermischt und anschließend zentrifugiert.
5. Zur Herstellung der cDNA, Inkubation des Reaktionsgemisches für 50 min bei 50°C im Thermomixer.
6. Die Reaktion wird für 5 min bei 85°C durch Inaktivierung der Reversen Transkriptase beendet und umgehend auf Eis gestellt.
7. Abzentrifugieren des Ansatzes, anschließend Hinzugeben von 1 μl RNase H und Inkubieren des Mixes für 20 min bei 37°C zum Abbau der verbliebenen RNA.
8. Die fertige cDNA wird auf Eis gestellt oder bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

In unseren Experimenten wurden stets 400 ng RNA als Ausgangsmaterial in einer RT-PCR eingesetzt.

3.9 Analyse von Nukleinsäuren

3.9.1 Qualitäts- und Quantitätsbestimmung von RNA und DNA

Jede isolierte RNA oder DNA wurde vor Verwendung in ihrer Qualität (Reinheit) und Quantität (Konzentration) beurteilt. Hierfür wurde das NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer mit dem zugehörigen Softwaremodul „*Nucleic Acids*“ (Peqlab Biotechnology GmbH) genutzt. Die Qualität und Quantität werden hier photometrisch bestimmt. Bereits 1 μl einer DNA oder RNA reicht für eine aussagekräftige Messung aus. Die Bestimmung der Konzentration der jeweiligen DNA bzw. RNA basiert auf der Messung der optischen Dichte (OD). Während das Absorptionsmaximum von EtOH, Proteinen sowie den in der Lösung zurückbleibenden Salzen bei einer Wellenlänge

von etwa 280 nm liegt, befindet sich das Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von etwa 260 nm. Vor diesem Hintergrund und mit Hilfe der OD bei 260 nm lässt sich die Konzentration unter Berücksichtigung des Lambert-Beerschen-Gesetzes berechnen. Darüber hinaus kann die Qualität, also die Reinheit der Probe, aus dem Verhältnis der beiden optischen Dichten (OD_{260nm}/OD_{280nm}), bestimmt werden. Während man Werte zwischen 1,7 und 1,8 für eine gute DNA-Qualität sprechen, sprechen Werte um 2,0 für eine gute RNA-Qualität. Im weiteren Verlauf wurden für die Experimente DNA-Verdünnungen in einer Konzentration von 100 ng/ μ l und für die Analysen in einer Konzentration von 20 ng/ μ l für das DNA-Verwaltungssystem ABgene (ABgene Ltd.) hergestellt.

3.9.2 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die von Mullis und Faloona (1987) entwickelte Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Möglichkeit, bestimmte DNA- bzw. cDNA-Abschnitte gezielt *in vitro* zu vervielfältigen, um Analysen daran durchführen zu können. Hierzu werden Oligonukleotide (Primer) benötigt, die notwendigerweise als Startsequenz für die Taq-Polymerase dienen und auf dem Vorwärts- (*forward*, F) und Rückwärts- (*reverse*, R) Strang binden. Ebenso wird ein Enzym, die Taq-Polymerase, benötigt, die dafür verantwortlich ist, die gebundenen Primer sequenzspezifisch mit freien Nukleotiden (Desoxyribonukleosidtriphosphate, dNTPs) zu verlängern. Darüber hinaus wird für eine PCR ein Puffer sowie Magnesiumchlorid benötigt. Ein Zyklus der PCR gliedert sich in drei Abschnitte, deren Temperaturwechsel - neben verschiedenen Zusatzreagenzien - Grundlage für die PCR sind: In der Denaturierungsphase, die bei 90-95°C stattfindet, wird die zu amplifizierende doppelsträngige DNA in Einzelstränge aufgetrennt, um in der Folgephase für die anzulagernden Primer zugänglich zu werden. In der anschließenden Hybridisierungsphase, bei der ein Temperaturoptimum primerabhängig zwischen 45-65°C benötigt wird, binden die Primer sequenzspezifisch an die komplementäre genomische Sequenz. In der abschließenden Elongationsphase, die bei 72°C liegt und bei der die Taq-Polymerase ihr Temperaturoptimum hat, erfolgt die Verlängerung der angelagerten F- bzw. R-Primer beginnend am 3'-Ende, indem dNTPs sequenzspezifisch eingebaut werden. In Abhängigkeit der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments benötigt die Taq-Polymerase in etwa eine Minute für 1.000

eingebaute Nukleotide, so dass eine klassische Elongationsphase mit 30-60 sec. angesetzt wird, da die zu vervielfältigenden Sequenzabschnitte in der Regel weniger als 1.000 Basenpaare umfassen. Nach Ende eines Zyklus startet die dreiphasige PCR erneut. Durch 30- bis 40-fache Wiederholung eines Zyklus ist es möglich, die gewünschten DNA-Abschnitte exponentiell zu vervielfältigen.

3.9.3 Aufarbeitung genetischer Suszeptibilitätsloki

Um einen genetischen Suszeptibilitätslokus detailliert aufzuarbeiten, wird ein solcher Locus häufig durch eine Feinkartierung analysiert. Dazu macht man sich das Kopplungsungleichgewicht (*linkage disequilibrium*, LD) zunutze, wodurch das humane Genom eine charakteristische Blockstruktur bekommt. Dabei werden Varianten, die in einem Block lokalisiert sind, häufig gekoppelt, das heißt in Abhängigkeit voneinander weitervererbt. Die in der Meiose stattfindende Rekombination unter anderem durch das Überkreuzen (*crossingover*) zweier homologer Chromosomen, ist hierfür die Grundlage. Rekombination findet dabei nicht willkürlich irgendwo im Genom statt, sondern an bestimmten bevorzugten Stellen (*hot spots*), so dass Chromosomenabschnitte blockweise rekombiniert werden. Diesen Umstand kann man sich in genetischen Analysen zunutze machen, denn durch das vorhandene LD in einem Block kann man die Ausprägung von benachbarten Varianten vorhersagen. Als Konsequenz muss man nicht jede Variante im Genom genotypisieren, sondern nur solche, die unabhängige Informationen liefern. Um diese Blockstruktur in einem populationsbasierten Genom zu bestimmen, kann man die sogenannten HapMap-Daten nutzen (The International HapMap Consortium, 2003). Als Grundlage dieser Arbeit wurde das populationsbasierte Genom von Bewohnern aus Utah mit Nord- und Westeuropäischer Abstammung (*Utah residents with Northern and Western European ancestry from the CEPH collection*, CEU, Release 28 aus August 2010, Phase I-III) genutzt, da dieses die LD-Informationen für unser deutsches Kollektiv widerspiegelt. Die Analyse der Blockstruktur eines Locus wird softwarebasiert mittels „Haploview 4.2“ durchgeführt (Barrett et al., 2005). Hierbei wird üblicherweise die Konfidenzintervalldefinition nach Gabriel et al. (2002) und ein Schwellenwert von $r^2 = 0,8$ gewählt. Dabei ist r^2 ein Maß für das LD, wobei Werte von 0 bis 1 erreicht werden können. Bei

einem $r^2 = 1$ spricht man von einem perfekten LD, so dass die beiden betrachteten Varianten gemeinsam vererbt werden. Bei einem LD von 0 liegt keine Kopplung vor, so dass die Varianten unabhängig voneinander weiter vererbt werden. Die „Unabhängigkeit“ ergibt sich dabei durch Rekombinationsereignisse, die zwischen zwei betrachteten Markern stattgefunden haben. Durch die in der o.g. Software integrierte Tagging-Funktion werden SNPs herausgefiltert, die redundante Informationen liefern und damit zu keinem weiteren Informationsgewinn führen.

3.9.4 Genotypisierung ausgewählter SNPs mittels Sequenom-Technologie

Für die Genotypisierung der Probanden-DNAs wurde nach Möglichkeit die Sequenom-Technologie verwendet, in der in einem einzigen Reaktionsansatz bis zu 40 SNPs parallel genotypisiert werden können, was man als Multiplex oder iPlex-Reaktion bezeichnet. Diese Technologie ist hocheffizient und basiert auf dem Grundprinzip einer PCR mit anschließender Massen-Extensions-Reaktion eines SNP-spezifischen, massenmodifizierten Zusatzprimers (Extensionsprimer) und einer abschließenden Analyse mittels MALDI-ToF-MS (*Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight Mass Spectrometry*)-Prinzip (Buetow et al., 2001; Haff und Smirnov, 1997; Tang et al., 1995):

In Vorbereitung des Experiments erfolgte zunächst das Primerdesign für die zu analysierenden SNPs (siehe Anhang I). Hierzu wurden die flankierenden Sequenzen dieser SNPs mit dem Online-Tool „*rs Sequence Retriever*“ (<https://www.mysequenom.com>) ermittelt sowie exportiert und anschließend im „*PreXTEND*“-Tool (<https://www.mysequenom.com>) zwecks SNP-Validierung und Auswahl der F- und R-Primer der Amplikons importiert. Anschließend erfolgte der Import der „*PreXTEND*“-Tool-Ergebnisse in die Software „*Assay Design 3.4*“, in der die benötigten Oligonukleotide (F-/R-Primer und Extensionsprimer) final bestimmt und in Multiplexreaktionen zusammengefasst werden. Die benötigten Primer (siehe Anhang II) wurden durch die Firma Metabion GmbH synthetisiert und abschließend nochmals in Ihrer Qualität überprüft. Zur Vorbereitung der Genotypisierung wurden die DNA-Proben in 384-Well-Platten vorpipettiert, wobei von jeder DNA 15 ng in ein Reaktionswell mittels Pipettierroboter vorgelegt und eingetrocknet wurden. Dazu wurden die benötigten DNAs zuvor mit Hilfe des ABgene Systems in Experimentier-Boxen (à 96 DNAs) zusammengefasst. Hierfür wurde die DNA-Arbeitsverdünnung

von 20 ng/μl verwendet. Aus diesen wurden mit Hilfe des Pipettierroboters „Biomex® NX S8G“ (Beckman-Coulter GmbH) 96-Well-Verdünnungsplatten mit einer DNA-Konzentration von 2,5 ng/μl hergestellt (4 μl DNA und 28 μl H₂O zu einem Gesamtvolumen von 32 μl pro Well). Mit Hilfe des Multichannel-Pipettierroboters „Biomex® NX MC“ (Beckman-Coulter GmbH) wurden aus vier dieser 96-Well-Platten jeweils 6 μl auf eine 384-Well-Platte pipettiert, was 15 ng DNA entsprach. Um eine Kontamination im Versuchsverlauf auszuschließen, wurden zur Qualitätskontrolle auf jeder 384-Well-Platte vier Negativproben (H₂O statt DNA) pipettiert. Abschließend wurde die 384-Well-Platte mit den DNAs abzentrifugiert und über Nacht bei RT eingetrocknet.

Zur Vorbereitung der PCR-Reaktionen wurden die F- und R-Primer einer Multiplex-Reaktion zunächst auf eine Konzentration von 500 nM in einem Mastermix zusammengefasst. Die Extensionsprimer wurden hingegen zunächst durch ein sogenanntes „Primeradjustment“ massenabhängig in Konzentrationsgruppen von 7 μM, 9,3 μM, 11,6 μM und 14 μM unterteilt (siehe Anhang II). Dies erfolgte mit Hilfe der Software „Typer 3.4“. Dabei wurden Extensionsprimer mit geringer Masse in die Gruppen mit niedriger Konzentration eingeteilt, während Extensionsprimer mit hoher Masse in hoher Konzentration benötigt wurden. Auch diese Primer wurden multiplexabhängig in einem Mastermix zusammenpipettiert.

In einer ersten PCR wurden zunächst die gewünschten SNP-Bereiche der vorliegenden DNA gezielt vervielfältigt. Zur Durchführung einer Multiplex-PCR wurde folgender PCR-Mastermix pipettiert:

Tab. 3: Pipettierschema für den PCR-Mastermix pro Reaktionsansatz und pro 384-Well-Platte inklusive Überhang.

Reagenz	Mengenangabe pro Reaktionsansatz [μl]	Mengenangabe pro Platte (x 500) [μl]
H ₂ O dest.	2,7	1.350
10x Puffer [15 mM MgCl ₂]	0,625	312,5
dNTPs [je 10 mM]	0,25	162,5
MgCl ₂ [25 mM]	0,325	125
PCR-Primer Mix [je 500 mM]	1	500
HotStart Taq-DNA-Polymerase [5 U/μl]	0,1	50
DNA	15 ng (eingetrocknet)	
Endvolumen	5	2.500

Bei einem Multiplexlevel von über 27 SNPs wurde der Anteil der Taq-Polymerase von 0,1 µl auf 0,15 µl pro Reaktionsansatz erhöht und die H₂O-Menge entsprechend reduziert. Die Verteilung des PCR-Mastermix erfolgte zunächst manuell auf eine 96-Well-Platte (jeweils 25 µl pro Well). Mit Hilfe des Multichannel-Pipettierroboters „Biomek® NX MC“ (Beckman-Coulter GmbH) wurden anschließend 4 x 5 µl pro Well entnommen und versetzt auf die 384-Well-Platte pipettiert, so dass alle Reaktionswells mit PCR-Mastermix gefüllt waren. Nach dem Versiegeln der 384-Well-Platte wurde die PCR nach folgendem Standard-PCR-Programm im Thermocycler durchgeführt:

Tab. 4: Programmkonfiguration im Thermocycler für die Standard-PCR.

		Reaktionsphase	Zeit	Temperatur
45 Zyklen		initiale Denaturierung	15 min	95°C
		Denaturierungsphase	20 sec	95°C
		Hybridisierungsphase	30 sec	56°C
		Elongationsphase	1 min	72°C
		finale Elongation	3 min	72°C
		Gesamtdauer	ca. 2,5 h	

Im nächsten Schritt mussten überschüssigen dNTPs entfernt werden, die im weiteren Experimentverlauf einen störenden Einfluss hätten. Dies erfolgte mittels *shrimp-alkaline-phosphatase* (SAP)-Verdau, wobei das SAP-Enzym überschüssige dNTPs dephosphoryliert und damit neutralisiert.

Für den SAP-Verdau wurde pro Reaktionswell folgender SAP-Mix hinzupipettiert:

Tab. 5: Pipettierschema für den SAP-Mix pro Reaktionsansatz und pro 384-Well-Platte inklusive Überhang.
Abkürzungen: SAP = *shrimp alkaline phosphatase*.

Reagenz	Mengenangabe pro Reaktionsansatz [µl]	Mengenangabe pro Platte (x 500) [µl]
H ₂ O dest.	1,53	765
10x SAP-Puffer	0,17	85
SAP-Enzym [1 U/µl]	0,3	150
Endvolumen	2	1000

Für die Nutzung des Pipettierroboters musste der SAP-Mix zunächst manuell auf eine 96-Well-Platte pipettiert werden (jeweils 10 µl pro Well). Aus dieser wurde der SAP-Mix mittels Pipettierroboter auf die 384-Well-Platte verteilt (jeweils 2 µl pro Well). Die 384-Well-Platte

wurde im Anschluss nach folgendem Standard-SAP-Programm im Thermocycler weiter prozessiert:

Tab. 6: Programmkonfiguration im Thermocycler für die Standard-SAP.

Reaktionsphase	Zeit [min]	Temperatur
SAP-Verdau	40 min	37°C
SAP-Inaktivierung	5 min	85°C
Gesamtdauer	45 min	

Im Anschluss an den SAP-Verdau erfolgte die Einzelbasen-Verlängerung (*single base extension*; SBE)-Reaktion. Zunächst bindet der Extensionsprimer unmittelbar vor dem jeweiligen SNP und wird anschließend durch ein massenmodifiziertes Didesoxynukleotidtriphosphat (ddNTP) sequenzspezifisch verlängert. Aufgrund der Tatsache, dass den ddNTPs im Vergleich zu den dNTPs eine Hydroxylgruppe am 3'-Kohlenstoffatom der Ribose fehlt, ist eine Kettenverlängerung mit einem weiteren Nukleotid über das eingebaute ddNTP hinaus nicht möglich, so dass der Extensionsprimer aufgrund der ausschließlich vorliegenden ddNTPs nicht weiter verlängert werden kann. Es kann demnach nur eine SNP-spezifische Base eingebaut werden. Die SBE-Reaktion wurde nach folgendem Schema pipettiert:

Tab. 7: Pipettierschema für den SAP-Mix pro Reaktionsansatz und pro 384-Well-Platte inklusive Überhang.
Abkürzungen: UEP = nicht verlängerter (*unextended*) Primer.

Reagenz	Mengenangabe pro Reaktionsansatz [μ l]	Mengenangabe pro Platte (x 500) [μ l]
H ₂ O dest.	0,619	309,5
10x iPLEX Gold Puffer	0,2	100
Termination Mix	0,2	100
UEP-Mix	0,94	470
iPLEX-Gold Enzym (Sequenase)	0,041	20,5
Endvolumen	2	1.000

Die Verteilung des SBE-Mix erfolgte analog der oben für den SAP-Mix beschriebenen Methode. Die 384-Well-Platte wurde nach folgendem Standard-iPLEX-Programm im Thermocycler prozessiert:

Tab. 8: Programmkonfiguration im Thermocycler für die Standard-iPlex.

		Reaktionsphase	Zeit	Temperatur
		initiale Denaturierung	30 sec	94°C
45 Zyklen	1x	Denaturierungsphase	5 sec	94°C
	5 Zyklen	Hybridisierungsphase	5 sec	56°C
		Elongationsphase	5 sec	72°C
		finale Elongation	3 min	72°C
			Gesamtdauer	ca. 4 h

Der SBE-Reaktion folgte die Aufreinigung der Reaktionsansätze mittels Resin. Hierbei handelt es sich um ein Ionenaustauscherharz (Oeth et al., 2005), das in der Lage ist, das Reaktionsprodukt zu entsalzen. Dies ist nötig, da im Reaktionsansatz vorhandene Kationen im weiteren Versuchsablauf stören können. Hierzu wurde Resin in einer speziellen 384-Well-Platte ausgestrichen, in der jedes Well etwa 6 mg Resin fasst. Das ausgestrichene Resin wird bei RT für mindestens 1 h getrocknet. Zwischenzeitlich wird in jedes Reaktions-Well der 384-Well-Platte 16 µl H₂O dest. zugegeben und die Platte einmal kurz abzentrifugiert. Danach wurden die Resin- und Reaktionsplatte passgenau aufeinandergelegt (Reaktionsplatte auf Resinplatte), so dass nach Invertieren der beiden Platten das Resin in die Flüssigkeit der Reaktionswells fallen/geklopft werden konnte. Anschließend wurde die 384-Well-Reaktionsplatte mit einer Klebefolie verschlossen, kurz anzentrifugiert und für mindestens 5 min kontinuierlich im Überkopfschüttler invertiert, um die vorhandenen Kationen aus dem Reaktionsgemisch zu entfernen. Um das Resin wieder aus der Reaktionslösung zu bekommen, wurde die 384-Well-Platte für 7 min bei 4.000 rpm abzentrifugiert. Für die abschließende spektrometrische Auswertung wurden etwa 20 nl des Probenmaterials mittels MassARRAY™ Nanodispenser (SAMSUNG Techwin Co. Ltd. für Sequenom® GmbH) auf die Matrix des SpectroCHIP® (Sequenom® GmbH) aufgetragen (gespottet). Auf dem SpectroCHIP® dient die organische Säure 3-Hydroxypicolinsäure als Matrix (Ragoussis et al., 2006). Zudem wurde auf jeden SpectroCHIP® ein Kalibrant mit Oligonukleotiden bekannter Massen gespottet. Das Auslesen eines SpectroCHIP® erfolgte im Hochvakuum des Sequenom-Massenspektrometers (MassARRAY™ Compact Analyzer, Bruker Daltonics Inc. für Sequenom® GmbH) als MALDI-ToF Reaktion: Hierfür wird jeder „Spot“ von einem kurzweiligen, wenige Nanosekunden dauernden Laserstrahl beschossen. Dieser Laserimpuls bewirkt eine Ionisation des Probenmaterials, wodurch sich die

nun positiv geladenen Moleküle der Probe aus der Matrix lösen können (Ionisation/Desorption). Durch die Ablösung von der Matrix ist es den Probemolekül-Ionen möglich, in dem vorliegenden elektrischen Feld des Vakuum-Flugrohrs des Massenspektrometers beschleunigt zu werden (Cotter, 1992; Ragoussis et al., 2006). Aufgrund ihrer unterschiedlichen Masse erreichen die Moleküle unterschiedliche Fluggeschwindigkeiten. Dadurch erreichen sie zu unterschiedlichen Zeiten den Detektor (Minus-Pol). Das hier zugrundeliegende Prinzip ist das Prinzip der Trägheit der Masse. Die unterschiedlichen Flugzeiten (Time of Flight) der Moleküle werden gemessen und anschließend mit der Software „SpectroACQUIRE“ (Version 3.3.1.3) in die jeweiligen Massen und damit in die entsprechenden Genotypen umgerechnet. Diese Technik erlaubt es, Moleküle mit einer Masse von 4.500 bis 9.000 Da zu analysieren (Ragoussis et al., 2006). Die Software ermöglicht eine graphische Darstellung der Ergebnisse (Abb. 4).

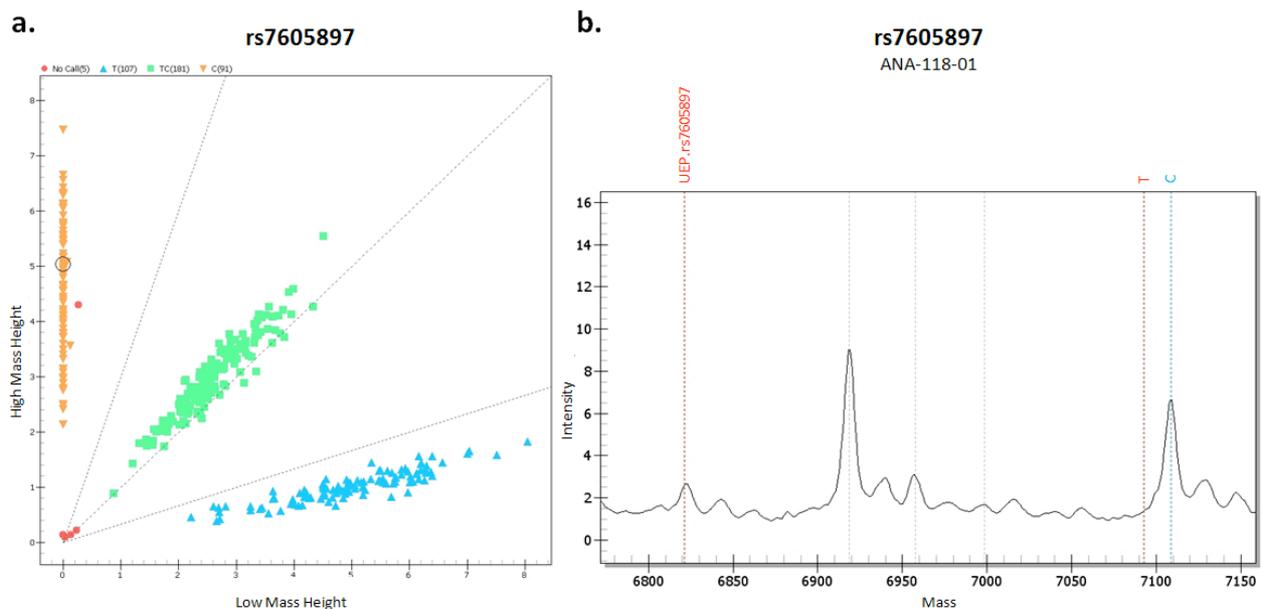


Abb. 4: Exemplarische graphische Darstellung einer SNP-Genotypisierung mittels Sequenom-Technologie und MALDI-ToF Prinzip. **a.:** Darstellung eines Clusterplot für rs7605897. Homozygote Träger eines T-Allels werden mit blauen Dreiecken, homozygote Träger eines C-Allels mit orangenen Dreiecken und Träger beider Allele (Heterozygote) mit grünen Vierecken dargestellt. Proben, die nicht genotypisiert werden können, werden mit roten Symbolen dargestellt (hier vier Negativkontrollen und ein Ausschluss). **b.:** Darstellung des Massenspektrums des ausgewählten SNPs der zugehörigen Probe ANA-118-01 (in Teil a. der Abb. durch Kreis markiert). Der deutliche Verlust des Peaks bei einer Masse von ca. 6.821 Da (x-Achse; linke rote Markierung) deutet auf den nahezu vollständigen Verbrauch des unverlängerten Extensionsprimers (UEP) für rs7605897 in der SBE-Reaktion hin. Je nach spezifischer Verlängerung des UEP in Abhängigkeit des vorliegenden Allels wird ein Peak bei einer Masse von ca. 7.092 Da (T-Allel; rechte rote Markierung) oder bei einer Masse von ca. 7.109 Da (C-Allel; blaue Markierung) erwartet. In diesem Fall ist aufgrund des Peaks bei einer Masse von ca. 7.109 Da ein C-Allel detektiert worden. Da bei einer Masse von ca. 7.092 Da kein Peak detektierbar ist, ist die Probe homozygot. Dies entspricht auch der Markierung in Teil a. dieser Abbildung.

SNPs, die mit der Sequenom-Technologie nicht genotypisiert werden konnten, wurden alternativ mittels quantitativer Real-Time PCR genotypisiert. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden zwei Plexe analysiert, Plex 1 mit 31 SNPs und Plex 2 mit 19 SNPs.

3.9.5 Genotypisierung ausgewählter SNPs mittels quantitativer Real-Time PCR

Das Prinzip der Genotypisierung mittels ABI Prism 7900HT Fast Real-Time PCR System (TaqMan) und der zugehörigen Software „SDS 2.2.2“ von Applied Biosystems (Life Technologies) GmbH, basiert auf der Messung von verschiedenen Fluoreszenzsignalen, mit deren Hilfe es möglich ist, auf die unterschiedlichen Allele zu schließen. Der *TaqMan SNP Genotyping Assay* enthält für das Experiment zwei Oligonukleotide, um den Zielbereich der genomischen DNA mit dem zu genotypisierenden SNP in einer PCR-Reaktion zu amplifizieren, sowie zwei fluoreszenzmarkierte TaqMan-Sonden, die spezifisch an das jeweilige Allel binden. Entscheidend ist hierbei das Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Prinzip. Eine TaqMan-Sonde trägt am 5'-Ende einen gekoppelten Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (in der Regel FAM oder VIC), während am 3'-Ende ein nicht fluoreszierender Quencher gekoppelt ist. Dieser Quencher ist in der Lage, die vom angeregten Reporter ausgestrahlte Energie zu absorbieren, sofern er sich in kurzer Distanz zum Reporter befindet. Dies führt dazu, dass bei Vorhandensein des Quenchers trotz Anregung des Reporters kein Fluoreszenzsignal detektiert werden kann (Abb. 5).

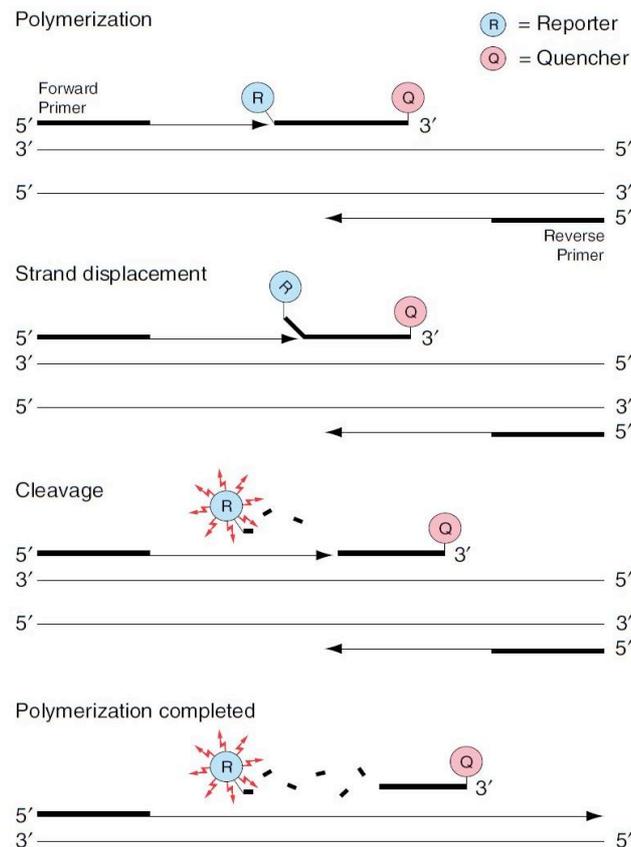


Abb. 5: Schematische Darstellung über das Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Prinzip. Entnommen aus Applied Biosystems (Life Technologies) TaqMan Universal PCR Master Mix Protokoll.

In der durchgeführten PCR binden die PCR-Primer und allelspezifische Sonden zu Beginn der Hybridisierungs-/Elongationsphase sequenzspezifisch an die DNA. Im weiteren Verlauf werden die PCR-Primer am 3'-Ende durch die Taq-Polymerase verlängert. Trifft die Taq-Polymerase auf die allelspezifische Sonde, zerstört sie die allelspezifische Sonde aufgrund ihrer 5'-3'-Endonukleaseaktivität (Bustin, 2000). Dadurch wird die räumliche Nähe des Quenchers zum Reporter aufgehoben, d.h. eine Unterdrückung des Signals ist nicht mehr möglich. Ein Fluoreszenzsignal wird detektierbar. Je nachdem, ob nun ein VIC-, FAM- oder beide Signale detektiert werden, kann auf das jeweilige Allel bzw. den Genotyp geschlossen werden. Ist nur ein Fluoreszenzsignal detektiert worden, handelt es sich um eine homozygote Person für den untersuchten SNP, wobei in Abhängigkeit des detektierten Fluoreszenzsignals das eine oder das andere Allel vorliegt. Sind beide Fluoreszenzmarker detektierbar, so handelt es sich um eine heterozygote Person. Zur Durchführung der PCR in einer 384-Well-Platte wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert:

Tab. 9: Pipettierschema für die quantitative Real-Time PCR (Genotypisierung) pro Reaktionsansatz und pro 384-Well-Platte inklusive Überhang.

Reagenz	Mengenangabe pro Reaktionsansatz [μ l]	Mengenangabe pro Platte (x485) [μ l]
H ₂ O dest.	2,375	1.151,875
TaqMan Universal PCR Master Mix (2X)	2,5	1.212,5
40X SNP Genotyping Assay	0,125	60,625
DNA	15 ng (eingetrocknet)	
Endvolumen	5	2.425

Die PCR wurde nach folgendem PCR-Protokoll im Thermocycler durchgeführt:

Tab. 10: Programmkonfiguration im Thermocycler für die quantitative Real-Time PCR (Genotypisierung).

	Reaktionsphase	Zeit	Temperatur
40 Zyklen	initiale Denaturierung	10 min	95°C
	Denaturierungsphase	15 sec	92°C
	Hybridisierungs-/Elongationsphase	1 min	60°C
	Gesamtdauer	ca. 1,5 h	

Abschließend erfolgte die Analyse der Proben im TaqMan und die Auswertung mittels der Software „SDS 2.2.2“ (Applied Biosystems (Life Technologies) GmbH) für allelische Diskriminierung.

3.9.6 Genexpressionsanalyse mittels quantitativer Real-Time PCR

Für die Analyse der Genexpression eines Zielgens wurde die Methode der quantitativen Real-Time PCR verwendet (Cikos und Koppel, 2009; Livak et al., 1995; Livak und Schmittgen, 2001; Nolan et al., 2006). Das Prinzip beruht auf einer in Echtzeit (*real-time*) durchgeführten PCR-Amplifikation einer cDNA, die zuvor aus RNA hergestellt wurde. Dabei wird nach jedem Amplifikationszyklus dieser PCR das vorhandene PCR-Produkt quantifiziert. Auf diese Weise kann letztendlich eine Aussage darüber getroffen werden, wie stark ein bestimmtes Gen exprimiert wird. Die Quantifizierungsergebnisse werden hinsichtlich ihres Amplifizierungsverlaufs mit einem Referenzgen verglichen, welches in verschiedenen Geweben relativ gleichmäßig exprimiert wird. Dabei ist die Wahl von geeigneten Referenzgenen von entscheidender Bedeutung (Bustin, 2002). Um eine möglichst genaue Quantifizierung zu

ermöglichen, werden Referenzgen und Zielgen im gleichen Reaktionswell in einer Duplexreaktion quantifiziert. Hierdurch kann die Expression des Zielgens normalisiert werden und relativ dazu die Expression des Zielgens in anderen Geweben oder Personen betrachtet werden (Bustin et al., 2005). Das Prinzip der Genexpressionsanalyse ähnelt dem Prinzip der Genotypisierung ausgewählter SNPs mittels quantitativer Real-Time PCR. Im Unterschied zur Genotypisierung werden jedoch nicht die unterschiedlichen - jeweils in Abhängigkeit des vorliegenden Allels - detektierten Fluoreszenzmarker, sondern die Signalstärke analysiert. In dieser Analyse erfolgt die Quantifizierung über eine sequenzspezifische Oligonukleotid-Sonde, die sogenannte TaqMan-Sonde. Um zu verhindern, dass sie irrtümlicherweise an genomische DNA binden, sind TaqMan-Sonden für Expressionsanalysen derart konzipiert, dass sie auf Exon-Exon-Grenzen binden. Hierdurch kann ausgeschlossen werden, dass versehentlich genomische DNA detektiert wird, da auf genomischer Ebene zwischen den Exons nicht-kodierende Introns liegen. Erst im weiteren Verlauf, wenn die Introns im Rahmen der messenger-RNA (mRNA)-Prozessierung durch den Spleißvorgang herausgeschnitten werden, entsteht die für die TaqMan-Sonden zum Binden notwendigen intronfreie mRNA. Bei der quantitativen Real-Time PCR mittels FRET-Prinzip ist die Intensität des nachgewiesenen Fluoreszenzsignals proportional zur Anzahl der initial vorhandenen cDNA-Stränge, und damit zur Menge der mRNA des exprimierten Gens. Die quantitative Real-Time PCR wurde nach folgendem Schema pipettiert, wobei zur besseren Quantifizierung Messtriplikate erstellt wurden. Hierbei war zu beachten, dass mit höchster Genauigkeit zu arbeiten ist, da bereits geringste Veränderungen oder Kontaminationen zu falschen und nicht reproduzierbaren Ergebnissen führen (Ding und Cantor, 2003):

Tab. 11: Pipettierschema für die quantitative Real-Time PCR (Genexpressionsanalyse). Abkürzungen: cDNA = *copy desoxyribonucleic acid* (copy-Desoxyribonukleinsäure).

Reagenz	Mengenangabe pro Reaktionsansatz [µl]
cDNA	3
H ₂ O	1
TaqMan Gene Expression Master Mix (2 x)	5
TaqMan Gene Expression Assay (20 x)	0,5
TaqMan Gene Expression Control Assay (20 x)	0,5
Endvolumen	10

Die PCR wurde nach folgendem PCR-Protokoll im Thermocycler durchgeführt:

Tab. 12: Programmkonfiguration im Thermocycler für die quantitative Real-Time PCR (Genexpressionsanalyse).

	Reaktionsphase	Zeit	Temperatur
40 Zyklen	initiale Denaturierungsphase	10 min	95°C
	Denaturierungsphase	15 sec	95°C
	Hybridisierungs-/Elongationsphase	1 min	60°C
	Gesamtdauer	ca. 1,5 h	

Um abschließend die gemessenen Fluoreszenzsignale zu quantifizieren, bedient man sich des sogenannten Zyklus-Schwellenwertes (*Ct*, *cycle threshold*). Er stellt den Zeitpunkt dar, an dem die Amplifikation des Zielfragments die exponentielle Phase erreicht. Seine Bestimmung erfolgt automatisch durch die „SDS 2.2.2“ Software über einen für alle Proben gültigen Schwellenwert. Die anschließende Berechnung der relativen Expression erfolgt anhand der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (Applied Biosystems User Bulletin No.2; Livak und Schmittgen, 2001). Prinzip dieser Berechnung ist es zunächst, den ΔCt -Wert als Differenz aus dem *Ct*-Wert des Zielgens und aus dem *Ct*-Wert des Referenzgens zu berechnen:

$$\text{Ct}_{(\text{Zielgen})} - \text{Ct}_{(\text{Referenzgen})} = \Delta\text{Ct}$$

Daraufhin erfolgt die Mittelung der drei ΔCt -Werte eines Messtriplikats. Die so berechneten ΔCt -Werte werden anschließend relativ zu einem Referenzwert berechnet, wobei als Referenzwert der ΔCt -Wert einer analysierten Probe oder der Mittelwert aller in diesem Experiment berechneten ΔCt -Werte gewählt werden kann:

$$\Delta\text{Ct}_{(\text{Messtriplikat})} - \Delta\text{Ct}_{(\text{Referenzwert})} = \Delta\Delta\text{Ct}$$

Unter Berücksichtigung des exponentiellen Verlaufs der PCR erfolgt anschließend die Umwandlung der relativen Werte in absolute Werte durch Potenzierung der negativen $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte zur Basis 2 ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$).

Um die Expression von *HDAC4* gewebeübergreifend zu vergleichen, wurden in unseren Versuchen verschiedene Gewebe über kommerziell erwerbliche Human Multiple-Tissue cDNA

(MTC) Panels I und II (Takara Bio Europe/Clontech), selbst extrahierte RNA (die in cDNA umgeschrieben wurde) aus Haarschaft und Vollbut sowie bereits vorliegende cDNA aus Kopfhaut und Haut (Schläfe) getestet und ausgewertet. Eine Normalisierung der gewebespezifischen Expression von *HDAC4* erfolgte mit der endogenen Kontrolle Cyclophilin (Cyc), die ubiquitär und gleichmäßig in einem Gewebe exprimiert vorkommt und damit ein gutes Referenzgen darstellt (Feroze-Merzoug et al., 2002). Zur Qualitätssicherung wurde darüber hinaus eine Positivkontrolle aus dem MTC Panel sowie eine Negativkontrolle hinzugefügt, bei der kein SuperScript-Enzym in der RT-PCR hinzupipettiert wurde. Zur Berechnung des $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wertes einer Probe wurde der Mittelwert aller gemessenen ΔCt -Werte als Referenzwert verwendet.

Als Qualitätskriterium der allelspezifischen Genexpressionsanalyse dieser Arbeit galten die erfolgreiche Genotypisierung der jeweiligen DNA-Probe, eine ausreichende RNA-Menge der Probe für die RT-PCR (400 ng) sowie die erfolgreiche Bestimmung der Expressionswerte als Messtriplikate.

3.10 Statistische Analysen

Für die statistische Analyse von Fall-Kontroll- und familienbasierten Studien werden unter Berücksichtigung von Qualitätsmerkmalen die Allelfrequenz bzw. die Genotypfrequenz zwischen den Betroffenen und den jeweiligen Kontrollgruppen verglichen. Bei einem signifikanten Unterschied bekommt man einen Hinweis darauf, dass es sich bei dieser Variante um eine möglicherweise kausale Variante der untersuchten Krankheit handelt. Zur Sicherung der Qualität wurden die generierten Daten vor der statistischen Auswertung einer Qualitätskontrolle unterzogen. Die untersuchten SNPs mussten hierfür mit einer Callrate von > 95 % genotypisiert worden sein, durften keine minimale Allelfrequenz des selteneren Allels (*minor allele frequency*, MAF) von < 1 % haben und es durfte keine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE) mit $P < 10^{-7}$ in Kontrollen vorliegen. Alle SNPs, die die Qualitätskriterien erfüllten, wurden statistisch ausgewertet. Darüber hinaus mussten alle

genotypisierten Probanden zu > 95 % genotypisiert werden können, um in die Analysen einzufließen.

Odds ratio (OR)

Bei der odds ratio (OR) handelt es sich um eine statistische Zahl, die das Chancenverhältnis zweier Gruppen vergleicht. Dabei gibt sie an, ob eine Erkrankung bei Betroffenen mit einem bestimmten Allel (= Risikoallel) häufiger auftritt als in der zu vergleichenden Gruppe, die nicht von der Erkrankung betroffen ist, aber dennoch das entsprechende Allel trägt. Eine OR von < 1 bedeutet hierbei, dass die Chance der Erkrankung in der Gruppe der Risikoallelträger niedriger ist als in der Gruppe derjenigen, die nicht das Risikoallel tragen. Eine OR von > 1 bedeutet, dass die Chance der Erkrankung in der Gruppe der Risikoallelträger höher ist als in der Gruppe derjenigen, die das Risikoallel nicht tragen. Eine OR = 1 bedeutet, dass das Chancenverhältnis ausgeglichen ist.

Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (*Hardy-Weinberg-Equilibrium*, HWE)

Das HWE geht zunächst von einer sogenannten idealen Population aus. Hierunter versteht man, dass keine Evolution stattfindet, die Genotyp- oder Allelfrequenzen verändern kann, so dass sich die Frequenzen über Generationen hinweg im Gleichgewicht befinden. Es handelt sich daher um ein theoretisches Modell. Dennoch wird dieses Modell auf die Realität bezogen, um allelspezifische Abweichungen in der untersuchten Population zu identifizieren, da solche Abweichungen bei allelbasierten Tests zu Verzerrungen führen können (Sasieni, 1997).

Cochran-Armitage-Trend-Test (ATT)

Beim ATT handelt es sich um einen genotypbasierten Test auf Assoziation. Der Test vergleicht die Genotypfrequenzen von Betroffenen und Kontrollen unter Berücksichtigung aller drei Genotypen und kann bereits einen Trend erkennen (Armitage, 1955). Dabei bedeuten kleine Wahrscheinlichkeitswerte (P-Werte) < 0,05, dass die Nullhypothese, also dass es keinen Unterschied in den Gruppen gibt, zu verwerfen ist.

Transmission Disequilibrium Test (TDT)

Beim TDT handelt es sich um einen familienbasierten Test auf Assoziation (Spielman et al., 1993). Bei ihm wird getestet, ob ein bestimmtes Allel einer Variante von den Eltern an die betroffenen Kinder signifikant häufiger vererbt wird, als nach den Regeln nach Mendel zu erwarten wäre, wobei im Idealfall eines der beiden Allele mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,5 weitergegeben wird. Voraussetzung für die Durchführung eines TDT ist das Vorliegen mindestens eines heterozygoten Elternteils hinsichtlich der betrachteten Variante. Stratifikationseffekte werden dabei vermieden, indem die nicht vererbten Allele der Eltern als interne Kontrollen dienen.

Bonferroni-Korrektur

Um gegebenenfalls falsch positive Ergebnisse auszuschließen, kann die Bonferroni-Korrektur durchgeführt werden. Hierbei handelt es sich um ein Verfahren zur Korrektur für multiple statistische Tests, um zufällig signifikante Ergebnisse herauszufiltern (Balding et al., 2007).

Alle genannten statistischen Analysen wurden durch PD Dr. Tim Becker und Dr. Christine Herold im Institut für Medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie (IMBIE) der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn durchgeführt.

Welch t-Test

Um in einer statistischen Analyse Mittelwerte zweier Stichproben (wie in den durchgeführten Expressionsanalysen) zu vergleichen, bedient man sich des sogenannten zweiseitigen t-Test. Hierbei handelt es sich um einen parametrischen Signifikanztest, der es ermöglicht zu überprüfen, ob die Mittelwerte der beiden Stichproben sich signifikant unterscheiden und damit die Nullhypothese zu verwerfen ist. Da in diesem Fall jeweils zwei Gruppen mit ungleicher Varianz verglichen werden (die betrachteten Gruppen aber normalverteilt sind), sollte hier der sogenannte Welch t-Test durchgeführt werden, um in Abhängigkeit der vorliegenden Allele der jeweiligen SNPs signifikante Unterschiede in der Genexpression feststellen zu können (Welch, 1947). Die statistische Analyse erfolgte mittels der Software R (Version 2.10.1, <http://www.r-project.org>).

4 ERGEBNISSE

4.1 Feinkartierung des Suszeptibilitätslokus auf Chr. 2q37

Der in der Metanalyse (MAAN, eingereicht) identifizierte neue Suszeptibilitätslokus auf Chr. 2q37 sollte durch eine Feinkartierung in unserem ANA-Kollektiv einer detaillierten Analyse unterzogen werden. Die Analyse sollte weitere Hinweise auf die diesem Lokus zugrundeliegende kausale Variante liefern. Zur Eingrenzung des zu untersuchenden Bereichs auf Chr. 2q37 wurde die Kopplungsungleichgewicht (LD)-Blockstruktur um den Hauptassoziationsbefund der Metaanalyse an diesem Lokus (rs9287638) in den HapMap-Daten (CEU, Release 28 aus August 2010, Phase I-III) mittels der Software „Haploview Version 4.2“ analysiert. Dieser SNP liegt etwa 275 kb zentromerisch von *HDAC4*. Die Blockstruktur an diesem Lokus zeigt, dass das LD zentromerisch ca. 59,4 kb und telomerisch ca. 60,6 kb vom Hauptbefund rs9287638 abnimmt, so dass für die Feinkartierung ein Bereich von 120 kb (Chr.2: 239.300.000 - 239.420.000 bp, NCBI build36) ausgewählt wurde, der 99 SNPs enthält (Abb. 6). Zur Reduktion der SNPs auf informative SNPs wurde der Bereich basierend auf einem r^2 von 0,8 getaggt, wobei der Top-SNP rs9287638 und der zweitbeste SNP rs11683401 ($P = 6,02 \times 10^{-11}$) der Metaanalyse (MAAN, eingereicht) an diesem Lokus als „force include“ in das SNP-Set integriert wurden. Der in unserer eigenen GWAS (Brockschmidt et al., 2011) nach rs9287638 ($P = 1,55 \times 10^{-4}$) zweitbeste SNP rs6753990 ($P = 5,24 \times 10^{-4}$) wurde ebenfalls als „force include“ in die Tagginganalyse aufgenommen. Durch die Tagging-Funktion konnte das zu analysierende SNP-Set auf 49 SNPs reduziert werden. Zwei informative SNPs wurden nachträglich in die Analyse aufgenommen: Ein eQTL (*expression quantitative trait locus*, Lokus eines quantitativen Merkmals) SNP aus dem „mRNA by SNP Browser 1.0.1“ (rs1198826, Chr.2: 238.457.807 bp, NCBI build36), der in *RAMP1* lokalisiert ist und einen Einfluss auf die Genexpression zeigt, sowie ein nicht-synonymer SNP in *HDAC4* (rs115599780, Chr.2: 239.713.105 bp, NCBI build36), der durch das 1000-Genome-Projekt (<http://www.1000genomes.org>) identifiziert wurde.

Von den 51 finalen SNPs konnten 50 SNPs mit Hilfe der Sequenom-Technologie in zwei Plexen (Plex 1 mit 31 SNPs und Plex 2 mit 19 SNPs) genotypisiert werden. Der SNP rs9287638 konnte

aus technischen Gründen nicht mittels Sequenom analysiert werden und wurde daher mit Hilfe der Real-Time PCR (TaqMan) genotypisiert.

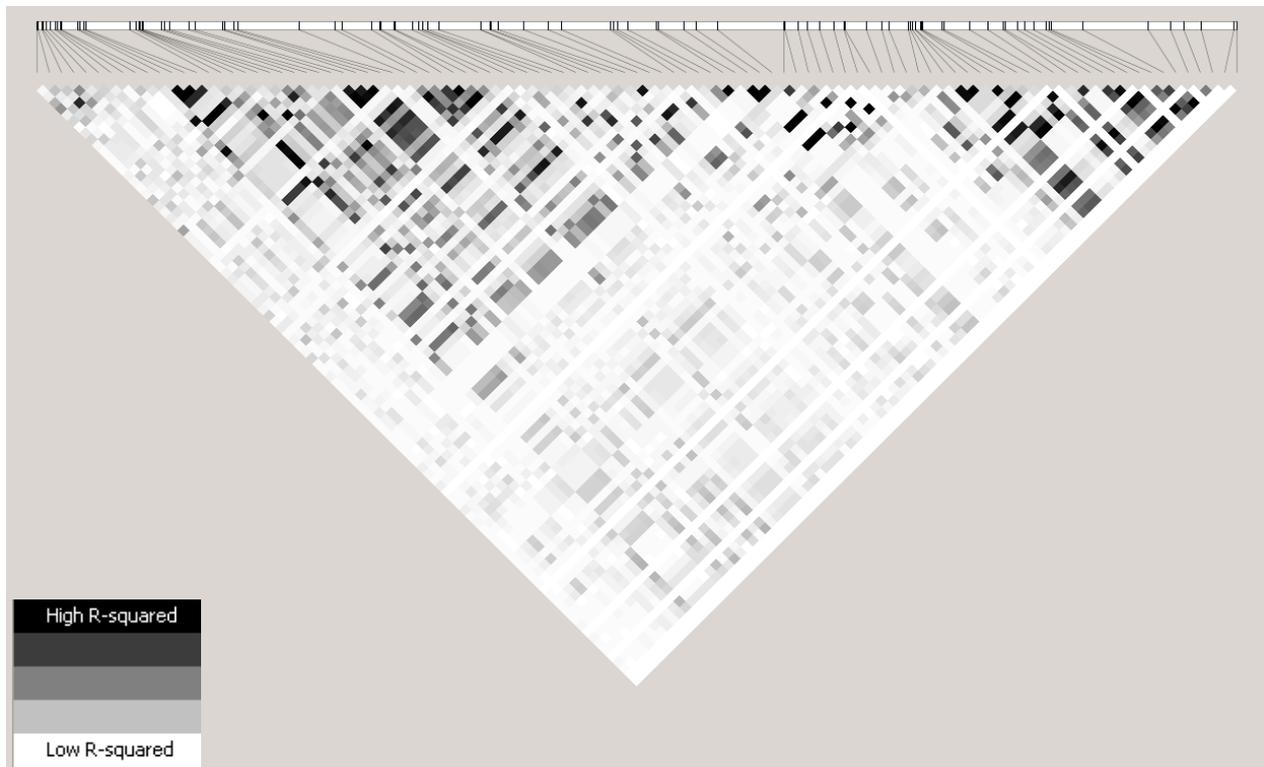


Abb. 6: Darstellung des untersuchten Chr. 2q37.3 Lokus (239.300.000 - 239.420.000 bp) anhand der UCSC-Daten (CEU, rel28 von August 2010, Phasen I-III, NCBI build36) mittels der Software Haploview 4.2. Abgebildet sind die LD-Blockstrukturen im untersuchten Bereich. Dunkle Bereiche entsprechen einem hohen LD, während helle Bereiche niedriges LD kennzeichnen. Die grauen Linien im oberen Teil der Abb. stellen die 99 SNPs dar, die in diesem Bereich lokalisiert sind.

In der Fall-Kontroll-Analyse mussten fünf Betroffene und eine Kontrolle ausgeschlossen werden, die die Callrate von mindestens 95 % nicht erreichten. 12 der 390 Familien wurden von der familienbasierten Analyse ausgeschlossen, da mindestens ein Familienmitglied die Callrate nicht erreichte oder Mendelfehler festgestellt wurden. 378 Familien wurden final mittels Transmission Disequilibrium Test (TDT) analysiert.

Die SNPs rs10929297, rs12465363, rs9287636, rs9287642 und rs9678577 mussten wegen einer Callrate von < 95% von der Analyse ausgeschlossen werden, zudem wurden die SNPs rs10182724, rs9287641, rs9677515, rs9677648 und rs9749737 wegen eines HWEs < 10^{-7} bzw. einer MAF < 1 % ausgeschlossen. Die SNPs rs10192207, rs115599780, rs13384378, rs9287648 waren in diesen Genotypisierungen nicht biallelisch und wurden ebenfalls von der Analyse ausgeschlossen. Nach Qualitätskontrolle konnten 37 SNPs erfolgreich analysiert werden.

In der Fall-Kontroll-Analyse mit 758 Betroffenen und 271 Kontrollen zeigten rs9287638 ($P = 1,8 \times 10^{-4}$), rs6753990 ($P = 0,012$), rs11683401 ($P = 0,014$), rs5022723 ($P = 0,016$), rs4545955 ($P = 0,019$) und rs12474299 ($P = 0,044$) nominelle Signifikanz. Nach Bonferroni-Korrektur für die Anzahl erfolgreich getesteter SNPs ($n = 37$) zeigte rs9287638 das einzige signifikante Assoziationssignal mit $P = 0,007$ (OR = 1,50; 95%-Konfidenzintervall (CI) [1,21-1,85]). Auch nach Stratifikation für rs9287638 konnte kein weiteres signifikantes Assoziationssignal detektiert werden. Das Risikoallel „A“ für diesen SNP fand sich zu 38 % bei Betroffenen und 29 % bei Kontrollen, womit ein Frequenzunterschied von 9 % vorlag. Tabelle 13 zeigt die Ergebnisse der Fall-Kontroll-Analyse:

Tab. 13: Tabellarische Übersicht der Ergebnisse der Fall-Kontroll-Analyse. Die SNP-Positionen auf Chr. 2 beruhen auf NCBI build36. Abkürzungen: MAF = Frequenz des selteneren Allels (*minor allele frequency*); $P_{\text{Korr.}}$ = P-Wert korrigiert für die Anzahl der SNPs (37) nach Bonferroni; OR = odds ratio; 95% CI = 95 % Konfidenzintervall.

SNP	Position (bp)	Allel A/B	MAF		P	$P_{\text{Korr.}}$	OR [95% CI]	P-Wert nach Stratifikation für rs9287638
			Betroffene	Nicht-Betroffene				
rs1198826	238.457.807	G/A	0.499 (G)	0.461 (G)	0.144	1	1.16 [0.95-1.41]	0.087
rs11681518	239.301.009	G/C	0.048 (G)	0.046 (G)	0.891	1	1.03 [0.65-1.65]	0.491
rs6431621	239.301.161	T/A	0.248 (T)	0.240 (T)	0.714	1	1.04 [0.83-1.31]	0.639
rs7580245	239.301.595	T/C	0.423 (T)	0.386 (T)	0.132	1	1.17 [0.95-1.43]	0.422
rs6740301	239.301.688	T/G	0.113 (T)	0.107 (T)	0.693	1	1.07 [0.78-1.46]	0.421
rs11690021	239.301.967	C/T	0.074 (C)	0.076 (C)	0.886	1	1.03 [0.71-1.49]	0.657
rs6716943	239.302.892	A/C	0.237 (A)	0.233 (A)	0.870	1	1.02 [0.81-1.28]	0.621
rs4545955	239.303.039	T/C	0.213 (T)	0.167 (T)	0.019	0.703	1.35 [1.04-1.74]	0.387
rs6720396	239.303.420	T/C	0.303 (T)	0.301 (T)	0.950	1	1.01 [0.81-1.25]	0.842
rs11674589	239.303.520	A/G	0.216 (A)	0.220 (A)	0.866	1	1.02 [0.81-1.29]	0.809
rs12618142	239.305.242	G/A	0.133 (G)	0.150 (G)	0.313	1	1.15 [0.87-1.52]	0.841
rs11673727	239.311.421	G/A	0.098 (G)	0.105 (G)	0.647	1	1.08 [0.78-1.49]	0.682
rs6745975	239.311.480	G/A	0.443 (G)	0.402 (G)	0.095	1	1.18 [0.97-1.44]	0.564
rs6753990	239.313.329	G/A	0.348 (G)	0.290 (G)	0.012	0.444	1.31 [1.06-1.62]	0.924
rs7605897	239.314.160	C/T	0.496 (T)	0.465 (C)	0.108	1	1.17 [0.96-1.42]	0.965
rs11688480	239.316.014	T/C	0.054 (T)	0.061 (T)	0.549	1	1.14 [0.75-1.72]	0.483
rs13036138	239.320.862	A/G	0.089 (A)	0.100 (A)	0.452	1	1.13 [0.81-1.58]	0.101
rs11674803	239.334.066	A/G	0.420 (A)	0.456 (A)	0.142	1	1.16 [0.95-1.41]	0.888
rs4663957	239.334.925	G/A	0.459 (A)	0.498 (G)	0.083	1	1.19 [0.98-1.45]	0.850
rs5022723	239.336.262	C/T	0.430 (T)	0.371 (C)	0.016	0.592	1.28 [1.05-1.56]	0.896
rs11676424	239.338.075	T/C	0.079 (T)	0.085 (T)	0.699	1	1.07 [0.75-1.53]	0.802
rs4663959	239.338.708	G/T	0.032 (G)	0.031 (G)	0.915	1	1.03 [0.59-1.81]	0.591
rs12474299	239.339.128	C/G	0.136 (C)	0.172 (C)	0.044	1	1.32 [1.01-1.72]	0.323
rs6431624	239.344.829	A/T	0.064 (A)	0.070 (A)	0.611	1	1.10 [0.75-1.63]	0.985
rs12614110	239.351.463	A/G	0.186 (A)	0.199 (A)	0.531	1	1.08 [0.84-1.38]	0.697

rs9750742	239.352.803	T/G	0.042 (T)	0.044 (T)	0.819	1	1.06 [0.65-1.71]	0.725
rs9287638	239.359.379	A/C	0.384 (A)	0.294 (A)	1.8×10^{-4}	0.007	1.50 [1.21-1.85]	-
rs11683401	239.362.355	T/C	0.482 (T)	0.456 (T)	0.014	0.518	1.28 [1.05-1.56]	0.597
rs10929296	239.374.868	A/G	0.114 (A)	0.140 (A)	0.107	1	1.27 [0.95-1.69]	0.519
rs9287640	239.377.004	T/G	0.229 (T)	0.229 (T)	0.988	1	1.00 [0.79-1.27]	0.912
rs9678628	239.379.677	T/C	0.127 (T)	0.109 (T)	0.277	1	1.18 [0.87-1.61]	0.712
rs9798281	239.385.071	T/C	0.089 (T)	0.105 (T)	0.270	1	1.20 [0.87-1.67]	0.762
rs9710693	239.386.997	T/C	0.265 (T)	0.253 (T)	0.573	1	1.06 [0.85-1.33]	0.850
rs9287645	239.387.249	T/C	0.484 (C)	0.472 (T)	0.082	1	1.19 [0.98-1.45]	0.535
rs10929299	239.390.388	C/T	0.086 (C)	0.101 (C)	0.268	1	1.20 [0.86-1.68]	0.707
rs9752491	239.399.424	A/G	0.244 (A)	0.216 (A)	0.193	1	1.17 [0.92-1.48]	0.260
rs11895264	239.404.185	T/C	0.349 (T)	0.325 (T)	0.321	1	1.11 [0.90-1.37]	0.565

In der familienbasierten Analyse mit 378 Familien zeigten drei SNPs eine nominell signifikante Assoziation. Das stärkste Assoziationssignal wurde hier für rs6716943 ($P = 0,009$) identifiziert, gefolgt von rs6720396 ($P = 0,010$) und rs9287638 ($P = 0,037$). Nach Stratifikation für den Befund der Metaanalyse (rs9287638) zeigte nur noch rs6716943 ($P = 0,023$) ein nominell signifikantes Assoziationssignal. Nach Bonferroni-Korrektur konnte jedoch keine signifikante Assoziation mehr gezeigt werden. Eine Übersicht der familienbasierten Analyse findet sich in der folgenden Tabelle 14.

Tab. 14: Tabellarische Übersicht der Ergebnisse der familienbasierten Analyse. Die SNP-Positionen auf Chr. 2 beruhen auf NCBI build36. Abkürzungen: TDT = Transmission Disequilibrium Test; T = Transmittiert; NT = Nicht transmittiert; $P_{\text{Korr.}}$ = P-Wert korrigiert für die Anzahl der SNPs (37) nach Bonferroni.

SNP	Position (bp)	Allel A/B	TDT			$P_{\text{Korr.}}$	Ratio	P-Wert nach Stratifikation für rs9287638	P-Wert nach korrigierter Stratifikation für rs9287638
			T	NT	P				
rs1198826	238.457.807	G/A	259	256	0.934	1	1.01	0.683	1
rs11681518	239.301.009	G/C	37	53	0.114	1	0.70	0.434	1
rs6431621	239.301.161	T/A	214	201	0.544	1	1.07	0.861	1
rs7580245	239.301.595	T/C	251	272	0.368	1	0.92	0.217	1
rs6740301	239.301.688	T/G	91	119	0.058	1	0.77	0.090	1
rs11690021	239.301.967	C/T	80	59	0.110	1	1.36	0.425	1
rs6716943	239.302.892	A/C	176	227	0.009	0.326	0.78	0.023	0.817
rs4545955	239.303.039	T/C	203	172	0.133	1	1.18	0.605	1
rs6720396	239.303.420	T/C	216	272	0.010	0.385	0.79	0.220	1
rs11674589	239.303.520	A/G	201	185	0.403	1	1.09	0.927	1
rs12618142	239.305.242	G/A	132	110	0.157	1	1.20	0.058	1
rs11673727	239.311.421	G/A	95	92	0.882	1	1.03	0.997	1
rs6745975	239.311.480	G/A	257	266	0.725	1	0.97	0.054	1
rs6753990	239.313.329	G/A	247	245	0.965	1	1.01	0.146	1
rs7605897	239.314.160	C/T	266	286	0.386	1	0.93	0.209	1
rs11688480	239.316.014	T/C	53	50	0.841	1	1.06	0.341	1
rs13036138	239.320.862	A/G	85	74	0.392	1	1.15	0.176	1

rs11674803	239.334.066	A/G	246	276	0.189	1	0.89	0.059	1
rs4663957	239.334.925	G/A	273	276	0.934	1	0.99	0.360	1
rs5022723	239.336.262	C/T	278	263	0.535	1	1.06	0.663	1
rs11676424	239.338.075	T/C	78	77	1	1	1.01	0.341	1
rs4663959	239.338.708	G/T	24	33	0.265	1	0.73	0.588	1
rs12474299	239.339.128	C/G	127	113	0.376	1	1.12	0.97	1
rs6431624	239.344.829	A/T	71	56	0.214	1	1.27	0.716	1
rs12614110	239.351.463	A/G	181	152	0.106	1	1.19	0.642	1
rs9750742	239.352.803	T/G	44	37	0.453	1	1.19	0.887	1
rs9287638	239.359.379	A/C	270	222	0.037	1	1.22	-	-
rs11683401	239.362.355	T/C	275	257	0.434	1	1.07	0.287	1
rs10929296	239.374.868	A/G	121	98	0.120	1	1.24	0.344	1
rs9287640	239.377.004	T/G	172	185	0.512	1	0.93	0.502	1
rs9678628	239.379.677	T/C	110	107	0.895	1	1.03	0.670	1
rs9798281	239.385.071	T/C	92	74	0.161	1	1.24	0.715	1
rs9710693	239.386.997	T/C	184	196	0.566	1	0.94	0.277	1
rs9287645	239.387.249	T/C	268	274	0.825	1	0.98	0.231	1
rs10929299	239.390.388	C/T	91	77	0.295	1	1.18	0.466	1
rs9752491	239.399.424	A/G	198	198	1	1	1	0.214	1
rs11895264	239.404.185	T/C	234	249	0.509	1	0.94	0.199	1

4.2 Gewebespezifische Expressionsanalyse des Kandidatengens *HDAC4*

Aufgrund des Assoziationsbefundes auf Chr. 2q37 sollte das 275 kb entfernte *HDAC4*-Gen als Kandidatengens für die AGA einer gewebespezifischen quantitativen Expressionsanalyse unterzogen werden. Die Expression dieses Kandidatengens in einem von AGA betroffenen Zielgewebe kann weitere Hinweise auf einem möglichen Beitrag von *HDAC4* geben. Für die Analyse wurden kommerziell erworbene cDNAs aus verschiedenen Geweben (Human Multiple-Tissue cDNA Panels I/II, Takara Bio Europe/Clontech) sowie cDNAs aus Haarschaft, Kopfhaut, Haut und Vollblut (insgesamt aus 20 verschiedenen Geweben) hinsichtlich einer Expression von *HDAC4* analysiert. Die Analyse erfolgte im Messtriplikat mittels quantitativer Real-Time PCR (ABI Prism 7900HT Fast Real-Time PCR System von Applied Biosystems (Life Technologies) GmbH). Eine Normalisierung der gewebespezifischen Expression von *HDAC4* erfolgte mit der endogenen Kontrolle Cyclophilin, die ubiquitär und gleichmäßig in einem Gewebe exprimiert vorkommt. Die Ergebnisse der gewebespezifischen Expressionsanalyse sind in Abb. 7 dargestellt.

Gewebespezifische Expression von *HDAC4*

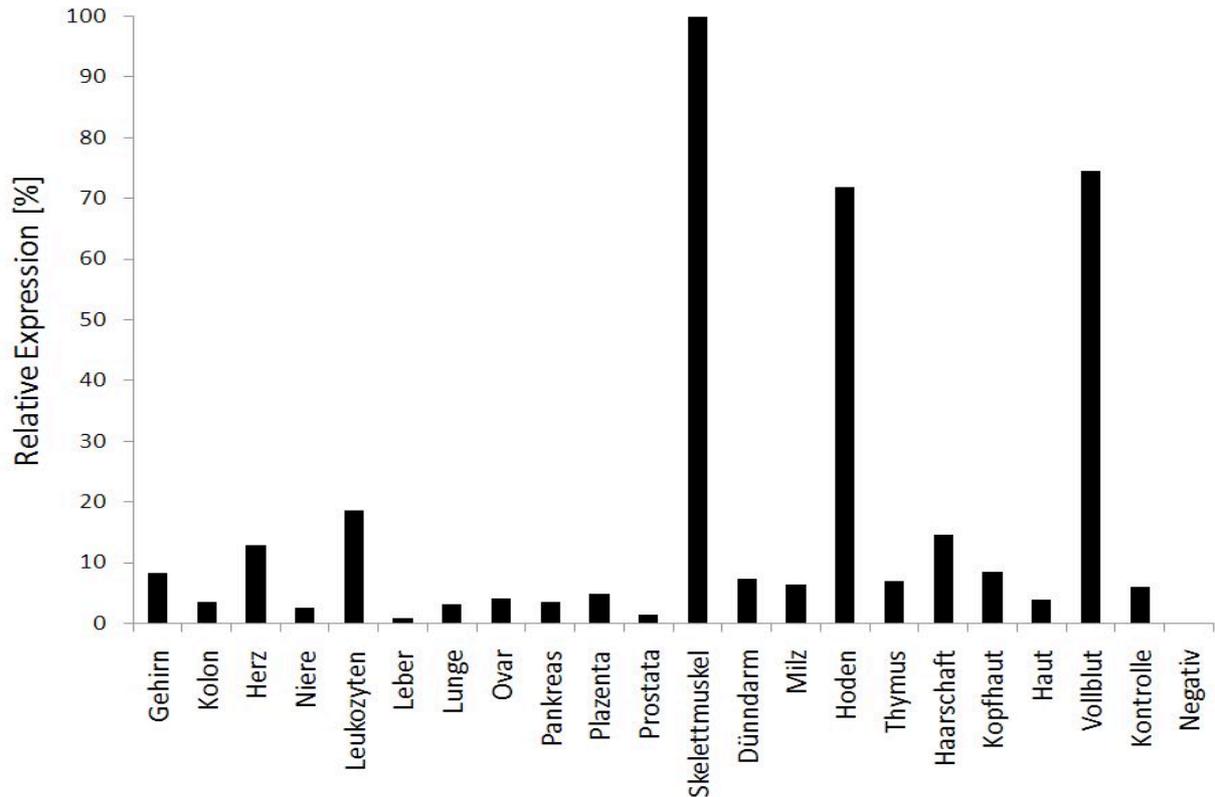


Abb. 7: Gewebespezifische Genexpression von *HDAC4*. *HDAC4* konnte in allen untersuchten Geweben detektiert werden. Das Gewebe mit der höchsten Expression war Skelettmuskel, welches auf 100% gesetzt wurde. Die weiteren Gewebe sind relativ zu der Expression von *HDAC4* in Skelettmuskel dargestellt. Es folgen Vollblut (75 %) und Hoden (72 %) mit der nächst höchsten Expression. Die Expression von *HDAC4* in den AGA-Zielgeweben betrug 15% (Haarschaft), 9% (Kopfhaut) bzw. 4% (Haut). Bei der „Kontrolle“ handelt es sich um eine Positivkontrolle aus dem MTC Panel, während „Negativ“ die Negativkontrolle darstellt.

HDAC4 konnte in allen analysierten Geweben detektiert werden. Die stärkste Expression wurde in Skelettmuskel (als Höchstwert auf 100 % gesetzt) nachgewiesen, gefolgt von Vollblut (75 %) und Hoden (72 %). In AGA-Zielgeweben konnte *HDAC4* ebenfalls detektiert werden. Die Haarschaftprobe zeigte eine relative Expression von 15 %, die Kopfhautprobe von 9 % und die Hautprobe von 4 %. Eine detaillierte Herleitung und Übersicht über die einzelnen Expressionswerte befindet sich in Anhang IV.

4.3 Allelspezifische Expressionsanalyse des Kandidatengens *HDAC4*

Die gewebespezifische Expressionsanalyse zeigte eine Expression von *HDAC4* in den AGA-Zielgeweben Haarschaft, Haut und Kopfhaut. Es ist denkbar, dass der SNP rs9287638 direkt oder indirekt einen Einfluss auf die Expression von *HDAC4* hat. Daher sollte die Genexpression von *HDAC4* allelspezifisch untersucht werden. Hierzu wurde das rekrutierte Kollektiv von Haarschaft-RNAs (Haarspenderkontrollen, HSKs) herangezogen, wobei ausschließlich männliche Probanden für diese Analyse ausgewählt wurden. 92 RNAs lagen in ausreichender Konzentration zu Analysezwecken vor. Die entsprechenden HSK-DNAs wurden zunächst für den SNP rs9287638 mittels TaqMan genotypisiert. Von diesen hatten 17 HSKs den Genotyp AA (18 %), 38 den Genotyp AC (41 %) und 37 den Genotyp CC (40 %). Anschließend wurde die Expression von *HDAC4* in den HSK-RNAs aus Haarschäften in Messtriplikaten quantifiziert. Zwei der 92 RNAs konnten nicht erfolgreich in Messtriplikaten quantifiziert werden, womit nach Qualitätskontrolle 90 HSKs in die Analysen eingeschlossen werden konnten. In Abhängigkeit des vorliegenden Allels/Genotyps wurden die HSKs in Gruppen zusammengefasst und mit Hilfe der Software „R“ (<http://www.r-project.org>) und dem Welch t-Test einer Expressionsanalyse unterzogen. Die Ergebnisse der allelspezifischen Genexpressionsanalyse, bei der die relative Expression in Abhängigkeit des vorliegenden Allels bei rs9287638 verglichen wurde, sind in der Abb. 8 zusammengefasst. Dabei wurden die Expressionswerte von heterozygoten Personen jeweils mit dem zugehörigen Expressionswert einfach in beiden Allel-Gruppen berücksichtigt, während homozygote Personen zweifach (für jedes Allel einmal) gewertet wurden. Eine Übersicht über die einzelnen Expressionswerte der Haarschaftproben befindet sich in Anhang V.

Expression von *HDAC4* in Abhängigkeit von rs9287638

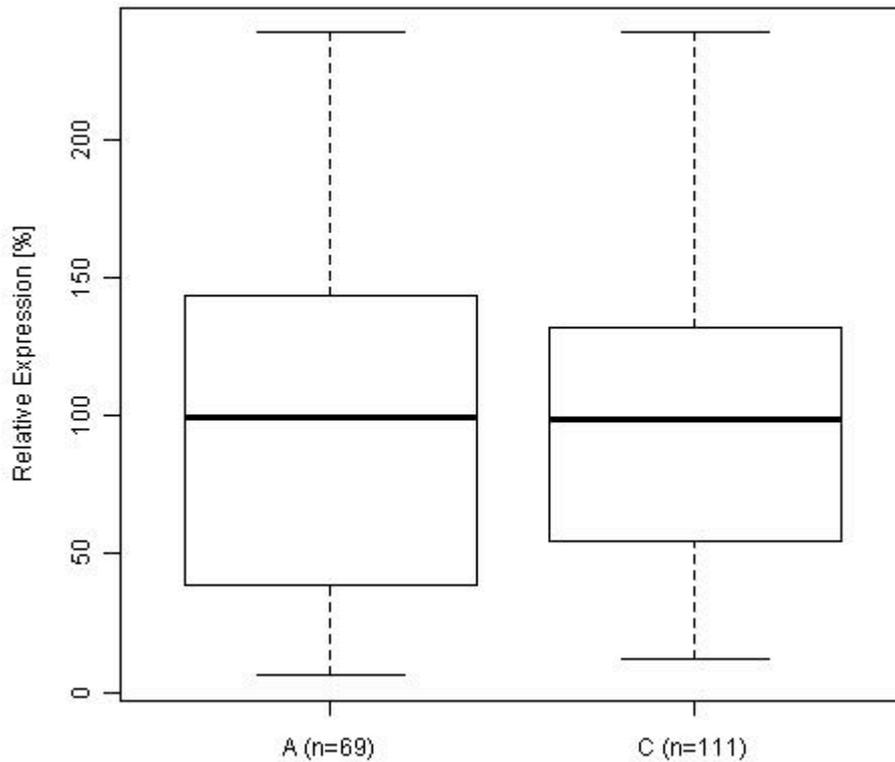


Abb. 8: Allelspezifische *HDAC4*-Expressionsanalyse in Abhängigkeit vom SNP rs9287638 in 90 Haarschaft-RNAs. Abgebildet sind die nach Allelen für rs9287638 zusammengefassten in Prozent dargestellten relativen Werte für die Genexpression von *HDAC4*. Die Darstellung erfolgt mittels Boxplots, die die Verteilung der Expressionswerte zeigen. Die fettgedruckte Linie innerhalb des Quadrats stellt den Median der Messwerte dar, während die obere Grenze des Quadrats das obere (75 %) Quartil und die untere Grenze das untere Quartil (25 %) darstellt. Die obere bzw. untere schmale horizontale Linie zeigen die erreichten Maximal- bzw. Minimalwerte. Der Median der Expression von *HDAC4* beim A-Allel liegt bei 99 % (n = 69) und beim C-Allel bei 98 % (n = 111).

Die allelspezifische Expressionsanalyse (Abb. 8) von *HDAC4* zeigte nahezu keinen Unterschied zwischen der „A“-Allelgruppe (n = 69) mit einem Median bei 99 % und der „C“-Allel-Gruppe (98 %; n = 111). In der statistischen Analyse mittels Welch t-Test konnte kein signifikanter Expressionsunterschied zwischen den untersuchten Allelgruppen gezeigt werden (P = 0,7998).

Der genotypspezifische *HDAC4*-Expressionsvergleich ist in der Abb. 9 zusammengefasst.

Expression von *HDAC4* in Abhängigkeit von rs9287638

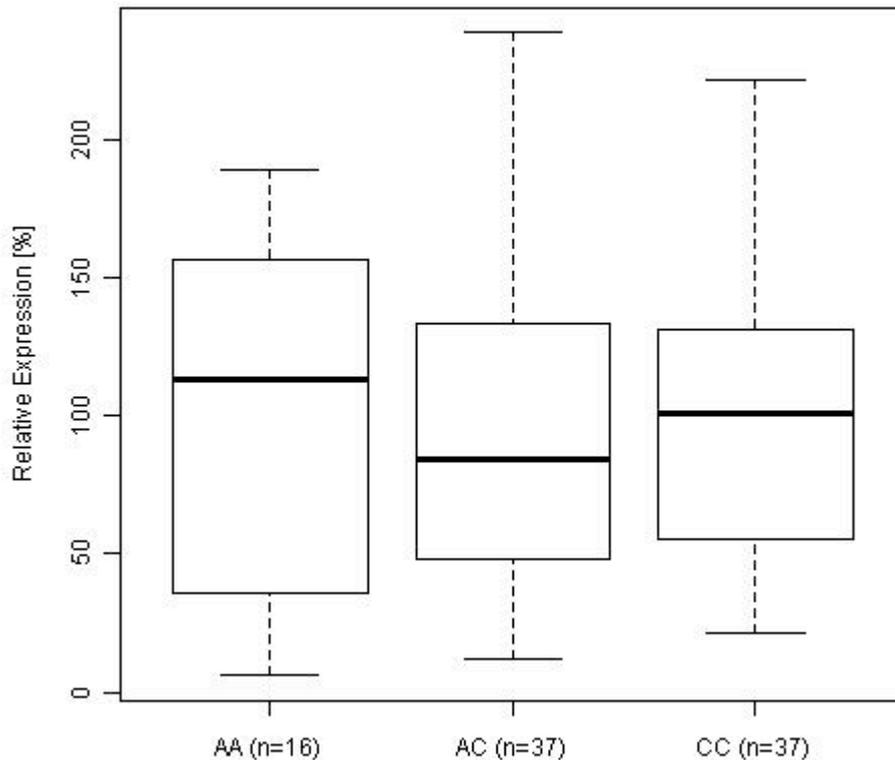


Abb. 9: Genotypspezifische *HDAC4*-Expressionsanalyse in Abhängigkeit vom SNP rs9287638 in 90 Haarschaft-RNAs. Abgebildet sind die nach Genotypen zusammengefassten in Prozent dargestellten relativen Werte für die Genexpression von *HDAC4*. Die Darstellung erfolgt mittels Boxplots. Die relative Expression von *HDAC4* bei den Genotypträgern „AA“ liegt bei 113 % (Median; n = 16), bei den Genotypträgern „CC“ bei 101 % (n = 37) und bei Genotypträgern „AC“ bei 84 % (n = 37).

In der genotypspezifischen Expressionsanalyse (Abb. 9) zeigte die Gruppe der „AA“-Träger im Median die höchste Expression mit 113 % (n = 16), während die Gruppe der „AC“-Träger mit 84 % (n = 37) und die Gruppe der „CC“-Träger mit 101 % (n = 37) jeweils eine niedrigere Expression zeigten. In der statistischen Analyse mittels Welch t-Test konnte im Vergleich zwischen den Gruppen der „AA“- und „AC“-Träger ($P = 0,7593$), zwischen den Gruppen der „AA“- und „CC“-Träger ($P = 0,7766$) sowie im Vergleich zwischen den Gruppen der „AC“- und „CC“-Träger ($P = 0,9578$) kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Die Zusammenfassung von Genotypgruppen zeigte folgende Ergebnisse (Abb. 10 und Abb. 11):

Expression von *HDAC4* in Abhängigkeit von rs9287638

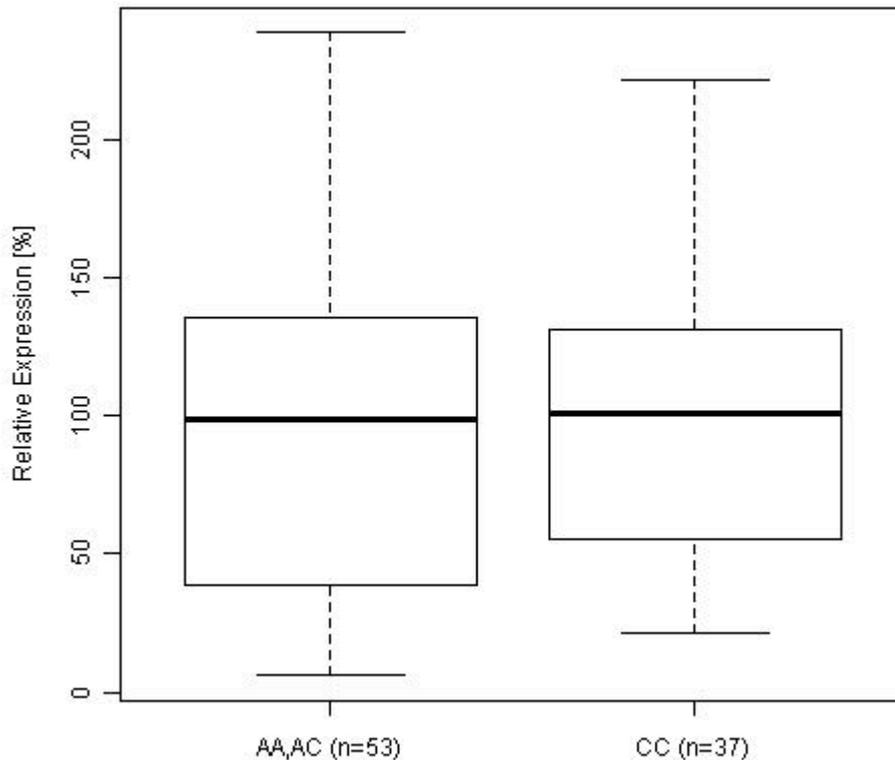


Abb. 10: Genotypspezifische *HDAC4*-Expressionsanalyse in Abhängigkeit vom SNP rs9287638 in 90 Haarschaft-RNAs nach den Genotypgruppen „AA, AC“ und „CC“ zusammengefasst. Abgebildet sind die zusammengefassten Genotypen „AA, AC“ und „CC“ mit in Prozent dargestellten relativen Werten für die Genexpression von *HDAC4*. Die Darstellung erfolgt mittels Boxplots. Die relative Expression von *HDAC4* liegt in der Gruppe der Genotypträger „AA“ oder „AC“ (n = 53) bei 98 % (Median) und in der Gruppe der „CC“-Genotypträger (n = 37) bei 101 %.

Abb. 10 zeigt den Vergleich der zusammengefassten Genotypgruppen „AA, AC“ und „CC“. Die „AA, AC“-Gruppe (n = 53) zeigt eine relative Genexpression von 98 % (Median), während die „CC“-Gruppe (n = 37) eine relative Genexpression von 101 % zeigt. Sie unterscheiden sich damit in ihren Medianen um 3 %. Im Welch t-Test konnte keine signifikante Abweichung hinsichtlich der relativen Genexpression von *HDAC4* im Vergleich zwischen der „AA, AC“- zur „CC“-Gruppe nachgewiesen werden (P = 0,9255).

Expression von *HDAC4* in Abhängigkeit von rs9287638

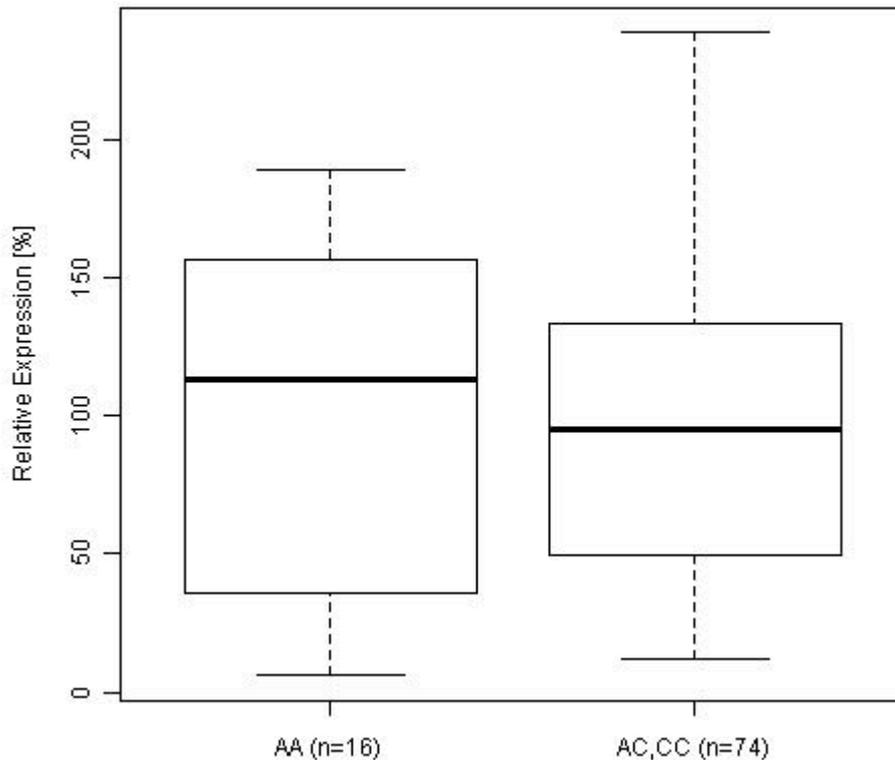


Abb. 11: Genotypspezifische *HDAC4*-Expressionsanalyse in Abhängigkeit vom SNP rs9287638 in 90 Haarschaft-RNAs nach den Genotypgruppen „AA“ und „AC, CC“ zusammengefasst. Abgebildet sind die zusammengefassten Genotypen „AA“ und „AC, CC“ mit in Prozent dargestellten relativen Werten für die Genexpression von *HDAC4*. Die Darstellung erfolgt mittels Boxplots. Die relative Expression von *HDAC4* liegt in der Gruppe der Genotypträger „AA“ bei 124 % (Median; n = 16) und in der Gruppe der „AC“- oder „CC“-Genotypträger (n = 74) bei 95 %.

Abb. 11 zeigt den Vergleich der zusammengefassten Genotypgruppen „AA“ und „AC, CC“. Die „AA“-Gruppe (n = 16) weist eine relative Genexpression von 124 % (Median) auf, die „AC, CC“-Gruppe (n = 74) eine relative Genexpression von 95 %. Somit zeigt sich ein Unterschied von 29 % im Vergleich der beiden Mediane. Im Welch t-Test konnte keine signifikante Abweichung hinsichtlich der relativen Genexpression von *HDAC4* im Vergleich zwischen der „AA“- zur „AC, CC“-Gruppe nachgewiesen werden (P = 0,7535).

5 DISKUSSION

Im Fokus der Humangenetik steht die Erforschung genetischer Determinanten, die zur Entstehung einer Krankheit führen. Für eine große Zahl von monogenen Erkrankungen sind die zugrundeliegenden Genveränderungen heute bekannt, z.B. für die Phenylketonurie (MIM 261600) oder Muskeldystrophie Typ Duchenne (MIM 310200). Weniger einfach stellt sich die Erforschung und Identifizierung krankheitsverursachender Gene und Mutationen bei genetisch komplexen/multifaktoriellen Erkrankungen dar. Gründe hierfür sind neben der unbekannt Anzahl genetischer Faktoren auch die Erfassung eventuell beteiligter exogener Faktoren. Hinsichtlich der genetischen Faktoren unterscheidet man zwischen Varianten, die für die Krankheitsentwicklung unbedingt notwendig sind und solchen, die nicht unbedingt notwendig sind, aber das Risiko für die Entwicklung einer Krankheit erhöhen (Greenberg, 1993). Zur Identifizierung notwendiger und begünstigender genetischer Faktoren bedient man sich in der molekulargenetischen Forschung Kopplungs- und Assoziationsstudien. Während familienbasierte Kopplungsstudien vorrangig bei der Erforschung notwendiger Faktoren Anwendung finden, können Assoziationsstudien in Kollektiven von Betroffenen und Kontrollen zudem zur Erfassung begünstigender Faktoren, sogenannter Suszeptibilitätsloki, genutzt werden (Ackerman et al., 2005; Botstein und Risch, 2003). Bei Assoziationsstudien wird untersucht, ob eine genetische Variante signifikant häufiger bei betroffenen Probanden als bei Kontrollen auftritt. Bis heute konnten zahlreiche genomweite Assoziationsstudien (GWAS) zur Identifizierung krankheitsrelevanter Loci von genetisch komplexen Krankheiten führen (*Catalog of Published Genome Wide Association Studies*, <http://www.genome.gov/gwastudies/>). Bei den assoziierten Varianten kann es sich um die kausale Variante selbst oder um eine Variante handeln, die im Kopplungsungleichgewicht (LD) zur kausalen Variante steht.

Die androgenetische Alopezie (AGA; MIM 109200, MIM 300710, MIM 612421) ist ein genetisch komplex vererbter Phänotyp (Hillmer et al., 2008b; Küster und Happle, 1984; Nyholt et al., 2003). Durch eine internationale Metaanalyse konnten sechs neue Suszeptibilitätsloki für die AGA auf den Chr. 1p36.22, 2q37.3, 7p21.1, 7q11.22, 17q21.31 und 18q12.3 identifiziert werden (MAAN, eingereicht). Der stärkste Assoziationsbefund unter den neu entdeckten Loci wurde dabei für rs9287638 (Chr.2: 239.359.379 bp; NCBI build36) identifiziert ($P = 1,01 \times 10^{-12}$). In der

vorliegenden Arbeit sollte eine Feinkartierung und eine weiterführende Aufarbeitung dieses Locus erfolgen mit dem Ziel, das beitragende Gen oder die dem Assoziationsbefund zugrundeliegende kausale Variante zu identifizieren. Insgesamt wurde ein Kollektiv 763 unabhängiger AGA-Betroffener und 272 AGA-Nicht-Betroffener in einer Fall-Kontroll-Analyse untersucht. Zusätzlich wurde eine familienbasierte Analyse an 390 Familien mit insgesamt 1.341 Individuen durchgeführt. Diesen Analysen wurden eine gewebespezifische und allelspezifische Expressionsanalyse eines potenziellen Kandidatengens angeschlossen. Sie sollten zum besseren Verständnis der pathophysiologischen Grundlagen der AGA beitragen.

Für die Feinkartierung wurde ein Bereich von ca. 120 kb, jeweils ca. 60 kb flankierend um den besten Befund aus der Metaanalyse (rs9287638), ausgewählt. In der hier durchgeführten Fall-Kontroll-Analyse zeigten rs9287638 ($P = 1,8 \times 10^{-4}$), rs6753990 ($P = 0,012$), rs11683401 ($P = 0,014$), rs5022723 ($P = 0,016$), rs4545955 ($P = 0,019$) und rs12474299 ($P = 0,044$) nominelle Signifikanz. Nach Korrektur für die Anzahl der SNPs zeigte nur noch rs9287638 ein signifikantes Assoziationssignal ($P = 0,007$; odds ratio (OR) = 1,50; 95%-Konfidenzintervall (CI) [1,21-1,95]). In der familienbasierten TDT-Analyse (Spielman et al., 1993) konnte der Assoziationsbefund für rs9287638 mit nomineller Signifikanz bestätigt werden ($P = 0,037$); mit rs6716943 ($P = 0,009$) und rs6720396 ($P = 0,010$) zeigten jedoch zwei andere Marker ein besseres Assoziationssignal. Dies ist nicht ungewöhnlich und ist vielmehr ein Zeichen dafür, dass es sich bei rs9287638 vermutlich nicht um die eigentlich kausale Variante handelt, sondern viel mehr um eine Variante im LD zur kausalen Variante. Nach Stratifikation für rs9287638 in der familienbasierten Analyse zeigte nur noch rs6716943 ($P = 0,023$) ein signifikantes Assoziationssignal. Dass rs9287638 jedoch am ehesten in der Lage ist, das Assoziationssignal auch in der familienbasierten Analyse zu erklären, zeigt sich nach korrigierter Stratifikation für diesen SNP, nach der auch in der familienbasierten Analyse keine andere Variante mehr eine Assoziation aufweist. rs9287638 kann damit sowohl in der Fall-Kontroll-, als auch in der familienbasierten Analyse das Assoziationssignal an diesem Locus alleine erklären. Damit bestätigen beide Analysen den Befund der Metaanalyse (MAAN, eingereicht). Der SNP rs9287638 liegt in einem nicht-kodierenden Bereich. Es besteht die Möglichkeit, dass rs9287638 in einem regulatorischen Element liegt und darüber die Transkription eines benachbarten Gens beeinflusst. Hierbei

spricht man von einem *expression quantitative trait locus* (eQTL). In Abhängigkeit der Entfernung spricht man in diesem Fall von einem cis-regulatorischen Effekt, bei dem die Variante bis zu 1 Mb vom regulierten Gen entfernt liegt (Dixon et al., 2007; Myers et al., 2007; Nica et al., 2010; Stranger et al., 2005). Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, dass regulatorische Elemente auch in größerer Entfernung zum untersuchten Gen liegen können (Kleinjan und van Heyningen, 2005; Melzer et al., 2008; Stranger et al., 2005; Yvert et al., 2003). Man spricht hier von einem trans-regulatorischen Effekt, wenn die assoziierte Variante weiter als 1 Mb vom regulierten Gen entfernt liegt oder sogar auf einem anderen Chromosom lokalisiert ist (Myers et al., 2007). In der im Rahmen dieser Arbeit betrachteten cis-Region um den Assoziationsbefund rs9287638 (+/- 1 Mb) liegen basierend auf der RefSeq-Datenbank (UCSC) die Gene *TWIST2* (ca. 62 kb telomerisch jeweils vom Assoziationsbefund rs9287638 entfernt), *FLJ43879* (ca. 147 kb telomerisch), *LOC151171* (ca. 231 kb zentromerisch), *HDAC4* (ca. 275 kb telomerisch), *ASB1* (ca. 334 kb zentromerisch), *TRAF3IP1* (ca. 385 kb zentromerisch), *MGC16025* (ca. 421 kb telomerisch), *PER2* (ca. 497 kb zentromerisch), *HES6* (ca. 546 kb zentromerisch), *LOC643387* (ca. 552 kb zentromerisch), *LOC151174* (ca. 554 kb zentromerisch), *ILKAP* (ca. 582 kb zentromerisch), *KLHL30* (ca. 633 kb zentromerisch), *ESPNL* (ca. 652 kb zentromerisch), *SCLY* (ca. 687 kb zentromerisch), *UBE2F* (ca. 743 kb zentromerisch), *RAMP1* (ca. 874 kb zentromerisch), *RBM44* (ca. 943 kb zentromerisch) und *LOC150935* (ca. 990 kb telomerisch). *FLJ43879*, *LOC151171*, *MGC16025*, *LOC643387*, *LOC151174* und *LOC150935* wurden als potenzielle Kandidatengene ausgeschlossen, da sie in der UCSC-Datenbank als hypothetisch bzw. nicht-kodierende RNA beschrieben sind. Man kann davon ausgehen, dass ein an der Krankheitsentwicklung beteiligtes Gen auch im Zielgewebe der beobachteten Krankheit exprimiert wird. *ESPNL*, *KLHL30*, *SCLY* und *MGC16025* scheinen in den AGA-Zielgeweben Haar, Kopfhaut und Haut nicht signifikant messbar exprimiert zu sein (MAAN, eingereicht), so dass sie ebenfalls nicht als Kandidatengene in Betracht kamen. *ASB1* kodiert das *Ankyrin repeat and SOCS box containing protein 1*. Es beinhaltet ein C-terminales *SOCS (suppressor of cytokine signaling)-box-motif* und spielt daher eine Rolle in der Zytokin-Signaltransduktion, wobei eine funktionelle Analyse in Mäusen keine vollständige Aufklärung der Funktion lieferte (Kile et al., 2001). *TRAF3IP1* kodiert das *TRAF3-interacting protein 1*, das dafür bekannt ist, mit einem Schizophrenie-assoziierten Gen (*disrupted-in-schizophrenia 1*, *DISC1*) zu interagieren (Morris et

al., 2003). *PER2* kodiert das *period circadian protein homolog 2*, das eine Rolle in der zirkadianen Rhythmik spielt (Zheng et al., 1999). *ILKAP* ist ein Gen, das eine Phosphatase kodiert und eine Rolle in der Signaltransduktion spielt (Leung-Hagesteijn et al., 2001). *UBE2F* kodiert ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym (Huang et al., 2009). Aufgrund der beschriebenen Funktion von *ASB1*, *TRAF3IP1*, *PER2*, *ILKAP* und *UBE2F* sind diese keine naheliegenden Kandidatengene für die AGA. *RBM44* (*RNA-binding protein 44*) kodiert ein Protein, das als interzelluläres Brückenprotein dient (Iwamori et al., 2011). *RAMP1* kodiert das *receptor activity-modifying protein 1* und gehört zur Familie der Rezeptoraktivität-modifizierenden Proteine, durch die zelluläre Transporte gesteuert werden können (McLatchie et al., 1998). *HES6* (*hairy and enhancer of split 6*, Drosophila) kodiert einen Transkriptionsfaktor, der zur *basic-loop-helix* Familie gehört, die verschiedene Entwicklungsprozesse reguliert (Gao et al., 2001). *TWIST2*, das das *Twist-related protein 2* kodiert und auch zur Unterfamilie der *basic-loop-helix* Familie gehört, spielt eine Rolle in der Transkriptionsregulation (Franco et al., 2011). *HDAC4* kodiert die *Histon-Deacetylase 4* und gehört zur Familie der Histon-Deacetylasen. Durch Histonmodifizierung sind sie in der Lage, die Transkription zu regulieren (Strachan und Read, 2005). Ungeachtet ihres Expressionsprofils in den AGA-Zielgeweben stellen *TWIST2*, *HDAC4*, *HES6*, *RAMP1* und *RBM44* aufgrund ihrer beschriebenen Funktion potenzielle Kandidatengene dar.

HDAC4 war aus unterschiedlichen Gründen das vielversprechendste Kandidatengen in der betrachteten Region: Zunächst stellt es mit 275 kb Abstand eines der nächstgelegenen Gene zum Assoziationsbefund rs9287638 dar. Darüber hinaus ist es in den drei AGA-Zielgeweben Haar, Kopfhaut und Haut signifikant exprimiert (MAAN, eingereicht). *HDAC4* ist für die Deacetylierung der Histon-Lysinreste verantwortlich, was zu einer kompakteren Packung der DNA und infolgedessen zu einer Blockierung der Transkription führt (de Ruiter et al., 2003; Fu et al., 2004; Haberland et al., 2009; Pazin und Kadonaga, 1997; Wolffe, 1997). Interessanter Weise wird *HDAC4* über verschiedene Transkriptionsfaktoren als Interaktionspartner des ARs berichtet (Jeong et al., 2004; Suh et al., 2008; Yang et al., 2011), der eine kausale genetische Determinante der AGA darstellt (Ellis et al., 2001a; Hillmer et al., 2008a; Richards et al., 2008). Darüber hinaus sind HDACs der Klasse IIa, zu denen *HDAC4* gehört (Fischle et al., 2001; Parra und Verdin, 2010), durch eine große N-terminale Erweiterung mit Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren der *myocyte enhancer factor 2* (MEF2)-Familie charakterisiert (Martin et

al., 2007). Für MEF2C, einen Vertreter der MEF-Familie (Molkentin et al., 1996), ist kürzlich berichtet worden, dass möglicherweise eine funktionelle Interaktion zum AR in Skelettmuskel besteht (Wyce et al., 2010). Die Autoren zeigten, dass verschiedene MEF2C-abhängige Gene ebenfalls direkt Ziele des ARs waren, was für ein funktionelles Zusammenspiel dieser beiden Transkriptionsfaktoren sprechen könnte (Wyce et al., 2010). Des Weiteren wurde durch die Metanalyse (MAAN, eingereicht) sowie durch eine Arbeit von Brockschmidt et al. (2011) Varianten in *HDAC9* als hochsignifikant mit AGA assoziiert berichtet. *HDAC4* und *HDAC9* gehören derselben Klasse der HDACs an (Klasse IIa) (Fischle et al., 2001; Parra und Verdin, 2010), wodurch *HDAC4* als Kandidatengen für die AGA nochmals gestützt wird. Vor diesen Hintergründen und den beschriebenen Expressionsprofilen und Funktionen der übrigen Gene dieser Region, die keinen erkennbaren Bezug zur AGA oder zum AR zeigen, stellt *HDAC4* damit das interessanteste Kandidatengen dieser Region dar.

Um erste Hinweise auf eine mögliche funktionelle Relevanz von *HDAC4* in der AGA-Ätiologie zu bekommen, wurde die Expression des Kandidatengens *HDAC4* zunächst gewebespezifisch untersucht. Die gewebespezifische Analyse zeigte eine ubiquitäre Expression von *HDAC4*, wobei die stärkste relative Expression in Skelettmuskel (als Höchstwert auf 100 % normalisiert) gefunden wurde. Darüber hinaus zeigten Vollblut (75 %) und Hoden (72 %) ebenfalls noch eine hohe relative Expression. *HDAC4* wurde dagegen in den AGA-Zielgeweben Haarschaft (15 %), Kopfhaut (9 %) und Haut (4 %) weniger stark exprimiert. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen Arbeiten die ebenfalls eine ubiquitäre Expression von *HDAC4* gezeigt haben (Grozinger et al., 1999; Liu et al., 2006; Petrie et al., 2003; Wang et al., 1999). Die Expression von *HDAC4* in allen untersuchten Geweben deutet darauf hin, dass *HDAC4* gewebeübergreifend von genereller Bedeutung ist. Durch die Expression von *HDAC4* in den AGA-Zielgeweben und den Umstand, dass mit den bisher assoziiert berichteten Genen wie *AR*, *PAX1*, *FOXA2* und *HDAC9* ebenfalls Gene aus der Transkriptionsmaschinerie (Culig et al., 1998; de Ruiter et al., 2003; Schnittger et al., 1992; Wang et al., 2002) in Zusammenhang mit der AGA berichtet wurden, bleibt *HDAC4* ein vielversprechendes Kandidatengen für die AGA.

In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass genetische Varianten in Abhängigkeit ihrer Allelausprägung zu einer veränderten Genexpression führen und es infolgedessen zu einer unterschiedlichen Krankheitsanfälligkeit kam. Meyer et al. (2008) zeigten

z.B. eine allelspezifische Hochregulation von *FGFR2* und damit eine erhöhte Anfälligkeit für Brustkrebs. Ria et al. (2011) zeigten ein vermindertes Risiko für einen Myokardinfarkt in Abhängigkeit einer verminderten allelspezifischen Genexpression von *TNFSF4*. Um einen solchen Effekt zwischen der hier assoziierten Variante rs9287638 und *HDAC4* zu untersuchen, wurde die Expression von *HDAC4* in RNAs aus dem AGA-Zielgewebe Haarschaft in Abhängigkeit der Variante rs9287638 allel- und genotypspezifisch quantifiziert. In der Expressionsanalyse konnte nach Gegenüberstellungen aller möglichen Allel- und Genotypgruppen jedoch kein signifikanter Unterschied in der Expression von *HDAC4* detektiert werden. Dabei erreichte der Vergleich der Genotypgruppen „AA“ gegen „AC, CC“ mit $P = 0,7535$ noch den besten P-Wert in den Gegenüberstellungen. Die Ergebnisse deuten damit darauf hin, dass die identifizierte Variante rs9287638 keinen Einfluss auf die Expression von *HDAC4* in Haarschaften hat. Schlussendlich kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass ein möglicher Effekt in unserer Analyse durch das relativ kleine Kollektiv von nur 90 RNAs nicht detektiert werden konnte, da es aufgrund der begrenzten Zahl analysierter Individuen zu wenig statistische Aussagekraft besitzt, einen gegebenenfalls vorhandenen, wenn auch marginalen Effekt zu detektieren. Es ist denkbar, dass die feine Abstimmung von Genen, die wie z.B. HDACs an Entwicklungs- oder Differenzierungsprozessen beteiligt sind (Chen et al., 2011), notwendig für einen geregelten Haarzyklus ist und die Deregulation zu einer Veränderung im Haarzyklus führt, wie sie als Ursache für die AGA beschrieben worden ist (Courtois et al., 1994). Die Untersuchung der Genexpression in einem deutlich größeren Kollektiv könnte hier gegebenenfalls zusätzliche Erkenntnisse liefern. Zudem kann ein Gen in unterschiedlichen Geweben divergenten Regulationsmechanismen unterliegen (Lage et al., 2008). Die hier verwendeten Haarschaft-RNAs stammen aus dem Okzipitalbereich des Kopfes, der im Gegensatz zum Frontalbereich nicht von einer AGA betroffen ist (Hamilton, 1951; Norwood, 1975). Eine gewebespezifische Expressionsanalyse von *HDAC4* in Abhängigkeit von rs9287638 könnte hier durchaus zu anderen Resultaten führen. Die Tatsache, dass für den AR unterschiedliche Konzentrationen im frontalen und okzipitalen Kopfbereich detektiert wurden (Hibberts et al., 1998; Sawaya und Price, 1997), spricht dafür, dass hier ein Unterschied in Abhängigkeit des betrachteten Areals vorliegt. Ein möglicher weitergehender Ansatz im Hinblick auf die Untersuchung der allelspezifischen Genexpression von *HDAC4* wäre daher der intra- aber auch interindividuelle Vergleich der

HDAC4-Expression von Haarschäften aus dem Okzipitalbereich und Frontalbereich zwischen Betroffenen und nicht Betroffenen. In unseren Untersuchungen wurden RNAs aus Haarschäften verwendet, die eine Mischung verschiedener Zelltypen darstellen wie äußere/innere Haarscheide, Haarmatrix oder Dermalpapillenzellen (Reifenberger und Ruzicka, 2010). Das in dieser Arbeit quantifizierte Expressionsprofil beruht daher auf unterschiedlichen Zellsystemen, wodurch ein eventuell vorhandener allelspezifischer Effekt in einem dieser Zellsysteme nicht mehr detektierbar wird. Bezüglich der Auswirkung von Androgenen konnte gezeigt werden, dass sie ihren Effekt hauptsächlich in den Dermalpapillenzellen ausüben (Brown et al., 1989; Lee und Chang, 2003; Wang et al., 2005), wo sie an den AR binden und diesen dadurch aktivieren (Lee und Chang, 2003; Pawlowski et al., 2002; Randall, 1994; Randall, 2007; Tyagi et al., 2000; Wang et al., 2004). Es ist daher denkbar, dass eine Analyse der *HDAC4*-Expression ausschließlich in Dermalpapillenzellen zu anderen Ergebnissen führt. Vor dem Hintergrund der Interaktion von *HDAC4* mit dem AR über verschiedene Transkriptionsfaktoren (Jeong et al., 2004; Suh et al., 2008; Wyce et al., 2010; Yang et al., 2011), der Funktion in der Genregulation (de Ruiter et al., 2003; Fu et al., 2004; Haberland et al., 2009; Pazin und Kadonaga, 1997; Wolffe, 1997) und der Tatsache, dass mit *HDAC9* ein weiteres Gen der *HDAC*-Familie hinsichtlich AGA assoziiert gefunden wurde (Brockschmidt, 2011; MAAN, eingereicht), ist *HDAC4* jedoch trotz der hier vorliegenden Ergebnisse nach wie vor ein gutes Kandidatengen, das ursächlich für das Assoziationssignal sein könnte. Im Rahmen dieser Arbeit konnte der dem Assoziationsbefund zugrundeliegende Effekt jedoch nicht weiter aufgeklärt werden. Die Kenntnis über den ursächlichen Pathomechanismus und den möglichen Beitrag von *HDAC4* zur AGA könnte zu neuen therapeutischen Möglichkeiten für die AGA führen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die androgenetische Alopezie (AGA) ist die häufigste Form des menschlichen Haarausfalls (Hamilton, 1951; Rexbye et al., 2005). Sie gehört zu den komplex vererbten Erkrankungen, das heißt, dass mehrere genetische Faktoren zu einer Haarlosigkeit führen. Mit dem *AR/EDA2R*- und dem *PAX1/FOXA2*-Lokus wurden bereits zwei genetische Loci zweifelsfrei identifiziert. Weitere Suszeptibilitätsloki für die AGA wurden kürzlich durch neuere Studien identifiziert (Brockschmidt et al., 2011; MAAN, eingereicht). Der neue Suszeptibilitätslokus auf Chr. 2q37.3 mit dem Assoziationsbefund rs9287638 (MAAN, eingereicht) sollte in dieser Arbeit durch genetische Feinkartierung weiter aufgearbeitet werden, die gewebespezifische Expression des favorisierten Kandidatengens *HDAC4* sowie der mögliche Einfluss assoziierter Varianten auf die Expression von *HDAC4* untersucht werden. In einer hoch-auflösenden familienbasierten und Fall-Kontroll-Analyse konnte rs9287638 als stärkstes Assoziationssignal in der Region identifiziert werden, welcher alleine das Assoziationssignal an diesem Locus erklären kann. rs9287638 oder eine im LD zu diesem SNP befindliche Variante stellen damit die kausale Variante an diesem Locus dar. Da durch rs9287638 kein Gen unmittelbar betroffen ist und das nächstgelegene Gen 62 kb entfernt ist, liegt der assoziierte Locus vermutlich in einem regulatorischen Bereich eines Gens. Datenbank- und Literaturrecherchen sowie Expressionsuntersuchungen identifizierten *HDAC4* als ein vielversprechendes Kandidatengen. Eine gewebespezifische Expressionsanalyse zeigte, dass *HDAC4* ubiquitär exprimiert ist, womit diesem Gen offensichtlich eine grundsätzliche Funktion über verschiedene Gewebe hinweg zugeschrieben werden kann. Die Expression in den AGA-Zielgeweben Haarschaft, Haut und Kopfhaut bestätigt es zudem als gutes Kandidatengen. Zur Überprüfung, ob rs9287638 einen regulatorischen Einfluss auf die Expression von *HDAC4* ausübt, wurden Haarschaft-RNAs einer allelspezifischen Genexpressionsanalyse unterzogen. Hierbei konnte für rs9287638 kein signifikanter allelspezifischer Effekt auf die Expression von *HDAC4* gezeigt werden. Die dem Assoziationsbefund zugrundeliegende funktionelle Auswirkung bleibt daher vorerst ungeklärt. Eine zukünftige Aufklärung würde zu einem besseren Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen der AGA beitragen und gegebenenfalls zur Entwicklung neuer therapeutischer Strategien führen.

7 ANHANG

Anhang I: Tabellarische Übersicht über die in der Feinkartierung analysierten SNPs. Die Positionen beruhen auf NCBI build36. Insgesamt wurden zwei Multiplexreaktionen (Plex 1 mit 31 SNPs, Plex 2 mit 19 SNPs) durchgeführt, ein SNP wurde mittels Real-Time PCR (TaqMan) analysiert. In der letzten Spalte wird angegeben, um welche Art SNP es sich handelt. Abkürzungen: tagSNP = SNP über die Tagging-Funktion der Software „Haploview 4.2“; eQTL = *Expression Quantitative Trait Locus*; GWAS = genomweite Assoziationsstudie.

Plex	SNP	Chr.	Position [bp]	Quelle
1	rs10182724	2	239.394.821	tagSNP
1	rs10192207	2	239.400.948	tagSNP
1	rs10929296	2	239.374.868	tagSNP
2	rs10929297	2	239.388.336	tagSNP
1	rs10929299	2	239.390.388	tagSNP
2	rs115599780	2	239.713.105	nicht-synonymer SNP in <i>HDAC4</i> aus 1000-Genome-Project
2	rs11673727	2	239.311.421	tagSNP
1	rs11674589	2	239.303.520	tagSNP
1	rs11674803	2	239.334.066	tagSNP
2	rs11676424	2	239.338.075	tagSNP
1	rs11681518	2	239.301.009	tagSNP
2	rs11683401	2	239.362.355	Metaanalyse (zweitbestes Assoziationssignal)
1	rs11688480	2	239.316.014	tagSNP
1	rs11690021	2	239.301.967	tagSNP
1	rs11895264	2	239.404.185	tagSNP
2	rs1198826	2	238.457.807	eQTL aus mRNA by SNP Browser (Expression auf <i>RAMP1</i>)
1	rs12465363	2	239.415.951	tagSNP
1	rs12474299	2	239.339.128	tagSNP
2	rs12614110	2	239.351.463	tagSNP
1	rs12618142	2	239.305.242	tagSNP
1	rs13036138	2	239.320.862	tagSNP
1	rs13384378	2	239.357.940	tagSNP
2	rs4545955	2	239.303.039	tagSNP
2	rs4663957	2	239.334.925	tagSNP
1	rs4663959	2	239.338.708	tagSNP
2	rs5022723	2	239.336.262	tagSNP
1	rs6431621	2	239.301.161	tagSNP
2	rs6431624	2	239.344.829	tagSNP
2	rs6716943	2	239.302.892	tagSNP
2	rs6720396	2	239.303.420	tagSNP
1	rs6740301	2	239.301.688	tagSNP
1	rs6745975	2	239.311.480	tagSNP
1	rs6753990	2	239.313.329	Eigene, unveröffentlichte GWAS (zweitbestes Assoziationssignal)
1	rs7580245	2	239.301.595	tagSNP
2	rs7605897	2	239.314.160	tagSNP
1	rs9287636	2	239.345.731	tagSNP
TaqMan	rs9287638	2	239.359.379	Metaanalyse/eigene GWAS (bestes Assoziationssignal)
1	rs9287640	2	239.377.004	tagSNP
1	rs9287641	2	239.380.656	tagSNP
1	rs9287642	2	239.380.807	tagSNP
2	rs9287645	2	239.387.249	tagSNP
2	rs9287648	2	239.412.851	tagSNP
2	rs9677515	2	239.419.140	tagSNP
1	rs9677648	2	239.419.380	tagSNP
2	rs9678577	2	239.345.895	tagSNP
1	rs9678628	2	239.379.677	tagSNP
1	rs9710693	2	239.386.997	tagSNP
1	rs9749737	2	239.387.395	tagSNP
2	rs9750742	2	239.352.803	tagSNP
1	rs9752491	2	239.399.424	tagSNP
1	rs9798281	2	239.720.326	tagSNP

Anhang II: Übersicht der in den Sequenomreaktionen verwendeten Primer. Die erste Spalte bezeichnet die Plexzugehörigkeit und den SNP (Spalte 2). In den folgenden Spalten werden die Sequenzen der Vorwärts (F-), Rückwärts (R-) und Extensionsprimer (UEP-) dargestellt (in 5'-3'-Richtung). Die letzte Spalte zeigt die eingesetzten massenabhängigen Primerkonzentrationen der Extensionsprimer (UEP), für die zu Übersichtszwecken die jeweiligen Gruppen grau schattiert wurden (vgl. Kap. 3.9.4).

Plex	SNP	F-Primer	R-Primer	UEP-Primer	UEP-Konz.
1	rs13036138	ACGTTGGATGCAGTGTGGTCTCTCATCC	ACGTTGGATGTGCCACTCTGTGACTAATG	TCATCCTCCAACCCC	7
1	rs11674589	ACGTTGGATGAGGCACCATGCTAGACTG	ACGTTGGATGAGGCTGGCCATGCACTAGTT	CTCCTGCCCTGCC	7
1	rs10929299	ACGTTGGATGAGACTGGCTGCTCCATGAAG	ACGTTGGATGGGGTGTGAAAATATGTATGCC	CGCCGTACACGCAC	7
1	rs12474299	ACGTTGGATGTGATGGCCTCCCTGCCTTT	ACGTTGGATGGTTTCTCCAACACGTGCATC	GCCTTCAAAGCCACT	7
1	rs7580245	ACGTTGGATGATTTGGCAAATCCACTCCC	ACGTTGGATGGTTCCAGAAATACCTGAC	CCCAAGTTGGAAGTCA	7
1	rs6431621	ACGTTGGATGATGAGATATCTGGAGGTTGC	ACGTTGGATGTAGGAACCTGGTCTTGTGTC	GGAGGTTGCATGGTTT	7
1	rs9749737	ACGTTGGATGACCACCTCCACGGAGTCTT	ACGTTGGATGAGGGCCCTGGAGATACAGAC	aACAGGGAGCTCCCTGC	7
1	rs9287636	ACGTTGGATGCTCATCTCCTCAGAGCATC	ACGTTGGATGCTTAGCCAGAGTCAAGCAAC	TGCTCTCCCTCCTTGAG	9.3
1	rs13384378	ACGTTGGATGCCATTAAGCCAGGAAAGGT	ACGTTGGATGCTTCTCATGGCCTCTGCGTTG	GGACACAGGACTCAAATA	9.3
1	rs9798281	ACGTTGGATGCCACTCTCCATCTAAAAGC	ACGTTGGATGTTTGTAAATCCTTCCAACG	ACGTTTTCCACAACCCTAT	9.3
1	rs11688480	ACGTTGGATGGATTGTCAATGGGAGCCACT	ACGTTGGATGAGCTGTGACCACCAGCAT	gaGGGAGCCACTGAGTTTT	9.3
1	rs10929296	ACGTTGGATGAGACTCACCCAGAGCAACTC	ACGTTGGATGAAAGAATGCATCTGTTGTC	cCAGCTCCACTCACAGTAC	9.3
1	rs11690021	ACGTTGGATGTAGTAACCTACCCTGCAAG	ACGTTGGATGTCTGTCTTCCAGAACGATG	caGGGAGTGCCTTCTCCAC	9.3
1	rs10182724	ACGTTGGATGAAAGACCTCACTGAAGGAGC	ACGTTGGATGGATCTTGCATCGCAGGAAG	GGTTGAAACCTCAGATGCC	9.3
1	rs9710693	ACGTTGGATGATCCAGACTCTGATGCTCTC	ACGTTGGATGTAGGTGACGCTGGAAATAGG	caTCTCTATCTCCAGGCTA	11.6
1	rs6740301	ACGTTGGATGTGAAGTGAAGTATCTCCCC	ACGTTGGATGAAATCTCCCTGGAGGGC	GCTGCGATTTAATAAGCCCG	11.6
1	rs10192207	ACGTTGGATGTCTCAGAACACTCCACATC	ACGTTGGATGGAATATTCTGTGTACACTG	ctAACACTCCACCATCTCAGA	11.6
1	rs6745975	ACGTTGGATGACATACGTGCACATGAATAC	ACGTTGGATGGTTTGTCTGATTTTTGATGC	ATGTACGTATGATCATGTTCA	11.6
1	rs9677648	ACGTTGGATGTGGGCTGCTCAGACCAAAG	ACGTTGGATGTTCTCCAGCAGAGAGATTC	AGGACCAAAGCTGAGCTGTTTT	11.6
1	rs9287642	ACGTTGGATGGAAGCTCTCCCTGTAAGAAG	ACGTTGGATGGGGTCAAAATGCAGATGGG	ccACACTAATGACACATTCCACA	11.6
1	rs9752491	ACGTTGGATGTTCACTCTCAAAGATGCC	ACGTTGGATGAAAAGCTAGGGAAGATTTT	tTACTTCAAAGATGCCACTCCAT	11.6
1	rs11681518	ACGTTGGATGACTCCAGCAAGGAGTAATG	ACGTTGGATGAAAAGCATGGTCAAGTGG	GCATATAACAAGACTTACAGTGA	14
1	rs11895264	ACGTTGGATGGGTAAGAATACCACAGAAGC	ACGTTGGATGAACCCAGTATCAAAGTTGC	gAAGAATACCACAGAGCGATATA	14
1	rs9678628	ACGTTGGATGTAAGAAAGAAAATGGAG	ACGTTGGATGGTCTGAAGCCGGGCACAT	AAGAAAAGAAAATGGAGTTTCAG	14
1	rs12465363	ACGTTGGATGCTAGCTATTTGAAATATGC	ACGTTGGATGAAAATAAGTTATAGTATTCTG	TTATTTTAACTGTAATTTCCCTAC	14
1	rs11674803	ACGTTGGATGCTCAAATCCTTTCCCATGC	ACGTTGGATGGGCTACATCTCTAAACTG	aTTTTCCATGCTATGCTCAGAATAA	14
1	rs6753990	ACGTTGGATGAAAATTGAGTACGAGAGCC	ACGTTGGATGTGTGATTTCCCTCATGTTG	gACGAGAGCCTGAGGTCCAACCCAC	14
1	rs9287640	ACGTTGGATGGGAAGACTTCTGTTGCTCCT	ACGTTGGATGAACAGTCTTCCCGACTGTG	gCTGTTGCTCCTCTTTCTCCATA	14
1	rs12618142	ACGTTGGATGAGCTTTCTCAAATCAGGGC	ACGTTGGATGGTGTATGGTCAAGGCAGAAC	tGCTAAGTTGTAATTGTCAATAGATTT	14
1	rs9287641	ACGTTGGATGAGAGAGCAAGGGAGGAATGT	ACGTTGGATGGGGTAAACCATAGATAAAC	cCAAGGGAGGAATGTGCATTCTATTGT	14
1	rs4663959	ACGTTGGATGTGCTCTCTCGCGCTCCA	ACGTTGGATGAGGGAGAGCAGGGTAATCAG	gtTCTCTCTCGCGCTCCAGATCATCG	14
2	rs9287648	ACGTTGGATGTCAGATCTCACCCCTCCTC	ACGTTGGATGGATGCTGGCAAAGACAGTCA	CCTCAAGGGCTCAT	7
2	rs6720396	ACGTTGGATGTTAGCACACAAGAGGGCTCC	ACGTTGGATGTACTTTGCACAGTTTTGGC	GGGCTCCTCAACGA	7
2	rs4545955	ACGTTGGATGACACTGGATATCGTCTAGAG	ACGTTGGATGTACTACTAGATGCCAGCAG	AGACATTTCTGGCTGT	7
2	rs9750742	ACGTTGGATGGAATACACCTCATGTGCTG	ACGTTGGATGCAGCCAAAAGACCTGTG	AGGATGATGAAAACCG	7
2	rs10929297	ACGTTGGATGGCTGTGTGGAGCCAGCCAT	ACGTTGGATGATTGTGAGAGTGGAGAGCG	tGCAGCCCTCACATGCC	9.3
2	rs9678577	ACGTTGGATGAGGAGTTGGCGCTTGATG	ACGTTGGATGGTCTAGCCTATCTTCTCTG	GTGGAGATGGAGGAG	9.3
2	rs6431624	ACGTTGGATGTCTTCCCTTAAGGCTGATG	ACGTTGGATGGAGAGTTCCCTGACAGATGA	AAGGCTGATGCTATTCC	9.3
2	rs6716943	ACGTTGGATGACCTCCAGGACTAGCACAC	ACGTTGGATGTGCTGAATATCTGACCAGGC	GGACTAGCACACAGTAGG	9.3
2	rs12614110	ACGTTGGATGAGTTGAAGCCTGAACCTCC	ACGTTGGATGTGAGAGAGAAAAGGGCAGAC	cAACCTCCTTTAGGTAGC	11.6
2	rs4663957	ACGTTGGATGATCAGCAGGATTGTGTCTCG	ACGTTGGATGCAGCCCTAAACTGTTAAGC	GCAGAGTCTCCATGAAAT	11.6
2	rs11673727	ACGTTGGATGGAATTGATGCAAAACAGGCC	ACGTTGGATGCAGCAAACATTGAGCATCAG	CTGTGAGGTAATCTCACTA	11.6
2	rs1198826	ACGTTGGATGCAGCACGTTCCAGATTCTTC	ACGTTGGATGTTCCAGACCTTCTATG	CTGTTCTGCCTTCTCTCC	11.6
2	rs115599780	ACGTTGGATGGCAAACCCACTTGTTCATC	ACGTTGGATGAGCAGTTTCTGGAGAAACAC	CCCACCTTGTTCATCTGCAGT	14
2	rs9677515	ACGTTGGATGAACCGTCTGGATGCATTTT	ACGTTGGATGCAGCTCCAGTACTATAATC	GGCGTGTCTGTCTATTTTAA	14
2	rs11676424	ACGTTGGATGAGCAGGTTGTCCAATGTCC	ACGTTGGATGTCATCAACCCACAGCAATC	ccGCCAAATGTCTGAGCCTG	14
2	rs7605897	ACGTTGGATGTTCTCTGGGTACATGCCTA	ACGTTGGATGGCAATTTCTAATGAGGTC	TGGGATTGCTGGATCACATGGT	14
2	rs9287645	ACGTTGGATGAACTCCCTGCTCCTCCGT	ACGTTGGATGACTGCAAAGTCTTGGGAAC	aTGCTCCTCCGTCATGTGCTG	14
2	rs5022723	ACGTTGGATGAGCAAAGATTGAGAGTTT	ACGTTGGATGCATGACAGTATTGCTTTT	ccAAGATTGAGAGTTTGGGGGA	14
2	rs11683401	ACGTTGGATGCTCAATTCTAGTACATGC	ACGTTGGATGGCCATGATTGTGTTGCATA	TCTAATTCTAGTACATGCTTAACTT	14

Anhang III: Ergebnisse der Fall-Kontroll-Analyse und der familienbasierten Analyse (Transmission Disequilibrium Test) einschließlich der Stratifikationsanalyse. Die SNP-Positionen beruhen auf NCBI build36. Abkürzungen: MAF = Frequenz des selteneren Allels (*minor allele frequency*, Allel in Klammern); $P_{\text{Korr.}}$ = P-Wert korrigiert für die Anzahl der SNPs (37) nach Bonferroni; OR = odds ratio; 95% CI = 95 % Konfidenzintervall; TDT = Transmission Disequilibrium Test; T = Transmittiert; NT = Nicht transmittiert.

SNP	Position (bp)	Allel A/B	MAF		Risikoallel	P	$P_{\text{Korr.}}$	OR [95% CI]	P-Wert nach Stratifikation für rs9287638	TDT			$P_{\text{Korr.}}$	Ratio	P-Wert nach Stratifikation für rs9287638	P-Wert nach korrigierter Stratifikation für rs9287638
			Betroffene	Nicht-Betroffene						T	NT	P				
rs1198826	238.457.807	G/A	0.499 (G)	0.461 (G)	G	0.144	1	1.16 [0.95-1.41]	0.087	259	256	0.934	1	1.01	0.683	1
rs11681518	239.301.009	G/C	0.048 (G)	0.046 (G)	G	0.891	1	1.03 [0.65-1.65]	0.491	37	53	0.114	1	0.70	0.434	1
rs6431621	239.301.161	T/A	0.248 (T)	0.240 (T)	T	0.714	1	1.04 [0.83-1.31]	0.639	214	201	0.544	1	1.07	0.861	1
rs7580245	239.301.595	T/C	0.423 (T)	0.386 (T)	T	0.132	1	1.17 [0.95-1.43]	0.422	251	272	0.368	1	0.92	0.217	1
rs6740301	239.301.688	T/G	0.113 (T)	0.107 (T)	T	0.693	1	1.07 [0.78-1.46]	0.421	91	119	0.058	1	0.77	0.090	1
rs11690021	239.301.967	C/T	0.074 (C)	0.076 (C)	T	0.886	1	1.03 [0.71-1.49]	0.657	80	59	0.110	1	1.36	0.425	1
rs6716943	239.302.892	A/C	0.237 (A)	0.233 (A)	A	0.870	1	1.02 [0.81-1.28]	0.621	176	227	0.009	0.326	0.78	0.023	0.817
rs4545955	239.303.039	T/C	0.213 (T)	0.167 (T)	T	0.019	0.703	1.35 [1.04-1.74]	0.387	203	172	0.133	1	1.18	0.605	1
rs6720396	239.303.420	T/C	0.303 (T)	0.301 (T)	T	0.950	1	1.01 [0.81-1.25]	0.842	216	272	0.010	0.385	0.79	0.220	1
rs11674589	239.303.520	A/G	0.216 (A)	0.220 (A)	G	0.866	1	1.02 [0.81-1.29]	0.809	201	185	0.403	1	1.09	0.927	1
rs12618142	239.305.242	G/A	0.133 (G)	0.150 (G)	A	0.313	1	1.15 [0.87-1.52]	0.841	132	110	0.157	1	1.20	0.058	1
rs11673727	239.311.421	G/A	0.098 (G)	0.105 (G)	A	0.647	1	1.08 [0.78-1.49]	0.682	95	92	0.882	1	1.03	0.997	1
rs6745975	239.311.480	G/A	0.443 (G)	0.402 (G)	G	0.095	1	1.18 [0.97-1.44]	0.564	257	266	0.725	1	0.97	0.054	1
rs6753990	239.313.329	G/A	0.348 (G)	0.290 (G)	G	0.012	0.444	1.31 [1.06-1.62]	0.924	247	245	0.965	1	1.01	0.146	1
rs7605897	239.314.160	C/T	0.496 (T)	0.465 (C)	C	0.108	1	1.17 [0.96-1.42]	0.965	266	286	0.386	1	0.93	0.209	1
rs11688480	239.316.014	T/C	0.054 (T)	0.061 (T)	C	0.549	1	1.14 [0.75-1.72]	0.483	53	50	0.841	1	1.06	0.341	1
rs13036138	239.320.862	A/G	0.089 (A)	0.100 (A)	G	0.452	1	1.13 [0.81-1.58]	0.101	85	74	0.392	1	1.15	0.176	1
rs11674803	239.334.066	A/G	0.420 (A)	0.456 (A)	G	0.142	1	1.16 [0.95-1.41]	0.888	246	276	0.189	1	0.89	0.059	1
rs4663957	239.334.925	G/A	0.459 (A)	0.498 (G)	G	0.083	1	1.19 [0.98-1.45]	0.850	273	276	0.934	1	0.99	0.360	1
rs5022723	239.336.262	C/T	0.430 (T)	0.371 (C)	C	0.016	0.592	1.28 [1.05-1.56]	0.896	278	263	0.535	1	1.06	0.663	1
rs11676424	239.338.075	T/C	0.079 (T)	0.085 (T)	C	0.699	1	1.07 [0.75-1.53]	0.802	78	77	1	1	1.01	0.341	1
rs4663959	239.338.708	G/T	0.032 (G)	0.031 (G)	G	0.915	1	1.03 [0.59-1.81]	0.591	24	33	0.265	1	0.73	0.588	1
rs12474299	239.339.128	C/G	0.136 (C)	0.172 (C)	G	0.044	1	1.32 [1.01-1.72]	0.323	127	113	0.376	1	1.12	0.97	1
rs6431624	239.344.829	A/T	0.064 (A)	0.070 (A)	T	0.611	1	1.10 [0.75-1.63]	0.985	71	56	0.214	1	1.27	0.716	1
rs12614110	239.351.463	A/G	0.186 (A)	0.199 (A)	G	0.531	1	1.08 [0.84-1.38]	0.697	181	152	0.106	1	1.19	0.642	1
rs9750742	239.352.803	T/G	0.042 (T)	0.044 (T)	G	0.819	1	1.06 [0.65-1.71]	0.725	44	37	0.453	1	1.19	0.887	1
rs9287638	239.359.379	A/C	0.384 (A)	0.294 (A)	A	1.8×10^{-4}	0.007	1.50 [1.21-1.85]	-	270	222	0.037	1	1.22	-	-
rs11683401	239.362.355	T/C	0.482 (T)	0.456 (T)	T	0.014	0.518	1.28 [1.05-1.56]	0.597	275	257	0.434	1	1.07	0.287	1
rs10929296	239.374.868	A/G	0.114 (A)	0.140 (A)	G	0.107	1	1.27 [0.95-1.69]	0.519	121	98	0.120	1	1.24	0.344	1
rs9287640	239.377.004	T/G	0.229 (T)	0.229 (T)	T	0.988	1	1.00 [0.79-1.27]	0.912	172	185	0.512	1	0.93	0.502	1
rs9678628	239.379.677	T/C	0.127 (T)	0.109 (T)	T	0.277	1	1.18 [0.87-1.61]	0.712	110	107	0.895	1	1.03	0.670	1
rs9798281	239.385.071	T/C	0.089 (T)	0.105 (T)	C	0.270	1	1.20 [0.87-1.67]	0.762	92	74	0.161	1	1.24	0.715	1
rs9710693	239.386.997	T/C	0.265 (T)	0.253 (T)	T	0.573	1	1.06 [0.85-1.33]	0.850	184	196	0.566	1	0.94	0.277	1
rs9287645	239.387.249	T/C	0.484 (C)	0.472 (T)	T	0.082	1	1.19 [0.98-1.45]	0.535	268	274	0.825	1	0.98	0.231	1
rs10929299	239.390.388	C/T	0.086 (C)	0.101 (C)	T	0.268	1	1.20 [0.86-1.68]	0.707	91	77	0.295	1	1.18	0.466	1
rs9752491	239.399.424	A/G	0.244 (A)	0.216 (A)	A	0.193	1	1.17 [0.92-1.48]	0.260	198	198	1	1	1	0.214	1
rs11895264	239.404.185	T/C	0.349 (T)	0.325 (T)	T	0.321	1	1.11 [0.90-1.37]	0.565	234	249	0.509	1	0.94	0.199	1

Anhang IV: Tabellarische Übersicht über die berechneten Expressionswerte für die HDAC4-Expressionsanalyse in verschiedenen Geweben. In der Tabelle angegeben sind von links: Gewebetyp, die drei Messwerte für Referenz- und Zielgen, der Mittelwert der drei ΔCt -Werte aus den Messtriplikaten (Mittelwert der Ct-Werte von HDAC4 - Mittelwert der Ct-Werte von Cyclophilin), der relative Expressionswert $\Delta\Delta Ct$ (Mittelwert ΔCt einer Probe - Mittelwert ΔCt aller Proben) und der absolute Expressionswert ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Abkürzungen: Ct = Cycle threshold (Zyklus-Schwellenwert) (vgl. Kap. 3.9.6).

Gewebetyp	Ct-Werte Cyclophilin			Ct-Werte HDAC4			Mittelwert ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 1	Messung 2	Messung 3			
Gehirn	19.67144	20.005419	20.07544	28.23386	28.711777	28.837854	8.677064	-0.463391167	1.378778939
Kolon	20.803337	20.697287	20.687605	30.600958	30.74718	30.527704	9.895871	0.755415833	0.592375618
Herz	19.636232	19.69277	19.704079	27.689638	27.73396	27.67272	8.021079	-1.119376167	2.172530102
Niere	18.10614	20.223629	20.13043	28.256878	30.527676	30.580433	10.301596	1.161140833	0.447158798
Leukozyten	20.28948	20.304367	20.369917	27.655054	27.83951	27.953987	7.494929	-1.645526167	3.128619406
Leber	18.041676	18.438368	18.521738	29.529264	30.19916	30.594545	11.773729	2.633273833	0.161177936
Lunge	18.910395	19.12605	19.508392	28.792624	29.17352	29.668201	10.029836	0.889380833	0.539845756
Ovar	19.426657	19.337082	18.02188	29.127064	29.105925	27.564543	9.670637667	0.5301825	0.692467132
Pankreas	18.813843	18.970917	18.766033	28.533148	28.775307	28.775307	9.856694667	0.7162395	0.608681954
Plazenta	19.914959	20.312607	20.828953	29.459133	29.699335	30.251318	9.451089	0.310633833	0.806287447
Prostata	18.720804	18.946493	18.839529	29.977459	30.191813	30.087294	11.24991333	2.109458167	0.231734032
Skelettmuskel	21.331152	21.42279	21.849367	26.418615	26.476692	26.940168	5.077388667	-4.0630665	16.71494265
Dünndarm	19.276188	19.179466	19.017515	28.19045	28.024633	27.743761	8.828558333	-0.311896833	1.241338721
Milz	18.446236	18.403208	18.496685	27.505749	27.483416	27.467665	9.036900333	-0.103554833	1.074417593
Hoden	19.222383	19.231195	19.105774	24.540455	24.92203	24.75455	5.552561	-3.587894167	12.0244097
Thymus	18.977627	19.038786	18.984953	27.98233	27.909426	27.895128	8.928506	-0.211949167	1.158251994
Haarschaft	19.520124	19.039085	19.126215	26.989048	27.11559	27.133932	7.851048667	-1.2894065	2.444274816
Kopfhaut	17.237926	17.546448	17.349375	25.912954	26.08575	25.997816	8.620923667	-0.5195315	1.433489662
Haut	17.160036	17.301012	17.335798	26.997826	26.94358	27.1043	9.74962	0.609164833	0.655576101
Vollblut	21.112698	21.42714	21.662828	26.800753	26.918102	26.986803	5.500997333	-3.639457833	12.46194918

Anhang V: Tabellarische Übersicht über die berechneten Expressionswerte für die HDAC4-Expressionsanalyse in Haarschaft-RNA. In der Tabelle angegeben sind von links: Probenkennung, der vorliegende Genotyp für rs9287638, die drei Messwerte für Referenz- und Zielgen, der Mittelwert der drei ΔCt -Werte aus den Messtriplikaten (Mittelwert der Ct-Werte von HDAC4 - Mittelwert der Ct-Werte von Cyclophilin), der relative Expressionswert $\Delta\Delta Ct$ (Mittelwert ΔCt einer Probe - Mittelwert ΔCt aller Proben) und der absolute Expressionswert ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Abkürzungen: Ct = Cycle threshold (Zyklus-Schwellenwert) (vgl. Kap. 3.9.6).

Proben-ID	rs9287638	Ct-Werte Cyclophilin			Ct-Werte HDAC4			Mittelwert ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
		Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 1	Messung 2	Messung 3			
HSK-001	AC	16.890194	18.120964	17.295872	27.197645	28.410738	27.162445	10.15459933	-0.374175439	1.29609857
HSK-003	AC	16.735289	17.167936	16.948448	28.019762	28.098944	28.24291	11.169981	0.641206228	0.64117664
HSK-004	CC	17.442505	16.941994	17.095655	27.273565	27.322762	27.298592	10.138255	-0.390519772	1.3108656
HSK-007	CC	18.853542	18.813435	18.540737	28.509161	28.580246	28.60467	9.828787667	-0.699987106	1.62449027
HSK-008	CC	18.054113	16.911098	18.53458	29.410698	27.7716	29.353283	11.01193	0.483155228	0.71541128
HSK-010	AC	17.571579	17.595984	17.243586	27.529192	27.621447	27.637817	10.125769	-0.403005772	1.3222599
HSK-012	AA	17.19157	17.409487	17.421648	27.47458	27.411465	27.543509	10.13561633	-0.393158439	1.31326534
HSK-014	AC	18.074684	17.38776	17.243214	31.83525	30.2533	30.363564	13.24881867	2.720043894	0.15176974
HSK-019	CC	19.04893	19.00375	19.68995	30.107788	30.621786	31.021904	11.33628267	0.807507894	0.57136798
HSK-020	AC	17.809864	17.397795	17.593222	29.356758	29.29632	29.504452	11.78554967	1.256774894	0.41847841
HSK-022	CC	16.531483	15.734965	18.33864	27.372648	26.479506	28.733286	10.66011733	0.131342561	0.91298144
HSK-024	CC	16.286993	15.7320175	15.985743	26.847546	26.127094	26.577507	10.51579783	-0.012976939	1.0090355
HSK-025	CC	16.932325	16.934376	16.841667	26.978622	26.968372	27.198502	10.14570933	-0.383065439	1.30410989
HSK-026	AA	17.041513	16.904737	17.413424	26.526474	26.577435	26.36017	9.368135	-1.160639772	2.23556543
HSK-028	CC	17.162546	17.483398	17.137373	26.952236	26.967228	26.898129	9.678092	-0.850682772	1.80335418
HSK-031	AC	17.769718	16.92331	18.323412	30.203365	30.265965	31.255972	12.902954	2.374179228	0.19288606
HSK-032	AA	18.190207	17.78428	18.530672	29.8357	29.556349	30.69101	11.8593	1.330525228	0.39762346
HSK-034	AA	21.847216	21.01704	21.783329	34.867527	35.41773	36.995506	14.21105933	3.682284561	0.07789721
HSK-038	CC	16.983078	17.027126	16.962526	26.803837	26.851679	26.620905	9.767897	-0.760877772	1.6945213
HSK-041	AC	19.653233	19.335604	20.680914	32.42467	31.566458	32.889965	12.40378067	1.875005894	0.27262582
HSK-043	AC	19.8173	19.268967	19.460018	31.483185	31.43056	31.244524	11.87066133	1.341886561	0.39450444
HSK-044	CC	17.45406	17.276669	17.04863	26.996126	27.124388	27.181692	9.840949	-0.687825772	1.61085403
HSK-053	CC	17.947763	15.901392	17.91724	27.533382	25.74374	27.709272	9.739999667	-0.788775106	1.72760705
HSK-055	AC	17.72104	17.495178	17.680458	28.525196	28.68857	28.471369	10.92948633	0.400711561	0.75748459

HSK-058	AC	16.664085	16.927378	16.588438	26.82154	26.601433	26.784767	10.00927967	-0.519495106	1.4334535
HSK-061	AC	18.036266	17.86675	18.088198	27.785744	27.528156	27.587769	9.636818333	-0.891956439	1.85569092
HSK-065	AA	17.553383	16.69205	17.7261	27.149414	25.564278	26.971043	9.237734	-1.291040772	2.44704524
HSK-066	AC	17.23186	17.42882	17.414474	29.062094	28.90602	28.82869	11.57388333	1.045108561	0.48460844
HSK-068	AC	16.974237	16.336643	17.00593	26.554573	26.478447	26.925922	9.880710667	-0.648064106	1.567064
HSK-069	AC	18.20806	16.69643	16.474566	28.544624	27.212051	26.838501	10.40537333	-0.123401439	1.08930008
HSK-076	AA	18.90017	16.792276	17.534502	30.051456	28.398926	29.321741	11.51505833	0.986283561	0.50477643
HSK-080	CC	18.679071	18.655453	17.42887	29.83738	30.355032	28.315115	11.24804433	0.719269561	0.60740489
HSK-081	AC	17.349884	16.753706	18.094963	27.777967	27.201847	28.526476	10.43591233	-0.092862439	1.06648409
HSK-083	AC	16.731972	17.831682	16.469471	26.629602	27.815907	26.544445	9.985609667	-0.543165106	1.45716587
HSK-084	AA	18.108858	18.070433	17.887974	29.676676	29.814352	29.933058	11.785607	1.256832228	0.41846178
HSK-085	CC	18.048693	17.371498	16.878714	27.883518	26.98212	26.628353	9.731695333	-0.797079439	1.73758004
HSK-088	CC	17.72908	18.203438	18.009996	29.3172	29.4847	29.630228	11.496538	0.967763228	0.51129817
HSK-089	AA	17.0464	17.098194	17.249231	26.916636	26.957489	26.895624	9.791974667	-0.736800106	1.6664755
HSK-090	AA	16.368101	15.89267	16.79619	27.818567	27.605267	27.74959	11.37215433	0.843379561	0.55733646
HSK-091	CC	18.23826	16.449791	16.84311	28.235462	27.107244	26.619305	10.14361667	-0.385158106	1.3060029
HSK-092	CC	16.974539	16.581253	16.933054	27.151617	27.137352	27.03833	10.27948433	-0.249290439	1.18862237
HSK-094	CC	16.43239	16.70659	16.448702	26.580906	26.556183	26.584314	10.04457367	-0.484201106	1.39881106
HSK-095	CC	18.163382	17.332304	18.799732	28.87878	28.494347	29.998154	11.02528767	0.496512894	0.70881798
HSK-096	AA	18.561724	17.55915	18.260145	30.658594	30.497684	30.336935	12.37073133	1.841956561	0.27894323
HSK-100	AC	17.727436	17.263845	18.05087	27.333536	26.840178	27.739697	9.623753333	-0.905021439	1.87257232
HSK-101	AC	17.795141	17.45462	17.045567	29.267454	29.096674	29.279615	11.782805	1.254030228	0.41927531
HSK-102	CC	17.56882	18.536346	17.555967	28.339693	29.354322	28.323923	10.78560167	0.256826894	0.83692666
HSK-103	AA	17.660116	16.623533	16.74721	27.376043	26.043081	26.46687	9.618378333	-0.910396439	1.87956191
HSK-105	CC	19.15198	17.137344	18.444286	29.68165	27.70623	28.94873	10.53433333	0.005558561	0.99615451
HSK-106	CC	17.125257	16.926245	17.027935	28.389994	28.458359	28.480988	11.41663467	0.887859894	0.54041518
HSK-107	AA	16.847013	16.235764	18.06597	26.822237	26.215578	27.633396	9.840821333	-0.687953439	1.61099659
HSK-109	AC	17.748695	16.247524	18.096735	28.291718	26.144836	28.191353	10.17831767	-0.350457106	1.27496452
HSK-113	CC	14.774512	14.155841	14.966392	25.363293	24.61771	25.295141	10.45979967	-0.068975106	1.04897123
HSK-117	CC	22.223103	22.093426	21.919052	34.606148	34.438988	34.23704	12.348865	1.820090228	0.28320326
HSK-120	CC	18.527998	18.336472	17.745468	28.386591	28.356781	28.199818	10.111084	-0.417690772	1.33578773
HSK-122	CC	16.591307	16.706285	16.882515	25.82963	25.764267	25.617273	9.010354333	-1.518420439	2.86477223
HSK-123	AA	16.62726	16.023123	17.910522	26.76135	26.333548	28.195944	10.24331233	-0.285462439	1.21880087
HSK-124	AC	16.729187	17.78369	16.348812	26.377628	27.295797	26.34268	9.718138667	-0.810636106	1.75398463
HSK-139	CC	17.44335	16.607449	16.517689	26.750689	26.01645	26.098303	9.432318	-1.096456772	2.13828888
HSK-140	AC	17.166525	16.718021	17.409737	26.661448	26.642086	26.441706	9.483652333	-1.045122439	2.06354148
HSK-141	AC	17.07486	17.630816	17.132122	28.145254	28.101063	28.06926	10.82592633	0.297151561	0.81385768
HSK-142	AC	17.377018	18.010683	17.014921	26.909523	27.780323	26.930727	9.739317	-0.789457772	1.72842472
HSK-143	AC	16.607769	16.795229	16.769491	26.503862	26.562735	26.414742	9.769616667	-0.759158106	1.69250267
HSK-144	AA	17.054937	17.355793	16.868446	26.299677	26.98236	26.232569	9.41181	-1.116964772	2.16890186
HSK-145	CC	17.40411	17.364212	16.892359	26.556786	26.55142	26.20272	9.216748333	-1.312026439	2.48290048
HSK-148	CC	16.557682	16.1696	16.453081	26.729437	26.509878	26.350517	10.13648967	-0.392285106	1.3124706
HSK-149	AC	17.873888	16.26154	17.219591	28.168928	26.525864	28.120338	10.48670367	-0.042071106	1.02959083
HSK-150	AA	16.814936	16.27686	16.214624	27.010878	25.968414	25.521332	9.731401333	-0.797373439	1.73793417
HSK-152	AC	17.262957	17.549316	17.37529	29.854523	29.679718	29.737423	12.361367	1.832592228	0.2807597
HSK-159	AC	18.744667	18.436365	18.655415	29.158983	29.108301	29.356937	10.59592467	0.067149894	0.95452184
HSK-160	AC	16.240704	16.59444	17.234663	26.86985	26.451828	27.255484	10.16911833	-0.359656439	1.2831203
HSK-161	CC	17.473965	17.420952	17.520517	30.18637	29.400084	29.593767	12.254929	1.726154228	0.30225661
HSK-162	CC	17.09814	15.967885	17.696346	27.849115	26.186872	27.99663	10.42341533	-0.105359439	1.07576238
HSK-163	CC	17.07188	17.097582	16.862547	27.999083	28.02174	27.75674	10.91518467	0.386409894	0.765031
HSK-165	AA	16.642754	16.803814	16.70479	26.187649	26.022867	26.088089	9.382415667	-1.146359106	2.21354562
HSK-167	AC	16.409906	16.73104	16.381145	27.111004	27.220734	27.217514	10.67572033	0.146945561	0.90316059
HSK-168	AC	17.195992	17.383238	17.27175	26.566538	26.474575	26.313313	9.167815333	-1.360959439	2.5685594
HSK-169	CC	17.862864	16.664955	17.880262	27.766155	26.148546	27.72299	9.743203333	-0.785571439	1.72377496
HSK-170	AC	17.865368	17.884867	18.108555	29.145218	29.105188	29.256247	11.21595433	0.687179561	0.62106684
HSK-171	AC	17.737587	17.867077	17.74316	27.175282	27.20353	27.258947	9.429978333	-1.098796439	2.14175943
HSK-173	CC	17.054617	16.73751	16.891808	26.390411	26.521736	26.583559	9.603923667	-0.924851106	1.8984883
HSK-174	AC	18.326517	16.488342	17.488503	27.821665	25.759325	26.734716	9.337448	-1.191326772	2.2836266
HSK-175	AC	17.71295	17.09053	18.173363	29.021978	28.734852	29.767828	11.51593833	0.987163561	0.50446862
HSK-176	AC	17.60386	17.98041	17.289219	26.584818	26.515871	26.47642	8.901206667	-1.627568106	3.08991704
HSK-177	CC	17.48555	15.93589	17.234655	26.584818	26.515871	26.47642	9.590306667	-0.938468106	1.91649217
HSK-179	CC	17.304573	16.49362	16.355795	28.483818	27.475847	27.826553	11.21074333	0.681968561	0.62331418
HSK-180	CC	17.568108	16.798681	16.998005	27.99119	27.063938	26.55582	10.08205133	-0.446723439	1.36294131
HSK-181	CC	18.077465	17.509092	17.265062	30.237688	29.987558	29.825726	12.39978433	1.871009561	0.27338205
HSK-182	AC	17.254135	17.203932	17.41325	26.53139	26.208387	26.40388	9.09078	-1.437994772	2.70944014
HSK-183	AC	18.289875	17.29982	16.793842	29.112204	28.252214	27.469288	10.816723	0.287948228	0.81906609

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Abdel Fattah NS, Darwish YW. Androgenetic alopecia and insulin resistance: are they truly associated? *Int J Dermatol* 2011; 50: 417-422
- Ackerman H, Usen S, Jallow M, Sisay-Joof F, Pinder M, Kwiatkowski DP. A comparison of case-control and family-based association methods: the example of sickle-cell and malaria. *Ann Hum Genet* 2005; 69: 559-565
- Ahouansou S, Le Toumelin P, Crickx B, Descamps V. Association of androgenetic alopecia and hypertension. *Eur J Dermatol* 2007; 17: 220-222
- Andersson S, Berman DM, Jenkins EP, Russell DW. Deletion of steroid 5 alpha-reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. *Nature* 1991; 354: 159-161
- Arias-Santiago S, Arrabal-Polo MA, Buendía-Eisman A, Arrabal-Martín M, Gutiérrez-Salmerón MT, Girón-Prieto MS, Jimenez-Pacheco A, Eduardo Calonje J, Naranjo-Sintes R, Zuluaga-Gomez, Serrano Ortega S. Androgenetic alopecia as an early marker of benign prostatic hyperplasia. *J Am Acad Dermatol* 2011; Epub ahead of print; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21835498> (Zugriffsdatum: 04.10.2011)
- Armitage P. Tests for Linear Trends in Proportions and Frequencies. *Biometrics* 1955; 11: 375-386
- Balding DJ, Bishop M, Cannings C. *Handbook of Statistical Genetics*. Third Edition. Chichester, Sussex: John Wiley & Sons, 2007
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005; 21: 263-265
- Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 2004; 116: 281-297
- Bauer WR, Hayes JJ, White JH, Wolffe AP. Nucleosome structural changes due to acetylation. *J Mol Biol* 1994; 236: 685-690
- Bergfeld WF. Androgenetic alopecia: an autosomal dominant disorder. *Am J Med* 1995; 98: 95S-98S
- Bienova M, Kucerova R, Fiurskova M, Hajdich M, Kolar Z. Androgenetic alopecia and current methods of treatment. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat* 2005; 14: 5-8
- Birch MP, Messenger AG. Genetic factors predispose to balding and non-balding in men. *Eur J Dermatol* 2001; 11: 309-314
- Birch MP, Messenger JF, Messenger AG. Hair density, hair diameter and the prevalence of female pattern hair loss. *Br J Dermatol* 2001; 144: 297-304

- Blume-Peytavi U, Blumeyer A, Tosti A, Finner A, Marmol V, Trakatelli M, Reygagne P, Messenger A. S1 guideline for diagnostic evaluation in androgenetic alopecia in men, women and adolescents. *Br J Dermatol* 2011a; 164: 5-15
- Blume-Peytavi U, Lönnfors S, Hillmann K, Bartels NG. A randomized double-blind placebo-controlled pilot study to assess the efficacy of a 24-week topical treatment by latanoprost 0.1% on hair growth and pigmentation in healthy volunteers with androgenetic alopecia. *J Am Acad Dermatol* 2011b; Epub ahead of print; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21875758> (Zugriffsdatum: 04.10.2011)
- Botchkarev VA, Kishimoto J. Molecular control of epithelial-mesenchymal interactions during hair follicle cycling. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2003; 8: 46-55
- Botstein D, Risch N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet* 2003; 33 Suppl: 228-237
- Braun-Falco O, Bergner T. Androgenetic alopecia in the male. Recent developments. *Hautarzt* 1989; 40: 669-678
- Brockschmidt FF, Nöthen MM, Hillmer AM. The two most common alleles of the coding GGN repeat in the androgen receptor gene cause differences in protein function. *J Mol Endocrinol* 2007; 39: 1-8
- Brockschmidt FF, Hillmer AM, Eigelshoven S, Hanneken S, Heilmann S, Barth S, Herold C, Becker T, Kruse R, Nöthen MM. Fine mapping of the human AR/EDA2R locus in androgenetic alopecia. *Br J Dermatol* 2010; 162: 899-903
- Brockschmidt FF, Heilmann S, Ellis JA, Eigelshoven S, Hanneken S, Moebus S, Alblas MA, Kluck N, Priebe L, Degenhardt FA, Abou Jamra R, Meesters C, Erbel R, Harrap S, Schumacher J, Kruse R, Hillmer AM, Becker T, Nöthen MM. Susceptibility variants on chromosome 7p21.1 suggest HDAC9 as a new candidate gene for male-pattern baldness. *Br J Dermatol* 2011; 165: 1293-1302
- Brooks JR, Baptista EM, Berman C, Ham EA, Hichens M, Johnston DB, Primka RL, Rasmusson GH, Reynolds GF, Schmitt SM, Arth GE. Response of rat ventral prostate to a new and novel 5 alpha-reductase inhibitor. *Endocrinology* 1981; 109: 830-836
- Brown C, Goss S, Lubahn D, Joseph D, Wilson E, French F, Willard H. Androgen receptor locus on the human X chromosome: regional localization to Xq11-12 and description of a DNA polymorphism. *Am J Hum Genet* 1989; 44: 264-269
- Buetow KH, Edmonson M, MacDonald R, Clifford R, Yip P, Kelley J, Little DP, Strausberg R, Koester H, Cantor CR, Braun A. High-throughput development and characterization of a genomewide collection of gene-based single nucleotide polymorphism markers by chip-based matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 581-584

- Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000; 25: 169-193
- Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 2002; 29: 23-39
- Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR - a perspective. *J Mol Endocrinol* 2005; 34: 597-601
- Carey AH, Chan KL, Short F, White D, Williamson R, Franks S. Evidence for a single gene effect causing polycystic ovaries and male pattern baldness. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1993; 38: 653-658
- Cash TF. The psychological effects of androgenetic alopecia in men. *J Am Acad Dermatol* 1992; 26: 926-931
- Chen Y, Zajac JD, MacLean HE. Androgen regulation of satellite cell function. *J Endocrinol* 2005; 186: 21-31
- Chen S, Bellew C, Yao X, Stefkova J, Dipp S, Saifudeen Z, Bachvarov D, El-Dahr SS. HDAC activity is critical for embryonic kidney gene expression, growth and differentiation. *J Biol Chem* 2011; 286: 32775-32789
- Cheung P, Allis CD, Sassone-Corsi P. Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell* 2000; 103: 263-271
- Chorley BN, Wang X, Campbell MR, Pittman GS, Nouredine MA, Bell DA. Discovery and verification of functional single nucleotide polymorphisms in regulatory genomic regions: current and developing technologies. *Mutat Res* 2008; 659: 147-157
- Cikos S, Koppel J. Transformation of real-time PCR fluorescence data to target gene quantity. *Anal Biochem* 2009; 384: 1-10
- Cipriani R, Ruzza G, Foresta C, Veller Fornasa C, Peserico A. Sex hormone-binding globulin and saliva testosterone levels in men with androgenetic alopecia. *Br J Dermatol* 1983; 109: 249-252
- Cobb JE, White SJ, Harrap SB, Ellis JA. Androgen receptor copy number variation and androgenetic alopecia: a case-control study. *PLoS One* 2009; 4: e5081
- Cobb JE, Zaloumis SG, Scurrah KJ, Harrap SB, Ellis JA. Evidence for two independent functional variants for androgenetic alopecia around the androgen receptor gene. *Exp Dermatol* 2010; 19: 1026-1028
- Cooper DN. Regulatory mutations and human genetic disease. *Ann Med* 1992; 24: 427-437
- Cotsarelis G, Millar SE. Towards a molecular understanding of hair loss and its treatment. *Trends Mol Med* 2001; 7: 293-301

- Cotsarelis G. Epithelial stem cells: a folliculocentric view. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 1459-1468
- Cotter RJ. Time-of-flight mass spectrometry for the structural analysis of biological molecules. *Anal Chem* 1992; 64: 1027A-1039A
- Courtois M, Loussouarn G, Hourseau C, Grollier JF. Hair cycle and alopecia. *Skin Pharmacol* 1994; 7: 84-89
- Cousen P, Messenger A. Female pattern hair loss in complete androgen insensitivity syndrome. *Br J Dermatol* 2010; 162: 1135-1137
- Cremers RG, Aben KK, Vermeulen SH, den Heijer M, van Oort IM, Kiemeneij LA. Androgenic alopecia is not useful as an indicator of men at high risk of prostate cancer. *Eur J Cancer* 2010; 46: 3294-3299
- Cude KJ, Dixon SC, Guo Y, Lisella J, Figg WD. The androgen receptor: genetic considerations in the development and treatment of prostate cancer. *J Mol Med (Berl)* 1999; 77: 419-426
- Culig Z, Hobisch A, Hittmair A, Peterziel H, Cato AC, Bartsch G, Klocker H. Expression, structure, and function of androgen receptor in advanced prostatic carcinoma. *Prostate* 1998; 35: 63-70
- Dallob AL, Sadick NS, Unger W, Lipert S, Geissler LA, Gregoire SL, Nguyen HH, Moore EC, Tanaka WK. The effect of finasteride, a 5 alpha-reductase inhibitor, on scalp skin testosterone and dihydrotestosterone concentrations in patients with male pattern baldness. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 703-706
- Dargie HJ, Dollery CT, Daniel J. Minoxidil in resistant hypertension. *Lancet* 1977; 2: 515-518
- Dawber RP, Rundegren J. Hypertrichosis in females applying minoxidil topical solution and in normal controls. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2003; 17: 271-275
- de Ruijter AJM, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg ABP. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* 2003; 370: 737-749
- Ding C, Cantor CR. A high-throughput gene expression analysis technique using competitive PCR and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight MS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 3059-3064
- Ding D, Xu L, Menon M, Reddy GP, Barrack ER. Effect of GGC (glycine) repeat length polymorphism in the human androgen receptor on androgen action. *Prostate* 2005; 62: 133-139
- Dixon AL, Liang L, Moffatt MF, Chen W, Heath S, Wong KC, Taylor J, Burnett E, Gut I, Farrall M, Lathrop GM, Abecasis GR, Cookson WO. A genome-wide association study of global gene expression. *Nat Genet* 2007; 39: 1202-1207

- Duret L. Mutation patterns in the human genome: more variable than expected. *PLoS Biol* 2009; 7: e1000028
- Ellis JA, Stebbing M, Harrap SB. Genetic analysis of male pattern baldness and the 5alpha-reductase genes. *J Invest Dermatol* 1998; 110: 849-853
- Ellis JA, Harrap SB. The genetics of androgenetic alopecia. *Clin Dermatol* 2001; 19: 149-154
- Ellis JA, Stebbing M, Harrap SB. Polymorphism of the androgen receptor gene is associated with male pattern baldness. *J Invest Dermatol* 2001a; 116: 452-455
- Ellis JA, Stebbing M, Harrap SB. Male pattern baldness is not associated with established cardiovascular risk factors in the general population. *Clin Sci (Lond)* 2001b; 100: 401-404
- Ellis JA, Sinclair R, Harrap SB. Androgenetic alopecia: pathogenesis and potential for therapy. *Expert Rev Mol Med* 2002; 4: 1-11
- Ellis JA, Scurrah KJ, Cobb JE, Zaloumis SG, Duncan AE, Harrap SB. Baldness and the androgen receptor: the AR polyglycine repeat polymorphism does not confer susceptibility to androgenetic alopecia. *Hum Genet* 2007; 121: 451-457
- Eun HC, Kwon OS, Yeon JH, Shin HS, Kim BY, Ro BI, Cho HK, Sim WY, Lew BL, Lee WS, Park HY, Hong SP, Ji JH. Efficacy, safety, and tolerability of dutasteride 0.5 mg once daily in male patients with male pattern hair loss: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III study. *J Am Acad Dermatol* 2010; 63: 252-258
- European Dermatology Forum, 2011: Evidence based (S3) guidelines for the treatment of androgenetic alopecia in women and in men. http://www.euroderm.org/edf/images/stories/guidelines/S3_guideline_androgenetic_alopecia.pdf (Zugriffsdatum: 12.09.2011)
- Feroze-Merzoug F, Berquin IM, Dey J, Chen YQ. Peptidylprolyl isomerase A (PPIA) as a preferred internal control over GAPDH and beta-actin in quantitative RNA analyses. *Biotechniques* 2002; 32: 776-778
- Fischle W, Kiermer V, Dequiedt F, Verdin E. The emerging role of class II histone deacetylases. *Biochem Cell Biol* 2001; 79: 337-348
- Ford ES, Freedman DS, Byers T. Baldness and Ischemic Heart Disease in a National Sample of Men. *Am J Epidemiol* 1996; 143: 651-657
- Franco HL, Casasnovas J, Rodríguez-Medina JR, Cadilla CL. Redundant or separate entities?--roles of Twist1 and Twist2 as molecular switches during gene transcription. *Nucleic Acids Res* 2011; 39: 1177-1186
- Fu M, Wang C, Zhang X, Pestell RG. Acetylation of nuclear receptors in cellular growth and apoptosis. *Biochem Pharmacol* 2004; 68: 1199-1208

- Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, Higgins J, DeFelice M, Lochner A, Faggart M, Liu-Cordero SN, Rotimi C, Adeyemo A, Cooper R, Ward R, Lander ES, Daly MJ, Altshuler D. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 2002; 296: 2225-2229
- Gao X, Chandra T, Gratton MO, Quélo I, Prud'homme J, Stifani S, St-Arnaud R. HES6 acts as a transcriptional repressor in myoblasts and can induce the myogenic differentiation program. *J Cell Biol* 2001; 154: 1161-1171
- Gassmueller J, Hoffmann R, Webster A. Topical fulvestrant solution has no effect on male and postmenopausal female androgenetic alopecia: results from two randomized, proof-of-concept studies. *Br J Dermatol* 2008; 158: 109-115
- Gho CG, Neumann HA. Therapeutic options for androgenetic alopecia. *Ned Tijdschr Geneeskd* 2011; 155: A2535
- Giles GG, Severi G, Sinclair R, English DR, McCredie MR, Johnson W, Boyle P, Hopper JL. Androgenetic alopecia and prostate cancer: findings from an Australian case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 549-553
- Gormley GJ, Stoner E, Bruskewitz RC, Imperato-McGinley J, Walsh PC, McConnell JD, Andriole GL, Geller J, Bracken BR, Tenover JS. The effect of finasteride in men with benign prostatic hyperplasia. The Finasteride Study Group. *N Engl J Med* 1992; 327: 1185-1191
- Grant PA, Berger SL. Histone acetyltransferase complexes. *Semin Cell Dev Biol* 1999; 10: 169-177
- Grant PA. A tale of histone modifications. *Genome Biol* 2001; 2: reviews0003.1-0003.6
- Greenberg DA. Linkage Analysis of "Necessary" Disease Loci versus "Susceptibility" Loci. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 135-143
- Griffin JE, Wilson JD. The androgen resistance syndromes: 5alpha-reductase deficiency, testicular feminisation & related disorders. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill, 1989; 1919-1944
- Grozinger CM, Hassig CA, Schreiber SL. Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 4868-4873
- Haberland M, Montgomery RL, Olson EN. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet* 2009; 10: 32-42
- Haff LA, Smirnov IP. Single-nucleotide polymorphism identification assays using a thermostable DNA polymerase and delayed extraction MALDI-TOF mass spectrometry. *Genome Res* 1997; 7: 378-388

- Halkidou K, Cook S, Leung HY, Neal DE, Robson CN. Nuclear accumulation of histone deacetylase 4 (HDAC4) coincides with the loss of androgen sensitivity in hormone refractory cancer of the prostate. *Eur Urol* 2004; 45: 382-389; author reply 389
- Hamilton JB. Male hormone stimulation is a prerequisite and an incitant in common baldness. *Am J Anat* 1942; 71: 451-480
- Hamilton JB. Patterned loss of hair in man: Types and incidence. *Ann N Y Acad Sci* 1951; 53: 708-728
- Harms E, Kivimäe S, Young MW, Saez L. Posttranscriptional and posttranslational regulation of clock genes. *J Biol Rhythms* 2004; 19: 361-373
- Harris H. The inheritance of premature baldness in men. *Ann Eugen* 1946; 13: 172-181
- Hawk E, Breslow RA, Graubard BI. Male Pattern Baldness and Clinical Prostate Cancer in the Epidemiologic Follow-Up of the First National Health and Nutrition Examination Survey Male Pattern Baldness and Clinical Prostate Cancer in the Epidemiologic Follow-Up of the First National Health. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 523-527
- Hayes VM, Severi G, Eggleton SA, Padilla EJ, Southey MC, Sutherland RL, Hopper JL, Giles GG. The E211 G>A androgen receptor polymorphism is associated with a decreased risk of metastatic prostate cancer and androgenetic alopecia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 993-996
- Herrera CR, D'Agostino RB, Gerstman BB, Bosco LA, Belanger AJ. Baldness and coronary heart disease rates in men from the Framingham Study. *Am J Epidemiol* 1995; 142: 828-833
- Hibberts NA, Howell AE, Randall VA. Balding hair follicle dermal papilla cells contain higher levels of androgen receptors than those from non-balding scalp. *J Endocrinol* 1998; 156: 59-65
- Higgins CA, Westgate GE, Jahoda CA. From telogen to exogen: mechanisms underlying formation and subsequent loss of the hair club fiber. *J Invest Dermatol* 2009; 129: 2100-2108
- Hillmer AM, Hanneken S, Ritzmann S, Becker T, Freudenberg J, Brockschmidt FF, Flaquer A, Freudenberg-Hua Y, Jamra RA, Metzen C, Heyn U, Schweiger N, Betz RC, Blaumeiser B, Hampe J, Schreiber S, Schulze TG, Hennies HC, Schumacher J, Propping P, Ruzicka T, Cichon S, Wienker TF, Kruse R, Nöthen MM. Genetic variation in the human androgen receptor gene is the major determinant of common early-onset androgenetic alopecia. *Am J Hum Genet* 2005; 77: 140-148
- Hillmer AM, Brockschmidt FF, Hanneken S, Eigelshoven S, Steffens M, Flaquer A, Herms S, Becker T, Kortüm AK, Nyholt DR, Zhao ZZ, Montgomery GW, Martin NG, Mühleisen TW, Alblas MA, Moebus S, Jöckel K-H, Bröcker-Preuss M, Erbel R, Reinartz R, Betz RC, Cichon S, Propping P, Baur MP, Wienker TF, Kruse R, Nöthen MM. Susceptibility variants for male-pattern baldness on chromosome 20p11. *Nat Genet* 2008a; 40: 1279-1281

- Hillmer AM, Flaquer A, Hanneken S, Eigelshoven S, Kortüm AK, Brockschmidt FF, Golla A, Metzen C, Thiele H, Kolberg S, Reinartz R, Betz RC, Ruzicka T, Hennies HC, Kruse R, Nöthen MM. Genome-wide scan and fine-mapping linkage study of androgenetic alopecia reveals a locus on chromosome 3q26. *Am J Hum Genet* 2008b; 82: 737-743
- Hillmer AM, Freudenberg J, Myles S, Herms S, Tang K, Hughes DA, Brockschmidt FF, Ruan Y, Stoneking M, Nöthen MM. Recent positive selection of a human androgen receptor/ectodysplasin A2 receptor haplotype and its relationship to male pattern baldness. *Hum Genet* 2009; 126: 255-264
- Hirso P, Laakso M, Matilainen V, Hiltunen L, Rajala U, Jokelainen J, Keinänen-Kiukaanniemi S. Association of insulin resistance linked diseases and hair loss in elderly men. Finnish population-based study. *Cent Eur J Public Health* 2006; 14: 78-81
- Hirso P, Rajala U, Hiltunen L, Jokelainen J, Keinänen-Kiukaanniemi S, Näyhä S. Obesity and low-grade inflammation among young Finnish men with early-onset alopecia. *Dermatology* 2007; 214: 125-129
- Hoffmann R. Male androgenetic alopecia. *Clin Exp Dermatol* 2002; 27: 373-382
- Hoffmann R, Niiyama S, Huth A, Kissling S, Happle R. 17Alpha-Estradiol Induces Aromatase Activity in Intact Human Anagen Hair Follicles Ex Vivo. *Exp Dermatol* 2002; 11: 376-380
- Huang DT, Ayrault O, Hunt HW, Taherbhoy AM, Duda DM, Scott DC, Borg LA, Neale G, Murray PJ, Roussel MF, Schulman BA. E2-RING expansion of the NEDD8 cascade confers specificity to cullin modification. *Mol Cell* 2009; 33: 483-495
- Imperato-McGinley J, Guerrero L, Gautier T, Peterson RE. Steroid 5 α -reductase deficiency in man. An inherited form of male pseudohermaphroditism. *Science* 1974; 186: 1213-1215
- Iwamori T, Lin YN, Ma L, Iwamori N, Matzuk MM. Identification and characterization of RBM44 as a novel intercellular bridge protein. *PLoS One* 2011; 6: e17066
- Jeong BC, Hong CY, Chattopadhyay S, Park JH, Gong EY, Kim HJ, Chun SY, Lee K. Androgen receptor corepressor-19 kDa (ARR19), a leucine-rich protein that represses the transcriptional activity of androgen receptor through recruitment of histone deacetylase. *Mol Endocrinol* 2004; 18: 13-25
- Kaufman KD, Olsen EA, Whiting D, Savin R, DeVillez R, Bergfeld W, Price VH, van Neste D, Roberts JL, Hordinsky M, Shapiro J, Binkowitz B, Gormley GJ. Finasteride in the treatment of men with androgenetic alopecia. *J Am Acad Dermatol* 1998; 39: 578-589
- Kaufman KD. Androgens and alopecia. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 198: 89-95
- Kile BT, Metcalf D, Mifsud S, DiRago L, Nicola NA, Hilton DJ, Alexander WS. Functional Analysis of Asb-1 Using Genetic Modification in Mice. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 6189-6197

- Kleinjan DA, van Heyningen V. Long-range control of gene expression: emerging mechanisms and disruption in disease. *Am J Hum Genet* 2005; 76: 8-32
- Kligman AM. The human hair cycle. *J Invest Dermatol* 1959; 33: 307-316
- Knezetic JA, Luse DS. The presence of nucleosomes on a DNA template prevents initiation by RNA polymerase II in vitro. *Cell* 1986; 45: 95-104
- Küster W, Happle R. The inheritance of common baldness: two B or not two B? *J Am Acad Dermatol* 1984; 11: 921-926
- Kwack MH, Kang BM, Kim MK, Kim JC, Sung YK. Minoxidil activates β -catenin pathway in human dermal papilla cells: a possible explanation for its anagen prolongation effect. *J Dermatol Sci* 2011; 62: 154-159
- Lage K, Hansen NT, Karlberg EO, Eklund AC, Roque FS, Donahoe PK, Szallasi Z, Jensen TS, Brunak S. A large-scale analysis of tissue-specific pathology and gene expression of human disease genes and complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 20870-20875
- Lee DY, Hayes JJ, Pruss D, Wolffe AP. A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* 1993; 72: 73-84
- Lee HJ, Chang C. Recent advances in androgen receptor action. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60: 1613-1622
- Leung-Hagesteijn C, Mahendra A, Naruszewicz I, Hannigan GE. Modulation of integrin signal transduction by ILKAP, a protein phosphatase 2C associating with the integrin-linked kinase, ILK1. *EMBO J* 2001; 20: 2160-2170
- Levy-Nissenbaum E, Bar-Natan M, Frydman M, Pras E. Confirmation of the association between male pattern baldness and the androgen receptor gene. *Eur J Dermatol* 2005; 15: 339-340
- Liu F, Pore N, Kim M, Voong KR, Dowling M, Maity A, Kao GD. Regulation of Histone Deacetylase 4 Expression by the SP Family of Transcription Factors. *Mol Biol Cell* 2006; 17: 585-597
- Livak KJ, Flood S, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 1995; 4: 357-362
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* 2001; 25: 402-408
- Lorch Y, LaPointe JW, Kornberg RD. Nucleosomes inhibit the initiation of transcription but allow chain elongation with the displacement of histones. *Cell* 1987; 49: 203-210
- Lotufo PA, Chae CU, Ajani UA, Hennekens CH, Manson JE. Male pattern baldness and coronary heart disease: the Physicians' Health Study. *Arch Intern Med* 2000; 160: 165-171

- Lucky AW. Topical antiandrogens. What use in dermatology? *Arch Dermatol* 1985; 121: 55-56
- Ludwig E. Classification of the types of androgenetic alopecia (common baldness) occurring in the female sex. *Br J Dermatol* 1977; 97: 247-254
- Lundin KB, Giwercman A, Dizeyi N, Giwercman YL. Functional in vitro characterisation of the androgen receptor GGN polymorphism. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 264: 184-187
- Madabusi LV, Latham GJ, Andruss BF. RNA extraction for arrays. *Methods Enzymol* 2006; 411: 1-14
- Martin M, Kettmann R, Dequiedt F. Class IIa histone deacetylases: regulating the regulators. *Oncogene* 2007; 26: 5450-5467
- Martin M, Kettmann R, Dequiedt F. Class IIa histone deacetylases: conducting development and differentiation. *Int J Dev Biol* 2009; 53: 291-301
- Matilainen V, Koskela P, Keinänen-Kiukaanniemi S. Early androgenetic alopecia as a marker of insulin resistance. *Lancet* 2000; 356: 1165-1166
- Matilainen VA, Mäkinen PK, Keinänen-Kiukaanniemi SM. Early onset of androgenetic alopecia associated with early severe coronary heart disease: a population-based, case-control study. *J Cardiovasc Risk* 2001; 358: 147-151
- McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 1998; 393: 333-339
- Melzer D, Perry JRB, Hernandez D, Corsi AM, Stevens K, Rafferty I, Lauretani F, Murray A, Gibbs JR, Paolisso G, Rafiq S, Simon-Sanchez J, Lango H, Scholz S, Weedon MN, Arepalli S, Rice N, Washecka N, Hurst A, Britton A, Henley W, van de Leemput J, Li R, Newman AB, Tranah G, Harris T, Panicker V, Dayan C, Bennett A, McCarthy MI, Ruukonen A, Jarvelin M-R, Guralnik J, Bandinelli S, Frayling TM, Singleton A, Ferrucci L. A genome-wide association study identifies protein quantitative trait loci (pQTLs). *PLoS Genet* 2008; 4: e1000072
- Meyer KB, Maia AT, O'Reilly M, Teschendorff AE, Chin SF, Caldas C, Ponder BA. Allele-specific up-regulation of FGFR2 increases susceptibility to breast cancer. *PLoS Biol* 2008; 6: e108
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215
- Milner Y, Sudnik J, Filippi M, Kizoulis M, Kashgarian M, Stenn K. Exogen, shedding phase of the hair growth cycle: characterization of a mouse model. *J Invest Dermatol* 2002; 119: 639-644
- Molkentin JD, Black BL, Martin JF, Olson EN. Mutational analysis of the DNA binding, dimerization, and transcriptional activation domains of MEF2C. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 2627-2636

- Morris JA, Kandpal G, Ma L, Austin CP. DISC1 (Disrupted-In-Schizophrenia 1) is a centrosome-associated protein that interacts with MAP1A, MIPT3, ATF4/5 and NUDEL: regulation and loss of interaction with mutation. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 1591-1608
- Mosley JG, Gibbs AC. Premature grey hair and hair loss among smokers: a new opportunity for health education? *BMJ* 1996; 313: 1616
- Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155: 335-350
- Myers AJ, Gibbs JR, Webster JA, Rohrer K, Zhao A, Marlowe L, Kaleem M, Leung D, Bryden L, Nath P, Zismann VL, Joshipura K, Huentelman MJ, Hu-Lince D, Coon KD, Craig DW, Pearson JV, Holmans P, Heward CB, Reiman EM, Stephan D, Hardy J. A survey of genetic human cortical gene expression. *Nat Genet* 2007; 39: 1494-1499
- Nica AC, Montgomery SB, Dimas AS, Stranger BE, Beazley C, Barroso I, Dermitzakis ET. Candidate causal regulatory effects by integration of expression QTLs with complex trait genetic associations. *PLoS Genet* 2010; 6: e1000895
- Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* 2006; 1: 1559-1582
- Norwood OT. Male pattern baldness: classification and incidence. *South Med J* 1975; 68: 1359-1365
- Norwood OT. Incidence of female androgenetic alopecia (female pattern alopecia). *Dermatol Surg* 2001; 27: 53-54
- Nyholt DR, Gillespie NA, Heath AC, Martin NG. Genetic basis of male pattern baldness. *J Invest Dermatol* 2003; 121: 1561-1564
- Oeth P, Beaulieu M, Park C, Kosman D, del Mistro G, van den Boom D, Jurinke C. iPLEX Assay: Increased Plexing Efficiency & Flexibility for Mass ARRAY System Through Single Base Primer Extension with Mass-Modified Terminators. *Sequenom Application* 2005; Note: 1-12
- Oh BR, Kim SJ, Moon JD, Kim HN, Kwon DD, Won YH, Ryu SB, Park YI. Association of benign prostatic hyperplasia with male pattern baldness. *Urology* 1998; 51: 744-748
- Olsen EA, Messenger AG, Shapiro J, Bergfeld WF, Hordinsky MK, Roberts JL, Stough D, Washenik K, Whiting DA. Evaluation and treatment of male and female pattern hair loss. *J Am Acad Dermatol* 2005; 52: 301-311
- Olsen EA, Hordinsky M, Whiting D, Stough D, Hobbs S, Ellis ML, Wilson T, Rittmaster RS. The importance of dual 5 α -reductase inhibition in the treatment of male pattern hair loss: Results of a randomized placebo-controlled study of dutasteride versus finasteride. *J Am Acad Dermatol* 2006; 55: 1014-1023

- Orentreich D, Orentreich N. Androgenetic alopecia & its treatment. In: Unger WP, Nordström REA, eds., Hair Transplantation. New York, Basel: Dekker, 1987: 1-35
- Osborn D. INHERITANCE OF BALDNESS: Various Patterns Due to Heredity and Sometimes Present at Birth—A Sex-limited Character—Dominant in Man—Women Not Bald Unless They Inherit Tendency from Both Parents. *J Hered* 1916: 347-355
- Parra M, Verdin E. Regulatory signal transduction pathways for class IIa histone deacetylases. *Curr Opin Pharmacol* 2010; 10: 454-460
- Pawlowski JE, Ertel JR, Allen MP, Xu M, Butler C, Wilson EM, Wierman ME. Liganded androgen receptor interaction with beta-catenin: nuclear co-localization and modulation of transcriptional activity in neuronal cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 20702-20710
- Pazin MJ, Kadonaga JT. What's up and down with histone deacetylation and transcription? *Cell* 1997; 89: 325-328
- Petrie K, Guidez F, Howell L, Healy L, Waxman S, Greaves M, Zelent A. The histone deacetylase 9 gene encodes multiple protein isoforms. *J Biol Chem* 2003; 278: 16059-16072
- Pitts RL. Serum elevation of dehydroepiandrosterone sulfate associated with male pattern baldness in young men. *J Am Acad Dermatol* 1987; 16: 571-573
- Prodi DA, Pirastu N, Maninchedda G, Sassu A, Picciau A, Palmas MA, Mossa A, Persico I, Adamo M, Angius A, Pirastu M. EDA2R is associated with androgenetic alopecia. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 2268-2270
- Pumthong G, Asawanonda P, Varothai S, Jariyasethavong V, Triwongwaranat D, Suthipinittharm P, Ingkaninan K, Leelapornpisit P, Waranuch N. Curcuma aeruginosa, a novel botanically derived 5 α -reductase inhibitor in the treatment of male-pattern baldness: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Dermatolog Treat* 2011; Epub ahead of print; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21756154> (Zugriffsdatum: 04.10.2011)
- Ragoussis J, Elvidge GP, Kaur K, Colella S. Matrix-assisted laser desorption/ionisation, time-of-flight mass spectrometry in genomics research. *PLoS Genet* 2006; 2: e100
- Randall VA. Role of 5 alpha-reductase in health and disease. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1994; 8: 405-431
- Randall VA. Hormonal regulation of hair follicles exhibits a biological paradox. *Semin Cell Dev Biol* 2007; 18: 274-285
- Rathnayake D, Sinclair R. Male androgenetic alopecia. *Expert Opin Pharmacother* 2010; 11: 1295-1304
- Reifenberger J, Ruzicka T. Hautanhangsorgane In: Zilles K, Tillmann B, eds., Anatomie, 1. Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag 2010: 593-598

- Rexbye H, Petersen I, Iachina M, Mortensen J, McGue M, Vaupel JW, Christensen K. Hair loss among elderly men: etiology and impact on perceived age. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2005; 60: 1077-1082
- Ria M, Lagercrantz J, Samnegård A, Boquist S, Hamsten A, Eriksson P. A common polymorphism in the promoter region of the TNFSF4 gene is associated with lower allele-specific expression and risk of myocardial infarction. *PLoS One* 2011; 6: e17652
- Richards JB, Yuan X, Geller F, Waterworth D, Bataille V, Glass D, Song K, Waeber G, Vollenweider P, Aben KK, Kiemeneij LA, Walters B, Soranzo N, Thorsteinsdottir U, Kong A, Rafnar T, Deloukas P, Sulem P, Stefansson H, Stefansson K, Spector TD, Mooser V. Male-pattern baldness susceptibility locus at 20p11. *Nat Genet* 2008; 40: 1282-1284
- Roth SY, Denu JM, Allis CD. Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* 2001; 70: 81-120
- Rutberg SE, Kolpak ML, Gourley JA, Tan G, Henry JP, Shander D. Differences in expression of specific biomarkers distinguish human beard from scalp dermal papilla cells. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 2583-2595
- Ruthenburg AJ, Li H, Patel DJ, Allis CD. Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 983-994
- Ryu HK, Kim KM, Yoo EA, Sim WY, Chung BC. Evaluation of androgens in the scalp hair and plasma of patients with male-pattern baldness before and after finasteride administration. *Br J Dermatol* 2006; 154: 730-734
- Sasieni PD. From genotypes to genes: doubling the sample size. *Biometrics* 1997; 53: 1253-1261
- Sawaya ME, Price VH. Different levels of 5alpha-reductase type I and II, aromatase, and androgen receptor in hair follicles of women and men with androgenetic alopecia. *J Invest Dermatol* 1997; 109: 296-300
- Sawaya ME, Shalita AR. Androgen receptor polymorphisms (CAG repeat lengths) in androgenetic alopecia, hirsutism, and acne. *J Cutan Med Surg* 1998; 3: 9-15
- Schnittger S, Rao V, Deutsch U, Gruss P, Balling R, Hansmann I. Pax1, a member of the paired box-containing class of developmental control genes, is mapped to human chromosome 20p11.2 by in situ hybridization (ISH and FISH). *Genomics* 1992; 14: 740-744
- Schnohr P, Lange P, Nyboe J, Appleyard M, Jensen G. Gray hair, baldness, and wrinkles in relation to myocardial infarction: the Copenhagen City Heart Study. *Am Heart J* 1995; 130: 1003-1010
- Sela M, Anfinsen CB, Harrington WF. The correlation of ribonuclease activity with specific aspects of tertiary structure. *Biochim Biophys Acta* 1957; 26: 502-512

- Severi G, Sinclair R, Hopper JL, English DR, McCredie MR, Boyle P, Giles GG. Epidemiology and Health Services Research Androgenetic alopecia in men aged 40 - 69 years: prevalence and risk factors. *Br J Dermatol* 2003; 149: 1207-1213
- Sinclair R. Male pattern androgenetic alopecia. *BMJ* 1998; 317: 865-869
- Sinclair R, Wewerinke M, Jolley D. Treatment of female pattern hair loss with oral antiandrogens. *Br J Dermatol* 2005; 152: 466-473
- Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet* 1993; 52: 506-516
- Spotswood HT, Turner BM. An increasingly complex code. *J Clin Invest* 2002; 110: 577-582
- Stenn KS, Paus R. Controls of hair follicle cycling. *Physiol Rev* 2001; 81: 449-494
- Stenn KS. Exogen is an active, separately controlled phase of the hair growth cycle. *J Am Acad Dermatol* 2005; 52: 374-375
- Stough D, Stenn K, Haber R, Parsley WM, Vogel JE, Whiting DA, Washenik K. Psychological effect, pathophysiology, and management of androgenetic alopecia in men. *Mayo Clin Proc* 2005; 80: 1316-1322
- Stough D. Dutasteride improves male pattern hair loss in a randomized study in identical twins. *J Cosmet Dermatol* 2007; 6: 9-13
- Strachan T, Read AP. *Molekulare Humangenetik*, 3. Auflage. München: Elsevier GmbH, 2005
- Stranger BE, Forrest MS, Clark AG, Minichiello MJ, Deutsch S, Lyle R, Hunt S, Kahl B, Antonarakis SE, Tavaré S, Deloukas P, Dermitzakis ET. Genome-wide associations of gene expression variation in humans. *PLoS Genet* 2005; 1: e78
- Su LH, Chen TH. Association of androgenetic alopecia with metabolic syndrome in men: a community-based survey. *Br J Dermatol* 2010; 163: 371-377
- Suh JH, Shong M, Choi HS, Lee K. CR6-interacting factor 1 represses the transactivation of androgen receptor by direct interaction. *Mol Endocrinol* 2008; 22: 33-46
- Tang K, Fu D, Kötter S, Cotter RJ, Cantor CR, Köster H. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of immobilized duplex DNA probes. *Nucleic Acids Res* 1995; 23: 3126-3131
- The Finasteride Male Pattern Hair Loss Study Group. Long-term (5-year) multinational experience with finasteride 1 mg in the treatment of men with androgenetic alopecia. *Eur J Dermatol* 2002; 12: 38-49

- The International HapMap Consortium. The International HapMap project. *Nature* 2003; 426: 789-796
- Toris CB, Gabelt BT, Kaufman PL. Update on the mechanism of action of topical prostaglandins for intraocular pressure reduction. *Surv Ophthalmol* 2008; 53 Suppl1: S107-S120
- Tran D, Sinclair RD. Understanding and managing common baldness. *Aust Fam Physician* 1999; 28: 248-250, 252-253
- Tromovitch TA, Glogau RG, Stegman SJ. Medical treatment of male pattern alopecia (androgenic alopecia). *Head Neck Surg* 1985; 7: 336-339
- Tyagi RK, Lavrovsky Y, Ahn SC, Song CS, Chatterjee B, Roy AK. Dynamics of intracellular movement and nucleocytoplasmic recycling of the ligand-activated androgen receptor in living cells. *Mol Endocrinol* 2000; 14: 1162-1174
- Unger WP, Unger RH. Hair transplanting: An important but often forgotten treatment for female pattern hair loss. *J Am Acad Dermatol* 2003; 49: 853-860
- van Neste D, Fuh V, Sanchez-Pedreno P, Lopez-Bran E, Wolff H, Whiting D, Roberts J, Kopera D, Stene JJ, Calvieri S, Tosti A, Prens E, Guarrera M, Kanojia P, He W, Kaufman KD. Finasteride increases anagen hair in men with androgenetic alopecia. *Br J Dermatol* 2000; 143: 804-810
- Vega RB, Matsuda K, Oh J, Barbosa AC, Yang X, Meadows E, McAnally J, Pomajzl C, Shelton JM, Richardson JA, Karsenty G, Olson EN. Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis. *Cell* 2004; 119: 555-566
- Verdin E, Dequiedt F, Kasler HG. Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet* 2003; 19: 286-293
- Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R, Ghandour G, Perkins N, Winchester E, Spencer J, Kruglyak L, Stein L, Hsie L, Topaloglou T, Hubbell E, Robinson E, Mittmann M, Morris MS, Shen N, Kilburn D, Rioux J, Nusbaum C, Rozen S, Hudson TJ, Lipshutz R, Chee M, Lander ES. Large-Scale Identification, Mapping, and Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms in the Human Genome. *Science* 1998; 280: 1077-1082
- Wang AH, Bertos NR, Vezmar M, Pelletier N, Crosato M, Heng HH, Th'ng J, Han J, Yang XJ. HDAC4, a human histone deacetylase related to yeast HDA1, is a transcriptional corepressor. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 7816-7827
- Wang H, Gauthier BR, Hagenfeldt-Johansson KA, Iezzi M, Wollheim CB. Foxa2 (HNF3beta) controls multiple genes implicated in metabolism-secretion coupling of glucose-induced insulin release. *J Biol Chem* 2002; 277: 17564-17570
- Wang Q, Udayakumar TS, Vasaitis TS, Brodie AM, Fondell JD. Mechanistic relationship between androgen receptor polyglutamine tract truncation and androgen-dependent transcriptional hyperactivity in prostate cancer cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 17319-17328

- Wang L, Hsu CL, Chang C. Androgen receptor corepressors: an overview. *Prostate* 2005; 63: 117-130
- Wang TL, Zhou C, Shen YW, Wang XY, Ding XL, Tian S, Liu Y, Peng GH, Xue SQ, Zhou JE, Wang RL, Meng XM, Pei GD, Bai YH, Liu Q, Li H, Zhang JZ. Prevalence of androgenetic alopecia in China: a community-based study in six cities. *Br J Dermatol* 2010; 162: 843-847
- Welch BL. The generalisation of student's problems when several different population variances are involved. *Biometrika* 1947; 34: 28-35
- Whiting DA. Diagnostic and predictive value of horizontal sections of scalp biopsy specimens in male pattern androgenetic alopecia. *J Am Acad Dermatol* 1993; 28: 755-763
- Whiting DA. Male pattern hair loss: current understanding. *Int J Dermatol* 1998; 37: 561-566
- Whiting DA. Possible mechanisms of miniaturization during androgenetic alopecia or pattern hair loss. *J Am Acad Dermatol* 2001; 45: S81-S86
- Winiarska A, Mandt N, Kamp H, Hossini A, Seltsmann H, Zouboulis CC, Blume-Peytavi U. Effect of 5alpha-dihydrotestosterone and testosterone on apoptosis in human dermal papilla cells. *Skin Pharmacol Physiol* 2006; 19: 311-321
- Wolffe AP. Transcriptional control. Sinful repression. *Nature* 1997; 387: 16-17
- Wright JL, Page ST, Lin DW, Stanford JL. Male pattern baldness and prostate cancer risk in a population-based case-control study. *Cancer Epidemiol* 2010; 34: 131-135
- Wyce A, Bai Y, Nagpal S, Thompson CC. Research Resource: The androgen receptor modulates expression of genes with critical roles in muscle development and function. *Mol Endocrinol* 2010; 24: 1665-1674
- Yamazaki M, Miyakura T, Uchiyama M, Hobo A, Irisawa R, Tsuboi R. Oral finasteride improved the quality of life of androgenetic alopecia patients. *J Dermatol* 2011; 38: 773-777
- Yang Y, Tse AK, Li P, Ma Q, Xiang S, Nicosia SV, Seto E, Zhang X, Bai W. Inhibition of androgen receptor activity by histone deacetylase 4 through receptor SUMOylation. *Oncogene* 2011; 30: 1-12
- Yassa M, Saliou M, De Rycke Y, Hemery C, Henni M, Bachaud JM, Thiounn N, Cosset JM, Giraud P. Male pattern baldness and the risk of prostate cancer. *Ann Oncol* 2011; 22: 1824-1827
- Yvert G, Brem RB, Whittle J, Akey JM, Foss E, Smith EN, Mackelprang R, Kruglyak L. Trans-acting regulatory variation in *Saccharomyces cerevisiae* and the role of transcription factors. *Nat Genet* 2003; 35: 57-64
- Zheng B, Larkin DW, Albrecht U, Sun ZS, Sage M, Eichele G, Lee CC, Bradley A. The *mPer2* gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock. *Nature* 1999; 400: 169-173

Zhou ZX, Lane MV, Kemppainen JA, French FS, Wilson EM. Specificity of ligand-dependent androgen receptor stabilization: receptor domain interactions influence ligand dissociation and receptor stability. *Mol Endocrinol* 1995; 9: 208-218

DANKSAGUNG

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Markus Nöthen, danke ich für die Überlassung des Promotionsthemas und die Möglichkeit, diese Arbeit unter großzügiger Bereitstellung jeglicher Instrumente und Materialien am Institut für Humangenetik im Bereich Genomics des Forschungszentrums Life & Brain durchführen zu können.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Felix Brockschmidt und Stefanie Heilmann für die herausragende Betreuung meines Promotionsvorhabens. Durch ihre exzellente Unterstützung und zahlreichen fachlichen Hilfestellungen, das jederzeit offene Ohr, die vielen konstruktiven und hilfreichen Anregungen und nicht zuletzt durch die freundschaftliche Verbundenheit haben sie einen ganz erheblichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit. Ganz herzlich danke ich auch meinem Weggefährten Alexander Zink für die Vermittlung dieser Promotionsstelle, der damit ebenfalls einen erheblichen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet hat.

Für das außergewöhnlich angenehme und nahezu freundschaftliche Arbeitsklima, die vielen erfrischenden Gespräche, die fachlichen Hilfestellungen und die gemeinsamen Aktivitäten möchte ich mich stellvertretend für die vielen Arbeitskollegen bei Buket Basmanav, Jessica Becker, Anne Böhmer, Dr. Felix Brockschmidt, Franziska Degenhardt, Dr. Hartmut Engels, Stefanie Heilmann, Dr. André Heimbach, Timo Hess, Dr. Kerstin Ludwig, Lutz Priebe, PD Dr. Johannes Schumacher, Florian Siedek und Alexander Zink bedanken. Ebenso bedanke ich mich bei PD Dr. Tim Becker und Dr. Christine Herold für die statistische Auswertung in dieser Arbeit.

Mein Dank gilt darüber hinaus meinen Freunden, die zwar aufgrund meiner zahlreichen Verpflichtungen und Hobbies häufiger das Nachsehen hatten, aber dennoch in jederlei Hinsicht für den passenden und notwendigen Ausgleich sorgen konnten.

Mein größter Dank gebührt meiner Familie und insbesondere meinen Eltern, die mir das Studium der Humanmedizin ermöglicht und hierbei durch die großzügige finanzielle Unterstützung exzellente Rahmenbedingungen geschaffen haben und mir darüber hinaus in jeglichen Lebenssituation mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.