

Aus der Klinik und Poliklinik für pädiatrische Hämatologie und Onkologie  
des Zentrums für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin  
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf  
Direktor Prof. Dr. Reinhard Schneppenheim

---

**Polymorphismus Phe/Tyr 2561 im  
Von-Willebrand-Faktor-Gen als Risikofaktor  
für Myokardinfarkt und koronare  
Herzkrankheit**

---

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

**Natalie Treder**

aus Soltau

Hamburg, 8. August 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am 25. Oktober 2005

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Professor Dr. R. Schneppenheim

Prüfungsausschuss, 2. Gutachterin: Professor Dr. K. Kutsche

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: Professor Dr. T. Meinertz

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Bedeutung und Pathogenese von KHK und MI . . . . .	1
1.2	Physiologie der Hämostase . . . . .	3
1.2.1	Vaskuläre Hämostase . . . . .	4
1.2.2	Zelluläre Hämostase . . . . .	4
1.2.3	Plasmatische Hämostase . . . . .	5
1.2.4	Fibrinolyse . . . . .	5
1.3	Genpolymorphismen des Gerinnungssystems in der Pathogenese von KHK und MI . . . . .	5
1.4	Von-Willebrand-Faktor . . . . .	9
1.4.1	Biosynthese und Struktur . . . . .	9
1.4.2	Funktion . . . . .	10
1.4.3	Von-Willebrand-Faktor, koronare Herzkrankheit und Myokardinfarkt . . . . .	11
1.4.4	Bekannte Mutationen und Polymorphismen im VWF-Gen . . . . .	12
1.4.5	F/Y2561-Polymorphismus . . . . .	13
1.5	Zielsetzung der vorliegenden Studie . . . . .	14
<b>2</b>	<b>Patienten, Material und Methoden</b>	<b>16</b>
2.1	Patienten . . . . .	16
2.1.1	Ein- und Ausschlusskriterien . . . . .	16
2.1.2	Definitionen . . . . .	16
2.1.3	Basischarakteristika des Studienkollektivs . . . . .	20
2.2	Material und Methoden . . . . .	21
2.2.1	DNA-Isolierung . . . . .	25
2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion . . . . .	25
2.2.2.1	PCR-Primer . . . . .	25
2.2.2.2	PCR-Ansätze . . . . .	26
2.2.2.3	Amplifizierung . . . . .	27
2.2.3	Dünnschicht-Polyacrylamid-Gelelektrophorese . . . . .	28
2.2.3.1	Silberfärbung . . . . .	29
2.2.3.2	Auswertung der PAGE . . . . .	30
2.2.4	DHPLC . . . . .	32
2.2.4.1	Mischen der Proben . . . . .	32
2.2.4.2	Heteroduplex-Programm . . . . .	33

## Inhaltsverzeichnis

2.2.4.3	Optimierung der DHPLC-Analyse für den Polymorphismus F/Y 2561 . . . . .	33
2.2.4.4	Detektion von Wildtp- und Mutantenallel des Polymorphismus F/Y 2561 . . . . .	36
2.2.4.5	Detektion neuer Mutationen . . . . .	37
2.2.5	Restriktionsenzymverdau . . . . .	40
2.2.6	Sequenzieren . . . . .	42
2.2.6.1	Prinzip des Cycle-Sequencing . . . . .	42
2.2.6.2	Agarosegel-Elektrophorese . . . . .	43
2.2.6.3	Sequenzierungsreaktion . . . . .	44
2.2.6.4	Auswertung der Sequenzierung . . . . .	45
2.2.7	Statistische Auswertung . . . . .	47
2.2.7.1	Methodik . . . . .	47
2.2.7.2	Verwendete statistische Tests und Software . . . . .	48
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>50</b>
3.1	Größe des Gesamtkollektivs und der Subgruppen . . . . .	50
3.2	Genotypverteilung . . . . .	51
3.2.1	Hardy-Weinberg-Äquilibrium . . . . .	51
3.2.2	Genotypverteilung in den Subgruppen . . . . .	52
3.3	Einordnung des Tyr-Allels neben die klassischen Risikofaktoren . . . . .	54
3.3.1	Tyr-Allel und klassische Risikofaktoren bei Patienten mit KHK . . . . .	54
3.3.2	Tyr-Allel und klassische Risikofaktoren in Abhängigkeit vom Grad der KHK . . . . .	55
3.3.3	Tyr-Allel und klassische Risikofaktoren bei Patienten mit zwei oder mehr MI (Gruppe $MI_{z \geq 2}$ ) . . . . .	58
3.4	Tyr-Allel als Risikofaktor für eine koronare Herzkrankheit . . . . .	59
3.4.1	Tyr-Allel in der Gruppe <i>KHK gesamt</i> . . . . .	59
3.4.1.1	Vergleich der Prävalenz in der Gruppe <i>KHK gesamt</i> und in der Kontrollgruppe . . . . .	59
3.4.1.2	Vergleich der Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe <i>KHK gesamt</i> und in der Kontrollgruppe in zwei Altersklassen . . . . .	60
3.4.1.3	Vergleich der Prävalenz des Tyr-Allels innerhalb der Gruppe <i>KHK gesamt</i> in zwei Altersklassen . . . . .	61
3.4.1.4	Vergleich der Prävalenz des Tyr-Allels innerhalb der Kontrollgruppe in zwei Altersklassen . . . . .	62
3.4.2	Tyr-Allel in der Gruppe <i>KHK ohne MI</i> . . . . .	62
3.4.2.1	Vergleich der Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe <i>KHK ohne MI</i> und in der Kontrollgruppe . . . . .	62
3.4.2.2	Vergleich der Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe <i>KHK ohne MI</i> und in der Kontrollgruppe in zwei Altersklassen . . . . .	63

## Inhaltsverzeichnis

3.4.2.3	Vergleich der Prävalenz des Tyr-Allels innerhalb der Gruppe <i>KHK ohne MI</i> in zwei Altersklassen . . . . .	64
3.5	Tyr-Allel als Risikofaktor für die Manifestation eines Myokardinfarktes . . . . .	65
3.5.1	Tyr-Allel in der Gruppe <i>MI</i> . . . . .	65
3.5.1.1	Vergleich der Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe <i>MI</i> und in der Kontrollgruppe . . . . .	65
3.5.1.2	Vergleich der Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe <i>MI</i> und in der Kontrollgruppe in zwei Altersklassen . . . . .	65
3.5.1.3	Vergleich der Prävalenz des Tyr-Allels innerhalb der Gruppe <i>MI</i> in zwei Altersklassen . . . . .	66
3.5.2	Tyr-Allel in der Gruppe der Patienten mit kürzer als einem Jahr zurückliegendem MI (Gruppe $MI_{t>-1}$ ) . . . . .	67
3.5.2.1	Vergleich der Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe $MI_{t>-1}$ und in der Kontrollgruppe . . . . .	67
3.5.2.2	Vergleich der Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe $MI_{t>-1}$ und in der Kontrollgruppe in zwei Altersklassen . . . . .	68
3.5.2.3	Vergleich der Prävalenz innerhalb der Gruppe $MI_{t>-1}$ in zwei Altersklassen . . . . .	69
3.6	Tyr-Allel als Risikofaktor für Reinfarkte . . . . .	70
3.6.1	Vergleich der Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe der Patienten mit zwei oder mehr MI (Gruppe $MI_{z\geq 2}$ ) und in der Kontrollgruppe . . . . .	70
3.6.2	Vergleich der Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe $MI_{z\geq 2}$ und in der Kontrollgruppe in zwei Altersklassen . . . . .	71
3.6.3	Vergleich der Prävalenz des Tyr-Allels innerhalb der Gruppe $MI_{z\geq 2}$ in zwei Altersklassen . . . . .	72
3.6.4	Vergleich der Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe $MI_{z\geq 2}$ und in der Gruppe $MI_{z=1}$ . . . . .	72
3.6.5	Vergleich der Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe $MI_{z\geq 2}$ und in der Gruppe $MI_{z=1}$ in zwei Altersklassen . . . . .	73
3.6.6	Vergleich der Prävalenz des Tyr-Allels innerhalb der Gruppe $MI_{z=1}$ in zwei Altersklassen . . . . .	74
3.7	Lifetable-Analyse . . . . .	75
3.8	Andere detektierte Mutationen . . . . .	79
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> . . . . .	<b>81</b>
4.1	Interpretation der Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung . . . . .	81
4.1.1	Vorzeitige Manifestation eines Myokardinfarktes bei Tyr-Allel-Trägern . . . . .	82
4.1.2	Homozygote Tyr-Allel-Träger . . . . .	84
4.1.3	Gruppengröße und statistische Validität . . . . .	84
4.1.4	Zusammenfassung . . . . .	85

## Inhaltsverzeichnis

4.2	Interaktion des Von-Willebrand-Faktors mit Thrombozyten und mögliche Beeinflussung dieser durch Polymorphismen . . . . .	85
4.2.1	Glykoproteinkomplex Ib-IX-V und VWF . . . . .	87
4.2.2	Glykoprotein IIb/IIIa und VWF . . . . .	89
4.2.3	Funktionelle Bedeutung von Gp IIb/IIIa-Polymorphismen . . . . .	91
4.2.4	Funktionelle Bedeutung des F/Y 2561-Polymorphismus . . . . .	92
4.3	Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Studie mit der Literatur . . . . .	94
4.4	Schlussfolgerung aus der vorliegenden Studie . . . . .	99
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>101</b>
<b>A</b>	<b>Verwendete Materialien</b>	<b>102</b>
A.1	Ansätze für Lösungen . . . . .	102
A.1.1	DNA-Isolierung . . . . .	102
A.1.2	Dünnschicht-Polyacrylamidgelelektrophorese . . . . .	102
A.1.3	Agarosegel-Elektrophorese . . . . .	102
A.1.4	DHPLC-Analyse . . . . .	103
A.2	Produkte und Geräte, Hersteller . . . . .	103
A.2.1	PCR . . . . .	103
A.2.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese . . . . .	104
A.2.3	DHPLC . . . . .	104
A.2.4	Restriktionsenzymverdau . . . . .	104
A.2.5	Agarose-Gelelektrophorese . . . . .	104
A.2.6	Sequenzieren . . . . .	105
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>106</b>

# Tabellenverzeichnis

2.1	Basischarakteristika des Studienkollektivs . . . . .	21
2.2	Prävalenz der klassischen Risikofaktoren der KHK im Studienkollektiv	22
2.3	PCR-Ansätze . . . . .	27
2.4	PCR-Programme im Thermocycler . . . . .	28
2.5	Silberfärbung des Polyacrylamidgels . . . . .	29
2.6	Puffergradient in der DHPLC-Analyse . . . . .	36
2.7	Ansatz für den Enzymverdau . . . . .	42
2.8	Ansatz für das Cycle-Sequencing . . . . .	44
2.9	Sequenzierprogramme im TRIO-Block . . . . .	45
3.1	Gesamtkollektivgröße und Subgruppengrößen . . . . .	51
3.2	Allelfrequenzen . . . . .	51
3.3	Hardy-Weinberg-Genotyp-Frequenzen . . . . .	52
3.4	Genotypen für F/Y 2561 in den einzelnen Subgruppen . . . . .	53
3.5	Prävalenz der klassischen Risikofaktoren der KHK und des Tyr-Allels bei Patienten der Gruppe <i>KHK gesamt</i> und Kontrollpersonen . . . . .	56
3.6	Tyr-Allel und klassische Risikofaktoren in Abhängigkeit vom Grad der KHK . . . . .	57
3.7	Prävalenz der klassischen Risikofaktoren der KHK und des Tyr-Allels in der Gruppe $MI_{z \geq 2}$ und Kontrolle . . . . .	59
3.8	Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe <i>KHK gesamt</i> und in der Kontrollgruppe . . . . .	60
3.9	Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe <i>KHK gesamt</i> und in der Kontrollgruppe in der Altersklasse $\leq 55$ Jahren . . . . .	60
3.10	Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe <i>KHK gesamt</i> und in der Kontrollgruppe in der Altersklasse $> 55$ . . . . .	61
3.11	Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe <i>KHK gesamt</i> in den Altersklassen $\leq 55$ und $> 55$ . . . . .	61
3.12	Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe <i>Kontrolle</i> $\leq 55$ und in der Gruppe <i>Kontrolle</i> $> 55$ . . . . .	62
3.13	Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe <i>KHK ohne MI</i> und in der Kontrollgruppe . . . . .	63
3.14	Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe <i>KHK ohne MI</i> und in der Kontrollgruppe in der Altersklasse $\leq 55$ . . . . .	63

## Tabellenverzeichnis

3.15 Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe <i>KHK ohne MI</i> und in der Kontrollgruppe in der Altersklasse $>55$ . . . . .	64
3.16 Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe <i>KHK ohne MI</i> in den Altersklassen $\leq 55$ Jahr und $>55$ Jahre . . . . .	64
3.17 Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe <i>MI</i> und in der Kontrollgruppe . . . . .	65
3.18 Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe <i>MI</i> und in der Kontrollgruppe in der Altersklasse $\leq 55$ Jahre . . . . .	66
3.19 Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe <i>MI</i> und in der Kontrollgruppe in der Altersklasse $>55$ Jahre . . . . .	66
3.20 Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe <i>MI</i> in den Altersklassen $\leq 55$ Jahre und $>55$ Jahre . . . . .	67
3.21 Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe $MI_{t>-1}$ und in der Kontrollgruppe . . . . .	68
3.22 Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe $MI_{t>-1}$ und in der Kontrollgruppe in der Altersklasse $\leq 55$ Jahre . . . . .	68
3.23 Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe $MI_{t>-1}$ und in der Kontrollgruppe in der Altersklasse $>55$ Jahre . . . . .	69
3.24 Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe $MI_{t>-1}$ in den Altersklassen $\leq 55$ Jahre und $>55$ Jahre . . . . .	69
3.25 Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe $MI_{z\geq 2}$ und in der Kontrollgruppe . . . . .	70
3.26 Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe $MI_{z\geq 2}$ und in der Kontrollgruppe in der Altersklasse $\leq 55$ Jahre . . . . .	71
3.27 Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe $MI_{z\geq 2}$ und in der Kontrollgruppe in der Altersklasse $>55$ Jahre . . . . .	72
3.28 Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe $MI_{z\geq 2}$ in den Altersklassen $\leq 55$ Jahre und $>55$ Jahre . . . . .	72
3.29 Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe $MI_{z\geq 2}$ und in der Gruppe $MI_{z=1}$ . . . . .	73
3.30 Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe $MI_{z\geq 2}$ und in der Gruppe $MI_{z=1}$ in der Altersklasse $\leq 55$ Jahre . . . . .	73
3.31 Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe $MI_{z\geq 2}$ und in der Gruppe $MI_{z=1}$ in der Altersklasse $>55$ . . . . .	74
3.32 Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe $MI_{z=1}$ in den Altersklassen $\leq 55$ Jahre und $>55$ Jahre . . . . .	74
3.33 Lifetable-Analyse für die Gruppe <i>MI</i> . . . . .	76
3.34 Lifetable-Analyse für die Gruppe $MI_{t>-1}$ . . . . .	76



# Abbildungsverzeichnis

2.1	Normal-Sequenz des Exon 45 des Von-Willebrand-Faktor-Gens . . . . .	23
2.2	Heterozygote Sequenz für F/Y 2561 . . . . .	24
2.3	Homozygote Sequenz für F/Y 2561 . . . . .	24
2.4	PAGE der PCR für die DHPLC-Analyse . . . . .	30
2.5	PAGE des Enzymverdaus . . . . .	31
2.6	PAGE der PCR der Sequenzierungsreaktion . . . . .	32
2.7	Schmelzkurve . . . . .	35
2.8	DHPLC-Analyse: Wildtyp und heterozygote Probe . . . . .	38
2.9	DHPLC-Analyse: Wildtyp und homozygote Probe . . . . .	38
2.10	DHPLC-Analyse: Wildtyp und heterozygote Probe gemischt . . . . .	39
2.11	DHPLC-Analyse: Wildtyp und homozygote Probe gemischt . . . . .	39
2.12	DHPLC-Analyse: Mutation $C^{7930} \rightarrow T$ . . . . .	40
2.13	DHPLC-Analyse: Mutation $C^{7913} \rightarrow G$ . . . . .	41
2.14	Sequenz der Mutation $C^{7930} \rightarrow T$ . . . . .	46
2.15	Sequenz der Mutation $C^{7913} \rightarrow G$ . . . . .	46
3.1	Prävalenzen des Tyr-Allels und der klassischen Risikofaktoren in den Gruppen Kontrolle, KHK gesamt und $MI_{z \geq 2}$ . . . . .	58
3.2	Lifetable-Analyse, Gruppe $MI$ . . . . .	77
3.3	Lifetable-Analyse, Gruppe $MI_{t > -1}$ . . . . .	78
3.4	Lifetable-Analyse, Gruppe $MI_{t > -1}$ , logarithmisch . . . . .	79
3.5	Sequenz des Polymorphismus C7740A . . . . .	80
4.1	Übersicht der Prävalenzen des Tyr-Allels im Gesamtkollektiv und in der Gruppe $\leq 55$ mit den jeweiligen männlichen und weiblichen Subgruppen . . . . .	82
4.2	Übersicht der Prävalenzen des Tyr-Allels in den Subgruppen in der Gruppe $> 55$ . . . . .	84

# Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ADP	Adenosindiphosphat
AgNO <sub>3</sub>	Silbernitrat
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Asp	Aspartat
BMI	Body-Mass-Index
bp	base pair (Basenpaar)
C	Cytosin
D	Arginin
DHPLC	denaturing high-performance liquid chromatography
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleotid
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat (C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> ·2H <sub>2</sub> O)
F	Phenylalanin
G	Glycin
G	Guanin
Gly	Glycin
Gp	Glykoprotein
HNO <sub>3</sub>	Salpetersäure
KHK	koronare Herzkrankheit

## Abkürzungsverzeichnis

KHK gesamt	Patienten mit koronarer Herzkrankheit
KHK ohne MI	Patienten mit koronarer Herzkrankheit ohne Myokardinfarkt
KI	Konfidenzintervall
l	Liter
LURIC	Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health
$\mu$	arithmetisches Mittel
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MI	Myokardinfarkt
MI <sub>t&gt;-1</sub>	Patienten mit kürzer als ein Jahr zurückliegendem Myokardinfarkt
MI <sub>z=1</sub>	Patienten mit genau einem Myokardinfarkt
MI <sub>z≥2</sub>	Patienten mit zwei oder mehr Myokardinfarkten
min	Minute(n)
μl	Mikroliter
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat
OR	odds ratio
P	Signifikanzwert nach Pearson
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
<i>PdmI</i>	Pseudomonas-diminuta-Restriktionsenzym
Phe	Phenylalanin
PTCA	perkutane transluminale Koronarangioplastie
R	Aspartat
$\sigma$	Standardabweichung
sec	Sekunde(n)
Ser	Serin
SN	single nucleotide
SNP	single nucleotide polymorphism

## Abkürzungsverzeichnis

T	Thymin
TAE-Puffer	Tris-Natrium-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	Thermus aquaticus
TEAA	Triethylammonium-Acetat
Tm	Annealingtemperatur
Tris	Trishydroxymethylaminomethan (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NHNO <sub>3</sub> )
Tyr	Tyrosin
VWF	Von-Willebrand-Faktor
Y	Tyrosin
z	Anzahl der Myokardinfarkte

# 1 Einleitung

Diese Studie untersucht, ob eine Assoziation zwischen dem Vorliegen des Tyrosin-Allels des Polymorphismus Phe/Tyr 2561 (F/Y 2561–Polymorphismus) im Von-Willebrand-Faktor-Gen und dem Auftreten von koronarer Herzkrankheit (KHK) und Myokardinfarkt (MI) besteht. Im Folgenden werden zunächst die Bedeutung und Pathogenese von KHK und MI behandelt. Dabei wird besonders auf die Bedeutung von Genpolymorphismen des Gerinnungssystems und den Stellenwert des Von-Willebrand-Faktors (VWF) eingegangen und so die Zielsetzung der Studie hergeleitet. Im Anschluss werden in Kapitel 2 das Studiendesign, die verwendeten Materialien sowie die angewandten Methoden beschrieben. In Kapitel 3 werden die Untersuchungsergebnisse referiert und schließlich in Kapitel 4 diskutiert.

## 1.1 Bedeutung und Pathogenese von KHK und MI

Krankheiten des Kreislaufsystems waren in Deutschland für 47,3 % aller Todesfälle im Jahre 2001 ursächlich (Statistisches Bundesamt 2004). Die koronare Herzkrankheit und der Myokardinfarkt sind unter den Krankheiten des Kreislaufsystems die am häufigsten zum Tode führenden und belegen seit vielen Jahren in der deutschen Todesursachenstatistik die beiden ersten Plätze. 12,3 % der Sterbefälle bei Frauen und 9,9 % bei Männer wurden 2003 auf eine koronare Herzkrankheit zurückgeführt, 6,5 % aller Todesfälle bei Frauen und 9,0 % bei Männer auf einen Myokardinfarkt (Statistisches Bundesamt 2004).

Die koronare Herzkrankheit ist definiert als Atherosklerose der Herzkranzgefäße (DGK 1998). Durch die atherosklerotischen Stenosen kommt es zu einer Einschränkung des Blutflusses in den Koronararterien und damit zu einer Koronarinsuffizienz, d. h. einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf- und -angebot im Myokard. Je nach Schwere und Dauer der daraus resultierenden Myokardischämie manifestiert sich die KHK in Form von Angina pectoris, Myokardinfarkt, Myokardinsuffizienz, Herzrhythmusstörungen oder plötzlichem Herztod. Etablierte Risikofaktoren für die Entstehung einer stenosierenden Atherosklerose wie bei der KHK sind unter anderem

höheres Alter und männliches Geschlecht als nicht beeinflussbare Größen und Nikotinkonsum, erhöhtes LDL-Cholesterin, fettreiche Kost, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Übergewicht und thrombogene Faktoren als beeinflussbare Umstände (Wood et al. 1998; Assmann et al. 1999; Luc et al. 2002).

In der Pathogenese der KHK kommt es in der Intima der Gefäße zur Bildung von fibrösen Plaques (Atheromen) aus Monozyten, Makrophagen, Schaumzellen, T-Lymphozyten, Bindegewebe, Gewebetümmern und Cholesterinkristallen. Für das Wachstum der Plaques und das Voranschreiten des Arteriosklerose spielen hämostatische Vorgänge wie die Ablagerung von Thrombozyten und eine fibröse Umorganisation sowie die gefährliche Plaqueruptur eine wichtige Rolle (Fuster et al. 1992a, b). Man unterscheidet sechs verschiedene Plaquetypen mit z. T. zusätzlichen Untergruppen. Typ I bis III sind arteriosklerotische Frühläsionen, die bereits in der ersten Lebensdekade nachweisbar sind (Stary 1989) und, falls nicht durch einen sich aufpfropfenden Thrombus beschleunigt, stetig und langsam wachsen (Worthley et al. 2001). Typ IV und Va sind bereits fortgeschrittene Läsionen, die durch ihren hohen Fettgehalt zu einer Plaqueruptur neigen, während die Typen Vb und Vc eher eine langsame Größenzunahme zeigen. Rupturierte Plaques mit verletzter Oberfläche gehören der Gruppe VI an (Fuster 1994). Ein ohne Ruptur langsam und stetig wachsender Plaque verursacht eine allmähliche Steigerung der Lumeneinschränkung und koronaren Insuffizienz, die die Ausbildung von Kollateralen erlaubt, so dass sich eine myokardiale Minderversorgung unter diesen Bedingungen häufig als stumme Ischämie klinisch inapparent äußert (Fuster 1994).

Instabile Angina Pectoris, Myokardinfarkt und plötzlicher Herztod als akute myokardiale Syndrome entstehen zu 75 % durch eine rasche vollständige Verlegung eines Koronargefäßes durch einen Thrombus, der sich nach einer Plaqueruptur auf der Läsion gebildet hat (Falk 1983). Faktoren, die das klinische Erscheinungsbild einer koronaren Herzkrankheit bestimmen, sind somit Ruptur und Grad der anschließenden Thrombusbildung. Zur Ruptur neigen vor allem Läsionen mit großem Fettkern, einem hohen Gehalt an thrombogenen Gewebsthromboplastin und einer nur dünnen fibrösen Kappe mit starker Infiltration durch Makrophagen. Der Grad der Thrombusbildung hängt von der Thrombogenität des rupturierten Plaques sowie von dem Maß der Störung der lokalen Gerinnung und des systemischen thrombotisch-thrombolytischen Gleichgewichts ab (Shah 1997).

Die Ruptur und die damit verbundene Verletzung der Gefäßwand führen zur Freisetzung thrombogenen Materials an Plaqueoberfläche und Gefäßwand. Dieses initiiert die vaskuläre und durch freiliegendes Kollagen auch die zelluläre Hämostase, die

schließlich in der Bildung eines Thrombus auf dem rupturierten Atherom mündet. Das schnelle Wachsen und die gerinnungsfördernde Oberfläche des Thrombus beeinflussen als lokale Faktoren wiederum die Fließeigenschaften des Bluts ungünstig, so dass eine weitere Ablagerung von Thrombozyten und damit ein weiteres Wachstum des Thrombus unterhalten wird, das schließlich zur kompletten Verlegung des Gefäßes führt (Chesebro et al. 1997). Zusätzlich forciert wird dieser Vorgang durch gleichzeitige Vasokonstriktion (Rauch et al. 2001).

Neben der Plaqueruptur kann auch eine oberflächliche Erosion des Atheroms eine Thrombusbildung initiieren, die in einen Myokardinfarkt mündet (Fuster 1994; Farb et al. 1996). In diesen Fällen könnten zu einem besonderen Grad eine systemische Thromboseneigung, die durch Risikofaktoren wie Rauchen, Diabetes mellitus und Hypercholeserämie gefördert wird, maßgeblich sein (Sambola et al. 2003). Kommt es bei einer akuten Thrombusbildung nicht zur kompletten Verlegung eines Gefäßes, schließt sich ein fibrotischer Umbau des Thrombus an, der zum sprunghaften Voranschreiten der arteriosklerotischen Läsion in dem Gefäß führt (Falk und Fernandez-Ortiz 1995).

Die Thrombusbildung ist somit nicht nur maßgeblich an der Entwicklung und dem Voranschreiten der Atherosklerose beteiligt, sondern auch der entscheidende Schritt in der Entwicklung der überwiegenden Mehrheit der Myokardinfarkte. Als Teil der Hämostase ist die Thrombusbildung einem komplexen System ineinandergreifender lokaler und systemischer Faktoren unterworfen, die den Grad der Gerinnbarkeit des Blutes sensibel steuern. Die angeborene, erworbene oder medikamentös veränderte Funktion dieses Systems kann den Verlauf einer koronaren Herzkrankheit und das Entstehen eines Myokardinfarktes grundlegend beeinflussen.

## 1.2 Physiologie der Hämostase

Die Hämostase ermöglicht im Falle von Verletzungen an Gewebe und kleineren Gefäßen ein rasches Sistieren des Blutflusses und schützt den Körper auf diese Weise vor großem Blutverlust. Man kann den Ablauf der Hämostase in die drei zeitlich aufeinander folgenden Phasen primäre Hämostase, sekundäre Hämostase und Fibrinolyse unterteilen. In der primären Phase führen vaskuläre und zelluläre Faktoren zur Entstehung eines noch relativ ungefestigten Thrombozytenpropfes (primärer, „weißer Thrombus“), der dann in der sekundären Phase durch das plasmatische Gerinnungssystem einen Fibrinfilz erhält und auf diese Weise stabilisiert wird (sekundärer, „roter Thrombus“). Im Anschluss an diese Phasen wird durch das fibrinolytische System die

langsame Auflösung des gebildeten Thrombus eingeleitet, um so eine Rekanalisierung und Heilung des geschädigten Gewebes zu ermöglichen (Dörner 1999).

### 1.2.1 Vaskuläre Hämostase

In der vaskulären Phase der Hämostase steht eine reflektorische Kontraktion der Gefäßwand im Vordergrund, die durch die Reizung der glatten Muskulatur in Arterien und Arteriolen nach Verletzung der Gefäßwand ausgelöst wird. Zusätzlich verstärkt wird sie durch aus Thrombozyten und der verletzten Gefäßwand freigesetzte vaso-konstriktorische Substanzen wie Serotonin, Katecholamine und Thromboxan A<sub>2</sub> (Silbernagl und Lang 1998).

### 1.2.2 Zelluläre Hämostase

Die zelluläre Hämostase beginnt mit der Adhäsion von Thrombozyten an subendothelialen Kollagenfasern, die bei der Verletzung des Gefäßendothels exponiert wurden. Im venösen System kann diese Adhäsion von Faktoren wie Fibrinogen und Fibronektin vermittelt werden (Dörner 1999; Silbernagl und Lang 1998). Im arteriellen System jedoch, wo hohe Scherspannungen die Thrombozyten von der Gefäßwand wegreißen, wird eine Adhäsion der Thrombozyten nur durch Brückenbildung des Von-Willebrand-Faktors zwischen dem Glykoprotein Ib<sub>α</sub> der Thrombozyten und den Kollagenfibrillen möglich. Der Kontakt ist zunächst noch locker und wird erst im Verlauf zu einer festen Anheftung stabilisiert. Schon während der Adhäsion konvertieren die Thrombozyten in einen aktivierten Zustand, in dem sie u. a. verschiedene vasokonstriktorische (Serotonin, Katecholamine, Thromboxan A<sub>2</sub>) und aggregationsfördernde Substanzen (ADP, plättchenaktivierender Faktor, Thromboxan A<sub>2</sub>) aus ihrer Granula freisetzen, Glykoprotein Gp IIb/IIIa an der Oberfläche exprimieren und durch Verlust der Scheibchen-Form und Ausbildung zytoplasmatischer Fortsätze (Pseudopodien), die eine wirkungsvolle Abdichtung der Gefäßwandläsion ermöglichen, ihre Gestalt ändern (Ruggeri 1997b).

Eine erste Aggregation der Thrombozyten erfolgt dann über eine zunächst noch reversible Bindung von Fibrinogen an das aktivierte Gp IIb/IIIa der Thrombozyten. Durch Einwirkung der aggregationsfördernden Substanzen aus der Thrombozyten-Granula wird diese Verbindung dann im Verlauf weiter gefestigt und schließlich unter Mitwirken des Von-Willebrand-Faktors in eine irreversible Aggregation überführt (Peterson et al. 1987; Weiss et al. 1989).



### **1.2.3 Plasmatische Hämostase**

Die plasmatische Gerinnung erfolgt unter der Beteiligung von insgesamt 15 Gerinnungsfaktoren, die im Plasma normalerweise in inaktiver Form vorliegen und im Verlauf der Gerinnung stufenweise aktiviert werden. Der VWF ist zwar kein Bestandteil dieser Gerinnungskaskade, nimmt als Trägerprotein für den wichtigen Faktor VIII, den er gleichzeitig auch vor frühzeitiger proteolytischer Spaltung und daraus folgender Inaktivierung schützt, jedoch eine wichtige Aufgabe im Ablauf der plasmatischen Hämostase wahr. Die plasmatische Hämostase kann über den endogenen Weg mit Hilfe einer Kontaktaktivierung oder über den exogenen Weg über das bei Gewebsverletzung aus den Mikrosomen zerstörter Zellen freigesetzte Gewebsthromboplastin initialisiert werden. Die beiden Aktivierungswege, die auch Querverbindungen aufweisen, münden beide in einer gemeinsam Endstrecke, in der als zentrale Reaktion der plasmatischen Gerinnung Fibrinogen durch Thrombin zunächst in lösliches Fibrin und durch den fibrinstabilisierenden Faktor schließlich in unlösliches Fibrin umgewandelt wird, das den primären Thrombus durchdringt, auf diese Weise verfestigt und zum festen, sekundären Thrombus macht (Dörner 1999; Silbernagl und Lang 1998).

### **1.2.4 Fibrinolyse**

Fibrin und Fibrinogen werden durch die Endopeptidase Plasmin abgebaut. Plasmin liegt in seiner inaktiven Form als Plasminogen im Plasma vor und kann in vivo durch die Plasminaktivatoren vom Urokinasetyp (u-PA) und vom Gewebetyp (tissue type plasminogen activator, t-PA), aktiviert werden. T-PA wird als wichtigster physiologischer Aktivator durch verschiedene Stimuli aus dem Gefäßendothel freigesetzt. Durch die Fibrinolyse ist zum einen eine Gegenregulation zu der im Blut physiologischerweise ständig ablaufenden Gerinnung gewährleistet, zum anderen hat sie die Aufgabe, die bei der Wundheilung entstehenden Fibrinablagerungen zu entfernen und so die Voraussetzung für Rekanalisierung und Wundheilung zu schaffen. Gentechnologisch hergestelltes t-PA wird daher auch zur Rekanalisierung von Myokardinfarkten eingesetzt (Dörner 1999; Silbernagl und Lang 1998).

## **1.3 Genpolymorphismen des Gerinnungssystems in der Pathogenese von KHK und MI**

Veränderungen der Hämostase und damit der Thrombogenität des Blutes haben entscheidenden Einfluss auf die Entstehung von KHK und MI und werden in der Be-

handlung dieser beiden Erkrankungen therapeutisch genutzt. Nach der von Virchow 1856 beschriebenen Trias sind neben Gefäßwandschädigungen und Veränderungen der Blutströmung als dritter Faktor Modifikationen der Blutzusammensetzung maßgeblich an der Entstehung arterieller Thromben beteiligt (Greten 2001, S. 308). Diese Modifikationen können zu einer Hyperkoagulabilität führen, die die lokale Thrombosebildung und somit auch die Entwicklung von KHK und Myokardinfarkt fördert (Badimon et al. 1992). Eine Hyperkoagulabilität des Blutes von KHK-Patienten konnten Urdulashvili et al. (2004) durch Beleg einer schnelleren Erythrozytenaggregation bei den Patienten gegenüber Kontrollpersonen nachweisen. Marker der Thrombogenität des Blutes wie z. B. erhöhte Fibrinogenwerte oder VWF-Plasmaspiegel wurden bereits in diversen Studien als mit akuten myokardialen Syndromen assoziiert nachgewiesen (Thompson et al. 1995; Saigo und P. Y. Hsue 2004).

Die ARIC-Studie, in deren Rahmen 14.477 Erwachsene ohne initial nachweisbare KHK im Mittel 5,2 Jahre verfolgt und die hämostatischen Risikofaktoren regelmäßig erhoben wurden, belegt die Korrelation der Inzidenz von koronarer Herzkrankheit und erhöhtem Plasmaspiegeln für Fibrinogen, Faktor VIII, VWF sowie erhöhten Leukozytenzahlen (Folsom et al. 1997). Systemische Faktoren mit Einfluss auf die Blutzusammensetzung können neben den plasmatischen Gerinnungsfaktoren aber auch metabolischer oder hormoneller Genese sein (z. B. Hyperproteinämie, Diabetes mellitus, hohe Katecholaminspiegel, Störungen im Renin-Angiotensin-System) oder aus der Zusammensetzung und Funktion der zellulären Elemente des Blutes herrühren (Fuster et al. 1992a, b; Rauch et al. 2001).

Die Therapie von KHK und MI versucht diese Faktoren zu beherrschen. Die anti-koagulatorische Therapie mit Thrombozytenaggregationshemmer greift vor allem auf der Ebene der zellulären Elemente des Blutes an und ist so in der Lage, das Risiko von Thrombosebildung und damit von Herzinfarkt, instabiler Angina Pectoris und plötzlichem Herztod nachhaltig zu verringern (Chesebro et al. 1997). Die wohl spezifischen und gleichzeitig auch potentesten Thrombozytenaggregationshemmern sind Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten (Pitts und Lange 1999). Sie binden an das Gp IIb/IIIa der Thrombozyten und verhindern somit eine Interaktion der Thrombozyten mit Fibrinogen und VWF. Dadurch hemmen sie einen zentralen Vorgang in der Thrombozytenadhäsion und -aggregation und können eine Thrombenentstehung verhindern.

Die vielen Faktoren, die an der Hämostase beteiligt sind, bieten reichlich Raum für pathophysiologische Veränderungen mit nachhaltiger Auswirkung auf die Pathogenese von ischämischen Herzkrankheiten. Die familiäre Vorbelastung als etablierter

Risikofaktor für KHK und MI (Jorde und Williams 1988), gerade bei jungen Menschen ohne weitere Risikofaktoren (Rissanen 1979), veranlasste zur Suche nach neuen, bisher noch unentdeckten vererbbaaren Risikofaktoren im Rahmen des Gerinnungssystems.

Polymorphismen als Varianten der DNA-Sequenz, die bei mehr als 1 % der Bevölkerung auftreten (Peake und Winship 1991), sind eine mögliche Erklärung für vererbbaare Thrombogenität mit vorzeitiger Entwicklung von KHK und MI. Es wurden bisher mehrere Genpolymorphismen in Proteinen des Gerinnungssystems nachgewiesen, die mit Auftreten und Progredienz von koronarer Herzkrankheit und Myokardinfarkt assoziiert werden konnten. Unter anderem fanden sich diese in den Genen des Fibrinogens, der Promoterregion für Plasmin-Aktivator-Inhibitor, der Faktoren V, VII, XII und XIII, des Prothrombins und des Thrombomodulins (Williams und Bray 2001). Für die Mehrzahl dieser Polymorphismen existieren neben Studien, die eine Assoziation postulieren, eine Reihe von Studien, die keine Assoziation zu KHK und MI nachweisen konnten. Dabei ist zu beachten, dass die Studien in Auswahl und Größe der Kollektive stark differieren und häufig nur schwer zu vergleichen sind. Besondere Betrachtung findet die Manifestation von KHK und MI bei jungen Menschen ohne weitere Risikofaktoren. In diesem Kollektiv konnte überdurchschnittlich häufig eine Assoziation der Polymorphismen mit dem Auftreten von KHK und MI nachgewiesen werden (Lane und Grant 2000).

Eine besondere Stellung nehmen die Polymorphismen der Thrombozytenmembran ein. Der Stellenwert der Glykoproteine auf der Thrombozytenmembran für die Gerinnung wurde ursprünglich durch ihren Defekt bei den Gerinnungsstörungen Thrombasthenie Glanzmann-Naegeli und dem Bernard-Soulier-Syndrom entdeckt und wird heutzutage durch die effektvolle Therapie mit Glykoproteinrezeptorantagonisten deutlich (Lane und Grant 2000). Begonnen bei Weiss et al. (1996) folgten bis zum heutigen Tag eine Vielzahl von Studien, die sich mit den polymorphen Glykoproteinrezeptoren auf der Thrombozytenmembran und deren Einfluss auf die Entstehung von ischämischen Herzkrankheiten beschäftigten. Der mit Abstand am häufigsten untersuchte Polymorphismus  $PI^{A1/A2}$  betrifft das Glykoprotein IIIa des Gp-IIb/IIIa-Rezeptorkomplexes. Dieser Rezeptor interagiert mit VWF und Fibrinogen und ist essentiell für die Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten (Lefkovits et al. 1995). Die Ergebnisse der Studien zu diesem Polymorphismus differieren, die Mehrzahl lässt jedoch eine Assoziation von KHK und MI mit dem selteneren  $PI^{A2}$ -Allel vermuten, die wiederum unter jungen Menschen besonders ausgeprägt erschien (Williams und Bray 2001). Auch diese Studien sind aufgrund von sehr unterschiedlichen Studiendesigns

und den unterschiedlichen ethnischen Gruppen, die untersucht wurden, nur schwer zu vergleichen.

Der in dieser Arbeit untersuchte F/Y2561-Polymorphismus befindet sich im Von-Willebrand-Faktor-Gen auf dem Chromosom 12. Der Polymorphismus liegt in dem Gen in der Nähe der Bindungsstelle des Von-Willebrand-Faktors für den Gp-IIb/IIIa-Rezeptorkomplex auf der Thrombozytenmembran. Er wurde von Schneppenheim (unveröffentlicht) und Eikenboom et al. (1998) identifiziert. Schlingmann (2000) konnte eine auffällige Häufung von Tyrosin(Tyr)-Allel-Trägern in einer Gruppe von 99 männlichen Herzinfarktpatienten gegenüber einer gesunden Kontrollgruppe von 35 Personen feststellen, die jedoch statistisch nicht signifikant war. Weitere Polymorphismen, die bisher im Von-Willebrand-Faktor-Gen untersucht und auf einen Einfluss auf die Manifestation von koronarer Herzkrankheit und Myokardinfarkt getestet wurden, befinden sich fast ausschließlich im Promotorbereich des Von-Willebrand-Faktors.

Aufgrund der nachgewiesenen Korrelation von hohen Plasmaspiegeln des Von-Willebrand-Faktors mit akuten ischämischen Ereignissen am Herzen (Jansson et al. 1991; Rumley et al. 1999) suchten diese Studien eine Assoziation zwischen den Polymorphismen, hohen Plasmakonzentrationen des Von-Willebrand-Faktors und dem Auftreten von KHK und MI und kamen dabei zu uneinheitlichen Ergebnissen. Keightley et al. (1999) und Lacquemant et al. (2000) konnten Polymorphismen in der Promoterregion identifizieren und diese mit unterschiedlichen erhöhten VWF-Plasmakonzentrationen assoziieren. Di Bitondo et al. (2001) und Simon et al. (2003) prüften einen dieser Polymorphismen und konnten keine Assoziation zu KHK oder MI nachweisen. Die letztgenannten fanden auch keine Korrelation zwischen VWF-Plasmakonzentrationen und Genotyp. Van der Meer et al. (2004) postuliert die Assoziation des untersuchten Polymorphismus 1793 C/G mit einem erhöhten Risiko für KHK bei Patienten mit bereits fortgeschrittener Arteriosklerose. Heywood et al. (1997) wiederum fanden in einer Gruppe mit Patienten mit anamnestischer ischämischer Herzkrankheit eine höhere Frequenz der selteneren Allele zweier neuer Polymorphismen in der Promotorregion des Von-Willebrand-Faktors, konnten diese jedoch nicht mit erhöhten VWF-Plasmakonzentrationen oder Myokardinfarkten assoziieren (Williams und Bray 2001). Wie auch für andere Polymorphismen in den Genen des Gerinnungsystems ergibt sich hier das von Lane und Grant (2000) beschriebene Paradoxon einer eindeutig nachgewiesenen Beziehung zwischen Gen und Protein sowie Protein und Krankheit bei einer Inkonsistenz der resultierenden Beziehung zwischen Gen und Krankheit. Lane und Grant (2000) vermuten als eine der Ursachen für diese widersprüchlichen Beobachtungen einen durch den Phänotyp bestimmten Unterschied in quantitativen Werten

wie etwa die Plasmakonzentration zirkulierender Proteine oder die Zahl exprimierter Rezeptoren.

## 1.4 Von-Willebrand-Faktor

### 1.4.1 Biosynthese und Struktur

Der VWF ist ein multimeres Plasmaprotein mit einer variablen Größe von 0,6 KD bis zu 20.000 KD, das in Endothelzellen und Megakaryozyten synthetisiert wird. Das Von-Willebrand-Faktor-Gen findet sich am distalen Ende des kurzen Armes des Chromosoms 12. Es ist 178 Kilobasen groß, beinhaltet 52 Exons und bildet die Vorlage für den 2813 Aminosäuren großen Pre-Pro-Von-Willebrand-Faktor. Nach Abspaltung eines Signalpeptids von 22 Aminosäuren wird daraus der Pro-Von-Willebrand-Faktor.

Dieses Vorläuferprotein des Von-Willebrand-Faktors hat einen ungewöhnlich hohen Anteil an sich wiederholenden Strukturen, die als Domänen bezeichnet werden. Es gibt vier verschiedene Domänen, die sich unterschiedlich häufig wiederholen und folgendermaßen angeordnet sind: D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-B1-B2-B3-C1-C2-CK. Der Abschnitt mit den Domänen D1-D2 bildet das große Propeptid (741 Aminosäuren), der Abschnitt von der Domäne D' bis zur Domäne CK die reife VWF-Untereinheit (2050 Aminosäuren).

Der Pro-Von-Willebrand-Faktor wird im endoplasmatischen Retikulum glykosyliert und dann über Disulfidbrücken, die am carboxyterminalen Ende der CK-Domäne lokalisiert sind, dimerisiert. Diese werden in den Golgi-Apparat transportiert, wo sie, genau wie im Postgolgi-Kompartement, weiter sulfatiert und glykosyliert werden, während gleichzeitig eine Polymerisation der Dimere nahe den aminoterminalen D-Domänen stattfindet. Schließlich wird im Trans-Golgi-Netzwerk das Propeptid abgespalten und der Von-Willebrand-Faktor unter Bildung von Disulfidbrücken am aminoterminalen Ende weiter multimerisiert (de Wit und van Mourik 2001). Hierbei entstehen Von-Willebrand-Moleküle variabler Größe, die sich aus der unterschiedlichen Anzahl von Multimeren ergibt.

Der VWF wird von den Endothelzellen entweder konstitutiv direkt nach der Synthese in das Plasma sezerniert oder zunächst in den Weibel-Palade-Bodies, die sich vermutlich aus dem Trans-Golgi-Netzwerk abschnüren, gespeichert. Aus diesen wird er dann erst durch einen entsprechenden Reiz, wie z. B. Thrombin, sezerniert. Der auf diese Weise freigesetzte VWF besteht aus Multimeren größerer Molekülmasse, die in der Hämostase effektiver sind als die kleineren, die auf dem konstitutiven Weg sezer-

niert werden. In den Thrombozyten wird der VWF, der bereits in den Megakaryozyten produziert wurde, in den  $\alpha$ -Granula gespeichert. Von hier kann er nur nach der Aktivierung der Thrombozyten ausgeschüttet werden (Ruggeri 1999).

Der VWF ist in der Lage, sich mit spezifischen Liganden und Rezeptoren zu verbinden. In der D'-Domäne sind Bindungsstellen für den Faktor VIII und Heparin lokalisiert, die Domäne A1 beinhaltet die Bindungsstelle für den Gp Ib-Rezeptor der Thrombozytenmembran sowie Heparin, Kollagen und Sulfatide. Eine weitere Bindungsstelle für Kollagen findet sich in der A3-Domäne. Desweiteren enthält der Pro-Von-Willebrand-Faktor zwei Arg-Gly-Asp-Sequenzen, die nach dem Einbuchstabencode der Aminosäuren auch als RGD-Sequenzen bezeichnet werden. Während eine im Propeptid lokalisiert und die Funktion noch nicht eindeutig erklärt ist, findet sich die andere im carboxyterminalen Ende der C1-Domäne und stellt die zum Gp IIb/IIIa der Thrombozytenmembran komplementäre Bindungsregion dar (de Wit und van Mourik 2001).

In der vorliegenden Arbeit wird die von Goodeve et al. (2001) vorgeschlagene neue Nomenklatur für den VWF verwendet, die die Aminosäuren (As) des Pre-Pro-Von-Willebrand-Faktors beginnend mit dem Initiator-Methionin kontinuierlich von 1–2.813 durchnummeriert und den Einbuchstabencode für Aminosäuren verwendet. Nach der alten Nomenklatur wurde dagegen nur der Abschnitt des murenen Von-Willebrand-Faktors von 1–2.050 nummeriert und der Dreibuchstabencode verwendet. Eine Positionsangabe nach der neuen, hier angewandten Nomenklatur gibt somit die Lokalisation einer AS im Pre-Pro-Von-Willebrand-Faktor an, wohingegen eine Positionsangabe nach der alten Nomenklatur die Lage der AS im murenen VWF beschreibt.

### 1.4.2 Funktion

Der VWF erfüllt zwei wichtige Funktionen.

1. Er vermittelt während der primären Hämostase die Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten an verletztes Subendothel und ermöglicht so die Bildung eines Thrombus und die rasche Blutstillung nach einer Endothelverletzung. In dieser Funktion ist er besonders im arteriellen System essentiell, da bei den hier herrschenden hohen Scherkräften andere adhäsive Faktoren wie Fibronectin und Fibrinogen im Gegensatz zu ihrem Wirken im venösen System eine Adhäsion der Thrombozyten nicht einleiten können (Ruggeri 1999).

2. Er ist Trägerprotein für den in der plasmatischen Gerinnung wichtigen Faktor VIII, den er gleichzeitig auch vor frühzeitiger proteolytischer Spaltung und daraus folgender Inaktivierung schützt (Ruggeri 1999).

### **1.4.3 Von-Willebrand-Faktor, koronare Herzkrankheit und Myokardinfarkt**

Hohe Plasmakonzentrationen an VWF konnten als unabhängiger Risikofaktor für akuten Myokardinfarkt, koronare Herzkrankheit, rezidivierende Myokardinfarkte und Tod nachgewiesen werden (Jansson et al. 1991; Thompson et al. 1995; Rumley et al. 1999; Sakai et al. 2000; Wiman et al. 2000). Im Umkehrschluss konnte tierexperimentell ein Schutz vor Arteriosklerose bei Schweinen mit schwerem Von-Willebrand-Jürgens-Syndrom (siehe dazu Abschnitt 1.4.4 auf der nächsten Seite) und daher erniedrigtem oder nicht funktionstüchtigem VWF nachgewiesen werden. Fuster et al. (1978, 1985) konnten bei Schweinen mit schwerem Von-Willebrand-Jürgens(VWJ)-Syndrom selbst unter cholesterinreicher Ernährung keine Plaquebildung in der Aorta feststellen. Für die Koronararterien war eine eindeutige Aussage in dieser Studie nicht möglich, sie konnte aber durch Nichols et al. (1986) erbracht werden. Die Autoren wiesen eine signifikant erniedrigte Inzidenz von okklusiven Thromben in stenosierten und verletzten Koronarien von Schweinen mit VWJ-Syndrom nach. Nichols et al. (1991) belegten zudem, dass erniedrigte Konzentrationen des Von-Willebrand-Faktors im Plasma die Ausdehnung von okklusiven Stenosen in stenosierten und verletzten Koronarien begrenzen. Somit liegt eine essentielle Beteiligung des Von-Willebrand-Faktors an der plötzlichen Thrombusbildung auf bestehende Stenosen oder Verletzungen nahe und damit an einem für den Myokardinfarkt ursächlichen Vorgang.

Trotz dieser eindeutigen Ergebnisse scheint die Protektion durch Erkrankungen, die die Funktion des Von-Willebrand-Faktors beeinträchtigen, für den Menschen noch nicht zweifelsfrei geklärt. Neben einzelnen Fallberichten, die von schwerer Arteriosklerose und Myokardinfarkten bei VWJ-Syndrom-Patienten berichten (Dulhoste et al. 1989; Federici et al. 1993; Arjomand et al. 2002), fanden Sramek et al. (2004) in einer Multicenterstudie mit 47 Patienten mit Typ 3 des Von-Willebrand-Jürgens-Syndroms und 84 Kontrollpatienten keinen Unterschied in der Plaqueentwicklung in Femoralis und Karotis zwischen den Gruppen. Zudem konnte kein Einfluss einer Plasmakonzentratbehandlung nachgewiesen werden.

#### 1.4.4 Bekannte Mutationen und Polymorphismen im VWF-Gen

Mutationen im VWF-Gen sind vor allem im Rahmen des Von-Willebrand-Jürgens-Syndroms bekannt. Das Von-Willebrand-Jürgens-Syndrom ist bei einer Prävalenz von ca. 1% die häufigste angeborene Gerinnungsstörung und vereint mit seinen drei Haupt- und vier Subtypen verschiedene Ätiologien der Funktionsstörung des Von-Willebrand-Faktors.

Von den drei Haupttypen des Von-Willebrand-Jürgens-Syndroms betreffen der Typ 1 bei leichter und der Typ 3 bei schwerer Symptomatik quantitative Mängel des Von-Willebrand-Faktors. Der heterogene Typ 2 dagegen betrifft qualitative Defekte des Von-Willebrand-Faktors; der Schweregrad der Symptomatik ist von leicht bis mittelschwer einzustufen. Beim Typ 1 und 3 sind Hypokoagulabilität und hämorrhagische Diatheseneigung auf eine zu geringe (Typ 1) bzw. fehlende (Typ 3) Konzentration des eigentlich intakten Von-Willebrand-Faktors im Plasma zurückzuführen (Schneppenheim et al. 2001b).

Während für die überwiegende Mehrheit der Patienten mit Typ 1 des Von-Willebrand-Jürgens-Syndroms bisher keine spezifischen Mutationen nachgewiesen werden konnte (Rodeghiero und Castaman 2001), sind für den Typ 3 des Von-Willebrand-Jürgens-Syndroms eine Reihe spezifischer Mutationen bekannt. So konnten bereits diverse Mutationen wie Substitutionen einzelner Aminosäuren und kleine Insertionen und Deletionen mit nachfolgendem Frameshift nachgewiesen werden. Viele der Mutationen produzieren Stop-Codons, was den quantitativen Mangel an VWF erklärt (Schneppenheim et al. 1994; Eikenboom 2001).

Als Typ 2 des Von-Willebrand-Jürgens-Syndroms werden Erkrankungen unterschiedlicher molekularer Grundlage zusammengefasst, die alle einen qualitativen Defekt des Von-Willebrand-Faktors aufweisen. Bei den Typen 2A, 2B und 2M ist die Interaktion des Von-Willebrand-Faktors mit den Thrombozyten gestört. Charakteristisch für den Typ 2N ist ein Defekt in der Bindung des Von-Willebrand-Faktors zu Faktor VIII der plasmatischen Gerinnung. Mutationen konnten in verschiedenen Domänen nachgewiesen werden. Die D1-Domäne betrifft das Propeptid des Von-Willebrand-Faktors, Mutationen hier führen zu Defekten in der Multimerisation. Mutationen in der D3-Domäne führen zu moderaten bis milden Symptomen. Auffällig ist das Auftreten von besonders großen, so genannten „supranormalen“ Multimeren des Von-Willebrand-Faktors. Die A1-Domäne beinhaltet die Bindungsstelle des Von-Willebrand-Faktors mit dem Glykoprotein Ib der Thrombozyten. Mutationen führen hier sowohl



zu einer erhöhten als auch erniedrigten Bindungsaffinität mit konsekutiv verstärkter oder verminderter Thrombozytenaggregation.

Beide Varianten führen allerdings zur Blutungsneigung. Im Falle der verstärkten Bindungsaffinität läßt sich dies am ehesten durch einen gleichzeitig bestehenden Mangel an großen Multimeren und den Verlust des Von-Willebrand-Faktors durch die verstärkte Adsorption an Thrombozyten erklären.

Mutationen im Bereich der A2-Domäne führen zu zwei unterschiedlichen molekularen Pathomechanismen. Zum einen ergibt sich ein Defekt im intrazellulären Transport des Von-Willebrand-Faktors, der zu einer gestörten Sekretion führt; zum anderen können Mutationen in dieser Domäne eine Konformationsänderung bedingen, die eine schnellere proteolytische Spaltung des Von-Willebrand-Faktors bedingt. Die A3-Domäne beinhaltet die Bindungsstelle des Von-Willebrand-Faktors für Kollagen. Mutationen hier führen bei milder Symptomatik zu einer gestörten Kollagenbindung. In der für die Dimerisation wichtigen „cysteine-knot“-Domäne wurden Mutationen nachgewiesen, die zu Dimerisierungs- und Multimerisierungsfehlern führen (Schneppenheim et al. 1996, 2001a). In der für die Bindung an Gp IIb/IIIa wichtigen C1-Domäne konnten im Rahmen des Von-Willebrand-Jürgens-Syndroms bisher keine Mutationen nachgewiesen werden (Meyer et al. 2001).

Die bisher im Von-Willebrand-Faktor-Gen untersuchten und auf einen Einfluss auf die Manifestation von koronarer Herzkrankheit und Myokardinfarkt getesteten Polymorphismen befinden sich fast ausschließlich im Promotorbereich des Von-Willebrand-Faktors. Wie bereits in Abschnitt 1.3 auf Seite 5 erläutert, ergaben die Studien zu diesen Polymorphismen bezüglich ihres Einflusses auf die Plasmakonzentration des Von-Willebrand-Faktors und die Entwicklung von ischämischen Herzkrankheiten uneinheitliche Ergebnisse. Aufgrund der z. T. sehr niedrigen Allelfrequenzen werden hier in der Zukunft wohl großzahlige Studien nötig sein, um zu einer eindeutigen Klärung zu führen.

### **1.4.5 F/Y 2561–Polymorphismus**

Im Exon 45 des VWF-Gens wurde in der hämostaseologischen Arbeitsgruppe der Abteilung für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums Eppendorf der Polymorphismus F/Y 2561 identifiziert. Hierbei handelt es sich um einen Single-Nucleotid-Polymorphismus, bei dem die im Wildtyp an Position 7932 des VWF-Gens vorliegende Nukleinsäure Thymin durch Adenin ersetzt wird. Dadurch kommt es zum Tausch der Aminosäure PhenylAdenin zu Tyrosin an Position 2561 des Von-Willebrand-Faktors. Der Austausch befindet sich somit in der C2-Domäne des Von-

Willebrand-Faktors und hier nahe der für die Bindung an den Gp-IIb/IIIa-Rezeptor der Thrombozytenmembran verantwortlichen RGD-Sequenz, die an Position 2.507–2.509 des Proteins (alte Nomenklatur: 1.744–1.747 des reifen Von-Willebrand-Faktors) im Exon 44 in der C1-Domäne lokalisiert ist (Berliner et al. 1988; Weiss et al. 1993; Beacham et al. 1992).

Es ist daher möglich, dass der Polymorphismus F/Y 2561 über eine Konformationsänderung in der Tertiärstruktur des Von-Willebrand-Faktors Einfluss auf die Interaktion zwischen der RGD-Sequenz des Von-Willebrand-Faktors und dem Gp-IIb/IIIa-Rezeptor der Thrombozytenmembran nimmt. Die mögliche Folge wäre eine in ihrer Funktion eingeschränkte oder verstärkte Thrombozytenaggregation, die sich auf die primäre Hämostase und damit auf die Entstehung von KHK und Myokardinfarkt auswirken könnte.

Schlingmann (2000) untersuchte diesen Polymorphismus bezüglich einer Assoziation zu Myokardinfarkt und koronarer Herzkrankheit und fand eine auffällige Häufung von Tyr-Allel-Trägern in einer Gruppe von 99 männlichen Herzinfarktpatienten gegenüber einer Vergleichsgruppe von 35 Personen mit koronarangiographischem Ausschluss arteriosklerotischen Veränderungen der Koronarien. Das Ergebnis war in der univariaten Analyse statistisch nicht signifikant, könnte jedoch dennoch eine Tendenz aufzeigen, die es in einer Studie mit größerem Kollektiv zu überprüfen gilt.

### 1.5 Zielsetzung der vorliegenden Studie

Die Hämostase spielt in der Entwicklung von koronarer Herzkrankheit und Myokardinfarkt eine entscheidene Rolle. Diverse Studien haben eine Beeinflussung der Hämostase auf Ebene der essentiellen Thrombozytenaggregation untersucht und dabei vor allem genetische Veränderungen des Gp-IIb/IIIa-Rezeptors der Thrombozytenmembran beleuchtet. Polymorphismen der Gene des Gp-IIb/IIIa-Rezeptors stehen im Verdacht, die Interaktion zwischen dem Rezeptor und seinen Liganden Fibrinogen und VWF derart zu verändern, dass eine Thrombozytenaggregation gefördert und das Risiko zur Entwicklung von koronarer Herzkrankheit und Myokardinfarkt erhöht wird. Dies könnte in besonderem Maße für Myokardinfarkte, die in einem jungen Lebensalter auftreten und mit einer familiären Belastung assoziiert sind, zutreffen.

Schlingmann (2000) hat bisher als einziger eine mögliche Veränderung der Interaktion des Gp-IIb/IIIa-Rezeptor durch einen Genpolymorphismus auf Seiten des Von-Willebrand-Faktors untersucht. Er testete den F/Y 2561–Polymorphismus, der in der Nähe der Bindungsregion des Von-Willebrand-Faktors für den Gp-IIb/IIIa-Rezeptor

liegt, auf eine mögliche Assoziation mit Myokardinfarkten. Es fand sich dabei eine auffällige Häufung der Tyr-Allel-Träger in der Gruppe der Myokardinfarktpatienten, die jedoch statistisch nicht signifikant war. Aufgrund des relativ kleinen Studienkollektivs von 99 Infarktpatienten und 35 Kontrollpersonen, der Beschränkung auf männliche Studienteilnehmer und des Verzichtes auf eine multivariate Analyse in der Auswertung kann nicht abschließend entschieden werden, ob die ausbleibende statistische Signifikanz Folge einer fehlenden Assoziation oder des Studiendesigns ist.

Die hier vorliegende Studie hat nun zum Ziel, den F/Y 2561–Polymorphismus in einem großen Kollektiv von 2070 angiographisch untersuchten Personen, darunter 416 gesunde Kontrollpersonen und 1654 Patienten mit KHK und/oder MI, auf eine Assoziation zu ischämischen Herzkrankheiten zu prüfen und dabei durch Anwendung einer multivariaten Analyse den unabhängigen Stellenwert des Polymorphismus in der Pathogenese von koronarer Herzkrankheit und Myokardinfarkt zu testen. Neben der gesteigerten statistischen Aussagekraft bietet die Größe des Kollektivs auch die Möglichkeit, die Allelfrequenz in der Normalbevölkerung zu bestimmen und einzelne Subgruppen wie z. B. junge und alte Erwachsene beider Geschlechter und Patienten mit einem oder mehreren Infarkten und somit Hochrisiko- und Niedrigrisikogruppen unabhängig voneinander zu betrachten.

## 2 Patienten, Material und Methoden

### 2.1 Patienten

Die Studienpopulation der vorliegenden Studie umfasst 2070 Teilnehmer, die in dem Zeitraum von Juli 1997 bis Januar 2000 im Rahmen der Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study (LURIC-Studie) rekrutiert wurden. Die Bewilligung der LURIC-Studie erfolgte durch die Ethik-Kommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz (Nr. 1997-203) (Winkelmann et al. 2001).

#### 2.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien

In die LURIC-Studie aufgenommen wurden kaukasische Patienten deutscher Abstammung, die sich im Ludwigshafener Herzzentrum einer Koronarangiographie unterzogen und die nach einer Aufklärung über die Studie in die Teilnahme einwilligten. Die Koronarangiographien der Teilnehmer wurden zur diagnostischen Abklärung bestehender pektanginöser Beschwerden sowie im Rahmen der Diagnostik von Herzklappenfehlern unternommen. Abgesehen von akuten koronaren Syndromen war die klinische Stabilität der Teilnehmer Bedingung. Als Ausschlusskriterien für die LURIC-Studie galten akute Erkrankungen mit Ausnahme koronarer Syndrome, chronische Leiden nicht kardialen Ursprungs sowie eine maligne Tumorerkrankung innerhalb der letzten fünf Jahre (Winkelmann et al. 2001). Für die hier vorliegende Studie wurden darüber hinaus alle Patienten mit Koronargefäßstenosen zwischen 1–19% ausgeschlossen, da sie weder der Kontroll- noch der KHK-Gruppe zugewiesen werden konnten, sowie alle Patienten, die zum Zeitpunkt des ersten Herzinfarktes älter als 70 Jahre waren, um somit Multimorbidität als Einflußgröße einzuschränken.

#### 2.1.2 Definitionen

Die folgenden Definitionen basieren auf Winkelmann et al. (2001).

**Kontrollpersonen** Zur Gruppe der Kontrollpersonen wurden alle Patienten gezählt, die weder zum Zeitpunkt der Aufnahme in die LURIC-Studie noch in der Fol-

gezeit bis zur Bearbeitung der vorliegenden Studie einen Myokardinfarkt erlitten haben und die in der Koronarangiographie keine sichtbare Wandverengung- oder -irregularität aufwiesen. Das Fehlen einer sichtbaren Wandverengung oder -irregularität wurde als 0%ige Stenose definiert.

**Koronare Herzkrankheit** Die Diagnose koronare Herzkrankheit (KHK) basiert ausschließlich auf koronarangiographischen Kriterien. Die Analyse der Angiogramme erfolgte visuell auf einem 2 m<sup>2</sup> großen Bildschirm nach einem feststehenden Schema. Gemäß den Kriterien des Ad-hoc-Komitees der American Heart Association wurden die drei großen Koronararterien in 15 Segmente unterteilt (vgl. Austen et al. 1975). Aufgrund der Tatsache, dass die Hälfte aller Myokardinfarkte auf der Ruptur eines atherosklerotischen Plaques bei einer Stenose von weniger als 50 % beruht, wurden in der vorliegenden Studie alle Patienten mit einer Stenose von wenigstens 20 % an mindestens einem Koronararteriensegment der Gruppe „Koronare Herzkrankheit“ (KHK) zugeordnet (vgl. Little et al. 1991).

**1-, 2- und 3-Gefäßerkrankung** Zur differenzierten Auswertung wurde eine Stratifizierung der Gruppe KHK in 1-, 2- und 3-Gefäßerkrankung vorgenommen. Eine 3-Gefäßerkrankung wurde definiert als das Vorliegen einer wenigstens 50%igen Stenose an allen drei großen Koronararterien, eine 2-Gefäßerkrankung als das Vorliegen einer wenigstens 50%igen Stenose an zwei der drei großen Koronararterien. In die Gruppe der 1-Gefäßerkrankungen wurden alle Patienten mit wenigstens 20%iger Stenose an mindestens einer der drei Hauptkoronararterien gerechnet, so dass unter dem Terminus der 1-Gefäßerkrankung auch solche Patienten subsumiert wurden, die eine minder schwere Verlaufsform der KHK aufwiesen.

**Koronare Herzkrankheit mit oder ohne Myokardinfarkt** Bei der Analyse der Daten wurde mit zwei verschiedenen Gruppen zur koronaren Herzkrankheit gearbeitet: „KHK gesamt“ impliziert alle Patienten mit einer mindestens 20%igen Stenose an einer der drei Hauptkoronararterien, während „KHK ohne MI“ nur die Patienten beinhaltet, die bei einer mindestens 20%igen Stenose an einer der drei Hauptkoronararterien bisher noch keinen Myokardinfarkt erlitten hatten.

**Myokardinfarkt** Zur Diagnosestellung des Myokardinfarktes waren typische EKG-Veränderungen ein zwingendes Kriterium, darüber hinaus mussten persistierende pektanginöse Beschwerden, die auf sublinguale Nitroglyzerin- bzw. Isosorbiddinitratapplikation keine Besserung zeigten, über einen Zeitraum von mehr als 20

Minuten vorliegen und zusätzlich – oder an Stelle dieser Beschwerden – charakteristische Enzymveränderungen nachweisbar sein. Als typische EKG-Veränderungen für einen Myokardinfarkt mit ST-Streckenhebung (transmuralem oder „Q-wave“-Infarkt) galten ST-Streckenerhöhungen von  $\geq 2$  mm in mindestens zwei nebeneinander liegenden Brustwandableitungen bzw. von  $\geq 1$  mm in zwei benachbarten Extremitätenableitungen oder eine im Ruhe-EKG neu aufgetretene pathologische Q-Zacke in wenigstens zwei nebeneinander liegenden Ableitungen. Die Q-Zacken wurden als pathologisch eingestuft ab einer Tiefe von 1 mm und einer Dauer von 0,003 Sekunden in den Ableitungen I, II, III, aVL, aVF, V<sub>5</sub>, V<sub>6</sub> bzw. von 0,02 Sekunden in V<sub>4</sub> in zwei aneinander grenzenden Ableitungen oder einer QR-Strecke von  $\geq 0,03$  Sekunden in den Ableitungen V<sub>1</sub>- V<sub>3</sub>. Die pathologischen Q-Zacken galten dann als neu, wenn in dem aktuellsten EKG, das von der Zeit vor Aufnahme in die Studie verfügbar war, diese nicht nachzuweisen waren. Typische EKG-Veränderungen für einen Myokardinfarkt ohne ST-Streckenhebung (nichttransmuralem oder „non-Q-wave“-Infarkt) waren eine neu aufgetretene ST-Streckensenkung von über 1 mm in zwei benachbarten Ableitungen, eine T-Negativierung von über 1 mm in mindestens drei nebeneinander liegenden Ableitungen mit Ausnahme von V<sub>1</sub> und aVR oder ein neu aufgetretener Linksschenkelblock. Als charakteristische Enzymveränderungen wurden definiert ein Anstieg der Creatinkinase (Gesamt-CK) um mindestens den Faktor zwei über den oberen Referenzwert des untersuchenden Labors, ein Anstieg des CK-MB-Anteils über 5 % oder über die 99%-Perzentile einer Referenz-Kontrollgruppe innerhalb der ersten 36 Stunden nach Auftreten der akuten Symptome eines Myokardinfarktes, ein Anstieg des CK-MB-Anteils über das Doppelte des oberen Grenzwertes bzw. über die 99%-Perzentile einer Referenz-Kontrollgruppe oder ein Anstieg von Troponin T bzw. I über den Referenzwert. Sofern sich der Myokardinfarkt längere Zeit vor Aufnahme in die Studie ereignete, wurden für die Diagnose eines Myokardinfarktes ärztliche Dokumente, wie z. B. Entlassungsbriefe aus dem Krankenhaus herangezogen.

**Kürzer und länger als ein Jahr zurückliegender Myokardinfarkt** Die Gruppe der Studienteilnehmer mit Myokardinfarkt wurde zur differenzierten Auswertung in die Subgruppen „Kürzer als ein Jahr zurückliegender Myokardinfarkt“ ( $MI_{t>-1}$ ) und die Subgruppe „Länger als ein Jahr zurückliegender Myokardinfarkt“ ( $MI_{t\leq-1}$ ) unterteilt, wobei  $t = 0$  als Zeitpunkt der Aufnahme in die Studie definiert wurde und  $t = -1$  den Zeitpunkt genau ein Jahr vor Eintritt in die Studie bezeichnet.  $t > -1$  war damit der Zeitabschnitt von 364 Tagen vor dem Aufnah-

metag in die Studie bis zu dem Aufnahmetag.  $t \leq -1$  meinte den Zeitraum, der aus der Vergangenheit bis genau 365 Tage vor Aufnahme in die Studie reichte. Hat sich der erste Myokardinfarkt in einem Zeitraum von unter einem Jahr vor Aufnahme in die Studie ereignet, so wurde der Patient zu der Gruppe  $MI_{t > -1}$  gezählt, lag der Infarkt genau ein Jahr oder länger zurück, so zählte er zu der Gruppe  $MI_{t \leq -1}$ .

**Anzahl der Myokardinfarkte** Die Anzahl der Myokardinfarkte war definiert als  $z$ . Zur Gruppe  $MI_{z=1}$  zählten alle Teilnehmer mit genau einem Myokardinfarkt, zu der Gruppe  $MI_{z \geq 2}$  alle Patienten, bei denen zwei oder mehr Myokardinfarkte diagnostiziert wurden. Die Gruppe „Myokardinfarkt“ (MI) beinhaltete unabhängig von der Anzahl der Myokardinfarkte des einzelnen Patienten, alle Patienten, bei denen mindestens ein Myokardinfarkt diagnostiziert wurde.

**Hypercholesterinämie** Ein Serumgesamtcholesterin von  $\geq 240$  mg/dl oder das Vorliegen einer lipidsenkenden Medikation bedingten die Definition Hypercholesterinämie.

**Rauchen** Als Raucher wurden alle aktuellen und ehemaligen Zigaretten-, Zigarren- und Pfeifenraucher eingestuft.

**Diabetes mellitus** Die Diagnose Diabetes mellitus wurde durch einen Plasmaglukosespiegel von  $\geq 160$  mg/dl nach zumindest achtstündiger Nahrungskarenz oder einen 2-h-Plasmaglukosewert von  $\geq 200$  mg/dl beim oralen Glukose-Toleranztest mit 75 g Glukose definiert oder durch eine bestehende antidiabetische Therapie mit oralen Antidiabetika bzw. Insulin bedingt.

**Übergewicht** Übergewicht wurde definiert als ein Body-Mass-Index (BMI)  $\geq 26$  kg/m<sup>2</sup>.

**Hypertonie** Kriterium für das Vorliegen einer Hypertonie war ein mindestens dreimal unter denselben Bedingungen gemessener systolischer Blutdruck  $\geq 140$  mmHg und/oder ein diastolischer Wert  $\geq 90$  mmHg oder das Bestehen einer antihypertensiven Therapie.

**Hyperfibrinogenämie** Zur Definition der Hyperfibrinogenämie wurde die 95%-Perzentile der Plasmafibrinogenkonzentration von 600 gesunden Blutspendern an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bestimmt und das Vorliegen einer Hyperfibrinogenämie bei Überschreiten dieser Grenze und somit bei einem Wert von mehr als 360 mg/dl festgelegt.

**Nomenklatur des F/Y 2561–Polymorphismus** Ein Polymorphismus ist definiert als eine Variabilität der DNA-Sequenz mit mindestens zwei Allelen, von denen das häufigere mit einer Frequenz  $\leq 99\%$  in der Bevölkerung auftritt (Peake und Winship 1991). Das häufigere Allel wird oft auch als Wildtypallel bezeichnet. In der vorliegenden Studie wurde der Polymorphismus von PhenylAdenin und Tyrosin an Position 2561 des Von-Willebrand-Faktor-Proteins (VWF-Protein) untersucht. Das Vorkommen von PhenylAdenin stellt hierbei die zuerst beschriebene und häufigere Variante dar, Träger des PhenylAdenins werden im Folgenden als Phe-Allel-Träger bezeichnet. Die ihr zugrunde liegende DNA-Sequenz entspricht dem Allel 7932T im Exon 45 des Von-Willebrand-Faktor-Gens auf dem kurzen Arm des Chromosoms 12 (12p13.2) (Mancuso et al. 1989). Tyrosin an Position 2561 des VWF-Proteins entspricht der selteneren Variante, Träger des Tyrosins werden im Folgenden als Tyr-Allel-Träger bezeichnet. Dieser Variante liegt ein Tausch von Thymin zu Adenin in dem Mutantenallel 7932A im Exon 45 des Von-Willebrand-Faktor-Gens zugrunde (Schneppenheim, unveröffentlicht). Dieser Polymorphismus ist in Abschnitt 2.2 auf der nächsten Seite beschrieben. Die Nomenklatur wurde auf F/Y 2561 festgelegt<sup>1</sup> und verwendet den Einbuchstabencode für Aminosäuren, wonach „F“ für PhenylAdenin und „Y“ für Tyrosin steht. Im an anderer Stelle ebenfalls verwendeten Dreibuchstabencode für Aminosäuren entspricht „Phe“ PhenylAdenin und „Tyr“ Tyrosin.

**F/Y 2561–Klassifikation: 7932A positiv und 7932A negativ** Heterozygote Träger des Mutanten-Allels 7932A mit dem Genotyp 7932TA und homozygote Träger des Allels 7932A mit dem Genotyp 7932AA wurden als 7932A positiv eingestuft. Teilnehmer mit dem Wildtypallel 7932T und dem Genotyp 7932TT wurden als 7932A negativ eingestuft.

### 2.1.3 Basischarakteristika des Studienkollektivs

Die 2070 Personen starke Studienpopulation wurde zur Darstellung der Basiswerte in die Gruppen *MI* (Myokardinfarkt), *KHK ohne MI* und *Kontrolle* eingeteilt. Tabelle 2.1 gibt einen Überblick über die Basischarakteristika des Kollektivs. Vergleicht man die Basiswerte der drei Untergruppen untereinander, ergeben sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe *MI* und der Kontrollgruppe sowie zwischen der Gruppe *KHK gesamt* und der Kontrollgruppe. In der Analyse der Daten wurden

<sup>1</sup> Generell werden Polymorphismen, die einzelne Aminosäuren betreffen, in der Form A/G 1234 angegeben; solche, die einzelne Nukleotide betreffen, in der Form 1234A/G (vgl. Goodeve und Peake 2001).



**Tabelle 2.1:** Basischarakteristika des Studienkollektivs

	Kontrolle <i>n</i> = 416		MI <i>n</i> = 789		KHK ohne MI <i>n</i> = 865	
	$\mu^a$	$\sigma^b$	$\mu$	$\sigma$	$\mu$	$\sigma$
Alter (Jahre)	58,14	11,75	61,65	9,53	64,65	9,39
Gewicht (kg)	78,59	14,27	80,48	14,02	80,07	13,96
Größe (cm)	169,88	9,79	170,86	8,43	169,83	8,66
männliches Geschlecht (%)	50,72		80,61		69,13	
Gesamtcholesterin (mg/dl)	215,32	39,50	201,25	42,13	214,09	44,85
systol. Blutdruck (mmHg)	134,52	21,94	137,60	24,16	146,52	22,75
diastol. Blutdruck (mmHg)	79,71	11,55	80,12	11,56	82,79	11,30
Fibrinogen (mg/dl)	359,14	82,05	424,67	119,87	393,91	97,27
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27,17	4,07	27,50	3,99	27,70	4,05
Von-Willebrand-Faktor-Antigen (U/dl)	153,42	62,07	178,69	74,13	170,83	71,31
ultrasensitives CRP (mg/l)	0,52	0,89	1,19	2,33	0,86	1,69
	MI vs. Kontr. P		KHK o. MI vs. Kontr. P		MI vs. KHK o. MI P	
Alter	0,0001		0,0001		0,0001	
Gewicht	0,0102		0,0495		0,4928	
Größe	0,0235		0,8407		0,0074	
Gesamtcholesterin	0,0001		0,3766		0,0001	
systol. Blutdruck	0,0510		0,0001		0,0001	
diastol. Blutdruck	0,5457		0,0001		0,0001	
Fibrinogen	0,0001		0,0001		0,0001	
BMI	0,1015		0,0139		0,2980	
Von-Willebrand-Faktor-Antigen	0,0001		0,0001		0,0343	
ultrasensitives CRP	0,0001		0,0001		0,0001	

<sup>a</sup> arithmetisches Mittel<sup>b</sup> Standardabweichung

in Übereinstimmung mit den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK 1998) Hypercholesterinämie, Rauchen, Hypertonie, Diabetes mellitus, Hyperfibrinogenämie und Übergewicht als klassische Risikofaktoren der KHK angesehen und in einer multivariaten Analyse unter Anwendung einer logistischen Regression miteinbezogen.

Die Prävalenz dieser Faktoren im Studienkollektiv ist in Tabelle 2.2 dargestellt.

## 2.2 Material und Methoden

Die Studienpopulation wurde auf Träger des Allels 7932T und auf heterozygote und homozygote Träger des Allels 7932A im Exon 45 des Von-Willebrand-Faktor-Gens auf dem kurzen Arm des zwölften Chromosoms untersucht. Es handelt sich dabei um

**Tabelle 2.2:** Prävalenz der klassischen Risikofaktoren der KHK im Studienkollektiv

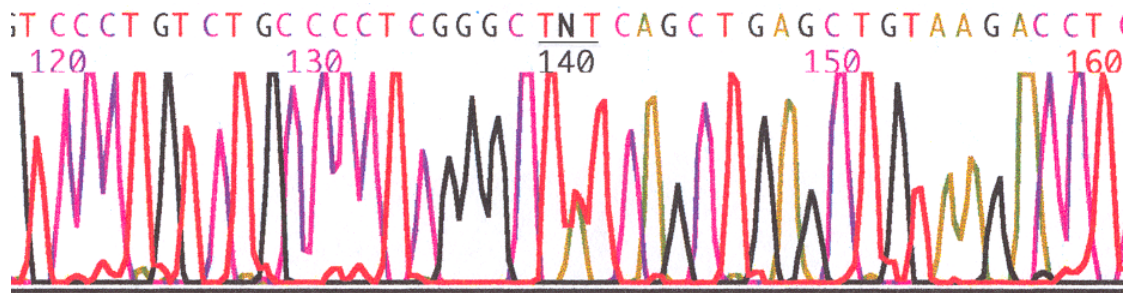
	MI (%)	KHK ohne MI (%)	Kontrolle (%)
Hypercholesterinämie	78,71	65,55	37,74
Rauchen	84,7	59,66	47,35
Hypertonie	69,46	80	60,58
Diabetes mellitus	33,84	33,18	17,55
Hyperfibrinogenämie	64,89	58,61	43,51
Übergewicht	62,1	64,05	57,21

den Single-Nucleotid (SN)-Polymorphismus 7932T/A, bei dem das an Basenposition 7932 stehende Thymin (T) (Mancuso et al. 1989) durch Adenin (A) ersetzt ist (Nomenklatur nach Goodeve und Peake 2001). Dieser Basentausch bedingt einen Aminosäuretausch: Codon 7931–7933 (5'-TTT-3') für die Aminosäure Phenylalanin an Position 2561 des VWF-Proteins (Abbildung 2.1) wird zu 5'-TAT-3' und bedingt damit den Einbau der Aminosäure Tyrosin in das VWF-Protein (Abbildung 2.2). Homozygotie für den F/Y 2561–Polymorphismus zeigt die Abbildung 2.3.

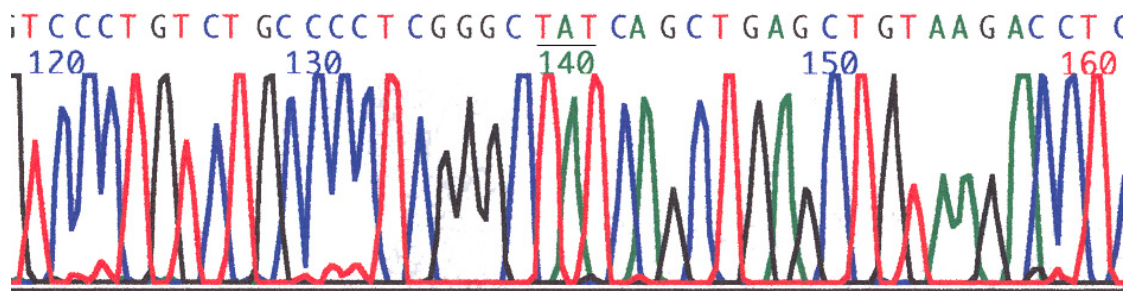
Zur Analyse der Studienpopulation auf das Vorliegen beider Allele des F/Y 2561–Polymorphismus wurde eine Methode angewandt, die es erlaubte, gleichzeitig auch andere Mutationen auf dem untersuchten DNA-Abschnitt zu detektieren. Alle Untersuchungen wurden blind durchgeführt: Es wurde mit fortlaufend (Nr. 1001–2500) nummerierten Probenröhrchen gearbeitet ohne, dass weitere Angaben über die Patientenproben bekannt waren. Analysiert wurden 2500 DNA-Proben, von denen dann durch die in Abschnitt 2.1.1 genannten Ausschlusskriterien 2070 in die Auswertung der vorliegenden Studie einfließen. Im chronologischen Ablauf kamen folgende molekularbiologischen Analysetechniken zur Anwendung:

1. Isolierung der DNA aus mononukleären Zellen (Citrat Vollblut)
2. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) Amplifizierung eines 201 Basenpaar (bp) langen Abschnitts im Exon 45 des Von-Willebrand-Faktor-Gens
3. Dünnschicht-Polyacrylamidgelelektrophorese
4. Silberfärbung des Polyacrylamidgels, Qualitätskontrolle der zuvor erfolgten PCR
5. Mischen der DNA von jeweils zwei Patientenproben in einem Probenröhrchen einer Mikrotiterplatte, Zuführen dieser in ein Heteroduplex-Programm im Thermocycler





**Abbildung 2.2:** Heterozygotie für den Polymorphismus F/Y 2561 (unterstrichenes Codon): Ein Peak für die Base Thymin an Position 7932 erscheint gleichzeitig mit einem Peak der Base Adenin, in 5'-3'-Richtung.



**Abbildung 2.3:** Homozygotie für 7932A: An Position 7932 (unterstrichenes Triplet) ist nur ein Peak für die Base Adenin nachweisbar, in 5'-3'-Richtung.

6. Analyse der Proben in der Denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) mit Hilfe der WAVE-Maker-4.1- und der D-7000-HSM-Software, Kennzeichnung aller Probenpaare, die eine Mutation aufwiesen
7. Erneute PCR mit den Probenpärchen, die nach DHPLC-Analyse auffällig waren: Amplifizierung eines nun 123 bp großen Abschnitts im Exon 45 des Von-Willebrand-Faktor-Gens mit Mismatch-Primern (*Pseudomonas-diminuta* (*Pdm*)I-Primer)
8. Restriktionsenzymverdau der PCR-Produkte mit dem *Pdm*I-Enzym
9. Dünnschicht-Polyacrylamidgelelektrophorese
10. Silberfärbung des Polyacrylamidgels, direktes Ablesen des Genotyps der untersuchten Proben auf dem Polyacrylamidgel
11. PCR der Proben, die in der DHPLC auffällig und nach Analyse durch Restriktionsenzymverdau für den Genotyp 7932A negativ waren: Amplifizierung eines

345 bp langen Abschnitts im Exon 45 des Von-Willebrand-Faktor-Gens für eine Sequenzierung

## 12. Sequenzieren der zuvor amplifizierten Proben

Diese Techniken und Methoden werden im folgenden kurz beschrieben.

### 2.2.1 DNA-Isolierung

Die DNA für die vorliegende Studie wurde bereits isoliert aus dem Pool der LURIC-Studie zur Verfügung gestellt. Die Isolierung erfolgte aus mononukleären Zellen (Citrat Vollblut) unter Verwendung des kommerziellen *QIAmp DNA Blood Mini Kit* der Firma Quiagen. Die Konzentration der DNA betrug 50 µg/ml bei einer Menge von 50 µl Aliquot je Probe.

### 2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) erlaubt es, einen durch den zugefügten Primer klar definierten DNA-Abschnitt in hoher Anzahl zu vervielfältigen. Der Primer entspricht dabei einer festgelegten DNA-Sequenz, die dem Reaktionsgemisch zugefügt wird und die sich der DNA an den ihr komplementären Stellen anlagert. Der Primer stellt einen Startpunkt für die replizierenden Enzyme da und markiert damit den Anfang und das Ende des zu vervielfältigenden Abschnitts der DNA. Die PCR wurde in dieser Studie im Zusammenhang mit drei unterschiedlichen molekularbiologischen Verfahren angewandt: Sie diente der Herstellung einer ausreichenden Menge von DNA für die DHPLC-Analyse, den Restriktionsverdau und die Sequenzierung. Für jede Methode wurde ein leicht modifizierter DNA-Abschnitt des Exons 45 des Von-Willebrand-Faktor-Gens auf dem distalen Abschnitt des zwölften Chromosoms amplifiziert. Definiert wurden diese Abschnitte über drei unterschiedliche Primerpaare.

#### 2.2.2.1 PCR-Primer

**Primer der PCR für die DHPLC-Analyse** Der für die DHPLC-Analyse verwendete DNA-Abschnitt hat eine Länge von 201 Basenpaaren (bp) (Abbildung 2.1 auf Seite 23). Die hierzu verwendeten Primer sind bisher unveröffentlicht: sense-Primer: 5'-GTGTCCGAGTGAAGGAGGAG-3', antisense-Primer: 5'-AGCCAAAAGTGGAAAGAGAGGC-3'. Es erfolgten zunächst mehrere Versuche mit anderen Primern. Die

damit amplifizierten DNA-Abschnitte erwiesen sich jedoch in der DHPLC-Analyse als nicht optimal, da sie entweder durch ihre Länge das Schmelzverhalten ungünstig beeinflussten oder einen anderen, bisher unveröffentlichten Polymorphismus (7740C/A) mit dem Austausch von Cytosin gegen Adenin im Intron Nr. 44 des VWF-Gens beinhalteten (siehe dazu Abschnitt 3.8 auf Seite 79 und Abbildung 3.5 auf Seite 80). Dieser überdeckte in der DHPLC-Analyse den Zielpolymorphismus F/Y2561, so dass ein Abschnitt gewählt werden mußte, der den DNA-Abschnitt mit dem Polymorphismus 7740C/A ausklammerte.

**Primer der PCR für den Restriktionsenzymverdau** Die für den Restriktionsenzymverdau amplifizierte Sequenz der DNA ist mit einer Länge von 123 bp der kürzeste der drei verwendeten DNA-Abschnitte. Es wurde folgendes Primerpaar verwendet: sense-Primer 5'-AGCTGGAGGTCCCTGTCTGCCCCGAAGGCT-3' und antisense-Primer 5'-AAAGGTGGTGCCCGGTCCAG-3'. Der sense-Primer ist ein Mismatch-Primer: Er weist an Basenpaar-Position 24–26 statt der genomischen Sequenz 5'-TGC-3' die Sequenz 5'-GAA'-3' auf und schafft somit die Voraussetzung für das spätere Anlagern des *PdmI*-Enzyms (vgl. Eikenboom et al. 1998).

**PCR für die Sequenzierung** Für die Sequenzierung wurde ein DNA-Abschnitt mit einer Länge von 345 bp amplifiziert. Verwendung fanden der sense-Primer 5-ACCACCTTCCTGAGAGAAGAG-3' und der antisense-Primer 5'-AGCCAAAAGTGGAAGAGAGGC-3'. Da bei der Sequenzierung die Basen, die im oder dicht am Primer liegen, nicht miterfasst werden können, wurde dieser DNA-Abschnitt länger gewählt als die oben beschriebenen DNA-Sequenzen, die beide innerhalb des DNA-Abschnitts für die Sequenzierung liegen.

### 2.2.2.2 PCR-Ansätze

Der Ansatz der PCR erfolgte als 50 µl-Ansatz in 96er Mikrotiterplatten und mit den in Tabelle 2.3 dargelegten Mengenverteilungen. Bei der verwendeten Polymerase handelt es sich um eine *Thermus-aquaticus*-Polymerase, die über *Escherichia coli* exprimiert wird. Verwendet wurde das Produkt der Firma GibcoBRL. Mit Ausnahme der PCR für die DHPLC-Analyse wurde cetus-Puffer verwendet (100 mM Tris, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 500mM KCl, 0,01 % Gelatine ad 100 ml Aqua destillata, HCl zu pH 8,3). Die DHPLC-Analyse verlangte einen Puffer ohne Gelatinezusatz, daher wurde für diesen Ansatz der PCR Buffer II der Firma Perkin Elmer verwendet (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8,3). Zum Ausschluss einer Kontamination wurde die PCR in einem nur für diese

**Tabelle 2.3:** PCR-Ansätze

PCR für	DHPLC- Analyse	Restriktions- enzymverdau	Sequenzierung
	( $\mu$ l)	( $\mu$ l)	( $\mu$ l)
Patienten DNA	1	1	1
Aqua dest.	39	40	40
Puffer	5 <sup>b</sup>	5 <sup>c</sup>	5 <sup>c</sup>
dNTP <sup>a</sup>	1	1	1
MgCl <sub>2</sub>	2,5	1	1
Sn-Primer	1	1	1
Asn-Primer	1	1	1
Taq-Polymerase	0,2	0,2	0,2

<sup>a</sup> Desoxyribonukleotide (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)

<sup>b</sup> Perkin-Elmer-Puffer II

<sup>c</sup> cetus-Puffer

PCR bestimmten Raum angesetzt, pro Mikrotiterplatte wurden zwei Negativkontrollen ohne Patienten-DNA mitgeführt.

### 2.2.2.3 Amplifizierung

Die Amplifizierung erfolgte im Thermocycler und teilte sich in die Schritte Denaturierung, Annealing und Extension auf. Ein vorab programmierter Ablauf legte die während der einzelnen Schritte im Thermocycler herrschenden Temperaturen fest. Während der Denaturierung bedingte eine hohe Temperatur die Auftrennung des DNA-Doppelstranges in die beiden Einzelstränge. Während der Annealingzeit sank die Temperatur wieder und gab den Primern die Möglichkeit, sich an die einzelnen DNA-Stränge anzulagern. Die optimale Annealingtemperatur ( $T_m$ , gemessen in °C) ist unter anderem abhängig von der Länge des gewählten Primers und dem Anteil an Guanin- und Cytosin-Basen in der Sequenz, da diese eine besonders hohe Annealingtemperatur verlangen. Die effizienteste Annealingtemperatur für die hier verwendeten Primer wurde zunächst näherungsweise nach der Formel  $T_m = 2 \times (n_A + n_T) + 4 \times (n_G + n_C)$  berechnet, wobei  $n_i$  mit  $i = A, C, G, T$  die absolute Häufigkeit der jeweiligen Base im Primer ist. Die errechnete Temperatur wurde dann experimentell optimiert, indem die Primer bei verschiedenen Annealingtemperaturen verwendet wurden und mit Hilfe der PAGE dann der quantitativ erfolgreichste Versuch bestimmt wurde. In der Extensionszeit wurde die Taq-Polymerase aktiv: Es handelt sich dabei um ein hitzestabiles

**Tabelle 2.4:** PCR-Programme im Thermocycler

PCR für	DHPLC-Analyse		Restriktionsenzymverdau		Sequenzierung	
	35		40		40	
Anzahl Zyklen	Temp. (°C)	Zeit (sec)	Temp. (°C)	Zeit (sec)	Temp. (°C)	Zeit (sec)
Denaturierung	95	30 <sup>a</sup>	95	30 <sup>a</sup>	94	40 <sup>a</sup>
Annealing	60	30	66	30	64,7	30
Extension	72	45 <sup>b</sup>	72	20 <sup>b</sup>	72	60 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Die Denaturierung im erste Zyklus dauert 300 sec länger.

<sup>b</sup> Die Extension im letzten Zyklus dauert 300 sec länger.

Polypeptid mit einem Molekulargewicht von ca. 94 kDa, das trotz der hohen Temperaturen in der Denaturierungsphase noch intakt ist. Die Taq-Polymerase besitzt als Prokaryonten-Enzym sowohl eine 5' → 3'-Polymerase-Aktivität, als auch eine 5' → 3'-Exonuklease-Aktivität. Nach Anlagerung des Enzyms an das 3'-OH-Ende der Primer erfolgte mit Hilfe der dem PCR-Ansatz als Cofaktoren beigefügten Desoxytrinukleotide (dNTPs) und des Mg<sup>2+</sup> die Neusynthese der DNA am Einzelstrang. Die Einbaurate der Taq-Polymerase liegt bei ca. 150 Nukleotiden pro Sekunde und Enzymmolekül bei einem Temperaturoptimum von 72–80 °C . Während der Amplifizierung wächst die Anzahl der neu synthetisierten doppelsträngigen DNA-Moleküle exponentiell: Sie verdoppelt sich jeweils während eines Zyklus (Müller 2001). Die Amplifizierung der PCR erfolgte in einem auf 95 °C vorgeheizten Thermocycler gemäß dem Programm in Tabelle 2.4.

Nach Abschluss des letzten Zyklus erfolgte eine Abkühlung auf 4 °C bis zur Entnahme der Proben aus dem Thermocycler.

### 2.2.3 Dünnschicht-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Nach der PCR und dem Restriktionsenzymverdau wurden die DNA-Produkte durch eine Dünnschicht-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach ihrer Größe aufgetrennt und schließlich durch eine Silberfärbung sichtbar und in ihrer Qualität beurteilbar gemacht. Es wurde ein 6%iges Polyacrylamidgel benutzt, dessen Grundsubstanz zunächst frisch nach einem festgelegten Lösungsansatz (siehe AnhangA.1.2) gemischt wurde und dann auf Trägerfolien zur Polymerisation gebracht wurde. Hierzu wurde jeweils eine Trägerfolie mit einer hydrophoben und einer hydrophilen Seite verwen-



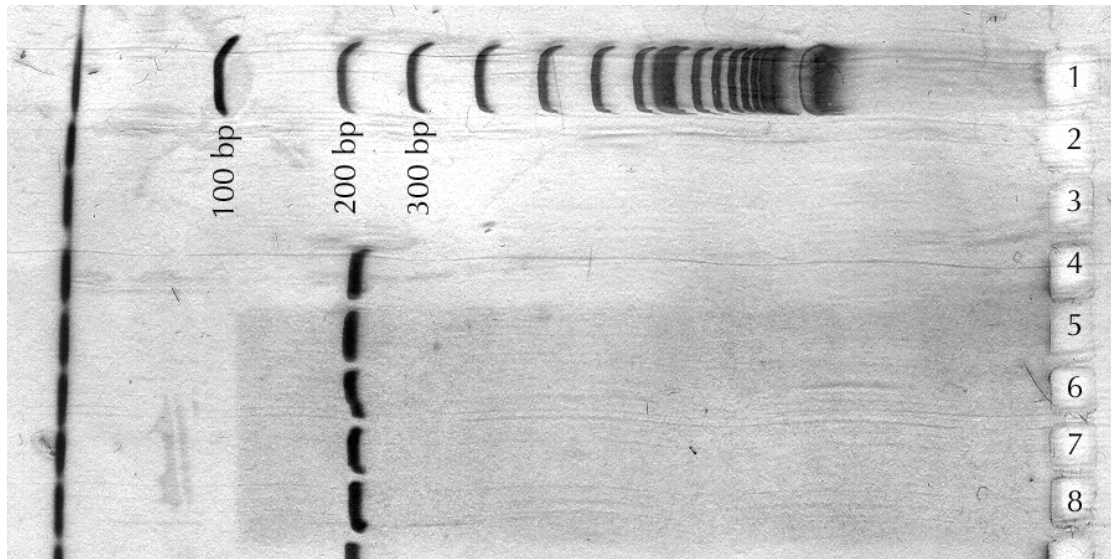
**Tabelle 2.5:** Silberfärbung des Polyacrylamidgels

Vorgang	Dauer	Schüttelwasserbad
1. Fixation	5 min	10%iges Ethanol
2. Oxidation	3 min	65%ige Salpetersäure (HNO <sub>3</sub> ) (15,4 ml auf 1 l Aqua destillata)
3. Spülung	30 sec	Aqua destillata
4. Inkubation	40 min	Silbernitrat (AgNO <sub>3</sub> ) (2,4 g auf 1 l Aqua destillat)
5. Spülung	2 × 30 sec	Aqua destillata
6. Reduktion	10–15 min	Reduktionslösung (30 g Natriumcarbonat (NaHCO <sub>3</sub> ) und 540 µl 37%iges Formalin auf 1 l Aqua destillata)
7. Stoppen der Reaktion	5 min	10%ige Essigsäure
8. Spülung	3 min	Aqua destillata

det. Nach Benetzung der hydrophoben Seite mit Wasser wurde die Folie auf eine Glasplatte aufgewalzt und an den Rändern mit 1,5 cm breiten Plastikspacern bedeckt. Darüber wurde eine zweite Glasplatte mit festen Klammern fixiert. Kantennah aufgeklebte Quadrate aus Klebestreifen mit einer Größe von ca. 3 mm<sup>2</sup> führten zu Vertiefungen im Gel, die später zum Auftragen der Proben dienten. Das gut gemischte Polyacrylamidgel wurde dann mit einer elektrischen 10 ml-Pipette zwischen die Platten gegossen. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Gel auf der Trägerfolie von den Platten gelöst und in eine auf 8 °C gekühlte Elektrophoresekammer gelegt. Die quadratischen Vertiefungen lagen dabei immer kathodennah. Als Elektroden dienten auf das Gel applizierte Filterpapierstreifen, die in Tris-Borat-Pufferlösung (Ansatz siehe Anhang A.1.2) getränkt wurden. In die Vertiefungen wurden nun je 1,5 µl des PCR-Produktes aufgetragen, sowie ein 100 bp-Marker zur Kontrolle. Die Elektrophorese erfolgte bei 100–600 Volt und einer konstanten Leistung von 14 Watt für 20–30 Minuten.

### 2.2.3.1 Silberfärbung

Zur Darstellung der DNA-Banden wurde das Polyacrylamidgel durch eine Silberfärbung behandelt. Die Silberfärbung erfolgte im Schüttelwasserbad nach dem Protokoll in Tabelle 2.5. Nach der Färbung wurden die Gele getrocknet und unter Klarsichtfolie versiegelt.

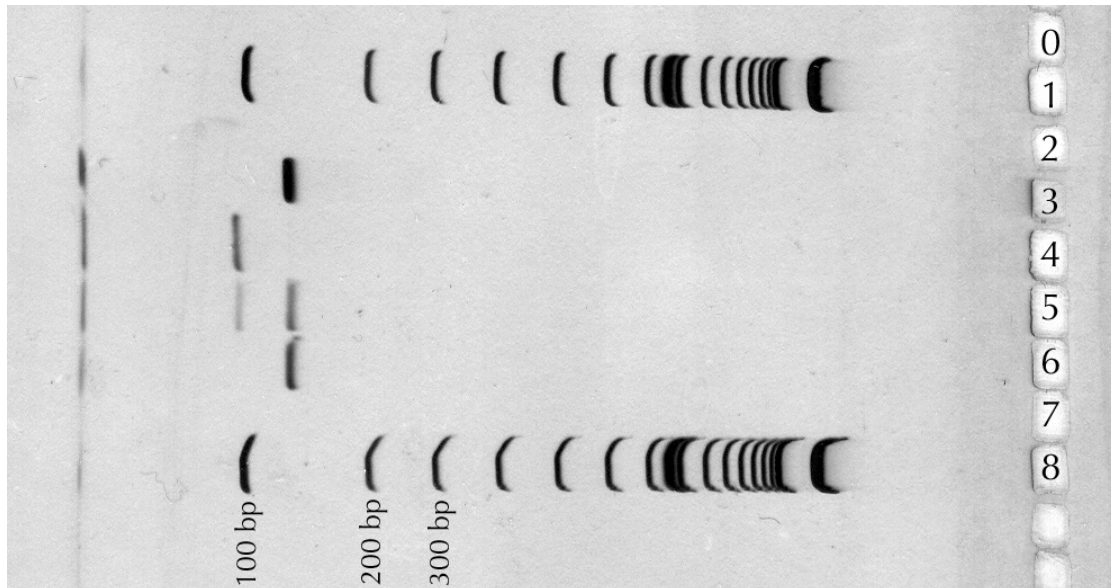


**Abbildung 2.4:** PAGE der PCR für die DHPLC-Analyse: Zwischen heterozygoten Proben mit dem Mutantenallel (4–5) und Wildtyp-Proben (6–8) ist keine Unterscheidung möglich. Produktlänge: 201 bp, 100 bp-Maker (1), Negativkontrollen (2–3)

### 2.2.3.2 Auswertung der PAGE

**PCR für die DHPLC-Analyse** Die Gele mit den PCR-Produkten für die DHPLC-Analyse wurden im Hinblick auf die Quantität der Produkte ausgewertet, die anhand der Stärke der Banden nach der PAGE auf dem Polyacrylamidgel beurteilt werden konnte. Zu schwach oder gar nicht amplifizierte Proben wurden aussortiert und ein zweites Mal amplifiziert. Die Produkte zeigten unabhängig vom Vorliegen des Wildtyp- oder Mutantenallels des Polymorphismus F/Y 2561 identische Laufeigenschaften, so dass eine genotypische Unterscheidung hier nicht möglich war (siehe Abbildung 2.4).

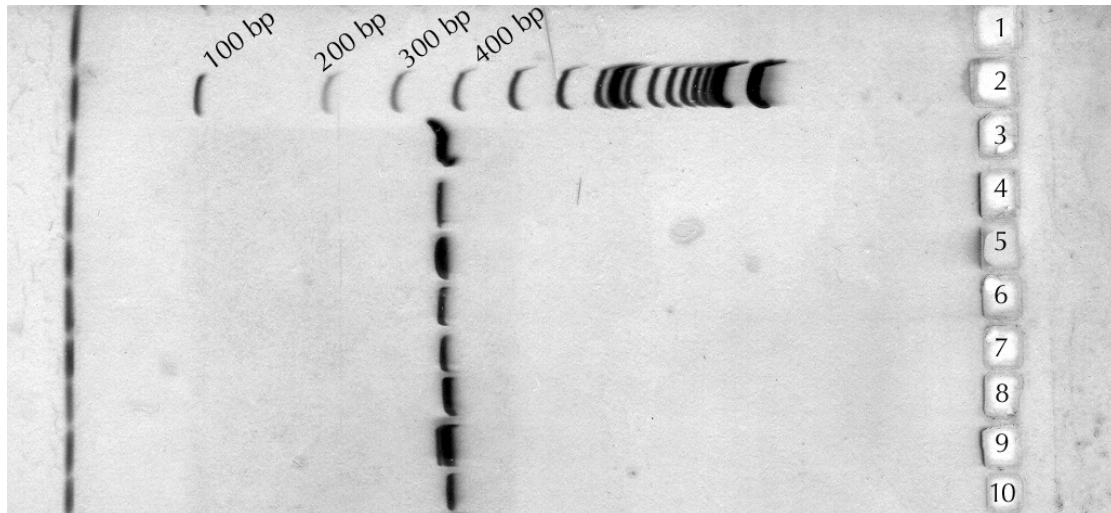
**Restriktionsenzymverdau** Die Gele mit den Produkten des *PdmI*-Restriktionsenzymverdau (siehe Abschnitt 2.2.5 auf Seite 40) wurden im Hinblick auf das Vorliegen des Mutanten- oder Wildtypalles des Polymorphismus F/Y 2561 untersucht. Der Verdau des Wildtyp-Produktes (123 bp) ergab zwei DNA-Fragmente mit einer Größe von 28 bp und 95 bp. In der PAGE wurde nur die 95 bp-Bande sichtbar. Der Verdau einer für die Mutation heterozygoten Probe führte zu zwei Banden auf dem Polyacrylamidgel: eine unverdaute, 123 bp große Bande des Mutantenallels (7932A) und eine 95 bp große Bande des Wildtypallels (7932T).



**Abbildung 2.5:** PAGE nach dem Enzymverdau. Wildtyp-Proben (4) wurden zu zwei Fragmenten verdaut, sichtbar ist das 95 bp-Fragment. Für die Mutation  $T^{7932} \rightarrow A$  heterozygote Proben (5) blieben zur Hälfte unverdaut (123 bp-Bande, Mutantenallel), die andere Hälfte (Wildtypallel) liegt verdaut als 95 bp-Fragment vor. Die homozygote Probe (6) blieb unverdaut (123 bp-Bande). In 3 ist eine Probe ohne erfolgten Enzymverdau (123 bp) aufgetragen.

Folglich führte ein für die Mutation homozygoter Genotyp zu einer einzigen 123 bp Bande (siehe Abbildung 2.5).

**PCR für die Sequenzierung** Die Gele mit den PCR-Produkten für die Sequenzierung wurden im Hinblick auf die Quantität der Produkte ausgewertet. Zu schwach oder gar nicht amplifizierte Proben wurden aussortiert und ein zweites Mal amplifiziert. Wie bei der Auswertung der PCR für die DHPLC-Analyse ließ sich auch hier durch die PAGE keine sichere Unterscheidung zwischen Mutanten- oder Wildtypallel des Polymorphismus F/Y2561 machen. Es zeigten sich jedoch Auffälligkeiten bei zwei Proben, bei denen eine andere Mutation festgestellt werden konnte. Hierbei handelt es sich zum einen um die stumme Mutation  $C^{7930} \rightarrow T$  ohne konsekutiven Aminosäureaustausch und die Mutation  $C^{7913} \rightarrow G$ , die einen Aminosäureaustausch von Prolin zu Adenin an Stelle 2555 des Von-Willebrand-Faktor-Proteins zur Folge hat (Abbildung 2.6), siehe hierzu auch Abschnitt 2.2.4.5 auf Seite 37 und 2.2.6.4 auf Seite 45.



**Abbildung 2.6:** PAGE der PCR für die Sequenzierungsreaktion, Wildtyp (3–7, 9 und 10) und heterozygote Probe für F/Y 2561 (8) sind nicht zu unterscheiden. Auffälligkeiten sind bei den Mutationen  $C^{7913} \rightarrow G$  (5) und  $C^{7930} \rightarrow T$  (9) zu erkennen. Produktlänge: 345 bp, 100 bp-Maker (2), Negativkontrolle (1)

## 2.2.4 DHPLC

Die Denaturing-High-Performance-Liquid-Chromatography (DHPLC) ist eine denaturierende *ion-pair reversed-phase*- Flüssigkeitschromatographie, die es erlaubt, mit hoher Sensitivität DNA-Mutationen in PCR-Produkten durch den Vergleich zu Wildtypsequenzen zu detektieren. Als halbautomatisches Verfahren eignet sie sich besonders zur Analyse einer großen Probenzahl.

### 2.2.4.1 Mischen der Proben

Um zu gewährleisten, dass auch homozygot vorliegende Mutationen als solche erkannt werden, verlangte das Verfahren nach erfolgreichem Abschluss der in Abschnitt 2.2.2.1 auf Seite 25 beschriebenen PCR das Mischen von jeweils zwei PCR-Produkten unterschiedlicher Individuen. Es wurden dazu 13  $\mu$ l jeder Probe verwendet und in einer neuen Mikrotiterplatte mit der Pipette mehrmals vermischt. Um verfälschte Messergebnisse durch unterschiedliche Qualitäten der verschiedenen PCR-Ansätze auszuschließen, wurden nur Proben eines PCR-Ansatzes untereinander gemischt. Zusätzlich wurden alle PCR-Produkte vor dem Mischen anhand einer PAGE begutachtet (siehe dazu Abschnitt 2.2.3.2 auf Seite 30). Ausgefallene sowie nur schwach amplifizierte Proben wurden gekennzeichnet und ein zweites Mal der PCR

zugeführt. Auf diese Weise konnte verhindert werden, dass beim Mischen zwei Proben mit stark abweichenden DNA-Konzentrationen vermenget wurden.

#### 2.2.4.2 Heteroduplex-Programm

Die gemischten Proben wurden vor der DHPLC-Analyse einem 30-minütigen Heteroduplex-Programm im Thermocycler zugeführt, das nach einer 95 °C -Denaturierung von fünf Minuten eine schrittweise Abkühlung von 1 °C pro Minute auf 25 °C vollzog. Dieses Programm führte in allen Probenröhrchen, in denen mindestens ein Mutantenallel für die Mutation T<sup>7932</sup>→A des Polymorphismus F/Y 2561 vorlag, zur Bildung von sogenannten Heteroduplices: Hierbei handelt es sich um Zusammenlagerungen von DNA-Einzelsträngen zweier unterschiedlicher Allele zu einem Doppelstrang (vgl. Kuklin et al. 1998). Bei gleichzeitiger Anwesenheit des Mutanten- als auch des Wildtypallels in einem Probenröhrchen kam es zur Bildung einer Heteroduplex, die nur auf einem Strang die Mutation trug und an dieser Stelle nicht komplementäre Basen aufwies. Gleichzeitig entstanden in demselben Röhrchen auch mutante Homoduplices, die einen Doppelstrang vorwiesen, der die Mutation und die dazu komplementäre Base trug sowie Wildtyp-Homoduplices, die auf beiden Strängen die Wildtypsequenz aufwiesen. Es zeigte sich, dass die Anwesenheit einer für die Mutation heterozygoten Probe neben einer Wildtyp-Probe in einem Probenröhrchen ausreichend war, um eine eindeutig nachweisbare Heteroduplex zu bilden. In allen Probenröhrchen, in denen kein Mutantenallel vorlag, bildeten sich während des Heteroduplex-Programms ausschließlich Wildtyp-Homoduplices.

#### 2.2.4.3 Optimierung der DHPLC-Analyse für den Polymorphismus F/Y 2561

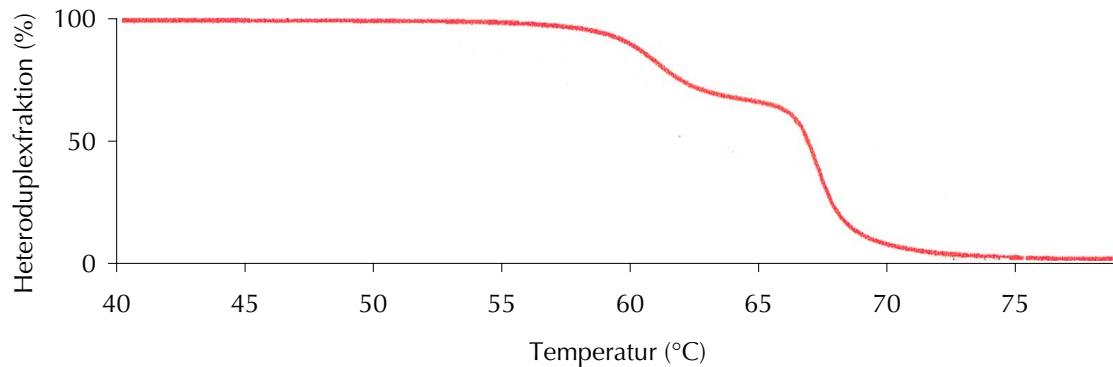
Der Nachweis der Mutation in der DHPLC beruht auf den veränderten Schmelzeigenschaften einer Heteroduplex. Die Heteroduplex schmilzt aufgrund ihrer Instabilität am Punkt der Mutation unter Erwärmung bei niedrigeren Temperaturen als die Homoduplex (vgl. Kuklin et al. 1998). Zur Detektion des Polymorphismus F/Y 2561 wurde auf die in Oefner und Underhill (1998) entwickelte Methode auf dem *WAVE DNA Fragment Analysis System* der Firma Transgenomic Inc., San Jose, USA, aufgebaut. Die stationäre Phase bildete die Säule *DNA Sep Cartridge* der Firma Transgenomic. Die Hauptkomponente der Säule waren alkylierte Polystyren-Divinylbenzol-Partikel ohne Poren. Die flüssige Phase bildeten hydro-organische Pufferlösungen mit Acetonitril und amphiphilen Triethylammonium-Ionen. Diese wurden an der Grenzschicht zwischen unpolarer stationärer und polarer mobiler Phase adsorbiert, so dass sich ei-

ne positiv geladene Oberfläche bildete. Gleichzeitig nahmen die Triethylammonium-Ionen eine Brückenfunktion zwischen dieser Grenzfläche und den negativ geladenen dissoziierten Phosphodiestergruppen des Zucker-Phosphat-Skeletts der DNA ein. Die auf diese Weise erfolgte Bindung der DNA an die stationäre Phase wurde durch Acetonitril gelöst und in der Folge die DNA von der Säule gewaschen. Das Auswaschen erfolgte bei einer in Heteroduplex-Form vorliegenden DNA schneller als bei einer in der Homoduplex-Form vorliegenden DNA. Gründe hierfür sind vermutlich vor allem ein verändertes Löslichkeitspotential der im Gegensatz zur stabileren Homoduplex unter der gewählten Temperatur bereits teils einzelsträngig vorliegenden und somit weniger hydrophilen DNA der Heteroduplex (Xiao und Oefner 2001). Mittels UV-Intensitätsmessung bei 260 nm konnte der zeitliche Unterschied des Auswaschens von Heteroduplex und Homoduplex gemessen und graphisch dargestellt werden.

Dabei mussten folgende Parameter optimiert werden:

**Länge der zu untersuchenden Sequenz** Die Länge des zu untersuchenden Abschnitts, der Anteil der Basen Guanin und Cytosin an diesem und die Lage des Polymorphismus innerhalb des Abschnitts beeinflussen die Schmelzeigenschaften der DNA-Sequenz in der DHPLC. In der Optimierung wurde daher mit fünf verschiedenen Primer-Paaren experimentiert. Es zeigte sich dabei, dass in der Nähe des untersuchten Zielpolymorphismus der bisher unveröffentlichte Polymorphismus 7740C/A mit dem Austausch von Cytosin gegen Adenin an Position 7740 im Intron Nr. 44 des Von-Willebrand-Faktor-Gens liegt. Dieser überdeckte in der Analyse den Zielpolymorphismus, so dass dieser Polymorphismus durch das zur Analyse ausgewählte Primer-Paar ausklammert werden musste.

**Temperatur der DHPLC** Ziel der Optimierung war es, eine DHPLC-Temperatur zu finden, bei der ein Teil der Heteroduplex bereits denaturiert vorliegt und infolge des dadurch veränderten Löslichkeitspotentials aus der Säule ausgewaschen wird, während das noch intakte Vorliegen der Homoduplex eine messbare Retention dieser in der Säule zur Folge hat. Mit jedem der fünf in der Optimierung verwendeten Primer-Paare wurde eine PCR durchgeführt und in der DHPLC in neun Temperaturschritten der Raum zwischen 50 °C, wo Heteroduplex und Homoduplex noch beide im Doppelstrang vorliegen und 69 °C, wo von der Denaturierung von Heteroduplex als auch Homoduplex auszugehen ist, abgedeckt. Anhand der von der Software *WAVEMaker 4.1* der Firma Transgenomic für die einzelnen DNA-Abschnitte berechneten Schmelzkurven wurde ein sensibler Temperaturbereich bestimmt, innerhalb dessen in Schritten von 1 °C getestet wurde. Die



**Abbildung 2.7:** Schmelzkurve des bei der DHPLC-Analyse verwendeten DNA-Abschnitts, optimale Trennung bei 66 °C

Schmelzkurve für das schließlich verwendete Primerpaar ist in Abbildung 2.7 dargestellt. Die Sequenz des verwendeten DNA-Abschnitts zeigt Abbildung 2.1. Eine optimale Trennung wurde bei einer Temperatur von 66 °C erreicht. Um die Ergebnisse verifizieren und unbekannte Mutationen ausschließen zu können, wurden die zur Optimierung verwendeten Proben zuvor sequenziert.

**Puffergradient und Länge der Messung** Das Maß der Retention konnte neben der Temperatur auch über den Acetonitril-Gehalt der Puffer der mobilen Phase gesteuert werden. Verwendet wurden Puffer A (0,1 M Triethylammonium-Acetat (TEAA)) und Puffer B (0,1 M TEAA, 25%iges Acetonitril). Die Lösungsansätze beider Puffer sind im Anhang A.1.4 beschrieben. Das Auswaschen der DNA von der Säule wurde über das Acetonitril erreicht. Die Heteroduplex löste sich aufgrund der oben geschilderten Instabilitäten in ihrem Aufbau schon bei geringeren Acetonitrilkonzentrationen in der flüssigen Phase. Um ein zeitlich getrenntes Auswaschen der Hetero- und Homoduplexes zu ermöglichen, wurde eine im Verlauf der Analyse stetig steigende Konzentration an Acetonitril und damit an Puffer B gewählt. In der Optimierung wurde ein Gradient mit einer Dauer von 19 Minuten verwendet, dieser wurde für die endgültige Analyse auf 9 Minuten gekürzt. Hierzu wurde die Pufferkonzentration des Puffers B zu Beginn der Analyse auf einen Wert angehoben, der kurz vor dem Auswaschen der Heteroduplex erreicht wurde. Nach Auswaschen der Homoduplex wurde der Gradient zudem gestoppt und das Waschen der Säule eingeleitet. Auf diese Weise ergab sich der in Tabelle 2.6 dargestellte Gradient mit einer Zunahme der Konzentration von Puffer B von 2,3 % pro Minute. Die Flow-Rate betrug 0,9 ml/min.

**Tabelle 2.6:** Puffergradient in der DHPLC-Analyse

	Zeit (min)	Anteil Puffer A (%)	Anteil Puffer B (%)
Laden	0,0	59	41
Start Gradient	0,5	54	46
Stop Gradient	6,5	44	56
Start Clean	6,6	0	100
Stop Clean	7,1	0	100
Start Equilibrate	7,2	59	41
Stop Equilibrate	8,1	59	41

#### 2.2.4.4 Detektion von Wildtp- und Mutantenallel des Polymorphismus F/Y 2561

Anhand der DHPLC-Analyse ist es möglich, Heteroduplices von Homoduplices zu unterscheiden, nicht jedoch Mutante- von Wildtyp-Homoduplices voneinander abzugrenzen (siehe oben): Wie in Abbildung 2.8 zu erkennen, führte die Analyse einer Wildtyp-Probe (schwarze Kurve) zu einem einzigen Peak nach 4,5 min. Auf dem gleichen Bild findet sich die Analyse einer heterozygoten Probe (rote Kurve) mit zwei Peaks: Nach ca. 3,6 min verursachte das Auswaschen der Heteroduplex aus gemischten Wildtyp- und Mutantenallelen der Probe den ersten Peak, darauf folgte das gemeinsame Auswaschen der Homoduplices aus reinen Mutantenallelen oder reinen Wildtypallelen mit einem zweiten Peak bei ca. 4,6 min. Heterozygote und Wildtyp-Probe waren demnach deutlich zu unterscheiden. Abbildung 2.9 zeigt, dass eine mutante Homoduplex nicht eindeutig von einer Wildtyp-Homoduplex zu unterscheiden war. Um die homozygoten Proben dennoch detektieren zu können, wurden - wie bereits in Abschnitt 2.2.4.1 erwähnt - jeweils zwei Proben gemischt und gleichzeitig in der DHPLC analysiert. Injiziert wurden 18 µl des Probengemischs. In einem Probenröhrchen, in dem eine Probe mit heterozygot vorliegender Mutation und ein Wildtyp gemischt wurden, lagen somit Mutanten- und Wildtypallele im Verhältnis von 1:3 vor. Dies reichte bereits aus, um einen deutlichen Heteroduplex-Peak zu erzeugen, wie in Abbildung 2.10 erkennbar ist. Die blaue Kurve markiert eine Probe mit Wildtyp, die schwarze Kurve ein Gemisch aus einer heterozygoten Probe und einem Wildtypen. Letztere zeigt einen nahezu identischen Kurvenverlauf wie eine ungemischte heterozygote Probe, hier die rote Kurve.

In dem untersuchten Kollektiv wurden nach der Hardy-Weinberg-Gleichung (vgl. Hirsch-Kauffmann und Schweiger 1987, S. 215) fünf homozygote Proben erwartet. Bei



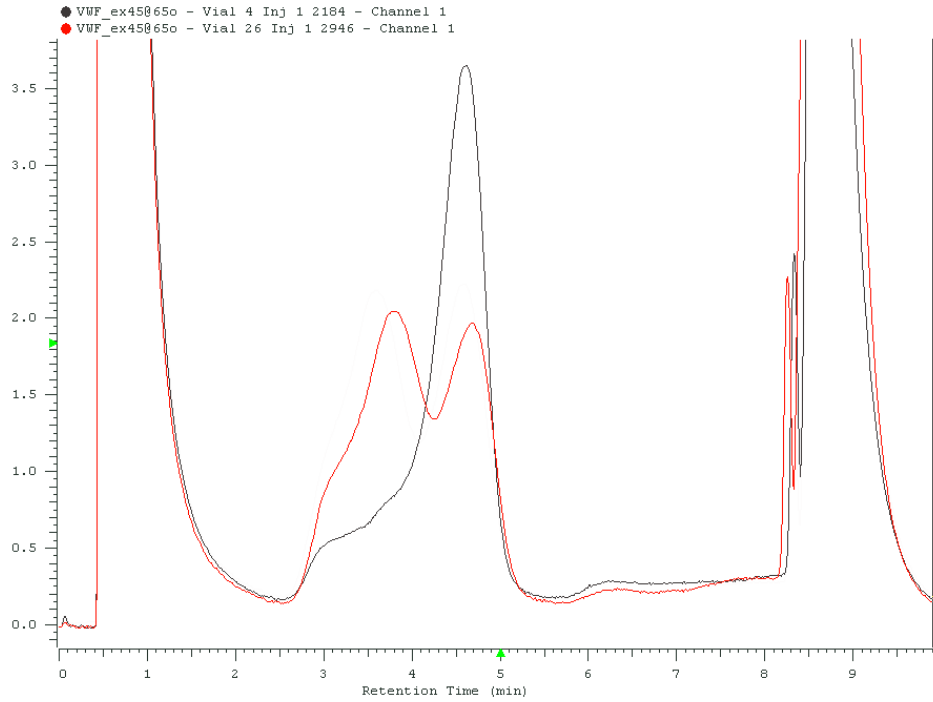
dieser Anzahl war davon auszugehen, dass beim Mischen der Proben immer eine homozygote Probe auf mindestens ein Wildtypallel traf, so dass sich eine Heteroduplex bilden und detektiert werden konnte. In Abbildung 2.11 ist zu erkennen, dass der Kurvenverlauf des Probengemischs aus einer Probe mit einem Wildtyp und einer für die Mutation homozygoten Probe (blaue Kurve) dem einer heterozygoten Probe (schwarze Kurve) gleichkam, während die homozygote Probe alleine (rote Kurve) in der Analyse dem Wildtyp (grüne Kurve) glich. Durch das Mischen von zwei PCR-Produkten unterschiedlicher Individuen für die Analyse wurde somit verhindert, dass für die Mutation homozygote Proben durch den ähnlichen Kurvenverlauf mit einer Probe des Wildtyps der Detektion entgingen. Im weiteren Verfahren wurden alle Probenpärchen, die eine Heteroduplex gezeigt hatten, dem Restriktionsenzymverdau zugeführt, anhand dessen entschieden werden konnte, welche der beiden Proben des Röhrchengemischs Träger des Mutantenallels war und ob dieses heterozygot oder homozygot vorlag.

Um eine gleich bleibende Qualität der Analyse zu gewährleisten, wurden vor jeder neuen Mikrotiterplatte mit 89 Proben folgende sieben Messungen in der angegebenen Reihenfolge erhoben: ein Mutationsstandardprogramm bei 56 °C , ein Mutationsstandardprogramm bei 65 °C , eine Spülung mit B-Puffer unter dem für die Analyse verwendeten Gradienten, die Messung von zwei verschiedenen, bekannt heterozygoten Proben, eine bekannte Wildtyp-Probe sowie eine aus Wildtyp und Heterozygot gemischte Probe. Auf diese Weise konnten die aktuelle Trennleistung der Säule und die Qualität des Puffers eingeschätzt werden und es war möglich, auf Qualitätsminderungen sofort zu reagieren.

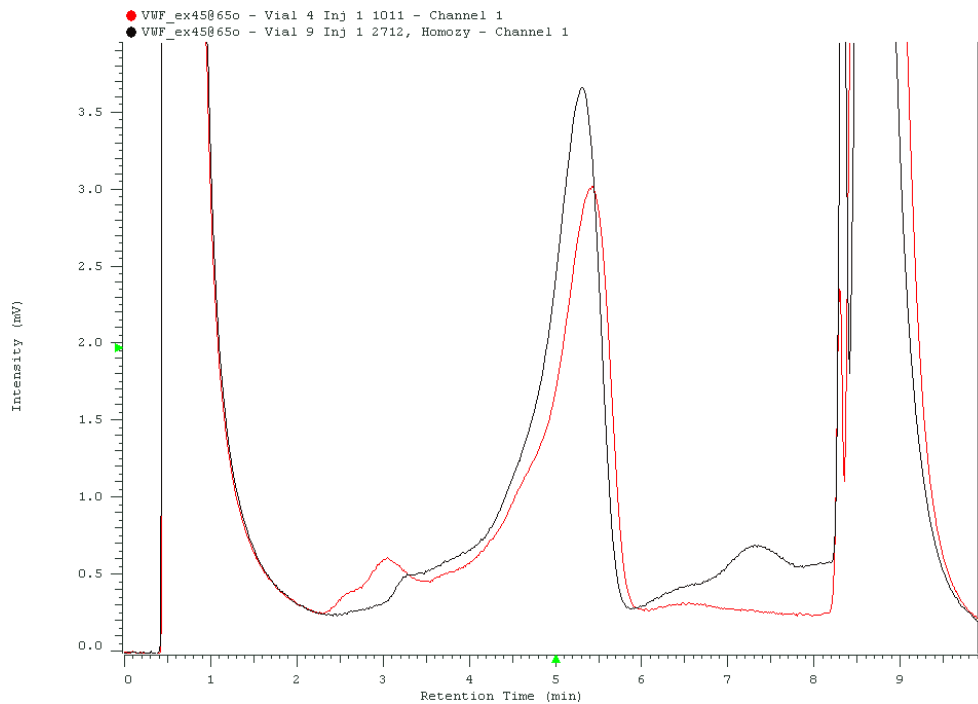
### 2.2.4.5 Detektion neuer Mutationen

Während der Analyse auf den Zielpolymorphismus konnten zwei bisher unveröffentlichte Mutationen detektiert werden. Diese im Abschnitt 2.2.6.4 auf Seite 45 näher beschriebenen Mutationen fielen in der DHPLC-Analyse durch eine Heteroduplex-Bildung auf, die sich von der Heteroduplex des gesuchten Polymorphismus unterschied. Der anschließende Restriktionsenzym-Verdau verlief negativ für die Mutation  $T^{7932} \rightarrow A$  des Polymorphismus F/Y 2561, so dass das Vorliegen einer anderen Mutation vermutet werden musste. Bei der Mutation  $C^{7930} \rightarrow T$  handelt sich um eine stumme Mutation, die keinen konsekutiven Aminosäureaustausch bedingt. In Abbildung 2.12 ist die entsprechende Probe blau gekennzeichnet; sie zeigt einen leicht abweichenden Verlauf von der in der Abbildung rot gekennzeichneten Probe, die den Zielpolymorphismus trägt. Die schwarze Kurve repräsentiert einen Wildtyp für beide Mutationen.

## 2 Patienten, Material und Methoden

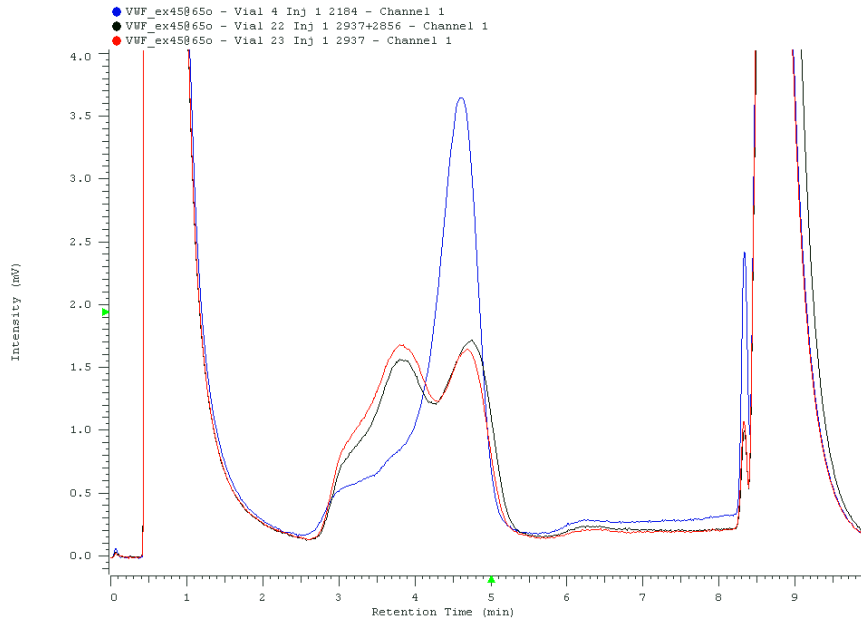


**Abbildung 2.8:** Wildtyp (schwarze Kurve) und heterozygote Probe für den Polymorphismus F/Y 2561 sind in der DHPLC-Analyse eindeutig zu unterscheiden.

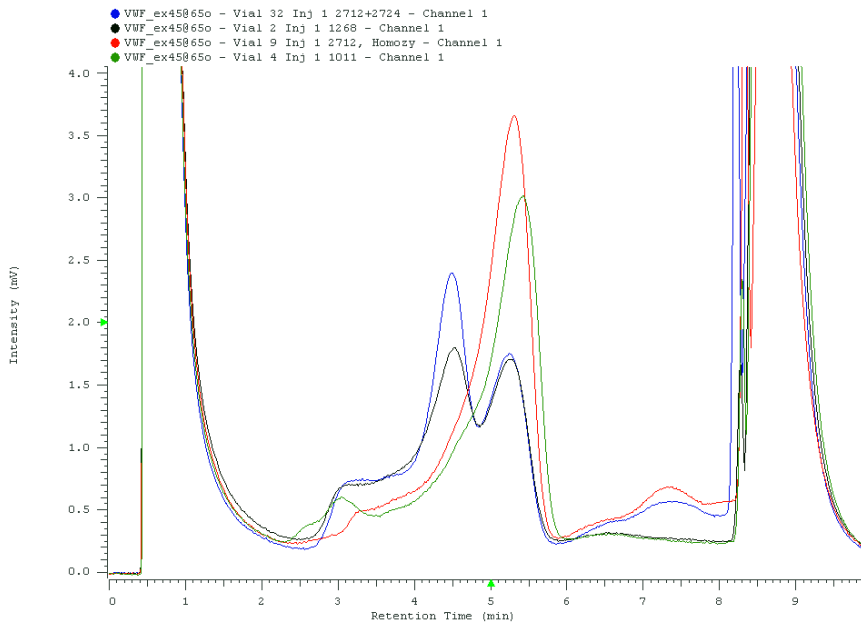


**Abbildung 2.9:** Wildtyp (rot) und homozygote Probe (schwarz) für den Polymorphismus F/Y 2561 sind in der DHPLC-Analyse nicht eindeutig zu unterscheiden.

## 2 Patienten, Material und Methoden

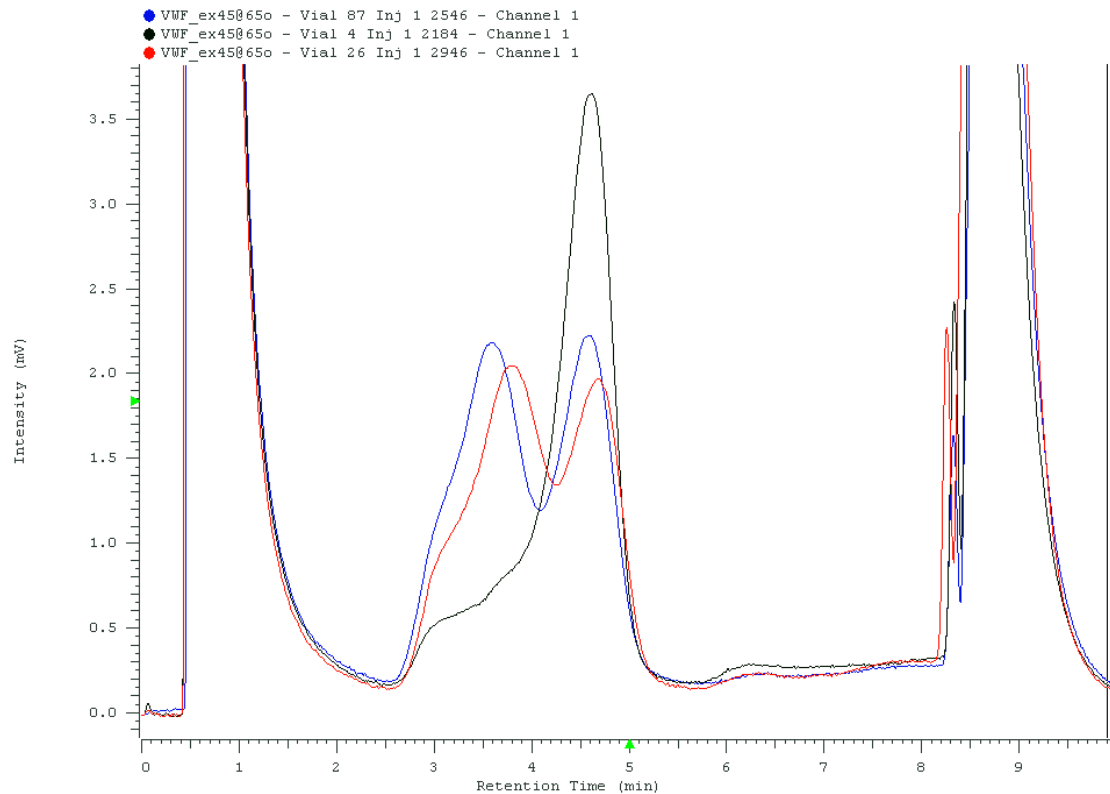


**Abbildung 2.10:** Das Probengemisch aus einem Wildtyp und einer heterozygoten Probe (schwarz) zeigt einen nahezu identischen Kurvenverlauf mit einer heterozygoten Probe (rot), beide sind eindeutig vom Wildtyp (blau) zu unterscheiden.



**Abbildung 2.11:** Allein ist die mutante Homoduplex für den Polymorphismus F/Y 2561 (rot) nicht sicher von der Wildtyp-Homoduplex (grün) zu unterscheiden. Ein Probengemisch aus einem Wildtyp und einer homozygoten Probe (blau) zeigt den Kurvenverlauf, wie ihn auch eine heterozygote Probe (schwarz) erzeugt.

## 2 Patienten, Material und Methoden



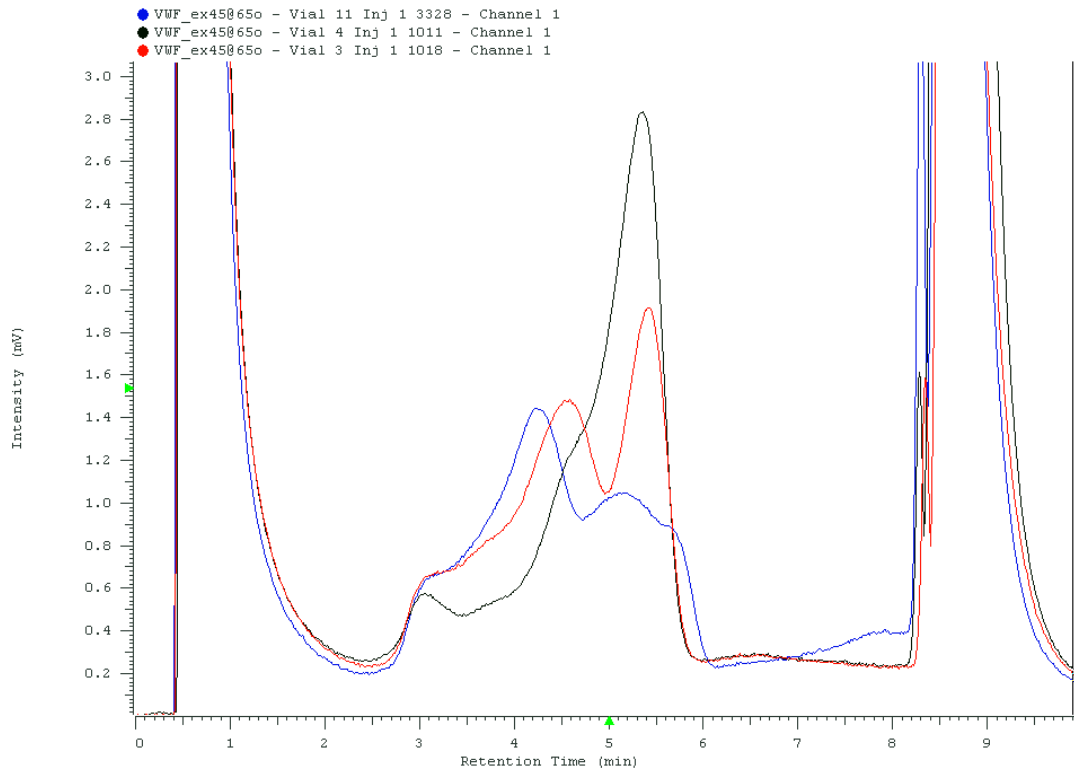
**Abbildung 2.12:** Die heterozygot vorliegende stumme Mutation  $C^{7930} \rightarrow T$  (blau) zeigt einen geringfügig abweichenden Verlauf im Vergleich mit einer heterozygoten Probe mit dem Mutantallel des Zielpolymorphismus F/Y 2561 (rot). Beide sind eindeutig vom Wildtyp (schwarz) zu unterscheiden.

Die Mutation  $C^{7913} \rightarrow G$  bewirkt einen Aminosäureaustausch von Prolin zu Adenin und ist in ihrer DHPLC-Analyse in Abbildung 2.13 dargestellt. Es zeigt sich, dass diese Mutation (blaue Kurve) einen deutlich anderen Kurvenverlauf in der DHPLC-Analyse erzeugt als eine F/Y 2561 -Heteroduplex (rote Kurve). Einen Wildtyp für beide Mutationen zeigt die schwarze Kurve in Abbildung 2.13.

### 2.2.5 Restriktionsenzymverdau

Dem Restriktionsenzymverdau wurden alle Probenpärchen zugeführt, die in der DHPLC-Analyse auffällig waren. Die in Abschnitt 2.2.2.1 auf Seite 25 beschriebenen PCR brachte zunächst die für das Restriktionsenzym nötige Schnittstelle in das PCR-Produkt ein, danach wurde der eigentliche Verdau durchgeführt. Der Ansatz für diese Reaktion findet sich in Tabelle 2.7.

## 2 Patienten, Material und Methoden



**Abbildung 2.13:** Die heterozygote Mutation  $C^{7913} \rightarrow G$  (blau) zeigt einen deutlich anderen Kurvenverlauf als die Heteroduplex mit dem Mutantenallel des Polymorphismus F/Y 2561 (rot). Beide unterscheiden sich deutlich vom Wildtyp (schwarz).

Es wurde das aus *Pseudomonas diminuta* gewonnene Restriktionsenzym *Pdml* der Firma Fermentas verwendet, sowie der Buffer  $Y^+$ /Tango des gleichen Herstellers (33 mM Tris-Acetate (pH7,9), 10 mM Magnesiumacetat, 66 mM Kaliumacetat, 0,1 mg/ml BSA). Der Verdau wurde über Nacht in einem Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Erkennungssequenz und Schnittstelle des Enzyms lagen bei 5'-GAAGG↓CTTTC-3' und beinhalteten mit dem Triplet TTT an der Position 7931–7933 des Exons 45 des Von-Willebrand-Faktor-Gens die für den Polymorphismus F/Y 2561 sensible Region. Daraus ergab sich, dass Bindung und Wirken des Enzyms nur bei einer im Wildtyp vorliegenden DNA (TTT) möglich war. Durch das Schneiden des Enzyms entstanden zwei Fragmente mit einer Länge von 95 bp und 28 bp. Bei Heterozygotie für 7932A wurde die Wildtypsequenz geschnitten, während die mutante Sequenz unverdaut blieb. Homozygot vorliegende DNA wurde nicht geschnitten und blieb unfragmentiert (siehe Abbildung 2.5 auf Seite 31). Nach der Inkubation wurden die Proben durch die in Abschnitt 2.2.3 auf Seite 28 beschriebene Dünnschichtpo-

**Tabelle 2.7:** Ansatz für den Enzymverdau

	$\mu\text{l}$
PCR-Produkt	10
Puffer <sup>a</sup>	2
Aqua destillata	7,75
<i>PdmI</i>	1

<sup>a</sup> Verwendet wurde Buffer  $\text{Y}^+$  /Tango der Firma Fermentas.

lyacrylamid-Elektrophorese aufgetrennt und mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. Die Bewertung der PAGE ist im Abschnitt 2.2.3.2 auf Seite 30 nachzuvollziehen.

### 2.2.6 Sequenzieren

Die DNA-Sequenzierung dient der Ermittlung der genauen Basenabfolge in einem definierten Abschnitt der DNA. Für diese Studie wurde die Methode des Sequenzierens zu zwei Zeitpunkten innerhalb des Analyse-Verfahrens genutzt:

1. In der Optimierung der DHPLC konnte das durch die Säulenschichtchromatographie erzielte Ergebnis durch das Sequenzieren verifiziert werden.
2. Alle Proben, die durch DHPLC und Restriktionsenzymverdau nicht eindeutig zu analysieren waren, da sie entweder Ergebnisse von minderer Qualität erzielten oder eine andere Mutation beinhalteten, wurden zum Abschluss des Verfahrens sequenziert.

Es kam die Sanger-DNA-Sequenzierung nach dem Prinzip des „Cycle-Sequencing“ (McCombie et al. 1992) unter Verwendung von BigDye-Terminatoren der Firma Applied Biosystems zur Anwendung. Die Analyse der Sequenzreaktion erfolgte auf einem ABI PRISM Genetic Analyzer der Firma Applied Biosystems.

#### 2.2.6.1 Prinzip des Cycle-Sequencing

Ebenso wie die Sanger-DNA-Sequenzierung arbeitete das Cycle-Sequencing mit Didesoxynukleotiden: In einer Polymerisations-Reaktion wurden zusätzlich zu den vier üblichen 2'-Desoxynukleotiden kleine Mengen von 2'- 3'-Didesoxynucleotide verwendet. Im Gegensatz zu den 2'-Desoxynukleotiden der DNA besaßen die

2'- 3'-Didesoxynucleotide keine freie OH-Gruppe am 3'- Ende, so dass die 3'-5'-Phosphodiester-Bindung zwischen den Desoxyribonukleotiden verhindert wurde und es mit Einbau eines Didesoxynucleotids zum Abbruch der Synthese eines Stranges kam. Zur Detektion dieser trunkeierten, unterschiedlich langen DNA-Fragmente werden bei der Sanger-Methode vier unterschiedliche Ansätze mit den radioaktiv markierten Didesoxynucleotiden mit jeweils nur einer Base verwendet. Beim hier angewandten Cycle-Sequencing kamen Dye-Terminatoren zur Anwendung, bei denen es sich um Fluoreszenz markierte Didesoxynucleotide handelte, die einen Fluorescein- und einen dRhodamin-Anteil trugen. Bei Einbau der Dye-Terminatoren in die DNA kam es zu einem Energietransfer von Fluorescein zu dRhodamin und es entstand eine messbare Fluoreszenz. Die Didesoxynucleotide der einzelnen Basen ließen sich durch unterschiedliche Wellenspektren der dRhodamin-Emission codieren, so dass in einem einzigen Ansatz die Visualisierung aller vier Dye-Terminatoren möglich war. Anstelle der bei der Sanger-Methode üblichen Autoradiographie folgte beim Cycle-Sequencing auf die elektrophoretische Auftrennung die Auswertung in einem Chromatogramm. Die Cycle-Sequencing-Methode nutzte ein temperaturgesteuertes, zyklisches Verfahren aus Denaturierung, Annealing und Extension, das dem der PCR ähnelte und benötigte daher wesentlich geringere Mengen an Template-DNA als die Sanger-Methode. Im Gegensatz zur PCR, wo sich die Anzahl der amplifizierten DNA exponentiell in jedem Zyklus vermehrte, kam es hier jedoch nur zu einer linearen Vermehrung der DNA. Dies bedeutet, dass eine größere Menge an Template-DNA eingesetzt werden musste, als bei der PCR nötig war. Vor dem Cycle-Sequencing wurde daher die in Abschnitt 2.2.2.1 auf Seite 25 beschriebene PCR durchgeführt, die dazu diente, Template-DNA für die Sequenzierungsreaktion zu erzeugen (Alphey 1998).

### 2.2.6.2 Agarosegel-Elektrophorese

Das Produkt der in Abschnitt 2.2.2.1 auf Seite 25 beschriebenen PCR wurde vor der Sequenzierungsreaktion in einer Agarosegel-Elektrophorese aufgereinigt. Dazu wurde zunächst ein 1,2%iges Agarosegel nach dem sich im Anhang A.1.3 befindenden Lösungsansatz hergestellt und noch warm in einen Plastikträger gegossen. Durch das Einstecken von Plastikreitern entstanden während des Erkaltens mehrere Löcher in dem Gel, in die das komplette PCR-Produkt (50 µl) sowie ein 100 bp-Maker einpipettiert werden konnten. Zur Elektrophorese wurde das Agarosegel in eine entsprechende Kammer gelegt und mit TAE-Puffer (Zusammensetzung siehe Anhang A.1.3) überschichtet. Die Auftrennung verlief bei einer konstant gehaltenen Spannung von 200 Volt und variabel eingestellter Ampèrezahl. Nach Beendigung der Elektrophorese

**Tabelle 2.8:** Ansatz für das Cycle-Sequencing

	µl
Patienten DNA	4
Primer <sup>a</sup>	1,5
BigDYE-Terminator	2
5xSequencing-Puffer	3
Aqua destillata	9,5
Taq-Polymerase	0,2

<sup>a</sup> Verwendung von entweder sense- oder antisense-Primer in einer Verdünnung von 1:10.

wurden die DNA-Banden unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in Ultrafree-DNA-Separierungssäulen der Firma Millipore überführt. Durch eine zehnmütige Zentrifugation bei 5000 G erfolgte in den Säulen die Aufreinigung der DNA aus dem Agarosegel.

### 2.2.6.3 Sequenzierungsreaktion

Für die Sequenzierungsreaktion wurde das ABI PRISM BigDYE-Terminator-Reaction-Kit der Firma Applied Biosystems in der Originalversion verwendet. Es kamen pro Sequenzierungsreaktion entweder der sense-Primer 5'-TGTTGGACTAACTCTGGTGCCC-3' oder der antisense-Primer 5'-AAGTGGAAGAGAGGCTTAAAGG-3' zur Anwendung. Um eine Entschlüsselung in beiden Richtungen zu erreichen, wurde jede Probe jeweils einmal mit sense- und einmal mit antisense-Primer sequenziert. Der Ansatz der Sequenzierungsreaktion ist Tabelle 2.8 zu entnehmen.

Das eigentliche Cycle-Sequencing wurde in einem TRIO-Thermoblock durchgeführt. Die dabei verwendeten Programme enthält Tabelle 2.9.

Nach Abschluss des Sequenzierprogramms im TRIO-Block wurden der Inhalt der Probenröhrchen herunterzentrifugiert, um dann die DNA mittels Isopropanol nach folgendem Protokoll zu fällen:

1. Zunächst wurden 80 µl 75%iges Isopropanol in 0,5 ml Probenröhrchen vorgelegt. Es wurde dann der gesamte Inhalt eines Sequenzierungsprobenröhrchens hinzupipettiert und das Röhrchen auf einem Vortexer gut durchmischt.
2. Die Röhrchen wurden 15 Minuten geschlossen stehen gelassen.



**Tabelle 2.9:** Sequenzierprogramme im TRIO-Block

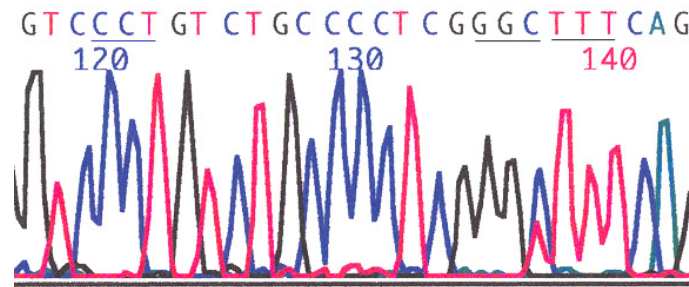
Programm für	sense-Primer		antisense-Primer	
	Temp. (°C)	Zeit (sec)	Temp. (°C)	Zeit (sec)
Anzahl Zyklen	40		40	
Denaturierung	95	30 <sup>a</sup>	95	30 <sup>a</sup>
Annealing	60	30	55	30
Extension	60	240	60	240

<sup>a</sup> Die Denaturierung im ersten Zyklus dauert 300 sec länger.

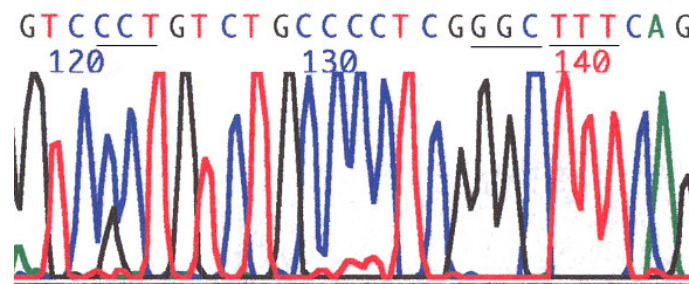
3. Bei 13 000 U/min und der Temperatur von 20 °C wurde die DNA für 20 Minuten herunterzentrifugiert und sammelte sich als Pellet am Boden der Reaktionsröhrchen. Der Überstand wurde abpipettiert.
4. Erneut wurden 200 µl 75%iges Isopropanol zugegeben. Die Probenröhrchen wurden daraufhin auf dem Vortexer gut durchmischt.
5. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 13 000 U/min und 20 °C wurde der Überstand abpipettiert.
6. Zum Schluss wurden die Probenröhrchen für 15–20 Minuten offen getrocknet.

#### 2.2.6.4 Auswertung der Sequenzierung

Die Sequenzierungsreaktion wurde in einem ABI PRISM 310 Genetic Analyzer der Firma Applied Biosystems mittels Kapillarelektrophorese analysiert. Das Ergebnis der Chromatographie wurde ausgedruckt und bewertet. Die Abbildungen 2.1–2.3 (S. 23–24) zeigen eine Probe mit dem Genotyp des Wildtyps (7932TT) des Polymorphismus F/Y2561, eine heterozygote Probe mit dem Genotyp 7932TA sowie eine homozygote Probe (7932AA), alle in 5'-3'-Richtung. Während des Screenings der Studienpopulation auf den Polymorphismus F/Y2561 wurden in dem untersuchten Genabschnitt im Exon 45 des Von-Willebrand-Faktor-Gens zwei weitere Mutationen entdeckt: In Abbildung 2.14 erkennt man einen heterozygoten Basenaustausch an der Stelle 7930 von Cytosin im Wildtyp zu Thymin in der vorliegenden Probe. Das entsprechende Triplet (linke Unterstreichung) ist dadurch von 5'-GGC-3' zu 5'-GGT-3' verändert, nimmt



**Abbildung 2.14:** Stumme Mutation an der Stelle 7930 von Cytosin zu Thymin ( $C^{7930} \rightarrow T$ , mittlere Unterstreichung), Wildtypallel des Polymorphismus F/Y 2561 (rechte Unterstreichung), sowie Wildtyp für die Mutation  $C^{7913} \rightarrow G$  (linke Unterstreichung), in 5'-3'-Richtung.



**Abbildung 2.15:** Mutation an der Stelle 7913 von Cytosin zu Guanin ( $C^{7913} \rightarrow G$ , linke Unterstreichung), konsekutiver Aminosäureaustausch (P/A 7913). Mittlere Unterstreichung: Vorliegen des Wildtyps an der Stelle 7930, rechte Unterstreichung: Wildtypallel für den Polymorphismus F/Y 2561, in 5'-3'-Richtung.

aber keinen Einfluss auf das Von-Willebrand-Faktor-Protein, da es auch in der mutierten Form noch für die Aminosäure Glycin kodiert. Die rechte Unterstreichung zeigt das Triplet mit dem Polymorphismus F/Y 2561, hier im Wildtyp vorliegend. In Abbildung 2.15 wird der heterozygote Austausch der Base Cytosin zu Guanin an der Stelle 7913 bei einem anderen Studienteilnehmer ersichtlich. Das Codon (linke Unterstreichung) ist damit von 5'-CCT-3' zu 5'-GCT-3' verändert, ein Aminosäureaustausch von Prolin zu Adenin an Stelle 2555 des Von-Willebrand-Faktor-Proteins ist die Folge. Die rechte Unterstreichung verdeutlicht wiederum den im Wildtyp vorliegenden Polymorphismus F/Y 2561 .

## 2.2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung hatte zum Ziel in dem Studienkollektiv von 2070 Patienten eine positive oder negative Korrelation zwischen dem Tyr-Allel des Polymorphismus F/Y2561 und der Manifestation eines Myokardinfarktes oder einer koronaren Herzkrankheit entweder nachzuweisen oder zu widerlegen.

### 2.2.7.1 Methodik

Nach der oben beschriebenen molekularbiologischen Untersuchung der DNA jedes Studienteilnehmers auf Vorliegen des Wildtyp-Allels 7932T (entsprechend dem Phe-Allel) oder des Mutantenallels 7932A (entsprechend dem Tyr-Allel) des Polymorphismus F/Y2561 wurde das Kollektiv gemäß Abschnitt 2.1.2 in Abhängigkeit zur Manifestation von Myokardinfarkt und koronarer Herzkrankheit in folgende Subgruppen eingeteilt: Gruppe *Kontrolle* (Probanden ohne Nachweis von Myokardinfarkt oder koronarer Herzkrankheit), Gruppe *KHK gesamt* (Probanden mit KHK einschließlich Teilnehmern mit zusätzlichem Myokardinfarkt), Gruppe *KHK ohne MI* (Probanden mit KHK ohne stattgehabten Myokardinfarkt), Gruppe  $MI_{t>-1}$  (Probanden mit Myokardinfarkt innerhalb des letzten Jahres vor Aufnahme in die Studie), Gruppe  $MI_{z=1}$  (Probanden mit genau einem Myokardinfarkt) und Gruppe  $MI_{z\geq 2}$  (Probanden mit zwei oder mehr Myokardinfarkten). Nach Test des Gesamtkollektivs auf Vorliegen des Hardy-Weinberg-Äquilibrium wurden die Prävalenzen der drei Genotypen des Polymorphismus F/Y2561 (Wildtyp TT, heterozygoter Mutant TA, homozygoter Mutant AA) in den einzelnen Subgruppen bestimmt. Für die Gruppe *KHK gesamt* wurden zusätzlich die Prävalenzen folgender klassischer Risikofaktoren für eine koronare Herzkrankheit bestimmt: Hypercholesterinämie, Rauchen, Diabetes mellitus, Hyperfibrinogenämie, Hypertonie, Übergewicht (Assmann et al. 1999; Wood et al. 1998; Luc et al. 2002). Die Prävalenz des Tyr-Allels wurde neben diese Risikofaktoren eingeordnet. Darüber hinaus wurden die Prävalenzen der beschriebenen Risikofaktoren und des Tyr-Allels in Relation zum Schweregrad der KHK betrachtet.

Eine mögliche positive oder negative Korrelation im Auftreten von Tyr-Allel und koronarer Herzkrankheit wurde dann getrennt untersucht von einer möglichen Korrelation im Auftreten von Tyr-Allel und Myokardinfarkt. Dabei wurden auch geschlechtsspezifische Unterschiede betrachtet und eine mögliche Assoziation überprüft zwischen dem Vorliegen des Tyr-Allels und dem vorzeitigen Auftreten einer KHK oder eines Myokardinfarktes in jungen Lebensjahren, sowie zwischen dem Vorliegen des Tyr-Allels und dem Auftreten von Reinfarkten. In Anlehnung an das im Insti-

tut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Düsseldorf verwendete Auswertungskonzept der LURIC-Daten (Zotz et al. 2005) wurden für die Untersuchung einer Korrelation zwischen dem Vorliegen des Tyr-Allels und dem Auftreten einer KHK die Subgruppen *KHK gesamt* und *KHK ohne MI* und für die Untersuchung einer Korrelation von Tyr-Allel mit Myokardinfarkt die Subgruppen *MI*,  $MI_{t>-1}$ ,  $MI_{z=1}$ ,  $MI_{z\geq 2}$  nach folgendem Schema geprüft:

1. Vergleich der Prävalenz des Tyr-Allels in der Subgruppe und in der Kontrollgruppe
2. Vergleich der Prävalenz des Tyr-Allels in der Subgruppe und in der komplementären Kontrollgruppe in der Altersklasse  $\leq 55$  Jahre
3. Vergleich der Prävalenz des Tyr-Allels in der Subgruppe und in der komplementären Kontrollgruppe in der Altersklasse  $> 55$  Jahre
4. Vergleich der Prävalenz des Tyr-Allels innerhalb der Subgruppe zwischen den Altersklassen  $\leq 55$  Jahre und  $> 55$  Jahre
5. Vergleich der Prävalenz des Tyr-Allels innerhalb Kontrollgruppe zwischen den Altersklassen  $\leq 55$  Jahre und  $> 55$  Jahre

Zusätzlich wurden die Prävalenzen in weiteren Subgruppen gegeneinander getestet, wenn sich Auffälligkeiten bei der Auswertung nach dem oben beschriebenen Schema ergeben hatten. Zur differenzierten Betrachtung der vorzeitigen Manifestation in Abhängigkeit zum Vorliegen des Tyr-Allels wurde eine Lifetable-Analyse nach dem Cox-Proportional-Hazard-Modell durchgeführt (Cox 1972; Zotz et al. 2005).

### 2.2.7.2 Verwendete statistische Tests und Software

Für die statistische Auswertung wurde die Statistikanalysesoftware SAS, Version 8.1, SAS Institute, Cary, North Carolina, verwendet. Diskrete Variablen wurden mit dem  $\chi^2$ -Test und bei kleineren Gruppenzahlen zusätzlich mit dem Fisher-Exakt-Test untersucht. Mit dem Mann-Whitney-U-Test (Wilcoxon-Rangsummen-Test) wurden die Mittelwerte unabhängiger Variablen stetiger Verteilung geprüft (vgl. Bender et al. 2002). Statistische Signifikanz wurde bei einem Pearson-Wert (P-Wert) von 0,05 oder weniger angenommen. Das relative Risiko wurde anhand der Odds Ratio geschätzt, (siehe dazu Sachs 1997; von Mühlendahl 1998). Eine Odds Ratio wurde als statistisch signifikant gewertet, wenn das zugehörige Konfidenzintervall den Wert 1 aus-

schluss (vgl. Bender und Lange 2001). Sich nicht überdeckende Konfidenzintervalle wurden nach Sachs (1997) als Beweis für einen signifikanten Unterschied zweier Parameter gewertet. Der Anteil der klassischen Risikofaktoren an KHK und Myokardinfarkt wurde durch eine multivariate Analyse in einem Modell zur logistischen Regression in die Auswertung miteinbezogen. Die logistische Regression wurde dabei korrigiert auf Alter, Geschlecht, Hypercholesterinämie, Rauchen, Hypertonie, Diabetes mellitus, Hyperfibrinogenämie, Übergewicht und 7932A-positiven-Status. Um einen Einfluss des Tyr-Allels auf das durchschnittliche Alter bei Myokardinfarkt zu prüfen, wurde eine auf dem Cox-Proportional-Hazard-Model basierende multivariate Regression angewandt. Dabei wurde der Ereigniszeitpunkt als das Lebensalter bei erstem Myokardinfarkt festgelegt.

## 3 Ergebnisse

Das folgende Kapitel stellt die Ergebnisse der statistischen Auswertung nach dem in Abschnitt 2.2 beschriebenen Schema dar. Zudem werden Mutationen beschrieben, die bei dem Screening auf den Polymorphismus 7932T/A zusätzlich detektiert werden konnten.

### 3.1 Größe des Gesamtkollektivs und der Subgruppen

Das untersuchte Studienkollektiv von 2070 Personen wurde zur Analyse in acht Subgruppen unterteilt. Die Größe dieser sowie die Anteile von Frauen und Männern sind in Tabelle 3.1 auf der nächsten Seite dargestellt. Die Gruppe *Kontrolle* ( $n = 416$ ) erfasste alle Personen, die in der Koronarangiographie eine 0%ige Stenose aufwiesen und keinen Myokardinfarkt erlitten hatten. Die Gruppe *KHK gesamt* ( $n = 1653$ ) umfasste alle Patienten mit der Diagnose KHK, unabhängig davon, ob zusätzlich ein Myokardinfarkt vorlag oder nicht. Die Gruppe *KHK ohne MI* ( $n = 865$ ) ist demgegenüber weiter differenziert und schließt nur diejenigen Teilnehmer ein, bei denen eine KHK, jedoch kein MI diagnostiziert werden konnte. Die Gruppe *MI* ( $n = 789$ ) schließt alle Patienten mit der Diagnose MI ein, unabhängig von der Anzahl der erlittenen Myokardinfarkte. Innerhalb dieser Gruppe wurde eine weitere Differenzierung hinsichtlich des zeitlichen Auftretens und der Anzahl der Myokardinfarkte vorgenommen. So wurden Personen mit einem Myokardinfarkt, der bei Aufnahme in die Studie kürzer als ein Jahr zurück lag, der Gruppe  $MI_{t>-1}$  ( $n = 260$ ) zugeteilt. Personen mit einem Myokardinfarkt, der bei Aufnahme in die Studie ein Jahr oder länger zurück lag, wurden in der Gruppe  $MI_{t\leq-1}$  ( $n = 529$ ) erfasst. Die Gruppe  $MI_{z=1}$  ( $n = 647$ ) schloss Teilnehmer mit genau einem Myokardinfarkt ein, die Gruppe  $MI_{z\geq 2}$  ( $n = 142$ ) Patienten, die zwei oder mehr Myokardinfarkte erlitten hatten.

Bei einem Teilnehmer wurde ein Myokardinfarkt ohne Vorliegen einer KHK diagnostiziert, bei allen anderen lag neben der Diagnose Myokardinfarkt stets auch eine KHK vor. Die Summe der Gruppe *KHK ohne MI* und der Gruppe *MI* ist daher mit 1654 Teilnehmern um eins größer als die Gruppe *KHK gesamt* mit 1653 Teilnehmern.

**Tabelle 3.1:** Gesamtkollektivgröße und Subgruppengrößen

Studienkollektiv					
gesamt	2070				
Kontrolle					
männlich	211				
weiblich	205				
alle	416				
KHK					
	KHK ohne MI	KHK gesamt			
männlich	598	1234			
weiblich	267	419			
alle	865	1653 <sup>a</sup>			
MI					
	gesamt	MI <sub>t&gt;-1</sub>	MI <sub>t≤-1</sub>	MI <sub>z=1</sub>	MI <sub>z≥2</sub>
männlich	636	204	432	518	118
weiblich	153	56	97	129	24
alle	789	260	529	647	142

<sup>a</sup> Ein Teilnehmer erlitt einen Myokardinfarkt ohne nachweisbare KHK; daher ist die Summe der Gruppe *KHK ohne MI* und der Gruppe *MI* um den Wert eins größer als die Gruppe *KHK gesamt*.

**Tabelle 3.2:** Allelfrequenzen

	Allelfrequenz (%)
Wildtyp-Allel (TTT)	94,86
mutantes Allel (TAT)	5,14

## 3.2 Genotypverteilung

### 3.2.1 Hardy-Weinberg-Äquilibrium

Zum Test auf das Vorliegen des Hardy-Weinberg-Äquilibriums in der untersuchten Population wurden zunächst die Allelfrequenzen bestimmt. Das Wildtyp-Allel (TTT) erreichte eine Frequenz von  $p = 94,86\%$ , das mutante Allel (TAT) wurde mit einer Frequenz von  $q = 5,14\%$  nachgewiesen (Tabelle 3.2).

**Tabelle 3.3:** Hardy-Weinberg-Genotyp-Frequenzen

	Genotyp-Frequenz	tatsächliche absolute Anzahl <sup>a</sup> (n)	erwartete absolute Anzahl (n)
Wildtyp (TTT/TTT)	0,900	1859	1862,5
heterozygot (TAT/TTT)	0,098	209	202,0
homozygot (TAT/TAT)	0,003	2	5,5

<sup>a</sup> P-Wert des  $\chi^2$ -Test zum Vergleich zwischen erwarteter und tatsächlicher absoluter Anzahl: 0,1171

Auf Grundlage der Allelfrequenzen wurden nach der Hardy-Weinberg-Gleichung ( $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ ) die zu erwartenden Genotypfrequenzen berechnet (Hirsch-Kauffmann und Schweiger 1987). Es ergaben sich Frequenzen von 90 % für den Wildtyp (Genotyp TTT/TTT), von 9,8 % für den heterozygoten Typ (Genotyp TAT/TTT) und von 0,3 % für den homozygot-mutanten Genotyp TAT/TAT. Auf Grundlage dieser prozentualen Verteilung wurde die erwartete absolute Anzahl von Individuen mit Wildtyp sowie mit heterozygotem oder homozygotem mutanten Genotyp berechnet und mit der tatsächlich detektierten absoluten Anzahl verglichen (Tabelle 3.3).

Die in der Studienpopulation nachgewiesene absolute Verteilung differiert nicht signifikant von der bei Hardy-Weinberg-Äquilibrium erwarteten (P-Wert von 0,1171 im  $\chi^2$ -Test). Es kann somit gefolgert werden, dass das Studienkollektiv sich bezüglich der Verteilung der Wildtyp- und Mutantallele des Polymorphismus Phe/Tyr 2561 im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befindet.

### 3.2.2 Genotypverteilung in den Subgruppen

Die Genotypverteilung in den einzelnen Subgruppen ist in Tabelle 3.4 auf der nächsten Seite dargestellt.

Folgende Beobachtungen konnten gemacht werden:

1. In den Subgruppen (*MI*, *KHK gesamt*, *KHK ohne MI*,  $MI_{t>-1}$  und  $MI_{z\geq 2}$ ) ergaben sich unterschiedliche prozentuale Anteile an Personen mit heterozygotem Genotyp für das mutante Tyr-Allel. Diese lagen sowohl in der geschlechtsunspezifischen als auch in der geschlechtsgetrennten Betrachtung in allen Subgruppen über denen der Kontrollgruppe. Den höchsten Prozentsatz an heterozygoten Trägern des Tyr-Allels erreichte in allen drei Subgruppen die Gruppe  $MI_{z\geq 2}$ .



### 3 Ergebnisse

**Tabelle 3.4:** Genotypen für F/Y 2561 in den einzelnen Subgruppen

	alle			
	gesamt (n)	Wildtyp Phe/Phe (%)	heterozygot Phe/Tyr (%)	homozygot Tyr/Tyr (%)
Kontrolle	416	90,63	9,38	0
MI	789	89,86	10,14	0
KHK gesamt	1653 <sup>a</sup>	89,65	9,86	0,12
KHK ohne MI	865	89,36	10,4	0,23
MI <sub>t&gt;-1</sub>	260	88,46	11,54	0
MI <sub>z≥2</sub>	142	87,32	12,68	0
	männlich			
	gesamt (n)	Wildtyp Phe/Phe (%)	heterozygot Phe/Tyr (%)	homozygot Tyr/Tyr (%)
Kontrolle	211	90,52	9,48	0
MI	636	90,25	9,75	0
KHK gesamt	1234	89,71	10,13	0,16
KHK ohne MI	598	89,13	10,54	0,33
MI <sub>t&gt;-1</sub>	204	89,71	10,29	0
MI <sub>z≥2</sub>	118	88,98	11,02	0
	weiblich			
	gesamt (n)	Wildtyp Phe/Phe (%)	heterozygot Phe/Tyr (%)	homozygot Tyr/Tyr (%)
Kontrolle	205	90,73	9,27	0
MI	153	88,24	11,76	0
KHK gesamt	419	89,5	10,5	0
KHK ohne MI	267	89,89	10,11	0
MI <sub>t&gt;-1</sub>	56	83,93	16,07	0
MI <sub>z≥2</sub>	24	79,17	20,83	0

<sup>a</sup> Ein Teilnehmer erlitt einen Myokardinfarkt ohne nachweisbare KHK; daher ist die Summe der Gruppe *KHK ohne MI* und der Gruppe *MI* um den Wert eins größer als die Gruppe *KHK gesamt*.

- Geordnet nach einem ansteigenden Anteil der heterozygoten Träger des Tyr-Allels ergab sich für die Gruppe beider Geschlechter folgende Reihenfolge: *Kontrolle* (9,38 %), *KHK gesamt* (9,86 %), *MI* (10,14 %), *KHK ohne MI* (10,4 %), *MI<sub>t>-1</sub>* (11,54 %) und *MI<sub>z≥2</sub>* (12,68 %). Für die männliche Subgruppe sah die Verteilung folgendermaßen aus: *Kontrolle* (9,48 %), *MI* (9,75 %), *KHK gesamt* (10,13 %), *MI<sub>t>-1</sub>* (10,29 %), *KHK ohne MI* (10,54 %), *MI<sub>z≥2</sub>* (11,02 %). In der weiblichen Gruppe

gestaltete sich die Verteilung wie folgt: *Kontrolle* (9,27%), *KHK gesamt* (10,5%), *KHK ohne MI* (10,11%), *MI* (11,76%),  $MI_{t>-1}$  (16,07%),  $MI_{z\geq 2}$  (20,83%).

3. In den Gruppen *MI*,  $MI_{t>-1}$  und  $MI_{z\geq 2}$  waren in den weiblichen Subgruppen prozentual mehr Tyr-Allel-Träger nachweisbar als in der männlichen Subgruppe. In der Kontrollgruppe und der Gruppe *KHK ohne MI* lag der Anteil der heterozygoten Träger in der männlichen Subgruppe höher.

Aufgrund des geringen Anteils der homozygoten Individuen mit 0,14% am Gesamtkollektiv, wurden für alle folgenden statistischen Auswertungen die drei homozygoten Personen der heterozygoten Gruppe zugeschlagen.

### 3.3 Einordnung des Tyr-Allels neben die klassischen Risikofaktoren

In diesem Abschnitt wird dargestellt, ob die klassischen Risikofaktoren einer koronaren Herzkrankheit in dem untersuchten Kollektiv bestätigt werden konnten. Zur Prüfung wurden die Faktoren Hypercholesterinämie, Rauchen, Diabetes mellitus, Hyperfibrinogenämie, Hypertonie und Übergewicht in verschiedenen Patientengruppen des Kollektivs und in der Kontrollgruppe bestimmt und nach einer univariaten Analyse zusammen mit den Variablen Alter und Geschlecht einer multivariaten Analyse unterzogen, um so den unabhängigen Einfluss der einzelnen Faktoren bestimmen zu können. Durch zusätzliches Einbeziehen des Tyr-Allels in die Analyse war es gleichzeitig möglich, den Stellenwert des Tyr-Allels als eigenständigen Risikofaktor für koronare Herzkrankheit zu ermitteln.

#### 3.3.1 Tyr-Allel und klassische Risikofaktoren bei Patienten mit KHK

Als klassische Risikofaktoren wurden hier Hypercholesterinämie, das Rauchen, eine bestehende Hypertonie und Hyperfibrinogenämie, sowie das Vorliegen von Diabetes mellitus und Übergewicht gewertet (Assmann et al. 1999; Wood et al. 1998; Luc et al. 2002). Diese konnten in dem untersuchten Kollektiv alle bestätigt werden: Patienten mit koronarer Herzkrankheit (mit und ohne Myokardinfarkt) wiesen signifikant häufiger die klassischen Risikofaktoren der koronaren Herzkrankheit auf als Kontrollpersonen ohne koronare Herzkrankheit (Tabelle 3.5 auf Seite 56 und Abbildung 3.1 auf Seite 58).

Das relative Risiko der univariaten Analyse für die Erkrankung an einer koronaren Herzkrankheit war bei Vorliegen einer Hypercholesterinämie mit einem Wert von

4,21 am höchsten, gefolgt von den Faktoren Rauchen, Diabetes mellitus, Hyperfibrinogenämie, Hypertonie und Übergewicht. Das Tragen des Tyr-Allels konnte in dieser Gruppe nicht als signifikanter Risikofaktor für das Entstehen einer koronaren Herzkrankheit nachgewiesen werden. Zwar liegt die Prävalenz unter den Personen mit KHK (mit und ohne MI) mit 10,34% höher als in der Kontrollgruppe (9,34%), doch wird bei einem P-Wert von 0,56 keine statistische Signifikanz erreicht.

Um einen unabhängigen Einfluss der einzelnen Risikofaktoren auf die Entstehung einer koronaren Herzkrankheit zu erfassen, wurde eine logistische Regression durchgeführt, in die die Variablen Alter, Geschlecht, Hypercholesterinämie, Rauchen, Diabetes mellitus, Hypertonie, Übergewicht und ein für das Mutantenallel TAT-positiver Genotyp einbezogen wurden. Mit Ausnahme des Übergewichts konnten alle oben genannten klassischen Risikofaktoren in dieser multivariaten Analyse als eigenständig signifikante Faktoren bestätigt werden. Das Tragen des Tyr-Allels zeigte in der logistischen Regression zwar eine höhere Odds Ratio und einen kleineren P-Wert (0,1749) als in der univariaten Analyse, beides erreichte jedoch wiederum keine statistische Signifikanz.

Die in Tabelle 3.5 auf der nächsten Seite dargelegte Analyse zwischen der Gruppe *KHK gesamt* und der Kontrollgruppe wurde zur differenzierteren Betrachtung ebenso zwischen der Gruppe *KHK ohne MI* und der Kontrollgruppe sowie zwischen der Gruppe *MI* und der Kontrollgruppe durchgeführt und ergab in diesen Gruppen bezüglich der Signifikanz der klassischen Risikofaktoren und des Tyr-Allels keinen Unterschied zu den oben beschriebenen Ergebnissen.

#### **3.3.2 Tyr-Allel und klassische Risikofaktoren in Abhängigkeit vom Grad der KHK**

Teilt man die Personen der Gruppe *KHK gesamt* dem Schweregrad der KHK folgend in die drei Untergruppen 1-Gefäßerkrankung, 2-Gefäßerkrankung und 3-Gefäßerkrankung auf, so ergibt sich in der univariaten Analyse eine statistische Signifikanz in allen drei Untergruppen und eine Steigerung der relativen Risiken mit dem Schweregrad der KHK für die Faktoren Hypercholesterinämie (4,14 bei der 1-Gefäßerkrankung, 5,35 bei der 3-Gefäßerkrankung), Rauchen (2,30–3,39), Diabetes mellitus (1,72–2,95) und Hyperfibrinogenämie (1,70–2,55, siehe Tabelle 3.6). Die Faktoren Hypertonie und Übergewicht erwiesen sich nur in den Gruppen 2-Gefäßerkrankung und 3-Gefäßerkrankung als statistisch signifikant, eine Steigerung

### 3 Ergebnisse

**Tabelle 3.5:** Prävalenz der klassischen Risikofaktoren der KHK und des Tyr-Allels bei Patienten der Gruppe *KHK gesamt* und Kontrollpersonen

	KHK gesamt <i>n</i> = 1653 (%)			Kontrolle <i>n</i> = 416 (%)		
Tyr-Allel	10,34			9,38		
Hypercholesterinämie	71,87			37,74		
Rauchen	68,78			47,36		
Diabetes mellitus	33,51			17,55		
Hyperfibrinogenämie	61,58			43,51		
Hypertonie	74,95			60,58		
Übergewicht	63,16			57,21		

	univariate Analyse			multivariate Analyse		
	P	OR	OR (95 %-KI)	P	OR	OR (95 %-KI)
Tyr-Allel	0,56	1,12	0,77–1,61	0,1749	1,328	0,881–2,000
Hypercholesterinämie	0,0001	4,21	3,36–5,28	0,0001	4,38	3,414–5,619
Rauchen	0,0001	2,45	1,97–3,05	0,0001	2,147	1,638–2,814
Diabetes mellitus	0,0001	2,37	1,80–3,11	0,0004	1,743	1,280–2,373
Hyperfibrinogenämie	0,0001	2,08	1,67–2,59	0,0002	1,592	1,242–2,040
Hypertonie	0,0001	1,95	1,55–2,44	0,0148	1,415	1,070–1,870
Übergewicht	0,026	1,28	1,03–1,60	0,8094	0,969	0,748–1,254

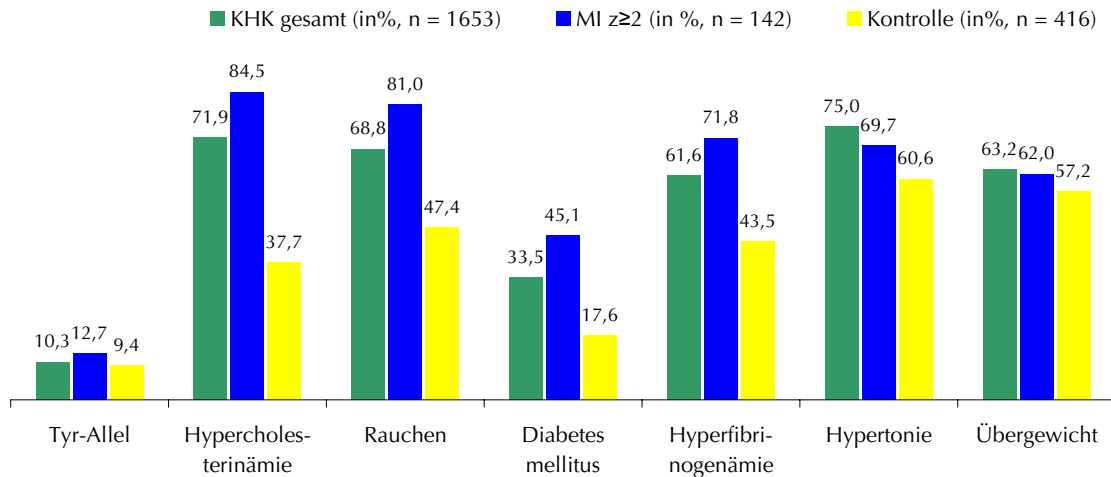
des relativen Risikos konnte aber auch hier beobachtet werden (1,29–2,44 für Hypertonie, 1,15–1,32 für Übergewicht).

Die Steigerungen der relativen Risiken können aufgrund der Überlappung der Konfidenzintervalle weder sicher als signifikant betrachtet noch als solche abgelehnt werden (Sachs 1997). In der multivariaten Analyse konnte der Faktor Übergewicht in keiner der drei Untergruppen als statistisch signifikant bewiesen werden. Die Hypertonie erwies sich hier sowohl für die 2-Gefäßerkrankung als auch für die 3-Gefäßerkrankung als statistisch signifikanter Risikofaktor. Die Faktoren Hypercholesterinämie, Rauchen, Diabetes mellitus und Hyperfibrinogenämie verhielten sich bezüglich Signifikanz und Steigerung der relativen Risiken in der multivariaten Analyse konform zu der univariaten Analyse. Ein Zusammenhang zwischen dem Tyr-Allel und den drei Schweregraden der KHK konnte nicht festgestellt werden; die P-Werte blieben sämtlich über einem Wert von 0,05 und waren somit statistisch nicht signifikant.

**Tabelle 3.6:** Relatives Risiko für das Auftreten einer KHK bei Vorliegen des Tyr-Allels und der klassischen Risikofaktoren in Abhängigkeit vom Grad der KHK

	univariate Analyse												
	1-Gefäßkrankung <i>n</i> = 837				2-Gefäßkrankung <i>n</i> = 791				3-Gefäßkrankung <i>n</i> = 1023				
	P	OR	OR (95%-KI)	P	OR	OR (95%-KI)	P	OR	OR (95%-KI)	P	OR	OR (95%-KI)	
Tyr-Allel	0,9558	0,9869	0,6192-1,5729	0,3979	1,2192	0,7696-1,9315	0,9934	1,0018	0,6531-1,5368				
Hypercholesterinämie	0,0001	4,236	3,1673-5,6654	0,0001	4,8622	3,5815-6,6009	0,0001	5,3528	4,0746-7,0319				
Rauchen	0,0001	2,3045	1,7411-3,0503	0,0001	2,5134	1,8770-3,3654	0,0001	3,3869	2,5944-4,4215				
Diabetes mellitus	0,0012	1,7238	1,2367-2,4029	0,0001	2,5523	1,8354-3,5493	0,0001	2,9477	2,1817-3,9825				
Hyperfibrinogenämie	0,0001	1,705	1,2971-2,2411	0,0001	1,9693	1,4832-2,6147	0,0001	2,546	1,9697-3,2909				
Hypertonie	0,0746	1,2924	0,9746-1,7137	0,0001	1,9734	1,4533-2,6796	0,0001	2,4354	1,8463-3,2125				
Übergewicht	0,3234	1,1489	0,8722-1,5134	0,029	1,3768	1,0328-1,8353	0,0305	1,325	1,0265-1,7104				
	multivariate Analyse												
	1-Gefäßkrankung <i>n</i> = 837				2-Gefäßkrankung <i>n</i> = 791				3-Gefäßkrankung <i>n</i> = 1023				
	P	OR	OR (95%-KI)	P	OR	OR (95%-KI)	P	OR	OR (95%-KI)	P	OR	OR (95%-KI)	
Tyr-Allel	0,8873	1,039	0,613-1,759	0,1001	1,584	0,916-2,739	0,7119	1,114	0,627-1,979				
Hypercholesterinämie	0,0001	4,555	3,306-6,276	0,0001	4,954	3,509-6,992	0,0001	6,819	4,771-9,747				
Rauchen	0,0002	1,882	1,343-2,636	0,0001	2,145	1,481-3,107	0,0001	2,351	1,631-3,390				
Diabetes mellitus	0,0188	1,591	1,080-2,345	0,0058	1,742	1,175-2,583	0,0001	2,157	1,463-3,181				
Hyperfibrinogenämie	0,0473	1,373	1,004-1,878	0,0405	1,42	1,015-1,987	0,0001	1,997	1,420-2,809				
Hypertonie	0,4991	1,129	0,794-1,606	0,0346	1,519	1,031-2,240	0,0158	1,598	1,092-2,339				
Übergewicht	0,9965	1,001	0,725-1,382	0,8613	1,032	0,728-1,463	0,8533	1,034	0,728-1,467				

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.1:** Prävalenzen des Tyr-Allels und der klassischen Risikofaktoren in den Gruppen Kontrolle, KHK gesamt und  $MI_{z \geq 2}$

#### 3.3.3 Tyr-Allel und klassische Risikofaktoren bei Patienten mit zwei oder mehr MI (Gruppe $MI_{z \geq 2}$ )

Aufgrund der auffälligen Häufung von Tyr-Allel-Trägern in der Gruppe  $MI_{z \geq 2}$  (siehe Abschnitt 3.2.2 auf Seite 52) wurde eine Analyse durchgeführt, die die Prävalenzen der klassischen Risikofaktoren und des Tyr-Allels in der Gruppe  $MI_{z \geq 2}$  und in der Kontrollgruppe sowohl einer uni- als auch multivariaten Analyse unterzog.

Hierbei zeigte sich, dass das Tyr-Allel zwar in der univariaten Analyse keine statistische Signifikanz in Bezug auf eine Assoziation mit dem Vorliegen von zwei Myokardinfarkten erreichte, wohl aber in der multivariaten Analyse. Hier war das Tyr-Allel mit einem relativen Risiko von 2,78 bei einem 95%Konfidenzintervall von 1,20–6,46 verbunden (siehe Tabelle 3.7 auf der nächsten Seite).

Die Abbildung 3.1 zeigt die Prävalenzen der klassischen Risikofaktoren und des Tyr-Allels in der Kontrollgruppe sowie in den Gruppen KHK gesamt und  $MI_{z \geq 2}$  und verdeutlicht die Steigerung der Prävalenzen des Tyr-Allels sowie der meisten Risikofaktoren in der Gruppe der Patienten mit zwei oder mehr Myokardinfarkten gegenüber der Gruppe von Patienten mit KHK und/oder Myokardinfarkt und gegenüber der Kontrollgruppe.

Die klassischen Risikofaktoren konnten in dieser Gruppe nicht alle bestätigt werden. Für die Faktoren Hypertonie und Übergewicht lag keine statistische Signifikanz vor. Die restlichen Faktoren erhielten dafür mehr Gewicht und erreichten eine höhere odds ratio als in den vorausgegangenen Analysen. Es bleibt offen, ob die fehlende

**Tabelle 3.7:** Prävalenz der klassischen Risikofaktoren der KHK und des Tyr-Allels in der Gruppe  $MI_{z \geq 2}$  und Kontrolle

	$MI_{z \geq 2}$ $n = 142$ (%)	Kontrolle $n = 416$ (%)
Tyr-Allel	12,68	9,38
Hypercholesterinämie	84,51	37,74
Rauchen	80,99	47,36
Diabetes mellitus	45,07	17,55
Hyperfibrinogenämie	71,83	43,51
Hypertonie	69,72	60,58
Übergewicht	61,97	57,21

	univariate Analyse			multivariate Analyse		
	P	OR	OR (95%)-KI	P	OR	OR (95%)-KI
Tyr-Allel	0,2621	1,4032	0,7746–2,5421	0,0175	2,781	1,197–6,464
Hypercholesterinämie	0,0001	8,9983	5,4801–14,7750	0,0001	12,505	6,679–23,413
Rauchen	0,0001	4,7349	2,9854–7,5096	0,0001	3,761	2,043–6,926
Diabetes mellitus	0,0001	3,8553	2,5431–5,8444	0,0001	3,086	1,758–5,417
Hyperfibrinogenämie	0,0001	3,3108	2,1888–5,0080	0,0009	2,521	1,461–4,347
Hypertonie	0,0515	1,4983	0,9959–2,2542	0,9956	1,002	0,569–1,763
Übergewicht	0,3203	1,2188	0,8248–1,8011	0,7326	1,097	0,645–1,866

statistische Signifikanz für die Faktoren Hypertonie und Übergewicht eine einmalige Erscheinung in diesem Kollektiv ist oder ein Hinweis auf ein Zurücktreten dieser Faktoren hinter andere Risikofaktoren in der Pathogenese von multiplen Infarkten.

### 3.4 Tyr-Allel als Risikofaktor für eine koronare Herzkrankheit

Im Folgenden wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Vorliegen des Tyr-Allels des Polymorphismus Phe/Tyr 2561 und einer koronaren Herzkrankheit geprüft. Dazu wurden nach dem in Kapitel 2 beschriebenen Schema (Abschnitt 2.2.7.1 auf Seite 47) die Prävalenzen des Tyr-Allels in der Gruppe *KHK gesamt* und in der Gruppe *KHK ohne MI* mit der Prävalenz des Tyr-Allels in der Kontrollgruppe verglichen.

#### 3.4.1 Tyr-Allel in der Gruppe *KHK gesamt*

##### 3.4.1.1 Vergleich der Prävalenz in der Gruppe *KHK gesamt* und in der Kontrollgruppe

Es fand sich eine Häufung von Tyr-Allel-Trägern in der Gruppe von Patienten mit KHK und/oder Myokardinfarkt gegenüber der Kontrollgruppe, die jedoch nicht statistisch signifikant war (*KHK gesamt*: 10,34 %, *Kontrolle*: 9,38 %, P-Wert univariat: 0,5582,

**Tabelle 3.8:** Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe *KHK gesamt* und in der Kontrollgruppe

	KHK gesamt		Kontrolle		Univariate Analyse ( $\chi^2$ -Test)			Multivariate Analyse (Logistische Regression)		
	%	n	%	n	P	OR	OR (95 %-KI)	P	OR	OR (95 %-KI)
männlich	10,29	127/1234	9,48	20/211	0,7181	1,0956	0,6673–1,7990			
weiblich	10,5	44/419	9,27	19/205	0,6311	1,1486	0,6522– 2,0230			
alle	10,34	171/1635	9,38	39/416	0,5582	1,1154	0,7737–1,6079	0,1749	1,328	0,881–2,000

**Tabelle 3.9:** Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe *KHK gesamt* und in der Kontrollgruppe in der Altersklasse  $\leq 55$  Jahren

	KHK gesamt $\leq 55$		Kontrolle $\leq 55$		Univariate Analyse ( $\chi^2$ -Test)		
	%	n	%	n	P	OR	OR (95 %-KI)
männlich	10,82	46/425	7,22	7/97	0,2885	1,5605	0,6820–3,5705
weiblich	12,79	11/86	6,98	3/43	0,3169 <sup>a</sup>	1,9556	0,5156–7,4165
alle	11,15	57/511	7,14	10/140	0,1663	1,6322	0,8108–3,2857

<sup>a</sup> P (Fisher-Test): 0,3833

multivariat: 0,1749). Die gleiche Beobachtung konnte für die männliche (*KHK gesamt*: 10,29 %, *Kontrolle*: 9,48 %, P: 0,7181) und die weibliche Subgruppe gemacht werden (*KHK gesamt*: 10,5 %, *Kontrolle*: 9,27 %, P: 0,6311), siehe dazu Tabelle 3.8.

Zur Analyse einer möglichen vorzeitigen Manifestation einer KHK bei Tyr-Allel-Trägern wurde die Gruppe *KHK gesamt* in die Altersklassen  $\leq 55$  Jahre und  $> 55$  Jahre geteilt. Diese wurden zunächst mit den jeweils altersentsprechenden Kontrollgruppen und dann gegeneinander verglichen.

### 3.4.1.2 Vergleich der Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe *KHK gesamt* und in der Kontrollgruppe in zwei Altersklassen

In der Altersklasse von 55 Jahren oder weniger fand sich sowohl in der geschlechtsunspecifischen als auch in der nach Frauen und Männer getrennten Betrachtung eine höhere Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe *KHK gesamt* als in der Kontrollgruppe. Die Differenz erreichte dabei keine statistische Signifikanz. Der Unterschied in der Prävalenz des Tyr-Allels zeigte sich unter den weiblichen Patienten (*MI*: 12,79 %, *Kontrolle*: 6,98 %) deutlicher ausgeprägt als unter den männlichen (*MI*: 10,82 %, *Kontrolle*: 7,22 %) und in der Gesamtgruppe (*MI*: 11,15 %, *Kontrolle*: 7,14 %), siehe Tabelle 3.9.

In der Altersklasse von über 55 Jahren fanden sich in der gemeinsamen Betrachtung der Männer und Frauen als auch in der männlichen Teilgruppe weniger Tyr-



### 3 Ergebnisse

**Tabelle 3.10:** Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe *KHK gesamt* und in der Kontrollgruppe in der Altersklasse >55

	KHK gesamt >55		Kontrolle >55		Univariate Analyse ( $\chi^2$ -Test)		
	%	n	%	n	P	OR	OR (95 %-KI)
männlich	10	81/809	11,4	13/114	0,6457	0,8644	0,4643–1,6093
weiblich	9,91	33/333	9,88	16/162	0,9907	1,0038	0,5351– 1,8827
alle	9,98	114/1142	10,51	29/276	0,795	0,9445	0,6140–1,4529

**Tabelle 3.11:** Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe *KHK gesamt* in den Altersklassen  $\leq 55$  und >55

	KHK mit u. ohne MI $\leq 55$		KHK mit u. ohne MI >55		Univariate Analyse ( $\chi^2$ -Test)		
	%	n	%	n	P	OR	OR (95 %-KI)
männlich	10,82	46/425	10,00	81/809	0,6559	1,0908	0,7441–1,5992
weiblich	12,79	11/86	9,91	33/333	0,4372	1,3333	0,6440–2,7606
alle	11,15	57/511	9,98	114/1142	0,4696	1,1322	0,8086–1,5852

Allel-Träger in der Gruppe *KHK gesamt* als in der Kontrollgruppe, in der weiblichen Teilgruppe fanden sich nahezu identisch viele Tyr-Allel-Träger in beiden Gruppen. Es wurde keine statistische Relevanz erreicht (siehe Tabelle 3.10).

#### 3.4.1.3 Vergleich der Prävalenz des Tyr-Allels innerhalb der Gruppe *KHK gesamt* in zwei Altersklassen

In der Gruppe von Patienten, bei denen sich eine KHK oder ein MI im Alter von unter 55 Jahren manifestierte, ergab sich eine höhere Prävalenz des Tyr-Allels als in der Gruppe von Patienten, bei denen eine KHK oder ein MI erst im Alter von über 55 Jahren diagnostiziert wurde (*KHK gesamt*  $\leq 55$ : 11,15 %, *KHK gesamt* >55: 9,98 %). Die Divergenz blieb unter dem 95 %-Signifikanz-Niveau (Tabelle 3.11). Dies galt ebenso für die weibliche (*KHK gesamt*  $\leq 55$ : 12,79 %, *KHK gesamt* >55: 9,91 %) und männliche Subgruppe (*KHK gesamt*  $\leq 55$ : 10,82 %, *KHK gesamt* >55: 10 %), wobei der Unterschied wiederum in der weiblichen Teilgruppe am deutlichsten wurde.

**Tabelle 3.12:** Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe *Kontrolle*  $\leq 55$  und in der Gruppe *Kontrolle*  $> 55$ 

	Kontrolle $\leq 55$		Kontrolle $> 55$		Univariate Analyse ( $\chi^2$ -Test)		
	%	n	%	n	P	OR	OR (95 %-KI)
männlich	7,22	7/97	11,4	13/114	0,3008	0,6043	0,2310–1,5810
weiblich	6,98	3/43	9,88	16/162	0,56	0,6844 <sup>a</sup>	0,1899– 2,4658
alle	7,14	10/140	10,51	29/276	0,266	0,6552	0,3096–1,3863

<sup>a</sup> P (Fisher-Test): 0,7695

#### 3.4.1.4 Vergleich der Prävalenz des Tyr-Allels innerhalb der Kontrollgruppe in zwei Altersklassen

In der Gruppe der Kontrollpersonen war das Tyr-Allel in der Altersklasse unter 55 Jahren seltener nachzuweisen als in der Altersklasse über 55 Jahre. Der Unterschied war nicht statistisch signifikant.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich in dem Gesamtkollektiv keine statistische Signifikanz fand im Vergleich zwischen Tyr-Allel-Trägern mit KHK oder MI und Trägern des Tyr-Allels ohne KHK oder MI. Es konnte jedoch eine Tendenz festgestellt werden, die zu einer Häufung von Tyr-Allel-Trägern bei Patienten führt, bei denen sich eine KHK oder ein Myokardinfarkt im Alter von 55 Jahren und jünger manifestierte. Diese Häufung war vor allem in der weiblichen Teilgruppe prägnant.

#### 3.4.2 Tyr-Allel in der Gruppe *KHK ohne MI*

##### 3.4.2.1 Vergleich der Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe *KHK ohne MI* und in der Kontrollgruppe

Es findet sich im Gesamtkollektiv keine statistische Signifikanz im Vergleich zwischen Tyr-Allel-Trägern und mit KHK und Tyr-Allel-Trägern ohne KHK. Es konnte das Tyr-Allel in der Gruppe *KHK ohne MI* jedoch häufiger nachgewiesen werden als bei Kontrollpersonen (*KHK*: 10,64 %, *Kontrolle*: 9,38 %). In der univariaten Analyse ergab sich ein P-Wert von 0,4855, der - genau wie der P-Wert der multivariaten Analyse (0,2649) - unter dem 95 %-Signifikanzniveau blieb. In der männlichen (*KHK*: 10,87 %, *Kontrolle*: 9,48 %) und weiblichen (*KHK*: 10,11 %, *Kontrolle*: 9,27 %) Teilgruppe ergaben sich ähnliche Prävalenzen, die ebenfalls nicht statistisch signifikant waren (Tabelle 3.13 auf der nächsten Seite)

**Tabelle 3.13:** Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe *KHK ohne MI* und in der Kontrollgruppe

	KHK ohne MI		Kontrolle		Univariate Analyse ( $\chi^2$ -Test)			Multivariate Analyse (Logistische Regression)		
	%	n	%	n	P	OR	OR (95 %-KI)	P	OR	OR (95 %-KI)
männlich	10,87	65/598	9,48	20/211	0,5711	1,1646	0,6871–1,9741			
weiblich	10,11	27/267	9,27	19/205	0,7592	1,1013	0,5940–2,0418			
alle	10,64	92/865	9,38	39/416	0,4855	1,1505	0,7757–1,7065	0,2649	1,288	0,825–2,010

**Tabelle 3.14:** Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe *KHK ohne MI* und in der Kontrollgruppe in der Altersklasse  $\leq 55$ 

	KHK ohne MI $\leq 55$		Kontrolle $\leq 55$		Univariate Analyse ( $\chi^2$ -Test)		
	%	n	%	n	P	OR	OR (95 %-KI)
männlich	11,4	13/114	7,22	7/97	0,3008	1,6549	0,6325–4,3297
weiblich	15,79	3/19	6,98	3/43	0,2792 <sup>a</sup>	2,5	0,4558–13,7135
alle	12,03	16/133	7,14	10/140	0,1691	1,7778	0,7763–4,0714

<sup>a</sup> P (Fisher-Test): 0,3592

#### 3.4.2.2 Vergleich der Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe *KHK ohne MI* und in der Kontrollgruppe in zwei Altersklassen

Patienten, bei denen sich eine KHK im Alter von unter 55 Jahren manifestiert hatte, waren häufiger Träger des Tyr-Allels als Kontrollpersonen. Es wurde jedoch kein statistisch signifikantes Niveau erreicht (Gruppe *KHK*: 12,03 %, Gruppe *Kontrolle*: 7,14 %,  $P=0,1691$ ). Gleiches galt für die Betrachtung ausschließlich weiblicher als auch ausschließlich männlicher Patienten (Tabelle 3.14). Patientinnen mit KHK wiesen mit einem Anteil von 15,79 % heterozygote Tyr-Allel-Trägerinnen gegenüber 6,98 % in der weiblichen Kontrollgruppe den größten Unterschied in der Prävalenz des Tyr-Allels zwischen den beiden Gruppen auf. In der männlichen *KHK*-Gruppe wurden 11,4 % Tyr-Allel-Träger nachgewiesen, in der Kontrollgruppe waren es 7,22 %.

Patienten, bei denen sich eine KHK im Alter von über 55 Jahren erstmalig manifestierte, wiesen nahezu gleich häufig das Tyr-Allel auf wie es eine Kontrollgruppe des gleichen Alters. In der gemeinsamen Gruppe beider Geschlechter lag die Prävalenz für das Tyr-Allel bei 10,38 %, in der Kontrollgruppe bei 10,51 %. Die weibliche und männliche Subgruppe verhielten sich sehr ähnlich (Tabelle 3.15 auf der nächsten Seite).

**Tabelle 3.15:** Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe *KHK ohne MI* und in der Kontrollgruppe in der Altersklasse >55

	KHK ohne MI >55		Kontrolle >55		Univariate Analyse ( $\chi^2$ -Test)		
	%	n	%	n	P	OR	OR (95 %-KI)
männlich	10,74	52/484	11,4	13/114	0,8387	0,9352	0,4906–1,7828
weiblich	9,68	24/248	9,88	16/162	0,947	0,9777	0,5023– 1,9031
alle	10,38	76/732	10,51	29/276	0,9539	0,9868	0,6278–1,5508

**Tabelle 3.16:** Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe *KHK ohne MI* in den Altersklassen  $\leq 55$  Jahr und >55 Jahre

	KHK ohne MI $\leq 55$		KHK ohne MI >55		Univariate Analyse ( $\chi^2$ -Test)		
	%	n	%	n	P	OR	OR (95 %-KI)
männlich	11,4	13/114	10,74	52/484	0,8387	1,0693	0,5609–2,0385
weiblich	15,79	3/19	9,68	24/248	0,3944	1,7500	0,4755– 6,4405
alle	12,03	16/133	10,38	76/732	0,5707	1,1804	0,6650–2,0953

<sup>a</sup> P (Fisher-Test): 0,7695

#### 3.4.2.3 Vergleich der Prävalenz des Tyr-Allels innerhalb der Gruppe *KHK ohne MI* in zwei Altersklassen

Patienten, bei denen eine KHK im Alter von 55 Jahren und jünger diagnostiziert wurde, waren häufiger Tyr-Allel-Träger als Patienten, bei denen sich eine KHK erst im Alter von über 55 Jahren manifestierte (Gruppe *KHK $\leq 55$* : 12,03 %, Gruppe *KHK $> 55$* : 10,38). Dieser Unterschied blieb bei einem P-Wert von 0,5707 unter dem statistischen Signifikanzniveau. Gleiches galt für die Betrachtung ausschließlich weiblicher wie auch ausschließlich männlicher Patienten (Tabelle 3.16). Patientinnen mit KHK unter 55 Jahren wiesen mit einem Anteil von 15,79 % heterozygoten Trägern gegenüber 9,68 % in der weiblichen Kontrollgruppe den größten Unterschied in der Prävalenz des Tyr-Allels zwischen den beiden Gruppen auf. In der männlichen Subgruppe ergaben sich 11,4 % heterozygote Träger in der KHK-Gruppe und 10,74 % in der Kontrollgruppe.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich im Gesamtkollektiv keine statistische Signifikanz im Vergleich zwischen Trägern des Tyr-Allels mit KHK und Trägern des Tyr-Allels ohne KHK fand. Es konnte jedoch eine Tendenz festgestellt werden, die zu einer Häufung von heterozygoten Trägern bei Patienten führt, bei denen sich eine KHK im Alter von 55 Jahren und jünger manifestierte. Diese Häufung war vor allem in der weiblichen Subgruppe prägnant.

**Tabelle 3.17:** Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe **MI** und in der Kontrollgruppe

	MI		Kontrolle		Univariate Analyse ( $\chi^2$ -Test)			Multivariate Analyse (Logistische Regression)		
	%	n	%	n	P	OR	OR (95 %-KI)	P	OR	OR (95 %-KI)
männlich	9,75	62/636	9,48	20/211	0,9086	1,0315	0,6072–1,7524			
weiblich	11,76	18/153	9,27	19/205	0,4427	1,3053	0,6602–2,5808			
alle	10,14	80/789	9,38	39/416	0,6724	1,0907	0,7292–1,6315	0,1849	1,404	0,850–2,320

### 3.5 Tyr-Allel als Risikofaktor für die Manifestation eines Myokardinfarktes

Es wurde zunächst die Gruppe der Patienten mit einem, zwei oder mehr Myokardinfarkten (Gruppe *MI*,  $n = 789$ ) betrachtet. Zusätzlich wurde dann die Subgruppe der Patienten mit kürzer als einem Jahr zurückliegenden Myokardinfarkt ( $MI_{t > -1}$ ,  $n = 260$ ) getestet, um einer möglichen Selektion der Tyr-Allel-Träger durch stärkere Komplikationen und früheres Versterben an den Folgen des Infarktes gerecht zu werden.

#### 3.5.1 Tyr-Allel in der Gruppe *MI*

##### 3.5.1.1 Vergleich der Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe *MI* und in der Kontrollgruppe

Es fand sich im Gesamtkollektiv keine statistische Signifikanz im Vergleich von Tyr-Allel-Trägern mit *MI* und Trägern des Tyr-Allels ohne *MI* (*MI*: 10,14 %, Kontrolle: 9,38 %,  $P = 0,6724$  univariat bzw. 0,1849 multivariat). Gleiches galt für die Betrachtung ausschließlich weiblicher als auch ausschließlich männlicher Patienten (Tabelle 3.17). Patientinnen mit Myokardinfarkt wiesen mit einem Anteil von 11,76 % heterozygote Träger des Tyr-Allels gegenüber 9,27 % in der weiblichen Kontrollgruppe den größten Unterschied in der Prävalenz des Tyr-Allels zwischen den beiden Gruppen auf.

##### 3.5.1.2 Vergleich der Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe *MI* und in der Kontrollgruppe in zwei Altersklassen

Sowohl weibliche als auch männliche Patienten, die einen Myokardinfarkt in einem Alter von 55 Jahren und weniger erlitten hatten, waren häufiger Tyr-Allel-Träger als weibliche oder männliche Kontrollpersonen im Alter von 55 Jahren und jünger. Diese Abweichung war jedoch statistisch nicht signifikant. Der Unterschied in der Prävalenz

**Tabelle 3.18:** Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe **MI** und in der Kontrollgruppe in der Altersklasse  $\leq 55$  Jahre

	MI $\leq 55$		Kontrolle $\leq 55$		Univariate Analyse ( $\chi^2$ -Test)		
	%	n	%	n	P	OR	OR (95 %-KI)
männlich	10,61	33/311	7,22	7/97	0,3263	1,5262	0,6526–3,5691
weiblich	11,94	8/67	6,98	3/43	0,3971 <sup>a</sup>	1,8079	0,4520–7,2316
alle	10,85	41/378	7,14	10/140	0,2089	1,5816	0,7696–3,2502

<sup>a</sup> P (Fisher-Test): 0,523

**Tabelle 3.19:** Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe **MI** und in der Kontrollgruppe in der Altersklasse  $> 55$  Jahre

	MI $> 55$		Kontrolle $> 55$		Univariate Analyse ( $\chi^2$ -Test)		
	%	n	%	n	P	OR	OR (95 %-KI)
männlich	8,92	29/325	11,4	13/114	0,4385	0,7612	0,3810–1,5207
weiblich	11,63	10/86	9,88	16/162	0,6683	1,2007	0,5197–2,7737
alle	9,49	39/411	10,51	29/276	0,6613	0,8929	0,5379–1,4822

des Tyr-Allels war unter den Patientinnen (MI: 11,94 %, Kontrolle: 6,98 %) deutlicher ausgeprägt als unter den männlichen Patienten (MI: 10,61 %, Kontrolle: 7,22 %) und in der Gesamtgruppe (MI: 10,85 %, Kontrolle: 7,14 %), Tabelle 3.18.

Im Vergleich zwischen den Patienten, die einen Myokardinfarkt mit über 55 Jahren erlitten hatten, und Kontrollpersonen im Alter von über 55 Jahren ergab sich in der Gesamtgruppe und in der männlichen und weiblichen Subgruppe keine einheitliche Tendenz bezüglich der Prävalenzen des Tyr-Allels. Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede deutlich (Tabelle 3.19).

### 3.5.1.3 Vergleich der Prävalenz des Tyr-Allels innerhalb der Gruppe **MI** in zwei Altersklassen

Männliche Patienten, die einen Myokardinfarkt im Alter von 55 Jahren oder jünger erlitten hatten, waren häufiger Tyr-Allel-Träger als Patienten, die einen Infarkt in einem Alter von über 55 erlitten hatten (MI $\leq 55$ : 10,61 %, MI $> 55$ : 8,92 %). Bei einem P-Wert von 0,3008 blieb diese Divergenz unter dem statistischen Signifikanzniveau. Ebenso verhielt sich die Gesamtgruppe, während in der weiblichen Subgruppe eine fast identische Prävalenz vorherrschte (MI $\leq 55$ : 11,94 %, MI $> 55$ : 11,63 %) (Tabelle 3.20 auf der nächsten Seite).

**Tabelle 3.20:** Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe **MI** in den Altersklassen  $\leq 55$  Jahre und  $> 55$  Jahre

	MI $\leq 55$		MI $> 55$		Univariate Analyse ( $\chi^2$ -Test)		
	%	n	%	n	P	OR	OR (95%-KI)
männlich	10,61	33/311	8,92	29/325	0,3008	0,6043	0,2310–1,5810
weiblich	11,94	8/67	11,63	10/86	0,5600 <sup>a</sup>	0,6844	0,1899– 2,4658
alle	10,85	41/378	9,49	39/411	0,2660	0,6552	0,3096–1,3863

<sup>a</sup> P (Fisher-Test): 0,7695

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich im Gesamtkollektiv kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Tyr-Allel-Trägern mit MI und Tyr-Allel-Trägern ohne MI nachweisen ließ. Es konnte jedoch eine Häufung an Tyr-Allel-Trägern unter Patienten festgestellt werden, die einen Infarkt im Alter von 55 Jahren und jünger erlitten hatten. Besonders ausgeprägt fand sich diese Häufung in der weiblichen Subgruppe.

### 3.5.2 Tyr-Allel in der Gruppe der Patienten mit kürzer als einem Jahr zurückliegendem MI (Gruppe $MI_{t>-1}$ )

Die Gruppe  $MI_{t>-1}$  umfasst alle Patienten, bei denen sich der Myokardinfarkt in einem Zeitraum von unter einem Jahr vor Aufnahme in die Studie ereignete. Die getrennte Betrachtung dieser Patienten mit relativ frischem Infarkt ermöglicht den Ausschluss einer eventuellen negativen Selektion der Tyr-Allel-Träger durch mit dem Tyr-Allel assoziierte letale Frühkomplikationen im ersten Jahr nach dem Infarkt.

#### 3.5.2.1 Vergleich der Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe $MI_{t>-1}$ und in der Kontrollgruppe

Patienten mit kürzer als einem Jahr zurückliegendem Myokardinfarkt waren häufiger Träger des Tyr-Allels als Kontrollpersonen; der Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant (MI: 11,54 %, Kontrolle: 9,38 %,  $P = 0,366$  univariat bzw. 0,2003 multivariat). Gleiches galt für die Betrachtung ausschließlich weiblicher als auch ausschließlich männlicher Patienten (Tabelle 3.21 auf der nächsten Seite). Patientinnen mit Zustand nach kürzer als einem Jahr zurückliegendem Myokardinfarkt wiesen mit einem Anteil von 16,07 % heterozygoten Trägern gegenüber 9,27 % in der weiblichen Kontrollgruppe den größten Unterschied in der Prävalenz des Tyr-Allels zwischen den beiden Gruppen auf. Die Prävalenzen des Tyr-Allels in der Gruppe von Patienten

**Tabelle 3.21:** Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe  $MI_{t>-1}$  und in der Kontrollgruppe

	$MI_{t>-1}$		Kontrolle		Univariate Analyse ( $\chi^2$ -Test)			Multivariate Analyse (Logistische Regression)		
	%	n	%	n	P	OR	OR (95 %-KI)	P	OR	OR (95 %-KI)
männlich	10,29	21/204	9,48	20/211	0,7808	1,0959	0,5749–2,0889			
weiblich	16,07	9/56	9,27	19/205	0,1449	1,8746	0,7971–4,4088			
alle	11,54	30/260	9,38	39/416	0,3660	1,2609	0,7621–2,0860	0,2003	1,527	0,799–2,917

**Tabelle 3.22:** Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe  $MI_{t>-1}$  und in der Kontrollgruppe in der Altersklasse  $\leq 55$  Jahre

	$MI_{t>-1}$ $\leq 55$		Kontrolle $\leq 55$ $\leq 55$		Univariate Analyse ( $\chi^2$ -Test)		
	%	n	%	n	P	OR	OR (95 %-KI)
männlich	12,66	10/79	7,22	7/97	0,2242	1,8634	0,6749–5,1443
weiblich	11,76	2/17	6,98	3/43	0,5454 <sup>a</sup>	1,7778	0,2699– 11,7095
alle	12,5	12/96	7,14	10/140	0,1644	1,8571	0,7681–4,4905

<sup>a</sup> P (Fisher-Test): 0,6159

mit einem kürzer als einem Jahr zurückliegendem Myokardinfarkt lagen in allen Subgruppen über den Prävalenzen der Gruppe aller Myokardinfarkte. Dieser Unterschied erwies sich aber als statistisch nicht signifikant.

### 3.5.2.2 Vergleich der Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe $MI_{t>-1}$ und in der Kontrollgruppe in zwei Altersklassen

Weibliche wie auch männliche Patienten, die einen kürzer als ein Jahr zurückliegenden Myokardinfarkt in einem Alter von 55 Jahren und weniger erlitten hatten, waren häufiger Tyr-Allel-Träger als weibliche oder männliche Kontrollpersonen im Alter von 55 Jahren und weniger ( $MI_{t>-1}$ : 12,5 %, Kontrolle: 7,14 %). Bei einem P-Wert von 0,1644 erreichte dies nicht das Signifikanzniveau. Der Unterschied in der Prävalenz des Tyr-Allels war unter den Patientinnen ( $MI_{t>-1}$ : 11,76 %, Kontrolle: 6,98 %) gleichermaßen ausgeprägt wie unter den männlichen Patienten ( $MI_{t>-1}$ : 12,66 %, Kontrolle: 7,22 %) (siehe Tabelle 3.22).

Im Vergleich zwischen den Patienten, die einen kürzer als ein Jahr zurückliegenden Myokardinfarkt mit über 55 Jahren erlitten hatten, und Kontrollpersonen im Alter von über 55 Jahren ergab sich in der Gesamtgruppe und der männlichen und weiblichen



### 3 Ergebnisse

**Tabelle 3.23:** Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe  $MI_{t>-1}$  und in der Kontrollgruppe in der Altersklasse >55 Jahre

	$MI_{t>-1}$ >55		Kontrolle >55		Univariate Analyse ( $\chi^2$ -Test)		
	%	n	%	n	P	OR	OR (95 %-KI)
männlich	8,8	11/125	11,4	13/114	0,5036	0,7497	0,3216–1,7477
weiblich	17,95	7/39	9,88	16/162	0,1551 <sup>a</sup>	1,9961	0,7589– 5,2502
alle	10,98	18/164	10,51	29/276	0,8778	1,0501	0,5634–1,9573

<sup>a</sup> P (Fisher-Test): 0,1657

**Tabelle 3.24:** Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe  $MI_{t>-1}$  in den Altersklassen  $\leq 55$  Jahre und >55 Jahre

	$MI_{t>-1}$ $\leq 55$		$MI_{t>-1}$ >55		Univariate Analyse ( $\chi^2$ -Test)		
	%	n	%	n	P	OR	OR (95 %-KI)
männlich	12,66	10/79	8,8	11/125	0,3770	1,5020	0,6064–3,7204
weiblich	11,76	2/17	17,95	7/39	0,5623 <sup>a</sup>	0,6095	0,1128– 3,2931
alle	12,5	12/96	10,98	18/164	0,7104	1,1587	0,5321–2,5232

<sup>a</sup> P (Fisher-Test): 0,7072

Subgruppe keine einheitliche Tendenz bezüglich der Prävalenzen des Tyr-Allels. Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede deutlich (Tabelle 3.23).

#### 3.5.2.3 Vergleich der Prävalenz innerhalb der Gruppe $MI_{t>-1}$ in zwei Altersklassen

Männliche Patienten, die einen kürzer als ein Jahr zurückliegenden Myokardinfarkt im Alter von 55 Jahren oder jünger erlitten hatten, waren häufiger Tyr-Allel-Träger als Patienten, die einen Infarkt in einem Alter von über 55 erlitten hatten ( $MI_{\leq 55}$ : 12,66 %,  $MI_{>55}$ : 8,8 %). Bei einem P-Wert von 0,377 war diese Divergenz statistisch nicht signifikant. Ebenso verhielt sich die Gesamtgruppe, während in der weiblichen Subgruppe in der Altersklasse unter 55 Jahren eine geringere Prävalenz vorherrschte ( $MI_{\leq 55}$ : 11,76 %,  $MI_{>55}$ : 17,95 %) (Tabelle 3.24).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich im Gesamtkollektiv keine statistische Signifikanz im Vergleich zwischen Trägern des Tyr-Allels mit kürzer als einem Jahr zurückliegendem Myokardinfarkt und Tyr-Allel-Trägern mit zeitlich nicht definiertem Infarkt bzw. ohne Myokardinfarkt feststellen ließ. Wie bereits bei der Betrachtung der Gruppe  $MI$  beobachtet, konnte jedoch eine Tendenz festgestellt werden,

**Tabelle 3.25:** Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe  $MI_{z \geq 2}$  und in der Kontrollgruppe

	$MI_{z \geq 2}$		Kontrolle		Univariate Analyse ( $\chi^2$ -Test)			Multivariate Analyse (Logistische Regression)		
	%	n	%	n	P	OR	OR (95 %-KI)	P	OR	OR (95 %-KI)
männlich	11,02	13/118	9,48	20/211	0,6560	1,1824	0,5654–2,4726			
weiblich	20,83	5/24	9,27	19/205	0,0801 <sup>a</sup>	2,5762	0,8641–7,6806			
alle	12,68	18/142	9,38	39/416	0,2621	1,4032	0,7746–2,5421	<b>0,0175</b>	<b>2,781</b>	<b>1,197–6,464</b>

<sup>a</sup> P (Fisher-Test): 0,1481

die zu einer Häufung von heterozygoten Trägern bei Patienten führte, die einen Infarkt im Alter von 55 Jahren und jünger erlitten hatten.

### 3.6 Tyr-Allel als Risikofaktor für Reinfarkte

Es wurde die Gruppe der Patienten mit zwei oder mehr Myokardinfarkten ( $MI_{z \geq 2}$ ,  $n = 142$ ) mit der Kontrollgruppe ( $n = 416$ ) und der Gruppe der Patienten mit einem Myokardinfarkt ( $MI_{z=1}$ ,  $n = 647$ ) verglichen.

#### 3.6.1 Vergleich der Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe der Patienten mit zwei oder mehr MI (Gruppe $MI_{z \geq 2}$ ) und in der Kontrollgruppe

Patienten mit zwei oder mehr Myokardinfarkten waren in der multivariaten Analyse signifikant häufiger Träger des Tyr-Allels als Kontrollpersonen (Tabelle 3.25). Die Prävalenz des Tyr-Allels betrug in der Gruppe der Patienten mit zwei oder mehr Infarkten 12,68 %, in der Kontrollgruppe dagegen 9,38 %. Multivariat ergab sich für heterozygote Träger des Tyr-Allels mit zwei oder mehr Myokardinfarkten ein relatives Risiko von 2,781 gegenüber Kontrollpersonen, der P-Wert betrug 0,0175. In der univariaten Analyse blieb der P-Wert ( $P = 0,2621$ ) über der 0,05-Signifikanzmarke. Vor allem in der weiblichen Subgruppe zeigte sich ein prägnanter Unterschied ( $MI_{z \geq 2}$ : 20,83 %, Kontrolle: 9,27 %), der allerdings nicht statistisch signifikant war ( $P = 0,0801$ ). In der männlichen Subgruppe wurden in der Gruppe  $MI_{z \geq 2}$  11,02 % und in der Kontrollgruppe 9,48 % heterozygote Träger nachgewiesen ( $P = 0,656$ ).

**Tabelle 3.26:** Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe  $MI_{z \geq 2}$  und in der Kontrollgruppe in der Altersklasse  $\leq 55$  Jahre

	$MI_{z \geq 2} \leq 55$		Kontrolle $\leq 55$		Univariate Analyse ( $\chi^2$ -Test)		
	%	n	%	n	P	OR	OR (95 %-KI)
männlich	13,70	10/73	7,22	7/97	0,1632	2,0408	0,7373–5,6490
weiblich	30,77	4/13	6,98	3/43	<b>0,0230<sup>a</sup></b>	<b>5,9259</b>	<b>1,1240– 31,2425</b>
alle	16,28	14/86	7,14	10/140	<b>0,0304</b>	<b>2,5278</b>	<b>1,0685–5,9799</b>

<sup>a</sup> P (Fisher-Test): 0,0434

### 3.6.2 Vergleich der Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe $MI_{z \geq 2}$ und in der Kontrollgruppe in zwei Altersklassen

Patienten, die im Alter von 55 Jahren oder weniger bereits zwei oder mehr Myokardinfarkte erlitten hatten, waren signifikant häufiger Träger des Tyr-Allels als Kontrollpersonen: 16,28 % der Patienten mit zwei oder mehr Infarkten bis 55 Jahren waren heterozygote Träger des Tyr-Allels, jedoch nur 7,14 % in der Kontrollgruppe (Tabelle 3.26).

Bei einem P-Wert von 0,0304 ergab sich für Träger des Tyr-Allels im Vergleich mit Trägern des Wildtyps ein relatives Risiko von 2,5278 für das Erleiden von zwei oder mehr Herzinfarkten. Ein noch höheres relatives Risiko ergab sich für Frauen im Alter von bis zu 55 Jahren: Sie tragen als Tyr-Allel-Trägerinnen ein um 5,9259 erhöhtes relatives Risiko, zwei oder mehr Herzinfarkte zu erleiden, als homozygote Trägerinnen des Phe-Allels.

In der Gruppe der Frauen bis zu 55 Jahren mit zwei oder mehr Myokardinfarkten wurden 30,77 % heterozygote Trägerinnen nachgewiesen, in der Kontrollgruppe waren es 6,98 % (P = 0,0230).

Dagegen zeigt sich in der männlichen Subgruppe zwar auch eine Häufung der heterozygoten Träger in der Gruppe der bis zu 55-Jährigen mit zwei oder mehr Myokardinfarkten (Prävalenz  $MI_{z \geq 2} \leq 55$ : 13,7 %, Kontrolle  $\leq 55$ : 7,22 %), bei einem P-Wert von 0,1623 konnte hieraus jedoch keine signifikante Steigerung des relativen Risikos abgeleitet werden.

Im Vergleich der Prävalenzen des Tyr-Allels in der Gruppe  $MI_{z \geq 2}$  und der Kontrollgruppe in der Altersklasse über 55 Jahre fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede. In der weiblichen Subgruppe ergaben sich nahezu identische Prävalenzen in beiden Gruppen, in der männlichen Subgruppe und in der Gesamtgruppe wurden mehr Tyr-Allel-Träger in der Altersgruppe über 55 Jahre nachgewiesen.

**Tabelle 3.27:** Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe  $MI_{z \geq 2}$  und in der Kontrollgruppe in der Altersklasse >55 Jahre

	$MI_{z \geq 2} > 55$		Kontrolle >55		Univariate Analyse ( $\chi^2$ -Test)		
	%	n	%	n	P	OR	OR (95 %-KI)
männlich	6,67	3/45	11,4	13/114	0,3711 <sup>a</sup>	0,5549	0,1503–2,0484
weiblich	9,09	1/11	9,88	16/162	0,9325 <sup>b</sup>	0,9125	0,1096–7,5979
alle	7,14	4/56	10,51	29/276	0,4429 <sup>c</sup>	0,6552	0,2209–1,9434

<sup>a</sup> P (Fisher-Test): 0,5596<sup>b</sup> P (Fisher-Test): 1<sup>c</sup> P (Fisher-Test): 0,6245**Tabelle 3.28:** Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe  $MI_{z \geq 2}$  in den Altersklassen  $\leq 55$  Jahre und >55 Jahre

	$MI_{z \geq 2} \leq 55$		$MI_{z \geq 2} > 55$		Univariate Analyse ( $\chi^2$ -Test)		
	%	n	%	n	P	OR	OR (95 %-KI)
männlich	13,7	10/73	6,67	3/45	0,2360 <sup>a</sup>	2,2222	0,5772–8,5548
weiblich	30,77	4/13	9,09	1/11	0,1926 <sup>b</sup>	4,4444	0,4158–47,5028
alle	16,28	14/86	7,14	4/56	0,1098	2,5278	0,7869–8,1204

<sup>a</sup> P (Fisher-Test): 0,3652<sup>b</sup> P (Fisher-Test): 0,3271

### 3.6.3 Vergleich der Prävalenz des Tyr-Allels innerhalb der Gruppe $MI_{z \geq 2}$ in zwei Altersklassen

Patienten, die zwei oder mehr Myokardinfarkte im Alter von bis zu 55 Jahren erlitten hatten, waren häufiger Tyr-Allel-Träger als Patienten, die zwei oder mehr Myokardinfarkte im Alter von über 55 Jahren erlitten hatten. Die Divergenz zeigte sich sowohl in der Gesamtgruppe ( $MI_{z \geq 2} \leq 55$ : 16,28 %,  $MI_{z \geq 2} > 55$ : 7,14 %), als auch in der weiblichen ( $MI_{z \geq 2} \leq 55$ : 30,77 %,  $MI_{z \geq 2} > 55$ : 9,09 %) und männlichen Subgruppe ( $MI_{z \geq 2} \leq 55$ : 13,7 %,  $MI_{z \geq 2} > 55$ : 6,67 %), war jedoch in keiner der drei Gruppen statistisch signifikant (Tabelle 3.28).

### 3.6.4 Vergleich der Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe $MI_{z \geq 2}$ und in der Gruppe der Patienten mit genau einem MI (Gruppe $MI_{z=1}$ )

Patienten mit zwei oder mehr Myokardinfarkten wiesen das Tyr-Allel häufiger auf als Patienten mit nur einem Myokardinfarkt ( $MI_{z \geq 2}$ : 12,68 %,  $MI_{z=1}$ : 9,58 %), dies jedoch unter dem 95 %-Signifikanzniveau (Tabelle 3.29 auf der nächsten Seite). In der männlichen wie auch in der weiblichen Subgruppe konnte die gleiche Beobachtung gemacht

**Tabelle 3.29:** Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe  $MI_{z \geq 2}$  und in der Gruppe  $MI_{z=1}$ 

	$MI_{z \geq 2}$		$MI_{z=1}$		Univariate Analyse ( $\chi^2$ -Test)			Multivariate Analyse (Logistische Regression)		
	%	n	%	n	P	OR	OR (95%-KI)	P	OR	OR (95%-KI)
männl.	11,02	13/118	9,46	49/518	0,6067	1,185	0,6205–2,2633			
weibl.	20,83	5/24	10,08	13/129	0,1332 <sup>a</sup>	2,3482	0,7512–7,3406			
alle	12,68	18/142	9,58	62/647	0,2688	1,3697	0,7828–2,3964	0,1677	1,501	0,843–2,675

<sup>a</sup> P (Fisher-Test):0,1637

**Tabelle 3.30:** Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe  $MI_{z \geq 2}$  und in der Gruppe  $MI_{z=1}$  in der Altersklasse  $\leq 55$  Jahre

	$MI_{z \geq 2} \leq 55$		$MI_{z=1} \leq 55$		Univariate Analyse ( $\chi^2$ -Test)		
	%	n	%	n	P	OR	OR (95%-KI)
männlich	13,7	10/73	9,66	23/238	0,3275	1,4838	0,6709–3,2816
weiblich	30,77	4/13	7,41	4/54	<b>0,0197<sup>a</sup></b>	<b>5,5556</b>	<b>1,1709– 26,3599</b>
alle	16,28	14/86	9,25	27/292	0,0653	1,9084	0,9514–3,8281

<sup>a</sup> P (Fisher-Test):0,04

werden; auch hier wurde dabei keine statistische Signifikanz erreicht. Besonders ausgeprägt war der Unterschied unter den Patientinnen mit 20,83 % heterozygoten Trägerinnen in der Gruppe  $MI$  und 10,08 % unter den Patientinnen mit einem Infarkt.

### 3.6.5 Vergleich der Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe $MI_{z \geq 2}$ und in der Gruppe $MI_{z=1}$ in zwei Altersklassen

Patientinnen, die ein oder mehr Myokardinfarkte mit bis zu 55 Jahren erlitten hatten, waren signifikant häufiger Träger des Tyr-Allels als Patientinnen, die mit bis zu 55 Jahren nur einen Herzinfarkt erlitten haben: In der ersten Gruppe fanden sich 30,77 % heterozygote Trägerinnen, in der zweiten nur 7,41 %,  $P = 0,0197$ . Patientinnen mit Tyr-Allel und bereits einem erlittenem Herzinfarkt trugen damit gegenüber Frauen ohne das Tyr-Allel ein um 5,56 erhöhtes relatives Risiko, einen Reinfarkt zu erleiden. Auch in der Gesamtgruppe ( $MI_{z \geq 2} \leq 55$ : 16,28 %,  $MI_{z=1} \leq 55$ : 9,25 %) und in der männlichen Subgruppe ( $MI_{z \geq 2} \leq 55$ : 13,7 %,  $MI_{z=1} \leq 55$ : 9,66 %) zeigte sich eine Tendenz wie bei den Frauen, jedoch fand sich hier keine statistische Signifikanz.

Im Vergleich der Prävalenzen des Tyr-Allels in der Gruppe  $MI_{z \geq 2}$  und in der Gruppe  $MI_{z=1}$  in der Altersklasse über 55 Jahre zeigte sich in der Gruppe der Patienten mit nur einem Myokardinfarkt eine höhere Prävalenz des Tyr-Allels als in der Gruppe der

**Tabelle 3.31:** Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe  $MI_{z \geq 2}$  und in der Gruppe  $MI_{z=1}$  in der Altersklasse  $>55$ 

	$MI_{z \geq 2} > 55$		$MI_{z=1} > 55$		Univariate Analyse ( $\chi^2$ -Test)		
	%	n	%	n	P	OR	OR (95 %-KI)
männlich	6,67	3/45	9,29	26/280	0,5673 <sup>a</sup>	0,6978	0,2022–2,4086
weiblich	9,09	1/11	12	9/75	0,7787 <sup>b</sup>	0,7333	0,0837– 6,4253
alle	7,14	4/56	9,86	35/355	0,5192	0,7033	0,2400–2,0610

<sup>a</sup> P (Fisher-Test): 0,7797<sup>b</sup> P (Fisher-Test): 1**Tabelle 3.32:** Prävalenz des Tyr-Allels in der Gruppe  $MI_{z=1}$  in den Altersklassen  $\leq 55$  Jahre und  $>55$  Jahre

	$MI_{z=1} \leq 55$		$MI_{z=1} > 55$		Univariate Analyse ( $\chi^2$ -Test)		
	%	n	%	n	P	OR	OR (95 %-KI)
männlich	9,66	23/238	9,29	26/280	0,8835	1,0451	0,5795–1,8848
weiblich	7,41	4/54	12,00	9/75	0,5141	0,6600	0,1881 – 2,3157
alle	9,25	27/292	9,86	35/355	0,8769	0,9589	0,5640–1,6305

Patienten mit zwei oder mehr Myokardinfarkten, es wurde jedoch keine statistische Signifikanz erreicht.

### 3.6.6 Vergleich der Prävalenz des Tyr-Allels innerhalb der Gruppe $MI_{z=1}$ in zwei Altersklassen

Innerhalb der Gruppe der Patienten mit einem Myokardinfarkt zeigte sich in der Gesamtgruppe und in der männlichen Subgruppe eine homogene Verteilung des Tyr-Allels zwischen den Gruppen der unter und über 55-Jährigen. Lediglich die weibliche Subgruppe wies mit 7,41 % heterozygoten Trägern in der Altersklasse  $\leq 55$  Jahre eine Divergenz zu der Altersklasse der über 55-Jährigen mit 12 % auf, die jedoch nicht das 95 %-Signifikanzniveau überschritt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das Tyr-Allel bei Frauen unter 55 Jahren zu einem signifikant erhöhten Risiko führte, zwei oder mehr Myokardinfarkte zu erleiden bzw. nach einem Myokardinfarkt einen Reinfarkt zu erleiden. Sowohl in der Gesamtgruppe beider Geschlechter als auch in der männlichen Subgruppe war die gleiche Tendenz ersichtlich, konnte jedoch nicht als statistisch signifikant nachgewiesen werden.

### 3.7 Lifetable-Analyse

Es wurde eine auf dem Cox-Proportional-Hazard-Modell basierende multivariate Regression angewandt, anhand derer auf Grundlage unterschiedlicher Schweregrade der KHK ein Einfluss des Tyr-Allels auf das durchschnittliche Alter bei Myokardinfarkt geprüft wurde (Cox 1972). Mittels dieses Verfahrens wird zwischen einem Einfluss des Tyr-Allels auf die Arteriosklerose und einem Einfluss des Tyr-Allels auf die Thrombogenität differenziert, indem das Tyr-Allel hier nicht in ein Verhältnis zum Grad der KHK gesetzt wird, sondern auf eine Assoziation getestet wird zwischen dem Tyr-Allel und dem Lebensalter bei Myokardinfarkt bei bestehender 1-, 2- oder 3-Gefäßerkrankung (?). Ein Einfluss des Tyr-Allels auf die Thrombogenität würde sich in einer bei Tyr-Allel-positiven Patienten im Vergleich zu Tyr-Allel-negativen Patienten vorzeitigen Manifestation eines MI bei gleichem Schweregrad der KHK äußern.

Für das Modell wurde der Ereigniszeitpunkt als das Lebensalter bei erstem Myokardinfarkt festgelegt. Die Gruppe der Patienten mit Myokardinfarkt und bestehender KHK wurde dem Schweregrad der KHK folgend eingeteilt in die Subgruppen 1-, 2- oder 3-Gefäßerkrankung. Jede Subgruppe wurde eingeteilt in die Gruppe *MI* mit Tyr-Allel-positivem Status und die Gruppe *MI* mit Tyr-Allel-negativem Status. Für jede dieser Subgruppen wurde der Median für das Alter bei Myokardinfarkt bestimmt (siehe Tabelle 3.33 auf der nächsten Seite). Eine zweite Lifetable-Analyse wurde mit der Gruppe der Patienten durchgeführt, die einen Myokardinfarkt innerhalb des letzten Jahres erlitten haben (siehe Tabelle 3.34 auf der nächsten Seite).

Sowohl für die 2- als auch 3-Gefäßerkrankung ergaben sich negative Differenzen im Vergleich des Medians für Tyr-Allel-positive Individuen und Tyr-Allel-negative Individuen in der Gruppe *MI* als auch in der Gruppe  $MI_{t>-1}$ . In diesen Gruppen haben Tyr-Allel-Träger im Schnitt bis zu sieben Jahre früher einen Myokardinfarkt erlitten als Patienten ohne nachweisbares Tyr-Allel. Statistisch signifikant wurde diese Differenz in der Gruppe der Patienten, die auf Grundlage einer 2-Gefäßerkrankung einen Myokardinfarkt innerhalb des letzten Jahres erlitten hatten: Der Median für das Alter bei Myokardinfarkt lag in dieser Gruppe für Tyr-Allel-Träger vier Jahre unter dem Median für Patienten mit Wildtyp. In der multivariaten Analyse ergab sich dafür ein P-Wert von 0,04.

In Abbildung 3.2 auf Seite 77 ist für Patienten mit 2-Gefäßerkrankung der Anteil der Patienten mit Myokardinfarkt (Ordinate) gegen das Lebensalter der Patienten (Abszisse) aufgetragen. In rot sind die Patienten mit Tyr-Allel-positivem Status, in schwarz die Patienten mit Tyr-Allel-negativen Status dargestellt. An dem unterschiedlichen

### 3 Ergebnisse

**Tabelle 3.33:** Uni- und multivariate Analyse für vorzeitiges Auftreten des Myokardinfarktes in Abhängigkeit vom Tyr-Allel und Grad der KHK

	Alter bei MI					
	Tyr-Allel-positiv			Tyr-Allel-negativ		
	n	Median	95 %-KI	n	Median	95 %-KI
1-Gefäßerkrankung	24/209	57,9232	51,8127–60,2788	185/209	53,135	50,7529–54,9110
2-Gefäßerkrankung	20/193	49,1712	46,3881–57,0576	173/193	56,4029	53,1345–57,4560
3-Gefäßerkrankung	35/385	56,5374	51,2973–60,6303	350/385	56,6122	55,4054–58,0128
	Mediandifferenz (Tyr-Allel-positiv – Tyr-Allel-negativ)				Analyse	
					univariat P	multivariat P
	1-Gefäßerkrankung	4,7882			0,5077	0,66
2-Gefäßerkrankung	-7,2317			0,5309	0,31	
3-Gefäßerkrankung	-0,0748			0,7222	0,68	

**Tabelle 3.34:** Uni- und multivariate Analyse für vorzeitiges Auftreten des Myokardinfarktes bei Patienten mit kürzer als einem Jahr zurückliegendem Myokardinfarkt in Abhängigkeit vom Tyr-Allel und Grad der KHK

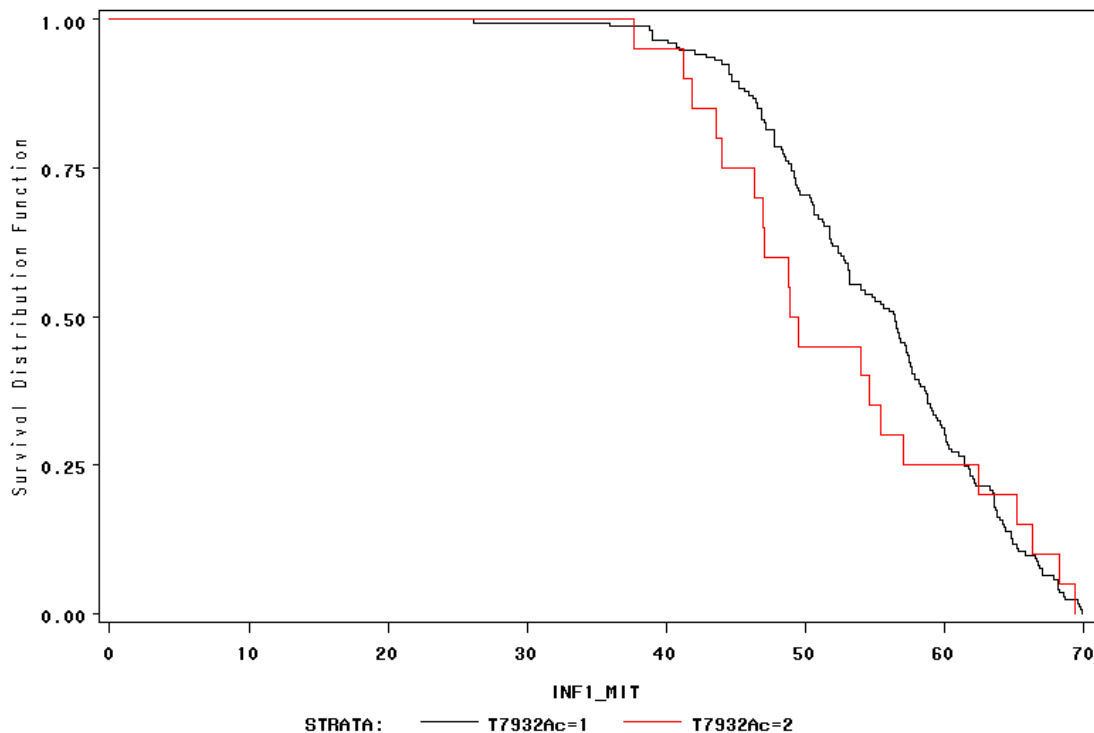
	Alter bei MI					
	Tyr-Allel-positiv			Tyr-Allel-negativ		
	n	Median	95 %-KI	n	Median	95 %-KI
1-Gefäßerkrankung	11/93	59,0926	43,7015–62,6738	82/93	53,2116	50,4244–57,0818
2-Gefäßerkrankung	8/77	55,8245	43,9820–66,3290	69/77	59,977	57,5238–61,8799
3-Gefäßerkrankung	10/89	59,2017	52,0644–65,3256	79/89	60,2234	57,3236–62,4904
	Mediandifferenz (Tyr-Allel-positiv – Tyr-Allel-negativ)				Analyse	
					univariat P	multivariat P
	1-Gefäßerkrankung	5,8810			0,8554	0,86
2-Gefäßerkrankung	-4,1525			0,7949	<b>0,04</b>	
3-Gefäßerkrankung	-1,0217			0,9563	0,94	

Verlauf der roten und schwarzen Kurve lässt sich ablesen, dass im Lebensalter zwischen 40-55 Jahren ein größerer Anteil der Tyr-Allel-Träger als der Wildtyp-Individuen einen Herzinfarkt erlitt. Die Differenz des Medians für das Alter bei Myokardinfarkt betrug zwischen den Gruppe der Polymorphismus-Träger und der Individuen vom Wildtyp 7,23 Jahre, war allerdings in der Gruppe aller Myokardinfarkte nicht statistisch signifikant (P = 0,5309 univariat und P = 0,31 multivariat).

In Abbildung 3.3 auf Seite 78 und Abbildung 3.4 auf Seite 79 ist für Patienten mit 2-Gefäßerkrankung der Anteil der Patienten mit Myokardinfarkt innerhalb des letz-



### 3 Ergebnisse

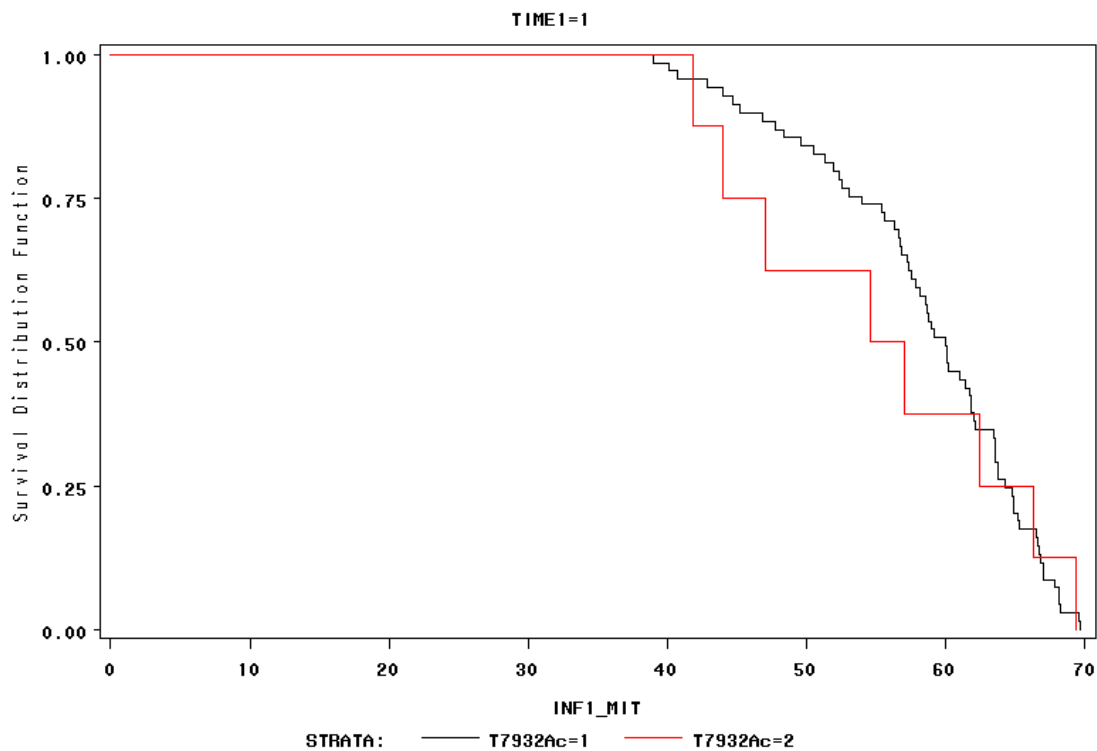


**Abbildung 3.2:** Lifetable-Analyse: Patienten mit 2-Gefäßerkrankung. Der Anteil der Patienten mit Myokardinfarkt (Ordinate) ist gegen das Lebensalter der Patienten (Abszisse) aufgetragen. Das vorzeitige Auftreten des Infarktes bei Tyr-Allel-Trägern ist statistisch nicht signifikant ( $P=0,5309$  univariat,  $P=0,31$  multivariat).

ten Jahres (Ordinate) gegen das Lebensalter der Patienten (Abszisse) aufgetragen. In rot sind die Patienten mit Tyr-Allel-positivem Status, in schwarz die Patienten mit Tyr-Allel-negativem Genotyp dargestellt. Wie schon in Abbildung 3.2 lässt sich an dem unterschiedlichen Verlauf der roten und schwarzen Kurve ablesen, dass im Lebensalter zwischen 40 und 55 Jahren ein größerer Anteil der Tyr-Allel-Träger als der Wildtyp-Individuen einen Herzinfarkt erlitt. Für die hier betrachtete Gruppe der Myokardinfarkte innerhalb des letzten Jahres betrug die Differenz der Mediane 4,15 Jahre. In der multivariaten Analyse konnte dieser Unterschied als statistisch signifikant nachgewiesen werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass bei Betrachtung der Gruppe von Patienten, die auf Grundlage einer 2-Gefäßerkrankung einen Myokardinfarkt erlitten hatten, eine Vorzeitigkeit für das Erleiden des Myokardinfarktes bei den Tyr-Allel-

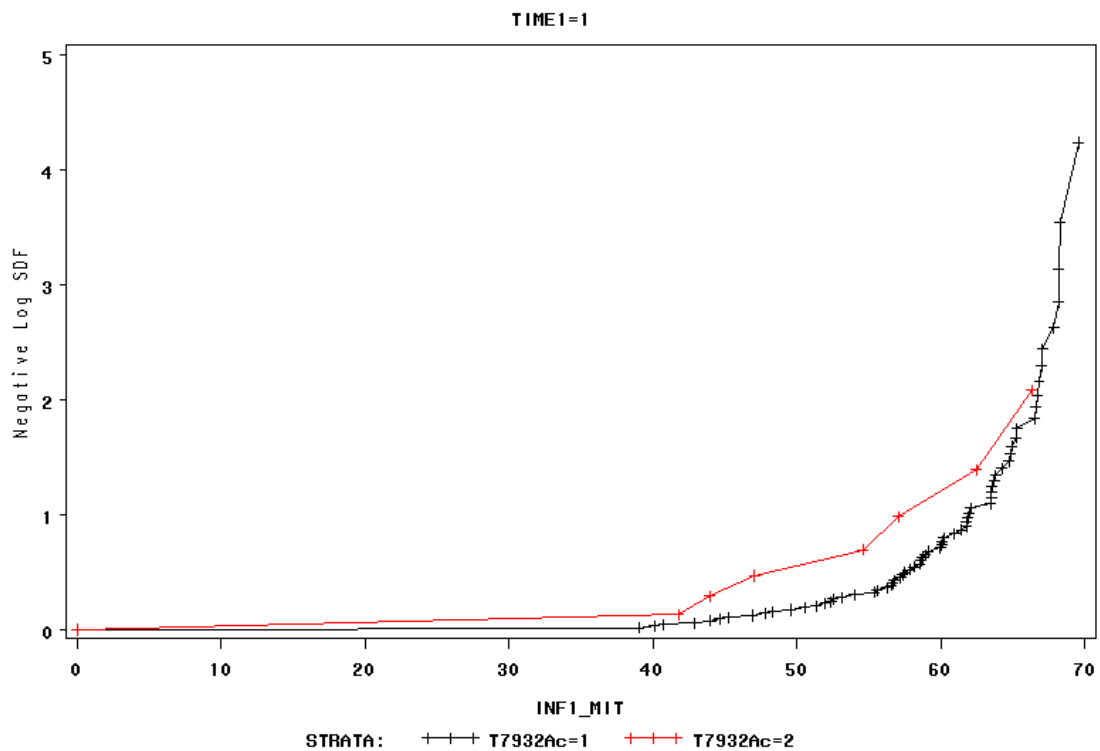
### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.3:** Lifetable-Analyse: Patienten mit 2-Gefäßerkrankung. Der Anteil der Patienten mit Myokardinfarkt innerhalb des letzten Jahres (Ordinate) ist gegen das Lebensalter der Patienten (Abszisse) aufgetragen. Das vorzeitige Auftreten des Infarktes bei Tyr-Allel-Trägern ist in der multi-variaten Analyse statistisch signifikant ( $P=0,04$ ).

Träger auffällig erschien. Diese war in der Gruppe aller MI-Patienten nicht statistisch signifikant, während sich das Ergebnis in der Gruppe der Patienten, die den Myokardinfarkt innerhalb des letzten Jahres vor Eintritt in die Studie erlitten hatten, in der multivariaten Analyse als statistisch signifikant beweisen ließ. Diese Vorzeitigkeit ließ sich jedoch nicht in den Gruppen der Patienten, die einen Myokardinfarkt auf Grundlage einer 1-oder 3-Gefäßerkrankung erlitten hatten, dokumentieren. Insgesamt ließ sich daher anhand der Lifetable-Analyse keine sichere Aussage über ein mögliches vorzeitiges Erleiden eines Myokardinfarktes und eine mögliche Steigerung der Thrombogenität bei Tyr-Allel-Trägern machen.

### 3 Ergebnisse

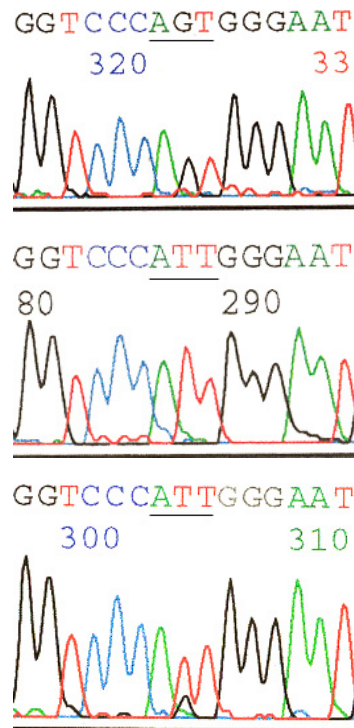


**Abbildung 3.4:** Lifetable-Analyse: Anteil der Patienten mit 2-Gefäßerkrankung und Myokardinfarkt innerhalb des letzten Jahres gegen Lebensalter in der logarithmischen Darstellung.

### 3.8 Andere detektierte Mutationen

Wie bereits in Abschnitt 2.2.2.1 auf Seite 25 geschildert, konnte in der Phase der Optimierung der PCR der bisher unveröffentlichte Polymorphismus (7740C/A) mit dem Austausch von Cytosin gegen Adenin im Intron Nr. 44 des VWF-Gens identifiziert werden (Abbildung 3.5 auf der nächsten Seite). Da dieser Polymorphismus die Detektion des Zielpolymorphismus in der DHPLC-Analyse störte, konnten lediglich im Rahmen der Optimierung zehn Patienten auf diesen Polymorphismus hin untersucht werden, bevor die folgenden Analysen dann die Amplifizierung eines verkleinerten DNA-Abschnittes erforderten, der den Polymorphismus 7740C/A ausklammerte. Unter den zehn auf den Polymorphismus 7740C/A untersuchten Patienten fanden sich zwei mit Normalsequenz, sechs mit einem heterozygotem Genotyp und zwei mit einem homozygotem Genotyp für diesen Polymorphismus.

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.5:** Sequenz des Polymorphismus 7740C/A im Intron 44 des VWF-Gens in 3'-5'-Richtung. Oben: Wildtyp-Sequenz des Polymorphismus 7740C/A; unterstrichen ist das Triplet des Polymorphismus (3'-AGT-5'). Mitte: homozygotes Vorliegen; im unterstrichenen Triplet erkennt man in 3'-5'-Richtung homozygot die Base T statt der Wildtypbase G. Unten: heterozygotes Vorliegen des Polymorphismus 7740C/A; unter dem Peak der Base T erscheint ein Peak des Wildtyp-Allels mit der Base G.

In der weiteren molekularbiologischen Analyse zur Detektion des Polymorphismus F/Y 2561 erlaubte das gewählte Verfahren auch andere Mutationen in dem amplifizierten DNA-Abschnitt zu entdecken. Zwei weitere Mutationen konnten so bei jeweils einem Patienten identifiziert werden: die stumme Mutation C7930T sowie die Mutation C7913G, die einen Aminosäureaustausch von Prolin zu Adenin bewirkt. Beide Patienten weisen für den F/Y 2561-Polymorphismus die Normalsequenz auf. Der Träger der stummen Mutation gehört der Gruppe  $MI_{z=1}$  an, der Patient mit der Mutation C7913G der Gruppe *KHK ohne MI*. Beide Mutationen sind in den Abschnitten 2.2.6.4 auf Seite 45 sowie 2.2.4.5 auf Seite 37 ausführlich beschrieben.

## 4 Diskussion

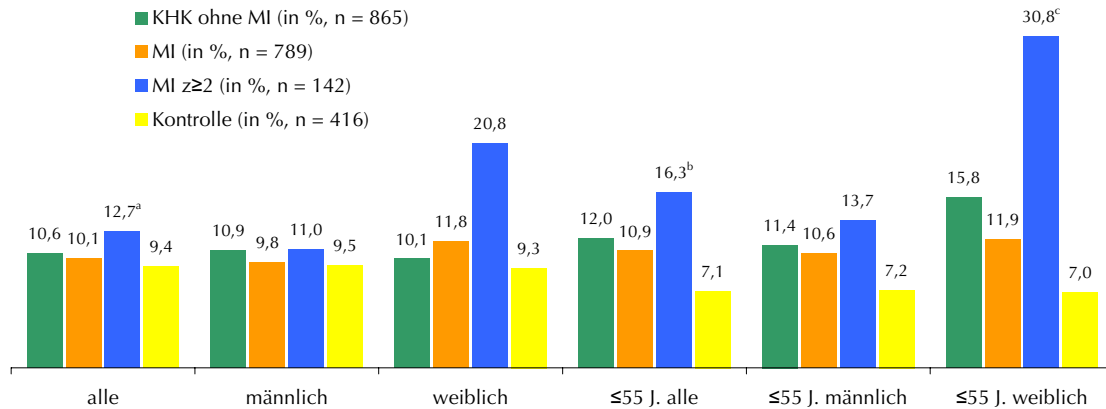
In der vorliegenden Studie wurde die Prävalenz des Tyr-Allels des F/Y2561-Polymorphismus in verschiedenen Subgruppen eines an KHK oder MI erkrankten Kollektivs bestimmt und mit der Prävalenz in einer nicht erkrankten Kontrollgruppe verglichen. Die Unterschiede wurden in einer univariaten und multivariaten Analyse auf statistische Signifikanz getestet. Ziel der Untersuchung war es, eine durch Schlingmann (2000) in einem kleineren und rein männlichen Kollektiv vermutete Assoziation zwischen dem Tyr-Allel und dem Auftreten von koronarer Herzkrankheit und Myokardinfarkt zu bestätigen oder zu entkräften.

Im folgenden Kapitel werden zunächst die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung interpretiert (Abschnitt 4.1). Danach wird auf die Interaktion des Von-Willebrand-Faktors mit Thrombozyten näher eingegangen und die mögliche Beeinflussung dieser durch Polymorphismen besonders beleuchtet (Abschnitt 4.2). Sodann wird das Ergebnis der vorliegenden Studie in die Literatur eingeordnet (Abschnitt 4.3) und abschließend die Schlußfolgerung formuliert (Abschnitt 2.7).

### 4.1 Interpretation der Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung

Nach Auswertung der Ergebnisse der vorliegenden Studie ist davon auszugehen, dass das Tyr-Allel mit dem Auftreten von Reinfarkten bei Frauen in der Altersklasse unter 55 Jahren assoziiert ist. Es ergibt sich für weibliche Tyr-Allel-Träger in der Altersklasse  $\leq 55$  Jahren ein relatives Risiko von 5,93 (95 %KI: 1,12–31,24) für die Manifestation von zwei oder mehr Myokardinfarkten gegenüber gleichaltrigen Frauen mit Phe-Allel. Man kann das Tyr-Allel somit mit dem Auftreten von Reinfarkten bei Frauen bereits in jungen Jahren assoziieren. Das relative Risiko für Tyr-Allel-Trägerinnen gegenüber der Gruppe mit einem MI beträgt 5,56 (95 %KI: 1,17–26,36).

Den Stellenwert des Tyr-Allels als Risikofaktor für multiple Infarkte unterstreicht eine multivariate Analyse, in dem das Tyr-Allel neben den klassischen Risikofaktoren in einer Gruppe mit Patienten mit zwei oder mehr Infarkten getestet wurde und als ei-



**Abbildung 4.1:** Übersicht der Prävalenzen des Tyr-Allels im Gesamtkollektiv und in der Gruppe  $\leq 55$  mit den jeweiligen männlichen und weiblichen Subgruppen: (a) Statistische Signifikanz in der Abweichung zur Kontrollgruppe in der multivariaten Analyse; (b) statistische Signifikanz in der Abweichung zur Kontrollgruppe; (c) statistische Signifikanz in der Abweichung zur Kontrollgruppe und in der Abweichung zur Gruppe  $MI_{z=1} \leq 55$ .

genständiger Faktor mit einem relativen Risiko von 2,78 (95 %KI: 1,197–6,464) bestätigt werden konnte (siehe Tabelle 3.7 auf Seite 59).

Diese Ergebnisse passen sich in eine deutliche Tendenz ein, die sich konstant über die untersuchten Gruppen zieht, jedoch keine weitere statistische Signifikanz erreicht: In der altersunabhängigen Betrachtung sind in den Patientengruppen prozentual mehr Tyr-Allel-Träger zu finden als es in der gesunden Kontrollgruppe (siehe Abbildung 4.1). Unter den altersunabhängigen Patientengruppen finden sich mehr Tyr-Allel-Träger in der Gruppe  $MI_{z \geq 2}$  als in den anderen Gruppen. Dieser Unterschied wird noch deutlicher, wenn man die Altersgruppen der unter 55-Jährigen mit ischämischer Herzkrankheit getrennt betrachtet. Für alle drei Beobachtungen gilt, dass sie in den weiblichen Subgruppen stärker ausgeprägt sind als in den männlichen. Auf Grundlage dieser Tendenzen sollte das Tyr-Allel generell mit der Pathogenese von KHK und MI zusammengebracht werden. Es scheint jedoch kein eigenständiger Risikofaktor zu sein, sondern nur unter besonderen Bedingungen das frühzeitige Auftreten von Myokardinfarkt und hier vor allem das Auftreten von Reinfarkten bei Frauen in der Altersklasse unter 55 zu fördern.

#### 4.1.1 Vorzeitige Manifestation eines Myokardinfarktes bei Tyr-Allel-Trägern

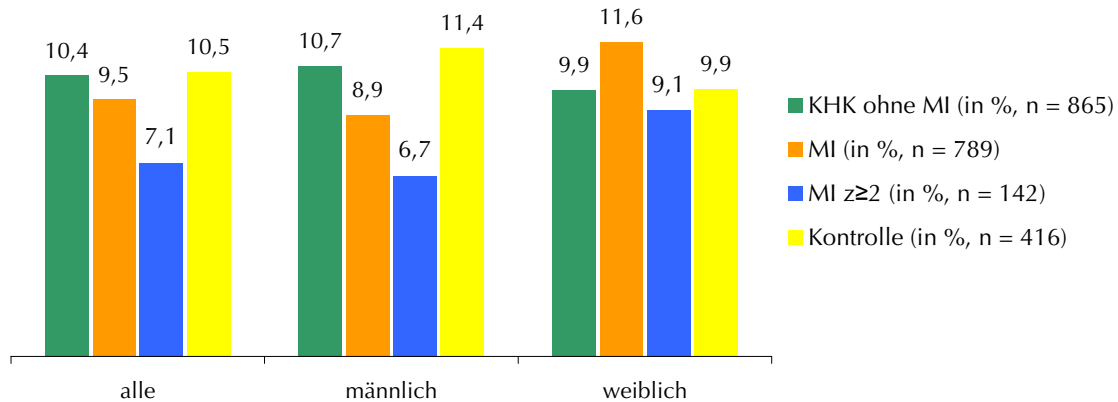
Für eine vorzeitige Manifestation eines Myokardinfarktes bei Tyr-Allel-Trägern spricht die eben dargelegte Häufung von Tyr-Allel-Trägern in den jüngeren Altersklassen mit MI. Betrachtet man die Gruppe der über 55-Jährigen, lassen sich die oben gemach-

ten Beobachtungen zur Häufung von Tyr-Allel-Trägern in einzelnen Patientengruppen nicht bestätigen.

Hier finden sich - gerade in der Gruppe der Patienten mit mindestens zwei Infarkten - prozentual weniger Tyr-Allel-Träger als in der gesunden Kontrollgruppe (siehe Abbildung 4.2 auf der nächsten Seite). Unter der Annahme, dass das Tyr-Allel Reinfarkte in jungen Jahren fördert, muss davon ausgegangen werden, dass Tyr-Allel-Träger ein höheres Risiko haben, in jüngeren Jahren an einem Infarkt zu versterben. Daraus ergibt sich, dass sie in einer Erhebung älterer Infarktpatienten durch die negative Selektion im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe unterdurchschnittlich häufig vertreten sein müssten. Die Tatsache, dass in der Gruppe der über 55-jährigen Infarktpatienten prozentual weniger Tyr-Allel-Träger vertreten sind, könnte also die Hypothese einer Förderung frühzeitiger Infarkte durch das Tyr-Allel stützen.

Eine weitere Erklärung könnte sein, dass das Tyr-Allel im Alter hinter anderen Risikofaktoren zurücktritt und an Bedeutung verliert. Gerade bei den Frauen wäre z. B. denkbar, dass der im Alter veränderte Hormonspiegel Bedingungen schafft, unter denen das Tyr-Allel als Risikofaktor keinen Einfluss mehr nimmt. Allerdings ist zu bedenken, dass die Prävalenz des Tyr-Allels in der Kontrollgruppe in der Altersstufe der unter 55-Jährigen auch unter der Prävalenz des Tyr-Allels in der Kontrollgruppe der über 55-Jährigen liegt, was jedoch keine statistische Signifikanz erreicht (siehe Tabelle 3.12 auf Seite 62). Schließlich ist zu betonen, dass alle in diesem Abschnitt diskutierten Unterschiede nicht statistisch signifikant sind und daher auch nur Ausdruck einer Zufallsverteilung sein können.

Zur Prüfung einer vorzeitigen Manifestation von Myokardinfarkten bei Tyr-Allel-Trägern diene auch die in Abschnitt 3.7 auf Seite 75 beschriebene Lifetable-Analyse. Hier zeigte sich, dass der Median des Lebensalters bei Myokardinfarkt für Tyr-Allel-Träger mit einer 2-Gefäßerkrankung mit 7,23 Jahren deutlich unter dem der Patienten mit homozygotem Phe-Allel und einer 2-Gefäßerkrankung lag. Dieser Wert war jedoch statistisch nicht signifikant. In der Gruppe der Patienten, die auf Grundlage einer 2-Gefäßerkrankung einen Myokardinfarkt innerhalb des letzten Jahres erlitten hatten, lag der Median für die Manifestation eines Myokardinfarktes bei Tyr-Allel-Trägern um 4,15 Jahre unter dem der Patienten mit homozygotem Phe-Allel. Diese Differenz erwies sich in der multivariaten Analyse als statistisch signifikant. Die in dieser Gruppe von Myokardinfarktpatienten mit 2-Gefäßerkrankung angedeutete Vorzeitigkeit ließ sich allerdings nicht für Patienten mit 1- oder 3-Gefäßkrankheit nachweisen, so dass das Ergebnis der Lifetable-Analyse insgesamt als nicht eindeutig zu werten ist. Das Ergebnis scheint, wie auch die weiter oben beschriebenen Beobachtungen, auf einen



**Abbildung 4.2:** Übersicht der Prävalenzen des Tyr-Allels in den Subgruppen in der Gruppe >55

möglichen Zusammenhang zwischen Tyr-Allel und der frühzeitigen Manifestation eines Myokardinfarktes hinzudeuten, ohne diese sicher belegen zu können.

#### 4.1.2 Homozygote Tyr-Allel-Träger

In dem untersuchten Kollektiv konnten zwei homozygote Tyr-Allel-Träger ausgemacht werden. Beide Personen waren männlich und gehörten der Gruppe KHK ohne MI an. Ein erhöhtes Risiko für multiple Myokardinfarkte bei homozygotem Vorliegen des Tyr-Allels bei Männern konnte in diesen beiden Fällen somit nicht nachgewiesen werden. Vor dem Hintergrund, dass das heterozygot vorliegende Tyr-Allel bei Frauen in der Altersklasse unter 55 Jahren zu einer Risikosteigerung für multiple Infarkte führt, wäre die Untersuchung von Frauen mit homozygoten Genstatus, die sich jedoch leider nicht in dem Kollektiv fanden, von großem Interesse gewesen. Fraglich ist, ob die statistisch nicht signifikante Differenz der durch das Hardy-Weinberg-Äquilibrium erwarteten 5,48 homozygoten Personen (siehe Abschnitt 3.2.1 auf Seite 51) zu den tatsächlich detektierten zwei Personen ein Hinweis auf eine negative Selektion der homozygoten Frauen sein könnte. Dies ließe sich aufgrund der geringen Allelfrequenzen des F/Y2561-Polymorphismus nur in einer wesentlich größeren Studie herausfinden.

#### 4.1.3 Gruppengröße und statistische Validität

Wie anhand der Anzahl der wenigen für das Tyr-Allel homozygoten Personen in dem Kollektiv erkennbar, ist selbst ein Kollektiv von 2070 Personen bei einer Allelfrequenz von 5,14% zu klein, um in speziellen Untergruppen statistisch valide Aussagen zu treffen. Zwar bot die Größe des untersuchten Kollektivs die Möglichkeit, spezielle Un-



tergruppen wie die Gruppe von Frauen im Alter unter 55 Jahren mit zwei Myokardinfarkten zu bilden und zu untersuchen, doch solche Untergruppen waren naturgemäß recht klein (Tyr-Allel-Trägerinnen in der Gruppe  $MI_{z \geq 2}$ : 4 von 13, in der Kontrollgruppe 3 von 43). Dennoch scheint die in dieser Gruppe belegte Assoziation zwischen dem Tyr-Allel und multiplen Myokardinfarkten glaubhaft, da die statistischen Tests signifikant und die Ergebnisse in mehreren Gruppen reproduzierbar waren. Zudem lassen die weiteren Untersuchungen im großen Kollektiv mit den oben dargelegten Tendenzen eine Konsistenz erkennen, die die statistisch signifikanten Aussagen vor einen glaubhaften Hintergrund setzen.

#### **4.1.4 Zusammenfassung**

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das Tyr-Allel das Auftreten von Reinfarkten bei jüngeren Frauen fördern könnte. Es lässt sich aufgrund der weiteren Tendenzen vermuten, dass das Tyr-Allel neben anderen Risikofaktoren eine zusätzliche Rolle in der Pathogenese von KHK und MI spielt. Dieses scheint in besonderer Weise für die Pathogenese von MI bei Frauen zu gelten.

In der multivariaten Analyse konnte das Tyr-Allel als eigenständiger Risikofaktor für das Erleiden von zwei Myokardinfarkten bestätigt werden; es war jedoch generell für KHK oder MI kein eigenständiger Risikofaktor. Es kann daher angenommen werden, dass das Tyr-Allel unter dem Einfluss besonderer, bisher noch nicht gänzlich geklärter Bedingungen neben den klassischen Risikofaktoren zu einer zusätzlichen und für jüngere Frauen nicht unerheblichen Risikosteigerung führt, dass es jedoch ohne Vorhandensein dieser besonderen Bedingungen zu keiner weiteren Gefährdung führt.

## **4.2 Interaktion des Von-Willebrand-Faktors mit Thrombozyten und mögliche Beeinflussung dieser durch Polymorphismen**

In der primären Hämostase im arteriellen System nimmt die maßgeblich über den VWF vermittelte Aggregation der Thrombozyten eine essentielle Stellung ein (Weiss 1975a, b). Während sie einerseits die lebenswichtige Kontrolle des Blutverlustes nach einer Gefäßverletzung gewährleistet, ist sie andererseits auch für die lebensgefährliche Thrombusbildung in der Pathogenese des Myokardinfarktes verantwortlich (Fuster et al. 1992a, b). Angeborene und erworbene Störungen in der Funktion der Thrombozyten oder des Von-Willebrand-Faktors sowie Fehler in der Interaktion der beiden

führen zwangsläufig zu Hämostasestörungen, die sich als Hyper- oder Hypokoagulabilität äußern können und die nachhaltig das sensible System der Blutgerinnung nach Verletzungen wie auch bei der Thrombusbildung bei Myokardinfarkt beeinflussen.

Die Interaktion von VWF und Thrombozyten über Glykoproteinrezeptoren ist nachweislich der entscheidende Schritt in der primären Hämostase (Ruggeri 1997b). Angeborene Störungen dieser Interaktion konnten sowohl auf Seiten der Glykoproteine als auch auf Seiten des Von-Willebrand-Faktors nachgewiesen werden. In verschiedenen Studien wurde ein Einfluss dieser Störungen auf die Blutgerinnung und das Risiko für ischämische Herzkrankheiten untersucht. Zusätzlich wurden in den letzten Jahren diverse Polymorphismen in den für die Interaktion relevanten DNA-Regionen vor allem auf Seiten der Glykoproteine identifiziert und auf ihren Einfluss auf koronare Herzerkrankung und Myokardinfarkt geprüft.

Die Interaktion von Thrombozyten und VWF ist vor allem im Hochdrucksystem für die Adhäsion der Thrombozyten an der Gefäßwand essentiell. Durch die gegenüber den Strömen in der Gefäßmitte niedrigere Fließgeschwindigkeit des Blutes nahe der Gefäßwand kommt es vor allem im arteriellen System zu großen Scherkräften, die die Anlagerung der Thrombozyten an die verletzten Zellwände behindern. Für die Adhäsion der Thrombozyten unter diesem Scherstress ist der VWF unumgänglich, da er als immobilierter Bestandteil der Zellwand den im Blutstrom vorbeiziehenden Thrombozyten quasi als erster Anker dient (Ruggeri 1997a). Die Bindung wird dabei über Glykoprotein-Rezeptoren auf der Thrombozytenmembran vermittelt, die mit bestimmten, der jeweiligen Struktur des Rezeptors komplementären Regionen des Von-Willebrand-Faktors interagieren. Eine erste, noch lockere Anheftung der vorbei fließenden, zunächst inaktiven Thrombozyten an den wandständigen VWF erfolgt über die Interaktion von Glykoprotein Ib<sub>α</sub> des Glykoproteinkomplexes Ib-IX-V der Thrombozytenmembran mit der A1-Domäne des Von-Willebrand-Faktors (Ruggeri 1997a). Nur über diese Bindung können mit Geschwindigkeitsreduktion und erster Adhäsion der schnell vorbeifließenden Thrombozyten die Voraussetzungen zur Aktivierung der Thrombozyten geschaffen werden. Die Aktivierung wiederum erlaubt die nachfolgende Bindung der C1-Domäne an das Gp IIb/IIIa der Thrombozytenmembran und leitet damit die endgültige Aggregation und Thrombusbildung ein (siehe Abschnitt 1.2.2 auf Seite 4).

In arteriellen Gefäßen mit arteriosklerosebedingter Plaquebildung ist der Scherstress, dem die Thrombozyten beim Vorbeiströmen am Plaque ausgesetzt sind, noch größer als an der Wand gesunder Arterien (Ruggeri 1997a). Verschiedene Studien belegen, dass gerade unter diesen Bedingungen eine Thrombusadhäsion und

-aggregation nur durch die Anwesenheit von VWF vermittelt werden kann (Peterson et al. 1987; Weiss et al. 1989; Goto et al. 1998). Goto et al. (1999) konnten bei Thrombozyten im Plasma von Patienten mit akutem Myokardinfarkt, bei denen gewöhnlich eine erhöhte Konzentration an VWF nachweisbar ist, eine gesteigerte Thrombozytenaggregation unter hohem Scherstress nachweisen und unterstreichen damit die Bedeutung, die die VWF-abhängige Thrombozytenaggregation bei der Manifestation einer akuten koronaren Thrombose hat.

Der VWF und seine Interaktion mit den Thrombozytenglykoproteinen ist somit für die Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten während der Blutstillung nach einer Verletzung, vor allem unter Anwesenheit hoher Scherkräfte, unerlässlich. So positiv das Einwirken des Von-Willebrand-Faktors unter diesen Umständen ist, so fatal ist sein Wirken, wenn er auf dem Boden eines rupturierten Plaques in einem Koronargefäß mit der Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten die Thrombusbildung einleitet und auf diese Weise den Beginn eines lebensgefährlichen Myokardinfarktes markiert.

#### 4.2.1 Glykoproteinkomplex Ib-IX-V und VWF

Der Glykoproteinkomplex Ib-IX-V vereinigt die Glykoproteine  $Ib_{\alpha}$ ,  $Ib_{\beta}$ , IX und V. Das Glykoprotein  $Ib_{\alpha}$  ist dabei der mit dem VWF interagierende Teil. Die komplementäre Region auf dem VWF ist die A1-Domäne. Im Rahmen der Adhäsion kommt es zunächst zu diversen Bindungen zwischen dem  $Ib_{\alpha}$  und den aktivierten A1-Domänen des multimeren Von-Willebrand-Faktors. Die Bindungen dieser primären Adhäsion sind jedoch noch durch Dissoziation und Bewegungen entlang der Gefäßwand gekennzeichnet und können daher noch keine irreversible Anhaftung der Thrombozyten an die Zellwand vermitteln (Ruggeri 1997a). Die Interaktion der A1-Domäne mit dem Glykoproteine  $Ib_{\alpha}$  ist die einzige Möglichkeit, die gerade im arteriellen System unter hohem Scherstress vorbeifließenden Thrombozyten einzufangen, zu verlangsamen und erstmalig anzuheften. Störungen dieser Interaktion können auf Seiten des Glykoproteinkomplexes oder auf Seiten des Von-Willebrand-Faktors liegen und haben weitreichende Konsequenzen für die Hämostase der betroffenen Patienten.

Störungen des Glykoproteinkomplexes sind ursächlich für die Riesenplättchen-thrombozythopathien Bernard-Soulier-Syndrom und May-Hegglin-Syndrom. Bei beiden ist der Glykoproteinkomplexes Ib-IX-V vermindert oder gar nicht nachweisbar. Betroffene sind somit nicht oder nur geringfügig in der Lage, den VWF über diesen Rezeptor zu binden. Beim autosomal-rezessiv vererbten Bernard-Soulier-Syndrom findet sich eine verlängerte Blutungszeit und eine unterschiedlich stark ausgeprägte

Blutungsneigung, die von leichten Schleimhautblutungen bis zu nicht seltenen schweren Blutungen als Reaktion auf Tonsillektomie, Appendektomie sowie andere chirurgische Eingriffe oder Unfälle reicht (Bennett 1991; Lopez et al. 1998). Auch beim May-Hegglin-Syndrom zeigt sich eine verlängerte Blutungszeit, die jedoch meist ohne Krankheitswert bleibt (Pschyrembel 1996).

Ebenfalls auf Seiten der Thrombozyten ist der Defekt beim autosomal-dominant vererbten Platelet-type-Von-Willebrand-Jürgens-Syndrom (Pseudo-Von-Willebrand-Jürgens-Syndrom) zu finden. Klinisch fallen eine Thrombozytopenie und ein geringer Anteil von großen VWF-Multimeren auf. Ursache ist eine Zunahme der Affinität des Glykoprotein Ib-Rezeptors für den VWF, in deren Folge es zu einem Entzug des Von-Willebrand-Faktors aus dem Plasma mit nachfolgender hämorrhagischer Diathese kommt (Weiss et al. 1982).

Störungen der Interaktion zwischen VWF und dem Glykoproteinkomplex Ib-IX-V, die durch Veränderungen im VWF bedingt sind, finden sich im Rahmen des Typ 2 des Von-Willebrand-Jürgens-Syndroms. Die ursächlichen Mutationen in der A1-Domäne können dabei sowohl eine Affinitätssteigerung als auch einen Affinitätsverlust des Von-Willebrand-Faktors gegenüber dem Gp Ib bewirken (Meyer et al. 2001).

#### **Mutationen im VWF-Gen, die die Affinität des Von-Willebrand-Faktors für Gp Ib erhöhen**

Die molekularbiologische Grundlage für diesen Affinitätsgewinn bilden über 20 Mutationen in der A1-Domäne des Von-Willebrand-Faktors (Meyer et al. 2001). Funktionelle Studien lassen vermuten, dass sie über eine Konformationsänderungen des Von-Willebrand-Faktors Einfluss auf die Bindungsfähigkeit des Von-Willebrand-Faktors zum Glykoprotein Ib nehmen (Ribba et al. 1994; Matsushita und Sadler 1995; Emsley et al. 1998; Miura et al. 2000). Bei den betroffenen Patienten ist eine erheblich gesteigerte Plättchenaggregation und Bindung von Plasma-VWF an Thrombozyten nachweisbar, die zwischen den VWF-Multimeren mit dem höchsten Molekulargewicht und Thrombozyten spontan im Plasma abläuft. Dies führt bei den meisten Patienten zu einem Entzug an funktionstüchtigen VWF, wobei vor allem Multimere mit hohem Molekulargewicht gebunden und so aus dem Verkehr geschleust werden. Gerade die hochmolekularen Multimere sind jedoch in der Adhäsionsvermittlung unter hohem Scherstress am effektivsten (Moake et al. 1986). Dieser Umstand und die zusätzlich durch die vermehrte Thrombozytenaggregation entstehende Thrombozytopenie führen zu einer stark verminderten Plättchenadhäsion, so dass die Patienten

trotz nachgewiesener erhöhter Thrombozytenaggregation unter Blutungssymptomen leiden (Ruggeri et al. 1982; Lankhof et al. 1997).

### **Mutationen im VWF-Gen, die die Affinität des Von-Willebrand-Faktors für Gp Ib vermindern**

In der A1-Domäne des Von-Willebrand-Faktors sind neben den affinitätssteigernden Mutationen auch Mutationen bekannt, die zu einer Abnahme der Affinität des Von-Willebrand-Faktors für den Glykoprotein-Rezeptor Ib auf der Thrombozytenmembran führen. Diese Mutationen finden sich bei Patienten mit Typ M und Typ 2A/2M des Von-Willebrand-Jürgens-Syndroms und führen, anders als die oben beschriebenen Mutationen, nicht zu einem einheitlichen Verhalten im Bezug auf die Verteilung von VWF-Multimeren. Es resultiert auch bei diesen Formen eine Blutungsneigung (Meyer et al. 2001).

### **4.2.2 Glykoprotein IIb/IIIa und VWF**

Der Glykoprotein-Rezeptor IIb/IIIa ist aus den Integrinen  $\alpha_{IIb}\beta_3$  aufgebaut. Er kann in Abhängigkeit von seinem Funktionszustand Fibrinogen, den VWF, Fibronectin, Vitronectin und Thrombospondin binden (O'Toole et al. 1990; Perutelli und Mori 1992). Vor der ersten Adhäsion der Thrombozyten über das Glykoproteine  $Ib_\alpha$  ist der Gp-IIb/IIIa-Rezeptor auf den Thrombozyten aufgrund seines Konformationszustandes zwar in der Lage, immobilisiertes Fibrinogen zu binden und so die erste Adhäsion zu unterstützen (Hantgan et al. 1990), eine Bindung an gelöstes Fibrinogen oder VWF ist jedoch nicht möglich (Ruggeri 1997a). Nach der primären Adhäsion kommt es zur Aktivierung der Thrombozyten und gleichzeitig zur Zustandsänderung des Glykoproteins IIb/IIIa, so dass nun eine Bindung sowohl an lösliches Fibrinogen als auch an den VWF möglich wird. Die komplementäre Bindungsregion auf dem VWF ist die Asp-Gly-Arg-(RGD-)Sequenz im Exon 44 in der C1-Domäne des reifen Von-Willebrand-Faktors (Berliner et al. 1988; Beacham et al. 1992; Weiss et al. 1993). Über diese Bindung bildet der VWF Brücken zwischen den Thrombozyten und vermittelt so gemeinsam mit Fibrinogen die irreversible Aggregation der Thrombozyten (Peterson et al. 1987; Ruggeri 1997a). Die Aggregation ist, wie Untersuchungen bei Afibrinogenämiepatienten zeigen, auch unter alleiniger Vermittlung durch den VWF möglich, erweist sich dann aber als nicht so stabil (Marco et al. 1986). Unter starkem Scherstress nimmt die Bedeutung des Von-Willebrand-Faktors für die Adhäsion und Aggregation weiter zu, und der VWF wird zu einem essentiellen Vermittler (Weiss et al. 1989; Ruggeri 1997a; Goto et al. 1998).

Die Schlüsselstellung, die die Interaktion von VWF und Gp IIb/IIIa einnimmt, ist unumstritten (Lefkovits et al. 1995). Medikamentös herbeigeführte Hemmungen des Rezeptors haben daher großen Einfluss auf die Koagulabilität des Blutes, wie die erfolgreiche Behandlung mit Gp-IIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten beweist. Zur Zeit verwendete Gp IIb/IIIa-Antagonisten sind entweder gentechnisch hergestelltes Fab-Fragment eines monoklonalen Antikörpers (Abciximab) oder synthetisch hergestellte zyklische Peptide (Eptifibatid) bzw. Nichtpeptide (Tirofiban). Da die Gp IIb/IIIa-Antagonisten im Gegensatz zu anderen Thrombozytenaggregationshemmern unabhängig vom Aktivierungsreiz wirken, stellen sie die potentesten Aggregationshemmer da (Karow und Lang 2002). Verschiedene Studien wie die EPIC-Studie und RESTORE-Studie konnten eine signifikante Risikoreduktion bei perkutanen Koronarinterventionen nachweisen, bei denen die Gp IIb/IIIa-Antagonisten zusätzlich zu Acetylsalicylsäure und Heparin i. v. angewandt wurden (The EPIC Investigators 1997; The RESTORE Investigators 1997). Bei instabiler Angina pectoris und non-Q-Wave-Infarkt konnten Studien wie die PRISM-PLUS-Study und die ESPRIT-Studie eine zusätzliche Reduktion von Mortalität und Auftreten von Myokardinfarkten bei Gabe von Gp IIb/IIIa-Antagonisten zusätzlich zur Standardtherapie mit Acetylsalicylsäure und Heparin i. v. belegen (The PRISM-PLUS Study Investigators 1998; ESPRIT Investigators 2000).

Auch angeborene Störungen des Gp IIb/IIIa haben großen Einfluss auf die Thrombogenität des Blutes, wie man am Beispiel der Thrombasthenie Glanzmann-Naegeli nachvollziehen kann, bei der der Gp IIb/IIIa-Gehalt der Thrombozytenmembran vermindert ist oder das Gp IIb/IIIa gänzlich fehlt. Die Patienten leiden bei nachweislich verlängerter Blutungszeit und verminderter Thrombozytenaggregation unter rezidivierenden Schleimhautblutungen, selten jedoch unter schwerwiegenderen Blutverlusten (Bennett 1991; Beardsley 1993). Als Ursache für die Störung konnten bisher eine Reihe von Mutationen sowohl auf dem Glykoprotein IIb als auch auf dem Glykoprotein IIIa beschrieben werden (Nurden 1995).

Der Gp-IIb/IIIa-Rezeptor auf den Thrombozyten beherbergt zudem eine Vielzahl von Polymorphismen, von denen in der Vergangenheit der  $PI^{A1/A2}$ -Polymorphismus mit Abstand am eingehendsten betrachtet wurde. Der Polymorphismus beinhaltet die zwei Allele  $PI^{A1}$  und  $PI^{A2}$  und wird in der neueren Nomenklatur dem human-platelet-antigen-System als HPA-1 zugeordnet. Mit dem HPA-1 stehen Erkrankungen wie die nach Thrombozytentransfusion auftretende Purpura, die neonatale Thrombozytopenie und die Zerstörung transfundierter Thrombozyten in Zusammenhang (Kunicki und Newmann 1986). Der Polymorphismus betrifft das Exon zwei des für den Gly-

koproteinrezeptor IIIa codierenden Gens auf Chromosom 17. An Position 1565 findet sich hier bei Trägern des  $PI^{A1}$ -Allels die Nukleinsäure Thymin, an Position 33 des Glykoprotein IIIa-Moleküls liegt dann die Aminosäure Leucin. Bei Trägern des  $PI^{A2}$ -Allels dagegen befindet sich an Position 1565 die Nukleinsäure Cytosin. Dies hat einen Aminosäureaustausch an Position 33 des Glykoproteins zur Folge, so dass hier nun Prolin nachweisbar ist (Newmann et al. 1989).

Beginnend mit Weiss et al. (1996) sind in den letzten Jahren eine ganze Reihe von Studien entstanden, die eine Assoziation des  $PI^{A2}$ -Allels mit dem Auftreten von koronarer Herzkrankheit und Myokardinfarkt untersuchen. Weiss et al. (1996) fanden eine statistisch signifikante Häufung von Trägern des  $PI^{A2}$ -Allels unter 71 Patienten mit Myokardinfarkt oder instabiler Angina pectoris gegenüber 68 gesunden Kontrollpatienten. Als besonders auffällig erwies sich der Unterschied in der Gruppe der unter 60-Jährigen mit koronarer Herzkrankheit oder Myokardinfarkt, die allerdings mit nur 21 Patienten repräsentiert war. In den darauffolgenden Jahren versuchten mehrere Arbeitsgruppen in verschiedenen Studiendesigns die Ergebnisse von Weiss et al. (1996) zu verifizieren. Die Ergebnisse blieben dabei uneinheitlich und aufgrund der unterschiedlichen Studiendesigns auch schwierig zu vergleichen (siehe Abschnitt 4.3 auf Seite 94).

Funktionsstörungen auf Seiten des Von-Willebrand-Faktors, die die Interaktion des Von-Willebrand-Faktors mit dem Gp IIb/IIIa beeinflussen, konnten bisher noch nicht beschrieben werden (Meyer et al. 2001).

### 4.2.3 Funktionelle Bedeutung von Gp IIb/IIIa-Polymorphismen

Die funktionelle Grundlage einer möglichen Beeinflussung der Pathogenese von KHK und MI durch den  $PI^{A1/A2}$ -Polymorphismus im Gp-IIb/IIIa-Rezeptor der Thrombozyten ist noch nicht eindeutig geklärt und wird kontrovers diskutiert. Die Framingham-Offspring-Studie konnte für das  $PI^{A2}$ -Allel eine Steigerung der Thrombozytenaggregabilität nachweisen, als deren Grundlage man eine durch die veränderte Primärstruktur hervorgerufene Konformationsänderungen des Rezeptors vermutet (Feng et al. 1999). Auch Michelson et al. (2000) konnten für  $PI^{A2}$ -positive Thrombozyten eine gesteigerte Aggregation feststellen und fanden gleichzeitig eine erhöhte Sensitivität der für das  $PI^{A2}$ -Allel heterozygoten Plättchen gegenüber der Aggregationshemmung durch Aspirin und den Gp-IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten Abciximab. Vijayan et al. (2000) schließlich belegten eine Veränderung einer Reihe der Integrin-vermittelten Funktionen wie Adhäsion und Gerinnselretraktion durch das  $PI^{A2}$ -Allel. Auch wenn eine Steigerung der Thrombozytenaggregabilität durch das  $PI^{A2}$ -Allel heute als wahr-

scheinlich angenommen wird, ist diese Annahme nicht unumstritten, und es gibt neben Studien, die eine Veränderung der  $\beta_3$ -Integrin-Interaktion mit den Liganden durch das  $PI^{A2}$ -Allel widerlegen (Bennett et al. 2001), sogar Studien, die eine Hypoaggregabilität der Thrombozyten von  $PI^{A2}$ -positiven Individuen nachweisen (Lasne et al. 1997).

Uneinheitlich sind auch die Ergebnisse der Studien, die den Einfluss des  $PI^{A2}$ -Allels auf die Fibrinogenbindung erforschen: Goodall et al. (1999) konnten eine gesteigerte Fibrinogenbindung der  $PI^{A2}$ -positiven Thrombozyten nachweisen, Meiklejohn et al. (1999) jedoch fanden keinen signifikanten Unterschied in der Fibrinogenbindung der beiden Allele des Polymorphismus.

Es ist zu vermuten, dass bisher unbekannte Einflüsse - z. B. der verwendeten Stimulatoren und Hemmer der Thrombozyten wie ADP und Aspirin - die Unterschiede in den nicht einheitlichen Versuchsanordnungen der einzelnen Studien zumindest teilweise verursachen. Zudem ist vorstellbar, dass weitere hämostatische Faktoren den Gp-IIb/IIIa-Rezeptor beeinflussen oder der  $PI^{A1/A2}$ -Polymorphismus mit anderen molekularen Varianten des Gens verbunden ist, die ihrerseits in den Prozess einwirken und so die Klärung der funktionellen Grundlage einer möglichen Assoziation des  $PI^{A1/A2}$ -Polymorphismus auf die die Entstehung von KHK und MI zum heutigen Zeitpunkt noch verschleiern.

#### 4.2.4 Funktionelle Bedeutung des F/Y 2561–Polymorphismus

Die funktionelle Bedeutung des F/Y 2561–Polymorphismus ist bisher unerforscht. Es lassen sich daher hier nur Vermutungen anstellen, die sich aufgrund der Lage des Polymorphismus in dem Von-Willebrand-Faktor-Gen ergeben.

Der F/Y 2561–Polymorphismus beschreibt einen Nukleinsäureaustausch im Exon 45 des Von-Willebrand-Faktor-Gens. An Stelle 7932 liegt im Mutantenallel statt Thymin die Nukleinsäure Adenin vor. Konsekutiv ergibt sich daraus der Tausch der Aminosäure PhenylAdenin zu Tyrosin an Stelle 2561 in der C1-Domäne des fertigen Proteins. Im Exon 44 in der C1-Domäne liegt in räumlicher Nähe zu dem Polymorphismus an Stelle 2507–2509 (alte Nomenklatur: 1744–1747 des reifen Von-Willebrand-Faktors) mit der RGD-Sequenz die Bindungsstelle des Von-Willebrand-Faktors für den Glykoproteinrezeptor IIb/IIIa (Berliner et al. 1988; Beacham et al. 1992; Weiss et al. 1993). Durch Bindung an den Gp-IIb/IIIa-Rezeptor ermöglicht der VWF die Aggregation der Thrombozyten auch unter dem Druck von hohen Scherkräften, die in arteriellen und atherosklerotischen Gefäßen herrschen.

Den Stellenwert von Punktmutationen im Bereich der RGD-Sequenz bewiesen Beacham et al. (1992), die in zwei rekombinanten Von-Willebrand-Faktor-Genen jeweils



eine andere Punktmutationen in die RGD-Sequenz einführten. Der Austausch von Glycin zu Adenin an Position 2506 (bzw. 1745 nach der alten Nomenklatur) sowie Aspartat zu Glutamat an Position 2509 (1746) führte in beiden rekombinaten VWF-Proteinen zu einem vollständigen Verlust der Bindungsfähigkeit zu dem Gp-IIb/IIIa-Rezeptor der Thrombozytenmembran und macht deutlich, dass bereits Mutationen einzelner Nukleotide zum kompletten Verlust der Bindungsfähigkeit eines Liganden führen können.

Dabei müssen diese Mutationen nicht zwingend die eigentliche Bindungssequenz des Liganden betreffen, sondern können aus weiterer Entfernung durch Konformationsänderungen in dem Protein auf die eigentliche Bindungsregion Einfluss nehmen. Beispiele hierfür finden sich bei dem Typ 2 des Von-Willebrand-Jürgens-Syndroms, in dessen Rahmen eine Reihe von Mutationen im Von-Willebrand-Faktor-Gen bekannt sind, die die Affinität zum GpIb-Rezeptor erhöhen.

Mehrere Studien haben gezeigt, dass der Grund für diese Affinitätssteigerung in Änderungen des Konformation des Von-Willebrand-Faktors zu suchen ist, obwohl die Mutationen nicht immer in der primären Bindungsregion des Von-Willebrand-Faktors für den Gp-Ib-Rezeptor liegen (Ribba et al. 1994; Matsushita und Sadler 1995; Miura et al. 2000). Emsley et al. (1998) untersuchten die Art der Einflussnahme dieser Mutationen auf die Affinität des Von-Willebrand-Faktors zum GpIb-Rezeptor mit Hilfe von 3D-Modellen und fanden heraus, dass diese Mutationen vermutlich durch Durchbrechen von Bindungen der Tertiärstruktur und durch hydrophobische Interaktionen den Konformationszustand des Von-Willebrand-Faktors verändern und dadurch in die Regulation der Bindungsaffinität involviert sein können. Es ist möglich, dass durch solch eine Änderung der Konformation die Bindungsregion für den GpIb-Rezeptor in der A1-Domäne des Von-Willebrand-Faktors exponierter dargestellt wird und dadurch die beschriebene erhöhte Affinität des Von-Willebrand-Faktors gegenüber dem Thrombozytenrezeptor entsteht. Auch Esch et al. (2005) wiesen jüngst nach, dass die die A1-Domäne flankierenden Regionen vermutlich einen Einfluss auf die Affinität des Von-Willebrand-Faktors auf den Glykoprotein-Ib-Rezeptor haben. In der Studie von Esch et al. (2005) zeigte sich, dass spezielle Glykosilierungen der seitlich an die VWF-A1-Schleife grenzenden Region einen negativ regulierenden Einfluss auf die Affinität der A1-Domäne von nicht aktiviertem VWF für den Gp-Ib-Rezeptor haben.

Auch im Falle des F/Y2561-Polymorphismus ist eine durch Konformationsänderungen induzierte Affinitätssteigerung des Von-Willebrand-Faktors für den Gp-IIb/IIIa-Rezeptor denkbar. Durch die relative räumliche Nähe der Mutation des F/Y2561-Polymorphismus zur RGD-Sequenz des Von-Willebrand-Faktors ist über ei-

ne Veränderung der Konformation eine Beeinflussung der Rezeptor-Liganden-Interaktion und damit der Thrombozytenaggregation gut vorstellbar. Diese Affinitätssteigerung könnte, vergleichbar mit dem vermuteten Reaktionsweg des  $PI^{A1/A2}$ -Polymorphismus (siehe Abschnitt 4.2.3 auf Seite 91) und den oben dargelegten Mechanismen, eine verstärkte Thrombozytenaggregation zur Folge haben und würde bei dem Tyr-Allel-Trägern zu einer erhöhten Thrombogenität führen, was zu einer besonderen Gefährdung für Reinfarkte führen könnte.

Neben der Möglichkeit einer Beeinflussung der Interaktion von VWF und Gp-IIb/IIIa-Rezeptor über die RGD-Sequenz sind Auswirkungen des F/Y2561-Polymorphismus auf die Hämostase auch auf anderen Wegen denkbar: So konnten z. B. Dejana et al. (1989) neben der Bindung der RGD-Sequenz an den Gp-IIb/IIIa-Rezeptor auch eine Interaktion der RGD-Sequenz mit dem  $\beta_3$ -Integrin von Endothelzellen nachweisen. Auch über diese Bindung scheint eine Adäsion vermittelt zu werden, deren biologische Relevanz aber noch unklar ist (Ruggeri 1999). Keuren et al. (2004) wiesen zudem für die C1- und C2-Domänen von der RGD-Sequenz unabhängige Bindungsregionen für Fibrin nach.

Letztendlich ist die molekularbiologische Grundlage des Tyr-Allels jedoch noch völlig ungeklärt und kann bis zum Vorliegen funktioneller Studien nur hypothetisch diskutiert werden.

### 4.3 Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Studie mit der Literatur

Der F/Y2561-Polymorphismus wurde bisher erst innerhalb von zwei Studien beschrieben. Eikenboom et al. (1998) identifizierten den Polymorphismus bei der Suche nach ursächlichen Mutationen für das Von-Willebrand-Jürgens-Syndrom vom Typ 1 und 3 bei acht italienischen Familien. Der Test von 102 Personen italienischer Abstammung ergab bei Eikenboom et al. (1998) eine Allelfrequenz von 95% für das Phe-Allel und 5% für das Tyr-Allel, der Test von 200 Personen niederländischer Abstammung eine Allelfrequenz von 94% für das Phe-Allel und 6% für das Tyr-Allel. Die Allelfrequenzen der in der vorliegenden Studie getesteten 2070 Personen deutscher Abstammung zeigen eine etwas stärkere Verbreitung des Tyr-Allels: Für den heterozygoten Genotyp ergab sich eine Frequenz von 9,8%, für den homozygoten eine Frequenz von 0,3% und für den Wildtyp eine Frequenz von 90%. Aufgrund der größeren Zahl an untersuchten Personen ist es wahrscheinlich, dass diese Allelfrequenzen der Verteilung in der Bevölkerung eher entspricht als die bei Eikenboom et al. (1998) nachgewiesenen; aller-

dings ist die unterschiedliche Abstammung der in den beiden Studien untersuchten Kollektive zu bedenken.

Schlingmann (2000) stellte erstmals den F/Y 2561–Polymorphismus in einen Zusammenhang mit ischämischen Herzkrankheiten und untersuchte 99 männliche Patienten deutscher Abstammung mit mindestens acht Wochen altem Myokardinfarkt, die zu einer Kontrollangiographie, teils mit interventioneller Therapie, vorstellig wurden. Als Vergleichskollektiv dienten 35 Patienten ohne vorausgegangene Myokardinfarkt und mit koronarangiographischen Ausschluss von arteriosklerotischen Veränderungen der Koronarien. In der Gruppe der Herzinfarktpatienten fanden sich 9 % (9/99) heterozygote Träger des Tyr-Allels, in der Kontrollgruppe waren es 2,8 % (1/35). Es ergab sich somit eine Allelfrequenz von 0,045 in der Patientengruppe und 0,014 in der Vergleichsgruppe für das heterozygot vorliegende Tyr-Allel und von 0,955 in der Patientengruppe und 0,986 in der Vergleichsgruppe für das Phe-Allel. Personen mit homozygoten Genotyp für das Tyr-Allel konnte Schlingmann in keiner der untersuchten Gruppen finden.

Das Tyr-Allel fand sich somit bei Schlingmann in der Patientengruppe dreimal häufiger als in der Vergleichsgruppe, was eine eindeutige Tendenz zu einer Assoziation zwischen Tyr-Allel und MI anzuzeigen schien. Bei einer Odds Ratio von 3,38 mit einem 95 %-Konfidenzintervall von 0,42–27,17 und einem P-Wert von 0,29829 war das Ergebnis in der univariaten Analyse jedoch statistisch nicht signifikant. Es ergab sich somit die Frage, ob die fehlende statistische Signifikanz in Schlingmanns Untersuchung aus dem Studiendesign hervorging oder den fehlenden Zusammenhang zwischen Tyr-Allel und MI dokumentierte. Das von Schlingmann untersuchte Kollektiv schien angesichts der Allelfrequenzen zu klein, um zufällige von systematischen Abweichungen zu unterscheiden. So fanden sich in der 99 Personen umfassenden Patientengruppe neun heterozygote Tyr-Allel-Träger, in der 36 Personen starken Vergleichsgruppe konnte nur ein Tyr-Allel-Träger nachgewiesen werden. Zudem gab es bei diesem Design der Studie keine Möglichkeit, geschlechtergetrennte und altersspezifische Betrachtungen durchzuführen oder in einer multivariaten Analyse den Einfluss des Tyr-Allels unabhängig vom Einfluss anderer Risikofaktoren zu betrachten.

In der vorliegenden Studie mit einem Kollektiv von 2070 angiographisch untersuchten Personen, darunter 416 gesunde Kontrollpersonen und 1654 Patienten mit KHK und/oder MI, war es nun möglich, speziell nach einer Assoziation des Tyr-Allels zu Myokardinfarkten in jungen Jahren zu suchen und die Geschlechter dabei getrennt voneinander zu betrachten. Gerade Myokardinfarkte in jüngeren Lebensaltern zeichnen sich durch eine familiäre Belastung der Betroffenen aus (Rissanen 1979) und

könnten auf vererbare Mechanismen wie Polymorphismen des Gerinnungssystems zurückzuführen sein.

Bei Schlingmann war in dem männlichen Kollektiv eine Tendenz festzustellen, die sich auch in dem hier untersuchten Kollektiv abzeichnete: Generell konnte beobachtet werden, dass in den Patientengruppen prozentual mehr Tyr-Allel-Träger zu finden waren als in der Kontrollgruppe. Aber erst die Betrachtung der unterschiedlichen Altersgruppen förderte in dieser Studie eine weitere Tendenz zu Tage: die höhere Prävalenz des Tyr-Allels in den jüngeren Altersgruppen mit Myokardinfarkt. Dieser Trend wiederum erwies sich durchgängig als in der weiblichen Subgruppe stärker ausgeprägt. Schließlich bot sich durch die Erhebung der genauen Daten der Studienteilnehmer auch die Möglichkeit, Patienten mit mehreren Infarkten gesondert zu betrachten und das Tyr-Allel in einer multivariaten Analyse neben den klassischen Risikofaktoren einzuordnen. Mit der Feststellung der Assoziation des Tyr-Allels mit Reinfarkten bei jüngeren Frauen und der Darstellung des Tyr-Allels als eigenständiger Risikofaktor für Reinfarkte in der multivariaten Analyse erbrachte diese Studie Erkenntnisse, die in Schlingmanns Studiendesign nicht ermittelbar waren.

Abschließend kann festgestellt werden, dass die vorliegende Studie die von Schlingmann geäußerte Vermutung einer Assoziation zwischen Tyr-Allel und Myokardinfarkt durch eine umfassende Untersuchung in einem großen Kollektiv überprüfen konnte. Die Tendenz, die bei Schlingmann zu erkennen war, konnte in dieser Studie bestätigt werden.

Durch das größere Kollektiv und die Betrachtung einzelner Subgruppen war es zusätzlich möglich, nach einer Gefährdung einzelner Risikogruppen durch das Tyr-Allel zu forschen. So konnte die Gefährdung von Tyr-Allel-positiven Frauen unter 55 Jahren für Reinfarkte nachgewiesen und die Bedeutung des Tyr-Allels für die Pathogenese von Reinfarkten neben den klassischen Risikofaktoren dargestellt werden. Eine generelle Assoziation zwischen Tyr-Allel und KHK oder MI blieb jedoch auch hier, wie schon bei Schlingmann, nur eine Tendenz und konnte nicht statistisch signifikant belegt werden.

Weitere Studien, die den F/Y2561-Polymorphismus untersucht haben und mit denen das Ergebnis der vorliegenden Studie in Zusammenhang gebracht werden könnte, gibt es bisher nicht. Wie bereits in Abschnitt 4.2.3 auf Seite 91 erläutert, existieren jedoch eine Reihe von Studien, die sich mit dem PI<sup>A1/A2</sup>-Polymorphismus im Glykoprotein IIIa beschäftigen. Unter der Annahme, dass das Tyr-Allel des F/Y2561-Polymorphismus seinen Einfluss auf die Pathogenese von Reinfarkten bei jüngeren Frauen über Modifikation der VWF/Gp-IIb/IIIa-Interaktion ausübt, stellen diese Stu-

dien das Gegenstück zum F/Y2561–Polymorphismus dar, weil sie die Interaktion zwischen VWF und Gp IIb/IIIa nicht wie die vorliegende Studie von Seiten des Von-Willebrand-Faktors, sondern von Seiten des Gp-IIb/IIIa-Rezeptors der Thrombozyten beleuchten.

Nachdem Weiss et al. (1996) eine statistisch signifikante Häufung von Trägern des  $PI^{A2}$ -Allels unter 71 Patienten mit Myokardinfarkt oder instabiler Angina pectoris gegenüber 68 gesunden Kontrollpatienten gefunden hatten, folgten in den nächsten Jahren eine ganze Reihe von Studien, die in verschiedenen Populationen und mit verschiedenen Studiendesigns die Ergebnisse von Weiss zu verifizieren versuchten. Arbeiten, die eine Assoziation zwischen dem  $PI^{A2}$ -Allel und der Entwicklung ischämischer Herzkrankheiten fanden, sind Carter et al. (1996, 1997); Walter et al. (1997a); Zotz et al. (1998); Garcia-Ribes et al. (1998); Anderson et al. (1999); Ardissino et al. (1999); Tereshchenko et al. (1999); Melus et al. (1999); Bray (2000); Mikkelsen et al. (2000); Bojesen et al. (2003); Abu-Amero et al. (2004); Lopes et al. (2004).

Demgegenüber stehen eine Reihe von Studien, die keine statistische Signifikanz im Zusammenhang zwischen dem Auftreten des  $PI^{A2}$ -Allels und Myokardinfarkt oder koronarer Herzkrankheit nachweisen konnten: Osborn et al. (1996); Marian und Brugada (1996); Herrmann et al. (1997); Ridker et al. (1997); Samani und Lodwick (1997); Scaglione et al. (1998); Mamotte et al. (1998); Durante-Mangoni et al. (1998); Gardemann et al. (1998); Kekomaki et al. (1999); Böttiger et al. (2000); Benze et al. (2002); Lagercrantz et al. (2003); Park et al. (2004).

Andere Studien wiederum erkennen eine Assoziation des  $PI^{A2}$ -Allels mit MI, nicht aber mit KHK (Grove et al. 2004) oder aber mit KHK und nicht mit MI (Gardemann et al. 1998) oder sie schränken eine Assoziation für MI auf Raucher mit KHK ein (Lopes et al. 2004). Gruchala et al. (2003) wiederum konnten feststellen, dass das  $PI^{A1}$ -Allel in der von ihnen untersuchten polnischen Population mit übermäßig schwerer KHK assoziiert ist.

Castelnuove et al. (2001) untersuchten in einer Metaanalyse 34 Studien, die eine Assoziation des  $PI^{A2}$ -Allels mit KHK getestet hatten, und sechs Studien, die eine Assoziation zu wiederaufgetretenen Stenosen nach Revaskularisierungstherapie untersucht hatten. Castelnuove et al. (2001) errechneten dabei für  $PI^{A2}$ -Träger ein relatives Risiko von 1,10 (95 %KI: 1,03–1,18) in der Assoziation mit KHK, für Patienten unter 60 Jahren von 1,21 (95 %KI: 1,05–1,38). In Bezug auf die Revaskularisierungstherapie ergab sich ein relatives Risiko von 1,31 (95 %KI: 1,10–1,56) für das Wiederauftreten von Stenosen bei  $PI^{A2}$ -Allel-Trägern. In der Metaanalyse ergab sich somit eine signifikante, jedoch schwache Assoziation des  $PI^{A2}$ -Allels mit dem Auftreten von ischämischen

Herzkrankheiten. Stärkere Assoziationen wurden in Subgruppen gefunden, wie z. B. den unter 60-Jährigen und in der Gruppe der Patienten, die nach Stentimplantation einen Myokardinfarkt entwickelten.

Die genannten Studien sind jedoch durch eine Reihe von Unterschieden im Studiendesign nicht ohne weiteres miteinander vergleichbar. Die Untersuchungen von Arabern (Abu-Amero et al. 2004) oder Koreanern (Park et al. 2004) müssen sicherlich in ihrer jeweiligen Population diskutiert werden. Aber auch unter den Studien, die kaukasische Populationen betrachteten, ergeben sich eine Reihe von Unterschieden wie die Größe des Studienkollektivs, ein retrospektiver oder prospektiver Aufbau, Ein- und Ausschlusskriterien und die Kriterien, nach denen KHK und MI definiert wurden. Bei aller Inkonsistenz zieht sich die bereits bei Weiss et al. (1996) nachgewiesene und auch in der Metaanalyse bei Castelnouve et al. (2001) bestätigte stärkere Assoziation zwischen dem  $PI^{A2}$ -Allel und ischämischer Herzkrankheit im jungen Lebensalter durch viele Studien (Carter et al. 1996; Gardemann et al. 1998; Zotz et al. 1998; Ardissino et al. 1999; Bojesen et al. 2003). Ebenso konnte eine Assoziation zwischen dem  $PI^{A2}$ -Allel und wiederauftretenden Stenosen nach Revaskularisierungstherapie (Stent, perkutane transluminale Koronarangioplastie [PTCA] und Bypass), die ebenfalls bei Castelnouve et al. (2001) bestätigt wurde, in einigen Studien nachgewiesen werden (Walter et al. 1997b; Kastrati et al. 2000; Zotz et al. 2000).

Es ist auffällig, dass sich diese beiden Beobachtungen in ähnlicher Weise auch in dieser Studie machen ließen. Zwar wurde hier nicht nach wiederauftretenden Stenosen nach Revaskularisierungstherapie gesucht, doch kann das Vorkommen von Reinfarkten als ähnlicher Parameter des gleichen Pathomechanismus angesehen werden. Da die molekularbiologische Grundlage sowohl des  $PI^{A1/A2}$ -Polymorphismus als auch des F/Y 2561-Polymorphismus zur Zeit noch ungeklärt ist (siehe Abschnitt 4.2.3 und Abschnitt 4.2.4), lässt sich an dieser Stelle nicht klären, ob diese Überschneidung in den Beobachtungen der Studien ein Hinweis auf eine ähnliche pathophysiologische Grundlage ist. In jedem Falle stützt die Beobachtung der Gefährdung insbesondere junger Leute durch die beiden Polymorphismen die Theorie, dass Polymorphismen gerade für die durch familiäre Belastung gekennzeichneten ischämischen Herzkrankheiten in jungen Jahren verantwortlich sein könnten (Williams und Bray 2001).

Lane und Grant (2000) bewerteten in einem Übersichtsartikel die Inkonsistenz in den Ergebnissen der Studien zu Polymorphismen in den Genen der Hämostase als Hinweis dafür, dass hämostatische Faktoren und ihre Polymorphismen zum Risiko der Entstehung von ischämischen Herzkrankheiten zwar vermutlich beitragen, sie jedoch nur einen kleinen Teil von vielen anderen metabolischen Faktoren bilden, die

in die Pathogenese von KHK und MI einfließen. Lane und Grant (2000) bemängelten zudem die Vielzahl klinischer Endpunkte (MI, instabile Angina, KHK, Progression dieser) und bemerkten, dass diese z. T. erst nach der Datenakquirierung auf der Suche nach statistischer Signifikanz definiert wurden. Da es nicht sehr wahrscheinlich ist, dass ein Polymorphismus allein KHK oder MI determiniert, forderten Lane und Grant (2000) daher für die Zukunft große Studien mit klar definierten klinischen Endpunkten, die die erworbenen Risikofaktoren stärker mit einbeziehen und in Relation setzen. Gleiches postulierten Williams und Bray (2001), die zusätzlich auch Studien, die Frauen speziell betrachten und Interaktionen der verschiedenen Behandlungen einbeziehen, vorschlugen.

Die hier vorliegende Studie kann eine Reihe dieser Kriterien erfüllen und sich somit wohl als aussagekräftige Untersuchung zur Erforschung des Einflusses eines Polymorphismus auf die Pathogenese von KHK und MI qualifizieren. Durch die Forderung einer Koronarangiographie für jeden Teilnehmer der Studie war zudem eine optimale Beurteilung der Herzkranzgefäße und Einstufung etwaiger arteriosklerotischer Veränderungen gewährleistet. Auch die Kontrollgruppe rekrutierte sich aus einem für eine Koronarangiographie vorgesehenen Personenkreis. Dadurch konnten zwar einerseits sichtbaren Wandverengungen oder -irregularitäten der Koronarien sicher ausgeschlossen werden, andererseits fanden sich in diesem Personenkreis kardiovaskulären Risikofaktoren oder gar Symptome überdurchschnittlich häufig, so dass man davon ausgehen muss, dass die Kontrollgruppe nicht einem natürlichen Querschnitt der Bevölkerung entspricht (Winkelmann et al. 2001). Unter dem Aspekt der sicher ausgeschlossenen KHK sollte die Inanspruchnahme dieser Kontrollgruppe jedoch dennoch zu rechtfertigen sein.

Das hier erlangte, nicht ganz eindeutige Ergebnis unterstützt die von Lane und Grant (2000) und Williams und Bray (2001) dargelegte Theorie, die Polymorphismen als einige von vielen, möglicherweise noch unbekanntem Faktoren in der Pathogenese von KHK und MI beurteilt. Die vorliegende Studie konnte eine Gefährdung bestimmter Gruppen durch das Tyr-Allel nachweisen; die kausale Kette wie auch der Zusammenhang zu der gefährdeten Gruppe sind mit dem heutigen Stand der Forschung jedoch noch völlig unklar.

### **4.4 Schlussfolgerung aus der vorliegenden Studie**

Die vorliegende Studie hat die Bedeutung des F/Y 2561-Polymorphismus im Von-Willebrand-Faktor-Gen im Hinblick auf eine Assoziation zu koronarer Herzerkrankung

und Myokardinfarkt untersucht. Wie die Resultate vieler Studien zu anderen Polymorphismen in den Genen des Gerinnungssystems sind auch die Ergebnisse dieser Studie nicht vollkommen eindeutig und werfen eine Reihe von Fragen auf. Es konnte eine statistisch signifikante Assoziation zwischen dem Tyr-Allel und dem Auftreten von zwei oder mehr Myokardinfarkten bei Frauen mit einem Alter von unter 55 Jahren nachgewiesen werden. Zudem stellte sich das Tyr-Allel in der multivariaten Analyse als unabhängiger Risikofaktor für das Erleiden von zwei oder mehr Myokardinfarkten dar. Eine generelle signifikante Assoziation zwischen dem Tyr-Allel und KHK oder MI konnte dagegen nicht nachgewiesen werden.

Diese Diskrepanz weist auf das Vorhandensein weiterer Faktoren hin, die in der Studie nicht erfasst wurden und die einen Einfluss auf die Pathogenese von KHK und MI und das Gewicht, das der F/Y 2561–Polymorphismus für diese hat, ausüben. Derartige Faktoren können auf Ebene der Gene in Form von regulatorischen Einheiten zu finden sein oder auch im Blut als Hormone oder andere metabolische Faktoren, die einen Einfluss auf die Gerinnung nehmen. Neben diesen und den klassischen Risikofaktoren scheint der hier beleuchtete Polymorphismus meist eine untergeordnete Rolle zu spielen und nur im Rahmen besonderer Bedingungen, wie sie offenbar bei Frauen unter 55 Jahren mit Myokardinfarkt vorherrschen, in den Vordergrund zu treten.

In der zukünftigen Forschung sollte versucht werden, diese Bedingungen näher zu bestimmen. Zum einen könnten dabei möglichst großzahlige und unter sehr genau definierten Bedingungen stattfindende Studien Aufschluss geben, die speziell die offensichtlich besonders gefährdete Personengruppe von jüngeren Frauen mit mindestens einem Herzinfarkt untersuchen. Zum anderen ist es sicherlich von großer Bedeutung, die molekularbiologische Grundlage des F/Y 2561–Polymorphismus in funktionellen Studien zu erfassen. Sollte sich in weiteren Studien das erhöhte Risiko für junge Frauen bestätigen, können diese Erkenntnisse schließlich in die Behandlung dieser Personengruppe einfließen. Denkbar wäre, dass dieser Personenkreis in besonderem Maße von der Gp IIb/IIIa-Blockade durch mononukleale Antikörper (Abciximab u.a.) profitieren würde.



## 5 Zusammenfassung

Die Interaktion zwischen dem Gp-IIb/IIIa-Rezeptor der Thrombozytenmembran und seinem Liganden Von-Willebrand-Faktor (VWF) ist für die Thrombozytenaggregation essentiell und begründet somit die mögliche Einflussnahme durch Polymorphismen, die diese Interaktion betreffen auf die Pathogenese von koronarer Herzkrankheit (KHK) und Myokardinfarkt (MI).

Nach einer Vielzahl von Studien, die den Einfluss des  $PI^{A1/A2}$ -Polymorphismus des Gp-IIb/IIIa-Rezeptors auf KHK und MI erforschten, untersuchte diese Studie mit dem Polymorphismus Phe/Tyr 2561 (F/Y 2561–Polymorphismus) in dem Von-Willebrand-Faktor-Gen eine Mutation, die sich in der Nähe der RGD-Domäne und damit der Bindungsstelle des Von-Willebrand-Faktors für den Gp-IIb/IIIa-Rezeptor befindet. In einem Gesamtkollektiv von 2070 angiographierten Personen, das sich aus 789 MI-Patienten, 865 KHK-Patienten und 416 Kontrollpatienten zusammensetzte, wurde das Tyrosin-Allel (Tyr-Allel) des Polymorphismus Phe/Tyr 2561 in dem Von-Willebrand-Faktor-Gen auf eine Assoziation zu KHK und MI getestet.

Es konnte eine statistisch signifikante Assoziation zwischen dem Tyr-Allel und dem Auftreten von zwei oder mehr Myokardinfarkten bei Frauen in einem Alter von unter 55 Jahren nachgewiesen werden. Zudem stellte sich das Tyr-Allel in der multivariaten Analyse als unabhängiger Risikofaktor für das Erleiden von zwei oder mehr Myokardinfarkten dar. Es fand sich in dem gesamten Kollektiv eine statistisch nicht signifikante Häufung von Tyr-Allel-Trägern in den jüngeren Patientengruppen, die besonders in den weiblichen Subgruppen ausgeprägt war. Eine generelle Assoziation zwischen dem Tyr-Allel und KHK oder MI konnte trotz dieser Tendenzen statistisch nicht nachgewiesen werden. Diese Diskrepanz weist auf das Vorhandensein weiterer Faktoren hin, die in der Studie nicht erfasst wurden und die einen Einfluss auf die Pathogenese von KHK und MI und das Gewicht, das der F/Y 2561–Polymorphismus für diese hat, ausüben. Neben den klassischen Risikofaktoren scheint das hier beleuchtete Tyr-Allel des Polymorphismus Phe/Tyr 2561 meist eine untergeordnete Rolle zu spielen und nur im Rahmen besonderen Bedingungen, wie sie offenbar bei Frauen unter 55 Jahren mit Myokardinfarkt vorherrschen, in den Vordergrund zu treten.

# A Verwendete Materialien

## A.1 Ansätze für Lösungen

### A.1.1 DNA-Isolierung

- QIAmp DNA Blood Mini Kit, Quiagen

### A.1.2 Dünnschicht-Polyacrylamidgelelektrophorese

1. 6%iges Polyacrylamidgel
  - 4 ml Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung 30% (Rotiphorese-Gel 30, Roth)
  - 13,5 ml Aqua destillata
  - 0,66 ml Tris-Sulfat-Puffer (1M) (Gibco), mit 121,1 g konzentrierter Schwefelsäure auf pH 9 einzustellen
  - 1,4 ml Glycerin 100%
  - 0,4 ml Ammoniumpersulfat 10% (Ammoniumpersulfat, Gibco)
2. Pufferlösung TRISBorat-Puffer (0,14 M; 16,96 g TRIS, mit Borat auf pH 9 einzustellen)
3. Größenmarker Base Pair Ladder (100bp DNA Ladder, invitrogen in einer Verdünnung von 1:10)

### A.1.3 Agarosegel-Elektrophorese

1. 1,2%iges Agarosegel
  - 1,2 g Agarose (Gibco)
  - 100ml TAE-Puffer
  - 10  $\mu$ l Ethidiumbromid (Sigma)
2. TAE-Puffer für Agarosegel

## A Verwendete Materialien

- 1 l Aqua destillata
  - 40 mM Tris
  - 12 mM Natriumacetat (Merck)
  - 2 mM EDTA (Gibco)
  - mit Essigsäure (Roth) auf pH 8,3 einzustellen
3. Größenmarker Base Pair Ladder (100bp DNA Ladder, invitrogen)

### A.1.4 DHPLC-Analyse

#### 1. Puffer A

- 50 ml TEAA (2M solution in water, pH 7,65, Transgenomic Inc., San Jose, USA)
- 950 ml Aqua destillata
- 250  $\mu$ l Acetonitril

#### 2. Puffer B

- 50 ml TEAA (2M solution in water, pH 7,65, Transgenomic Inc., San Jose, USA)
- 750 ml Aqua destillata
- 250 ml Acetonitril

## A.2 Produkte und Geräte, Hersteller<sup>1</sup>

### A.2.1 PCR

- Gilson-pipetman-Pipetten, 2  $\mu$ l, 10  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l
- Sarstedt-Pipettenspitzen
- 96-er-Mikrotiterplatten mit Abdeckhütchen von peqLab Biotechnologie GmbH
- Thermocycler, Biometra T-Gradient

---

<sup>1</sup> Geräte, die bei mehreren Verfahren zur Anwendung kamen, sind nur unter dem Erstgenannten erwähnt.

### **A.2.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

- 10 ml elektrische Pipette, pipetus-akku\*\*\*\*, Hirschmann
- Gerhardt-MAG-H-Shaker
- PAGE-Folien von DESAGA, Heidelberg
- MultiTempIII-Kühlung, Pharmacia Biotech
- MultiphorII-Elektrophoresekammer, Pharmacia Biotech
- Power-supply 3000/20, DESATRONIC
- Schüttelbad Mini-Shaker, Adolf-Kühner-AG, Basel, Schweiz

### **A.2.3 DHPLC**

- WAVE DNA Fragment Analysis System, Transgenomic Inc., San Jose, USA
- DNA Sep Catridge, Transgenomic Inc., San Jose, USA
- Software WAVEMaker 4.1, Transgenomic Inc., San Jose, USA
- Software Hitachi Model D-7000, Chromatography Data Station Software, Version 3.0 - 2.1
- Mutationsstandard-Lösung für 56 °C und 64 °C Transgenomic Inc., San Jose, USA

### **A.2.4 Restriktionsenzymverdau**

- Funktion-line-Brutschrank von Heraeus

### **A.2.5 Agarose-Gelelektrophorese**

- Power-supply Power Pack P25, Biometra
- Appartus GNA-200-Elektrophoresekammer von Pharmacia Fine Chemicals
- TR-302-Spectroline-Transilluminator, 302 nm Ultraviolet

### **A.2.6 Sequenzieren**

- 0,5 ml Tubes, Biozym
- Ultrafree-DA-Separierungssäulen, Millipore
- Biofuge-fresco-Zentrifuge, Heraeus instruments
- Certomat-MV-Whirler von B.Braun Biotech international
- Zentrifuge-costar, Model 10
- TRIO-Thermoblock von Biometra
- ABI-310-Sequenzierer von Applied-Biosystems

# Literaturverzeichnis

- ABU-AMERO, K. K., C. A. WYNGAARD und N. DZIMIRI (2004): Association of the platelet glycoprotein receptor IIIa (P1<sup>A1/A2</sup>) genotype with coronary artery disease in Arabs. *Blood Coagul Fibrinolysis* 15: 77–79
- ALPHEY, L. (1998): *DNA-Sequenzierung*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- ANDERSON, J. L., G. J. KING, T. L. BAIR, S. P. ELEMERA, J. B. MUHLESTEIN, J. HABASHI und J. F. CARLQUIST (1999): Association between a polymorphism in the gene encoding glycoprotein IIIa and myocardial infarction or coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 33: 727–733
- ARDISSINO, D., P. M. MANUCCI, P. A. MERLINI, F. DUCA, R. FETIVEAU, L. TAGLIABUE, M. TUBARO, M. GALVANI, F. OTTANI, M. FERRARIO, J. CORRAL und M. MARGAGLIONE (1999): Prothrombotic genetic risk factors in young survivors of myocardial infarction. *Blood* 94: 46–51
- ARJOMAND, H., P. AQUILINA und D. MCCORMICK (2002): Acute myocardial infarction in a patient with von Willebrand disease: pathogenetic dilemmas and therapeutic challenges. *J Invasive Cardiol* 14: 615–618
- ASSMANN, G., P. CULLEN, F. JOSSA, B. LEWIS und M. MANCINI (1999): Coronary Heart Disease: Reducing the Risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 1819–1824
- AUSTEN, W. G., J. E. EDWARDS, R. L. FRYE, G. G. GENSINI, V. L. GOTT, L. S. GRIFFITH, D. MCGOON, M. L. MURPHY und B. B. ROE (1975): A reporting system on patients evaluated for coronary artery disease. Report of the ad hoc committee for grading of coronary artery disease. *Circulation* 51: 5–40
- BADIMON, L., J. H. CHESEBRO und J. J. BADIMON (1992): Thrombus formation on ruptured atherosclerotic plaques and rethrombosis on evolving thrombi. *Circulation* 86: 74–85

- BEACHAM, D. A., R. J. WISE, S. M. TURCI und R. I. HANDIN (1992): Selective Inactivation of the Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) Binding Site in von Willebrand Factor by Site-directed Mutagenesis. *J Biol Chem* 267: 3409–3415
- BEARDSLEY, D. S. (1993): Platelet abnormalities in infancy and childhood. In: D. G. NATHAN und F. A. OSKI (Hg.), *Hematology of Infancy and Childhood*, 4. Aufl., W. B. Saunders, Philadelphia, 1561–1604
- BENDER, R. und S. LANGE (2001): Was ist ein Konfidenzintervall? *Dtsch Med Wochenschr* 126: T41
- BENDER, R., S. LANGE und A. ZIEGLER (2002): Wichtige Signifikanztests. *Dtsch Med Wochenschr* 127: T1–T3
- BENNETT, J. S. (1991): Hereditary disorders of platelet function. In: R. HOFFMAN, E. J. BENZ und S. J. SHATTIL (Hg.), *Hematology: Basic Principles and Practice*, Churchill Livingstone, New York, 1514–1528
- BENNETT, J. S., F. CATELLA-LAWSON, A. R. RUT, G. VILAIREA, W. QI, S. C. KAPOOR, S. MURPHY und G. A. FITZGERALD (2001): Effect of the PI<sup>A2</sup> alloantigen on the function of  $\beta_3$ -integrins in platelets. *Blood* 97: 3093–3099
- BENZE, G., J. HEINRICH, H. SCHULTE, S. RUST, U. NOWAK-GOTTL, M. C. TATARU, E. KOHLER, G. ASSMANN und R. JUNKER (2002): Association of the GPIa C807T and GPIIIa PLA1/A2 polymorphisms with premature myocardial infarction in men. *Eur Heart J* 23: 325–330
- BERLINER, S., K. NIIYA, J. R. ROBERTS, R. A. HOUGHTEN und Z. M. RUGGERI (1988): Generation and characterization of peptide-specific antibodies that inhibit von Willebrand factor binding to GP IIb-IIIa without interacting with other adhesive molecules. *J Biol Chem* 263: 7500–7505
- BOJESEN, S. E., K. JUUL, P. SCHNOHR, A. TYBJAERG-HANSEN und B. G. NORDESTGAARD (2003): Platelet glycoprotein IIb/IIIa PI<sup>(A2)</sup>/PI<sup>(A2)</sup> homozygosity associated with risk of ischemic cardiovascular disease and myocardial infarction in young men: the Copenhagen City Heart Study. *J Am Coll Cardiol* 42: 661–667
- BRAY, P. F. (2000): Platelet glycoprotein polymorphisms as risk factors for thrombosis. *Curr Opin Hematol* 7: 284–289

- BÖTTIGER, C., A. KASTRATI, W. KOCH, J. MEHILLI, H. SEIDL, K. SCHÖMIG, N. VON BECKERATH und A. SCHÖMIG (2000): HPA-1 and HPA-2 Polymorphisms of the Platelet Fibrinogen Receptor and Coronary Artery Disease and Myocardial Infarction. *Thromb Haemost* 83: 559–562
- CARTER, A. M., N. OSSEI-GERNING und G. P. J. (1996): Platelet glycoprotein IIIa PLA polymorphism in young men with myocardial infarction. *Lancet* 348: 485–486
- CARTER, A. M., N. OSSEI-GERNING, I. J. WILSON und P. J. GRANT (1997): Association of platelet PI<sup>A</sup> polymorphism of glycoprotein IIb /IIIa and the fibrinogen  $\beta$  448 Polymorphism with myocardial infarction and extent of coronary disease. *Circulation* 96: 1424–1431
- CASTELNUOVE, A. D., G. DE GAETANO, M. B. DONATI und L. IACOVIELLO (2001): Platelet Glycoprotein Receptor IIIa Polymorphism  $PI^{A1}/PI^{A2}$  and Coronary Risk: a Meta-Analysis. *Thromb Haemost* 85: 626–633
- CHESEBRO, J. H., U. RAUCH, V. FUSTER und J. J. BADIMON (1997): Pathogenesis of thrombosis in coronary artery disease. *Haemostasis* 27: 12–18
- Cox, D. R. (1972): Regression models with life tables. *J R Stat Soc* 34: 187–220
- DEJANA, E., M. G. LAMPUGNANI, M. GIORGI, M. GABOLI, A. B. FEDERICI, Z. M. RUGGERI und P. C. MARCHISIO (1989): Von Willebrand Factor Promotes Endothelial Cell Adhesion via an Arg-Gly-Asp-dependent Mechanism. *J Cell Biol* 109: 367–375
- DGK (1998): Leitlinie: Koronare Herzkrankheit/ Angina Pectoris. *Z Kardiol* 87: 907–911
- DI BITONDO, R., C. L. CAMERON, M. E. DALY, S. A. CROFT, R. P. STEEDS, K. S. CHANNER, N. J. SAMANI, D. LILICRAP und P. R. WINSHIP (2001): The -1185 A/G and -1051 G/A dimorphisms in the von Willebrand factor gene promoter and risk of myocardial infarction. *Br J Haematol* 115: 701–706
- DÖRNER, K. (1999): *Klinische Chemie und Hämatologie*. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart
- DULHOSTE, M. N., J. BONNET, C. VERGNES, A. CHOUSSAT und H. BRICAUD (1989): von Willebrand's disease and coronary atherosclerosis. Apropos of 3 cases. *Arch Mal Coeur Vaiss* 82: 1875–8
- DURANTE-MANGONI, E., G. J. DAVIES, N. AHMED, G. RUGGERIO und E. G. TUDDENHAM (1998): Coronary Thrombosis and the Platelet Glycoprotein IIIA Gene PI<sup>A2</sup> Polymorphism. *Thromb Haemost* 80: 218–219



- EIKENBOOM, J. C. J. (2001): Congenital von Willebrand Disease Type 3: Clinical Manifestations, Pathophysiology and Molecular Biology. *Best Pract Res Clin Haematol* 14: 365–379
- EIKENBOOM, J. C. J., G. CASTAMAN, H. L. VOS, R. M. BERTINA und F. RODEGHIERO (1998): Characterization of the Genetic Defects in Recessive Type 1 and Type 3 von Willebrand Disease Patients of Italian Origin. *Thromb Haemost* 79: 709–717
- EMSLEY, J., M. CRUZ, R. HANDIN und R. LIDDINGTON (1998): Crystal Structure of the von Willebrand Factor A1 Domain and Implications for the Binding of Platelet Glycoprotein Ib. *J Biol Chem* 273: 10396–10401
- ESCH, J. S. N., S. C. ROBSON, W. T. KNOEFEL, C. F. EISENBERGER, M. PEIPER und X. ROGIERS (2005): Impact of O-linked glycosylation of the VWF-A1-domain flanking regions on platelet interaction. *Br J Haematol* 128: 82–90
- ESPRIT INVESTIGATORS (2000): Novel dosing regimen of eptifibatide in planned coronary stent implantation (ESPRIT): a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 356: 2037–44
- FALK, E. (1983): Plaque rupture with severe pre-existing stenosis precipitating coronary thrombosis. Characteristics of coronary atherosclerotic plaques underlying fatal occlusive thrombi. *Br Heart J* 50: 127–134
- FALK, E. und A. FERNANDEZ-ORTIZ (1995): Role of Thrombosis in Atherosclerosis and its Complications. *Am J Cardiol* 75: 5B–11B
- FARB, A., A. P. BURKE, A. L. TANG, Y. LIANG, P. MANNAN, J. SMIALEK und R. VIRMANI (1996): Coronary Plaque Erosion Without Rupture Into a Lipid Core. *Circulation* 93: 1354–1363
- FEDERICI, A. B., P. M. MANNUCCI, E. FOGATO, P. GHIDONI und L. MATTURRI (1993): Autopsy findings in three patients with von Willebrand disease type IIB and type III: presence of atherosclerotic lesions without occlusive arterial thrombi. *Thromb Haemost* 70: 758–761
- FENG, D., K. LINDPAINNER, M. G. LARSON, V. S. RAO, C. J. O'DONNELL, I. LIPINSKA, C. SCHMITZ, P. A. SUTHERLAND, H. SILBERSCHATZ, R. B. D'AGOSTINO, J. E. MULLER, R. H. MYERS, D. LEVY und G. H. TOFLER (1999): Increased platelet aggregability associated with platelet GPIIIa PLA2 polymorphism: the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 1142–1147

- FOLSOM, A. R., K. K. WU, W. D. ROSAMOND, A. R. SHARRETT und L. E. CHAMBLESS (1997): Prospective Study of Hemostatic Factors and Incidence of Coronary Heart Disease-The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circulation* 96: 1102–1108
- FUSTER, E., E. J. BOWIE, J. C. LEWIS, D. N. FASS, C. A. J. OWEN und A. L. BROWN (1978): Resistance to arteriosclerosis in pigs with von Willebrand's disease. Spontaneous and high cholesterol diet-induced arteriosclerosis. *J Clin Invest* 61
- FUSTER, V. (1994): Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology. *Circulation* 90: 2126–2146
- FUSTER, V., L. BADIMON, J. J. BADIMON und J. H. CHESEBRO (1992a): The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med* 326: 242–250
- FUSTER, V., L. BADIMON, J. J. BADIMON und J. H. CHESEBRO (1992b): The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). *N Engl J Med* 326: 310–318
- FUSTER, V., J. T. LIE, L. BADIMON, J. A. ROSEMARK, J. J. BADIMON und E. J. BOWIE (1985): Spontaneous and diet-induced coronary atherosclerosis in normal swine and swine with von Willebrand disease. *Arteriosclerosis* 5: 67–73
- GARCIA-RIBES, M., D. GONZALEZ-LAMUNO, R. HERNANDEZ-ESTEFANIA, T. COLMAN, M. PCOVI, M. DELGADO-RODRIGUEZ, M. GARCIA-FUENTES und J. M. REVUELTA (1998): Ploymorphism of the Platelet Glycoprotein IIIa Gene in Patients with Coronary Stenosis. *Thromb Haemost* 79: 1126–1129
- GARDEMANN, A., J. HUMME, J. STRICKER, Q. D. NGUYEN, N. KATZ, M. PHILIPP, H. TILLMANNNS, F. W. HEHRLEIN, M. RAU und W. HABERBOSCH (1998): Association of the Platelet Glycoprotein IIIa PI<sup>A1/A2</sup> Gene Polymorphism to Coronary Artery Disease but not to Nonfatal Myocardial Infarction in Low Risk Patients. *Thromb Haemost* 80: 214–217
- GOODALL, A. H., N. CURZEN, M. PANESAR, C. HURD, C. J. KNIGHT, W. H. OUWEHAND und K. M. FOX (1999): Increased binding of fibrinogen to glycoprotein IIIa-proline33 (HPA-1b, PIA2, Zwb) positive platelets in patients with cardiovascular disease. *Eur Heart J* 20: 742–7

- GOODEVE, A. und I. PEAKE (2001): A Standard Nomenclature for von Willebrand Factor Gene Mutations and Polymorphisms. *Best Pract Res Clin Haematol* 14: 235–240
- GOODEVE, A. C., J. C. J. EIKENBOOM, D. GINSBURG, L. HILBERT, C. MAZURIER, I. R. PEAKE, J. E. SADLER und F. RODEGHIERO (2001): A Standard Nomenclature for von Willebrand Factor Gene Mutations and Polymorphisms. *Thromb Haemost* 85: 929–931
- GOTO, S., Y. IKEDA, E. SALDIVAR und Z. M. RUGGERI (1998): Distinct Mechanisms of Platelet Aggregation as a Consequence of Different Shearing Flow Conditions. *J Clin Invest* 101: 479–486
- GOTO, S., H. SAKI, M. GOTO, M. ONO, Y. IKEDA, S. HANDA und Z. M. RUGGERI (1999): Enhanced Shear-Induced Platelet Aggregation in Acute Myocardial Infarction. *Circulation* 99: 608–613
- GRETEN, H. (Hg.) (2001): *Innere Medizin*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- GROVE, E. L., T. F. ORNTOFT, J. F. LASSEN, H. K. JENSEN und S. D. KRISTENSEN (2004): The platelet polymorphism  $PI^{A2}$  is a genetic risk factor for myocardial infarction. *J Intern Med* 255: 637–644
- GRUCHALA, M., D. CIECWIERZ, K. OCHMAN, R. TARGONSKI, W. DUBANIEWICZ, W. SOBICZEWSKI, B. WASAG, P. DREWLA, S. P., P. ROMANOWSKI, J. LIMON und A. RYNKIEWICZ (2003): Association between the  $PI^{A}$  platelet glycoprotein GPIIIa polymorphism and extent of coronary artery disease. *Int J Cardiol* 88: 229–237
- HANTGAN, R. R., G. HINDRIKS, R. G. TAYLOR, J. J. SIXMA und P. G. DE GROOT (1990): Glycoprotein Ib, von Willebrand Factor, and Glycoprotein IIb:IIIa Are All Involved in Platelet Adhesion to Fibrin in Flowing Whole Blood. *Blood* 76: 345–353
- HERRMANN, S. M., O. POIRIER, P. MARQUES-VIDAL, A. EVANS, D. ARVEILER, G. LUC, J. EMMERICH und F. CAMBIEN (1997): The Leu33/Pro polymorphism ( $PI^{A1}/PI^{A2}$ ) of the glycoprotein IIIa (GP IIIa) receptor is not related to myocardial infarction in the ECTIM study. *Thromb Haemost* 77: 1179–1181
- HEYWOOD, D. M. H., N. OSSEI-GERNING und P. J. GRANT (1997): Two novel polymorphisms of the von Willebrand factor gene promoter and association with ischaemic heart disease. *Thromb Haemost* 77: S375
- HIRSCH-KAUFFMANN, M. und M. SCHWEIGER (1987): *Biologie für Mediziner, Pharmazeuten und Chemiker*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

- JANSSON, J. H., T. K. NILSSON und O. JOHNSON (1991): von Willebrand factor in plasma: a novel risk for recurrent myocardial infarction and death. *Br Heart J* 66: 351–355
- JORDE, L. B. und R. R. WILLIAMS (1988): Relation between family history of coronary artery disease and coronary risk variables. *Am J Cardiol* 62: 708—713
- KAROW, T. und R. LANG (2002): *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 10. Aufl., Selbstverlag, Pulheim
- KASTRATI, A., W. KOCH, M. GAWAZ, J. MEHILLI, C. BOTTIGER, K. SCHOMIG, N. VON BECKERATH und A. SCHOMIG (2000): P1A polymorphism of glycoprotein IIIa and risk of adverse events after coronary stent placement. *J Am Coll Cardiol*. 36: 84–89
- KEIGHTLEY, A. M., Y. M. LAM, J. N. BRADY, C. L. CAMERON und D. LILICRAP (1999): Variation at the von Willebrand Factor (vWF) Gene Locus Is Associated With Plasma vWF:Ag Levels: Identification of Three Novel Single Nucleotide Polymorphisms in the vWF Gene Promoter. *Blood* 93: 4277–4283
- KEKOMAKI, S., L. HAMALAINEN, R. KAUPPINEN-MAKELIN, H. PALOMAKI, M. KASTE und K. KONTULA (1999): Genetic polymorphism of platelet glycoprotein IIIa in patients with acute myocardial infarction and acute ischaemic stroke. *J Cardiovasc Risk* 6: 13–17
- KEUREN, J. F., D. BARUCH, P. LEGENDRE, C. V. DENIS, P. J. LENTING, J. P. GIRMA und T. LINDHOUT (2004): von Willebrand factor C1C2 domain is involved in platelet adhesion to polymerized fibrin at high shear rate. *Blood* 103: 1741–1746
- KUKLIN, A., A. P. DAVIS, R. HAEFELE, G. ALIANELL, D. GJERDE und P. TAYLOR (1998): New Paradigms in DNA Polymorphism Detection. *BioMedical Products* 7: 90–92
- KUNICKI, T. J. und P. J. NEWMANN (1986): The biochemistry of the platelet specific antigens. In: A. HASSIG (Hg.), *Current studies in hematology and blood transfusion*, S. Karger, Basel, 18–32
- LACQUEMANT, C., C. GAUCHER, C. DELORME, G. CHATELLIER, Y. GALLOIS, M. RODIER, P. PASSA, B. BALKAU, C. MAZURIER, M. MARRE und P. FROGUEL (2000): Association between high von Willebrand factor levels and the Thr789Ala vWF gene polymorphism but not with nephropathy in type I diabetes. *Kidney Int* 57: 1437–1443
- LAGERCRANTZ, J., M. BERGMAN, P. LUNDMAN, P. TORNVALL, P. HJEMDAHL, A. HAMSTEN und P. ERIKSSON (2003): No evidence that the P1<sup>A1/A2</sup> polymorphism of platelet gly-

- coprotein IIIa is implicated in angiographically characterized coronary atherosclerosis and premature myocardial infarction. *Blood Coagul Fibrinolysis* 14: 749–753
- LANE, D. A. und P. J. GRANT (2000): Role of hemostatic gene polymorphism in venous and arterial thrombotic disease. *Blood* 95: 1517–1532
- LANKHOF, H., C. DAMAS, M. E. SCHIPHORST, M. J. IJSSELDIJK, M. BRACK, J. J. SIXMA, T. VINK und P. G. DE GROOT (1997): Functional studies on platelet adhesion with recombinant von Willebrand factor type 2B mutants R543Q and R543W under conditions of flow. *Blood* 89: 2766–2772
- LASNE, D., M. KRENN, V. PINGAULT, E. ARNAUD, J. N. FIESSINGER, M. AIACH und F. RENDU (1997): Interdonor variability of platelet response to thrombin receptor activation: influence of P1A2 polymorphism. *Br J Haematol* 99: 801–807
- LEFKOVITS, J., E. F. PLOW und E. J. TOPOL (1995): Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Receptors in Cardiovascular Medicine. *N Engl J Med* 332: 1553–1559
- LITTLE, W. C., T. R. DOWNES und R. J. APPLGATE (1991): The underlying coronary lesion in myocardial infarction: implications for coronary angiography. *Clin Cardiol* 14: 868–874
- LOPES, N., A. PEREIRA, W. HUEB, P. R. SOARES, J. R. LANZ, B. J. GERSH, S. DE OLIVEIRA, L. A. CESAR, J. F. RAMIRES und J. E. KRIEGER (2004): Effect of glycoprotein IIIa P1<sup>A2</sup> polymorphism on outcome of patients with stable coronary artery disease and effect of smoking. *Am J Cardiol* 93: 1469–1472
- LOPEZ, J. A., R. K. ANDREWS, V. AFSHAR-KHARGHAN und M. C. BERNDT (1998): Bernard-Soulier syndrome. *Blood* 91: 4397–4418
- LUC, G., J.-M. BARD, J. FERRIÈRES, A. EVANS, P. AMOUYEL, D. ARVEILER, J.-C. FRUCHART und P. DUCIMETIÈRE (2002): Value of HDL Cholesterol, Apolipoprotein A-I, Lipoprotein A-I, and Lipoprotein A-I/A-II in Prediction of Coroary Heart Disease: The PRIME Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22: 1155–1161
- MAMOTTE, C. D., F. M. VAN BOCKXMEER und R. R. TAYLOR (1998): P1<sup>A1/A2</sup> polymorphism of glycoprotein IIIa and risk of coronary artery disease and restenosis following coronary angioplasty. *Am J Cardiol* 82: 13–16
- MANCUSO, D. J., E. A. TULEY, L. A. WESTFIELD, N. K. WORRALL, B. B. SHELTON-INLOES, J. M. SORACE, Y. G. ALEVY und J. E. SADLER (1989): Structure of the Gene for Human von Willebrand Factor. *J of Biol Chem* 264: 19 514–19 527

- MARCO, L. D., A. GIROLAMI, T. S. ZIMMERMAN und Z. M. RUGGERI (1986): von Willebrand Factor Interaction with the Glycoprotein IIb/IIIa Complex. Its Role in Platelet Function as Demonstrated in Patients with Congenital Afibrinogenemia. *J Clin Invest* 77: 1272–1277
- MARIAN, A. J. und R. BRUGADA (1996): Platelet glycoprotein IIIa P1<sup>A</sup> polymorphism and myocardial infarction. *N Engl J Med* 335: 1071–1072
- MATSUSHITA, T. und J. E. SADLER (1995): Identification of Amino Acid Residues Essential for von Willebrand Factor Binding to Platelet Glykoprotein Ib. *J Biol Chem* 270: 13406–13414
- MCCOMBIE, W. R., C. HEINER, J. M. KELLY, M. G. FITZGERALD und J. D. GOCAYNE (1992): Rapid and reliable fluorescent cycle sequencing of double stranded templates. *DNA Seq* 2: 289–296
- VAN DER MEER, I. M., G. J. BROUWERS, S. BULK, F. W. LEEBEEK, D. A. VAN DER KUIP, A. HOFMAN, J. C. WITTEMAN und E. B. GOMEZ GARCIA (2004): Genetic variability of von Willebrand factor and risk of coronary heart disease: the Rotterdam Study. *Br J Haematol* 124: 343–347
- MEIKLEJOHN, D. J., S. J. URBANIAK und M. GREAVES (1999): Platelet glycoprotein IIIa polymorphism HPA 1b (PIA2): no association with platelet fibrinogen binding. *Br J Haematol* 105: 664–666
- MELUS, V., R. PULLMANN, J. HYBENOVA, M. SKERENOVA und J. R. PULLMANN (1999): Is the P1<sup>A1/A2</sup> polymorphism of the human platelet membrane glycoprotein IIIa gene a risk factor for myocardial infarction? *Bratisl Lek Listy* 100: 593–7
- MEYER, D., E. FRESSINAUD, L. HILBERT, A.-S. RIBBA, J.-M. LAVERGNE und C. MAZURIER (2001): Type 2 von Willebrand Disease Causing Defective von Willebrand Factor-Dependent Platelet Function. *Best Pract Res Clin Haematol* 14: 349–364
- VON MÜHLENDAHL, K. E. (1998): Odds Ratio (OR) und Relatives Risiko (RR). *Umwelt-med Forsch Prax* 3: 124
- MICHELSON, A. D., M. I. FURMAN, P. GOLDSCHMIDT-CLERMONT, M. A. MASCELLI, C. HENDRIX, L. COLEMAN, J. HAMLINGTON, M. R. BARNARD, T. KICKLER, D. J. CHRISTIE, S. KUNDU und P. F. BRAY (2000): Platelet GP IIIa P1A Polymorphisms Display Different Sensitivities to Agonists. *Circulation* 101: 1013–1018

- MIKKELSSON, J., M. PEROLA, P. LAIPPALA, A. PENTTILA und P. J. KARHUNEN (2000): Glycoprotein IIIa  $PI^{A1/A2}$  polymorphism and sudden cardiac death. *J Am Coll Cardiol* 36: 13–23
- MIURA, S., C. Q. LI, Z. CAO, M. R. W. HUIFANG WANG und J. E. SADLER (2000): Interaction of von Willebrand Factor Domain A1 with Platelet Glycoprotein Iba-(1–289). *J Biol Chem* 275: 7539–7546
- MÜLLER, H.-J. (2001): *Polymerase-Kettenreaktion (PCR)*. 8. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin
- MOAKE, J. L., N. A. TURNER, S. N. A., L. NOLASCO und H. J. D. (1986): Involvement of large plasma von Willebrand factor (vWF) multimers and unusually large vWF forms derived from endothelial cells in shear stress-induced platelet aggregation. *J Clin Invest* 78: 1456–1461
- NEWMANN, P. J., R. S. DERBES und R. H. ASTER (1989): The human platelet alloantigens  $PIA1$  and  $PIA2$  are associated with a leucine 33 / proline 33 amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by a DNA typing. *J Clin Invest* 83: 1778–1781
- NICHOLS, T. C., D. A. BELLINGER, T. A. JOHNSON, M. A. LAMB und T. R. GRIGGS (1986): von Willebrand's disease prevents occlusive thrombosis in stenosed and injured porcine coronary arteries. *Circ Res* 59: 15–26
- NICHOLS, T. C., D. A. BELLINGER, R. L. REDDICK, M. S. READ, G. G. KOCH, K. M. BRINKHOUS und T. GRIGGS (1991): Role of von Willebrand factor in arterial thrombosis. Studies in normal and von Willebrand disease pigs. *Circulation* 83: 56–64
- NURDEN, A. T. (1995): Polymorphisms of Human Platelet Membrane Glycoproteins: Structure and Clinical Significance. *Thromb Haemost* 74: 345–351
- OEFNER, P. J. und P. A. UNDERHILL (1998): DNA mutation detection using denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). *Curr Protocols Hum Genet (Suppl)* 19: 7.10.1–7.10.12
- OSBORN, S. V., K. K. HAMPTON, D. SMILLIE und K. S. CHANNER (1996): Platelet glycoprotein IIIa gene polymorphism and myocardial infarction. *Lancet* 348: 1309–1310
- O'TOOLE, T. E., J. C. LOFTUS, X. DU, A. A. GLASS, Z. M. RUGGERI, S. J. SHATTIL, E. F. PLOW und M. H. GINSBERG (1990): Affinity modulation of the  $\alpha_{IIb}\beta_3$  integrin (platelet GPIIb-IIIa) is an intrinsic property of the receptor. *Cell Regul* 1: 883–893

- PARK, S., H. Y. PARK, C. PARK, Y. G. KO, E. K. IM, I. JO, C. SHIN, J. B. LEE, W. H. SHIM, S. Y. CHO und Y. JANG (2004): Association of the gene polymorphisms of platelet glycoprotein Ia and IIb/IIIa with myocardial infarction and extent of coronary artery disease in the Korean population. *Yonsei Med J* 45: 428–344
- PEAKE, I. und P. WINSHIP (1991): What is a polymorphism. *Blood* 78: 251
- PERUTELLI, P. und P. G. MORI (1992): The human platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex: a multi functional adhesion receptor. *Haematologica* 77: 162–168
- PETERSON, D. M., N. A. STATHOPOULOS, T. D. GIORGIO, J. D. HELSUMS und J. L. MOAKE (1987): Shear-induced platelet aggregation requires von Willebrand factor and platelet membrane glycoproteins Ib and IIb-IIIa. *Blood* 69: 625–628
- PITTS, W. R. und R. A. LANGE (1999): Platelet Glykoprotein IIb/IIIa Receptor Blockade: Lessening the Risk of Coronary Interventions. *Thromb Haemost* 82: 136–138
- PSCHYREMBEL (1996): Klinisches Wörterbuch. CD-ROM, De Gruyter, Berlin
- RAUCH, U., J. I. OSENDE, V. FUSTER, J. J. BADIMON, Z. FAYAD und J. H. CHESEBRO (2001): Thrombus Formation on Atherosclerotic Plaques: Pathogenesis and Clinical Consequences. *Ann Intern Med* 134: 224–238
- RIBBA, A. S., . CHRISTOPHE, A. DERLON, G. CHEREL, V. SIGURET, J. M. LAVERGNE, J. P. GIRMA, D. MEYER und G. PIETU (1994): Discrepancy Between IIA Phenotype and IIB Genotype in a Patient With a Variant of von Willebrand Disease. *Blood* 83: 833–841
- RIDKER, P. M., C. H. HENNEKENS, C. SCHMITZ, M. J. STAMPFER und K. LINDPAINTNER (1997): P1<sup>A1/A2</sup> polymorphism of platelet glykoprotein IIIa and risks of myocardial infarction, stroke and venous thrombosis. *Lancet* 349: 385–388
- RISSANEN, A. M. (1979): Familial occurrence of coronary heart disease: Effect of age at diagnosis. *Am J Cardiol* 44: 60–66
- RODEGHIERO, F. und G. CASTAMAN (2001): Congenital von Willebrand Disease Type I: Definition, Phenotypes, Clinical and Laboratory Assessment. *Best Pract Res Clin Haematol* 14: 321–335
- RUGGERI, Z. M. (1997a): Mechanisms Initiating Platelet Thrombus Formation. *Thromb Haemost* 78: 611–616



- RUGGERI, Z. M. (1997b): Perspective Series: Cell Adhesion in Vascular Biology – von Willebrand Factor. *J Clin Invest* 99: 559–564
- RUGGERI, Z. M. (1999): Structure and Function of von Willebrand Factor. *Thromb Haemost* 82: 576–584
- RUGGERI, Z. M., R. LOMBARDI, L. GATTI, R. BADER, C. VALSECCHI und T. S. ZIMMERMAN (1982): Type IIB von Willebrand's disease: differential clearance of endogenous versus transfused large multimer von Willebrand factor. *Blood* 60: 1453–1456
- RUMLEY, A., G. D. O. LOWE, P. M. SWEETNAM, J. W. G. YARNELL und R. P. FORD (1999): Factor VIII, von Willebrand factor and the risk of major ischaemic heart disease in the Caerphilly Heart Study. *Br. J. Haematol* 105: 110–116
- SACHS, L. (1997): *Angewandte Statistik*. 8. Aufl., Springer, Heidelberg
- SAIGO, M. und D. D. W. P. Y. HSUE (2004): Role of thrombotic and fibrinolytic factors in acute coronary syndromes. *Prog Cardiovasc Dis*. 46: 524–38
- SAKAI, H., S. GOTO, J. Y. KIM, N. AOKI, S. ABE, N. ICHIKAWA, M. YOSHIDA, Y. NAGAOKA und S. HANDA (2000): (2000). Plasma concentration of von Willebrand factor in acute myocardial infarction. *Thromb Haemost* 84: 204–209
- SAMANI, N. J. und D. LODWICK (1997): Platelet glycoprotein IIIa P1<sup>A</sup> polymorphism and myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 33: 693–697
- SAMBOLA, A., V. FUSTER und J. J. BADIMON (2003): Role of Coronary Risk Factors in Blood Thrombogenicity and Acute Coronary Syndromes. *Rev Esp Cardiol* 56: 1001–1009
- SCAGLIONE, L., S. BERGERONE und G. GASCHINO (1998): Lack of relationship between the P1<sup>A1/A2</sup> polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and premature myocardial infarction. *Eur J Clin Invest* 28: 385–388
- SCHLINGMANN, K. P. (2000): *Gerinnungsphysiologische und molekularbiologische Analysen zur Diagnostik chronisch thrombophiler Zustände als Risikofaktoren für koronare Herzkrankheiten und Myokardinfarkt*. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Kiel
- SCHNEPPENHEIM, R., J. BRASSARD, S. KREY, U. BUDDE, T. J. KUNICKI, L. HOLMBERG, J. WARE und Z. M. RUGGERI (1996): Defective dimerization of von Willebrand factor

- subunits due to a CYS → ARG mutation in type IID von Willebrand disease. *Proc Nat Acad Sci USA* 93: 3581–3586
- SCHNEPPENHEIM, R., U. BUDDE, T. OBSER, J. BRASSARD, K. MAINUSCH, Z. M. RUGGERI, S. SCHNEPPENHEIM, R. SCHWAAB und J. OLDENBURG (2001a): Expression and characterization of von Willebrand factor dimerization defects in different types of von Willebrand disease. *BLOOD* 97
- SCHNEPPENHEIM, R., U. BUDDE und Z. M. RUGGERI (2001b): A Molecular Approach to the Classification of von Willebrand Disease. *Best Pract Res Clin Haematol* 14: 281–298
- SCHNEPPENHEIM, R., S. KREY, F. BERGMANN, D. BOCK, U. BUDDE, M. LANGE, R. LINDE, U. M. E. MEILI, G. MERTES, K. OLEK, H. PLENDL und E. SIMEONI (1994): Genetic heterogeneity of severe von Willebrand disease type III in the German population. *J Hum Genet* 6: 640–652
- SHAH, P. K. (1997): Plaque disruption and coronary thrombosis: new insight into pathogenesis and prevention. *Clin Cardiol* 20: II–38–44
- SILBERNAGL, S. und F. LANG (1998): *Taschenatlas der Pathophysiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- SIMON, D., C. A. PALUDO, G. C. GHISLENI, W. C. MANFROI und I. ROISENBERG (2003): Association studies between -1185A/G von Willebrand factor gene polymorphism and coronary artery disease. *Braz J Med Biol Res* 36: 709–714
- SRAMEK, A., P. BUCCIARELLI, A. B. FEDERICI, P. M. MANNUCCI, V. DE ROSA, G. CASTAMAN, M. MORFINI, M. G. MAZZUCCONI, A. ROCINO, M. SCHIAVONI, F. A. SCARAGGI, J. H. REIBER und F. R. ROSENDAAL (2004): Patients with type 3 severe von Willebrand disease are not protected against atherosclerosis: results from a multicenter study in 47 patients. *Circulation* 109: 740–744
- STARY, H. C. (1989): Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults. *Arteriosclerosis* 9: 119–132
- STATISTISCHES BUNDESAMT (2004): Datenreport 2004. Teil 1, 193–194
- TERESHCHENKO, S. N., N. N. LEVCHUK und V. N. DROZDOV (1999): Polymorphism of GP IIIa platelet glycoprotein gene  $PI^{A1/A2}$  compared to plasma hemostasis in myocardial infarction patients. *Ter Arkh* 71: 66–70

- THE EPIC INVESTIGATORS (1997): Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade and low-dose heparin during percutaneous coronary revascularization. Use of a monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in high-risk coronary angioplasty: The EPIC Investigation. *N Engl J Med* 336: 1689—1696
- THE PRISM-PLUS STUDY INVESTIGATORS (1998): Inhibition of the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor with tirofiban in unstable angina and non- Q-wave myocardial infarction: Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management in Patients Limited by Unstable Signs and Symptoms. *N Engl J Med* 338: 1488–1497
- THE RESTORE INVESTIGATORS (1997): Effects of platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade with tirofiban on adverse events in patients with unstable angina or acute myocardial infarction undergoing coronary angioplasty: The RESTORE Investigation. *Circulation* 96: 1445—1453
- THOMPSON, S. G., J. KIENAST, S. D. M. PYKE, F. HAVERKATE und J. C. W. VAN DE LOO (1995): Hemostatic Factors and the Risk of Myocardial Infarction or Sudden Death in Patients with Angina Pectoris. *N Engl J Med* 332: 635–641
- URDULASHVILI, T., N. MOMTSELIDZE, M. MANTSKAVA, N. NARSIA und G. MCHEDLISHVILI (2004): Hemorheological disorders and arteriolar resistance during ischemic heart disease. *Clin Hemorheol Microcirc* 30: 399–401
- VIJAYAN, K. V., P. J. GOLDSCHMIDT-CLERMONT, C. ROOS und P. F. BRAY (2000): The PIA2 polymorphism of integrin b3 enhances outside-in signaling and adhesive functions. *J Clin Invest* 105: 793–802
- WALTER, D., V. SCHACHINGER, M. ELSNER, S. DIMMELER und A. M. ZEIHNER (1997a): Platelet glycoprotein IIIa polymorphisms and risk of coronary stent thrombosis. *Lancet* 350: 1217–1219
- WALTER, D. H., V. SCHACHINGER, M. ELSNER, S. DIMMELER und A. M. ZEIHNER (1997b): Platelet glycoprotein IIIa polymorphisms and risk of coronary stent thrombosis. *Lancet* 350: 1217–1219
- WEISS, E. J., P. F. BRAY, M. TAYBACK, S. P. SCHULMANN, T. S. KICKLER, L. C. BECKER, J. L. WEISS, G. GERSTENBLITH und P. J. GOLDSCHMIDT-CLERMONT (1996): A Polymorphism of a Platelet Glycoprotein Receptor as an Inherited Risk Factor For Coronary Thrombosis. *N Engl J Med* 334: 1090–1094

- WEISS, H. J. (1975a): Platelet physiology and abnormalities of platelet function (first of two parts). *N Engl J Med* 293: 531–541
- WEISS, H. J. (1975b): Platelet physiology and abnormalities of platelet function (second of two parts). *N Engl J Med* 293: 580–588
- WEISS, H. J., J. HAWIGER, Z. M. RUGGERI, V. T. TURTO, P. THIAGARAJAN und T. HOFFMANN (1989): Fibrinogen-independent Platelet Adhesion and Thrombus Formation on Subendothelium Mediated by Glycoprotein IIb-IIIa Complex at High Shear Rate. *J Clin Invest* 83: 288–297
- WEISS, H. J., T. HOFFMANN, A. YOSHIOKA und Z. M. RUGGERI (1993): Evidence that the arg1744 gly1745 asp1746 sequence in the GPIIb-IIIa-binding domain of von Willebrand factor is involved in platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium. *J Lab Clin Med* 122: 324–332
- WEISS, H. J., D. MEYER, R. RABINOWITZ, G. PIETU, J. P. GIRMA, W. J. WICIC und J. ROGERS (1982): Pseudo-von-Willebrand's disease. An intrinsic platelet defect with aggregation by unmodified human factor VIII/von Willebrand factor and enhanced absorption of its high-molecular-weight multimers. *N Engl J Med* 306: 326–333
- WILLIAMS, M. S. und P. F. BRAY (2001): Genetics of Arterial Prothrombotic Risk States. *Exp Biol Med* 226: 409–419
- WIMAN, B., T. ANDERSSON, J. HALLQVIST, C. REUTERWALL, A. AHLBOM und U. DEFAIRE (2000): Plasma levels of tissue plasminogen activator/plasminogen activator inhibitor-1 complex and von Willebrand factor are significant risk markers for recurrent myocardial infarction in the Stockholm Heart Epidemiology Program (SHEEP) study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 2019–2023
- WINKELMANN, B. R., W. MÄRZ, B. O. BOEHM, R. ZOTZ, J. HAGER, P. HELLSTERN und J. SENEGES (2001): Rationale and Design of the LURIC Study – A Resource for Functional Genomics, Pharmacogenomics and Long-term Prognosis of Cardiovascular Disease. *Pharmacogenomics* 2: S7–S71
- DE WIT, T. R. und J. A. VAN MOURIK (2001): Biosynthesis, processing and secretion of von Willebrand Factor: Biological Implications. *Best Pract Res Clin Haematol* 14: 241–255

- WOOD, D., G. D. BACKER, O. FAERGEMAN, J. GRAHAM, G. MANCIA und K. PYÖRÄLÄ (1998): Prevention of coronary heart disease in clinical practice. *Eur Heart J* 19: 1434–1503
- WORTHLEY, S. G., J. I. OSENDE, G. HELFT, J. J. BADIMON und V. FUSTER (2001): Coronary Artery Disease: Pathogenesis and Acute Coronary Syndromes. *Mt Sinai J Med* 68: 167–181
- XIAO, W. und P. J. OEFNER (2001): Denaturing High-Performance Liquid Chromatography: A Review. *Hum Mutat* 17: 439–474
- ZOTZ, R. B., A. GERHARDT, C. KLUFT und R. E. SCHARF (2005): Venous thromboembolism during pregnancy is not associated with persistent elevated activated protein C (APC) sensitivity ratio based on the endogenous thrombin potential. *Thromb Haemost.* 2: 306–310
- ZOTZ, R. B., M. KLEIN, H. P. DAUBEN, C. MOSER, E. GAMS und R. E. SCHARF (2000): Prospective Analysis after Coronary-artery Bypass Grafting: Platelet GP IIIa Polymorphism (HPA-1b/PI<sup>A2</sup>) Is a Risk Factor for Bypass Occlusion, Myocardial Infarction and Death. *Thromb Haemost* 83: 404–407
- ZOTZ, R. B., B. R. WINKELMANN, M. NAUCK, G. GIERS, B. MARUHN-DEBOWSKI, W. MÄRZ und R. E. SCHARF (1998): Polymorphism of Platelet Membrane Glycoprotein IIIa: Human Platelet Antigen 1b (HPA-1b/PI<sup>A2</sup>) Is an Inherited Risk Factor for Premature Myocardial Infarction in Coronary Artery Disease. *Thromb Haemost* 79: 731–735

# Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Reinhard Schneppenheim möchte ich für die Überlassung des Themas und die wissenschaftliche Betreuung und Anleitung beim Erstellen der Arbeit herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt zudem Herrn PD Dr. med. Rainer B. Zotz im Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Düsseldorf, dem ich das Konzept zur statistischen Auswertung, die technischen Möglichkeiten für diese und viele Hilfestellungen bei der Ausführung verdanke.

Für die Bereitstellung, Bearbeitung und Versendung der Proben möchte ich dem Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Düsseldorf unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Rüdiger E. Scharf danken.

Herrn Tobias Obser und Herrn Florian Oyen danke ich für die große Unterstützung, technische Assistenz und freundschaftliche Hilfe während der praktischen Arbeiten. Für seine anregende Auseinandersetzung mit den Inhalten der Arbeit möchte ich Herrn Dr. Johannes Rischewski danken.

Weiterhin gilt mein Dank allen Mitarbeitern der Labore der Klinik und Poliklinik für pädiatrische Hämatologie und Onkologie im Universitätsklinikum Hamburg für die freundschaftliche Aufnahme und Unterstützung.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Familienstand	Ledig
Geboren am	2. Juli 1977 in Soltau
Staatsbürgerschaft	Deutsch
Anschrift	Ulmenweg 4, 32760 Detmold
E-Mail	natalie.treder@gmx.de

## Beruf und Ausbildung

seit Februar 2005	Assistenzärztin in der kinder- und jugendmedizinischen Klinik des Klinikums Lippe Detmold
Dezember 2004	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2003–2004	PJ-Tertiale in Pädiatrie, Chirurgie, Innere Medizin in Hamburg und Sydney/Australien
1998–2004	Studium der Humanmedizin, Universität Hamburg Famulaturen in Pädiatrie, Anästhesiologie, Gynäkologie in Hamburg, Zagreb/Kroatien und Durban/Südafrika
1997	Au-pair-Tätigkeit in Kobe/Japan
1996	Freiwilliges soziales Jahr, Mutter-Kind-Kurheim Pellworm
1989–1996	Gymnasium Rissen, Hamburg
1984–1989	Grundschule Faßberg (Niedersachsen)

## Sonstiges

Stipendium	Stipendiatin der Studienstiftung des deutschen Volkes
Auszeichnung	Theodor-Fontane-Preis (1999) verliehen durch die Studienstiftung des deutschen Volkes für Initiative zur transnationalen Verständigung
Hobbys	Volleyball, Trekking

# Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Detmold, den 8. August 2006

Natalie Treder