

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III
(Direktor: Prof. Dr. K. Werdan) und dem Institut für Humangenetik und
Medizinische Biologie (Direktor: Prof. Dr. I. Hansmann)
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**Untersuchungen zum Stellenwert ausgewählter genetischer Marker bei
Patienten mit koronarer Makroangiopathie im Vergleich zu
koronarangiographisch unauffälligen Vergleichspersonen aus dem
mitteldeutschen Raum**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Dirk Rehfeld

geboren am 08. April 1976 in Wittenberg

Gutachter:

1. Prof. Dr. Hansmann

2. PD Dr. Taubert

3. Prof. Dr. Morawietz (Dresden)

01.03.2005

05.09.2005

Kurzreferat und bibliographische Beschreibung

Überblick: In der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen einer klinischen Studie Untersuchungen zu ausgewählten koronaren Risikofaktoren in einer mitteldeutschen Population an europäischen Kaukasiern durchgeführt. Es wurde geprüft, ob für diese Risikofaktoren eine Assoziation zum angiographischen Koronarbefund nachgewiesen werden kann. Hierzu wurden zwei alters- und geschlechtsgepaarte Probandenstichproben mit angiographisch gesichertem Koronarbefund erhoben: eine Gruppe von 95 Koronarpatienten mit mindestens 70%iger Verengung eines Hauptgefäßes und einem Erkrankungsalter vor dem 56. Lebensjahr sowie eine Vergleichsgruppe von 95 Probanden mit angiographisch gesichertem unauffälligem Koronarbefund. Für die Beurteilung der Häufigkeitsverteilungen der geprüften genetischen Varianten in der angiographisch untersuchten Stichprobe wurden 470 unselektierte anonymisierte Langzeit-Blutspender der gleichen geographischen Region, ebenfalls europäische Kaukasier, herangezogen.

Untersuchte genetische Varianten: In der vorliegenden Arbeit wurden der TNF β -*NcoI*-SNP im Intron 1, die FaktorV-Leidenmutation und der Angiotensinogen-T174M-SNP an einer mitteldeutschen Population von 660 Kaukasiern auf Assoziation zur KHK untersucht.

Ergebnisse: Die Inzidenz koronarer Herzerkrankungen war in der untersuchten Population nicht mit den Genotypen des TNF β -*NcoI*-SNP im Intron 1 (n=463) assoziiert. Ein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Genotypenrelationen und Allelfrequenzen zwischen den koronar auffälligen Patienten und Blutspendern ließ eine Beeinflussung metabolischer Faktoren vermuten. Es fand sich eine Tendenz zu vermehrtem Auftreten des G-Allels mit zunehmender Ausprägung der koronaren Herzkrankheit ohne Signifikanz. Heterozygote Allelträger des TNF β -*NcoI*-SNP besaßen einen signifikant niedrigeren Serumcholesteringehalt in der untersuchten Population. Die Leidenmutation des Faktor V (n=644) und der Angiotensinogen-T174M-Polymorphismus (n=640) waren in der untersuchten mitteldeutschen Population nicht mit dem angiographisch gesicherten Koronarbefund assoziiert. Jedoch war beim Angiotensinogen-T174M-Polymorphismus eine protektive Tendenz des T-Allels gegenüber dem Wildtyp zu verzeichnen.

Rehfeld, Dirk: Untersuchungen zum Stellenwert ausgewählter genetischer Marker bei Patienten mit koronarer Makroangiopathie im Vergleich zu koronarangiographisch unauffälligen Vergleichspersonen aus dem mitteldeutschen Raum.
Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 67 Seiten, 2004

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen

1	Einleitung	1
1.1	Risikofaktoren für die Entstehung der koronaren Herzkrankheit	1
1.2	Das Zytokin TNF β und seine Bedeutung in der Atherogenese	3
1.3	Gerinnungsfaktor V und atherosklerotische Gefäßwandprozesse	5
1.4	Angiotensinogen als wichtige Komponente des Renin-Angiotensin-Aldosteron- Systems	7
2	Zielstellung	9
3	Material und Methoden	10
3.1	Studienkollektiv	10
3.2	Studienkonzept	11
3.2.1	Erhebung der Krankengeschichte	11
3.2.2	Biochemische Labordiagnostik und molekulargenetische Untersuchung	11
3.3	Durchführung der Koronarangiographie	13
3.4	Genotypisierung	13
3.4.1	<i>Nco</i> I-Polymorphismus des TNF β - IVS1+90A>G	15
3.4.2	Leiden-Polymorphismus des Faktors V - c.1691G>A	15
3.4.3	T174M-Polymorphismus des Angiotensinogen - c.659C>T	16
3.5	Statistische Auswertung	17
4	Ergebnisse	18
4.1	Charakterisierung der Studienteilnehmer	18

4.2	Prüfung der Genpolymorphismen auf Assoziation zur Koronaren Herzkrankheit....	23
4.2.1	TNFβ- <i>NcoI</i> -Polymorphismus.....	23
4.2.2	FaktorV-Leiden-Polymorphismus	27
4.2.3	Angiotensinogen-T174M-Polymorphismus.....	30
4.3	Untersuchung der genetischen Varianten im Kontext zum Ausprägungsgrad der KHK	32
4.4	Einfluss des Genotyps auf ausgewählte Blutgerinnungs- und Lipidparameter sowie die Expression klassischer koronarer Risikofaktoren	34
4.5	Untersuchung der Familienanamnese	36
5	Diskussion	38
5.1	Die Bedeutung des TNFβ- <i>NcoI</i> -Polymorphismus bei der koronaren Herzkrankheit.....	38
5.2	Die Rolle der Leidenmutation des Faktor V bei der Ausbildung der Koronaren Atherosklerose.....	42
5.3	Angiotensinogen-T174M-Polymorphismus und koronares Risiko	45
5.4	Einschränkende Aspekte	48
5.5	Perspektiven	49
6	Zusammenfassung.....	50
	Literaturverzeichnis.....	52
	Thesen.....	67
	Anlagen	

Verzeichnis der Abkürzungen

A	Adenin (Base)
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-I-konvertierendes Enzym
AGT	Angiotensinogen
APC	aktiviertes Protein C
Apo AI	Apolipoprotein AI
Apo B100	Apolipoprotein B100
AT III	Antithrombin III
bp	Basenpaare
BS	Blutspender
BMI	Body mass index
C	Cytosin (Base)
CAD	engl.: Coronary Artery Disease
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CI	Konfidenzintervall
CMV	Cytomegalievirus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
etc.	et cetera
ECTIM	Etude Cas-Temoin de l'Infarctus du Myocarde
F V	Faktor V
F VII	Faktor VII
HDL	High-density Lipoprotein
homog.	homogen
HRS	Harnsäure
Intra- und Extravasation	Hindurchwandern durch das Gefäßendothel
IU	Internationale Einheiten
J.	Jahre
KHK	Koronare Herzerkrankung
LDL	Low-density Lipoprotein
Lp(a)	Lipoprotein(a)
LRP1	LDL receptor-related protein

LTA	Lymphotoxin alpha (entspricht Tumornekrosefaktor beta)
MHC	Major-Histocompatibly-Complex
M	Methionin (Aminosäure)
MI	Myokardinfarkt
modif.	modifiziert
<i>Mnl</i> I	eine Restriktionsendonuklease
<i>Nco</i> I	eine Restriktionsendonuklease
OR	Odds Ratio
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-Komplex-1
PC	Protein C
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PS	Protein S
PTCA	perkutane transluminale Koronarangioplastie
RF	Risikofaktor
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
SD	Standardabweichung vom Mittelwert
SNP	Singlenukleotidpolymorphismus
TCHOL	Totalcholesterol
TG	Triglyzeride
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
TNF β	Tumornekrosefaktor beta
T	Threonin (Aminosäure)
T	Thymin (Base)
Tab.	Tabelle
vs.	versus

1 Einleitung

Die koronare Herzkrankheit stellt derzeit die häufigste Krankheits- und Todesursache in Deutschland dar. 158 384 Patienten, dies entspricht 18,8% der Gesamtmortalität, verstarben 2001 in Deutschland an chronisch ischämischer Herzkrankheit bzw. akutem Myokardinfarkt (Statistisches Bundesamt 2004). Diese Fakten veranschaulichen die große sozial-ökonomische Bedeutung dieses Krankheitsbildes. Eine spezielle Prävention und effektive Therapie bei der Behandlung der betroffenen Patienten ist folglich nicht nur von medizinisch-ethischem sondern auch von volkswirtschaftlichem Interesse. Je genauer die Risiken und pathophysiologischen Mechanismen von multifaktoriell bedingten Erkrankungen wie der KHK qualitativ und quantitativ erfassbar sind, desto effektiver können Behandlungsstrategien zur Prävention und Therapie gestaltet werden.

1.1 Risikofaktoren für die Entstehung der koronaren Herzkrankheit

Der Manifestationszeitpunkt und der Verlauf der koronaren Herzkrankheit werden sowohl von genetischen als auch von umweltbedingten Faktoren beeinflusst (Abb. 1).

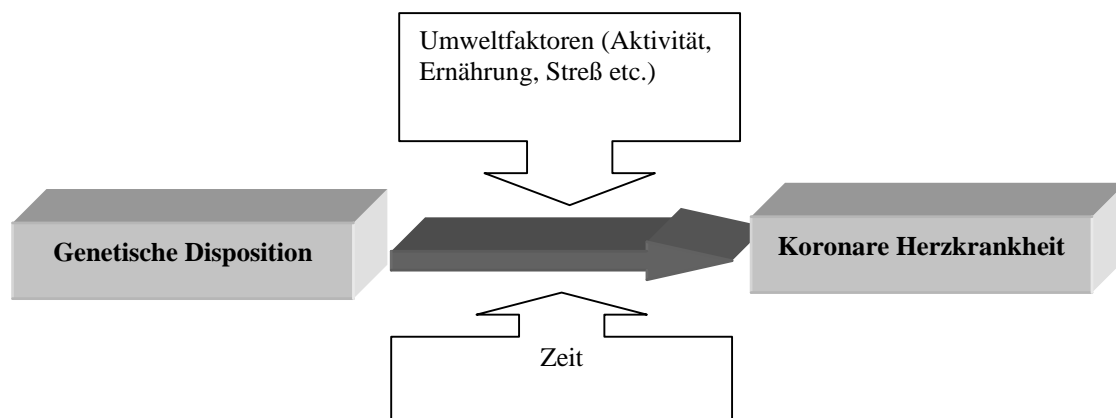


Abbildung 1: Zusammenwirken von verschiedenen Risikofeldern bei der Ausbildung einer koronaren Herzkrankheit

Mit der Framinghamstudie wurde 1950 (Sherman et al. 1999, Fox et al. 2004) erstmals begonnen, fundamentale Einflussgrößen der koronaren Herzkrankheit in einer Großstudie systematisch zu erforschen. Bis zum Ende des letzten Jahrhunderts wurden dabei vor allem

die in Tabelle 1 dargestellten Faktoren ermittelt, die das individuelle Risikoprofil charakterisieren.

Tabelle 1: Faktoren für ein erhöhtes Risiko an koronaren Ereignissen laut „Prevention of Coronary Heart Disease in Clinical Practice“ (Wood et al. 1998)

Lebensstil	biochemische und physiologische Charakteristika (beeinflussbar)	persönliche Charakteristika (nicht beeinflussbar)
<ul style="list-style-type: none"> - Ernährung reich an gesättigten Fetten, Cholesterin und Kalorien - Zigaretten rauchen - Übermäßiger Alkoholgenuss - körperliche Inaktivität - emotionaler Stress mit der so genannten Typ-A-Persönlichkeitsstruktur (Ehrgeiz, Aggressivität, Hektik) 	<ul style="list-style-type: none"> - arterieller Hypertonus - Gesamtcholesterin >4,9 mmol/l - LDL-Cholesterin >2,9 mmol/l - HDL-Cholesterin <1,0 mmol/l - Triglyceride >2,0 mmol/l - Diabetes mellitus - Adipositas - thrombogene Faktoren 	<ul style="list-style-type: none"> - Alter - Geschlecht - Familienanamnese von KHK oder anderen Gefäßerkrankungen in jüngerem Alter (Männer <55 J., Frauen <65 J.) - bereits bekannte KHK oder atherosklerotische Gefäßerkrankung

In zunehmendem Maße werden auch bestimmte genetische Konstellationen mit der Ausbildung von artherosklerotischen Gefäßveränderungen bzw. dem Myokardinfarktisiko assoziiert. Entsprechende Kandidatengene, die Pathomechanismen wie z.B. der endothelialen Dysfunktion, Gerinnungsstörungen oder Entzündungsprozessen zugeordnet werden, sind dementsprechend Schwerpunkte in der medizinischen Grundlagen- und klinischen Forschung. Hierzu gehören beispielsweise polymorphe Genvarianten von Komponenten des Lipidstoffwechsels, wie z.B. der Lipoprotein-Lipase, Apolipoprotein B und E, LRP1, von Komponenten des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, wie z.B. ACE und Angiotensin I, von Komponenten des Koagulation-Fibrinolyse-Systems, wie z.B. Fibrinogen, PAI-1 und die Thrombozytenrezeptorkomplexe für den von Willebrand Faktor GP Ib/IX (Jukema et al.

1996, Schulz et al. 2003, ECTIM-Studie von Behague et al. 1996, de Maat et al. 1998, Yu et al. 1996, Murata et al. 1998), aber auch immunrelevante Faktoren, wie Interleukin-6-174 G/C (Humphries et al. 2001) oder TNF α (Szalai et al. 2002).

Auch das Risikopotential infektiöser Keime wird bei der Ausbildung einer koronaren Herzkrankheit diskutiert. So konnte von verschiedenen Autoren virale DNA in der Arterienwand nachgewiesen werden. Horvath et al. (2000) und Wong et al. (2000) fanden beispielsweise einen signifikanten Zusammenhang zwischen einer CMV-Infektion und der Ausbildung einer KHK ($p < 0.01$). Kowalski (2001) stellte eine signifikante Assoziation zwischen dem Vorhandensein einer *Helicobacter pylori* – Infektion und Ausbildung einer KHK fest.

In der vorliegenden Arbeit wurden genomische Varianten von drei Kandidatengenen der koronaren Atherosklerose, nämlich der T174M-Polymorphismus des Angiotensinogens, der Leiden-Polymorphismus des Gerinnungsfaktors Faktor V und der *NcoI*-Polymorphismus des Tumornekrosefaktors β , im Rahmen einer klinischen Studie in einer mitteldeutschen Population untersucht.

1.2 Das Zytokin TNF β und seine Bedeutung in der Atherogenese

In atherosklerotischen Plaques und Läsionen wurden vermehrt Entzündungszellen wie Makrophagen und T-Zellen gefunden (Xu et al. 1990, Wick et al. 1995). In diese komplexen entzündlichen Vorgänge der Gefäßwand sind eine Vielzahl von Faktoren und komplexe Signaltransduktionskaskaden involviert. Zytokine, wie auch die Tumornekrosefaktoren α und β , scheinen hierbei eine wichtige Rolle zu spielen.

TNF β , auch als Lymphotoxin α bezeichnet, wurde zuerst bei Mitogen-stimulierten Lymphozyten mit antizellulärer Aktivität gegen neoplastische Zelllinien entdeckt (Gray et al. 1984). TNF β ist zusammen mit TNF α auf dem kurzen Arm des Chromosom 6 (6p21.3) in der sogenannten MHC-Klasse-III-Region im TNF-Cluster lokalisiert (Spies et al. 1989). Diese beiden Glykoproteine besitzen eine 50 prozentige Homologie der Aminosäuresequenz und ähnliche funktionelle Eigenschaften (Nedwin et al. 1985, Aggarwal et al. 1985). So binden beide an die gleichen, von Brockhaus et al. (1990) beschriebenen

Oberflächenrezeptoren p55 (TNF-R1) und p75 (TNF-R2) und verursachen daher auch ganz ähnliche biochemische Effekte:

- Sie induzieren in Endothelzellen die Synthese von Zytokinen (Locksley et al. 1987, Hochman et al. 1995).
- Sie initiieren die Expression von Adhäsionsmolekülen unter anderem an Endothelzellen, Lymphozyten und Makrophagen (Van de Kar et al. 1993, Cavender et al. 1988 und 1989, Lapierre et al. 1988).
- Sie steuern die Lymphozytenmigration und Bindung der Lymphozyten an Endothelzellen (Issekutz et al. 1989).
- Sie fungieren als chemotaktisch-aktive Moleküle für Neutrophile und Makrophagen (Oster et al. 1987).
- Sie steuern die prokoagulatorische Aktivität von Endothelzellen und besitzen somit ein antifibrinolytisches Potential (Schmid et al. 1995, Bussolino et al. 1990, van Hinsbergh et al. 1988).
- Sie sind essentiell für die normale Entwicklung und Funktion des Immunsystems (Eugster et al. 1996) und steuern den Aufbau des lymphatischen Gewebes (Ruddle 1999). Ein Mangel an TNF α und β führt zu erhöhter Infektionsgefahr.
- Sie hemmen die Angiogenese bzw. das Endothelzellwachstum (Tsuruoka et al. 1998, Sato et al. 1990), steigern aber das Fibroblastenwachstum und die Kollagensynthese (Kahaleh et al. 1988).

Abbildung 2 veranschaulicht die Funktionen des Tumornekrosefaktor β auf Endothelebene.

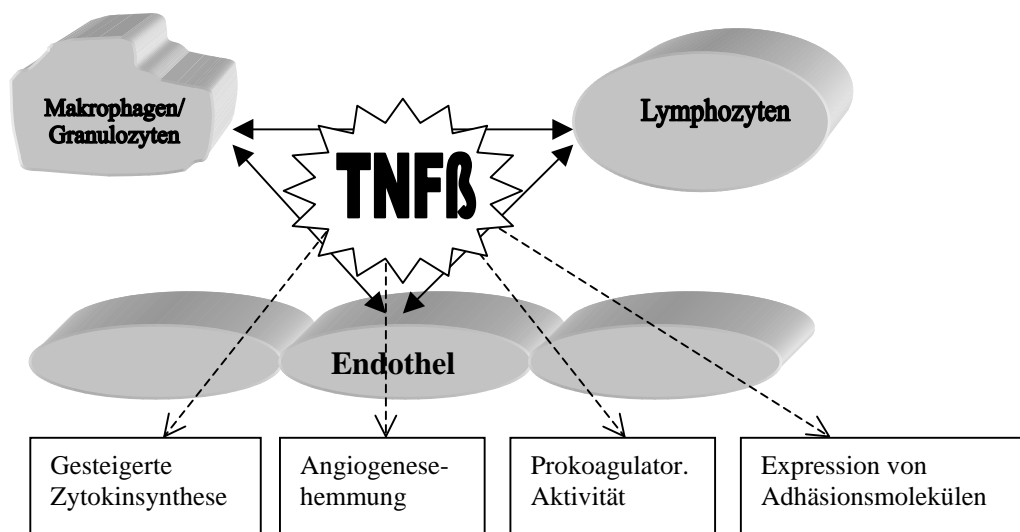


Abbildung 2: Einflussnahme des Tumornekrosefaktor β im Bereich des Gefäßendothels

Schreyer et al. fanden 2002 heraus, dass TNF β -defiziente Mäuse ein um 62% geringeres Plaquewachstum im Aortabereich aufwiesen. TNF α hatte dabei keinen Einfluss. TNF β spielt außerdem eine Schlüsselrolle bei chronisch inflammatorischen Zuständen (Kratz et al. 1996). TNF β , welches von aktivierten T-Lymphozyten ausgeschüttet wurde, förderte bei Endothelzellen eine Intra- und Extravasation von inflammatorischen Zellen (Pober et al. 1987).

Mit Ausnahme von Erythrozyten exprimieren somatischen Zellen ca. 400 - 20.000 TNF-Rezeptoren (Kull et al. 1985, Munker et al. 1987, Hohmann et al. 1989, Saito et al. 1994). Dabei entfalten beide Tumornekrosefaktoren eine pleiotrope, überwiegend proinflammatorische und immunmodulatorische Wirkung. Während TNF α von einer Vielzahl von Zellen wie Monozyten, Makrophagen, T-Zellen (CD 4+) aber auch Myozyten und Fibroblasten sezerniert wird (Adachi et al. 1994, Imanishi et al. 1995, Bomalaski et al. 1995), erfolgt die Bildung von TNF β ausschließlich von aktivierten Lymphozyten (Staugas et al. 1992, Imanishi et al. 1995). Im atherosklerotischen Prozess ist eine wichtige Rolle des TNF β in der Aktivierung von Endothelzellen und neutrophilen Granulozyten zu sehen. Für beide TNF sind verschiedene genomische Varianten beschrieben (Jongeneel et al. 1991). TNF α -Polymorphismen konnten zum Teil schon direkt zu atherosklerotischen Erkrankungen assoziiert werden (Szalai et al. 2002). Trotz seiner unbestrittenen pathophysiologischen Bedeutung liegen zu genomischen Varianten von TNF β bisher nur wenige Assoziationsdaten vor. Erste Assoziationen zum sogenannten *NcoI*-Polymorphismus des TNF β konnten von Braun et al. (1998) beschrieben werden, die enge Bezüge zum metabolischen Syndrom fanden. Dieser *NcoI*-Polymorphismus, ein Basenaustausch von Adenin zu Guanin, befindet sich im Intron 1 des TNF β -Gens an Position 90.

1.3 Gerinnungsfaktor V und atherosklerotische Gefäßwandprozesse

Faktor V (syn. Proaccelerin) spielt eine zentrale Rolle in der Koagulationskaskade. Ein inaktiver Vorläufer mit einer Kettenlänge von 2224 AS wird durch limitierte Proteolyse in die biologisch aktive Form überführt. Aktivierter Faktor V und Kalzium-Ionen werden als Kofaktor für die Serinprotease Faktor X (Stuart-Prower-Faktor) benötigt, um Prothrombin (Faktor II) in seine aktive Form zu überführen. Faktor V ist somit für den intrinsischen und

extrinsischen Weg der sekundären Hämostase essentiell erforderlich (Hick 1995). Abbildung 3 bietet eine schematische Übersicht der plasmatischen Gerinnung des Menschen.

Dahlback et al. (1993, 1994) fanden eine Assoziation von familiärer Häufung einer APC-Resistenz verbunden mit erhöhtem Thromboserisiko bei mutativer Veränderung des Faktor V. Bertina et al. (1994) entdeckten eine Punktmutation von Guanin zu Arginin an Position 1691 der cDNA im Exon 10 des Faktor-V-Gens (chromosomale Lokalisation: 1q23), welche zu einem Aminosäureaustausch an Position 506 (arg506gln) führt und als FV R506Q oder Leidenmutation bezeichnet wird. Diese Genvariante des Gerinnungsfaktors V ist der häufigste bekannte kongenitale Risikofaktor für Thrombophilie. Der FV-Leiden-Phänotyp zeigt dabei die gleiche prokoagulatorische Aktivität wie der Wildtyp. Aktiviertes Protein C (APC) vermittelt durch weiteren proteolytischen Abbau die Inaktivierung von Faktor V. Bei der Leiden-Mutation ist eine der drei Angriffsstellen des APC am Faktor V verändert, was eine Inaktivierung dieses Gerinnungsfaktors behindert. Personen mit dieser genetischen Variante weisen deshalb eine erhöhte Koagulationsfähigkeit ihres Blutes mit gesteigertem Thromboserisiko auf (Bertina et al. 1994, Greengard et al. 1994, Zoller et al. 1994).

Kiechl et al. (1999) haben hinsichtlich der Ausbildung einer fortgeschrittenen Atherosklerose an Femoralarterien und Carotiden von einer unabhängigen und graduellen Assoziation mit einer vorhandenen APC-Resistenz berichtet, wobei die Leiden-Mutation allerdings nur eine Facette dieses Zusammenspiels neben Einflüssen der Umwelt, des Verhaltens und auch der Wirkung von Hormonen darstellte. In einer Fall-Kontrollstudie mit Männern unter 70 Jahren (Doggen et al. 1998) wurde eine Steigerung des Myokardinfarkttrisikos bei Vorhandensein der Leiden-Mutation von 40% ermittelt. In einer epidemiologischen Studie, welche mehrere europäische und außereuropäische Länder einschloss, haben Herrmann et al. (1997) für eine Stichprobe aus dem nordöstlichen Raum Deutschlands den höchsten prozentualen Anteil an Mutationsträgern der gesamten Studie ermittelt.

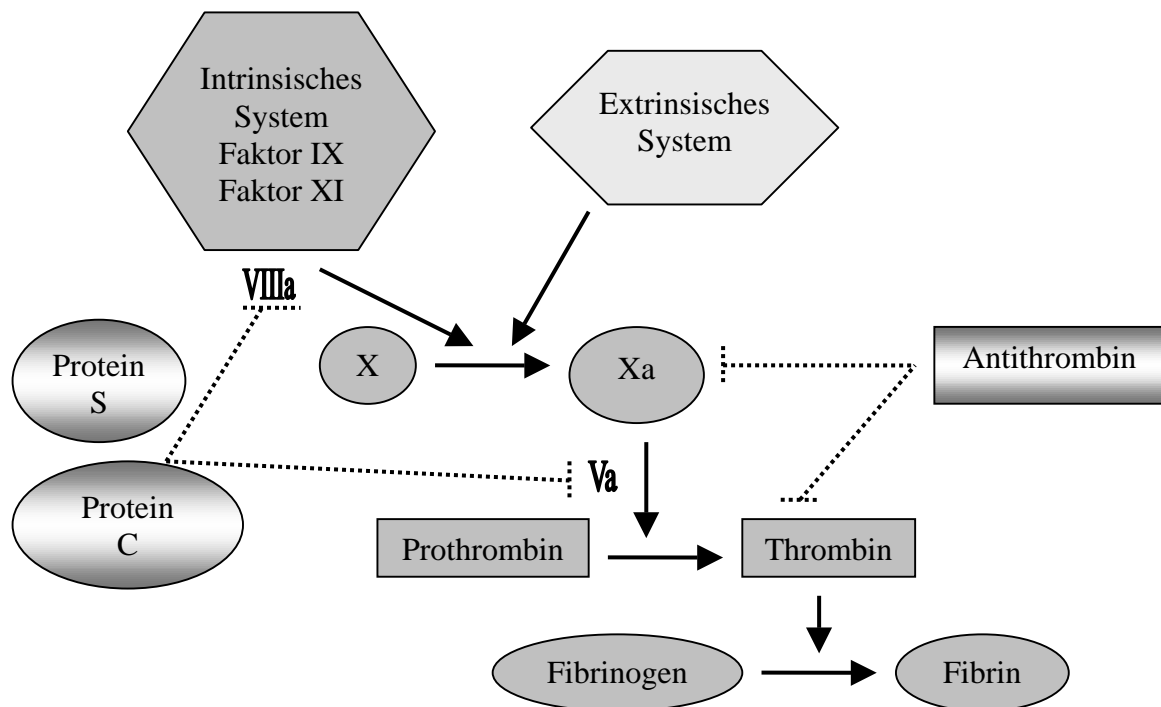


Abbildung 3: Plasmatische Gerinnung, Einfluß der Inhibitoren (nach Willeke et al. 2002)

1.4 Angiotensinogen als wichtige Komponente des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems

Die Komponenten des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) sind essentiell für die Aufrechterhaltung der Homöostase und sind damit wichtige Kandidatengene des Atheroskleroserisikos. Es besteht ein kausaler Zusammenhang zwischen Fehlregulationen des RAAS und der Entwicklung von atherosklerotischen Gefäßwandveränderungen.

Das in der Leber produzierte Angiotensinogen agiert als Precursorprotein von Angiotensin I. Durch weitere proteolytische Spaltung mittels ACE entsteht der potente Vasokonstriktor Angiotensin II. Dieser enzymatisch gesteuerte Regelkreis wirkt im gesunden Organismus der Erniedrigung auf ein unzureichendes Blutdruckniveau entgegen (Abbildung 4).

Das Angiotensinogen-Gen besitzt 5 Exons und ist auf Chromosom 1q42-q43 lokalisiert (Gaillard-Sanchez et al. 1990). Angiotensinogen besteht aus 452 Aminosäuren und hat je nach Glykosylierungsgrad eine molare Masse von 55-65 kD. Bisher sind verschiedene

genomische Varianten des Angiotensinogens bekannt, wobei der T174M- und der M235T-Polymorphismus bisher am häufigsten untersucht wurden. Diese genetischen Varianten des AGT konnten signifikant mit essentieller Hypertonie assoziiert werden (Jeunemaitre et al. 1992). Erste Daten liegen zu einer möglichen Assoziation des T174M-Polymorphismus zur koronaren Atherosklerose vor (Gardemann et al. 1999, Chistiakov et al. 1999). Der T174M-Polymorphismus, ein Aminosäureaustausch an Aminosäureposition 174 von Threonin nach Methionin, wird durch einen Basenaustausch an Position 659 der cDNA im Exon 2 von Cytosin nach Thymin verursacht.

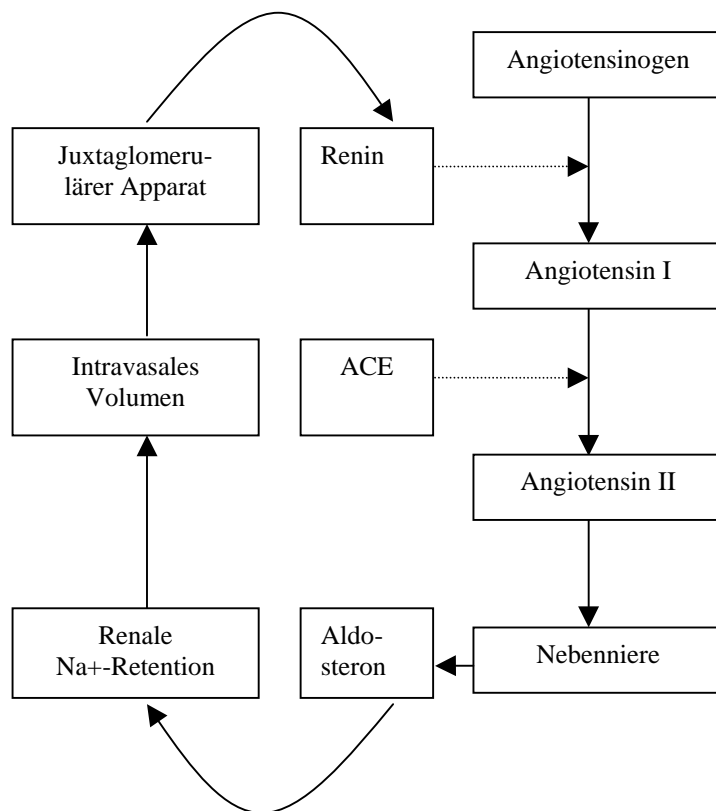


Abbildung 4: Regulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (nach Reincke et al. 2003)

2 Zielstellung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten in einer klinischen Studie Untersuchungen zu ausgewählten koronaren Risikofaktoren in einer mitteldeutschen Population an europäischen Kaukasiern durchgeführt werden. Es sollte geprüft werden, ob für diese Risikofaktoren eine Assoziation zum angiographischen Koronarbefund nachgewiesen werden könne.

Dementsprechend waren folgende Schwerpunkte zu bearbeiten:

1. In der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin Halle sollten zwei alters- und geschlechtsgepaarte Probandenstichproben mit angiographisch gesichertem Koronarbefund erhoben werden: eine Gruppe von Koronarpatienten mit mindestens 70%iger Stenosierung eines Hauptgefäßes und einem Erkrankungsalter vor dem 56. Lebensjahr sowie eine Vergleichsgruppe von Probanden mit angiographisch gesichertem unauffälligem Koronarbefund. Diese wird im weiteren Text als „koronar glatte“ Vergleichsgruppe bezeichnet.
2. Anhand eines halbstandardisierten Fragebogens sollte im persönlichen Interview eine ausführlich erhobene Anamnese zur Krankengeschichte aber auch zu externen Risikofaktoren wie Rauchen, Ernährungsgewohnheiten, Stress usw. sowie die Krankenakte einbezogen werden.
3. Im Rahmen eines erweiterten Laborspektrums waren Risikofaktoren des Lipidstoffwechsels, der Gerinnung, der Entzündungsreaktion u.a. Stoffwechselbereiche zu erfassen.
4. Genetische Varianten von drei Risikogenen, nämlich der *NcoI*-Polymorphismus des TNF β , der Faktor V- Leiden-Polymorphismus und der T174M-Polymorphismus des Angiotensinogens, sollten bestimmt werden.
5. Durch statistische Analysen sollte geprüft werden, ob in der untersuchten territorialspezifischen Stichprobe eine Assoziation dieser genetischen Varianten zum angiographisch gesicherten Koronarstatus gefunden und welcher Stellenwert anamnestischen und klinischen bzw. laborbiochemischen Befunden zugemessen werden kann.

3 Material und Methoden

3.1 Studienkollektiv

In der vorliegenden klinischen Studie wurden ausschließlich Probanden kaukasischer Herkunft aus dem mitteldeutschen Raum um Halle/Saale eingeschlossen, für die ein positives Votum der Ethikkommission der Martin-Luther-Universität vorlag. Die Teilnahme an der Studie war freiwillig. Die Teilnehmer wurden über Ziele und Verlauf der Studie aufgeklärt und erteilten ihr schriftliches Einverständnis. Die Rekrutierung der Studienteilnehmer erfolgte von Januar 1997 bis Juni 2000 an der Klinik für Innere Medizin der Martin-Luther-Universität Halle. Es wurden insgesamt 190 koronarangiographierte Patienten einbezogen.

Für die Koronargruppe wurden 95 Patienten erfasst, die eine angiographisch gesicherte koronare Verschlusskrankheit mit einem Stenosegrad von mindestens 70% besaßen. 76,8% der Patienten waren Männer. Das Durchschnittsalter lag bei 47 ± 9 Jahren. Alle Patienten hatten nachweislich eine massive klinische Erstmanifestation ihrer Koronarerkrankung vor dem 56. Lebensjahr. Einbezogen wurden Patienten mit Myokardinfarkt oder solche, die eine PTCA- oder ACVB-pflichtige Stenose aufwiesen. Sie erhielten eine medikamentöse Standardmedikation, bestehend aus Azetylsalizylsäure (82,1%), Nitraten (70,5%), ACE-Hemmern (69,5%), β -Rezeptoren-Blockern (76,8%), Kalzium-Kanal-Blockern (10,5%), Diuretika (17,9%) und zum Teil Antikoagulanzen (42,1%) in verschiedenen Kombinationen. Alle Patienten waren zum Zeitpunkt des Studienbeginns hospitalisiert und klinisch stabil.

Die koronar glatten Vergleichsprobanden, eine zu den KHK-Patienten alters- und geschlechtsgepaarte Stichprobe, wiesen allesamt einen angiographisch gesicherten unauffälligen Koronarbefund auf. Dazu zählten Personen, die auf Grund von Herzklappenvitien, atypischen pectanginösen Beschwerden, Hypertonie mit pectanginösen Beschwerden (sekundäre linksventrikuläre Hypertrophie), Kardiomyopathie oder psychogener Brustschmerz einer Koronarangiographie unterzogen wurden. Alle koronar glatten Vergleichspersonen waren zum Zeitpunkt des Studienbeginns ebenfalls hospitalisiert und klinisch stabil.

Für die Beurteilung der Häufigkeitsverteilungen der geprüften genetischen Varianten in der angiographisch untersuchten Stichprobe wurden 470 unselektierte anonymisierte Langzeit-

Blutspender der gleichen geographischen Region, ebenfalls europäische Kaukasier, die in der Universitätsblutspende Halle erhoben wurden, herangezogen. Jeder Spender wurde in den letzten drei Jahren bis zur Erfassung durch regelmäßigen hausärztlichen Check-up als gesund eingestuft. Es lagen keine positiven Familienanamnesen bezüglich kardiovaskulärer Krankheiten vor. Das Durchschnittsalter lag bei 43 ± 11 Jahren. 63% der Blutspender waren Männer.

3.2 Studienkonzept

3.2.1 Erhebung der Krankengeschichte

Alle Studienteilnehmer wurden nach einem halbstandardisierten Fragebogen zu folgenden Schwerpunkten persönlich interviewt:

- Auswertung der klinischen Befunde
- Erkrankungsanamnese
- Begleiterkrankungen (Hypertonie [$>140/90$], Adipositas [BMI $>25,9$], Diabetes mellitus, Lipidstoffwechselstörungen usw.)
- Ernährung / Genussmittel unter besonderer Beachtung des Fettgehalts und Alkoholkonsums
- Rauchen (Dauer und durchschnittliche Anzahl pro Tag)
- Schadstoffbelastung
- berufliche Tätigkeit
- körperliche Belastung in Beruf und Freizeit
- psychosozialer Stress
- Familienanamnese unter besonderer Berücksichtigung kardiovaskulärer Erkrankungen

3.2.2 Biochemische Labordiagnostik und molekulargenetische Untersuchung

Nach der Anamnese erfolgte am nächsten Tag zwischen 7 und 8 Uhr eine Nüchternblutentnahme aus der Armvene mit Serum-, EDTA-, Citrat- und Heparinmonovetten. Es schloss sich eine erweiterte Laboranalytik einschließlich Gerinnungs- und Lipidstoffwechsel im Zentrallabor des Universitätsklinikums Halle an. Die untersuchten Parameter sind in Tabelle 2 aufgeführt. Für die molekulargenetischen Untersuchungen wurde EDTA-Blut verwendet.

Tabelle 2: Untersuchte Laborparameter mit Bestimmungsmethode und Referenzbereich

Laborwert	Forschung	Referenzbereich	Einheit
Totalcholesterol	Enzymat. Farbtest	< 5,7	mmol/l
HDL	Enzymat. homog. Test	> 1,5	mmol/l
LDL	Enzymat. homog. Test	< 3,9	mmol/l
TG	Enzymat. Farbtest	< 2,3	mmol/l
Apo AI	Immunephelometrie	m 0,8 – 1,75	g/l
		w 0,9 – 1,9	g/l
Apo B	Immunephelometrie	m 0,8 – 1,4	g/l
		w 0,8 – 1,5	g/l
Lp(a)	Immunephelometrie	< 0,2	g/l
α_2 -Makroglobulin	Immunephelometrie	m 1,2 – 2,7	g/l
		w 1,4 – 3,2	g/l
TPZ (Quick)	Optische Methode	>70	%
PTT	Optische Methode	24 – 36	s
TZ	Optische Methode	14 – 21	s
Fibrinogen	Optische Methode	1,5 – 4,0	g/l
AT III	Kinetischer Test mit chromogenem Substrat	> 80	%
Prot. C	Kinetischer Test mit chromogenem Substrat	> 70	%
Prot. S aktivität	Rocket- Immunelektrophorese	81 – 113	%
Plasminogen	Kinetischer Test mit chromogenem Substrat	> 75	%
PAI	Kinetischer Test mit chromogenem Substrat	0,3 – 3,5	E/ml
Fakt V	Modif. Quicktest mit Fakt. V- Mangelplasma	>70	%
Fakt VII	Modif. Quicktest m. Fakt. VII- Mangelplasma	>70	%
Thrombozyten	Widerstandsimpedanzmes- sung	140-440	Gpt/l

3.3 Durchführung der Koronarangiographie

Die Durchführung der koronarangiographischen Untersuchungen oblag jeweils zwei erfahrenen interventionellen Kardiologen der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin Halle, denen der Einschluss der einzelnen Patienten in die vorliegende Studie nicht bekannt war. Die Stenosen der großen epikardialen Gefäße galten als hämodynamisch signifikant, wenn sich das Lumen auf 70% oder mehr verengt darstellte, was einer visuellen Verminderung des Gefäßdurchmessers um mehr als 50% entsprach. Eine Einteilung der Stenosierung wurde nach Zahl der betroffenen koronaren Hauptgefäße in 1-Gefäß-, 2-Gefäß- und 3-Gefäßerkrankung vorgenommen. Alle 190 Studienteilnehmer wurden mit Hilfe einer biplanen Koronarangiographie unter Verwendung eines Optimus M 200 (Philips, Deutschland) analysiert. Dazu wurde ein standardisiertes Protokoll für die Erfassung der koronarangiographischen und ventrikulographischen Daten verwendet.

3.4 Genotypisierung

Die Genotypisierung erfolgte im Institut für Humangenetik und Medizinische Biologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Aus den Leukozyten des hierfür abgenommenen EDTA-Bluts wurde mit Hilfe des „QIAamp DNA Blood Maxi Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Vorschrift des Produzenten die genomische DNA gewonnen. Die Güte der Präparation wurde durch Analyse der DNA im Agarosegel überprüft (1,2%iges ethidiumbromidhaltiges Agarosegel, 0,5µg/ml Ethidiumbromid, UV-Anregung bei 254nm). Eine weitere Kontrolle erfolgte durch Absorptionsmessung bei 260nm. Die präparierten DNA-Proben wurden bei -20°C gelagert.

Die Genotypisierung erfolgte durch Amplifikation der jeweils spezifischen PCR-Produkte und nachfolgende Restriktionsspaltung. Die Amplifikation wurde nach Standardprogramm mit Hilfe eines Thermocyclers Eppendorf gradient durchgeführt. In Tabelle 3 sind die Amplifikationsbedingungen und verwendeten Primer zusammengefasst.

Tabelle 3: Genotypisierung der untersuchten Polymorphismen des TNF β , Faktor V und Angiotensinogen
(PCR: Thermocycler Eppendorf gradient; Elektrophorese: 1,2%iges Agarosegel, Ethidiumbromidmarkierung)

Gen/ Accession	Position/ Austausch	Primer	Größe d. PCR- Produktes	Annealing- temperatur/ Zyklenzahl	PCR- Zusätze	Laufzeit d. Elektro- phorese	Restrik- tions- enzym
TNF β / Z15026	IVS1+90A>G Intron 1	5'- Primer 5'- GCCTGGGCCTTGGTGGGTTT -3' 3'- Primer 5'- CATCTTGGGGTGCTGACGGG - 3'	556bp	59°C/ 28 Zyklen	4% Formamid	50 min	<i>Nco</i> I
Faktor V/ M14335	R506Q c.1691G>A Exon 10	5'- Primer 5'- TGC CCA GTG CTT AAC AAG AC -3' 3'- Primer 5'- ATG CCC CAT TAT TTA GGC AG - 3'	209bp	52°C/ 30 Zyklen	5% Glyzerin	50 min	<i>Mnl</i> I
Angioten- sinogen/ M69110	T174M c.659C>T Exon 2	5'- Primer 5'- TCGCTGCAAACTTGACACC-3' 3'- Primer 5'- GAGCAGCCAGTCTTCCATCC - 3'	526bp	53°C/ 32 Zyklen	2% Formamid	50 min	<i>Nco</i> I

3.4.1 *NcoI*-Polymorphismus des TNF β - IVS1+90A>G

Der im Intron 1 des TNF β -Gens befindliche *NcoI*-Polymorphismus, ein Basenaustausch A+90G, betrifft eine Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease *NcoI*: „5'-C/CATGG-3'“. Bei der Allelkonstellation A weist das 556bp-große PCR-Produkt keine entsprechende Schnittstelle auf. Im Fall des G-Allels entsteht eine *NcoI*-Schnittstelle, so dass zwei kleinere Fragmente nach dem Verdau registriert werden können (459bp und 97bp).

Die Genotypisierung wurde nach der Methode von Schagdarsurengin (2003) durchgeführt.

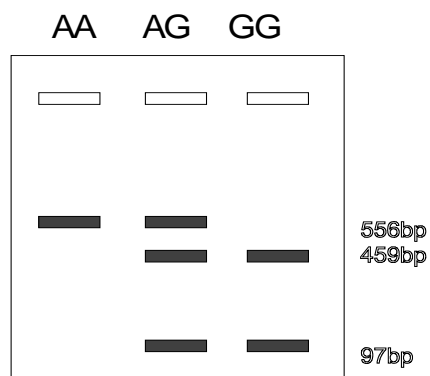


Abbildung 5 : Schematische Darstellung der *NcoI*-Spaltung des spezifischen PCR-Produktes von 556bp zur Analyse des TNF β -*NcoI*-Polymorphismus (IVS1+90A>G).

3.4.2 Leiden-Polymorphismus des Faktors V - c.1691G>A

Der Faktor V-Leiden-Polymorphismus an Position 1691 der cDNA betrifft die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *MnlI*: „5'...CCTC(N)₇/...3'“. Beim homozygoten GG-Genotyp sind zwei Erkennungssequenzen für das Enzym *MnlI* im PCR-Produkt (209 bp) vorhanden, wodurch nach dem Verdau drei DNA-Fragmente nachweisbar sind (106bp, 67bp und 36bp). Durch den Basenaustausch G>A wird eine dieser Erkennungssequenzen zerstört, so dass für das A-Allel nur noch zwei Fragmente dargestellt werden (142bp und 67bp).

Für die Genotypisierung der Leidenmutation im Faktors V-Gen wurde die Methode nach Bertina et al. (1994) eingesetzt.

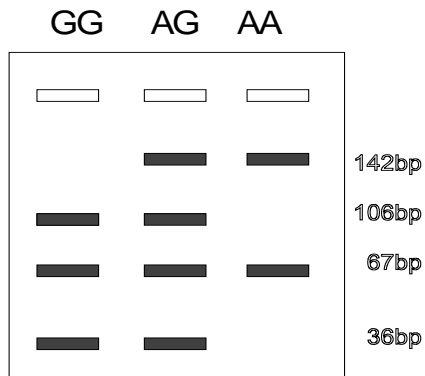


Abbildung 6: Schematische Darstellung der *MnlI*-Spaltung des spezifischen PCR-Produktes von 209 bp zur Analyse des Faktor V-Leiden-Polymorphismus

3.4.3 T174M-Polymorphismus des Angiotensinogen - c.659C>T

Der T174M-Polymorphismus des Angiotensinogen-Gens betrifft eine Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *NcoI*: „5'-C/CATGG-3'“. Das 526bp große PCR-Fragment besitzt im Fall des C-Allels eine Schnittstelle, weshalb nach Verdau zwei DNA-Fragmente detektiert werden (413bp und 113bp). Im Fall des T-Allels entsteht eine zweite Schnittstelle, was zu einem Fragmentmuster von 233bp, 180bp und 113bp führt.

Die Genotypisierung erfolgte nach der Methode von Jeunemaitre et al. (1992).

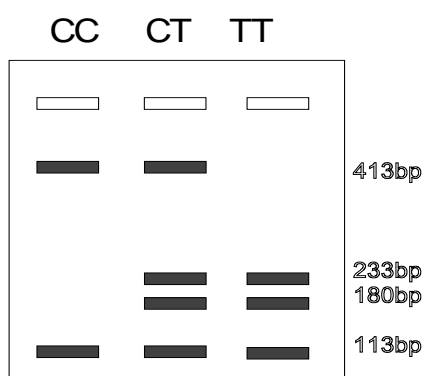


Abbildung 7: Schematische Darstellung der *NcoI*-Spaltung des spezifischen PCR-Produktes von 526 bp zur Analyse T174M-Polymorphismus des Angiotensinogens

3.5 Statistische Auswertung

Die Erfassung von Studienteilnehmern erfolgte nur unter Berücksichtigung der Einschlusskriterien „Koronarbefund“ und juvenile Erstmanifestation (≤ 55 Jahre). Weitere selektive Kriterien wurden bei der klinischen Erhebung nicht berücksichtigt. Dem klinischen Ärzteteam wurden die Prämissen der Arbeit erläutert, ohne dass es Einsicht in die konkrete Patientenselektierung erhielt. Die erhobenen koronarangiographisch unauffälligen Vergleichsprobanden wurden den Koronarpatienten geschlechts- und alterskonform zugeordnet.

Die statistische Auswertung erfolgte unter Konsultation des Instituts für Biometrie und medizinische Statistik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg mit dem Standardprogramm SPSS in der Version 10.07.

Die Überprüfung zwischen den einzelnen Untergruppen des Studienkollektivs bezüglich Assoziationen zu den einzelnen genetischen Varianten erfolgte mittels multipler logistischer Regressionmodelle, um bekannte Risikofaktoren für die koronare Herzkrankheit wie Rauchen, Dyslipidämie etc. berücksichtigen zu können.

Für den Test auf Normalverteilung wurde der Kolmogorow-Smirnow-Test verwendet. Für normalverteilte metrische Variablen wurde der t-Test für abhängige und unabhängige Stichproben angewandt. Bei signifikanter Abweichung von der Normalverteilung wurde vom nichtparametrischen Test nach Mann-Whitney-U bei unabhängigen und Wilcoxon bei abhängigen Variablen Gebrauch gemacht. Mittelwertvergleiche unter mehr als zwei unabhängigen Stichproben wurden bei vorhandener Normalverteilung mit der einfaktoriellen Varianzanalyse ANOVA durchgeführt, sonst kam der nichtparametrische Test nach Kruskal und Wallis zum Einsatz. Kategoriale Variablen wurden mit dem Chi-Quadrat- bzw. Fisher's exaktem Test bei unabhängigen Stichproben analysiert. Gepaarte kategoriale Variablen wurden mit dem McNemar-Test ausgewertet. Eine statistische Irrtumswahrscheinlichkeit von $< 5\%$ ($p < 0,05$) galt als statistisch signifikant. Bei Vergleich von mehr als 2 Untergruppen wurde nur eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $< 1\%$ als signifikant akzeptiert.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der Studienteilnehmer

Die Koronarpatienten (n=95) wiesen eine oder mehrere Stenosen der Hauptkoronargefäße von mehr als 70 % auf. In Tabelle 4 sind der Ausprägungsgrad der koronaren Herzkrankheit und die durchgeführte interventionelle Therapie in dieser Patientengruppe dargestellt.

Tabelle 4: Basischarakteristiken der KHK im Gesamtkollektiv von 95 Koronarpatienten

		Anzahl	(%)
Ausprägung der KHK	1-Gefäßerkrankung	26	(27,4)
	2-Gefäßerkrankung	23	(24,2)
	3-Gefäßerkrankung	46	(48,4)
Durchgeführte Intervention	ACVB	21	(22,1)
	PTCA	57	(60,0)

Anhand des aktuellen klinischen Befundes war für 85,3% der KHK-Fälle ein Myokardinfarkt dokumentiert. Die beiden nach Alter und Geschlecht gepaarten Untersuchungsgruppen waren durch ein erhebliches Spektrum von Begleiterkrankungen gekennzeichnet. Es wurden Informationen aus der Eigenanamnese, den Arztbriefen und den im Rahmen der Studie durchgeführten Laboruntersuchungen berücksichtigt. Bei den Koronarpatienten lagen in 84,2% erhöhte Serumlipide vor. Es folgen Adipositas (68,4%), Hypertonie (55,8%), Hyperurikämie (37,9%), Leber- und Gallenerkrankungen (21,1%) und Diabetes mellitus (18,9%). Klinische Manifestationen der Atherosklerose außerhalb des Herzens wie periphere arterielle Verschlusskrankheiten (6,3%) waren nur bei einem geringen Teil der KHK-Patienten nachgewiesen. Tabelle 5 bietet eine Zusammenfassung im Gruppenvergleich.

Tabelle 5: Gegenüberstellung der Begleiterkrankungen von KHK- und koronar glatter Vergleichsgruppe

Begleiterkrankungen	KHK-Fälle		koronar glatte Vergleichsgruppe	
	Anzahl	(%)	Anzahl	(%)
Myokardinfarkt	81	(85,3)	0	(0,0)
Blutfette erhöht	80	(84,2)	51	(53,7)
Cholesterol erhöht	75	(78,9)	43	(45,3)
Triglyceride erhöht	35	(36,8)	22	(23,2)
Adipositas (BMI>25,9)	65	(68,4)	58	(61,1)
Hypertonie	53	(55,8)	44	(46,3)
Hyperurikämie	36	(37,9)	32	(33,7)
Leber-und Gallenerkrankungen	20	(21,1)	25	(26,3)
Diabetes mellitus	18	(18,9)	12	(12,6)
Schilddrüsenkrankungen	11	(11,6)	14	(14,7)
PAVK	6	(6,3)	2	(2,1)
Apoplex	3	(3,2)	4	(4,2)
Niereninsuffizienz	2	(2,1)	4	(4,2)
pos. Familienanamnese: MI	34	(35,8)	15	(15,8)
pos. Familienanamnese: Apoplex	26	(27,4)	18	(18,9)
Gesamt	95	(100,0)	95	(100,0)

Bei allen koronarangiographierten Studienteilnehmern wurden 17 ausgewählte biochemische Werte aus dem Lipid- und Gerinnungsspektrum nach der Blutabnahme bestimmt. In Tabelle 6 erfolgt eine deskriptive Darstellung der Lipidparameter. HDL- ($p=0,048$) und ApoA1-Werte ($p=0,021$) konnten als protektive Faktoren für die KHK-Ausbildung dargestellt werden, wobei die HDL-Werte in beiden Gruppen unter den Labornormwerten des Zentrallabors des Klinikums Kröllwitz lagen. Alle sonstigen Mittelwerte lagen innerhalb der Referenzbereiche. Die Unterschiede zwischen KHK- und koronar glatter Vergleichsgruppe hinsichtlich des Gesamtcholesterins sowie der noch nicht zuvor erwähnten Lipidwerte erwiesen sich als nicht signifikant. Bei Interpretation der Lipidparameter ist zu berücksichtigen, dass 64,2 % ($n=61$)

der KHK-Fälle und 22,1 % (n=21) der koronaren Vergleichsgruppe Lipidsenker zum Zeitpunkt der Studienteilnahme einnahm.

Tabelle 6: Gegenüberstellung der Lipidparameter von KHK- und koronar glatter Vergleichsgruppe

	KHK-Fälle		koronar glatte Vergleichsgruppe	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
Total Cholesterol (mmol/l)	5,6	1,4	5,3	1,1
HDL (mmol/l)	1,1	0,3	1,3	0,4
LDL (mmol/l)	3,4	1,2	3,2	0,9
Triglyceride (mmol/l)	2,3	1,8	2,1	1,8
Apo A1 (g/l)	1,28	0,29	1,37	0,26
Apo B100 (g/l)	1,15	0,36	1,14	0,26
Lp (a) (g/l)	0,30	0,36	0,24	0,28

Bei den ermittelten Gerinnungsparametern lagen nur die Mittelwerte des Plasminogen-Aktivator-Inhibitors über dem Labornormwert (3,5 E/ml) und dies in beiden Gruppen. Es konnten mit den entsprechenden Tests für verbundene Stichproben bei den Werten Fibrinogen ($p=0,009$) und Thrombozytengehalt ($p=0,011$) signifikante Unterschiede zwischen den KHK-Patienten und der koronar glatten Vergleichsgruppe berechnet werden.

Tabelle 7: Gegenüberstellung der Gerinnungsparameter von KHK- und koronar glatter Vergleichsgruppe

	KHK-Fälle		koronar glatte Vergleichsgruppe	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
Antithrombin III (%)	102	14	102	16
Alpha2-Makroglobulin (g/l)	1,5	0,5	1,7	0,6
Fibrinogen (g/l)	4,0	1,3	3,5	1,1
Protein C (%)	116	22	113	25
Protein S (%)	98	32	97	30
PAI (E/ml)	3,6	2,0	3,6	2,2
Plasminogen (%)	119	21	117	21
Faktor V (%)	116	24	107	20
Faktor VII (%)	102	19	92	27
Thrombozyten (Gpt/l)	237	70	215	53

Für etablierte klinische Risikofaktoren wurde mittels logistischer Regression in einfaktorieller Auswertung eine Odds Ratio beschrieben. Tabakgenuss über 5 Jahre, erhöhtes Serumcholesterin (>5,7 mmol/l), fettreiche Diät und positive Anamnese hinsichtlich Herzinfarkt in der Blutlinie konnten als signifikante Risikofaktoren für die Ausbildung der koronaren Herzerkrankung im Untersuchungskollektiv ermittelt werden (Tabelle 8). Bei geschlechtsgetrennter Betrachtung ergab sich ein p-Wert von 0,079 (OR 4,6) bezüglich Diabetes mellitus bei Frauen (Männer $p=0,813$; OR 1,1). Männer unterschieden sich signifikant ($p<0,0001$; OR 6,0) im Anteil der Patienten mit erhöhtem Serumcholesteringehalt. Frauen wiesen in dieser Hinsicht eine Odds Ratio von 2,1 ($p=0,230$) auf. Tabakabusus und Herzinfarkt in der Familienanamnese grenzten sich bei beiden Geschlechtern signifikant ab (nicht tabellarisch aufgeführt).

Tabelle 8: Klinische Risikofaktoren der KHK in einfaktorieller Auswertung adjustiert nach Alter und Geschlecht

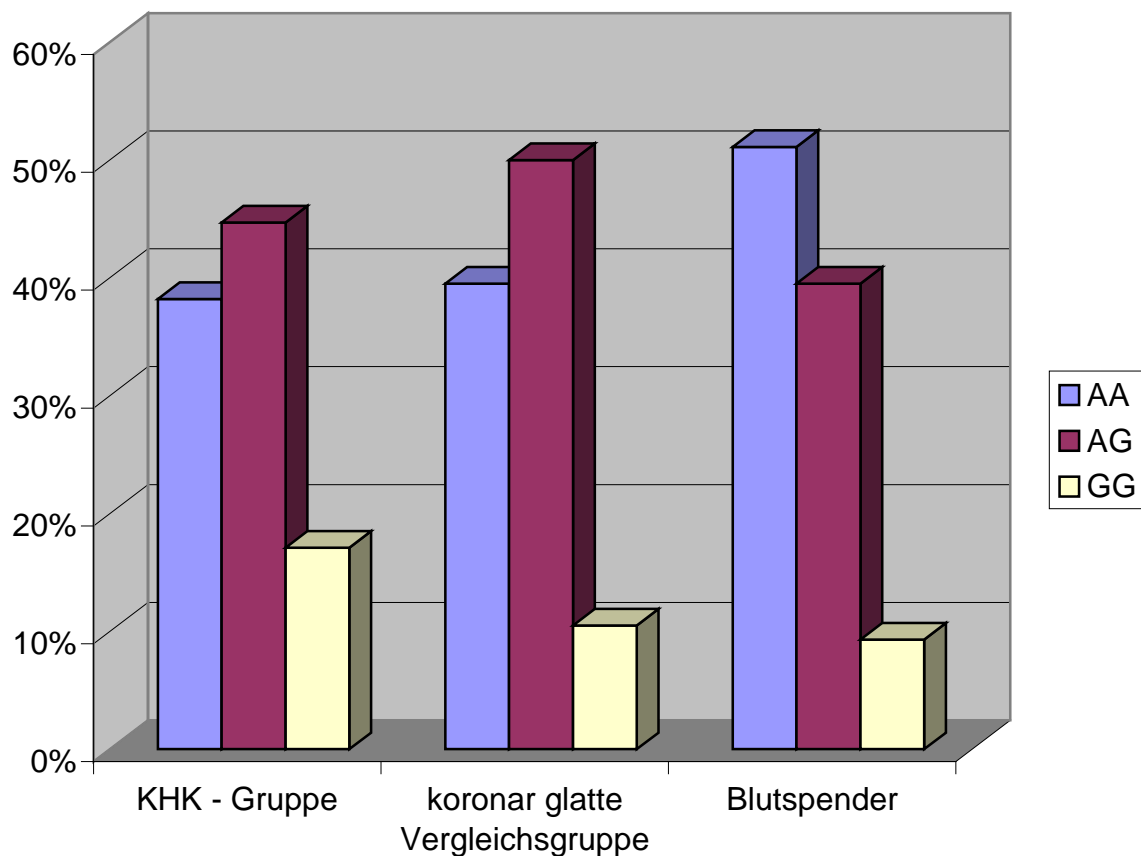
Risikofaktor	KHK-Patienten		koronar glatte Vergleichsgruppe		p-Wert	Odds Ratio
	Anzahl	(%)	Anzahl	(%)		
Tabakgenuss >5Jahre	83	(87,4)	58	(61,1)	<0,0001	4,4
Hypertonie	53	(55,8)	44	(46,3)	0,192	1,5
Erhöhtes Cholest. (>5,7 mmol/l)	75	(78,9)	43	(45,3)	<0,0001	4,5
Erniedrigtes HDL (< 1,0 mmol/l)	31	(32,6)	22	(23,2)	0,147	1,6
Erhöhtes LDL (>2,9 mmol/l)	63	(66,3)	59	(62,1)	0,545	1,2
erh. Triglyzeride (>2,3 mmol/l)	35	(36,8)	22	(23,2)	0,207	1,5
BMI (>25,9 kg/m ²)	65	(68,4)	58	(61,1)	0,289	1,4
Fetteiche Diät	36	(37,9)	20	(21,1)	0,012	2,3
Diabetes mell.	18	(18,9)	12	(12,6)	0,235	2,5
KHK in Familienanamnese	34	(35,8)	15	(15,8)	0,002	3,0

4.2 Prüfung der Genpolymorphismen auf Assoziation zur Koronaren Herzkrankheit

Um den Einfluss klassischer Risikofaktoren in der Auswertung zu berücksichtigen, wurde mit multiplen Regressionsmodellen gearbeitet. Dabei erfolgte die Analyse der drei Polymorphismen im kodominanten, dominanten und rezessiven genetischen Modell. Anfangs fand für jede genetische Variante eine Prüfung auf Alters- und Geschlechtsabhängigkeit statt. Es konnten keine Assoziationen in diesem Punkt für jede der drei untersuchten Varianten festgestellt werden. Die untersuchten Gruppen befanden sich hinsichtlich der drei untersuchten Polymorphismen im Hardy-Weinberg-Äquilibrium.

4.2.1 TNF β -*Nco*I-Polymorphismus

In die Analyse des TNF β -*Nco*I-Polymorphismus konnten 76 alters- und geschlechtsadjustierte Probandenpaare mit angiographisch gesichertem Koronarbefund (Männer 71%) und 311 gesunde Blutspender (Männer 68%) einbezogen werden. In Abbildung 8 sind die absoluten und relativen Häufigkeiten der drei möglichen Genotypen für jede Gruppe getrennt aufgeführt. Hier zeigt sich grafisch ein deutlicher Unterschied der relativen Genotypenanteile zwischen koronarangiographierten Patienten und den gesunden Blutspendern.



TNFβ *Nco*-I Polymorphismus IVS1+90A>G

Genotyp	KHK-Fälle		koronar glatte Vergleichsgruppe		Blutspender		Gesamt	
	Anzahl	(%)	Anzahl	(%)	Anzahl	(%)	Anzahl	(%)
GG	13	(17,1)	8	(10,5)	29	(9,3)	50	(10,8)
AG	34	(44,7)	38	(50,0)	123	(39,5)	195	(42,1)
AA	29	(38,2)	30	(39,5)	159	(51,1)	218	(47,1)
Gesamt	76	(100,0)	76	(100,0)	311	(100,0)	463	(100,0)

Abbildung 8: Absolute und relative Häufigkeiten der Genotypen des TNFβ-*Nco*I-Polymorphismus in den drei Untergruppen

Die Auswertung wurde unter Berücksichtigung der drei möglichen Erbmodi kodominant (AA versus AG versus GG), G-dominant (AA versus AG + GG) und G-rezessiv (AA + AG versus GG) durchgeführt. Die einzelnen Regressionsmodelle mit ihren statistischen Basisdaten sind in Tabelle 9 aufgeführt. Bei Prüfung der KHK-Gruppe gegenüber der koronar glatten Vergleichsgruppe hinsichtlich der TNF β -Erbmodi wurden die Ergebnisse sowohl ohne als auch unter Adjustierung nach klassischen klinischen Risikofaktoren (RF) gezeigt. Die Darstellung von Tabelle 9 soll an einem Beispiel erläutert werden. Kann die TNF β -NcoI-Genotypisierung im Studienkollektiv der vorliegenden Dissertation die Zugehörigkeit zur KHK-Gruppe beeinflussen, wenn die koronar glatte Vergleichsgruppe als Referenz gewählt wird? In diesem Beispiel soll der kodominante Erbgang des TNF β -NcoI-SNP ohne Berücksichtigung klassischer Risikofaktoren betrachtet werden. Für AA- versus AG-Genotyp ergab sich eine Odds Ratio von 0,9 bei einem p-Wert gleich 0,826. Das 95%-Konfidenzintervall wurde hierzu mit 0,5-1,8 angegeben. Die entsprechenden statistischen Daten für AA- versus GG-Genotyp sind durch einen Schrägstrich getrennt daneben dargestellt. In der untersten Zeile für den kodominanten Erbgang ist außerdem der globale p-Wert von 0,495 für den TNF β -NcoI-SNP ohne Berücksichtigung klassischer klinischer Risikofaktoren angeführt.

Während bei der Analyse der Genotypenverteilungen zwischen KHK-Patienten und koronar glatter Vergleichsgruppe ausschließlich ein $p \gg 0,05$ auftrat, wurde bei dem Vergleich der KHK- mit der Blutspendergruppe im dominanten Erbgang das Signifikanzniveau $p < 0,05$ unterschritten. Die Odds Ratio ist in diesem Fall mit 1,7 (95%CI 1,0-2,8) angegeben. Jedoch zeigten sich nur geringe Unterschiede des p-Wertes zwischen den drei Erbmodi beim Vergleich der KHK- mit der Blutspendergruppe. Wurden die homozygoten Merkmalsträger AA und GG als Einflussvariable für die Zuordnung zwischen Koronarpatientengruppe und Blutspendergruppe gewählt, so wurde überdies ein $p = 0,021$ erzielt. AA versus AG wirkte sich nicht signifikant aus.

Tabelle 9: Beschreibung des Risikos für eine klinische Erstmanifestation der KHK vor dem 56. Lebensjahr mittels Odds Ratio durch den TNF β -NcoI-Polymorphismus

TNF β -NcoI	statist. Größe	KHK- vs. koronar glatte Vergleichsgruppe			KHK vs. BS
		ohne RF	mit Rauchen	mit klass. RF*	ohne RF
Erbgang kodominant (AA>AG/ AA>GG)	OR	0,9/ 1,7	1,1/ 2,4	1,2/ 2,3	1,5/ 2,5
	95%CI	0,5-1,8/ 0,6-4,7	0,5-2,3/ 0,8-7,6	0,5-2,6/ 0,7-7,8	0,9-2,6/ 1,1-5,3
	p	0,826/ 0,317	0,831/ 0,134	0,690/ 0,200	0,137/ 0,021
	p-global	0,495	0,305	0,439	0,056
dominant (AA > AG + GG)	OR	1,0	1,3	1,3	1,7
	95%CI	0,5-1,8	0,6-2,6	0,6-2,9	1,0-2,8
	p	0,868	0,460	0,441	0,044
rezessiv (AA + AG > GG)	OR	1,8	2,3	2,1	2,0
	95%CI	0,7-4,5	0,8-6,7	0,7-6,6	1,0-4,1
	p	0,244	0,172	0,222	0,054

* RF (Risikofaktoren): Rauchen, Hypertonie, Cholesterinerhöhung, Diabetes

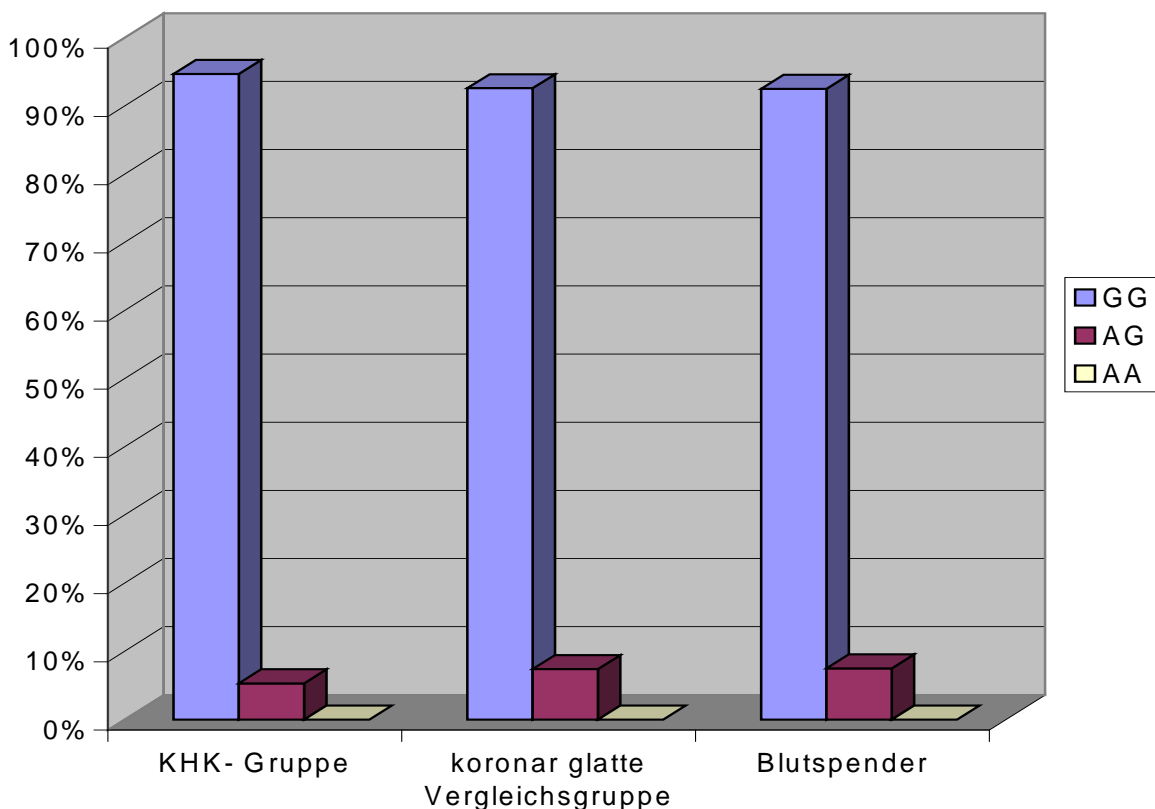
Die Allelfrequenzen für das G-Allel in der Patienten- und koronar glatten Vergleichsgruppe belaufen sich auf 0,40 und 0,36 (Tabelle 10). Im Gegensatz hierzu zeigte sich das Allelverhältnis von 0,29 : 0,71 in der Gruppe der gesunden Blutspender. Der chi²-Test bei Vergleich der KHK-Gruppe mit der Blutspendergruppe war mit einem p=0,013 deutlich signifikant. Bei Prüfung auf Abhängigkeit der Allelfrequenz von koronar glatter Vergleichsgruppe und Blutspendergruppe ergab sich ein p-Wert von 0,122.

Tabelle 10: Allelfrequenzen des TNF β -NcoI-Polymorphismus

TNF β -Allele	KHK-Gruppe		koronar glatte Vergleichsgruppe		Blutspender		p-Wert
	Anzahl/ Gesamt	%	Anzahl/ Gesamt	%	Anzahl/ Gesamt	%	
G	60 /152	39,5	54 /152	35,5	181 /622	29,1	1 = 0,477
A	92 /152	60,5	98 /152	64,5	441 /622	70,9	2 = 0,013

4.2.2 FaktorV-Leiden-Polymorphismus

Die Faktor V-R506Q-Genotypen stellten eine weitere genetische Variante dar, deren Risiko für eine klinische Frühmanifestation der koronaren Herzkrankheit überprüft wurde. 644 Probanden wurden hierbei untersucht.



FaktorV-Leidenmutation

Genotyp	KHK-Fälle		koronar glatte Vergleichsgruppe		Blutspender		Gesamt	
	Anzahl	(%)	Anzahl	(%)	Anzahl	(%)	Anzahl	(%)
AG	5	(5,3)	7	(7,4)	34	(7,5)	46	(7,1)
GG	89	(94,7)	87	(92,6)	422	(92,5)	598	(92,9)
Gesamt	94	(100,0)	94	(100,0)	456	(100,0)	644	(100,0)

Abbildung 9: Absolute und relative Häufigkeiten der Genotypen des Faktor V-R506Q-Polymorphismus in den drei Untergruppen

Ein homozygoter Studienteilnehmer für das mutierte A-Allel war nicht in der untersuchten Population vertreten. Der relative Anteil der Heterozygoten lag in der Patientengruppe bei 5,3% (n=94). Bei der koronar glatten Vergleichsgruppe war dieser Anteil um 2.1% bzw. den Blutspendern um 2,2% höher. Abbildung 9 zeigt die ermittelten Daten in grafischer und tabellarischer Form.

Aufgrund fehlender homozygoter Merkmalsträger konnte nur geprüft werden, ob das heterozygote Vorhandensein des A-Allels einen signifikanten Einfluss auf die Zugehörigkeit zu einer der Untergruppen in der untersuchten Studienpopulation zur Folge hatte. In allen logistischen Regressionsmodellen wurde dies abgelehnt ($p > 0,05$). Es zeigte sich eine Odds Ratio von 0,7 bei Vorhandensein des mutierten A-Allels ohne Unterschied, ob der Vergleich der KHK-Patienten mit der koronar glatten Vergleichsgruppe oder den gesunden Blutspendern geführt wurde. Die bei Hinzunahme klassischer Risikofaktoren noch geringere Odds Ratio von 0,5 (Tabelle 11) musste statistisch als Zufall betrachtet werden.

Tabelle 11: Beschreibung des Risikos für eine klinische Erstmanifestation der KHK vor dem 56. Lebensjahr mittels Odds Ratio durch die FaktorV-Leidenmutation

FaktorV-Leiden	statist. Größe	KHK- vs. koronar glatte Vergleichsgruppe			KHK vs. BS
		ohne RF	mit Rauchen	klass. RF*	ohne RF
Erbgang					
Dominant	OR	0,7	0,8	0,5	0,7
(GG > AG)	95%CI	0,2-2,3	0,2-2,7	0,1-1,9	0,3-1,8
	p	0,552	0,683	0,316	0,466

* RF (Risikofaktoren): Rauchen, Hypertonie, Cholesterinerhöhung, Diabetes

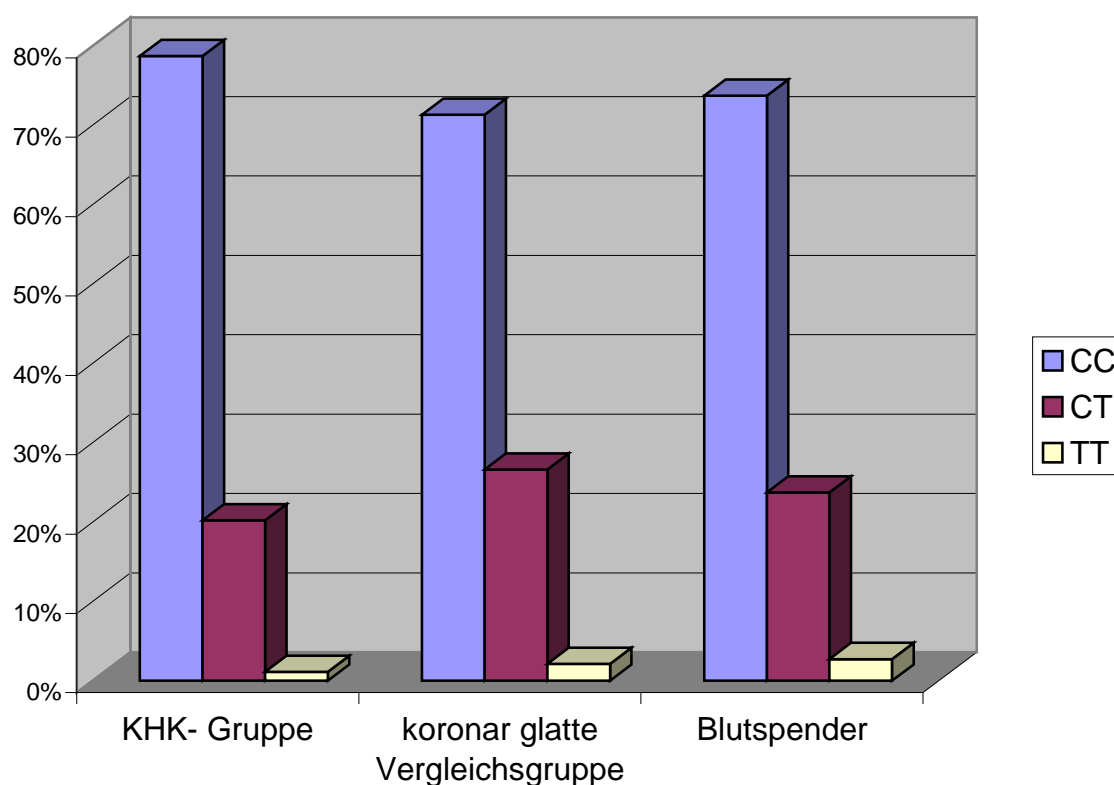
Bei separater Betrachtung der Allelfrequenzen war das A-Allel bei den Koronarpatienten mit 2,7% repräsentiert. Koronar glatte Vergleichsgruppe und Blutspender zeigten identisch einen 1% höheren Anteil. Es fanden sich keine signifikanten Zusammenhänge zwischen den einzelnen Untergruppen.

Tabelle 12: Allelfrequenzen der Faktor V-Leidenmutation

FaktV- Leiden- Allele	KHK-Gruppe		koronar glatte Vergleichsgruppe		Blutspender		p-Wert 1=KHK vs. koron. Vergleichsgr. 2=KHK vs. BS
	Anzahl/ Gesamt	%	Anzahl/ Gesamt	%	Anzahl/ Gesamt	%	
A	5 /188	2,7	7 /188	3,7	34 /912	3,7	p = 0,557
G	183 /188	97,3	181 /188	96,3	878 /912	96,3	p = 0,471

4.2.3 Angiotensinogen-T174M-Polymorphismus

640 Studienteilnehmer wurden betreffs der dritten genetischen Variante, dem Angiotensinogen-T174M-Polymorphismus, untersucht. Wie in Abbildung 10 erkennbar, zeigte sich ein ähnliches Verhältnis der Genotypen in jeder Untergruppe.



Angiotensinogen-T174M-Polymorphismus

Genotyp	KHK-Fälle		koronar glatte Vergleichsgruppe		Blutspender		Gesamt	
	Anzahl	(%)	Anzahl	(%)	Anzahl	(%)	Anzahl	(%)
TT	1	(1,1)	2	(2,1)	12	(2,7)	15	(2,3)
CT	19	(20,2)	25	(26,6)	107	(23,7)	151	(23,6)
CC	74	(78,7)	67	(71,3)	333	(73,7)	474	(74,1)
Gesamt	94	(100,0)	94	(100,0)	452	(100,0)	640	(100,0)

Abbildung 10: Absolute und relative Häufigkeiten der Genotypen des Angiotensinogen-T174M-Polymorphismus in den drei Untergruppen

Entsprechend Abbildung 10 führte die Analyse der Genotypenrelationen zwischen den Untergruppen in den einzelnen Regressionsmodellen erwartungsgemäß zu nicht signifikanten Ergebnissen. Jedes berechnete Modell hatte eine Odds Ratio $<1,0$ zur Folge.

Tabelle 13: Beschreibung des Risikos für eine klinische Erstmanifestation der KHK vor dem 56. Lebensjahr mittels Odds Ratio durch den Angiotensinogen-T174M-Polymorphismus

AGT - T174M	statist. Größe	KHK- vs. koronar glatte Vergleichsgruppe			KHK vs. BS
		ohne RF	mit Rauchen	klass. RF*	ohne RF
Erbgang					
Kodominant (CC>CT/ CC>TT)	OR	0,7 /0,5	0,8 /0,8	0,7/ 0,8	0,8/0,4
	95%CI	0,4-1,4/ 0,0-5,1	0,4-1,5/ 0,1-10,7	0,3-1,5/ 0,0-18,1	0,5-2,9
	p	0,283/ 0,521	0,434/ 0,874	0,362/ 0,893	0,423/ 0,350
	p-global	0,477	0,732	0,658	0,488
Dominant (CC > CT + TT)	OR	0,7	0,8	0,7	0,8
	95%CI	0,4-1,3	0,4-1,5	0,3-1,5	0,4-1,3
	p	0,240	0,431	0,362	0,308
Rezessiv (CC + CT > TT)	OR	0,5	0,9	0,9	0,4
	95%CI	0,0-5,6	0,1-11,5	0,0-19,4	0,5-3,1
	p	0,568	0,948	0,930	0,374

*RF (Risikofaktoren): Rauchen, Hypertonie, Cholesterinerhöhung, Diabetes

Beim Vergleich des relativen Anteils des T-Allels bestand ein 4,2% höherer Anteil der koronar glatten Vergleichsgruppe beziehungsweise ein 3,3% höherer Anteil der Blutspender gegenüber der Koronarpatientengruppe (Tabelle 14). Die Untersuchung der Allelfrequenzen ergab zwischen den drei Untergruppen des Studienkollektivs ausschließlich p-Werte größer 0,05.

Tabelle 14: Allelfrequenzen des Angiotensinogen-T174M-Polymorphismus

AGT– T174M- Allele	KHK- Gruppe		koronar glatte Vergleichsgruppe		Blutspender		p-Wert
	Anzahl/ Gesamt	%	Anzahl/ Gesamt	%	Anzahl/ Gesamt	%	
T	21 /188	11,2	29 /188	15,4	131 /904	14,5	p = 0,224
C	167 /188	88,8	159 /188	84,6	773 /904	85,5	p = 0,231

4.3 Untersuchung der genetischen Varianten im Kontext zum Ausprägungsgrad der KHK

Im Weiteren wurde untersucht, ob die genetischen Varianten Einfluss auf den Progressionsgrad der koronaren Herzkrankheit hätten. Hinsichtlich des TNF β -NcoI-Polymorphismus zeigte Abbildung 11 ein tendenziell häufigeres Auftreten homozygoter Träger des G-Allels bei Zunahme der Zahl der erkrankten Gefäße. Es fanden sich 8,3% homozygote Merkmalsträger des G-Allels unter den Ein-Gefäßerkrankungen (n=24). Unter den Zwei-Gefäßerkrankungen (n=21) war dieser Anteil um 8,0% sowie unter den Drei-Gefäßerkrankungen (n=34) um 12,2% höher. Die Leidenmutation zeigte in diesem Sinne kein eindeutiges Muster (Abbildung 12). Beim Angiotensinogen-T174M-Polymorphismus waren heterozygote Merkmalsträger unter den Ein-Gefäßerkrankungen (n=25) mit 28,0% häufiger vertreten als unter den Zwei-Gefäßerkrankungen (n=23) mit 21,7% und den Drei-Gefäßerkrankungen (n=46) mit 15,2% (Abbildung 13). Alle drei Polymorphismen wurden daher mittels chi²-Test auf Assoziationen hierzu untersucht. Es erfolgte eine Analyse des kodominanten, dominanten und rezessiven genetischen Modells sowie der Allelfrequenzen. Eine signifikante Beeinflussung konnte bei Vergleich von Ein- vs. Zwei- vs. Dreigefäß oder Ein- vs. Mehrgefäßerkrankung in dieser Studienpopulation nicht bestätigt werden ($p > 0.05$).

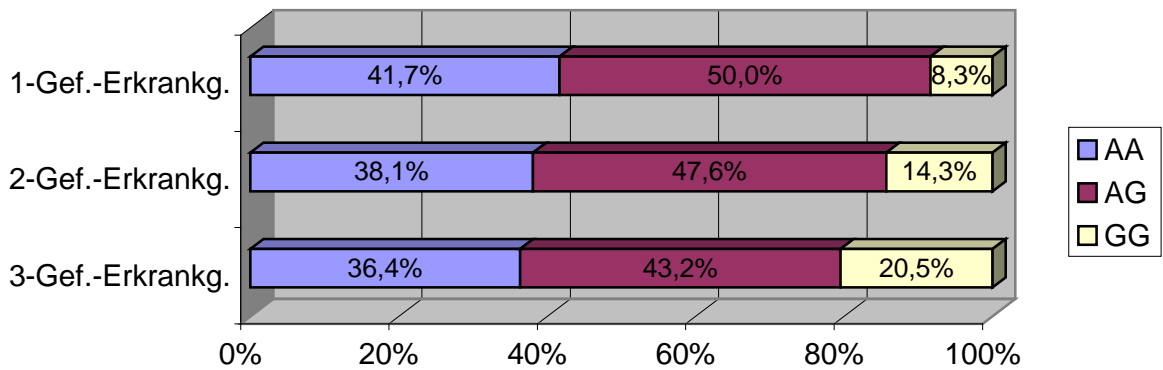


Abbildung 11: TNF β -NcoI-Polymorphismus im Kontext zum Ausprägungsgrad der KHK

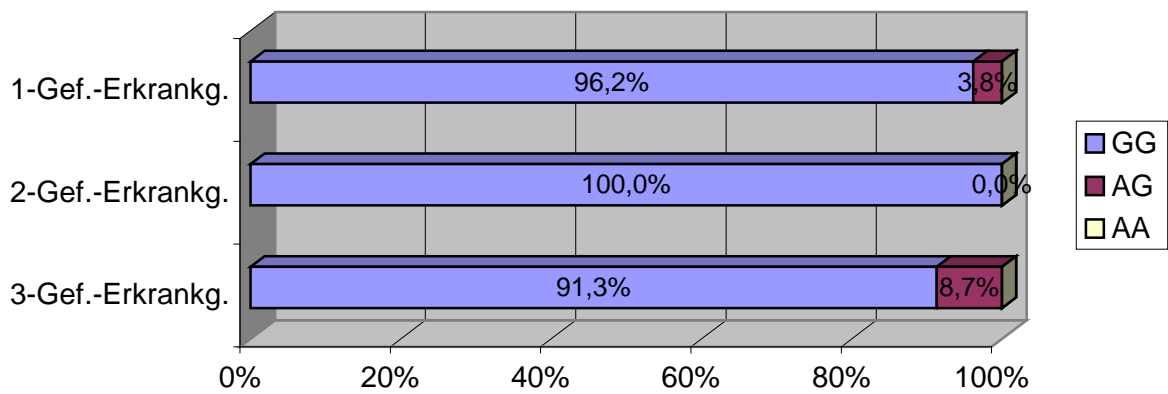


Abbildung 12: Faktor V-Leidenmutation im Kontext zum Ausprägungsgrad der KHK

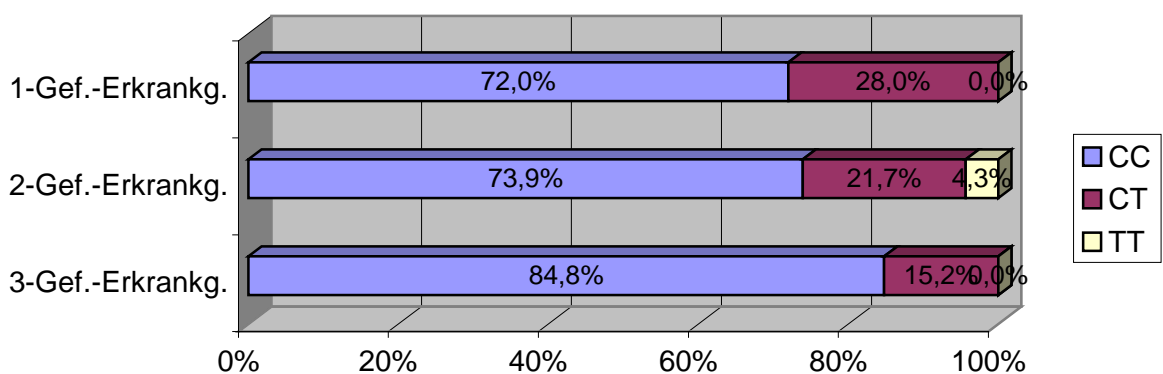


Abbildung 13: Angiotensinogen-T174M-Polymorphismus im Kontext zum Ausprägungsgrad der KHK

4.4 Einfluss des Genotyps auf ausgewählte Blutgerinnungs- und Lipidparameter sowie die Expression klassischer koronarer Risikofaktoren

Bei den 190 nach Alter und Geschlecht gepaarten Patienten wurden 17 Parameter des Lipid- und Gerinnungssystems bestimmt (Tabelle 6 und 7 im Kapitel 4.1) und auf Unterschiede im Serumgehalt oder -aktivität zwischen den Genotypen der Polymorphismen statistisch analysiert. Dies erfolgte sowohl mit als auch ohne Separierung in KHK- und koronar glatter Vergleichsgruppe. Da das anfangs festgelegte Signifikanzniveau nur für den Vergleich von zwei Stichproben vorgesehen war, erfolgte eine Reduktion von 0,05 auf 0,01.

Bei Verzicht auf gruppengetrennte Auswertung des Cholesterinlevels bezüglich der verschiedenen Genotypen fand sich eine signifikante Erniedrigung ($p=0,009$) des Cholesterinlevels bei heterozygoter Anlage des TNF β -Polymorphismus (Abbildung 14). Der Mittelwert \pm SD betrug für GG $5,6\pm 1,0$ mmol/l, AG $5,1\pm 1,0$ mmol/l und AA $5,7\pm 1,5$ mmol/l. Die separate Auswertung der KHK-Fälle und koronar glatten Vergleichsfälle ergab in diesem Fall einen p-Wert von 0,214 bzw. 0,025. Alle anderen erhobenen Lipid- und Gerinnungsparameter inklusive der Aktivität von Faktor V ($p>0,05$) wiesen keine abhängige Beziehung unter der Voraussetzung $p<0,01$ zu den drei untersuchten Polymorphismen auf.

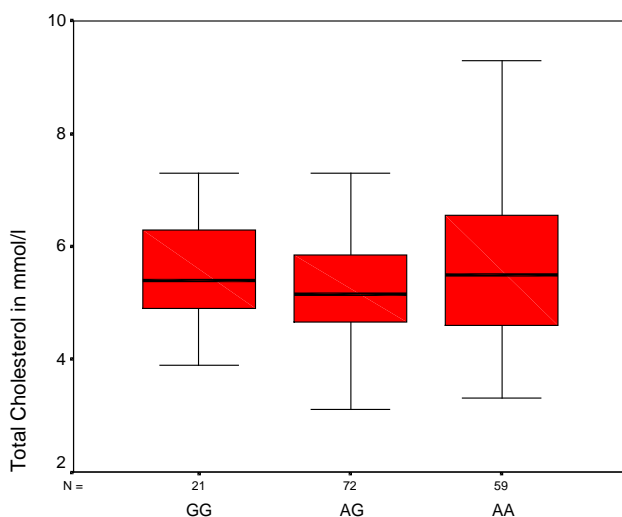


Abbildung 14: Gesamtcholesterin und TNF β -NcoI-Polymorphismus

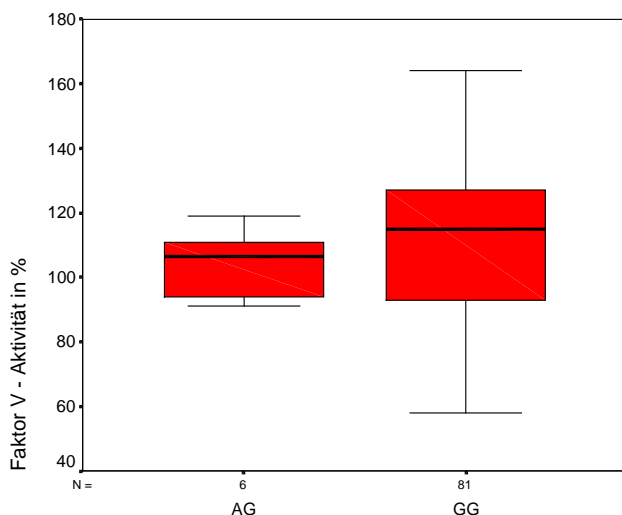


Abbildung 15: Faktor V-Aktivität und Leidenmutation

Eine Analyse der Abhängigkeit der TNF β -*NcoI*-Genotypen von der Lipidsenkereinnahme (Tabelle 14) ergab mittels chi²-Test ein $p=0,436$. Selbst bei Begrenzung auf Studienteilnehmer ohne Einnahme von Lipidsenkern gab ANOVA beim Vergleich der drei TNF β -Genotypen einen Signifikanzwert von $p=0,031$ bezüglich des Gesamtcholesterins aus.

Tabelle 15: Lipidsenkereinnahme und TNF β -*NcoI*-SNP

	GG		AG		AA		Gesamt	
	Anzahl	(%)	Anzahl	(%)	Anzahl	(%)	Anzahl	(%)
Lipidsenker ja	7	(31,8)	39	(47,0)	28	(42,4)	74	(43,3)
nein	15	(68,2)	44	(53,0)	38	(57,6)	97	(56,7)
Gesamt	22	(100,0)	83	(100,0)	66	(100,0)	171	(100,0)

Ergänzend zu den Laborparametern wurden die klassischen Risikofaktoren Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Adipositas (BMI über 25,9), Cholesterinerhöhung über 5,7 mmol/l sowie Tabakabusus auf Assoziation zu den drei Polymorphismen untersucht. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Genotypverteilung bei Betrachtung der zuvor aufgeführten koronaren Risikofaktoren.

4.5 Untersuchung der Familienanamnese

Die Odds Ratio einer klinischen KHK-Manifestation vor Vollendung des 55. Lebensjahres war bei positiver Familienanamnese von Myokardinfarkten 3,0. Tabelle 16 zeigt die absoluten und relativen Häufigkeiten des untersuchten Zusammenhangs. Der McNemar-Test wies eine hohe Signifikanz von 0,004 auf.

Tabelle 16: Herzinfarkt in der Blutlinie bei KHK-Fällen und gepaarter koronar glatter Vergleichsgruppe

		KHK-Fälle		koronar glatte Vergleichsgruppe		Gesamt	
		Anzahl	(%)	Anzahl	(%)	Anzahl	(%)
positive Familienanamnese bezügl. Myokardinfarkt?	ja	34	(35,8)	15	(15,8)	49	(25,8)
	nein	61	(64,2)	80	(84,2)	141	(74,2)
Gesamt		95	(100,0)	95	(100,0)	190	(100,0)

Bei Prüfung der Myokardinfarktanamnese hinsichtlich der untersuchten Polymorphismen fielen signifikante Unterschiede beim Angiotensinogen-T174M-Polymorphismus auf (Tabelle 17 und 18). Für Patienten mit dem häufiger vorkommenden C-Allel wurde eine OR von 2,8 (95%CI: 1,2 bis 6,8, $p=0,018$) für das Auftreten eines Myokardinfarktes in der Blutlinie errechnet. Bei den Genotypenfrequenzen konnte im dominanten Modell der logistischen Regression eine Odds Ratio von 0,35 (95%CI: 0,14 – 0,88) für TT- und CT-Patienten gegenüber CC-Patienten bei einem p -Wert von 0,025 ermittelt werden. Für das kodominante Modell war $p=0,111$ festzustellen, wobei die geringe Zahl homozygoter Merkmalsträger für das T-Allel zu beachten war.

Tabelle 17: Genotypenverteilung des Angiotensinogen-T174M-Polymorphismus unter Beachtung einer positiven Familienanamnese bezüglich Myokardinfarkt

	positive Familienanamnese bezüglich Myokardinfarkt				Gesamt	
	ja		nein			
	Anzahl	(%)	Anzahl	(%)	Anzahl	(%)
TT			3	(2,1)	3	(1,6)
CT	6	(12,5)	38	(27,1)	44	(23,4)
CC	42	(87,5)	99	(70,7)	141	(75,0)
Gesamt	48	(100,0)	140	(100,0)	188	(100,0)

Tabelle 18: Allelfrequenzen des AGT-T174M-Polymorphismus unter Beachtung einer positiven Familienanamnese bezüglich Myokardinfarkt

	positive Familienanamnese bezüglich Myokardinfarkt				Gesamt	
	ja		nein			
	Anzahl	(%)	Anzahl	(%)	Anzahl	(%)
Allel C	90	(93,7)	236	(84,3)	326	(86,7)
T	6	(6,3)	44	(15,7)	50	(13,3)
Gesamt	96	(100,0)	280	(100,0)	376	(100,0)

5 Diskussion

5.1 Die Bedeutung des TNF β -NcoI-Polymorphismus bei der koronaren Herzkrankheit

Entzündungsvorgänge sind mit hoher Wahrscheinlichkeit in die Pathogenese der Atherosklerose involviert (Wick et al. 1995, Bruunsgaard et al. 2000). Xu et al. (1990) zeigten, dass in der normalen Intima im Vergleich zu atherosklerotisch veränderter die T-Zellanzahl 10-fach erhöht war. 70% dieser T-Zellen waren aktiviert. TNF β übernimmt eine gut definierte Rolle im inflammatorischen Prozeß. Es steuert im Zusammenspiel mit anderen Mediatoren die Bindung der Lymphozyten an Endothelzellen (Issekutz et al. 1989). Kahaleh et al. (1988) fanden bei *in vitro* Untersuchungen zur Fibrose von Gefäßgewebe eine dosisabhängige Steigerung des Fibroblastenwachstums, der Fibronectin- und Kollagensynthese durch beide Tumornekrosefaktoren. Weiterhin hemmt TNF β die Angiogenese bzw. das Endothelzellwachstum (Sato et al. 1990). Schreyer et al. (2002) beschrieben bei TNF β -defizienten Mäusen ein 62% geringeres Plaquewachstum im Aortabereich unter atherogener Diät.

In Bezug auf die Expression des Tumornekrosefaktor β werden zum NcoI-Polymorphismus unterschiedliche Angaben gemacht. Laut Messer et al. (1991) korreliert dieser mit einem reduzierten Niveau der TNF-Produktion. Andererseits publizierten Ozaki et al. (2002) ein um 50% erhöhtes Transkriptionslevel für TNF β bei Trägern der NcoI-Variante im Intron 1.

Die Literatur-Recherche zum Thema TNF β -NcoI-Polymorphismus und CAD bietet ein heterogenes Bild mit Publikationen positiver und negativer Aussagen. So wurde die Wirkung dieses Polymorphismus auf Hyperinsulinämie und Dyslipoproteinämie an 199 Männern mit angiographisch gesicherter über 50%iger Koronarstenose aus dem Raum Frankfurt/Main von Braun et al. (1998) untersucht (A:G=0,65:0,35). Als Kontrollgruppe dienten 81 Personen mit einem angiographisch gesicherten Ausschluss einer Stenose (A:G=0,66:0,34). Schilddrüsenerkrankungen oder akute Entzündungsvorgänge galten als Ausschlusskriterium. KHK-Patienten mit einem BMI größer 26 waren öfters heterozygot als angiographisch unauffällige Kontrollen (p=0,08). Eine Analyse unter diesen Voraussetzungen führte im

Studienkollektiv der vorliegenden Dissertation zu keinen signifikanten Ergebnissen, im Gegenteil: 42,6% der KHK-Fälle standen 60,2% gepaarten Kontrollen gegenüber ($p=0,062$). Der Vergleich von MI-Patienten ($n=127$) mit einer Kontrollgruppe zeigte bei Braun et al. (1998) dagegen keine unterschiedlichen Verteilungen der TNF β -Allele. Im Kontrast hierzu kam eine japanische Studie von Ozaki et al. (2002) nach einer Analyse von über 92000 Singlenukleotidpolymorphismen (SNPs) im menschlichen Genom zu dem Ergebnis, dass der SNP des TNF β (252A>G) im Intron 1 zu den wenigen gehörte, welche die Signifikanzschwelle von $p=0,01$ für ein erhöhtes Herzinfarkttrisiko unterschritten. Die Studie schloss 1133 Japaner mit klinisch, elektrokardiographisch und laborchemisch gesichertem Herzinfarkt ein (Durchschnittsalter: $62,5 \pm 11,3$ Jahre; A:G=0,59:0,41). Als Vergleichsgruppe 1 dienten 1006 unselektierte Mitglieder der allgemeinen Population (38,5 Jahre durchschnittlich; 3-88J.; A:G=0,62:0,38), die von verschiedenen medizinischen Instituten rekrutiert wurden. Vergleichsgruppe 2 bildeten 872 altersadjustierte Individuen (Durchschnittsalter: $64,3 \pm 11,3$ Jahre; A:G=0,64:0,36). Mittels χ^2 -Analyse des GG- versus AG + AA-Genotyps wurde ein p-Wert gleich 0,000022 bei Vergleichsgruppe 1 und 0,000018 bei Vergleichsgruppe 2 berechnet. Es erfolgte eine Prüfung, ob die drei klassischen Risikofaktoren Diabetes mellitus ($p=0,14$), Hypertonie ($p=0,96$) und Hyperlipidämie ($p=0,68$) zum SNP des TNF β im Intron 1 assoziiert sind. Tabakabusus wurde nicht berücksichtigt.

In der vorliegenden Dissertation sollte der TNF β -*NcoI*-Polymorphismus bei Patienten mit angiographisch nachgewiesener Koronarstenose von mindestens 70% im Vergleich mit alters- und geschlechtsgepaarten Probanden mit einer angiographisch ausgeschlossenen Koronarstenose analysiert werden. Da diese Vergleichsgruppe erwartungsgemäß ebenfalls einen hohen Anteil von Begleiterkrankungen aufwies, wurde zusätzlich eine Gruppe gesunder Blutspender ohne metabolische Risikofaktoren, mit Nichtraucherstatus und negativer Familienanamnese bezüglich kardiovaskulärer Erkrankungen einbezogen. Diese Untergruppe repräsentiert somit die Genotypenverteilung bei fehlender Morbidität in der mitteldeutschen Region.

Die Guaninallelfrequenz von 0,29 bei den klinisch gesunden Blutspendern war vergleichbar mit anderen Studien im europäischen Raum (0,27, Peruccio et al. 1993). Sie unterschied sich signifikant ($p=0,013$) von der KHK-Gruppe mit einer Guaninallelfrequenz von 0,40. Demgegenüber unterschied sich die ebenfalls multimorbide Untergruppe ohne Koronarstenose mit 0,36 nicht signifikant von der KHK-Gruppe. Mittels binärer logistischer

Regressionsmodelle ergaben sich in den drei möglichen Vererbungsmodi zwischen den KHK-Patienten und gepaarter koronar glatter Untersuchungsgruppe eine Odds Ratio größer 1 nach Adjustierung durch konventionelle KHK-Risikofaktoren. Das Signifikanzniveau von 0,05 wurde aber wie bei Koch et al. (2001) in keinem Modell erreicht. Bei Koch et al. (2001) bestand die Studienpopulation kaukasischen Ursprungs aus drei Untergruppen: Kollektiv 1 (n=998; G=0,31) mit angiographisch signifikanter Koronarstenose, aber ohne Zeichen eines alten oder akuten Myokardinfarkts, Kollektiv 2 (n=793; G=0,32 /OR 1,09; 95%CI: 0,72-1,66) mit Myokardinfarkt und Kollektiv 3 (n=340; G=0,31 /OR1,35; 95%CI: 0,87-2,11) aus alters- und geschlechtsadjustierte Kontrollen ohne KHK oder Myokardinfarkt. Zum dritten Kollektiv wurden keine weiteren Angaben in der entsprechenden Veröffentlichung gemacht. Der Vergleich der gesunden Blutspender mit der KHK-Gruppe führte in der vorliegenden Dissertation zu einer OR von 1,7 (95%CI: 1,0 – 2,8) bei einem p-Wert von 0,044 im dominanten genetischen Modell. Jedoch kam es beim kodominanten und rezessiven Modell zu wenig abweichenden Ergebnissen (p=0,056 und p=0,054), so dass insgesamt von einer Beeinflussung metabolischer Vorgänge jedoch nicht von einer unabhängigen Erhöhung des KHK-Risikos auszugehen ist. Koch et al. (2001) führten diesen Vergleich nicht durch.

Mit zunehmendem Ausprägungsgrad der KHK deutete sich eine kontinuierliche Tendenz in Richtung vermehrten Auftretens des G-Allels an. Diese erwies sich jedoch als nicht signifikant. Koch et al. (2001) kamen zum gleichen Resultat. Zusätzlich erfolgte in der vorliegenden Dissertation eine Untersuchung von 17 erhobenen Laborparametern des Lipid- und Gerinnungsspektrums auf Assoziation zu den Genotypen des TNF β -NcoI-SNP. Bei Betrachtung der Mittelwerte des Gesamtcholesterins fiel auf, dass Heterozygote in KHK- und koronar glatter Vergleichsgruppe jeweils einen mindestens 0,5 mmol/l geringeren Mittelwert als homozygote AA- oder GG-Träger aufwiesen. Dieser Unterschied erwies sich bei gemeinsamer Auswertung aller 190 Probanden als signifikant. Selbst bei Ausschluss der Einnahme eines Lipidsenkens ist ein p=0,031 angegeben. In anderen Studien wurde dieser Sachverhalt nicht dargestellt, so dass ein Vergleich nicht diskutiert werden kann. Ergebnisse über Auswirkungen der Genotypenrelation auf klassische Risikovariablen wurden kategorial ausgewertet. Erhöhter Cholesteringehalt, Hypertonie, BMI >25,9, Diabetes mellitus und Tabakabusus waren in der vorliegenden Dissertation und auch bei Koch et al. (2001) nicht mit der Genotypenverteilung assoziiert. Interessant hierbei ist, dass Braun et al. (1998) einen signifikant höheren Anteil des Wildtyps (AA) in der Gruppe mit einem Insulingehalt >20mU/l bemerkten.

Die Arbeitsgruppe um Ozaki (2002) sah eine Assoziation des untersuchten TNF β -SNP mit einem erhöhtem Myokardinfarkttrisiko in der japanischen Population. Dies konnte von Koch et al. (2001), welche eine ähnlich hohe Probandenzahl in Europa wie Ozaki et al. (2002) in Japan analysierten, für die deutsche Population nicht bestätigt werden. Das Resultat der vorliegenden Dissertation ist jedoch aufgrund eines nur 85,3%igen Anteils von Myokardinfarkten nicht direkt mit Ozaki et al. (2002) vergleichbar.

In einer Autopsieserie von 700 finnischen Männern zwischen 33 und 70 Jahren ($G=0,30$) wurde kein Zusammenhang zwischen dem untersuchten TNF β -Polymorphismus und einem klinisch erheblichen Ausmaß koronarer Atherosklerose erkannt (Keso et al. 2001). Eine brasilianische Studie von Padovani et al. (2000) mit 148 MI-Patienten (Manifestationsalter <55J.; Durchschnittsalter 43; Männer/Frauen-Relation 3,3:1; $G=0,35$) und 148 gesunden Blutspendern ($G=0,30$), adjustiert nach Alter und Geschlecht, ergab eine $OR=1,3$ für MI im dominanten genetischen Modell mit nicht signifikantem Ergebnis. Es wurde eine Risikoerhöhung zur Atherothrombose durch Beeinflussung klassischer Risikofaktoren vermutet.

Insgesamt lässt sich aus den Ergebnissen anderer Arbeiten und auch der vorliegenden Dissertation schlussfolgern, dass metabolische Faktoren durch den TNF β -*NcoI*-SNP beeinflusst werden könnten. Hier sei das erniedrigte Cholesterinniveau bei Heterozygoten in der vorliegende Dissertation oder die von Braun et al. (1998) publizierten Heterozygoten mit gesteigerter Nüchtern glukose ($p=0,08$) genannt. Eine direkte Prädisposition zur KHK durch den untersuchten TNF β -Polymorphismus konnte für rein kaukasische Populationen nicht dargestellt werden und sollte durch zukünftige Metaanalysen geklärt werden.

5.2 Die Rolle der Leidenmutation des Faktor V bei der Ausbildung der Koronaren Atherosklerose

Die Faktor V-Leidenmutation, der häufigste hereditäre Gerinnungsfehler in allen diesbezüglich untersuchten Populationen, ist beschrieben als Risikofaktor für venöse Thrombosen (Griffin et al. 1993; Svensson et al. 1994, Miletich et al. 1993). In einer multizentrischen epidemiologischen Studie unter Neugeborenen (Herrmann et al. 1997) erwies sich besonders Norddeutschland endemisch. Die Prävalenz der Heterozygoten lag hier bei 7,12% (n=814). Im Vergleich dazu lagen beispielsweise Polen bei 5,0%, Holland bei 2,9% oder Indien bei 1,3%. Das gehäufte Vorkommen dieser Mutation in der norddeutschen Population wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation an einer mitteldeutschen Population überprüft.

Thrombotische Ereignisse könnten nicht nur kritische okklusive Prozesse verursachen, sondern auch intermittierend zum Plaquewachstum beitragen, indem es zu rezidivierenden Thrombenbildungen im Plaquenkern kommt (Badimon et al. 1993, Frink 1994, Davies 1996). In diesem Zusammenhang ist die untersuchte Leidenmutation des Faktor V im Gerinnungssystem von Interesse. Über 20% des Faktor V sind im Blut an Thrombozyten gebunden (Tracy et al. 1982). Der mutierte Faktor V kann von aktiviertem Protein C komplett inaktiviert werden, jedoch deutlich langsamer (Kalafatis et al. 1995). Somit kann der prokoagulatorische Effekt von Thrombozyten bei Vorhandensein von mutiertem Faktor V länger andauern. Es ist möglich, dass hierdurch eine arterielle Thrombenbildung im Kernbereich der atherosklerotischen Läsionen und deren Progression gefördert wird.

Der Gerinnungsstatus des Blutes spielt eine entscheidende Rolle bei der Inzidenz von koronaren Sensationen (Assmann et al. 1996/ PROCAM-Studie). Maede et al. (1993) zeigt mit der Northwick Park Heart Study 1993-1997, dass besonders in jüngerem Alter zwischen 40 und 54 Jahren die fibrinolytische Aktivität des Blutes einen signifikanten Einfluss auf die KHK-Inzidenz nimmt. Ein geringes fibrinolytisches Potential bei Personen dieses Alters könnte den Abtransport von Fibrinansammlungen beeinträchtigen. Da die durch Blutabnahme laborchemisch ermittelten Aktivitäten der Gerinnungsfaktoren nicht in der Lage sind, die lokalen Konzentrationen über einen längeren Zeitraum aufgrund einer Beeinflussung durch Diät, körperliche Aktivität und medikamentöse Therapie exakt widerzuspiegeln (De Boever et

al. 1995, Eliasson et al. 1995, Pajak et al. 1998), könnten genetische Marker aussagekräftiger sein.

Die Rolle der Leidenmutation des Gerinnungsfaktor V beim Auftreten von arteriellen Thrombosen wird unterschiedlich bewertet. Einige Studien entdeckten einen möglichen Beitrag zur Ausbildung koronarer Atherosklerose. Doggen et al. (1998) untersuchten das MI-Risiko bei Vorhandensein der Faktor V-Leidenmutation in einem niederländischen Kollektiv von 560 Männern mit einem MI vor dem 70. Lebensjahr (AG=6,6%, AA= 0,2%). Als Kontrollen wurden 646 Männer zu den Patienten in Gruppen mit 10 Jahresintervallen gepaart (AG=5,0%; AA=0,0%). Diese unterzogen sich einer orthopädischen Intervention und waren frei von MI in der Krankengeschichte. Die Odds Ratio für die gesamte Studienpopulation betrug 1,4 für Allelträger (95%CI: 0,8-2,2). Für die 314 MI-Patienten unter 50 Jahren ergab sich eine höhere OR=1,8 (95%CI: 0,8-3,9). Unter Rauchern mit diesem Gerinnungsdefekt war die OR sechsfach erhöht, ohne diese Abnormität aber nur dreifach. 1998 stellten Dunn et al. bei 766 koronarangiographierten weißen US-Amerikanern (Geschlechtsverhältnis Männer:Frauen= 4,9:1; keine Altersrestriktion; AG=6,8%, AA=0,1%) fest, dass die Leidenmutation nicht unabhängig mit einer Koronarstenose von mehr als 50% assoziiert war. Dies änderte sich auch nicht bei Anwendung eines logistischen Regressionsmodells mit bekannten biochemischen Risikofaktoren. Jedoch existierte unter männlichen Trägern der Leidenmutation und Myokardinfarktgeschichte ein 4 Jahre geringeres Durchschnittsalter als ohne Myokardinfarkt (56 ± 8 versus 60 ± 13 ; $p=0,15$). Dies könnte die These unterstützen, dass die Faktor V-Leidenmutation bei Vorhandensein anderer Risikofaktoren die Atherogenese beschleunigt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stützen die negativen Resultate hinsichtlich der prognostischen Bedeutung von FV-R506Q. Werden die Prävalenzen von heterozygoten Merkmalsträgern in koronar glatter Vergleichs- und Blutspendergruppe der vorliegenden Arbeit (7,4 und 7,5%) mit der von Herrmann et al. (1997) in Norddeutschland (7,12%) ermittelten verglichen, so liegen diese tendenziell darüber. Dagegen liegt die KHK-Gruppe sogar mit 5,3 % darunter. Homozygote Merkmalsträger der untersuchten Gerinnungsabnormität fanden sich nicht im mitteldeutschen Kollektiv. Die bereits publizierten Ergebnisse ließen dies erwarten (Dunn et al. 1998, Doggen et al. 1998, Cushman et al. 1998). Eine Odds Ratio von 0,7 (95%CI: 0,2-2,3) bei Vergleich der KHK- mit der koronar glatten

Gruppe beziehungsweise identischem Ergebnis bei Vergleich mit den Blutspendern vermittelt einen scheinbar protektiven Effekt für Allelträger der Leidenmutation. Dies ist jedoch pathophysiologisch nicht plausibel. Ähnliche Ergebnisse mit einer Odds Ratio kleiner 1 sind nur in einer prospektiven Studie von Cushman et al. (1998) zu finden. Das Patientengut unterschied sich jedoch erheblich mit einem Durchschnittsalter von $74,2 \pm 5,8$ Jahren. Hier wurden Patienten mit Herzinfarkt ($n=149$; $OR=0,46$; $95\%CI: 0,17-1,25$; $AG = 3,4\%$) und Angina pectoris ($n=140$; $OR=1,0$; $95\%CI: 0,45-2,25$, $AG = 7,8 \%$) aus einer Kohorte von 5201 überwiegend kaukasischen Männern und Frauen der USA mit einem Alter ab 65 Jahren analysiert. Die Prävalenz der Leidenmutation betrug in der Kontrollgruppe 7,1%, in der MI-Gruppe 3,4% und in der Gruppe mit Angina pectoris 7,9 %. Eine Adjustierung nach Alter, Geschlecht, Rasse, Raucherstatus, Hypertonie, Diabetes mellitus, Cholesterin und BMI veränderte die beobachteten Beziehungen bei Cushman et al. (1998) nicht. Die Einbeziehung konventioneller Risikofaktoren hatte für beide Gruppen sogar eine noch geringere Odds Ratio zur Folge. Für das Resultat der vorliegenden Dissertation als auch für Cushman et al. (1998) sind Studien mit ähnlichem Design und konträrer Aussage zu finden. Ridker et al. (1995) publizierten im Rahmen der prospektiven amerikanischen Physicians' Health Study unter 14918 Teilnehmern/innen eine OR von 1,5 ($95\%CI: 0,8-1,8$; $p=0,8$) nach Adjustierung durch klassische Risikofaktoren für Myokardinfarktpatienten ($n=374$). Holm et al. (1996) untersuchten in Schweden 101 Myokardinfarktüberlebende mit alters- und geschlechtsgepaarten Kontrollen (Geschlechtsverhältnis 3,6:1) und erhielten ein $p=0,03$ bei ausschließlicher Analyse der männlichen Patienten (Heterozygotenfrequenz 23 versus 10%). Bei Prüfung des Gesamtkollektivs blieb diese Tendenz ohne Signifikanz erhalten (Heterozygotenfrequenz 18% versus 10%). Eine geschlechtsgetrennte Untergliederung wie bei Holm et al. (1996) brachten in der hier untersuchten mitteldeutschen Population keine zusätzlichen Informationen. Die vorgestellten, sehr widersprüchlichen Ergebnisse sind insofern erklärbar, als auch andere Gerinnungsfehler das Ergebnis beeinflussen.

Ausgehend von den am Anfang des Kapitels erwähnten pathologischen Erkenntnissen des intermittierenden Aufreißens der Plaqueoberflächen, war die Bedeutung des Faktor-V-R506Q-SNP für den Ausprägungsgrad der koronaren Herzkrankheit zu analysieren. Hierbei war keine eindeutige Tendenz im mitteldeutschen Studienkollektiv der Dissertation zu erkennen. Ergebnisse von Dunn et al. (1998) bestätigten diesen Sachverhalt. Lowe et al. (1999) untersuchten an 460 Männern und 495 Frauen mit einem Alter zwischen 25 und 74 Jahren die Faktor-V-R506Q-Mutation auf Assoziationen zu kardiovaskulären Risikofaktoren.

Alleinig deutlich niedrigere APC-Ratio, Protein C-, S- und erhöhte Faktor VIII-Aktivität zeigten signifikante Resultate an dieser Stelle. Das mitteldeutsche Studienkollektiv der vorliegenden Arbeit wies hinsichtlich der 17 untersuchten Laborparameter des Lipid- und Gerinnungsspektrums inklusive der Aktivität von Protein C, S und Faktor V keine signifikanten Mittelwertunterschiede zur Genotypenverteilung der Leidenmutation auf. Studien mit ähnlicher Fragestellung untersuchten sonst nur die Beziehung der Lipid- und Gerinnungsparameter zur APC-Ratio und publizierten hierbei signifikante Unterschiede des Gesamtcholesterins (Kiechl et al. 1999, Lowe et al. 1999).

Insgesamt veranschaulichen die Ergebnisse der vorliegenden mitteldeutschen Studie den fehlenden prädiktiven Wert der Faktor V-Leidenmutation als unabhängigen Risikofaktor für die Ausbildung einer klinisch manifesten koronaren Herzkrankheit. Trotz dessen ungleich höherer Prävalenz bei Vergleich mit anderen hereditären Thrombophilien wie ATIII-, Protein C- und S-Mangel (Spannagl et al. 2000) muss einschränkend erwähnt werden, dass diese Störungen als Confounder für die vorliegende Analyse agieren können.

5.3 Angiotensinogen-T174M-Polymorphismus und koronares Risiko

Die Beteiligung des Renin-Angiotensin-Systems in der Ausbildung der KHK belegen verschiedene Studien. Dabei wurden verschiedene Zusammenhänge analysiert. Zum einen konnte eine erhöhte Reninaktivität bei Hypertonikern mit ischämischer Herzkrankheit in Verbindung gebracht werden (Maede et al. 1993, Aldermann et al. 1995 und 1997). Desweiteren war eine gesteigerte ACE-Akkumulation in Regionen mit T-Lymphozyten und fettbeladenen Makrophagen in atherosklerotischen Plaques menschlicher Koronararterien zu finden (Diet et al. 1996). Dies könnte zu lokal gesteigerter Angiotensinsynthese führen. Kranzhöfer et al. (1999) demonstrierten in einer experimentellen Arbeit eine deutliche Stimulation von vaskulären glatten Muskelzellen durch Angiotensin. Es wurde die Produktion von Zytokinen und Nuklearfaktor [kappa]-B angeregt, welcher für die Transkription der meisten Zytokingene notwendig ist. Eine inflammatorische Aktivierung der Gefäßwand durch ein dysreguliertes Renin-Angiotensin-System könnte zur Pathogenese der Atherosklerose beitragen. Diese Hypothese wird durch zahlreiche Studien an verschiedenen Spezies unterstützt. ACE-Hemmer halten die Progression atherosklerotischer Läsionen besonders im Bereich der Koronarien auf (Aberg et al. 1990, Kowala et al. 1994 und 1998, Jacobsson et al.

1994) und das oft ohne dauerhaft blutdrucksenkenden Effekt. In diesem Zusammenhang wurde zudem eine signifikant günstige Beeinflussung der Blutfette selbst bei gleichzeitiger Applikation eines HMG-CoA-Reduktasehemmers herausgefunden (Kowala et al. 1998).

Genetische Varianten des Angiotensin-Converting-Enzyms und des Angiotensinogens konnten signifikant mit der Ausbildung der koronaren Herzkrankheit in Verbindung gebracht werden, obwohl widersprüchliche Daten vorliegen (Katsuya et al. 1995, Ludwig et al. 1997, Gardemann et al. 1999, Cambien et al. 1992, Kee et al. 2000, Lindpainter et al. 1995).

Angiotensinogen wird als drittes Kandidatengen der vorliegenden Dissertation erörtert. Die Allelfrequenz des Angiotensin-T174M-SNP von 0,88 : 0,11 (C:T) in der KHK-Gruppe ist mit internationalen Studien kaukasischer Populationen vergleichbar (Tiret et al. 1995, Gardemann et al. 1999). Die Kontrollen wiesen einen Anteil von 0,87 (Gardemann et al. 1999); 0,88 (Tiret et al. 1995), 0,82 (Hegele et al. 1994) und 0,85 (vorliegende Arbeit) für das C-Allel auf. Die Relation der Allelfrequenzen unterschied sich in allen erwähnten Studien nicht signifikant zwischen KHK- und koronar glatter Gruppe. Allein Chistiakov et al. (1999) publizierten einen signifikanten Unterschied der Allelfrequenzen in einem Moskauer Studienkollektiv (C=67,9% vs. 89,2%/ MI-Pat vs. Kontrolle). Dies ist jedoch im Licht der geringen Probandenzahl von 45 MI-Patienten und 60 Kontrollpatienten zu betrachten. Die Untersuchung der Genotypenrelationen im Kontext des Vorhandenseins der KHK oder eines MI führte nicht zu solch fest umrissener Aussage nach Analyse der publizierten Ergebnisse. Im Rahmen des MONICA-Projektes der WHO veröffentlichten Tiret et al. (1995) nicht signifikante Auswirkungen des AGT-T174M-Polymorphismus auf nicht fatale Myokardinfarkte unter kaukasischen Männern (630 KHK-Fälle; Durchschnittsalter $54,0 \pm 0,3$ Jahre / 741 Kontrollfälle; Durchschnittsalter $53,0 \pm 0,3$ Jahre). Die Angabe von Odds Ratios erfolgte nicht. Hierbei ist die Beschränkung auf Überlebende von Myokardinfarkten freilich als bedeutsame Einschränkung zu sehen. Gardemann et al. (1999) gehen in ihrer Studie mit 2250 koronarangiographierten kaukasischen Männern mit diesem Ergebnis konform (MI-Gruppe: Durchschnittsalter $62,2 \pm 9,5$ Jahre; n=1058/ Kontrollgruppe mit einer Stenose unter 50%: Durchschnittsalter $58,5 \pm 10,6$ Jahre; n=511). Die Analyse erfolgte hier unter Beachtung des MI-Status, der Anzahl erkrankter Koronargefäße und bekannter biochemischer Risikoparameter. Außerdem wurde ein „Coronary-heart-disease-score“ nach Gensini (1983) für jeden Studienteilnehmer kalkuliert. In diesem Punkt unterschieden sich die Genotypenrelationen signifikant in der Weise, dass der TT-Genotyp einen höheren Score-

Wert verursachte als der Wildtyp CC. CT lag dazwischen. Dieser Score-Wert wurde von keiner anderen Studie mit ähnlicher Fragestellung, die vorliegende Arbeit inbegriffen, erhoben.

In der vorliegenden mitteldeutschen Population erfolgte erstmals die Untersuchung des AGT-T174M-SNP in einer rein kaukasischen Population bezüglich des Risikos zur Ausbildung der koronaren Herzkrankheit in einem alters- und geschlechtsgepaarten Patientenkollektiv und zusätzlicher gesunder Blutspendergruppe. In den berechneten logistischen Regressionsmodellen zeigte sich in allen Erbgängen bei Vergleich der KHK-Gruppe mit der koronar glatten Vergleichsgruppe und mit den gesunden Blutspendern keine signifikante Beeinflussung des KHK-Risikos. Für das Vorhandensein des mutierten T-Allels wurde in jedem Regressionsmodell, selbst unter Einbeziehung klassischer Risikofaktoren, ein $OR < 1,0$ berechnet, so dass diese genetischen Variante eher eine protektive Tendenz für die KHK zeigte. Die Unterteilung der KHK-Patienten und koronar gesunden Gruppe in Untergruppen mit einem ApoA1-Level größer und kleiner 1,43 g/l, wie bei Gardemann et al. (1999), führte zu keinem Informationsgewinn im Studienkollektiv der vorliegenden Arbeit. Eine mögliche protektive Wirkung des T-Allels wird zudem durch die familienanamnestische Auswertung verstärkt. Das Wildtyp-Allel (C) zeigte eine Odds Ratio von 2,8 (95%CI: 1,2-6,8; $p=0,018$) für das Auftreten eines Myokardinfarktes in der Blutlinie. Bezüglich der Genotypenfrequenzen konnte im dominanten Modell der logistischen Regression eine Odds Ratio von 0,35 (95%CI: 0,14 – 0,88; $p=0,025$) für TT- + CT-Patienten gegenüber CC-Patienten für eine positive Familienanamnese hinsichtlich Myokardinfarkt ermittelt werden. Diese Ergebnisse zeigten einen gegensätzlichen Effekt des Wildtyps verglichen mit den Ergebnissen von Gardemann et al. (1999), die den „Coronary-heart-disease-score“ nach Gensini (1983) ermittelten. Die Unterschiede zwischen beiden Studien liegen in den grundsätzlich verschiedenen Einschlusskriterien mit schließlich deutlich höherem Durchschnittsalter, dem Vergleich von nicht alters- und geschlechtsgepaarten Probanden mit Myokardinfarktpatienten und einer Kontrollgruppe mit koronaren Stenosen unter 50%.

Bei Aufgliederung der vorliegenden mitteldeutschen Population in Untergruppen von Ein-, Zwei- und Dreifäßerkrankungen fanden sich in nicht signifikantem Ausmaß mit zunehmender Zahl der erkrankten Gefäße mehr homozygote Träger des Wildtyps. Die Analyse der erhobenen Lipid- und Gerinnungsparameter sowie des arteriellen Hypertonus

fürte ebenfalls zu keinen signifikanten Unterschieden bezüglich der Genotypenverteilung. Gardemann et al. (1999) und Tiret et al. (1995) kamen zum gleichem Ergebnis.

Studien mit nicht kaukasischen Kollektiven demonstrierten eine fehlende Assoziation zwischen KHK und dem AGT-T174M-SNP (Japan: Ichihara et al. 1997; Indien: Nair et al. 2003; China: Ko et al. 1997).

5.4 Einschränkende Aspekte

Die vorliegende Arbeit wird durch drei Punkte limitiert: Erstens, die Resultate leiten sich von einem Studienkollektiv aus dem mitteldeutschen Raum ab und lassen sich nicht uneingeschränkt auf andere Populationen anwenden. Zweitens wurde als Einschlusskriterium der KHK-Gruppe, die erste klinische Manifestation vor dem 56. Lebensjahr, als Bedingung gesetzt. Hierdurch lag das Durchschnittsalter von 47 Jahren unter dem der meisten publizierten Studien mit ähnlicher Fragestellung. Allerdings ist anzunehmen, dass bei Patienten mit früherem Erkrankungsalter genetische Risiken in höherem Maße dominieren. Drittens besteht eine Begrenzung der Aussagekraft durch die limitierte Anzahl von 95 Paaren. Außerdem ist die Vergleichbarkeit zu anderen Studien eingeschränkt, da die Normbereiche kategorialer Merkmale in den verschiedenen publizierten Studien zum Teil deutlich voneinander abwichen. Es fanden sich beispielsweise BMI-Grenzwerte für Übergewicht von 24,5 bis 30,0 kg/m² (Lindpainter et al. 1995 BMI >24,5; Tiret et al. 1995 BMI ≥26; Padovani et al. 2000 BMI ≥30 für Männer und ≥27,3 für Frauen).

Bei Sichtung der Publikationen zum TNFβ-*NcoI*-SNP fiel auf, dass sich die Allelfrequenzen für Guanin von 0,31 in der KHK- und der gepaarten Kontrollgruppe von Koch et al. (2001) mit den in der mitteldeutschen Population vorliegenden von 0,40 bzw. 0,36 deutlich unterschieden. Eine mögliche Erklärung könnte die fehlende Restriktion des Erstmanifestationsalters auf unter 56 Jahre sein. Als Argument wäre wiederum denkbar, dass sich in früheren Lebensjahren eher genetische Risikofaktoren manifestieren. In diesem Kontext sind auch die anfangs aufgeführten Allelfrequenzen (G=0,35) von Braun et al. (1998) einzuordnen. Diese entstammen wie bei Koch et al. (2001) dem deutschen Raum, und sind ebenfalls höher für Guanin.

5.5 Perspektiven

Mit der vorliegenden Arbeit wurden an einer mitteldeutschen Population Untersuchungen zu potenziellen Risikofaktoren einer klinisch relevanten koronaren Stenose durchgeführt, die Diagnostik, Primär-, Sekundärprävention und Therapie beeinflussen könnten.

In Zukunft könnte durch die Erstellung eines individuellen Risikoprofils unter Einbeziehung genetischer sowie konventioneller klinischer und laborbiochemischer Parameter eine gezielte Primärprävention der KHK bereits in jungem Lebensalter vorgenommen werden. Dies wäre auch ein wesentlicher Ausgangspunkt zur Erforschung neuer präventiver Therapien. Jedoch ließe sich auch bereits zum jetzigen Zeitpunkt zum Beispiel durch frühzeitige Einnahme von ASS (Voisard et al. 2001) oder Lipidsenkern das Risiko des Auftretens klinischer Symptome vermindern, wenn frühzeitig ein aussagekräftiges genetisches KHK-Risikoprofil erstellt werden könnte.

6 Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen haben sich im letzten Jahrhundert zur Hauptursache für Morbidität und Mortalität in den Industrieländern entwickelt. Der Erkennung von Risikogruppen und der Durchführung präventiver Maßnahmen kommt deshalb besondere medizinisch-ethische als auch volkswirtschaftliche Bedeutung zu.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden polymorphe Varianten dreier Kandidatengene an einer mitteldeutschen Population von 660 Probanden auf Assoziation zur KHK untersucht. Diese Kandidatengene sind der Inflammation, der Blutgerinnung bzw. der Homöostase zuzuordnen. Es erfolgte im Unterschied zu anderen Studien der Vergleich von alters- und geschlechtsadjustierten Patientenpaaren aus dem mitteldeutschen Raum mit angiographisch verifizierten Koronarstatus unter Berücksichtigung klassischer Risikofaktoren. Dem wurde eine Prüfung des jeweiligen Polymorphismus zwischen den KHK-Patienten und 470 unselektierten gesunden Blutspendern gegenübergestellt.

Die Analysen ergaben, dass weder der *TNF β -NcoI*- noch der Leiden- noch der Angiotensinogen-T174M-Polymorphismus mit dem angiographisch gesicherten Koronarbefund assoziiert war, und dies unabhängig von Alter und Geschlecht ermittelt wurde. Dieses Ergebnis basiert auf Analysen mit binären logistischen Regressionsmodellen unter Berücksichtigung von klassischen Risikofaktoren und der drei genetischen Marker sowie einer Prüfung der χ^2 -Verteilung bei den jeweiligen Allelhäufigkeiten. Durch das angewandte Studiendesign von alters- und geschlechtsadjustierten Paaren wurden hierbei zwei wesentliche Confounding-Variablen (Alter, Geschlecht) ausgeschlossen.

Es zeigte sich jedoch eine Tendenz beim untersuchten *TNF β -NcoI*-SNP zur Beeinflussung des KHK-Ausprägungsgrades. Außerdem konnte die Beeinflussung metabolischer Faktoren durch diesen Polymorphismus dargestellt werden. Heterozygote Merkmalsträger besaßen einen signifikant niedrigeren Gesamtcholesterinspiegel im Serum. Des Weiteren unterschieden sich die gesunden Blutspender deutlich in der Verteilung von Genotyp- und Allelfrequenz gegenüber KHK- und koronar glatter Vergleichsgruppe. Im Kontrast hierzu deutete sich beim Angiotensinogen-T174M-Polymorphismus ein protektive Tendenz für die Ausbildung der koronaren Herzkrankheit an.

Weitere prospektive populationsbasierende Studien sind notwendig, um das Ausmaß einer genetischen Prädisposition für die Ausbildung der koronaren Herzkrankheit durch die drei untersuchten Polymorphismen endgültig zu klären. Metaanalysen könnten den Stellenwert der untersuchten genetischen Varianten in kaukasischen Populationen ebenfalls deutlicher analysieren, jedoch nur bei vergleichbaren Einschlusskriterien und einheitlichen Grenzwerten für klassische Risikoparameter der koronaren Herzkrankheit, eine unabdingbare Voraussetzung für eine sinnvolle Zusammenführung verschiedener Studien, die derzeit unzureichend gegeben scheint.

Literaturverzeichnis

1. Aberg G, Ferrer P: Effects of captopril on atherosclerosis in cynomolgus monkeys. *J Cardiovasc Pharmacol.* 15 Suppl 5 (1990) 65-72
2. Adachi Y, Okazaki M, Ohno N, Yadomae T: Enhancement of cytokine production by macrophages stimulated with (1->3)-beta-D-glucan, grifolan (GRN), isolated from *Grifola frondosa*. *Biol Pharm Bull.* 17 (1994) 1554-1560
3. Aggarwal BB, Eessalu TE, Hass PE: Characterization of receptors for human tumour necrosis factor and their regulation by gamma-interferon. *Nature.* 318 (1985) 665-667
4. Alderman MH, Ooi WL, Cohen H, Madhavan S, Sealey JE, Laragh JH: Plasma renin activity: a risk factor for myocardial infarction in hypertensive patients. *Am J Hypertens.* 10 (1997) 1-8
5. Alderman MH: Plasma renin activity and coronary heart disease: are they related? *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 4 (1995) 201-203
6. Assmann G, Cullen P, Heinrich J, Schulte H: Hemostatic variables in the prediction of coronary risk: results of the 8 year follow-up of healthy men in the Munster Heart Study (PROCAM). *Prospective Cardiovascular Munster Study. Isr J Med Sci.* 32 (1996) 364-370
7. Badimon JJ, Fuster V, Chesebro JH, Badimon L: Coronary atherosclerosis. A multifactorial disease. *Circulation.* 87 Suppl 3 (1993) II3-16
8. Behague I, Poirier O, Nicaud V, Evans A, Arveiler D, Luc G, Cambou JP, Scarabin PY, Bara L, Green F, Cambien F: The *ECTIM* Study. Etude Cas-Temoins sur l'Infarctus du Myocarde. Beta fibrinogen gene polymorphisms are associated with plasma fibrinogen and coronary artery disease in patients with myocardial infarction. *Circulation.* 93 (1996) 440-449

9. Bertina RM, Koeleman BPC, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, Reitsma PH: Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*. 369 (1994) 64-67
10. Braun J, Marz W, Winkelmann BR, Donner H, Henning-Usadel K, Badenhop K: Tumour necrosis factor beta alleles and hyperinsulinaemia in coronary artery disease. *Eur J Clin Invest*. 28 (1998) 538-542
11. Brockhaus M, Schoenfeld HJ, Schlaeger EJ, Hunziker W, Lesslauer W, Loetscher H: Identification of two types of tumor necrosis factor receptors on human cell lines by monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87 (1990) 3127-3131
12. Bruunsgaard H, Skinhoj P, Pedersen AN, Schroll M, Pedersen BK: Ageing, tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and atherosclerosis. *Clin Exp Immunol*. 121 (2000) 255-260
13. Bussolino F, Camussi G, Tetta C, Garbarino G, Bosia A, Baglioni C: Selected cytokines promote the synthesis of platelet-activating factor in vascular endothelial cells: comparison between tumor necrosis factor alpha and beta and interleukin-1. *J Lipid Mediat*. 2 Suppl (1990) 15-22
14. Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D, Luc G, Bard JM, Bara L, Ricard S, et al: Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature*. 359 (1992) 588-589
15. Cavender DE, Edelbaum D, Ziff M: Endothelial cell activation induced by tumor necrosis factor and lymphotoxin. *Am J Pathol*. 134 (1989) 551-560
16. Cavender DE, Edelbaum D: Inhibition by IL-1 of endothelial cell activation induced by tumor necrosis factor or lymphotoxin. *J Immunol*. 141 (1988) 3111-3116
17. Chistiakov DA, Turaulov RI, Moiseev VS, Nosikov VV: T174M polymorphism of angiotensinogen gene in Moscow population is associated with hypertension

Polimorfizm T174M gena angiotenzinogena v moskovskoi populiatsii sviazan s gipertonicheskoj bolezn'iu. *Mol Biol (Mosk)*. 33 (1999) 592-594

18. Cushman M, Rosendaal FR, Psaty BM, Cook EF, Valliere J, Kuller LH, Tracy RP: Factor V Leiden is not a risk factor for arterial vascular disease in the elderly: results from the Cardiovascular Health Study. *Thromb Haemost*. 79 (1998) 912-915
19. Dahlback B, Carlsson M, Svensson PJ: Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90 (1993) 1004-1008
20. Dahlback B, Hildebrand B: Inherited resistance to activated protein C is corrected by anticoagulant cofactor activity found to be a property of factor V. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91 (1994) 1396-1400
21. Davies MJ: Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture 1995. *Circulation*. 94 (1996) 2013-2020
22. De Boever E, De Bacquer D, Braeckman L, Baele G, Rosseneu M, De Backer G: Relation of fibrinogen to lifestyles and to cardiovascular risk factors in a working population. *Int J Epidemiol*. 24 (1995) 915-921
23. De Maat MP, Kastelein JJ, Jukema JW, Zwinderman AH, Jansen H, Groenemeier B, Brusckhe AV, Kluft C: REGRESS group: 455G/A polymorphism of the beta-fibrinogen gene is associated with the progression of coronary atherosclerosis in symptomatic men: proposed role for an acute-phase reaction pattern of fibrinogen. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 18 (1998) 265-271
24. Diet F, Pratt RE, Berry GJ, Momose N, Gibbons GH, Dzau VJ: Increased accumulation of tissue ACE in human atherosclerotic coronary artery disease. *Circulation*. 94 (1996) 2756-2767

25. Doggen CJ, Cats VM, Bertina RM, Rosendaal FR: Interaction of coagulation defects and cardiovascular risk factors: increased risk of myocardial infarction associated with factor V Leiden or prothrombin 20210A. Comment in: *Circulation*. 99 (1999) 457-458; *Circulation*. 97 (1998) 1037-1041
26. Dunn ST, Roberts CR, Schechter E, Moore WE, Lee ET, Eichner JE: Role of factor V Leiden mutation in patients with angiographically demonstrated coronary artery disease. *Thromb Res*. 91 (1998) 91-99
27. Eliasson M, Asplund K, Evrin PE, Lundblad D: Relationship of cigarette smoking and snuff dipping to plasma fibrinogen, fibrinolytic variables and serum insulin. The Northern Sweden MONICA Study. *Atherosclerosis*. 113 (1995) 41-53
28. Eugster HP, Muller M, Karrer U, Car BD, Schnyder B, Eng VM, Woerly G, Le Hir M, di Padova F, Aguet M, Zinkernagel R, Bluethmann H, Ryffel B: Multiple immune abnormalities in tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha double-deficient mice. *Int Immunol*. 8 (1996) 23-36
29. Fox CS, Evans JC, Larson MG, Kannel WB, Levy D: Temporal trends in coronary heart disease mortality and sudden cardiac death from 1950 to 1999: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 110 (2004) 522-527
30. Frink RJ: Chronic ulcerated plaques: new insights into the pathogenesis of acute coronary disease. *J Invasive Cardiol*. 6 (1994) 173-185
31. Gaillard-Sanchez I, Mattei MG, Clauser E, Corvol P: Assignment by in situ hybridization of the angiotensinogen gene to chromosome band 1q4, the same region as the human renin gene. *Hum. Genet*. 84 (1990) 341-343
32. Gardemann A, Stricker J, Humme J, Nguyen QD, Katz N, Philipp M, Tillmanns H, Hehrlein FW, Haberbosch W: Angiotensinogen T174M and M235T gene polymorphisms are associated with the extent of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 145 (1999) 309-314

33. Gensini GG: A more meaningful scoring system for determining the severity of coronary heart disease. *Am J Cardiol.* 51 (1983) 606
34. Gray PW, Aggarwal BB, Benton CV, Bringman TS, Henzel WJ, Jarrett JA, Leung DW, Moffat B, Ng P, Svedersky LP, Palladino MA, Nedwin GE: Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumour necrosis activity. *Nature.* 312 (1984) 721-724
35. Greengard JS, Eichinger S, Griffin JH, Bauer KA: Variability of thrombosis among homozygous siblings with resistance to activated protein C due to an arg-to-gln mutation in the gene for factor V. *N Engl J Med.* 331 (1994) 1559-1562
36. Greengard JS, Sun X, Xu X, Fernandez JA, Griffin JH, Evatt B: Activated protein C resistance caused by arg506gln mutation in factor Va. *Lancet.* 343 (1994) 1361-1362
37. Griffin JH, Evatt B, Wideman C, Fernandez JA: Anticoagulant protein C pathway defective in majority of thrombophilic patients. *Blood.* 82 (1993) 1989-1993
38. Hegele RA, Brunt JH, Connelly PW. A polymorphism of the angiotensinogen gene associated with variation in blood pressure in a genetic isolate. *Circulation.* 90 (1994) 2207-2212
39. Herrmann FH, Koesling M, Schroder W, Altman R, Jimenez Bonilla R, Lopaciuk S, Perez-Requejo JL, Singh JR: Prevalence of factor V Leiden mutation in various populations. *Genet Epidemiol.* 14 (1997) 403-411
40. Hick C: *Physiologie.* 1. Aufl. Jungjohann, Neckarsulm, Lübeck, Ulm 1995
41. Hochman PS, Majeau GR, Mackay F, Browning JL: Proinflammatory responses are efficiently induced by homotrimeric but not heterotrimeric lymphotoxin ligands. *J Inflamm.* 46 (1995-96) 220-234

42. Hohmann HP, Remy R, Brockhaus M, van Loon AP: Two different cell types have different major receptors for human tumor necrosis factor (TNF alpha). *J Biol Chem.* 264 (1989) 14927-14934
43. Holm J, Zoller B, Berntorp E, Erhardt L, Dahlback B: Prevalence of factor V gene mutation amongst myocardial infarction patients and healthy controls is higher in Sweden than in other countries. *J Intern Med.* 239 (1996) 221-226
44. Horvath R, Cerny J, Benedik J Jr, Hokl J, Jelinkova I, Benedik J: The possible role of human cytomegalovirus (HCMV) in the origin of atherosclerosis. *J Clin Virol.* 16 (2000) 17-24
45. Humphries SE, Luong LA, Ogg MS, Hawe E, Miller GJ: The interleukin-6 -174 G/C promoter polymorphism is associated with risk of coronary heart disease and systolic blood pressure in healthy men. *Eur Heart J.* 22 (2001) 2219-2220
46. Ichihara S, Yokota M, Fujimura T, Kato S, Hirayama H, Tsunekawa A, Inagaki H, Takatsu F, Nakashima N, Yamada Y: Lack of association between variants of the angiotensinogen gene and the risk of coronary artery disease in middle-aged Japanese men. *Am Heart J.* 134 (1997) 260-265
47. Imanishi K, Akatsuka H, Inada K, Uchiyama T: IFN-gamma-stimulated human vascular endothelial cells function as accessory cells for superantigen-induced TNF production in human T cells. *Int Arch Allergy Immunol.* 106 (1995) 163-165
48. Imanishi K, Inada K, Akatsuka H, Gu Y, Igarashi H, Uchiyama T.: Tumor necrosis factor production by human T-cells stimulated with bacterial superantigens. *Int J Immunopharmacol.* 17 (1995) 841-848
49. Issekutz TB, Stoltz JM: Stimulation of lymphocyte migration by endotoxin, tumor necrosis factor, and interferon. *Cell Immunol.* 120 (1989) 165-173
50. Jacobsson LS, Persson K, Aberg G, Andersson RG, Karlberg BE, Olsson AG: Antiatherosclerotic effects of the angiotensin-converting enzyme inhibitors captopril

- and fosinopril in hypercholesterolemic minipigs. *J Cardiovasc Pharmacol.* 24 (1994) 670-677
51. Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charru A, Hunt SC, Hopkins PN, Williams RR, Lalouel JM: Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell.* 71 (1992) 169-180
 52. Jongeneel CV, Briant L, Udalova IA, Sevin A, Nedospasov SA, Cambon-Thomsen A: Extensive genetic polymorphism in the human tumor necrosis factor region and relation to extended HLA haplotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88 (1991) 9717-9721
 53. Jukema JW, van Boven AJ, Groenemeijer B, Zwinderman AH, Reiber JH, Brusckhe AV, Henneman JA, Molhoek GP, Bruin T, Jansen H, Gagne E, Hayden MR, Kastelein JJ: The Asp9 Asn mutation in the lipoprotein lipase gene is associated with increased progression of coronary atherosclerosis. *Circulation.* 94 (1996) 1913-1918
 54. Kahaleh MB, Smith EA, Soma Y, LeRoy EC: Effect of lymphotoxin and tumor necrosis factor on endothelial and connective tissue cell growth and function. *Clin Immunol Immunopathol.* 49 (1988) 261-272
 55. Kalafatis M, Bertina RM, Rand MD, Mann KG: Characterization of the molecular defect in factor V R506Q. *J Biol Chem.* 270 (1995) 4053-4057
 56. Katsuya T, Koike G, Yee TW, Sharpe N, Jackson R, Norton R, Horiuchi M, Pratt RE, Dzau VJ, MacMahon S: Association of angiotensinogen gene T235 variant with increased risk of coronary heart disease. *Lancet.* 345 (1995) 1600-1603
 57. Kee F, Morrison C, Poirier O, McCrum E, Mallet C, Nicaud V, McMaster D, Dallongeville J, Fruchart JC, Evans AE: Angiotensin II type-I receptor and ACE polymorphisms and risk of myocardial infarction in men and women. *Eur J Clin Invest.* 30 (2000) 1076-1082
 58. Keso T, Perola M, Laippala P, Ilveskoski E, Kunnas TA, Mikkelsen J, Penttila A, Hurme M, Karhunen PJ: Polymorphisms within the tumor necrosis factor locus and

- prevalence of coronary artery disease in middle-aged men. *Atherosclerosis*. 154 (2001) 691-697
59. Kiechl S, Muigg A, Santer P, Mitterer M, Egger G, Oberhollenzer M, Oberhollenzer F, Mayr A, Gasperi A, Poewe W, Willeit J: Poor response to activated protein C as a prominent risk predictor of advanced atherosclerosis and arterial disease. *Diabetes Care*. 22 (1999) 1339-1346
 60. Ko YL, Ko YS, Wang SM, Chu PH, Teng MS, Cheng NJ, Chen WJ, Hsu TS, Kuo CT, Chiang CW, Lee YS: Angiotensinogen and angiotensin-I converting enzyme gene polymorphisms and the risk of coronary artery disease in Chinese. *Hum Genet*. 100 (1997) 210-214
 61. Koch W, Kastrati A, Bottiger C, Mehilli J, von Beckerath N, Schomig A: Interleukin-10 and tumor necrosis factor gene polymorphisms and risk of coronary artery disease and myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 159 (2001) 137-144
 62. Kowala MC, Valentine M, Recce R, Beyer S, Goller N, Durham S, Aberg G: Enhanced reduction of atherosclerosis in hamsters treated with pravastatin and captopril: ACE in atheromas provides cellular targets for captopril. *J Cardiovasc Pharmacol*. 32 (1998) 29-38
 63. Kowala MC, Grove RI, Aberg G: Inhibitors of angiotensin converting enzyme decrease early atherosclerosis in hyperlipidemic hamsters. Fosinopril reduces plasma cholesterol and captopril inhibits macrophage-foam cell accumulation independently of blood pressure and plasma lipids. *Atherosclerosis*. 108 (1994) 61-72
 64. Kowalski M: *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection in coronary artery disease: influence of *H. pylori* eradication on coronary artery lumen after percutaneous transluminal coronary angioplasty. The detection of *H. pylori* specific DNA in human coronary atherosclerotic plaque. *J Physiol Pharmacol*. 52 Suppl 1 (2001) 3-31

65. Kranzhofer R, Schmidt J, Pfeiffer CA, Hagl S, Libby P, Kubler W. Angiotensin induces inflammatory activation of human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19 (1999) 1623-1629
66. Kratz A, Campos-Neto A, Hanson MS, Ruddle NH: Chronic inflammation caused by lymphotoxin is lymphoid neogenesis. *J Exp Med.* 183 (1996) 1461-1472
67. Kull FC, Jacobs S, Cuatrecasas P: Cellular receptor for 125I-labeled tumor necrosis factor: specific binding, affinity labeling, and relationship to sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82 (1985) 5756 - 5760
68. Lapierre LA, Fiers W, Pober JS. Three distinct classes of regulatory cytokines control endothelial cell MHC antigen expression. Interactions with immune gamma interferon differentiate the effects of tumor necrosis factor and lymphotoxin from those of leukocyte alpha and fibroblast beta interferons. *J Exp Med.* 167 (1988) 794-804
69. Lindpaintner K, Pfeffer MA, Kreutz R, Stampfer MJ, Grodstein F, LaMotte F, Buring J, Hennekens CH: A prospective evaluation of an angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease. *N Engl J Med.* 332 (1995) 706-711
70. Locksley RM, Heinzel FP, Shepard HM, Agosti J, Eessalu TE, Aggarwal BB, Harlan JM: Tumor necrosis factors alpha and beta differ in their capacities to generate interleukin 1 release from human endothelial cells. *J Immunol.* 139 (1987) 1891-1895
71. Lowe GD, Rumley A, Woodward M, Reid E, Rumley J: Activated protein C resistance and the FV:R506Q mutation in a random population sample--associations with cardiovascular risk factors and coagulation variables. *Thromb Haemost.* 81 (1999) 918-924
72. Ludwig EH, Borecki IB, Ellison RC, Folsom AR, Heiss G, Higgins M, Lalouel JM, Province MA, Rao DC: Associations between candidate loci angiotensin-converting enzyme and angiotensinogen with coronary heart disease and myocardial infarction: the NHLBI Family Heart Study. *Ann Epidemiol.* 7 (1997) 3-12

73. Meade TW, Cooper JA, Peart WS: Plasma renin activity and ischemic heart disease. *N Engl J Med.* 329 (1993) 616-619
74. Meade TW, Ruddock V, Stirling Y, Chakrabarti R, Miller GJ: Fibrinolytic activity, clotting factors, and long-term incidence of ischaemic heart disease in the Northwick Park Heart Study. *Lancet.* 342 (1993) 1076-1079
75. Messer G, Spengler U, Jung MC, Honold G, Blomer K, Pape GR, Riethmuller G, Weiss EH: Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an NcoI polymorphism in the first intron of the human TNF-beta gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF-beta production. *J Exp Med.* 173 (1991) 209-219
76. Miletich JP, Prescott SM, White R, Majerus PW, Bovill EG: Inherited predisposition to thrombosis. *Cell.* 72 (1993) 477-480
77. Munker R, DiPersio J, Koeffler HP: Tumor necrosis factor: receptors on hematopoietic cells. *Blood.* 70 (1987) 1730-1734
78. Murata M, Kawano K, Matsubara Y, Ishikawa K, Watanabe K, Ikeda Y: Genetic polymorphisms and risk of coronary artery disease. *Semin Thromb Hemost.* 24 (1998) 245-250
79. Nair KG, Shalia KK, Ashavaid TF, Dalal JJ: Coronary heart disease, hypertension, and angiotensinogen gene variants in Indian population. *J Clin Lab Anal.* 17 (2003) 141-146
80. Nedwin GE, Naylor SL, Sakaguchi AY, Smith D, Jarrett-Nedwin J, Pennica D, Goeddel DV, Gray PW: Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic Acids Res.* 13 (1985) 6361-6373
81. Oster W, Lindemann A, Horn S, Mertelsmann R, Herrmann F: Tumor necrosis factor (TNF)-alpha but not TNF-beta induces secretion of colony stimulating factor for macrophages (CSF-1) by human monocytes. *Blood.* 70 (1987) 1700-1703

82. Ozaki K, Ohnishi Y, Iida A, Sekine A, Yamada R, Tsunoda T, Sato H, Sato H, Hori M, Nakamura Y, Tanaka T: Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nat Genet.* 32 (2002) 650-654
Erratum in: *Nat Genet.* 33 (2003) 107
83. Pajak A, Broda G, Manolio TA, Kawalec E, Rywik S, Davis CE, Picon J, Pytlak A, Thomas RP: Constitutional, biochemical and lifestyle correlates of fibrinogen and factor VII activity in Polish urban and rural populations. *Int J Epidemiol.* 27 (1998) 953-961
84. Padovani JC, Pazin-Filho A, Simoes MV, Marin-Neto JA, Zago MA, Franco RF: Gene polymorphisms in the TNF locus and the risk of myocardial infarction. *Thromb Res.* 100 (2000) 263-269
85. Peruccio D, D'Alfonso S, Borelli I, Amoroso A, Mazzola G, Marsico D, Bersanti M, Richiardi P: Distribution of tumor necrosis factor alleles (NcoI RFLP) and their relationship to HLA haplotypes in an Italian population. *Hum Hered.* 43 (1993) 103-110
86. Pober JS, Lapierre LA, Stolpen AH, Brock TA, Springer TA, Fiers W, Bevilacqua MP, Mendrick DL, Gimbrone MA Jr: Activation of cultured human endothelial cells by recombinant lymphotoxin: comparison with tumor necrosis factor and interleukin 1 species. *J Immunol.* 138 (1987) 3319-3324
87. Pober JS: Effects of tumour necrosis factor and related cytokines on vascular endothelial cells. *Ciba Found Symp.* 131 (1987) 170-184
88. Reincke M, Seiler L, Rump LC: Normokaliämischer primärer Hyperaldosteronismus *Dtsch Ärztebl.* 100 (2003) A-184 / B-169 / C-165
89. Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, Stampfer MJ, Eisenberg PR, Miletich JP: Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in apparently healthy men. *N Engl J Med.* 332 (1995) 912-917

90. Ruddle NH: Lymphoid neo-organogenesis: lymphotoxin's role in inflammation and development. *Immunol Res.* 19 (1999) 119-125
91. Saito T, Kato H, Saito M, Karaki Y, Tazawa K, Fujimaki M: TNF receptor number-dependent cytotoxicity to TNF-resistant human esophageal cancer cell lines by combination with recombinant human necrosis factor and hyperthermia. *Hum Cell.* 7 (1994) 55-61
92. Sato N, Nariuchi H, Tsuruoka N, Nishihara T, Beitz JG, Calabresi P, Frackelton AR Jr: Actions of TNF and IFN-gamma on angiogenesis *in vitro*. *J Invest Dermatol.* 95 Suppl 6 (1990) 85-89
93. Schagdarsurengin U, persönliche Mitteilung (2001)
94. Schmid E, Muller TH, Budzinski RM, Pfizenmaier K, Binder K: Lymphocyte adhesion to human endothelial cells induces tissue factor expression via a juxtacrine pathway. *Thromb Haemost.* 73 (1995) 421-428
95. Schreyer SA, Vick CM, LeBoeuf RC: Loss of lymphotoxin-alpha but not tumor necrosis factor-alpha reduces atherosclerosis in mice. *J Biol Chem.* 277 (2002) 12364-12368
96. Schulz S, Birkenmeier G, Schagdarsurengin U, Wenzel K, Müller-Werdan U, Rehfeld D, Süß T, Kabisch A, Werdan K, Gläser C: The role of LDL receptor-related protein (LRP) in coronary atherosclerosis. *Int J Cardiol.* 92 (2003) 137-144
97. Sherman SE, D'Agostino RB, Silbershatz H, Kannel WB: Comparison of past versus recent physical activity in the prevention of premature death and coronary artery disease. *Am Heart J.* 138 (1999) 900-907
98. Spannagl M, Heinemann LA, Schramm W: Are factor V Leiden carriers who use oral contraceptives at extreme risk for venous thromboembolism? *Eur J Contracept Reprod Health Care.* 5 (2000) 105-112

99. Spies T, Blanck G, Bresnahan M, Sands J, Strominger JL: A new cluster of genes within the human major histocompatibility complex. *Science*. 243 (1989) 214-217
100. Statistisches Bundesamt Deutschland: Sterbefälle nach den 10 häufigsten Todesursachen insgesamt 2002. Internethomepage www.destatis.de (2004)
101. Staugas RE, Harvey DP, Ferrante A, Nandoskar M, Allison AC: Induction of tumor necrosis factor (TNF) and interleukin-1 (IL-1) by *Pseudomonas aeruginosa* and exotoxin A-induced suppression of lymphoproliferation and TNF, lymphotoxin, gamma interferon, and IL-1 production in human leukocytes. *Infect Immun*. 60 (1992) 3162-3168
102. Svensson PJ, Dahlback B: Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis. *N Engl J Med* 330 (1994) 517-522
103. Szalai C, Füst G, Duba J, Kramer J, Romics L, Prohaska Z, Csaszar A: Association of Polymorphisms and allelic combinations in the tumour necrosis factor-alpha-complement MHC region with coronary artery disease. *J Med Genet*. 39 (2002) 46-51
104. Tiret L, Ricard S, Poirier O, Arveiler D, Cambou JP, Luc G, Evans A, Nicaud V, Cambien F: Genetic variation at the angiotensinogen locus in relation to high blood pressure and myocardial infarction: the ECTIM Study. *J Hypertens*. 13 (1995) 311-317
105. Tracy PB, Eide LL, Bowie EJ, Mann KG: Radioimmunoassay of factor V in human plasma and platelets. *Blood*. 60 (1982) 59-63
106. Tsuruoka N, Sugiyama M, Tawaragi Y, Tsujimoto M, Nishihara T, Goto T, Sato N: Inhibition of *in vitro* angiogenesis by lymphotoxin and interferon-gamma. *Biochem Biophys Res Commun*. 155 (1988) 429-435
107. Van de Kar NC, Monnens LA, Van Hinsbergh VW: Tumor necrosis factor and interleukin 1 induce expression of the glycolipid verotoxin receptor in human endothelial cells. Implications for the pathogenesis of the haemolytic uraemic syndrome. *Behring Inst Mitt*. 92 (1993) 202-209

108. Van Hinsbergh VW, Kooistra T, van den Berg EA, Princen HM, Fiers W, Emeis JJ: Tumor necrosis factor increases the production of plasminogen activator inhibitor in human endothelial cells *in vitro* and in rats *in vivo*. *Blood*. 72 (1988) 1467-1473
109. Voisard R, Fischer R, Osswald M, Voglic S, Baur R, Susa M, Koenig W, Hombach V: Aspirin (5 mmol/L) inhibits leukocyte attack and triggered reactive cell proliferation in a 3D human coronary *in vitro* model. *Circulation*. 103 (2001) 1688-1694
110. Wick G, Schett G, Amberger A, Kleindienst R, Xu G: Is atherosclerosis an immunologically mediated disease? *Immunol Today* 16 (1995) 27-33
111. Willeke A, Gerdson F, Bauersachs RM, Lindhoff-Last E: Rationelle Thrombophiliediagnostik. *Dtsch Arztebl*. 99 (2002) A-2111
112. Wong YK, Dawkins KD, Ward ME: Circulating Chlamydia pneumoniae DNA as a predictor of coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 34 (1999) 1440-1442; *J Am Coll Cardiol*. 36 (2000) 657-658
113. Wood D, De Backer G, Faergeman O, Graham I, Mancina G, Pyorala K: Prevention of coronary heart disease in clinical practice. Summary of recommendations of the Second Joint Task Force of European and other Societies on Coronary Prevention. *J Hypertens*. 16 (1998) 1407-1414
114. Xu Q, Oberhuber G, Gruschwitz M, Wick G: Immunology of atherosclerosis: Cellular composition and major histocompatibility complex class II antigen expression in aortic intima, fatty streaks and atherosclerotic plaques in young and aged human specimens. *Clin Immunol Immunopathol*. 56 (1990) 344-359
115. Yu Q, Safavi F, Roberts R, Marian AJ: A variant of beta fibrinogen is a genetic risk factor for coronary artery disease and myocardial infarction. *J Investig Med*. 44 (1996) 154-159

116. Zoller B, Dahlback B: Linkage between inherited resistance to activated protein C and factor V gene mutation in venous thrombosis. *Lancet*. 343 (1994) 1536-1538
117. Zoller B, Svensson PJ, He X, Dahlback B: Identification of the same factor V gene mutation in 47 out of 50 thrombosis-prone families with inherited resistance to activated protein C. *J Clin Invest*. 94 (1994) 2521-2524

Thesen

1. Kardiovaskuläre Erkrankungen haben sich im letzten Jahrhundert zur Hauptursache für Morbidität und Mortalität in den Industrieländern entwickelt. Der Erkennung von Risikogruppen und der Durchführung präventiver Maßnahmen kommt deshalb besondere medizinisch-ethische als auch volkswirtschaftliche Bedeutung zu.
2. Der Manifestationszeitpunkt und der Verlauf der koronaren Herzkrankheit werden sowohl von genetischen als auch von umweltbedingten Faktoren beeinflusst.
3. Der chronische Prozess der atherosklerotischen Koronargefäßverengung, der über Jahrzehnte ohne klinische Manifestation bleiben kann, könnte durch genetische Marker früh erkannt und präventiv behandelt werden.
4. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden der TNF β -*NcoI*-SNP im Intron 1, die FaktorV-Leidenmutation und der Angiotensinogen-T174M-Polymorphismus an einer mitteldeutschen Population von 660 Kaukasiern auf Assoziation zur KHK untersucht. Diese Kandidatengene sind der Inflammation, der Blutgerinnung bzw. der Hämostase zuzuordnen.
5. Es erfolgte im Unterschied zu anderen Studien der Vergleich von 95 alters- und geschlechtsadjustierten Patientenpaaren aus dem mitteldeutschen Raum mit angiographisch verifizierten Koronarstatus unter Berücksichtigung klassischer Risikofaktoren. Dem wurde eine Prüfung des jeweiligen Polymorphismus zwischen den KHK-Patienten und 470 unselektierten gesunden Blutspendern gegenübergestellt.
6. Der Tumornekrosefaktor β ist ein Zytokin mit pleiotropen Funktionen. Durch seine Effekte im chronisch inflammatorischen, zellregeneratorischen und koagulatorischen Bereich der Endothelfunktion kann er in die kardiovaskuläre Pathophysiologie involviert sein.
7. Das Auftreten koronarer Herzerkrankungen war in der untersuchten Population nicht mit den Genotypen des TNF β -*NcoI*-SNP im Intron 1 assoziiert. Ein signifikanter Unterschied

in der Verteilung der Genotypenrelationen und Allelfrequenzen zwischen den koronar auffälligen Patienten und Blutspendern ließ eine Beeinflussung metabolischer Faktoren vermuten. Es fand sich ein Tendenz zu vermehrten Auftreten des G-Allels mit zunehmender Ausprägung der koronaren Herzkrankheit ohne Signifikanz.

8. Heterozygote Allelträger des TNF β -*NcoI*-SNP besaßen einen signifikant niedrigeren Serumcholesteringehalt in der untersuchten Population.
9. Maede et al. (1993) zeigten mit der Northwick Park Heart Study 1993-1997, dass besonders in jüngerem Alter zwischen 40 und 54 Jahren die fibrinolytische Aktivität des Blutes einen signifikanten Einfluss auf die KHK-Inzidenz nimmt. Die Faktor V-Leidenmutation, der häufigste hereditäre Gerinnungsfehler, ist besonders in Norddeutschland endemisch (Herrmann et al. 1997).
10. Die Analysen ergaben, dass die Leidenmutation des Faktor V in der untersuchten mitteldeutschen Population nicht mit dem angiographisch gesicherten Koronarbefund assoziiert war. Die Serumaktivität des Faktor V wurde durch den untersuchten Polymorphismus nicht beeinflusst.
11. Die Komponenten des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) sind essentiell für die Aufrechterhaltung der Homöostase und sind damit wichtige Kandidatengene des Atheroskleroserisikos.
12. Die untersuchte Studienpopulation zeigte hinsichtlich des Angiotensinogen-T174M-Polymorphismus keine signifikante Beeinflussung des koronaren Risikos. Es deutete sich eine protektive Tendenz des T-Allels gegenüber dem Wildtyp an.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Rehfeld
Vorname: Dirk
Geburtsdatum/-ort: 08.04.1976 / Wittenberg
Anschrift: Dorfstraße 29 06895 Leetza
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1982-1990 Polytechnische Oberschule Zahna
1990-1991 Diesterweg-Oberschule Wittenberg (Leistungsklasse)
1991-1994 Melanchthon- Gymnasium Wittenberg
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Dienstzeit:

1994-1995 Zivildienst in der Inneren Abteilung der
Paul-Gerhardt-Stiftung Wittenberg

Hochschulausbildung:

ab 1995 Studium der Medizin an der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
1997 Ärztliche Vorprüfung
ab 1998 Promotionsstudien und molekulargenetisches Praktikum
(PCR, Sequenzierung. etc.) an der Universitätsklinik und
Poliklinik für Innere Medizin III (Direktor: Prof. Dr. K.
Werdan) und am Institut für Humangenetik und Med.
Biologie der MLU (Direktor: Prof. Dr. I. Hansmann)
1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2001-2002 Praktisches Jahr: Martin-Luther-Universität Halle
(Wahlfach: Augenheilkunde), Universität Rostock
12/2002 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2-11/2003

AIP bei Dr. Heider in Sangerhausen

- Tätigkeit auf Belegabteilung und in Praxis

seit 1/2004

AIP /Assistenzarzt in der Augenklinik des CTK Cottbus

Leetza, 19.02.2005

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Leetza, 19.02.2005

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Die Dissertation hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner medizinischen Fakultät vorgelegen.

Leetza, 19.02.2005

Publikationen der Dissertationsergebnisse

Originalartikel:

Schulz S, Birkenmeier G, Schagdarsurengin U, Wenzel K, Müller-Werdan U, **Rehfeld D**, Süß T, Kabisch A, Werdan K, Gläser C: The role of LDL receptor-related protein (LRP) in coronary atherosclerosis. *Int J Cardiol.* 92 (2003) 137-144

Schulz S, Schagdarsurengin U, **Rehfeld D**, Süß T, Müller-Werdan U, Werdan K, Gläser C: Effect of TNF- α and TNF- β polymorphism on TNF- α gene- and protein-expression and their impact on coronary atherosclerosis. Eingereicht 2004

Abstracts:

Archoukieh E, Greiser P, Schulz S, Schagdarsurengin U, Weidhase L, Nordwig A, **Rehfeld D**, Schnürer C, Kabisch A, Werdan K, Gläser C: Basic fibroblast growth factor (FGF2) and its genetic variants in patients with coronary obstruction. *J Mol Med.* 78 (2000) B11

Greiser P, Schagdarsurengin U, Schulz S, Müller-Werdan U, Schnürer C, Süß T, **Rehfeld D**, Nordwig A, Weidhase L, Werdan K, Gläser C: Investigation of the relation between gene expression and genetic variants of FGF2 in patients with coronary artery disease (CAD). *Eur J Hum Genet.* 9 Suppl 1 (2001) 178

Greiser P, Schagdarsurengin U, Schulz S, Süß T, Kabisch A, **Rehfeld D**, Müller-Werdan U, Taute BM, Werdan K, Hansmann I, Gläser C: Coronary atherosclerosis: correlation of the FGF2 gene-expression to genetic variants in the 5'UTR. *Am J Hum Gen.* 69 (2001) 584

Greiser P, Schnürer C, Schulz S, Kabisch A, Archoukieh E, Schagdarsurengin U, Wenzel K, Taute BM, **Rehfeld D**, Teichmann W, Werdan K, Glaeser C: Investigation of genetic risk markers related to progress and severity of the CAD. *Circulation.* Suppl 102 (2000) 853

Greiser P, Schulz S, U Schagdarsurengin, Süß T, **Rehfeld D**, Nordwig A, Kabisch A, Müller-Werdan U, Werdan K, Gläser C: Genetic background of the protein regulation of FGF2 ex vivo. *Eur J Hum Genet.* 10 Suppl 1 (2002) 166

Schagdarsurengin U, Greiser P, Schulz S, **Rehfeld D**, Süß T, Kabisch A, Müller-Werdan U, Werdan K, Hansmann I, Gläser C: Importance of a cluster analysis in the promoter region of TNF α for the genetic risk constellation in patients with coronary artery disease. *Am J Hum Genet.* 69 Suppl (2001) 502

Schagdarsurengin U, Greiser P, Schulz S, Müller-Werdan U, Kabisch A, **Rehfeld D**, Schnürer C, Süß T, Weidhase L, Nordwig A, Werdan K, Gläser C: Investigation of genetic variants of the tumor necrosis factor alpha and their importance in the risk profile of CAD. *Eur J Hum Genet.* 9 Suppl 1 (2001) 368

Schagdarsurengin U, Schulz S, Greiser P, Archoukieh E, **Rehfeld D**, Suess T, Werdan K, Hansmann I, Glaeser C: Importance of polymorphic variants of the TNF β gene in coronary artery disease (CAD). *Am J Hum Genet.* 67 (2000) 212

Schulz S, Birkenmeier G, Greiser P, Süß T, **Rehfeld D**, Nordwig A, Schagdarsurengin U, Werdan K, Gläser C: LDL receptor-related protein (LRP) expression pattern in male coronary patients: Inverse regulation on transcriptional and translational level. *Eur J Hum Genet.* 10 Suppl 1 (2002) 74

Schulz S, Gläser C, **Rehfeld D**, Süß T, Müller-Werdan U, Werdan K, Hansmann I: The importance of the BamHI-polymorphism in heparan sulphate proteoglycan 2 (HSPG2) for coronary atherosclerosis. *Am J Hum Genet.* 73 (2003) 473

Schulz S, Greiser P, Schnürer C, Süß T, **Rehfeld D**, Kabisch A, Müller-Werdan U, Werdan K, Gläser C: Herunterregulation des „Low density lipoprotein receptor-related protein“ (LRP) bei männlichen Koronarprobanden. *Z Kardiol.* 91 Suppl 1 (2002) 138

Schulz S, Schagdarsurengin U, Schnürer C, Archoukieh E, Greiser P, Weidhase L, Nordwig A, Kabisch A, **Rehfeld D**, Werdan K, Gläser C: Importance of a novel genomic variant, a creation of an additional SP1 binding-site in the promoter of the LDL receptor-related protein (LRP) gene, for myocardial infarction. *J Mol Med.* 78 (2000) B16

Schulz S, Schagdarsurengin U, Süß T, **Rehfeld D**, Schnürer C, Müller-Werdan U, Gläser C: Werden die Gen- und Proteinexpression des als therapeutisch eingesetzten

Angiogenesestimulators, Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2) individuell genetisch reguliert? Z Kardiol. 92 Suppl 1 (2003) 162-163

Süß T, Schulz S, Schagdarsurengin U, Greiser P, **Rehfeld D**, Nordwig A, Kabisch A, Müller-Werdan U, Werdan K, Gläser C: Power of genomic variants of TNF α and TNF β as major risk factors for coronary macroangiopathies. Eur J Hum Genet. 10 Suppl 1 (2002) 75

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich ganz herzlich Professor Teichmann danken. Er ermöglichte den klinischen Abschnitt der vorliegenden Dissertation. Dies gilt auch für Professor Werdan, welcher die Leitung der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin III der Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg nach Emeritierung von Prof. Teichmann übernahm.

Weiterhin danke ich Professor Hansmann, Leiter des Instituts für Humangenetik und Medizinische Biologie der Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg, für die gebotenen Arbeitsmöglichkeiten und Unterstützung.

Besondere Anerkennung möchte ich Frau Dr. Gläser, Leiterin der Arbeitsgruppe Herz-Kreislaufkrankungen am Institut für Humangenetik und Medizinische Biologie, für die Betreuung der Dissertation aussprechen. Sie hat mit großem Engagement den Fortgang der Arbeit begleitet und mich immer mit Rat und Tat unterstützt. Ohne ihre fachliche Erfahrung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. In diesem Zusammenhang danke ich auch den Mitarbeiter/Innen ihrer Arbeitsgruppe.

Außerdem bin ich Frau Dr. Lautenschläger und Frau Haufe zu großem Dank verpflichtet, die mir wertvolle Hinweise für die statistische Auswertung gaben.

Ganz herzlich danke ich meiner Familie, die mich von Anfang an mit Geduld und Tatkraft unterstützt hat.