

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik für Herz-und Kreislauferkrankungen, Deutsches Herzzentrum München,
des Freistaates Bayern

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig)

**Ein Hotspot für die koronare Herzkrankheit auf Chromosom 9:
Assoziation ausgewählter Sequenzvariationen mit dem Myokardinfarkt**

Serin Türk

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. A. Kastrati

2. Univ.-Prof. Dr. Th. A. Meitinger

Die Dissertation wurde am 13.12.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 23.05.2012 angenommen.

Literaturverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	7
1 Einleitung	9
1.1 Koronare Herzkrankheit und Myokardinfarkt: klinische Bedeutung.....	9
1.2 Pathogenese und Ätiologie der Atherosklerose.....	9
1.3 Klinische Manifestation der Atherosklerose.....	14
1.4 Risikofaktoren der Entstehung der Atherosklerose	16
1.5 Einfluss genetischer Faktoren auf die Entwicklung eines Myokardinfarktes bzw. einer koronaren Herzerkrankung	17
1.6 Assoziation ausgewählter Sequenzvariationen mit dem Myokardinfarkt.....	20
1.7 Ziel der Arbeit	24
2 Methoden	26
2.1 Patienten und Kontrollpersonen.....	26
2.2 Definitionen.....	26
2.3 Geräte	27
2.4 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien	27
2.5 DNA-Isolierung	28
2.6 Das TaqMan-Verfahren	28
2.7 Bestimmung der rs1333040 (T/C)-, rs7857345 (C/T)-und rs1333045 (C/T)-Genotypen mit dem TaqMan-Verfahren.....	32
2.8 Statistik.....	34
3 Ergebnisse	36
3.1 Basale Charakteristika der Myokardinfarkt-Gruppe und der Kontrollgruppe	36
3.2 Genotypverteilung der drei Polymorphismen in der Myokardinfarkt-Gruppe und der Kontrollgruppe	37
3.3 Allelfrequenzen der drei Polymorphismen in der Myokardinfarkt-Gruppe und der Kontrollgruppe	40
3.4 Multiple logistische Regressionsanalyse	42
3.5 Haplotypenfrequenzen der SNPs rs1333040 (T/C), rs7857345 (C/T) und rs1333045 (C/T) auf Chromosom 9p21.3.....	42

4	Diskussion	44
4.1	Die Einflüsse der Polymorphismen auf Chromosom 9p21.3 auf den Myokardinfarkt und der koronaren Herzerkrankung: Darstellung bisheriger Publikationen	45
4.2	Die Einflüsse der Polymorphismen auf Chromosom 9p21.3 auf den Diabetes mellitus: Darstellung bisheriger Publikationen.....	49
4.3	Assoziationen der Polymorphismen auf Chromosom 9p21.3 mit der Atherosklerose der Carotiden, der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit, dem abdominellen Aortenaneurysma und den intracraniellen Aneurysmata: Darstellung bisheriger Publikationen.....	50
4.4	Assoziation der Polymorphismen auf Chromosom 9p21.3 mit dem Schlaganfall: Darstellung bisheriger Studien.....	51
4.5	Die Einflüsse der Polymorphismen auf Chromosom 9p21.3 auf das Manifestationsalter des Myokardinfarkt und der koronare Herzerkrankung: Darstellung bisheriger Publikationen.....	54
4.6	Ansatzpunkte zur Erklärung der Assoziation dieser Polymorphismen auf Chromosom 9p21.3 mit dem Auftreten des Myokardinfarktes und der koronaren Herzerkrankung	55
4.7	Physiologische Bedeutung der SNPs auf Chromosom 9 (<i>CDKN, ANRIL</i>).....	57
4.8	Ziele der Identifikation molekulargenetischer Risikofaktoren	59
5	Zusammenfassung.....	61
6	Inhaltsverzeichnis	64
7	Veröffentlichung.....	87
8	Danksagung.....	88

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-1-Converting-Enzym
AGT	Angiotensinogen
AGTR1	Angiotensin II-Rezeptor 1
Alpha 1A-AR	Alpha 1A-Adrenozeptor
ANRIL	Antisense non coding RNA of the INK locus
APOE	Apolipoprotein E
AR	Adrenorezeptor
β_1 -AR	β_1 -Adrenorezeptor
β_2 -AR	β_2 -Adrenorezeptor
Bp	Basenpaar
Bzw.	Beziehungsweise
CCHS	Copenhagen City Heart Study
CCS	Canadian Cardiovascular Society
CDKN2a	Cyclin -Dependent Kinase Inhibitor 2A
CDKN2b	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2B
CELSR2	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 2 gene
CETP	Cholesterolestertransferprotein
CRP	C-reaktives Protein
CXCL12	Chemokine(C-X-C motif) ligand 12 gene
C1-THF	C1-Tetrahydrofolat
DHS	Dallas Heart Study
dL	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
ELAM-1	Endotheliale leukozytäre Adhäsionsmolekül
EKG	Elektrokardiogramm
GNB3	G-Protein β 3
GPx-1	Glutathionperoxidase-1
HDL	High density-Lipoprotein
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
INK	Inhibitor of CDK4
Kb	Kilobase

KHK	Koronare Herzkrankheit
KI	Konfidenzintervall
LD	Linkage disequilibrium
LDL	Low density-Lipoprotein
LPL	Lipoprotein-Lipase
Mb	Megabase
Mg	Milligramm
MI	Myokardinfarkt
Min	Minute
MIA3	Melanoma inhibitory activity family, member 3 gene
MTAP	Methylthioadenosin Phosphorylase
MTHFD1L	Methlentetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+dependent) 1-like
MTHFR	Methyltetrahydrofolatreduktase
MYBPHL	Myosin binding protein H-like gene
NOS3	NO-Synthase 3
NSTEMI	Nicht-ST-Hebungsinfarkt
OHS-1	Ottawa Heart Study 1
OHS-2	Ottawa Heart Study 2
OHS-3	Ottawa Heart Study 3
OR	Odds ratio
P14/ARF	P14 tumor suppressor gene
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PSRC1	Indicates proline/serin-rich coiled 1 gene
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RCA	Rechte Koronararterie
RCX	Ramus circumflexus
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RIVA	Ramus interventricularis anterior
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
S.D.	Standard Deviation
SDF-1 Faktor	Stromal cell-derived factor-1
SMAD3	Mothers against decapentaplegic homolog 3
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SORT1	Sortilin 1 gene

STEMI	ST-Hebungsinfarkt
TUM	Technische Universität München
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VLDL	Very low density-Lipoprotein

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Atherosklerotisch verändertes Blutgefäß	10
Abbildung 2:	Formale Pathogenese der Atherosklerose.....	13
Abbildung 3:	Schematische Darstellung des PCR-Zyklus.....	29
Abbildung 4:	Taqman Assay zur Genotypisierung	31
Abbildung 5:	Genotypverteilung des rs1333040 (T/C) Polymorphismus in der Myokardinfarkt-Gruppe und der Kontrollgruppe.....	38
Abbildung 6:	Genotypverteilung des rs7857345 (C/T) Polymorphismus in der Myokardinfarkt-Gruppe und der Kontrollgruppe.....	39
Abbildung 7:	Genotypverteilung des rs1333045 (C/T) Polymorphismus in der Myokardinfarkt-Gruppe und der Kontrollgruppe.....	40
Abbildung 8:	Darstellung der SNPs, die eine Assoziation zum Myokardinfarkt und zum Schlaganfall gezeigt haben.....	52
Abbildung 9:	Schematische Darstellung eines Teils der 9p21.3 Region.....	58

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Stadieneinteilung der stabilen AP nach der Canadian Cardiovascular Society (CCS), adaptiert nach Campeau.....	15
Tabelle 2:	Klinische Erscheinungsformen des akuten Koronarsyndroms.....	16
Tabelle 3:	Auswahl einiger Kandidatengene mit potentiell krankheitsbegünstigenden Polymorphismen.....	20
Tabelle 4:	Auswahl von Genen, die sich innerhalb oder neben den 4 mit der koronaren Herzkrankheit assoziierten Loci befinden.....	22
Tabelle 5:	Bestandteile des Reaktionsmixes für den rs1333040 T/C TaqMan Assay.....	33
Tabelle 6:	Bestandteile des Reaktionsmixes für den rs7857345 C/T TaqMan Assay und für den rs1333045 C/T TaqMan Assay.....	33
Tabelle 7:	Nukleotidsequenzen der Primer und Sonden für die rs1333040, rs7857345, rs1333045 TaqMan Assays.....	34
Tabelle 8:	Basale Charakteristika der Myokardinfarkt-Gruppe und der Kontrollgruppe.....	36
Tabelle 9:	Genotypverteilung der drei Polymorphismen in der Myokardinfarkt-Gruppe und der Kontrollgruppe.....	37
Tabelle 10:	Allelfrequenzen der drei untersuchten Polymorphismen in der Myokardinfarkt-Gruppe und der Kontrollgruppe.....	41

Tabelle 11:	Haplotypenfrequenzen der Polymorphismen rs1333040, rs7857345 und rs1333045 auf Chromosom 9p21.3.....	43
Tabelle 12:	Assoziation der SNP Haplotypen auf Chromosom 9p21.3 auf den ischämischen Schlaganfall	54

1 Einleitung

1.1 Koronare Herzkrankheit und Myokardinfarkt: klinische Bedeutung

Derzeit stellen kardiovaskuläre Erkrankungen die häufigste Todesursache in der deutschen Bevölkerung dar (Statistisches Bundesamt Deutschland, Wiesbaden, 2007). Soweit prognostische Aussagen möglich sind, werden die koronare Herzerkrankung und der Herzinfarkt – eine der Komplikationen der koronaren Herzerkrankung – auch in den nächsten 25 Jahren in den westlichen Industrienationen die häufigste Todesursache bleiben (Murray et al., 1997). Ein akuter Myokardinfarkt war im Jahr 2007 für 17 % der Todesfälle in Deutschland verantwortlich (Statistisches Bundesamt Deutschland, Wiesbaden, 2007). Die Mortalität des akuten Myokardinfarktes beträgt bis zu 50 %, und nur etwa die Hälfte der Patienten bemerkt vor dem Infarktereignis Symptome einer koronaren Herzerkrankung (Muller et al., 1990). Aufgrund der Häufigkeit und der hohen Letalität der koronaren Herzerkrankung ist die Verbesserung der Primärprävention von großer Bedeutung. Um eine möglichst effektive Primärprävention zu gewährleisten, dabei Individuen mit hohem Risiko zu identifizieren und diese möglichst frühzeitig vor dem Auftreten von Komplikationen behandeln zu können, ist eine exakte Kenntnis der Pathophysiologie nötig.

1.2 Pathogenese und Ätiologie der Atherosklerose

Unter Atherosklerose versteht man einen morphologischen Symptomenkomplex von Veränderungen der Gefäßintima, bestehend aus örtlichen Ansammlungen von Fetten, komplexen Kohlenhydraten, Blutbestandteilen sowie fibrösem Gewebe und Calcium, verbunden mit Veränderungen der Gefäßmedia, welches zu einer Verdickung und Verhärtung der Arterienwand führt (Hornbostel et al., 1992; Stobbe et al., 1996; Riede et al., 1993). Die Abbildung 1 zeigt ein atherosklerotisch verändertes Gefäß.

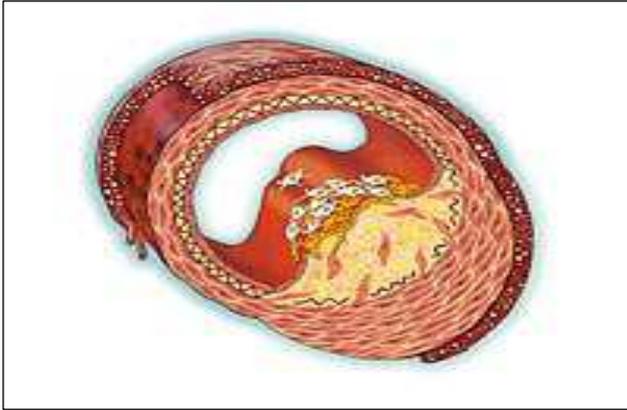


Abbildung 1: Atherosklerotisch verändertes Blutgefäß
(www.Herz-info.de, Stand: 09.06.2010)

Die pathophysiologischen Mechanismen, die zur Atherosklerose führen, sind komplex und werden in der Regel durch zahlreiche genetische Faktoren (polygenetisch) sowie Umweltfaktoren beeinflusst, so dass aktuell von einem multifaktoriellen Geschehen ausgegangen wird (Chamberlain et al., 1990, Gross et al., 1996, Miserez et al., 1995). Die Atherosklerose wurde ausgehend von den seit längerem bekannten Risikofaktoren, Hypercholesterinämie, Rauchen, arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus, als Prozess der passiven Lipidakkumulation in der Gefäßwand angesehen. Im Jahre 1999 postulierte Ross, dass es sich bei der Artherosklerose um eine inflammatorische Erkrankung handle, bei welcher Entzündungsvorgänge wesentliche Mechanismen der Limitierung, Unterhaltung und des Fortschreitens der Atherosklerose darstellen (Ross, 1999a). Diese werden als die „Response-to-injury-Hypothese“ bezeichnet. Die „Response-to-injury-Hypothese“ (Verletzungstheorie) wird am breitesten für die Atheroskleroseentstehung akzeptiert, die mit einer Vielzahl experimenteller Beweise übereinstimmt (Hornbostel et al., 1992; Isselbacher et al., 1995). Das initiale Ereignis der Atherogenese besteht nach dieser Theorie in einer wiederholten und kontinuierlichen Schädigung durch chemische, mechanische, immunologische oder toxische Einflüsse der die Intima auskleidenden Endothelzellen (Fuster et al., 1996; Hornbostel et al., 1992; Ross, 1993), die zu einer endothelialen Dysfunktion führt. Das Agens, welches eine endotheliale Dysfunktion auslöst, wurde bisher nicht identifiziert, mögliche Kandidaten sind oxidierte Lipide (oxidierte LDL), Zytokine oder Proteasen, Änderungen der Scherkräfte, freie Radikale, Homocystein oder eine virale Infektion (Fuster et al., 1996). Es entsteht somit eine lokale Entzündungsreaktion in der Arterienwand. Bei längerer Dauer resultiert daraus eine

toxische Schädigung der Zellen der Arterienwand mit drauffolgender fibroproliferativer Reaktion (Fuster et al., 1996; Ross, 1993) Diese führen zu einer Kette von komplexen Wechselwirkungen zwischen Endothel (Zellen der Gefäßwand), glatten Muskelzellen der Tunica media der Arterien, Lymphozyten, Thrombozyten, Monozyten bzw. Makrophagen, aktivierten T-Lymphozyten sowie Wachstumsfaktoren und Zytokinen, die im Vollbild der Atherosklerose münden können (Ross, 1993; Liao, 1998; Hornbostel et al., 1992).

Arteriosklerotische Veränderungen werden nach Herbert C. Stary in acht verschiedenen Stadien eingeteilt (Fuster et al., 1996; Just et al., 1994).

Stadium I: In diesem Stadium kommt es aufgrund der endothelialen Dysfunktion infolge einer Verletzung zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen durch das alterierte Endothel. Hierdurch adhären Monozyten und T-Lymphozyten aus dem Blut am Endothel. Es kommt zur Expression von spezifischen Adhäsionsmolekülen (endotheliale leukozytäre Adhäsionsmolekül-1(ELAM-1), P-Selektin, „vascular cell adhesion molecule 1“ (VCAM-1) und „intercellular adhesion molecule 1“ (ICAM-1) an der Oberfläche der Endothelzellen (Fuster et al., 1996, Ross, 1993). Monozyten und T-Lymphozyten aus dem Blut binden an diese Rezeptoren an, wandern unter dem Einfluss von Zytokinen und Wachstumsfaktoren durch die endotheliale Barriere und treten in den subendothelialen Raum über. Zusätzlich gelangen vermehrt Lipoproteine durch das Endothel in die Intima. Die eingewanderten Monozyten werden zu Makrophagen, nehmen über den Scavenger-Rezeptor oxidiertes LDL-Cholesterin auf und speichern es in Vakuolen im Zytoplasma. Da diese Aufnahme keinem negativen Feedbackmechanismus unterliegt, kommt es zur Überladung der Makrophagen und damit zur Bildung isolierter Schaumzellen, die in ihrem Zytoplasma zahlreiche Lipidvakuolen gespeichert haben (Stary, 1989; Stary et al., 1995; Stary, 2000; Riede et al., 1989).

Stadium II: In diesem Stadium bilden sich sogenannte „fatty streaks“, welche durch eine erhöhte Akkumulation von Makrophagen sowie durch das Auftreten von Schichten von Schaumzellen und lipidbeladenen glatten Muskelzellen charakterisiert sind. Die Makrophagen nehmen oxidiertes LDL über den Scavenger-Rezeptor auf, der im Gegensatz zum LDL-Rezeptor keinem negativen Feedbackmechanismus bei

hohen Cholesterinkonzentrationen unterliegt, und speichern diese im Zytoplasma, hauptsächlich in den Lysosomen. Diese bezeichnet man als Schaumzellen (Fuster et al., 1996; Hecht et al., 1988). Diese Veränderungen sind bereits makroskopisch sichtbar, es sind jedoch noch keine Gewebsschäden nachweisbar (Stary, 1989; Stary et al., 1995; Stary, 2000; Ross, 1993).

Stadium III: Die kontinuierliche Einwanderung der oben beschriebenen Zellen und deren Proliferation unter dem Einfluss der sezernierten Zytokine und Wachstumsfaktoren bewirken die Progression zur präatheromatösen Läsion, in der sich zusätzlich zu den Komponenten der „Fatty streaks“ multiple extrazelluläre Lipidablagerungen in muskuloelastischen Schichten finden. In diesem Stadium sind bereits mikroskopische Gewebsschäden nachweisbar (Stary et al., 1994; Stary et al., 1995).

Stadium IV: Hier kommt es zur Ausbildung eines Lipidkerns, welcher durch Vergrößerung und Konfluieren von extrazellulären Lipidablagerungen entsteht. Diese stellen als definierender Bestandteil des Atheroms das Charakteristikum des Stadiums IV nach Stary dar (Stary et al., 1994; Stary et al., 1995).

Stadium V: Es entsteht das Fibroatherom, bei dem neben den oben beschriebenen Veränderungen eine dicke, kappenartige Kollagenschicht in der Intima zu erkennen ist (Stobbe et al., 1996). Dabei wird durch verschiedene Wachstumsfaktoren die Proliferation glatter Muskelzellen und ihre Umwandlung zu aktiven Zellen gefördert, die extrazelluläre Matrix wie Kollagen, Proteoglykane und elastische Fasern synthetisieren. Es findet sich über dem Lipidkern eine fibröse Kappe aus Kollagen und glatten Muskelzellen (Stary et al., 1994).

Stadium VI: Eine Läsion von Typ VI kann sowohl aus einer Läsion vom Typ V als auch vom Typ IV ausgehen. In diesem Stadium kommt es zu Fissuren, Hämatomen und konsekutiven muralen Thrombenbildungen (Stary et al., 1995; Fuster et al., 1992).

Stadium VII: Hier prägen nekrotisierte und kalzifizierte Areale das Bild, d.h. jede fortgeschritten Läsion, die vorrangig aus Calcium besteht.

Stadium VIII: Hier dominiert zellarmes kollagenes Bindegewebe (Stary, 2000), d.h. jede fortgeschrittene Läsion, die vorrangig aus Kollagen besteht. Dieses Stadium ist eher als Ausheilungsstadium denn als Komplikation anzusehen (Bräsen et al., 1997). Die Abbildung 2 zeigt bildlich die einzelnen Schritte der Atheroskleroseentstehung.

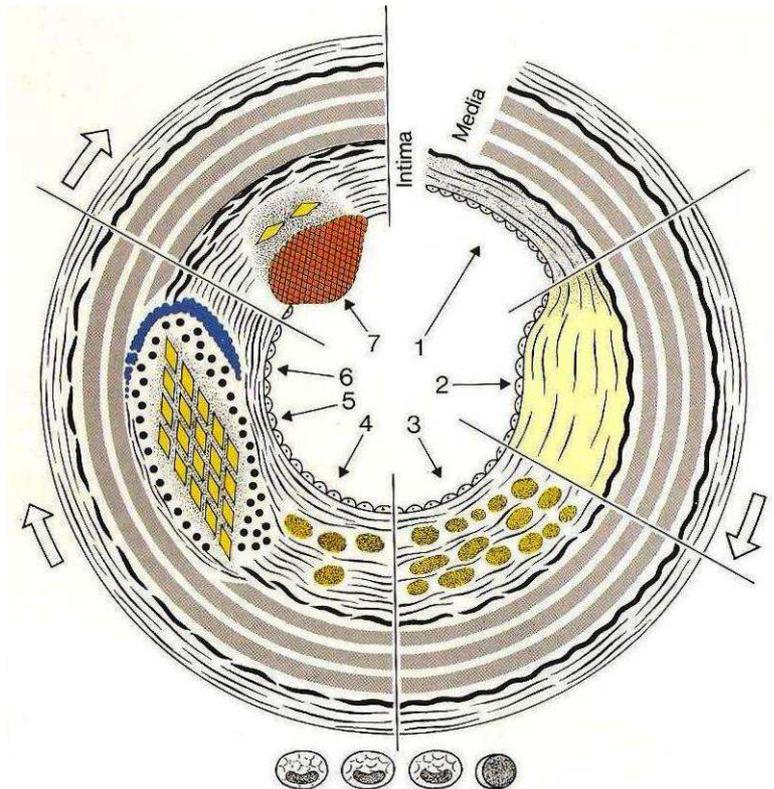


Abbildung 2: Pathogenese der Atherosklerose (Riede et al. 1994, S. 438)

1: normale Arterienwand; 2: initiale, subintimale Akkumulation von Lipiden, Proteoglykanen und Kollagenfasern; 3: intimale Lipidherde, erste Schaumzellen;
 4: fortschreitende Schaumzellenansammlung, proliferierende Myofibroblasten;
 5: Atherom mit zentraler, Cholesterinkristalle enthaltender Nekrose, umsäumt von Schaumzellen und einzelnen T-Lymphozyten und perifokaler Sklerose;
 6: spangenförmige Atheromverkalkung; 7: atheromatöses Geschwür mit parietalem Abscheidungsthrombus

1.3 Klinische Manifestation der Atherosklerose

Die häufigste klinische Manifestation der Atherosklerose ist die koronare Herzerkrankung, die entweder durch Symptome wie Angina pectoris oder durch das Auftreten ihrer Komplikationen wie Herzinfarkt, Herzrhythmusstörungen und plötzlicher Herztod in Erscheinung tritt (Baenkler et al., 1999; Gersh et al., 1997). Die Atherosklerose kann sich jedoch neben den kardialen Erkrankungen klinisch auch in Form der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit, der cerebralen Ischämie und in Form eines Bauchaortenaneurysmas präsentieren. Seltener sind retinale, renale und mesenteriale Manifestationen. Die Prädilektionsstellen sind hier vor allem die proximalen Gefäßabschnitte und Gefäßaufzweigungen (Poche et al., 1996).

Die koronare Herzkrankheit ist die Manifestation atherosklerotischer Gefäßveränderungen an den Koronararterien (Gross et al., 1996). Durch die Entstehung atherosklerotischer Plaques kommt es zu mehr oder weniger ausgeprägten, akut auftretenden oder langsam progredienten Okklusionen der epikardialen Koronargefäße mit der Folge der myokardialen Ischämie, d.h. einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf (Wagner, 1991). In etwa 90 % der Fälle liegt der Sauerstoffmangelversorgung eine stenosierende und/oder okkludierende Arteriosklerose der extramuralen Herzkranzgefäße zugrunde, in etwa 10 % besteht eine hämodynamisch wirksame Einengung des intramuralen Strombettes (Stobbe et al., 1996). Klinisch unterscheidet man dabei zwischen der stabilen koronaren Herzkrankheit und dem akuten Koronarsyndrom. Morphologisches Korrelat der stabilen koronaren Herzkrankheit ist eine hämodynamisch relevante Stenosierung in einer oder mehreren Koronararterien. Eine Stenose ist in der Regel hämodynamisch bedeutsam, wenn das Gefäßlumen um mehr als 70 % eingeengt ist (Gibbons et al., 1999). Die typische klinische Symptomatik der stabilen Angina pectoris sind belastungsabhängige pektanginöse Beschwerden, die sich durch sublinguale Nitroglyceringabe rasch bessern, ischämietypische Veränderungen im Ruhe-Elektrokardiogramm (T-Negativierung, ST-Strecken-Senkung) und eine pathologische Ergometrie oder andere Belastungsuntersuchungen (Myokard-Szintigraphie, Stress-Echokardiographie). Die Sicherung der Diagnose erfolgt durch die direkte Darstellung der Koronararterien mittels Koronarangiographie (Rosenkranz et al., 2006). Die Klassifikation der stabilen, belastungsinduzierten Angina pectoris erfolgt nach der Canadian

Cardiovascular Society (CCS) (Campeau et al., 1976) in vier Schweregrade. Diese sind in der Tabelle 1 genannt.

Tabelle 1: Stadieneinteilung der stabilen AP nach der Canadian Cardiovascular Society (CCS), adaptiert nach Campeau (Campeau et al., 1976)

0	Klinisch stumm.
1	Normale körperliche Aktivität wie Gehen oder Treppensteigen verursacht keine Angina pectoris. Angina pectoris tritt auf bei intensiver, schneller oder lang dauernder Anstrengung durch Arbeit oder Freizeitbeschäftigung.
2	Leichte Einschränkung normaler Aktivität. Angina pectoris tritt bei schnellem Gehen oder Treppensteigen auf, beim Bergaufgehen, bei Belastung nach dem Essen, bei Kälte, Wind, emotionaler Belastung oder nur in den ersten Stunden nach dem Aufwachen. Angina pectoris tritt erst nach mehr als 200 m Gehen in ebenem Gelände oder einer Etage Treppensteigen in normalem Tempo auf.
3	Deutliche Einschränkung normaler Aktivitäten. Angina pectoris tritt während 100 bis 200 m Gehen auf oder unter einer Etage Treppensteigen in normalem Tempo.
4	Auftreten von Angina pectoris bei jeder körperlicher Betätigung, Gehstrecke unter 100 m, Beschwerden beim Gehen im Haus oder bei persönlicher Pflege. Symptome können auch in Ruhe vorhanden sein.

Das akute Koronarsyndrom beinhaltet die instabile Angina pectoris, „non-ST-elevation myocardial infarction“ (NSTEMI) und „ST-elevation myocardial infarction (STEMI)“ (Alpert et al., 2000; Prodzinsky et al., 2003; Hamm et al., 2004 Teil 1 und Teil 2). Die Thrombusbildung in der Folge einer Plaque-Ruptur bzw. Fissur in einem atherosklerotisch veränderten Koronargefäß ist das pathomorphologische Verbindungsglied zwischen den drei Formen der akuten Koronarsyndrome (Yun et al., 1997). In der Tabelle 2 sind die klinischen Erscheinungsformen des akuten Koronarsyndroms dargestellt.

Tabelle 2: Klinische Erscheinungsformen des akuten Koronarsyndroms (Herold, 2004)

Instabile AP	ohne Anstieg von Troponin I oder T
NSTEMI	Anstieg von Troponin I oder T, aber ohne ST-Streckenhebung
STEMI	Troponin T oder I Anstieg mit ST-Streckenhebung

1.4 Risikofaktoren der Entstehung der Atherosklerose

Trotz der Komplexität atherogenetischer Mechanismen ließen sich anhand epidemiologischer Untersuchungen einzelne Parameter identifizieren, deren verstärkte oder verminderte Ausprägung das Atheroskleroserisiko erhöhen (Chamberlain et al., 1990; Lusic et al., 1992; Miserez et al., 1995). Für die Entstehung von atherosklerotischen Läsionen sind verschiedene Risikofaktoren verantwortlich. In Anlehnung an die Leitlinien der „International Atherosclerosis Society“ 2003 sind die Hauptrisikofaktoren: Zigarettenrauchen, arterielle Hypertonie, „low-density lipoprotein“ (LDL)-Cholesterin-Erhöhung, „high-density lipoprotein“ (HDL)-Cholesterin-Erniedrigung, Erhöhung der Triglyzeride, höheres Lebensalter (Männer > 45 Jahren, Frauen > 55 Jahren oder in der Postmenopause), koronare Herzerkrankung/Herzinfarkt bei erstgradigen Familienangehörigen vor dem 60. Lebensjahr (männlich) bzw. 65. Lebensjahr (weiblich) und Diabetes mellitus (Dietz et al., 2003; Gohlke, 2009; Fuster et al., 1996; Tejada et al., 1968; Myers et al., 1990). Als besonders ungünstig ist eine Kombination mehrerer Risikofaktoren anzunehmen, da die Wahrscheinlichkeit, an einer koronaren Herzerkrankung zu erkranken, dabei überadditiv ansteigt (Anderson et al., 1991; Foucan et al., 2001).

In den letzten 10-15 Jahren wurden darüber hinaus weitere kardiovaskuläre Risikofaktoren identifiziert. Dazu zählen das Homocystein, das C-reaktive Protein (CRP) sowie die zellulären anti-oxidativen Enzyme und hier vornehmlich die Glutathionperoxidase-1 (GPx-1) und die Marker für Hämostase.

Hyperhomocysteinämie:

Ausgehend von bereits im Kindesalter auftretenden atherothrombotischen Läsionen bei homozygoten Enzymdefekten wie z.B. der Homocystinurie konnte in mehreren Studien ebenfalls ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko für Erwachsene mit

Homocystein-Erhöhungen gezeigt werden (Welck et al., 1998)

Marker für Hämostase und Entzündung:

Hier sind als Risiken vor allem Abweichungen hämostatischer Faktoren im Sinne einer Erhöhung des Fibrinogens (Koenig et al., 1998) zu nennen sowie als wichtiger Entzündungsparameter das C-reaktive-Protein (CRP). Die Untersuchungen von Ridker und Mitarbeitern konnten zeigen, dass die Serumkonzentration des CRP mit dem kardiovaskulären Risiko assoziiert ist (Ridker et al., 1998). Diese Assoziation konnte in unterschiedlicher Stärke in verschiedenen großen Studien reproduziert werden (Danesh et al., 2004). Auch die Ergebnisse von Tiermodellen, in denen humanes oder Kaninchen-CRP überexprimiert wurde, sind variabel. Während eine Studie eine Beschleunigung der Arterioskleroseentwicklung beschreibt (Paul et al., 2004), zeigten andere Studien keine Assoziation der Serumkonzentration des CRP zum kardiovaskulären Risiko (Reifenberg et al., 2005; Trion et al., 2005; Hirschfield et al., 2005). Zusammenfassend kann man sagen, dass zum aktuellen Zeitpunkt kein kausaler Zusammenhang der Rolle des CRP in der Pathogenese der Arteriosklerose eindeutig gezeigt werden kann (Lackner et al., 2007).

Glutathionperoxidase-1 (GPX-1):

In einer prospektiven Studie an Patienten mit koronarer Herzkrankheit konnte eine inverse Beziehung zwischen der erythrozytären Glutathionperoxidase-1(GPx-1)-Aktivität und dem Risiko kardialer Ereignisse gezeigt werden (Blankenberg et al., 2003). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass ein Glutathionperoxidase-1(GPx-1)-Mangel im Mausmodell die Entstehung der Arteriosklerose beschleunigt (Torzewski et al., 2007).

1.5 Einfluss genetischer Faktoren auf die Entwicklung eines Myokardinfarktes bzw. einer koronaren Herzerkrankung

Als Grundlage zur Identifikation der „Hochrisiko“-Individuen werden aktuell die Untersuchungen der jeweils bei den Individuen vorliegenden kardiovaskulären Risikofaktoren genommen (Anderson et al., 1991; Foucan et al., 2001; Hengstenberg et al., 2002). Es zeigt sich jedoch, dass anhand dieser Risikofaktoren nur eine grobe Einschätzung des individuellen Risikos möglich ist, denn nur etwa 50 % des individuellen Risikos sind durch diese Risikofaktoren zu erklären (Hengstenberg et

al., 2002). So kann sich bei Individuen ohne bekannte Risikofaktoren ein gehäuftes familiäres Auftreten der koronaren Herzkrankheit zeigen (Hunt et al., 2002; Li et al., 2000). Die positive Familienanamnese konnte neben den traditionellen Risikofaktoren als unabhängiger Risikofaktor nachgewiesen werden (Schildkraut et al., 1989; Colditz et al., 1986). Im Rahmen von Zwillingsstudien und in zahlreichen Familienstudien konnte diese genetische Prädisposition für die Entwicklung einer koronaren Herzerkrankung nachgewiesen werden (Mansour-Chemaly et al., 2002; Valdes et al., 2001; Herrmann et al., 2001).

In einer Langzeitstudie an über 10.000 schwedischen Zwillingspaaren haben die Daten gezeigt, dass für monozygote Zwillinge das Risiko für das Auftreten eines Herzinfarktes bei Männern um das 8,1 Fache erhöht war, wenn das andere Zwillingspaar vor dem 55. Lebensjahre an einem Herzinfarkt verstarb. Für die dizygoten Zwillinge, die genetisch wie „normale“ Geschwister von Herzinfarktpatienten anzusehen sind, bestand eine Risikoerhöhung von 2,6. Bei monozygoten weiblichen Zwillingen war das Risiko um den Faktor 15 erhöht, wenn der eine Zwilling an einer koronaren Herzerkrankung vor dem 65. Lebensjahr verstarb (Marenberg et al., 1994). Es gilt als wahrscheinlich, dass diese genetische Disposition nicht einem einzelnen genetischen Merkmal zugeordnet werden kann, sondern aus der Wechselwirkung und Summation verschiedener genetischer Varianten resultiert (Ortlepp et al., 1999).

Die Genomforschung hat besonders bei komplexen Erkrankungen wie z.B. der koronaren Herzerkrankung eine große Bedeutung, da diese wie bereits erwähnt unter Zusammenwirken von exogenen Faktoren und einer Vielzahl von genetischen Faktoren entstehen. Dabei gibt es hauptsächlich zwei Ansätze: Zum einen können die Einflüsse von bekannten Polymorphismen in Kandidatengenen untersucht werden. Kandidatengene sind dabei diejenigen, die Proteine kodieren, welche wiederum selbst in der Entwicklung einer multifaktoriellen Erkrankung, z.B. der koronaren Herzerkrankung, involviert sind (Hengstenberg et al., 2002). Der zweite Ansatz liegt darin, das gesamte Genom systematisch nach Lokalisationen von Risiko-Genen für Myokardinfarkt abzusuchen (genomweiter Ansatz). Das Ziel hier ist die Identifizierung neuer, bisher nicht mit der koronaren Herzerkrankung oder der Arteriosklerose in Beziehung gebrachter Genloci (Hengstenberg et al. 2002).

In jüngster Zeit werden zunehmend Polymorphismen in Genen kardiovaskulärer Proteine als mögliche Einflussfaktoren auf die Entstehung oder den Verlauf einer koronaren Herzerkrankung untersucht. Unter einem Genpolymorphismus versteht man das häufige Vorkommen von zwei oder mehr unterschiedlichen Allelen der genomischen DNA. Häufig bedeutet dabei, dass das seltenere Allel häufiger als 1 % in der untersuchten Population auftritt (Ortlepp et al., 1999). Bei den meisten Polymorphismen handelt es sich um Einzelbasenpolymorphismen („single nucleotide“ polymorphismen, SNPs). Als SNPs werden Variationen einzelner Basenpaare in einem DNA-Strang bezeichnet. Ein SNP liegt dann vor, wenn der durch die Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin charakterisierte genetische Code einen Austausch besitzt. D.h. ist ein einzelner Nukleotid ausgetauscht, so handelt es sich um einen SNP (Selzer et al., 2004). SNPs stellen ca. 90 % aller genetischen Variationen im menschlichen Genom dar. Dabei treten sie nicht gleich verteilt auf, sondern nur ungleichmäßig stark an bestimmten Regionen. „Single nucleotide“ Polymorphismen kommen durchschnittlich alle 1000 Basen im menschlichen Genom vor. Heute existieren „SNP-maps“, in denen alle bekannten Polymorphismen gespeichert und für wissenschaftliche Projekte zugänglich sind (Collins et al., 1998; Ortlepp et al., 1999). Über 130 Gene und Gengruppen sind beschrieben, deren Polymorphismen als potentielle genetische Risikofaktoren (Kandidatengene) der Atherosklerose und ihrer Folgeerkrankungen angesehen werden (Tang et al., 2001). Cambien et al. konnten 1992 eine Assoziation zwischen dem ACE-Polymorphismus und dem Auftreten von Herzinfarkt nachweisen. Der DD-Genotyp war dabei mit einem 1,34fach erhöhten Risiko mit dem Auftreten von Myokardinfarkt assoziiert. Dies konnte in einer Meta-Analyse von 15 Studien bestätigt werden, wobei in dieser Meta-Studie homozygote Träger des D-Allels ein 1,26fach erhöhtes Risiko für das Auftreten von Myokardinfarkt aufwiesen (Samani et al., 1996). Im Gegensatz dazu zeigte eine Analyse der Physicians`Health Study an 1.250 männlichen Patienten mit koronarer Herzkrankheit und 2.340 Kontrollen weder in der Gesamtpopulation noch in einer Subgruppenanalyse von Patienten mit niedrigem kardiovaskulären Risiko einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen dem DD-Genotyp und koronarer Herzerkrankung (Lindpainter et al., 1995). In der Tabelle 3 sind einige Beispiele für Kandidatengene mit potentiell krankheitsbegünstigenden Polymorphismen zusammengestellt (Ortlepp et al., 1999; Tang et al., 2001).

Tabelle 3: Auswahl einiger Kandidatengene mit potentiell krankheitsbegünstigenden Polymorphismen (Collins et al., 1998; Ortlepp et al., 1999).

Lipidstoffwechsel	Endothel	RAAS	Adrenozeptoren	Andere
CETP Ile405Val	eNos,NOS3 (27bp) _n Intron 4; oder Glu298Asp	ACE, I/D- Polymorphismus	Alpha 1A-AR C1441T	GNB3 C825T
APOE E2,3,4 RFLP HhaI	MTHFR C677T	AGT M235T	β 1-AR G1165C	
LPL Asp9Asn Asn291Ser	ELAM 1, D62E Ser128Arg	AGTR1 A1166C	β 2-AR A46G	

CETP: Cholesterol-ester-transferprotein; NOS3: NO-Synthase 3; ACE:Angiotensin-1-Convertinenzym; Alpha 1A-AR: Alpha1A-Adrenozeptor; GNB3: G Protein β 3; APOE: Apolipoprotein E; RFLP: Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus; MTHFR: Methyltetrahydro-folatreduktase; AGT: Angiotensinogen; β 1-AR: β 1-Adrenozeptor; β 2-AR: β 2-Adrenorezeptor; LPL: Lipoprotein-lipase; ELAM 1: Endotheliale leukozytäre Adhäsionsmolekül; AGTR1: Angiotensin II-Rezeptor 1; β 2-AR: β 2-Adrenozeptor

1.6 Assoziation ausgewählter Sequenzvariationen mit dem Myokardinfarkt

In letzter Zeit konnten im großen Maße Assoziationsstudien Risikogene für die Entwicklung einer koronaren Herzerkrankung bzw. den Myokardinfarkt identifizieren. Es handelt sich dabei um genomweite Analysen mit SNP-Markern. Dabei werden mehr als 500.000 SNP-Marker pro Person gleichzeitig auf sogenannten „SNP-Chips“ untersucht. Da diese eine große Anzahl von Befunden liefern, von denen einige lediglich aufgrund der Wahrscheinlichkeitsverteilung positiv sind, ist es wichtig, diese möglicherweise „falsch-positiven“ Befunde durch eine Wiederholung der Untersuchungen in einer unabhängigen Population erneut zu prüfen. Falls die Befunde dann bestätigt werden können, ist von einem echten Effekt auszugehen. Einige Beispiele von genomweiten Fall-Kotrollstudien werden im Nachfolgenden

dargestellt. Genomweite Assoziationsstudien konnten wiederholt eine Assoziation des Chromosom 9p21.3 Locus mit einer erhöhten Inzidenz der koronaren Herzerkrankung bzw. des Myokardinfarktes identifizieren (Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007; McPherson et al., 2007; Helgadottir et al., 2007; Samani et al., 2007). Des Weiteren konnte eine kombinierte Analyse der Wellcome Trust Case Control Consortium Studie (WTCCC) und der Deutschen Myokardinfarkt Familien Studie sieben chromosomale Loci (auf den Chromosomen 1p13.3, rs599839; 1q41, rs17465637; 2q36.3, rs2943634; 6q25.1, rs6922269; 9p21.3, rs1333049; 10q11.21, rs501120 und 15q22.33, rs17228212) identifizieren, die alle eine hoch signifikante Assoziation auf das Auftreten einer koronaren Herzerkrankung zeigten (Samani et al., 2007). Diese neun SNPs wurden in einer weiteren Assoziationsstudie in 11.550 Fällen und 11.205 Kontrollen aus neun europäischen Studien erneut auf die Assoziation mit der koronaren Herzerkrankung untersucht (Coronary Artery Disease Consortium et al., 2009). In dieser Studie konnte ebenfalls eine signifikante Assoziation der Polymorphismen auf den Chromosomen 9p21.3, 1p13.3, 1q41 und 10q11.21 mit dem KHK-Risiko repliziert werden. Die Ursache des erhöhten Risikos für die koronare Herzerkrankung bei Vorhandensein dieser Polymorphismen ist aktuell noch unklar. Die Tabelle 4 zeigt eine Auswahl von Genen, die sich innerhalb oder in der Nähe dieser vier oben genannten Risikoloci befinden (Coronary Artery Disease Consortium et al., 2009).

Tabelle 4: Auswahl von Genen, die sich innerhalb oder neben den vier mit der KHK assoziierten Loci befinden

Chromosom	Gene
1p13.3	PSRC1, CELSR2, MYBPHL, SORT1
1q41	MIA3
2q36.3	keine bekannten Gene
6q25.1	MTHFD1L
9p21.3	P16/CDKN2A, P15/CKKN2B, P14/ARF, MTAP, ANRIL
10q11.21	CXCL12
15q22.33	SMAD3

PSRC1: indicates proline/serine-rich coiled coil 1 gene; CELSR2: cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 2 gene; MYBPHL: myosin binding protein H-like gene; SORT1: sortilin 1 gene; MIA3: melanoma inhibitory activity family, member 3 (MIA3) gene; p16/CDKN2A: cyclin-dependent kinase inhibitor 2A gene; p15/CDKN2B: cyclin-dependent kinase inhibitor 2B gene; p14/ARF: P14 tumour suppressor gene; MTAP: methylthioadenosine phosphorylase gene; ANRIL: antisense noncoding RNA; CXCL12: chemokine (C-X-C motif) ligand 12 gene; MTHFD1L: Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+dependent) 1-like; SMAD3: Mothers against decapentaplegic homolog 3

Einige Studien konnten eine starke Assoziation des Polymorphismus auf Chromosom 1p13.3 auf die LDL-Cholesterin-Konzentration zeigen (Wallace et al., 2008; Kathiresan et al., 2008; Willer et al., 2008; Sandhu et al. 2008; Samani et al., 2008). Der Polymorphismus auf Chromosom 1q41 liegt innerhalb der *MIA3* Gene („Melanoma inhibitory activity family, member 3“), welche eine Rolle im Zellwachstum oder der Zellinhibition haben (Bossert AK, 2002; Buettner R, 2002). Gleiches gilt für Gene auf Chromosom 1p13.3 (*PSRC1*) und 15q22.33 (*SMAD3*), welche ebenfalls eine große Rolle im Zellwachstum oder deren Inhibition haben (Qin BY et al., 2002; Lo et al., 1999). Diese Prozesse sind fundamental für die Formation und die Progression des atherosklerotischen Plaques und für die Plaquestabilität (Libby et al., 2005) Die mögliche Assoziation des Chromosoms 6q25.1 mit der koronaren

Herzerkrankung führt man auf das *MTHFD1L* Gen zurück. *MTHFD1L* kodiert die mitochondriale Isoenzyme des *C1-THF* (Tetrahydrofolat)-Synthase (Prasanna et al., 2003; Walkup et al., 2005). Die Familie der THF-Synthasen sind in einer Vielzahl von zellulären Prozessen, insbesondere in der Synthese von Purinen und Methionin, beteiligt (Prasanna et al., 2003). Die unterschiedliche *MTHFD1L*-Aktivität trägt zu der Höhe des Homocystein-Levels im Serum bei. Dies könnte ein Ansatz zur Erklärung der Assoziation des Chromosoms 6q25.1 auf die koronare Herzerkrankung sein (Fruchart et al., 2004). Der Locus auf Chromosom 10q11.21 liegt in der Nähe der *CXCL12* Gene („Chemokine C-X-C motif ligand 12 gene“), welches den SDF-1 Faktor („stromal cell-derived factor-1“) kodiert. Es handelt sich dabei um ein Chemokin, welches eine Schlüsselrolle in der Gewebsregeneration bei der ischämischen Kardiomyopathie (Askari A et al., 2003) und in der Förderung der Angiogenese durch die Rekrutierung der endothelialen Progenitorzellen spielt (Zheng H et al., 2007). Der Locus auf Chromosom 9p21.3 grenzt an die Gene zweier Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitoren, *CDKN2A* und *CDKN2B*. Die durch diese zwei Gene kodierten Proteine sind *p16INK4a*, *ARF* und *p15INK4b*. Diese spielen eine große Rolle in der Regulation des Zellzyklus. Außerdem wird angenommen, dass sie zu einer Familie von Genen gehören, welche an der Entstehung der Atherosklerose beteiligt sind (Schunkert et al., 2008; Lowe et al., 2003; Hannon et al., 1994; Kalinina et al., 2004). Zusätzlich überlappt der Risikolocus 9p21.3 mit *ANRIL* („Antisense non coding RNA of the INK locus“). *ANRIL* wird in Geweben und Zelltypen exprimiert, die einen Einfluss auf die Atheroskleroseentstehung haben (Broadbent et al., 2008).

Zum aktuellen Zeitpunkt ist noch unklar, ob zwischen den chromosomalen Polymorphismen und den oben genannten Genen eine Assoziation bezüglich einer erhöhten Anfälligkeit zur koronaren Herzerkrankung vorliegt. Die Ergebnisse könnten die Aussicht auf neuere anwendbare Therapien der koronaren Herzerkrankung bzw. des Myokardinfarktes durch eine bessere Kenntnis der durch diese Loci beeinflussten pathogenetischen Mechanismen in der Gefäßwand liefern.

Häufig ist eines der größten Probleme in Assoziationsstudien der Mangel an Reproduzierbarkeit (Morgan et al., 2007). Aufgrund dessen sind Bestätigungsstudien notwendig, um die Gene aufzuklären, welche in der Pathogenese der koronaren Herzerkrankung oder des Myokardinfarktes involviert sind. Bisher zeigte der Locus auf Chromosom 9p21.3 die stärkste Assoziation mit der koronaren Herzerkrankung bzw. mit dem Myokardinfarkt. Aufgrund dessen haben wir uns in dieser Studie das

Ziel gesetzt, diese genomische Region im Detail weiter zu untersuchen und die bereits in vorherigen Studien identifizierten Polymorphismen, welche eine Assoziation zum Auftreten einer koronaren Herzerkrankung bzw. eines Myokardinfarkts zeigten, erneut auf deren positive Assoziation zu replizieren .

1.7 Ziel der Arbeit

Als Grundlage für die vorliegende Dissertationsschrift dienten mehrere im Jahr 2007 publizierte genomweite Assoziationsstudien, die unabhängig voneinander auf einen bestehenden Zusammenhang zwischen SNPs innerhalb des p21.3-Bereichs auf dem Chromosom 9 und der koronaren Herzkrankheit sowie dem Myokardinfarkt hingewiesen haben (Helgadottir et al., 2007; McPherson et al., 2007; Wellcome Trust Case Consortium, 2007; Samani et al., 2007).

Die Arbeit erfolgte im Rahmen einer pathogenetischen Feinanalyse des mit dem Myokardinfarkt assoziierten, etwa 175000 Basenpaare langen Abschnitts der 9p21.3-Region, wobei wie in den Ausgangsstudien SNPs als genetische Marker verwendet wurden. Im Gesamtprojekt wurden insgesamt 35 SNPs untersucht, die gemeinsam die genetische Variation in dem genannten Genomabschnitt weitgehend repräsentieren. Zu diesen 35 SNPs gehören rs1333040, rs7857345 und rs1333045, deren Assoziation mit dem Myokardinfarkt in dieser Arbeit festgestellt werden sollte. Eine Verbindung von rs1333040 mit dem Myokardinfarkt ist bereits gezeigt worden (Helgadottir et al., 2007), so dass mit der Verwendung dieses SNPs ein studienübergreifender Vergleich ermöglicht wurde. Die beiden anderen SNPs (rs7857345 und rs1333045) sind bisher noch nicht im Zusammenhang mit kardiovaskulären Krankheiten eingesetzt worden.

Die genetische Untersuchung erfolgte innerhalb einer Fall-Kontroll-Studie, in die 3657 Myokardinfarktpatienten und 1211 Kontrollpersonen mit angiographisch normalen Koronararterien eingeschlossen wurden. Beteiligte Zentren waren das Deutsche Herzzentrum München und die 1. Medizinische Klinik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München. Die allermeisten Studienteilnehmer stammten aus dem süddeutschen Raum, der eine genetisch relativ homogene Population aufweist, die für Mitteleuropa repräsentativ ist.

Zur Genotypbestimmung wurde genomische DNA, die aus den Leukozyten des peripheren Blutes gewonnen worden war, zur Verfügung gestellt. Die Zuordnung der

Genotypen zu den einzelnen Studienteilnehmern erfolgte mit dem auf der Polymerasekettenreaktion beruhenden TaqMan-Verfahren.

Die Bestimmungsarbeiten wurden ohne Kenntnis des Fall-oder Kontrollstatus der einzelnen DNA-Proben durchgeführt. Ein statistisch signifikanter Unterschied in der Häufigkeit der beiden Allele eines SNPs zwischen der Myokardinfarkt-und der Kontrollgruppe diente als Kriterium für eine bestehende Assoziation.

2 Methoden

2.1 Patienten und Kontrollpersonen

Dieser Fall-Kontroll-Studie liegt ein Kollektiv von 4.868 Personen zugrunde, die im Zeitraum von 1993 bis 2002 einer koronarangiographischen Untersuchung im Deutschen Herzzentrum München oder in der 1. Medizinischen Klinik, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München unterzogen worden waren. In die Patientengruppe wurden 3.657 Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt eingeschlossen. Die Kontrollgruppe bestand aus 1.211 Personen mit angiographisch normalen Koronararterien. Alle Patienten, die an der Studie teilgenommen haben, waren zuvor über die Studie aufgeklärt worden und hatten eine entsprechende Erklärung unterschrieben. Das Studienprotokoll stand im Einklang mit der Deklaration von Helsinki und wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der TUM genehmigt.

2.2 Definitionen

Als Kriterium für einen Myokardinfarkt galten Brustschmerzen mit einer Dauer von über 20 min kombiniert mit ST-Streckenerhöhungen oder pathologische Q-Zacken im Elektrokardiogramm (EKG). Zudem mussten sich in der Koronarangiographie entweder ein verschlossenes Gefäß und/oder in der Laevokardiographie regionale Wandbewegungsstörungen korrespondierend zu der elektrokardiographischen Infarktlokalisierung zeigen. Die Individuen aus der Kontrollgruppe hatten keine für einen Myokardinfarkt typischen Symptome, keinen Myokardinfarkt in der Vorgeschichte, wiesen keine Zeichen eines Myokardinfarktes im EKG und angiographisch normale Koronargefäße sowie keine regionalen Wandbewegungsstörungen in der Laevokardiographie auf. Die Patienten wurden als Diabetiker eingestuft, wenn sie insulinpflichtig waren oder orale Antidiabetika einnahmen. Basierend auf den Kriterien der World Health Organisation wurde diese Diagnose auch bei diätisch eingestellten Diabetikern bei pathologischem Glucosetoleranzwert gestellt und/oder wenn während des Klinikaufenthaltes erhöhte Werte für Nüchtern-Glukose in mindestens zwei Blutabnahmen festgestellt worden waren (World Health Organisation Study Group, 1985). Die Personen, die während der letzten sechs Monate rauchten, galten als Raucher. Eine arterielle Hypertonie

wurde bei systolischen Blutdruckwerten ≥ 140 mmHg und/oder diastolischen Blutdruckwerten ≥ 90 mmHg bei mindestens zwei separaten Messungen diagnostiziert oder bei einer bestehenden antihypertensiven Behandlung. Eine Hypercholesterinämie wurde bei Serumcholesterinkonzentrationen (nüchtern) ≥ 240 mg/dl oder bei Einnahme cholesterinsenkender Medikation angenommen

2.3 Geräte

PCR-Thermocycler:

- GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)
- GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)
- ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems)

Zentrifugen:

- Rotor A-2-MTP Centrifuge 5430 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Mixer:

- Vortexer (Genio2™ Bender&Obein AGV Zürich, Schweiz)

2.4 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

DNA-Isolierung:

- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland)
- High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)

PCR-Reaktionslösung:

- TaqMan Universal PCR Master Mix (Abgene und Applied Biosystems)

Primer und Sonden:

- Primer und Sonden für das TaqMan-Verfahren wurden von Applied Biosystems synthetisiert.

PCR-Gefäße:

- PCR Tubes, 2 ml ultradünn (Eppendorf)

- MicroAmp®Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems)

2.5 DNA-Isolierung

Zur Genotypbestimmung wurde DNA zur Verfügung gestellt. Die genomische DNA wurde mit Hilfe eines kommerziell erwerblichen Kits (QIAmp DNA Blood Mini Kit oder High Pure PCR Template Preparation Kit) aus Leukozyten von 200 µl peripheren Blutes gewonnen. Zunächst erfolgt die Lyse der Zellen, danach die Bindung der DNA an eine Silika-Gel-Membran. Es folgte ein mehrmaliges Reinigen der DNA von Blut- und Zellbestandteile und schließlich die Isolierung der reinen DNA. Die Lagerung der DNA-Proben erfolgte bei -25°C .

2.6 Das TaqMan-Verfahren

Zur Genotypisierung wurde das TaqMan-Verfahren eingesetzt. Das TaqMan-Verfahren als Methode zur Genotypisierung basiert auf einer Kombination aus der Polymerasekettenreaktion (PCR) und der 5' Nuklease-Reaktion (Livak, 1999). Das TaqMan-Verfahren bietet die Möglichkeit, die Amplifikation und die Genotypenbestimmung in einem Schritt durchzuführen. Der PCR-Prozess besteht aus einer Anzahl von 12-50 Zyklen, die in einem Thermocycler durchgeführt werden. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten. Mit Hilfe der PCR ist es möglich, einen bestimmten Abschnitt der DNA mit bekannter Basensequenz zu vervielfältigen (Amplifikation). Die PCR ist ein zyklisches Verfahren, bei dem sich während jedes Zyklus die Anzahl der DNA-Kopien verdoppelt. Dadurch kommt es im Verlauf der PCR zu einem exponentiellen Anstieg von Kopien. Zunächst werden die beiden Stränge der DNA durch Erhitzen auf 95°C getrennt („Denaturierung“). Im nächsten Schritt wird die Temperatur in dem PCR Gerät auf eine Temperatur heruntergefahren, bei der sich die vorher ausgewählten Primer spezifisch an die Enden des zu vervielfältigenden DNA-Segments, in diesem Fall an die Template-DNA, anlagern („Annealing“). Die Verlängerung der Primer katalysiert die Polymerase, wobei die in einem Puffer gelösten Nukleotide als Bausteine dienen („Elongation“). Die Abbildung 3 zeigt schematisch den PCR-Zyklus.

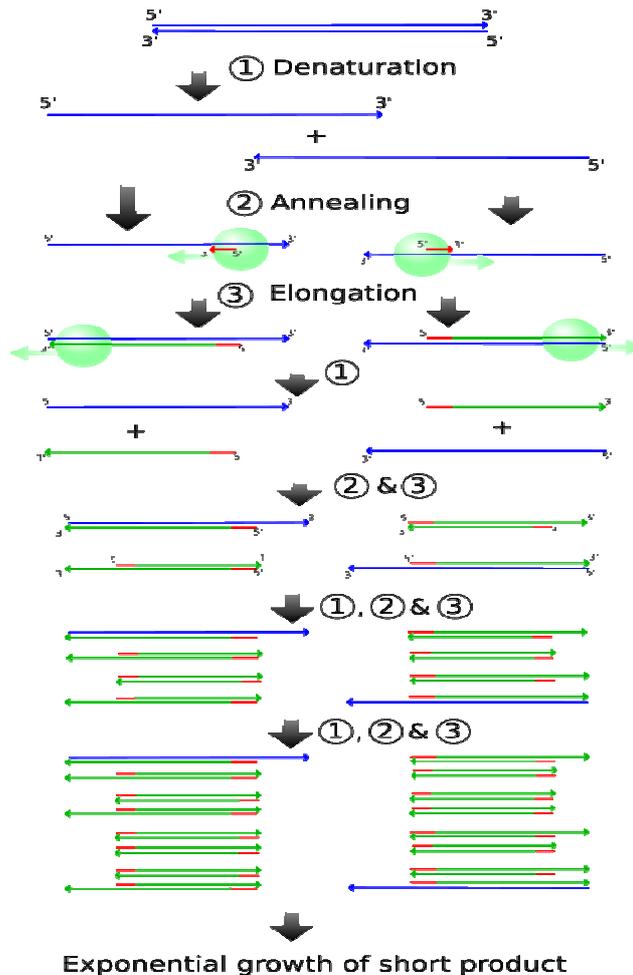


Abbildung 3: Schematische Darstellung des PCR-Zyklus
 (<http://de.wikipedia.org/wiki/Polymerase-Kettenreaktion> Stand:13.01.2010)

(1) Schmelzen (Denaturierung) bei ca. 95°C.

(2) Anlagerung (Primerhybridisierung=Primerannealing) bei ca. 68°C,

(3) Verlängerung (Elongation) bei ca. 72°C; (P=Polymerase).

Exponentielles Anwachsen des kurzen Produktes (von Primern eingeschlossener Bereich).

Für das TaqMan-Verfahren sind neben dem Primerpaar zwei für die beiden Allele spezifische fluorogene DNA-Sonden erforderlich. Die Sonden bestehen aus Oligonukleotiden, die zum jeweiligen DNA-Abschnitt um die polymorphe Stelle komplementär sind. Primer und Sonden wurden mit Hilfe der Primer-Express-Software (Version 2.0.0; Applied Biosystems) ermittelt. Die Sequenzen der Oligonukleotide wurden aus der Datenbank entnommen, die in der GenBank

niedergelegt sind. Die beiden Sonden sind mit verschiedenen, fluoreszierenden Farbstoffen markiert. Am 5'-Ende ist die Sonde mit dem fluoreszierendem Reporter-Farbstoff (R) FAM (6-Carboxyfluoreszein) oder VIC (Fluoreszenzfarbstoff der Firma Applied Biosystems) kovalent verbunden und am 3'-Ende mit dem nichtfluoreszierenden Quencher-Farbstoff (Q). In die verwendete Sonde ist ein „Minor Groove Binder“ (MGB) zwischen dem 3'-Ende der Sonde und dem Quencher-Farbstoff eingebaut. Dieses sichelförmige Molekül fügt sich bei Hybridisierung von Sonde und DNA-Matrize in die Furche der DNA-Doppelhelix ein und stabilisiert die Bindung. Die relative Nähe des Q zum R verringert die Aussendung des Fluoreszenzsignals. Die 5'→3' Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase schneidet und zerstört während der Erweiterungsphase die an den DNA-Strang hybridisierte komplementäre Sonde. Dieses Schneiden der fluorogenen Sonde führt zu einer räumlichen Trennung der beiden Farbstoffe R und Q und damit zu einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität des Reporterfarbstoffes (R). Die Fluoreszenz, die während jedem Zyklus freigesetzt wird, ist proportional zur Anzahl der in diesem Zyklus hergestellten Fragmente. Die Zuordnung der Einzelproben zu einem Genotyp erfolgte automatisch unter Verwendung der „Gene detection software“ des „ABI Prism 7000 Sequence Detection System“. Durch Auswertung der allelspezifischen Fluoreszenzsignale erfolgt die Zuordnung zum jeweiligen Genotyp, wobei die Fluoreszenzsignale der beiden homozygoten Genotypen anhand von Standards vorgegeben sind. Ein Anstieg des Fluoreszenzsignals nur eines Farbstoffes ist charakteristisch für den homozygoten Genotyp, ein Anstieg der Fluoreszenzsignale beider Farbstoffe ist kennzeichnend für den heterozygoten Genotyp. Die Abbildung 4 zeigt schematisch das TaqMan-Verfahren zur Genotypisierung. In der Tabelle 7 sind die Basensequenzen der verwendeten Primer und Sonden gezeigt.

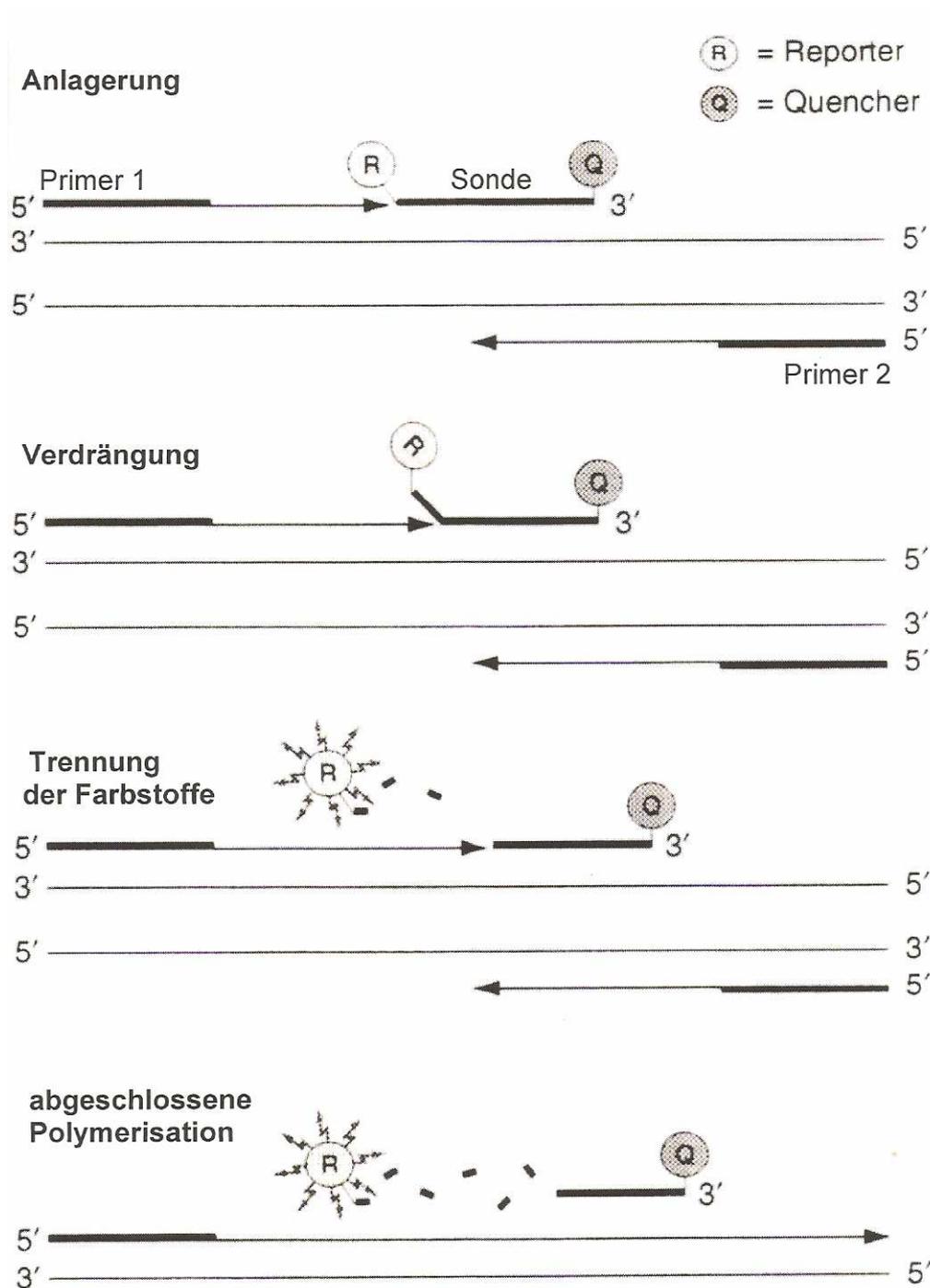


Abbildung 4: Taqman Assay zur Genotypisierung

Schematische Darstellung eines Zyklus des TaqMan-Verfahrens nach einer Abbildung im Protokoll für den „TaqMan Universal PCR Master Mix“ (Applied Biosystems)

2.7 Bestimmung der rs1333040 (T/C)-, rs7857345 (C/T)-und rs1333045 (C/T)-Genotypen mit dem TaqMan-Verfahren

Die TaqMan-Sonde ist so entwickelt, dass sie sich ideal zwischen den Primer 1 und Primer 2 der PCR anlagert. Die Primer und die markierten Sonden wurden mit Hilfe der Primer-Express-Software ausgewählt (Applied Biosystems, Darmstadt). Die Primer-Sequenzen und die Sequenzen der Sonden für die drei Polymorphismen sind in der Tabelle 7 dargestellt. Die Sonde für rs1333040T, für rs7857245C und für rs1333045C wurden mit dem Reporterfarbstoff FAM und die Sonde für rs1333040C, für rs7857245T und für rs1333045T mit dem Reporterfarbstoff VIC am 5`-Ende gekennzeichnet. Alle Sonden wurden am 3`-Ende mit dem Quencher-Farbstoff markiert.

Die TaqMan-Assays für die drei SNPs wurden jeweils mit dem in der Tabelle 5 und Tabelle 6 angegebenen Reaktionsmix durchgeführt. Von diesem Reaktionsmix, der sowohl die Primer als auch die Sonden beinhaltetete, wurden 20 µl in jede Vertiefung einer Mikrotiterplatte mit 96 Reaktionskammern gegeben. Anschließend wurde jeweils 2 µl gelöste DNA bzw. Wasser im Falle der Negativ-Kontrollen hinzugefügt. Die Anordnung der Proben auf der 96-Lochplatte war wie folgt: 90 Patientenproben mit unbekanntem Genotyp, jeweils 2 Standard-DNA-Proben für die jeweiligen homozygoten Träger des Allels sowie 2 Negativ-Kontrollen mit Wasser. Der TaqMan-Assay wurde ausgeführt mit 35 Zyklen Denaturierung bei 92°C für 15 Sekunden, die Primerhybridisierung und die Verlängerung bei 60°C für 1 min. Für die Reaktion wurden als Thermocycler „GeneAmp PCR System 9700“ oder „GeneAmp PCR System 9600“ benutzt. Nach dem Abschluss der PCR wurden die Proben im „ABI Prism 7000 Sequence Detection System“ (Applied Biosystems, Darmstadt) analysiert, in welchem die während der PCR akkumulierte Fluoreszenz gemessen und weiterverarbeitet wurde. Ein isolierter Signalanstieg von FAM oder VIC Fluoreszenz war charakteristisch für C- bzw. T-Allel-Homozygotie. Ein Anstieg der beiden Signale wies auf Heterozygotie der untersuchten DNA hin. Die Genotypisierung wurde durchgeführt, ohne die klinischen und die angiographischen Daten der Patienten zu kennen. Zur Kontrolle der Ergebnisse der Genotypisierung wurde bei 20 % der untersuchten Patienten eine unabhängige zweite Bestimmung des Genotyps durchgeführt, wobei DNA-Proben verwendet wurden, die getrennt von den in der ersten Bestimmung verwendeten DNA-Proben isoliert wurden.

Tabelle 5: Bestandteile des Reaktionsmixes für den rs1333040 T/C TaqMan-Assay

Bestandteile	Menge
H2O (deionisiert)	548 µl
Primer 1	25,5 µl
Primer 2	25,5 µl
FAM-arkierte Sonde	25,5 µl
VIC-markierte Sonde	25,5 µl
Universal Master Mix	850 µl

Tabelle 6: Bestandteile des Reaktionsmixes für den rs7857345 C/T TaqMan-Assay und für den rs1333045 C/T TaqMan-Assay

Bestandteile	Menge
H2O (deionisiert)	565 µl
Primer 1	25,5 µl
Primer 2	25,5 µl
FAM-markierte Sonde	17,0 µl
VIC-markierte Sonde	17,0 µl
Universal Master Mix	850 µl

Tabelle 7: Nukleotidsequenzen der Primer und Sonden für die rs1333040, rs7857345 und rs1333045 TaqMan-Assays.

Polymorphismus	Primer (5' → 3')
rs1333040 (T/C)	5'AGTGCCCACTTATGGAATGATTTC 3'
	5'ACCATATCTCATATCTGTACCTTCCTCTCT 3'
	TaqMan Sonden (5' → 3')
	FAM-CCCAGCGGTA <u>A</u> CAT
	VIC-CCCAGCGGTAG <u>C</u> CAT
rs7857345 (C/T)	Primer (5' → 3')
	5'ATGACATTGAACCATTGACTGAATCTAC 3'
	5'AGAGATGCATTTAGCATTGATTAGTTAGG 3'
	TaqMan Sonden (5' → 3')
	FAM-CTTGTAATAG <u>A</u> AAAACACAACATA
	VIC-ACTTGTAATA <u>A</u> AAAACACAACATA
rs1333045(C/T)	Primer (5' → 3')
	5'GTGAGGCCCAAGTGCAATAATATATAGT 3'
	5'GGCCTTGAATAAGCAAATCATAATT 3'
	TaqMan Sonden (5' → 3')
	FAM-CACTGTG <u>C</u> CTGGCAT
	VIC-ACTGTG <u>T</u> CTGGCATC

Die allelspezifischen Nukleotide sind unterstrichen.

2.8 Statistik

Diskrete Variablen wurden entweder als Zahl oder als Prozentanteil (%) angegeben und mittels Chi-Quadrat-Test oder Fischers-Exact-Test verglichen. Kontinuierliche Variablen wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung (\pm S.D.) angegeben und mittels dem nicht gepaarten, zweiseitigen t-Test oder mittels Varianzanalyse für mehr als zwei Gruppen verglichen. Es erfolgte die Prüfung, ob sich die Genotypverteilung in der Kontrollgruppe im Gleichgewicht (Hardy-Weinberg-Gesetz) befindet und damit derjenigen entspricht, die in einer stabilen homologen Population erwartet wird (Henning et al., 2002). Für die Risikoanalyse wurde jeweils die Odds Ratio und das 95 % Konfidenzintervall berechnet. Um feststellen zu können, ob eine Assoziation

zwischen den rs1333040 (T/C)-, des rs7857345 (C/T)-und des rs133045 (C/T)-Polymorphismus und dem Myokardinfarkt-Risiko unabhängig von anderen Faktoren bestand, wurde eine multivariate Analyse mit Berücksichtigung der folgenden möglichen beeinflussenden Faktoren durchgeführt: Alter, Geschlecht, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Rauchen und Hypercholesterinämie. Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm S-Plus, Version 4.0 Professional (Mathsoft, Inc., Seattle, Washington USA) durchgeführt. Ein P-Wert von $<0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Basale Charakteristika der Myokardinfarkt-Gruppe und der Kontrollgruppe

Das Risikoprofil der Patienten der Myokardinfarkt-Gruppe und der Kontrollgruppe sind in der Tabelle 8 dargestellt. Das Durchschnittsalter der Patienten in der Myokardinfarkt-Gruppe war 64,0+/-12.0, das Durchschnittsalter der Patienten in der Kontrollgruppe betrug 60,3+/-11.9. Somit war das Durchschnittsalter der Patienten in der Myokardinfarkt-Gruppe höher als in der Kontrollgruppe ($P < 0,0001$). Der Anteil an Frauen lag in der Myokardinfarkt-Gruppe bei 885 (24,2 %) und in der Kontrollgruppe bei 598 (49,4 %) Frauen. Somit war der Anteil an Frauen in der Myokardinfarkt-Gruppe kleiner als in der Kontrollgruppe ($P < 0,0001$). Es zeigte sich des Weiteren, dass die Patienten in der Myokardinfarkt-Gruppe häufiger Diabetes mellitus (5,4 % vs. 20,6 %; $P < 0,0001$), arterielle Hypertonie (48,6 % vs. 24,2 %; $P < 0,0001$) und Hypercholesterinämie (49,7 % vs. 56,5 %; $P < 0,0001$) im Vergleich zur Kontrollgruppe hatten. Ebenso war der Anteil an Rauchern (15,2 % vs. 50,6 %; $P < 0,0001$) in der Myokardinfarkt-Gruppe höher als in der Kontrollgruppe. Wie erwartet, waren somit die bekannten Risikofaktoren für eine koronare Herzerkrankung bzw. einen Myokardinfarkt in der Patientengruppe signifikant häufiger vorhanden als in der Kontrollgruppe.

Tabelle 8: Basale Charakteristika der Myokardinfarkt-Gruppe und der Kontrollgruppe

	MI-Gruppe n=3.657 (%)	Kontrollgruppe N=1.211 (%)
Alter	64,0+/-12,0	60,3+/-11,9
Frauen	885 (24,2 %)	598 (49,4 %)
Arterielle Hypertonie	2.246 (61,4 %)	589 (48,6 %)
Hypercholesterinämie	2.967 (56,5 %)	602 (49,7 %)
Zigarettenraucher	1.849 (50,6 %)	184 (15,2 %)
Diabetes mellitus	754 (20,6 %)	65 (5,4 %)

Alter als Mittelwert +/- SD („Standard deviation“), die anderen Variablen sind als Zahlen dargestellt (Prozent), „ $P > 0,0001$ für alle Vergleiche“; MI, Myokardinfarkt

3.2 Genotypverteilung der drei Polymorphismen in der Myokardinfarkt-Gruppe und der Kontrollgruppe

Die Ergebnisse der Genotypverteilung der drei untersuchten Polymorphismen sind in der Tabelle 9 dargestellt. Die Genotypverteilung entsprach dem Hardy-Weinberg-Gesetz.

Tabelle 9: Genotypverteilung der Polymorphismen in der Myokardinfarkt-Gruppe und der Kontrollgruppe

SNP	Genotyp	MI-Gruppe (n=3.657)	Kontrollgruppe (n=1.211)	*P _{HWE}
rs1333040	TT	1.396 (38,2 %)	335 (27,7 %)	0,20
	TC	1.714 (46,9 %)	625 (51,6 %)	
	CC	547 (15,0 %)	251 (20,7 %)	
rs7857345	CC	2.036 (55,7 %)	541 (44,7 %)	0,85
	CT	1.377 (37,7 %)	539 (44,5 %)	
	TT	244 (6,7 %)	131 (10,8 %)	
rs1333045	CT	1.142 (31,2 %)	273 (22,5 %)	0,79
	CC	1.827 (50,0 %)	599 (49,5 %)	
	TT	688 (18,8 %)	339 (28,0 %)	

*P_{HWE}, P-Wert für Hardy-Weinberg-Gleichgewicht in der Kontrollgruppe
MI, Myokardinfarkt

Der TT-Genotyp des SNP rs1333040 wurde bei 1.396 Patienten (38,2 %) der Myokardinfarkt-Gruppe nachgewiesen. In der Kontrollgruppe wurde der TT-Genotyp bei 335 Patienten (27,7 %) nachgewiesen. Der TC-Genotyp wurde bei 1.714 Patienten (46,9 %) der Myokardinfarkt-Gruppe nachgewiesen. In der Kontrollgruppe wurde der TC-Genotyp bei 625 Patienten (51,6 %) nachgewiesen. Der CC-Genotyp wurde bei 547 Patienten (15 %) der Myokardinfarkt-Gruppe nachgewiesen. Der CC-Genotyp wurde bei 251 Patienten (20,7 %) der Kontrollgruppe nachgewiesen. Zusammengefasst war die Häufigkeit des TT-Genotyps in der Myokardinfarkt-Gruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Dies deutet auf eine Assoziation des TT-Genotyps des SNP rs1333040 mit dem Myokardinfarkt-Risiko hin. Die Genotypverteilung ist in der Abbildung 5 dargestellt.

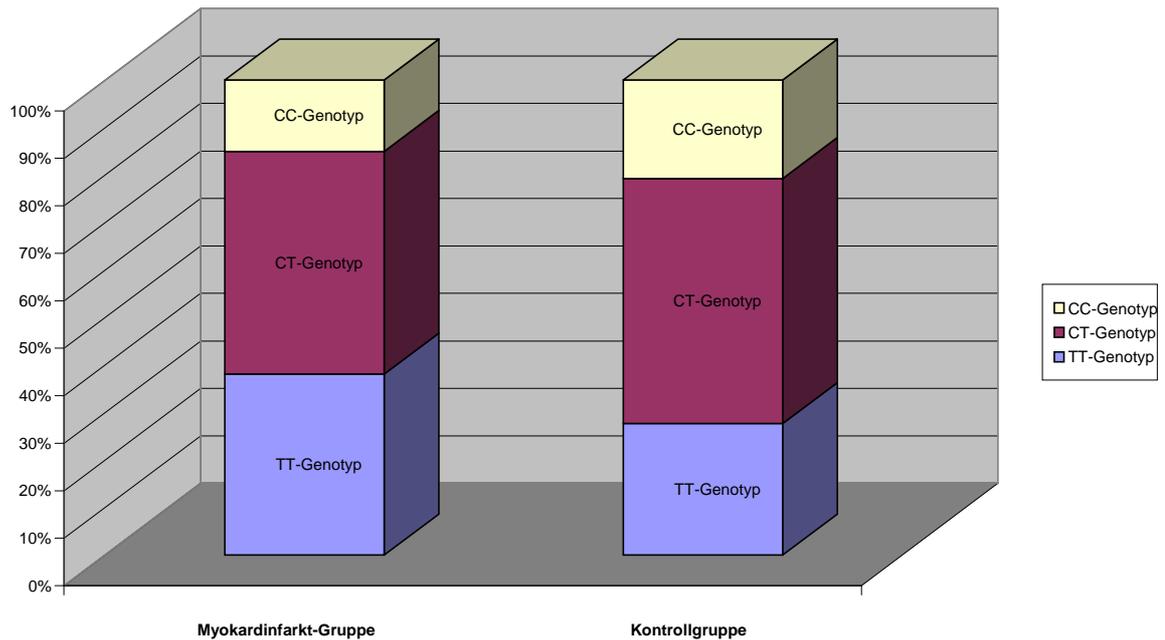


Abbildung 5: Genotypverteilung des rs1333040 (T/C) Polymorphismus in der Myokardinfarkt-Gruppe und der Kontrollgruppe

Der CC-Genotyp des SNP rs7857345 wurde bei 2036 Patienten (55,7 %) der Myokardinfarkt-Gruppe nachgewiesen. In der Kontroll-Gruppe wurde der CC-Genotyp bei 541 Patienten (44,7 %) nachgewiesen. Der CT-Genotyp wurde bei 1.377 Patienten (37,7 %) der Myokardinfarkt-Gruppe nachgewiesen. In der Kontrollgruppe wurde der CT-Genotyp bei 539 Patienten (44,5 %) nachgewiesen. Der TT-Genotyp wurde bei 244 Patienten (6,7 %) der Myokardinfarkt-Gruppe nachgewiesen. Der TT-Genotyp wurde bei 131 Patienten (10,8 %) der Kontrollgruppe nachgewiesen. Zusammengefasst war die Häufigkeit des CC-Genotyps unter den Myokardinfarkt-Gruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Dies deutet auf eine Assoziation des CC-Genotyps des SNP rs7857345 mit dem Myokardinfarkt-Risiko hin. Die Genotypverteilung ist in Abbildung 6 dargestellt

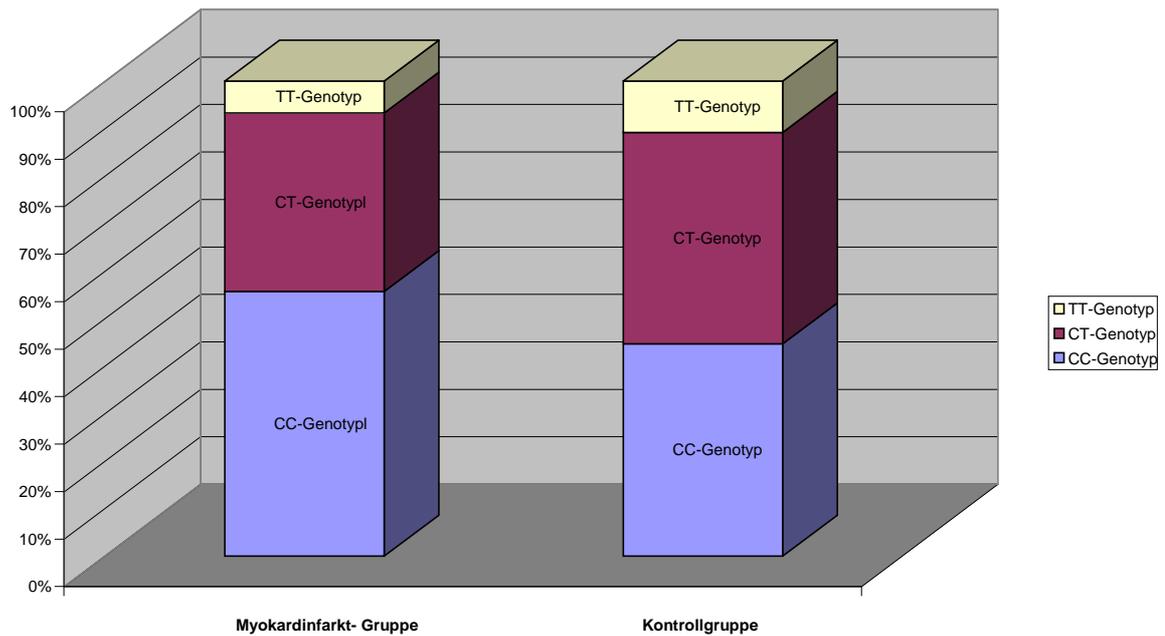


Abbildung 6: Genotypverteilung des rs7857345 (C/T) Polymorphismus in der Myokardinfarkt-Gruppe und der Kontrollgruppe

Der CC-Genotyp des SNP rs1333045 wurde bei 1.142 Patienten (31,2 %) der Myokardinfarkt-Gruppe nachgewiesen. In der Kontroll-Gruppe wurde der CC-Genotyp bei 273 Patienten (22,5 %) nachgewiesen. Der CT-Genotyp wurde bei 1.827 Patienten (50,0 %) der Myokardinfarkt-Gruppe nachgewiesen. In der Kontroll-Gruppe wurde der CT-Genotyp bei 599 Patienten (49,5 %) nachgewiesen. Der TT-Genotyp wurde bei 688 Patienten (18,8 %) der Myokardinfarkt-Gruppe nachgewiesen. Der TT-Genotyp wurde bei 339 Patienten (28,0 %) der Kontrollgruppe nachgewiesen. Zusammengefasst war die Häufigkeit des CC-Genotyps in der Myokardinfarkt-Gruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Dies deutet auf eine Assoziation des CC-Genotyps des SNP rs1333045 mit dem Myokardinfarkt-Risiko hin. Die Genotypverteilung ist in Abbildung 7 dargestellt.

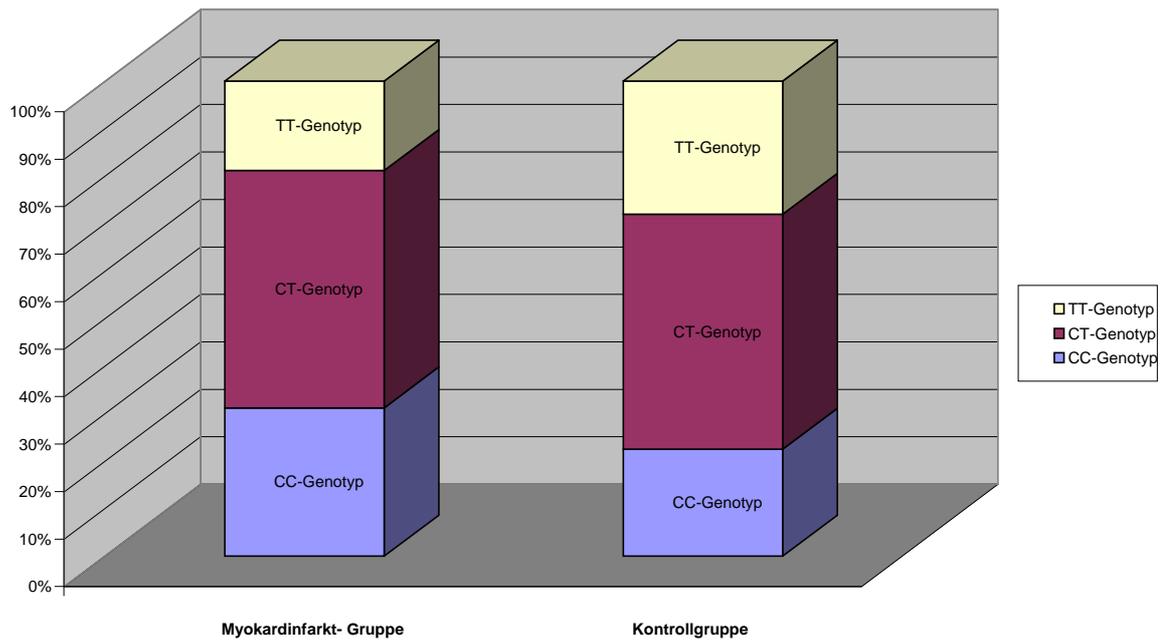


Abbildung 7: Genotypverteilung des rs1333045 (C/T) Polymorphismus in der Myokardinfarkt-Gruppe und der Kontrollgruppe

3.3 Allelfrequenzen der drei Polymorphismen in der Myokardinfarkt-Gruppe und der Kontrollgruppe

Die Ergebnisse der Allelverteilung der drei untersuchten Polymorphismen sind in Tabelle 10 dargestellt. Die Allelverteilung entsprach dem Hardy-Weinberg-Gesetz.

Tabelle 10: Allelfrequenzen der drei untersuchten Polymorphismen in der Myokardinfarkt-Gruppe und der Kontrollgruppe

SNP	MI-Gruppe (n=3.657 Allele)		Kontrollgruppe (n=1.211 Allele)		P
rs1333040	T-Allel 4.506 (61,6)	C-Allel 2.808 (38,4)	T-Allel 1.296 (53,5)	C-Allel 1.127 (46,5)	T-Allel P1
rs7857345	C-Allel 5.449 (74,5)	T-Allel 1.865 (25,5)	C-Allel 1.621 (66,9)	T-Allel 801 (33,1)	C-Allel P2
rs1333045	C-Allel 4.111 (56,2)	T-Allel 3.203 (43,8)	C-Allel 1.143 (47,3)	T-Allel 1.277 (52,7)	C-Allel P3

**P_{HWE}, P-Wert für Hardy-Weinberg-Gleichgewicht in der Kontrollgruppe
Die Variablen sind als absolute und in Klammern als relative Zahlen angegeben.
MI, Myokardinfarkt
P1: $1,5 \times 10^{-12}$, P2: $4,4 \times 10^{-13}$, P3: $2,1 \times 10^{-14}$*

Das T-Allel des SNP rs1333040 zeigte in der Myokardinfarkt-Gruppe eine Häufigkeit von 4.506 (61,6 %). In der Kontrollgruppe lag die Häufigkeit des T-Allels bei 1.295 (53,5 %). Die Häufigkeit des C-Allels lag in der Myokardinfarktgruppe bei 2.808 (38,4 %) und in der Kontrollgruppe bei 1.127 (46,5 %). Der P-Wert lag bei $1,5 \times 10^{-12}$. Die Häufigkeit des T-Allels in der Myokardinfarkt-Gruppe war signifikant höher als in der Kontrollgruppe und stellte somit das Risikoallel dar.

Das C-Allel des SNP rs7857345 zeigte in der Myokardinfarkt-Gruppe eine Häufigkeit von 5.449 (74,5 %). In der Kontrollgruppe lag die Häufigkeit des C-Allels bei 1.621 (66,9 %). Die Häufigkeit des T-Allels lag in der Myokardinfarktgruppe bei 1.865 (25,5 %) und in der Kontrollgruppe bei 801 (33,1 %). Der P-Wert lag bei $4,4 \times 10^{-13}$. Die Häufigkeit des C-Allels in der Myokardinfarkt-Gruppe war signifikant höher als in der Kontrollgruppe und stellte somit das Risikoallel dar.

Das C-Allel des SNP rs1333045 zeigte in der Myokardinfarkt-Gruppe eine Häufigkeit von 4.111 (56,2 %). In der Kontrollgruppe lag die Häufigkeit des C-Allels bei 1.143 (47,3 %). Die Häufigkeit des T-Allels lag in der Myokardinfarktgruppe bei 3.203 (43,8 %) und in der Kontrollgruppe bei 1.277 (52,7 %). Der P-Wert lag bei $2,1 \times 10^{-14}$.

Die Häufigkeit des C-Allels in der Myokardinfarkt-Gruppe war signifikant höher als in der Kontrollgruppe und stellte somit das Risikoallel dar.

3.4 Multiple logistische Regressionsanalyse

Um feststellen zu können, ob eine Assoziation zwischen den SNPs rs1333040 (T/C), rs7857345 (C/T), rs1333045 (C/T) und dem Myokardinfarkt-Risiko unabhängig von den bekannten Kofaktoren bestand, wurde eine multivariate Analyse mit Berücksichtigung der folgenden Faktoren durchgeführt: Alter, Geschlecht, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie und aktives Rauchen. Auch in der multivariaten Analyse zeigte sich eine signifikante Assoziation des rs7857345 C-Allels für den Myokardinfarkt-Risiko ($P < 0,0001$, OR = 1,53 (95 % KI 1,36-1,72)). D.h. nach Adjustierung für die Kofaktoren erhöht ein C-Allel das Risiko für den Myokardinfarkt um 53 %. Die Multivarianzanalyse zeigte auch für die beiden anderen SNPs eine hochsignifikante Assoziation für den Myokardinfarkt nach Adjustierung für die Kofaktoren.

3.5 Haplotypenfrequenzen der SNPs rs1333040 (T/C), rs7857345 (C/T) und rs1333045 (C/T) auf Chromosom 9p21.3

Die Haplotypenfrequenzen der Kontrollgruppe und der Myokardinfarktgruppe sind in Tabelle 11 dargestellt. Es zeigte sich, dass die Verteilung der Haplotypenfrequenzen zwischen den beiden Gruppen bezüglich der drei Haplotypen (TCC, CTT und TTT) einen signifikanten Unterschied zeigen. Der TTT-Haplotyp kommt relativ selten vor. Auf Grund der geringen Häufigkeit ($< 1\%$) kann keine zuverlässige Aussage zur Assoziation dieses Haplotyps gemacht werden. Die Haplotypen TCC und CTT zeigten eine hohe statistisch signifikante Assoziation mit dem Myokardinfarkt-Risiko. Diese beiden assoziierten Haplotypen sind in allen drei Allelen zueinander komplementär. In der Myokardinfarkt-Gruppe zeigten 3.661 (50,1 %) Patienten den TCC-Haplotyp. In der Kontrollgruppe zeigten 987 (40,8 %) Patienten den TCC-Haplotyp. Der TCC-Haplotyp war somit in der Myokardinfarktgruppe signifikant häufiger vorhanden als in der Kontrollgruppe ($p < 0,0001$). Es errechnete sich eine Odds ratio von 1,46 (95 % KI). Das Risiko, bei Anwesenheit dieses Haplotyps einen Myokardinfarkt zu erleiden, ist somit auf 46 % im Vergleich mit den übrigen Haplotypen erhöht. In der Myokardinfarktgruppe hatten 1.787 (24,4 %) Patienten den

CTT-Haplotyp, während 767 (31,7 %) Personen in der Kontrollgruppe den CTT-Haplotyp aufwiesen. Es errechnet sich ein Odds ratio von 0,70 (95 % KI). Bei Anwesenheit dieses Haplotyps reduziert sich das Risiko eines Herzinfarktes um 30 % im Vergleich mit den übrigen Haplotypen. Die Anwesenheit des CTT-Haplotyp ist somit assoziiert mit einem um 30 % reduzierten Risiko eines Herzinfarktes im Vergleich mit den übrigen Haplotypen. Zusammengefasst kann damit gesagt werden, dass die Anwesenheit des Haplotyps TCC ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Myokardinfarktes darstellt, während die Anwesenheit des Haplotyps CTT einen protektiven Faktor darstellt.

Tabelle 11: Haplotypenfrequenzen der Polymorphismen rs1333040, rs7857345 und rs1333045 auf Chromosom 9p21.3

Haplotyp	Myokardinfarkt-Gruppe N=7.314 Haplotypen	Kontrollgruppe N=2.422 Haplotypen	OR (95 %KI)	P
TCC	3661 (50,1)	987 (40,8)	1,46 (1,33-2,60)	>0,0001
CTT	1787 (24,4)	767 (31,7)	0,70 (0,63-0,77)	>0,0001
TCT	817 (11,2)	288 (11,9)	0,93 (0,81-1,07)	0,33
CCT	571 (7,8)	202 (8,3)	0,93 (0,79-1,10)	0,40
CCC	400 (5,47)	144 (5,9)	0,92 (0,75-1,11)	0,38
CTC	50 (0,68)	14 (0,58)	1,18 (0,65-2,15)	0,58
TTT	28 (0,38)	20 (0,83)	0,46 (0,26-0,82)	0,007
TTC	0	0		

Die Variablen sind als absolute und in Klammern als relative Zahlen angegeben.

4 Diskussion

Die vorliegende Doktorarbeit war Teil eines Projektes, in dem 35 SNPs auf Chromosom 9p21.3 auf eine mögliche Assoziation mit dem Auftreten eines Myokardinfarktes untersucht wurden. Die Publikation dieses Projektes ist in Vorbereitung. Das Studienkollektiv bestand aus 3.657 Myokardinfarktpatienten und 1.211 Kontrollpersonen. Es erfolgte eine Genotypisierung für 35 verschiedene Einzelnukleotid-Polymorphismen, wobei drei von diesen Einzelnukleotid-Polymorphismen in dieser Arbeit behandelt wurden. Dabei zeigte sich, dass Träger der rs13330040T-Allels, Träger des rs7857345C-Allels und Träger des rs1333045C-Allels ein statistisch signifikant höheres Risiko für das Auftreten eines Myokardinfarktes haben als Individuen ohne diese Risiko-Allele.

Bei drei in dieser Studie untersuchten Polymorphismen konnte gezeigt werden, dass der Einfluss dieser Polymorphismen bezüglich der Entwicklung eines Myokardinfarktes unabhängig vom Vorhandensein der etablierten Risikofaktoren, wie Rauchen, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, Alter, arterielle Hypertonie und Geschlecht, ist. Diese Ergebnisse stimmen mit anderen durchgeführten Studien überein, die ebenfalls den Einfluss des 9p21.3 Locus auf die koronare Herzerkrankung oder den Myokardinfarkt unabhängig von den etablierten Risikofaktoren gezeigt haben (Samani et al., 2008; Schunkert et al., 2008, Broadbent et al., 2008).

Es zeigte sich des Weiteren, dass der Haplotyp TCC der SNPs rs1333040, rs7857345, rs1333045 signifikant häufiger vorhanden war bei Patienten mit Myokardinfarkt als bei der Kontrollgruppe. Die Odds ratio betrug 1,46. Dies bedeutet, dass das Risiko für einen Myokardinfarkt bei Individuen mit dem Risiko-Haplotyp um 46 % höher ist. Der komplementäre Haplotyp CTT war dagegen signifikant häufiger in der Kontrollgruppe vorhanden als bei Patienten mit Myokardinfarkt. Die Odds ratio betrug 0,70 und somit ist das Risiko für einen Myokardinfarkt um 30 % geringer bei Vorhandensein dieses Haplotyps. Zusammengefasst kann damit gesagt werden, dass die Anwesenheit des Haplotyp TCC ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Myokardinfarktes darstellt, während die Anwesenheit des Haplotyp CTT einen protektiven Faktor darstellt.

4.1 Die Einflüsse der Polymorphismen auf Chromosom 9p21.3 auf den Myokardinfarkt und der koronaren Herzerkrankung: Darstellung bisheriger Publikationen

Grundlage der vorliegenden Arbeit waren die im Jahre 2007 durchgeführten genomweiten Studien zu Chromosom 9 (Helgadottir et al., 2007; McPherson et al., 2007), die unabhängig voneinander eine Assoziation bestimmter SNPs auf Chromosom 9 mit dem Risiko eines Myokardinfarktes gezeigt haben. Einige Zeit später wurde dieser Risiko-Lokus auf Chromosom 9 in zwei weiteren genomweiten Assoziationsstudien (Wellcome Trust Case Consortium, 2007; Samani et al., 2007) ebenfalls als Risikofaktor für einen Myokardinfarkt identifiziert. Die Studienpopulationen bestanden aus kaukasischen Kohorten (Helgadottir et al., 2007; McPherson et al., 2007; Samani et al., 2007; Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007).

Helgadottir et al., 2007 entdeckte in einer isländischen Population eine Assoziation zwischen dem Myokardinfarkt und zwei SNPs (rs2383207 und rs10757278), welche sich in der gleichen 9p21.3 Region befanden. Sie führten dabei eine genomweite Assoziationsstudie in einer isländischen Population durch. Es wurden 30.5953 SNPs auf die Assoziation eines Myokardinfarktes in einer Gruppe von 1.607 Fällen und 6.728 Kontrollen untersucht. Die Fälle wiesen einen Myokardinfarkt vor dem 70. Lebensjahr (Männer) und vor dem 75. Lebensjahr (Frauen) auf. Drei SNPs, rs1333040, rs2383207 und rs10116277, zeigten eine starke Assoziation mit dem Auftreten eines Myokardinfarktes (Odds ratio=1,22). Dieses Ergebnis wurde in vier weiteren kaukasischen Kohorten repliziert. Das G-Allel des SNP rs2383027 zeigte die stärkste Assoziation mit einer Odds ratio von 1,25 mit dem Auftreten des Myokardinfarktes. Die SNPs rs10116277 und rs1333040 zeigten eine hohe Korrelation mit dem rs2383027, jedoch konnten ihre Auswirkungen nicht zuverlässig voneinander unterschieden werden. Zusätzlich wurden weitere SNPs, welche eine wesentliche Korrelation mit dem rs2383027 aufwiesen, identifiziert. Acht SNPs wurden dabei genotypisiert. Es zeigte sich, dass der SNP rs10757278 die stärkste Assoziation mit dem Auftreten eines Herzinfarktes aufwies (Odds ratio=1,28). Die Odds ratio für heterozygote Träger des Risikoallels rs10757278G lag bei 1,26 und das Odds ratio für homozygote Träger lag bei 1,64. Des Weiteren konnte eine

Risikoerhöhung mit dem Auftreten eines frühen Myokardinfarktes gezeigt werden. Bei Männern, welche vor dem 50. Lebensjahr einen Myokardinfarkt erlitten hatten, und bei Frauen, die vor ihrem 60. Lebensjahr einen Myokardinfarkt erlitten hatten, zeigte sich ein Anstieg der Odds ratio auf 1,49 für heterozygote Träger und auf 2,02 für homozygote Träger des Risikoallels rs10757278G.

McPherson et al., 2007 identifizierte in einer genomweiten Assoziationsstudie mit 100.000 SNPs zwei SNPs auf Chromosom 9p21.3 (rs10757274 und rs2383206), welche 20 kb voneinander entfernt auf Chromosom 9p21.3 lokalisiert waren. Diese waren mit dem Auftreten der koronaren Herzerkrankung in einer kanadischen Population assoziiert. Um falsch positive Assoziationen zu minimieren, wurden die Analysen mit insgesamt sechs verschiedenen kaukasischen Kohorten durchgeführt. Dabei waren die Fälle und Kontrollen kaukasische Frauen und Männer aus Ottawa, Kanada, welche in der Ottawa Heart Studie (OHS) teilgenommen hatten. Die Fälle hatten eine schwere vorzeitige koronare Herzerkrankung, welche vor dem 60. Lebensjahr aufgetreten war. Ausgeschlossen wurden Patienten mit Faktoren, die eine stark erhöhte Anfälligkeit für die Ausbildung einer vorzeitigen koronaren Herzerkrankung aufwiesen. Diese Faktoren beinhalteten Diabetes mellitus und eine reine Hypercholesterinämie (>280 mg/dL). Die Kontrollen waren gesunde kaukasische Frauen (>70 Jahre) und Männer (>65 Jahre) aus Ottawa, welche keine Symptome oder eine positive Anamnese bezüglich der koronaren Herzerkrankung aufwiesen. In der Ottawa Heart Studie-1 (OHS-1) wurden 100.000 SNPs bei 322 Fällen und 312 Kontrollen untersucht. Von diesen 100.000 SNPs zeigten 2.586 SNPs eine Assoziation mit dem Auftreten einer koronaren Herzerkrankung. Diese 2.586 SNPs wurden in einer zweiten Studie, Ottawa Heart Studie-2 (OHS-2), erneut auf eine Assoziation mit der koronaren Herzerkrankung untersucht. In der OHS-2-Studie wurden 311 Fälle und 326 Kontrollen einbezogen, ansonsten galten die gleichen Kriterien wie in der OHS-1-Studie. Von diesen 2.586 SNPs konnte in der OHS-2-Studie bei 50 SNPs eine Assoziation mit dem Auftreten einer koronaren Herzerkrankung gezeigt werden. Diese 50 SNPs wurden einer erneuten Untersuchung in einer kaukasischen Population unterzogen. Um falsch-positive Assoziationen infolge einer unzureichenden statistischen Aussagekraft zu begrenzen, wurden diese in einer größeren prospektiven Studie der Atherosclerosis Risk in Communities-Studie (ARIC-Studie) durchgeführt, in welche 1.1478

kaukasische Personen eingeschlossen waren. Von diesen 50 SNPs zeigten lediglich zwei SNPs eine Assoziation mit der koronaren Herzerkrankung. Es handelte sich bei diesen zwei SNPs um den SNP rs10757274 und den SNP rs2383206, welche 20 kb voneinander entfernt auf Chromosom 9p21.3 lokalisiert sind. Schließlich wurden diese zwei SNPs erneut in drei verschiedenen voneinander unabhängigen Kohorten, der Copenhagen City Heart Study (CCHS), der Dallas Heart Study (DHS) und der Ottawa-Heart Study-3 (OHS-3) überprüft. Alle drei Studien zeigten eine hochsignifikante Assoziation dieser beiden SNPs mit dem Auftreten einer koronaren Herzerkrankung. Der Mechanismus, weshalb diese beiden SNPs das Risiko für das Auftreten einer koronaren Herzerkrankung erhöhen, ist nicht bekannt. Anzumerken ist, dass diese beiden SNPs nicht mit den bekannten Risikofaktoren der koronaren Herzerkrankung assoziiert sind (Mc Pherson et al., 2007). Auch in unserer Arbeit konnte gezeigt werden, dass die in unserer Studie untersuchten SNPs nicht mit den bekannten Risikofaktoren der koronaren Herzerkrankung assoziiert sind. Es zeigte sich, dass die G-Allele der beiden SNPs, rs10757274 und rs2383206, das Risiko für das Auftreten einer koronaren Herzerkrankung um 15 bis 20 % bei den heterozygoten Trägern und eine Erhöhung um 30 bis 40 % bei den homozygoten Trägern bewirken. Um den Locus auf Chromosom 9p21.3, welcher mit dem Auftreten der koronaren Herzerkrankung assoziiert war, genauer zu untersuchen, erfolgte eine weitere Studie. Dabei wurden nun SNPs in 5 kb Intervallen entlang dieser Region, die sich jeweils 175 kb aufwärts und abwärts von rs2383206 und rs10757274 erstreckte, bei 500 Kontrollen und 500 Patienten der OHS-2-Studie und OHS-3-Studie untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass 8 SNPs, welche eine Region von 58 kb umspannten, mit der koronaren Herzerkrankung signifikant assoziiert waren. Diese Region erstreckte sich von kb 22,062,301 bis kb 22,120,389 des Chromosoms 9p21.3. Die Region, die von diesen acht SNPs markiert wurde, war flankiert an beiden Seiten durch jeweils zwei Regionen, die eine Länge von 50 kb aufwiesen. Erstaunlicherweise zeigte keiner der 30 getesteten SNPs in dieser Region eine Assoziation mit dem Auftreten einer koronaren Herzerkrankung. Diese Daten konnten somit zeigen, dass der Risiko-Locus auf Chromosom 9p21.3 eine Spannweite von 58 kb umfasst.

Der gleiche Genlocus wurde ebenfalls bei einer britischen Population identifiziert (Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007). Dabei wurde eine Assoziation des SNP rs1333049C mit dem Auftreten einer koronaren Herzerkrankung gezeigt. Dieses Ergebnis wurde in einer deutschen Population repliziert (Samani et al., 2007).

Um die Rolle der genetischen Varianten in der Region auf Chromosom 9p21.3 bezüglich ihres Einflusses zur koronaren Herzerkrankung zu verdeutlichen und einen Beweis zu liefern, führte Schunkert et al. 2008 eine Genotypisierung des SNP rs1333049 in sieben Fall-Kontroll-Studien (4.645 Patienten und 5.177 Kontrollen) durch. Schließlich wurde zusätzlich eine Metaanalyse mit den vorhandenen Daten und vorherigen veröffentlichten Daten (Helgadottir et al., 2007; McPherson et al., 2007; Samani et al., 2007; Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007) durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass der Risikogenotyp des SNP rs1333049 in jeder Studie übereinstimmend mit dem Auftreten einer koronaren Herzerkrankung assoziiert war. Die Odds ratio betrug 1,29 pro Kopie des Risikogenotyps. Es wurde keine Interaktion dieses SNPs mit den aktuell bekannten traditionellen Risikofaktoren beobachtet (männliches Geschlecht, Alter, Body-maß-Index > 30 kg/m², Rauchen, arterielle Hypertonie und Hyperlipidämie). Die anschließend durchgeführte Metaanalyse von rs1333049 in 12.004 Fällen und 28.949 Kontrollen konnte ebenso den Hinweis für die Assoziation dieses SNP mit dem Myokardinfarkt und der koronaren Herzerkrankung zeigen, die errechnete Odds ratio betrug 1,24 pro Risikoallel.

Es gibt weitere Studien, die eine Assoziation der SNPs auf Chromosom 9p21 mit der koronaren Herzerkrankung bzw. des Myokardinfarktes untersuchten. In einer italienischen Population konnte eine Assoziation der SNPs rs10757274, rs2383206, rs2383027 und rs10757278 mit dem Auftreten eines Myokardinfarktes gezeigt werden (Shen et al., 2007). In einer japanischen und einer koreanischen Untersuchung fand sich eine Assoziation des SNPs rs1333049 mit dem Auftreten einer koronaren Herzerkrankung (Hinohara et al., 2008). Weitere Bestätigungsstudien wurden in einer südkoreanischen Untersuchung für die koronare Herzerkrankung durchgeführt (Shen et al., 2008) und für den Myokardinfarkt in einer japanischen Untersuchung (Hiura et al., 2008). Shen et al., 2008 untersuchten die SNPs rs10757274, rs2383206, rs2383027 und rs10757278 und Hiura et al., 2008

untersuchten die SNPs rs1333049 und rs17465637. Auch in diesen beiden Studien ergab sich eine positive Assoziation der untersuchten SNPs mit dem Entstehen einer koronaren Herzerkrankung bzw. des Myokardinfarkts.

Zusammenfassend ergibt sich aus diesen Studien, dass diese Gen-Region auf Chromosom 9p21.3 eine Assoziation mit dem Auftreten eines Myokardinfarktes zeigt. Hervorzuheben ist, dass in unserer Studie sowohl bei der Myokardinfarkt-Gruppe als auch bei der Kontrollgruppe eine Koronarangiographie durchgeführt wurde, d.h. der Phänotyp konnte somit eindeutig bestimmt werden. Alle anderen bisher durchgeführten Assoziationsstudien auf Chromosom 9p21.3 (Helgadottir et al., 2007; Mc Pherson et al., 2007; Welcome Trust Case Control Consortium, 2007; Samani et al., 2007) haben auf eine Kontrollpopulation aus der Allgemeinbevölkerung zurückgegriffen, bei der keine Koronarangiographie durchgeführt wurde, so dass der Phänotyp nicht eindeutig bestimmt war.

4.2 Die Einflüsse der Polymorphismen auf Chromosom 9p21.3 auf den Diabetes mellitus: Darstellung bisheriger Publikationen

Drei Studien identifizierten im Jahre 2007 eine Assoziation des T-Allels des rs10811661 SNP auf Chromosom 9p21.3 mit dem Diabetes mellitus Typ II (Zeggini et al., 2007, Scott et al., 2007, Saxena et al., 2007). Helgadottir et al., 2008 konnten die Assoziation des T-Allels des rs10811661 auf Chromosom 9p21.3 mit dem Diabetes mellitus Typ II replizieren. Helgadottir et al., 2007 identifizierten eine Assoziation das G-Allels des SNP rs10757278 auf Chromosom 9p21.3 mit der koronaren Herzerkrankung. Wie in Kapitel 4.1 bereits genannt, waren annähernd 21 % der europäischen Individuen homozygot bezüglich des rs10757278G und es konnte herausgefunden werden, dass deren Risiko um 1,64 höher war, einen Herzinfarkt zu erleiden, als bei den Individuen, die keine Träger dieses Allels waren. Diese beiden SNPs, rs10811661 und rs10757278, sind voneinander durch fast 9.600 Basenpaare getrennt, die jeweils mit *CDKN2A* und *CDKN2B* benachbart sind. Bekanntlich stellt der Diabetes mellitus Typ II einen Risikofaktor für die koronare Herzerkrankung und im Allgemeinen der Atherosklerose dar. Aufgrund der Nähe dieser beiden Polymorphismen könnte es sein, dass die Region auf Chromosom 9p21.3 durch ein geteilten biologischen Mechanismus zum Diabetes mellitus Typ II und der koronaren Herzerkrankung prädisponiert (Samani et al., 2007).

4.3 Assoziationen der Polymorphismen auf Chromosom 9p21.3 mit der Atherosklerose der Carotiden, der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit, dem abdominellen Aortenaneurysma und den intracraniellen Aneurysmata: Darstellung bisheriger Publikationen

Die Gruppe von Helgadottir et al., 2008 genotypisierte die SNPs rs10811661 und rs10757278 bei Individuen, die andere vaskuläre Erkrankungen wie die Atherosklerose der Carotiden, die periphere arterielle Verschlusskrankheit, das abdominelle Aortenaneurysma und intracranielle Aneurysmata aufwiesen. Es konnte keine Assoziation des rs10811661T mit den vier oben angegebenen arteriellen Erkrankungen gefunden werden. Es konnte eine signifikante Assoziation des SNP rs10757278G mit dem Auftreten von intracraniellen Aneurysmata, mit dem abdominellen Aortenaneurysma, der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit und der Atherosklerose der Carotiden festgestellt werden. Am stärksten war die Assoziation für das abdominelle Aorteneurysma ($OR=1,31$, $p=1,2 \times 10^{-12}$) und für die intracraniellen Aneurysmata ($OR=1,29$, $p=2,5 \times 10^{-6}$). Aufgrund der starken Komorbidität zwischen der koronaren Herzerkrankung und dem abdominellen Aortenaneurysma wurde eine Replikationsstudie durchgeführt ohne die Fälle, welche eine koronare Herzerkrankung als Zweiterkrankung zum abdominellen Aortenaneurysma aufwiesen. Auch dann war der Effekt des rs10757278G auf das abdominelle Aortenaneurysma nur gering kleiner. Dies impliziert, dass die Assoziation des abdominellen Aortenaneurysmas keine Konsequenz der Assoziation des rs10757278G mit der koronaren Herzerkrankung darstellt. Bezüglich der intracraniellen Aneurysmata gibt es in der aktuellen Literatur keine Annahme, dass eine Assoziation bzw. Komorbidität mit der koronaren Herzerkrankung besteht, so dass in diesem Fall auf eine Replikationsstudie unter Ausschluss der Individuen mit einer koronaren Herzerkrankung als Komorbidität verzichtet wurde. Bei der Untersuchung der Gruppe mit der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit und der Gruppe mit der Atherosklerose der Carotiden konnte in der Replikationsstudie mit Ausschluss der Individuen mit einer koronaren Herzerkrankung als Komorbidität eine deutlich geringere Assoziation dieses Polymorphismus gefunden werden. Dies war insbesondere bei der peripheren arteriellen Erkrankung am deutlichsten. Es konnte somit gezeigt werden, dass der Effekt des rs10757278G auf die zwei durch Aneurysmata bedingten Erkrankungen, dem abdominellen Bauchaortenaneurysma

und dem intracraniellen Aneurysmata, vergleichbar ist mit dem Effekt auf die koronare Herzerkrankung und dass dieser Polymorphismus nur einen vernachlässigbaren Effekt auf die periphere arterielle Verschlusskrankheit und der Atherosklerose der Carotiden zeigt. Somit könnte es sein, dass diese Variante auf dem Chromosom 9p21.3 eine Rolle in einem pathophysiologischen Bestandteil spielt, der für diese Erkrankungen des arteriellen Systems (arterieller Phänotypen) gleich ist. Dieses kann das anormale Gefäß-„Remodelling“ und/oder die -Reparatur mit einbeziehen, die als Schlüssel in der Pathogenese der koronaren Herzerkrankung identifiziert worden sind (Chatzizisis et al., 2007; Hashimoto et al., 2006; Moore et al., 1994). Diese Resultate stützen zusätzlich die Annahme, dass die Sequenzvariante rs10757278G eine Rolle spielt, die durch die abnorme Gefäßumgestaltung gekennzeichnet ist. Obgleich genetische Faktoren eine wichtige Rolle in der Ätiologie des abdominellen Aortenaneurysmas und der intracraniellen Aneurysmata haben (Schievink et al., 1997; Lederle et al., 2001; Lederle et al., 2000), zeigen die in dieser Studie veröffentlichten Resultate erstmals die Assoziation dieser Sequenz auf Chromosom 9p21.3 mit dem abdominellen Aortenaneurysma und mit dem intracraniellen Aneurysmata. Das zuschreibbare Risiko unter den Individuen europäischer Herkunft wird sowohl für das abdominelle Aortenaneurysma als auch für intrakranielle Aneurysmata auf 26 % geschätzt.

4.4 Assoziation der Polymorphismen auf Chromosom 9p21.3 mit dem Schlaganfall: Darstellung bisheriger Studien

Die koronare Herzerkrankung steigert das Risiko eines Schlaganfalls, und der Schlaganfall ist assoziiert mit einem großen Anstieg des Risikos der Mortalität nach einem Myokardinfarkt. Des Weiteren sind die Risikofaktoren beider Erkrankungen identisch (Witt et al., 2005). Aus diesem Grund stellten sich Matarin et al., 2008 die Frage, ob der *CKDN2A/CDKN2B* Locus auf Chromosom 9p21.3, welcher mit dem Myokardinfarkt assoziiert ist, ebenfalls ein Risiko bzw. eine Assoziation mit den ischämischen Schlaganfall zeigt. Es erfolgte die Analyse der Daten aus ihrer kürzlich durchgeführten Studie, einer genomweiten Analyse des Schlaganfalls, die über 400.000 SNPs aus der Illumina Infinium Human-1 und HumanHap300 untersuchte, bestehend aus einer Kohorte mit 249 Patienten und 268 Kontrollen (Matarin et al., 2007). Dabei zeigten sich signifikante Assoziationen der Polymorphismen rs10116277, rs1333040, rs1333042 und rs2383207 mit dem ischämischen

Schlaganfall. Die beiden letztgenannten SNPs zeigten eine Assoziation unter einem dominanten Modell. Bei zwei von diesen SNPs, rs1333040 und rs2383207, ist bereits in vorherigen Studien eine Assoziation mit dem Myokardinfarkt belegt worden (Helgadottir et al., 2007). Die Abbildung 8 zeigt die SNPs, welche eine Assoziation mit dem Myokardinfarkt gezeigt haben, und die SNPs, welche eine Assoziation mit dem ischämischen Schlaganfall gezeigt haben.

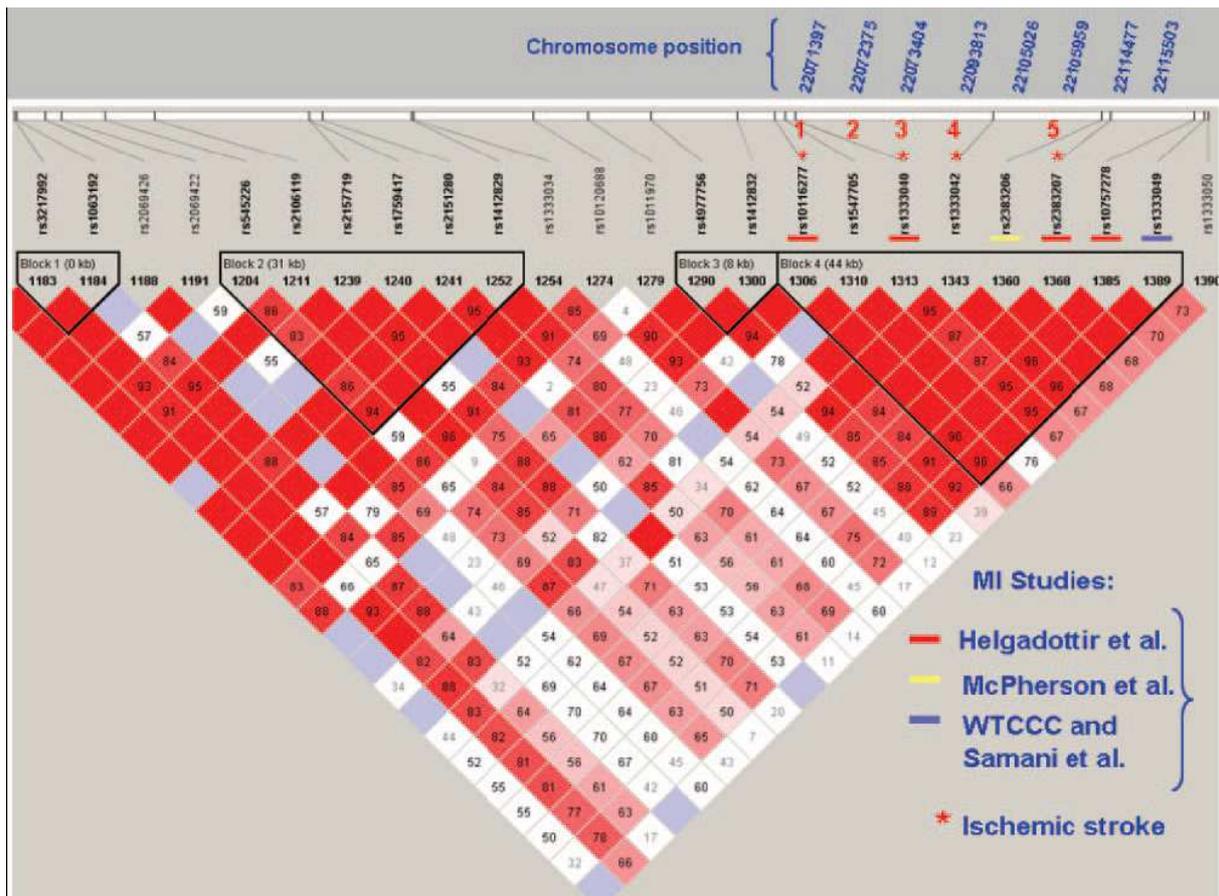


Abbildung 8: Darstellung der SNP, die eine Assoziation zum Myokardinfarkt und zum Schlaganfall gezeigt haben (Matarin et al., 2008)

Paarweises LD (Kopplungsungleichgewicht) der Region 21.9 bis 22.1 Mb auf Chromosom 9. Heruntergeladen von der HapMap Datenbank (www.hapmap.org) für die CEU Population. Die Abbildung zeigt die in letzter Zeit untersuchten SNPs unter Benutzung des Illumina Infinium Human -1 und HumanHap300 Assays (Nummer 1 bis 5) und SNPs, bei welchen kürzlich eine Assoziation zum Myokardinfarkt nachgewiesen werden konnte.

Einem bestimmten LD-Wert zwischen zwei Polymorphismen ist jeweils eine farbkodierte Fläche zugeordnet. Die rote Flächen bedeutet eine starke Kopplung

zwischen zwei Polymorphismen, die hellere Fläche eine geringe Kopplung zwischen zwei Polymorphismen.

WTCCC: Wellcome Trust Case Control Consortium

Erstaunlicherweise zeigte sich unter Einbeziehung der Risikofaktoren für den ischämischen Schlaganfall, dass das rs1333042-Risikoallel für den Myokardinfarkt einen protektiven Effekt bezüglich des ischämischen Schlaganfalls hatte. Signifikante Assoziationen wurden ebenfalls in fast allen Haplotypen unter Einbeziehung dieser SNPs in additiven und dominanten Modellen beobachtet, sowohl unter Einbeziehung als auch ohne Einbeziehung der Risikofaktoren für den ischämischen Schlaganfall. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 12 dargestellt. Ebenso konnte in einer weiteren Studie von Smith et al., 2009 eine Assoziation des rs2383207 und rs13333049 mit dem ischämischen Schlaganfall gezeigt werden.

Tabelle 12: Assoziation der SNP Haplotypen auf Chromosom 9p21 mit dem ischämischen Schlaganfall (Matarin et al., 2008)

Data	SNP Reihenfolge	Modell	Haplotyp	P-Wert	OR (95 %KI)
„Unadjusted“	3-4-5	Additiv	CAA	0,0177	1,36 (1,06-1,76)
„Unadjusted“	1-2-3-4-5	Additiv	GACAA	0,0196	1,36 (1,05-1,75)
„Unadjusted“	3-4-5	Dominant	CAA	0,0088	1,61 (1,13-2,29)
„Unadjusted“	1-2-3-4-5	Dominant	GACAA	0,0102	1,59 (1,12-2,27)
„Adjusted“	3-4-5	Additiv	CAA	0,0207	1,44 (1,06-1,96)
„Adjusted“	1-2-3-4-5	Additiv	GACAA	0,00229	1,43 (1,05-1,95)
„Adjusted“	3-4-5	Dominant	CAA	0,0131	1,72 (1,12-2,65)
„Adjusted“	1-2-3-4-5	Dominant	GACAA	0,0152	1,70 (1,11-2,62)

1=rs10116277, 2=rs1547705, 3=rs1333040, 4=rs1333042, 5=rs2383207

4.5 Die Einflüsse der Polymorphismen auf Chromosom 9p21.3 auf das Manifestationsalter des Myokardinfarkt und der koronare Herzerkrankung: Darstellung bisheriger Publikationen

Wie oben bereits genannt, haben vier unabhängige genomweite Assoziationsstudien einen Locus auf Chromosom 9p21.3 in einer kaukasischen Population identifiziert, welcher mit einer Anfälligkeit zur Entstehung der koronaren Herzerkrankung bzw. des Myokardinfarktes assoziiert ist. Dieser Risikolocus ist annähernd 58 kb lang und beinhaltet keine Gene (McPherson et al., 2007). Nur eine dieser Studien explorierte die Effekte dieser SNPs in diesem Risikolocus auf das Erkrankungsalter der koronaren Herzerkrankung und des Myokardinfarktes (Helgadottir et al., 2007). In dieser Studie hatte das Hochrisiko-Allel eines SNPs (rs10757278G) eine signifikant

höhere genotyp-spezifische Odds ratio in der Subgruppe mit einem sehr frühen Erkrankungsalter. Außerdem zeigte sich in der linearen Regressionsanalyse innerhalb der Fälle, dass sich mit je einer Kopie des Hochrisiko-Allels das Erkrankungsalter bezüglich des Myokardinfarktes um ein Jahr reduzierte. Helgadottir et al., 2007 berichteten bei heterozygoten Trägern des Risiko-Allels rs107572778G eine Odds ratio von 1,49 (95 % KI, 1,31-1,69) bei frühem Auftreten der Erkrankung (Männer<50 Jahre; Frauen<60 Jahre) verglichen mit einer Odds ratio von 1,26 (95 % KI, 1,16-1,36) bei der Gesamtpopulation mit Myokardinfarkt (Männer>70 Jahre; Frauen>75 Jahre). Bei den homozygoten Trägern des Risiko-Allels rs10757278G zeigte sich eine Odds ratio von 2,02 (95 % KI, 1,72-2,36) bei frühem Auftreten der Erkrankung (Männer<50 Jahre, Frauen<60 Jahre) verglichen mit einer Odds ratio von 1,64 (95 % KI, 1,47-1,82) bei der Gesamtpopulation mit Myokardinfarkt (Männer>70 Jahre, Frauen>75 Jahre).

4.6 Ansatzpunkte zur Erklärung der Assoziation dieser Polymorphismen auf Chromosom 9p21.3 mit dem Auftreten des Myokardinfarktes und der koronaren Herzerkrankung

Es stellt sich die Frage, in welcher Weise die beschriebene Region auf Chromosom 9p21.3 mit dem Auftreten der koronaren Herzerkrankung und des Myokardinfarktes assoziiert ist. Horne et al., 2008 untersuchten die Daten von einem großem Register mit 14.000 Individuen, die sich zwischen 1994 und 2007 innerhalb des Utah basierenden Intermountain Gesundheitssystems einer Koronarangiographie unterzogen hatten. Sie untersuchten, ob der 9p21.3 Risikolocus mit der Plaqueruptur (nichttödlicher Myokardinfarkt oder Tod) unter den Individuen mit einer bestehenden koronaren Herzerkrankung assoziiert war. Dabei fand sich keine Assoziation des 9p21.3 Risikolocus mit dem Vorkommen von nichttödlichen Myokardinfarkt oder Tod infolge einer Plaqueruptur. In einer zweiten Analyse erforschten sie, ob die Gegenwart einer koronaren Herzerkrankung oder ein Herzinfarkt in der Vorgeschichte mit dem 9p21.3 Risikolocus assoziiert war. Dabei verglichen sie die Genotypenverteilungen von Individuen mit koronarer Herzerkrankung und Myokardinfarkt mit der Genotypenverteilung einer randomisierten Bevölkerungsgruppe. Dabei zeigte sich, dass die Assoziation mit dem 9p21.3 Risikolocus stärker für die Patienten mit koronarer Herzerkrankung als bei den Patienten mit Myokardinfarkt war. Es wurde jedoch keine Assoziation mit dem 9p21

Risikolocus zum Schweregrad oder zur Ausdehnung einer koronaren Herzerkrankung gefunden. Horne et al., 2008 postulierten somit, dass der 9p21.3 Risikolocus an einem Anfangsstadium als „Initiator“ der koronaren Herzerkrankung fungiert. Die Tatsache, dass in der Studie von Horne et al., 2008 keine Assoziation mit dem 9p21.3 Risikolocus zur Schwere oder Ausdehnung einer koronaren Herzerkrankung gefunden werden konnte, widerspricht den Entdeckungen in einigen anderen Studien, die eine Assoziation des 9p21.3 Risikolocus mit der Atheromlast gefunden haben (Assimes et al., 2008). Die Interpretation von Horne et al., 2008, dass der Mangel an Assoziation der SNPs dieser Region auf Chromosom 9p21.3 mit der Anzahl der Koronararterien, die eine signifikante Obstruktion aufweisen, einen Hinweis darauf geben könnte, dass der Locus involviert ist, in der Initiation der koronaren Atherosklerose weniger in deren Progression, könnte eine mögliche Erklärung sein, kann jedoch nicht generell vorausgesetzt werden (Samani et al., 2008).

Schunkert et al., 2008 führten eine Metaanalyse durch, indem alle bis dato veröffentlichten Studien im Hinblick auf die Assoziation der SNPs auf dem Chromosomen 9p21.3 mit dem Auftreten einer koronaren Herzerkrankung und Myokardinfarkt analysiert wurden. Dabei zeigte sich, dass diese Region, in welcher sich die untersuchten SNPs befinden, von zwei angrenzenden „rekombination hot spots“ definiert ist und die kodierende Sequenz die Gene der zwei Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitoren, *CDKN2A* und *CDKN2B*, enthält. (Knippers et al., 2006). Die durch diese Gene (*CDKN2A* und *CDKN2B*) kodierten Proteine heißen *p16INK4a*, *ARF* und *P15INK4b* (Helgadottir et al., 2007). Es wird vermutet, dass diese oben genannten Gene bzw. die sie kodierten Proteine, eine große Rolle in der Regulation von Zellzyklen haben und es wird angenommen, dass sie zu einer Familie von Genen gehören, welche an der Entstehung der Atherosklerose beteiligt sind, als Ergebnis ihres Beitrages zur Hemmung des Zellwachstums durch die Umwandlung des „growth factor- β 1“ (Schunkert et al., 2008; Lowe et al., 2003, Hannon et al., 1994; Kalinina et al., 2004). Diese Gene spielen des Weiteren eine große Rolle in der Zellproliferation, im Altern und der Apoptose (Kim et al., 2006). Es zeigte sich jedoch, dass die SNPs, welche am stärksten eine Assoziation mit der koronaren Herzerkrankung oder dem Myokardinfarkt zeigten, eine relative große Entfernung zu diesen Genen aufwiesen. Das am nächsten gelegene SNP ist 10 kb abwärts von

CDKN2B lokalisiert (Schunkert et al., 2008). Von den drei in dieser Arbeit untersuchten SNPs liegt das SNP rs1333040 am nächsten an *CDKN2B*. Es liegt 75 kb von *CDKN2B* entfernt. Ein Effekt durch die Regulation eines dieser Cyclin-abhängigen Kinasen könnte möglich sein. In der Zukunft müssen jedoch auch weitere Erklärungen berücksichtigt und in Betracht gezogen werden.

Ein bislang unbekannter DNA-Abschnitt, „antisense“, nicht kodierende RNA, genannt *ANRIL* (*ANRIL*= “antisense non coding RNA of the INK locus“) wurde kürzlich entdeckt (Pasmant et al., 2007), und es konnte gezeigt werden, dass *ANRIL* in vaskulären Endothelzellen, von Monozyten abgeleiteten Makrophagen und koronaren glatten Muskelzellen (Broadbent et al., 2008) exprimiert wird. Es handelt sich dabei um Zelltypen, die alle einen Einfluss auf die Atheroskleroseentstehung haben (Broadbent et al., 2008). *ANRIL* umspannt einen Bereich von 126,3 kb und überlappt mit seinem 5`-Ende mit *CDKN2B*. Es konnte gezeigt werden, dass der Risiko-Lokus 9p21.3 mit den Exonen 13-19 von *ANRIL* überlappt. (Broadbent et al., 2008). Quantitative „real time PCR Analysen“ haben gezeigt, dass die Expression der kurzen Variante von *ANRIL* um das 2,2-Fache erhöht war bei Personen, welche homozygot für das Risiko-Allel waren, während die Expression der langen Variante von *ANRIL* um das 1,3-Fache gesunken war. Zusätzlich war dieser Unterschied mit einem Abfall der relativen Anzahl der Kopien der Transkripte für *CDKN2B* assoziiert. Man geht von der Hypothese aus, dass das 9p21.3 Risiko-Allel durch die Regelung des alternierenden Spleissens von *ANRIL*, indem es die Expression der langen Variante von *ANRIL*-Transkripte reduziert oder die Expression der kurzen Variante von *ANRIL*-Transkripte erhöht, die Expression von Genen, die eine Kontrolle in der Zellproliferation haben, modifiziert und somit die Atherosklerose-Entstehung fördert (Jarinova et al., 2009).

4.7 Physiologische Bedeutung der SNPs auf Chromosom 9 (*CDKN*, *ANRIL*)

In der vorliegenden Studie haben wir einen Abschnitt auf dem Chromosomen 9p21.3, welches sich über eine Region von 21,950kb bis 22,125kb erstreckt, durch die Genotypisierung von 35 SNPs untersucht. Dabei zeigten 15 SNPs eine signifikante Assoziation zum Auftreten eines Myokardinfarktes. In dieser Arbeit wurden drei von diesen 15 SNPs näher untersucht. Es handelt sich bei diesen drei SNPs um rs1333040, rs7857345 und rs1333045. Diese SNPs liegen zwischen dem 22073kb

und 22110kb des Chromosoms 9p21.3. Es handelt sich dabei um Introns, welche kein Protein kodieren, d.h. diese SNPs sind in keiner für ein bestimmtes Gen kodierenden Region lokalisiert (Wrba et al., 2007). In der Nähe dieser Region liegen jedoch zwei Gene, welche die Proteine *CDKN2A* („Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A“) und *CDKN2B* („Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2B“) kodieren, die eine Rolle bei der Regulation des Zellwachstums spielen (Schunkert et al., 2008). Ein Teil der 9p21.3 Region wird schematisch in der Abbildung 9 dargestellt.

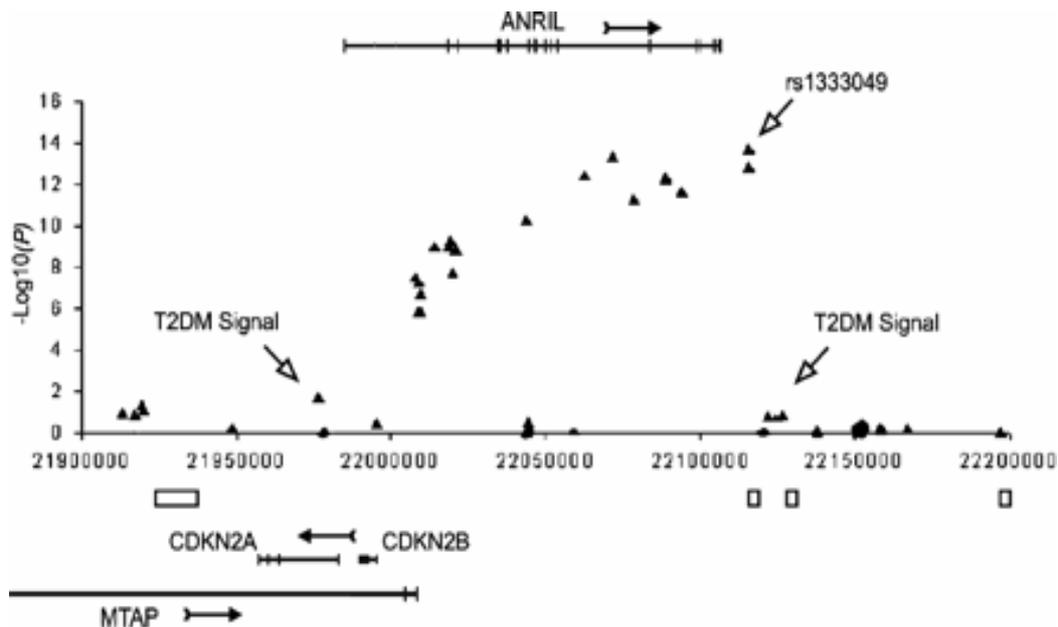


Abbildung 9: Schematische Darstellung eines Teils der 9p21.3 Region (Samani NJ, Schunkert H, 2008)

x-Achse: Lokalisation der Region in Basenpaaren (300 kb sind dargestellt)

y-Achse: $-\log_{10}(P)$ Assoziationssignale der SNPs in dieser Region (dargestellt als Dreieck), welche in der Welcome Trust Case Control Consortium-Studie untersucht wurden

horizontale Pfeile: Richtung der Transkription

T2DM: Diabetes mellitus Typ II

Boxen unterhalb der x- Achse: Lokalisation der „Rekombination Hot spots“.

MTAP: Methylthioadenosin Phosphorylase, CDKN2A/CDKN2B: „Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A/2B“

Die Abbildung 9 zeigt auf der x-Achse die Lokalisation der Region auf Chromosom 9p21.3 in Basenpaaren (circa 300 kb sind dargestellt). Die y-Achse zeigt in $-\log_{10} P$ die Assoziationssignale der SNPs in dieser Region, welche in der WTCCC-Studie 2007 untersucht worden sind. Der SNP rs1333049 mit der stärksten Assoziation ist mit einem Pfeil markiert. Eine Assoziation wird über eine Region von fast 100 kb gezeigt. Die nächsten proteinkodierenden Gene sind *CDKN2A*, *CDKN2B* und Methylthioadenosin-Phosphorylase (*MTAP*). Zusätzlich wird diese Region fast komplett überspannt durch ein kürzlich identifiziertes Gen, *ANRIL* („Antisense non coding RNA of the INK locus“). Die Lokalisation von zwei Loci, die mit Diabetes mellitus Typ II assoziiert sind, wird ebenfalls gezeigt. Keiner von beiden zeigt eine Überlappung mit dem Locus für die koronare Herzerkrankung. Der Locus für den Diabetes mellitus Typ II auf der rechten Seite der Graphik ist durch ein „Rekombinations Hot spot“ von dem Gen-Lokus, der mit koronarer Herzerkrankung assoziiert ist, getrennt. Dies kann den schnellen Fall des Assoziationssignals für die koronare Herzerkrankung auf dieser Seite erklären.

4.8 Ziele der Identifikation molekulargenetischer Risikofaktoren

Durch die genomweiten Assoziationsstudien ist es in den letzten drei Jahren gelungen, zahlreiche reproduzierbare Risikoallele für den Myokardinfarkt zu identifizieren. Durch weitere genomweite Assoziationsstudien ist zu erwarten, dass in der nächsten Zeit die Zahl der sicher evaluierten genetischen Varianten, die mit dem Herzinfarkttrisiko assoziiert sind, deutlich größer sein wird. In der Zusammenschau der Informationen ist zu vermuten, dass sich auch eine genauere Vorhersage des kardiovaskulären Risikos machen lässt, als dies zum aktuellen Zeitpunkt anhand der Familienanamnese möglich ist (Kathiresan S. et al., 2008). So könnten durch die Lieferung prädiktiver Informationen durch die genetische Informationen zukünftig Risiko-Scores besser zwischen einem niedrigen, mittleren und hohen zukünftigen Risiko diskriminieren und die Primärprävention könnte somit gezielt bei Hochrisikopersonen eingesetzt werden. Außerdem könnte die Bewertung möglich werden, wie das individuelle Risiko abnimmt, wenn behandelbare Risikofaktoren wie z.B. arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus und Rauchen eliminiert werden (Yamaha et al., 2008). Offen bleibt der zugrundeliegende Pathomechanismus der Allelvarianten, die letztendlich zur Risikoerhöhung für die Entwicklung eines Myokardinfarktes führen. In der Zukunft sind weitere Arbeiten

notwendig, um den Pathomechanismus der durch diese Genvarianten verursachten erhöhten Anfälligkeit für den Myokardinfarkt zu klären.

In der heutigen Medizin erfolgen medizinische Maßnahmen auf der Grundlage der Diagnose und Schwere einer bestimmten Erkrankung. Die Effizienz der Medikamente und das Eintreten der Nebenwirkungen variieren unter den Individuen. Das Ziel von Behandlungen, die auf genetischen Informationen basieren, ist zum einen das therapeutische Outcome und das Auftreten von Nebenwirkungen besser vorhersagen zu können und zum anderen die Effizienz und Sicherheit der Anwendung zu erhöhen. In der Zukunft sollte es möglich werden, spezifische therapeutische Wirkstoffe individualisiert auf der Basis von genetisch anfälligen Faktoren zu benutzen, dabei deren Effizienz zu erhöhen und deren Toxizität zu minimieren (Damani et al., 2007).

5 Zusammenfassung

Derzeit stellen kardiovaskuläre Erkrankungen die häufigste Todesursache in der deutschen Bevölkerung dar (Statistisches Bundesamt Deutschland, Wiesbaden 2007). Soweit prognostische Aussagen möglich sind, werden die koronare Herzerkrankung und der Herzinfarkt – eine der Komplikationen der koronaren Herzerkrankung – auch in den nächsten 25 Jahren in den westlichen Industrienationen die häufigste Todesursache bleiben (Murray et al., 1997). Aufgrund der Häufigkeit und der hohen Letalität der koronaren Herzerkrankung ist eine Verbesserung der Primärprävention von großer Bedeutung. Um eine möglichst effektive Primärprävention zu gewährleisten, ist eine exakte Kenntnis der Pathophysiologie und möglicher Risikofaktoren nötig, damit Individuen mit hohem Risiko identifiziert und möglichst frühzeitig, vor dem Auftreten von Komplikationen behandelt werden können. Als wichtigste Risikofaktoren der koronaren Herzerkrankung gelten arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus und Rauchen. Zusätzlich gibt es aus Zwillingsstudien gesicherte Hinweise dafür, dass genetische Faktoren an der Ausprägung dieser komplexen Erkrankung beteiligt sind (Marenberg et al., 1994). Das Ziel ist es dabei, diese Genvarianten zu identifizieren, denn durch die Identifikation von genetischen Risikofaktoren könnte dem primärpräventiven Ansatz ein großer Nutzen hinzugefügt werden, und somit die präventiven Maßnahmen gezielt und kosteneffizient hauptsächlich bei Hochrisikopersonen zur Anwendung gebracht werden. (Hengstenberg et al., 2002). Der aktuelle Fortschritt im Bereich der humanen Genetik und der Genomforschung mit dem Höhepunkt in der Komplettierung der Nukleotidsequenz des menschlichen Genoms durch das Human-Genome-Projekt (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004) hat einen substantiellen Zugewinn für die klinische Medizin gebracht, einschließlich der Erleichterung der Charakterisierung der Krankheitspathogenese auf molekularer Ebene und der Entwicklung von genetischen Markern zur Festsetzung des Krankheitsrisikos.

Grundlage der vorliegenden Studie waren die im Jahre 2007 genomweiten Studien zu Chromosom 9 (Helgadottir et al., 2007; McPherson et al., 2007; Wellcome Trust Case Consortium, 2007; Samani et al., 2007), die unabhängig voneinander eine Assoziation bestimmter SNPs auf Chromosom 9p21.3 mit der koronaren Herzerkrankung und dem Myokardinfarkt-Risiko gezeigt haben.

In der vorliegenden Studie wurde eine mögliche Assoziation von drei SNPs in einer Genregion auf Chromosom 9p21.3 mit dem Auftreten von Myokardinfarkt untersucht. Die Studienpopulation bestand aus 1.211 Kontrollen und 3.657 Myokardinfarkt-Patienten. Die Genotypbestimmung erfolgte mit Hilfe des TaqMan-Verfahrens, bei dem allelspezifische Oligonukleotidsonden in einer Polymerasekettenreaktion zum Einsatz kommen. Die genetische Analyse bestand aus der Bestimmung der Genotypen und verschiedenen Allelkombinationen (Haplotyp) der SNPs rs1333040, rs7857345 und rs1333045. Dabei zeigte sich, dass das T-Allel des SNP rs1333040, das C-Allel des SNP rs7857345 und das C-Allel des SNP rs1333045 Risikoallele für den Myokardinfarkt darstellen. Es zeigte sich des Weiteren, dass der Haplotyp TCC der SNPs rs1333040, rs7857345, rs1333045 in der Myokardinfarkt-Gruppe signifikant häufiger vorhanden war als in der Kontrollgruppe. Der Haplotyp CTT war dagegen signifikant häufiger in der Kontrollgruppe vorhanden als bei Patienten mit Myokardinfarkt. Zusammengefasst kann damit gesagt werden, dass der Haplotyp TCC ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Myokardinfarktes darstellt, während der Haplotyp CTT einen protektiven Faktor darstellt. Schließlich konnte diese Studie eine Assoziation mit dem Auftreten eines Myokardinfarktes und der untersuchten Gen-Region auf Chromosom 9p21.3 zeigen. Warum diese Gen-Region eine Assoziation zum Auftreten eines Myokardinfarktes zeigt, ist bisher noch nicht geklärt. In dieser Region liegen zwei Gene, welche die Proteine *CDKN2A* und *CDKN2B* kodieren, die eine Rolle bei der Regulation des Zellwachstums spielen (Schunkert et al., 2008). Des Weiteren könnte ein bislang unbekannter DNA-Abschnitt *ANRIL* (*ANRIL*=“antisense non coding RNA of the INK locus“), welcher in Gewebe und Zelltypen exprimiert wird, die einen Einfluss auf die Atheroskleroseentstehung haben, eine Bedeutung haben. *ANRIL* umspannt einen Bereich von 126,3 kb und überlappt mit seinem 5`-Ende mit *CDKN2B*. PCR-Analysen zeigten, dass *ANRIL*, welches ein Zell-Typ-Profil manifestiert, das eine Ähnlichkeit zu atherosklerotischen Koronararterien hat, in atheromatösen Gefäßen exprimiert wird. Es wurde herausgefunden, dass *ANRIL* in vaskulären Endothelzellen, von Monozyten abgeleiteten Makrophagen und koronaren glatten Muskelzellen (Broadbent et al., 2008) exprimiert wird, welche alle einen Beitrag zur Entstehung der Atherosklerose leisten (Broadbent et al. 2008). Quantitative real time PCR-Analysen haben gezeigt, dass die Expression der kurzen Variante von *ANRIL* um das 2,2-Fache erhöht war bei Personen, welche homozygot für das Risiko-Allel waren,

während die Expression der langen Variante von *ANRIL* um das 1,3-Fache gesunken war. Zusätzlich war dieser Unterschied assoziiert mit einem Abfall der relativen Anzahl der Kopien der Transkripte für die Zellproliferation, nämlich *CDKN2A* und *CDKN2B*. Man geht von der Hypothese aus, dass das 9p21.3 Risiko-Allel durch die Regelung des alternierenden Spleissens von *ANRIL*, welches wiederum eine Funktion in der Expression von Genen, die eine Kontrolle in der Zellproliferation haben, die Arteriosklerose-Entstehung fördert (Jarinoa. et al., 2009). Ein Effekt durch die Regulation eine dieser Cyclin-abhängigen Kinasen könnte möglich sein. In der Zukunft müssen jedoch auch weitere Erklärungen berücksichtigt und in Betracht gezogen werden.

6 Inhaltsverzeichnis

1. Abbasi F, Brown BW, Lamendola C, McLaughlin T, Reaven GM. Relationship between obesity, insulin resistance, and coronary heart disease risk. *J Am Coll Cardiol* 40 (2002), 944-945.
2. Abdullah KG, Li L, Shen GQ, Hu Y, Yang Y, MacKinlay KG, Topol EJ, Wang QK. Four SNPs on chromosome 9p21 confer risk to premature, familial CAD and MI in an American Caucasian population (GeneQuest). *Ann Hum Genet* 72 (2008), 654-7.
3. Alpert JS, Thygesen K, Antman E, Bassand JP. Myocardial infarction redefined-a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 36 (2000), 959-69.
4. Amento EP, Ehsani N, Palmer H, Libby P. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb.* 11 (1991), 1223-30.
5. Anderson K, Kannel W, Odell P, Wilson P. An updated coronary risk profile. *Circulation* 83 (1991), 357-363.
6. Askari A, Unzek S, Popovic ZP, Goldman CK, Ellis SG, Thomas JD, DiCorleto PE, Topol EJ, Penn MS. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet* 362 (2003), 697-703.
7. Assimes TL, Knowles JW, Basu A, Iribarren C, Southwick A, Tang H, Absher D, Li J, Fair JM, Rubin GD, Sidney S, Fortmann SP, Go AS, Hlatky MA, Myers RM, Risch N, Quertermous T. Susceptibility locus for clinical and subclinical coronary artery disease at chromosome 9p21 in the multi-ethnic ADVANCE study. *Hum Mol Genet.* 17 (2008), 2320-2328.
8. Auer R, Berent R, Kirchgatterer A, Weber T, Mayr H, Maurer E, Eber B. Klinik der instabilen Angina pectoris. *J Kardiol* 6 (1999), 246-50.
9. Baenkler HW. „Innere Medizin, MLP Duale Reihe.“ Hippokrates Verlag im Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1999, 1.Auflage, 119-163.
10. Baer FM, Rosenkranz S. Koronare Herzkrankheit und akutes Koronarsyndrom In: „Klinische Kardiologie: Krankheiten des Herzens, des

- Kreislaufs und der herznahen Gefäße“, Erdmann E (Hrsg.), Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2009, 7.Auflage, 13-69.
11. Baim DS, Grossmann W. “Grossman`s cardiac catheterization, angiography, and intervention”, Lippincott Williams & Wilkins 1996, 7.Auflage, 57-82.
 12. Baumann G, Stangl K. Krankheiten des Herzes – Einführung. In: „Innere Medizin – Grundlagen und Klinik innerer Krankheiten, Stobbe H, Baumann G (Hrsg.). Ullstein Mosby, Berlin, Wiesbaden, 1996, 7.überarbeitete und erweiterte Auflage, 127-168.
 13. Baumann G, Stangl K. Krankheiten des Herzen-Koronare Herzkrankheit. In „Innere Medizin-Grundlagen und Klinik innerer Krankheiten. Stobbe H, Baumann G (Hrsg.), Ullstein Mosby, Berlin, Wiesbaden, 1996, 7.überarbeitete und erweiterte Auflage, 265-293.
 14. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Torzewski M, Hafner G, Tiret L, Smieja M, Cambien F, Meyer J, Lackner KJ. Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *N Engl. J Med.* 349 (2003), 1605-13.
 15. Bosserhoff AK, Buettner R. Expression, function and clinical relevance of MIA (melanoma inhibitory activity). *Histol Histopathol.* 17 (2002), 289-300.
 16. Bottcher M, Falk, E. Pathology of the coronary arteries in smokers and non-smokers. *J Cardiovasc Risk* 6 (1999), 299-302.
 17. Broadbent HM, Peden JF, Lorkowski S, Goel A, Ongen H. Susceptibility to coronary artery disease and diabetes is encoded by distinct, tightly linked SNPs in the ANRIL locus on chromosome 9p. *Hum Mol Genet* 17 (2008), 806-814.
 18. Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou J, Arveiler D, Luc G, Bard JM, Bara L, Ricard S, Tiret L, Amouyel P, Alhenc-Gelas F, Soubrier F. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 359 (1992), 641-644.
 19. Campeau L. Letter: Grading of angina pectoris. *Circulation.* 54 (1976), 522-523.
 20. Casas JP, Hingorani AD, Bautista LE, Sharma P. Meta-analysis of genetic studies in ischemic stroke: thirty-two genes involving approximately 18.000 cases and 58.000 controls. *Arch Neurol* 61 (2004), 1652-1661.

21. Castelli WP. Epidemiology of coronary heart disease: the Framingham study. *Am J Med* 76 (1984), 4-12.
22. Chamberlain JC, Galton DJ. Genetic susceptibility to atherosclerosis. *Br Med Bull* 476 (1990), 917-40.
23. Chatzizisis YS, Coskun AU, Jonas M, Edelmann ER, Feldmann CL, Stone PH. Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodelling: molecular, cellular, and vascular behaviour. *J Am Coll Cardiol*. 49 (2007), 2379-2393.
24. Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH. A prospective study of parental history of myocardial infarction and coronary heart disease in women. *Am J Epidemiol*. 123 (1986), 48-58.
25. Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Res*. 8 (1998), 1229-31.
26. Coronary Artery Disease Consortium, Samani NJ, Deloukas P, Erdmann J, Hengstenberg C, Kuulasmaa K, McGinnis R, Schunkert H, Soranzo N, Thompson J, Tiret L, Ziegler A. Large scale association analysis of novel genetic loci for coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 29 (2009), 774-80.
27. Damani SB, Topol EJ. Future use of genomics in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 50 (2007), 1933-1940.
28. Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM, Eda S, Eiriksdottir G, Rumley A, Lowe GD, Pepys MB, Gudnason V. C-reactive protein and other circulation markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N Engl J Med*. 350 (2004), 1387-97.
29. Dankner R, Boyko V, Goldbourt U, Reicher-Reiss H. Predictors of cardiac and noncardiac mortality among 14697 patients with coronary heart disease. *Am J Cardiol* 91 (2003), 121-127.
30. Dietze G, Bunse M, Jung W, Van Erckelens F. Pathogenesis of coronary disease. *Z Kardiol* 89 (2000), 7-10.
31. Dietz R, Rauch B, Gottwik M, Levenson B, Meinertz T, Osterspey A, Strasser R, Tebbe U, Werdan K. Leitlinie zur Diagnose und Behandlung der chronischen koronaren Herzerkrankung der Deutschen Gesellschaft für

- Kardiologie-Herz-und Kreislaufforschung (DGK). *Z Kardiol.* 92 (2003), 501-521.
32. Dzau, V. Atherosclerosis and hypertension: mechanisms and interrelationships. *J Cardivasc Pharmacol* 15 (1990), 59-64.
33. Ennker J. „Checkliste XXL Herzchirurgie“. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2002.
34. Erdmann J, Grosshennig A, Braund PS, König IR, Hengstenberg C, Hall AS, Linsel-Nitschke P, Kathiresan S, Wright B, Trégouët DA, Cambien F, Bruse P, Aherrahrou Z, Wagner AK, Stark K, Schwartz SM, Salomaa V, Elosua R, Melander O, Voight BF, O'Donnell CJ, Peltonen L, Siscovick DS, Altshuler D, Merlini PA, Peyvandi F, Bernardinelli L, Ardissino D, Schillert A, Blankenberg S, Zeller T, Wild P, Schwarz DF, Tiret L, Perret C, Schreiber S, El Mokhtari NE, Schäfer A, März W, Renner W, Bugert P, Klüter H, Schrezenmeir J, Rubin D, Ball SG, Balmforth AJ, Wichmann HE, Meitinger T, Fischer M, Meisinger C, Baumert J, Peters A, Ouwehand WH. Italian Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology Working Group, Myocardial Infarction Genetics Consortium, Wellcome Trust Case Control Consortium, Cardiogenics Consortium, Deloukas P, Thompson JR, Ziegler A, Samani NJ, Schunkert H. New susceptibility locus for coronary artery disease on chromosome 3q22.3. *Nat Genet.* 41 (2009), 280-2.
35. Farzaneh-Far R, Na B, Schiller NB, Whooley MA. Lack of association of chromosome 9p21.3 genotype with cardiovascular structure and function in persons with stable coronary artery disease: The Heart and Soul Study. *Atherosclerosis* 205 (2009), 492-6.
36. FitzGerald G, Nowak J, Oates, J. Cigarette smoking and hemostatic function. *Am Heart J* 115 (1988), 257-271.
37. Foucan L, Bangou-Bredent J, Deloumeaux J, Ekouevi D, Kangabmbega P, Roset J. Hypertension and combinations of cardiovascular risk factors. An epidemiologic case – control study in an adult population in Guadelupe. *Eur J Epidemiology* 17 (2001), 1089-1095.
38. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 326 (1992), 242-250, 310-318.

39. Fuster V, Ross R, Topol EJ. "Atherosclerosis and coronary artery disease"
Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, New York, 1996.
40. Fruchart JC, Nierman MC, Stroes ES, Kastelein JJ, Duriez P. New risk
factors for atherosclerosis and patient risk assessment. *Circulation* 109
(2004), Suppl I: III-15-III-19.
41. Gersh BJ, Braunwald E, Rutherford JD. Chronic Artery Disease. In: "Heart
disease: a textbook of cardiovascular medicine. 5th ed", Braunwald E
(Hrsg.). Saunders, Philadelphia, 1997, 1289-1365.
42. Gibbons RJ, Chatterjee K, Daley J, Douglas JS, Fihn SD, Gardin JM,
Grunwald MA, Levy D, Lytle BW, O'Rourke RA, Schafer WP, Williams SV.
ACC/AHA/ACP-ASIM guidelines for the management of patients with
chronic stable angina: executive summary and recommendations. A Report
of the American College of Cardiology/American Heart Association Task
Force on Practice Guidelines (Committee on Management of Patients with
Chronic Stable Angina). *Circulation* 101 (1999), 2829-2848.
43. Gordon DJ, Bangdiwala S, Castelli WP, Garrison RJ, Jacobs DR, Knoke
JD, Neaton JD, Tyroler HA, Probstfield JL. High-density lipoprotein
cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American
studies. *Circulation* 79 (1989), 8-15.
44. Gotto A. High-density lipoprotein cholesterol and triglycerides as
therapeutic targets for preventing and treating coronary artery disease. *Am
Heart J* 144 (2002), 33-42.
45. Greenland P, Abrams J., Aurigemma GP, Bond Mg, Clark LT, Criqui MH,
Drouse JR, Friedeman L, Fuster V, Herrington DM, Duller LH, Ridker PM,
Roberts WC, Stanford W, Stone N, Swan HJ, Taubert KA, Wexler L.
Prevention Conference V: Beyond secondary prevention: identifying the
highrisk patient for primary prevention: non invasive tests of atherosclerotic
burden: Writing Group III. *Circulation* 101 (2000), E16-E22.
46. Grimaldi A, Heurtier A. Epidemiology of cardio-vascular complications of
diabetes. *Diabetes Metab.* 25 (1999), 12-20.
47. Gross R, Gerok W, Schölmerich P. „Die Innere Medizin“. Schattauer
Verlag, Stuttgart, New York, 1996. 9. Auflage
48. Grossmann E, Messerli, F. Diabetic and hypertensive disease. *Ann Intern
Med* 125 (1996), 304-310.

49. Hamm CW, Arntz HR, Bode C, Giannitsis H, Katus H, Levenson B, Nordt Th, Neumann FJ, Tebbe U, Zahn R. Leitlinien: Akutes Koronarsyndrom (ACS) Teil 2: Akutes Koronarsyndrom mit ST-Hebung. *Z Kardiologie* 93 (2004), 324-341.
50. Hamm CW, Arntz HR, Bode C, Giannitsis H, Katus H, Levenson B, Nordt Th, Neumann FJ, Tebbe U, Zahn R. Leitlinien: Akutes Koronarsyndrom (ACS) Teil 1: Akutes Koronarsyndrom ohne ST-Hebung. *Z. Kardiologie* 93 (2004), 72-90.
51. Hamm CW, Braunwald E. A classification of unstable angina revisited. *Circulation*. 102 (2000), 118-122.
52. Hannon GJ, Beach D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 371 (1994), 257-61.
53. Hansson GK, Hellstrand M, Rymo L, Rubbia L, Gabbiani G. Interferon gamma inhibits both proliferation and expression of differentiation-specific alpha-smooth muscle actin in arterial smooth muscle cells. *J Exp Med*. 170 (1989), 1595-608.
54. Hansson GK, Holm J, Jonasson L. Detection of activated T-lymphocytes in the human atherosclerotic plaque. *Am J Pathol*. 135 (1989), 169-75.
55. Hashimoto T, Meng H, Young WL. Intracranial aneurysms: links among inflammation, hemodynamics and vascular remodelling. *Neurol. Res.* 28 (2006), 372-380.
56. Hecht A, Lunzenauer K. "Allgemeine Pathologie. Eine Einführung für Studenten". Verlag Volk und Gesundheit, Berlin 1988, 5. Auflage
57. Helgadóttir A, Thorleifsson G, Manolescu A, Gretarsdóttir S, Blondal T, Jonasdóttir A, Jonasdóttir A, Sigurdsson A, Baker A, Palsson A, Masson G, Gudbjartsson DF, Magnusson KP, Andersen K, Levey AI, Backman VM, Matthiasdóttir S, Jonsdóttir T, Palsson S, Einarsdóttir H, Gunnarsdóttir S, Gylfason A, Vaccarino V, Hooper WC, Reilly MP, Granger CB, Austin H, Rader DJ, Shah SH, Quyyumi AA, Gulcher JR, Thorgeirsson G, Thorsteinsdóttir U, Kong A, Stefansson K. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science* 316 (2007), 1491-1493.
58. Helgadóttir A, Thorleifsson G, Magnusson KP, Grétarsdóttir S, Steinthorsdóttir V, Manolescu A, Jones GT, Rinkel GJ, Blankensteijn JD,

- Ronkainen A, Jääskeläinen JE, Kyo Y, Lenk GM, Sakalihan N, Kostulas K, Gottsäter A, Flex A, Stefansson H, Hansen T, Andersen G, Weinsheimer S, Borch-Johnsen K, Jorgensen T, Shah SH, Quyyumi AA, Granger CB, Reilly MP, Austin H, Levey AI, Vaccarino V, Palsdottir E, Walters GB, Jonsdottir T, Snorraddottir S, Magnusdottir D, Gudmundsson G, Ferrell RE, Sveinbjornsdottir S, Hernesniemi J, Niemelä M, Limet R, Andersen K, Sigurdsson G, Benediktsson R, Verhoeven EL, Teijink JA, Grobbee DE, Rader DJ, Collier DA, Pedersen O, Pola R, Hillert J, Lindblad B, Valdimarsson EM, Magnadottir HB, Wijmenga C, Tromp G, Baas AF, Ruigrok YM, van Rij AM, Kuivaniemi H, Powell JT, Matthiasson SE, Gulcher JR, Thorgeirsson G, Kong A, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. The same sequence variant on 9p21 associates with myocardial infarction, abdominal aortic aneurysm and intracranial aneurysm. *Nat Genet.* 40 (2008), 217-224.
59. Hengstenberg C, Bröckel U, Holmer S, Mayer B, Fischer M, Baessler A, Erdmann J, Lieb W, Löwel H, Rieger G, Schunkert H. Genetische Einflüsse beim Herzinfarkt; Ergebnisse eines Kandidatengen- und eines genomweiten Ansatzes. *Herz* 27 (2002), 649-661.
60. Hengstenberg CH. (2007) Koronare Herzerkrankung/Herzinfarkt- Genetische Faktoren tragen zur Erkennung von Risikopatienten bei. (http://www.ngfn.de/image/NGFN_Presseordner_2007.pdf)
Stand: 16.11.2009
61. Henning, W. "Genetik", Springer-Verlag, Berlin–Heidelberg–New York, 2002, 3.Auflage, 708-710.
62. Hermann S, Paul M. The genetics of coronary heart disease. *Eur J Intern Med.* 12 (2001), 2-10.
63. Herold G „Innere Medizin“, Selbstverlag, Köln, 2004.
64. Hinohara K, Nakajima T, Takahashi M, Hohda S, Sasaoka T, Nakahara K, Chida K, Sawabe M, Arimura T, Sato A, Lee BS, Ban JM, Yasunami M, Park JE, Izumi T, Kimura A. Replication of the association between a chromosome 9p21 polymorphism and coronary artery disease in Japanese and Korean populations. *Journal of Human Genetics* 53 (2008), 357-359.
65. Hirschfield GM, Gallimore JR, Kahan MC, Hutchinson WL, Sabin CA, Benson GM Dhillon AP, Tennent GA, Pepys MB. Transgenic human C-

- reactive protein is not proatherogenic in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 102 (2005), 8309-14.
66. Hiura Y, Fukushima Y, Yuno M, Sawamura H, Kokubo Y, Okamura T, Tomoike H, Goto Y, Nonogi H, Takahashi R, Iwai N. Validation of the Association of Genetic Variants on Chromosome 9p21 and 1q41 with myocardial Infarction in a Japanese Population. *Circulation Journal*, 72 (2008), 1213-1217.
67. Hornbostel H, Kaufmann W, Siegenthaler W. In: "Innere Medizin in Praxis und Klinik". H.Hornbostel H, Kaufmann W, Siegenthaler W. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1992, 4.Auflage, 1.39,1.50,2.2,2.7-2.9,16.4.
68. Horne BD, Carlquist JF, Muhlestein JB, Bair TL, Anderson JL. Association of variation in the chromosome 9p21 locus with myocardial infarction versus chronic coronary artery disease. *Circ Cardiovasc Genet*. 1 (2008), 85-92.
69. Houston M. New sights and approaches to reduce end-organ damage in the treatment of hypertension: Subsets of hypertension approach. *Am Heart J* 123 (1992), 1337-1367.
70. Hu F, Willett W. Optimal diets for prevention of coronary heart disease. *J Am Med Association* 288 (2002), 2569-2578.
71. Humphries SE, Morgan L. Genetic risk factors for stroke and carotid atherosclerosis: insights into pathophysiology from candidate gene approaches. *Lancet Neurology* (2004), 227-235
72. Hunt K, Almasy L, Blangero J, Duggirala R, O'Leary D, Stern M, Williams J. Genetic basis of variation in carotid artery plaque in the San Antonio family heart study. *Stroke* 33 (2002), 2775-2780.
73. International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature* 437 (2005), 1299-320.
74. International HapMap Consortium, Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, Gibbs RA, Belmont JW, Boudreau A, Hardenbol P, Leal SM, Pasternak S, Wheeler DA, Willis TD, Yu F, Yang H, Zeng C, Gao Y, Hu H, Hu W, Li C, Lin W, Liu S, Pan H, Tang X, Wang J, Wang W, Yu J, Zhang B, Zhang Q, Zhao H, Zhao H, Zhou J, Gabriel SB, Barry R, Blumenstiel B, Camargo A, Defelice M, Faggart M, Goyette M, Gupta S,

Moore J, Nguyen H, Onofrio RC, Parkin M, Roy J, Stahl E, Winchester E, Ziaugra L, Altshuler D, Shen Y, Yao Z, Huang W, Chu X, He Y, Jin L, Liu Y, Shen Y, Sun W, Wang H, Wang Y, Wang Y, Xiong X, Xu L, Waye MM, Tsui SK, Xue H, Wong JT, Galver LM, Fan JB, Gunderson K, Murray SS, Oliphant AR, Chee MS, Montpetit A, Chagnon F, Ferretti V, Leboeuf M, Olivier JF, Phillips MS, Roumy S, Sallée C, Verner A, Hudson TJ, Kwok PY, Cai D, Koboldt DC, Miller RD, Pawlikowska L, Taillon-Miller P, Xiao M, Tsui LC, Mak W, Song YQ, Tam PK, Nakamura Y, Kawaguchi T, Kitamoto T, Morizono T, Nagashima A, Ohnishi Y, Sekine A, Tanaka T, Tsunoda T, Deloukas P, Bird CP, Delgado M, Dermitzakis ET, Gwilliam R, Hunt S, Morrison J, Powell D, Stranger BE, Whittaker P, Bentley DR, Daly MJ, de Bakker PI, Barrett J, Chretien YR, Maller J, McCarroll S, Patterson N, Pe'er I, Price A, Purcell S, Richter DJ, Sabeti P, Saxena R, Schaffner SF, Sham PC, Varilly P, Altshuler D, Stein LD, Krishnan L, Smith AV, Tello-Ruiz MK, Thorisson GA, Chakravarti A, Chen PE, Cutler DJ, Kashuk CS, Lin S, Abecasis GR, Guan W, Li Y, Munro HM, Qin ZS, Thomas DJ, McVean G, Auton A, Bottolo L, Cardin N, Eyheramendy S, Freeman C, Marchini J, Myers S, Spencer C, Stephens M, Donnelly P, Cardon LR, Clarke G, Evans DM, Morris AP, Weir BS, Tsunoda T, Mullikin JC, Sherry ST, Feolo M, Skol A, Zhang H, Zeng C, Zhao H, Matsuda I, Fukushima Y, Macer DR, Suda E, Rotimi CN, Adebamowo CA, Ajayi I, Aniagwu T, Marshall PA, Nkwodimmah C, Royal CD, Leppert MF, Dixon M, Peiffer A, Qiu R, Kent A, Kato K, Niikawa N, Adewole IF, Knoppers BM, Foster MW, Clayton EW, Watkin J, Gibbs RA, Belmont JW, Muzny D, Nazareth L, Sodergren E, Weinstock GM, Wheeler DA, Yakub I, Gabriel SB, Onofrio RC, Richter DJ, Ziaugra L, Birren BW, Daly MJ, Altshuler D, Wilson RK, Fulton LL, Rogers J, Burton J, Carter NP, Clee CM, Griffiths M, Jones MC, McLay K, Plumb RW, Ross MT, Sims SK, Willey DL, Chen Z, Han H, Kang L, Godbout M, Wallenburg JC, L'Archevêque P, Bellemare G, Saeki K, Wang H, An D, Fu H, Li Q, Wang Z, Wang R, Holden AL, Brooks LD, McEwen JE, Guyer MS, Wang VO, Peterson JL, Shi M, Spiegel J, Sung LM, Zacharia LF, Collins FS, Kennedy K, Jamieson R, Stewart J. A second generation human haplotyp map of over 3.1. million SNPs. *Nature* 449 (2007), 851-61.

75. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431 (2004), 931-945.
76. Isselbacher KJ, Schmailzl KJG. „Harrisons Innere Medizin“ Band 1, Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin, Wien, deutsche Ausgabe der 13. Auflage, 1995.
77. Jarinova O, Stewart AF, Roberts R, Wells G, Lau P, Naing T, Buerki C, McLean BW, Cook RC, Parker JS, McPherson R. Functional analysis of the chromosome 9p21.3 coronary artery diseases risk Locus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29 (2009), 1671-1677.
78. Just H, Hort W, Zeiher AM. „Arteriosclerosis. New insights into pathogenetic mechanisms and prevention“: Steinkopff Verlag, Darmstadt, New York, 1994.
79. Kalinina N, Agrotis A, Antropova Y, Ilyinskaya O, Smirnov V, Tararak E, Bobik A. Smad expression in human atherosclerotic lesions: evidence for impaired TGF-beta/Smad signaling in smooth muscle cells of fibrofatty lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (24) 2004, 1391-6.
80. Kannel WB, Castelli W, Gordon T, McNamara PM. Serum cholesterol, lipoproteins and the risk of coronary heart disease. The Framingham study. *Ann of Intern Med.* 74 (1971), 1-12.
81. Kannel WB, Neaton JD, Wentworth D, Thomas HE, Stamler J, Hulley SB, Kjelsberg MO. Overall and coronary heart disease mortality rates in relation to major risk factors in 325,348 men screened for the MRFIT. Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Am Heart J* (112) 1986, 825-836.
82. Kathiresan S, Melander O, Guiducci C, Surti A, Burt NP, Rieder MJ, Cooper GM, Roos C, Voight BF, Havulinna AS, Wahlstrand B, Hedner T, Corella D, Tai ES, Ordovas JM, Berglund G, Vartiainen E, Jousilahti P, Hedblad B, Taskinen MR, Newton-Cheh C, Salomaa V, Peltonen L, Groop L, Altshuler DM, Orho-Melander M. Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans. *Nat Genet.* 40 (2008), 189-197.
83. Kathiresan S, Voight BF, Purcell S, Musunuru K, Ardissino D, Mannucci PM, Anand S, Engert JC, Samani NJ, Schunkert H, Erdmann J, Reilly MP, Rader DJ, Morgan T, Spertus JA, Stoll M, Girelli D, McKeown PP, Patterson CC, Siscovick DS, O'Donnell CJ, Elosua R, Peltonen L, Salomaa

V, Schwartz SM, Melander O, Altshuler D, Ardissino D, Merlini PA, Berzuini C, Bernardinelli L, Peyvandi F, Tubaro M, Celli P, Ferrario M, Fetiveau R, Marziliano N, Casari G, Galli M, Ribichini F, Rossi M, Bernardi F, Zoncin P, Piazza A, Mannucci PM, Schwartz SM, Siscovick DS, Yee J, Friedlander Y, Elosua R, Marrugat J, Lucas G, Subirana I, Sala J, Ramos R, Kathiresan S, Meigs JB, Williams G, Nathan DM, MacRae CA, O'Donnell CJ, Salomaa V, Havulinna AS, Peltonen L, Melander O, Berglund G, Voight BF, Kathiresan S, Hirschhorn JN, Asselta R, Duga S, Spreafico M, Musunuru K, Daly MJ, Purcell S, Voight BF, Purcell S, Nemesh J, Korn JM, McCarroll SA, Schwartz SM, Yee J, Kathiresan S, Lucas G, Subirana I, Elosua R, Surti A, Guiducci C, Gianniny L, Mirel D, Parkin M, Burt N, Gabriel SB, Samani NJ, Thompson JR, Braund PS, Wright BJ, Balmforth AJ, Ball SG, Hall AS; Wellcome Trust Case Control Consortium, Schunkert H, Erdmann J, Linsel-Nitschke P, Lieb W, Ziegler A, König I, Hengstenberg C, Fischer M, Stark K, Grosshennig A, Preuss M, Wichmann HE, Schreiber S, Schunkert H, Samani NJ, Erdmann J, Ouwehand W, Hengstenberg C, Deloukas P, Scholz M, Cambien F, Reilly MP, Li M, Chen Z, Wilensky R, Matthai W, Qasim A, Hakonarson HH, Devaney J, Burnett MS, Pichard AD, Kent KM, Satler L, Lindsay JM, Waksman R, Knouff CW, Waterworth DM, Walker MC, Mooser V, Epstein SE, Rader DJ, Scheffold T, Berger K, Stoll M, Huge A, Girelli D, Martinelli N, Olivieri O, Corrocher R, Morgan T, Spertus JA, McKeown P, Patterson CC, Schunkert H, Erdmann E, Linsel-Nitschke P, Lieb W, Ziegler A, König IR, Hengstenberg C, Fischer M, Stark K, Grosshennig A, Preuss M, Wichmann HE, Schreiber S, Hólm H, Thorleifsson G, Thorsteinsdottir U, Stefansson K, Engert JC, Do R, Xie C, Anand S, Kathiresan S, Ardissino D, Mannucci PM, Siscovick D, O'Donnell CJ, Samani NJ, Melander O, Elosua R, Peltonen L, Salomaa V, Schwartz SM, Altshuler D.. Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants. *Nat Genet* 41 (2009), 334-41.

84. Keil U. Coronary artery disease: the role of lipids, hypertension and smoking. *Basis Res Cardiol.* 95 (2000), 152-58.
85. Kim WY, Sharpless NE. The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell* 127 (2006), 265-275.

86. Knippers R. "Molekulare Genetik", Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 9.Auflage, 2006.
87. Koch W, Hoppmann P, Michou E, Jung V. TaqMan assays for genotyping of single nucleotide polymorphisms present at a disease susceptibility locus on chromosome 6. *Clin Chem Lab Med* 43 (2005), 167-172.
88. Koenig W. Haemostatic risk factors for cardiovascular diseases. *Eur Heart J* 19 (1998), Suppl C:C 39-43
89. Kotani J, Awata M, Nanto S, Uematsu M, Oshima F, Minamiguchi H, Mintz GS, Nagata S. Incomplete neointimal coverage of sirolimus-eluting stents: angioscopic findings. *J Am Coll Cardiol.*47 (2006), 2108-2111.
90. Lackner KJ, Torzewski M ,Ochsenhirt V, Reifenberg K. Neue Risikofaktoren der Arteriosklerose. Institut für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin und zentrale Versuchstiereinrichtung. Klinikum der Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Online-Buch-DGAF2007. (http://www.dgaf.de/docs/online_buch_DGAF_2007_gesamt.pdf). Stand: 16.11.2009.
91. Lapidus L, Bengtsson C, Larsson B. Distribution of adipose tissue and risk of cardiovascular disease and death: a 12-year follow-up of participants in the population study of women in Gotheburg, Sweden. *Br Med J* 289 (1984), 1257-1261.
92. Lederle FA, Johnson GR, Wilson SE. Abdominal aortic aneurysm in women. *J Vasc Surg.* 34 (2001), 122-126.
93. Lederle FA, Johnson GR, Wilson SE, Chute EP, Hye RJ, Makaroun MS, Barone GW, Bandyk D, Moneta GL, Makhoul RG. The aneurysm detection and management study screening program: validation cohort and final results. Aneurysm Detection and Management Veterans Affairs Cooperative Study Investigators. *Arch Intern Med.*160 (2000), 1425-1430.
94. Lee LG, Spurgeon L, Heiner CR, Benson SC, Rosenblum BB, Menchen SM, Graham RJ, Constantinescu A, Upadhya KG, Cassel JM. New energy transfer dyes for DNA sequencing. *Nucleic Acids Res.* 25 (1997), 2816-2822.
95. Li R Bensen J, Hertz-Picciotto I, Hutchinson R, Province M, Sprafka J, Tyroler H. Family risk score of coronary heart disease (CHD) as a predictor

- of CHD: the Atherosclerosis Risk in Community Studies and the NHLBI Family Heart Study. *Genet Epidemiol.* 18 (2000), 236-250.
96. Liao J. Endothelium and acute coronary syndromes *Clin Chem* 44 (1998), 1799-1808.
 97. Libby P. Coronary artery injury and the biology of atherosclerosis: inflammation, thrombosis and stabilization. *Am J Cardiol* 86 (2000), 3J-8J.
 98. Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation* 111 (2005), 3481-8.
 99. Lindpainter K., Pfeffer MA, Kreutz R, Stampfer J, 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.
 100. Livak KJ. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet Anal* 14 (1999), 143-149.
 101. Lo PK, Chen JY, Lo WC, Chen BF, Hsin JB, Tang PP, Wang FF. Identification of a novel mouse p53 target gene DDA3. *Oncogene* 18 (1999), 7765-74.
 102. Löffler G. Stoffwechsel von Phosphoglyceriden, Sphingolipiden und Cholesterin. In: „Biochemie und Pathobiochemie“, Löffler G, Heinrich C, Petrides E (Hrsg.), Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2007, 8.Auflage, 554-584.
 103. Lowe SW, Sherr CJ. Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. *Curr Opin Genet Dev* 13 (2003), 77-83.
 104. Lusis AJ, Rotter JI, Sparkes RS. „Molecular genetics of coronary artery disease. Candidate genes and processes in atherosclerosis“. Karger Verlag, Basel, Freiburg, Paris 1992, 14.Auflage
 105. Mansour-Chemaly M, Haddy N, Siest G, Visvikis S. Family studies: their role in the evaluation of genetic cardiovascular risk factors. *Clin Chem Lab Med.* 40 (2002), 1085-1096.
 106. Marenberg ME, Risch N, Berkman LF, Floderus B, de Faire U. Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins. *N Engl J.Med.* 330 (1994), 1041-1046.
 107. Matarin M, Brown WM, Scholz S, Simon-Sanchez J, Fung HC, Hernandez D, Gibbs JR, De Vrieze FW, Crews C, Britton A, Langefeld CD, Brott TG,

- Brown RD Jr, Worrall BB, Frankel M, Silliman S, Case LD, Singleton A, Hardy JA, Rich SS, Meschia JF. A genome-wide genotyping study in patients with ischaemic stroke: Initial analysis and data release. *Lancet Neurol*.6 (2007), 414-420.
108. Matarin M, Brown WM, Singleton A, Hardy JA, Meschia JF. Whole Genome Analyses Suggest Ischemic Stroke and Heart Disease Share an Association with Polymorphisms on Chromosome 9p21. *Stroke* 39 (2008), 1586-1589.
109. McPherson R, Pertsemlidis A, Kavaslar N, Stewart A, Roberts R, Cox DR, Hinds DA, Pennacchio LA, Tybjaerg-Hansen A, Folsom AR, Boerwinkle E, Hobbs HH, Cohen JC. A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science* 316 (2007), 1488-1491.
110. Miller DT, Zee RYL, Danik JS, Kozlowski P, Chasman DI, Lazarus R, Cook NR, Ridker PM, Kwiatkowski DJ. Association of common CRP gene variants with CRP levels and cardiovascular events. *Ann Hum Genet* 69 (2005), 623-38.
111. Miserez AR, Braun JR. Anwendung genetischer Prinzipien zur Ursachenabklärung der Atherosklerose. *Therapeutische Umschau*, 52 (1995), 835-843.
112. Mooradian, A. Cardiovascular disease in type 2 diabetes mellitus: current management guidelines. *Arch Intern Med* 163 (2003), 33-40.
113. Moore JE Jr., Xu C, Glagov S, Zarins CK, Ku DN. Fluid wall shear stress relationship to atherosclerosis. *Atherosclerosis* 110 (1994), 225-240.
114. Morgan TM, Krumholz HM, Lifton RP, Spertus JA. Nonvalidation of reported genetic risk factors for acute coronary syndrome in a large-scale replication study. *JAMA* 297 (2007), 1551-1561.
115. Muller DW, Topol EJ, Califf RM, Sigmon KN, Gorman L, George BS, Kereiakes DJ, Lee KL, Ellis SG. Relationship between antecedent angina pectoris and short-term prognosis after thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. Thrombolysis and Angioplasty in Myocardial Infarction (TAMI) Study Group. *Am Heart J* 119 (1990), 224-31.
116. Murray CJ, Lopez AD. Global mortality, disability and the contribution of risk factors. *Global Burden of Disease Study*. *Lancet* 349 (1997), 1436-42.

117. Myers RH, Kiely DK, Cupples LA, Kannel WB. Parental history is an independent risk factor for coronary artery disease: the Framingham Study. *Am Heart J.* 120 (1990), 963-969.
118. Ogsten B, Bennet N, Ogsten C. The influence of cigarette smoking on the plasma fibrinogen concentration. *Atherosclerosis* 11 (1079), 349-353.
119. Ortlepp JK, HG; Hanrath P. Polymorphismen-Genetische Risikofaktoren der koronaren Herzerkrankung?
Dtsch Med Wochenschr. 124 (1999), 600-608.
120. Pasmant E, Lauremdeau L, Heron D, Vidaud M, Vidaud D, Bieche I. Characterisation of germ-line deletion, including the entire INK4/ARF locus in a melanoma-neural system tumor family: identification of ANRIL, an antisense non-coding RNA whose expression co-clusters with ARF. *Cancer Res* 67 (2007), 3963-9.
121. Paul A, Ko KW, Li L, Yechoor V, McCrory MA, Szalai AJ, Chan L. C-reactive protein accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 109 (2004), 647-55.
122. Pfizer Pharma GmbH (2010). Atherosklerose
(<http://www.herz-info.de/atherosklerose/index.htm>) Stand: 09.06.2010.
123. Poche R., Poche-de Vos F, Hauptmann S. Pathologische Anatomie der Koronarinsuffizienz und des Herzinfarkts. In: „Herzkrankheiten: Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie“, Roskamm H, Reindell R (Hrsg.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1996, 4. Auflage, 584-600.
124. Poeck K, Hacke W „Neurologie“, Springer Medizinverlag, Heidelberg, 2006, 12. Auflage
125. Prasanna P, Pike S, Peng K, Shane B, Appling DR. Human mitochondrial C1-tetrahydrofolate synthase: gene structure, tissue distribution of the mRNA, and immunolocalization in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 278 (2003), 43178-87.
126. Prodzinsky R, Werdan K. Akute Koronarsyndrome. In: „Das Herzbuch Praktische Herz-Kreislauf-Medizin“, Werdan K, Trappe HJ, Zerkowski HR (Hrsg.), Urban u. Fischer Verlag, München, Jena, 2003, 1. Auflage, 454-462.

127. Qin BY, Lam SS, Correia JJ, Lin K. Smad3 allostery links TGF-beta receptor kinase activation to transcriptional control. *Genes Dev* 16 (2002), 1950-63.
128. Randak C, Roschinger W, Rolinski B, Hadorn HB, Applegarth DA, Roscher AA. Three siblings with nonketonic hyperglycinaemia, mildly elevated plasma homocysteine concentrations and moderate methylmalonic aciduria. *J Inher Metab Dis* 23 (2000), 520-2.
129. Reifenberg K, Lehr HA, Baskal D, Wiese E, Schaefer SC, Black S, Samols D, Torzewski M, Lackner KJ, Husmann M, Blettner M, Bhakadi S. Role of C-reactive protein in atherogenesis: can the apolipoprotein E knockout mouse provide the answer? *Arterioscler Thromb Vasc. Biol.* 25 (2005), 1641-1646.
130. Ridker PM, Buring JE, Shih J, Matias M, Hennekens CH. Prospektive study of C-reactive protein and the risk of future cardiovascular events among apparently healthy women. *Circulation* 98 (1998), 731-3.
131. Ridker PM, Glynn RJ, Hennekens CH. C-reactive protein adds to the predictive value of total and HDL cholesterol in determining risk of first myocardial infarction. *Circulation* 97 (1998), 2007-11.
132. Riede, UN, Schäfer HE. „Allgemeine und spezielle Pathologie“, Georg Thieme Verlag, Stuttgart/New York, 1993, 2.Auflage.
133. Rinkel, GJE, Djibuti M, Algra A, van Gijn J. Prevalence and risk of rupture of intracranial aneurysms: A systemic review. *Stroke* 29 (1989), 251-256.
134. Risch N, Zhang H. Extreme discordant sib pairs for mapping quantitative trait loci in humans. *Science* 268 (1995), 1584-1589.
135. Rosenkranz S. Grundlagen der Atherosklerose. Klassische Risikofaktoren. In: „Prävention atherosklerotischer Erkrankungen“, Rosenkranz S, Schneider CA, Erdmann E (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, 2006, 1. Auflage, 7-17.
136. Roskamm H, Neumann, FJ, Kalusche D, Bestehorn HP. „Herzkrankheiten“, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 2004.
137. Ross R, Glomset J. The pathogenesis of Atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.* 295 (1976), 369-377, 420-425.
138. Ross R, Glomset J. Response to injury and atherosclerosis. *Am J Pathol* 86 (1977), 675-684.

139. Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362 (1993), 801-808.
140. Samani NJ, Braund PS, Erdmann J, Goötz A, Tomaszewski M, Linsel-Nitschke P, Hajat C, Mangino M, Hengstenberg C, Stark K, Ziegler A, Caulfield M, Burton PR, Schunkert H, Tobin MD. The novel genetic variant predisposing to coronary artery disease in the region of the PSRC1 and CELSR2 genes on chromosome 1 associates with serum cholesterol. *J Mol Med.* 86 (2008), 1233-1241.
141. Samani NJ, Erdmann J, Hall AS, Hengstenberg C, Mangino M, Mayer B, Dixon RJ, Meitinger T, Braund P, Wichmann H-E, Barrett JH, König IR, Stevens SE, Szymczak S, Tregouet D-A, Iles MM, Pahlke F, Pollard H, Lieb W, Cambien F, Fischer M, Ouwehand W, Blankenberg S, Balmforth AJ, Baessler A, Ball SG, Strom TM, Brænne I, Gieger C, Deloukas P, Tobin MD, Ziegler A, Thompson JR, Schunkert H, for the WTCCC and the Cardiogenics Consortium. Genomewide association analysis of coronary artery disease. *New Engl J Med* 357 (2007), 443-453.
142. Samani NJ, Raitakari OT, Sipilä K, Tobin MD, Schunkert H, Juonala M, Braund PS, Erdmann J, Viikari J, Moilanen L, Taittonen L, Jula A, Jokinen E, Laitinen T, Hutri-Kähönen N, Nieminen MS, Kesäniemi YA, Hall AS, Hulkkonen J, Kähönen M, Lehtimäki T. Coronary Artery Disease-Associated Locus on Chromosome 9p21 and Early Markers of Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28 (2008), 1769-1683
143. Samani NJ, Schunkert H. Chromosome 9p21 and cardiovascular disease: the Story unfolds. *Circ Cardiovasc Genet.* 1 (2008), 81-4.
144. Samani NJ, Thompson JR, O'Tolle L, Channer K, Woods KL. A meta analysis of the association of the deletion allele of the angiotensin-converting enzyme gene with myocardial infarction. *Circulation* 94 (1996),708-712
145. Sandhu MS, Waterworth DM, Debenham SL, Wheeler E, Papadakis K, Zhao JH, Song K, Yuan X, Johnson T, Ashford S, Inouye M, Luben R, Sims M, Hadley D, McArdle W, Barter P, Kesäniemi YA, Mahley RW, McPherson R, Grundy SM, Wellcome Trust Case Control Consortium, Bingham SA, Khaw KT, Loos RJ, Waeber G, Barroso I, Strachan DP, Deloukas P, Vollenweider P, Wareham NJ, Mooser V. LDL-cholesterol

- concentrations: a genome-wide association study. *Lancet* 371 (2008), 483-491.
146. Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, Burtt NP, de Bakker PI, Chen H, Roix JJ, Kathiresan S, Hirschhorn JN, Daly MJ, Hughes TE, Groop L, Altshuler D, Almgren P, Florez JC, Meyer J, Ardlie K, Bengtsson Boström K, Isomaa B, Lettre G, Lindblad U, Lyon HN, Melander O, Newton-Cheh C, Nilsson P, Orho-Melander M, Råstam L, Speliotes EK, Taskinen MR, Tuomi T, Guiducci C, Berglund A, Carlson J, Gianniny L, Hackett R, Hall L, Holmkvist J, Laurila E, Sjögren M, Sterner M, Surti A, Svensson M, Svensson M, Tewhey R, Blumenstiel B, Parkin M, Defelice M, Barry R, Brodeur W, Camarata J, Chia N, Fava M, Gibbons J, Handsaker B, Healy C, Nguyen K, Gates C, Sougnez C, Gage D, Nizzari M, Gabriel SB, Chirn GW, Ma Q, Parikh H, Richardson D, Ricke D, Purcell S. Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science* 316 (2007), 1331-1336.
147. Schildkraut JM, Myers RH, Cupples LA, Kiely DK, Kannel WB. Coronary risk associated with age and sex of parental heart disease in the Framingham Study. *Am J Cardiol.* 64 (1989), 555-559.
148. Schievink WI. Intracranial aneurysms. *N Engl J Med.* 336 (1997), 28-40.
149. Schuler G, Hambrecht R, Schlierf G, Niebauer J, Hauer K, Neumann J, Hoberg E, Drinkmann A, Bacher F, Grunze M. Regular physical exercise and low-fat diet. Effects on progression of coronary artery disease. *Circulation* 86 (1992), 1-11.
150. Schunkert H, Götz A, Braund P, McGinnis R, Tregouet D-A, Mangino M, Linsel-Nitschke P, Cambien F, Hengstenberg C, Stark K, Blankenberg S, Tiret L, Ducimetiere P, Keniry A, Ghorri MJR, Schreiber S, El Mokhtari NE, Hall AS, Dixon RJ, Goodall AH, Liptau H, Pollard H, Schwarz DF, Hothorn LA, Wichmann H-E, König IR, Fischer M, Meisinger C, Ouwehand W, Deloukas P, Thompson JR, Erdmann J, Ziegler A, Samani NJ. Repeated replication and a prospective meta-analysis of the association between chromosome 9p21.3 and coronary artery disease. *Circulation.* 117 (2008), 1675-1684.

151. Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL. A genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science* 316 (2007), 1341-1345.
152. Shen GQ, Li L, Rao S, Abdullah KG, Ban JM, Lee BS, Park JE, Wang QK. Four SNPs on chromosome 9p21 in a South Korean Population implicate a genetic locus that confers high cross-race risk for development of coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28 (2008), 360-365.
153. Shen GQ, Rao S, Martinelli N, Li L, Olivieri O, Corrocher R, Abdullah KG, Hazen SL, Smith J, Bernard J, Plow EF, Girelli D, Wang QK. Association between four SNPs on chromosome 9p21 and myocardial infarction is replicated in an Italian population. *Journal of Human Genetics*. 53 (2008), 144-150.
154. Smith JG, Melander O, Lökvist H, Hedblad B, Engström G; Nilsson P, Carlson, J, Berglund G, Norrving B, Lindgren A. Common genetic variants on chromosome 9p21 confers risk of ischemic stroke: a large-scale genetic association study. *Circ Cardiovasc Genet* 2 (2009), 159-164.
155. Stampfer M, Hennekens C, Sacks F, Salvini S, Willet W. A prospective study of cholesterol, apolipoproteins and the risk for myocardial infarction. *N Engl J Med* 325 (1991), 373-381.
156. Stry HC. Composition and classification of human atherosclerotic lesions. *Virchows Archiv. A Pathological anatomy and histopathology*. 421 (1992), 277-290.
157. Stry HC. Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults. *Arteriosclerosis* 9 (1989), 119-132.
158. Stry HC. Natural History and Histological Classification of Atherosclerotic Lesions, An Update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 20 (2000), 1177-1178.
159. Stry HC, Chandler A, Dinsmore R, Fuster V, Glagov S, Insull W, Rosenfeld M, Schwartz C, Wagner W, Wissler R. A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb and Vasc Biol*. 15 (1995), 1512-1531.
160. Stry HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the

- committee on vascular lesions of the council on atherosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 89 (1994), 2462- 78.
161. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden. Gesundheit. Todesursachen in Deutschland. Gestorbene in Deutschland an ausgewählten Todesursachen im Jahre 2007
(<http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Navigation/Publikationen/Fachveroeffentlichungen/Fachveroeffentlichungen.psm>) Stand: 30.11.2009
162. Stein E. Management of dyslipidemia in the high risk patient. *Am Heart J* 144 (2002), 43-50.
163. Stobbe H, Baumann G. „Innere Medizin, Grundlagen und Klinik innerer Krankheiten“ Ullstein Mosby, Berlin, Wiesbaden, 1996, 7. überarbeitete und erweiterte Auflage, 265-2937.
164. Suk HJ, Ridker PM, Cook NR, Zee RYL. Relation of polymorphisms within the C-reactive protein gene and plasma CRP levels. *Atherosclerosis* 178 (2005), 139-45.
165. Tang Z, Tracy RP. Candidate genes and confirmed genetic polymorphisms associated with cardiovascular diseases: a tabular assessment. *J Thromb Thrombolysis* 11 (2001), 49-81.
166. Teupser D., Thiery J. „Update“ in der Pathogenese der Atherosklerose und neue Risikofaktoren der KHK. Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik, Universitätsklinikum Leipzig.
http://www.klinikundforschung.de/sup/8_3/thiery.htm Stand: 16.11.2009
167. The Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 447 (2007), 661-678.
168. Torzewski M, Ochsenhirt V, Kleschyov AL, Oelze M, Daiber A, Li H, Tsimikas S, Reifenberg K, Cheng F, Canisius A, Lehr HA, Bankenberg S, Förstermann U, Münzel T, Lackner KJ. Deficiency of glutathione peroxidase 1 accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27 (2007), 850-7.
169. Trion A, de Maat MP, Jukema JW, van der Laarse A, Maas C, Offerman EH, Havekes LM, Szalai AJ, Princen HM, Emeis JJ. No effect of C-

- reactive protein on early atherosclerosis development in apolipoprotein E* 3-leiden/human C-reactive protein transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25 (2005), 1635-40.
170. Valdes A, Gefter W, Rut A, Rader D, Tate H, Wolfe M. Association of traditional risk factors with coronary calcification in persons with a family history of premature coronary heart disease: the study of the inherited risk of coronary atherosclerosis. *J Invest Med* 49 (2001), 353-361.
171. Van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* 89 (1994), 36-44.
172. Wagner J. "Praktische Kardiologie für Studium und Praxis, de Gruyter, Berlin, New York, 2. Auflage, 242-260.
173. Wallace C, Newhouse SJ, Braund P, Zhang F, Tobin M, Falchi M, Ahmadi K, Dobson RJ, Marçano AC, Hajat C, Burton P, Deloukas P, Brown M, Connell JM, Dominiczak A, Lathrop GM, Webster J, Farrall M, Spector T, Samani NJ, Caulfield MJ, Munroe PB. Genome-wide association study identifies genes for biomarkers of cardiovascular disease: serum urate and dyslipidemia. *Am J Hum Genet.* 82 (2008), 139-149.
174. Willer CJ, Sanna S, Jackson AU, Scuteri A, Bonnycastle LL, Clarke R, Heath SC, Timpson NJ, Najjar SS, Stringham HM, Strait J, Duren WL, Maschio A, Busonero F, Mulas A, Albai G, Swift AJ, Morken MA, Narisu N, Bennett D, Parish S, Shen H, Galan P, Meneton P, Hercberg S, Zelenika D, Chen WM, Li Y, Scott LJ, Scheet PA, Sundvall J, Watanabe RM, Nagaraja R, Ebrahim S, Lawlor DA, Ben-Shlomo Y, Davey-Smith G, Shuldiner AR, Collins R, Bergman RN, Uda M, Tuomilehto J, Cao A, Collins FS, Lakatta E, Lathrop GM, Boehnke M, Schlessinger D, Mohlke KL, Abecasis GR. Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. *Nat Genet.* 40 (2008), 161-169.
175. Walkup AS, Appling DR. Enzymatic characterization of human mitochondrial C1-tetrahydrofolate synthase. *Arch Biochem Biophys* 442 (2005), 196-205.

176. Wasmuth HE, Matern S, Lammert F. From genotypes to haplotypes in hepatobiliary diseases: one plus one equals (sometimes) more than two. *Hepatology* 39 (2004), 604-7.
177. Wattanaki K., Folsol AR, Chambless LE, Nieto FJ. Risk factors for cardiovascular event recurrence in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Am Heart J* 149 (2005), 606-612.
178. Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med* 338 (1998), 1042-50.
179. Wikipedia (2010) Polymerasekettenreaktion (<http://de.wikipedia.org/wiki/Polymerase-Kettenreaktion>) Stand:13.01.2010
180. Wirth A, Gohlke H. Rolle des Körpergewichts für die Prävention der koronaren Herzkrankheit. *Zeitschrift für Kardiologie*, 94 (2005), III/22-III/29.
181. Witt BJ, Brown RD Jr, Jacobsen SJ, Weston SA, Yawn BP, Roger VL. A community-based study of stroke incidence after myocardial infarction. *Ann Intern Med.* 143 (2005), 785-792.
182. World Health Organisation Study Group. Diabetes mellitus. WHO Tech Rep Ser. 727 (1985), 1-104.
183. Wrba F, Dolzinig H, Mannhalter C. „Genetik verstehen, Grundlagen der molekularen Biologie“, Universitätsverlag, Wien, Österreich, 2007.
184. Ye S, Willeit J, Kronenberg F, Xu Q, Kiechl S. Association of genetic variation on chromosome 9p21 with susceptibility and progression of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 52 (2008), 378-384.
185. Yamada Y, Ichihara S, Nishida T. Molecular genetics of myocardial infarction. *Genomic Med.* 2 (2008), 7-22.
186. Yun DD, Alpert JS. Acute coronary syndromes. *Cardiology* 88 (1997), 223-237.
187. Zeggini E. Weedon MN, Lindgren CM, Frayling TM, Elliott KS, Lango H, Timpson NJ, Perry JR, Rayner NW, Freathy RM, Barrett JC, Shields B, Morris AP, Ellard S, Groves CJ, Harries LW, Marchini JL, Owen KR, Knight B, Cardon LR, Walker M, Hitman GA, Morris AD, Doney AS; Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC), McCarthy MI, Hattersley AT. Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science* 316 (2007), 1336-1341.

Zheng H, Fu G, Dai T, Huang H. Migration of endothelial progenitor cells mediated by stromal cell-derived factor-1alpha/CXCR4 via PI3K/Akt/eNOS signal transduction pathway. *J Cardiovasc Pharmacol.* 50 (2007), 274-280.

7 Veröffentlichung

Hoppmann P, Erl A, Türk S, Tiroch K, Mehilli J, Schömig A, Kastrati A, Koch W. No Association of Chromosome 9p21.3 Variation with clinical and angiographic outcomes after placement of Drug-Eluting Stents. *Journal of the American College of Cardiology/Cardiovascular interventions*. (2) 2009, 1149-1155.

Koch W, Türk S, Erl A, Hoppmann P, Pfeufer A, King L, Schömig A, Kastrati A. The chromosome 9p21 region and myocardial infarction in a European population. *Atherosclerosis*. (1) 2011, 220-6.

8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Schömig, Direktor der Medizinischen Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München und des Deutschen Herzzentrum München, danke ich sehr für die Möglichkeit, die vorliegende Dissertation durchführen zu können.

Zusätzlich bedanke ich mich bei Herrn Univ.-Prof. A. Kastrati für die Überlassung des Themas.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. W. Koch für die freundliche Betreuung der Arbeit.

Ein großer Dank gilt Frau Dr. Hoppmann für die präzise und ausführliche Betreuung der Arbeit.

Großer Dank gilt auch dem ganzen Team im Labor, Frau Marianne Eichinger, Frau Angela Ehrenhaft, Herrn Wolfgang Latz sowie allen Mitarbeitern des Labors der experimentellen Kardiologie des Deutschen Herzzentrums für die Unterstützung und sehr hilfreichen Ratschläge während des experimentellen Teils der Arbeit.