

Die Bedeutung der Methylentetrahydrofolatreduktase-Gen-C₆₇₇T und A₁₂₉₈C-Polymorphismen, Plasma-Homocystein-, Folsäure- und Vitamin B₁₂-Konzentration für die koronare Herzerkrankung

Harald Eckart Lengnick

Klinik für Herz- und Kreislauferkrankungen, Deutsches Herzzentrum München,
des Freistaates Bayern
Technische Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig)

Die Bedeutung der Methylentetrahydrofolatreduktase-Gen- $C_{677}T$ und
 $A_{1298}C$ -Polymorphismen, Plasma-Homocystein-, Folsäure- und Vitamin
 B_{12} -Konzentration für die koronare Herzerkrankung

Harald Eckart Lengnick

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. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. A. Kastrati

2. apl. Prof. Dr. P.B. Lippa

Die Dissertation wurde am 17.05.2005 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin 14.09.2005 angenommen.

„Wahrheit an sich ist kostbar.
Kostbarer aber noch die Fähigkeit, sie zu
finden.“

(Alexander von Humboldt, 1769-1859)

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	8
1.1 Der heutige Kenntnisstand über Homocystein (Hcy)	8
1.2 Der Hcy-Stoffwechsel	10
1.3. Ursachen für erhöhte Hcy-Spiegel und Hyperhomocysteinämie	
1.3.1 Definition der Hyperhomocysteinämie	12
1.3.2 Genetische Faktoren	12
1.3.3 Nutritive Faktoren	13
1.3.4 Weitere Faktoren, die zu einer Erhöhung des Hcy-Spiegels führen können	14
1.4 Pathomechanismen: Hcy-Wirkung auf den Organismus	16
1.4.1 Endothelschäden und endotheliale Dysfunktion	16
1.4.2 Direkte Wirkung von Hcy auf Blutplättchen	18
1.4.3 Glatte Muskelzell-Proliferation	18
1.4.4 Endothel-Leukozyten-Interaktion	19
1.5 Folsäure sowie Vitamin B ₁₂ und ihre Bedeutung im Hcy-Stoffwechsel	20
1.5.1 Folsäure	20
1.5.2 Vitamin B ₁₂	21
2 Fragestellung	22
3 Methoden	24
3.1 Studienpopulation	24
3.2 Definition der traditionellen Risikofaktoren/Messmethoden	24
3.3 Blutentnahme und Blutproben	25
3.3.1 Bestimmung von Hcy	26
3.3.2 Bestimmung von Folsäure	26
3.3.3 Bestimmung von Vitamin B ₁₂	27
3.4 MTHFR-Genotyp-Bestimmung	28
3.4.1 Restriktionsenzymanalyse und TaqMan-Verfahren	28
3.4.2 Bestimmung der MTHFR-Genotypen	29

3.5 Material und Geräte	32
3.6 Statistik	33
4 Ergebnisse	34
4.1 Zusammenhang zwischen den MTHFR-Gen-Polymorphismen und der Plasma-Konzentration von Hcy, Folsäure und Vitamin B ₁₂	34
4.1.1 Verteilung der Genotypen der MTHFR-Gen-Polymorphismen	34
4.1.2 MTHFR-Gen-Polymorphismen und Hcy, Folsäure und Vitamin B ₁₂	34
4.2 Beziehung zwischen den MTHFR-Gen-Polymorphismen und KHE	37
4.2.1 Studienpopulation für die Untersuchung von MTHFR- Polymorphismen und KHE	37
4.2.2 Zusammenhang zwischen den MTHFR-Polymorphismen und KHE	38
4.3 Beziehung zwischen den MTHFR-Gen-Polymorphismen und dem Schweregrad der KHE	41
4.3.1 Studienpopulation für die Untersuchung von MTHFR- Polymorphismen und Schweregrad der KHE	41
4.3.2 Zusammenhang zwischen den MTHFR-Gen-Polymorphismen und dem Schweregrad der KHE	42
4.4 Zusammenhang zwischen KHE und Hcy, Folsäure und Vitamin B ₁₂	44
4.4.1 Hcy-, Folsäure- und Vitamin B ₁₂ -Konzentration in der Patientengruppe und der Kontrollgruppe	44
4.5 Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der KHE und Hcy, Folsäure und Vitamin B ₁₂	45
4.5.1 Hcy-, Folsäure- und Vitamin B ₁₂ -Konzentration in Abhängigkeit vom Schweregrad der KHE	45
4.6 Multivarianzanalyse	46
5 Diskussion	48
6 Zusammenfassung	64
7 Literaturverzeichnis	68
8 Curriculum Vitae	88
9 Danksagung	90

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AP	Alkalische Phosphatase
bp	Basenpaare
BMI	Body Mass Index
CBS	Cystathionin- β -Synthase
cDNA	Cyclic desoxyribonucleid acid
CI	Confidence interval
CL	Cystathionin- γ -Lyase
CNI	Chronische Niereninsuffizienz
CVD	Cardiovascular disease
DHZ	Deutsches Herzzentrum München
DNA	Desoxyribonucleid acid
DTT	Dithiothreitol
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FBP	Folsäurebindungsprotein
FPIA	Fluoreszenz-Polarisationsimmunoassay
GE	Gefässerkrankung
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
Hcy	Homocystein
HUVEC	Humane Umbilicalvenen-Endothelzellen
KHE	Koronare Herzerkrankung
LDL	Low-density-Lipoprotein
Lp (a)	Lipoprotein (a)
5-Methyl-THF	5-Methyltetrahydrofolsäure
MTHFR	Methylentetrahydrofolatreduktase

Abkürzungsverzeichnis

n	Anzahl der Individuen
NO	Stickstoffmonoxid
OR	Odds Ratio
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PCR	Polymerasekettenreaktion
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
RNA	Ribonucleid acid
RR	Relatives Risiko
SAH	S-Adenosyl-Homocystein
SAM	S-Adenosyl-Methionin
TF	Tissue factor
tPA	Tissue plasminogen activator
TU	Technische Universität
TVT	Tiefe Venenthrombose
V	Volt

1 Einleitung

1.1 Der heutige Kenntnisstand über Homocystein

Die Bedeutung der Aminosäure Homocystein (Hcy) als unabhängiger Risikofaktor für die Genese atherosklerotischer Gefäßveränderungen ist Gegenstand einer aktuellen wissenschaftlichen Diskussion (11, 61). Hyperhomocysteinämie und Hyperhomocystinurie werden mit einer Vielzahl von Erkrankungen wie zum Beispiel koronarer Herzerkrankung (KHE), peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) oder zerebrovaskulären Ereignissen in Verbindung gebracht (13, 131, 145).

Zu den Ursachen für Hyperhomocysteinämie werden u.a. genetische Faktoren (MTHFR-Gen-C₆₇₇T und A₁₂₉₈C-Polymorphismen), nutritive Faktoren (Folsäure- und Vitamin B₁₂-Mangel), eingeschränkte Nierenfunktion, Alter und Geschlecht, verhaltensassoziierte Faktoren (z.B. Nikotinabusus), verschiedene Krankheitsbilder (u.a. Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson), Interaktionen von Hcy mit Medikamenten und endokrine Faktoren gezählt (siehe Tabelle I) (29, 83). Die durch Hcy ausgelösten Pathomechanismen bei der Genese der Atherosklerose sind vielfältig: Hcy hat beispielsweise Einfluss auf oxidative Prozesse, auf das Gerinnungs- und Fibrinolyse-System, auf die Zellsynthese und -proliferation, die Kollagensynthese sowie auf den Cholesterinstoffwechsel in der Leber (94, 95).

Genetische Polymorphismen, welche für die am Hcy-Metabolismus beteiligten Enzyme codieren, werden für erhöhte Hcy-Plasmaspiegel verantwortlich gemacht. Insbesondere das MTHFR-Gen steht, auf Grund seiner Bedeutung für die physiologische MTHFR-Funktion, im Mittelpunkt des Interesses: der MTHFR-Gen-C₆₇₇T-Polymorphismus (CC₆₇₇, CT₆₇₇, TT₆₇₇-Genotypen) war in einigen Studien assoziiert mit einer verminderten Enzymaktivität sowie um ca. 25% erhöhten Plasma-Hcy-Werten (12, 15, 44).

Experimentelle Studien haben gezeigt, dass die MTHFR-C₆₇₇T-Variante eine verminderte Affinität zu dem enzymatischen Cofaktor Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) besitzt, verbunden mit einer verminderten Enzymaktivität (159). Zur Aufrechterhaltung der Enzymfunktion konnte dem Verlust von FAD durch die Gabe von Folsäurederivaten entgegengewirkt werden (55). Diese Beobachtung gibt einen Hinweis darauf, dass Folsäure sowie Vitamin B₁₂ im Metabolismus von Hcy eine wesentliche Rolle spielen: der Mangel eines dieser Vitamine wird mit erhöhten

Plasma-Hcy-Konzentrationen in Verbindung gebracht, da die genannten Vitamine als Cofaktoren für Hcy-metabolisierende Enzyme fungieren (140).

Der MTHFR-Gen-A₁₂₉₈C-Polymorphismus führte in wenigen durchgeführten Studien zu signifikant erhöhten Plasma-Hcy-Konzentrationen. Ausserdem zeigte sich in einigen Studien ein Effekt auf die Hcy-Konzentration bei gleichzeitigem Auftreten der MTHFR-C₆₇₇T und A₁₂₉₈C-Gen-Polymorphismen (14, 156).

Arbeiten, welche den Zusammenhang zwischen dem MTHFR-Gen-C₆₇₇T-Polymorphismus und der KHE untersuchten, führten nicht zu einheitlichen Ergebnissen. Einzelne Studien stellten die Hypothese auf, dass der C₆₇₇T-Polymorphismus durch seinen Einfluss auf die Plasma-Hcy-Konzentration eine Rolle in pathophysiologischen Prozessen der KHE spielt (48, 73). Der TT₆₇₇-Genotyp wurde in manchen Studien als KHE-Risikofaktor beschrieben, während andere Untersuchungen diese Assoziation nicht feststellten (12, 73).

Für den MTHFR-Gen-A₁₂₉₈C-Polymorphismus liegen ebenfalls unterschiedliche Studienergebnisse in der internationalen Literatur vor, die entweder für oder gegen eine Beteiligung des Polymorphismus an der KHE sprechen (41, 60, 132).

Die einzelnen Arbeiten setzten unterschiedliche Beobachtungsschwerpunkte und zeigten kein einheitliches Studienprofil (19, 65, 73, 115).

Ein kausaler Zusammenhang zwischen milder Hyperhomocysteinämie und Atherosklerose konnte bisher nicht ohne begründeten Zweifel dargestellt werden und bleibt, aus diesem Grunde, Gegenstand der aktuellen Diskussion (3).

In der vorliegenden Studie wurde evaluiert, ob zwischen dem MTHFR-Gen-C₆₇₇T und A₁₂₉₈C-Polymorphismus und der Plasma-Hcy-Konzentration sowie dem Auftreten und dem Schweregrad der KHE innerhalb einer grossen, mit Koronarangiographie untersuchten Patientenpopulation, ein Zusammenhang besteht.

1.2 Der Hcy-Stoffwechsel

Hcy ist eine schwefelhaltige, α -aliphatische Aminosäure, die in mehreren biochemischen Schritten aus der essentiellen Aminosäure Methionin gebildet wird (siehe dazu Abbildung I). Methionin wiederum wird mit der Nahrung (ca. 2g/Tag) aufgenommen (158). Hcy ist zu 70-80% an Albumin im Plasma gebunden, in 20-30% der Fälle tritt Hcy in Form von Homocystin- oder Hcy-Cystein-Disulfiden auf. Nur ein geringer Teil liegt in freier, ungebundener Form vor (130). Hcy ist kein Bestandteil der Proteinbiosynthese (66).

Methionin wird im Organismus zu S-Adenosyl-Methionin (SAM) abgebaut, welches einen wichtigen Methylgruppen-Donor im menschlichen Stoffwechsel darstellt. SAM wird beispielsweise für die Transmethylierung von DNA, RNA oder einiger Neurotransmitter benötigt. Nach Abgabe der Methylgruppe wird unter Beteiligung der Glycin-Methyltransferase (SAH-Synthase) S-Adenosyl-Hcy (SAH) gebildet. Im weiteren Verlauf führt die Hydrolyse von SAH schliesslich zur Bildung von Hcy (95). Das dabei entstehende Nebenprodukt Adenosin wird zu Harnsäure abgebaut (90). Bei niedriger intrazellulärer Konzentration von Hcy und Adenosin wird SAM auf direktem Wege zu Hcy verstoffwechselt. Die Transmethylierung stellt den einzigen Stoffwechselweg für die Hcy-Synthese des Organismus dar (28).

Der Hcy-Abbau, der in der Leber und in der Niere stattfindet (95), unterscheidet zum einen den Remethylierungsweg, auf welchem Hcy zu Methionin umgewandelt wird, zum anderen den Transsulfurierungsweg, an dessen Ende das Abbauprodukt Cystein steht (90). An der Remethylierung von Hcy zu Methionin (Methylierungszyklus) ist die Methionin-Synthase (MS) beteiligt, die das Vitamin B₁₂ als Cofaktor und 5-Methyltetrahydrofolsäure (5-Methyl-THF) als Methylgruppen-Donor verwendet. An dieser Stelle findet sich ein Verknüpfungspunkt mit dem Folsäurezyklus: die mit der Nahrung aufgenommene Folsäure wird zu Tetrahydrofolsäure umgebaut, welche unter Verwendung von Serin zu Methyltetrahydrofolsäure generiert wird. Methyltetrahydrofolsäure wird mit Hilfe des Enzyms MTHFR zu 5-Methyl-THF umgebaut. 5-Methyl-THF steht nun dem Enzym MS für die Remethylierung von Hcy zu Methionin zur Verfügung (siehe Abbildung I).

Darüber hinaus wird Hcy durch das Enzym Betain-Hcy-Methyltransferase in der Leber zu Methionin umgewandelt. Die dafür notwendige Methylgruppe liefert Betain,

Einleitung

welches zu N, N-Dimethylglycin umgewandelt wird (112).

Der Transsulfurierungsweg von Hcy zu Cystein läuft innerhalb einer irreversiblen Reaktion ab. Zunächst wird Hcy zusammen mit Serin von der Cystathionin- β -Synthase (CBS) zu Cystathionin umgewandelt (90). Dieses Zwischenprodukt wird von der Cystathionin- γ -Lyase (CL) in Cystein und das Nebenprodukt α -Ketobutyrat umgewandelt. Sowohl die CBS als auch die CL benötigen das Vitamin B₆ als Cofaktor. Cystein wird entweder in Glutathion eingebaut oder zu Sulfat genutzt und mit dem Urin ausgeschieden. Weitere Nebenprodukte sind Pyruvat und Taurin (siehe Abbildung I) (95, 112).

Unter physiologischen Stoffwechselbedingungen besteht ein striktes Gleichgewicht zwischen Bildung und Eliminierung von Hcy. Üblicherweise werden über 50% zu Methionin regeneriert, bei erhöhter Proteinaufnahme über die Nahrung steigt der über den Transsulfurierungsweg metabolisierte Anteil von Hcy an. Wird jedoch ein grösserer Teil Hcy gebildet als verstoffwechselt werden kann, beginnt die Zelle Hcy auszuschleiden. Daraus resultiert ein erhöhter Hcy-Spiegel in Plasma/Serum und Urin (106).

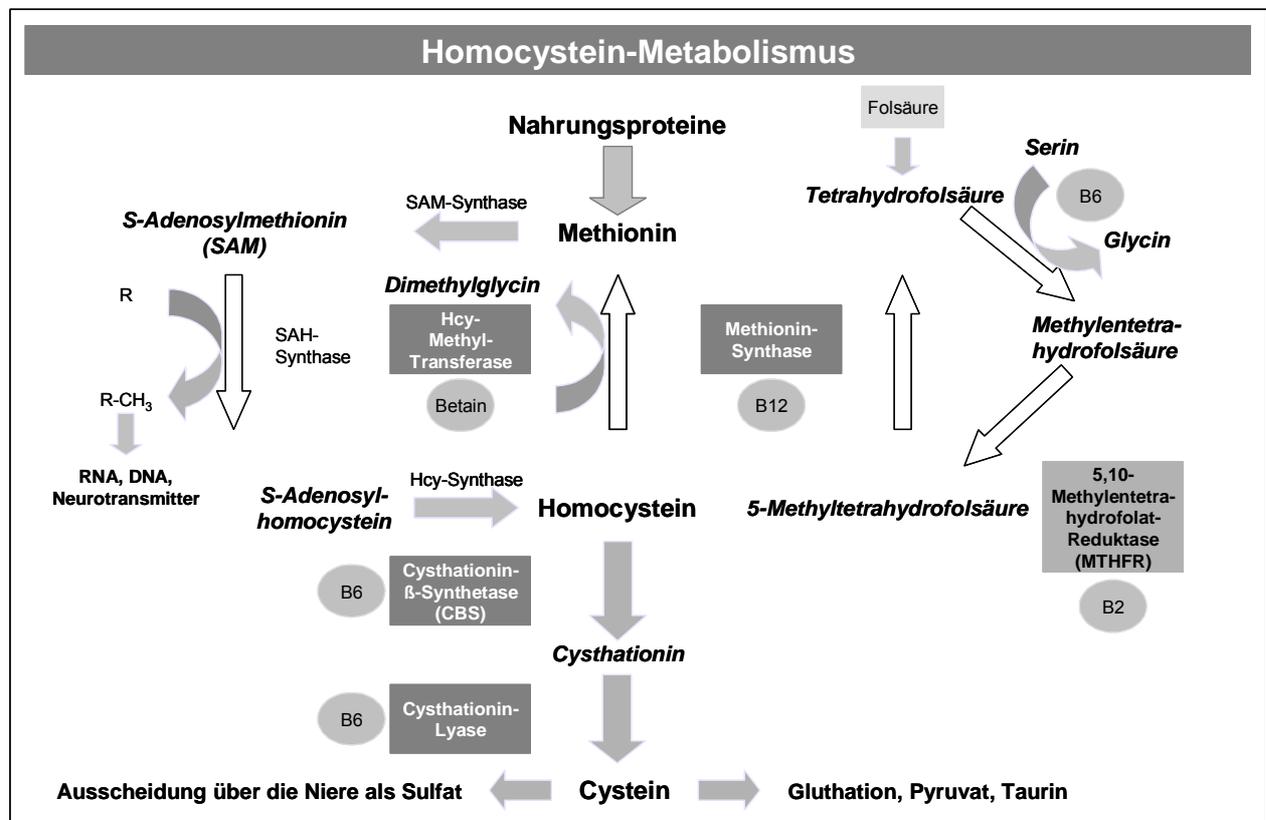


Abbildung I: Hcy-Metabolismus (75)

1.3 Ursachen für erhöhte Hcy-Spiegel und Hyperhomocysteinämie

1.3.1 Definition der Hyperhomocysteinämie

Der Referenzbereich für Plasma-Hcy wird international für Werte zwischen 5-15 $\mu\text{mol/l}$ angegeben (39). Die Klassifikation der Hyperhomocysteinämie unterscheidet eine milde Form mit Hcy-Konzentrationen zwischen $>15-30 \mu\text{mol/l}$, eine intermediäre Form zwischen $>30-100 \mu\text{mol/l}$ und eine schwere Form mit Hcy-Werten $>100 \mu\text{mol/l}$ (157).

Folgende Ursachen werden für erhöhte Hcy-Spiegel geltend gemacht:

1.3.2 Genetische Faktoren

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass genetische Defekte im Hcy-Metabolismus zu Hyperhomocysteinämie führen (12, 15, 44). Dabei beobachtete man im Wesentlichen Defekte bei der Remethylierung von Hcy zu Methionin durch Polymorphismen der MTHFR und bei der Transsulfurierung von Hcy zu Cystein durch die CBS (28).

Das Enzym MTHFR katalysiert die Reduktion von 5,10-Methylen-THF zu 5-Methyl-THF. Das MTHFR-Gen ist auf Chromosom 1p36.3 positioniert. Insgesamt konnten bisher zehn Mutationen des MTHFR-Gen durch Analyse von isolierter cDNA identifiziert werden (50, 159). Für die Ausbildung von Hyperhomocysteinämie werden bestimmte MTHFR-Gen-Polymorphismen verantwortlich gemacht: durch eine C₆₇₇T-Transition kommt es zur Ausbildung einer thermolabilen Variante (TT₆₇₇-Genotyp) der MTHFR (72). Diese Variante besitzt weniger als die Hälfte der normalen MTHFR-Aktivität, dadurch steigt das Risiko einer Hyperhomocysteinämie an (47). Diese autosomal-rezessiv vererbte Mutation führt dazu, dass an Position 222 des MTHFR-Polypeptids die Aminosäure Alanin anstatt Valin eingebaut wird (71).

Der TT₆₇₇-Genotyp variiert in seiner Häufigkeit innerhalb verschiedener untersuchter Bevölkerungsgruppen (0-16%) und ist mit erhöhten Homocysteinwerten assoziiert (29, 121). Die mutante MTHFR-Form unterscheidet sich von der intakten MTHFR durch die Inaktivierung bei Temperaturen um 46°C. Bei heterozygoten Merkmalsträgern des MTHFR-Gen-C₆₇₇T-Polymorphismus konnte bisher keine Hyperhomocysteinämie beobachtet werden, diese lag nur bei Trägern des TT₆₇₇-Genotyps vor (16, 37).

Der MTHFR-A₁₂₉₈C-Polymorphismus wird ebenfalls im Zusammenhang mit

Hyperhomocysteinämie diskutiert. Die Substitution der Aminosäure Alanin durch Glutamat auf Position 1298 führte zu einer verminderten MTHFR-Aktivität (1). Eine signifikante Assoziation des MTHFR-Gen-A₁₂₉₈C-Polymorphismus mit Hyperhomocysteinämie wurde in einigen Studien nachgewiesen (13, 156). Ausserdem wurden Genotypkombinationen der MTHFR-C₆₇₇T und A₁₂₉₈C-Polymorphismen hinsichtlich erhöhter Hcy-Konzentration untersucht: eine Studie an Hämodialyse-Patienten beobachtete signifikant erhöhte Hcy-Werte ($37,7 \pm 12,0$ $\mu\text{mol/l}$) bei Patienten mit der Genotypkombination CC₆₇₇/CC₁₂₉₈ (63). Die Kombinationen der MTHFR-Genotypen TT₆₇₇/AA₁₂₉₈ und CT₆₇₇/AC₁₂₉₈ waren bei Patienten mit Hämodialyse, Peritonealdialyse bzw. Nierentransplantation signifikant mit Hyperhomocysteinämie (>15 $\mu\text{mol/l}$) assoziiert (34, 35).

Eine weitere mögliche Ursache für Hyperhomocysteinämie (die zur Ausbildung einer Hyperhomocystinurie führen kann) ist ein genetischer Defekt innerhalb der Transsulfurierungsreaktion von Hcy zu Cystein. Das defekte Enzym CBS, dessen Punktmutation mit einer Häufigkeit von 1:20 000-1:200 000 auftritt, zeigte eine verminderte Substrat-Affinität zu Hcy. Heterozygote Merkmalsträger des autosomal-rezessiven Erbgangs entwickelten eine um ca. 50% verminderte CBS-Aktivität (74). Patienten mit einer frühzeitig auftretenden vaskulären Erkrankung waren zu 30-40% heterozygot für diese CBS-Mutation (138).

1.3.3 Nutritive Faktoren

Zahlreiche Studien lieferten den Nachweis für die Wichtigkeit der B-Vitamine innerhalb des Hcy-Metabolismus (127). Die therapeutische Gabe von Folsäure (singulär) und Kombinationen aus Vitamin B₂, B₆ und B₁₂ reduzierten die Hcy-Werte von Patienten mit normaler und erhöhter Plasma-Hcy-Konzentration (140, 152, 155). Eine Metaanalyse aus zwölf randomisierten Versuchsreihen ergab, dass eine Folsäure-Substitution zwischen 500-5000 $\mu\text{g/Tag}$ über den Zeitraum von 6-8 Wochen die Hcy-Konzentration um 25% (3,0 $\mu\text{mol/l}$) senkte. Der Hcy-Spiegel vor Behandlungsbeginn lag im Durchschnitt bei 12,0 $\mu\text{mol/l}$, nach Behandlungsende bei 9,0 $\mu\text{mol/l}$ (18). Durch gezielte Vitamin B₁₂-Substitution von 500 $\mu\text{g/Tag}$ wurde innerhalb derselben Studie eine Reduzierung von rund 7% des Hcy-Spiegels erreicht (18).

Studien mit Mensch und Tier zeigten, dass ein diätetisch begründeter Mangel an

Folsäure oder Cobalamin einen Anstieg zuvor im Referenzbereich liegender Hcy-Werte (5-15 µmol/l) auf moderate bis intermediäre Werte zur Folge hatte (28, 55).

1.3.4 Weitere Faktoren, die zu einer Erhöhung des Hcy-Spiegels führen können:

Die Nierenfunktion stellt eine wichtige Determinante für die Plasma-Hcy-Konzentration dar (32, 40). Erhöhte Hcy-Werte waren invers korreliert mit der Nierenfunktion, insbesondere im Rahmen einer verminderten glomerulären Filtrationsrate (GFR) (38, 125).

Chronische Niereninsuffizienz (CNI) zeigte eine Assoziation mit erhöhter Morbidität und Mortalität für kardiovaskuläre Erkrankung. Diese Assoziation konnte nur unzureichend durch die Wirkung anderer kardiovaskulärer Risikofaktoren erklärt werden (40, 59). Hyperhomocysteinämie wird als unabhängiger Risikofaktor bei Nierenerkrankungen im Endstadium diskutiert. Die Hcy-Werte waren bei diesen Patienten teilweise um das Dreifache des Normwertes erhöht (9, 146).

Die Plasma-Hcy-Werte stiegen mit zunehmendem Alter tendenziell an (4, 94). Bei Frauen wurde ein Anstieg der Hcy-Spiegel nach der Menopause verbunden mit erhöhtem KHE-Erkrankungsrisiko festgestellt (2, 115). Das Geschlecht (Frauen und Männer) wurde hinsichtlich der Hyperhomocysteinämie berücksichtigt, da gesunde Männer im Vergleich zu gleichaltrigen gesunden Frauen einen um 21% höheren Hcy-Wert aufwiesen (79, 86).

Eine positive Korrelation wurde zwischen Rauchen und erhöhtem Plasma-Hcy nachgewiesen (108, 129); ein zwölfmal erhöhtes KHE-Erkrankungsrisiko war die Folge der Kombination dieser beiden Faktoren (129). Exzessiver Alkohol- und Kaffeegenuss (>600 ml/Tag) sowie bewegungsarme Lebensweise wurden darüberhinaus im Zusammenhang mit erhöhten Hcy-Werten diskutiert (22, 54, 66, 128). Erhöhte Plasma-Hcy-Konzentrationen waren ausserdem in Verbindung mit verschiedenen Krankheitsbildern (6, 20, 37, 114), Arzneimitteln (23) sowie endokrinen Faktoren (102) nachweisbar (siehe Tabelle I).

Tabelle I: Zusammenfassung der Einflussfaktoren auf die Plasma-Hcy-Konzentration (27)

A Genetische Faktoren:

- MTHFR-Defekt I (C₆₇₇T- und A₁₂₉₈C-Polymorphismus)
- MTHFR-Defekt II: Kombinationsgenotypen (CC₆₇₇/CC₁₂₉₈, CT₆₇₇/AA₁₂₉₈, TT₆₇₇/AA₁₂₉₈)
- CBS- und MS-Defekt

B Nutritive Faktoren:

- Folsäure-Mangel
- Vitamin B₆ und B₁₂-Mangel

C Mit Hyperhomocysteinämie assoziierte Krankheitsbilder (u.a.):

- KHE
- PAVK, Atherothrombose, Thrombembolie
- Psoriasis
- Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer

D Verminderte Nierenfunktion (GFR↓)

E Alter und Geschlecht (♂)

F Verhaltensassoziierte Faktoren:

- Nikotinabusus
- Vitamin-Mangelernährung
- Alkohol- und Kaffeekonsum (>600 ml/Tag)
- Bewegungsarme Lebensweise

G Interaktion mit Medikamenten:

- Antiepileptika: Phenytoin, Carbamazepin
- Folsäure- und Vitamin B₆-Antagonisten: Methotrexat, Sulfasalazin, Trimethoprim
- Distickstoff
- Lipidsenker: Statine, Niacin, Fibrate, Cholestyramin
- L-Dopa
- Zytostatika: 6-Mercaptopurin

H Endokrine Faktoren:

- Estrogen ↓, Testosteron ↑
- Insulin ↓
- Schilddrüsenhormone T₃ ↑ und T₄ ↑

1.4 Pathomechanismen: Hcy-Wirkung auf den Organismus

Die "Hcy-Theorie der Atherosklerose" basiert auf einer Reihe von Studien, die potenzielle Mechanismen für die Hcy-induzierte Atherogenese untersuchten (92, 93). Zu den möglichen Pathomechanismen erhöhter Plasma-Hcy-Werte tragen die folgenden Komponenten bei (siehe Abbildung II) (37, 46, 153):

1. Endothelschäden und endotheliale Dysfunktion
2. Plättchenaktivierung
3. Glatte Muskelzellproliferation
4. Oxidative Modifikation von low-density-Lipoproteinen (LDL)
5. Endothel-Leukozyten-Interaktion

1.4.1 Endothelschäden und endotheliale Dysfunktion

Die "response to injury"-Hypothese geht davon aus, dass durch Infektionen, Entzündungen, Ischämie, Trauma oder Medikamente (u.a.) hervorgerufene Endothelschäden und endotheliale Dysfunktion am Beginn der Atherogenese stehen (46, 118, 119). Aufgrund dessen sind die Fähigkeiten des Endothels, die vaskuläre Hämostase und die Gewebepерfusion aufrechtzuerhalten, beeinträchtigt. Es resultieren hieraus Plättchen- und Leukozyten-Adhäsion, Vasospasmen, Lipidanreicherungen, Atherombildung, glatte Muskelzellproliferation, Sklerosierung/Verkalkung der Gefäßwand und ein erhöhtes Thromboserisiko (118, 131).

a) Endothelschädigung durch Hcy

Eine Studie mit humanen Umbilicalvenen-Endothelzellen (HUVEC) konnte eine dosisabhängige (1-10 mmol/l) Schädigung des Endothels durch Hcy nachweisen (153). Ebenso zeigte sich eine Schädigung bei bovinen Endothelzellen der Aorta nach Exposition der Endothelzellen mit 0,5 mmol/l Hcy bei gleichzeitiger Anwesenheit von Kupfer (13). Dies scheint auf den Effekt von "oxidativem Stress" zurückzuführen zu sein: bei der durch Kupfer katalysierten Autooxidation von Hcy entsteht Wasserstoffperoxid, welches toxische Wirkung auf die Endothelzellen hat (8, 153). Neben Wasserstoffperoxid sind Superoxid-Anionen an der Endothelschädigung durch oxidativen Stress beteiligt (90).

Zusätzlich wurden bei mit Hcy inkubierten Endothelzellen vermehrt DNA-Strangbrüche und verminderte NAD⁺-Konzentrationen beobachtet (10). Neben dem gesteigerten DNA-Abbau zeigte sich eine Verminderung der DNA-Synthese in HUVEC. Diese Auswirkungen von Hcy auf die DNA reduzieren nicht nur die Regenerationsfähigkeit des Endothels, sondern vermindern auch die Synthese der Enzyme, die an der Verstoffwechslung von Hcy auf dem Remethylierungs- sowie Transsulfurierungsweg beteiligt sind (135).

b) Endotheliale Dysfunktion (ausgelöst durch Hcy)

Stickstoffmonoxid (NO):

Stickstoffmonoxid reguliert den Gefäßtonus, inhibiert die Plättchenaktivierung, die Plättchenadhäsion und -aggregation, limitiert die glatte Muskelzellproliferation und moduliert die Endothel-Leukozyten-Interaktion (85, 90).

Patienten mit moderater Hyperhomocysteinämie sowie Homocystinurie zeigten eine signifikant beeinträchtigte endothelabhängige Vasodilatation im Vergleich zur Kontrollgruppe (133). In vitro und in vivo Studien führten zu der Annahme, dass Hcy die Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid vermindert, indem es dessen oxidativen Abbau fördert und die Synthese durch das Endothel vermindert (126, 135).

Antioxidativ wirksame Vitamine und Folsäure in therapeutischer Dosierung konnten die Hcy-induzierte endotheliale Dysfunktion vermindern, möglicherweise durch Modulation des oxidativen Metabolismus (135).

Gluthation Peroxidase:

Die Gluthation Peroxidase zählt innerhalb der Endothelzellen zu den Abwehrmechanismen gegen oxidativen Stress: das Enzym katalysiert die Reduktionsreaktion von Wasserstoffperoxid zu dessen korrespondierendem Alkohol; darüberhinaus wirkt es der oxidativen Inaktivierung von Stickstoffmonoxid entgegen (84, 143). Hcy-Konzentrationen von 0,25 mmol/l inaktivierten die Gluthation Peroxidase in bovinen Endothelzellen der Aorta um 81%, gleichzeitig wurde eine Verminderung der mRNA-Konzentration von Gluthation Peroxidase beobachtet.

Hämostase:

Hcy beeinflusst das Gleichgewicht pro- und antikoagulativer Mechanismen innerhalb der vaskulären Hämostase und ist damit sowohl direkt als auch indirekt an der

Thrombogenese beteiligt (135).

Hcy besitzt prokoagulative Wirkung, indem es schon in geringen Konzentrationen (0,5 mmol/l) die Aktivität von Faktor V fördert und an der gesteigerten Transkription und Aktivierung des thrombogen wirksamen "tissue factor" (TF) beteiligt ist (45, 117). Hcy vermindert die Konzentration von aktiviertem Protein C durch kompetitive Hemmung der Umwandlung von Thrombin zu Thrombomodulin (116) sowie durch seine direkte und irreversible Wirkung auf Thrombomodulin und Protein C (62, 78, 116). Hcy wird für die verminderte Expression von antikoagulativ wirksamen "heparin-like-Glykosaminoglycan" (103), verminderte Antithrombin-Konzentration (111), Deaktivierung des Gewebe-Plasminogen-Aktivators (57, 58, 90) und für vermehrte Plättchenaktivierung (26) verantwortlich gemacht.

1.4.2 Direkte Wirkung von Hcy auf Blutplättchen

Die Wirkung von Hcy auf die Plättchenkinetik und -funktion ist umstritten (135), jedoch konnten einige Studien einen gesteigerten Umsatz von Blutplättchen bei homocystinurischen Patienten nachweisen (61, 101). Obwohl eine erhöhte Plättchenadhäsion bei Homocystinurie festgestellt wurde (91), gibt es keinen Nachweis für einen direkten in vitro Effekt von Hcy auf die Plättchenadhäsion oder -aggregation (142). Plasma-Hcy-Konzentrationen über 1,0 mmol/l liessen eine gesteigerte Produktion des vasokonstriktorisch und thrombogen wirksamen Agenz Thromboxan erkennen (26, 51, 154).

1.4.3 Glatte Muskelzell-Proliferation

Eine wesentliche Komponente der Atherosklerose stellt die Proliferation glatter Muskelzellen in der Gefässintima mit nachfolgender Bildung extrazellulärer Kollagenmatrix dar (118, 119). Diskutiert wird, dass dieser Prozess primär durch Hcy gefördert wird bzw. sekundär durch den mitogenen Effekt endothelialer Wachstumsfaktoren sowie des "platelet derived growth factor" entsteht. Diese Mediatoren werden bei Hcy-induzierten Gefässschäden freigesetzt (135). Tsai et al. demonstrierten, dass bereits geringe Konzentrationen von Hcy (5,0 µmol/l) die DNA-Synthese glatter Muskelzellen mit nachfolgender Proliferation anregten (139).

1.4.4 Endothel-Leukozyten-Interaktion

Die Adhäsion von Leukozyten an das Gefäßendothel stellt einen wichtigen Teil des Entzündungsprozesses der Atherogenese dar (119).

Eine vermehrte Adhäsion und transendotheliale Migration von neutrophilen Granulozyten wurde in einem in vitro Experiment mit HUVEC, die mit Hcy-Konzentrationen von 0,05 mmol/l vorbehandelt waren, nachgewiesen (27). Der Mechanismus der Hcy-induzierten Endothel-Leukozyten-Interaktion schliesst den "Neutrophile-docking-Protein-Komplex" CD 11b/CD18 und die endotheliale Expression von "monocyte chemoattractant protein-1" ein (27, 113).

Damit stimuliert Hcy die Anlagerung von Monozyten, aufgrund chemotaktischer Reize kommt es zu einer weiteren Zunahme der Leukozyten-Migration.

Ausserdem wird Hcy eine oxidative Modifikation von LDL zugesprochen, welches als wichtiger Mediator in der Genese der Cholesterin-induzierten Arteriosklerose gilt (114).

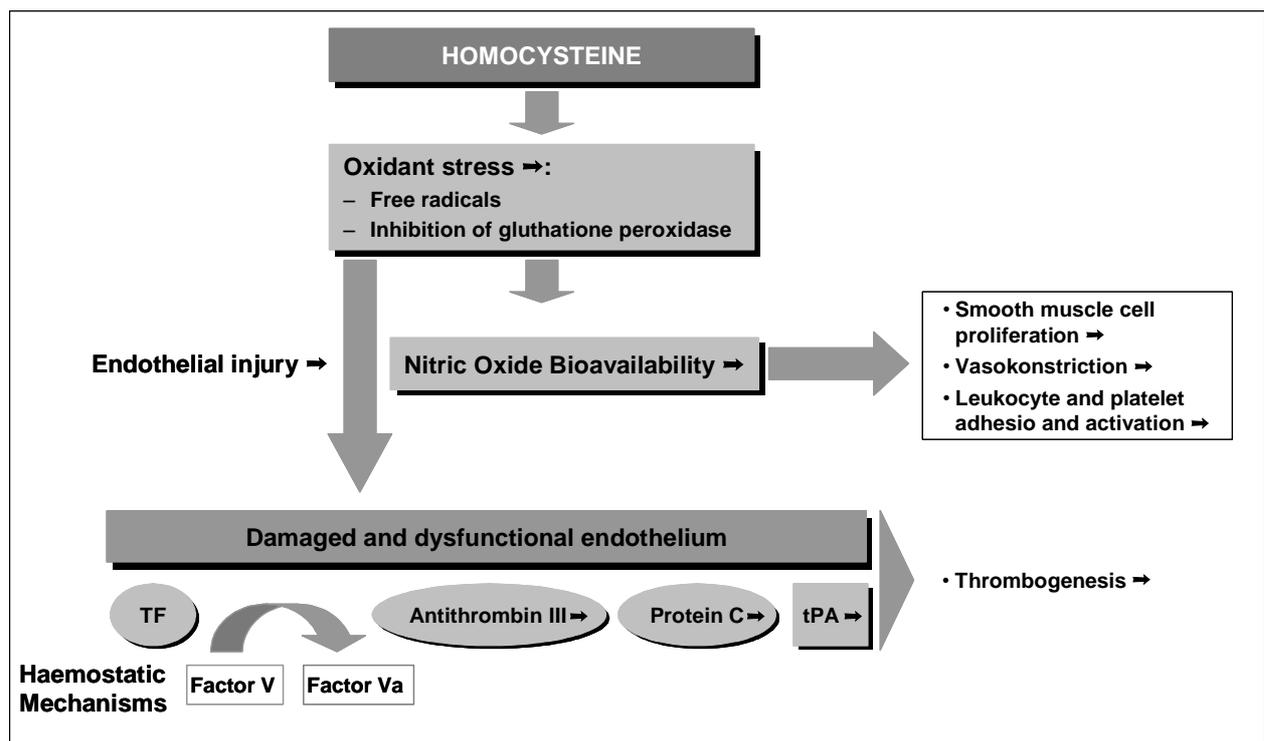


Abbildung II: Potenzielle Pathomechanismen von Hcy (TF = "tissue factor", tPA = "tissue plasminogen activator") (57)

1.5. Folsäure sowie Vitamin B₁₂ und ihre Bedeutung im Hcy-Stoffwechsel

1.5.1 Folsäure

Die Folsäure ist bei der Remethylierung von Hcy zu Methionin als Methylgruppendonator beteiligt (90). Der Bedarf an Folsäure beträgt 200-400 µg/Tag. Sie ist enthalten insbesondere in Milch und Gemüse (100).

Folsäure wird im Darm an Rezeptoren gebunden und via Endozytose in die Darmepithelzellen aufgenommen (64). Der Transport zur Leber erfolgt als N₅-Methyl-Folsäure an Albumin gebunden, dort erfolgt die Aufnahme erneut auf endozytotischem Wege (53). Die Leber ist in der Lage, einen Vorrat an Folsäure für ungefähr vier Monate zu speichern (64).

In den vergangenen Jahren erkannte man die Wichtigkeit der Folsäure bei der Prävention der Atherosklerose, Neuralrohrdefekten bei Neugeborenen sowie bei Krebserkrankungen (64, 67, 109). Weiterhin ist bekannt, dass ein Mangel an fluiden Folsäure einen Defekt der DNA-Synthese hervorruft, der zu megaloblastärer Anämie führt (149).

In einigen Studien wurde der Folsäure für den Hcy-Stoffwechsel entscheidende Bedeutung zugesprochen: die PACIFIC-Studie aus Australien und Neuseeland wies nach, dass die tägliche Gabe von 2,0 mg Folsäure an eine Patientengruppe mit instabiler Angina pectoris oder Myokardinfarkt das KHE-Risiko im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verminderte (109). Eine höhere Folsäure-Dosierung (2,0 mg/Tag vs. 0,2 mg/Tag) führte in der Studie zu einem ausgeprägteren Hcy-senkenden-Effekt (Hcy-Senkung um 1,8 µmol/l vs. 1,2 µmol/l) (109).

Venn et al. konnten in einer randomisierten Doppel-Blind-Studie nachweisen, dass die tägliche Gabe von 100 µg Folsäure bereits ausreichte, um erhöhte Hcy-Werte innerhalb des Referenzbereiches (5-15 µmol/l) therapeutisch einzustellen, verbunden mit einer Senkung des Hcy-Spiegels um 16% (148).

Folsäure hatte Einfluss auf die Höhe der Hcy-Konzentration bei Vorliegen der thermolabilen MTHFR-Variante (TT₆₇₇-Genotyp): Träger des TT₆₇₇-Genotyps hatten trotz einer um 50% verminderten MTHFR-Enzymaktivität Hcy-Werte im Referenzbereich, Voraussetzung dafür war eine höhere externe Folsäurezufuhr als bei CT₆₇₇-Genotypträgern (28).

Einige Studien demonstrierten eine Assoziation zwischen Folsäure und kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität (90, 134). Als Folge Hcy-senkender Therapie mit Folsäure stellte sich eine Reduzierung des Intima-Media-Durchmessers, der Steifigkeit der Gefäßwand und der antikoagulativen Aktivität ein (90).

Ausserdem wurde von präventiven Auswirkungen der Folsäure auf das KHE-Risiko unabhängig von der Hcy-senkenden Wirkung berichtet: als mögliche Mechanismen wurden eine antioxidative Wirkung der Folsäure, Effekte auf die Verfügbarkeit der Cofaktoren oder direkte Interaktionen mit dem Enzym Endotheliale-NO-Synthetase diskutiert (149).

1.5.2 Vitamin B₁₂

Das Vitamin B₁₂ dient im Hcy-Stoffwechsel als Cofaktor für die Methionin-Synthase, welche Hcy zu Methionin remethyliert (90). Der Bedarf an Vitamin B₁₂ beträgt 10-20 µg/Tag (25). Die Darmflora des Dickdarms synthetisiert das Vitamin, das in diesem Darmabschnitt nicht resorbiert werden kann. Die Parietalzellen der Magenschleimhaut produzieren den Intrinsic Faktor, welcher im Duodenum das Vitamin B₁₂ bindet und einen Komplex aus Intrinsic Faktor und Vitamin B₁₂ bildet. Dieser Komplex wird im Dünndarm an Rezeptoren gebunden und das Vitamin in Darmepithelzellen aufgenommen. Vitamin B₁₂ wird dann an Transcobalamin II im Blut abgegeben, zur Leber transportiert und dort per Endozytose aufgenommen. In der Leber wird Vitamin B₁₂ grösstenteils an Transcobalamin I angelagert und über mehrere Monate gespeichert oder an periphere Gewebe weitergegeben (115).

Als Vitamin B₁₂-reiche Nahrungsquellen gelten besonders Fleisch und Innereien (56). Im Hinblick auf den Hcy-Stoffwechsel scheint dem Vitamin B₁₂ eine wichtige Rolle zuzukommen: Moriyama et al. berichteten, dass TT₆₇₇-Genotyp-Träger mit erhöhten Hcy-Spiegeln durch diätetische Gabe von Vitamin B₁₂ ebenso gut eingestellt werden konnten wie mit Folsäure (99).

Unter Vitamin B₁₂-Therapie wurde eine Normalisierung der Hcy-Werte bei nahezu 70% der Patienten mit intermediärer oder schwerer Hyperhomocysteinämie beobachtet, die zuvor einen Vitamin B₁₂-Mangel aufwiesen (81).

2 Fragestellung

Hyperhomocysteinämie ($>15 \mu\text{mol/l}$) wird in einigen Studien als Risikofaktor für KHE beschrieben. Die MTHFR-Gen- C_{677}T und A_{1298}C -Polymorphismen gelten (u.a.) als Determinanten der Hcy-Konzentration. Die Frage, ob die MTHFR-Gen-Polymorphismen als Risikofaktoren an der Entstehung der KHE beteiligt sind, wird momentan in der internationalen Literatur diskrepanz diskutiert.

Ziel der vorliegenden Studie war es, den Einfluss der MTHFR-Gen- C_{677}T und A_{1298}C -Polymorphismen auf die Hcy-Konzentration sowie auf das Auftreten der KHE und den Schweregrad der KHE zu untersuchen. Gegenstand der Studie war darüber hinaus die Frage, ob eine Korrelation der Plasma-Konzentrationen von Hcy, Folsäure und Vitamin B_{12} mit dem Auftreten der KHE und dem Schweregrad der KHE besteht. Mit Hilfe der Multivarianz-Analyse wurde überprüft, welche Faktoren zu den voneinander unabhängigen Einflussgrößen der Plasma-Hcy-Konzentration bzw. der KHE zu zählen sind.

Aufgrund der weltweit veröffentlichten unterschiedlichen Studienergebnisse bezüglich der Assoziation zwischen den MTHFR-Gen- C_{677}T und A_{1298}C -Polymorphismen und KHE hatte diese Untersuchung das Ziel, anhand einer eigenen, umfassenden, vorwiegend aus Mitteleuropa stammenden Studienpopulation, repräsentative Ergebnisse zu erhalten.

Die geringe Anzahl publizierter Studien für den MTHFR-Gen- A_{1298}C -Polymorphismus sowie für die Kombination der Genotypen der beiden MTHFR-Polymorphismen war der Grund dafür, dass die Studienpopulation hinsichtlich eines Zusammenhanges dieser Polymorphismen mit der Hcy-Konzentration sowie dem KHE-Risiko untersucht wurde. Die vorliegende Studie war unseres Wissens die erste, die eine Assoziation des MTHFR-Gen- A_{1298}C -Polymorphismus und der Genotypkombinationen mit dem Schweregrad der KHE evaluierte.

Die Frage, ob Hyperhomocysteinämie ein Risikofaktor für KHE ist, wurde seit langer Zeit kontrovers diskutiert und noch nicht abschliessend beantwortet. Weltweit durchgeführte Studien verwendeten voneinander differierende Studienkonzepte (z.B. fehlende Folsäure-Bestimmung), kamen zu widersprüchlichen Resultaten und konnten einen kausalen Zusammenhang bisher nicht ohne begründeten Zweifel nachweisen.

Fragestellung

Die Ergebnisse dieser Studie stützten sich auf eine grosse (2738 Personen), vollständig koronarangiographisch untersuchte Patientenpopulation, welche die für die Interaktion mit Hcy wichtige Bestimmung der Folsäure- und Vitamin B₁₂-Konzentrationen berücksichtigte.

Im Rahmen einer für Mitteleuropa repräsentativen Fall-Kontroll-Studie wurden in der Klinik des Deutschen Herzzentrums München und der I. Medizinischen Klinik des Klinikums rechts der Isar über einen Zeitraum von drei Jahren serologische Laboranalysen durchgeführt.

In der Patientengruppe befanden sich 2121 Patienten mit angiographisch gesicherter KHE, welche als Erkrankung von mindestens einem Koronargefäss (Stenosegrad >50%) definiert war. Der Kontrollgruppe gehörten 617 Patienten mit keiner Koronararterienstenose oder Stenosegrad \leq 10% an.

Die Genotypbestimmung wurde anhand von genomischer DNA, die aus Leukozyten des peripheren Blutes gewonnen war, in der Klinik für Herz- und Kreislauferkrankungen des Deutschen Herzzentrum München durchgeführt. Mit Hilfe des TaqMan-Verfahrens wurde der Genotyp bestimmt. Die Entnahme von Blut für serologische Analysen erfolgte unter standardisierten Bedingungen (am liegenden Patienten unmittelbar vor der Herzkatheteruntersuchung). Die Blutproben wurden im Anschluss an die Entnahme im Institut für Laboratoriumsmedizin des Deutschen Herzzentrum München analysiert. In der Studienpopulation wurden die konventionellen Arteriosklerose-Risikofaktoren Alter, arterieller Hypertonus, Hypercholesterinämie, Nikotinabusus und Diabetes mellitus bestimmt.

Im Bezug auf die MTHFR-Polymorphismen generierte diese Studie die Hypothese für den Zusammenhang mit KHE, eine Aussage für die prognostische Wertigkeit der Studienergebnisse ist zum momentanen Zeitpunkt nicht möglich.

Diese Studie erwartete im Hinblick auf die klinische Relevanz der Hyperhomocysteinämie aussagekräftige Ergebnisse, die im weitesten Sinne eine anamnestiche und diagnostische Konsequenz im Zusammenhang mit KHE haben sollten.

3 Methoden

3.1 Studienpopulation

Im Zeitraum zwischen August 1999 bis September 2002 wurde eine 2738 Personen umfassende Studienpopulation (davon 1831 Männer und 907 Frauen) aufgrund des Verdachts der KHE von Kardiologen der Klinik des Deutschen Herzzentrum München und der 1. Medizinischen Klinik des Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität (TU) München koronarangiographisch untersucht. Alle an der Studie teilnehmenden Patienten gaben nach schriftlicher Aufklärung über die durchzuführende Intervention und die Genotyp-Bestimmung ihr Einverständnis für die Untersuchung.

Das Studienprotokoll erhielt die Zustimmung der Ethikkommission der TU München. Ausschlusskriterien für die Studie waren akuter Myokardinfarkt oder Schlaganfall innerhalb der letzten drei Monate vor Aufnahme in die Studie. Die Patientengruppe umfasste 2121 Personen mit angiographisch nachweisbarer KHE.

KHE war definiert als $\geq 50\%$ Stenose in mindestens einem der drei grossen Koronargefässe oder Koronaräste. Zur Kontrollgruppe wurden 617 Personen gezählt, deren Koronargefässe keine Stenose oder eine Verengung von $\leq 10\%$ aufwiesen. Die Koronarangiographie wurde entsprechend der Standardkriterien durchgeführt. Im Herzkatheterlabor wurden die digitalen Angiogramme off-line mittels eines automatisierten "edge-Bestimmungssystems" (CMS, Medis Medical Imaging Systems, Nuon, Niederlande) von zwei unabhängigen und erfahrenen Ärzten beurteilt.

3.2 Definition der traditionellen Risikofaktoren/ Messmethoden

a) Definitionen:

"Arterieller Hypertonus" wurde bei aktiver Therapie mit antihypertensiv wirksamen Medikamenten oder bei mindestens zweifacher Messung des systolischen Blutdruck von ≥ 160 mmHg und/oder diastolischem Blutdruck ≥ 90 mmHg definiert. Cholesterinwerte ≥ 240 mg/dl waren definiert als "Hypercholesterinämie". Aktueller Genuss von Tabakprodukten fiel unter die Definition "Nikotinabusus". Die Definition "Diabetes mellitus" traf auf Patienten zu, die eine Therapie mit Insulin oder oralen

Antidiabetika durchführten. Auch Patienten, die lediglich einer diätetischen Behandlung unterlagen, wurden gemäss der WHO-Kriterien zur Gruppe der Diabetiker gezählt, sofern pathologische Nüchternblutzuckerwerte oder ein auffälliger Glucosetoleranztest festgestellt wurden.

b) Messmethoden:

"Lipoprotein (a)" (Lp(a)) wurde quantitativ mit Hilfe des Immuno-Latex verstärkten Immunoassay (Behring Diagnostics GmbH, Marburg, Germany) bestimmt: durch die Reaktion eines an Latexpartikel adsorbierten Lp(a)-Antikörpers mit in der Probe enthaltenem Lp(a) entstehen hochmolekulare Immunkomplexe. Die hierbei auftretende Trübung des Probeninhaltes kann photometrisch bestimmt werden.

Die "Serum-Kreatinin"-Bestimmung erfolgte mittels des Verfahrens "Creatinine Jaffé". Das Testprinzip beruht auf der Reaktion von Kreatinin mit Pikrinsäure in alkalischer Lösung und der daraus resultierenden Bildung eines gelb-roten Adduktes. Die Bildungsgeschwindigkeit des Farbstoffes ist direkt proportional zu der Kreatininkonzentration in der Probe. Sie wird durch Messung der Extinktionszunahme bestimmt.

3.3 Blutentnahme und Blutproben

Die Blutentnahme erfolgte am liegenden Patienten unmittelbar vor Beginn der Herzkatheter-Untersuchung. Als Entnahmeorte diente üblicherweise die Arteria femoralis, in Ausnahmefällen die Arteria brachialis.

Die Blutproben wurden in heparinisierten Röhrchen gesammelt und zur Analyse in das Institut für Laboratoriumsmedizin des Deutschen Herzzentrum München befördert.

Im Labor wurden die Proben unverzüglich mit 1550xg für zehn Minuten zentrifugiert. Die separierten Plasmaproben wurden bei einer Temperatur von +4°C aufbewahrt und innerhalb von drei Tagen analysiert.

Alle Messungen wurden vom Laborpersonal durchgeführt - es lagen dem Analysierenden weder Informationen über die Resultate der Koronarangiographie noch über die Bestimmung des Genotyp-Profiles vor.

3.3.1 Bestimmung von Hcy

Zur Messung der Hcy-Konzentration im Blutplasma wurde das AxSYM®System (Abbot Laboratories, Abbot Park, IL, USA) verwendet. Die Plasma-Hcy-Konzentration wurde mit einem automatisierten Fluoreszenz-Polarisationsimmunoassay (FPIA) bestimmt. Dabei wird Homocystin reduziert, proteingebundenes Hcy und gemischte Disulfidformen durch Dithiothreitol (DTT) zu freiem Hcy umgewandelt (124). Das freie Hcy wird anschliessend enzymatisch durch die S-Adenosyl-L-Hcy-Hydrolase in SAH umgewandelt. SAH oder ein Fluoreszein-markiertes Analog von SAH (Tracer) wird durch einen monoklonalen Antikörper erkannt und gebunden. Am Antikörper gebundener Tracer kann die Polarisation des Fluoreszenzstrahles beeinflussen, und zwar umso stärker, je mehr Tracermoleküle am Antikörper fixiert sind. Dies ist abhängig von der Hcy-Konzentration in der Probe: je höher die Hcy-Konzentration, desto schwächer das Messsignal.

Die analytische Sensitivität des Assays liegt bei $\leq 0,8 \mu\text{mol/l}$ (Sensitivität ist definiert als diejenige Konzentration, die zwei Standardabweichungen über dem Mittelwert des AxSYM Hcy-Null-Kalibrators liegt).

Der obere Grenzwert des Messbereichs liegt bei $50 \mu\text{mol/l}$ Hcy in nativen Proben. Die Präzision der Analyse wurde gemäss dem Protokoll EP5-T2 des "National Committee for Clinical Laboratory Standards" (NCCLS) mit Hilfe von Kontrollproben im niedrigsten, mittleren und höchsten Bereich bestimmt. Der Variationskoeffizient dieser Messungen beträgt 4,88% bei $7,7 \mu\text{mol/l}$, 4,48% bei $13,8 \mu\text{mol/l}$ und 2,00% bei $27,3 \mu\text{mol/l}$.

Eine mögliche Interferenz von Billirubin, Triglyzeriden, Gesamteiweiss, Hämoglobin und Erythrozyten liegt bei $\leq 10\%$.

3.3.2 Bestimmung von Folsäure

Die Folsäure-Werte im Blutplasma wurden mit dem AxSYM®System (Abbot Laboratories, Abbot Park, IL, USA) bestimmt. Zur Ermittlung der Folsäure-Konzentration wurde ein Ionenbindungsverfahren verwendet: eine Fiberglasmatrix wird durch Zugabe einer quartären Ammoniumverbindung positiv geladen und fängt die während des Testablaufs gebildeten negativen Komplexe aus dem Analyten Folsäure und Polyanion ein. Verwendet wird ein Folsäurebindungsprotein (FBP), das

an monoklonale Antikörper gebunden ist. Diese Antikörper sind kovalent an Carboxymethylamylose, ein Polyanion, gekoppelt. Nicht mit Folsäure besetzte FBP-Bindungsstellen binden ein Konjugat aus Pteroinsäure und Alkalischer Phosphatase (AP). Gemessen wird die Aktivität der gebundenen AP; je höher deren Aktivität ausfällt, desto geringer ist die Folsäure-Konzentration in der Probe.

Die analytische Sensitivität des AxSYM Folsäure-Assay liegt bei 0,9 ng/ml. Der obere Grenzwert des Messbereiches liegt bei 20 ng/l Folsäure. Die Präzision der Analyse wurde mit Hilfe von Kontrollproben im niedrigsten, mittleren und höchsten Bereich überprüft. Der Variationskoeffizient dieser Messungen beträgt 7,66% bei 2,6 ng/l, 6,06% bei 6,6 ng/l und 3,50% bei 14,2 ng/l.

3.3.3 Bestimmung von Vitamin B₁₂

Die Vitamin B₁₂-Konzentration im Blutplasma wurde mit Hilfe des AxSYM® System (Abbot Laboratories, Abbot Park, IL, USA) ermittelt. Das Verfahren beruht auf der Mikropartikel-Enzym-Immunoassay-Technologie. Mit Intrinsic Factor beschichtete Mikropartikel werden zu der Reaktion hinzugegeben und binden das in der Probe vorhandene Vitamin B₁₂. Die Reaktionsmischung wird auf eine Glasfibrermatrix aufgetragen, welche Mikropartikel irreversibel bindet. Freie Bindungsstellen des Intrinsic Faktor auf den Mikropartikeln können durch ein Vitamin B₁₂-AP-Konjugat besetzt werden. Gemessen wird wiederum die Aktivität der gebundenen AP.

Die analytische Sensitivität des Verfahrens für die Vitamin B₁₂-Bestimmung liegt bei 60 pg/ml. Die obere Messgrenze ist bei 2000 pg/ml Vitamin B₁₂ erreicht. Die Präzision der Analyse wurde mit Hilfe von Kontrollproben im niedrigsten, mittleren und höchsten Bereich bestimmt. Der Variationskoeffizient dieser Messungen beträgt 14,2% bei 197 pg/ml, 8,8% bei 392 pg/ml, 7,3% bei 773 pg/ml.

3.4 MTHFR-Genotyp-Bestimmung

3.4.1 Restriktionsenzymanalyse und TaqMan-Verfahren

Die beiden verwendeten Methoden zur Genotypisierung, Restriktionsenzymanalyse und TaqMan-Assay, basieren auf dem Verfahren der PCR. Mit Hilfe der PCR ist es möglich, einen bestimmten Abschnitt der DNA zu vervielfältigen (Amplifikation). Innerhalb der PCR finden Zyklen statt, die im Idealfall in jedem Durchlauf die Anzahl der DNA-Kopien verdoppeln und einen exponentiellen Anstieg von DNA-Kopien zur Folge haben.

Die beiden Stränge der DNA werden zunächst bei 95°C getrennt. Anschliessend wird die Temperatur in einem Thermocycler auf ca. 60°C heruntergekühlt, wobei sich die zuvor ausgewählten Primer spezifisch an die Enden des zu vervielfältigenden DNA-Segments anlagern ("annealing"). Die Taq-(DNA-)Polymerase katalysiert die Verlängerung der Primer, dabei dienen die in einem geeigneten Puffer gelösten Nukleotide (dNTP) als Bausteine.

Das TaqMan-Verfahren beruht auf einer Kombination aus der PCR und dem 5' Nuklease-Assay (82). Für die Reaktion sind zwei für die beiden Allele spezifischen DNA-Sonden sowie ein Primerpaar notwendig. Die Sonden sind zum DNA-Abschnitt um die polymorphe Stelle komplementäre Oligonukleotide. Sie werden mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (Reporterfarbstoff am 5' Ende und "dark-quencher" am 3' Ende) markiert. Zwei verschiedene Reporterfarbstoffe markieren die beiden allelspezifischen Sonden. Die Nähe des "dark-quencher" zum Reporterfarbstoff bei Intaktheit der Sonde verringert die Fluoreszenz des Letzteren. Die Taq-Polymerase besitzt eine 5' → 3' Exonuklease-Aktivität, die eine während der PCR an einen DNA-Strang hybridisierte komplementäre Sonde schneidet. Das Schneiden der fluorogenen Sonde führt zur räumlichen Trennung der beiden Farbstoffe und damit zu einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität des Reporterfarbstoffes. Die Sondenfragmente sind dann vom Zielabschnitt entfernt und die PCR wird fortgesetzt. Die Bestimmung des Genotyps erfolgt durch Auswertung der allelspezifischen Fluoreszenzsignale.

3.4.2 Bestimmung der MTHFR-Genotypen

Zur Präparation genomischer DNA aus Leukozyten des peripheren Blutes wurde der "QIAamp DNA Blood Kit" (Qiagen, Hilden, Deutschland) oder der "High Pure PCR Template Preparation Kit" (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland) verwendet. Die Analyse des Genotyps erfolgte mit Hilfe von zwei allelspezifischen fluorogenen Oligonukleotid-Sonden in einem Reaktionsansatz, welcher die PCR und die 5' Nuclease-Reaktion (TaqMan technique; Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) kombinierte. Die Primer und Sonden wurden mit Hilfe der Primer Express Software (Version 2.0.0; Applied Biosystems) ermittelt. Dies erfolgte nach Herunterladen der DNA-Sequenzen, die unter den Zugangsnummern AF 105980 (MTHFR Gen, Exon 4) und AF 105983 (MTHFR Gen, Exon 7) in der GenBank oder der EMBL Datenbank zu erhalten sind. Die Primer 5' GACCTGAAGCACTTGAAGGAGAAG 3' und 5' CTTCAAAAGCGGAAGAATGTGT 3' (siehe Tabelle II) wurden zur Amplifizierung eines 96 Basenpaare (bp) langen Abschnitts des Exons 4 verwendet, welcher die polymorphe Stelle C₆₇₇T trug sowie die Primer 5' AGGAGGAGCTGCTGAAGATGTG 3' und 5' GTTCTCCCGAGAGGTAAAGAACAAA 3' (siehe Tabelle II) zur Amplifizierung eines 87 bp langen Abschnitts des Exons 7, welcher die Stelle A₁₂₉₈C enthielt.

Tabelle II: *Primersequenzen für Amplifikation der 96 bp (C₆₇₇T) bzw. 87 bp (A₁₂₉₈C) langen, die polymorphe Base beinhaltende, DNA-Sequenz des MTHFR-Gens*

1 (C₆₇₇T): 5' GACCTGAAGCACTTGAAGGAGAAG 3'

2 (C₆₇₇T): 5' CTTCAAAAGCGGAAGAATGTGT 3'

1 (A₁₂₉₈C): 5' AGGAGGAGCTGCTGAAGATGTG 3'

2 (A₁₂₉₈C): 5' GTTCTCCCGAGAGGTAAAGAACAAA 3'

Die Sequenzen der allelspezifischen Oligonukleotid-Sonden waren FAM-5' TGATGAAATCGGGCTCC 3' (C₆₇₇), VIC-5' TGATGAAATCGACTCCC 3' (T₆₇₇), FAM-5' TCAAAGACACTTICTTCACT 3' (A₁₂₉₈) und VIC-5' AAAGACACTTGCTTCACT 3' (C₁₂₉₈) (die SONDENSEQUENZEN sind komplementär zu den Sequenzen von AF105980 und AF105983; die allelspezifischen Nukleotide sind unterstrichen, siehe Tabelle III).

Tabelle III: Nukleotidsequenzen der Sonden für den *MTHFR-C₆₇₇T* bzw. *A₁₂₉₈C*-TaqMan-Assay

1 (C₆₇₇): FAM-5` TGATGAAATCGGGCTCC 3`

2 (T₆₇₇): VIC-5` TGATGAAATCGACTCCC 3`

1 (A₁₂₉₈): FAM-5` TCAAAGACACTTICTTCACT 3`

2 (C₁₂₉₈): VIC-5` AAAGACACTTGCTTCACT 3`

Das TaqMan-Verfahren wurde zur Identifikation der Träger homozygoter DNA (CC₆₇₇, TT₆₇₇, AA₁₂₉₈ und CC₁₂₉₈) für die gesamte Studienpopulation eingesetzt. Die fluoreszierenden Reporterfarbstoffe, 6-Carboxy-Fluoreszein (FAM) oder VIC (Farbstoff im Besitz von Applied Biosystems; chemische Struktur nicht veröffentlicht), waren an das 5`-Ende der Sondenmoleküle gebunden, um eine Differenzierung der Allele zu gewährleisten. An die 3`-Enden der Sonden wurden Molekülstrukturen gekoppelt, die eine Bindung der Sonde mit der kleinen Vertiefung der DNA-Doppelhelix ermöglichte ("minor groove binder groups"), um die Sequenzspezifität zu erhöhen. Für die Reaktion wurden als Thermocycler "GeneAmp PCR System 9600 und 9700" (Applied Biosystems, Darmstadt) und der Thermocycler im "ABI Prism 7700 Sequence Detection System" (Applied Biosystems) verwendet. Das 2-Stufen-PCR-Protokoll bestand aus abwechselnd je 35 Zyklen der Denaturierung (bei 92°C für 15 Sekunden) und 35 Zyklen Anlagerung und Verlängerung des Primers (bei 60°C für eine Minute). Mit Hilfe des "ABI Prism 7700 Sequence Detection System" wurde die akkumulierte Fluoreszenz der Proben nach der PCR gemessen und weiterverarbeitet. Ein isolierter Signalanstieg von FAM- oder VIC-Fluoreszenz war charakteristisch für CC₆₇₇- oder TT₆₇₇-Homozygotie bzw. AA₁₂₉₈- oder CC₁₂₉₈-Homozygotie. Ein Anstieg beider Signale wies auf Heterozygotie der untersuchten DNA hin. Zur Kontrolle wurde die Bestimmung des Genotyps bei 20% der Proben wiederholt. Dabei wurde DNA verwendet, die separat von der originalen Blutprobe isoliert worden war. Die Bestimmung der Genotypen wurde ohne Wissen von klinischen und angiographischen Daten des Patienten durchgeführt.

Eine Restriktionsenzymanalyse erfolgte zur konventionellen Genotyp-Bestimmung von DNA-Proben, die von Blutspendern einer Kontrollgruppe zur Verfügung gestellt wurden. Zur PCR verwendet wurden hierbei dieselben Primer, die in Kombination mit

den allelspezifischen Proben Anwendung fanden.

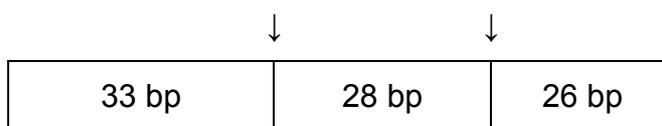
Die Restriktionsenzymanalyse (2-Stufen-PCR) bestand aus abwechselnd je 35 Zyklen Denaturierung (bei 95°C für eine Minute) und 35 Zyklen der Anlagerung ("annealing") und Verlängerung ("extension") des Primers (bei 60°C für eine Minute), gefolgt von einer letztmaligen Verlängerung bei 72°C für sieben Minuten. Jedes Experiment erhielt eine Negativkontrolle, um eine Kontamination mit fremder DNA auszuschliessen. Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe der Restriktionsenzyme "Hinfl" (C₆₇₇T) oder "MbolI" (A₁₂₉₈C) geschnitten (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland). Die Separierung der Restriktionsfragmente erfolgte mittels Elektrophorese auf einem Polyacrylamidgel (8% Acrylamid; Novex, Karlsruhe).

Die Auftrennung erfolgte bei 100 Volt (V) für 40 Minuten. Nach abgeschlossener Elektrophorese wurden durch die Anfärbung mit Ethidiumbromid und Verwendung von UV-Licht (312 nm) die entstandenen Banden sichtbar gemacht. Das Restriktionsenzym "Hinfl" spaltete das T₆₇₇-spezifische PCR-Produkt in zwei Fragmente mit 61 bp und 35 bp; das C₆₇₇-spezifische PCR-Produkt enthielt keine "Hinfl"-Schnittstelle. Das Enzym "MbolI" spaltete das A₁₂₉₈-spezifische PCR-Produkt in drei Fragmente mit 33 bp, 28 bp und 26 bp sowie das C₁₂₉₈-spezifische PCR-Produkt in zwei Fragmente mit 61bp und 26 bp (siehe Abbildung III).

Das T₆₇₇-spezifische PCR-Produkt:



Das A₁₂₉₈-spezifische PCR-Produkt:



Das C₁₂₉₈-spezifische PCR-Produkt:



Abbildung III: Bestimmung der MTHFR-Genotypen C₆₇₇T bzw. A₁₂₉₈C durch allelspezifischen Verdau mit den Enzymen "Hinfl" bzw. "MbolI". Das Amplikon (96 bp bzw. 87 bp) wurde durch Restriktionsverdau mit "Hinfl" bzw. "MbolI" in die entsprechenden Fragmente gespalten. Der Pfeil zeigt die Schnittstellen des Enzyms.

3.5 Material und Geräte

a) Geräte

PCR-Thermocycler:

- Authorized thermal Cycler for PCR (Hybaid, Heidelberg)
- Primus 96 plus (MWG-Biotech, Ebersberg)
- GeneAmp PCR System 9600 und 9700 (Applied Biosystems, Darmstadt)
- ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems)

Spannungsquelle:

- Power N Pac 300 (Bio-Rad, München)

Elektrophorese-Kammer:

- Xcell II (Invitrogen, Karlsruhe)

Zentrifugen:

- Zentrifuge A 14 und CR3-12 (Jouan, St.Herblain, Frankreich)
- Biofuge fresco (Heraeus Instruments, Hanau)

Mixer:

- Voretexer (Genio2™ Bender&Obein AGV Zürich, Schweiz)
- Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg)

b) Chemikalien, Enzyme, Verbrauchsmaterialien

DNA-Isolierung:

- QIAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden)
- High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Applied Science, Mannheim)

Enzyme:

- TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)
- Taq-Pol (Qiagen GmbH, Hagen)
- Restriktionsendonuklease Bsp 1431 (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

Gel:

- 8 % Polyacrylamidgel (Novex, Karlsruhe)

PCR-Gefäße:

- PCR Tubes; 0,5 ml ultradünn (Eppendorf, Hamburg)

Methoden

- Micro Amp® Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems)
- Micro Amp® Optical Caps (8 Caps/Strip) (Applied Biosystems)

Sonstiges:

- Molekulargewichtsmarker VIII (Roche Applied Science)

Primer und Sonden für das TaqMan-Verfahren von Applied Biosystems

c) Puffer und Lösungen

PCR-Puffer:

- 10xPCR-Puffer (Qiagen GmbH, Hilden)

Desoxyribonukleotidlösung (10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP):

- GeneAmp^R (Invitrogen, Karlsruhe)

Ethidiumbromidlösung (1%):

- 1g Ethidiumbromid (Serva, Mannheim)
- ad 100 ml aqua dest.

Ladepuffer für Gelelektrophorese:

- 10mM TBE-Puffer (Invitrogen, Karlsruhe)

3.6 Statistik

Die Daten werden dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung, Aufzählung oder als Verhältniszahlen (Prozent).

Vergleiche zwischen Gruppen wurden durchgeführt mittels des ungepaart 2-seitigen t-Test oder dem "Wilcoxon-Rangsummen-Test", sofern dies als geeignet erschien. Für Vergleiche von mehr als zwei Gruppen stand die Varianzanalyse (ANOVA) zur Verfügung. Der "chi-Quadrat-Test" wurde zum Vergleich kategorischer Daten angewendet. Der Einfluss von verschiedenen Faktoren auf die Plasma-Hcy-Konzentration wurde mit dem multiplen linearen Regressionsmodell bestimmt.

Die unabhängige Beziehung zwischen MTHFR-Gen-C₆₇₇T und A₁₂₉₈C-Polymorphismus und Hcy bei Vorliegen einer KHE wurde nach Bestimmung des Einflusses anderer Faktoren mit der multiplen logistischen Regressionsanalyse ermittelt. Statistische Signifikanz manifestierte sich ab einem p-Wert von <0,05.

4 Ergebnisse

4.1 Zusammenhang zwischen den MTHFR-Gen-Polymorphismen und der Plasma-Konzentration von Hcy, Folsäure und Vitamin B₁₂

4.1.1 Verteilung der Genotypen der MTHFR-Gen-Polymorphismen

In der gesamten Studienpopulation (d.h. Patienten mit und ohne KHE) lagen die folgenden MTHFR-Gen-C₆₇₇T-Genotypverteilungen vor: CC₆₇₇-Genotyp bei 1181 (43,1%), CT₆₇₇-Genotyp bei 1238 (45,2%) und TT₆₇₇-Genotyp bei 319 Personen (11,7%) (Graphik I). Die Genotypverteilung entsprach dem Hardy-Weinberg-Gesetz (Patienten: p (Pearson)=0,94; Kontrollen: p =0,57).

Die MTHFR-Gen-A₁₂₉₈C-Genotypverteilungen waren: AA₁₂₉₈-Genotyp bei 1254 (45,8%), AC₁₂₉₈-Genotyp bei 1189 (43,4%) und CC₁₂₉₈-Genotyp bei 295 (10,8%) der Patienten (Graphik II). Die Genotypverteilung entsprach dem Hardy-Weinberg-Gesetz (Patienten: p =0,14; Kontrollen p =0,09).

Die Verteilung der Kombinationen der Genotypen beider Polymorphismen sah wie folgt aus: CC₆₇₇/AA₁₂₉₈-Genotyp bei 308 (11,2%), CC₆₇₇/AC₁₂₉₈ bei 579 (21,1%), CC₆₇₇/CC₁₂₉₈ bei 294 (10,7%), CT₆₇₇/AA₁₂₉₈ bei 627 (22,9%), CT₆₇₇/AC₁₂₉₈ bei 610 (22,3%), CT₆₇₇/CC₁₂₉₈ bei 1 (0,037%), TT₆₇₇/AA₁₂₉₈ bei 319 (11,7%) der Patienten. Nur die genannten Genotypkombinationen kamen in der Population vor, jedoch sind weitere Kombinationen theoretisch möglich.

4.1.2 MTHFR-Gen-Polymorphismen und Hcy, Folsäure und Vitamin B₁₂

a) MTHFR-Gen-C₆₇₇T-Polymorphismus:

Ein signifikanter Anstieg der Hcy-Konzentration wurde mit zunehmender Anzahl des T-Allels (CC₆₇₇→CT₆₇₇→TT₆₇₇), sowohl in der KHE-Patientengruppe (p <0,001) als auch in der Kontrollgruppe (p =0,047) festgestellt (Tabelle IV).

Die Folsäure-Konzentration nahm signifikant vom CC₆₇₇-, über CT₆₇₇- bis zum TT₆₇₇-Genotyp ab. Diese Beobachtung galt sowohl für KHE-Patienten (p <0,001) als auch für die Kontrollgruppe (p =0,02).

Unter Berücksichtigung der Plasma-Konzentration von Vitamin B₁₂ fiel kein signifikanter Unterschied innerhalb der verschiedenen Genotypen für den MTHFR-Gen-C₆₇₇T-

Polymorphismus, weder für Patienten ($p=0,64$) noch für die Kontrollgruppe ($p=0,26$), auf. In Tabelle IV werden die Ergebnisse vollständig wiedergegeben.

b) MTHFR-Gen-A₁₂₉₈C-Polymorphismus:

Der MTHFR-Gen-A₁₂₉₈C-Polymorphismus war in keiner der beiden Patientengruppen mit der Konzentration von Hcy (KHE-Patienten: $p=0,61$, Kontrollgruppe: $p=0,34$) signifikant assoziiert (Tabelle IV).

Die Folsäure zeigte für die verschiedenen Genotypen eine signifikante Zunahme innerhalb der KHE-Patientengruppe von AA₁₂₉₈ über AC₁₂₉₈ bis CC₁₂₉₈ ($p=0,04$). Für die Kontrollgruppe traf diese Beobachtung nicht zu ($p=0,81$) (Tabelle IV).

Für die Vitamin B₁₂-Werte stellte sich keine signifikante Assoziation mit den verschiedenen Genotypen des MTHFR-Gen-A₁₂₉₈C-Polymorphismus ein (KHE-Patienten: $p=0,73$; Kontrollgruppe: $p=0,55$) (Tabelle IV).

c) Genotypkombinationen der MTHFR-Gen-C₆₇₇T und A₁₂₉₈C-Polymorphismen:

Ein signifikanter Anstieg ($p<0,001$) der Hcy-Konzentration innerhalb der Patientengruppe wurde in der Reihenfolge CC₆₇₇/AA₁₂₉₈, CC₆₇₇/AC₁₂₉₈, CC₆₇₇/CC₁₂₉₈, CT₆₇₇/AA₁₂₉₈, CT₆₇₇/AC₁₂₉₈, TT₆₇₇/AA₁₂₉₈ beobachtet, während die Folsäure-Konzentration in derselben Reihenfolge signifikant ($p<0,001$) abnahm. Die inverse Korrelation in Form signifikant ansteigender Hcy-Werte ($p=0,012$) bzw. signifikant abnehmender Folsäure-Werte ($p=0,04$) in der oben gezeigten Reihenfolge wurde auch innerhalb der Kontrollgruppe beobachtet (Tabelle IV). Für die Vitamin B₁₂-Werte waren keine signifikanten Veränderungen innerhalb der beiden Patientengruppen zu erkennen (KHE-Patienten: $p=0,56$; Kontrollgruppe: $p=0,57$).

In Tabelle IV werden die Resultate der Untersuchung einer Assoziation der MTHFR-Polymorphismen mit den Plasma-Konzentrationen von Hcy, Folsäure und Vitamin B₁₂ vollständig wiedergegeben.

Tabelle IV: MTHFR-Polymorphismen und die Konzentration von Hcy, Folsäure und Vitamin B₁₂ bei Patienten mit und ohne KHE

Genotypen	Homocystein (µmol/l)		Folsäure (ng/ml)		Vitamin B ₁₂ (pg/ml)	
	mit KHE	ohne KHE	mit KHE	ohne KHE	mit KHE	ohne KHE
MTHFR C₆₇₇T						
CC	12,5 ± 4,8	11,7 ± 4,5	10,0 ± 3,1	10,1 ± 3,0	427,8 ± 309,8	431,0 ± 254,2
CT	12,8 ± 4,8	11,9 ± 4,1	9,3 ± 3,1	9,9 ± 4,6	415,1 ± 296,2	409,1 ± 256,8
TT	14,8 ± 6,7	13,2 ± 5,7	8,4 ± 3,3	8,7 ± 2,9	426,0 ± 295,2	464,6 ± 321,6
p-Wert	<0,001	0,047	<0,001	0,02	0,64	0,26
MTHFR A₁₂₉₈C						
AA	12,9 ± 5,0	11,8 ± 4,5	9,3 ± 3,1	10,0 ± 4,5	427,0 ± 312,0	433,3 ± 278,1
AC	12,8 ± 5,3	11,8 ± 4,9	9,6 ± 3,2	9,8 ± 3,2	419,2 ± 297,5	412,5 ± 245,4
CC	12,6 ± 4,4	11,4 ± 4,6	9,7 ± 3,1	9,9 ± 2,9	411,5 ± 277,3	444,1 ± 282,3
p-Wert	0,61	0,34	0,04	0,81	0,73	0,55
Kombinierte Genotypen_{677/1298}						
CC/AA	11,8 ± 3,7	11,8 ± 5,1	10,2 ± 2,9	10,4 ± 3,0	455,8 ± 348,2	452,9 ± 274,0
CC/AC	12,7 ± 5,4	11,8 ± 4,3	10,0 ± 3,1	10,0 ± 3,0	422,4 ± 304,4	415,0 ± 233,0
CC/CC	12,6 ± 4,4	11,4 ± 4,6	9,7 ± 3,1	9,9 ± 2,8	410,5 ± 277,4	444,1 ± 282,3
CT/AA	12,5 ± 4,3	11,1 ± 3,1	9,3 ± 3,0	10,4 ± 5,6	413,6 ± 301,4	408,2 ± 256,6
CT/AC	13,0 ± 5,2	12,7 ± 4,8	9,3 ± 3,2	9,6 ± 3,3	416,1 ± 291,1	409,9 ± 257,9
TT/AA	14,8 ± 6,7	13,2 ± 5,7	8,4 ± 3,3	8,7 ± 2,9	426,0 ± 295,2	464,6 ± 321,6
p-Wert	<0,001	0,012	<0,001	0,04	0,56	0,57

4.2 Beziehung zwischen den MTHFR-Polymorphismen und KHE

4.2.1 Studienpopulation für die Untersuchung von MTHFR-Polymorphismen und KHE

Die Gruppe mit KHE bestand aus 2121 (77,5%) Patienten, der Kontrollgruppe gehörten 617 (22,5%) Personen an. Alle in der Studie berücksichtigten Personen wurden angiographisch untersucht. KHE war definiert als $\geq 50\%$ Stenose des Durchmessers mindestens eines der drei grossen Koronargefässe oder Koronaräste. In die Kontrollgruppe wurden Personen aufgenommen, deren Koronargefässe keine Stenose oder eine Verengung von $\leq 10\%$ aufwiesen.

Die KHE-Patienten zeigten ein ungünstigeres Arterioskleroserisikoprofil als Patienten ohne KHE (Tabelle V): KHE-Patienten waren mit $66,8 \pm 12,8$ Jahren signifikant älter als die Personen der Kontrollgruppe mit $60,8 \pm 12,4$ Jahren ($p < 0,001$). Es wurde innerhalb der Patientengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ein signifikant häufiger auftretender arterieller Hypertonus beobachtet ($p < 0,001$). Ebenso fanden sich signifikante Unterschiede zwischen Patienten- und Kontrollgruppe bezüglich der Parameter Cholesterinämie ($p < 0,001$), Nikotinabusus ($p < 0,001$), Diabetes mellitus ($p < 0,001$), Lp (a) ($p = 0,002$) und Kreatinin ($p < 0,001$). Tabelle V gibt die Ergebnisse vollständig wieder.

Tabelle V: *Baseline Charakteristika für die Patientengruppe (mit KHE) und die Kontrollgruppe (ohne KHE)*

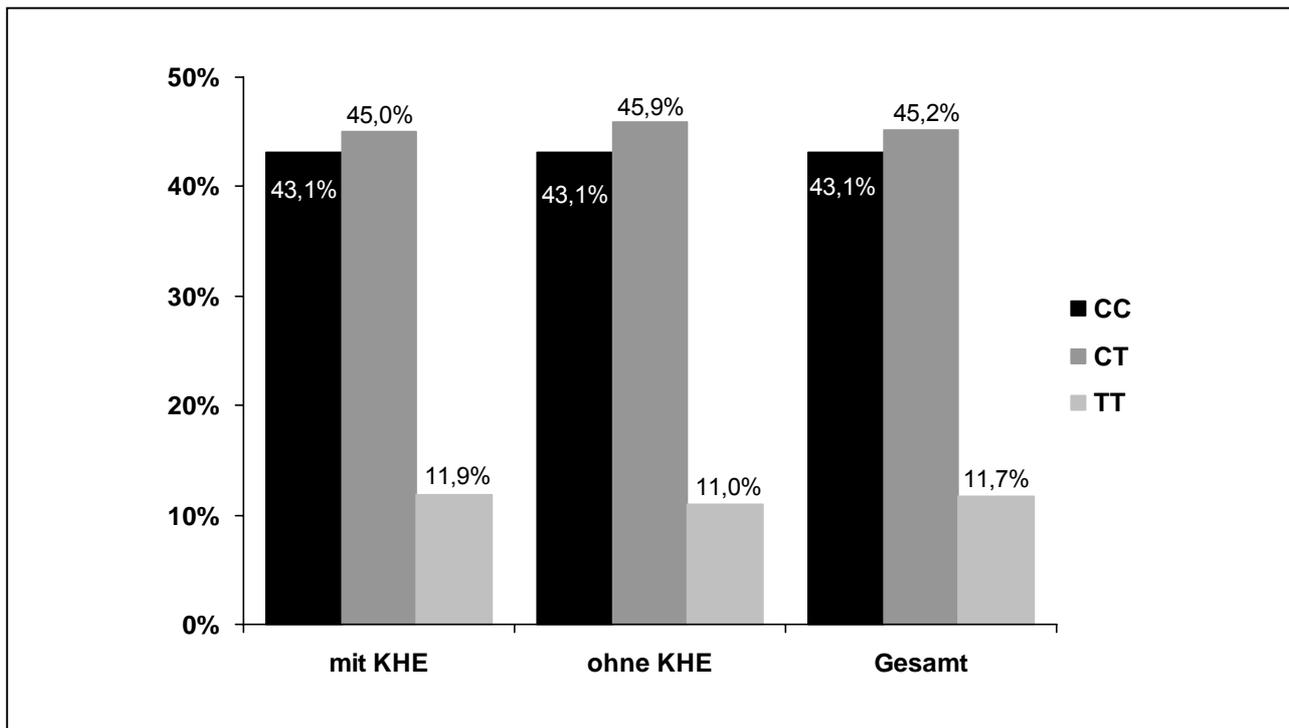
Parameter	mit KHE (n=2121)	ohne KHE (n=617)	p-Wert
Alter (Jahre)	$66,8 \pm 12,8$	$60,8 \pm 12,4$	$< 0,001$
Männer	1535 (72,0%)	296 (48,0%)	$< 0,001$
Arterieller Hypertonus	1698 (80,1%)	420 (68,1%)	$< 0,001$
Cholesterinämie	1461 (69,0%)	246 (40,0%)	$< 0,001$
Nikotinabusus	941 (44,4%)	180 (29,2%)	$< 0,001$
Diabetes mellitus	507 (24,0%)	63 (10,2%)	$< 0,001$
Lipoprotein (a) (mg/dl)	$40,6 \pm 48,6$	$31,4 \pm 39,5$	0,002
Kreatinin (mg/dl)	$1,13 \pm 0,31$	$1,01 \pm 0,22$	$< 0,001$

4.2.2 Zusammenhang zwischen den MTHFR-Polymorphismen und KHE

a) MTHFR-Gen-C₆₇₇T-Genotypverteilungen:

Der C₆₇₇T-Polymorphismus zeigte keine signifikante Assoziation ($p=0,84$) mit KHE im Vergleich der Patientengruppe mit der Kontrollgruppe (Tabelle VI).

Graphik I zeigt die prozentuale Verteilung der Gruppen mit und ohne KHE sowie die Gesamtzahl der Genotypträger des C₆₇₇T-Polymorphismus.



Graphik I: MTHFR-Gen-C₆₇₇T-Genotypverteilung der Patientengruppe (mit KHE) und der Kontrollgruppe (ohne KHE) sowie der Gesamtpopulation (Gesamt)

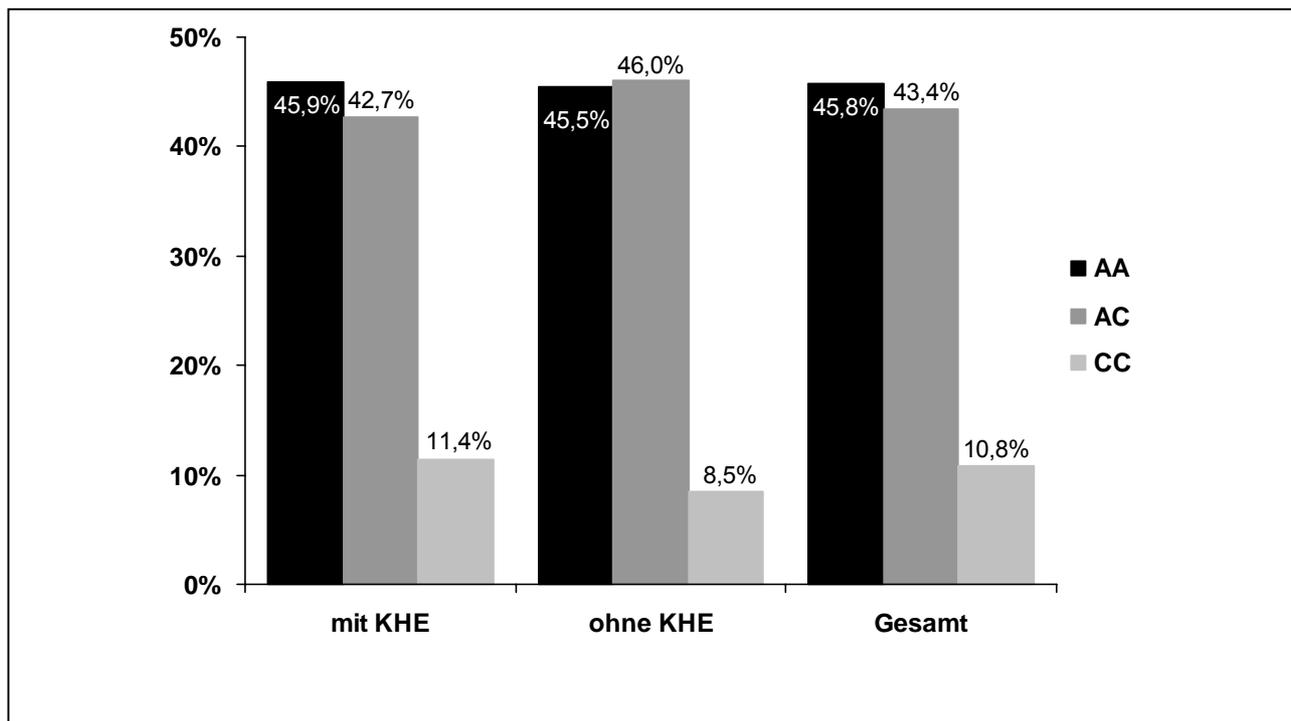
Tabelle VI: Verteilung der Genotypen des MTHFR-C₆₇₇T-Polymorphismus in der Patientengruppe (mit KHE) und der Kontrollgruppe (ohne KHE)

Parameter	mit KHE (n=2121)	ohne KHE (n=617)	p-Wert
MTHFR-C ₆₇₇ T-Genotypen			0,84
CC	915 (43,1%)	266 (43,1%)	
CT	955 (45,0%)	283 (45,9%)	
TT	251 (11,9%)	68 (11,0%)	

b) MTHFR-Gen-A₁₂₉₈C-Genotypverteilungen:

Eine Tendenz ($p=0,07$; Signifikanz manifestierte sich ab $p<0,05$) für eine Assoziation des MTHFR-Gen-A₁₂₉₈C-Polymorphismus mit KHE war im Vergleich der Patientengruppe mit der Kontrollgruppe zu beobachten (Tabelle VII).

Graphik II zeigt die prozentuale Verteilung der Gruppen mit und ohne KHE sowie die Gesamtzahl der Genotypträger des MTHFR-A₁₂₉₈C-Polymorphismus.



Graphik II: MTHFR-Gen-A₁₂₉₈C-Genotypverteilung der Patientengruppe (mit KHE) und Kontrollgruppe (ohne KHE) sowie der Gesamtpopulation (Gesamt)

Tabelle VII: Verteilung der Genotypen des MTHFR-A₁₂₉₈C-Polymorphismus in der Patientengruppe (mit KHE) und der Kontrollgruppe (ohne KHE)

Parameter	mit KHE (n=2121)	ohne KHE (n=617)	p-Wert
MTHFR-A ₁₂₉₈ C-Genotypen			0,07
AA	973 (45,9%)	281 (45,5%)	
AC	905 (42,7%)	284 (46,0%)	
CC	243 (11,4%)	52 (8,5%)	

c) Genotypkombinationen:

Die Genotypkombinationen beider MTHFR-Polymorphismen waren nicht signifikant ($p=0,41$) mit erhöhtem KHE-Risiko assoziiert. Die prozentuale Verteilung der Genotypen in der Patientengruppe entsprach in weiten Teilen der Genotypverteilung in der Kontrollgruppe (Tabelle VIII).

Tabelle VIII: *Verteilung der Genotypkombinationen in der Patientengruppe (mit KHE) und in der Kontrollgruppe (ohne KHE)*

Parameter	mit KHE (n=2121)	ohne KHE (n=617)	p-Wert
Genotypkombination ^{677/1298}			0,41
CC/AA	236 (11,1%)	72 (11,7%)	
CC/AC	437 (20,6%)	142 (23,0%)	
CC/CC	242 (11,5%)	52 (8,4%)	
CT/AA	486 (22,9%)	141 (22,9%)	
CT/AC	468 (22,1%)	142 (23,0%)	
CT/CC	1 (0,05%)	0 (0,0%)	
TT/AA	251 (11,8%)	68 (11,0%)	

4.3 Beziehung zwischen den MTHFR-Gen-Polymorphismen und dem Schweregrad der KHE

4.3.1 Studienpopulation für die Untersuchung von MTHFR-Polymorphismen und Schweregrad der KHE

Die Patienten mit KHE (n=2121) wurden gemäss der Anzahl der betroffenen Koronargefässe in drei Gruppen unterteilt. Insgesamt berücksichtigte die Studie 593 Patienten mit einer 1-Gefässerkrankung (GE), 614 Patienten mit 2-GE und 914 Patienten mit 3-GE (Tabelle IX). Patienten mit 3-GE waren im Trend älter als Patienten mit 1-GE ($68,7 \pm 9,8$ vs. $63,6 \pm 12,0$ Jahre; $p=0,1$). Die Parameter arterieller Hypertonus ($p<0,001$), Diabetes mellitus ($p<0,001$), Lp(a) ($p=0,01$) und Kreatinin ($p<0,001$) waren mit dem zunehmenden Schweregrad der KHE signifikant assoziiert (Tabelle IX). Männer hatten im Vergleich zu Frauen ein höheres Risiko ($p<0,001$), eine Mehrgefässerkrankung zu entwickeln.

Tabelle IX: *Baseline Charakteristika der Studienpopulation zur Bestimmung des Schweregrades der KHE*

	Zahl der betroffenen Koronargefässe			
	1-GE (n=593)	2-GE (n=614)	3-GE (n=914)	p-Wert
Alter (Jahre)	$63,6 \pm 12,0$	$66,5 \pm 10,9$	$68,7 \pm 9,8$	0,1
Männer	375 (63,2%)	455 (74,1%)	705 (77,1%)	<0,001
Arterieller Hypertonus	440 (74,2%)	489 (79,6%)	769 (84,1%)	<0,001
Cholesterinämie	395 (66,6%)	433 (70,5%)	633 (69,3%)	0,32
Nikotinabusus	259 (44,0%)	272 (44,0%)	410 (45,0%)	0,90
Diabetes mellitus	101 (17,0%)	138 (22,5%)	268 (29,3%)	<0,001
Lipoprotein (a) (mg/dl)	$36,3 \pm 45,1$	$38,7 \pm 45,7$	$45,0 \pm 52,6$	0,01
Kreatinin (mg/dl)	$1,08 \pm 0,3$	$1,13 \pm 0,34$	$1,16 \pm 0,31$	<0,001

4.3.2 Zusammenhang zwischen den MTHFR-Gen-Polymorphismen und dem Schweregrad der KHE

Es wurde untersucht, ob die MTHFR-Gen-C₆₇₇T und A₁₂₉₈C-Polymorphismen sowie die Genotypkombinationen dieser beiden Polymorphismen einen signifikanten Unterschied innerhalb der KHE-Patientengruppe mit 1-, 2- oder 3-GE zeigten (Tabelle X):

a) MTHFR-Gen-C₆₇₇T-Polymorphismus und Schweregrad der KHE:

Die Genotypen (CC₆₇₇-, CT₆₇₇-, TT₆₇₇-) des MTHFR-Gen-C₆₇₇T-Polymorphismus zeigten keine signifikante Assoziation ($p=0,62$) mit dem zunehmenden Schweregrad der KHE (1-, 2-, 3-GE) (Tabelle X). Die Genotypen waren in den drei Schweregradgruppen prozentual relativ ähnlich verteilt.

Tabelle X: Relation zwischen dem MTHFR-Gen-C₆₇₇T-Polymorphismus und dem Schweregrad der KHE

	Zahl der betroffenen Koronargefäße			
	1-GE (n=593)	2-GE (n=614)	3-GE (n= 914)	p-Wert
MTHFR-C ₆₇₇ T-Genotyp				0,62
CC	257 (43,3%)	250 (40,7%)	408 (44,6%)	
CT	263 (44,4%)	291 (47,4%)	401 (43,9%)	
TT	73 (12,3%)	73 (11,9%)	105 (11,5%)	

b) MTHFR-Gen-A₁₂₉₈C-Polymorphismus und Schweregrad der KHE:

Der MTHFR-Gen-A₁₂₉₈C-Polymorphismus war nicht signifikant ($p=0,14$) mit dem KHE-Schweregrad assoziiert. Tabelle XI gibt die Resultate der Studie wieder.

Tabelle XI: Relation zwischen dem MTHFR-Gen-A₁₂₉₈C-Polymorphismus und dem Schweregrad der KHE

	Zahl der betroffenen Koronargefäße			
	1-GE (n=593)	2-GE (n=614)	3-GE (n=914)	p-Wert
MTHFR-A ₁₂₉₈ C-Genotyp				0,14
AA	270 (45,5%)	300 (48,8%)	403 (44,1%)	

Ergebnisse

	Zahl der betroffenen Koronargefäße			
	1-GE (n=593)	2-GE (n=614)	3-GE (n=914)	p-Wert
AC	261 (44,0%)	254 (41,4%)	390 (42,7%)	
CC	62 (10,5%)	60 (9,8%)	121 (13,2%)	

c) Genotypkombinationen:

Die Genotypkombinationen (CC₆₇₇/AA₁₂₉₈, CC₆₇₇/AC₁₂₉₈, CC₆₇₇/CC₁₂₉₈, CT₆₇₇/AA₁₂₉₈, CT₆₇₇/AC₁₂₉₈, TT₆₇₇/AA₁₂₉₈) wiesen keinen signifikanten Unterschied (p=0,52) hinsichtlich des KHE-Schweregrades (1-, 2-, 3-GE) auf (Tabelle XII).

Tabelle XII: Relation zwischen den Genotypkombinationen und dem Schweregrad der KHE

	Zahl der betroffenen Koronargefäße			
	1-GE (n=593)	2-GE (n=614)	3-GE (n=914)	p-Wert
Genotypkombination _{677/1298}				0,52
CC/AA	67 (11,2%)	72 (11,7%)	97 (10,6%)	
CC/AC	129 (21,7%)	118 (19,2%)	190 (20,8%)	
CC/CC	61 (10,3%)	60 (9,8%)	121 (13,2%)	
CT/AA	130 (21,9%)	155 (25,2%)	201 (22,0%)	
CT/AC	132 (22,2%)	136 (22,1%)	200 (21,9%)	
TT/AA	73 (12,3%)	73 (11,9%)	105 (11,5%)	

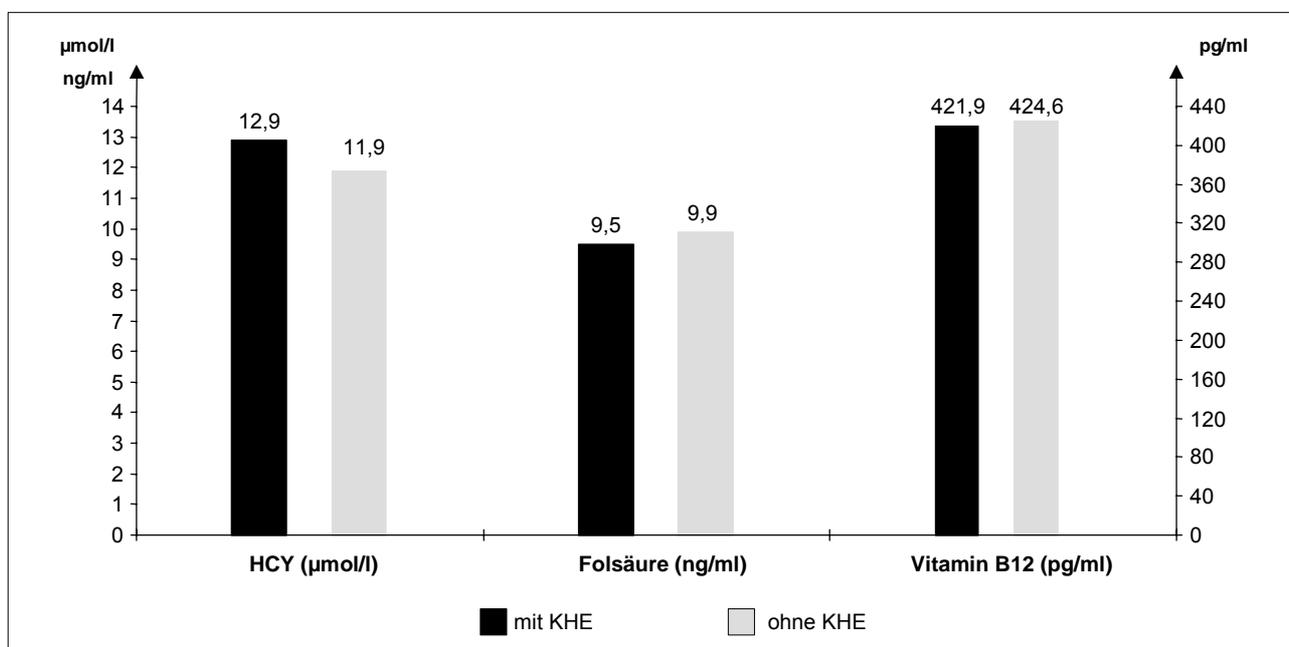
4.4 Zusammenhang zwischen KHE und Hcy, Folsäure und Vitamin B₁₂

4.4.1 Hcy-, Folsäure- und Vitamin B₁₂-Konzentration in der Patientengruppe und der Kontrollgruppe

Für die Untersuchung stand dieselbe Studienpopulation zur Verfügung wie sie in 4.2.1 beschrieben wurde. Die Plasma-Hcy-Werte waren in der Patientengruppe ($12,9 \pm 5,1 \mu\text{mol/l}$) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($11,9 \pm 4,5 \mu\text{mol/l}$) signifikant höher ($p < 0,001$) (Tabelle XII, Graphik III). Im Gegensatz dazu wies die KHE-Patientengruppe eine signifikant niedrigere Folsäure-Konzentration auf als die Kontrollgruppe ($9,5 \pm 3,1 \text{ ng/ml}$ vs. $9,9 \pm 3,8 \text{ ng/ml}$, $p = 0,008$). Keine signifikanten Unterschiede wurden für das Vitamin B₁₂ innerhalb des Vergleichs der beiden Gruppen festgestellt ($p = 0,83$).

Tabelle XIII: Hcy, Folsäure und Vitamin B₁₂ im Vergleich Patienten- mit Kontrollgruppe

Parameter	mit KHE (n=2121)	ohne KHE (n=617)	p-Wert
Plasma Hcy ($\mu\text{mol/l}$)	$12,9 \pm 5,1$	$11,9 \pm 4,5$	$<0,001$
Plasma Folsäure (ng/ml)	$9,5 \pm 3,1$	$9,9 \pm 3,8$	0,008
Plasma Vitamin B ₁₂ (pg/ml)	$421,9 \pm 301,9$	$424,6 \pm 263,7$	0,83



Graphik III: Hcy, Folsäure und Vitamin B₁₂ im Vergleich der Patientengruppe (mit KHE) mit der Kontrollgruppe (ohne KHE)

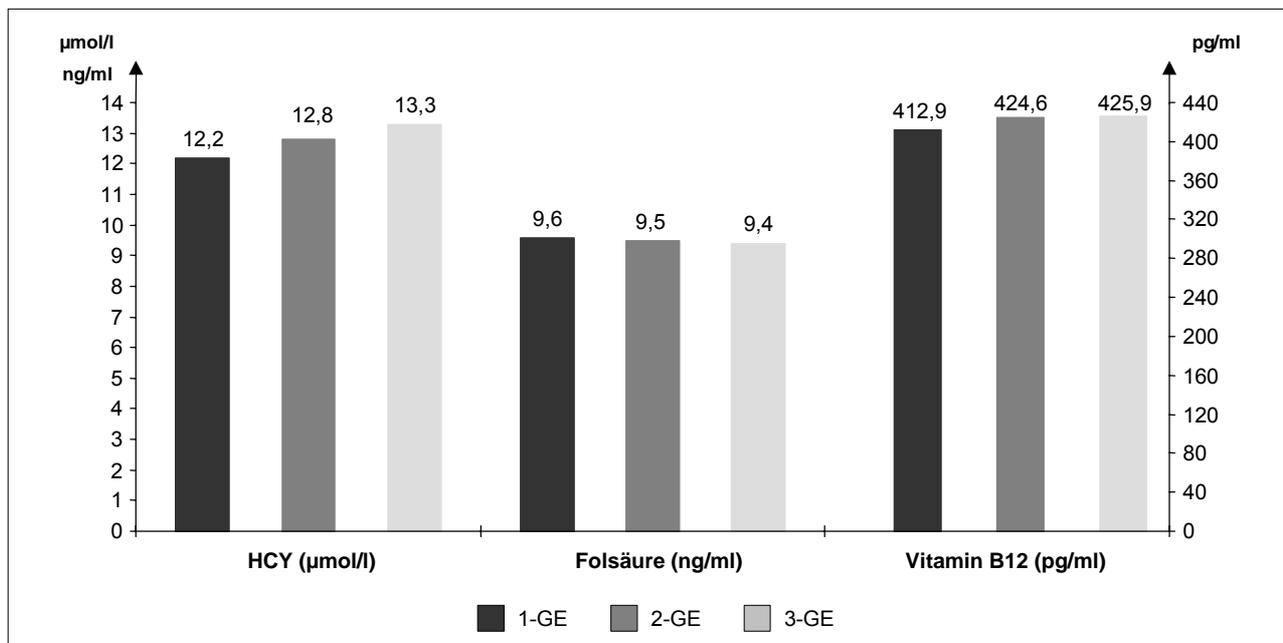
4.5 Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der KHE und Hcy, Folsäure und Vitamin B₁₂

4.5.1 Hcy-, Folsäure- und Vitamin B₁₂-Konzentration in Abhängigkeit vom Schweregrad der KHE

Für die Untersuchung stand dieselbe Studienpopulation zur Verfügung wie sie in 4.3.1 beschrieben wurde. Die Hcy-Konzentration zeigte einen signifikanten Anstieg ($p < 0,001$) mit dem Schweregrad der KHE (1-GE über 2-GE bis zu 3-GE; Tabelle XIV, Graphik IV). Dagegen war für die Plasma-Konzentrationen von Folsäure ($p = 0,32$) und Vitamin B₁₂ ($p = 0,69$) keine Korrelation mit dem Schweregrad der Koronararteriosklerose zu sehen.

Tabelle XIV: Assoziation des KHE-Schweregrades mit der Plasma-Konzentration von Hcy, Folsäure und Vitamin B₁₂

	Zahl der betroffenen Koronargefäße			
	1-GE (n=593)	2-GE (n=614)	3-GE (n=914)	p-Wert
Plasma Hcy (µmol/l)	12,2 ± 4,6	12,8 ± 5,1	13,3 ± 5,3	<0,001
Plasma Folsäure (ng/ml)	9,6 ± 3,1	9,5 ± 3,2	9,4 ± 3,2	0,32
Plasma Vitamin B ₁₂ (pg/ml)	412,9 ± 262,8	424,6 ± 317,9	425,9 ± 314,6	0,69



Graphik IV: Plasma-Konzentration von Hcy, Folsäure und Vitamin B₁₂ für den Schweregrad der KHE

4.6 Multivarianz-Analyse

Das multiple lineare Korrelationsmodell wurde verwendet, um den Einfluss voneinander unabhängiger Faktoren auf die Plasma-Hcy-Konzentration zu bestimmen. Die Parameter Alter, Geschlecht, arterieller Hypertonus, Hypercholesterinämie, Nikotinabusus, Diabetes mellitus, Plasma-Folsäure- und Vitamin B₁₂-Konzentration, Serum-Kreatinin sowie MTHFR-Gen-C₆₇₇T und A₁₂₉₈C-Polymorphismus standen hierbei im Mittelpunkt des Interesses. Die MTHFR-Gen-C₆₇₇T und A₁₂₉₈C-Polymorphismen waren Teil der Berechnungen, nachdem sie in CC- versus CT+TT-Genotypen sowie AA- versus AC+TT Genotypen kategorisiert wurden.

Das Modell zeigte, dass die Parameter Alter ($p < 0,001$), Serum-Kreatinin ($p < 0,001$), Plasma-Folsäure ($p < 0,001$), Plasma-Vitamin B₁₂ ($p < 0,001$) und MTHFR-Gen-C₆₇₇T-Polymorphismus ($p = 0,006$) unabhängige Prädiktoren für die Plasma-Hcy-Konzentration waren (Tabelle XV). Ausserdem konnte eine signifikante ($p = 0,018$) Interaktion zwischen dem MTHFR-Gen-C₆₇₇T-Polymorphismus und der Plasma-Folsäure-Konzentration demonstriert werden. Die Ergebnisse werden in Tabelle XV dargestellt.

Tabelle XV: *Prädiktoren für die Hcy-Konzentration im Plasma (Korrelationsmodell)*

Parameter	p-Wert
MTHFR-C ₆₇₇ T	0,006
MTHFR-A ₁₂₉₈ C	0,589
Alter	<0,001
Geschlecht	0,793
Arterieller Hypertonus	0,750
Diabetes mellitus	0,537
Hypercholesterinämie	0,186
Nikotinabusus	0,344
Folsäure	<0,001
Vitamin B ₁₂	<0,001
Kreatinin	<0,001

Ergebnisse

Das multiple logistische Regressionsmodell wurde angewendet, um die unabhängigen Einflussgrößen für das Auftreten der KHE zu ermitteln. Berücksichtigt wurden hierbei die folgenden Variablen: Alter, Geschlecht, arterieller Hypertonus, Hypercholesterinämie, Nikotinabusus, Diabetes mellitus, Serum-Kreatinin, Lp (a), Plasma-Hcy-, Folsäure- und Vitamin B₁₂-Konzentration sowie die MTHFR-Gen-C₆₇₇T und A₁₂₉₈C- Polymorphismen. Als unabhängige Faktoren für KHE wurden Alter ($p < 0,001$), Geschlecht ($p < 0,001$), Diabetes ($p < 0,001$), Hypercholesterinämie ($p < 0,001$) und Nikotinabusus ($p < 0,001$) bestimmt (Tabelle XVI). Es zeigte sich, dass die MTHFR-Gen-Polymorphismen C₆₇₇T ($p = 0,380$) und A₁₂₉₈C ($p = 0,473$) sowie die Plasma-Konzentration von Hcy ($p = 0,897$), Folsäure ($p = 0,134$) und Vitamin B₁₂ ($p = 0,417$) keine statistisch signifikanten KHE-Prädiktoren waren. Die Tabelle XVI gibt die Ergebnisse vollständig wieder.

Tabelle XVI: *Prädiktoren für das Auftreten der KHE (Regressionsmodell)*

Parameter	p-Wert
MTHFR-C ₆₇₇ T	0,380
MTHFR-A ₁₂₉₈ C	0,473
Alter	<0,001
Geschlecht	<0,001
Arterieller Hypertonus	0,124
Diabetes mellitus	<0,001
Hypercholesterinämie	0,001
Nikotinabusus	<0,001
Hcy	0,897
Folsäure	0,134
Vitamin B ₁₂	0,417

5 Diskussion

MTHFR-Polymorphismen, Hcy, Folsäure, Vitamin B₁₂ und KHE

Diese Fall-Kontroll-Studie evaluierte innerhalb einer umfassenden Patientenpopulation (n=2738) die Zusammenhänge zwischen den MTHFR-Gen-Polymorphismen und der Plasma-Hcy-Konzentration sowie der KHE. Untersucht wurde ausserdem, ob eine Verbindung zwischen KHE und der Aminosäure Hcy besteht.

Zu den wichtigsten Befunden zählte, dass die MTHFR-Gen-C₆₇₇T und A₁₂₉₈C-Polymorphismen keine Assoziation mit dem Auftreten von KHE oder dem Schweregrad der KHE zeigten. Der MTHFR-Gen-C₆₇₇T-Polymorphismus wurde als unabhängiger Prädiktor der Plasma-Hcy-Konzentration erfasst.

Milde Hyperhomocysteinämie war zunächst positiv assoziiert mit KHE. Nach Bestimmung anderer KHE-Risikofaktoren im multiplen logistischen Regressionsmodell verlor die positive Assoziation zwischen Hcy und angiographisch nachgewiesener KHE jedoch ihre statistische Signifikanz. Hcy war damit kein Prädiktor für KHE.

Die "Hcy-Theorie der Arteriosklerose" stützt sich grösstenteils auf klinische und pathophysiologische Beobachtungen bei Patienten mit Homocystinurie (29, 92, 93). Die pathophysiologische Relevanz der Hcy-Theorie im Hinblick auf die klinische Bedeutung von Hcy wurde von einer tierexperimentellen Studie in Zweifel gestellt. Im Tierversuch führten experimentell erzeugte Plasma-Hcy-Konzentrationen, welche deutlich höhere Werte als die Hcy-Spiegel von KHE-Patienten annahmen, nicht zu arteriosklerotischen Gefässveränderungen (123). Im Rahmen klinischer Studien unterstützen insbesondere retrospektive Studien die These eines kausalen Zusammenhanges zwischen erhöhtem Plasma-Hcy und Arteriosklerose, wohingegen prospektive Studien seltener signifikante Ergebnisse erhoben (12, 17, 36, 73, 75, 136).

Ob milde Hyperhomocysteinämie (>15-30 µmol/l), wie man sie bei Genotypträgern des C₆₇₇T und A₁₂₉₈C-Polymorphismus finden konnte, auch tatsächlich atherogen wirken, bleibt weiterhin Gegenstand der aktuellen Diskussion (69, 97, 160).

Bedeutung des MTHFR-Gen-C₆₇₇T-Polymorphismus für die Plasma-Konzentration von Hcy und Folsäure:

Das Enzym MTHFR katalysiert die irreversible Konversion von 5,10-methylen-THF zu 5-methyl-THF, welches als Methylgruppen-Donor für die im Organismus physiologisch ablaufende Umwandlungsreaktion von Hcy zu Methionin dient.

Über 10% der weissen Bevölkerung sind homozygot für eine Mutation von C nach T auf dem Basenpaar 677 (29). Dieser Polymorphismus führt zu Thermolabilität des Enzyms, welche sich in verminderter katalytischer Aktivität des Enzyms in vitro äussert (72).

Die vorliegende Studie zeigte, dass der MTHFR-Gen-C₆₇₇T-Polymorphismus einer der unabhängigen Prädiktoren ($p=0,006$) für die Plasma-Hcy-Konzentration ist. Träger des TT₆₇₇-Genotyps hatten um 2,3 $\mu\text{mol/l}$ höhere Hcy-Spiegel als CC₆₇₇-Genotypen ($14,8 \pm 6,7 \mu\text{mol/l}$ vs $12,5 \pm 4,8 \mu\text{mol/l}$).

Diese Beobachtung entspricht den Ergebnissen anderer Studien: Brattström et al. lieferten den Nachweis innerhalb einer aus 13 Studien bestehenden Meta-Analyse, dass die Träger des TT₆₇₇-Genotyps im Vergleich zu Trägern des CC₆₇₇-Genotyps um durchschnittlich 25% (= 2,6 $\mu\text{mol/l}$) höhere Hcy-Konzentrationen aufwiesen (12). Klerk et al. beobachteten, ebenfalls in einer Meta-Analyse (40 Fall-Kontroll-Studien mit 11 162 Patienten und 12 758 Kontrollpersonen), einen signifikanten ($p<0,001$) Zusammenhang zwischen erhöhten Plasma-Hcy-Werten und dem Auftreten des TT₆₇₇-Genotyps (TT₆₇₇-Genotypen: 13,4 $\mu\text{mol/l}$, CC₆₇₇-Träger: 11,2 $\mu\text{mol/l}$) (73).

In der vorliegenden Studie liess sich eine, im Zusammenhang mit erhöhten Hcy-Werten stehende, signifikante Verminderung der Folsäure-Konzentration für die Genotypträger (CC₆₇₇→CT₆₇₇→TT₆₇₇) des MTHFR-C₆₇₇T-Polymorphismus nachweisen (KHE-Patienten: $p<0,001$; Kontrollgruppe $p=0,02$).

Die Tatsache, dass ein Folsäure-Mangel zu erhöhten Hcy-Konzentrationen führt, wurde in zahlreichen Studien beschrieben und gilt als wissenschaftlich erwiesen (7, 21, 134). Bei Folsäure-Mangel ist der Hcy-Metabolismus auf der Stufe der Remethylierung von Hcy zu Methionin vermindert, da das Enzymsubstrat Methylentetrahydrofolsäure der Methionin-Synthase in nicht ausreichender Menge zur Verfügung steht (106).

Verminderte Folsäure-Werte bei gleichzeitig erhöhtem Hcy-Spiegel wurden für den

Diskussion

MTHFR-C₆₇₇T-Polymorphismus auch in anderen Studien gefunden: Meleady et al. beobachteten neben erhöhten Hcy-Werten eine signifikant ($p=0,02$) niedrigere Folsäure-Konzentration für die drei Genotypen (CC₆₇₇→CT₆₇₇→TT₆₇₇) der Patientengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (97). Verhoef et al. berichteten, dass Homozygotie für den MTHFR-TT₆₇₇-Polymorphismus insbesondere bei niedriger Folsäure-Konzentration zu erhöhtem nüchtern Plasma-Hcy-Spiegel führte (150). Innerhalb einer Studie mit 126 gesunden Probanden wurden bei Trägern des TT₆₇₇-Genotyps niedrigere Folsäure-Werte beobachtet als bei CC₆₇₇- bzw. CT₆₇₇-Genotypträgern (TT₆₇₇=15,2 nmol/ml; CT₆₇₇=17,2 nmol/ml; CC₆₇₇=20,6 nmol/ml $p=0,004$). Gleichzeitig lagen auch signifikant ($p=0,001$) höhere Hcy-Werte bei den Trägern des TT₆₇₇-Genotyps vor (7).

Die Frage, ob erhöhte Hcy-Spiegel bei Trägern des MTHFR-Gen-C₆₇₇T-Polymorphismus im Zusammenhang mit einer verminderten Folsäure-Aufnahme mit der Nahrung stehen, blieb anhand unserer Studienkonzeption offen.

De Bree et al. stellten im Rahmen einer "cross-sectional-Studie" ($n=2051$) bei niedriger externer Folsäure-Zufuhr (166 µg/Tag) signifikante ($p<0,05$) Unterschiede für die Folsäure-Konzentrationen aller drei Genotypen des MTHFR-C₆₇₇T-Polymorphismus (CC₆₇₇=7,1 ng/ml; CT₆₇₇=6,2 ng/ml; TT₆₇₇=5,4 ng/ml) fest (21). Die Träger des TT₆₇₇-Genotyps wiesen neben den erniedrigten Folsäure-Werten auch signifikant ($p<0,001$) höhere Hcy-Werte auf als die CC₆₇₇- oder CT₆₇₇-Genotypträger. Bei erhöhter externer Folsäure-Zufuhr (250 µg/Tag) zeigten die TT₆₇₇-Genotypträger (7,3 ng/ml) im Vergleich zu den CC₆₇₇- (8,3 ng/ml) oder CT₆₇₇-Genotypen (8,6 ng/ml) signifikant niedrigere ($p=0,04$) Folsäure-Werte, die Plasma-Hcy-Konzentration unterschied sich zwischen den drei Genotypen jedoch nicht mehr signifikant (21). Die Studie von de Bree et al. (21) eignete sich aufgrund der ähnlichen prozentualen Verteilung der TT₆₇₇-Genotypen (10%) für den Vergleich mit der vorliegenden Studie (TT₆₇₇: 11,7%).

Neben den verminderten Folsäure-Werten sollte eine mögliche eingeschränkte Funktion der anderen am Hcy-Metabolismus beteiligten Enzyme (Methionin-Synthase und CBS), die in dieser Studie unberücksichtigt blieben, als Ursache der erhöhten Hcy-Konzentrationen in Betracht gezogen werden.

Die Beobachtung erhöhter Hcy-Werte bei Trägern des MTHFR-C₆₇₇T-Polymorphismus (>15 µmol/l) führte zu der Frage, ob ein kausaler Zusammenhang mit erhöhtem KHE-Risiko besteht (5, 12, 43, 70, 87, 97).

Assoziation zwischen MTHFR-Gen-C₆₇₇T-Polymorphismus, KHE und dem Schweregrad der KHE:

In der vorliegenden Studie war der MTHFR-C₆₇₇T-Polymorphismus weder in der univariaten ($p=0,84$) noch in der multivariaten ($p=0,38$) Datenanalyse mit einem erhöhten Auftreten angiographisch nachweisbarer KHE assoziiert.

Die fehlende Assoziation in unserer Studie zwischen dem C₆₇₇T-Polymorphismus (CC₆₇₇, CT₆₇₇, TT₆₇₇) und der KHE spiegelt die Ergebnisse vorangegangener Studien wieder: Anderson et al. wiesen in einer prospektiven Studie (1412 Patienten mit angiographisch gesicherter KHE) keine Verbindung zwischen dem MTHFR-Gen-C₆₇₇T-Polymorphismus und dem Risiko für Myokardinfarkt oder angiographisch definierter KHE nach (2).

In der "Physicians Health Study" mit 583 Patienten (8-Jahres-follow-up) zeigten Patienten und Kontrollpersonen eine, mit dieser Studie vergleichbaren, Häufigkeitsverteilung der MTHFR-Genotypen CC₆₇₇ (47%), CT₆₇₇ (41%) und TT₆₇₇ (11%). Das relative Risiko (RR) war für heterozygote Herzinfarktpatienten im Vergleich zu homozygoten Patienten nicht signifikant erhöht (CC₆₇₇ vs. CT₆₇₇: RR= 1,1 (95% Konfidenzintervall (CI): 0,8-1,5); CC₆₇₇ vs. TT₆₇₇: RR= 0,8 (95% CI: 0,5-0,8)). Es bestand keine Assoziation für ein signifikant gehäuftes Auftreten von KHE bei Vorliegen des TT₆₇₇-Polymorphismus (87).

Die bereits angesprochene Meta-Analyse von Brattström et al. beobachtete erhöhte Hcy-Werte bei Trägern des TT₆₇₇-Genotyps, konnte aber keine Assoziation zu erhöhtem kardiovaskulären Erkrankungsrisiko nachweisen (12).

Im Gegensatz dazu fanden Kluijtmans et al. ein dreifach erhöhtes Risiko für frühzeitig auftretende KHE bei Trägern des TT₆₇₇-Genotyps bei 60 niederländischen Patienten und 111 Kontrollpersonen (76). Das Studiendesign differierte in einigen Punkten zu dem der vorliegenden Studie: das Alter dieser Patienten bei Beginn der KHE war niedriger als in unserer Studie (76). Darüberhinaus wurden Patienten mit den KHE-Risikofaktoren Hyperlipoproteinämie, arterieller Hypertonus und Diabetes mellitus aus der Studie ausgeschlossen. Die Prävalenz des homozygoten TT₆₇₇-Genotyps in der Kontrollgruppe (5,4%, n=6 aus 111) war deutlich niedriger als in der vorliegenden Studie (11%; 68 aus 617)

Eine in Japan durchgeführte Meta-Analyse (18 Studien mit 9855 Personen, darunter drei japanische Studien) konnte zunächst ein höheres KHE-Risiko bei homozygoten

Diskussion

Trägern des TT₆₇₇-Genotyps im Vergleich zu CC₆₇₇-Trägern nachweisen (OR: 1,4; 95% CI: 1,2-1,6; p<0,0002) (68)). Die drei japanischen Studien wurden in einer zweiten Untersuchung aus der Metaanalyse separiert und die beiden neu formierten Studiengruppen getrennt voneinander untersucht. Innerhalb der drei japanischen Studien ergab der Vergleich der homozygoten TT₆₇₇- mit den CC₆₇₇-Trägern ein höheres KHE-Risiko für TT₆₇₇-Genotypen (OR: 2,0; 95% CI: 1,6-2,7; p<0,00001). Die Metaanalyse der verbliebenen 15 Studien verlor die statistische Signifikanz des zuvor beobachteten Unterschiedes zwischen den beiden Genotypgruppen (OR: 1,1; 95%: 0,9-1,3; p=0,42).

Diese Beobachtungen lassen Rückschlüsse auf interkontinentale Unterschiede des KHE-Risikos aufgrund einer genetischen Heterogenität des MTHFR-C₆₇₇T-Polymorphismus zu. Tatsächlich existieren interethnische Variationen in der Frequenz der T-Allele: diese variiert je nach Population zwischen 0% und 16% (Beispiel Afrika und Italien) (121).

Möglicherweise sind Interaktionen zwischen genetischen Faktoren und Ernährungsgewohnheiten die Ursache für das Auftreten des MTHFR-Gen-C₆₇₇T-Polymorphismus als Prädiktor für kardiovaskuläre Erkrankungen in verschiedenen ethnischen Gruppen und regionalen Gebieten innerhalb Europas: positive Zusammenhänge zwischen KHE und TT₆₇₇-Genotypträgern wurden beispielsweise in japanischen (98), israelisch-jüdischen (88), niederländischen (76) und irischen (47) Studien festgestellt, dagegen wurden negative Korrelationen häufiger bei Studien mit Bewohnern angelsächsischer Gebiete erhoben (88).

Unterschiede in der Folsäureaufnahme über die Nahrung wurden bezüglich der Assoziation der MTHFR-Gen-Polymorphismen mit KHE geltend gemacht (33, 94, 95, 137). Eine Meta-Analyse kam zu der Schlussfolgerung, dass Träger des TT₆₇₇-Genotyps insbesondere im Rahmen niedriger Folsäure-Werte ein signifikant höheres Risiko für KHE aufwiesen (151).

Das Ergebnis der vorliegenden Studie stimmt mit dieser Beobachtung nicht überein, da sich trotz signifikanter (p=0,04) Unterschiede der Folsäure-Spiegel, keine signifikante Korrelation des C₆₇₇T-Polymorphismus mit dem Auftreten der KHE feststellen liess.

In der vorliegenden Arbeit und drei weiteren Studien wurde die Beziehung zwischen dem MTHFR-C₆₇₇T-Polymorphismus und dem Schweregrad der KHE untersucht. In

Diskussion

dieser Arbeit wurde keine signifikante Assoziation ($p=0,62$) mit dem Schweregrad der KHE für den MTHFR-C₆₇₇T-Polymorphismus (CC₆₇₇, CT₆₇₇, TT₆₇₇) nachgewiesen. Unterstützt wurden die Resultate dieser Arbeit von einer in den Niederlanden durchgeführten Studie, welche ebenfalls keine signifikante Verbindung ermittelte (144).

Hingegen fanden Gardemann et al. in einer Fall-Kontroll-Studie mit 2453 Teilnehmern, eine signifikante Assoziation ($p<0,05$) zwischen homozygoten Trägern des TT₆₇₇-Genotyps und dem Schweregrad der KHE bei Patienten mit ausgeprägtem KHE-Risikoprofil (48). Es wurde eine Einteilung der Studienpopulation in Individuen mit "hohem Risikoprofil" und "niedrigem Risikoprofil" gemäss der KHE-Kriterien nach Gensini (49) vorgenommen. Signifikante Ergebnisse wurden erst nach Ausschluss der Studiengruppe mit "niedrigem Risikoprofil" gefunden. Eine Assoziation des MTHFR-Polymorphismus mit dem Schweregrad der KHE war im Zusammenhang mit dem konventionellen KHE-Risikofaktor Diabetes (Glucose >112 mg/dl, $p=0,018$) bzw. dem Verhältnis aus KHE-Risikofaktor und den kardioprotektiven Faktoren Apolipoprotein A1/Apolipoprotein B $<1,19$ ($p=0,039$) erkennbar.

Gardemann et al. stellten keine Hcy-Werte in der Veröffentlichung ihrer Studienergebnisse dar. Eine Aussage bezüglich des Zusammenhanges zwischen der Plasma-Hcy-Konzentration und dem MTHFR-C₆₇₇T-Polymorphismus sowie dem Schweregrad der KHE ist aufgrund dessen nicht möglich.

Kang et al. verifizierten die thermolabile MTHFR-Variante (TT₆₇₇-Genotyp) als Risikofaktor für die verschiedenen KHE-Schweregrade (72). Die Tatsache, dass die konventionellen KHE-Risikofaktoren nicht signifikant mit der Präsenz der thermolabilen MTHFR assoziiert waren, werteten die Autoren als positive Verstärkung der Assoziation zwischen MTHFR-Gen-Polymorphismus und KHE. Die Einteilung der Studienpopulation in drei Schweregrad-Gruppen (1. schwere Koronarstenose: $\geq 70\%$ Stenose in einem oder mehreren Koronargefässen oder $>50\%$ Verschluss der A.coronaria sinistra; 2. milde bis moderate Koronarstenose: $<70\%$ Stenose in einem oder mehreren Koronargefässen oder $<50\%$ Verschluss der A.coronaria sinistra; 3. keine KHE oder Brustschmerz nicht-kardialer Ursache) differierte grundsätzlich vom Studiendesign der vorliegenden Untersuchung.

Bedeutung des MTHFR-Gen-A₁₂₉₈C-Polymorphismus für die Plasma-Konzentration von Hcy und Folsäure:

Es wurde in vorangegangenen Studien berichtet, dass der MTHFR-Gen-A₁₂₉₈C-Polymorphismus aufgrund verminderter Enzymaktivität an der Entstehung erhöhter Hcy-Werte beteiligt war (60). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten hinsichtlich einer Assoziation zwischen dem MTHFR-Gen-A₁₂₉₈C-Polymorphismus und der Plasma-Hcy-Konzentration weder in der Patientengruppe ($p=0,61$) noch in der Kontrollgruppe (0,34) eine statistisch signifikante Assoziation (Tabelle II in 4.1.2).

Andere Studien unterstützten diese Resultate (21, 36, 38): Eine Fall-Kontroll-Studie des MTHFR-A₁₂₉₈C-Polymorphismus stellte weder bei 161 KHE-Patienten noch bei 211 Kontrollpersonen erhöhte Hcy-Werte im Blutplasma fest (132). Zu demselben Ergebnis kam eine schwedische Studie, die bei 347 Patienten (167 KHE-Patienten vs. 180 Personen in der Kontrollgruppe) keinen Zusammenhang zwischen dem MTHFR-A₁₂₉₈C-Polymorphismus und dem Vorliegen erhöhter Hcy-Werte nachweisen konnte (160).

Weisberg et al. versuchten eine Erklärung für den fehlenden Einfluss des MTHFR-Gen-A₁₂₉₈C-Polymorphismus auf die Hcy-Konzentration zu finden (156): sie verglichen die MTHFR-Enzymaktivität von Individuen, welche sowohl den C₆₇₇T- als auch den A₁₂₉₈C-Genotyp trugen (41% Aktivität) mit der Enzymaktivität bei Personen, die entweder Träger des MTHFR-C₆₇₇T (45%) oder des A₁₂₉₈C-Genotyps (68%) waren. Der MTHFR-A₁₂₉₈C-Polymorphismus führte nicht zur Ausbildung eines thermolabilen Enzyms und die Hcy-Konzentration blieb unbeeinflusst. Die Hcy-Konzentration stieg bei Trägern beider MTHFR-Gen-Polymorphismen auf signifikant ($p<0,05$) höhere Hcy-Werte an. Diskutiert wird, dass die substituierte Aminosäure (C₆₇₇T: Alanin für Valin; A₁₂₉₈C: Alanin für Glutamat) und die Lokalisation der Polymorphismen (C₆₇₇T: N-terminale katalytische Domäne; A₁₂₉₈C: C-terminale regulatorische Domäne) zu unterschiedlicher Stabilität und damit auch zu unterschiedlich hoher Aktivität des Enzyms führt.

Signifikant erhöhte Hcy-Spiegel ($p<0,05$) bei Vorliegen des MTHFR-A₁₂₉₈C-Genotyps wurden in einer portugiesischen Studie mit 117 gesunden Personen (46 Frauen, 71 Männer) beobachtet (14). Die Plasma-Folsäure-Konzentration war nicht mit dem A₁₂₉₈C-Polymorphismus assoziiert. Die Autoren kamen zu der Schlussfolgerung, dass die Beziehung zwischen dem MTHFR-Polymorphismus und erhöhten Hcy-

Diskussion

Werten nicht durch Folsäure beeinflusst wurde (14). In der vorliegenden Studie war die Folsäure-Konzentration innerhalb der KHE-Patientengruppe signifikant ($p=0,04$) mit der Zunahme des C-Allels ($AA_{1298} \rightarrow AC_{1298} \rightarrow CC_{1298}$) assoziiert. Eine statistisch signifikante Auswirkung auf die Hcy-Konzentration blieb jedoch aus, da der Effekt der verminderten Folsäure-Konzentration möglicherweise zu gering ($p=0,04$) ausfiel. Die "Family Heart Study" (FHS) stellte signifikant ($p=0,02$) höhere Hcy-Werte bei Trägern des AC_{1298} -Genotyps im Vergleich zu AA_{1298} -Genotypen ($8,9 \mu\text{mol/l}$ vs. $8,0 \mu\text{mol/l}$) fest (156). Im Vergleich zur vorliegenden Studie wurde die "FHS" mit einer sehr kleinen Patientenpopulation durchgeführt (AA_{1298} : 93, AC_{1298} : 105), homozygote Träger des CC_{1298} -Genotyps waren in der Studienpopulation nicht vertreten.

Assoziation zwischen MTHFR-Gen- $A_{1298}C$ -Polymorphismus, KHE und dem Schweregrad der KHE:

Der MTHFR-Gen- $A_{1298}C$ -Polymorphismus war in der Studie des Deutschen Herzzentrum München statistisch nicht signifikant mit dem Auftreten der KHE assoziiert. Dennoch ist eine Tendenz ($p=0,07$; Signifikanz manifestierte sich ab $p<0,05$) für einen möglichen Zusammenhang des Polymorphismus mit KHE erkennbar.

Eine signifikante Assoziation zwischen dem $A_{1298}C$ -Polymorphismus und frühzeitig einsetzender KHE beobachtete eine Fall-Kontroll-Studie (161 Patienten <50 Jahre, 211 gesunden Probanden <50 Jahre) unabhängig von der Hcy- und Folsäure-Konzentration (CC_{1298} : $RR=1,71$; 95% CI: 1,13-2,59; AC_{1298} : $RR=3,09$; 95% CI: 1,36-7,02) (132). Die Autoren begründeten diese Assoziation mit der auch die Zellreplikation im menschlichen Organismus betreffenden Methylierungsfunktion der MTHFR. Die Zellreplikation ist u.a. an der Reparatur von arteriosklerotisch geschädigtem Gefässendothel mitbeteiligt. Sofern dieser Reparaturmechanismus aufgrund der genetischen Variabilität der MTHFR in seiner Funktion negativ beeinflusst wird, steigt das KHE-Risiko bei Trägern des MTHFR- $A_{1298}C$ -Polymorphismus an (132).

Die Mehrzahl veröffentlichter Studien beobachtete keine klinisch relevante Assoziation ($p>0,05$) zwischen dem MTHFR-Gen- $A_{1298}C$ -Polymorphismus und der Hcy-Konzentration sowie dem KHE-Risiko (43, 60, 80, 120). Die Autoren sahen sich in ihrer Hypothese bestätigt, dass der MTHFR-Gen- $A_{1298}C$ -Polymorphismus nur dann

mit KHE interferierte, wenn gleichzeitig auftretende niedrige Folsäure-Werte zu einem Anstieg der Hcy-Konzentration führten (43, 60).

Eine in Saudi-Arabien durchgeführte Studie wies eine höhere Prävalenz des MTHFR-AC₁₂₉₈-Genotyps (51,5%) in der Patientengruppe als in unserer (42,7%) und anderen Studien nach (1, 120, 156). Dennoch war auch bei höherer Prävalenz als in dieser Studie der A₁₂₉₈C-Polymorphismus nicht mit KHE innerhalb des Vergleichs der Patientengruppe mit der Kontrollgruppe assoziiert ($p=0,75$) (1).

Die vorliegende Studie gehörte zu den ersten, die den Zusammenhang des MTHFR-Gen-A₁₂₉₈C-Polymorphismus mit dem Schweregrad der KHE untersuchte, wies jedoch keine signifikante Assoziation ($p=0,14$) der verschiedenen Genotypen (AA₁₂₉₈, AC₁₂₉₈, CC₁₂₉₈) mit dem Schweregrad nach. Prozentual waren die Genotypträger in den drei Gruppen des KHE-Schweregrades relativ gleich verteilt (siehe Tabelle XI).

Die Bedeutung der Genotypkombinationen für die Plasma-Konzentration von Hcy, Folsäure und Vitamin B₁₂:

In den vorausgegangenen Untersuchungen wurde der MTHFR-C₆₇₇T-Gen-Polymorphismus, jedoch nicht der MTHFR-A₁₂₉₈C-Gen-Polymorphismus als Prädiktor der Hcy-Konzentration erfasst. Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse für diese MTHFR-Polymorphismen in der Einzelbetrachtung, wurden die Genotypkombinationen beider Polymorphismen auf eine Assoziation mit den Plasma-Konzentrationen von Hcy, Folsäure und Vitamin B₁₂ untersucht.

Ein signifikanter Anstieg der Hcy-Spiegel in der Patientengruppe ($p<0,001$) wurde in der Reihenfolge CC₆₇₇/AA₁₂₉₈, CC₆₇₇/AC₁₂₉₈, CC₆₇₇/CC₁₂₉₈, CT₆₇₇/AA₁₂₉₈, CT₆₇₇/AC₁₂₉₈, TT₆₇₇/AA₁₂₉₈ beobachtet. Die Folsäure-Werte waren invers zur Hcy-Konzentration korreliert, d.h. eine signifikante Abnahme ($p>0,001$) der Folsäure-Konzentration wurde in derselben Reihenfolge der Genotypkombinationen (siehe oben) beobachtet. Den niedrigsten Hcy-Wert hatten die Genotypträger CC₆₇₇/AA₁₂₉₈ ($11,8 \pm 3,7 \mu\text{mol/l}$), den höchsten Hcy-Wert TT₆₇₇/AA₁₂₉₈ ($14,8 \pm 6,7 \mu\text{mol/l}$). Die Kontrollgruppe zeigte ebenfalls eine signifikante ($p=0,012$) Zunahme der Hcy-Werte sowie eine signifikante ($p=0,04$) Reduzierung der Folsäure-Konzentration in der oben erläuterten Reihenfolge der Genotypkombinationen.

Der Kombinationsgenotyp CT₆₇₇/CC₁₂₉₈ wurde bei nur einem KHE-Patienten und in der Kontrollgruppe überhaupt nicht nachgewiesen. Aufgrund der nicht

repräsentativen Anzahl in der Studienpopulation blieb der CT₆₇₇/CC₁₂₉₈-Genotyp für die Bestimmung einer Assoziation zwischen Kombinationsgenotypen und der Hcy-Konzentration unberücksichtigt. In unserer Studienpopulation nicht vertreten waren die Kombinationen der Genotypen TT₆₇₇/AC₁₂₉₈ und TT₆₇₇/CC₁₂₉₈.

Die Autoren anderer Studien beschrieben insbesondere für den TT₆₇₇/AA₁₂₉₈-Genotyp einen signifikanten Zusammenhang mit Hyperhomocysteinämie (34, 35). Die in einer nordamerikanischen Studie (insgesamt 1238 Personen) erhobenen Ergebnisse, deren Prävalenz der Kombinationsgenotypen vergleichbar mit der vorliegenden Studie waren, zeigten bezüglich der Hcy-Konzentration bei Individuen mit TT₆₇₇/AA₁₂₉₈-Genotyp signifikant erhöhte Hcy-Werte ($p < 0,05$) im Vergleich zu vier anderen Kombinationen des Genotyps (CC₆₇₇/AA₁₂₉₈, CC₆₇₇/AC₁₂₉₈, CC₆₇₇/CC₁₂₉₈, CT₆₇₇/AA₁₂₉₈)(60). Die Höhe der Folsäure-Konzentration hatte keinen Einfluss auf die Hcy-Werte der sechs Genotypkombinationen (60). Die Autoren hatten eine sich am Median der Folsäure-Konzentration (833 nmol/l) orientierende Einteilung der Studienpopulation in zwei Subpopulationen (>833 nmol/l und <833 nmol/l) vorgenommen. Es bleibt offen, ob dieses von unserem Resultat abweichende Ergebnis im Hinblick auf die Beziehung zwischen Hcy- und Folsäure-Konzentration lediglich aus methodischen Gründen zustande gekommen ist.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie wurden unterstützt von den Resultaten einer "cross-sectional-Studie": vergleichbar mit dieser Studie war der MTHFR-A₁₂₉₈C-Polymorphismus in der Patientengruppe nicht signifikant mit Hyperhomocysteinämie assoziiert. Unter Berücksichtigung beider MTHFR-Polymorphismen zeigte der Kombinationsgenotyp CC₆₇₇/CC₁₂₉₈ im Vergleich zur CC₆₇₇/AA₁₂₉₈-Genotypkombination signifikant ($p < 0,05$) erhöhte Hcy-Spiegel (63). Die Vergleichbarkeit mit der vorliegenden Studie unterliegt Einschränkungen: die KHE-Patientengruppe der anderen Studie wurde aus Hämodialyse-Patienten rekrutiert. Möglicherweise sind die Unterschiede in der Hcy-Konzentration, die um ein Vielfaches ($37,3 \pm 12,0$ $\mu\text{mol/l}$) höher als in der Patientengruppe dieser Studie (CC₆₇₇/CC₁₂₉₈: $12,6 \pm 4,4$ $\mu\text{mol/l}$) lag, durch die Einschränkung des Hcy-Metabolismus in Folge der verminderten Nierenfunktion zu erklären.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen, aufgrund eines fehlenden signifikanten ($p > 0,05$) Einflusses der Genotypkombinationen beider Polymorphismen auf die Hcy-Konzentration der KHE-Patientengruppe, nicht mit einer anderen in Deutschland

durchgeführten Fall-Kontroll-Studie (981 KHE-Patienten, 981 Kontrollpersonen) überein (96). Die Autoren verzichteten auf die Messung der Folsäure-Konzentrationen in der Patienten- und Kontrollgruppe. Der Einfluss eines möglichen Folsäure-Mangels auf die Hcy-Konzentration, wie er in zahlreichen Studien beschrieben und in unserer Studie sowohl für den MTHFR-C₆₇₇T-Polymorphismus als auch die Genotypkombinationen beider Polymorphismen beobachtet wurde, lässt sich daher nicht beurteilen.

Die Assoziation zwischen den Genotypkombinationen und KHE sowie dem Schweregrad der KHE:

Ein signifikanter Zusammenhang für das Auftreten von KHE wurde für die Genotypkombinationen des MTHFR-Polymorphismus in dieser Studie innerhalb des Vergleichs der Patientengruppe mit der Kontrollgruppe nicht festgestellt ($p=0,41$). Eine Fall-Kontroll-Studie unterstützte das Ergebnis dieser Studie, da keine der Genotypkombinationen beider MTHFR-Polymorphismen im Einzelvergleich der Patientengruppe mit der Kontrollgruppe ein erhöhtes KHE-Risiko aufwies (CC₆₇₇/AA₁₂₉₈: p =nicht veröffentlicht; CC₆₇₇/AC₁₂₉₈: $p=0,28$; CC₆₇₇/CC₁₂₉₈: $p=0,11$; CT₆₇₇/AA₁₂₉₈: $p=0,12$; CT₆₇₇/AC₁₂₉₈: $p=0,40$; TT₆₇₇/AA₁₂₉₈: $p=0,07$) (87).

Dagegen beobachteten Haviv et al. in der bereits erwähnten Studie mit Hämodialyse-Patienten für die Träger der CC₆₇₇/CC₁₂₉₈-Genotypkombination neben signifikant erhöhten Hcy-Werten auch eine signifikante Assoziation des Genotyps mit KHE (63). Die Autoren beschrieben aussergewöhnlich hohe Hcy-Werte (Patienten: $37,7 \mu\text{mol/l} \pm 12,0 \mu\text{mol/l}$). Eine Erklärung hierfür liegt möglicherweise im Einfluss des Ausmasses der Hyperhomocysteinämie (hier: intermediäre) auf das KHE-Risiko.

Diese Studie gehörte zu den ersten, die einen Zusammenhang der Genotypkombinationen der MTHFR-Gen-Polymorphismen mit dem Schweregrad der KHE untersuchten. Die Kombinationen der Genotypen waren nicht signifikant ($p=0,52$) mit dem KHE-Schweregrad assoziiert.

Tabelle XVII: *Ergebnissübersicht anderer Studien bezüglich der MTHFR-Gen Polymorphismen-C₆₇₇T und A₁₂₉₈C und der Assoziation mit Hcy und KHE*

Studie	Polymorphismus	Assoziation mit Hcy	Assoziation mit KHE
Diese Studie (DHZ)	C ₆₇₇ T: T-Allel	+	-
	A ₁₂₉₈ C: A-Allel	-	-
Brattström et al. (12)	C ₆₇₇ T: TT ₆₇₇ -Genotyp	+	-
Ma et al. (87)	C ₆₇₇ T: T-Allel	-	-
	A ₁₂₉₈ C: A-Allel	-	-
van Bockxmeer et al. (144)	C ₆₇₇ T: T-Allel	-	-
Anderson et al. (2)	C ₆₇₇ T: TT ₆₇₇ -Genotyp	(+)	-
Gardemann et al. (48)	C ₆₇₇ T: TT ₆₇₇ -Genotyp	+	+
Klerk et al. (73)	C ₆₇₇ T: T-Allel	+	+
Kadziela et al. (69)	C ₆₇₇ T: TT ₆₇₇ -Genotyp	+	+
Tokozoglu et al. (137)	C ₆₇₇ T: TT ₆₇₇ -Genotyp	-	-
Dekou et al. (24)	A ₁₂₉₈ C: A-Allel	-	nicht bestimmt
Lievers et al. (80)	A ₁₂₉₈ C: A-Allel	-	-
Friso et al. (43)	A ₁₂₉₈ C: A-Allel	-	-
Szczalik et al. (132)	A ₁₂₉₈ C: A-Allel	-	+
Zetterberg et al. (160)	A ₁₂₉₈ C: A-Allel	-	arterielle und venöse Thrombose: -
Castro et al. (14)	A ₁₂₉₈ C: A-Allel	+	nicht bestimmt
Weisberg et al. (156)	A ₁₂₉₈ C: A-Allel	+	nicht bestimmt

Die Zusammenhänge von KHE sowie dem Schweregrad der KHE mit der Plasma-Konzentration von Hcy, Folsäure und Vitamin B₁₂

Diese Fall-Kontroll-Studie zeigte, dass angiographisch untersuchte KHE-Patienten signifikant ($p < 0,001$) höhere Hcy-Werte aufwiesen als Personen der Kontrollgruppe ($12,9 \pm 5,1 \mu\text{mol/l}$ vs. $11,9 \pm 4,5 \mu\text{mol/l}$). Invers korreliert zu Hcy war die Folsäure-Konzentration, welche in der KHE-Patientengruppe signifikant ($p = 0,008$) niedrigere Werte als in der Kontrollgruppe ($9,5 \pm 3,1 \text{ ng/ml}$ vs. $9,9 \pm 3,8 \text{ ng/ml}$) annahm. Kein signifikanter ($p = 0,83$) Zusammenhang manifestierte sich für die Konzentration von Vitamin B₁₂ im Vergleich der beiden Gruppen ($421,9 \pm 301,9 \text{ pg/ml}$ vs. $426,6 \pm 63,7 \text{ pg/ml}$). Im multiplen linearen Korrelationsmodell wurden Folsäure und Vitamin B₁₂ als unabhängige Prädiktoren ($p < 0,001$) der Plasma Hcy-Konzentration identifiziert. Unter Berücksichtigung der Arteriosklerose-Risikofaktoren (Alter, Geschlecht, Hypertonus, Diabetes mellitus, Nikotin, Hypercholesterinämie, Folsäure, Vitamin B₁₂, MTHFR-Gen-C₆₇₇T und MTHFR-A₁₂₉₈C-Polymorphismus) in der Multivarianz-Analyse, wurde keine statistisch signifikante Assoziation zwischen Plasma-Hcy und KHE erhoben ($p = 0,897$).

Die Autoren anderer Studien beobachteten ebenfalls keine signifikante Verbindung zwischen erhöhten Hcy-Werten und KHE: die "Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC)-Studie" und die "Caerphilly-Studie" sahen nach der Berücksichtigung anderer KHE-Risikofaktoren (Alter, Hypertonus, Body Mass Index (BMI), Serum-Triglyzeride) keine signifikante Beziehung zwischen erhöhtem Plasma-Hcy und KHE (36, 44, 141).

Im Gegensatz dazu war Hcy in der "Hordaland-Studie" (7591 Männer, 8585 Frauen) positiv assoziiert ($p < 0,05$) mit den konventionellen kardiovaskulären Risikofaktoren Alter, Geschlecht, Hypertonus, Nikotinabusus sowie Hyperlipidämie. Die Autoren folgerten daraus, dass Hcy mit grosser Wahrscheinlichkeit positiv mit KHE assoziiert sei, verzichteten aber auf eine statistische Überprüfung dieser Hypothese (107).

Diskrepante Ergebnisse wurden speziell im Rahmen prospektiver und retrospektiver Studien erhoben (136): prospektive Studien, die bei Untersuchungsbeginn gesunde Individuen in der Studienpopulation berücksichtigten, erzielten weit weniger signifikante Ergebnisse als retrospektive Studien.

Knekt et al. stellten in einer prospektiven Studie keinen signifikanten Zusammenhang

zwischen erhöhten Hcy-Werten und KHE fest (RR: 0,90; 95% CI: 0,51-1,60) (77). Allerdings war Hyperhomocysteinämie bei Patienten mit anamnestisch erhobenen früheren KHE-Ereignissen positiv assoziiert mit dem erneuten Auftreten von KHE-Symptomen (RR:2,3; 95% CI:1,03-4,85) (77).

Ein Zusammenhang zwischen KHE und Hyperhomocysteinämie wurde in mehreren retrospektiven Studien beobachtet (52, 89, 90, 136). Die retrospektiven Studien zeigten Nachteile in der Beurteilung von Einflussfaktoren der Hcy-Konzentration (z.B. veränderbare Therapieansätze mit Folsäure, die Nierenfunktion, konventionelle Arteriosklerose-Risikofaktoren), die (hypothetisch) zu einer sekundären Erhöhung der Hcy-Konzentration führen können. Daraus leiteten einige Autoren die These ab, dass Hyperhomocysteinämie nicht die Ursache für KHE, sondern die Folge einer Endothelverletzung bei Myokardischämie ist (77, 136).

Um den Einfluss anderer Faktoren in der Beurteilung der Assoziation von Hyperhomocysteinämie und KHE zu ermitteln, bestimmte die vorliegende Studie die unabhängigen Prädiktoren sowohl der Plasma-Hcy-Konzentration als auch der KHE in der Multivarianz-Analyse (siehe 4.6).

Einschränkungen in der Aussagekraft von retrospektiven Fall-Kontroll-Studien werden bezüglich des Studienkonzeptes proklamiert, da die Kontrollgruppe (wie auch in der vorliegenden Studie) oftmals aus derselben Patientenpopulation mit Angina pectoris-Symptomatik stammende Individuen ohne angiographisch nachweisbare KHE berücksichtigt (136).

Die These eines kausalen Zusammenhanges zwischen Hyperhomocysteinämie und KHE findet die meiste Unterstützung in wenigen prospektiven Studien: Vasan et al. wiesen in einer prospektiven Kohorten-Studie mit 2491 Erwachsenen ("Framingham Heart Study") Hyperhomocysteinämie als Prädiktor für die Entwicklung eines Myokardinfarktes bei zuvor gesunden Personen nach (Frauen: OR = 1,93 (95% CI: 1,19-3,14); Männer: OR = 1,84 (95% CI: 1,06-3,17) (147).

Eine Metaanalyse aus 30 prospektiven und retrospektiven Studien ergab, dass erhöhte Hcy-Konzentrationen einen moderaten Prädiktor für ischämische Herzkrankheit und Schlaganfall bei Gesunden darstellten (136). Die Auswertung der prospektiven Studien der Metaanalyse zeigte, dass eine 25%ige Senkung der Hcy-Werte mit einem um 11% vermindertem KHE-Risiko verbunden war.

In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass die Hcy-Werte mit zunehmender Ausprägung der Koronarsklerose (1-GE über 2-GE bis 3-GE) progressiv und signifikant ($p < 0,001$) zunahmen (1-GE: $12,2 \pm 4,6 \mu\text{mol/l}$ → 2-GE: $12,8 \pm 5,1 \mu\text{mol/l}$ → 3-GE: $13,3 \pm 5,3 \mu\text{mol/l}$).

Die Ergebnisse dieser Arbeit fanden Unterstützung durch die Resultate von Schnyder et al.: die Autoren wiesen in einer Studie mit 631 angiographisch untersuchten Patienten Plasma-Hcy als starken Prädiktor ($p < 0,0001$) für den KHE-Schweregrad (1-GE: $10,4 \pm 3,9 \mu\text{mol/l}$; 2-GE: $11,3 \pm 4,7 \mu\text{mol/l}$; 3-GE: $12,4 \pm 5,4 \mu\text{mol/l}$) nach (122). Eine Erhöhung der Hcy-Werte nach stattgefundenem Myokardinfarkt sollte in einer zweiten Untersuchung ausgeschlossen werden, welche Patienten mit Infarkt ereignis < 6 Monate nicht berücksichtigte. Unter den 450 verbleibenden Patienten blieb Hcy signifikant ($p < 0,0001$) mit dem Schweregrad der KHE assoziiert (122). In der vorliegenden Studie wurden Patienten mit Myokardinfarkt < 3 Monate von Beginn an nicht berücksichtigt, da bekannt ist, dass kürzlich stattgefundenener Myokardinfarkt zur Erhöhung der Plasma-Hcy-Werte führen kann (30).

Eine finnische Studie identifizierte Serum-Hcy als Prädiktor für den Schweregrad der KHE bei Individuen ohne KHE-Symptome, die allerdings Zwillingsgeschwister mit KHE hatten (110). KHE und KHE-Schweregrad waren, vergleichbar mit dieser Studie, als Stenose $> 50\%$ in mindestens einem Koronargefäß definiert.

Dagegen stellten Nygard et al. in einer prospektiven Studie mit KHE-Patienten lediglich eine schwache Korrelation ($p = 0,05$) zwischen Plasma-Hcy und dem Schweregrad der KHE fest (105). Die Ergebnisse stützten sich auf kleinere Patientenzahlen in den KHE-Gruppen mit 1-GE ($n = 94$), 2-GE (172) und 3-GE (321) im Vergleich zu der vorliegenden Studie (105).

Hcy als Marker für KHE ?

Einige prospektive Studien stellten die Bedeutung von Hcy als primären Risikofaktor für Arteriosklerose in Frage (42, 77, 105). Vielmehr gingen die Autoren davon aus, dass erhöhtes Plasma-Hcy ein Marker für ein kardiovaskuläres Risiko, insbesondere bei Patienten mit einer bestehenden Vorerkrankung oder positiver Familienanamnese sein könnte (42, 77, 105, 110).

Diskutiert wurde die umgekehrte Kausalitätshypothese, welche davon ausgeht, dass

Diskussion

die Arteriosklerose selbst zur Erhöhung der Hcy-Werte im Blutplasma führt und es auf diese Weise zu einer scheinbaren Assoziation zwischen Hyperhomocysteinämie und KHE kommt (12, 31, 36).

Knekt et al. bezeichneten Hcy als Indikator bereits vorhandener Gewebeschädigung sowie als Verstärker eines entzündlichen, die Gefässintima betreffenden Prozesses, jedoch nicht als Initiator von Arteriosklerose (77).

Insbesondere in prospektiven Studien wurde Hcy weniger als prädisponierender Risikofaktor für KHE bezeichnet, vielmehr könnte erhöhtes Plasma-Hcy ein acute-Phase-Reaktant sein, welches mit den konventionellen kardiovaskulären Risikofaktoren (z.B. Hypertonus, Diabetes mellitus, Alter) interagiert und an der Entstehung akuter Krankheitsereignisse beteiligt ist (17, 104).

6 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der MTHFR-C₆₇₇T und A₁₂₉₈C-Polymorphismen im Zusammenhang mit Hyperhomocysteinämie und dem Auftreten von koronarer Herzerkrankung (KHE) untersucht. KHE ist definiert als Manifestation der Arteriosklerose an den Koronararterien, welche durch eine Stenosierung des Gefäßlumens zu einer Ischämie des Myokardgewebes führt. KHE ist die häufigste Todesursache in den Industrieländern.

Die Aminosäure Homocystein (Hcy) wird im Organismus aus Methionin gebildet. Aufgrund vielfältiger Pathomechanismen wird Hcy eine Beteiligung an der Genese von Arteriosklerose zugerechnet.

Die MTHFR katalysiert Hcy durch Remethylierung zu Methionin. Für das MTHFR-Gen sind genetische Varianten (C₆₇₇T- und A₁₂₉₈C-Polymorphismen) bekannt. Der Austausch von Alanin für Valin beim MTHFR-Gen-C₆₇₇T-Polymorphismus sowie Glutamat für Alanin beim MTHFR-Gen-A₁₂₉₈C-Polymorphismus führte in einigen veröffentlichten Studien zu einer verminderten MTHFR-Aktivität, die im Zusammenhang mit erhöhten Hcy-Konzentrationen steht.

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der MTHFR-Gen-C₆₇₇T und A₁₂₉₈C-Polymorphismen sowie der Genotypkombinationen beider Polymorphismen auf die Hcy-Konzentration und die Genese der KHE zu untersuchen. Ausserdem stand die von anderen Studien postulierte Assoziation zwischen Hcy mit der KHE und dem Schweregrad der KHE im Focus dieser Studie.

In diese Studie wurden 2738 Patienten mit koronarangiographischer Untersuchung am Deutschen Herzzentrum München und der I. Medizinischen Klinik des Klinikum rechts der Isar der TU München eingeschlossen.

In der gesamten Studienpopulation (d.h. Patienten mit und ohne KHE) lagen die folgenden MTHFR-Gen-C₆₇₇T-Genotypenverteilungen vor: CC₆₇₇-Genotyp bei 1181 (43,1%), CT₆₇₇-Genotyp bei 1238 (45,2%) und TT₆₇₇-Genotyp bei 319 Personen (11,7%).

Die MTHFR-Gen-A₁₂₉₈C-Genotypverteilungen waren: AA₁₂₉₈-Genotyp bei 1254 (45,8%), AC₁₂₉₈-Genotyp bei 1189 (43,4%) und CC₁₂₉₈-Genotyp bei 295 (10,8%) der Patienten.

Zusammenfassung

Die Verteilung der Kombinationen der Genotypen beider Polymorphismen sah wie folgt aus: CC₆₇₇/AA₁₂₉₈-Genotyp bei 308 (11,2%), CC₆₇₇/AC₁₂₉₈ bei 579 (21,1%), CC₆₇₇/CC₁₂₉₈ bei 294 (10,7%), CT₆₇₇/AA₁₂₉₈ bei 627 (22,9%), CT₆₇₇/AC₁₂₉₈ bei 610 (22,3%), CT₆₇₇/CC₁₂₉₈ bei 1 (0,037%), TT₆₇₇/AA₁₂₉₈ bei 319 (11,7%) der Patienten. Nur die genannten Genotypkombinationen kamen in der Population vor, jedoch sind weitere Kombinationen theoretisch möglich.

In der KHE-Patientengruppe befanden sich 2121 Patienten mit angiographisch gesicherter KHE, welche als Erkrankung von mindestens einem Koronargefäss (Stenosegrad >50%) definiert war. Der Kontrollgruppe gehörten 617 Patienten mit keiner Koronararterienstenose oder Stenosegrad ≤ 10% an.

Der Schweregrad der KHE wurde nach der Anzahl der erkrankten grossen Koronargefässe (1-GE: 593 Patienten, 2-GE: 614 Patienten, 3-GE: 914 Patienten) bestimmt. Patienten mit Stenosierung der Koronargefässe >10% bis <50% wurden aus Gründen der Genauigkeit der Studienergebnisse ebenso aus der Studie ausgeschlossen, wie Patienten mit Myokardinfarkt innerhalb der vergangenen drei Monate vor Einschluss in die Studie zur Vermeidung falsch erhöhter Hcy-Werte direkt nach dem Infarktereignis.

Die Analyse des Genotyps erfolgte mittels der TaqMan-Methode (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland).

Die Bestimmung der Konzentrationen von Hcy, Folsäure und Vitamin B₁₂ wurde im Institut für Laboratoriumsmedizin des Deutschen Herzzentrum München unter Verwendung des AxSYM®System durchgeführt (Abbot Laboratories, Abbot Park, IL, USA).

Die wichtigsten Befunde dieser Studie waren, dass der MTHFR-C₆₇₇T-Polymorphismus mit zunehmender Anzahl des T-Allels (CC₆₇₇→CT₆₇₇→TT₆₇₇) einen signifikanten Anstieg (p<0,001) der Hcy-Konzentration sowohl bei KHE-Patienten (CC₆₇₇: 12,5 ± 4,8 µmol/l; CT₆₇₇: 12,8 ± 4,8 µmol/l; TT₆₇₇: 14,8 ± 6,7 µmol/l) als auch in der Kontrollgruppe zeigte (CC₆₇₇: 11,7 ± 4,5 µmol/l; CT₆₇₇: 11,9 ± 4,1 µmol/l; TT₆₇₇: 13,2 ± 5,7 µmol/l; p=0,047). Gleichzeitig nahm die Folsäure-Konzentration mit zunehmender Anzahl des T-Allels signifikant ab (KHE-Patienten: p<0,001; Kontrollgruppe: p=0,02).

Eine signifikante Assoziation des MTHFR-C₆₇₇T-Polymorphismus mit KHE wurde im

Zusammenfassung

Vergleich der Patientengruppe mit der Kontrollgruppe nicht festgestellt ($p=0,84$). In der Multivarianz-Analyse war der MTHFR-Gen- $C_{677}T$ -Polymorphismus ein unabhängiger Prädiktor für das Auftreten von Hyperhomocysteinämie ($p=0,006$), jedoch kein unabhängiger Faktor für KHE ($p=0,38$).

Der MTHFR-Gen- $A_{1298}C$ -Polymorphismus zeigte mit zunehmender Anzahl des C-Allels ($AA_{1298} \rightarrow AC_{1298} \rightarrow CC_{1298}$) keine signifikante Assoziation mit der Plasma-Hcy-Konzentration (Patientengruppe: $p=0,61$; Kontrollgruppe: $0,34$), jedoch für die Folsäure-Konzentration der Patientengruppe ($p=0,04$).

Eine signifikante Assoziation des MTHFR- $C_{1298}T$ -Polymorphismus mit KHE wurde im Vergleich der Patientengruppe mit der Kontrollgruppe nicht festgestellt ($p=0,07$). In der Multivarianz-Analyse war der MTHFR-Gen- $C_{1298}T$ -Polymorphismus weder für das Auftreten von Hyperhomocysteinämie ($p>0,05$) noch von KHE ($p=0,47$) ein unabhängiger Prädiktor.

Die Genotypkombinationen (CC_{677}/AA_{1298} , CC_{677}/AC_{1298} , CC_{677}/CC_{1298} , CT_{677}/AA_{1298} , CT_{677}/AC_{1298} , CT_{677}/CC_{1298} , TT_{677}/AA_{1298}) wiesen für die KHE-Patienten als auch die Kontrollgruppe signifikante Zusammenhänge mit Hcy (KHE-Patienten: $p<0,001$; Kontrollgruppe: $p=0,012$) und Folsäure (KHE-Patienten: $p<0,001$; Kontrollgruppe: $p=0,04$) auf. Eine signifikante Assoziation der Genotypkombinationen beider MTHFR-Polymorphismen mit KHE wurde im Vergleich der Patientengruppe mit der Kontrollgruppe nicht festgestellt ($p=0,41$).

Weder der MTHFR-Gen- $A_{677}C$ -Polymorphismus ($p=0,62$) und MTHFR-Gen- $A_{1298}C$ -Polymorphismus ($p=0,14$) noch die Genotypkombinationen beider Polymorphismen ($p=0,52$) waren mit dem Schweregrad der KHE statistisch signifikant assoziiert.

Die KHE-Patienten hatten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant ($p<0,001$) höhere Plasma-Hcy-Werte ($12,9 \pm 5,1 \mu\text{mol/l}$ vs. $11,9 \pm 4,5 \mu\text{mol/l}$). Im Gegensatz dazu wies die Patientengruppe mit KHE signifikant ($p=0,008$) niedrigere Folsäure-Konzentrationen auf als die Kontrollgruppe ($9,5 \pm 3,1 \text{ ng/ml}$ vs. $9,9 \pm 3,8 \text{ ng/ml}$). Mit zunehmendem Schweregrad der KHE stieg die Hcy-Konzentration signifikant an (1-GE: $12,2 \pm 4,6 \mu\text{mol/l}$; 2-GE: $12,8 \pm 5,1 \mu\text{mol/l}$; 3-GE: $13,3 \pm 5,3 \mu\text{mol/l}$; $p<0,001$). In der Multivarianzanalyse wurden Plasma-Hcy ($p=0,89$), Folsäure ($p=0,13$) und Vitamin B_{12} ($p=0,41$) nicht als unabhängiger Faktor der KHE beurteilt.

Zusammenfassung

Zusammenfassend ergibt sich aus dieser Studie, dass kein kausaler Zusammenhang der MTHFR-Gen-C₆₇₇T und A₁₂₉₈C-Polymorphismen sowie den Genotypkombinationen beider Polymorphismen mit KHE und dem Schweregrad der KHE besteht.

Der MTHFR-Gen-C₆₇₇T-Polymorphismus ist ein unabhängiger Prädiktor der Plasma-Hcy-Konzentration.

Milde Hyperhomocysteinämie war mit KHE und dem Schweregrad der KHE signifikant assoziiert, jedoch wird Hcy in der Multivarianzanalyse nicht als unabhängiger Prädiktor der KHE erfasst.

7 Literaturverzeichnis

- (1) Abu-Amero, K.K., Wyngaard, C.A., Dzimiri, N.
Prevalence and role of methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T and 1298A→C polymorphisms in coronary artery disease in Arabs.
Arch. Pathol. Lab. Med. 127 (2003) 1349-1352.
- (2) Anderson, J.L., King, G.J., Thomson, M.J., Todd, M., Bair, T.L., Muhlestein, J.B., Carlquist, J.F.
A mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is not associated with increased risk for coronary artery disease or myocardial infarction.
J. Am. Coll. Cardiol. 30 (1997) 1206-1211.
- (3) Anderson, J.L., Muhlestein, J.B., Horne, B.D., Carlquist, J.F., Bair, T.L., Madsen, T., Pearson, R.R.
Plasma homocysteine predicts mortality independently of traditional risk factors and C-reactive protein in patients with angiographically defined coronary artery disease
Circulation. 102 (2000) 1227-1232.
- (4) Andersson, A., Brattström, L., Israelsson, B., Isaksson, A., Hamfelt, A., Hultberg, B.
Plasma homocysteine before and after methionine loading with regard to age, gender and menopausal status.
Eur. J. Clin. Invest. 22 (1992) 79-87.
- (5) Andreassi, M.G., Botto, N., Cocci, F., Battaglia, D., Antonioli, E., Masetti, S., Manfredi, S., Colombo, M.G., Biagini, A., Clerico, A.
Methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism, homocysteine, vitamin B12, and DNA damage in coronary artery disease.
Hum. Genet. 112 (2003) 171-177.
- (6) Arnesen, E., Refsum, H., Bonaa, K.H., Ueland, P.M., Forde, O.H., Nordrehaug, J.E.
Serum total homocysteine and coronary heart disease.
Int. J. Epidemiol. 24 (1995) 704-709.
- (7) Ashfield-Watt, P.A., Pullin, C.H., Whiting, J.M., Clark, Z.E., Moat, S.J., Newcombe, R.G., Burr, M.L., Lewis, M.J., Powers, H.J., McDowell, I.F.
Methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T genotype modulates homocysteine responses to a folate-rich diet or a low-dose folic acid supplement: a randomized controlled trial.
Am. J. Clin. Nutr. 76 (2002) 180-186.

(8) Berman, R.S., Martin, W.

Arterial endothelial barrier dysfunction: actions of homocysteine and the hypoxanthine-xanthine oxidase free radical generating system.

Br. J. Pharmacol. 108 (1993) 920-926.

(9) Blom, H.J., De Vriese, A.S., De Vriese, S.

Why are homocysteine levels increased in kidney failure? A metabolic approach.

J. Lab. Clin. Med. 139 (2002) 262-268.

(10) Blundell, G., Jones, B.G., Rose, F.A., Tudball, N.

Homocysteine mediated endothelial cell toxicity and its amelioration.

Atherosclerosis. 122 (1996) 163-172.

(11) Brattström, L., Wilcken, D.E.

Homocysteine and cardiovascular disease: cause or effect?

Am. J. Clin. Nutr. 72 (2000) 315-323.

(12) Brattström, L., Wilcken, D.E., Ohrvik, J., Brudin, L.

Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis.

Circulation. 98 (1998) 2520-2526.

(13) Carson, N.A., Neill, D.W.

Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland.

Arch. Dis. Child. 37 (1962) 505-513.

(14) Castro, R., Rivera, I., Ravasco, P., Jakobs, C., Blom H.J., Camilo, M.E., de Almeida, I.T.
5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T and 1298A→C mutations are genetic determinants of elevated homocysteine.

QJM. 96 (2003) 297-303.

(15) Chamberlain, J.C., Galton, D.J.

Genetic susceptibility to atherosclerosis.

Br. Med. Bull. 46 (1990) 917-940.

(16) Chen, L.H., Liu, M.L., Hwang, H.Y., Chen, L.S., Korenberg, J., Shane, B.

Human methionine synthase, cDNA cloning, gene localization, and expression.

J. Biol. Chem. 272 (1997) 3628-3634.

(17) Christen, W.G., Ajani, U.A., Glynn, R.J., Hennekens, C.H.

Blood levels of homocysteine and increased risks of cardiovascular disease: causal or casual?

Arch. Intern. Med. 160 (2000) 422-434.

(18) Clarke, R., Armitage, J.

Vitamin supplements and cardiovascular risk: review of the randomized trials of the homocysteine-lowering vitamin supplements.

Semin. Thromb. Hemost. 26 (2000) 341-348.

(19) Dahlmann, I., Eaves, I.A., Kosoy, R., Morrison, V.A., Heward, J., Gough, S.C., Allahabadia, A., Franklyn, J.A., Tuomiletho, J., Tuomiletho-Wolf, E., Cucca, F., Guja, C., Ionescu-Tirgoviste, C., Stevens, H., Carr, P., Nutland, S., McKinney, P., Shield, J.P., Wang, W., Cordell, H.J., Walker, N., Todd, J.A., Concannon, P.

Parameters for reliable results in genetic association studies in common disease.

Nat. Genet. 30 (2002) 149-150.

(20) D'Angelo, A., Selhub, J.

Homocysteine and thrombotic disease.

Blood. 90 (1997) 1-11.

(21) de Bree, A., Verschuren, W.M., Bjorke-Monsen, A.L., van der Put, N.M., Heil, S.G., Trijbels, F.J., Blom, H.J.

Effect of the methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T mutation on the relations among folate intake and plasma folate and homocysteine concentrations in a general population sample.

Am. J. Clin. Nutr. 77 (2003) 687-693.

(22) de Bree, A., Verschuren, W.M., Blom, H.J., Kromhout, D.

Alcohol consumption and plasma homocysteine: what's brewing?

Int. J. Epidemiol. 30 (2001) 626-627.

(23) de Bree, A., Verschuren, W.M., Kromhout, D., Kluijtmans, L.A., Blom, H.J.

Homocysteine determinants and the evidence to what extent homocysteine determines the risk of coronary heart disease.

Pharmacol. Rev. 54 (2002) 599-618.

(24) Dekou, V., Whincup, P., Papacosta, O., Ebrahim, S., Lennon, L., Ueland, P.M., Refsum, H., Humphries, S.E., Gudnason, V.

The effect of the C677T and A1298C polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene on homocysteine levels in elderly men and women from the British regional heart study.

Atherosclerosis. 154 (2001) 659-666.

(25) Delva, M.D.

Vitamin B12 replacement. To B12 or not to B12?

Can. Fam. Physician. 43 (1997) 917-922.

(26) Di Minno, G., Davi, G., Margaglione, M., Cirillo, F., Grandone, E., Ciabattini, G. Catalano, I., Strisciuglio, P., Andria, G., Patrono, C., et al.

Abnormally high thromboxane biosynthesis in homozygous homocystinuria. Evidence for platelet involvement and probucol-sensitive mechanism.

J. Clin. Invest. 92 (1993) 1400-1406.

(27) Dudman, N.P., Temple, S.E., Guo, X.W., Fu, W., Perry, M.A.

Homocysteine enhances neutrophil-endothelial interactions in both cultured human cells and rats in vivo.

Circ. Res. 84 (1999) 409-416.

(28) Durand, P., Prost, M., Loreau, N., Lussier-Cacan, S., Blache, D.

Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease.

Lab. Invest. 81 (2001) 645-672.

(29) Eikelboom, J.W., Lonn, E., Genest, J. Jr., Hankey, G., Yusuf, S.

Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence.

Ann. Intern. Med. 131 (1999) 363-375.

(30) Egerton, W., Silberberg, J., Crooks, R., Ray, C., Xie, L., Dudman, N.

Serial measures of plasma homocyst(e)ine after acute myocardial infarction.

Am. J. Cardiol. 77 (1996) 759-761.

(31) Evans, R.W., Shaten, B.J., Hempel, J.D., Cutler, J.A., Kuller, L.H.; MRFIT Research Group.

Homocyst(e)ine and risk of cardiovascular disease in the multiple risk factor intervention trial.

Indian. Heart. J. 52 (2000) 44-52.

(32) Finkelstein, J.D.

The metabolism of homocysteine: pathways and regulation.

Eur. J. Pediatr. 157 (1998) 40-44.

(33) Fletcher, O., Kessling, A.M.

MTHFR association with atherosclerotic vascular disease?

Hum. Genet. 103 (1998) 11-21.

(34) Födinger, M., Buchmayer H., Heinz, G., Papagiannopoulos, M., Kletzmayer, J., Perschl, A., Vychytil, A., Horl, W.H., Sunder-Plassmann, G.

Association of two MTHFR polymorphisms with total homocysteine plasma levels in dialysis patients.

Am. J. Kidney. Dis. 38 (2001) 77-84.

(35) Födinger, M., Buchmayer H., Heinz, G., Papagiannopoulos, M., Kletzmayer, J., Rasoul-Rockenschaub, S., Hörl, W.H., Sunder-Plassmann, G.

Effect of MTHFR 1298A→C and MTHFR 677C→T genotypes on total homocysteine, folate and vitamin B(12) plasma concentrations in kidney graft recipients.

J. Am. Soc. Nephrol. 11 (2000) 1918-1925.

(36) Folsom, A.R., Nieto, F.J., McGovern, P.G., Tsai, M.Y., Malinow, M.R., Eckfeldt J.H., Hess, D.L., Davis, C.E.

Prospective study of coronary heart disease incidence in relation to fasting total homocysteine, related genetic polymorphisms, and B vitamins: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study.

Circulation. 98 (1998) 204-210.

(37) Fonseca, V., Guba, S.C., Fink, L.M.

Hyperhomocysteinemia and the endocrine system: implications for atherosclerosis and thrombosis.

Endocr. Rev. 20 (1999) 738-759.

(38) Foreman, J.W., Wald, H., Blumberg, G., Pepe, L.M., Segal, S.

Homocysteine uptake in isolated rat renal cortical tubules.

Metabolism. 31 (1982) 613-619.

(39) Frantzen, F., Faaren, A.L., Alfheim, I., Nordhei, A.K.

Enzyme conversion immunoassay for determining total homocysteine in plasma or serum.

Clin. Chem. 44 (1998) 311-316.

(40) Friedman, A.N., Bostom, A.G., Selhub, J., Levey, A.S., Rosenberg, I.H.

The kidney and homocysteine metabolism.

J. Am. Soc. Nephrol. 12 (2001) 2181-2189.

(41) Friedman, G., Goldschmidt, N., Friedlander, Y., Ben-Yehuda, A., Selhub, J., Babaey, S., Mendel, M., Kidron, M., Bar-On, H.

A common mutation A1298C in human methylenetetrahydrofolate reductase gene: association with plasma total homocysteine and folate concentrations.

J. Nutr. 129 (1999) 1656-1661.

(42) Frishman, W.H.

Biologic markers as predictors of cardiovascular disease.

Am. J. Med. 104 (1998) 18-27.

(43) Friso, S., Girelli, D., Trabetti, E., Stranieri, C., Olivieri, O., Tinazzi, E., Martinelli, N., Faccini, G., Pignatti, P., Corrocher, R.

A1298C methylenetetrahydrofolate reductase mutation and coronary artery disease: relationships with C677T polymorphism and homocysteine/folate metabolism.

Clin. Exp. Med. 2 (2002) 7-12.

(44) Frosst, P., Blom, H.J., Milos, R., Goyette, P., Sheppard, C.A., Matthews, R.G., Boers, G.J., den Heijer, M., Kluijtmans, L.A., van den Heuvel, L.P., et al.

A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase.

Nat. Genet. 10 (1995) 111-113.

(45) Fryer, R.H., Wilson, B.D., Gubler, D.B., Fitzgerald, L.A., Rodgers, G.M.

Homocysteine, a risk factor for premature vascular disease and thrombosis, induces tissue factor activity in endothelial cells.

Arterioscler. Thromb. 13 (1993) 1327-1333.

(46) Fuster, V., Badimon, J.J., Chesebro, J.H.

The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndrome (1).

N. Engl. J. Med. 326 (1992) 242-250.

(47) Gallagher, P.M., Meleady, R., Shields, D.C., Tan, K.S., McMaster, D., Rozen, R., Evans, A., Graham, I.M., Whitehead, A.S.

Homocysteine and risk of premature coronary heart disease. Evidence for a common gene mutation.

Circulation. 94 (1996) 2154-2158.

(48) Gardemann, A., Weidemann, H., Philipp, M., Katz, N., Tillmanns, H., Hehrlein F.W., Haberbosch, W.

The TT genotype of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism is associated with the extent of coronary atherosclerosis in patients at high risk for coronary artery disease.

Eur. Heart. J. 20 (1999) 584-592.

(49) Gensini, G.G.

A more meaningful scoring system for determining the severity of coronary heart disease. Am. J. Cardiol. 51 (1983) 606.

(50) Goyette, P., Sumner, J.S., Milos, R., Duncan, A.M., Rosenblatt, D.S., Matthews, R.G., Rozen, R.

Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification.

Nat. Genet. 7 (1994) 195-200.

(51) Graeber, J.E., Slott, J.H., Ulane, R.E., Schulman, J.D., Stuart, M.J.

Effect of homocysteine and homocystine on platelet and vascular arachidonic acid metabolism.

Pediatr. Res. 16 (1982) 490-493.

(52) Graham, I.M., Daly, L.E., Refsum, H.M., Robinson, K., Brattström, L.E., Ueland, P.M., Palms-Reis, R.J., Boers, G.H., Sheahan, R.G., Israelsson, B., Uiterwaal, C.S., Meleady, R., McMaster, D., Verhoef, P., Witteman, J., Rubba, P., Bellet, H., Wautrecht, J.C., de Valk, H.W., Sales Luis, A.C., Parrot-Rouland, F.M., Tan, K.S., Higgins, I., Garcon, D., Andria, G., et al.

Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerned Action Project.

JAMA. 277 (1997) 1775-1781.

(53) Gregory, J.F. 3rd

Case Study: folate bioavailability.

J. Nutr. 131 (2001) 1376-1382.

(54) Grubben, M.J., Boers, G.H., Blom, H.J., Broekhuizen, R., de Jong R., van Ruijter, E., Swinkels, D.W., Nagengast, F.M., Katan, M.B.

Unfiltered coffee increases plasma homocysteine concentrations in healthy volunteers: a randomized trial.

Am. J. Clin. Nutr. 71 (2000) 480-484.

(55) Guenther, B.D., Sheppard, C.A., Tran, P., Rozen, R., Matthews, R.G., Ludwig, M.L.
The structure and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli*
suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia.

Nat. Struct. Biol. 6 (1999) 359-365.

(56) Gupta, A.K., Damji, A., Uppulari, A.

Vitamin B12 deficiency. Prevalence among South Asians at a Toronto clinic.

Can. Fam. Physician. 50 (2004) 743-747.

(57) Harpel, P.C., Zhang, X., Borth, W.

Homocysteine and hemostasis: pathogenic mechanisms predisposing to thrombosis.

J. Nutr. 126 (1996) 1285-1289.

(58) Hajjar, K.A.

Homocysteine-induced modulation of tissue plasminogen activator binding to its endothelial
cell membrane receptor.

J. Clin. Invest. 91 (1993) 2873-2879.

(59) Hankey, G.J., Eikelboom, J.W.

Homocysteine and vascular disease.

Lancet. 354 (1999) 407-413.

(60) Hanson, N.Q., Aras, O., Yang, F., Tsai, M.Y.

C677T and A1298C polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase gene:
incidence and effect of combined genotypes on plasma fasting and post-methionine load
homocysteine in vascular disease.

Clin. Chem. 47 (2001) 661-666.

(61) Harker, L.A., Slichter, S.J., Scott, C.R., Ross, R.

Hyperhomocysteinemia. Vascular injury and arterial thrombosis.

N. Engl. J. Med. 291 (1974) 537-543.

(62) Hayashi, T., Honda, G., Suzuki, K.

An atherogenic stimulus: homocysteine inhibits cofactor activity of thrombomodulin and
enhances thrombomodulin expression in human umbilical vein endothelial cells.

Blood. 79 (1992) 2930-2936.

(63) Haviv, Y.S., Shpichinetsky, V., Goldschmidt, N., Atta, I.A., Ben-Yehuda, A., Friedman, G.

The common mutations C677T and A1298C in the human methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease in hemodialysis patients.

Nephron. 92 (2002) 120-126.

(64) Hofbrand, A., Weir, D.

Historical Review: the history of folic acid.

Brit. J. Haemat. 113 (2001) 579-589.

(65) Ioannidis, J.P., Trikalinos, T.A., Ntzani, E.E., Contopoulos-Ioannidis, D.G.

Genetic associations in large versus small studies: an empirical assessment.

Lancet. 361 (2003) 567-571.

(66) Jacobsen, D.W.

Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease.

Clin. Chem. 44 (1998) 1833-1843.

(67) Jaques, P.F., Selhub, J., Bostom, A.G., Wilson, P.W., Rosenberg, I.H.

The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations.

N. Engl. J. Med. 340 (1999) 1449-1454.

(68) Jee, S.H., Beaty, T.H., Suh, I., Yoon, Y., Appel, L.J.

The methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with increased cardiovascular risk in Japan, but not in other populations.

Atherosclerosis. 153 (2000) 161-168.

(69) Kadziela, J., Janas, J., Dzielinska, Z., Szperl, M., Gazdzik, D., Chotkowska, E., Piotrowski, W., Ruzylo, W.

The C677T mutation in methylenetetrahydrofolate reductase gene, plasma homocysteine concentration and the risk of coronary heart disease.

Kardiol. Pol. 59 (2003) 17-26.

(70) Kalina, A., Czeizel, A.E.

The methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism (C677T) is associated with increased cardiovascular mortality in Hungary.

Int. J. Cardiol. 97 (2004) 333-334.

- (71) Kang, S.S., Passen, E.L., Ruggie, N., Wong, P.W., Sora, H.
Thermolabile defect of methylenetetrahydrofolate reductase in coronary artery disease.
Circulation. 88 (1993) 1463-1469.
- (72) Kang, S.S., Wong, P.W., Susmano, A., Sora, J., Norusis, M., Ruggie, N.
Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease.
Am. J. Hum. Genet. 48 (1991) 536-545.
- (73) Klerk, M., Verhoef, P., Clarke, R., Blom, H.J., Kok, F.J., Schouten, E.G.; MTHFR Studies Collaboration Group.
MTHFR 677C→T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis.
JAMA. 288 (2002) 2023-2031.
- (74) Kluijtmans, L.A., Blom, H.J., Boers, G.H., van Oost, B.A., Trijbels, F.J., van den Heuvel, L.P.
Two novel missense mutations in the cystathionine-β-synthase gene in homocystinuric patients.
Hum. Genet. 96 (1995) 249-250.
- (75) Kluijtmans, L.A., Kastelein, J.J., Lindemans, J., Boers, G.H., Brusckhe, A.V., Jukema, J.W., van den Heuvel, L.P., Trijbels, F.J., Boerma, G.J., Verheugt, F.W., Willems, F., Blom, H.J.
Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in coronary artery disease.
Circulation. 96 (1997) 2573-2577.
- (76) Kluijtmans, L.A., van den Heuvel, L.P., Boers, G.H., Frosst, P., Stevens, E.M., van Oost, B.A., den Heijer, M., Trijbels, F.J., Rozen, R., Blom, H.J.
Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease.
Am. J. Hum. Genet. 58 (1996) 35-41.
- (77) Knekt, P., Reunanen, A., Alfthan, G., Heliovaara, M., Rissanen, H., Marniemi, J., Aromaa, A.
Hyperhomocysteinemia: a risk factor or a consequence of coronary heart disease?
Arch. Intern. Med. 161 (2001) 1589-1594.
- (78) Lentz, S.R., Sadler, J.E.
Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein C activation by the thrombogenic agent homocysteine
J. Clin. Invest. 88 (1991) 1906-1914.

(79) Lien, E.A., Anker, G., Loning, P.E., Refsum, H., Ueland, P.M.

Effects of hormones on the plasma levels of the atherogenic amino acid homocysteine.

Biochem. Soc. Trans. 25 (1997) 33-35.

(80) Lievers, K.J., Boers, G.H., Verhoef, P., den Heijer, M., Kluijtmans, L.A., van der Put, N.M., Trijbels, F.J., Blom, H.J.

A second common variant in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene and its relationship to MTHFR enzyme activity, homocysteine, and cardiovascular disease risk.

J. Mol. Med. 79 (2001) 522-528.

(81) Lindenbaum, J., Heaton, E.B., Savage, D.G., Brust, J.C., Garrett, T.J., Podell, E.R., Marcell, P.D., Stabler, S.P., Allen, R.H.

Neuropsychiatric disorders caused by cobalamin deficiency in the absence of anemia or macrocytosis.

N. Engl. J. Med. 318 (1988) 1720-1728.

(82) Livak, K.J.

Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay.

Genet. Anal. 14 (1999) 143-149.

(83) Loscalzo, J.

Homocysteine and dementias.

N. Engl. J. Med. 346 (2002) 466-468.

(84) Loscalzo, J.

The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia.

J. Clin. Invest. 98 (1996) 5-7.

(85) Luscher, T.F., Tanner, F.C., Noll, G.

Lipids and endothelial function: effects of lipid-lowering and other therapeutic interventions.

Curr. Opin. Lipidol. 7 (1996) 234-240.

(86) Lussier-Cacan, S., Xhignesse, M., Piolot, A., Selhub, J., Davignon, J., Genest, J.Jr.

Plasma total homocysteine in healthy subjects: sex-specific relation with biological traits.

Am. J. Clin. Nutr. 64 (1996) 587-593.

(87) Ma, J., Stampfer, M.J., Hennekens, C.H., Frosst, P., Selhub, J., Horsford, J., Malinow, M.R., Willett, W.C., Rozen, R.

Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, plasma folate, homocysteine, and risk of myocardial infarction in US physicians.

Circulation. 94 (1996) 2410-2416.

(88) Mager, A., Lalezari, S., Birnbaum, Y., Adler, Y., Magal, N., Shohat, M. Methylene-tetrahydrofolat reductase gene and early-onset of coronary artery disease in Israel.

Eur. Heart. J. 19 (1998) 446.

(89) Malinow, M.R., Ducimetiere, P., Luc, G., Evans A.E., Arveiler, D., Cambien, F., Upson, B.M.

Plasma homocyst(e)ine levels and graded risk for myocardial infarction: findings in two populations at contrasting risk for coronary heart disease.

Atherosclerosis. 126 (1996) 27-34.

(90) Mangoni, A.A., Jackson, S.H.

Homocysteine and cardiovascular disease: current evidence and future prospects.

Am. J. Med. 112 (2002) 556-565.

(91) McDonald, L., Bray, C., Field, C., Love, F., Davies, B.

Homocystinuria, thrombosis, and the blood-platelets.

Lancet. 15 (1964) 745-746.

(92) McKully, K.S.

Homocysteine theory of arteriosclerosis development and current status.

Atherosclerosis. 11 (1983) 157-246.

(93) McKully, K.S.

Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis.

Am. J. Pathol. 56 (1969) 111-128.

(94) Medina, M.A., Amores-Sanchez, M.I.

Homocysteine: an emergent cardiovascular risk factor?

Eur. J. Clin. Invest. 30 (2000) 754-762.

(95) Medina, M.A., Urdiales, J.L., Amores-Sanchez, M.I.

Roles of homocysteine in cell metabolism: old and new functions.

Eur. J. Biochem. 268 (2001) 3871-3882.

(96) Meisel, C., Cascorbi, I., Gerloff, T., Stangl, V., Laule, M., Müller, J.M., Wernecke, K.D., Baumann, G., Roots, I., Stangl, K.

Identification of six methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genotypes resulting from common polymorphisms: impact on plasma homocysteine levels and development of coronary artery disease.

Atherosclerosis. 154 (2001) 651-658.

(97) Meleady, R., Ueland, P.M., Blom, H., Whitehead, A.S., Refsum, H., Daly, L.E., Vollset, S.E., Donohue, C., Giesendorf, B., Graham, I.M., Ulvik, A., Zhang, Y., Bjorke Monsen, A.L.; EC Concerted Action Project: Homocysteine and Vascular Disease.

Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase, homocysteine, and cardiovascular disease risk: the European Concerted Action Project.

Am. J. Clin. Nutr. 77 (2003) 63-70.

(98) Morita, H., Taguchi, J., Kurihara, H., Kitaoka, M., Kaneda, H., Kurihara, Y., Maemura, K., Shindo, T., Minamino, T., Ohno, M., Yamaoki, K., Ogasawara, K., Aizawa, T., Suzuki, S., Yazaki, Y.

Genetic polymorphism of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) as a risk factor for coronary artery disease.

Circulation. 95 (1997) 2032-2036.

(99) Moryama, Y., Okamura, T., Kajinami, K., Iso, H., Inazu, A., Kawashiri, M., Mizuno, M., Takeda, Y., Sakamoto, Y., Kimura, H., Suzuki, H., Mabuchi, H.

Effects of serum B vitamins on elevated plasma homocysteine levels associated with the mutation of methylenetetrahydrofolate reductase gene in Japanese.

Atherosclerosis. 164 (2002) 321-328.

(100) Müller, H.

Determination of the folic acid content of grain, cereal products, baked goods and legumes using high-performance liquid chromatography (HPLC).

Z. Lebensm. Unters. Forsch. 197 (1993) 573-577.

(101) Murad, F., Arnold, W.P., Mittal, C.K., Braughler, J.M.

Properties and regulation of guanylate cyclase and some proposed functions of cyclic GMP.

Adv. Cyclic. Nucleotide. Res. 11 (1979) 175-204.

(102) Nedrebo, B.G., Ericsson, U.B., Nygard, O., Refsum, H., Ueland, P.M., Aakvaag, A., Aanderud, S., Lien, E.A.

Plasma total homocysteine levels in hyperthyroid and hypothyroid patients.

Metabolism. 47 (1998) 89-93.

(103) Nishinaga, M., Ozawa, T., Shimada, K.

Homocysteine, a thrombogenic agent, suppresses anticoagulant heparan sulfate expression in cultured porcine aortic endothelial cells.

J. Clin. Invest. 92 (1993) 1381-1386.

Literaturverzeichnis

(104) Nurk, E., Tell, G.S., Vollset, S.E., Nygard, O., Refsum, H., Ueland, P.M. Plasma total homocysteine and hospitalizations for cardiovascular disease: the Hordaland Homocysteine Study.

Arch. Intern. Med. 162 (2002) 1374-1381.

(105) Nygard, O., Nordrehaug, J.E., Refsum, H., Ueland, P.M., Farstad, M., Vollset, S.E. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. N. Engl. J. Med. 337 (1997) 230-236.

(106) Nygard, O., Vollset, S.E., Refsum, H., Brattström, L., Ueland, P.M.

Total homocysteine and cardiovascular disease.

J. Int. Med. 246 (1999) 425-454.

(107) Nygard, O., Vollset, S.E., Refsum, H., Stensvold, I., Tverdal, A., Nordrehaug, J.E., Ueland, M., Kvale, G.

Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. The Hordaland Homocysteine Study.

JAMA. 274 (1995) 1526-1533.

(108) O'Callaghan, P., Meleady, R., Fitzgerald, T., Graham, I.; European COMAC group. Smoking and plasma homocysteine.

Eur. Heart. J. 23 (2002) 1580-1586.

(109) Pacific Study Group.

Dose-dependent effects of folic acid on plasma homocysteine in a randomized trial conducted among 723 individuals with coronary heart disease.

Eur. Heart. J. 23 (2002) 1509-1515.

(110) Pajunen, P., Syvanne, M., Nieminen, M.S., Kareinen, A., Viitanen, L., Lehto, S., Laakso, M.

Serum homocysteine, creatinine, and glucose as predictors of the severity and extent of coronary artery disease in asymptomatic members of high-risk families.

Eur. J. Clin. Invest. 32 (2002) 472-478.

(111) Palareti, G., Salardi, S., Piazzzi, S., Legnani, C., Poggi, M., Grauso, F., Caniato, A., Coccheri, S., Cacciari, E.

Blood coagulation changes in homocystinuria: effects of pyridoxine and other specific therapy.

J. Pediatr. 109 (1986) 1001-1006.

(112) Prasad, K.

Homocysteine, a risk factor for cardiovascular disease.

Int. J. Ang. 8 (1999) 76-86.

(113) Poddar, R., Sivasubramaniam, N., Robinson, K., Jacobsen, D.W.

Homocysteine modulates the expression of a specific cytokine (Monocyte chemoattractant protein-1) in human aortic endothelial cells.

Circulation. 96 (1997) 286.

(114) Refsum, H., Ueland, P.M., Nygard, O., Vollset, S.E.

Homocysteine and cardiovascular disease.

Annu. Rev. Med. 49 (1998) 31-62.

(115) Rimm, E.B., Willett, W.C., Hu, F.B., Sampson, L., Colditz, G.A., Manson, J.E., Hennekens, C., Stampfer, M.J.

Folate and vitamin B6 from diet and supplements in relation to risk of coronary heart disease among women.

JAMA. 279 (1998) 359-364.

(116) Rodgers, G.M., Conn, M.T.

Homocysteine, an atherogenic stimulus, reduces protein C activation by arterial and venous endothelial cells.

Blood. 75 (1990) 895-901.

(117) Rodgers, G.M., Kane, W.H.

Activation of endogenous factor V by a homocysteine-induced vascular endothelial cell activator.

J. Clin. Invest. 77 (1986) 1909-1916.

(118) Ross, R.

The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s.

Nature. 362 (1993) 801-809.

(119) Ross, R.

The pathogenesis of atherosclerosis - an update.

N. Engl. J. Med. 314 (1986) 488-500.

(120) Rothenbacher, D., Fischer, H.G., Hoffmeister, A., Hoffmann, M.M., Marz, W., Bode, G., Rosenthal, J., Koenig, W., Brenner, H.

Homocysteine and methylenetetrahydrofolate reductase genotype: association with risk of coronary heart disease and relation to inflammatory, hemostatic, and lipid parameters.

Atherosclerosis. 162 (2002) 193-200.

(121) Schneider, J.A., Rees, D.C., Liu, Y.T., Clegg, J.B.

Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation.

Am. J. Human. Genet. 62 (1998) 1258-1260.

(122) Schnyder, G., Pin, R., Roffi, M., Flammer, Y., Hess, O.M.

Association of plasma homocysteine with the number of major coronary arteries severely narrowed.

Am. J. Card. 88 (2001) 1027-1030.

(123) Selhub, J., D'Angelo, A.

Hyperhomocysteinemia and thrombosis: acquired conditions.

Thromb. Haemost. 78 (1997) 527-531.

(124) Shipchandler, M.T., Moore, E.G.

Rapid, fully automated measurement of plasma homocyst(e)ine with the Abbot IMx® analyzer.

Clin. Chem. 41 (1995) 991-994.

(125) Stabler, S.P., Marcell, P.D., Podell, E.R., Allen, R.H.

Quantitation of total homocysteine, total cysteine, and methionine in normal serum and urine using capillary gas chromatography-mass spectrometry.

Anal. Biochem. 162 (1987) 185-196.

(126) Stamler, J.S., Osborne, J.A., Jaraki, O., Rabbani, L.E., Mullins, M., Singel, D., Loscalzo, J.

Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen.

J. Clin. Invest. 91 (1993) 308-318.

(127) Stolzenberg-Solomon, R.Z., Miller, E.R. 3rd, Maguire, M.G., Selhub, J., Appel, L.J.

Association of dietary protein intake and coffee consumption with serum homocysteine concentrations in an older population.

Am. J. Clin. Nutr. 69 (1999) 467-475.

(128) Strandhagen, E., Zetterberg, H., Aires, N., Palmer, M., Rymo, L., Blennow, K., Landaas, S., Thelle, D.S.

The methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is a major determinant of coffee-induced increase of plasma homocysteine: a randomized placebo controlled study. *Int. J. Mol. Med.* 13 (2004) 811-815.

(129) Subar, A.F., Harlan, L.C., Mattson, M.E.

Food and nutrient differences between smokers and non-smokers in the US. *Am. J. Public. Health.* 80 (1990) 1323-1329.

(130) Svardal, A., Refsum, H., Ueland, P.M.

Determination of in vivo protein binding of homocysteine and its relation to free homocysteine in the liver and other tissues of the rat.

J. Biol. Chem. 261 (1986) 3156-3163.

(131) Sydow, K., Böger R.H.

Homocysteine, endothelial dysfunction and cardiovascular risk: pathomechanisms and therapeutic options.

Z. Kardiol. 90 (2001) 1-11.

(132) Szczelik, A., Sanak, M., Jankowski, M., Dropinski, J., Czachor, R., Musial, J., Axenti, I., Twardowska, M., Brzostek, T., Tendera, M.

Mutation A1298C of methylenetetrahydrofolate reductase: risk for early coronary disease not associated with hyperhomocysteinemia.

Am. J. Med. Genet. 101 (2001) 36-39.

(133) Tawakol, A., Omland, T., Gerhard, M., Wu, J.T., Creager, M.A.

Hyperhomocyst(e)inemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilatation in humans.

Circulation. 95 (1997) 1119-1121.

(134) Thambyrajah, J., Landray, M.J., Jones, H.J., McGlynn, F.J., Wheeler, D.C., Townend, J.N.

A randomized double-blind placebo-controlled trial of the effect of homocysteine-lowering therapy with folic acid on endothelial function in patients with coronary artery disease.

J. Am. Coll. Cardiol. 37 (2001) 1858-1863.

(135) Thambyrajah, J., Townend, J.N.

Homocysteine and atherothrombosis-mechanisms for injury.

Eur. Heart. J. 21 (2000) 967-974.

(136) The Homocysteine Studies Collaboration.

Homocysteine and the risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *JAMA*. 288 (2002) 2015-2022.

(137) Tokgozoglu, S.L., Alikasifoglu, M., Unsal, T., Atalar, E., Aytemir, K., Ozer, N., Ovunc, K., Usal, O., Kes, S., Tuncbilek, E.

Methylenetetrahydrofolate reductase genotype and the risk and extent of coronary artery disease in a population with low plasma folate.

Heart. 81 (1999) 518-522.

(138) Tsai, M.Y., Garg, U., Key, N.S., Hanson, N.Q., Suh, A., Schwichtenberg, K.

Molecular and biochemical approaches in the identification of heterozygotes for homocystinuria.

Atherosclerosis. 122 (1996) 69-77.

(139) Tsai, J.C., Wang, H., Perrella, M.A., Yoshizumi, M., Sibinga, N.E., Tan, L.C., Haber, E., Chang, T.H., Schlegel, R., Lee, M.E.

Induction of cyclin A gene expression by homocysteine in vascular smooth muscle cells.

J. Clin. Invest. 97 (1996) 146-153.

(140) Ubbink, J.B.

The role of vitamins in the pathogenesis and treatment of hyperhomocyst(e)inemia.

J. Inher. Metab. Dis. 20 (1997) 316-325.

(141) Ubbink, J.B., Fehily, A.M., Pickering, J., Elwood, P.C., Vermaak, W.J.

Homocysteine and ischaemic heart disease in the Caerphilly cohort.

Atherosclerosis. 140 (1998) 349-356.

(142) Uhlemann, E.R., Tenpas, J.H., Lucky, A.W., Schulman, J.D., Mudd, S.H., Shulman, N.R.

Platelet survival and morphology in homocystinuria due to cystathionine synthase deficiency.

N. Engl. J. Med. 295 (1976) 1283-1286.

(143) Upchurch, G.R. Jr., Welch, G.N., Fabian, A.J., Freedman, J.E., Johnson, J.L., Keany, J.F. Jr., Loscalzo, J.

Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase.

J. Biol. Chem. 272 (1997) 17012-17017.

(144) van Bockxmeer, F.M., Mamotte, C.D., Vasikaran, S.D., Taylor, R.R.

Methylenetetrahydrofolate reductase gene and coronary artery disease.

Circulation. 95 (1997) 21-23.

(145) van der Put, N.M., van der Molen, E.F., Kluijtmans, L.A., Heil, S.G., Trijbels, J.M., Eskes, T.K., Van Oppenraaij-Emmerzaal, D., Banerjee, R., Blom, H.J.

Sequence analysis of the coding region of human methionine synthase: relevance to hyperhomocysteinemia in neural-tube defects and vascular disease.

QJM. 90 (1997) 511-517.

(146) van Guldener, C., Stam, F., Stehouwer, C.D.

Homocysteine metabolism in renal failure.

Kidney. Int. Suppl. 78 (2001) 234-237.

(147) Vasan, R.S., Beiser, A., D'Agostino, R.B., Levy, D., Selhub, J., Jacques, P.F., Rosenberg, I.H., Wilson, P.W.

Plasma homocysteine and risk of congestive heart failure in adults without prior myocardial infarction.

JAMA. 289 (2003) 1251-1257.

(148) Venn, B.J., Mann, J.I., Williams, S.M., Riddell, L.J., Chisholm, A., Harper, M.J., Aitken, W., Rossaak, J.I.

Assessment of three levels of folic acid on serum folate and plasma homocysteine: a randomised placebo-controlled double-blind dietary intervention trial.

Eur. J. Clin. Nutr. 56 (2002) 748-754.

(149) Verhaar, M.C., Stroes, E., Rabelink, T.J.

Folates and cardiovascular disease.

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 22 (2002) 6-13.

(150) Verhoef, P., Kok, F.J., Kluijtmans, L.A., Blom, H.J., Refsum, H., Ueland, P.M., Kruyssen, D.A.

The 677C→T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: associations with plasma total homocysteine levels and risk of coronary atherosclerotic disease.

Atherosclerosis. 132 (1997) 105-113.

(151) Wald, D.S., Law, M., Morris, J.K.

Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis.

BMJ. 325 (2002) 1202-1209.

(152) Wald, D.S., Bishop, L., Wald, N.J., Law, M., Hennessy, E., Weir, D., McPartlin, J., Scott, J.

Randomized trial of folic acid supplementation and serum homocysteine levels.

Arch. Intern. Med. 161 (2001) 695-700.

- (153) Wall, R.T., Harlan, J.M., Harker, L.A., Striker, G.E.
Homocysteine-induced endothelial cell injury in vitro: a model for the study of vascular injury.
Thromb. Res. 18 (1980) 113-121.
- (154) Wang, J., Dudman, N.P., Wilcken, D.E.
Effects of homocysteine and related compounds on prostacyclin production by cultured human vascular endothelial cells.
Thromb. Haemost. 70 (1993) 1047-1052.
- (155) Ward, M., McNulty, H., McPartlin, J., Sreain, J.J., Weir, D.G., Scott, J.M.
Plasma homocysteine, a risk factor for cardiovascular disease, is lowered by physiological doses of folic acid.
QJM. 90 (1997) 519-524.
- (156) Weisberg, I.S., Jacques, P.F., Selhub, J., Bostom, A.G., Chen, Z., Curtis Ellison, R., Eckfeldt, J.H., Rozen, R.
The 1298A→C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine.
Atherosclerosis. 156 (2001) 409-415.
- (157) Welch, G.N., Loscalzo, J.
Homocysteine and atherothrombosis.
N. Engl. J. Med. 338 (1998) 1042-1050.
- (158) Wilcken, D.E., Wilcken, B.
The pathogenesis of coronary artery disease. A possible role for methionine metabolism.
J. Clin. Invest. 57 (1976) 1079-1082.
- (159) Yamada, K., Chen, Z., Rozen, R., Matthews, R.G.
Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98 (2001) 14853-14858.
- (160) Zetterberg, H., Coppola, A., D'Angelo, A., Palmer, M., Rymo, L., Blennow, K.
No association between the MTHFR A1298C and transcobalamin C776G genetic polymorphisms and hyperhomocysteinemia in thrombotic disease.
Thromb. Res. 108 (2002) 127-131.

8 Curriculum Vitae

PERSÖNLICHE DATEN

Name, Vorname: Lengnick, Harald Eckart
Geburtsdatum/-ort: 02.12.1977 in München
Anschrift: Fürstenbergstrasse 18, 80809 München
Eltern: Dres. med. vet. Herlinde, geb. Faulhaber, und Horst Lengnick
Familienstand: ledig

SCHULBILDUNG

1984-1988 Matthäus-Beger-Grundschule, Reutlingen
1988-1997 Isolde-Kurz-Gymnasium, Reutlingen
1996 Medizinerfest
1997 Abitur (Abschlussnote: 2,2)

WEHRDIENST

1997-1998 Sanitätssoldat am Bundeswehrkrankenhaus Ulm

STUDIUM

1999-2001 Studium der Medizin an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt am Main
2001 Physikum, Frankfurt am Main
2001 Wechsel an die Technische Universität (TU) München
2001-2003 Famulaturen:
- Kardiologie, Deutsches Herzzentrum München
- Kardiologische Tagesklinik, Deutsches Herzzentrum München
- Orthopädie, Praxis Drs. Zirngibel/Konvallon/Zenta, München
- Internistische Intensivstation, Universitätsspital Zürich, Schweiz
2001-2004 Promotion, Thema: Homocystein als Risikofaktor für koronare Herzerkrankung, unter der Leitung von Prof. Dr. A. Kastrati und Dr. W. Koch, Deutsches Herzzentrum München
2002 Erstes Staatsexamen, TU München
2004 Zweites Staatsexamen, TU München

2004/2005 Praktisches Jahr:
- Innere Medizin: II. Med. Klinik (Medizinische Notaufnahme) und III. Med. Klinik (Onkologie), Klinikum rechts der Isar, München
- Chirurgie: Universitätskrankenhaus Örebro, Schweden
- Orthopädie: Universitätsklinik Balgrist Zürich, Schweiz

2005 Drittes Staatsexamen, TU München

PRAKTISCHE NEBENTÄTIGKEITEN

1997-1998 Pflegepraktikum (Orthopädie), Bundeswehrkrankenhaus Ulm im Rahmen des Wehrdienstes

1998 Praktikum am sportmedizinischen Institut der Universität Ulm unter der Leitung von Prof. Dr. M. Lehmann

2000 Teilnahme am sportmedizinischen Seminar der Universität Frankfurt am Main unter der Leitung von Prof. Dr. M. Hofstätter, Riezlern, Österreich

2003 Besuch der Vorlesung „Sportmedizin“ und „Orthopädie“ im Rahmen der Zusatzbezeichnung „Sportmediziner“

ZUSATZQUALIFIKATIONEN

1996/1998 Erwerb der C- und B-Trainerlizenz des Württembergischen Tennisbundes, Stuttgart

2004 Erwerb der A-Trainerlizenz des Deutschen Tennisbundes (DTB), Hannover

EDV-Kenntnisse: im Umgang mit Word, Excel, Power Point, SPSS, Harvard Graphics

Fremdsprachen: sehr gute Englisch- und Schwedischkenntnisse, Grundlagen in Französisch und Italienisch

HOBBIES

Tennis: als Leistungssport, beste Ranglistenposition: DTB 91 (1999), 2.Bundesliga, TV Reutlingen (1995-1997, 2000); Württembergliga, SSV Ulm 1846 (1998-1999); Hessenliga, SC 1880 Frankfurt (2001); Regionalliga und Bayernliga, MTTC Iphitos München (2002-2005)

9 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Dr. Werner Koch, der mit seiner Hilfe und grossen Geduld wesentlich zum Gelingen der Dissertation beigetragen hat.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Kastrati für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und für seine freundliche Hilfe in jeglicher Hinsicht.

Herrn Prof. Dr. Dr. Kölling, Herrn Dr. Braun und Herrn Dr. Ndrepepa sei für die Betreuung und ihren Einsatz gedankt.

An dieser Stelle sei mein Mitdoktorand und Freund Marc erwähnt, mit dem zusammen ich viele Stunden vor dem Computer verbracht habe.

Danke an meine Freunde Frank und Reiner für ihre kompetente Unterstützung.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester Ulrike, die während des Studiums stets zu mir gehalten und mich jederzeit unterstützt haben.

Ausserdem bedanke ich mich für die seelisch-moralische Unterstützung meiner Freundin Katrin, die mich durch alle Höhen und Tiefen begleitet hat.