

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

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

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

**Untersuchung der Assoziation von
Einzelnukleotidpolymorphismen
im Fibrinogen- α - und - β -Gen mit dem Myokardinfarkt**

Janita Biele

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. Dr. A. Kastrati

2. Priv.-Doz. Dr. A. Bauer

Diese Dissertation wurde am 02.03.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 29.04.09 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	7
1. Einleitung.....	9
1.1 Pathogenese der koronaren Herzkrankheit und des Myokardinfarkts	9
1.1.1 Epidemiologie	10
1.1.2 Risikofaktoren der koronaren Herzkrankheit.....	11
1.2 Physiologie der Hämostase.....	12
1.2.1 Vaskuläre Hämostase	13
1.2.2 Zelluläre Hämostase und Fibrinogen.....	13
1.2.3 Plasmatische Hämostase und Fibrinolyse	15
1.2.4 Pathogenese der Atherosklerose und Thrombusbildung	16
1.3 Fibrinogenmolekül	19
1.4 Fibrinogen-Gen	20
1.5 Fibrinogen und Atherosklerose.....	21
1.6 Genpolymorphismen und koronare Herzkrankheit	22
1.7 Polymorphismen des Fibrinogens	23
1.8 Ziel der Arbeit	26
2. Methoden	27
2.1 Kontrollpersonen und Patienten	27
2.2 Definitionen	27
2.3 DNA-Proben	28
2.4 Genotypbestimmung des Thr312Ala-, Arg448Lys- und -148C/T- Polymorphismus.....	28
2.5 Statistik.....	33
2.6 Material und Geräte.....	34
3. Ergebnisse.....	35
3.1 Kontrollen und Patientenkollektiv	35
3.2 Genotypverteilung der Fibrinogenpolymorphismen	36
3.3 Genotypverteilung des Thr312Ala-Polymorphismus im Fibrinogen- α - Gen	37

3.4 Genotypverteilung des Arg448Lys-Polymorphismus im Fibrinogen- β -Gen	38
3.5 Genotypverteilung des -148C/T-Polymorphismus im Fibrinogen- β -Gen	39
3.6 Haplotypfrequenzen der Polymorphismen im Fibrinogen- β -Gen.....	40
3.7 Diplotypverteilung der Polymorphismen im Fibrinogen- β -Gen	41
4. Diskussion	42
4.1 Publierte Untersuchungen der Assoziation des Fibrinogen-Thr312Ala-, Arg448Lys- und -148C/T-Polymorphismus mit dem Myokardinfarkt.....	42
4.2 Untersuchung der Assoziation der Fibrinogen-Genregion mit dem Myokardinfarkt unter dem Einsatz repräsentativer Polymorphismen.....	47
5. Zusammenfassung	56
6. Literaturverzeichnis	58
7. Veröffentlichungen.....	70
8. Danksagungen.....	71

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ADP	Adenosindiphosphat
ACE	Angiotensin-1-Converting-Enzyme
All	Angiotensin II
Ala	Alanin
ApoB	Apolipoprotein B
Arg	Arginin
bp	Basenpaar
Ca ²⁺	Calcium
CK	Creatinin-Kinase
C	Cytosin
db	Database
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ET	Endothelin
eNOS	endotheliale Nitroxidsynthase
FGA	Fibrinogen- α -Gen
FGB	Fibrinogen- β -Gen
FGG	Fibrinogen- γ -Gen
g/l	Gramm pro Liter
GP	Glykoprotein
G	Guanin
HDL	„High density“-Lipoprotein
HIFMECH	Hypercoagulability and Impaired Fibrinolytic function MECHAnisms predisposing to myocardial infarction study
ECTIM	Etude Cas-Temoins de Infarctus Myocarde
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
Kb	Kilobase
Kda	Kilodalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	„Low density“-Lipoprotein
l	Liter
Lys	Lysin
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht

MI	Myokardinfarkt
NCBI	National Center for Biological Information
NO	Stickstoffmonoxid
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCR	Polymerasenkettenreaktion
PGI2	Prostazyklin
SNP	“Single Nucleotide Polymorphism”
TF	Tissue Factor
Thr	Threonin
T	Thymin
TxA2	Thromboxan A2
VLDL	„Very low density“-Lipoprotein
vs.	versus
z. B.	zum Beispiel
vWF	von Willebrand Faktor
WHO	World Health Organisation

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aggregation-Fibrinogenbrücken zwischen zwei GPIIb-IIIa-Molekülen.....	14
Abbildung 2: Endogenes und exogenes Blutgerinnungssystem	16
Abbildung 3: Stadien der Atherosklerose.....	18
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Fibrinogenmoleküls.....	20
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Fibrinogen-Genregion	21
Abbildung 6: TaqMan-Reaktion	30
Abbildung 7: Prozentuale Verteilung der Thr312Ala-Genotypen in der Kontrollgruppe und der MI-Gruppe	37
Abbildung 8: Prozentuale Verteilung der Arg448Lys-Genotypen in der Kontrollgruppe und der MI-Gruppe	38
Abbildung 9: Prozentuale Verteilung der –148C/T-Genotypen in der Kontrollgruppe und der MI-Gruppe	39
Abbildung 10: Prozentuale Haplotypverteilung der Arg448Lys- und –148C/T-Polymorphismen in der Kontrollgruppe und der MI-Gruppe	40
Abbildung 11: Position der Polymorphismen im <i>FGG</i> , Fibrinogen- γ -Gen; <i>FGA</i> , Fibrinogen- α -Gen; <i>FGB</i> , Fibrinogen- β -Gen	48
Abbildung 12: Graphische Darstellung des Kopplungsungleichgewichts (LD) für die untersuchten Fibrinogen-Polymorphismen.....	55

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Todesursachenstatistik 2003 (Deutschland)	10
Tabelle 2:	Risikofaktoren für atherosklerotische Läsionen.....	12
Tabelle 3:	Polymorphismen der Fibrinogen-Gene	25
Tabelle 4:	Primer und Sonden für die Amplifikation der polymorphen Sequenzen des Fibrinogen- α - und Fibrinogen- β -Gens	31
Tabelle 5:	Bestandteile des Reaktionsmix für den Thr312Ala-, Arg448Lys- und -148C/T-Polymorphismus.....	32
Tabelle 6:	Basale Charakteristika der Kontrollgruppe und MI-Gruppe.....	35
Tabelle 7:	Genotypverteilung der Polymorphismen in der Kontrollgruppe und MI-Gruppe	36
Tabelle 8:	Verteilung der Genotypen des Thr312Ala-Polymorphismus in der Kontrollgruppe und der MI-Gruppe	37
Tabelle 9:	Verteilung der Genotypen des Arg448Lys-Polymorphismus in der Kontrollgruppe und der MI-Gruppe	38
Tabelle 10:	Verteilung der Genotypen des -148C/T-Polymorphismus in der Kontrollgruppe und der MI-Gruppe	39
Tabelle 11:	Haplotypfrequenzen der Arg448Lys- und -148C/T- Polymorphismen in der Kontrollgruppe und der MI-Gruppe	40
Tabelle 12:	Diploypverteilung der Arg448Lys und -148C/T-Polymorphismen in der Kontrollgruppe und der MI-Gruppe.....	41
Tabelle 13:	Studienergebnisse des Thr312Ala-Polymorphismus	44
Tabelle 14:	Studienergebnisse des Arg448Lys-Polymorphismus.....	45
Tabelle 15:	Studienergebnisse des -148C/T-Polymorphismus	46
Tabelle 16:	Polymorphismen der Fibrinogen-Gene	47

Tabelle 17:	Die häufigsten Allelfrequenzen der Fibrinogen- γ -, α - und β -Polymorphismen in den Kontroll- und MI-Gruppen der Studienpopulationen 1 und 2	51
Tabelle 18:	Die 12 häufigsten Haplotypen aus den 10 Fibrinogen-Polymorphismen in den Kontroll- und MI-Gruppen der Studienpopulationen 1 und 2	52
Tabelle 19:	Die genspezifischen Haplotypfrequenzen der Fibrinogen- γ -, α - und β -Polymorphismen in den Kontroll- und MI-Gruppen der Studienpopulationen 1 und 2	53
Tabelle 20:	Die intergenetischen Haplotypfrequenzen der Fibrinogen- γ -, α - und β -Polymorphismen in den Kontroll- und MI-Gruppen der Studienpopulationen 1 und 2	54

1. Einleitung

1.1 Pathogenese der koronaren Herzkrankheit und des Myokardinfarkts

Atherosklerose ist der Oberbegriff für eine Reihe von Gefäßerkrankungen, in deren Folge es durch Wandverdickung zu einer Verfestigung der Arterienwand mit konsekutivem Elastizitätsverlust und auch zu Lumeneinengung kommt. Gemäß WHO wird sie definiert als „eine variable Kombination von Veränderungen der Intima, bestehend aus einer herdförmigen Ansammlung von Fettsubstanzen, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia“ (Böcker et al., 2004). Die koronare Herzkrankheit (KHK) ist die Manifestation der Atherosklerose in den Koronararterien. Die KHK bezeichnet eine akute oder chronische Störung der Herzfunktion, bei der es durch atherosklerotische Verengungen der Koronararterien zu einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffverbrauch des Herzmuskels kommt (Gerok et al., 2000; Herold et al., 2005). Man unterscheidet vier Schweregrade der Koronarstenose (entsprechend der Querschnittsverminderung in %) (Herold et al., 2005):

Grad I:	25-49 %
Grad II:	50-74 % (signifikante Stenose)
Grad III:	75-99 % (kritische Stenose)
Grad IV:	100 % (kompletter Verschluss)

Regionale Perfusionsstörungen des Myokards sind erst zu erwarten, wenn eine Koronarstenose > 50 % des Gefäßlumens einengt, wobei das Ausmaß von Kollateralgefäßen eine Rolle spielt. Sind > 75 % des Gefäßvolumens eingeengt (kritische Stenose), so ist bei Fehlen von kompensatorisch wirkenden Kollateralen die Koronarreserve (Differenz zwischen Koronardurchblutung in Ruhe und maximal möglicher Koronardurchblutung) erschöpft und es resultiert eine belastungsabhängige Angina pectoris, das Leitsymptom der KHK mit retrosternal lokalisierten Schmerzen, die Sekunden bis Minuten andauern können. Die Patienten empfinden diesen Schmerz meist als brennend, stechend oder einschnürend mit Ausstrahlung zum Hals, Unterkiefer, Schultergegend, linken Arm bis in die ulnaren Fingerspitzen oder in den Oberbauch. Klinisch gilt zu unterscheiden zwischen den Verlaufsformen der Angina als stabile Angina pectoris oder als instabile Angina pectoris. Während bei der stabilen Angina pectoris die Beschwerden durch bestimmte Mechanismen

(z. B. körperliche oder psychische Belastung) auslösbar und in Ausmaß und Qualität relativ konstant bleiben, bezeichnet man neu auftretende, sich ändernde, zunehmende sowie bereits in Ruhe auftretende Schmerzen als Anzeichen einer instabilen Angina pectoris (Herold et al., 2005; Gerok et al., 2000; Gawaz et al., 1999).

Nach WHO-Definition liegt ein Myokardinfarkt (MI) vor, wenn bei instabiler Angina pectoris Marker einer Myokardschädigung (z. B. Troponin T oder I, CK-MB-Creatinin-Kinase, Myokardtyp) und typische Veränderungen in einem 12-Kanal-EKG nachweisbar sind (Herold et al., 2005; Siegenthaler et al., 2006).

1.1.1 Epidemiologie

Nach Angaben der WHO ist die KHK derzeit die häufigste Todesursache auf der Welt (Gerok et al., 2000). In den westlichen Industrieländern erleiden jedes Jahr ca. 300 pro 100.000 Einwohner einen Herzinfarkt. In den ersten Minuten und Stunden nach dem Gefäßverschluss ist das Sterberisiko am höchsten: Etwa 25 % aller Betroffenen überleben die ersten Stunden nicht (Löwel et al., 2002).

Tabelle 1: Todesursachenstatistik 2003 (Deutschland)

Todesursache	Insgesamt	Frauen	Männer
Koronare Herzkrankheit	10,9 %	11,8 %	9,7 %
Akuter Myokardinfarkt	7,5 %	6,5 %	8,8 %

Statistisches Bundesamt Deutschland 2003 (www.destatis.de)

Im Jahr 2003 führten die KHK und der akute MI die Todesursachenstatistik in Deutschland mit 10,9 % und 7,5 % der registrierten Todesfälle an (Tabelle 1). Dabei verstarben Männer häufiger an einem Herzinfarkt als Frauen (8,8 % vs. 6,5 %). So erleiden unter 65 Jahren alte Männer im Vergleich mit gleichaltrigen Frauen bis zu 8-mal häufiger einen Infarkt und versterben bis zu 9-mal öfter an der Erkrankung. Nach dem 65. Lebensjahr weisen Männer ein 3-fach höheres Risiko auf, ab dem 85. Lebensjahr kommt es in etwa zu einem Gleichstand. Indes zeigt sich im Zeitraum von 1990 bis 2003 ein deutlicher Rückgang der Infarktsterblichkeit. So sank die altersstandardisierte Sterblichkeitsrate bei Frauen von 48,0 auf 32,4 jährliche Infarktodesfälle pro 100.000 Einwohnerinnen. Bei Männern reduzierte sich die Sterbeziffer im selben Zeitraum von 127,6 auf 71,4 (www.destatis.de).

Seit 1975 ist die Mortalität für kardiovaskuläre Erkrankungen in den meisten Ländern Europas (z. B. Schottland, Finnland, Irland und England) und in den USA um 24-28 % gesunken. Etwa 45 % dieser Reduktionen sind der Verbesserung der Therapien für die KHK zuzuschreiben, die restlichen 55 % werden einer Reduktion der Risikofaktoren, vor allem dem Rückgang des Rauchens und der Behandlung der Hypertonie, zugeschrieben (Hennekens UpToDate 2007).

1.1.2 Risikofaktoren der koronaren Herzkrankheit

Durch epidemiologische Studien wurden zahlreiche Risikofaktoren für das Auftreten der KHK identifiziert (Saito et al., 2000). Als Risikofaktoren werden jene Faktoren bezeichnet, die das Auftreten und die Progression einer Erkrankung statistisch begünstigen können. Solche Risikofaktoren können einerseits eine genetische Prädisposition sein oder durch Umwelteinflüsse bedingt sein (Tabelle 2) (Böcker et al., 2004). Nach ihrer Bedeutung für die Progression der KHK werden sie nach Risikofaktoren 1. Ordnung (z. B. arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, Nikotinabusus, Adipositas) und 2. Ordnung (z. B. Bewegungsmangel, Hyperhomocysteinämie, Stress und niedriger sozialer Status) gegliedert (Böcker et al., 2004). Besonders ungünstig wirkt sich die Kombination mehrerer Risikofaktoren aus; zum Beispiel wird durch inhalatives Rauchen das Koronarrisiko verdoppelt, durch Rauchen plus Cholesterinerhöhung vervierfacht und durch Rauchen plus Cholesterinerhöhung plus Hypertonie verachtfacht. Eine besondere Gefährdung ist bei der homozygoten Form der familiären Hypercholesterinämie, bei Cholesterinwerten über 240 mg/dl gegeben sowie bei rauchenden Frauen, die Antikonzeptiva einnehmen (Gerock et al., 2000). Bei ca. 30 % der Erkrankten spielt eine familiäre Belastung eine Rolle (Myers et al., 1990). Mit zunehmendem Alter jedoch nimmt der Einfluss der genetischen Faktoren ab und der Einfluss der umweltbedingten Faktoren zu (Adrissino et al., 1999).

Tabelle 2: Risikofaktoren für atherosklerotische Läsionen

Genetische Prädisposition

- Erhöhter LDL/VLDL-Spiegel
- Reduzierter HDL-Spiegel
- Erhöhter Lipoprotein-(a)-Spiegel
- Homozysteinämie
- Diabetes mellitus und Adipositas
- Erhöhter Spiegel von Gerinnungsfaktoren
- Depression und Verhaltensstörung
- Geschlecht
- Systemische Entzündungserkrankung
- Metabolisches Syndrom
- Familiäre Häufung

Umweltfaktoren

- Fettreiche Ernährung
 - Nikotinabusus
 - Niedriger Antioxidantienspiegel
 - Infektion (z. B. Chlamydien)
-

Böcker et al. (nach A. J. Lusis: Atherosclerosis. Nature. 2000; 407: 234).

1.2 Physiologie der Hämostase

Die Hämostase stellt einen physiologischen Schutzmechanismus gegen Blutverlust dar, der durch ein harmonisches Zusammenspiel von Gefäßwand, Thrombozyten, Blutgerinnung und Fibrinolyse gewährleistet wird und durch positive und negative Feedbackmechanismen herauf- oder herunterreguliert wird. (Löffler et al., 1998; Silbernagl et al., 2005). Die Hämostase wird nach dem zeitlichen Ablauf in drei verschiedenen Stadien unterteilt: primäre Hämostase, sekundäre Hämostase und Fibrinolyse. Während der primären Hämostase führen vaskuläre und zelluläre Faktoren zur Entstehung eines noch relativ unbefestigten Thrombozytenpfropfes (primärer, „weißer Thrombus“), der dann in der sekundären Phase durch Aktivierung des plasmatischen Gerinnungssystems mit Fibrin angereichert wird und auf diese Weise das fragile Plättchenaggregat stabilisiert (sekundärer, „roter Thrombus“). Im Anschluss an diese Phase wird durch das fibrinolytische System der gebildete Thrombus wieder abgebaut, um so eine Rekanalisierung zu ermöglichen (Gawaz et al., 1999; Silbernagl et al., 2005).

1.2.1 Vaskuläre Hämostase

In der vaskulären Blutstillung steht eine reflektorische Kontraktion der Gefäßwand im Vordergrund, die durch die Reizung der glatten Muskulatur nach Verletzung der Gefäßwand ausgelöst wird. Die Kontraktion wird unterstützt durch die Freisetzung vasokonstriktorischer Substanzen wie Serotonin und Katecholamin aus den Thrombozyten und der verletzten Gefäßwand (Löffler et al., 1998; Silbernagl et al., 2005).

1.2.2 Zelluläre Hämostase und Fibrinogen

Die zelluläre Hämostase beginnt mit der Thrombozytenadhäsion an subendothelialen Kollagenfasern, die bei der Verletzung des Gefäßendothels freigelegt wurden. Unter physiologischen Bedingungen zirkulieren Blutplättchen in einem ruhenden Zustand, ohne miteinander zu aggregieren oder mit der Gefäßwand in Kontakt zu treten (Gawaz et al., 1999). Kommt es jedoch zu einer Schädigung oder Verletzung der Endothelschicht, werden subendotheliale Strukturen wie Kollagen oder der „von-Willebrand-Faktor“ (vWF) freigelegt und somit die Adhäsion der Plättchen ans Endothel ermöglicht (Rugger, 1994; Schrör et al., 2001; Silbernagl et al., 2005). Die Adhäsion führt zur Aktivierung und Formveränderung der Thrombozyten, indem sie verschiedene vasokonstriktorisches (z. B. Serotonin, Katecholamine, Thromboxan A₂ (TxA₂)) und aggregationsfördernde Substanzen (z. B. Adenosindiphosphat (ADP), plättchenaktivierender Faktor (PAF)) aus ihrer Granula freisetzen. Gleichzeitig kommt es zu einer Veränderung an der Thrombozytenoberfläche und zur Anlagerung weiterer Thrombozyten (Gawaz et al., 1999; Schrör et al., 2001; Silbernagl et al., 2005). Während des Vorgangs der Aggregation werden biologisch aktive Substanzen (z. B. ADP) freigesetzt, welche weitere Thrombozyten aktivieren und zur Aggregation anregen (Ruggeri 1994, Schrör et al., 2001). Die Interaktion zwischen zirkulierenden Thrombozyten mit Zellen der Gefäßwand kann durch die Freisetzung von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und anderen biologisch aktiven Substanzen eine weitere Progression der thrombotischen Veränderungen bewirken. So kann es im geschädigten Bereich durch unkontrollierte Plättchenaktivierung und Aggregatbildung zu einem transienten thrombotischen Gefäßverschluss, oder durch permanenten Verschluss, z. B. einer Koronararterie, zum Untergang des versorgten Myokardgewebes mit nachfolgendem MI kommen.

Eine zentrale Bedeutung im Prozess der Aggregation kommt dabei dem Glykoprotein(GP)IIb-IIIa-Komplex auf der Thrombozytenoberfläche zu. Im intakten Zustand

kann kein lösliches plasmatisches Fibrinogen an die Thrombozytenoberfläche binden. Erst nach Aktivierung des Blutplättchens kommt es im Bereich des GPIIb-IIIa-Komplexes zur Freilegung von Bindungsstellen für Fibrinogen (Abbildung 1) (Gawaz et al., 1999).

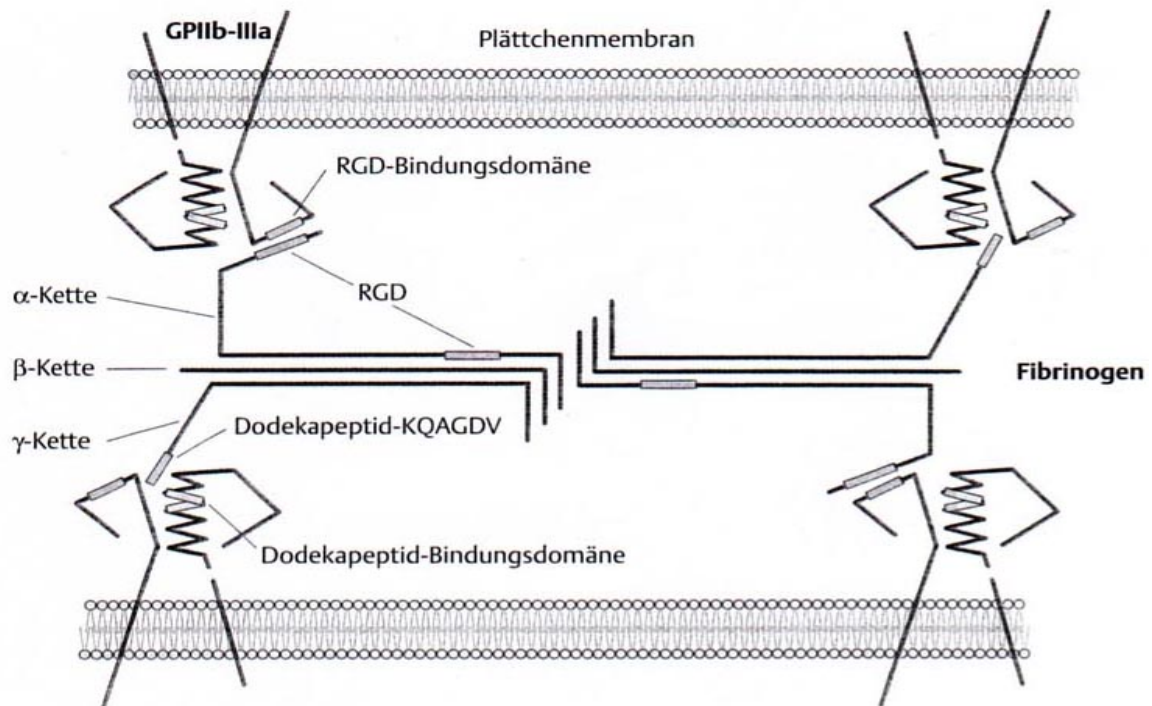


Abbildung 1: Aggregation-Fibrinogenbrücken zwischen zwei GPIIb-IIIa-Molekülen
(modifiziert nach Charo et al. 1994)

Die Bindung von Fibrinogen an den GPIIb-IIIa-Rezeptor erfolgt über spezifische Bindungsregionen, den Carboxyterminus der γ -Kette (KQAGDV-Sequenz) und zwei Signalsequenzen im Bereich der α -Kette (RGD-Sequenz). So können sich zwischen zwei benachbarten Thrombozyten über „Fibrinogenbrücken“ Plättchenaggregate bilden (Gawaz et al., 1991; Plow 1992).

1.2.3 Plasmatische Hämostase und Fibrinolyse

Die plasmatische Gerinnung erfolgt unter der Beteiligung von Gerinnungsfaktoren, die im Plasma normalerweise in inaktiver Form vorliegen und im Verlauf der Gerinnung stufenweise aktiviert werden. Die plasmatische Hämostase kann über den exogenen Weg (extravaskulär), der durch Gewebethromboplastin (Tissue Factor, TF) aus verletztem Gewebe in Gang gesetzt wird, aktiviert werden. Der endogene Weg (intravaskulär) wird dadurch aktiviert, dass Faktor XII mit Kollagenfasern aus verletztem Endothel und in Gegenwart von hochmolekularem Kininogen und Kallikrein in Berührung kommt. In der Folge wird Faktor XI aktiviert und durch diesen dann Faktor IX (Abbildung 2). Die beiden Aktivierungswege münden in einer gemeinsamen Endstrecke (Faktor X). Der aktivierte Faktor Xa bildet in Kombination mit Calcium (Ca^{2+}), Phospholipiden und Faktor V die Prothrombinase, welche die Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin katalysiert. Durch Einwirkung von Thrombin wird Fibrinogen zu Fibrin konvertiert. Dabei werden vom Fibrinogenmolekül die Fibrinopeptide A und B abgespalten. Die so entstandenen Fibrinmonomere (siehe S. 20) polymerisieren zu instabilem Fibrin, welches sich unter dem Einfluss der Transglutaminase Faktor XIII (fibrinstabilisierender Faktor) in ein unlösliches Fibrinnetz umwandelt (Cottier et al., 1980; Müller-Berghaus et al., 1999). Das Fibringerinnsel dient als Gerüst für die Adhäsion, Ausbreitung, Migration und Proliferation von Zellen, was wesentlich zu einem dauerhaften Verschluss der Läsion führt. Im Anschluss an die plasmatische Gerinnung wird das quervernetzte Fibrin durch die proteolytische Serinprotease Plasmin in Fibrinolyseprodukte X, Y, D und E gespalten. Durch die Fibrinolyse ist zum einen eine Gegenregulation zu der im Blut physiologischerweise ständig ablaufende Gerinnung gewährleistet, zum anderen hat sie die Aufgabe, die Fibrinablagerungen, die bei der Wundheilung entstehen, zu entfernen und so die Voraussetzung für Rekanalisierung und Wundheilung zu schaffen (Silbernagl et al., 2005).

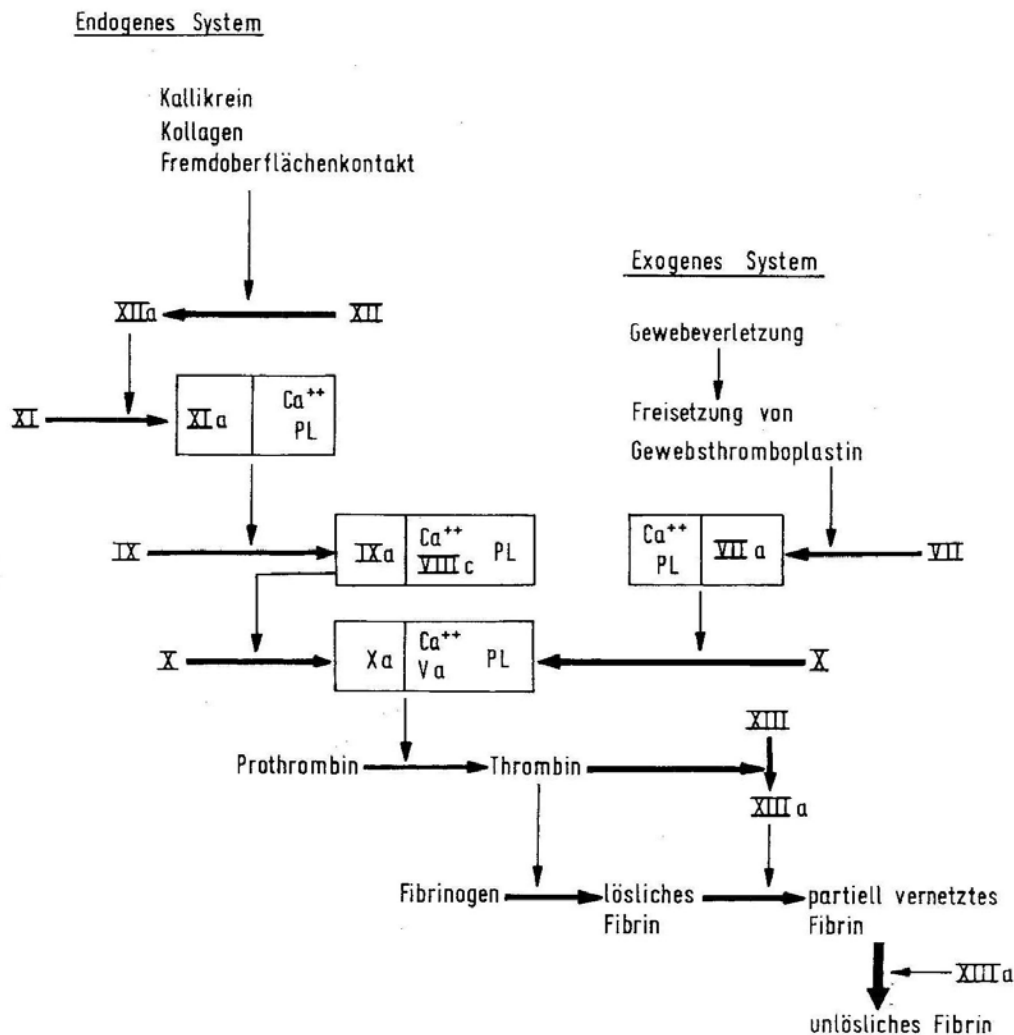


Abbildung 2: Endogenes und exogenes Blutgerinnungssystem
(nach Müller 1993)

1.2.4 Pathogenese der Atherosklerose und Thrombusbildung

Die atherosklerotischen Gefäßläsionen treten bevorzugt an Verzweigungen auf, in Bereichen mit hoher mechanischer Belastung und einem Übergang der vorwiegend laminaren in eine turbulente Strömung. So sind bei der Aorta vor allem die Gefäßabgänge befallen. In den Karotiden (Halsschlagader) und der Koronarzirkulation treten atherosklerotische Veränderungen im Bereich von Verzweigungen auf (Griebenow et al., 1999; Gerok et al., 2000).

Bei der Entstehung der Atherosklerose handelt es sich um einen komplexen Vorgang, der durch eine vielseitige Wechselwirkung zwischen Endothel, glatten Muskelzellen der Tunika media der Arterien, Blutplättchen, Monozyten bzw. Makrophagen, aktivierten T-Lymphozyten sowie Wachstumsfaktoren und Zytokinen charakterisiert

ist. Zur Entstehung der Atherosklerose hat sich die „Response-to-Injury“-Hypothese etabliert, die von Ross (1999) ausführlich beschrieben wurde. Dabei handelt es sich um eine „Verletzung“ des Endothels durch schädigende Faktoren (z. B. Hyperlipidämie, Hypertonie), die zu einer endothelialen Dysfunktion führen. In der Folge kommt es zum Verlust der physiologischen Funktion des Endothels. Die Aufgabe des Gefäßendothels besteht in der Regulation der Fließeigenschaften des Blutes, der Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten und der Steuerung des vaskulären Tonus. Dies erfolgt, indem vasoaktive Substanzen wie z. B. Stickstoffmonoxid (NO), Prostazyklin (PGI₂), Endothelin (ET) und Angiotensin II (All) gebildet werden. Das geschädigte Endothel zeichnet sich durch eine erhöhte Permeabilität für Lipoproteine aus (Lefkowitz et al., 2001). Die Folge ist eine verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen wie E-Selektin und ICAM 1 (interzelluläres Adhäsionsmolekül-1) auf der Oberfläche des Endothels. Diese Adhäsionsmoleküle sind in der Lage, zirkulierende Monozyten und T-Lymphozyten an das Endothel zu binden. Dadurch wird die Infiltration von Monozyten und Leukozyten in den subendothelialen Raum gefördert. Die einwandernden Monozyten differenzieren sich zu Makrophagen, die modifiziertes bzw. oxidiertes „Low density“-Lipoprotein (LDL) aufnehmen und dadurch zu Schaumzellen werden. Diese Lipidakkumulation in der Intima, die auch als Fettstreifenläsion (fatty streak) bezeichnet wird, ist die erste pathologisch sichtbare Veränderung in der Arterienwand. Im weiteren Verlauf werden Wachstumsfaktoren und Zytokine durch eingewanderte Leukozyten sezerniert und verursachen dadurch eine Entzündungsreaktion. Zum einen differenzieren sich daraufhin die glatten Muskelzellen der medialen Gefäßwand vom kontraktilen zum synthetischen Phänotyp, was zur Migration in die Intima, zur verstärkten Proliferation und zur Bildung extrazellulärer Matrix führt. Folge ist ein konsekutiver Gewebeumbau mit einer bindegewebigen Kappe, die einen Lipidkern aufweist („atherosklerotische Plaque“) (Libby 2002). Die Entwicklung einer fibrösen Kappe, die die atherosklerotische Plaque vom zirkulierenden Blutstrom trennt, ist die Folge eines verengten Gefäßlumens (Ross 1999b). Wird die stabile Plaque instabil, zum Beispiel durch den Abbau extrazellulärer Matrix durch Matrixmetalloproteasen, die aus akkumulierten Makrophagen freigesetzt werden, kommt es zur Ausdünnung der fibrösen Kappe, was schließlich durch die Scherkräfte des Blutstroms eine Plaque-Ruptur bewirken kann (Gerok et al., 2000). Durch die Ruptur einer entzündlichen arteriosklerotischen

Plaque kommt es zur plötzlichen Bildung eines frischen Thrombus und zum vollständigen Verschluss des Gefäßlumens (Abbildung 3).

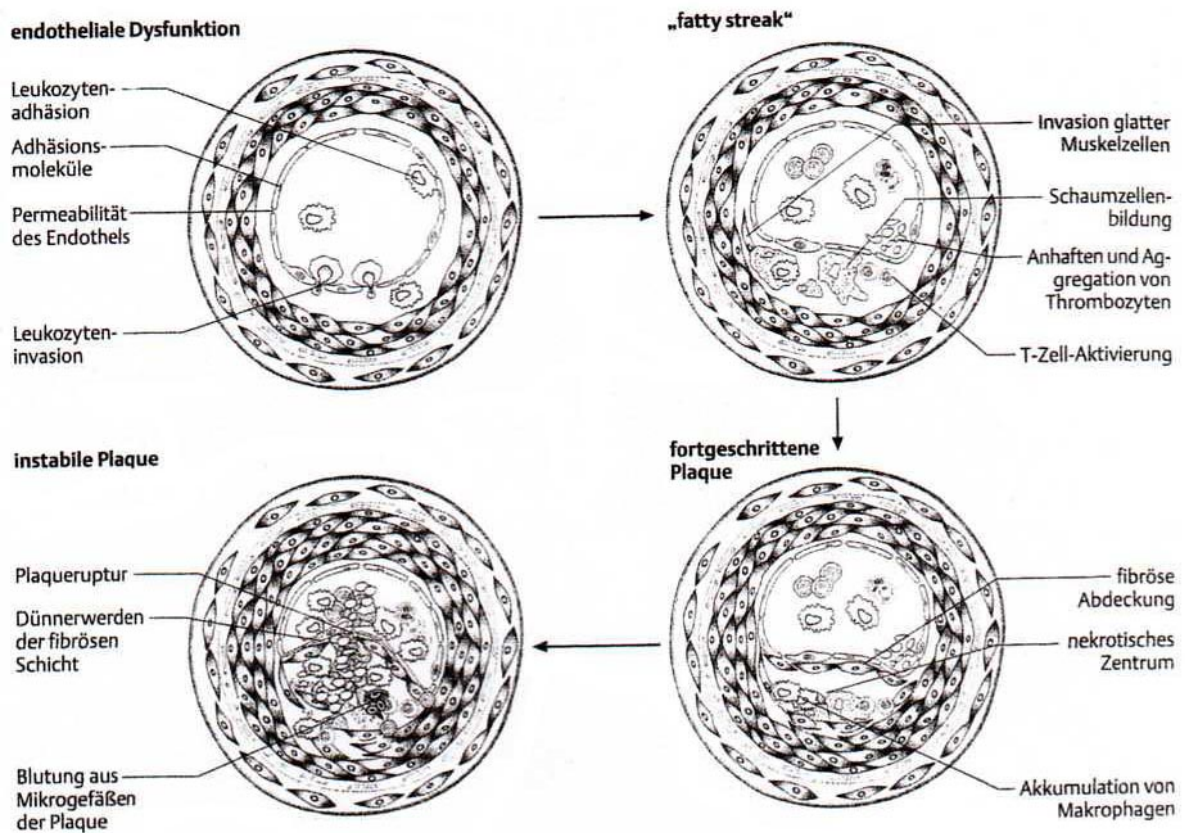


Abbildung 3: Stadien der Atherosklerose
(nach Siegenthaler et al. 2006)

Das Risiko einer Ruptur ist vor allem abhängig von der Zusammensetzung der jeweiligen Plaque. Dabei ist die Instabilität der atherosklerotischen Plaque durch das Vorhandensein und die Größe des Lipidkerns sowie durch die abnehmende Stärke der fibrösen Kappe bestimmend. Die Ruptur der Plaque und die damit verbundene Verletzung der Gefäßwand führen zur Freisetzung des thrombogenen Materials (z. B. vWF), welche die vaskuläre und durch freigelegtes Kollagen auch die zelluläre Hämostase aktivieren. Die Fließeigenschaften des Blutes werden durch das schnelle Wachstum und die gerinnungsfördernde Oberfläche des Thrombus ungünstig beeinflusst, so dass eine weitere Ablagerung von Thrombozyten aufrechterhalten wird, die schließlich zum kompletten Verschluss des Gefäßlumens führen kann (Gawaz et al., 1999; Fuster et al., 1992).

1.3 Fibrinogenmolekül

Humanes Fibrinogen, ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 340 kDa, wird von den Parenchymzellen der Leber gebildet und gehört zu den Akutphasenproteinen (Cottier, 1980; Müller-Berghaus et al., 1999). Als Blutkomponente liegt es im Gesamtblut in einer physiologischen Konzentration von 1,6-3,5 g/l (Barthels et al., 2003) vor, mit einer biologischen Halbwertszeit von fünf Tagen (Löffler et al., 1998). Fibrinogen besteht aus zwei symmetrischen Halbmolekülen, die jeweils aus drei nicht identischen Polypeptidketten α -Fibrinogen ($A\alpha$ -Kette), β -Fibrinogen ($B\beta$ -Kette) und γ -Fibrinogen (γ -Kette) bestehen, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Mit einer Anzahl von 610 Aminosäuren und einem Molekulargewicht (MG) von 66.500 ist das α -Fibrinogen ($A\alpha$ -Kette) die größte und das γ -Fibrinogen (γ -Kette) mit einer Anzahl von 411 Aminosäuren und einem MG von 46.500 die kleinste der drei Polypeptidketten. Mit einem MG von 52.000 besteht das β -Fibrinogen ($B\beta$ -Kette) aus 561 Aminosäuren (Müller-Berghaus et al., 1999). Das Fibrinogenmolekül weist eine Drei-Domänen-Struktur auf: zwei terminale D-Domänen, die mit einer zentralen E-Domäne über stäbchenartige Konnektoren, die aus den Mittelstücken der Polypeptidketten bestehen, verbunden sind.

Die Fibrinopeptide A und B, die sich an den aminoterminalen Enden des α -Fibrinogens und β -Fibrinogens befinden, werden durch Thrombin bei der Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin abgespaltet (Abbildung 4) (Hofmann 2006).

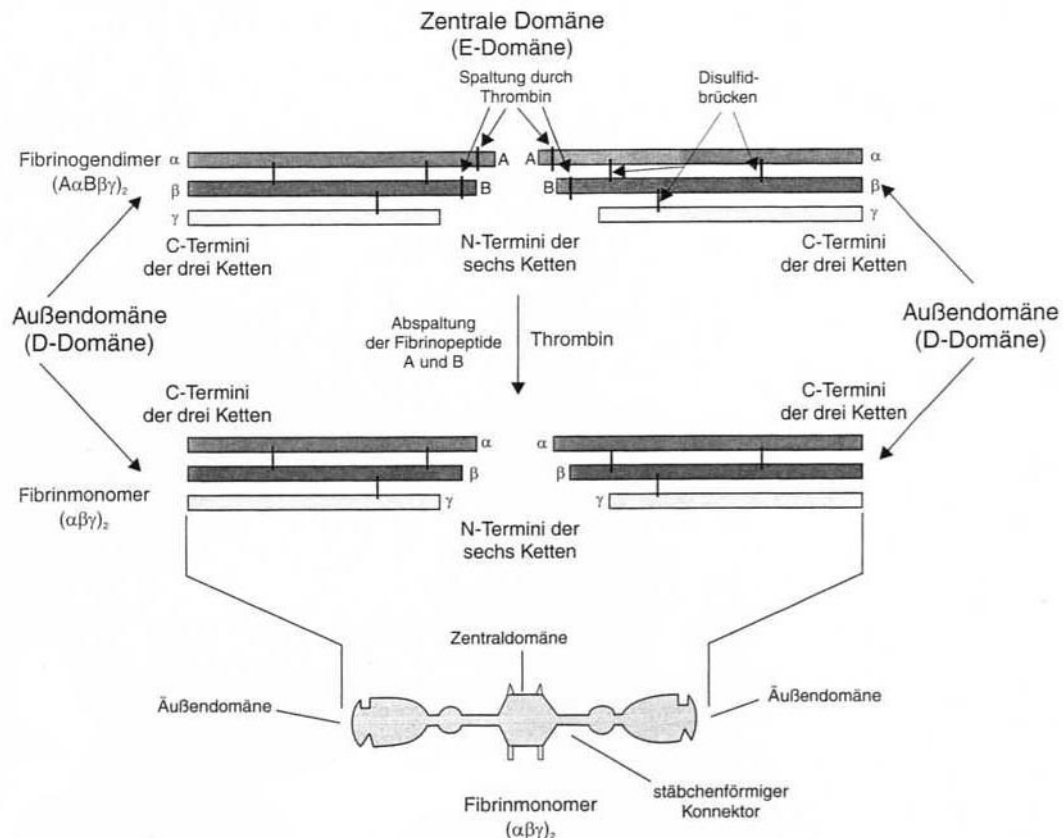


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Fibrinogenmoleküls (Hofmann 2006)

1.4 Fibrinogen-Gen

Die drei Gene, die das α -Fibrinogen, das β -Fibrinogen und das γ -Fibrinogen kodieren, befinden sich in einer Region von 50 kb auf Chromosom 4 (im Bereich von 4q23 bis 4q32) (Chung et al., 1990; Kant et al., 1985; Humphries et al., 1984). In der Abbildung 4 ist die Fibrinogen-Genregion dargestellt. Die DNA-Sequenz der drei Fibrinogen-Gene weist erhebliche Homologien auf, so dass man davon ausgehen kann, dass die Gene durch Duplikation und anschließende Diversifikation eines gemeinsamen Vorläufergens entstanden sind (Löffler et al., 1998). Das Fibrinogen- α -Gen ist zwischen dem Fibrinogen- γ - und dem Fibrinogen- β -Gen lokalisiert. Die Transkriptionsrichtung des Fibrinogen- β -Gens ist derjenigen des Fibrinogen- α - und Fibrinogen- γ -Gens entgegengesetzt (Chung et al., 1990; Manila et al., 2005).



Abbildung 5: Schematische Darstellung der Fibrinogen-Genregion
FGG, Fibrinogen- γ -Gen, *FGA*, Fibrinogen- α -Gen, *FGB*, Fibrinogen- β -Gen. Die Pfeile zeigen die Transkriptionsrichtung (nach Manila et al., 2005).

1.5 Fibrinogen und Atherosklerose

Fibrinogen erhöht die Blutviskosität (Leschke et al., 1988) und ist in atherosklerotische Prozesse involviert (Koenig et al., 2003). Bereits in frühen atherosklerotischen Läsionen, besonders aber in fortgeschrittenen Plaques, ist es in hoher Konzentration nachzuweisen (Bini et al., 1989). Mehrere prospektive epidemiologische Studien zeigten, dass eine erhöhte Fibrinogenkonzentration ein unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen ist (Ernst et al., 1993; Danesh et al., 1998; Maresca et al., 1999; Fibrinogen Studies Collaboration 2005). Ebenfalls bestätigen mehrere Studien eine Assoziation zwischen einem erhöhten Fibrinogenspiegel im Plasma und atherosklerotischen Manifestationen in koronaren, zerebralen und peripheren Gefäßen (Wilhelmsen et al., 1984; Kannel et al., 1987; Lee et al., 1999; Yarnell et al., 1991). Fibrinogen und seine Degradationsprodukte scheinen die vaskuläre Proliferation zu stimulieren und haben eine chemoattraktive Wirkung auf Neutrophile, Fibroblasten und Monozyten. Des Weiteren beeinflusst Fibrinogen die Ablagerung von Lipiden in fibrösen Plaques, indem Fibrin Lipoprotein (a) in hoher Affinität bindet und eine konsekutive Lipidakkumulation fördert (Koenig et al., 2003). Bei akutem MI korreliert der Fibrinogenspiegel positiv mit dem Stenosegrad, dem Ausmaß der KHK und dem Schweregrad der klinischen Symptomatik (Müller-Berghaus et al., 1999; Leschke et al., 1988). Ebenfalls korrelieren Unterschiede im Fibrinogen-Gen mit dem Risiko der Entstehung einer KHK sowie einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (PAVK) (Lee et al., 1999; de Maat et al., 1998).

1.6 Genpolymorphismen und koronare Herzkrankheit

Die KHK ist eine komplizierte, multifaktorielle Erkrankung, die von einer besonderen genetischen Disposition und einer Vielzahl verschiedener Risikofaktoren abhängig ist. Schwedische Forscher haben in einer Langzeitstudie an über 10.000 Zwillingspaaren den genetischen Risikofaktor bestimmt. Diese Studie zeigte, dass, wenn ein Geschwisterteil vor dem 55. Lebensjahr an der KHK verstarb, das Risiko, ebenfalls an einer KHK zu sterben, für männliche monozygote Zwillinge um das 8,1-Fache erhöht war. Noch ausgeprägter, nämlich um den Faktor 15 erhöht, war das Risiko bei monozygoten weiblichen Zwillingen, wenn der eine Zwilling an einer KHK vor dem 65. Lebensjahr verstarb (Marenberg et al., 1994). Von zunehmender wissenschaftlicher Bedeutung für die Atherogenese sind Gene, die im Fettstoffwechsel, der Blutgerinnung und der Blutdruckregulation eine zentrale Rolle einnehmen. Gene mit potentieller Assoziation zur KHK werden als Kandidatengene bezeichnet. Zu diesen Genen zählen diejenigen, die für die Apolipoproteine B und E, das Lipoprotein (a), die Fibrinogen-Untereinheiten und die endotheliale Nitroxidsynthase (eNOS) kodieren (Gerok et al., 2000; Kostner 1990; Walter et al., 2000).

Im Mittelpunkt der genassoziierten Studien stehen Polymorphismen, die in einem möglichen Zusammenhang mit der Krankheit stehen. Im Falle der ischämischen Herzerkrankung gehören hierzu:

1. *Fettstoffwechsel*: der $\epsilon 1/\epsilon 2/\epsilon 3$ -Polymorphismus des Apolipoprotein-E-Gens (Herold et al., 2005); heterozygoter LDL-Rezeptordefekt Arg3500Gln (Siegenthaler et al., 2006; Kostner, 1990).
2. *NO-Stoffwechsel*: Glu298Asp-Polymorphismus des NO-Synthase-Gens (Tesauro et al., 2000; Walter et al., 2000)
3. *Renin-Angiotensin-System*: I/D-Polymorphismus im Angiotensin-1-converting-Enzym(ACE)-Gen (Amant et al., 1997; Furster et al., 1994; Walter et al., 2000).
4. *Homocystein-Stoffwechsel*: C677T-Polymorphismus des Methylentetrahydrofolatreduktase- (MTHFR-) Gens (Herold et al., 2005; Walter et al., 2000).
5. *Fibrinogen-System*: -455G/A-Polymorphismus des Fibrinogen- β -Gens (Green et al., 1993; Thomson et al., 1991); -448-Polymorphismus des Fibrinogen- β -Gens (Carter et al., 1997).

Ein Genlocus wird als polymorph bezeichnet, wenn das seltenere Allel häufiger als 1 % in der untersuchten Population auftritt (Strachan et al., 2005). Bei den meisten der untersuchten Polymorphismen handelt es sich um Einzelnukleotidpolymorphismen, die im menschlichen Genom im Abstand von durchschnittlich etwa 300 Basen vorkommen (Knippers 2006).

Variationen in den Genen der Komponenten der Gerinnungs- und Fibrinolyse-Systeme sind wahrscheinlich mit der KHK und dem MI assoziiert (Mannila et al., 2005; Thomas et al., 1991; Gardemann et al., 1997). Es sind vor allem diejenigen Allele der Genpolymorphismen von Interesse, die zur Ausbildung unterscheidbarer Phänotypen führen. Dazu gehören quantitative oder funktionelle Veränderungen des jeweiligen Genprodukts. So sind Polymorphismen im Promotor des Fibrinogen- β -Gens (-455G/A und -854G/A) in der Lage Transkription und Expression des Gens zu beeinflussen (van 't Hooft et al., 1999). Außerdem können Polymorphismen, die innerhalb von Exonen liegen, zum Austausch einer Aminosäure führen (z. B. Austausch von Glutamat durch Aspartat des eNOS 894G/T-Polymorphismus) und dadurch die Funktion des Proteins möglicherweise beeinträchtigen.

1.7 Polymorphismen des Fibrinogens

In der Fibrinogen-Genregion sind zahlreiche Polymorphismen identifiziert worden (Tabelle 3) (Mannila et al., 2005; Behague et al., 1996). Die größte genetische Varianz zeigt dabei das Fibrinogen- β -Gen (Mannila et al., 2005; Behague et al., 1996). In zahlreichen Studien wurde versucht, eine Assoziation der Fibrinogen-Genpolymorphismen mit dem MI nachzuweisen (Mannila et al., 2005; Mannila et al., 2004; van 't Hooft et al., 1999; de Maat et al., 1998; Behague et al., 1996). Mannila und Mitarbeiter untersuchten mehrere Polymorphismen im Fibrinogen-Gen, um ihre Assoziation zum MI aufzuweisen. Insgesamt wurden acht der identifizierten Polymorphismen im Fibrinogen- γ -, α - und β -Gen untersucht: der -647A>G-, 1299+79T>C- und 1300-189C/T-Polymorphismus im Fibrinogen- γ -Gen, der -58G>A- und Thr312Ala-Polymorphismus im Fibrinogen- α -Gen, sowie der -249C>T-, -455G>A- und -854G>A-Polymorphismus im Fibrinogen- β -Gen. Diese Studie belegte, dass die Genotypkombination TG (1299+79T>C, -58G>A) und TGC (1299+79T>C, -58G>A, -455G>A) mit einem erhöhten MI-Risiko assoziiert war.

Carter und Mitarbeiter zeigten einen Zusammenhang zwischen dem Thr312Ala-Polymorphismus des Fibrinogen- α -Gens und der gesteigerten Mortalität nach Schlaganfall bei bestehendem Vorhofflimmern (Carter et al., 1999). Des Weiteren wurde ein Zusammenhang des Thr312Ala-Polymorphismus mit dem Auftreten von Lungenarterienembolie gezeigt (Carter et al., 2000). Diese Studie belegte, dass das Ala312-Risikoallel des Thr312Ala-Polymorphismus mit einem erhöhten Embolierisiko assoziiert ist. Auf dem Fibrinogen- β -Gen sind Polymorphismen identifiziert worden, die mit einem erhöhten Plasmafibrinogenspiegel assoziiert sind (-854G>A, -455G>A, -148C>T, Arg448Lys, Bcl I) (Mannila et al., 2005; Mannila et al., 2004; Iacovello et al., 2001; van 't Hooft et al., 1999; de Maat et al., 1998). Van 't Hooft und Mitarbeiter haben den Zusammenhang zwischen den β -Fibrinogen -455G/A- und -854G/A-Polymorphismen und dem erhöhten Plasmafibrinogenspiegel in Probanden untersucht. Dabei zeigte sich, dass das A-Allel des -455G/A-Polymorphismus und des -854G/A-Polymorphismus mit erhöhtem Plasmafibrinogenspiegel in gesunden Probanden signifikant assoziiert war (van 't Hooft et al., 1999). Außerdem ist das A-Allel mit einer beschleunigten Progression der Koronarsklerose assoziiert (de Maat et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt drei Polymorphismen im Fibrinogen-Gen untersucht. Für diese wurden die in der Literatur gebräuchlichsten Bezeichnungen verwendet: der Thr313Ala-, Arg448Lys- und -148C/T-Polymorphismus. Der Thr312Ala-Polymorphismus des Fibrinogen- α -Gens liegt im Exon 5, der Aminosäureaustausch an Position 312. Der Arg448Lys-Polymorphismus des Fibrinogen- β -Gens liegt im Exon 8, der Aminosäureaustausch an Position 448. Der -148C/T-Polymorphismus des Fibrinogen- β -Gens liegt in der 5'-Region, -148 bezieht sich auf die Transkriptionsstartstelle.

Tabelle 3: Polymorphismen der Fibrinogen-Gene

Gen	Polymorphismus	rs-Nummer
<i>FGG</i>	-1420T>A	rs2066854
	-942C>T	-
	-867C>T	-
	-647A>G	rs1800792
	1299+79T>C	rs1049636
	1300-189C/T	rs2066864
	216C>T	rs2066865
	<i>FGA</i>	-2031G>A
	-1441A>G	-
	-1407C>G	-
	-1106T>G	-
	-58G>A	rs2070011
	180+123G>A	rs2070014
	Thr312Ala	rs6050
<i>FGB</i>	-1420G>A	rs1800789
	-993C>T	rs2227389
	-854G>A	rs1800791
	-455G>A	rs1800790
	-249C>T	rs1800788
	Arg448Lys	rs4220
	-148C>T	rs1800787

FGG, Fibrinogen- γ -Gen, *FGA*, Fibrinogen- α -Gen, *FGB*, Fibrinogen- β -Gen
(Mannila et al., 2005)

1.8 Ziel der Arbeit

Es war das Ziel dieser Arbeit festzustellen, ob zwischen Variationen im Bereich der Fibrinogen-Gene und dem MI eine Assoziation besteht. Untersucht wurden die Polymorphismen Thr312Ala im Fibrinogen- α -Gen sowie Arg448Lys und -148C/T im Fibrinogen- β -Gen. Ausschlaggebend für die Wahl dieser Polymorphismen war ihre bereits nachgewiesene Bedeutung für die Genexpression und die Fibrinstruktur.

Zur Genotypisierung standen DNA-Proben von 3657 MI-Patienten und 1211 Kontrollpersonen zur Verfügung. Die Untersuchung der Proben erfolgte unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion in Verbindung mit dem Einsatz allelspezifischer DNA-Sonden (TaqMan-Verfahren). Die genetische Analyse bestand aus der Bestimmung der Genotypen und verschiedener Allelkombinationen (Haplotyp, Diplotyp). Ein Vergleich der Verteilung der Genotypen und Allelkombinationen zwischen der Patienten- und Kontrollgruppe diente zur Klärung der Frage, ob eine Assoziation der Fibrinogen-Polymorphismen und dem MI nachweisbar ist oder nicht.

Diese Arbeit ist ein Teil eines größeren Projektes, in dem die Bedeutung der gesamten genetischen Variation der Fibrinogen-Genregion für den MI untersucht wurde.

2. Methoden

2.1 Kontrollpersonen und Patienten

Dieser Fall-Kontrollstudie liegt ein Kollektiv von 1.211 Kontrollpersonen und 3.657 MI-Patienten aus dem süddeutschen Raum zugrunde, die im Zeitraum von 1993 bis 2002 einer koronarangiographischen Untersuchung im Deutschen Herzzentrum München oder in der 1. Medizinischen Klinik, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München unterzogen worden waren. Alle Personen, die an der Studie teilgenommen haben, haben ihr Einverständnis zur genetischen Analyse gegeben. Die Durchführung der Studie stand im Einklang mit der Deklaration von Helsinki. Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission des Klinikums rechts der Isar genehmigt.

2.2 Definitionen

Die Personen, die zu der Kontrollgruppe zählten, wiesen einen angiographisch gesicherten unauffälligen Koronarbefund auf. Sie wurden aufgrund von pektanginösen Beschwerden einer Koronarangiographie unterzogen. Ein akuter MI wurde bei anhaltenden retrosternalen Schmerzen (< 20 min) mit EKG-Veränderungen (ST-Hebungen, pathologische Q-Welle) verbunden mit einem Anstieg der Herzenzyme diagnostiziert. Die Diagnose eines abgelaufenen MI wurde durch charakteristische Veränderungen im 12-Kanal-EKG festgestellt. Eine arterielle Hypertonie wurde bei systolischen Blutdruckwerten > 140 mmHg und/oder diastolischen Blutdruckwerten > 90 mmHg bei mindestens zwei Messungen diagnostiziert (Guidelines Subcommittee 1999). Eine Hypercholesterinämie lag bei einer Serumcholesterinkonzentration (nüchtern) > 240 mg/dl vor. Die Personen, welche in den letzten sechs Monaten regelmäßig rauchten, wurden als Raucher definiert. Der Diabetes mellitus wurde diagnostiziert, wenn die Patienten insulinpflichtig waren oder orale Antidiabetika einnahmen. Entsprechend den WHO-Kriterien wurde diese Diagnose auch für diätisch eingestellte Diabetiker vergeben bei pathologischem Glukosetoleranztest und/oder wenn während des Klinikaufenthaltes erhöhte Werte für Nüchtern-Glukose in mindestens zwei Blutabnahmen festgestellt worden waren (World Health Organisation Study Group 1985).

2.3 DNA-Proben

Zur Genotypbestimmung wurde DNA zur Verfügung gestellt, die aus Leukozyten des peripheren Blutes präpariert worden war. Zur Präparation der DNA wurde der „QIAmp DNA Blood Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) oder der „High Pure PCR Template Preparation Kit“ (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland) verwendet. Der Vorgang bestand aus Lyse der Zellen, Bindung der DNA, Reinigung und Isolierung der reinen DNA. Die Lagerung der DNA-Proben erfolgte bei -25°C .

2.4 Genotypbestimmung des Thr312Ala-, Arg448Lys- und -148C/T-Polymorphismus

Die verwendete TaqMan-Methode zur Genotypisierung basierte auf dem Verfahren der PCR. Mit Hilfe der PCR ist es möglich, einen bestimmten Abschnitt der DNA zu vervielfältigen (Amplifikation) und damit einer Analyse wie z.B. der Genotypisierung zugänglich zu machen. Die PCR ist ein zyklisches Verfahren, bei dem nach jedem Zyklus die Anzahl der Moleküle verdoppelt wird; somit kommt es zu einem exponentiellen Anstieg des ausgewählten DNA-Abschnitts. Weil jeder Zyklus eine Hitzedenaturierung enthält, wird eine thermostabile DNA-Polymerase – nämlich die aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) – verwendet. Die DNA-Doppelstränge werden zunächst durch Erhitzen auf 95°C in Einzelstränge getrennt (Denaturierungsphase). Anschließend wird die Temperatur abgesenkt, damit sich die Primer spezifisch an die Template-DNA anlagern können (Annealing). Danach katalysiert die Taq-(DNA)Polymerase die Verlängerung der Primer.

Das TaqMan-Verfahren basiert auf einer Kombination aus der PCR und der 5'-Nuklease-Reaktion (Livak 1999). Dafür werden ein Primerpaar und zwei für die beiden Allele spezifische DNA-Sonden benötigt. Primer und Sonden wurden mit Hilfe der Primer Express Software (Version 2.0.0; Applied Biosystems) ermittelt. Die Sequenzen der Oligonukleotide wurden Daten entnommen, die in der GenBank niedergelegt sind. Die DNA-Sonden sind kurze Oligonukleotide, die zum DNA-Abschnitt um die polymorphe Stelle herum komplementär sind. Die beiden Sonden sind an ihrem 5'-Ende mit je einem von zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert FAM (6-Carboxifluoreszein) und VIC (Fluoreszenzfarbstoff der Firma Applied Biosystems), der als Reporterfarbstoff (R) fungiert. Am 3'-Ende befindet sich der Quencherfarbstoff (Q) TAMRA (6-Carboxitetramethylrhodamin). Bei Intaktheit der

Sonde verringert die relative Nähe des Q zum R die Aussendung des Fluoreszenzsignals. Die Taq-Polymerase besitzt eine 5'→3'-Exonukleaseaktivität, die während der PCR die an den DNA-Strang hybridisierte komplementäre Sonde hydrolysiert. Durch den Abbau der fluorogenen Sonde kommt es zur räumlichen Trennung des Q und R und damit zu einer für die Messung entscheidenden Erhöhung der Fluoreszenzintensität des R (Abbildung 6).

Nach der Beendigung der Reaktion erfolgt eine automatische Auswertung der allelspezifischen Fluoreszenzsignale und die Zuordnung des entsprechenden Genotyps. Dies geschah unter Verwendung des „ABI Prism 7700 Sequence Detection System“. In Tabelle 4 sind die Basensequenzen der verwendeten Primer und Sonden gezeigt.

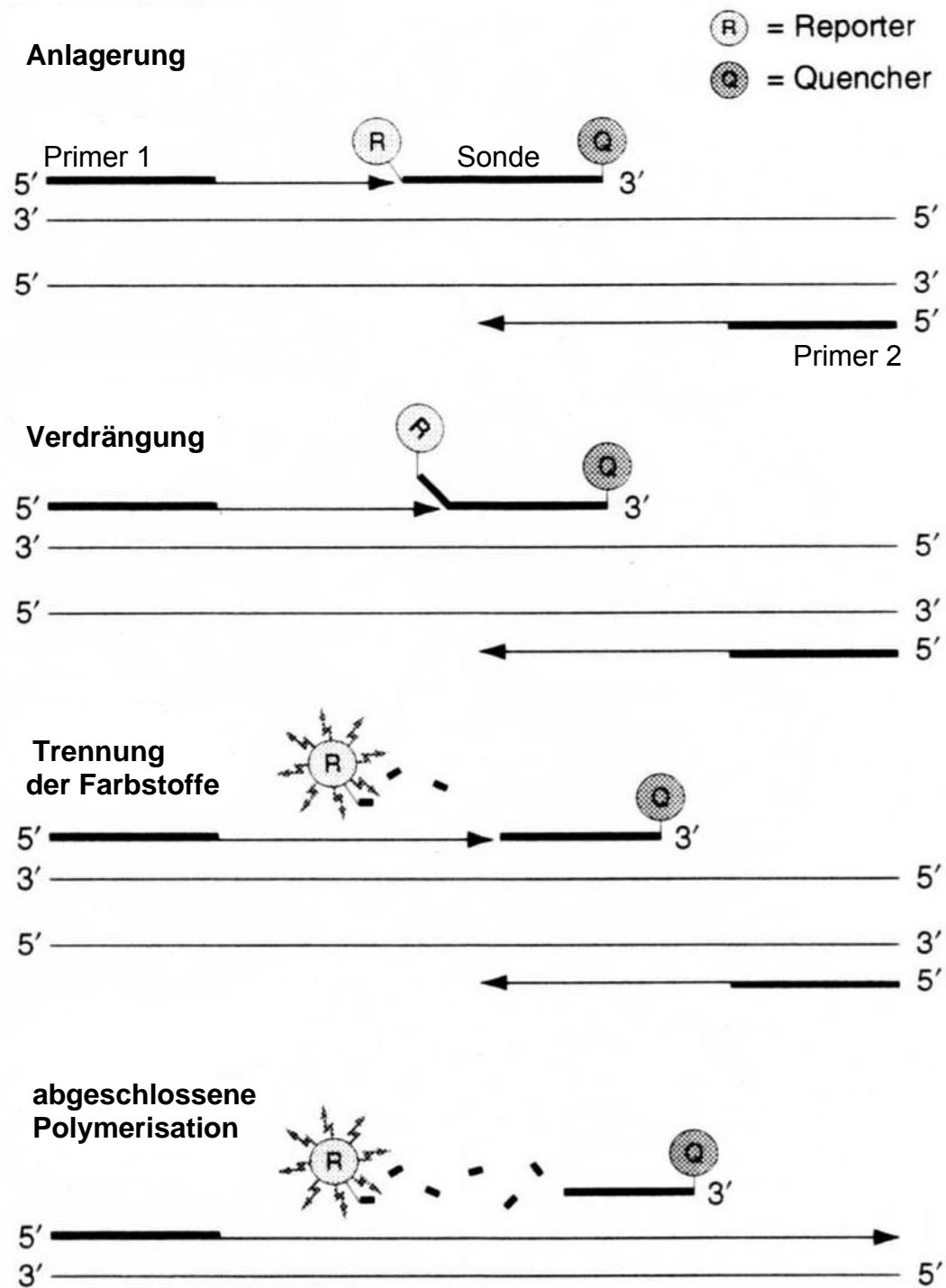


Abbildung 6: TaqMan-Reaktion

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

Tabelle 4: Primer und Sonden für die Amplifikation der polymorphen Sequenzen des Fibrinogen- α - und Fibrinogen- β -Gens

Polymorphismus	Primer und Sonden*
	<u>Primer (5'→3')</u>
<i>FGA</i> Thr312Ala	5' GAGGGACTGCAACCTGGAAAC 3' 5' CCAGGGTTTTGGTTTCCAGTACT 3'
	<u>TaqMan Sonden (5'→3')</u>
	FAM-TCCAGCTTCCAGT <u>ACT</u> TCCAGGTCCA VIC-TCCAGCTTCCAG <u>C</u> ACTTCCAGGTC
	<u>Primer(5'→3')</u>
<i>FGB</i> Arg448Lys	5' ACAGATGATGGTGTAGTATGGATGAATT 3' 5' GGGACTATTGCTGTGGGAAGAA 3'
	<u>TaqMan Sonden(5'→3')</u>
	FAM-ACTCATCTTC <u>C</u> TCATTGAGTACCATGACCC VIC-CATACTCATCTTC <u>I</u> TCATTGAGTACCATGACCC
	<u>Primer (5'→3')</u>
<i>FGB</i> -148C/T	5' CCCATCATTTTGTCCAATTAATGA 3' 5' ACTTGTTGGCTGAACCATTTTATCA 3'
	<u>TaqMan Sonden (5'→3')</u>
	FAM-CAACATCTTCCCAGCAA <u>A</u> GCTTATTTACTTGTC VIC-CAACATCTTCCCAGCAA <u>A</u> ACTTATTTACTTGTC

*FAM (6-Carboxifluoreszein) und VIC sind Fluoreszenzfarbstoffe der Firma Applied Biosystems. Die allelspezifischen Nukleotide sind unterstrichen.

FGA, Fibrinogen- α -Gen, *FGB*, Fibrinogen- β -Gen

Für die Genotypisierung der Polymorphismen wurden je zwei allelspezifische Sonden verwendet. Die Sonde für das 312A-, für das 448G-, und für das –148C-Allel war mit dem Reporterfarbstoff FAM und die Sonde für das 312G-, für das 448A-, und für das –148T-Allel mit dem Reporterfarbstoff VIC am 5'-Ende markiert.

Der Reaktionsmix für den TaqMan Assay bestand aus Universal Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt), Forward Primer, Reverse Primer und Sonden (FAM) und (VIC). Der Reaktionsansatz für den TaqMan Assay ist in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Bestandteile des Reaktionsmix für den Thr312Ala-, Arg448Lys- und –148C/T-Polymorphismus

Bestandteile	Menge (100 Reaktionen)
H ₂ O (deionisiert)	790 µl
Unversal Master Mix	1.100 µl
Forward Primer	33 µl (150 nmol/l)
Reverse Primer	33 µl (150 nmol/l)
FAM-markierte Sonde	22 µl (100 nmol/l)
VIC-markierte Sonde	22 µl (100 nmol/l)

Von diesem Reaktionsmix wurden 20 µl in jede Vertiefung einer 96-Loch-Platte gegeben, anschließend wurden 2 µl der DNA-Lösung oder deionisiertes Wasser (Negativkontrolle) hinzugefügt. Die Belegung einer 96-Loch-Platte war folgende: zwei Negativkontrollen, 6 Positionen für DNA mit bekanntem Genotyp als Referenzen (je 2 pro Genotyp) und 92 Positionen für Patientenproben mit unbekanntem Genotyp.

Es wurden Thermocycler des Typs „GeneAmp PCR System 9600“ und „GeneAmp PCR System 9700“ (Applied Biosystems, Darmstadt) verwendet. Das PCR-Protokoll bestand aus 35 Zyklen mit jeweils zwei Reaktionsschritten: 1. Denaturierung bei 92°C für 15 Sekunden, 2. „Annealing“ und Polymerisation bei 62°C (Thr312Ala-Polymorphismus) oder 60°C (Arg448Lys- und –148C/T-Polymorphismus) für 1 Minute. Nach Abschluss der PCR erfolgte die Auswertung der Ergebnisse mit dem „ABI Prism 7700 Detection System“ (Applied Biosystems, Darmstadt). Zur Kontrolle wurde bei 20 % der Studienteilnehmer eine zusätzliche Bestimmung des Genotyps durchgeführt. Die DNA-Proben, die für die Zweitbestimmung verwendet wurden,

waren separat von den originalen Blutproben isoliert worden. Die Genotypbestimmung wurde ohne Kenntnis von klinischen und angiographischen Daten des Patienten durchgeführt.

2.5 Statistik

Diskrete Variablen wurden als Zahl oder Prozentanteil angegeben und mittels Chi-Quadrat-Test oder Fischer's Exact Test verglichen. Kontinuierliche Variablen wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben und mittels des nicht gepaarten zweiseitigen t-Tests oder mittels Varianzanalyse für mehr als zwei Gruppen verglichen. Es wurde geprüft, ob sich die Genotypverteilung in der Kontrollgruppe im Gleichgewicht (Hardy-Weinberg-Gesetz) befindet und damit derjenigen entspricht, die in einer stabilen homologen Population erwartet wird (Henning et al., 2002). Ein P-Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm S-Plus, Version 4.0 (Mathsoft Inc, Seattle, Washington USA).

2.6 Material und Geräte

Material

Enzyme:

- TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt)

Sonstiges:

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

PCR-Gefäße:

- Mikro Amp® Optikal 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems)

Geräte

PCR-Thermocycler:

- GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystems)
- GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)
- ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems)

Zentrifugen:

- Zentrifuge CR 3.12 (Jouan)

Mixer:

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

3. Ergebnisse

3.1 Kontrollen und Patientenkollektiv

Die basalen Charakteristika der Kontrollgruppe und MI-Gruppe sind in Tabelle 6 dargestellt. Das Durchschnittsalter der Patienten in der MI-Gruppe war höher als in der Kontrollgruppe ($60,3 \pm 11,9$ vs. $64,0 \pm 12,0$; $P < 0,0001$), und der Anteil an Frauen war in der MI-Gruppe kleiner als in der Kontrollgruppe (49,4 % vs. 24,2 %; $P < 0,001$). Außerdem hatten die Patienten in der MI-Gruppe häufiger Diabetes mellitus (5,4 % vs. 20,6 %; $P < 0,001$), arterielle Hypertonie (48,6 % vs. 61,4 %; $P < 0,0001$) und Hypercholesterinämie (49,75 % vs. 56,5 %; $P < 0,0001$) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Anteil an aktiven Rauchern (15,2 % vs. 50,6 %; $P < 0,0001$) war ebenso in der MI-Gruppe höher als in der Kontrollgruppe.

Tabelle 6: Basale Charakteristika der Kontrollgruppe und MI-Gruppe

	Kontrollgruppe (n = 1.211)	MI-Gruppe (n = 3.657)	P
Alter (Jahre)	60,3±11,9	64,0±12,0	< 0,0001
Frauen	598 (49,4)	885 (24,2)	< 0,0001
Arterielle Hypertonie	589 (48,6)	2246 (61,4)	< 0,0001
Hypercholesterinämie	602 (49,7)	2067 (56,5)	< 0,0001
Aktive Raucher	184 (15,2)	1849 (50,6)	< 0,0001
Diabetes mellitus	65 (5,4)	754 (20,6)	< 0,0001

Das Alter der Patienten wird als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Die anderen Variablen sind als absolute und (in Klammern) als relative Zahlen angegeben.

3.2 Genotypverteilung der Fibrinogenpolymorphismen

Die Ergebnisse der Genotypverteilung der Thr312Ala-, Arg448Lys- und -148C/T-Polymorphismen sind in Tabelle 7 dargestellt. Die Genotypverteilung entsprach dem Hardy-Weinberg-Gesetz.

Tabelle 7: Genotypverteilung der Polymorphismen in der Kontrollgruppe und MI-Gruppe

Polymorphismus	Genotyp	Kontrollgruppe (n = 1.211)	MI-Gruppe (n = 3.657)	P	*P _{HWE}
Thr312Ala	AA	658 (54,3 %)	2.019 (55,2 %)	0,82	0,61
	AG	474 (39,1 %)	1.413 (38,6 %)		
	GG	79 (6,5 %)	225 (6,2 %)		
Arg448Lys	GG	717 (59,2 %)	2.190 (59,9 %)	0,89	0,94
	GA	429 (35,4 %)	1.268 (37,7 %)		
	AA	65 (5,4 %)	199 (5,4 %)		
-148C/T	CC	742 (61,3 %)	2.294 (62,7 %)	0,45	0,27
	CT	420 (34,7 %)	1.200 (32,8 %)		
	TT	49 (4,0 %)	163 (5,4 %)		

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

3.3 Genotypverteilung des Thr312Ala-Polymorphismus im Fibrinogen- α -Gen

Die Genotypverteilung der Kontroll- und MI-Gruppe sind in Tabelle 8 dargestellt. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Tabelle 8: Verteilung der Genotypen des Thr312Ala-Polymorphismus in der Kontrollgruppe und der MI-Gruppe

Genotyp	Kontrollgruppe (n = 1.211)	MI-Gruppe (n = 3.657)	P-Wert	*P _{HWE}
AA	658 (54,3 %)	2.019 (55,2 %)	0,82	0,61
AG	474 (39,1 %)	1.413 (38,6 %)		
GG	79 (6,5 %)	225 (6,2 %)		

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

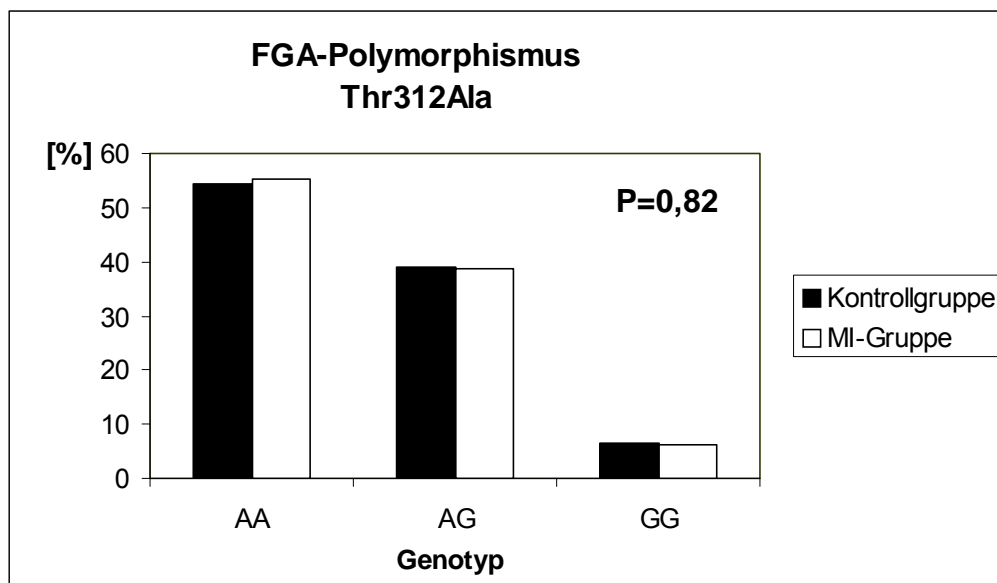


Abbildung 7: Prozentuale Verteilung der Thr312Ala-Genotypen in der Kontrollgruppe und der MI-Gruppe

FGA, Fibrinogen- α -Gen

3.4 Genotypverteilung des Arg448Lys-Polymorphismus im Fibrinogen- β -Gen

Die Genotypverteilung der Kontroll- und MI-Gruppe sind in Tabelle 9 dargestellt. Die Arg448Lys-Genotypverteilung zwischen der Kontrollgruppe und der MI-Gruppe wies keinen signifikanten Unterschied auf.

Tabelle 9: Verteilung der Genotypen des Arg448Lys-Polymorphismus in der Kontrollgruppe und der MI-Gruppe

Genotyp	Kontrollgruppe (n = 1.211)	MI-Gruppe (n = 3.657)	P-Wert	*P _{HWE}
GG	717 (59,2 %)	2.190 (59,9 %)	0,89	0,94
GA	429 (35,4 %)	1.268 (37,7 %)		
AA	65 (5,4 %)	199 (5,4 %)		

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

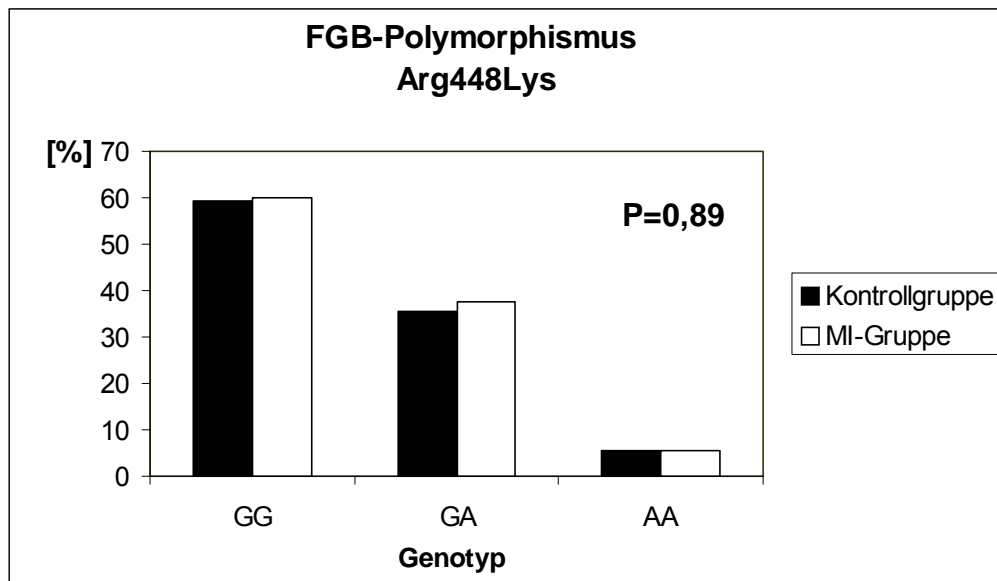


Abbildung 8: Prozentuale Verteilung der Arg448Lys-Genotypen in der Kontrollgruppe und der MI-Gruppe.

FGB, Fibrinogen- β -Gen

3.5 Genotypverteilung des -148C/T-Polymorphismus im Fibrinogen- β -Gen

Die Genotypverteilung der Kontroll- und MI-Gruppe sind in Tabelle 10 dargestellt. Die -148C/T-Genotypverteilung zwischen der Kontrollgruppe und der MI-Gruppe war nicht signifikant verschieden.

Tabelle 10: Verteilung der Genotypen des -148C/T-Polymorphismus in der Kontrollgruppe und der MI-Gruppe

Genotyp	Kontrollgruppe (n = 1.211)	MI-Gruppe (n = 3.657)	P-Wert	*P _{HWE}
CC	742 (61,3 %)	2.294 (62,7 %)	0,45	0,27
CT	420 (34,7 %)	1.200 (32,8 %)		
TT	49 (4,0 %)	63 (5,4 %)		

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

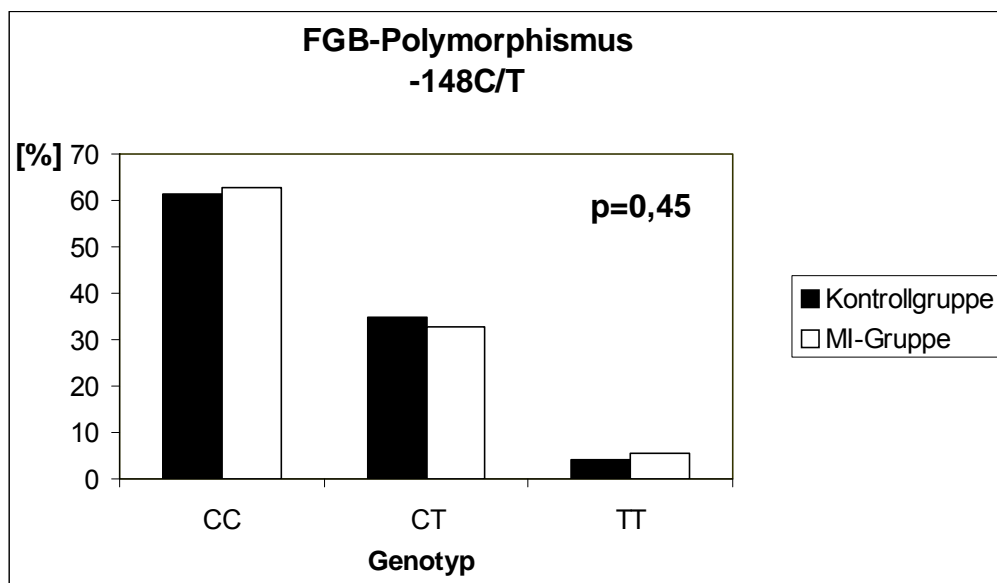


Abbildung 9: Prozentuale Verteilung der -148C/T-Genotypen in der Kontrollgruppe und der MI-Gruppe
FGB, Fibrinogen- β -Gen

3.6 Haplotypfrequenzen der Polymorphismen im Fibrinogen- β -Gen

Die Haplotypfrequenzen der Kontroll- und MI-Gruppe sind in Tabelle 11 dargestellt. Die Verteilung der vier verschiedenen Haplotypfrequenzen zwischen den beiden Gruppen zeigte keinen signifikanten Unterschied.

Tabelle 11: Haplotypfrequenzen der Arg448Lys- und -148C/T-Polymorphismen in der Kontrollgruppe und der MI-Gruppe

Haplotyp	Kontrollgruppe (2.422 Haplotypen)	MI-Gruppe (7.314 Haplotypen)	P
CG	1.863 (76,9)	5.647 (77,2)	0,77
TA	518 (21,4)	1.525 (20,9)	0,57
TG	41 (1,7)	141 (1,9)	0,46
CA	0	1 (0,01)	

Das erste Allel des Haplotyps repräsentiert den Arg448Lys-Polymorphismus und das zweite den -148C/T-Polymorphismus. Die Variablen sind als absolute und (in Klammern) als relative Zahlen angegeben.

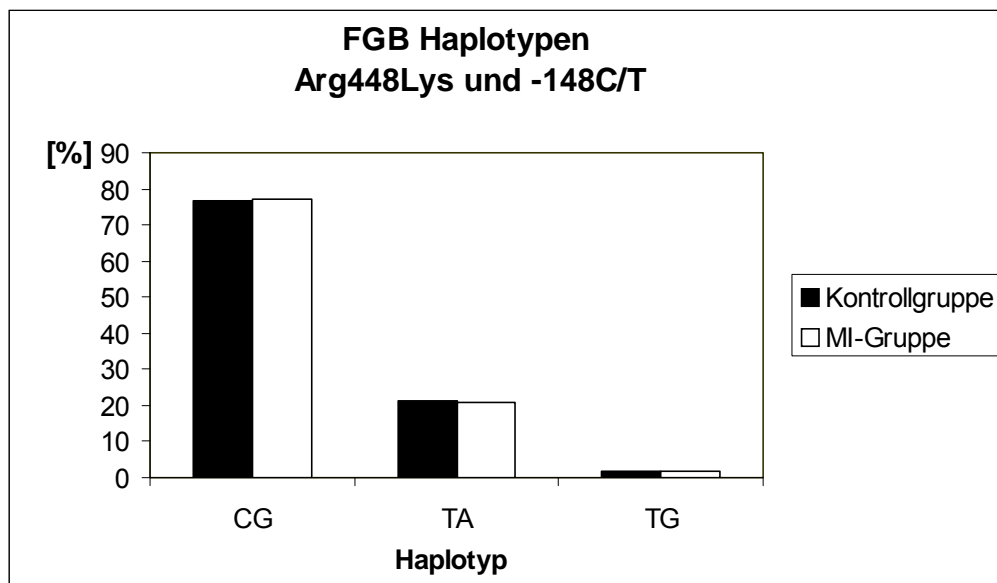


Abbildung 10: Prozentuale Haplotypverteilung der Arg448Lys- und -148C/T-Polymorphismen in der Kontrollgruppe und der MI-Gruppe
FGB, Fibrinogen- β -Gen

3.7 Diplotypverteilung der Polymorphismen im Fibrinogen- β -Gen

Die Diplotypverteilung der Kontroll- und MI-Gruppe sind in Tabelle 12 dargestellt. Die Diplotypverteilung der Arg448Lys- und -148C/T-Polymorphismen zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Tabelle 12: Diplotypverteilung der Arg448Lys und -148C/T-Polymorphismen in der Kontrollgruppe und der MI-Gruppe

Diplotyp	Kontrollgruppe (1.211 Diplotypen)	MI-Gruppe (3.657 Diplotypen)	P
CG/CG	717 (59,2)	2.189 (59,9)	0,69
CG/TA	404 (33,4)	1.165 (31,9)	0,33
TA/TA	49 (4,0)	163 (4,5)	0,54
CG/TG	25 (2,1)	103 (2,8)	0,16
TG/TA	16 (1,3)	34 (0,9)	0,24
TG/TG	0	2 (0,05)	
CC/GA	0	1 (0,03)	

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

4. Diskussion

Diese Studie untersuchte innerhalb eines relativ großen Kollektivs (1.211 Kontrollen und 3.657 Patienten), ob ein Zusammenhang zwischen den genetischen Variationen in der Fibrinogen-Genregion und dem MI besteht. Insgesamt wurden im Fibrinogen- α - und - β -Gen drei Polymorphismen untersucht: der Thr312Ala-, Arg448Lys- und –148C/T-Polymorphismus. Der Thr312Ala-Polymorphismus liegt im Fibrinogen- α -Gen, der Arg448Lys- und –148C/T-Polymorphismus im Fibrinogen- β -Gen. Das Ergebnis der hier vorliegenden Arbeit zeigte: Die Genotyp-, Haplotyp- und Diplotypverteilung des Fibrinogen- α - und β -Polymorphismus wies zwischen der Kontrollgruppe und der MI-Gruppe keinen signifikanten Unterschied auf.

4.1 Publierte Untersuchungen zur Assoziation des Fibrinogen-Thr312Ala-, Arg448Lys- und –148C/T-Polymorphismus mit dem Myokardinfarkt

Eine Übersicht über die Ergebnisse dieser und anderer Studien bezüglich der Assoziation des Thr312Ala-, Arg448Lys- und –148C/T-Polymorphismus mit dem MI oder der KHK bieten die Tabellen 13 bis 15. Mannila und Mitarbeiter untersuchten mehrere Polymorphismen der Fibrinogen-Gene im Zusammenhang mit dem MI. In einer Studiengruppe aus 387 Kontrollen und 377 Patienten wurde festgestellt, dass die Genotypverteilung des Thr312Ala-Polymorphismus zwischen der Kontrollgruppe und der MI-Gruppe nicht signifikant verschieden war. Zum gleichen Ergebnis kamen auch Curran und Mitarbeiter, die den Thr312Ala-Polymorphismus bei 592 Patienten (aus Nordirland 183 und aus Frankreich 409 Patienten) und 658 Kontrollen (aus Nordirland 159 und aus Frankreich 499 Kontrollen) untersuchten (Curran et al., 1998). Die Autoren anderer Studien (z. B. Carter et al., 1997, Behague et al., 1996), die die Genotypverteilung des Arg448Lys-Polymorphismus zwischen der Kontroll- und MI-Gruppe ermittelten, beobachteten, dass zwischen den genetischen Variationen des Fibrinogen-Gens und dem MI keine signifikante Verbindung besteht. Auch die Studienergebnisse von Keavney et al., 2006, Mannila et al., 2005, Mannila et al., 2004 und Blake et al., 2001, die den –148C/T-Polymorphismus im Zusammenhang mit dem MI untersuchten, zeigten keinen signifikanten Unterschied der Genotypverteilung zwischen der Kontroll- und MI-Gruppe. Die vorliegende Arbeit und die hier erwähnten Studien zeigen, dass zwischen den genetischen Variationen im Fibrinogen-Gen und dem MI keine signifikante Assoziation besteht, trotz Befunden,

die eine derartige Assoziation nahegelegt haben (Carter et al., 1996; de Maat et al., 1998).

Zusammenfassend ergibt sich aus dieser Studie, dass die untersuchten Polymorphismen im Fibrinogen- α - und β -Gen keine brauchbaren Marker für die Risikoabschätzung des MI darstellen.

Tabelle 13: Studienergebnisse des Thr312Ala-Polymorphismus

Studie (Land)	Kontroll-/ MI-Gruppe	Männer (%) Kontroll-/ MI-Gruppe	Phänotyp der Patienten	Assoziation	Risikoallel/Risikogenotyp
Diese Arbeit 2008 (Deutschland)	1211/3657	50,6/76,8	MI	Nein	-/-
Mannila et al., 2005 (Schweden)	387/377	82/82	MI	Nein	-/-
Curran et al., 1998 (Nordirland)	159/183	100/100	MI/KHK	Nein	-/-
(Frankreich)	499/409	100/100	MI/KHK	Nein	-/-

MI, Myokardinfarkt; KHK, Koronare Herzkrankheit

Tabelle 14: Studienergebnisse des Arg448Lys-Polymorphismus

Studie (Land)	Kontroll-/ MI-Gruppe	Männer (%) Kontroll-/MI-Gruppe	Phänotyp der Patienten	Assoziation	Risikoallel/Risikogenotyp
Diese Arbeit 2008 (Deutschland)	1211/3657	50,6/76,8	MI	Nein	-/-
Carter et al., 1997 (England)	216/405	50,9/69,1	MI/KHK	Nein	-/-
Behague et al., 1996 (Nordirland)	168/182	100/100	KHK	Nein	-/-
(Frankreich)	500/383	100/100	KHK	Nein	-/-

MI, Myokardinfarkt; KHK, Koronare Herzkrankheit

Tabelle 15: Studienergebnisse des –148C/T-Polymorphismus

Studie (Land)	Kontroll-/ MI-Gruppe	Männer (%) Kontroll-/MI-Gruppe	Phänotyp der Patienten	Assoziation	Risikoallel/Risikogenotyp
Diese Arbeit 2008 (Deutschland)	1211/3657	50,6/76,8	MI	Nein	-/-
Keavney et al., 2006 (England)	3290/4490	100/100	MI	Nein	-/-
Mannila et al., 2005 (Schweden)	387/377	82/82	MI	Nein	-/-
Mannila et al., 2004 (Schweden)	575/533	100/100	MI	Nein	-/-
Blake et al., 2001 (USA)	751/386	100/100	MI	Nein	-/-

MI, Myokardinfarkt

4.2 Untersuchung der Assoziation der Fibrinogen-Genregion mit dem Myokardinfarkt unter dem Einsatz repräsentativer Polymorphismen

Diese Arbeit ist ein Teil eines größeren Projektes, in dem insgesamt 10 Polymorphismen im Fibrinogen- γ -, α - und β -Gen bezüglich einer Assoziation mit dem MI untersucht worden sind. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stellen einen Betrag zu dieser umfassenden Analyse dar (Koch et al., 2008). In Tabelle 16 sind die in dem Gesamtprojekt untersuchten Fibrinogen-Polymorphismen aufgeführt. Abbildung 11 zeigt die Lage der 10 Polymorphismen in der Fibrinogen-Genregion. In zwei relativ großen Studienpopulationen – Population 1 (1.211 Kontrollen und 3.657 MI-Patienten) und Population 2 (1.392 Kontrollen und 1.392 MI-Patienten) – wurden die Genotyp- und Haplotypverteilung der Fibrinogen- γ -, α - und β -Polymorphismen in den Kontroll- und MI-Gruppen ermittelt. Diese 10 Polymorphismen repräsentieren den überwiegenden Teil der genetischen Variation innerhalb der etwa 50kb umfassenden Fibrinogen-Genregion.

Tabelle 16: Polymorphismen der Fibrinogen-Gene

Gen	Polymorphismus	rs-Nummer	Lage
<i>FGG</i>	-647A>G	rs1800792	5'-Region
	1299+79T>C	rs1049636	Intron 9
	1300-189C>T	rs2066864	Intron 9
<i>FGA</i>	-58G/A	rs2070011	Exon 1
	Thr312Ala	rs6050	Exon 5
<i>FGB</i>	Arg448Lys	rs4220	Exon 8
	-148C>T	rs1800787	5'-Region
	-249C>T	rs1800788	5'-Region
	-455G>T	rs1800790	5'-Region
	-854G>A	rs1800791	5'-Region

FGG, Fibrinogen- γ -Gen, *FGA*, Fibrinogen- α -Gen, *FGB*, Fibrinogen- β -Gen. Die drei hervorgehobenen Polymorphismen wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht.

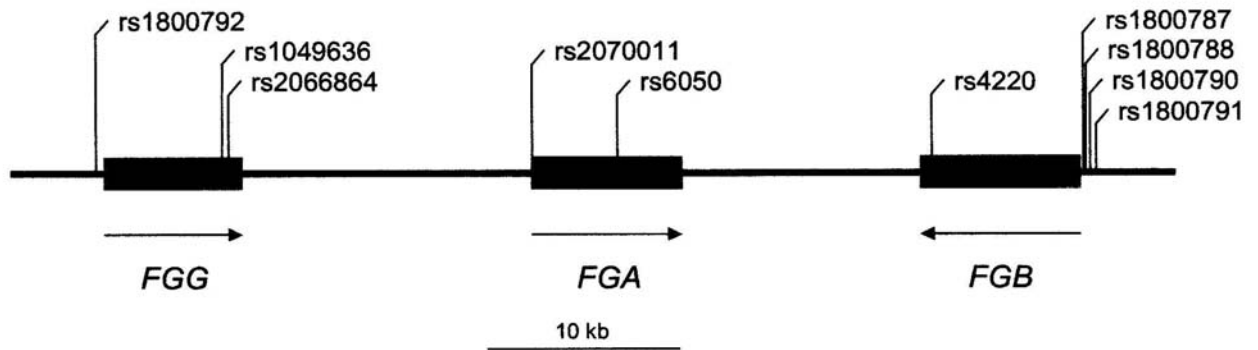


Abbildung 11: Position der Polymorphismen im *FGG*, Fibrinogen- γ -Gen;
FGA, Fibrinogen- α -Gen; *FGB*, Fibrinogen- β -Gen
 Die Pfeile geben die Transkriptionsrichtung an

Die Allelfrequenzen der Fibrinogen- γ -, - α - und - β -Polymorphismen waren zwischen den Kontrollen und MI-Patienten nicht signifikant verschieden – dies gilt für beide Studienpopulationen (Tabelle 17). Die Allelfrequenz der Kontrollgruppen war nicht signifikant verschieden von denjenigen, die in anderen Kontrollgruppen beobachtet wurden, die vorwiegend aus Weißen bestanden (Behague et al., 1996; McCarthy et al., 2004; Scarabin et al., 1993; Green et al., 1993; Gardemann et al., 1997; Doggen et al., 2000; Blake et al., 2001; Humphries et al., 1995; van't Hooft et al., 1999; Menegatti et al., 2001).

Unter den Kontrollen und Patienten der Populationen 1 und 2 wurde aus den 10 Polymorphismen die Frequenz der 12 häufigsten Haplotypen (Frequenz >1 %) ermittelt (Tabelle 18). Keiner der 12 häufigsten Haplotypen wies eine signifikante Assoziation mit dem MI auf (Tabelle 18).

Zur Erfassung möglicher krankheitsrelevanter Interaktionen zwischen den Fibrinogen-Polymorphismen wurde zusätzlich die genspezifische und die intergenetische Haplotypverteilung der Fibrinogen- γ -, - α - und - β -Polymorphismen untersucht. Die genspezifischen und die intergenetischen Haplotypen wurden auf der Basis der 12 häufigsten Haplotypen aus den 10 Polymorphismen bestimmt. Die genspezifische Haplotypverteilung des Fibrinogen- γ -Gens (-647A>G, 1299+79T>C, 1300-189C>T), des Fibrinogen- α -Gens (-58G>A, Ala312Thr) und des Fibrinogen- β -Gens (Arg448Lys, -148C/T, -249C>T,

–455G>A, –854G>A) zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Kontroll- und den MI-Gruppen der beiden Studienpopulationen (Tabelle 19).

Neben der direkten Assoziationsanalyse zwischen Polymorphismen und Phänotyp einer Krankheit können die Kopplungsungleichgewichte (Linkage Disequilibrium, LD) benachbarter Allele betrachtet werden. Das LD gibt an, ob in einer Population Allele an zwei oder mehr Stellen einer Sequenz häufiger gekoppelt in einem Haplotyp vorkommen, als man statistisch erwarten würde (Knippers 2006).

Die Abbildung 12 gibt einen Überblick über das LD zwischen den untersuchten Polymorphismen im Fibrinogen- γ -, $-\alpha$ - und $-\beta$ -Gen. Fazit: es besteht eine starke Kopplung zwischen jeweils benachbarten Polymorphismen mit Ausnahme von rs 6050 (*FGA*) und rs 4220 (*FGB*).

Anschließend wurden intergenetische Haplotypfrequenzen, die eine relativ geringe Kopplung untereinander aufweisen, im Zusammenhang mit dem MI untersucht. Dabei handelt es sich um den Fibrinogen- γ - und $-\alpha$ -Gen (1299+79C>T, –58G>A), den Fibrinogen- γ -, $-\alpha$ - und $-\beta$ -Gen (1299+79T>C, –58G>A, –455G>A). Die Verteilung dieser intergenetischen Haplotypen war zwischen den Kontrollen und MI-Patienten der beiden Studienpopulationen nicht signifikant unterschiedlich (Tabelle 20).

Mannila und Mitarbeiter (2005) untersuchten in ihrer Studienpopulation aus 387 Kontrollen und 377 MI-Patienten ebenfalls Haplotypen im Fibrinogen- γ -, $-\alpha$ - und $-\beta$ -Gen im Zusammenhang mit dem MI. Diese Studie fand ein niedrigeres MI-Risiko in den intragenetischen Kombinationen ACC (–647A>G, 1299+79T>C, 1300-189C>T), AA (–58G>A, Thr312Ala) und im Gegensatz zu der Arbeit von Koch und Mitarbeiter (2008) ein erhöhtes MI-Risiko in den intergenetischen Kombinationen TG (1299+79T>C, –58G>A) und TGC (1299+79T>C, –58G>A, –455G>A). Mannila und Mitarbeiter (2005) haben acht von den identifizierten Polymorphismen untersucht, die auch in der Arbeit von Koch (2008) erforscht wurden. Der Unterschied der Ergebnisse zwischen der Arbeit von Koch (2008) und der Studie von Mannila (2005) könnte darauf beruhen, dass die Teilnehmerzahl des untersuchten Kollektivs von Koch (2008) deutlich größer war als die Gruppe, die von Mannila (2005) untersucht wurde (387 Kontrollen und 377 Patienten).

Weitere Unterschiede bestanden in der Diagnosestellung des MI. Alle Teilnehmer der Studie von Koch (2008) – auch die Kontrollpersonen – wurden einer koronarangiographischen Untersuchung unterzogen. Im Gegensatz dazu wurde in der Studie von Mannila (2005) die koronarangiographische Untersuchung in der Patientengruppe unvollständig und in der Kontrollgruppe nicht durchgeführt.

Zusammenfassend ergibt sich aus der Studie von Koch und Mitarbeiter (2008), dass kein kausaler Zusammenhang der untersuchten Fibrinogen-Genpolymorphismen und dem MI besteht. Die Ergebnisse der Arbeit von Koch (2008) zeigten, dass eine Untersuchung der Fibrinogen-Polymorphismen für die Risikostratifizierung des MI nicht in Frage kommt. Unabhängig davon, ob sie einzeln oder in verschiedenen Kombinationen betrachtet werden, lassen Genvarianten im Fibrinogen-Gen keinen Zusammenhang mit dem Risiko für den MI erkennen.

In mehreren genomweiten Studien wurden Polymorphismen identifiziert, die eine Assoziation mit dem MI aufweisen. Dazu gehören der $\epsilon 1/\epsilon 2/\epsilon 3$ -Polymorphismus des Apolipoprotein-E-Gens (Herold et al., 2005), der heterozygote LDL-Rezeptordefekt Arg3500Gln (Siegenthaler et al., 2006), der C677T-Polymorphismus des Methylentetrahydrofolatreduktase- (MTHFR-) Gens (Herold et al., 2005; Walter et al., 2005), der Glu298Asp-Polymorphismus des NO-Synthase-Gens (Tesauro et al., 2000; Walter et al., 2000), der 5A-1171/6A-Polymorphismus im Stromelysin-1-Gen (bei Frauen) und der C1019T-Polymorphismus des Connexin-37-Gens (bei Männern) (Yamada et al., 2002). Diese Polymorphismen erweisen sich vielleicht als brauchbare Marker für die Risikoabschätzung des MI und für die Wahl einer geeigneten Therapie. Daraufhin könnte die frühzeitige Einleitung der Therapie das Herzinfarktrisiko senken und zur Vermeidung plötzlicher Ereignisse beitragen. Möglicherweise leistet die Untersuchung genetischer Varianten in Zellkultur- und Tierexperimenten einen Beitrag zur Aufklärung der Genese des MI und liefert Hinweise für neuartige Therapieansätze.

Tabelle 17: Die Allelfrequenzen der Fibrinogen- γ -, - α - und - β -Polymorphismen in den Kontroll- und MI-Gruppen der Studienpopulationen 1 und 2

Gene*	SNP	Allel	Population 1			Population 2		
			Kontrollgruppe (2.422 Allele)	MI-Gruppe (7.314 Allele)	P	Kontrollgruppe (2.784 Allele)	MI-Gruppe (2.784 Allele)	P
<i>FGG</i>	-647A>G	A	56,0	54,4	0,17	55,2	55,2	0,96
<i>FGG</i>	1299+79T>C	T	69,9	70,7	0,44	71,4	69,6	0,15
<i>FGG</i>	1300-189C>T	C	74,8	75,7	0,35	73,9	75,6	0,14
<i>FGA</i>	-58G>A	G	62,6	63,3	0,55	60,9	61,9	0,46
<i>FGA</i>	Thr312Ala	A	73,9	74,5	0,54	72,8	74,5	0,15
<i>FGB</i>	Arg448Lys	C	78,6	79,1	0,58	78,7	77,0	0,13
<i>FGB</i>	-148C>T	G	76,9	77,2	0,76	77,0	74,0	0,06
<i>FGB</i>	-249C>T	G	80,0	80,3	0,79	78,6	80,6	0,07
<i>FGB</i>	-455G>A	C	76,9	77,3	0,72	77,3	75,1	0,05
<i>FGB</i>	-854G>A	C	84,0	85,5	0,07	87,3	86,3	0,25

**FGG*, Fibrinogen- γ -Gen, *FGA*, Fibrinogen- α -Gen, *FGB*, Fibrinogen- β -Gen. Die Allelfrequenzen der Kontroll- und MI-Gruppen sind in % angegeben.

Tabelle 18: Die 12 häufigsten Haplotypen der 10 Fibrinogen-Polymorphismen in den Kontroll- und MI-Gruppen der Studienpopulationen 1 und 2

Haplotyp		Population 1		Population 2	
Name	Allelkombination*	Kontroll-/MI-Gruppe	P	Kontroll-/MI-Gruppe	P
Hap 1	GTCGACGGCC	26,2/28,9	0,07	27,1/26,3	0,68
Hap 2	ATTAGCGACC	17,3/17,3	0,99	18,1/16,4	0,24
Hap 3	GTCGATAGTC	15,9/15,4	0,68	15,7/17,1	0,34
Hap 4	ACCGACGGCT	15,3/14,3	0,39	12,6/13,6	0,43
Hap 5	ACCAACGGCC	8,8/8,6	0,83	9,5/9,5	0,99
Hap 6	ATTAGCGGCC	3,7/3,6	0,92	4,6/4,2	0,61
Hap 7	ATTAGTAGTC	4,3/3,6	0,32	3,7/3,7	0,96
Hap 8	ACCGACGGCC	2,8/2,5	0,63	3,0/2,8	0,76
Hap 9	ACCAACAGTC	1,7/1,8	0,73	1,5/2,1	0,23
Hap 10	ACCGATAGTC	1,3/1,5	0,58	1,2/1,5	0,59
Hap 11	GTCGACGACC	1,4/1,2	0,57	1,7/1,3	0,54
Hap 12	GTCAGCGACC	1,3/1,2	0,85	1,3/1,5	0,60

* Allelkombinationen der 10 Polymorphismen aus der Fibrinogen-Genregion in der Reihenfolge (von links nach rechts): Fibrinogen- γ -Gen: -647A>G, 1299+79T>C, 1300-189C>T; Fibrinogen- α -Gen: -58G/A, Thr312Ala; Fibrinogen- β -Gen: Arg448Lys, -148C>T, -249C>T, -455G>T, -854G>A. Die Haplotypfrequenzen der Kontroll- und MI-Gruppen sind in % angegeben.

Tabelle 19: Die genspezifischen Haplotypfrequenzen der Fibrinogen- γ -, - α - und - β -Polymorphismen in den Kontroll- und MI-Gruppen der Studienpopulationen 1 und 2

Gen	Haplotyp*	Population 1		Population 2	
		Kontroll-/MI-Gruppe	P	Kontroll-/MI-Gruppe	P
<i>FGG</i>	GTC	44,9/46,8	0,27	45,8/46,2	0,82
	ACC	29,9/28,7	0,13	27,9/29,5	0,35
	ATT	25,3/24,6	0,64	26,4/24,3	0,20
<i>FGA</i>	GA	62,9/63,8	0,59	61,3/62,6	0,47
	AG	26,6/25,8	0,61	27,7/25,8	0,26
	AA	10,5/10,4	0,96	11,0/11,6	0,65
<i>FGB</i>	CGGCC	41,5/43,7	0,19	44,2/42,8	0,47
	TAGTC	21,5/20,5	0,46	20,6/22,2	0,30
	CGACC	20,1/19,7	0,80	21,1/19,2	0,24
	CGGCT	15,3/14,3	0,39	12,6/13,6	0,43
	CAGTC	1,7/1,8	0,73	1,5/2,1	0,23

*Die Genotypkombinationen im Fibrinogen- γ -Gen (-647A>G, 1299+79T>C, 1300-189C>T), im Fibrinogen- α -Gen (-58G>A, Ala312Thr) und im Fibrinogen- β -Gen (Arg448Lys, -148C/T, -249C>T, -455G>A, -854G>A). Die Haplotypfrequenzen der Kontroll- und MI-Gruppen sind in % angegeben.

Tabelle 20: Die intergenetischen Haplotypfrequenzen der Fibrinogen- γ -, - α - und - β -Polymorphismen in den Kontroll- und MI-Gruppen der Studienpopulationen 1 und 2

Gen	Haplotyp	Population 1		Population 2	
		Kontroll-/MI-Gruppe	P	Kontroll-/MI-Gruppe	P
<i>(FGG-FGA)*</i>	TG	43,6/45,5	0,25	44,5/44,7	0,88
	TA	26,6/25,8	0,61	27,7/25,8	0,26
	CG	19,4/18,2	0,38	16,8/17,0	0,46
	CA	10,5/10,4	0,96	11,0/11,6	0,65
<i>(FGG-FGA-FGB)*</i>	TGC	27,7/30,1	0,12	28,8/27,7	0,53
	TAC	22,3/22,2	0,93	24,0/22,1	0,25
	CGC	18,1/16,8	0,32	15,6/16,4	0,56
	TGT	15,9/15,4	0,68	15,7/17,1	0,34
	CAC	8,8/8,6	0,83	9,5/9,5	0,99
	TAT	4,3/3,6	0,32	3,7/3,7	0,96
	CAT	1,7/1,8	0,73	1,5/2,1	0,23
	CGT	1,3/1,5	0,58	1,2/1,5	0,59

*Die Genotypkombinationen im Fibrinogen- γ - und - α -Gen (1299+79T>C, -58G/A-), im Fibrinogen- γ -, - α - und - β -Gen (1299+79T>C-, -58G/A, -455G>T). Haplotypfrequenzen der Kontroll- und MI-Gruppen sind in % angegeben.

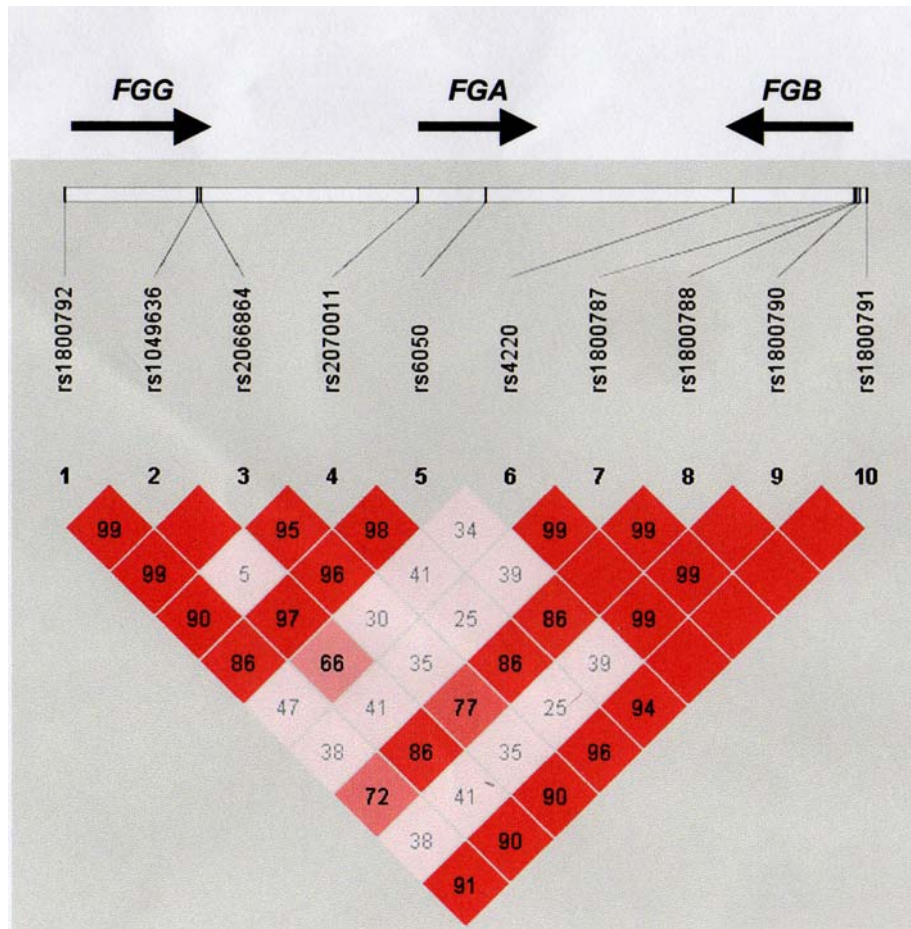


Abbildung 12: Graphische Darstellung des Kopplungsungleichgewichts (LD) für die untersuchten Fibrinogen-Polymorphismen

Einem bestimmten LD-Wert zwischen zwei Polymorphismen ist jeweils eine farbkodierte Fläche zugeordnet. Die rote Fläche bedeutet eine starke Kopplung zwischen zwei Polymorphismen, die hellere Fläche eine geringe Kopplung zwischen zwei Polymorphismen. Die Pfeile geben die Transkriptionsrichtung an.

5. Zusammenfassung

Die KHK ist derzeit die häufigste Todesursache in den westlichen Industrieländern und ist als die Manifestation der Atherosklerose in den Koronararterien definiert (www.destatis.de). Die KHK ist eine komplexe Erkrankung, die durch verschiedene genetische Faktoren, die Lebensweise und Umwelteinflüsse determiniert wird. Als wichtigste Risikofaktoren der KHK gelten Hypertonie, Hypercholesterinämie, der Diabetes mellitus und das Rauchen. Darüber hinaus gibt es aus Zwillingsstudien gesicherte Hinweise dafür, dass genetische Faktoren an der Ausprägung dieser komplexen Erkrankung beteiligt sind (Marenberg et al., 1994). Es wurden daher große Anstrengungen unternommen, Kandidatengene zu identifizieren, die in die Gefäßtonusregulation, in den Lipidstoffwechsel und in die Blutgerinnung eingreifen und deshalb zur Koronarsklerose beitragen könnten. Insbesondere die Komponenten der Gerinnungssysteme (z. B. das Fibrinogen), die eine zentrale Rolle bei der Entstehung der KHK und des MI spielen, sind auf genetische Veränderungen hin untersucht worden (Mannila et al., 2005; Thomas et al., 1991).

Das Fibrinogen, das eine essentielle Rolle bei der Blutgerinnung spielt, ist mit der Entstehung des MI assoziiert worden (Mannila et al., 2005; Saito et al., 2000; Thomson et al., 1995; Meade et al., 1986). Besonders genetische Varianten des Fibrinogen- γ , - β und - α -Gens wurden mit dem Auftreten erhöhter Plasma-Fibrinogenspiegel und damit dem MI-Risiko in Verbindung gebracht.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Assoziation des Thr312Ala-Polymorphismus im Fibrinogen- α -Gen sowie des Arg448Lys- und -148C/T-Polymorphismus im Fibrinogen- β -Gen mit dem MI untersucht. Die Studienpopulation bestand aus 1.211 Kontrollpersonen und 3.657 MI-Patienten. Zur Genotypbestimmung wurde das TaqMan-Verfahren benutzt, bei dem allelspezifische Oligonukleotidsonden in einer Polymerasekettenreaktion zum Einsatz kommen. Die genetische Analyse bestand aus der Bestimmung der Genotypen und verschiedener Allelkombinationen (Haplotyp, Diplotyp) der Studienteilnehmer. Es zeigte sich, dass die Verteilung der Genotypen und Allelkombinationen zwischen der Patienten- und Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied aufwies. Dieser Befund lässt den Schluss zu – und das ist das Hauptergebnis –, dass zwischen den Fibrinogen-Polymorphismen und dem MI keine Assoziation besteht. Daraus

folgt, dass die hier untersuchten Genvariationen keine brauchbaren Marker für die Risikoabschätzung des MI darstellen und keine Rückschlüsse auf die Wahl einer geeigneten Therapie oder das individuelle Risiko für den MI zulassen. Auch die Untersuchung weiterer Polymorphismen der Fibrinogen-Genregion ergab keinen Anhaltspunkt für eine Verbindung mit dem MI (Koch et al., 2008).

6. Literaturverzeichnis

1. Ardissino, D., Mannucci, P.M., Merlini, P.A., Duca, F., Fève, R., Tagliabue, L., Tubaro, M., Galvani, M., Ottani, F., Ferrario, M., Corrola, J., Margaglione, M.
Prothrombotic genetic risk factors in young survivors of myocardial infarction.
Blood. 94 (1999) 46-51
2. Amant, C., Bauters, C., Bodart, J.C., Lablanche, J.M., Grollier, G., Danchin, N., Hamon, M., Richard, F., Helbecque, N., McFadden, E.P., Amouyel, P., Bertrand, M.E.
D allele of the angiotensin I-converting enzyme is a major risk factor for restenosis after coronary stenting.
Circulation. 96 (1997) 56-60
3. Barthels, M., M. von Depka.
„Das Gerinnungskompandium“
Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 2003, 393-393
4. Baumann, R.E., Henschen, A.H.
Linkage disequilibrium relationships among four polymorphisms within the human fibrinogen gene cluster.
Human Genet. 94 (1994)165-170
5. Baumann, R.E., Henschen, A.H.
Human fibrinogen polymorphic site analysis by restriktion endonuclease digestion and allele-specific polymerase chain reaction amplifikation:
Identifikation of polymorphisms at position A α 312 and B β 448.
Blood. 82 (1993) 2117-2124
6. Behague, I., Poirier, O., Nicaud, V., Evans, A., Arveiler, D., Luc, G., Cambou, J.P., Scarabin, P.Y., Bara, L., Green, F., Cambien, F.
 β Fibrinogen gene polymorphisms are associated with plasma fibrinogen and coronary artery disease in patients with myocardial infarktion. The ECTIM study.
Circulation. 93 (1996) 440-449

7. Benderly, M., Graff, E., Reicher-Reiss, H., Behar, S., Brunner, D., Goldbour, U.
For the Bezafibrate Infarction Prevention (BIP) study group. Fibrinogen is a predictor of mortality in coronary heart disease patients.
Arterioscler Thromb vasc Biol. 16 (1996) 351-356
8. Bini, A., Fenoglio, J.J., Mesa-Tejada, R., Kudryk, B., Kaplan, K.L.
Identification and distribution of fibrinogen, fibrin, and fibrin(ogen) degradation products in atherosclerosis. Use of monoclonal antibodies.
Arteriosklerosis. 9 (1989) 109-121
9. Blake, G.J., Schmitz, C., Lindpaintner, K., Ridker, P.M.
Mutation in the promoter region of the β -fibrinogen gene and the risk of future myocardial infarction, stroke and venous thrombosis.
Eur Heart J. 22 (2001) 2262-2266
10. Bolibar, I., Kienast, J., Thompson, S.G., Matthias, R., Niessner, H., Fechrup, C.
On behalf of the ECAT angina pectoris study group London, England, Münster and Giessen, Germany, and Vienna, Austria.
Relation of fibrinogen to presence and severity of coronary artery disease is independent of other coexisting heart disease.
Am Heart. 125 (1993) 1601-1605
11. Bombeli, T., Schwarz, B.R., Harlan, J.M.
Adhesion of activated platelets to endothelial cells: Evidence for GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), $\alpha_v\beta_3$ integrin, and GPIb α .
J Exp Med. 187 (1998) 329-339
12. Böcker, W., Denk, H., Heitz, U.Ph.
„Pathologie“
Urban & Fischer, München-Jena, 2004, 3. Auflage, 484-489
13. Carter, A.M., Catto, A.J., Kohler, H.P., Ariens, R.A. S., Stickland, M.H., Grant P.J.
 α -Fibrinogen Thr312Ala polymorphism and venous thromboembolism.
Blood. 96 (2000) 1177-1179

14. Carter, A.M., Catto, A.J., Grant, P.J.
Association of the α -fibrinogen Thr312Ala polymorphism with poststroke mortality in subjects with atrial fibrillation.
Circulation. 99 (1999) 2423-2426
15. Carter, A.M., Ossei-Gerning, N., Wilson, I.J., Grant, P.J.
Association of the platelet PIA polymorphism of glycoprotein IIb/IIIa and fibrinogen B β 448 polymorphism with myocardial infarction and extent of coronary artery disease.
Circulation. 96 (1997) 1424-1431
16. Carter, A.M., Mansfield, M.W., Stickland, M.H., Grant, P.J.
 β -Fibrinogen gene -455G/A polymorphism and fibrinogen levels: risk factors for coronary artery disease in subjects with NIDDM.
Diabetes Care. 19 (1996) 1265-1268
17. Chung, D.W., Harris, J.E., Davie E.W.
Nucleotide sequences of the three genes coding for human fibrinogen.
Adv Exp Med Biol. 281 (1990) 39-48
18. Cottier, H. Bürki. K., Hess, M.W., Keller, H.U., Roos, B., Schindler, R., Zimmermann, A.
„Pathogenese“
Springer-Verlag, Heidelberg-New York, 1980, Band 1, 437-445, 482-489
19. Curran, J.M., Evans, A., Arveiler, D., Luc, G., Ruidavets, J.B., Humphries, S.E., Green, F.R.
The α fibrinogen T/A312 polymorphism in the ECTIM study.
Thromb Haemost. 79 (1998) 1057-1058
20. Danesh, J., Collins, R., Appleby, P., Peto, R.
Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leucocyte count with coronary heart disease: meta-analyses of prospective studies.
JAMA. 279 (1998) 1477-1482

21. de Maat, P.M., Kastelein, J.P., Jukema, J.W., Zwindermann, A.H., Jansen, H., Groenemeier, B., Brusckhe, A.V.G., Kluff, C.
On behalf of the REGRESS group.
–455G/A polymorphism of the β -fibrinogen gene is associated with the progression of coronary atherosclerosis in symptomatic men.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 18 (1998) 265-271
22. Doggen, C.J.M., Bertina, R.M., Manger, C.V., Rosendaal, F.R. Fibrinogen polymorphisms are not associated with the risk of myocardial infarction.
British Journal of Haematology. 110 (2000) 935-938
23. Ernst, E., Resch, K.L.
Fibrinogen as a cardiovascular risk factor.
Ann Intern Med. 118 (1993) 956-963
24. Fatha K., Silveira A., Tornvall P., Karpe F., Blombäck M., Hamsten A.
Proneness to formation of tight and rigid fibrin gel structures in men with myocardial infarction at a young age.
Thrombosis and Haemostasis. 76 (1996) 535-40
25. Fibrinogen studies collaboration. Plasma fibrinogen level and the risk of major cardiovascular diseases and nonvascular mortality: an individual participant metaanalysis.
JAMA 294 (2005) 1799-1809
26. Fuster, V., Badimon, L., Badimon, J., Chesebro, J. H.
The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes.
N Engl J Med. 326 (1992) 242-249, 310-318
27. Fuster, V., Lewis, A. Conner Memorial Lecture.
Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology.
Circulation. 90 (1994) 2126-2146

28. Gardemann, A., Schwartz, O., Haberbosch, W., Katz, N., Weiss, T., Tillmanns, H., Hehrlein, F.W., Waas, W., Eberbach, A.
Positive association of the β fibrinogen H1/H2 gene variation to basal fibrinogen levels and to the increase in fibrinogen concentration during acute phase reaction but not to coronary artery disease and myocardial infarction.
Thromb Haemost. 77 (1997) 1120-6.
29. Gawaz, M.
„das Blutplättchen“,
Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 1999, 1-107
30. Gerok, W., Huber, C., Meinertz, T., Zeidler, H.
“Die Inneren Medizin“
Schattauer-Verlagsges., Stuttgart-New York, 2000, 10. Auflage, 244-256, 257-269, 409-415
31. Green, F., Hamsten, A., Blombäck, M., Humphries, S.
The role of β -fibrinogen genotype in determining plasma fibrinogen levels in young survivors of myocardial infarction and healthy controls from Sweden.
Thromb Haemost. 70 (1993) 915-20
32. Griebenow, R., Gülker, H., Dominiak, P., Piper, H.M.
„Das autonome Nervensystem und Koronare Herzkrankheit“
Norvartis, Nürnberg, 1999, 66-67
33. Guidelins Subcommittee. World Health Organisation-International Society of Hypertension Guidelines for the management of Hypertension.
J Hypertens. 17 (1999) 151-183
34. Heid, I.M., Lamina, C., Bongardt, F., Fischer, G., Klopp, N., Huth, C., Küchenhoff, H., Kronenberg, F., Wichmann, H.E., Illig, T.
Wie gut können Haplotypen in den populationsbasierten KORA-Studien rekonstruiert werden?
Gesundheitswesen, © Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart-New York, 67 (2005)132-136
35. Hennekens, C.H.
Primary prevention of coronary heart disease and stroke.
UpToDate 2007. www.uptodate.com

36. Henning, W.
„Genetik“
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 2002, 3. Auflage, 708-710
37. Herold, G.
„Innere Medizin“
Köln, 2005, 198-201, 592-594, 697-698
38. Humphries, S.E., Imam, A.M.A., Robbins, T.P., Cooc, M., Caritt, B., Ingle, C., Williamson, R.
The identification of DNA polymorphism of the α fibrinogen gene, and the regional assignment of the human fibrinogen genes to 4q26-qter.
Human Genet. 68 (1984) 148-153
39. Humphries, S.E., Ye, S., Talmud, P., Bara, L., Wilhelmsen, L., Tiret, L.
European atherosclerosis research study-genotype at the fibrinogen locus G(-455)-A beta-gene is associated with differences in plasmafibrinogenlevels in young men and women from different regions in Europa-evidence for gender genotype enviroment interaction.
Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology. 15 (1995) 96-104
40. Iacoviello, L., Vischetti, M., Zito, F., Donato, M.B.
Genes encoding fibrinogen and cardiovascular risk.
Hypertension 38 (2001) 1199-203
41. Kannell, W.B., Wolf, P.A., Castelli, W.P., D'Agostino, R.B.
Fibrinogen and Risk of cardiovascular disease. The Framingham study.
JAMA. 258 (1987) 1183-1186
42. Kannel, W.B., D'Agostino, R.B., Belanger, A.J.
Fibrinogen, cigarette smoking, and risk of cardiovascular disease: Insights from the Framingham study.
American Heart Journal. 113 (1987) 1006-1010
43. Kant, J.A., Fornace, A.J., Saxe, D., Simon, M.I., McBride, O.W., Carbtree, G.R.
Evolution and organization of fibrinogen locus on chromosome 4 : Gene duplikation accompanied by transposition and inversion.
Proct Nat Acad Sci USA. 82 (1985) 3244-2348

44. Keavney, B., Danesh, J., Parish, S., Palmer, A., Clark, S., Youngman, L., Delèpine, M., Lathrop, M., Peto, R., Collins, R.
For The International Studies of Infarct Survivals (ISIS) Collaborators.
Fibrinogen and coronary heart disease: test of causality by 'Mendelian randomization'.
Int J Epidemiol. 35 (2006) 935-943
45. Knippers, R.
„Molekulare Genetik“
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2006, 9. Auflage, 510-511
46. Koch, W., Hoppmann, P., Biele, J., Mueller, J.C., Schömig, A., Kastrati, A.
Fibrinogen genes and myocardial infarction: A haplotype analysis.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 28 (2008) 758-763
47. Koenig, W.
Fibrinogen in cardiovascular disease: an update
Thromb Haemost. 89 (2003) 601-9
48. Kostner G.
Neuere pathophysiologische aspekte der Atherogenese.
WMW (Wiener medizinische Wochenschrift). Nr.4 (1990) 101-109
49. Lee, A.J., Fowkes, F.G.R., Lowe, G.D.O., Connor, J.M., Rumley, A.
Fibrinogen, factor VII and PAI-1 genotypes and the risk of coronary and peripheral atherosclerosis: Edinburgh Artery Study.
Thromb Haemost. 81(1999) 553-60
50. Lefkowitz, R.J., Willerson, I.T.
Prospects for cardiovascular research
JAMA. 285 (2001) 581-587
51. Leschke, M., Blanke, H., Stellwaag, M., Motz, W., Strauer, B.E.
Hyperfibrinogenämie und pathologische Plasmaviskosität.
Deutsche Medizinische Wochenschrift. 113 (1988) 1175-1181
52. Libby, P.
Inflammation in atherosclerosis.
Nature. 420c (2002) 868-874

53. Libby, P.
Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes.
Circulation. 104 (2001) 365-372
54. Livak, K.J.
Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay.
Genet Anat. 14 (1999) 143-9
55. Löffler, G., Petrides, E.
„Biochemie und Pathobiochemie“.
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1998, 6. Auflage, 920-925
56. Löwel, H., Meisinger, C., Heier, M.
Geschlechtsspezifische Trends von plötzlichem Herztod und akutem
Herzinfarkt. Ergebnisse des bevölkerungsbasierten KORA/MONICA-
Augsburg Herzinfarkt-Registers 1985 bis 1998.
Deutsche Medizinische Wochenschrift. 127 (44) (2002) 2311–6
57. Mannila, M.N., Eriksson, P., Lundman, P., Samnegord, A., Boquist, S.,
Ericsson, C.G., Tornvall, P., Hamsten, A., Silveira, A.
Contribution of haplotypes across the fibrinogen gene cluster to variation in
risk of myocardial infarction.
Thromb Haemost. 93 (2005) 570-7
58. Mannila, M.N., Silveira, A., Hawe, E., Eriksson, P., Aillaud, M.F., Juhan-
Vague, I., Yudkin, J., Margaglione, M., di Minno, G., Mussoni, L., Tremoli, E.,
Humphries, S., Hamsten, A.
On behalf of the HIFMECH study group.
Thromb Haemost. 92 (2004) 1240-9
59. Marenberg, M.E., Risch, N., Berkman, L.F.
Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of
twins.
N Engl J Med. 330 (1994) 1041-1046
60. Maresca, G., Di Blasio, A., Marchioli, R., Di Minno, G.
Measuring plasma fibrinogen to predict stroke and myocardial infarction: an
update.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 19 (1999) 1368-1377

61. McCarthy, J.J., Parker, A., Salem, R., Moliterno, D.J., Wang, Q., Plow, E.F., Rao, S., Shen, G., Rogers, W.J., Newby, L.K., Cannata, R., Glatt, K., Topol, E.J.
Large scale association analysis for identification of genes underlying premature coronary heart disease: cumulative perspective from analysis of 111 candidate genes.
J Med Genet. 41 (2004) 334-341
62. Meade, T.W., Brozovic M., Chakrabarti, R.R., Haines, A.P., Imeson, J.D., Mellows, S., Miller, G.J., North, W.R., Stirling, Y., Thompson, S.G.
Haemostatic function and ischaemic heart disease: Principal results of the Northwick Park Heart Study.
The Lancet. 2 (1986) 533-537
63. Menegatti, M., Asselta, R., Duga, S., Malcovati, M., Bucciarelli, P., Mannucci, P.M., Tenchini, M.L.
Identifikation of four novel polymorphisms in the $A\alpha$ and γ fibrinogen genes and analysis of association with plasma levels of the protein.
Thrombosis Research. 103 (2001) 299-307
64. Müller-Berghaus, Pötzsch, B.
„Hämoseologie“
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1999, 285-286, 585-586
65. Müller, G.
„Klinische-chemische Diagnostik“
Gustav Fischer Verlag, Jena-Stuttgart, 1993, 245-246
66. Myers, R.H., Kiely, D.K., Cupples, L.A., Kannel, W.B.
Parental history is an independent risk factor for coronary artery disease: the Framingham study.
Am Heart J. 113 (1987) 1006-1010
67. Plow, E.F., D'Souza, S.E., Ginsberg, M.H.
Ligand Binding to GPIIb-IIIa: A Status Report.
Seminar in Thrombosis and Hemostasis. 18 (1992) 324-331

68. Ross, R.
Atherosclerosis an inflammatory disease.
N Engl J Med. 340 (1999a) 115-126
69. Ross R. Atherosclerosis an inflammatory disease.
N Engl J Med. 138 (1999b) 419-420
65. Ruggeri, Z.M.
New insights into mechanisms of platelet adhesion and aggregation.
Sem Hematol. 31 (1994) 229-2
70. Saito, I., Folsom, A.R., Brancati, F.L., Duncan, B.B., Chambless, L.E.,
McGovern, P.G.
Nontraditional risk factors for coronary heart disease incidence among
persons with diabetes: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC)
Study.
Ann Intern Med. 133 (2000) 81-91
71. Scarabin, P.Y., Bara, L., Ricard, S., Poirier, O., Cambou, J-P., Arveiler, D.,
Luc, G., Evans, A.E., Samama, M.M., Cambien, F.
Genetic variation at the β -fibrinogen locus in relation to plasma fibrinogen
concentrations and risk of myocardial infarction.
Arterioscler Thromb. 13 (1993) 886-891
72. Schrör, K.
Pathophysiologie der Thrombozytenaktivierung und Pharmakologie der
GPIIb/IIIa-Inhibitoren.
Herz. 26 (Supplement I) (2001) 30-5
73. Silbernagl, S., Klinke, R., Pape, H.C.
„Physiologie“
Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New-York, 2005, 5. Auflage, 245-253
74. Siegenthaler W., Blum H.E.
„Klinische Pathophysiologie“
Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 2006, 9. Auflage, 148-156, 465-
466
75. Statistisches Bundesamt Deutschland 2003 und 2005.
www.destatis.de

76. Strachan, T., Read, A.P.
"Molekulare Humangenetik"
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2005, 3. Auflage, 366-367
77. Schunkert, H., Hense, H.W.
„Molekulare Genetik kardiovaskulärer Erkrankungen“
Deutsche medizinische Wochenschrift. 120 (1995) 533-539
78. Tesauro, M., Thomson, W.C., Rogliani, P., Chaudhary, L.Qi. P. P., Moss, J.
Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms
associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases:
Cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298.
Proc Natl Acad Sci USA. 97 (2000) 2832-5
79. The International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genom.
Nature. 437 (2005) 1299-1320
80. Thomas, A. E, Green, F.R., Kelleker, C.H., Wilkes, H.C., Brennan, P.J.,
Meade, T.W., Humphries, S.E.
Variation in the promotor region of the β fibrinogen gene is associated with
plasma fibrinogen levels in smokers and nonsmokers.
Thromb Haemost. 65 (1991) 487-90
81. Thomson, S.G., Kienast, J., Pykes, S.D.M., Haverkate, F., and van de Loo,
J.C.W.
Haemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in
patients with angina pectoris. European concerted action on thrombosis and
disabilities angina pectoris study group.
N engl J Med. 332 (1995) 635-641
82. van't Hooft F.M., von Bahr, S.J.F, Silveira, A., Iliadou, A., Eriksson, P.,
Hamsten, A.
Two common, functional polymorphisms in the promoter region of the β -
fibrinogen gene contribute to regulation of plasma fibrinogen concentration.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 19 (1999) 3063-70
83. Walter, D.H., Zeiher, A.M.
Genetische Risikofaktoren für den Myokardinfarkt.
Herz. 25 (2000) 7-14

84. Wilhelmsen, L., Svärdsudd, K., Korsan-Bengsten, K., Larsson, B., Welin, L., and Tibblin, G.
Fibrinogen as risk factor for stroke and myocardial infarction.
N Engl J Med. 311 (1984) 501-505
85. World Health Organisation Study Group. Diabetes mellitus.
WHO Tech Rep Ser. 727(1985) 1-104
86. Yarnell, J.W., Baker, I.A., Sweetmann, P.M., Bainton, D., O'Brien, J.R., Whitehead, P.J., and Elwood, P.C.
Fibrinogen, viscosity, and white blood cell count are major risk factors for ischemic heart disease. The Caerphilly and speedwell collaborative heart disease studies.
Circulation. 83 (1991) 836-844
87. Yamada, Y., Izawa, H., Ischiyama, S., Takatsu, F., Ishihara, H., Hirayama, H., Sone, T., Tanaka, M., Yokota, Mitsuhiro.
Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes.
N Engl J Med. 347 (2002) 1916-1923

7. Veröffentlichungen

Koch, W., Hoppmann, P., Biele, J., Mueller, J.C., Schömig, A., Kastrati, A. Fibrinogen genes and myocardial infarction: A haplotype analysis.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 28 (2008) 758-763

8. Danksagungen

Herrn Prof. Dr. med. Schömig, Direktor der Medizinische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München und des Deutschen Herzzentrum München, danke ich für die Möglichkeit, die vorliegende Dissertation an seinem Klinikverbund durchführen zu können und den Zugriff auf die hervorragend strukturierte Klinikdatenbank.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Kastrati, meinem Doktorvater, für die Überlassung des Themas.

Herrn Dr. Werner Koch möchte ich sehr herzlich für seine präzise und ausführliche methodische Beratung sowie für die Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit danken.

Großer Dank gilt auch dem ganzen Team im Labor, Wolfgang Latz und Claudia Ganser, die mit Tatkraft und guter Stimmung die Arbeit im Labor unterstützt. Insbesondere Frau Eichinger, die mich im Labor eingearbeitet hat, möchte ich für viel Geduld und Verständnis danken.

Meinem Freund Christian möchte ich für seine unendliche Geduld, sein Vertrauen und seine zuverlässige Hilfe bei der Korrektur der Arbeit danken.