

**Genpolymorphismen als prädiktive Marker zur Vorhersage für die
Entstehung der Koronaren Herzerkrankung**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2007

vorgelegt von:

Nadia Saleh

geb. am: 02.05.1975

in Siegburg

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Zusammenfassung	4
Summary	6
2. Abkürzungsverzeichnis	7
3. Einleitung	9
3.1 Koronare Herzerkrankung	10
3.1.1 Definition	10
3.1.2 Epidemiologie	10
3.1.3 Ätiologie	11
3.1.4 Pathogenese	12
4. Gen- Polymorphismen	14
4.1 Paraoxonase (PONA) Arg192Gln/ Paraoxonase (PONA) Met55Leu	15
4.2 Apolipoprotein- A- V (APO-A-V) 1131T→C	18
4.3 Apolipoprotein Kringle IV Met75Thr	19
4.4 Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) 469C→T	20
4.5 Monocyte-chemoattractant- Protein-1 (MCP-1) 2518 A→G	21
4.6 Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR) 677C→T	22
5. Fragestellung	23
6. Patienten und Methoden	24
6.1 Patienten	24
6.2 Blutentnahme und Probenlagerung	24
6.3 Materialien und Methoden	25
6.4 Analytik	25
6.4.1 DNA – Isolierung	25
6.4.2 PCR	26
6.4.3 Schneiden der DNA mit Restriktionsenzymen	26
6.4.4 Agarosegelektrophorese	27
6.5 Genotypisierungen	28
6.5.1 Paraoxonase (PONA) Arg192Gln Genotypisierung	28
6.5.2 Paraoxonase (PONA) Met55Leu Genotypisierung	29
6.5.3 Apolipoprotein- A- V (APO-A-V) 1131T→C Genotypisierung	30
6.5.4 Apolipoprotein Kringle IV Met75Thr Genotypisierung	31
6.5.5 Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) 469C→T Genotypisierung	34
6.5.6 Monocyte-chemoattractant- Protein-1 (MCP-1) 2518 A→G Genotypisierung	35
6.5.7 Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR) 677C→T Genotypisierung	36
6.6 Chemikalien, Reagenzien, Materialien und Geräte	37
6.7 Referenz- bzw. Risikobereiche und Methoden	39

6.8	Statistische Methoden	40
6.8.1	Box-and -Whisker-Plots	40
6.8.2	Odds Ratio	40
6.8.3	Nichtparametrische Testverfahren	41
6.8.3.1	Chi-Quadrat-Test	41
6.8.3.2	Mann-Whitney-Test	41
6.8.3.3	Kruskal-Wallis-Test	41
7.	Ergebnisse	42
7.1	Charakterisierung der Studienteilnehmer	42
7.2	Verschiedene Genotypverteilung in den untersuchten Studiengruppen	46
7.3	Ausmaß der KHK und Gen- Polymorphismen	57
7.4	Einfluss des Genotyps auf ausgewählte Laborparameter	65
7.5	Vergleich laborchemischer Parameter der Patientengruppe mit Ein - Dreigefäßerkrankung und der Kontrollgruppe	80
8.	Diskussion	82
9.	Literaturverzeichnis	96
10.	Danksagung	111
11.	Lebenslauf	112

1. Zusammenfassung

Die Koronare Herzerkrankung stellt eine komplexe Erkrankung mit zunehmender Prävalenz dar. Dabei spielen genetische Faktoren einen nicht unerheblichen Einfluß. Daher ist zur Erstellung von Präventionskonzepten und therapeutischer Strategien die Miteinbeziehung genetischer Aspekte unentbehrlich.

In der vorliegenden Arbeit werden insgesamt sieben verschiedene den Lipidstoffwechsel, das Entzündungssystem und den Homocystein-Metabolismus betreffende Genpolymorphismen identifiziert und untersucht, ob die entsprechenden Genpolymorphismen mit einem erhöhten Risiko der Koronaren Herzkrankheit einhergehen und damit als prädiktive Marker bei der Risikobewertung dienen können.

Hierbei handelt es sich um die Polymorphismen Paraoxonase Arg192Gln, Paraoxonase Met 55Leu, Apolipoprotein-A-V 1131T→C, Apolipoprotein Kringle IV Met75Thr, Intercellular Adhesion Molecule-1 469C→T, Monocyte-chemoattractant-Protein-1 2518A→G und Methylentetrahydrofolatreduktase 677C→T. Weiterhin wird untersucht, inwieweit laborchemische Parameter wie Cholesterin, High Density Lipoprotein, Low Density Lipoprotein, Triglyceride, Lipoprotein(a), C-reaktives Protein, Homocystein, Folsäure und Vitamin B12 dadurch beeinflußt werden.

In diesem Rahmen werden Nüchtern - Blutproben von 200 Patienten kaukasischer Herkunft mit koronarer Herzerkrankung unterschiedlichen Schweregrades verwendet, welche im Rahmen durchgeföhrter Koronarangiographien in der Medizinischen Klinik III des Universitätsklinikums Homburg gewonnen wurden. Die Kontrollgruppe besteht aus 89 herzgesunden altersgematchten Mitarbeitern des Universitätsklinikums Homburg. Die Bestimmung der Genotypen erfolgt mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion und anschließendem Restriktionsenzymverdau sowie im Falle des Apolipoprotein Kringle IV Met75Thr - Polymorphismus zusätzlich mit Hilfe der Single Stranded Conformational Polymorphism - Analyse.

Die Auswertung der Ergebnisse vorliegender Studie zeigt, dass der Monocyte-chemoattractant-Protein-1 2518A→G - Polymorphismus mit einer erhöhten Inzidenz an Koronarer Herzerkrankung einhergeht; Träger des G-Allels findet man insbesondere bei den Patienten mit KHK-Stadium 1-3, gefolgt von den Patienten mit beginnender Koronarer Herzerkrankung und unauffälliger Koronarangiographie. Der p-Wert beträgt 0.029. Ein Einfluß des Monocyte-chemoattractant-Protein-1 2518A→G - Polymorphismus auf laborchemische Parameter, insbesondere wie die des Lipoprotein(a) zeigt sich jedoch nicht. Alle weiteren untersuchten Genpolymorphismen gehen weder mit einer erhöhten Inzidenz an Koronarer Herzerkrankung einher noch beeinflussen sie den Schweregrad der Koronaren Herzerkrankung. Ebensowenig besteht eine Korrelation dieser Polymorphismen zu den verschiedenen Laborparametern. Der p-Wert beträgt stets > 0.05.

Die verschiedenen Referenz-Studien, auf die man sich bei der Auswahl der untersuchten Gen-Polymorphismen vorliegender Arbeit bezieht, konnten für die einzelnen Polymorphismen einen signifikanten Zusammenhang zur Koronaren Herzkrankheit aufzeigen. In der vorliegenden Arbeit konnte dieser Sachverhalt jedoch nicht bestätigt werden. Ein nicht unwesentlicher Grund hierbei ist die Tatsache, dass es sich bei den Referenz-Studien hauptsächlich um Studien mit nur geringer Fallzahl handelt und bei derartig geringer Fallzahl die Reproduzierbarkeit nur bedingt möglich ist.

Summary

Gene polymorphisms as predictive markers for susceptibility to coronary artery disease

Coronary artery disease represents a complex disease with increasing prevalence. In this context genetic plays an important role. Thus genetic aspects have to be taken into account when preparing preventive measures and therapeutic strategies.

In the current work seven different polymorphisms concerning the lipidmetabolism, inflammatory system and the homocysteine metabolism are tested for correlation to a higher susceptibility to coronary artery disease. It concerns the following polymorphisms Paraoxonase Arg192Gln, Paraoxonase Met55Leu, Apolipoprotein-A-V 1131T→C, Apolipoprotein Kringle IV Met75Thr, Intercellular Adhesion Molecule-1 469C→T, Monocyte-chemoattractant-Protein-1 2518A→G and Methylentetrahydrofolatreduktase 677C→T. Furthermore a possible influence of the polymorphisms on different laboratory parameters such as cholesterol, high density lipoprotein, low density lipoprotein, triglyceride, lipoprotein (a), c-reaktive protein, homocysteine, folic acid and vitamin B12 were taken into account.

Within this scope blood samples of 200 patients of caucasian descent with coronary artery disease were used which were attained from former coronary angiographies carried out at the Medizinischen Klinik III of the university of homburg. The control group consists of 89 matched healthy staff members of the university of homburg. The identification of the genotypes was carried out using the polymerase chain reaction. In case of the Apolipoprotein-A-V 1131T→C-polymorphism the single stranded conformational polymorphism analyse was used additional to the polymerase chain reaction. The evaluation of the results of the current work reveals that the Monocyte-chemoattractant- Protein-1 2518 A→G - polymorphism is associated with a higher incidence of coronary artery disease ($p = 0.029$). Thus most of the carrier of the G-allele were found in the group of the patients with coronary artery disease in stage 1-3, followed by patients with beginning coronary artery disease and finally followed by patients without pathological findings in the coronary angiography. However the Monocyte-chemoattractant- Protein-1 2518 A→G - polymorphism does not influence laboratory parameter and especially is not associated with elevated Lipoprotein(a) levels. All further examined polymorphisms are neither associated with increased incidence of coronary artery disease nor do they influence severity code of coronary artery disease. They also do not correlate with any laboratory parameter ($p>0.05$). There is no consent when comparing the results of the current work with the results of the reference literature. Those reference-studies consist of a limited number of participants and due to this fact reproducibility is just possible to a limited extent.

2. Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
apoA-I	Apolipoprotein A-I
APOA-V 1131T→C	Apolipoprotein A-V T→C
B12	Vitamin B12
BMI	Body Mass Index
CAM	Cellular Adhesion Molecules
CBS	Cystathionin-B-Synthase
CRP	C-reaktives Protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
GP Ia/IIa	Glykoproteinrezeptor Ia/ IIa- Antagonisten
GPIIb/IIIa	Glykoproteinrezeptor IIb/ IIIa- Antagonisten
HPA-1	Human Platelet Antigen-1
HPA-3	Human Platelet Antigen-3
Hcyst	Homocystein
HDL	High Density Lipoprotein
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IL	Interleukine
KHK	Koronare Herzkrankheit
LBS	Lysin-bindende Einheiten
LDL	Low Density Lipoprotein
Lp (a)	Lipoprotein (a)
MCP-1	Monocyte-chemoattractant- Protein-1
MONICA	Multinational MONItoring of trends and determinants in CArdiovascular disease
MTHFR 677C→T	Methylentetrahydrofolatreduktase 677C→T
MHCI	Major Histocompatibility Complex I
MHCII	Major Histocompatibility Complex II
NTP-Mix	Nucleotid-Tri-Phoshat
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaktion
PON-1	Paraoxonase-1
PON-2	Paraoxonase-2
PON-3	Paraoxonase-3
PONA Arg192Gln	Paraoxonase Arg192Gln

PONA Met55Leu	Paraoxonase Met55Leu
RANTES	regulated upon activation, normal T-expressed and secreted
SAM	S-Adenosylmethionin
SSCP	Single Stranded Conformational Polymorphism
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TNF-alpha	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha

3. Einleitung

Weltweit stellt die Koronare Herzerkrankung (KHK) weiterhin die häufigste Todesursache dar (FARRALL et al, 2006).

Die Erkennung und Behandlung der Risikofaktoren für die Entstehung der KHK hat demnach hohe Priorität. Die Ätiologie der Koronaren Herzkrankheit ist multifaktoriell und sehr heterogen (FARRALL et al, 2006, KIM et al, 1998).

Im Rahmen der Framingham-Studie (1966), die wesentlich zum Verständnis der Genese der Koronaren Herzerkrankung beigetragen hat, wurden erstmals Risikofaktoren für die Entstehung der KHK definiert. Hierzu - auch als konventionelle Risikofaktoren bezeichnet - zählen arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, Nikotinabusus und Diabetes mellitus (GRUNDY et al, 1998, DAWBER D, The Framingham study, 1966). Einige dieser Risikofaktoren werden auch durch den individuellen Lebensstil beeinflusst wie z. B. Nikotinabusus oder die alimentär bedingten Hypercholesterinämien. Konventionelle Risikofaktoren sind allerdings lediglich in ungefähr 50% der Fälle ursächlich für die Inzidenz der Atherosklerose (AUER et al, 2004, WILSON et al, 1998).

In neueren Studien konnte zudem gezeigt werden, dass inflammatorische Prozesse einen erheblichen Einfluß auf die Pathogenese der KHK haben (LIBBY et al, 2002, SPRINGER et al, 1996, BERK et al, 1990). Dabei nimmt die Inflammation in allen Stadien der Atherogenese eine zentrale Stellung ein (SHISHEHBOR et al, 2004).

Daneben spielen genetische Faktoren als unbeeinflussbare Faktoren eine wesentliche Rolle (LUSIS et al, 2004, ZDRAVKOVICZ et al, 2002). Die Koronare Herzerkrankung folgt dabei einem komplexen Erbgang (NOVELLI et al, 2003). Genetisch komplexe Krankheiten sind dadurch definiert, dass sie trotz vermehrten Auftretens innerhalb einer Familie keinem eindeutigen Erbgang zuzuordnen sind. Innerhalb der Allgemeinbevölkerung können seltene Mutationen größere Auswirkungen bezüglich der Entwicklung z.B. einer Hypercholesterinämie und KHK bei den einzelnen Individuen haben, während wiederum häufige Polymorphismen mit initial nur geringem Effekt für das einzelne Individuum aufgrund ihrer Häufigkeit jedoch wesentliche Auswirkungen innerhalb der Gesamtpopulation haben können (KIM et al, 1998).

Inzwischen gibt es umfangreiche Kenntnisse über die Koronare Herzerkrankung und die ihr zugrunde liegende Pathogenese der Atherosklerose; in Deutschland hat die Koronare Herzerkrankheit mit rund 300000 tödlichen und nichttödlichen Fällen im Jahr weiterhin epidemischen Charakter (KEIL et al, MONICA-Project, 2005). Diese hohe Morbiditäts- und Mortalitätsrate der Atherosklerose und die damit assoziierten sozioökonomischen Folgen erfordern die Identifizierung von Risikopatienten, wobei die Erkennung von Kandidatengenen eine große Bedeutung besitzt. Eine derartige Kenntnis könnte einen wesentlichen Beitrag zur Prävention und einer neuen therapeutischen Strategie der KHK leisten.

3.1 Koronare Herzkrankung

3.1.1 Definition/ klinisches Bild

„Die koronare Herzkrankung ist die Manifestation der Atherosklerose an den Herzkranzgefäßen, die entweder diffus oder isoliert befallen sein können. Die dadurch entstandene Verengung der Koronarien führt zu einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und –bedarf im Herzmuskel. Schweregrad und Dauer der hierdurch hervorgerufenen Ischämie bestimmen die Manifestation in Form von stabiler oder instabiler Angina pectoris, stummer Myokardischämie, ischämisch bedingter Herzinsuffizienz, Herzrhythmusstörungen und akutem Myokardinfarkt“ (Leitlinie Koronare Herzkrankheit, Deutsche Gesellschaft für Kardiologie).

3.1.2 Epidemiologie

In den westlichen Industrieländern stellt die Koronare Herzkrankung immer noch die häufigste Todesursache dar (RUMBERGER et al, 1999). In den von der American Heart Association- Heart and Stroke Statistics- gemachten Angaben seien im Jahr 2001 515204 Menschen an den Folgen kardiovaskulärer Erkrankungen in den USA verstorben (MILAN et al, 2005).

Bis zur Menopause sind Frauen von einer KHK weniger betroffen, im höheren Alter gleichen sich die Zahlen denen der Männer an (CLEARFIELD, 2004).

In Deutschland hat die koronare Herzkrankheit rund 300000 tödliche und nichttödliche Fälle im Jahr zur Folge (MONICA-Projekt, monitoring trends and determinants in cardiovascular disease von den frühen 80er bis zu den 90er). Hier konnte gezeigt werden, dass bezüglich der Morbidität als auch der Mortalität wesentliche regionale Unterschiede bestehen (TUNSTALL-PEDOE et al, 1994). In den westlichen Ländern nahm die KHK-Mortalität durch Verbesserung der Therapien und Reduktion der Risikofaktoren ab, während in Osteuropa eine Zunahme der Mortalität zu verzeichnen war.

Die altersspezifische Mortalität nimmt ebenfalls ab, jedoch wird durch den zunehmenden Anteil älterer Menschen an der Gesamtbevölkerung die Anzahl der Personen mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen absolut gesehen ansteigen (RIEDER et al, 2001).

3.1.3 Ätiologie

Die Entstehung der Atherosklerose wird durch eine Reihe von Risikofaktoren begünstigt. Hierbei ist eine Einteilung in konventionelle und neuere Risikofaktoren möglich. Im Rahmen der Framingham-Studie Anfang der 70er Jahre (Dawber et al, 1963, Grundy et al, 1998, Lloyd-Jones et al, 2004) wurde das 10-Jahres-Risiko einer Koronaren Herzkrankheit ermittelt und folgende konventionelle Risikofaktoren erkannt:

Konventionelle Risikofaktoren

- Zigarettenrauchen
- Arterielle Hypertonie
- LDL-Cholesterin-Erhöhung
- HDL-Cholesterin-Erniedrigung
- Diabetes mellitus
- Alter
- Adipositas

Andere/ neuere Risikofaktoren (Grundy et al, 1998)

- Körperliche Inaktivität
- Lipidstoffwechselstörungen
- Entzündungszustände bei KHK-Patienten
- erstgradige Familienangehörige mit KHK oder Herzinfarkt
- Thromboseneigung
- Hyperhomocysteinämie
- Infektionen
- Lp (a) - Erhöhung

3.1.4 Pathogenese der Atherosklerose

Die KHK ist eine entzündlich-fibroproliferative Reaktion auf eine initiale Endothelschädigung (ROSS et al, 1999) gefolgt von reparativen Mechanismen.

Sowohl metabolische (Diabetes mellitus, Fettstoffwechselstörungen, Hyperhomocysteinämie) als auch mechanische (Hypertonie) sowie genetische Faktoren und schließlich Infektionen durch Mikroorganismen wie Herpesviren oder Chlamydien (LIBBY et al, 1997, JACKSON et al, 1997) können eine endotheliale Dysfunktion verursachen (ROSS et al, 1993, 1976, 1973).

Ungeachtet der auslösenden Ursache stellt die Atherosklerose eine charakteristische Antwort bestimmter arterieller Gefäße dar (ROSS et al, 1981). Die Endothelläsion führt zur Endotheldysfunktion, die wiederum durch Kompensationsmechanismen zu einer Alteration der normalen hämostasiologischen Eigenschaften des Endothels führt.

Die Folge ist eine erhöhte Haftfähigkeit für Leukozyten oder Thrombozyten und eine vermehrte Durchlässigkeit des Endothels für Lipoproteine und andere zirkulierende Stoffe im Plasma. Die verschiedenartigen oben genannten Einflüsse führen außerdem zur Entwicklung prokoagulatorischer Eigenschaften und induzieren die Bildung vasoaktiver Moleküle, Zytokine und Wachstumsfaktoren. Wird der die Inflammation verursachende Faktor nicht behoben, dauern diese Vorgänge an und Migration und Proliferation glatter Muskelzellen werden angeregt.

Im späteren Stadium dieser Vorgänge kommt es zu einer Verdickung der Gefäßwand. Der gesamte Prozeß der „Atherogenese“ wird von Monozyten/ Makrophagen und spezifischen Untergruppen der T-Lymphozyten unterhalten (ROSS et al 1999, STARY et al 1996, VAN DER WAL 1989, GLAGOV et al 1987, JONASSON et al 1986).

Die anhaltende Inflammation führt zu einer Migration von Makrophagen und Lymphozyten aus dem Blut zur Läsion, in der sich diese Zellen vermehren und hydrolytische Enzyme, Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren freisetzen (LIBBY et al, 1996).

In der Folge werden Endothelzellen aktiviert und exprimieren vermehrt Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche. Bestimmte Adhäsionsmoleküle, vor allem Selektine, vermitteln zunächst den temporären Kontakt bestimmter Blutzellen wie Monozyten und T-Lymphozyten mit dem Endothel.

Durch eine weitere Gruppe von Adhäsionsmolekülen, Cellular Adhesion Molecules (CAMs), kommt es zur festen Anheftung dieser Zellen an die Gefäßwand (LIBBY et al, 2002).

Eine wichtige Rolle spielt hier durch Oxidation, Glykolisierung oder im Rahmen eines immunogenen Geschehens modifiziertes LDL (ROSS et al, 1999, STEINBERG et al, 1997, NAVAB et al, 1996).

Haften sich erst LDL-Partikel an die Gefäßwand an und gelangen passiv in den subendothelialen Raum, werden sie nach erfolgter Oxidation von Makrophagen aufgenommen. Die dadurch entstandenen Schaumzellen setzen vermehrt proinflammatorische Zytokine und Chemokine wie Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF-alpha), Interleukine (IL), Wachstumsfaktoren und andere Mediatoren frei, wodurch glatte Muskelzellen in der Gefäßwand aktiviert werden. Diese wandern aus der Media in die entstehende intime Läsion und teilen sich dort weiter (LIBBY et al, 2002).

Zyklen der Akkumulation mononuklearer Zellen, Migration und Proliferation glatter Muskelzellen und Bildung fibröser Plaques sowie Apoptose von Zellen und weitere Lipidaufnahme führen zur Bildung eines nekrotischen Kerns in der Läsion.

Kann das Gefäß diesen Vorgang durch weitere Dilatation nicht weiter kompensieren, so entstehen Läsionen, die das Gefäßlumen einengen und so den Blutfluß behindern können (ROSS et al, 1999).

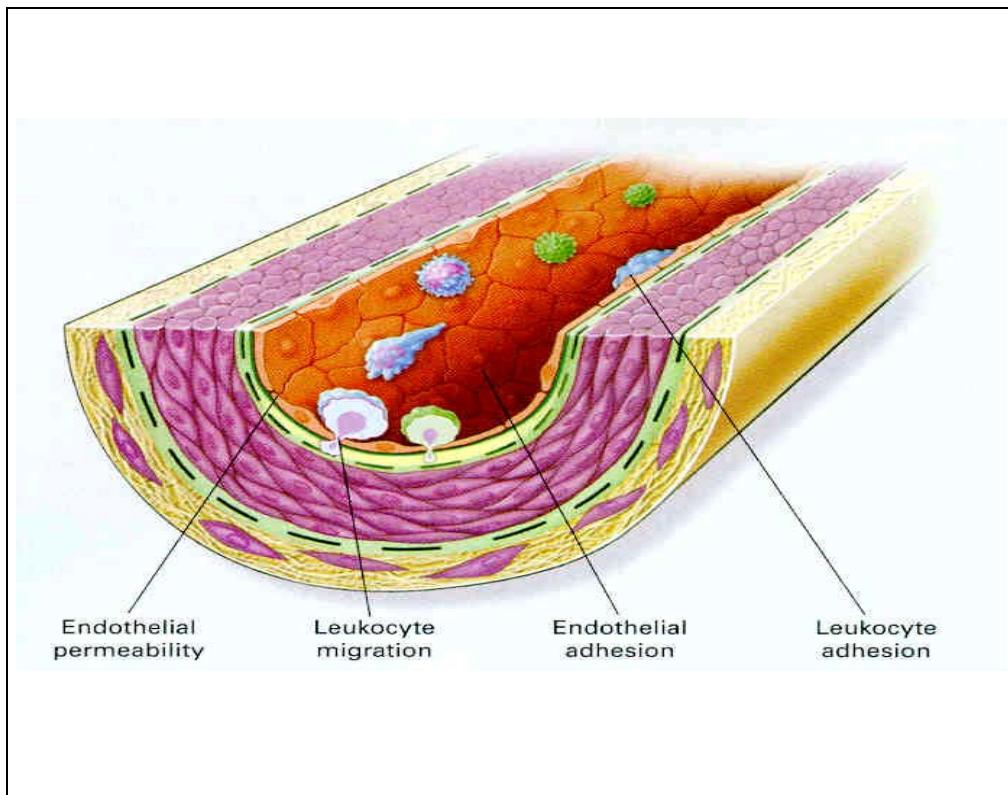


Abbildung 1: Endotheliale Dysfunktion als Vorstufe der Atherosklerose
Aus Ross: N Engl J Med, Volume 340(2).January 14, 1999.115-126

4. Gen- Polymorphismen

Am Prozess der Atherogenese sind komplexe Mechanismen der Zelladhäsion, Hämostase, Inflammation, Gerinnung und des Fettstoffwechsels beteiligt.

In jüngster Zeit wurde daher im Rahmen diverser Studien zur Identifizierung neuer Risikomarker kardiovaskulärer Erkrankungen das Augenmerk auf verschiedene Genpolymorphismen gerichtet. Hierzu zählen unter anderem:

- Homocystein-Metabolismus:
Cystathionin- β -Synthase, Methylentetrahydrofolatreduktase (WANG, 1999)
- Parameter der Inflammation:
MCP-1 (SZALAI, 2001), ICAM-1 (JIANG, 2002), TNF- α (KOCH, 2001),
Interleukin 1, (VOHNOUT, 2003), Interleukin 6 (LATKOVSKIS, 2004),
Interleukin 10 (KOCH, 2001)
- Endotheliale Parameter:
E-Selectin (AUER, 2003), endotheliale NO-Synthase (RIOS, 2005)
- Thrombozytäre Rezeptoren:
GP Ia/IIa (LEWANDOWSKI, 2005),
GPIIb/IIIa (WEISS, 1996), HPA-1, HPA-3 (BOTTIGER, 2000)
- Gerinnungsfaktoren:
Fibrinogen, Faktor II, Faktor V, Faktor VII (FENG, 1999)
- Parameter aus dem Renin-Angiotensin-Aldosteronsystem:
ACE, Angiotensinogen, Angiotensin II Rezeptor Typ 1 (BURACZYNNSKA, 2003)
- Lipidstoffwechsel:
Paraoxonase (DURRINGTON, 2004) ,
LDL- Rezeptor (POCATHIKORN, 2003)
Apolipoproteine A, B, CIII, E, Hepatische Lipase, Lipoproteinlipase (BARONI, 2003)

Im Rahmen der vorliegenden Studie hat man sich auf die unten aufgeführten Genpolymorphismen, die den Lipidstoffwechsel, das Entzündungssystem und den Homocystein-Metabolismus betreffen, fokussiert:

- Paraoxonase (PONA) Arg192Gln, Paraoxonase (PONA) Met55Leu
- Apolipoprotein-A -V (APOA-V) 1131T→C
- Apolipoprotein Kringle IV Met75Thr
- Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) 469C→T
- Monocyte-chemoattractant- Protein-1 (MCP-1) 2518A→G
- Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR) 677C→T

4.1 Paraoxonase (PONA) Arg192Gln/ Paraoxonase (PONA) Met55Leu

Bekannt wurde die Paraoxonase erstmals im Zusammenhang mit dem in Insektiziden und Nervengasen vorkommenden Parathion. Dieses Organophosphat wirkt durch irreversible Bindung an Synapsen und neuromuskulären Junctions stark neurotoxisch.

Paraoxonase, daher röhrt auch der Name dieses aus 354 Aminosäuren bestehenden Proteins mit einem Molekulargewicht von 43kDa, bewirkt durch die Hydrolyseierung des Parathionmetaboliten Paraoxon die Entgiftung dieser toxischen Substanzen (DURRINGTON et al, 2002).

Paraoxonase, kurz PONA, ist zusammen mit anderen Genen der Super-Gen-Familie auf dem langen Arm von Chromosom 7 lokalisiert. Die Nähe von PON1 zum Gen, das für eine der Pyruvatdehydrogenasen kodiert, mag die Tatsache erklären, dass PONA-Genotypen in einigen Studien diabetischer Fragestellungen untersucht wurden und klinische Relevanz zeigten.

PON-1 kommt nur bei Säugetieren vor und wird dort in der Leber gebildet. Das Produkt von PON-2 ist bisher noch unklar; PON-3 konnte neuerdings auf dem Lipoprotein HDL des Hasen nachgewiesen werden.

Im Serum ist PON-1 ausnahmslos auf dem Lipoprotein HDL lokalisiert.

Während die neuroprotektive Funktion von PON-1 schon relativ lange bekannt ist, ist der antiatherogene Faktor durch die Hemmung der Lipidoxidation relativ neu (DURRINGTON et al, 2002, MACKNESS et al, 1995). Die Oxidation von LDL und dessen Aufnahme in die Arterienwand spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose.

HDL ist durch das Vorhandensein von PON- 1 befähigt, eine Lipidperoxidation von LDL durch eine enzymatische Phospholipid-Hydrolyse zu verhindern und wirkt daher antiatherogen. Bis dahin erklärte man sich die antiatherogene Wirkung allein durch den Abtransport von Cholsterin von den Gefäßen bzw. der Peripherie.

Man vermutet, dass PON-1 zwei aktive Zentren besitzt. Während die Cysteingruppe an Position 283 unentbehrlich für die antioxidative Funktion und somit für die LDL-Oxidations-Protektion zu sein scheint, läuft die hydrolytische Funktion von Organophosphaten ohne diese Cysteingruppe ab (AVIRAM et al, 1998). Hingegen benötigt die hydrolytische Funktion unbedingt Calcium, während dessen die der antioxidativen unabhängig von Calcium ist.

Gesunde Bevölkerungsgruppen der verschiedenen Länder zeigen eine unterschiedliche Serumaktivität von PON-1, die zum einen mit dem Vorliegen verschiedener Genotypen korreliert, dann aber in anderen Studien keine Abhängigkeit zum bestehenden Genotyp zeigt (MACKNESS MI et al, 1996).

Eine wohl noch nicht ausreichend untersuchte, aber mögliche Erklärung hierfür könnten die unterschiedlichen Ernährungsgewohnheiten liefern.

SUTHERLAND et al, 1999 stellten einen Zusammenhang zwischen Art des Speiseöls und dem Serumspiegel von PON-1 her. Je mehr gesättigte Fettsäuren das Speiseöl enthält, desto niedriger der Serumspiegel von PON-1. Alkoholkonsum vermag den Serumspiegel von PON-1 zu erhöhen (VAN DER GAAG MS, 1999).

Es existieren diverse Polymorphismen im PON-1 Gen (DURRINGTON 2001). Die zwei meist untersuchten sind PONA 192 und PONA 55

PONA Arg192Gln / PONA Met55Leu - Polymorphismus

Bei dem PON-1 Polymorphismus 192 besteht ein Austausch der Aminosäure Arginin gegen Glutamin an Position 192. Bei der Mutation PON 55 liegt ein Austausch der Aminosäure Methionin gegen Leucin an Position 55 vor.

Es herrscht noch große Uneinigkeit darüber, ob diese beiden Polymorphismen die Aktivität der Paraoxonase und damit entscheidend das Auftreten einer KHK-Erkrankung beeinflussen oder nicht.

In diversen Studien wurde dies untersucht. Die Ergebnisse sind allerdings sehr kontrovers und heterogen. In einigen Untersuchungen konnte man keinen Zusammenhang zwischen dem Genotyp und einer erhöhten Inzidenz der KHK feststellen.

Vielmehr sollen die unterschiedlichen PON-1 Konzentrationen der einzelnen Untersuchungsgruppen eine Rolle spielen (MACKNESS et al, 2001).

Dann wiederum stellte das Vorliegen der PON 192 Q/Q (Glutamin/ Glutamin) Mutation den größten Oxidationsschutz von LDL dar und damit eine niedrigere Inzidenz der Atherosklerose. Der Variante PONA 55 MM schreibt man die größte antioxidative Wirkung zu (AVIRAM et al 1998, MACKNESS B et al, 1998, MACKNESS MI et al, 1997). Dies konnte jedoch in anderen Untersuchungen nicht immer bestätigt werden.

Für die Hydrolyse von Paraoxon allerdings konnte in anderen Studien gezeigt werden, dass das Vorliegen von PON 192 RR (Arginin/ Arginin) die größte hydrolytische Aktivität besitzt, während PON 192 Glutamin/ Glutamin eine relativ geringe hydrolytische Aktivität aufweist (MACKNESS B et al, 1997, DAVIES et al, 1996, ADKINS et al, 1993)

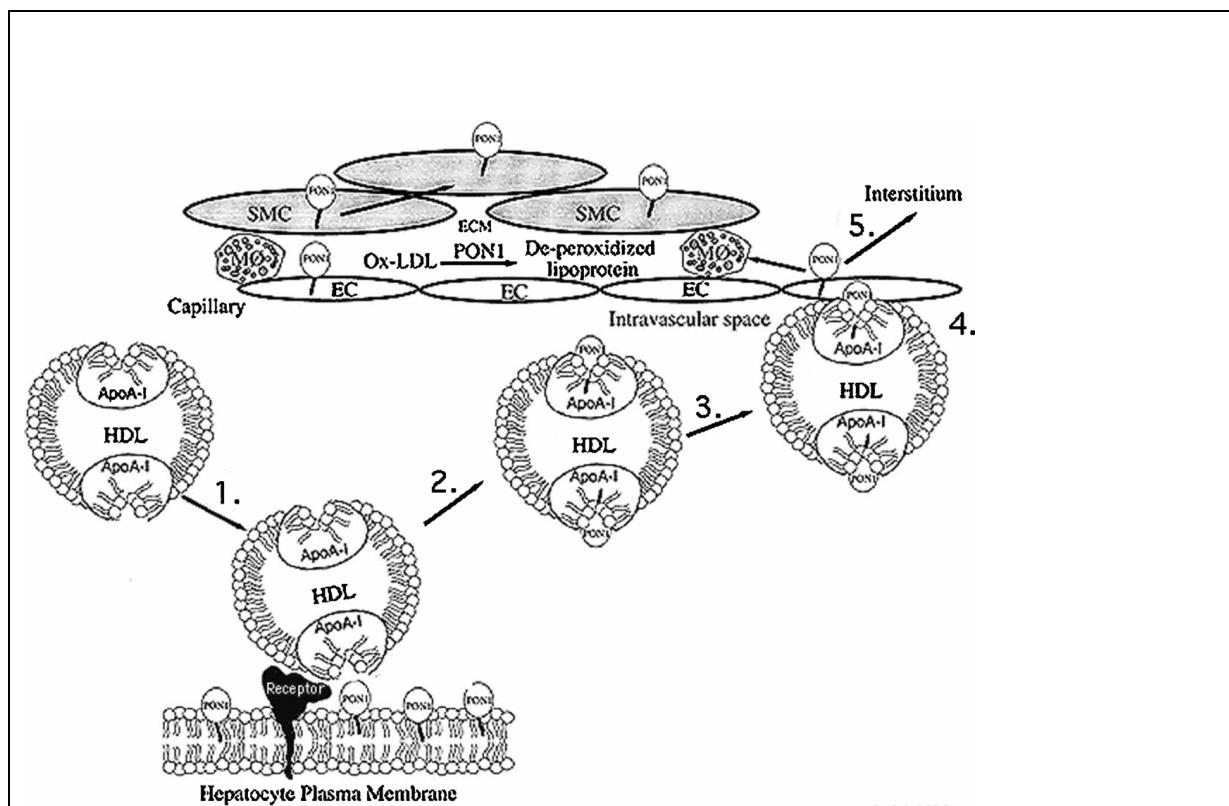


Abbildung 2: Pon1 Sekretion, Zusammenhang zwischen HDL und Lipidperoxidation, EC, endothelial cell; SMC, smooth muscle cell; MF, macrophage; ECM, extracellular matrix; Ox-LDL, oxidised LDL aus Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol. 19 (9), 2214–2225,

(1) HDL ist transient über einen Rezeptor an der Zelloberfläche gebunden. (2) PON1-über den N-terminalen Teil mit der Zellmembran verankert- wird von HDL aufgenommen. Diese Konstellation wird durch ApoAI stabilisiert. (3) Zusammen mit HDL tritt PON1 in den intravaskulären Raum ein. (4)/(5) PON1 vermag – höchstwahrscheinlich rezeptorvermittelt - durch Rekrutierung von Cholesterin aus dem Endothel oder der glatten Muskelzelle Phospholipide abzutransportieren. Im Interstitium oder in Bereichen vermehrter LDL – Accumulation und oxidativ bedingter Zellschäden vermag es so protektiv zu wirken. Das verbliebende hydrophobe N-terminale Signalpeptid ist als dicke schwarze Linie dargestellt.

4.2 Apolipoprotein- A- V (APO-A-V) 1131T→C

Bei den Apolipoproteinen handelt es sich um den Proteinanteil der Lipoproteine. Durch ihre amphipathische Struktur können Apolipoproteine sowohl mit dem Lipidanteil der Lipoproteine als auch mit ihrer hydrophilen Umgebung interagieren. Daher spielen Apolipoproteine eine zentrale Rolle bei der Determinierung und Stabilisierung der Struktur von Lipoproteinen (WEINBERG et al, 2003).

Apolipoproteine können in nichtaustauschbare (ApoB) und austauschbare Apolipoproteine (Apo A, Apo C und Apo E) unterteilt werden (SEGREST et al, 2001). Bis auf Apolipoprotein B können sich also die Apolipoproteine zwischen den unterschiedlichen Lipoproteinpartikeln hin- und herbewegen.

Ein weiteres, relativ neues Mitglied der Plasma-Apolipoprotein-Familie ist das ApoA-V. Während alle anderen Apolipoproteine im Plasma identifiziert wurden, hat man das ApoA-V im Rahmen vergleichender Studien des menschlichen und murinen Genoms entdeckt.

Das Gen ist auf Chromosom 11 unweit des A-I/CIII/ A-IV Gene-Clusters lokalisiert (PENNACCHIO et al, 2002).

ApoA-V beeinflusst in hohem Maße den Plasma-Triglycerid-Spiegel.

Eine Inaktivierung des ApoA-V Gens führt zu einem bis zu 4fach erhöhten Triglycerid-Spiegel (PENNACCHIO et al, 2002, VAN DER VLIET et al, 2002).

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass ein Thymin zu Cytosin (T→C) Polymorphismus im APOA-V-Gen eine Erhöhung des Triglyceridspiegels bewirkt und daher dieser Polymorphismus einen potentiellen kardiovaskulären Risikofaktor darstellt (KATHY et al, 2005, BECKSTEAD et al, 2003).

4.3 Apolipoprotein Kringle IV Met75Thr

Lipoprotein a (Lp (a)) gehört zu den Lipoproteinen und stellt per se einen unabhängigen Risikofaktor für die Entstehung der Arteriosklerose dar (KOSTNER et al, 1981).

Die Proteinkomponente besteht aus Apolipoprotein (Apo)B100 und ist über eine Disulfidbrücke mit Apolipoprotein (Apo a), einem extrem polymorphen Glykoprotein verbunden. Apo (a) besteht unter anderem aus 11 bis 40 Kringel-IV-Einheiten, die homolog zum Kringel-IV des Plasminogens sind (SIMO et al, 2001, SCANU et al, 1995).

Kringles sind Sequenzen bestehend aus 80-90 Aminosäuren, die dreidimensional angeordnet sind und durch drei Disulfidbrücken stabilisiert werden.

Apo (a) beinhaltet mehrere Kopien des plasminogenähnlichen Krings, die zwar ähnlich, nicht jedoch identisch sind. Man unterscheidet 10 verschiedene Krings.

Lp (a) besitzt, ähnlich wie Plasminogen, „Lysin-bindende Einheiten“ (LBS), die die Interaktion mit anderen Zellen, der extrazellulären Matrix und mit Fibrin vermitteln (MILES et al, 1995). Dabei stellt Kringle Nr.10 des Lp (a) den Hauptanteil der Lysin-bindenden Einheit und damit eine Schlüsselfunktion in der Aktivität des Apo (a) dar (SIMO et al, 2001, BOONMARK et al, 1997, HOOVER-PIOW et al, 1996).

Es sind mehrere Mutationen im Kringle IV (10) bekannt, die alle mit einer verminderten LBS-Aktivität einhergehen (SCANU et al, 1994).

Eine weitere Mutation, die allerdings nicht mit der Verminderung in der LBS-Aktivität, wohl aber mit einer Erhöhung des Lp(a)-Spiegels im Plasma einhergeht, ist der Ersatz der Aminosäure Methionin durch Threonin an Position 75 im Kringle IV von Apo (a) (SYRRIS et al, 1997, KRAFT et al, 1995). Dieser Polymorphismus befindet sich ausserhalb des LBS-Bereichs von Apo (a). Der Met75Thr - Polymorphismus im Kringle IV geht mit einer erhöhten Inzidenz der KHK einher (SIMO et al, 2001).

SYRRIS et al, 1997, konnte jedoch keinen Zusammenhang zwischen dem Met75Thr-Polymorphismus und einer erhöhten Inzidenz der KHK oder der Beeinflussung des Lp (a)-Spiegels feststellen.

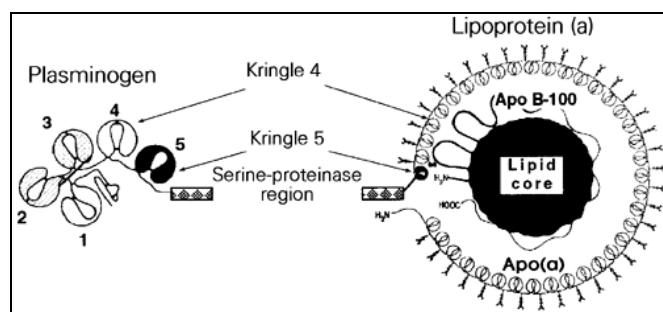


Abbildung 3: Strukturelle Homologien zwischen Apolipoprotein (a) und Plasminogen aus: Brazilian Journal of Medical and Biological Research

4.4 Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) 469C→T

ICAM gehört zu den Adhäsionsmolekülen. Adhäsionsmoleküle sind Rezeptoren, die sich auf der Oberfläche verschiedener Zelltypen wie Monozyten, Granulozyten, Thrombozyten und Endothelzellen befinden und von diesen durch die Einwirkung proinflammatorischer Zytokine gebildet werden (DE CATERINA R et al, 1994).

Adhäsionsmoleküle können in die vier Hauptgruppen Integrine, Selektine, Cadherine und die Familie der Immunglobuline unterteilt werden.

ICAM-1 ist ein transmembranöses Glycoprotein, welches zu der Familie der Immunglobulin Superfamilie zählt. Es besteht aus fünf unterschiedlichen antikörperähnlichen Domänen mit je einem transmembranösen, hydrophoben und einem kurzen cytoplasmatischen Anteil (VAN DE STOLPE et al, 1996).

ICAM-1 wird von diversen Zelltypen wie Leukocyten und Endothelzellen exprimiert. Mehrere Zytokine können es auf bestimmte Weise induzieren; stimulierend wirken z.B. TNF- α , IL-1 und Interferon- γ , einen hemmenden Einfluß haben z.B. Glukokortikoide (VAN DE STOLPE et al, 1996).

ICAM-1 spielt eine wichtige Rolle bei Entzündungsvorgängen und bei T-Zell vermittelten Abwehrvorgängen (MHC I und MHC II). Am Endothel bewirkt ICAM-1 eine Migration aktiver Leukozyten zum Entzündungsherd (VAN DE STOLPE et al, 1996).

Mehrere Studien konnten belegen, dass ICAM-1 einen wichtigen Faktor in der Entstehung der KHK und insbesondere im Auftreten des Akuten Koronarsyndroms darstellt (ZOURIDAKIS et al, 2004, RIDKER et al, 1999).

Es konnte gezeigt werden, dass die Höhe der Serumkonzentration von ICAM-1 sehr gut korreliert mit der Entwicklung einer KHK oder eines Myokardinfarktes (BLANKENBERG et al, 2001, KAMIJIKKOKU et al, 1998).

Nach JIANG et al, 2002, war der Polymorphismus im ICAM-1-Gen, bei dem der Austausch der Base Cytosin zu Thymin zu einem Ersatz der Aminosäure Glutaminsäure zu Lysin im ICAM-1-Protein führt, mit einer erhöhten Inzidenz an KHK assoziiert.

4.5 Monocyte-chemoattractant- Protein-1 (MCP-1) 2518A→G

MCP-1 gehört zu den Zytokinen. Zytokine sind lösliche Proteine oder Glykoproteine, die die Interaktion und Kommunikation zwischen den verschiedenen Zellen durch die Bildung komplementärer Rezeptoren vermitteln (OPPENHEIM et al, 2001).

Sie sind an diversen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen wie Inflammation, Zellwachstum- und Differenzierung, Zelltod, Angiogenese und Hämostase beteiligt (OPPENHEIM et al, 2001).

Chemokine, eine Untergruppe der Zytokine, sind kleine heparinbindende Polypeptide. Chemokine locken Zellen zu Entzündungsherden chemotaktisch an und funktionieren über G-Protein-gekoppelte Signalkaskaden (Sheikine Y et al, 2004).

Sie werden von einer Vielzahl verschiedener Zellen gebildet (BAGGIOLINI et al, 1998). Benannt werden sie nach ihrer speziellen Funktion (z.B. MCP-1 = monocyte chemotactic protein 1) oder nach ihrer zellulären Quelle (z.B. RANTES = regulated upon activation, normal T-expressed and secreted). Bei den Chemokinen unterscheidet man je nach der zugrunde liegenden Aminosäurestruktur CC- und CXC-Chemokine (Murphy et al, 2002).

MCP-1 ist ein Mitglied der CC-Familie und ist ein potenter Agonist der Monocyten, T-Lymphozyten, Natürliche Killerzellen und Basophilen.

MCP-1 bindet und aktiviert den als CC-chemokine-rezeptor 2 bekannten Rezeptor, der aus sieben transmembranösen Domänen besteht (GOSLING et al, 1999, ROLLINS et al, 1997).

Man konnte anhand von Zellkulturen feststellen, dass eine vermehrte MCP-1-Synthese durch oxidiertes LDL besteht (CUSHING et al, 1990).

Zudem ließ sich eine erhöhte MCP-1 Expression in makrophagenreichen atherosklerotischen Plaques nachweisen (NELKEN et al, 1991).

Außerdem konnte in einer Studie von YU et al 1992 gezeigt werden, dass bei Primaten mit diätetisch induzierter Hypercholesterinämie vermehrt MCP-1 von glatten Muskelzellen exprimiert wird. Diese Tatsache ließ vermuten, dass MCP-1 eine bedeutende Rolle in der Initiation der Atherosklerose spielt (BORING et al, 1998). Allerdings sind zur Entstehung atherosklerotischer Plaques weitere Faktoren erforderlich. Lokale MCP-1 Überexprimierung im Endothel allein reiche hierfür nicht aus (NAMIKI et al, 2002).

SZALAI et al, 2001 konnten im Rahmen von Untersuchungen des Polymorphismus Adenin zu Guanin im MCP-1-Gen nachweisen, dass der Genotyp G/G mit einer erhöhten Inzidenz an KHK einhergeht.

4.6 Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR) 677C→T

Die schwefelhaltige Aminosäure Homocystein entsteht durch Abspaltung der Methylgruppe aus der essentiellen Aminosäure Methionin (GIRELLI et al, 1998, MUDD et al, 1995).

Homocystein kann durch Remethylierung in Methionin zurückverwandelt werden. Diese Reaktion wird durch das Vitamin-B12-abhängige Enzym Methioninsynthase katalysiert. Alternativ kann Homocystein durch Sulfidgruppenübertragung über Cystathionin irreversibel in Cystein und Glutathion umgewandelt werden. Für diesen Schritt der Transsulfurierung ist die Cystathionin-B-Synthase (CBS) erforderlich, die Pyridoxalphosphat (Vitamin B6) als Kofaktor braucht (STANGER et al, 2003). Methylentetrahydrofolatreductase (MTHFR) reduziert 5,10-Methylentetrahydrofolat zu 5-Methyltetrahydrofolat. 5-Methyltetrahydrofolat ist das Hauptfolsäurederivat im Plasma und wirkt als Methylgruppendonator für die Reaktion im Remethylierungszyklus (MAGER et al, 1999, FROSST et al, 1995). Störungen im Rahmen der Remethylierung oder der Transsulfurierung, die diätetisch als auch genetisch bedingt sein können, können mit einer Hyperhomocysteinämie einhergehen (GIRELLI et al, 1998).

Die Hyperhomocysteinämie stellt einen unabhängigen Risikofaktor für die Entstehung einer KHK und der Alzheimer-Erkrankung dar. Zudem führen erhöhte Homocysteinspiegel zu einer Beeinträchtigung kognitiver Fähigkeiten (HERRMANN et al, 2007, MEYER et al, 2004, REFSUM et al, 1998). Auch nach WELCH et al, 1998 und MC CULLY et al, 2005, stellt die Hyperhomocysteinämie einen von den klassischen Risiken für vaskuläre Erkrankungen wie Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus oder Zigarettenkonsum unabhängigen Risikofaktor dar. Die autosomal rezessiv vererbte Mutation 677 Cytosin zu Thymin in Exon 3 des MTHFR-Gens führt durch einen Aminosäureaustausch Alanin zu Valin zu einer thermolabilen Variante des Enzyms. Diese Mutation geht im homozygoten Zustand mit einer verminderten Enzymaktivität, einem erniedrigten Folsäure- und einem erhöhten Homocystein-Spiegel einher (MAGER et al, 1999, FROSST et al, 1995). Eine zweite, seltene Mutation 1298 Adenin zu Guanin (Glu429Ala) in Exon 7 ist in Kombination mit der 677 C→T-Mutation ebenfalls mit den genannten Veränderungen assoziiert (LIEVERS et al, 2001).

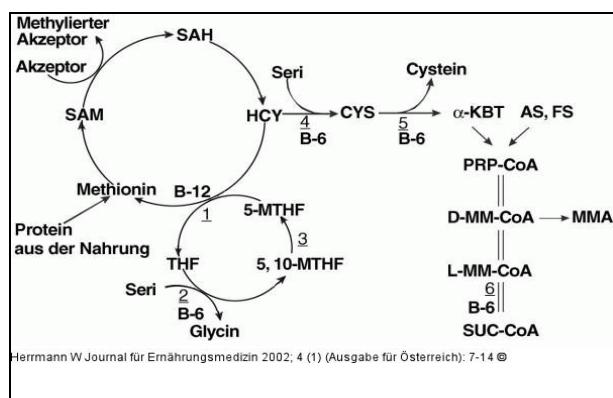


Abbildung 4: Homocystein – Metabolismus, Herrmann 2002

1 Methioninsynthase; 2 Serin-Hydroxymethyltransferase; 3 N5,N10-Methylentetrahydrofolatreduktase; 4 Cystathionin-β-Synthase; 5 Cystathionase; 6 L-Methylmalonyl-CoA-Mutase

5. Fragestellung

Die Koronare Herzkrankheit stellt trotz Kenntnis konventioneller Risikofaktoren und zunehmendem Verständnis der pathogenetischen Grundlagen immer noch eine große sozioökonomische und therapeutische Herausforderung dar. Die KHK steht daher weiterhin im Mittelpunkt zahlreicher diverser epidemiologischer und klinischer Studien.

Die Entstehung der KHK scheint im Wesentlichen von der Interaktion genetischer Faktoren mit Umwelteinflüssen und konventionellen Risikofaktoren abzuhängen.

Es ist allgemein bekannt, dass insbesondere jüngere Menschen eine KHK entwickeln bzw. einen Myokardinfarkt erleiden ohne dass bei ihnen klassische Risikofaktoren bestehen. Andererseits entwickeln Menschen mit bestehenden Risikofaktoren nicht immer eine KHK. Daher ergibt sich die Forderung nach der Klärung anderer zugrunde liegender Ursachen und der Möglichkeit einer Risikostratifizierung.

Die Referenzstudien, auf die man sich im Rahmen der vorliegenden Studie bezieht, haben für die Polymorphismen Paraoxonase (PONA) Arg192Gln, Paraoxonase (PONA) Met55Leu, Apolipoprotein- A -V (APOA-V) 1131T→C, Apolipoprotein Kringle IV Met75Thr, Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) 469C→T, Monocyte-chemoattractant-Protein-1 (MCP-1) 2518A→G und Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR) 677C→T einen signifikanten Zusammenhang zur Koronaren Herzkrankheit aufzeigen können.

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob und inwieweit Gen-Polymorphismen zur Vorhersage des Risikos für die Entstehung der Koronaren Herzkrankung (KHK) fungieren können. Hat der Genotyp in Zusammenschau mit dem Phänotyp prädiktiv prognostischen Wert?

6. Patienten und Methoden

6.1 Patienten

Für diese Studie wurden Blutproben von 200 Patienten kaukasischer Herkunft mit koronarer Herzerkrankung verwendet, welche im Rahmen durchgeföhrter Koronarangiographien im Zeitraum 07/1998 – 08/1998 in der Medizinischen Klinik III des Universitätsklinikums Homburg gewonnen wurden.

In Zusammenschau der Befunde der Katheteruntersuchung zeigte sich bei 67 Patienten eine koronare Herzerkrankung im Stadium 5 (= Dreigefäßerkrankung); bei 32 Patienten lag das KHK-Stadium 4 (= Zweigefäßerkrankung) und bei 33 Patienten das KHK-Stadium 3 (= Eingefäßerkrankung) vor.

Eine beginnende Koronare Herzerkrankung, also Stadium 2 ließ sich bei 25 dieser untersuchten Patienten nachweisen. In 36 Fällen ergab die Koronarangiographie unauffällige Befunde.

Zusätzlich wurden Informationen über begleitende Risikofaktoren wie essentielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Fettstoffwechselstörungen, Nikotinabusus, Alkoholabusus und Adipositas eruriert. Zudem wurden eine bestehende Herzinsuffizienz oder ein durchgemachter Herzinfarkt berücksichtigt.

Die untersuchten Patienten waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme zwischen 40 und 85 Jahre alt. Das mediane Alter im Gesamtkollektiv der Patienten beträgt 65 Jahren.

Als Kontrollgruppe dienen 89 gesunde altersgematchte Personen kaukasischer Herkunft, bei denen keine koronare Herzerkrankung bekannt war. Eine Koronarangiographie wurde bei diesen Personen nicht durchgeföhrt. Hierbei handelt es sich um Mitarbeiter des Universitätsklinikums Homburg.

Ausschlusskriterien für diese Studiengruppe waren das Vorliegen einer Schilddrüsenerkrankung, vorbestehende Nierenerkrankung, akute oder chronisch entzündliche Erkrankungen oder Leberfunktionsstörungen.

6.2 Blutentnahme und Probenlagerung

Die Patienten erklärten sich nach entsprechender Aufklärung mit der Blutentnahme für Studienzwecke einverstanden. Bei der Blutentnahme waren die Patienten nüchtern. Die Blutproben wurden unmittelbar nach Abnahme zentrifugiert und das Serum und das EDTA-Plasma bei -70°C im Zentrallabor der Klinischen Chemie des Universitätsklinikums Homburg eingefroren und bis zur Durchführung der analytischen Untersuchungen dort gelagert.

6.3 Materialien und Methoden

Methoden

Überblick angewandter Arbeitsverfahren:

Primär wurde die DNA aus Leukozyten der oben genannten Blutproben sowohl der KHK-Patienten als auch der Kontrollgruppe isoliert. Anschließend wurde nach Amplifizierung der entsprechenden Genabschnitte mittels PCR und erfolgtem Enzymschnitt die Gelelektrophorese durchgeführt.

Im Rahmen der Mutation des Apolipoproteins im Kringle IV Met75Thr wurde zusätzlich anschließend nach erfolgter entsprechender PCR die Methode der Single Stranded Conformational Polymorphism-Analyse zur weiteren Detektion und optischen Darstellung einzelner Punktmutationen angewandt.

6.4 Analytik

6.4.1 DNA – Isolierung

Für die DNA-Isolierung wurde der High-Pure PCR Template Preparation-Kit der Firma ROCHE® verwendet.

EDTA - Blut der Patienten wurde mit je 400µl Phosphate Buffered Saline/ PBS-Puffer verdünnt, da die Blutproben in den ersten Isolierungen zu viskös waren.

Ansatz:

200 µl EDTA- Blut

400 µl PBS- Puffer

40 µl Proteinase K (unspezifische Serin-Protease, isoliert aus einem Pilz, aktiv bei pH-Bereich 7,4 - 11,5; keine Inhibition durch EDTA oder Harnstoff; inaktiviert sehr schnell native Proteine, DNAsen und RNAsen).

Der Ansatz wird gut mit dem Vortex®mixer gemischt und 10 Minuten bei 72°C im vorgeheizten Thermomixer inkubiert. Anschließend erfolgt die Auftrennung der Proben durch Zugabe sterilen Isopropanols (100µl) aus dem Kitt. Hierfür wird das High Pure Filtertube in ein Auffanggefäß eingesetzt und die Probe komplett (~540µl) in das obere Reservoir pipettiert. Der Ansatz wird 1 Minute bei 8000 U/min zentrifugiert.

Der Durchlauf wird mit dem Auffanggefäß verworfen und das Filtertube in ein neues Auffanggefäß eingesetzt. Nun wird jeweils 500µl Inhibitor Removal Buffer zugegeben, welches die DNA von Substanzen befreit, die die PCR stören bzw. hemmen.

Nach der Zentrifugation erfolgen 2 Durchläufe mit jeweils Zusatz von je 400µl WashBuffer, welches die DNA von Salzen, Proteinen und anderen zellulären Verunreinigungen befreit.

Schließlich wird der Durchlauf verworfen, 10 Sekunden ohne jegliche Zusätze zentrifugiert und dann das Filtertube in ein sauberes, steriles Reaktionsgefäß eingesetzt.

Durch Zusatz von 200 µl vorgewärmtem Elutionspuffer erfolgt nun die Isolierung der gereinigten DNA (ca. 200µl) in ein steriles Gefäß. Die DNA wurde bei Temperaturen zwischen 4-8°C im Kühlschrank bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

6.4.2 PCR

Benötigte Substanzen:

- PCR-Puffer
- NTP-Mix (Nucleotid-Tri-Phoshat)
- US Primer / DS Primer
- Taq-Polymerase
- Steriles Wasser

Das sogenannte Mastermix besteht aus den oben genannten Substanzen, welche der Reihe nach in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß gegeben werden. Die Taq Polymerase wird zuletzt pipettiert. Anschließend werden 24 PCR-Gefäße (0.2ml) von 1 bis 24 durchnummieriert. Dieses Mastermix wird nun in entsprechender Menge in die vorbereiteten PCR-Röhrchen gegeben. Schließlich wird jeweils die benötigte Menge DNA, die zuvor isoliert wurde, hinzugegeben. Der Ansatz wird mit der Pipette gemischt. Die letzte Probe Nr. 24 beinhaltet als Negativ-Kontrolle keine DNA. Die PCR wird am Robocycler Gradient 96 mit dem Programm 1 (Window 1: 94°C-1min, 60°C-45s, 72°C-30s, 36 Zyklen; Window 2: 72°C-10 min, 6°C-0min) durchgeführt. Der Vorgang der Amplifizierung dauert 1:39 Stunden.

Anschließend wird die DNA mit Restriktionsenzymen geschnitten.

6.4.3 Schneiden der DNA mit Restriktionsenzymen

Vorbereitung:

- Thermo-Mixer auf 37°C stellen
- Herstellung des Restriktionsenzym/Puffergemisches

Der Verdau erfolgt nach den Angaben des Herstellers in den jeweils mitgelieferten Reaktionspuffern.

Das PCR-Produkt wird in vorbereitete von 1-24 nummerierte 1.5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Anschließend wird das Enzympuffergemisch in entsprechender Menge in den Deckel dieser 1.5ml Reaktionsgefäß gegeben und danach verschlossen.

Es folgt die Zentrifugation in der Tischzentrifuge bei 14000U/min für 1 Minute.

Dann werden die Proben in den vorgewärmten Thermomixer gestellt.

Der Verdau erfolgt nun für mindestens 3 Stunden oder über Nacht.

Nach erfolgtem Enzymverdau werden die Proben mit jeweils 3 µl Stoppmix (30% Glycerin, 0.25% Bromphenolblau, 0.25% Xylencyanol, 50mM EDTA) versetzt und auf ein 3%iges Agarose-Gel (Nusieve® GTG® Agarose; Cat-N: 50080 (BMA)) aufgetragen.

6.4.4 Agarosegelelektrophorese

3g des Agarose-Gels werden in ein Becherglas gegeben und mit TBE-Puffer (**Tris-Borat-EDTA**-Puffer: 10,78 g (89 mM) Tris 5,50 g (89 mM) Borsäure und 0,58 g (2 mM) EDTA mit destilliertem Wasser (auf 1000ml)) auf 100 ml aufgefüllt.

Anschließend wird das Becherglas auf eine Kochplatte gestellt und so lange gekocht bis die Flüssigkeit aufklart. Nach Abkühlung des Gels werden 12 µl des Ethidiumbromids (1%ige Stammlösung) ins Gel pipettiert und durch vorsichtiges Schwenken mit diesem vermischt.

In die vorgefertigte Kammer wird nun das Gel gegossen. Für die Ausbildung der Probenauftragtaschen (Slots) werden vor dem Befüllen mit dem Gel auf der Kathodenseite 2 Gelkämme in die Kammer eingesetzt und fixiert. Nach dem Erstarren des Gels und Entfernen der Kämme wird in die Kammer Elektrophoresepuffer gefüllt, so dass das Gel vollständig mit Puffer überschichtet ist. Die zu trennenden DNA-Proben werden in die Slots eingefüllt. In das erste Slot werden jeweils 12µl Marker (DNA- Standard 1kb Leiter, GibcoBRL®) pipettiert. Nach Anlegen einer Spannung kann die Elektrophorese gestartet werden. Sie läuft bei 125 V über 1.5 Stunden.

Der im Stopp-Mix enthaltene Farbstoff Bromphenolblau wandert schneller als die meisten DNA-Moleküle. Auf diese Weise kann die Elektrophorese ständig überwacht und rechtzeitig abgebrochen werden. Schließlich erfolgt nach der elektrophoretischen Auftrennung die Anfertigung eines Polaroidphotos des Gels unter UV-Beleuchtung.

Die Auswertung erfolgt anhand des sichtbaren Bandenmusters.

6.5 Genotypisierungen

Die PCRs der verschiedenen Mutationen werden am RoboCycler Gradient 96 von Stratagene mit dem Programm 1 durchgeführt. Die Primer wurden von Gibco BRL® bezogen und auf 10 pmol/µl verdünnt.

6.5.1 Paraoxonase (PONA) Arg192Gln Genotypisierung

Die Primer für die PCR wurden entsprechend der Sequenz von ADKINS et al. (1993) synthetisiert.

Primer AS 5'- CAG GCT AAA CCC AAA TAC ATC TC-3'

Primer S 5'- TAT TGT TGC TGT GGG TAC ATC TC-3'

Die Primer sind von Gibco BRL und auf 10 pmol/µl verdünnt.

Für die PCR wird ein 13.25µl Ansatz folgendermaßen pipettiert:

PCR- Reaktionspuffer	1.25 µl
NTP-Mix (2.5mM) Takara®	1.25 µl
MgCl ₂	0.25 µl
Primer US	0.375 µl
Primer DS	0.375 µl
H ₂ O steril	7.675 µl
Taq DNA Polymerase, Eppendorf® (5 U/µl)	0.075 µl
DNA	2.00 µl

Restriktionsendonuklease ALwl der Firma Ne BioLabs ® und Enzympuffer

Verdau 13.25µl PCR-Produkt + 0.8µl Enzym ALwl + 1.5µl Enzympuffer NE-Puffer 4

Fragmentgröße
 0 = Genotyp Arg/ Arg: 99bp
 1 = Genotyp Gln/ Arg: 30bp, 69bp, 99bp
 2 = Genotyp Gln/ Gln: 30bp, 69bp

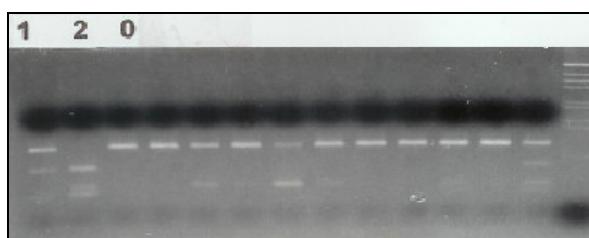


Abbildung 5: Paraoxonase (PONA) Arg192Gln

6.5.2 Paraoxonase (PONA) Met55Leu Genotypisierung

Die Primer für die PCR wurden entsprechend der Sequenz von ADKINS et al. (1993) synthetisiert.

Primer AS 5`-TTT AAT CCA GAG CTA ATG AAA GCC-3`

Primer S 5`-GAA GAG TGA TGT ATA GCC CCA G-3`

Die Primer sind von Gibco BRL und auf 10 pmol/µl verdünnt.

Für die PCR wird ein 13.75µl Ansatz folgendermaßen pipettiert:

PCR- Reaktionspuffer	1.25 µl
NTP-Mix (2.5mM) Takara®	1.25 µl
MgCl ₂	0.25 µl
Primer US	0.375 µl
Primer DS	0.375 µl
H ₂ O steril	7.675 µl
Taq DNA Polymerase, Eppendorf® (5U/µl)	0.075 µl
DNA	2.50 µl

Restriktionsendonuklease Nla III der Firma Ne BioLabs® und Enzympuffer

Verdau 13.75µl PCR-Produkt + 0.4µl Enzym Nla III + 1.5µl Enzympuffer NE-Puffer 4 + 0.4µl BSA

Fragmentgröße 0 = Genotyp Met/ Met: 44bp, 126bp
1 = Genotyp Met/ Leu: 44bp, 126bp, 170bp
2 = Genotyp Leu/ Leu: 170bp

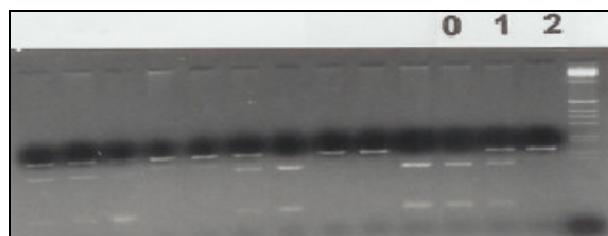


Abbildung 6: Paraoxonase (PONA) Met55Leu

6.5.3 Apolipoprotein A-V (APOA-V) 1131T→C Genotypisierung

Die Primer für die PCR wurden entsprechend der Sequenz von PENNACCHIO et al. (2001) synthetisiert.

Die Primer sind von Gibco BRL und auf 10 pmol/µl verdünnt.

Primer AS 5'- CCC CAG GAA CTG GAG CGA AAT T- 3'

Primer S 5'- GAT TGA TTC AAG ATG CAT TTA GGA C- 3'

Für die PCR wird ein 12.5µl Ansatz folgendermaßen pipettiert:

PCR- Reaktionspuffer (10x konz. + MgCl ₂)	1.25 µl
NTP-Mix (2.5mM), Takara ®	1.25 µl
MgCl ₂	0.75 µl
Primer US	0.50 µl
Primer DS	0.50 µl
H ₂ O steril	5.875 µl
Taq DNA Polymerase, Roche® (1U/µl)	0.375 µl
DNA	2.0 µl

Restriktionsendonuklease MSE I der Firma MBI ® und Enzympuffer

Verdau 12.5µl PCR-Produkt + 1.0µl Enzym MSE I +
1.4 µl Enzympuffer

Fragmentgröße 0 = Genotyp TT: 187 bp Fragment
1 = Genotyp TC: 187bp + 155 bp Fragmente
2 = Genotyp CC: 155 bp Fragment

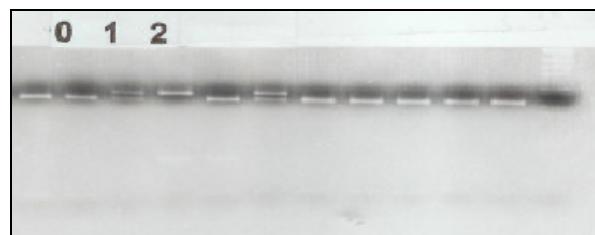


Abbildung 7: Apolipoprotein A-V (APOA-V) 1131T→C

6.5.4 Apolipoprotein Kringle IV Met 75Thr Genotypisierung

Die Primer für die PCR wurden entsprechend der Sequenz von SIMÓ et al. (2001) synthetisiert.

Die Primer sind von Gibco BRL und auf 10 pmol/ μ l verdünnt.

Primer AS 5'-AGT GGC CTG ACA ATG AAC TA- 3'

Primer S 5'-ACC TTG TTC AGA AGG AGG CC- 3'

Für die PCR wird ein 25 μ l Ansatz folgendermaßen pipettiert:

PCR- Reaktionspuffer (10x konz. + MgCl ₂)	2.50µl
NTP-Mix (2.5mM) Takara®	2.50µl
MgCl ₂	1.50µl
Primer US	0.75µl
Primer DS	0.75µl
H ₂ O steril	13.75µl
Taq DNA Polymerase, Roche® (1U/µl)	0.75µl
DNA	2.50µl

Vorverdau Enzym BamHI, Enzympuffer, Eppendorf®-Qualitäts-
Wasser

Restriktionsendonuklease NCOI-Enzym der Firma MBI Fermentas® und Enzympuffer Y+/Tango TM

Verdau 12µl PCR-Produkt + 1.0µl Enzym NCOI, MBI® + 1.4µl Enzympuffer Y+/ TANGO TM

Fragmentgröße	Genotyp MM:	198bp Fragment
	Genotyp MT:	198bp + 175bp Fragment
	Genotyp TT:	175bp Fragment

Der betrachtete Polymorphismus Met75Thr befindet sich im Kringle IV, Nr.10.

Daher werden alle anderen vorliegenden Kringles durch einen zusätzlichen Enzym- Verdau abgetrennt. Dieser wird entsprechend der Referenzliteratur von SIMÓ et al, 2001 mit dem Enzym BAM HI 5U/ µg DNA durchgeführt.

Im Rahmen der Vorbereitung dieses Enzymverdaus wird der zugehörige Enzympuffer mit steriles Eppendorf®-Qualitäts-Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnt. Das Enzym BamHI wird nun mit dem verdünnten Puffer 1:4 verdünnt. Das verdünnte BamHI wird in den Deckel pipettiert und nach Zufügen unverdünnten Puffers verschlossen und zentrifugiert.

Schließlich kann nach Pipettierung der DNA in die einzelnen Reaktionsgefäß und kurzer Zentrifugation der Verdau bei 37°C für 2 Stunden gestartet werden:

15µl DNA +1.5µl BamHI + 1.8µl Enzympuffer.

Nach erfolgtem Verdau und damit Entfernung aller irrelevanten Kringles wird schließlich die PCR durchgeführt:

PCR- Reaktionspuffer (10x konz. + MgCl ₂)	2.50µl
NTP-Mix (2.5mM) Takara®	2.50µl
MgCl ₂	1.50µl
Primer US	0.75µl
Primer DS	0.75µl
H ₂ O steril	13.75µl
Taq DNA Polymerase, Roche® (1U/µl)	0.75µl
DNA	2.50 µl

Danach findet der eigentliche Verdau statt und die DNA wird mit dem Restriktionsenzym NCOI-Enzym der Firma MBI Fermentas® und dem zugehörigen Enzympuffer für mindestens 3 Stunden bei 37 °C geschnitten:

12 µl PCR-Produkt + 1.0 µl Enzym NCOI, MBI® + 1.4 µl Enzympuffer Y+/ Tango TM

Nun kann die Mutationsanalyse am ABI Prism 310 durchgeführt werden. Hierfür musste das PCR-Produkt vorher durch Hitze und die Zugabe von Formamid denaturiert werden. Die nun denaturierte als Einzelstrang vorliegende DNA kann abhängig von der vorliegenden Basensequenz verschiedene räumliche Strukturen annehmen.

Die einzelnen Arbeitsschritte sind:

- Thermomixer auf 90 °C stellen
- Nummerierung der Röhrchen von 1-24
- Verdünnung der PCR-DNA mit sterilem Wasser (HPLC-Wasser) im Verhältnis 1:40, Pipettierung in die einzelnen vorbereiteten Röhrchen
- Mix ansetzen bestehend aus 10.5µl Formamid, 0.5µl NaOH und 0.5µl Standard Tamra (GENESCAN®)
- Mix und verdünnte DNA (11µl Mix + 1µl DNA) in Reaktionsgefäß pipettieren und vortexen
- Reaktionsgefäß nun in den Thermomixer bei 90°C für 2 Minuten erhitzen
- schließlich sofort danach in vorbereitetes Eismatch abkühlen lassen und anschließend zentrifugieren.

Nach Umfüllen der Proben in die zugehörigen Sample Tubes werden diese in den ABI Prism 310® gesetzt. Die einzelnen Läufe am Gerät können durch Änderung der Temperatur optimiert werden. Nach einigen Probeläufen und Erhalt der optimalen Bedingungen bei 35°C, wurden sämtliche Läufe nur noch bei dieser Temperatur durchgeführt.

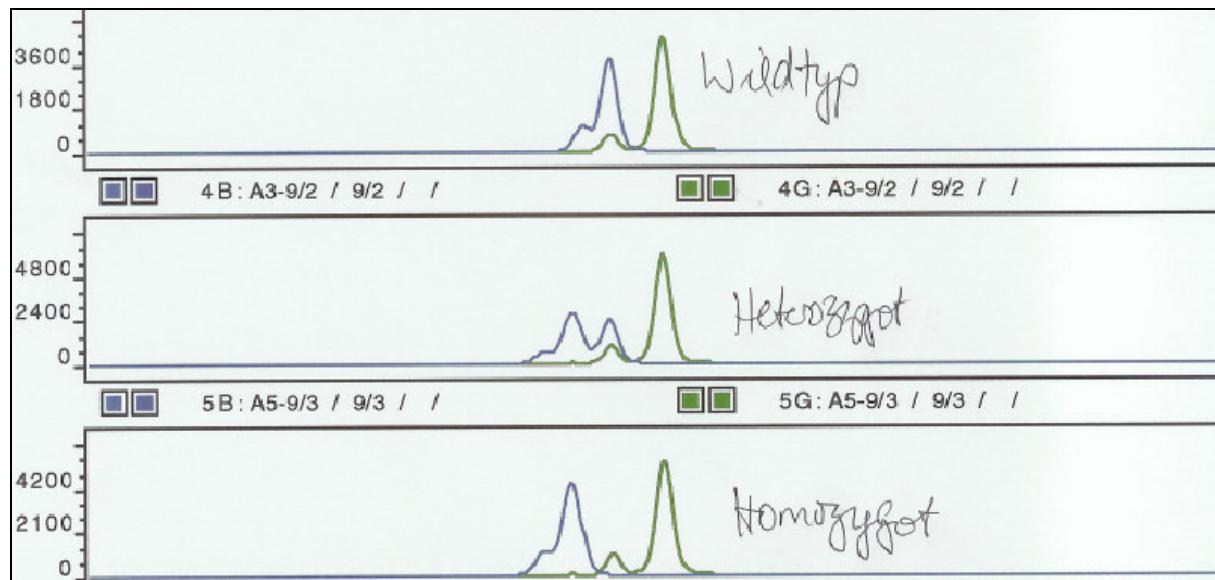


Abbildung 8: Apolipoprotein Kringle IV Met75Thr

6.5.5 Intercellular Adhesion Molecule (ICAM-1) 469C→T Genotypisierung

Die Primer für die PCR wurden entsprechend der Sequenz von JIANG et al. (2002) synthetisiert.

Die Primer sind von Gibco BRL und auf 10 pmol/µl verdünnt.

Primer AS 5'- TTC CCA GCA GAC TCC AAT GT- 3'

Primer S 5'- GGA TAC AAC AGG CGG TGA GG-3'

Für die PCR wird ein 12.5µl Ansatz folgendermaßen pipettiert:

PCR- Reaktionspuffer (10x konz. + MgCl ₂)	1.25 µl
NTP-Mix (2.5mM) Promega®	1.25 µl
MgCl ₂	0.25 µl
Primer US	0.375 µl
Primer DS	0.375 µl
H ₂ O steril	7.675 µl
Taq DNA Polymerase, Eppendorf ® (5U/µl)	0.075 µl
DNA	1.25 µl

Restriktionsendonuklease Bsh 12361 (Fnu DII) der Firma MBI Fermentas ® und Enzympuffer

Verdau 12.5µl PCR-Produkt + 1.0µl Enzym Bsh12361 + 1.4µl Enzympuffer

Fragmentgröße
0 = Genotyp CC: 331 bp Fragment
1 = Genotyp CT: 331 + 268 bp Fragment
2 = Genotyp TT: 268 bp Fragment

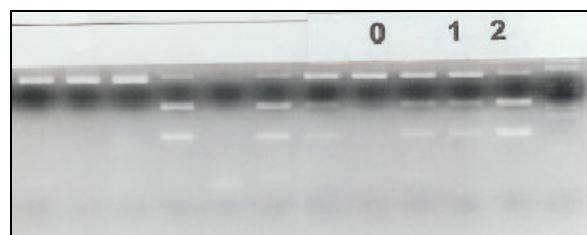


Abbildung 9: Intercellular Adhesion Molecule (ICAM-1) 469C→T

6.5.6 Monocyte-chemoattractant Protein-1 (MCP-1) 2518A→G Genotypisierung

Die Primer für die PCR wurden entsprechend der Sequenz von SZALAI et al. (2001) synthetisiert.

Die Primer sind von Gibco BRL und auf 10 pmol/µl verdünnt.

Primer AS 5`-TTC TGA ACC CAC TTC TGC TTG- 3`

Primer S 5`-TCC TGT GCC TGC TGC TCA TAG C-3`

Für die PCR wird ein 12.5 µl Ansatz folgendermaßen pipettiert:

PCR- Reaktionspuffer (10x konz. + MgCl ₂)	1.25 µl
NTP-Mix (2.5mM) Promega®	1.25 µl
MgCl ₂	0.25 µl
Primer US	0.375 µl
Primer DS	0.375 µl
H ₂ O steril	7.675 µl
Taq DNA Polymerase, Eppendorf ® (5U/µl)	0.075 µl
DNA	1.25 µl

Restriktionsendonuklease: Pvu II der Firma MBI ® und Enzypuffer

Verdau: 12.5µl PCR-Produkt + 1.0µl Enzym Pvu II + 1.4µl Enzypuffer

Fragmentgröße: 0 = Genotyp AA: 234bp Fragment
1 = Genotyp AG: 234bp+159+75bp
2 = Genotyp GG: 159bp + 75bp Fragmente

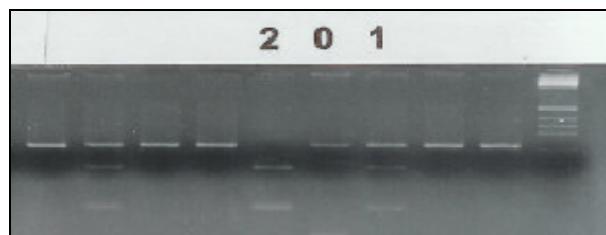


Abbildung 10: Monocyte-chemoattractant Protein-1 (MCP-1) 2518A→G

6.5.7 Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR) 677C→T Genotypisierung

Die Primer für die PCR wurden entsprechend der Sequenz von FROSST et al. (1995) synthetisiert.

Die Primer sind von Gibco BRL und auf 10pmol/µl verdünnt.

Primer AS 5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA- 3'

Primer S 5'-AGG ACG CTG CGG TGA GAG TG- 3'

Für die PCR wird ein 15µl Ansatz folgendermaßen pipettiert:

PCR- Reaktionspuffer (10x konz. + MgCl ₂)	1.5 µl
NTP-Mix (2.5mM) Promega®	1.5 µl
Primer US	1.2 µl
Primer DS	1.2 µl
H ₂ O steril	7.65 µl
Taq DNA Polymerase, Roche®	0.45 µl
DNA	1.50 µl

Restriktionsendonuklease Hinf I der Firma MBI ® und Enzympuffer

Verdau 15µl PCR-Produkt + 1.0µl Enzym Hinf I +1.4µl Enzympuffer R + 1.4 µl BSA

Fragmentgröße 0 = Genotyp CC: 198bp Fragment
1 = Genotyp CT: 198bp + 175bp Fragment
2 = Genotyp TT: 175bp Fragment

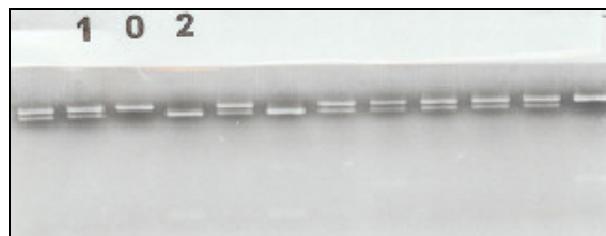


Abbildung 11: Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR) 677C→T

6.6 Chemikalien, Reagenzien, Materialen und Geräte

Chemikalien und Reagenzien

Agarose (NuSieve GTG)	BMA, USA
DNA-Standard 1kb Leiter	GibcoBRL, Eggenstein
Qualitätswasser	Eppendorf, Hamburg
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
High Pure PCR Template Preparation Kit	Roche, Mannheim
NTP-Mix (2.5mM)	Promega, Mannheim
NTP-Mix (2.5mM)	Takara, Bioscience Japan
Primer	GibcoBRL, Eggenstein
Restriktionsendonuklease Hinf I	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Restriktionsendonuklease Pvu II	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Restriktionsendonuklease Nco I	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Restriktionsendonuklease Tru1I	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Restriktionsendonuklease Bsh 12361	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Restriktionsendonuklease Nla III	BioLabs, New England
Restriktionsendonuklease Alw I	BioLabs, New England
Standard Mix Tamra	GENESCAN, Freiburg
Taq-Polymerase	Roche, Mannheim
Taq DNA Polymerase	Eppendorf, Hamburg
TBE-Puffer 10x	GibcoBRL, Eggenstein

Einmalartikel

Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Biosphere Filter Tips 100µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipetten blau 1000µl	Sarstedt, Nümbrecht
Steril DNAase, RNAase frei 0.5-10µl Typ E	Ratiolab, Dreieich-Buchschlag
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
PCR-Gefäße	Greiner-Bio-One, Solingen-Wald
Polaroid Photos	Polaroid, Frankfurt
Gläser 250ml	Schott, Mainz

Geräte

Elektrophoresekammer /	
Electrophoresis power supply EPS 500/ 400	Biotec Fischer, Reiskirchen
Eppendorf Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge EBA 12	Hettich, Tuttlingen
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Robocycler Gradient 96	Stratagene, USA
Polaroid MP4 + Instant Camara System	INTAS, Göttingen
Vortex Genie 2	Scientific Industry, USA
ABI Prism 310 Genetic Analyser	Applied Biosystems, Darmstadt

6.7 Referenz - bzw. Risikobereiche und Methoden

Parameter	Referenz - bzw. Risikobereich	SI Einheit	Methode
Triglyceride	<200	[mg/dl]	Enzymatischer Farbtest
Cholesterin	<200	[mg/dl]	Enzymatischer Farbtest
LDL-Cholesterin	< 135	[mg/dl]	nach Friedewald errechnet LDL-Cholesterin = Gesamtcholesterin - HDL-Cholesterin - (Triglyceridwert : 5)
HDL-Cholesterin	♂ 35 – 55	[mg/dl]	Enzymatischer Farbtest
HDL-Cholesterin	♀ 45 – 65	[mg/dl]	Enzymatischer Farbtest
Lp(a)	< 30	[mg/dl]	Nephelometrie
C-reaktives Protein	< 5	[mg/l]	Immunologische Turbidimetrie
Homocystein	<12	[µmol/l]	FPIA/HPLC Fluorescence Polarization Immunoassay/ High-Performance Liquid Chromatographie
Folsäure	> 5,38	[ng/ml]	chLIA komp (kompetitiver chemilumineszens Liganden Immunoassay)
Vitamin B 12	211 – 911	[pg/ml]	chLIA komp (kompetitiver chemilumineszens Liganden Immunoassay)

6.8 Statistische Methoden

Als Software für die Datenauswertung wird SPSS (Statistical Product and Service Solution, Chicago, USA) Version 13.0 verwendet.

6.8.1 Box-and –Whisker-Plots

Der Boxplot dient zur graphischen Darstellung von Häufigkeitsverteilungen.

Hierbei werden folgende Größen in die Erstellung der Box miteinbezogen:

Minimum, unteres Quartil, Median, oberes Quartil, Maximum.

Die Box wird durch die obere (die 75 % Perentile) und die untere (die 25 % Perzentile) Quartile begrenzt. Die Länge der so gebildeten Box stellt den Interquartilsabstand dar. Der Median, dargestellt durch eine schwarze Linie innerhalb der Box, informiert über die Verteilung der Daten. Durch die beiden Whiskers, dargestellt durch horizontale Linien, werden jeweils der größte und kleinste Wert gekennzeichnet. Außerhalb dieses Bereichs liegende Werte werden als Ausreißer bezeichnet und sind- sofern diese 1.5 bis 3 Boxlängen oberhalb/ unterhalb der oberen/ unteren Boxbegrenzung liegen- durch Kreise gekennzeichnet.

Sterne kennzeichnen Extremwerte, die mehr als 3 Boxlängen von der oberen bzw. unteren Boxbegrenzung entfernt sind.

6.8.2 Odds Ratio

Mit Hilfe der Vierfeldertafel kann man das Odds Ratio berechnen. Das Odds Ratio stellt die Chance dar, dass Personen mit einem Risikofaktor verglichen mit Personen ohne entsprechenden Risikofaktor an einer bestimmten Krankheit erkranken. Spricht man von einem signifikanten Odds Ratio, so wird im entsprechenden 95%- Konfidenzintervall der Wert 1 nicht eingeschlossen.

$$\text{or} = \frac{a * d}{c * b}$$

$$c * b$$

6.8.3 Nichtparametrische Testverfahren:

Folgende nichtparametrische Tests wurden verwendet:

6.8.3.1 Chi-Quadrat-Test (χ^2)

Der Chi-Quadrat-Test wird zur Überprüfung von Häufigkeitsverteilungen eingesetzt, also bei Variablen mit nominalem Skalenniveau. Sofern die Angabe des statistischen Tests fehlt, kam der Chi-Quadrat -Test zum Einsatz.

6.8.3.2 Mann-Whitney-Test

Der Mann-Whitney-Test (U- Test) ist ein parameterfreier Test, der zur Überprüfung der Signifikanz der Übereinstimmung zweier Verteilungen dient.

Das Signifikanzniveau $p < 0.05$ wird als signifikant betrachtet.

6.8.3.3 Kruskal-Wallis-Test

Der Kruskal-Wallis-Test ist eine Erweiterung des U-Test auf mehr als zwei Gruppen. Er prüft die Nullhypothese, dass Populationen sich nicht unterscheiden. Dabei werden keine Voraussetzungen an die Verteilungen der Populationen (verteilungsfrei) gemacht.

7. Ergebnisse

7.1 Charakterisierung der Studienteilnehmer

Die Patientengruppe setzt sich aus 67 (33.5%) weiblichen Patienten und 133 (66.5%) männlichen Patienten zusammen. Die Altersangabe erfolgt als arithmetischer Mittelwert. Die weiblichen Patienten sind im Mittel mit 68.6 Jahren älter als die männlichen Patienten (60.7). Angegeben sind zudem die klassischen Risikofaktoren Adipositas, Diabetes mellitus Fettstoffwechselstörungen, arterielle Hypertonie und Nikotinabusus. Bei den Männern bestehen in mindestens 50% die Risikofaktoren arterielle Hypertonie, Fettstoffwechselstörungen und Adipositas. Die weiblichen Patienten weisen hauptsächlich die beiden Risikofaktoren Adipositas (41.8%) und Hypertonie (38.8%) auf. Bei beiden Geschlechtern liegt in bis zu 60% eine Herzinsuffizienz und in knapp 19% ein Diabetes mellitus Typ II vor. Fast 40% aller männlichen und 30% aller weiblichen Patienten erlitten einen Herzinfarkt. Bei beiden Geschlechtern machen die beiden Risikofaktoren Rauchen und Alkoholabusus insgesamt nur einen geringen Anteil aus. So findet man bei den weiblichen Patienten 1.3% Raucher und doppelt so viele Exraucher. Unter den Männern rauchen knapp 10% mit einem Exraucheranteil von 37.2 %. Abbildung 12/ Tabelle 1 fassen die Basisdaten des Patientenkollektivs zusammen.

Abbildung 12: Basisdaten des Patientenkollektivs

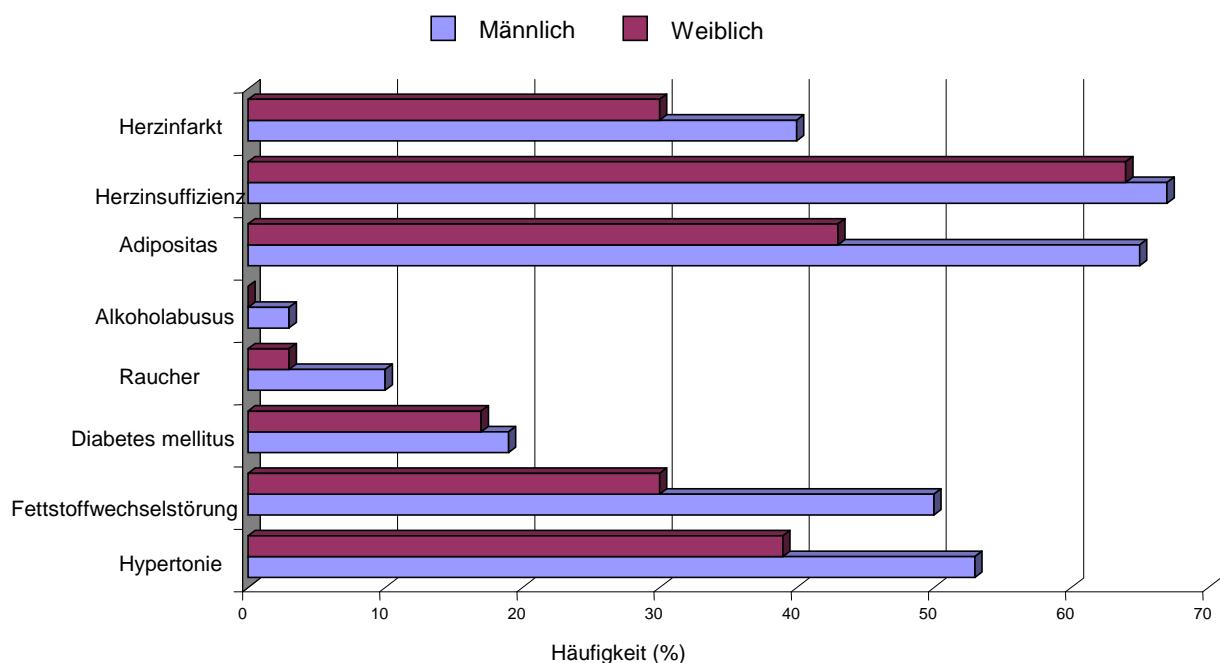


Tabelle 1: Basisdaten des Patientenkollektivs, getrennt nach Geschlecht

	Männlich	Weiblich	p - Wert
Anzahl	n = 133	n = 67	
Alter Mittelwert [Jahren]	60.7	68.6	0.754
Hypertonie, n (%)	70 (52.6%)	26 (38.8%)	0.020
Fettstoffwechsel störung*, n (%)	66 (50.0%)	20 (29.8%)	0.080
Diabetes mellitus, n (%)	25 (18.8%)	11 (16.4%)	0.548
Raucher, n (%)	13 (9.8%)	2 (1.34%)	0.023
Exraucher, n (%)	28 (37.2%)	4 (2.8%)	< 0.010
Alkoholabusus, n (%)	3 (2.3%)	0	0.217
Adipositas, BMI>25 kg/m ²	86 (64.6%)	28 (41.8%)	0.804
Herzinsuffizienz, n (%)	89 (66.9%)	43 (64.2%)	0.273
Herzinfarkt, n (%)	53 (39.8%)	20 (29.8%)	0.113

* Triglyceride >200 mg/dl, Cholesterin > 200 mg/dl, LDL-Cholesterin >135 mg/dl,
HDL-Cholesterin, ♂ < 35 – 55 mg/dl, ♀ < 45 – 65 mg/dl

* Alkoholkonsum > 40 – 60 g/d

Bei der Gegenüberstellung der verschiedenen klassischen Risikofaktoren erfolgt eine Einteilung sowohl der Patienten als auch der Kontrollpersonen in verschiedene Gruppen.

Gruppe 0 stellt die Kontrollgruppe dar bestehend aus herzgesunden Mitarbeitern des Universitätsklinikums Homburg. Eine Koronarangiographie wurde in dieser Gruppe nicht durchgeführt.

Das Patientenkollektiv wurde je nach Ergebnis der Koronarangiographie in die Gruppen 1-3 eingeteilt:

Gruppe 1 = Unauffällige Koronarangiographie

Gruppe 2 = Beginnende Koronare Herzkrankheit

Gruppe 3 = 1-3-Gefäßerkrankung

In Gruppe 1 und 2 überwiegen die Frauen (52%), während in Gruppe 0 und 3 Männer den Hauptanteil bilden (> 70%).

Die Patienten mit beginnender KHK und mit Ein- bis Dreigefäßerkrankung sind im Mittel älter (69 Jahren/ 67 Jahren) als die Kontrollgruppe und die Patienten mit unauffälliger Koronarangiographie (66 Jahren/ 61 Jahren). Patienten aus der Gruppe 2 weisen mit 27.3% die höchste Prävalenz an Diabetes mellitus Typ II-Erkrankung auf.

Betrachtet man die Risikofaktoren Nikotinabusus und Adipositas in den verschiedenen Gruppen, so wird ersichtlich, dass die Patienten in Gruppe 3 im Mittel schwerer sind (BMI > 27 kg/m²) als die Personen aus Gruppe 1 und 2. In dieser Gruppe gibt es auch prozentual die meisten Raucher.

Tabelle 2: Gegenüberstellung klinischer Parameter und klassischer Risikofaktoren in den verschiedenen Gruppen

	Gruppe 0	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	p-Wert
Geschlecht ♂ (%)	65 (71%)	17 (48%)	11 (48%)	101 (75%)	0.020
Alter, Mittelwert [Jahren]	66.0	61	69	67	0.800
Diabetes mellitus, n (%)	0	2 (5.5 %)	9 (27.3 %)	25 (18.5%)	<0.01
Nikotinabusus, n (%)	4 (4.3 %)	3 (1.08 %)	2 (8.9 %)	43 (31.8%)	0.088
Gewicht, Mittelwert [kg]	*	77	69	78	0.083
BMI, Mittelwert [kg/m ²]	*	26.3	25.4	27.1	0.435

* Daten nicht verfügbar

Gruppe 0 = Kontrollgruppe, Gruppe 1 = Patienten mit unauffälliger Koronarangiographie, Gruppe 2 = Patienten mit beginnender KHK, Gruppe 3 = Patienten mit Ein-Drei-Gefäßerkrankung

7.2 Verschiedene Genotypverteilung in den untersuchten Studiengruppen

Die folgenden Tabellen und Abbildungen stellen die Häufigkeit der verschiedenen Genotypen der einzelnen Mutationen in den unterschiedlichen Studiengruppen dar.

Hierbei erfolgt eine Einteilung der Patientengruppe abhängig von dem Ergebnis der durchgeführten Koronarangiographie in die 3 Gruppen *Unauffällige Koronarangiographie*, *beginnende KHK* und *Ein-Gefäß – bis Dreigefäßerkrankung*. Bei Vorliegen einer beginnenden KHK zeigt sich in der Koronarangiographie definitionsgemäß ein teilweise wandverändertes Gefäßsystem ohne Stenosen.

Im Rahmen der Auswertung durch Odds Ratio und dem exakten Test nach Fisher wurden die Merkmalsträger heterozygoter und homozygoter Mutationen (X/Y und Y/Y) aufgrund geringer Fallzahlen zur besseren statistischen Auswertbarkeit zusammengefaßt. Verglichen wird hierbei die Patientengruppe mit Ein – Dreigefäßerkrankung mit der Kontrollgruppe.

PONA Arg192Gln - Polymorphismus

Wie der Tabelle 3 und der Abbildung 13 zu entnehmen, besteht sowohl in der Kontrollgruppe als auch bei den Patienten mit Ein-Dreigefäßerkrankung sowie bei den Patienten mit Beginnender KHK hauptsächlich der AA-Genotyp des PONA Arg192Gln - Polymorphismus. In der Patientengruppe mit unauffälliger Koronarangiographie finden sich überwiegend Träger des AG-Allels (53%). Der GG-Genotyp liegt mit 13.4% hauptsächlich in der Gruppe mit beginnender KHK vor. In den übrigen Studiengruppen zeigt sich bezüglich des Vorkommens des GG-Genotyps kein wesentlicher Unterschied; insbesondere in den beiden Gruppen Kontrollgruppe und Patienten mit KHK 1-3 besteht diesbezüglich kein signifikanter Unterschied ($p = 0.783$).

Tabelle 3: Häufigkeit der verschiedenen Genotypen der Mutation PONA Arg192Gln in den einzelnen Studiengruppen

	Kontrollgruppe	Unauffällige Koronarangiographie	Beginnende KHK	Patienten KHK1-3	p - Wert
PONA Arg192Gln	n= 88	n= 36	n= 23	n= 134	
AA	49 (55.6%)	14 (38.8%)	12 (52.2%)	71 (53%)	
AG	33 (37.5%)	19 (52.7%)	8 (34.7%)	53 (39.5%)	0.656
GG	6 (6.8%)	3 (8.3%)	3 (13.0%)	10 (7.4%)	

Abbildung 13: Häufigkeit der verschiedenen Genotypen der Mutation PONA Arg192Gln in den einzelnen Studiengruppen

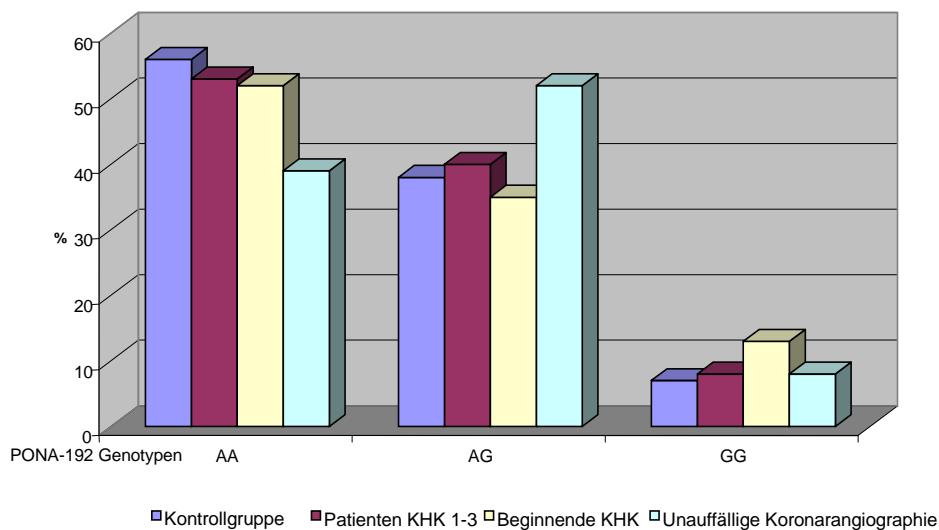


Tabelle 4: Odds Ratio für das Auftreten der PONA Arg192Gln - Mutation Genotyp AG bzw. GG und p-Wert nach exaktem Fisher-Test

PONA Arg192Gln (AA vs AG/ GG)	Odds Ratio	95%-Konfidenzintervall	p-Wert (nach Fisher)
Kontrollgruppe	1.0	0.6 -1.9	0.783
Patientenkollektiv KHK 1-3	0.9	0.7- 1.3	

PONA Met55Leu - Polymorphismus

Tabelle 5 und Abbildung 14 zeigen für das ML - Allel und den LL - Genotyp des PONA Met55Leu - Polymorphismus in allen vier Studiengruppen ein relativ ausgewogenes Verhältnis. Insbesondere besteht zwischen den beiden Gruppen Kontrollgruppe und Patienten KHK 1-3 kein wesentlicher Unterschied bezüglich des Auftretens der verschiedenen Allelformen von PONA Met55Leu ($p = 1.0$).

Tabelle 5: Häufigkeit der verschiedenen Genotypen der Mutation **PONA Met55Leu** in den einzelnen Studiengruppen

	Kontrollgruppe n= 85	Unauffällige Koronarangiographie n= 36	Beginnende KHK n= 23	Patienten KHK1-3 n= 135	p - Wert
PONA Met55Leu	n= 85	n= 36	n= 23	n= 135	0.825
	MM	36 (42.3%)	15 (41.6%)	10 (43.7%)	
	ML	40 (47.0%)	19 (52.7%)	9 (39.1%)	
LL	9 (10.5%)	2 (5.5%)	4 (17.4%)	18 (13.3%)	

PONA: Paraoxonase MM = Wildtyp, ML = Heterozygote, LL = Homozygote Träger

Abbildung 14: Häufigkeit der verschiedenen Genotypen der Mutation PONA Met55Leu in den einzelnen Studiengruppen

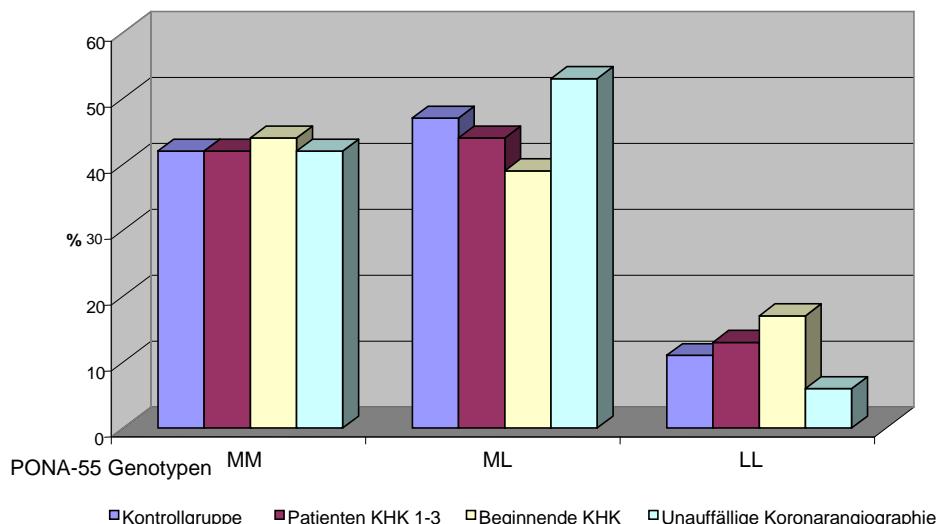


Tabelle 6: Odds Ratio für das Auftreten der PONA Met55Leu - Mutation Genotyp ML bzw. LL und p-Wert nach exaktem Fisher-Test

PONA Met55Leu (MM vs ML/ LL)	Odds Ratio	95%- Konfidenzintervall	p-Wert (nach Fisher)
Kontrollgruppe	1.0	0.7 -1.4	1.0
Patientenkollektiv KHK 1-3	0.9	0.8 - 1.3	

APOA-V 1131T→C - Polymorphismus

Tabelle 7 und Abbildung 15 zeigen, dass für den APOA-V 1131T→C - Polymorphismus in allen vier Studiengruppen in mindestens 80% der Genotyp TT (Wildform) vorkommt.

Erneut wird jedoch deutlich, dass insbesondere für die Kontrollgruppe und Patienten mit Ein – Dreigefäßerkrankung bezüglich der Häufigkeit der verschiedenen Allelformen kein signifikanter Unterschied besteht ($p = 0.854$).

Tabelle 7: Häufigkeit der verschiedenen Genotypen der Mutation APOA-V 1131T→C in den einzelnen Studiengruppen

	Kontrollgruppe	Unauffällige Koronarangiographie	Beginnende KHK	Patienten KHK1-3	p – Wert
APOA-V 1131T→C	n= 76	n= 35	n= 23	n= 135	
TT	63 (82.9%)	32 (91.4%)	18 (78.2%)	110(81.5%)	0.624
TC	11 (14.4%)	3 (8.5%)	3 (13.0%)	19 (14.0%)	
CC	2 (2.6%)	0	2 (8.7%)	6 (4.4%)	

APOA-V: Apolipoprotein- AV

TT = Wildtyp, TC = Heterozygote, CC = Homozygote Träger

Abbildung 15: Häufigkeit der verschiedenen Genotypen der Mutation APOA-V 1131T→C in den einzelnen Studiengruppen

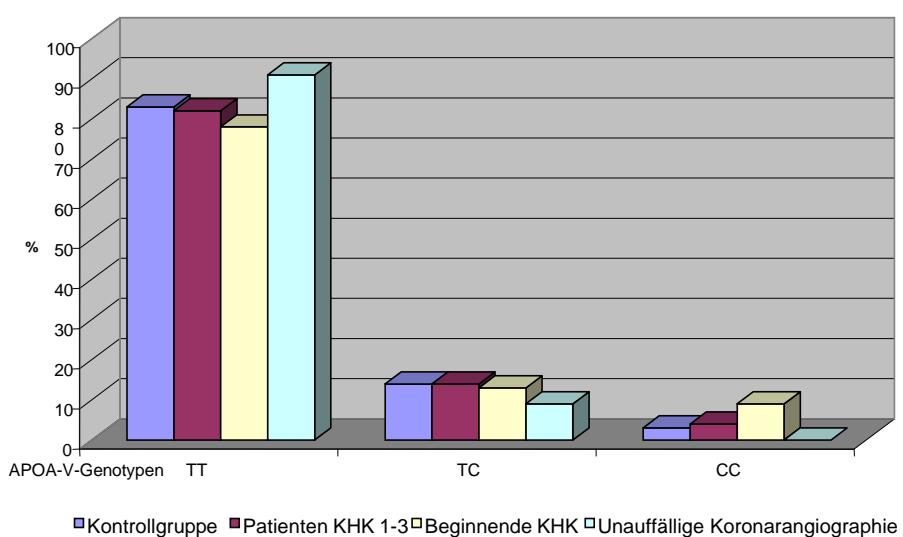


Tabelle 8: Odds Ratio für das Auftreten der APOA-V 1131T→C - Mutation Genotyp TC bzw. CC und p-Wert nach exaktem Fisher-Test

APOA-V 1131T→C (TT vs TC/ CC)	Odds Ratio	95%- Konfidenzintervall	p-Wert (nach Fisher)
Kontrollgruppe	1.0	0.8 -1.2	0.854
Patientenkollektiv KHK 1-3	0.9	0.5 - 1.7	

Apolipoprotein Kringle IV Met75Thr- Polymorphismus

Auch für den Met75Thr- Polymorphismus wird in den unten dargestellten Tabellen und der Abbildung ersichtlich, dass insbesondere für die beiden Studiengruppen Kontrollgruppe und Patienten KHK 1-3 fast identische Ergebnisse bezüglich der Häufigkeit der verschiedenen Allelformen vorliegen. Folglich tritt der Genotyp MM in beiden Gruppen mit einer Häufigkeit von 50%, das Allel MT mit einer Häufigkeit von 40% und der Genotyp TT mit 10% auf (p = 1).

Tabelle 9: Häufigkeit der verschiedenen Genotypen der Mutation Apolipoprotein Kringle IV Met75Thr in den einzelnen Studiengruppen

	Kontrollgruppe	Unauffällige Koronarangiographie	Beginnende KHK	Patienten KHK1-3	p-Wert
Met75Thr	n= 90	n= 36	n= 22	n= 135	0.834
MM	45 (50%)	17 (47.2%)	14 (63.6%)	67 (49.6%)	
MT	36 (40%)	17 (47.2%)	7 (31.8%)	55 (40.7%)	
TT	9 (10%)	2 (5.5%)	1 (4.5%)	13 (9.6%)	

Met75Thr: Apolipoprotein Kringle IV MM = Wildtyp, MT = Heterozygote, TT = Homozygote Träger

Abbildung 16: Häufigkeit der verschiedenen Genotypen der Mutation Apolipoprotein Kringle IV Met75Thr in den einzelnen Studiengruppen

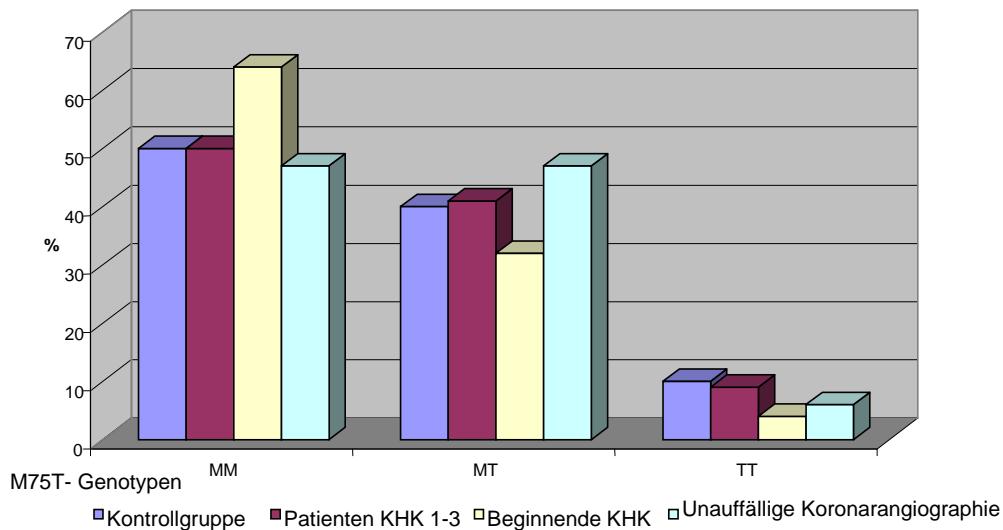


Tabelle 10: Odds Ratio für das Auftreten der Apolipoprotein Kringle IV Met75Thr-Mutation Genotyp MT bzw. TT und p-Wert nach exaktem Fisher-Test

Met75Thr (MM vs. MT/ TT)	Odds Ratio	95%- Konfidenzintervall	p-Wert (nach Fisher)
Kontrollgruppe	1.0	0.8 -1.3	1.0
Patientenkollektiv KHK 1-3	0.9	0.8 - 1.3	

ICAM-1 469C→T - Polymorphismus

Für den ICAM-1 469C→T - Polymorphismus ergeben sich folgende Erkenntnisse:

Der heterozygote Genotyp CT macht in allen vier Gruppen den Haupanteil (mindestens 45%) aller drei Allelformen aus. Der homozygote Genotyp TT kommt hauptsächlich in der Kontrollgruppe vor.

Tabelle 11: Häufigkeit der verschiedenen Genotypen der Mutation ICAM-1 469C→T in den einzelnen Studiengruppen

	Kontrollgruppe	Unauffällige Koronarangiographie	Beginnende KHK	Patienten KHK1-3	p - Wert
ICAM-1 469C→T	n= 90	n= 36	n= 23	n= 135	
CC	26 (28.8%)	14 (38.8%)	7 (30.4%)	44 (32.6%)	
CT	40 (44.4%)	19 (52.7%)	12 (52.2%)	75 (55.5%)	0.080
TT	24 (26.6%)	3 (8.3%)	4 (17.4%)	16 (11.8%)	

ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule CC = Wildtyp, CT = Heterozygote, TT= Homozygote Träger

Abbildung 17: Häufigkeit der verschiedenen Genotypen der Mutation ICAM-1 469C→T in den einzelnen Studiengruppen

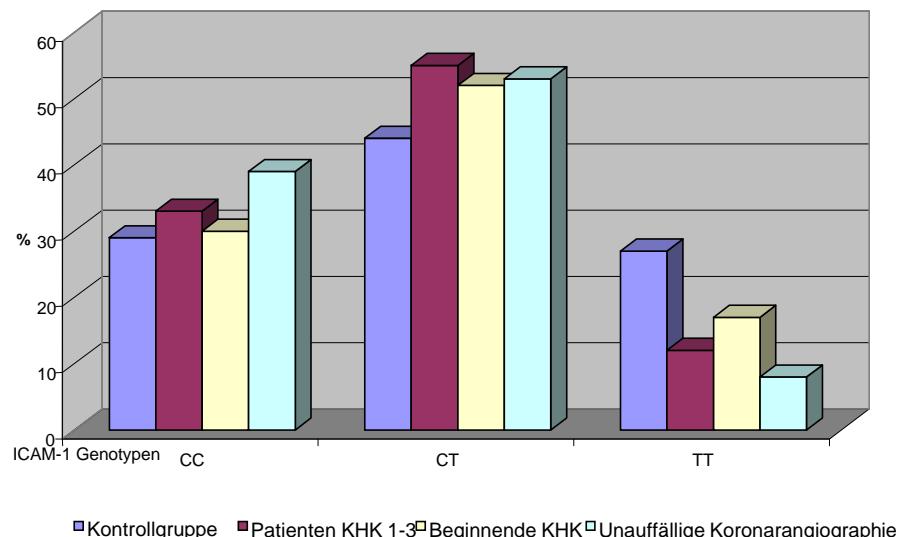


Tabelle 12: Odds Ratio für das Auftreten der ICAM-1 469C→T - Mutation Genotyp CT bzw. TT und p-Wert nach exaktem Fisher-Test

ICAM-1 469C→T (CC vs CT/ TT)	Odds Ratio	95%- Konfidenzintervall	p- Wert (nach Fisher)
Kontrollgruppe	1.0	0.6 -1.3	0.659
Patientenkollektiv KHK 1-3	0.8	0.8 - 1.3	

MCP-1 2518A→G - Polymorphismus

Tabelle 13 und Abbildung 18 zeigen die Häufigkeiten der einzelnen Genotypen AA, AG und GG für MCP-1 in den verschiedenen Studiengruppen Kontrollgruppe, Unauffällige Koronarangiographie, Beginnende KHK und Patienten KHK1-3.

In allen vier Gruppen macht der AA-Genotyp zahlenmäßig den größten Anteil aus und liegt hier jeweils in mindestens 50% vor.

Träger des GG-Genotyps für den MCP-1 2518A→G - Polymorphismus findet man insbesondere bei den Patienten mit KHK-Stadium 1-3, gefolgt von den Patienten mit beginnender KHK und unauffälliger Koronarangiographie. In der Kontrollgruppe macht die homozygote Zustandsform des MCP-1 2518A→G - Polymorphismus 5% aus.

Tabelle 13: Häufigkeit der verschiedenen Genotypen der Mutation MCP-1 2518A→G in den einzelnen Studiengruppen

Kontrollgruppe		Unauffällige Koronarangiographie	Beginnende KHK	Patienten KHK1-3	p - Wert
MCP-1 2518A→G	n= 90	n= 36	n= 23	n= 135	0.225
	AA	60 (66%)	17 (47%)	15 (65%)	
	AG	25 (27%)	16 (45%)	6 (26%)	
	GG	5 (5%)	3 (8.3%)	2 (8.6%)	

MCP-1: Monocyte-chemoattractant-Protein AA = Wildtyp, AG = Heterozygote Träger, GG = Homozygote Träger

Abbildung 18: Häufigkeit der verschiedenen Genotypen der Mutation MCP-1 in den einzelnen Studiengruppen

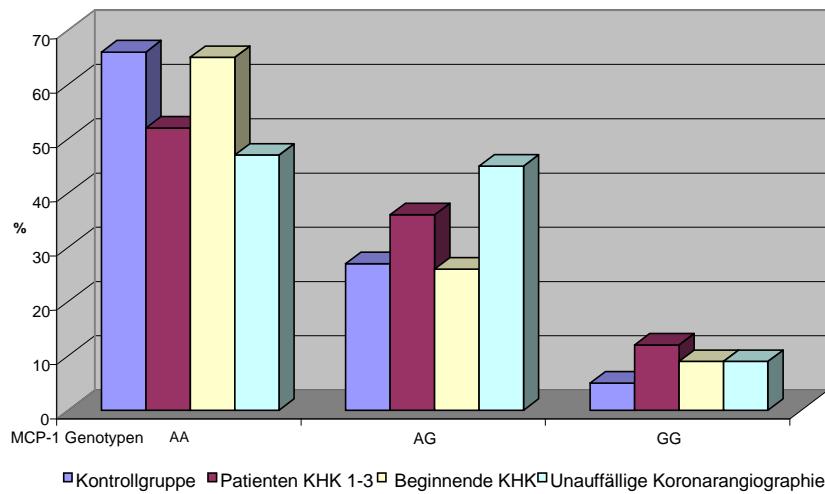


Tabelle 14: Odds Ratio für das Auftreten der MCP-1 2518A→G - Mutation Genotyp AG/ GG und p-Wert nach exaktem Fisher-Test

MCP-1 2518A→G (AA vs AG/ GG)	Odds Ratio	95%- Konfidenzintervall	p - Wert (nach Fisher)
Kontrollgruppe	1.0	1.0 -1.6	0.029
Patientenkollektiv KHK 1-3	0.7	0.5 – 0.973	

MTHFR 677C→T - Polymorphismus

Aus der Tabelle 15 und der Abbildung 19 geht hervor, dass auch für den MTHFR 677C→T - Polymorphismus insbesondere für die beiden Studiengruppen Kontrollgruppe und Patienten KHK 1-3 fast identische Ergebnisse bezüglich der Häufigkeit der verschiedenen Allelformen vorliegen. In diesen beiden Gruppen liegt mit knapp 60% hauptsächlich der heterozygote Genotyp vor. Zudem gibt es in der Patientengruppe KHK 1-3 weniger Träger des homozygoten Genotyps TT als in der Kontrollgruppe.

Tabelle 15: Häufigkeit der verschiedenen Genotypen der Mutation MTHFR 677C→T in den einzelnen Studiengruppen

	Kontrollgruppe	Unauffällige Koronarangiographie	Beginnende KHK	Patienten KHK1-3	p – Wert
MTHFR 677C→T	n= 88	n= 36	n= 23	n= 134	
CC	28 (31.8%)	10 (27.7%)	12 (52.2%)	45 (33.6%)	0.086
CT	51 (58.0%)	18 (50.0%)	8 (34.8%)	79 (59.0%)	
TT	9 (10.2%)	8 (22.2%)	3 (13.0%)	10 (7.6%)	

MTHFR : Methylentetrahydrofolatreduktase CC = Wildtyp, CT = Heterozygote, TT = Homozygote Träger

Abbildung 19: Häufigkeit der verschiedenen Genotypen der Mutation MTHFR 677 C→T in den einzelnen Studiengruppen

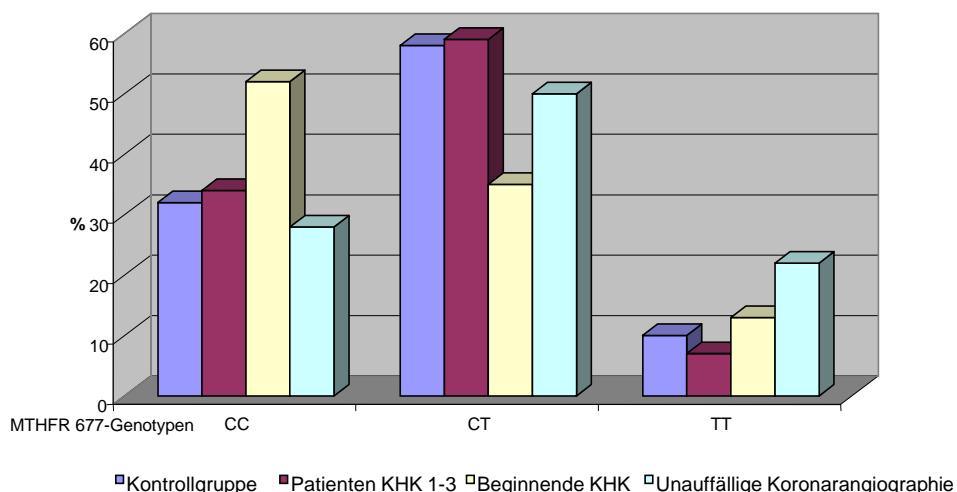


Tabelle 16: Odds Ratio für das Auftreten der Mutation MTHFR 677C→T - Mutation Genotyp CT bzw. TT und p-Wert nach exaktem Fisher-Test

MTHFR 677C→T (CC vs CT/ TT)	Odds Ratio	95%- Konfidenzintervall	p – Wert (nach Fisher)
Kontrollgruppe	1.0	0.6 -1.4	p = 0.884
Patientenkollektiv KHK 1-3	0.9	0.8- 1.2	

7.3 Ausmaß der Koronaren Herzkrankheit und Gen- Polymorphismen

Verschiedene Genotypverteilung innerhalb der Patientengruppe mit Ein-/Zwei- und Dreigefäßerkrankung

Die folgenden Tabellen 17 – 23 und Abbildungen 20 – 26 stellen die Häufigkeit der verschiedenen Genotypen der einzelnen Mutationen innerhalb der Patientengruppe dar. Betrachtet wird hierbei das Patientenkollektiv mit entweder Ein-, Zwei- oder Dreigefäßerkrankung. Innerhalb dieser Gruppe überwiegen zahlenmäßig die Patienten mit Dreigefäßerkrankung (49 %).

PONA Arg192Gln - Polymorphismus

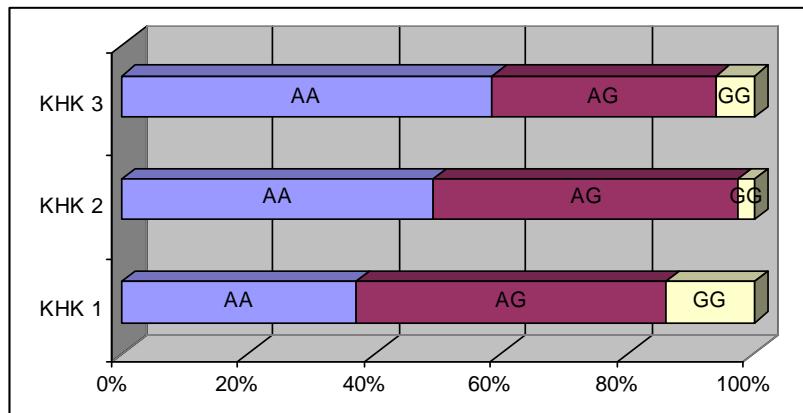
Für den PONA Arg192Gln - Polymorphismus zeigen sich folgende Resultate: Die KHK-Gruppe 1 weist im Vergleich zu den beiden anderen Patientengruppen mit KHK-Schweregrad 2 und 3 den höchsten Anteil an Trägern der AG- und GG –Genotypen auf. Der Genotyp AA (Wildtyp) kommt hier wesentlich seltener vor als in der KHK-Gruppe mit Schweregrad 2 oder gar Schweregrad 3. Bei den Patienten mit KHK-Stadium 3 lässt sich hauptsächlich der Genotyp AA (Wildtyp) nachweisen (58%).

Tabelle 17: Häufigkeit der verschiedenen Genotypen der Mutation PONA Arg192Gln innerhalb der Patientengruppe

	KHK 1	KHK 2	KHK 3	p- Wert
PONA Arg192Gln	n= 35	n= 34	n= 65	
AA	13 (37%)	20 (59%)	38 (58%)	0.163
AG	17 (49%)	13 (38%)	23 (35%)	
GG	5 (14%)	1 (3%)	4 (6%)	

PONA: Paraoxonase AA = Wildtyp, AG = Heterozygote, GG = Homozygote Träger

Abbildung 20: Häufigkeit der verschiedenen Genotypen der Mutation PONA Arg192Gln innerhalb der Patientengruppe



PONA Met55Leu - Polymorphismus

Auch für den PONA Met55Leu - Polymorphismus wird in der dargestellten Tabelle 18 und der Abbildung 21 ersichtlich, dass keine Korrelation zwischen Schweregrad der KHK-Erkrankung und dem Genotyp des Polymorphismus besteht.

In der Patientengruppe mit KHK-Stadium 1 lassen sich mit 17% die meisten Träger des LL-Genotyps nachweisen, gefolgt von den Patienten mit Schweregrad 2. In der KHK-Gruppe mit Stadium 3, in der zwar die meisten Träger des ML-Allels bestehen, gibt es die wenigsten Träger des LL-Genotyps.

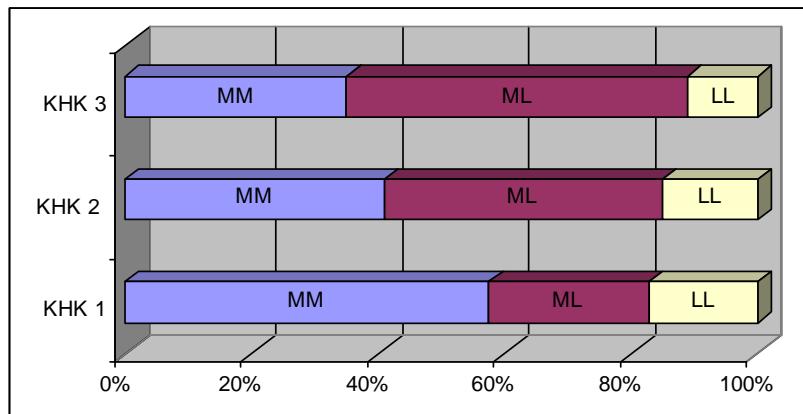
Tabelle 18: Häufigkeit der verschiedenen Genotypen der Mutation PONA Met55Leu innerhalb der Patientengruppe

	KHK 1	KHK 2	KHK 3	p-Wert
PONA Met55Leu	n= 35	n= 34	n= 66	
MM	20 (57%)	14 (41%)	23 (35%)	0.100
ML	9 (25%)	15 (44%)	36 (54%)	
LL	6 (17%)	5 (15%)	7 (11%)	

PONA: Paraoxonase

MM = Wildtyp, ML = Heterozygote, LL = Homozygote Träger

Abbildung 21: Häufigkeit der verschiedenen Genotypen der Mutation PONA Met55Leu innerhalb der Patientengruppe



APOA-V 1131T→C - Polymorphismus

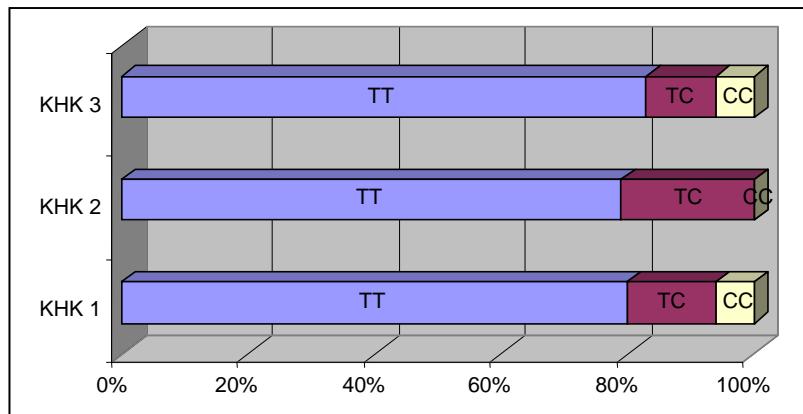
Wie aus der Tabelle 19 und der Abbildung 22 hervorgeht, besteht auch hier keine Korrelation zwischen Schweregrad des KHK-Stadiums und dem Vorliegen des Genotyps TC und CC. In allen drei KHK-Stadien liegt in 80% der homozygote Genotyp TT (Wildtyp) vor. Die heterozygote Allelform TC tritt prozentual am meisten in der Patientengruppe mit KHK-Stadium 2 auf. In dieser Gruppe lässt sich der Genotyp CC nicht nachweisen. Der Genotyp CC tritt in den KHK- Gruppen 1 und 3 mit jeweils 6% gleichermaßen häufig auf.

Tabelle 19: Häufigkeit der verschiedenen Genotypen der Mutation APOA-V 1131T→C innerhalb der Patientengruppe

	KHK 1	KHK 2	KHK 3	p-Wert
APOA-V 1131T→C	n= 35	n= 34	n= 66	
TT	28 (80%)	27 (79%)	55 (83%)	0.452
TC	5 (14%)	7 (21%)	7 (11%)	
CC	2 (6%)	0	4 (6%)	

APOA-V: Apolipoprotein- AV CC = Wildtyp, CT = Heterozygote, TT = Homozygote Träger

Abbildung 22: Häufigkeit der verschiedenen Genotypen der Mutation APOA-V 1131T→C innerhalb der Patientengruppe



Apolipoprotein Kringle IV Met75Thr - Polymorphismus

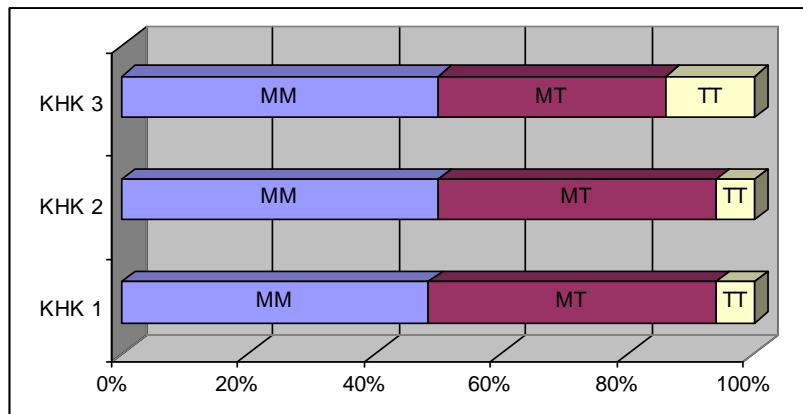
Bei der Überprüfung des Met75Thr – Polymorphismus im Apolipoprotein Kringle IV in der Patientengruppe zeigt sich, dass in allen drei KHK-Stadien in über 50% der homozygote Genotyp MM (Wildtyp) vorliegt. In den beiden Patientengruppen KHK 1 und 2 zeigt sich auch für die beiden anderen Genotypen MT (45%) und TT (6%) kein Unterschied. In der Gruppe mit KHK-Stadium 3 gibt es mit 14% die meisten Träger des TT-Genotyps.

Tabelle 20: Häufigkeit der verschiedenen Genotypen der Mutation Apolipoprotein Kringle IV Met75Thr innerhalb der Patientengruppe

	KHK 1	KHK 2	KHK 3	p - Wert
Met75Thr	n= 35	n= 34	n= 66	
MM	17 (49%)	17 (50%)	33 (50%)	0.595
MT	16 (46%)	15 (44%)	24 (36%)	
TT	2 (6%)	2 (6%)	9 (14%)	

Met75Thr Apolipoprotein Kringle IV MM = Wildtyp, MT = Heterozygote, TT = Homozygote Träger

Abbildung 23: Häufigkeit der verschiedenen Genotypen der Mutation Apolipoprotein Kringle IV Met75Thr innerhalb der Patientengruppe



ICAM-1 469C→T - Polymorphismus

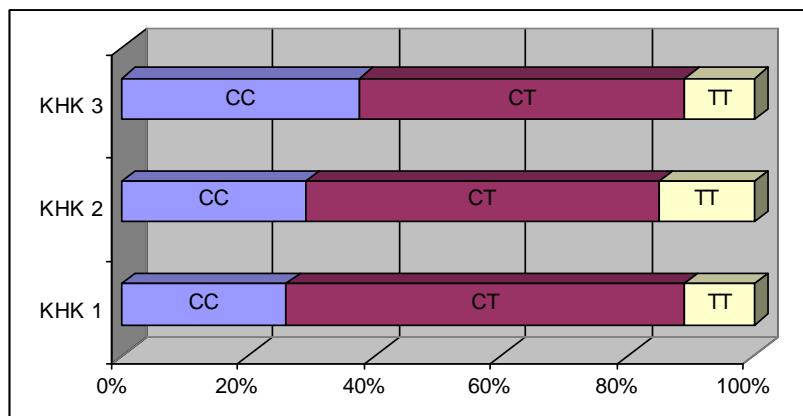
Für alle drei KHK-Gruppen liegen im wesentlichen fast übereinstimmende Ergebnisse bezüglich der Häufigkeit der verschiedenen Allelformen vor. Es besteht keine Korrelation zwischen dem Ausmaß der KHK und dem Genotyp.

Tabelle 21: Häufigkeit der verschiedenen Genotypen der Mutation ICAM-1 469C→T innerhalb der Patientengruppe

	KHK 1	KHK 2	KHK 3	p - Wert
ICAM-1 469C→T	n= 35	n= 34	n= 66	
CC	9 (26%)	10 (29%)	25 (38%)	0.729
CT	22 (63%)	19 (56%)	34 (52%)	
TT	4 (11%)	5 (15%)	7 (11%)	

ICAM: Intercellular Adhesion Molecule CC = Wildtyp, CT = Heterozygote, TT= Homozygote Träger

Abbildung 24: Häufigkeit der verschiedenen Genotypen der Mutation ICAM-1 innerhalb der Patientengruppe



MCP-1 2518A→G - Polymorphismus

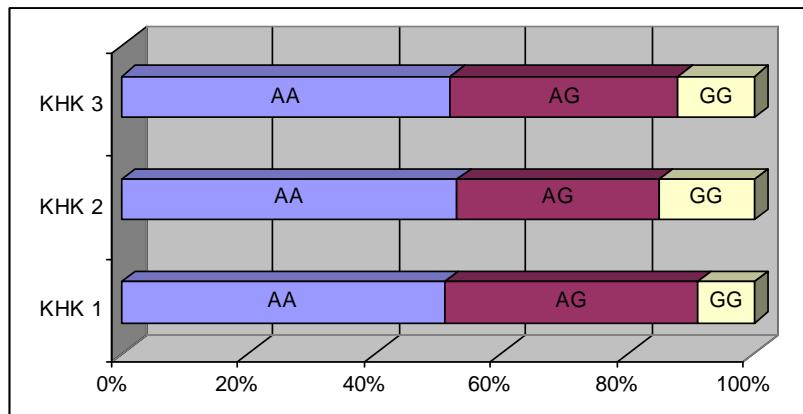
Wie aus der Tabelle 22 und der Abbildung 25 zu entnehmen, besteht keine Korrelation zwischen Schweregrad des KHK-Stadiums und dem Vorliegen des homozygoten Genotyps GG des MCP-1- 2518A→G - Polymorphismus. In allen drei KHK-Stadien liegt in über 50% der homozygote Genotyp AA (Wildtyp) vor. Die heterozygote Allelform AG tritt prozentual am meisten in der Patientengruppe mit KHK- Stadium 1 auf. Den höchsten Anteil am homozygoten Genotyp GG weist die Patientengruppe mit KHK Stadium 2 auf.

Tabelle 22: Häufigkeit der verschiedenen Genotypen der Mutation MCP-1 2518A→G innerhalb der Patientengruppe

	KHK 1	KHK 2	KHK 3	p - Wert
MCP-1 2518A→G	n= 35	n= 34	n= 66	
AA	18 (51%)	18 (53%)	34 (52%)	0.932
AG	14 (40%)	11 (32%)	24 (36%)	
GG	3 (8.6%)	5 (15%)	8 (12%)	

MCP-1: Monocyte-chemoattractant-Protein AA = Wildtyp, AG = Heterozygote, GG = Homozygote Träger

Abbildung 25: Häufigkeit der verschiedenen Genotypen der Mutation MCP-1 2518A→G innerhalb der Patientengruppe



MTHFR 677C→T- Polymorphismus

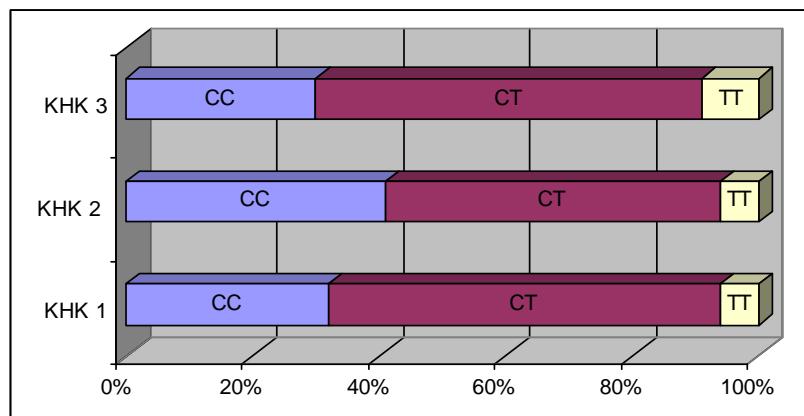
Betrachtet man Tabelle 23 und Abbildung 26, so zeigt sich, dass auch für den MTHFR 677C→T - Polymorphismus kein wesentlicher Unterschied zwischen den verschiedenen KHK-Stadien und der Allelhäufigkeit besteht. Es besteht auch hier keine Korrelation zwischen dem Ausmaß der KHK und dem Genotyp.

Tabelle 23: Häufigkeit der verschiedenen Genotypen der Mutation MTHFR 677C→T innerhalb der Patientengruppe

	KHK 1	KHK 2	KHK 3	p - Wert
MTHFR 677C→T	n= 34	n= 34	n= 66	
CC	11 (32%)	14 (41%)	20 (30%)	0.816
CT	21 (62%)	18 (53%)	40 (61%)	
TT	2 (6%)	2 (6%)	6 (9%)	

MTHFR: Methylentetrahydrofolatreduktase CC = Wildtyp, CT = Heterozygote, TT = Homozygote Träger

Abbildung 26: Häufigkeit der verschiedenen Genotypen der Mutation MTHFR 677C→T innerhalb der Patientengruppe



7.4 Einfluss des Genotyps auf ausgewählte Laborparameter

Untersuchung laborchemischer Parameter bezogen auf die einzelnen Genpolymorphismen innerhalb der Patientengruppe mit Ein-/Zwei- und Dreigefäßerkrankung

In den folgenden Tabellen wird mittels der univariaten Analyse nach Mann-Whitney-T innerhalb der Patientengruppe untersucht, ob ein signifikanter Unterschied bezüglich unten aufgeführter Laborparameter zwischen den Trägern des Wildtyps und dem Status „Heterozygot/ Homozygot „ besteht.

In Kapitel 7.4 wurden bei der Auswertung der Ergebnisse aufgrund der geringen Fallzahlen die heterozygoten und homozygoten Mutationen zusammengefasst.

Angegeben werden die Werte der 50. Perzentile, in Klammern stehen die Werte der 10. und 90. Perzentile.

Wie aus den einzelnen Tabellen 24 – 30 zu entnehmen, besteht für keine der untersuchten Mutationen ein signifikanter Unterschied zwischen heterozygoten/ homozygoten Trägern und dem Wildtyp und den untersuchten Laborparametern. Folglich war das ermittelte p stets größer als 0.05.

Tabelle 24: Univariate Analyse laborchemischer Parameter mittels Mann-Whitney-Test innerhalb der Patientengruppe mit Ein-/Zwei- und Dreigefäßerkrankung bezogen auf die PONA Arg192Gln - Mutation

PONA Arg192Gln	AA	AG + GG	P (Mann-Whitney-Test)
Cholesterin [mg/dl]	227 (152-305) n= 71	211 (158-280) n= 63	0.144
Triglyceride [mg/dl]	150 (82-289) n= 71	143 (83-255) n= 63	0.347
HDL-Cholesterin [mg/dl]	44 (29-65) n= 71	47 (33-71) n= 63	0.136
LDL-Cholesterin [mg/dl]	145 (100-233) n= 67	137 (94-202) n= 58	0.112
Lp(a) [mg/dl]	13 (6-94) n= 71	16 (6-113) n= 63	0.585
CRP [mg/l]	4 (0.12-18) n= 70	4 (0.24-23) n= 63	0.438
Hcyst [μmol/l]	15 (10-26) n= 65	15 (10-25) n= 57	0.718
Folsäure [ng/ml]	18 (10-28) n= 71	16 (10-33) n= 63	0.564
B12 [pg/ml]	264 (165-461) n= 71	256 (155-394) n= 63	0.755

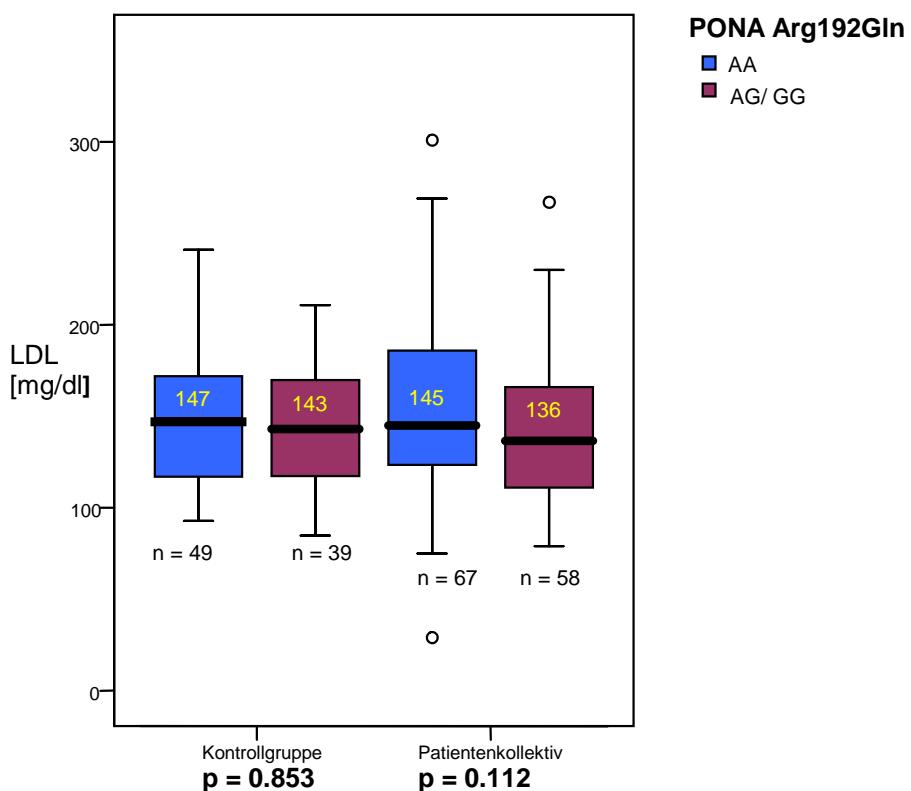
Angegeben sind jeweils die 50. (10.- 90.) Perzentile

HDL: High Density Lipoprotein, LDL: Low Density Lipoprotein, Lp (a): Lipoprotein (a)
CRP: C-reaktives Protein, Hcyst: Homocystein, B12: Vitamin B12

AA = Wildtyp, AG + GG = Heterozygote + Homozygote Träger

Boxplot 1:Einfluß der PONA Arg192Gln-Mutation auf den LDL-Spiegel in der Kontroll- und Patientengruppe

Es zeigt sich sowohl für die Kontrollgruppe als auch für das Patientenkollektiv KHK 1-3 kein signifikanter Einfluß des PONA Arg192Gln- Polymorphismus auf den LDL-Spiegel. Folglich weisen Träger des AG bzw. GG - Genotyps keine höheren Werte für LDL auf. Der p- Wert beträgt in beiden Fällen > 0.05.



Boxplot 2:Einfluß der PONA Arg192Gln-Mutation auf den HDL-Spiegel in der Kontroll- und Patientengruppe

Auch bezogen auf den HDL – Spiegel zeigt sich sowohl für die Kontrollgruppe als auch für das Patientenkollektiv KHK 1-3 kein signifikanter Einfluß des PONA Arg192Gln-Polymorphismus. Folglich weisen Träger des AG bzw. GG - Genotyps keine erniedrigten Werte für HDL auf; p- Wert > 0.05

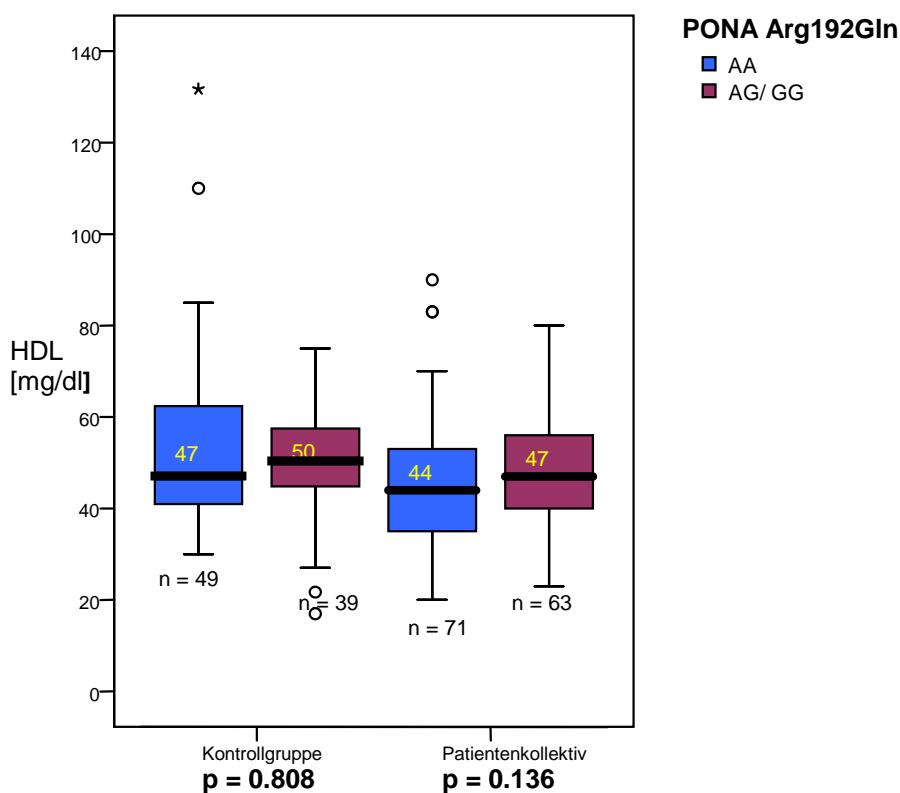


Tabelle 25: Univariate Analyse laborchemischer Parameter mittels Mann-Whitney-Test innerhalb der Patientengruppe mit Ein-/Zwei- und Dreigefäßerkrankung bezogen auf die PONA Met55Leu- Mutation

PONA Met55Leu	MM	ML + LL	P (Mann-Whitney- Test)
Cholesterin [mg/dl]	207 (156-289) n= 57	223 (159-300) n= 78	0.220
Triglyceride [mg/dl]	150 (83-261) n= 57	145 (83-289) n= 78	0.674
HDL-Cholesterin [mg/dl]	42 (31-70) n= 57	46 (34-66) n= 78	0.225
LDL-Cholesterin [mg/dl]	136 (94-217) n= 53	145 (103-231) n= 73	0.168
Lp(a) [mg/dl]	13 (6-105) n= 57	16 (6-101) n= 78	0.660
CRP [mg/l]	n= 57 5 (0.2- 32)	n= 77 4 (0.3-16)	0.405
Hcyst [μmol/l]	16 (10-27) n= 52	15 (10-22) n= 71	0.283
Folsäure [ng/ml]	16 (10- 31) n= 57	18 (11-29) n= 78	0.083
B12 [pg/ml]	261 (153-397) n= 57	261 (165-438) n= 78	0.769

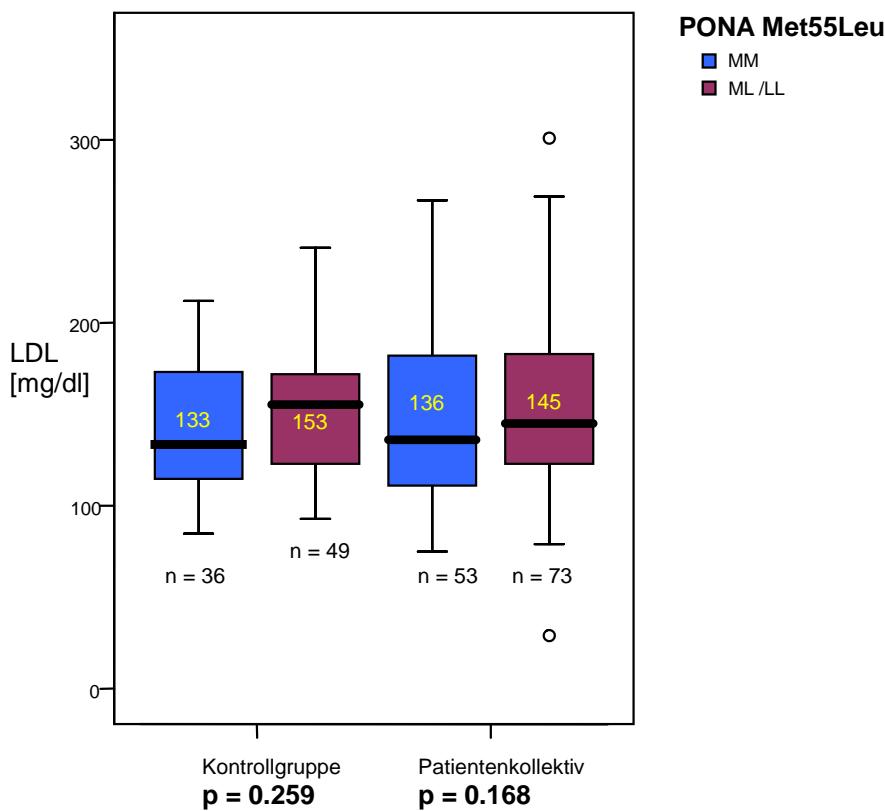
Angegeben sind jeweils die 50. (10.- 90.) Perzentile

HDL: High Density Lipoprotein, LDL: Low Density Lipoprotein, Lp (a): Lipoprotein (a)
CRP: C-reaktives Protein, Hcyst: Homocystein, B12: Vitamin B12

MM = Wildtyp, ML + LL = Heterozygote + Homozygote Träger

Boxplot 3:Einfluß der PONA Met55Leu-Mutation auf den LDL-Spiegel in der Kontroll- und Patientengruppe

Es wird deutlich, dass sowohl für die Kontrollgruppe als auch für das Patientenkollektiv KHK 1-3 kein signifikanter Einfluß des PONA Met55Leu-Polymorphismus auf den LDL- Spiegel besteht. Träger des ML bzw. LL- Genotyps weisen keine höheren LDL-Spiegel auf; p- Wert > 0.05.



Boxplot 4:Einfluß der PONA Met55Leu-Mutation auf den HDL-Spiegel in der Kontroll- und Patientengruppe

Aus Boxplot 4 geht ebenfalls hervor, dass in beiden untersuchten Studiengruppen keinerlei Abhängigkeit zwischen dem HDL- Spiegel und dem PONA Met55Leu-Polymorphismus besteht. Träger des ML bzw. LL- Genotyps weisen nicht erniedrigte HDL-Spiegel auf; p- Wert > 0.05.

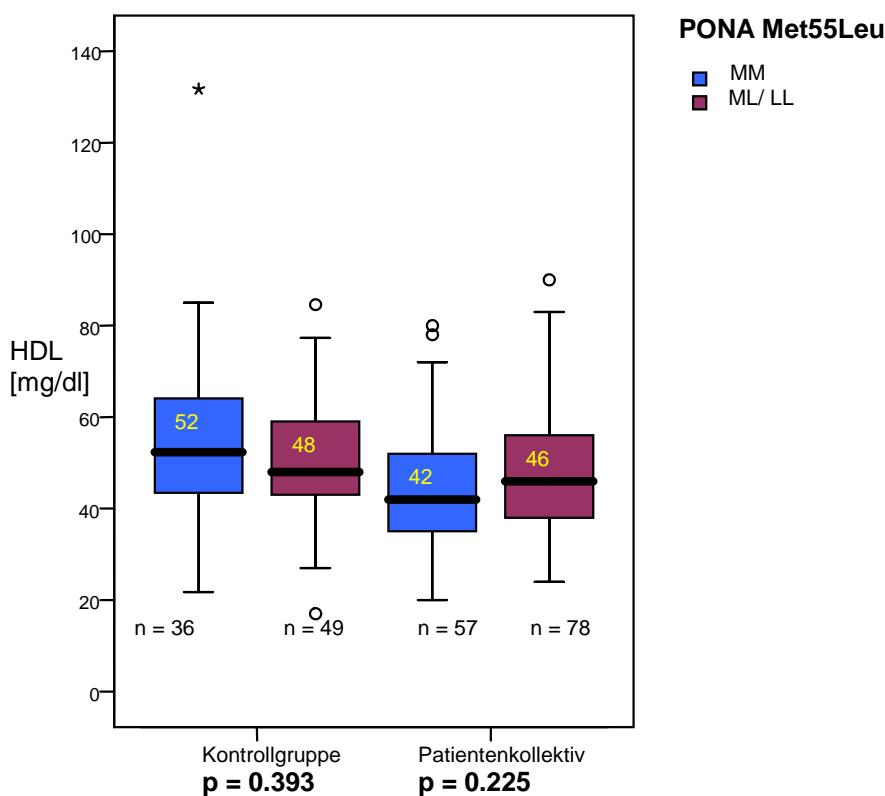


Tabelle 26: Univariate Analyse laborchemischer Parameter mittels Mann-Whitney-Test innerhalb der Patientengruppe mit Ein-/Zwei- und Dreigefäßerkrankung bezogen auf die APOA-V 1131T→C Mutation

APOA-V 1131T→C	TT	TC+ CC	P (Mann-Whitney- Test)
Cholesterin [mg/dl]	219 (157-296) n= 110	228 (166-312) n= 25	0.331
Triglyceride [mg/dl]	148 (82-281) n= 110	150 (100-241) n= 25	0.917
HDL-Cholesterin [mg/dl]	45 (32-65) n= 110	48 (30-81) n= 25	0.642
LDL-Cholesterin [mg/dl]	140 (98-223) n= 102	143 (98-242) n= 24	0.659
Lp(a) [mg/dl]	14 (6-104) n= 110	14 (6-104) n= 25	0.954
CRP [mg/l]	4 (0-22) n= 110	5 (0.6-43) n= 24	0.638
Hcyst [μmol/l]	15 (10-26) n= 101	15 (11-26) n= 22	0.784
Folsäure [ng/ml]	17 (10-29) n= 110	17 (8-31) n= 25	0.801
B12 [pg/ml]	261 (159-419) n= 110	259 (189-399) n= 25	0.971

Angegeben sind jeweils die 50. (10.- 90.) Perzentile

HDL: High Density Lipoprotein, LDL: Low Density Lipoprotein, Lp (a): Lipoprotein (a)
CRP: C-reaktives Protein, Hcyst: Homocysteine, B12: Vitamin B12

TT = Wildtyp, TC + CC = Heterozygote + Homozygote Träger

Boxplot 5:
Einfluß der APOA-V 1131T→C-Mutation auf den Triglyceridspiegel in der Kontroll- und Patientengruppe

Boxplot 5 zeigt, dass in beiden untersuchten Studiengruppen keinerlei Abhängigkeit zwischen dem Triglyceridspiegel und der APOA-V 1131T→C-Mutation besteht. Träger des TC bzw. CC-Genotyps weisen nicht höhere Triglyceridspiegel auf als Träger des LL-Genotyps; p-Wert > 0.05.

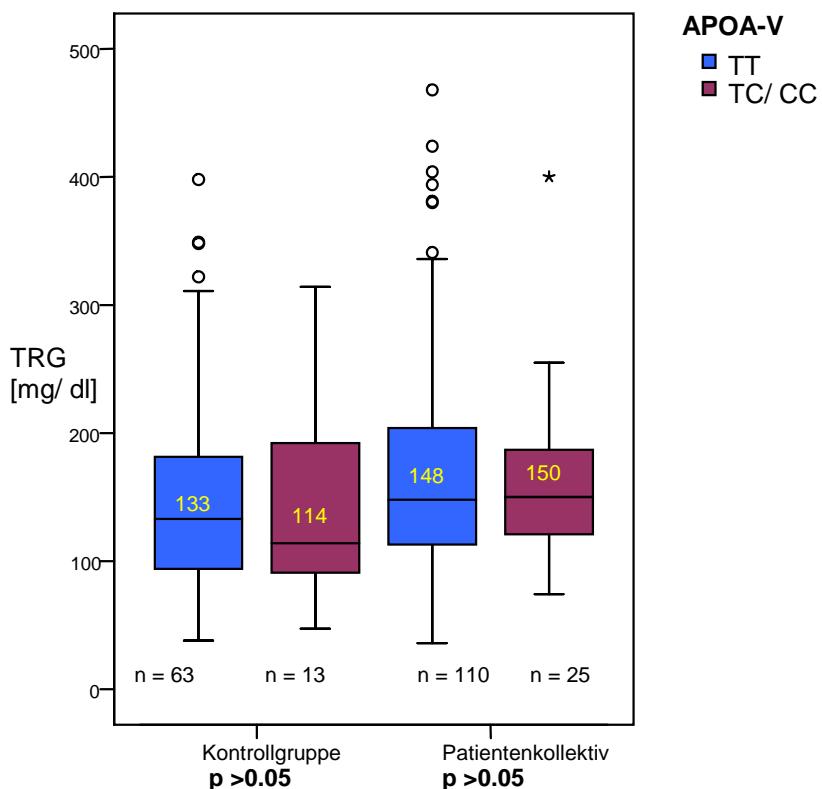


Tabelle 27: Univariate Analyse laborchemischer Parameter mittels Mann-Whitney-Test innerhalb der Patientengruppe mit Ein-/Zwei- und Dreigefäßerkrankung bezogen auf die Apolipoprotein Kringle IV Met75Thr -Mutation

Met75Thr	MM	MT + TT	P (Mann-Whitney-Test)
Cholesterin [mg/dl]	226 (151-283) n= 67	212 (158-300) n= 68	0.949
Triglyceride [mg/dl]	151 (96-283) n= 67	141 (81-260) n= 68	0.196
HDL-Cholesterin [mg/dl]	44 (31-70) n= 67	47 (32-66) n= 68	0.805
LDL-Cholesterin [mg/dl]	144 (99-203) n= 62	140 (96-231) n= 64	0.992
Lp(a) [mg/dl]	14 (6-90) n= 67	14 (6-115) n= 68	0.812
CRP [mg/l]	5 (0.7-18) n= 67	3 (0-23) n= 67	0.190
Hcyst [μmol/l]	16 (10-27) n= 60	15 (10-24) n= 63	0.695
Folsäure [ng/ml]	17 (10-29) n= 67	17 (10-32) n= 68	0.975
B12 [pg/ml]	263 (151-443) n= 67	252 (174-388) n= 68	0.591

Angegeben sind jeweils die 50. (10.- 90.) Perzentile

HDL: High Density Lipoprotein, LDL: Low Density Lipoprotein, Lp (a): Lipoprotein (a)

CRP: C-reaktives Protein, Hcyst: Homocystein, B12: Vitamin B12

MM = Wildtyp, MT + TT = Heterozygote + Homozygote Träger

Boxplot 6:Einfluß der Apolipoprotein Kringle IV Met75Thr-Mutation auf den Lp(a)-Spiegel in der Kontroll- und Patientengruppe

Aus Boxplot 6 geht hervor, dass in beiden untersuchten Studiengruppen keinerlei Abhängigkeit zwischen dem Apolipoprotein Kringle IV Met75Thr-Polymorphismus und dem Lp (a)- Spiegel besteht. Träger des MT bzw. TT-Genotyps weisen nicht erhöhte Lp(a)-Spiegel auf.

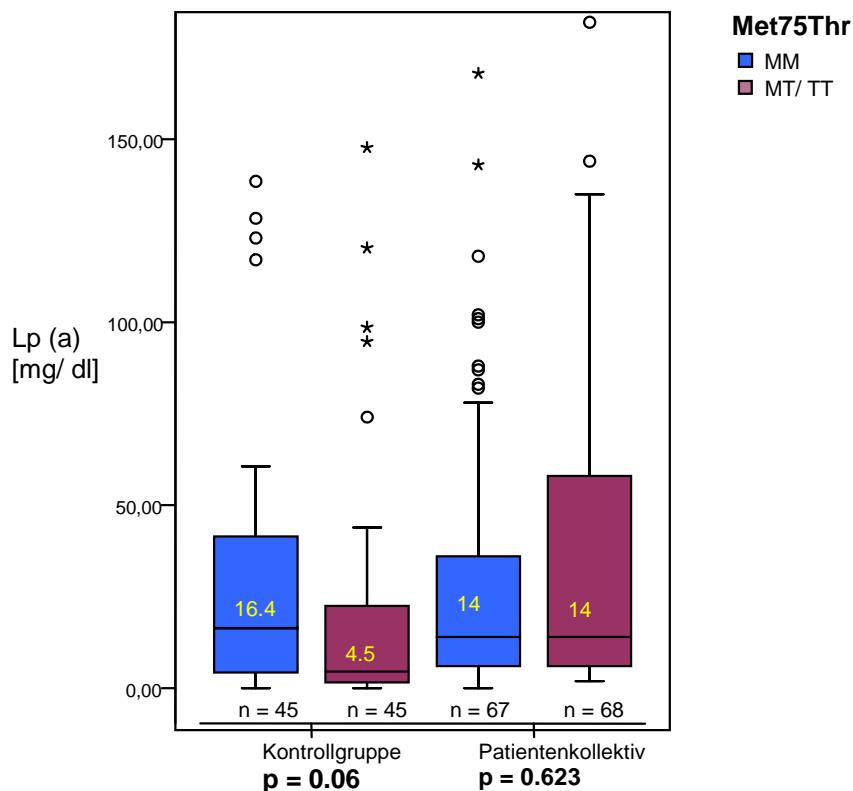


Tabelle 28: Univariate Analyse laborchemischer Parameter mittels Mann-Whitney-Test innerhalb der Patientengruppe mit Ein-/Zwei- und Dreigefäßerkrankung bezogen auf die ICAM-1 469C→T-Mutation

ICAM-1 469C→T	CC	CT + TT	P (Mann-Whitney- Test)
Cholesterin [mg/dl]	222 (159-290) n= 72	223 (170-284) n= 159	0.779
Triglyceride [mg/dl]	144 (79-265) n= 72	142 (73-281) n= 159	0.708
HDL-Cholesterin [mg/dl]	47 (30-71) n= 72	48 (32-71) n= 159	0.659
LDL-Cholesterin [mg/dl]	142 (99-206) n= 69	143 (100-209) n= 153	0.944
Lp(a) [mg/dl]	11 (3-95) n= 72	14 (2-102) n= 159	0.568
CRP [mg/l]	4 (0-15) n= 60	4 (0-14) n= 143	0.861
Hcyst [μmol/l]	15 (9-26) n= 69	13 (9-20) n= 150	0.215
Folsäure [ng/ml]	17 (10-31) n= 72	17 (10-33) n= 159	0.388
B12 [pg/ml]	261 (155-416) n= 72	274 (190-482) n= 159	0.191

Angegeben sind jeweils die 50. (10.- 90.) Perzentile

HDL: High Density Lipoprotein, LDL: Low Density Lipoprotein, Lp (a): Lipoprotein (a)
CRP: C-reaktives Protein, Hcyst: Homocystein, B12: Vitamin B12

CC = Wildtyp, CT + TT = Heterozygote + Homozygote Träger

Tabelle 29: Univariate Analyse laborchemischer Parameter mittels Mann-Whitney-Test innerhalb der Patientengruppe mit Ein-/Zwei- und Dreigefäßerkrankung bezogen auf die MCP-1 2518A→G-Mutation

MCP-1 2518A→G	AA	AG + GG	P (Mann-Whitney- Test)
Cholesterin [mg/dl]	224 (150-300) n= 70	211 (175-270) n= 65	0.656
Triglyceride [mg/dl]	154 (83-280) n= 70	143 (81-264) n= 65	0.609
HDL-Cholesterin [mg/dl]	42 (31-64) n= 70	48 (31-71) n= 65	0.069
LDL-Cholesterin [mg/dl]	144 (97-228) n= 64	140 (98-193) n= 62	0.446
Lp(a) [mg/dl]	13 (6-111) n= 70	16 (6-98) n= 65	0.349
CRP [mg/l]	4 (0.30-25) n= 70	4 (0.05-15) n= 64	0.176
Hcyst [μmol/l]	15 (9-25) n= 65	15 (10-26) n= 58	0.616
Folsäure [ng/ml]	17 (10-30) n= 70	17 (10-30) n= 65	0.979
B12 [pg/ml]	257 (165-419) n= 70	274 (152-408) n= 65	0.388

Angegeben sind jeweils die 50. (10.- 90.) Perzentile

HDL: High Density Lipoprotein, LDL: Low Density Lipoprotein, Lp (a): Lipoprotein (a)
CRP: C-reaktives Protein, Hcyst: Homocysteine, B12: Vitamin B12

AA = Wildtyp, AG + GG = Heterozygote + Homozygote Träger

Tabelle 30: Univariate Analyse laborchemischer Parameter mittels Mann-Whitney-Test innerhalb der Patientengruppe mit Ein-/Zwei- und Dreigefäßerkrankung bezogen auf die MTHFR 677C→T - Mutation

MTHFR 677C→T	CC	CT + TT	P (Mann-Whitney- Test)
Cholesterin [mg/dl]	213 (151-299) n= 45	222 (161-298) n= 89	0.974
Triglyceride [mg/dl]	143 (84-269) n= 45	150 (81-278) n= 89	0.790
HDL-Cholesterin [mg/dl]	46 (30-69) n= 45	45 (32-66) n= 89	0.754
LDL-Cholesterin [mg/dl]	145 (95-227) n= 44	140 (100-221) n= 81	0.863
Lp(a) [mg/dl]	16 (6-107) n= 45	14 (6-102) n= 89	0.270
CRP [mg/l]	3.8 (0.1-16) n= 45	5 (0.3-24) n= 88	0.584
Hcyst [μmol/l]	16 (10-26) n= 40	14 (9-26) n= 82	0.529
Folsäure [ng/ml]	19 (11-33) n= 45	16 (10-28) n= 89	0.114
B12 [pg/ml]	261 (155-414) n= 45	261 (175-411) n= 89	0.871

Angegeben sind jeweils die 50. (10.- 90.) Perzentile

HDL: High Density Lipoprotein, LDL: Low Density Lipoprotein, Lp (a): Lipoprotein (a)
CRP: C-reaktives Protein, Hcyst: Homocysteine, B12: Vitamin B12

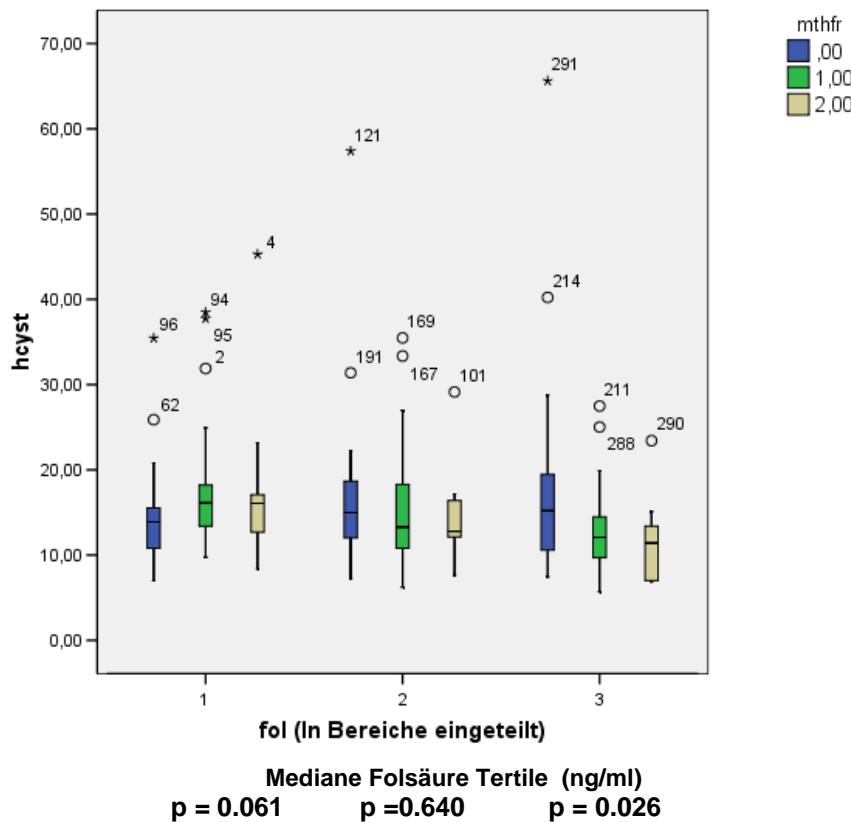
CC = Wildtyp, CT + TT = Heterozygote + Homozygote Träger

Boxplot 7Einfluß der MTHFR 677C→T-Mutation auf den Plasma-Homocysteinspiegel im Gesamtkollektiv in den verschiedenen Folsäure-Tertilen

Das Gesamtkollektiv – bestehend sowohl aus Patienten als aus Kontrollen - wurde in drei verschiedene Folsäure-Tertile unterteilt. In jedem Tertile wurde der Plasma-Homocysteinspiegel bezogen auf die verschiedenen MTHFR-Genotypen gemessen.

(0 = CC (Wildtyp), 1 = CT (Heterozygot), 2 = TT (Homozygot))

Für die unterste Tertile beträgt der p-Wert 0,061, für die mittlere Tertile $p = 0,640$ und in der höchsten Tertile $p = 0,026$. Es wird deutlich, dass die unterste Tertile nicht mit einer hohen Prävalenz an der homozygoten MTHFR-677-Mutation einhergeht und insbesondere hier nicht höhere Homocysteinspiegel vorliegen.



7.5 Vergleich laborchemischer Parameter der Patientengruppe mit Ein - Dreigefäßerkrankung und der Kontrollgruppe

In der folgenden Tabelle erfolgt der Vergleich der Kontrollgruppe mit der Patientengruppe mit Ein-/Zwei- und Dreigefäßerkrankung (KHK 1-3) bezüglich konventioneller Risikofaktoren wie die der Fettstoffwechselstörungen (Cholesterin, High Density Lipoprotein (HDL), Low Density Lipoprotein (LDL), Lipoprotein (a) (Lp (a)).

Des weiteren werden neuere Risikofaktoren wie die der Inflammation (C-reaktives Protein (CRP)) und die der Hyperhomocystämie (Homocystein (Hcyst))/ Folsäure und Vitamin B12 (B12) betrachtet.

Angegeben werden die Werte der 50. Perzentile, in Klammern stehen jeweils die Werte der 10. und 90. Perzentile.

Aus der Tabelle 31 wird ersichtlich, dass lediglich für das CRP ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollgruppe und der Patientengruppe besteht. Für alle weiteren untersuchten laborchemischen Parameter ergab die univariate Analyse nach Mann-Whitney-T keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Patientengruppe. Das ermittelte p war hier stets größer als 0.05.

Tabelle 31: Vergleich laborchemischer Parameter zwischen der Patientengruppe mit Ein- Zwei- und Dreigefäßkrankung und der Kontrollgruppe

	Kontrollgruppe	Patienten KKK 1-3	P (Mann-Whitney- Test)
Cholesterin [mg/dl]	222 (176-274) n= 93	221 (158-297) n= 135	0.327
Triglyceride [mg/dl]	133 (63-263) n= 93	149 (83-275) n= 135	0.410
HDL-Cholesterin [mg/dl]	50 (33-75) n= 93	45 (32-66) n= 135	0.989
LDL-Cholesterin [mg/dl]	144 (102-202) n= 93	140 (98-224) n= 126	0.171
Lp(a) [mg/dl]	11 (0.2- 97) n= 93	14 (6-102) n= 135	0.282
CRP [mg/l]	2.65 (0.3-9) n= 64	4.1 (0.25-22) n= 134	0.020
Hcyst [µmol/l]	11.3 (8-17) n= 93	15.2 (10-26) n= 123	0.539
Folsäure [ng/ml]	17 (10-40) n= 93	17 (10-30) n= 135	0.434
B12 [pg/ml]	267 (194-524) n= 93	260 (165-410) n= 135	0.260

Angegeben sind jeweils die 50. (10.- 90.) Perzentile

HDL: High Density Lipoprotein, LDL: Low Density Lipoprotein, Lp (a): Lipoprotein (a)
CRP: C-reaktives Protein, Hcyst: Homocystein, B12: Vitamin B12

8. Diskussion

Die zunehmende Prävalenz der pathobiochemisch sehr komplexen KHK erfordert die Miteinbeziehung genetischer Diagnostik in therapeutische Maßnahmen und präventive Strategien.

Mit der vorliegenden Studie sollte geklärt werden, ob die hier untersuchten Genpolymorphismen mit einer erhöhten Suszeptibilität für die Koronare Herzerkrankung einhergehen und damit Genpolymorphismen generell zur Vorhersage für die Entstehung der KHK herangezogen werden können.

8. 1 Paraoxonase (PONA) Arg192Gln/ Paraoxonase (PONA) Met55Leu und KHK

Die oxidative Modifizierung von LDL spielt bei der Entstehung der KHK eine wichtige Rolle. Das in der Leber gebildete und auf dem Lipoprotein HDL lokalisierte Enzym Paraoxonase (PONA) vermag die Oxidation von LDL zu verhindern und scheint daher einen Einfluß auf die Entstehung der KHK zu haben (DURRINGTON et al, 2001, CHEN et al, 2003).

Zwei Polymorphismen im *PON1* (Leu55Met und Arg192Gln) - einhergehend mit einer verminderten Aktivität der antioxidativen Fähigkeit - sind bekannt und wurden daher mit der Entstehung der KHK assoziiert (CHEN et al, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurden diese beiden Polymorphismen PONA Arg192Gln und PONA Met55Leu untersucht.

PONA Arg192Gln

Vergleicht man die Häufigkeitsverteilung der Allelfrequenzen des Polymorphismus PONA Arg192Gln in den beiden Studiengruppen Patientenkollektiv und Kontrollgruppe, so lässt sich kein wesentlicher Unterschied feststellen. Es lassen sich im Patientenkollektiv nicht mehr Träger des GG-Genotyps nachweisen als in der Kontrollgruppe.

Folglich beträgt der p-Wert jeweils > 0.05 . Betrachtet man die Allelhäufigkeit innerhalb der Patientengruppe, zeigen sich in der Patientengruppe mit unauffälliger Koronarangiographie überwiegend Träger des AG-Allels.

Der GG - Genotyp liegt hauptsächlich in der Gruppe mit beginnender KHK vor. In der Patientengruppe KHK 1-3 liegen überwiegend Träger des AA-Genotyps vor.

Hier lässt sich also ebenso wenig eine Korrelation für den Schweregrad der KHK aufzeigen.

In der Literatur wird die Assoziation des PONA Arg192Gln - Polymorphismus zur KHK sehr kontrovers diskutiert.

SERRATO et al, 1995, gehörten mit zu den ersten, die den PONA Arg192Gln-Polymorphismus als genetischen Risikofaktor der KHK beschrieben.

Es folgten viele weitere Fall-Kontroll-Studien, die ebenfalls einen Zusammenhang zwischen dem PONA Arg192Gln - Polymorphismus und der KHK feststellen konnten (ZAMA et al, 1997, SANGHERA, et al 1998, IMAI et al, 2000, CHEN et al, 2003).

Allerdings wurde in mindestens genauso vielen Studien eine Assoziation zwischen dem PONA Arg192Gln - Polymorphismus und der KHK widerlegt (OMBRES, et al, 1998, KO et al, 1998, CASCORBI et al, 1999, GARDEMANN et al, 2000, TURBAN et al, 2000, AYNACIOGLU et al, 2000).

PONA Met55Leu

Der ML - und LL - Genotyp des PONA Met55Leu - Polymorphismus kommt in den Studiengruppen gleichermaßen häufig vor. Insbesondere für die beiden Gruppen Kontrollgruppe und Patienten KHK 1-3 zeigen sich keine wesentlichen Unterschiede für die verschiedenen Allelformen von PONA Met55Leu. Der p- Wert beträgt hier 1.0.

Der PONA Met55Leu - Polymorphismus beeinflusst ebenso wenig den Schweregrad der KHK. In der Patientengruppe mit KHK-Stadium 1 lassen sich mit 17% die meisten Träger des LL – Genotyps nachweisen, gefolgt von den Patienten mit Schweregrad 2. In der KHK-Gruppe mit Stadium 3, in der zwar die meisten Träger des ML-Allels bestehen, gibt es die wenigsten Träger des LL – Genotyps. Auch bezüglich des PONA Met55Leu - Polymorphismus gibt es uneinheitliche Ergebnisse in der Literatur. Allerdings existieren zum PONA Met55Leu - Polymorphismus insgesamt nur wenige Veröffentlichungen, die einen Zusammenhang zwischen dem PONA Met55Leu - Polymorphismus und der KHK postulieren (WATZINGER et al, 2002 CHI et al, 2006).

Bei der Mehrheit der Veröffentlichungen zum PONA Met55Leu - Polymorphismus stellt der LL - Genotyp kein erhöhtes Risiko für das Auftreten einer koronaren Herzerkrankung dar (SANGHERA et al, 1998, CASCORBI et al, 1999, GARDEMANN et al, 2000, ARCA et al, 2002). Nach OLIVEIRA et al, 2004 stelle sogar der PONA Met55Leu - Polymorphismus einen protektiven Faktor dar und schütze vor einer koronaren Herzerkrankung.

PONA Arg192Gln/ PONA Met55Leu und Laborparameter

Bei der Untersuchung einzelner Parameter des Lipidstoffwechsels bezogen auf die verschiedenen Allelformen sowohl der PONA Arg192Gln - Mutation als auch die der PONA-Met55Leu -Mutation innerhalb der Patientengruppe mit Ein-/Zwei- und Dreigefäßerkrankung als auch in der Kontrollgruppe lässt sich erneut keine Korrelation aufzeigen. Folglich weisen Träger des GG - bzw. des LL - Genotyps keine höheren Werte für Cholesterin, LDL,

Triglyceride oder Lp (a) bzw. niedrigere Werte für HDL auf. Veranschaulicht wird dies auch in den Boxplots 1-4.

In der Metaanalyse von MACKNESS et al, 2001 wurden all jene Studien reevaluiert, die den Einfluß des PONA-Polymorphismus auf die KHK untersuchten. Hierbei war unter anderem eine Zunahme der GG-Genotypfrequenz des PONA Arg192Gln - Polymorphismus über die Jahre hinweg zu beobachten, was jedoch angesichts der Bias durch vermeintlich große Effekte in relativ kleinen Studiengruppen und eventuelle fehlende Veröffentlichung von Studien mit nichtsignifikanten Ergebnissen insgesamt nur mit großer Vorsicht betrachtet werden soll.

Überdies konnte mit der Metaanalyse wiederholt gezeigt werden, dass widersprüchliche Ergebnisse bezüglich des PONA-Polymorphismus und der KHK vorliegen.

MACKNESS et al, 2001, führen diese inhomogenen Resultate auf die Tatsache zurück, dass die bisherigen Studien die PONA-Aktivität und Konzentration nicht berücksichtigt haben. Die Autoren konnten in ihren Studien die Beobachtung machen, dass die KHK-Patienten geringere PONA-Aktivitäten und Konzentrationen ganz unabhängig vom Genotyp aufweisen als die gesunde Kontrollgruppe. Zusammenfassend empfehlen sie zur Klärung der Assoziation zur KHK eine zusätzliche Bestimmung der PONA-Aktivität und der PONA-Konzentration ergänzend zur Genotypisierung.

In der von MACKNESS et al, 2003 durchgeführten *Caerphilly Prospective Study*, wurde in einem Kollektiv bestehend aus 1353 Männern im Alter zwischen 49 und 65 Jahren mit Koronarer Herzerkrankung die Serum PON-1-Aktivität gemessen (MACKNESS B et al, 2003). Anhand der gewonnenen Ergebnisse konnten die Autoren schließen, dass eine niedrige PON-1-Aktivität einen unabhängigen Risikofaktor für das Auftreten von Koronarsyndromen bei Patienten mit Hoch-Risiko-KHK darstelle.

Bereits JARVIK et al, 2000 sowie BROPHY et al, 2000 erkannten, dass die alleinige Bestimmung des Genotyps zur Identifizierung des KHK-Risikos nicht ausreiche und zu falsch negativen Ergebnissen führen könne. Auch sie empfahlen daher die ergänzende Bestimmung der Enzymaktivität. So erzielt man in Zusammenschau des Genotyps mit dem Phänotyp eine bessere Vorhersagbarkeit des KHK-Risikos.

Die Tatsache, dass die Esterase PONA zwei verschiedene aktive Zentren besitzt und die antioxidative Wirkung mit der enzymatischen Fähigkeit und mit dem Genotyp nicht immer übereinstimmt, mag die teilweise widersprüchlichen Ergebnisse in den verschiedenen Studien erklären (KUREMOTO et al, 2003).

Während die Cysteingruppe an Position 283 unentbehrlich für die antioxidative Funktion und somit für die Protektion vor LDL-Oxidation zu sein scheint, läuft die hydrolytische Funktion von Organophosphaten ohne diese Cysteingruppe ab (AVIRAM et al, 1998).

Zudem gibt es eine Reihe von externen Faktoren, die die Aktivität von PONA beeinflussen. Nach JAMES et al, 2000, führt das Rauchen zu einer Abnahme der PONA-Aktivität und -Konzentration mit allerdings schneller Erholung nach kurzer Rauchpause.

Erniedrigte PONA-Spiegel im Serum seien häufiger mit einer schweren KHK und Beeinträchtigung der antioxidativen Kapazität assoziiert. Erniedrigte PON-1-Spiegel spielen auch in anderen wichtigen, mit der KHK assoziierten Erkrankungen wie Diabetes mellitus und Hypercholesterinämie, eine wesentliche Rolle (DURRINGTON et al, 2001, MACKNESS et al, 1991, 1998). DURRINGTON et al, 2001, warnen vor Schlussfolgerungen, die lediglich den Genotyp berücksichtigen, zumal es auch gänzlich vom Genotyp unabhängige interindividuelle Schwankungen in der PON-1-Aktivität gäbe. MACKNESS et al, 2004 favorisieren in Zusammenschau aller bisher vorliegenden Studienergebnisse die Durchführung von Studien mit Fokussierung auf die biochemischen Zusammenhänge und die die PON-1-Aktivität beeinflussende Faktoren, solange es sich nicht um große prospektive Studien mit großen Fallzahlen handelt.

In der vorliegenden Studie wurden die PONA-Aktivität und Konzentration nicht berücksichtigt, sondern lediglich eine mögliche Assoziation der verschiedenen Gen-Polymorphismen zur KHK untersucht.

Zusammenfassend ist zu betonen, dass zahlreiche Studien mit zum Teil sehr kontroversen Ergebnissen und sehr unterschiedlichen Schwerpunkten existieren, die die Frage nach einer Assoziation zwischen Genotyp mit oder ohne Berücksichtigung der PONA-Aktivität und der Suszeptibilität für KHK nicht zufriedenstellend beantworten können. Dabei handelte es sich überwiegend um retrospektive Fall-Kontrollstudien. Weitere prospektive Studien mit Berücksichtigung sowohl biochemischer als auch genetischer Aspekte zur abschließenden Klärung sind notwendig.

8. 2 Apolipoprotein- A -V(APOA-V) 1131T→C und KHK

Hypertriglyceridämie, Hypercholesterinämie sowie erniedrigte Werte für HDL gelten schon lange als kardiovaskuläre Risikofaktoren. Die Regulation der Serumspiegel erfolgt durch genetische und exogene Faktoren (LAI et al, 2004). Dabei sind interindividuelle Schwankungen bezüglich der Triglyceridspiegel in bis zu 20 - 40% genetisch bedingt (KLOS et al, 2005).

Das von PENNACCHIO et al, 2002, relativ neu identifizierte Apolipoprotein A-V-Gen beeinflusst in hohem Maße den Triglyceridspiegel im Sinne einer Reduktion, während der Polymorphismus 1131T→C im APOA-V-Gen eine bis zur 4fachen Erhöhung des Triglyceridspiegels bewirkt (EVANS et al, 2003) und daher als potentieller kardiovaskulärer Risikofaktor anzusehen ist.

O`BRIEN et al, 2005 konnten erstmals beweisen, dass APOA-V auch im Serum zirkuliert, wenn auch in deutlich geringerer Konzentration verglichen mit anderen Lipoproteinen.

Zudem konnte diese Arbeitsgruppe nachweisen, dass APOA-V auf VLDL, HDL und Chylomikronen lokalisiert ist.

Im Rahmen diverser Studien konnte der genaue Mechanismus der Triglyceridspiegelerhöhung durch den APOA-V 1131T→C-Polymorphismus bzw. die Erniedrigung der Triglyceridspiegel durch APOA-V nicht geklärt werden.

VAESSEN et al, 2006 vermuten, dass APOA-V sowohl eine verstärkte Hydrolyse von VLDL-Triglyceride als auch eine erhöhte hepatische Aufnahme von Lipoprotein-Core-Remnents bewirkt.

In der vorliegenden Arbeit wurden der CC - Genotyp in allen vier Studiengruppen kaum nachgewiesen, insbesondere trat sie in der KHK-Gruppe nicht vermehrt auf. In allen Studiengruppen kam in mindestens 80% der TT – Genotyp (Wildtyp) vor.

Vorliegende Ergebnisse stehen nicht im Einklang mit Resultaten aus mehreren Studien, in denen der APOA-V 1131T→C-Polymorphismus als unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung der KHK deklariert wurde.

Szalai et al, 2004 untersuchten in einem Kollektiv von 308 Patienten mit KHK und 310 Kontrollpersonen den APOA-V 1131T→C-Polymorphismus und konnten in der KHK-Gruppe einen signifikant höheren Anteil an CC-Genotyp-Träger nachweisen.

Ähnliche Ergebnisse mit signifikant höherem Anteil an CC-Genotyp-Träger in der KHK-Gruppe zeigten sich in asiatischen Studien von BI, et al, 2004, LIU et al, 2005, HSU et al, 2006.

LAI et al, 2004, schlossen aus dem Probanden-Pool der Framingham Heart Study insgesamt 1129 männliche und 1262 weibliche Personen in ihre eigene Studie ein und untersuchten den APOA-V 1131T→C-Polymorphismus in Bezug auf den Triglyceridspiegel und insbesondere hinsichtlich einer erhöhten Prävalenz bei Patienten mit Koronarer Herzerkrankung. Hierbei konnten sie bei allen Probanden, die den APOA-V 1131T→C-Polymorphismus aufwiesen, signifikant höhere Triglyceridspiegel messen und bei den weiblichen Probanden eine signifikante Korrelation zwischen dem APOA-V 1131T→C-Polymorphismus und dem Bestehen einer KHK feststellen.

In einer weiteren-hier prospektiven- Epic Norfolk Population Study von VAESSEN et al, 2006 untersuchte man ebenfalls den Zusammenhang des APOA-V 1131T→C-Polymorphismus zur Hypertriglyceridämie sowie eine mögliche Assoziation des APOA-V 1131T→C-Polymorphismus zur Koronaren Herzkrankheit. Auch hier fand sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus und erhöhter Triglyceridspiegel. Allerdings zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem APOA-V 1131T→C-Polymorphismus und der KHK.

Ebensowenig konnten LEE et al, 2004 sowie MARTINELLI et al, 2006 in ihren Studien einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem APOA-V 1131T→C-Polymorphismus und dem Vorliegen einer KHK feststellen, wenn auch bei beiden der APOA-V 1131T→C-Polymorphismus mit deutlich erhöhten Triglyceridspiegel einherging.

APOA-V 1131T→C und Laborparameter

EVANS, et al, 2003 fanden eine eindeutige Korrelation zwischen Trägern des CC - Genotyps und stark erhöhten Triglyceridspiegeln, während die Serumcholesterinwerte weniger stark von dem APOA-V-Polymorphismus beeinflusst wurden.

Auch JANG et al, 2004, LAI et al, 2004, BAUM et al, 2003, KLOS et al, 2005, MARTINELLI et al, 2006, HODOGLUGIL et al, 2006 und VAESSEN et al, 2006 zeigten, dass der APOA-V 1131T→C-Polymorphismus mit einer deutlichen Erhöhung der Triglyceridspiegel einhergeht.

Im Rahmen der Literaturrecherche fand sich keine Publikation, die oben genannten Zusammenhang zwischen APOA-V 1131T→C-Polymorphismus und erhöhte Triglyceridspiegel widerlegt.

Betrachtet man den APOA-V 1131T→C-Polymorphismus im Studienkollektiv der vorliegenden Studie im Hinblick auf Parameter des Lipidstoffwechsels, so lassen sich für keinen der untersuchten Parameter wie Cholesterin, LDL und insbesondere Triglyceride signifikant erhöhte Spiegel bzw. erniedrigte HDL-Spiegel bei Trägern des T/C - Allels - oder CC-Genotyps nachweisen. Beim Vergleich der vorliegenden Ergebnisse mit denen in der Literatur lassen sich keine Übereinstimmungen erkennen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Tatsache sein, dass es sich im vorliegenden Kollektiv hauptsächlich um Patienten handelt, die medikamentös mit Lipidsenkern behandelt sind.

8. 3 Apolipoprotein Kringle IV Met 75Thr und KHK

Apo (a) ist ein dem Plasminogen homologes Glycoprotein und stellt einen Bestandteil von Lipoprotein (a) dar (PRINS et al, 1998). Diverse Polymorphismen im Apo (a)- Gen sind bekannt. Der Polymorphismus, bei dem im Kringle IV Typ 10 an Position 75 Methionin durch Threonin ersetzt wird (Apolipoprotein Kringle IV Met75Thr), geht mit einer Erhöhung des Lipoprotein (a) – Spiegels einher (SIMO et al, 2001).

Die Assoziation von Lipoprotein (a) zur koronaren Herzerkrankung wird in der Literatur sehr kontrovers diskutiert. In der Meta-Analyse von DANESH et al, 2000, in der insgesamt 27 prospektive Studien über einen Zeitraum von 10 Jahren mit insgesamt 5436 KHK-Patienten reevaluiert wurden, konnte eine Assoziation des Lp(a)-Spiegels zur KHK festgestellt werden.

Der genaue Mechanismus bzw. die Funktionalität des Met75Thr-Polymorphismus im Apolipoprotein Kringle IV ist nicht genau bekannt. SIMO et al, 2001, vermuten einen Zusammenhang zwischen Lp (a), nicht jedoch zwischen dem Polymorphismus und der Aktivität der Lysinbindenden Einheiten.

Beim Vergleich der Studienergebnisse von SIMO et al, 2001, mit der bisherigen insgesamt nur geringen Anzahl an Publikationen zum Apolipoprotein Kringle IV Met75Thr-Polymorphismus zeigt sich, dass keine weitere Studie oben genannten Sachverhalt bestätigen konnte.

In früheren Studien konnten sowohl SYRRIS et al, 1997 als auch PRINS et al, 1998, keine Assoziation des Apolipoprotein Kringle IV Met75Thr-Polymorphismus zur KHK aufzeigen.

Auch die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse bezüglich des Apolipoprotein Kringle IV Met75Thr-Polymorphismus zeigen keine Korrelation zur KHK.

Folglich liegen fast identische Ergebnisse bezüglich der Häufigkeit der verschiedenen Genotypen in den beiden Studiengruppen Patienten KHK1-3 und Kontrollgruppe vor.

Apolipoprotein Kringle IV Met75Thr und Laborparameter

In der Studie von SIMO et al, 2001 ging der Apolipoprotein Kringle IV Met75Thr-Polymorphismus mit erhöhten Lp(a)-Werten einher und stellte insbesondere einen Risikofaktor für das Auftreten eines Myokardinfarktes dar.

In der vorliegenden Arbeit lässt sich keine Korrelation zwischen dem Apolipoprotein Kringle IV Met75Thr Polymorphismus und erhöhter Lp (a)- Spiegel erkennen.

8. 4 Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) 469C→T und KHK

Die Adhäsion zirkulierender Leukozyten und deren anschließende transendotheliale Migration sind wesentliche Schritte bei der Initiation atherosklerotischer Läsionen. Adhäsionsmoleküle wie das Intercellular adhesion molecule (ICAM-1) spielen hierbei eine bedeutende Rolle (BLANKENBERG, et al, 2001).

JIANG et al, 2002, untersuchten in einem Kollektiv bestehend aus insgesamt 528 deutschen Patienten mit angiographisch gesicherter KHK und 213 Kontrollpersonen ohne KHK die Assoziation zwischen dem 469C→T-Polymorphismus im ICAM-1-Gen und einer erhöhten Suszeptibilität der Koronaren Herzerkrankung. Hierbei fanden sich bei den KHK-Patienten signifikant mehr Träger des CT bzw. des TT – Genotyps. Der Mechanismus, der bei Vorliegen des ICAM-1 469C→T-Polymorphismus für das Auftreten einer KHK prädisponiert, ist weiterhin unklar. Man vermutet jedoch eine Beeinträchtigung der endothelabhängigen Vasodilatation durch den ICAM-1 469C→T-Polymorphismus (JIANG et al, 2002).

Ähnliche Ergebnisse zeigen sich in der Studie von ZHANG et al, 2006, bei der 173 chinesische KHK – Patienten und 141 Kontrollpersonen untersucht wurden. Auch hier bedeutete der ICAM-1 469C→T-Polymorphismus ein Risikofaktor für die Entstehung der KHK. Der CC - Genotyp galt sogar als protektiv.

Die im Rahmen der vorliegenden Dissertation gewonnenen Ergebnisse zum ICAM-1 469C→T-Polymorphismus zeigen allerdings keine Übereinstimmung mit den Ergebnissen oben aufgeführter Studien.

Betrachtet man nämlich die Häufigkeiten der verschiedenen Allelformen in den unterschiedlichen Studiengruppen, so wird deutlich, dass in allen vier Gruppen Kontrollgruppe, Unauffällige Koronarangiographie, Beginnende KHK und Patienten mit KHK1-3 gleichermaßen häufig in mindestens 45% der heterozygote Genotyp CT den Haupanteil aller drei Genotypen ausmacht. In der Kontrollgruppe bestehen sogar die meisten Träger des TT - Genotyps. Hier stellt also der ICAM-1 469C→T-Polymorphismus keinen Risikofaktor für die Entstehung der KHK dar. Der p-Wert beträgt 0.659.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit einer von MC GLINCHEY et al, 2004, veröffentlichten Studie, in der insgesamt über 1000 irische KHK – Patienten auf den ICAM-1 469C→T-Polymorphismus hin untersucht wurden. Die Autoren konnten in Zusammenschau der Befunde keine erhöhte Suszeptibilität für die Koronare Herzerkrankung erkennen.

MILUTINOVIC et al, 2006 schlossen ebenfalls aus ihrer Studie mit insgesamt 367 Personen kaukasischer Herkunft (KHK-Patienten mit Diabetes mellitus und Kontrollpersonen ohne KHK), dass der ICAM-1 469C→T-Polymorphismus nicht als genetischer Marker für die Beurteilung einer erhöhten Suszeptibilität für KHK/ Myokardinfarkt herangezogen werden kann.

8. 5 Monocyte-chemoattractant- Protein-1 (MCP-1) 2518 A→G und KHK

Während Zelladhäsion und zellvermittelnde Interaktion zwischen Leukozyten und dem Endothel – Hauptvorgänge in der Leukozytenrekrutierung – von essentieller Bedeutung bei der Abwehr von Infektionen sind, legen diese Interaktionen jedoch auch den Grundstein bei der Entstehung arterieller Gefäßläsionen und damit atherosklerotischer Plaques. Zytokine sind an der Regulation dieser Interaktionen beteiligt (SIMEONI et al, 2004). Hierbei spielt insbesondere das Zytokin Monocyte-chemoattractant- Protein-1 (MCP-1) eine wesentliche Rolle, welches in makrophagenreichen Plaques stark exprimiert wird (NELKEN et al, 1991). Mehrere Studien konnten einen Zusammenhang zwischen erhöhten MCP-1-Spiegeln und einem erhöhten Risiko für das Auftreten eines akuten Myokardinfarktes oder eines plötzlichen Herztones feststellen (MC DERMOTT et al, 2005).

Mehrere Polymorphismen im MCP-1-Gen wurden bereits beschrieben.

SZALAI et al, 2001, konnten im Rahmen von Untersuchungen des Polymorphismus Adenin zu Guanin (A/G) im MCP-1-Gen nachweisen, dass der Genotyp G/G mit einer erhöhten Inzidenz an KHK einhergeht. Dieser Polymorphismus wird in neueren Studien auch MCP-1-2578 A→G genannt (MC DERMOTT et al, 2005). Als möglicher Mechanismus wird ein Einfluß des MCP-1 2518A→G-Polymorphismus auf die Regulation der Transkriptionsaktivität im MCP-1-Gen diskutiert (ROVIN et al, 1999).

In einer großen Longitudinalstudie von MC DERMOTT et al, 2005, wurden insgesamt 1797 Nachkommen der Framingham-Heartstudy mit durchgemachtem Myokardinfarkt und eine entsprechend große Kontrollgruppe auf eine mögliche Assoziation zwischen dem MCP-1 2518A→G-Polymorphismus und erhöhter MCP-1- Spiegel untersucht. Hierbei ließen sich bei Trägern des GG - Genotyps signifikant höhere MCP-1-Spiegel und eine signifikant höhere Inzidenz an Myokardinfarkten nachweisen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen im Einklang mit denen der oben genannten Studie. Folglich findet man Träger des GG - Genotyps insbesondere bei Patienten mit KHK-Stadium 1-3, gefolgt von Patienten mit beginnender KHK und unauffälliger Koronarangiographie. In der Kontrollgruppe macht die homozygote Zustandsform GG des MCP-1-Polymorphismus lediglich 5% aus. Der p-Wert beträgt 0.029

KIM et al, 2006, untersuchten bei 679 phänotypisch gesunden Nachkommen von KHK-Patienten, ob eine Assoziation zwischen dem MCP-1 2518A→G-Polymorphismus und einer erhöhten Susceptibilität für KHK besteht. Dabei konnten durch angewandte Untersuchungen wie die der Thallium-201 Single Photon Emission Computer Tomographie (SPECT) bei Trägern des GG - Genotyps signifikant mehr okkulte Läsionen nachgewiesen und damit erstmals auch dieser Polymorphismus als potentieller Risikofaktor für eine erhöhte Suszeptibilität der KHK in einem phänotypisch gesunden Kollektiv deklariert werden.

Demgegenüber steht eine Reihe von Veröffentlichungen, in denen sich jedoch kein Zusammenhang zwischen dem MCP-1 2518A→G-Polymorphismus und der KHK erkennen lässt (MC GLINCHEY et al 2004, CERMAKOVA et al, 2005, BJARNADOTTIR et al, 2005, IWAI et al, 2006).

MCP-1 2518A→G und Laborparameter

SZALAI et al, 2001 konnten zudem eine Korrelation zwischen dem MCP-1 2518A→G-Polymorphismus und erhöhter Lp (a)- Spiegel feststellen. Allerdings kann hier kein Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus und erhöhter Lp (a)-Spiegel aufgezeigt werden.

8. 6 Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR) 677C→T und KHK

Bereits 1969 wurden von McCully et al die negativen Effekte der Hyperhomocysteinämie auf das cardiovaskuläre System anhand von postmortem Befunden mit atherosclerotischer Plaques zweier verstorbener Kinder mit Hyperhomocysteinämie beschrieben (FARIA- NETO et al, 2006).

Sowohl retrospektive als auch prospektive Studien verdeutlichen den kausalen Zusammenhang zwischen Hyperhomocysteinämie und Koronarer Herzerkrankung (HERRMANN W, 2006).

Der Homocysteinspiegel wird durch eine Reihe von Faktoren beeinflusst. Durch die zusammenhängenden Stoffwechselwege des Homocystein mit Folsäure und Vitamin B12 können sowohl erniedrigte Werte an Folsäure als auch eine Vitamin B12-Defizienz zu einer Erhöhung der Homocysteinspiegel führen (FARIA – NETO et al, 2006, HERRMANN et al, 2007).

Zudem spielen genetische Faktoren eine wesentliche Rolle bei der Entstehung der Hyperhomocysteinämie (GEISEL et al, 2001, GEISEL et al, 2003).

FROSST et al, 1995 zeigten, dass der Polymorphismus der Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR) 677C→T mit einer thermolabilen Form des Enzyms und damit mit einer Hyperhomocysteinämie einhergeht. Der Polymorphismus MTHFR 677C→T wurde daher als Risikofaktor für die Entstehung der Koronaren Herzerkrankung deklariert.

Es folgte eine Reihe von Veröffentlichungen, die diesen Sachverhalt bestätigten (RASSOUL et al, 2000, GULEC et, al, 2001, HERRMANN et al, 2003, FALCHI et al, 2005, CHO et al, 2006, HUH et al, 2006, KERKENI et al, 2006).

MAGER et al, 2005 untersuchten in einer Studie bestehend aus 284 israelischen KHK-Patienten den Zusammenhang zwischen positiver Familienanamnese, Homocysteinspiegeln, das Alter bei Erstmanifestation der KHK und dem MTHFR 677C→T-Polymorphismus und fanden heraus, dass Träger des TT - Genotyps und positiver Familienanamnese bezüglich der KHK früher an KHK erkranken und höhere Spiegel an Homocystein aufweisen als Träger des CC - Genotyps.

Nach KOLLING et al, 2004, sei zwar die Hyperhomocysteinämie ein Risikofaktor der KHK-Erkrankung, könne aber nicht alleine, sondern nur im Zusammenhang mit anderen Risikofaktoren betrachtet werden. Dieser Sachverhalt wurde auch im Rahmen einer arabischen Studie von ABU AMERO et al, 2003 dargestellt. Hier war sogar in Kombination mit anderen kardiovaskulären Risikofaktoren die Hyperhomocysteinämie nicht als Risikofaktor für koronare Herzerkrankung zu werten.

Nach PAYNE et al, 2001 kann die MTHFR 677C→T-Mutation bei Patienten mit bereits bestehenden kardiovaskulären Risikofaktoren für die Schwere der KHK von prognostischem Wert sein. Folglich zeigten in dieser Studie Patienten mit Diabetes mellitus und nachgewiesener MTHFR 677C→T-Mutation einen schwereren Verlauf der KHK als Patienten ohne MTHFR 677C→T-Mutation. HANSON et al, 2001, konnten in ihrer Studie bestehend aus 1238 KHK-Patienten und Patienten mit tiefer Beinvenenthrombose keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus MTHFR 677C→T und der Prävalenz der KHK feststellen.

NAKAI et al, 2001, MEISEL et al, 2001, KIM et al, 2001, HSU et al, 2001, ZUNTAR et al, 2003, GUEANT-RODRIQUES et al, 2005, YILMAZ et al, 2006 konnten in den verschiedenen Studien ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus MTHFR 677C→T und der KHK aufzeigen.

Auch die vorliegende Studie zeigt ähnliche Ergebnisse bezüglich des MTHFR 677C→T-Polymorphismus. Vergleicht man nämlich die Genotyphäufigkeit in den einzelnen Studiengruppen, so wird ersichtlich, dass in dem Patientenkollektiv KHK 1-3 weniger Träger des TT - Genotyps vorliegen als in der Kontrollgruppe. Auch bei dem Schweregrad der KHK zeigt sich keine entsprechende Korrelation.

Im Rahmen einer Meta-Analyse von WALD et al, 2002, wurden insgesamt 72 Studien über den kausalen Zusammenhang zwischen dem MTHFR 677C→T-Polymorphismus und KHK reevaluiert. Hierbei ließ sich ein kausaler Zusammenhang zwischen erhöhten Homocysteinwerten im Serum und der Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankung feststellen. Eine durch tägliche Folsäuresupplementation induzierte Erniedrigung der Homocysteinkonzentration um 3 µmol/ l im Serum könnte das Risiko für die Entstehung einer KHK um 16% reduzieren.

In der Hordaland - Interventionsstudie von NYGARD et al, 1998 wurde ebenfalls zur Reduktion oder gar zur Normalisierung erhöhter Homocysteinwerte im Serum die tägliche Einnahme von Folsäure empfohlen. In dieser Studie, die von 1992-1993 geführt wurde und in der insgesamt 18.000 Personen zwischen 40-67 Jahren eingeschlossen waren, wurden der MTHFR-Status, Homocystein und Folsäure im Serum bestimmt. Zusammenfassend ließ sich aus dieser Studie schließen, dass in der Gesamtpopulation bei bestehender Hyperhomocysteinämie > 40 µmol/l meist von einer Mutation 677C→T im MTHFR-Gen kombiniert mit niedrigen Folsäurespiegel ausgegangen werden muß.

Die erst kürzlich publizierte Metanalyse von LEWIS et al, 2005, in der insgesamt 80 Fall-Kontroll- sowie prospektive Studien über den MTHFR 677C→T-Polymorphismus über einen Zeitraum 2001 bis 2004 eingeschlossen und reevaluiert wurden, konnte in Zusammenschau der Studien keinen kausalen Zusammenhang zwischen Hyperhomocysteinämie und koronarer Herzkrankheit aufzeigen.

Ebensowenig scheint nach Auffassung der Autoren die Supplementierung mit Folsäure einen positiven Effekt im Sinne einer Reduktion der Homocysteinspiegel zu erzielen.

MTHFR 677C→T und Laborparameter

In mehreren Studien ließ sich ein kausaler Zusammenhang zwischen erhöhten Homocysteinwerten im Serum und der Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankung feststellen (NYGARD et al, 1998, WALD et al, 2002)

Betrachtet man die Laborparameter Homocystein, Folsäure und Vitamin B12 in der vorliegenden Studie, so wird deutlich, dass kein signifikanter Zusammenhang zwischen MTHFR-Mutation und oben genannten Laborparametern besteht.

Das untersuchte Gesamtkollektiv wurde in drei verschiedene Folsäure-Tertile unterteilt. In jedem Tertile wurde der Plasma- Homocysteinspiegel bezogen auf die verschiedenen MTHFR-Genotypen gemessen. Es wird deutlich, dass die unterste Terzile nicht mit einer hohen Prävalenz an der homozygoten MTHFR 677C→T-Mutation einhergeht und insbesondere kein Einfluß der MTHFR 677C→T-Mutation auch bei gleichzeitig bestehenden niedrigen Folsäurespiegeln auf den Homocystein-Spiegel besteht.

Zusammenfassend konnten in der vorliegenden Arbeit lediglich für den MCP-1 2518A→G-Polymorphismus signifikante Ergebnisse aufgezeigt werden. Bezieht man jedoch diesen Polymorphismus auf laborchemische Parameter und hier insbesondere auf den Lp(a)-Spiegel, so zeigt sich keine Übereinstimmung mit der veröffentlichten Referenzliteratur.

Bei den sechs weiteren untersuchten Polymorphismen konnte kein signifikanter Zusammenhang zur Koronaren Herzerkrankung oder gar ein Einfluß auf den Schweregrad der KHK aufgezeigt werden. Ebensowenig gelang der Nachweis einer Korrelation der Polymorphismen zu den verschiedenen Laborparametern. Der p-Wert beträgt stets > 0.05.

Ein zu betonender Aspekt zur Erklärung vorliegender Ergebnisse ist die relativ geringe Fallzahl in den meisten veröffentlichten Studien. So bestand z. B. die Studiengruppe von SIMO et al, 2001, in der der Polymorphismus Apolipoprotein Kringle IV Met75Thr mit einer erhöhten Inzidenz an KHK einherging, lediglich aus 94 männlichen KHK – Patienten.

In einer so kleinen Studiengruppe entstehen leicht Bias durch vermeintlich große Effekte.

Besteht eine derartig kleine Fallzahl, so sind wesentliche statistische Verfahren nicht immer anwendbar. Keine der Referenzstudien, auf die man sich im Rahmen dieser Studie bezog, bot eine ausreichend große Fallzahl.

Studiengruppen mit ausreichend großen Fallzahlen sind jedoch von großer Bedeutung. Verdeutlicht wird dieser Sachverhalt insbesondere bei der Untersuchung von Genpolymorphismen. So können in einem ohnehin schon kleinen Kollektiv durch niedrige Allelfrequenzen noch kleinere Untergruppen entstehen.

Sieht man vom Problem der niedrigen Fallzahlen ab, so wird beim Vergleich der verschiedenen Studien insbesondere deutlich, dass die verschiedenen Allele der untersuchten Polymorphismen in den verschiedenen Völkern und Rassen mit einer unterschiedlichen Häufigkeit auftreten. Das in der vorliegenden Dissertation bestehende Kollektiv war ausschließlich kaukasischer Herkunft.

Eindrücklich veranschaulicht wird dieser Sachverhalt beim Vergleich der Literatur bezüglich des Apolipoprotein- A -V (APOA-V) 1131T→C-Polymorphismus. Hierbei fällt nämlich auf, dass der CC-Genotyp gehäuft in der asiatischen Population auftritt (BI, et al, 2004, LIU et al, 2005, HSU et al, 2006). Signifikante aus Studien mit Populationen unterschiedlicher ethnischer Herkunft gewonnene Resultate lassen sich also nicht ohne weiteres auf andere Studiengruppen übertragen. Nicht nur die verschiedenen ethnischen Hintergründe in den unterschiedlichen Studiengruppen, sondern auch der unterschiedliche Aufbau der Studien/ das Studiendesign und die bereits eingangs erwähnte Größe der Studienpopulation mögen ganz wesentlich bei der Klärung der unterschiedlichen Resultate eine Rolle spielen.

In Zusammenschau der Ergebnisse vorliegender Dissertation konnte das Ziel, Gen-Polymorphismen bzw. genetische Risikofaktoren zur Vorhersage des Risikos für die Entstehung der Koronaren Herzerkrankung zu nutzen, nicht erreicht werden. Dennoch sollte nicht daraus die Schlussfolgerung gezogen werden, genetische Untersuchungen seien überflüssig und unnötig. Vielmehr bieten innovative Technologien zunehmend Alternativen zu herkömmlichen diagnostischen Strategien. Es bleibt wiederholt zu betonen, dass die KHK eine multifaktorielle komplexe Erkrankung darstellt, die stark von genetischen Faktoren, dann aber auch von der Interaktion zwischen Gen und Umwelt abhängt. Die einzelnen Risikofaktoren wiederum werden von einer Reihe weiterer genetischer und externer Faktoren beeinflusst. Ein einzelner Genpolymorphismus vermag nicht immer eine wesentliche Wirkung bei der Entstehung einer so komplexen Erkrankung haben und das Erkrankungsrisiko ist nicht wesentlich erhöht. Für das einzelne Individuum jedoch kann das Auftreten mehrerer funktioneller Gen-Polymorphismen ein wesentlich erhöhtes Erkrankungsrisiko bedeuten. Eine frühzeitige Erfassung dieser genetischen Veränderung würde einen wesentlichen Beitrag für die Erstellung von Präventionsplänen leisten. Hier bietet sich z.B. die DNA – Chiptechnologie an, die die Analyse von Genexpression auf breiter Ebene und die Testung mehrerer Genotypen ermöglicht.

Genetische Untersuchungen und damit genetische Risikomarker ermöglichen im Gegensatz zu den konventionellen Risikofaktoren eine genauere individuelle Prognose und Risikoabschätzung bezüglich kardiovaskulärer Erkrankungen. Viele konventionelle Risikofaktoren wie z. B. das metabolische Syndrom treten erst im höheren Lebensalter auf.

Dagegen ermöglicht die Kenntnis genetischer Risikomarker bereits in früheren Krankheitsstadien oder gar vor Ausbruch der Erkrankung eine gezielte und effektive Prävention und zusätzlich die Stratifizierung in verschiedene Risikogruppen.

Abschließend sind zur Klärung und Beantwortung der Fragestellung vorliegender Studie weitere prospektive, ausreichend große Studien mit homogenem Studiendesign unter Einbeziehung sowohl innovativer genetischer Untersuchungen als auch klassischer klinischer und laborchemischer Risikoindikatoren erforderlich.

9. Literaturverzeichnis

1. Abu-Amro KK, Wyngaard CA, Dzimiri N (2003) Prevalence and role of methylenetetrahydrofolate reductase 677 C->T and 1298 A->C polymorphisms in coronary artery disease in Arabs. *Arch Pathol Lab Med* 127:1349-52
2. Adkins S, Gan KN, Mody M, La Du BN (1993) Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. *Am J Hum Genet* 52:598-608
3. Arca M, Ombres D, Montali A, Campagna F, Mangieri E, Tanzilli G, Campa PP, Ricci G, Verna R, Pannitteri G (2002) PON1 L55M polymorphism is not a predictor of coronary atherosclerosis either alone or in combination with Q192R polymorphism in an Italian population. *Eur J Clin Invest* 32:9-15
4. Auer J, Weber T, Berent R, Lassnig E, Lamm G, Eber B (2003) Genetic polymorphisms in cytokine and adhesion molecule genes in coronary artery disease. *Am J Pharmacogenomics* 3:317-28
5. Auer J, Berent R, Weber T, Lamm G, Lassnig E, Prammer W, Aichinger W, Eber B (2004) Chronische Infektion, Inflammation und koronare Herzkrankheit. *Journal für Kardiologie* 11:503-510
6. Aviram M, Billecke S, Sorenson R, Bisgaier C, Newton R, Rosenblat M, Erogul J, Hsu C, Dunlop C, La Du B (1998) Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulphydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1617-24
7. Aynacioglu AS, Kepekci Y (2000) The human paraoxonase Gln-Arg192 (Q/R) polymorphism in turkish patients with coronary artery disease. *Int J Cardiol* 74:33-37
8. Bagnolini M (1998) Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392:565-568
9. Baroni MG, Berni A, Romeo S, Arca M, Tesorio T, Sorropago G, Di Mario U, Galton DJ (2003) Genetic study of common variants at the Apo E, Apo AI, Apo CIII, Apo B, lipoprotein lipase (LPL) and hepatic lipase (LIPC) genes and coronary artery disease (CAD): variation in LIPC gene associates with clinical outcomes in patients with established CAD. *BMC Med Genet* 10: 4-8
10. Baum L, Tomlinson B, Thomas GN (2003) APOA5-1131T>C polymorphism is associated with triglyceride levels in Chinese men. *Clin Genet* 63:377-379
11. Beckstead JA, Oda MN, Martin DD, Forte TM, Bielicki JK, Berger T, Luty R, Kay CM, Ryan RO (2003) Structure-function studies of human apolipoprotein A-V: a regulator of plasma lipid homeostasis. *Biochemistry* 42:9416-9423
12. Berk BC, Weintraub WS, Alexander RW (1990) Elevation of C-reactive protein in "active" coronary artery disease. *Am J Cardiol* 65:168-172
13. Bi N, Yan SK, Li GP, Yin ZN, Chen BS (2004) A single nucleotide polymorphism - 1131T>C in the apolipoprotein A5 gene is associated with an increased risk of coronary artery disease and alters triglyceride metabolism in Chinese. *Mol Genet Metab* 83:280-286

14. Bjarnadottir K, Eiriksdottir G, Aspelund T, Gudnason V (2006) Examination of genetic effects of polymorphisms in the MCP-1 and CCR2 genes on MI in the Icelandic population. *Atherosclerosis* 188:341-346
15. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Peetz D, Hafner G, Tiret L, Meyer J (2001) Circulating cell adhesion molecules and death in patients with coronary artery disease. *Circulation* 104:1336-1342
16. Boonmark NW, Lawn RM (1997) The lysine-binding function of Lp(a). *Clin Genet* 52:355-360
17. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF (1998) Decreased lesion formation in CCR2-/mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 394:894-897
18. Bottiger C, Kastrati A, Koch W, Mehilli J, Seidl H, Schomig K, von Beckerath N, Schomig A (2000) HPA-1 and HPA-3 polymorphisms of the platelet fibrinogen receptor and coronary artery disease and myocardial infarction. *Thromb Haemost* 83:559-562
19. Brophy VH, Jarvik GP, Richter RJ, Rozek LS, Schellenberg GD, Furlong CE (2000) Analysis of paraoxonase (PON1) L55M status requires both genotype and phenotype. *Pharmacogenetics* 10:453-460
20. Buraczynska M, Pijanowski Z, Spasiewicz D, Nowicka T, Sodolski T, Widomska Czekajska T, Ksiazek A (2003) Renin-angiotensin system gene polymorphisms: assessment of the risk of coronary heart disease. *Kardiol Pol* 58:1-9
21. Cascorbi I, Laule M, Mrozikiewicz PM, Mrozikiewicz A, Andel C, Baumann G, Roots I, Stangl K (1999) Mutations in the human paraoxonase 1 gene: frequencies, allelic linkages, and association with coronary artery disease. *Pharmacogenetics* 9:755-761
22. Cermakova Z, Petrakova J, Arakelyan A, Drabek J, Mrazek F, Lukl J, Petrek M (2005) The MCP-1 -2518 (A to G) single nucleotide polymorphism is not associated with myocardial infarction in the Czech population. *Int J Immunogenet* 32:315-318
23. Chen Q, Reis SE, Kammerer CM, McNamara DM, Holubkov R, Sharaf BL, Sopko G, Pauly DF, Merz CN, Kamboh MI (2003) Association between the severity of angiographic coronary artery disease and paraoxonase gene polymorphisms in the National Heart, Lung, and Blood Institute-sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) study. *Am J Hum Genet* 72:13-22
24. Chi DS, Ling WH, Ma J, Xia M, Hou MJ, Wang Q, Zhu HL, Tang ZH, Yu XP (2006) Relationship between paraoxonase 1 55 Met/Leu, paraoxonase 2 148 Ala/Gly genetic polymorphisms and coronary artery disease. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 23:289-293
25. Cho SE, Hong KS, Shin GJ, Chung WS (2006) The methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene mutation is associated with hyperhomocysteinemia, cardiovascular disease and plasma B-type natriuretic peptide levels in Korea. *Clin Chem Lab Med* 44:1070-1075
26. Clearfield M (2004) Coronary heart disease risk reduction in postmenopausal women: the role of statin therapy and hormone replacement therapy. *Prev Cardiol* 7:131-136

27. Cushing S (1990) Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells (atherosclerosis/oxidized lipoproteins) *Cell Biology* 87:5134-5138
28. Danesh J, Collins R, Peto R (2000) Lipoprotein(a) and coronary heart disease. Meta-analysis of prospective studies. *Circulation* 102:1082-1085
29. Dawber TR, Kannel WB (1966) The Framingham study. An epidemiological approach to coronary heart disease. *Circulation* 34:553-555
30. Davies HG, Richter RJ, Keifer M, Broomfield CA, Sowalla J, Furlong CE (1996) The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nat Genet* 14:334-336
31. De Caterina R, Cybulsky MI, Clinton SK, Gimbrone MA Jr, Libby P (1994) The omega-3 fatty acid docosahexaenoate reduces cytokine-induced expression of proatherogenic and proinflammatory proteins in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb* 14:1829-1836
32. Dong Y, Zhu H (2004) Single-strand conformational polymorphism analysis: basic principles and routine practice. *Methods Mol Med* 108:149-158
33. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI (2001) Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:473-480
34. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI (2002) The hunt for nutritional and pharmacological modulators of paraoxonase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:1248-1250
35. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI (2004) Paraoxonase polymorphisms and coronary heart disease. *Lancet* 364:579-580
36. Evans D, Buchwald A, Beil FU (2003) The single nucleotide polymorphism -1131T>C in the apolipoprotein A5 (APOA5) gene is associated with elevated triglycerides in patients with hyperlipidemia. *J Mol Med* 81:645-654
37. Falchi A, Giovannoni L, Piras IS, Calo CM, Moral P, Vona G, Varesi L (2005) Prevalence of genetic risk factors for coronary artery disease in Corsica island (France). *Exp Mol Pathol* 79:210-213
38. Faria-Neto JR, Chagas AC, Bydlowski SP, Lemos Neto PA, Chamone DA, Ramirez JA, da Luz PL (2006) Hyperhomocystinemia in patients with coronary artery disease. *Braz J Med Biol Res* 39:455-463
39. Farrall M, Green F, Peden J, Olsson P, Clarke R, Hellenius ML, Rust S, Lagercrantz J, Franzosi M, Schulte H, Carey A, Olsson G, Assmann G, Tognoni G, Collins R, Hamsten A, Watkins H (2006) Genome-Wide Mapping of Susceptibility to Coronary Artery Disease Identifies a Novel Replicated Locus on Chromosome 17. *PLoS Genetics* 2
40. Feng YJ, Draghi A, Linfert DR, Wu AH, Tsongalis GJ (1999) Polymorphisms in the genes for coagulation factors II, V, and VII in patients with ischemic heart disease. *Arch Pathol Lab Med* 123:1230-1235

41. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP (1995) A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 10:111-113
42. Gardemann A, Philipp M, Hess K, Katz N, Tillmanns H, Haberbosch W (2000) The paraoxonase Leu-Met54 and Gln-Arg191 gene polymorphisms are not associated with the risk of coronary heart disease. *Atherosclerosis* 152:421-431
43. Geisel J, Zimbelmann I, Schorr H, Knapp JP, Bodis M, Hubner U, Herrmann W (2001) Genetic defects as important factors for moderate hyperhomocysteinemia. *Clin Chem Lab Med* 39:698-704
44. Geisel J, Hubner U, Bodis M, Schorr H, Knapp JP, Obeid R, Herrmann W. (2003) The role of genetic factors in the development of hyperhomocysteinemia. *Clin Chem Lab Med* 41:1427-1434
45. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ (1987) Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 316:1371-1375 in: Ross R (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-126
46. Girelli D, Friso S, Trabetti E, Olivieri O, Russo C, Pessotto R, Faccini G, Pignatti PF, Mazzucco A, Corrocher R (1998) Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Mutation, Plasma Homocysteine and Folate in Subjects From Northern Italy With or Without Angiographically Documented Severe Coronary Atherosclerotic Disease: Evidence for an Important Genetic-Environmental Interaction. *Blood* 11:4158-4163
47. Gosling J, Slaymaker S, Gu L, Tseng S, Zlot C, Young S, Rollins B, Charo I (1999) MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein. *B Clin Invest* 6:773-778
48. Grundy SM, Balady GJ, Criqui MH, Fletcher G, Greenland P, Hiratzka LF, Houston-Miller N, Kris-Etherton P, Krumholz HM, LaRosa J, Ockene IS, Pearson TA, Reed J, Washington R, Smith SC Jr. (1998) Primary Prevention of Coronary Heart Disease: Guidance From Framingham : A Statement for Healthcare Professionals From the AHA Task Force on Risk Reduction. *Circulation* 97:1876-1887
49. Gueant-Rodriguez RM, Juilliere Y, Candito M, Adjalla CE, Gibelin P, Herbeth B, Van Obberghen E, Gueant JL (2005) Association of MTRRA66G polymorphism (but not of MTHFR C677T and A1298C, MTRA2756G, TCN C776G) with homocysteine and coronary artery disease in the French population. *Thromb Haemost* 94:510-515
50. Gulec S, Aras O, Akar E, Tutar E, Omurlu K, Avci F, Dincer I, Akar N, Oral D (2001) Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and risk of premature myocardial infarction. *Clin Cardiol* 24:281-284
51. Guttormsen AB, Ueland PM, Nesthus I, Nygard O, Schneede J, Vollset SE, Refsum H. (1996) Determinants and vitamin responsiveness of intermediate hyperhomocysteinemia (> or = 40 micromol/liter). The Hordaland Homocysteine Study. *J Clin Invest* 98:2174-2183

52. Hanson NQ, Aras O, Yang F, Tsai MY (2001) C677T and A1298C polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase gene: incidence and effect of combined genotypes on plasma fasting and post-methionine load homocysteine in vascular disease. *Clin Chem* 47:661-666
53. Herrmann W, Obeid R, Schorr H, Zarzour W, Geisel J (2003) Homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and the B- vitamins: a facet of nature-nurture interplay. *Clin Chem Lab Med* 41:547-553
54. Herrmann W. (2006) Significance of hyperhomocysteinemia. *Clin Lab* 52:367-374
55. Herrmann W, Herrmann M, Obeid R (2007) Hyperhomocysteinaemia: a critical review of old and new aspects. *Curr Drug Metab* 8:17-31
56. Hodoglugil U, Tanyolac S, Williamson DW, Huang Y, Mahley RW (2006) Apolipoprotein A-V: a potential modulator of plasma triglyceride levels in Turks. *J Lipid Res* 47:144-153
57. Hoover-Plow JL, Boonmark N, Skocir P, Lawn R, Plow EF (1996) A quantitative immunoassay for the lysine-binding function of lipoprotein(a). Application to recombinant apo(a) and lipoprotein(a) in plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16:656-664
58. Hsu LA, Ko YL, Wang SM, Chang CJ, Hsu TS, Chiang CW, Lee YS (2001) The C677T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene is not associated with the risk of coronary artery disease or venous thrombosis among Chinese in Taiwan. *Hum Hered* 51:41-45
59. Hsu LA, Ko YL, Chang CJ, Hu CF, Wu S, Teng MS, Wang CL, Ho WJ, Ko YS, Hsu TS, Lee YS (2006) Genetic variations of apolipoprotein A5 gene is associated with the risk of coronary artery disease among Chinese in Taiwan. *Atherosclerosis* 185:143-149
60. Huh HJ, Chi HS, Shim EH, Jang S, Park CJ (2006) Gene-nutrition interactions in coronary artery disease: correlation between the MTHFR C677T polymorphism and folate and homocysteine status in a Korean population. *Thromb Res* 117:501-506
61. Imai Y, Morita H, Kurihara H, Sugiyama T, Kato N, Ebihara A, Hamada C, Kurihara Y, Shindo T, Oh-hashi Y, Yazaki Y (2000) Evidence for association between paraoxonase gene polymorphisms and atherosclerotic diseases. *Atherosclerosis* 149:435-442
62. Iwai N, Kajimoto K, Kokubo Y, Okayama A, Miyazaki S, Nonogi H, Goto Y, Tomoike H (2006) Assessment of genetic effects of polymorphisms in the MCP-1 gene on serum MCP-1 levels and myocardial infarction in Japanese. *Circ J* 70:805-809
63. Jackson LA, Campbell LA, Schmidt RA et al. (1997) Specificity of detection of Chlamydia pneumoniae in cardiovascular atheroma: evaluation of the innocent bystander hypothesis. *Am J Pathol* 150:1785-90 in: Ross R Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999 340:115-126
64. James R, Leviev I, Righetti A (2000) Smoking Is Associated With Reduced Serum Paraoxonase Activity and Concentration in Patients With Coronary Artery Disease. *Circulation* 101:2252-2257

65. Jang Y, Kim JY, Kim OY, Lee JE, Cho H, Ordovas JM, Lee JH (2004) The -1131T-->C polymorphism in the apolipoprotein A5 gene is associated with postprandial hypertriacylglycerolemia; elevated small, dense LDL concentrations; and oxidative stress in nonobese Korean men. *Am J Clin Nutr* 80:832-840
66. Jarvik GP, Rozek LS, Brophy VH, Hatsukami TS, Richter RJ, Schellenberg GD, Furlong CE (2000) Paraoxonase (PON1) phenotype is a better predictor of vascular disease than is PON1(192) or PON1(55) genotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:2441-2447
67. Jiang H, Klein RM, Niederacher D, Du M, Marx R, Horlitz M, Boerrigter G, Lapp H, Scheffold T, Krakau I, Gulkler H (2002) C/T polymorphism of the intercellular adhesion molecule-1 gene (exon 6, codon 469). A risk factor for coronary heart disease and myocardial infarction. *Int J Cardiol* 84:171-177
68. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK (1986) Regional accumulations of T cells, macrophages and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis* 6:131-138 in: Ross R Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-126
69. Kamijikkoku S, Murohara T, Tayama S, Matsuyama K, Honda T, Ando M, Hayasaki K (1998) Acute myocardial infarction and increased soluble intercellular adhesion molecule-1: a marker of vascular inflammation and a risk of early restenosis? *Am Heart J* 136:231-236
70. Kang SS, Wong PW, Susmano A, Sora J, Norusis M, Ruggie N (1991) Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery. *Am. J. Hum. Genet* 48:536-545
71. Kathy L, Klos, Hamon S, Clark A, Boerwinkle E, Kiang L, Sing C (2005) APOA5 polymorphisms influence plasma triglycerides in young, healthy African American and whites of the CARDIA Study. *J. Lipid Res* 46: 564-570
72. Keil U (2005) The Worldwide WHO MONICA Project: results and perspectives. *Gesundheitswesen* 67:38-45
73. Kerkeni M, Addad F, Chauffert M, Myara A, Gerhardt M, Chevenne D, Trivin F, Farhat MB, Miled A, Maaroufi K (2006) Hyperhomocysteinaemia, methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and risk of coronary artery disease. *Ann Clin Biochem* 43:200-206
74. Kim J, Song J, Park Y, Hong S (1998) Molecular Bases of Coronary Heart Disease in Koreans. *J Korean Med Sci* 13:1-15
75. Kim CH, Hwang KY, Choi TM, Shin WY, Hong SY (2001) The methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in Koreans with coronary artery disease. *Int J Cardiol* 78:13-17
76. Kim MP, Wahl LM, Yanek LR, Becker DM, Becker LC (2006) A monocyte chemoattractant protein-1 gene polymorphism is associated with occult ischemia in a high-risk asymptomatic population. *Atherosclerosis* 23
77. Klos K, Hamon S, Clark A, Boerwinkle E, Liu K, Sing C F (2005) APOA5 polymorphisms influence plasma triglycerides in young, healthy African Americans and whites of the CARDIA Study. *J Lipid Res* 46:564-570

78. Ko YL, Ko YS, Wang SM, Hsu LA, Chang CJ, Chu PH, Cheng NJ, Chen WJ, Chiang CW, Lee YS (1998) The Gln-Arg 191 polymorphism of the human paraoxonase gene is not associated with the risk of coronary artery disease among Chinese in Taiwan. *Atherosclerosis* 141:259-264
79. Koch W, Kastrati A, Bottiger C, Mehilli J, von Beckerath N, Schomig A (2001) Interleukin-10 and tumor necrosis factor gene polymorphisms and risk of coronary artery disease and myocardial infarction. *Atherosclerosis* 159:137-144
80. Kolling K, Ndreppea G, Koch W, Braun S, Mehilli J, Schomig A, Kastrati A (2004) Methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T and A1298C polymorphisms, plasma homocysteine, folate, and vitamin B12 levels and the extent of coronary artery disease. *Am J Cardiol* 93:1201-1206
81. Kostner GM, Avogaro P, Cazzolato G, Marth E, Bittolo-Bon G, Quinci GB (1981) Lipoprotein Lp(a) and the risk for myocardial infarction. *Atherosclerosis* 38:51-61.
82. Kraft HG, Haibach C, Lingensel A, Brunner C, Trommsdorff M, Kronenberg F, Muller HJ, Utermann G (1995) Sequence polymorphism in kringle IV 37 in linkage disequilibrium with the apolipoprotein (a) size polymorphism. *Hum Genet* 95:275-282
83. Kuremoto K, Watanabe Y, Ohmura H, Shimada K, Mokuno H, Daida H (2003) R/R genotype of human paraoxonase (PON1) is more protective against lipoprotein oxidation and coronary artery disease in Japanese subjects. *J Atheroscler Thromb* 10:85-92
84. Lai CQ, Demissie S, Cupples LA, Zhu Y, Adiconis X, Parnell LD, Corella D, Ordovas JM (2004) Influence of the APOA5 locus on plasma triglyceride, lipoprotein subclasses, and CVD risk in the Framingham Heart Study. *J Lipid Res* 45:2096-2105
85. Latkovskis G, Licus N, Kalnins U (2004) C-reactive protein levels and common polymorphisms of the interleukin-1 gene cluster and interleukin-6 gene in patients with coronary heart disease. *Eur J Immunogenet* 31:207-213
86. Lee KW, Ayyobi AF, Frohlich JJ, Hill JS (2004) APOA5 gene polymorphism modulates levels of triglyceride, HDL cholesterol and FERHDL but is not a risk factor for coronary artery disease. *Atherosclerosis* 176:165-172
87. Leitlinie: Koronare Herzkrankheit / Angina pectoris, Deutsche Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung, Prof. Dr. med. J. Meyer, Mainz, Prof. Dr. med. G. Breithardt, Münster, Prof. Dr. med. R. Erbel, Essen, Prof. Dr. med. E. Erdmann, Köln, Prof. Dr. med. H. Gohlke, Bad Krozingen, Prof. Dr. med. P. Hanrath, Aachen, Dr. med. F. Sonntag, Henstedt-Rhen, Prof. Dr. med. G. Steinbeck, München
88. Lewandowski K, Swierczynska A, Kwasnikowski P, Elikowski W, Rzezniczak M. (2005) The prevalence of C807T mutation of glycoprotein Ia gene among young male survivors of myocardial infarction: a relation with coronary angiography results. *Kardiol Pol* 63:107-113
89. Lewis SJ, Ebrahim S, Davey Smith G (2005) Meta-analysis of MTHFR 677C->T polymorphism and coronary heart disease: does totality of evidence support causal role for homocysteine and preventive potential of folate? *BMJ* 331:1053
90. Libby P, Ross R (1996) Cytokines and growth regulatory molecule. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. *Atherosclerosis and coronary artery disease* 1996:585-594 in: Ross R (1999) *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. *N Engl J Med* 340:115-126

91. Libby P, Egan D, Skarlatos S (1997) Role of infectious agents in atherosclerosis and restenosis: an assessment of the evidence and need for future research. *Circulation* 96: 4095-103 in: Ross R (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-126
92. Libby P (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420:868-874
93. Lievers KJ, Boers GH, Verhoef P, den Heijer M, Kluijtmans LA, van der Put NM, Trijbels FJ, Blom HJ (2001) A second common variant in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene and its relationship to MTHFR enzyme activity, homocysteine, and cardiovascular disease risk. *J Mol Risk* 79:522-528
94. Liu H, Zhang S, Lin J, Li H, Huang A, Xiao C, Li X, Su Z, Wang C, Nebert DW, Zhou B, Zheng K, Shi J, Li G, Huang D (2005) Association between DNA variant sites in the apolipoprotein A5 gene and coronary heart disease in Chinese. *Metabolism* 54:568-572
95. Lloyd-Jones DM, Wilson PW, Larson MG, Beiser A, Leip EP, D'Agostino RB, Levy D (2004) Framingham risk score and prediction of lifetime risk for coronary heart disease. *Am J Cardiol* 94:20-24
96. Lusis AJ, Mar R, Pajukanta P (2004) Genetics of atherosclerosis. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 5:189-218
97. Mackness MI, Harty D, Bhatnagar D, Winocour PH, Arrol S, Ishola M, Durrington PN (1991) Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 86:193-199
98. Mackness MI, Durrington PN (1995) HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis* 115:243-253
99. Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, Connelly PW, Hegele RA (1996) Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 7:69-76
100. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Durrington PN (1997) Effect of the molecular polymorphisms of human paraoxonase (PON1) on the rate of hydrolysis of paraoxon. *Br J Pharmacol* 122:265-268
101. Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, Fogelman AM, Berliner J, Lusis AJ, Navab M, Shih D, Fonarow GC. (1998) Paraoxonase and coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol* 9:319-324
102. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Julier K, Abuasha B, Miller JE, Boulton AJ, Durrington PN (1998) Serum paraoxonase (PON1) 55 and 192 polymorphism and paraoxonase activity and concentration in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 139:341-349
103. Mackness B, Davies G, Turkie W, Lee E, Roberts D, Hill E, Roberts C, Durrington P, Mackness M (2001) Paraoxonase Status in Coronary Heart Disease: Are Activity and Concentration More Important Than Genotype? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 21:1451-1457
104. Mackness MI, Mackness B, Durrington PN (2002) Paraoxonase and coronary heart disease. *Atheroscler* 3:49-55

105. Mackness B, Durrington P, McElduff P, Yarnell J, Azam N, Watt M, Mackness M. (2003) Paraoxonase Activity Predicts Coronary Events in the Caerphilly Prospective Study. *Circulation* 107:2775-2779
106. Mackness M, Durrington P, Mackness B (2004) Paraoxonase 1 activity, concentration and genotype in cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 15:399-404
107. Mackness B, Quarck R, Verreth W, Mackness M, Holvoet P (2006) Human paraoxonase-1 overexpression inhibits atherosclerosis in a mouse model of metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:1545-1550
108. Mager A, Lalezari S, Shobat T, Birnbaum Y, Adler Y, Magal N, Shohat M (1999) Methylentetrahydrofolate Reductase Genotypes and Early- Onset Coronary Artery Disease. *Circulation* 100:2406-2410
109. Mager A, Koren-Morag N, Shohat M, Harell D, Battler A (2005) Family history, plasma homocysteine, and age at onset of symptoms of myocardial ischemia in patients with different methylenetetrahydrofolate reductase genotypes. *Am J Cardiol* 95:1420-1424
110. Martinelli N, Trabetti E, Bassi A, Girelli D, Friso S, Pizzolo F, Sandri M, Malerba G, Pignatti PF, Corrocher R, Olivieri O (2006) The -1131 T>C and S19W APOA5 gene polymorphisms are associated with high levels of triglycerides and apolipoprotein C-III, but not with coronary artery disease: an angiographic study. *Atherosclerosis* 6
111. McCully KS (2005) Hyperhomocysteinemia and arteriosclerosis: historical perspectives. *Clin Chem Lab Med* 43:980-986
112. McDermott DH, Yang Q, Kathiresan S, Cupples LA, Massaro JM, Keaney JF Jr, Larson MG, Vasan RS, Hirschhorn JN, O'Donnell CJ, Murphy PM, Benjamin EJ (2005) CCL2 polymorphisms are associated with serum monocyte chemoattractant protein-1 levels and myocardial infarction in the Framingham Heart Study. *Circulation* 112:1113-1120
113. McGlinchey PG, Spence MS, Patterson CC, Allen AR, Murphy G, Belton C, McKeown PP (2004) Lack of association between the -2518G/A polymorphism of the MCP-1 gene and ischaemic heart disease: a family-based investigation. *Tissue Antigens* 64:199-203
114. McGlinchey PG, Spence MS, Patterson CC, Allen AR, Murphy G, Belton C, McKeown PP (2004) The intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) gene K469E polymorphism is not associated with ischaemic heart disease: an investigation using family-based tests of association. *Eur J Immunogenet* 31:201-206
115. Meisel C, Cascorbi I, Gerloff T, Stangl V, Laule M, Muller JM, Wernecke KD, Baumann G, Roots I, Stangl K (2001) Identification of six methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genotypes resulting from common polymorphisms: impact on plasma homocysteine levels and development of coronary artery disease. *Atherosclerosis* 154:651-658
116. Meyer K, Fredriksen A, Ueland PM (2004) High- Level Multiplex Genotyping of Polymorphisms Involved in Folate or Homocysteine Metabolism by Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry* 50:391-402
117. Milan E (2005) Coronary artery disease. The other half of the heaven. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 49:72-80

118. Miles LA, Fless GM, Scanu AM, Baynham P, Sebald MT, Skocir P, Curtiss LK, Levin EG, Hoover-Plow JL, Plow EF (1995) Interaction of Lp(a) with plasminogen binding sites on cells. *Thromb Haemost* 73:458-465
119. Milutinovic A, Petrovic D (2006) The K469E polymorphism of the intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) gene is not associated with myocardial infarction in caucasians with type 2 diabetes. *Folia Biol* 52:79-80
120. Mudd SH, Levy HL, Skovby F (1995) Disorder of transsulfuration in Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valles D: The Metabolic Basis of Inherited Disease
121. Murphy PM (2002) International Union of Pharmacology. XXX. Update on chemokine receptor nomenclature. *Pharmacol Rev* 54:227-229
122. Navab M, Berliner JA, Watson AD (1996) The Yin and Yang of oxidation in the development of fatty streaks: a review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16: 831-834
123. Nakai K, Itoh C, Nakai K, Habano W, Gurwitz D (2001) Correlation between C677T MTHFR gene polymorphism, plasma homocysteine levels and the incidence of CAD. *Am J Cardiovasc Drugs* 1:353-361
124. Namiki M, Kawashima S, Yamashita T, Ozaki M, Hirase T, Ishida T, Inoue N, Hirata K, Matsukawa A, Morishita R, Kaneda Y, Yokoyama M (2002) Local Overexpression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 at Vessel Wall Induces Infiltration of Macrophages and Formation of Atherosclerotic Lesion Synergism With Hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:115-120
125. Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, Wilcox J (1991) Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest* 88:1121-1127
126. Novelli G, Borgiani P, Giardina E, Mango R, Contino G, Romeo F, Mehta JL (2002) Role of genetics in prevention of coronary atherosclerosis. *Curr Opin Cardiol* 18:368-371
127. Nygard O, Refsum H, Ueland PM, Vollset SE (1998) Major lifestyle determinants of plasma total homocysteine distribution: the Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr* 67:263-270
128. O'Brien PJ, Alborn WE, Sloan JH, Ulmer M, Boodhoo A, Knierman MD, Schultze AE, Konrad RJ (2005) The novel apolipoprotein A5 is present in human serum, is associated with VLDL, HDL, and chylomicrons, and circulates at very low concentrations compared with other apolipoproteins. *Clin Chem* 51:351-359
129. Oliveira SA, Mansur AP, Ribeiro CC, Ramires JA, Annichino-Bizzacchi JM (2004) PON1 M/L55 mutation protects high-risk patients against coronary artery disease. *Int J Cardiol* 94:73-77
130. Ombres D, Pannitteri G, Montali A, Candeloro A, Seccareccia F, Campagna F, Cantini R, Campa PP, Ricci G, Arca M (1998) The gln-Arg192 polymorphism of human paraoxonase gene is not associated with coronary artery disease in italian patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1611-1616

131. Oppenheim J (2001) Cytokines: past, present, and future. *Int J Hematol* 74:3-8
132. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci* 86:2766-2770
133. Payne DA, Chamoun AJ, Seifert SL, Stouffer GA (2001) MTHFR 677 C-->T mutation: a predictor of early-onset coronary artery disease risk. *Thromb Res* 103:275-279
134. Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Cohen JC, Cox DR, Fruchart JC, Krauss RM, Rubin EM (2001) An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science* 294:169-173
135. Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Krauss RM, Rubin EM, Cohen J (2002) Two independent apolipoprotein A5 haplotypes influence human plasma triglyceride levels. *Hum Mol Genet* 11:3031-3038
136. Pocathikorn A, Granath B, Thiry E, Van Leuven F, Taylor R, Mamotte C (2003) Influence of exonic polymorphisms in the gene for LDL receptor-related protein (LRP) on risk of coronary artery disease. *Atherosclerosis* 168:115-121
137. Prins J, van der Hoek YY, Biesheuvel TH, Leus FR, van Rijn HJ, Kastelein JJ (1998) The functional and clinical significance of the Met-->Thr substitution in Kringle IV type 10 of apolipoprotein(a). *Thromb Res* 90:125-130
138. Rassoul F, Richter V, Kuntze T, Mohr FW, Geisel J, Herrmann W (2000) Genetic Polymorphism of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) and Coronary Artery Disease. *Int J Angiol* 9:205-207
139. Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE (1998) Homocysteine and cardiovascular disease. *Ann Rev Med* 49:31-62
140. Rieder A (2001) Social medicine aspects of the aging man. *Wien Med Wochenschr*. 151:412-421
141. Ridker PM (1999) Inflammation, atherosclerosis, and cardiovascular risk: an epidemiologic view. *Blood Coagul Fibrinolysis Suppl* 1:9-12
142. Rios DL, Callegari-Jacques SM, Hutz MH (2005) Endothelial nitric oxide synthase and fractalkine chemokine receptor polymorphisms on angiographically assessed coronary atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 362:138-146
143. Rollins B (1997) Chemokines. *Blood*, 3:909-928
144. Ross R, Glomset JA (1973) Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis 180:1332-1339 in: Ross R (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-126
145. Ross R (1976) The pathogenesis of atherosclerosis. *N Engl J Med* 295:369-377, in: Ross R (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-126
146. Ross R (1981) Atherosclerosis – a problem of the biology of arterial wall cells and their interactions with blood components. *Arteriosclerosis* 1:293-311: Ross R (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-126

147. Ross R (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362:801-809 in: Ross R (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-126
148. Ross R (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-126
149. Rovin BH, Lu L, Saxena R (1999) A novel polymorphism in the MCP-1 gene regulatory region that influences MCP-1 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 259:344-348
150. Rumberger JA, Brundage BH, Rader DJ, Kondos G (1999) Electron beam computed tomographic coronary calcium scanning: a review and guidelines for use in asymptomatic persons. *Mayo Clin Proc* 74:538
151. Sanghera DK, C E Aston, N Saha, and M I Kamboh (1998) DNA polymorphisms in two paraoxonase genes (PON1 and PON2) are associated with the risk of coronary heart disease. *Am J Hum Genet* 62:36-44
152. Sanghera DK, Saha N, Kamboh MI (1998) The codon 55 polymorphism in the paraoxonase 1 gene is not associated with the risk of coronary heart disease in Asian Indians and Chinese. *Atherosclerosis* 136:217-223
153. Scanu AM, Edelstein C (1994) Apolipoprotein(a): structural and functional consequences of mutations in kringle type 10 (or kringle 4-37). *Clin Genet* 46:42-45
154. Scanu AM (1995) Structural and functional polymorphism of lipoprotein(a): biological and clinical implications. *Clin Chem* 41:170-172
155. Segrest JP, Jones MK, De Loof H, Dashti N (2001) Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. *J Lipid Res* 42:1346-1367
156. Serrato M, Marian AJ (1995) A variant of human paraoxonase/arylesterase (HUMPONA) gene is a risk factor for coronary artery disease. *J Clin Invest* 96:3005-3008
157. Sheikine Y, Hansson GK (2004) Chemokines and atherosclerosis. *Ann Med* 36:98-118
158. Shishehbor MH, Bhatt DL (2004) Inflammation and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 6:131-139
159. Simeoni E, Winkelmann BR, Hoffmann MM, Fleury S, Ruiz J, Kappenberger L, Marz W, Vassalli G (2004) Association of RANTES G-403A gene polymorphism with increased risk of coronary arteriosclerosis. *Eur Heart J* 25:1438-1446
160. Simo JM, Joven J, Vilella E, Ribas M, Figuera L, Virgos C, Sundaram IM, Hoover-Plow J (2001) Polymorphisms in human apolipoprotein(a) kringle IV-10 and coronary artery disease: relationship to allele size, plasma lipoprotein(a) concentration, and lysine binding site activity. *J Mol Med* 79:294-299
161. Springer TA, Alon R, Fuhlbrigge RC, Finger EB (1996) Interactions through L-selectin between leukocytes and adherent leukocytes nucleate rolling adhesions on selectins and VCAM-1 in shear flow. *J Cell Biol* 135:849-865

162. Stary HC (1996) The histological classification of atherosclerotic lesions in human coronary arteries. *Atherosclerosis and coronary artery disease*: 463-474 in: Ross R (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-126
163. Stanger O, Herrmann W, Pietrzik B, Fowler J, Geisel J, Dierkes M, D.A.CH.-Liga Homocystein e.V. (2003) Konsensuspapier der D.A.CH.-Liga Homocystein über den rationellen klinischen Umgang mit Homocystein, Folsäure und B-Vitaminen bei kardiovaskulären und thrombotischen Erkrankungen –Richtlinien und Empfehlungen *J KARDIOL* 10
164. Steinberg D (1997) Low density lipoprotein oxidation and its pathophysiological significance. *J Biol Chem* 272:20963-20966
165. Sutherland WH, Walker RJ, de Jong SA, van Rij AM, Phillips V, Walker HL (1999) Reduced postprandial serum paraoxonase activity after a meal rich in used cooking fat. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:1340-1347
166. Syrris P, Schwartzman R, Jeffery S, Kaski JC, Carter N (1997) Polymorphism in apolipoprotein(a) kringle IV 37(Met/Thr): frequency in a London population and its association with coronary artery disease. *Clin Cardiol* 20:870-872
167. Szalai C, Duba J, Prohaszka Z, Kalina A, Szabo T, Nagy B, Horvath L, Csaszar A. (2001) Involvement of polymorphisms in the chemokine system in the susceptibility for coronary artery disease (CAD). Coincidence of elevated Lp(a) and MCP-1 -2518 G/G genotype in CAD patients. *Atherosclerosis* 158:233-239
168. Szalai C, Keszei M, Duba J, Prohaszka Z, Kozma GT, Csaszar A, Balogh S, Almassy Z, Fust G, Czinner A (2004) Polymorphism in the promoter region of the apolipoprotein A5 gene is associated with an increased susceptibility for coronary artery disease. *Atherosclerosis* 173:109-114
169. Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Amouyel P, Arveiler D, Rajakangas AM, Pajak A (1994) Myocardial infarction and coronary deaths in the World Health Organization MONICA Project. Registration procedures, event rates, and case-fatality rates in 38 populations from 21 countries in four continents. *Circulation* 90:583-612
170. Turban S, Fuentes F, Ferlic L, Brugada R, Gotto AM, Ballantyne CM, Marian AJ (2001) A prospective study of paraoxonase gene Q/R192 polymorphism and severity, progression and regression of coronary atherosclerosis, plasma lipid levels, clinical events and response to fluvastatin. *Atherosclerosis* 154:633-640
171. The British Heart Foundation (BHF) Family Heart Study Samani NJ, Burton P, Mangino M, Ball SG, Balmforth AJ, Barrett J, Bishop T, Hall A BHF (2005) Family Heart Study Research Group
172. Vaessen SF, Schaap FG, Kuivenhoven JA, Groen AK, Hutten BA, Boekholdt SM, Hattori H, Sandhu MS, Bingham SA, Luben R, Palmen JA, Wareham NJ, Humphries SE, Kastelein JJ, Talmud PJ, Khaw KT (2006) Apolipoprotein A-V, triglycerides and risk of coronary artery disease: the prospective Epic-Norfolk Population Study. *J Lipid Res* 47:2064-2070
173. Van de Stolpe A, van der Saag PT (1996) Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med* 74:13-33

174. Van der Gaag MS, van Tol A, Scheek LM, James RW, Urgert R, Schaafsma G, Hendriks HF (1999) Daily moderate alcohol consumption increases serum paraoxonase activity; a diet-controlled, randomised intervention study in middle-aged men. *Atherosclerosis* 147:405-410
175. Van der Wal AC, Das PK, Bentz van de Berg D, van der Loos CM, Becker AE (1989) Atherosclerotic lesions in humans: *in situ* immunophenotypic analysis suggesting an immune mediated response. *Lab invest* 61:166-170 in: Ross R (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-126
176. van der Vliet HN, Schaap FG, Levels JH, Ottenhoff R, Looije N, Wesseling JG, Groen AK, Chamuleau RA (2002) Adenoviral overexpression of apolipoprotein A-V reduces serum levels of triglycerides and cholesterol in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 295:1156-1159
177. Vohnout B, Di Castelnuovo A, Trotta R, D'Orazi A, Panniteri G, Montali A, Donati MB, Arca M, Iacoviello L (2003) Interleukin-1 gene cluster polymorphisms and risk of coronary artery disease. *Haematologica* 88:54-60
178. Wald DS, Law M, Morris JK (2002) Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ* 325:1202
179. Wang XL, Duarte N, Cai H, Adachi T, Sim AS, Cranney G, Wilcken DE (1999) Relationship between total plasma homocysteine, polymorphisms of homocysteine metabolism related enzymes, risk factors and coronary artery disease in the Australian hospital-based population. *Atherosclerosis* 146:133-140
180. Watzinger N, Schmidt H, Schumacher M, Schmidt R, Eber B, Fruhwald FM, Zweiker R, Kostner GM, Klein W (2002) Human paraoxonase 1 gene polymorphisms and the risk of coronary heart disease: a community-based study. *Cardiology* 98:116-122
181. Weinberg RB, Cook VR, Beckstead JA, Martin DD, Gallagher JW, Shelness GS, Ryan RO (2003) Structure and interfacial properties of human apolipoprotein A-V. *J Biol Chem* 278:34438-34444
182. Welch GN, Loscalzo J (1998) Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med* 338:1042-1050
183. Weiss EJ, Bray PF, Tayback M, Schulman SP, Kickler TS, Becker LC, Weiss JL, Gerstenblith G, Goldschmidt-Clermont PJ (1996) A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *N Engl J Med* 334:1090-1094
184. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB (1998) Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* 97:1837-1847
185. Yilmaz H, Isbir S, Agachan B, Ergen A, Farsak B, Isbir T (2006) C677T mutation of methylenetetrahydrofolate reductase gene and serum homocysteine levels in Turkish patients with coronary artery disease. *Cell Biochem Funct* 24:87-90
186. Yu, Dluz S, Graves DT, Zhang L, Antoniades HN, Hollander W, Prusty S, Valente AJ, Schwartz CJ, Sonenshein GJ (1992) Elevated Expression of Monocyte Chemoattractant Protein 1 by Vascular Smooth Muscle Cells in Hypercholesterolemic Primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89:6953-6957

187. Zama T, Murata M, Matsubara Y, Kawano K, Aoki N, Yoshino H, Watanabe G, Ishikawa K, Ikeda Y (1997) A 192Arg variant of the human paraoxonase (HUMPPONA) gene polymorphism is associated with an increased risk for coronary artery disease in the Japanese. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:3565-3569
188. Zdravkovic S, Wienke A, Pedersen NL, Marenberg ME, Yashin AI, De Faire U (2002) Heritability of death from coronary heart disease: a 36-year follow-up of 20 966 Swedish twins. *J Intern Med* 252:247-254
189. Zhang SR, Xu LX, Gao QQ, Zhang HQ, Xu BS, Lin J, Huang WJ (2006) The correlation between ICAM-1 gene K469E polymorphism and coronary heart disease. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 23:205-207
190. Zouridakis E, Avanzas P, Arroyo-Espliguero R, Fredericks S, Kaski JC (2004) Markers of inflammation and rapid coronary artery disease progression in patients with stable angina pectoris. *Circulation* 110:1747-1753
191. Zuntar I, Topic E, Vukosavic D, Vukovic V, Demarin V, Begonja A, Antoljak N, Simundic AM (2003) Croatian population data for the C677T polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase: frequencies in healthy and atherosclerotic study groups. *Clin Chim Acta* 335:95-100

10. Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich beim Werdegang meiner Dissertation begleitet haben.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. W. Herrmann, dem Leiter des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin – Zentrallabor des Universitätsklinikums des Saarlandes, Homburg/ Saar, danke ich herzlich für die Nutzung der technischen Möglichkeiten.

In besonderem Maße gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. J. Geisel für die Überlassung des Themas und für seine Geduld bei der wissenschaftlichen Betreuung. Seine anregende Kritik und große Hilfe trugen ganz wesentlich zur Erstellung meiner Arbeit bei.

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei der medizinisch – technischen Assistentin Frau Marion Bodis für ihre kompetente Einarbeitung sowie ihre freundliche und wertvolle Unterstützung bei den Laborarbeiten bedanken.

Weiterhin gebührt Frau jun. Prof. Dr. Rima Obeid sowie Herrn Dr. Ulrich Hübner großer Dank für ihre motivierende Unterstützung und Hilfe bei den statistischen Fragen und Problemen.

Meiner Familie gilt tiefer und unermeßlicher Dank.

11. Lebenslauf

Personendaten

Name: Nadia Saleh

Geburtstag: 02.05.1975

Geburtsort: Siegburg

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulische Ausbildung

1982 Grundschule Deichhaus Siegburg

1986 Alexander – von – Humboldt – Realschule, Siegburg

1992 Städt. Anno-Gymnasium, Siegburg,
Schulabschluß Allgemeine Hochschulreife

Freiwilliges Soziales Jahr

09/1996 - 09/1997 Johanniter- Kinderklinik, Sankt Augustin

Studium

10/ 1997 - 04/ 2003 Studium der Humanmedizin an der Universität Saarbrücken

04/ 2003 - 03/ 2004 Praktisches Jahr Universität Bonn

05/2004 Ärztliche Prüfung

Seit 07/2004 Assistenzärztin Universitätsklinikum Bonn, Pädiatrie