

Hereditäre Suszeptibilitätsfaktoren für die koronare Herzerkrankung als Basis einer individualisierten Arzneitherapie

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach

Klinische Pharmakologie

Vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Herrn Dr. med. Christian Meisel
geboren am 16.02.1967 in Bad Aibling

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. J. Mlynek
Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Eingereicht: Juni 2003
Datum der Habilitation: 4.12.2003

Gutachter: 1. Prof. Dr. Dr. W. Kirch
2. Prof. Dr. M. Wehling

Diese Habilitationsschrift beruht auf dem Inhalt der nachfolgenden Arbeiten:

- V1:** Meisel C, Köpke K, Roots I. Polymorphisms of adrenergic receptors and the risk of heart failure. (Letter to the Editor) *N Engl J Med* 2003;348:468-469
- V2:** Laule M*, Meisel C*, Prauka I, Cascorbi I, Malzahn U, Felix SB, Baumann G, Roots I, Stangl K, Stangl V. Interaction of CA repeat polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase and hyperhomocysteinemia in acute coronary syndromes: evidence of gender-specific differences. *J Mol Med* 2003;81:305-9. (*contributed equally)
- V3:** Meisel C, Gerloff T, Kirchheiner J, Mrozikiewicz PM, Niewinski P, Brockmöller J, Roots I. Implications of Pharmacogenetics for Individualising Drug Treatment and for Study Design. *J Mol Med* 2003;81:154-167
- V4:** Klerk M, Verhoef P, Clarke R, Blom HJ, Kok FJ, Schouten EG, and the **MTHFR Studies Collaboration Group**. MTHFR 677C>T Polymorphism and risk of coronary heart disease: A Meta-Analysis. *JAMA* 2002; 288:2023-31
- V5:** Meisel C, Afshar-Kharghan V, Cascorbi I, Laule M, Stangl V, Felix SB, Bauman G, López JA, Roots I, Stangl K. Role of Kozak sequence polymorphism of platelet glycoprotein Ib α as a risk factor for coronary artery disease and catheter interventions. *J Am Coll Cardiol* 2001;38:1024-1027.
- V6:** Meisel C, Cascorbi I, Gerloff T, Stangl V, Laule M, Müller JM, Wernecke KD, Baumann G, Roots I, Stangl K. Identification of Six Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Genotypes Resulting From Common Polymorphisms: Impact on Plasma Homocysteine Levels and Development of Coronary Artery Disease. *Atherosclerosis*. 2001; 154:651-8.
- V7:** Meisel C, Cascorbi I, Herrmann A, Roots I, Laule M, Stangl V, Stangl K. The Platelet Glycoprotein Ia C807T Polymorphism as Risk Factor for Coronary Catheter Interventions (Letter). *Blood* 2000; 96:2002-2003

V8: Meisel C, Laule M, Cascorbi I, Stangl V, Roots I, and Stangl K. The G Protein Subunit beta 3 and Early Complications After Coronary Catheter Interventions (Letter). *Atherosclerosis* 2000; 153:523-524

V9: Mrozikiewicz PM, Cascorbi I, Ziemer S, Laule M, Stangl V, Meisel C, Baumann G, Roots I, Stangl K.: Reduced procedural risk for coronary interventions in carriers of the coagulation factor VII-Gln353 gene. *J Am Coll Cardiol.* 2000; 36: 1520-1525

V10: Meisel C, López JA, Stangl K. Role of platelet glycoprotein polymorphisms in cardiovascular diseases. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2003 Nov 12 [Epub ahead of print].

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung in die Thematik
 - 1.1. Hereditäre Suszeptibilitätsfaktoren für die koronare Herzerkrankung
 - 1.2. Bedeutung von Polymorphismen im Homozysteinmetabolismus für die koronare Herzerkrankung
 - 1.3. Bedeutung von Polymorphismen im Gerinnungssystem für die koronare Herzerkrankung
2. Zielstellungen und zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse
 - 2.1. Patientenpopulation und Studiendesign
 - 2.2. Assoziation von Polymorphismen der Methylentetrahydrofolatreduktase mit dem Homozystein-Spiegel und dem KHK-Risiko (V4, V6)
 - 2.3. Geschlechtsunterschiede in der Homozystein-abhängigen Gen-Umwelt-Interaktion bei akuten Koronarsyndromen (V2)
 - 2.4. Assoziation des Kozak-Sequenz-Polymorphismus des thrombozytären Glycoproteins Ib α mit der koronaren Herzerkrankung und Frühkomplikationen nach Koronarinterventionen (V5, V10)
 - 2.5. Assoziation des Polymorphismus C⁸⁰⁷T im thrombozytären Glycoprotein Ia mit Frühkomplikationen nach Koronarinterventionen (V7, V10)
 - 2.6. Assoziation des Gerinnungsfaktor VII-Polymorphismus Arg³⁵³Gln (R³⁵³Q) mit dem prozeduralen Risiko nach Koronarintervention (V9)
 - 2.7. Assoziation des C⁸²⁵T-Polymorphismus in dem für die β 3-Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins kodierenden Gen (GNB3) mit Frühkomplikationen nach Koronarinterventionen (V8)
3. Zusammenfassende Diskussion
 - 3.1. Medizinische Anwendung
 - 3.2. Methodische Aspekte genetischer Assoziationsstudien (V1,V3)
 - 3.3. Ausblick
4. Zusammenfassung
 - Abkürzungen
 - Referenzen
 - Danksagung
 - Eidesstattliche Erklärung

1. Einführung in die Thematik

1.1. Hereditäre Suszeptibilitätsfaktoren für die koronare Herzerkrankung als Basis einer individualisierten Therapie

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind heute die führende Todesursache in den Industrieländern. Sie stellen für öffentliche Gesundheitssysteme in den Industrieländern eine zunehmende Bedrohung dar, da die Therapie der koronaren Herzerkrankung und ihrer Komplikationen, die Behandlung von Schlaganfall und peripherer arterieller Verschlusskrankheit große Anteile der Gesundheitsausgaben beanspruchen.

Bereits seit mehr als 35 Jahren sind mit den Ergebnissen der *Framingham Study* Hypercholesterinämie, Nikotinabusus, Diabetes mellitus und arterielle Hypertonie als wesentliche kausale Risikofaktoren für die koronare Herzerkrankung und den Myokardinfarkt bekannt ¹.

Es ist unzweifelhaft belegt, dass über diese konventionellen Risikofaktoren hinaus genetische Faktoren einen wichtigen Beitrag zur Erkrankung liefern. Eine Vielzahl von Fall-Kontroll-Studien und prospektiven Kohortenstudien, darunter die *Framingham Study* und die *Nurses Health Study* ^{2,3}, zeigen, dass die positive Familienanamnese erstgradiger Verwandter ein weiterer unabhängiger Risikofaktor für die koronare Herzerkrankung und den Myokardinfarkt darstellt. In prospektiven Studien hatten erstgradige Verwandte von Patienten, die an einem Myokardinfarkt verstorben sind, adjustiert für konventionelle Risikofaktoren ein 1,5- bis 2-fach erhöhtes Risiko, selbst einen Myokardinfarkt zu erleiden ⁴. In Zwillingsstudien war eine signifikant höhere Konkordanz der koronaren Herzerkrankung bei monozygoten Zwillingen verglichen mit dizygoten Zwillingen beobachtet worden; in einer Studie hatten monozygote Zwillinge ein 8-fach erhöhtes Risiko, dizygote Zwillinge ein 4-fach erhöhtes Risiko ebenso wie der andere Zwilling an einem Myokardinfarkt zu versterben ⁵.

Während des letzten Jahrzehnts sind weltweit intensive Anstrengungen unternommen worden, genetische Einflussfaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen zu untersuchen. Seit der Verfügbarkeit der ersten Referenzfassung der humanen Genomsequenz ^{6, 7} ist die Charakterisierung der genomischen Variabilität ein neuer, grundlegender Schwerpunkt genomischer Forschung geworden. Die systematische Untersuchung genetischer Prädispositionsfaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen und ihrer Komplikationen hat sich zu einem besonders intensiv bearbeiteten Forschungsfeld entwickelt.

Aus klinisch-pharmakologischer Sicht sind diese pharmakogenomischen Untersuchungen sowohl für die Arzneimitteltherapie wie auch für die Arzneimittelent-

wicklung bedeutsam. Wirkstofffindung und Arzneimittelentwicklung profitieren ebenso von der Pharmakogenomik, da ein intensiveres Verständnis der Erkrankung und das Auffinden neuer pathophysiologischer Mechanismen auf der molekularen Ebene die Möglichkeit bietet, neue Zielmoleküle für die Arzneimittelentwicklung zu finden. Für die konkrete medizinische Anwendung von Arzneimitteln am Menschen ist die Untersuchung genetischer Suszeptibilitätsfaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen mit der besonderen Erwartung verknüpft, dass die Aufklärung genetischer Risikofaktoren für komplexe Erkrankungen es erlauben könnte, solche Patientenpopulationen auf der Basis genetischer Information besser identifizieren zu können, die ein besonderes Erkrankungsrisiko aufweisen. Dieses Wissen könnte im Sinne einer individualisierten Behandlung für die Beratung, Prävention und Therapie der Patienten genutzt werden.

Die Untersuchung hereditärer Suszeptibilitätsfaktoren für komplexe Erkrankungen ist ein wichtiger Teilbereich der Pharmakogenomik, da möglicherweise neben der Einschätzung des Erkrankungsrisikos als Grundlage der Prävention auch die Indikationsstellung zur Therapie und die Auswahl und Dosierung von Arzneimitteln durch die Einbeziehung genetischer Marker vermehrt individualisiert werden können. Pathophysiologisch bedeutsame Targets stellen häufig gleichzeitig Angriffspunkte für Arzneimittel dar. Genetische Variabilität dieser Targets kann so die Wirkung von Arzneimitteln beeinflussen. Kürzlich wurde am Beispiel der Wirkung von Salbutamol gezeigt, dass die Bronchodilatation nach inhalativer Gabe des β_2 -Agonisten von Haplotypen des β_2 -adrenergen Rezeptors beeinflusst wird⁸.

Es wurden zwei grundsätzlich unterschiedliche Ansätze zur Untersuchung genetischer Prädispositionsfaktoren für komplexe Erkrankungen angewandt. Die Kopplungsanalyse (*linkage analysis*) verfolgt die Kovarianz einer phänotypischer Ausprägung (z.B. des Myokardinfarkts) mit der Allelkonfiguration in Familienstrukturen, wie Geschwisterpaare oder Mehrgenerationenstammbäume, während die Assoziationsanalyse den Effekt eines Allels auf eine phänotypische Größe durch den Vergleich von Erkrankten mit gesunden Kontrollen untersucht.

Die Kopplungsanalyse war bei der Aufklärung monogener Ursachen von Erkrankungen sehr erfolgreich⁹. Bei komplexen Erkrankungen, wie koronare Herzerkrankung, Diabetes oder Krebs, sind eine Vielzahl von Genen beteiligt, die einzeln jeweils nur ein gering bis moderat erhöhtes Risiko mit sich bringen. Darüber hinaus interagieren verschiedene Gene komplex miteinander und mit Umweltfaktoren. Wegen dieser

Voraussetzungen ist die statistische Power der Kopplungsanalyse für die Untersuchung komplexer Erkrankungen geringer als die der Assoziationsstudien¹⁰⁻¹³.

Daher erscheinen Assoziationsstudien, die das Auftreten von Genvarianten bei Patienten mit einem definierten Phänotyp (z.B. Myokardinfarkt) mit gesunden Kontrollen vergleichen, als geeignetere Strategie. Nachdem in einer Pionier-Arbeit diese Methode erfolgreich in einer Fall-Kontrollstudie angewandt worden war¹⁴, sind in einer Vielzahl von Assoziationsstudien verschiedene Kandidatengene als genetische Prädispositionsfaktoren für komplexe Erkrankungen untersucht worden. Tabelle 1 zeigt eine Auswahl von Stoffwechselsystemen und Genen, die in ihrer Assoziation mit kardiovaskulären Erkrankungen untersucht wurden.

Tabelle 1. Beispiele von Kandidatengenen, die in ihrer Assoziation zu kardiovaskulären Erkrankungen untersucht wurden. Gene, deren Untersuchung Gegenstand dieser Habilitationsschrift ist, finden sich im Fettdruck.

Physiologisches System	Ausgewählte Gene
Blutgerinnung/Fibrinolyse	Thrombozytäre Rezeptoren (z.B. GP Iβ , GP Ia/IIa , GP I Ib/IIIa) Gerinnungsfaktoren (z.B. Faktor II, Faktor V, Faktor VII , Faktor XIII) PAI-1 t-PA Fibrinogen α , β , γ
Renin/Angiotensin/Aldosteronsystem	ACE Angiotensinogen Angiotensin II Rezeptor Typ 1 Aldosteron-Synthase (CYP11B2)
Endothelin system	Endothelin 1, 2, 3 ECE-1 Endothelinrezeptoren A und B
Adrenerges System	Beta-adrenerge Rezeptoren -1, -2, -3 Alpha-adrenerge Rezeptoren -1, -2 Signaltransduktion: G-Proteine
Entzündungssystem	ICAM-1 Interleukin 1- α , 6 TNF- α
Endotheliale Funktion	E-Selectin, endotheliale NO-Synthase (eNOS)
Lipidsystem	Apolipoproteine A, B, CIII, E Cholesterinestertransferprotein Lipoproteinlipase Paraoxonase LDL Rezeptor
Homozystein-Metabolismus	Cystathion β -Synthase Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR) Methioninsynthase
Ionenkanäle	SCN5A
Xenobiotika-Metabolismus und Transport	Cytochrom-P450-Enzyme Phase-II-Enzyme P-Glycoprotein multidrug resistance Andere Multidrugtransporter

Schwerpunkte der eigenen Arbeit in diesem Forschungsbereich waren Untersuchungen zu Kandidatengenenen aus dem Blutgerinnungssystem und dem Homozysteinstoffwechsel als potentielle genetische Suszeptibilitätsfaktoren für die koronare Herzerkrankung. In der vorliegenden Habilitationsschrift werden nach einer kurzen Einführung die Ergebnisse der eigenen Arbeiten zusammenfassend dargestellt.

1.2. Bedeutung von Polymorphismen im Homozysteinstoffwechsel für die koronare Herzerkrankung

Homozystein ist eine schwefelhaltige Aminosäure, der im Methionin-Stoffwechsel eine entscheidende Rolle zukommt.

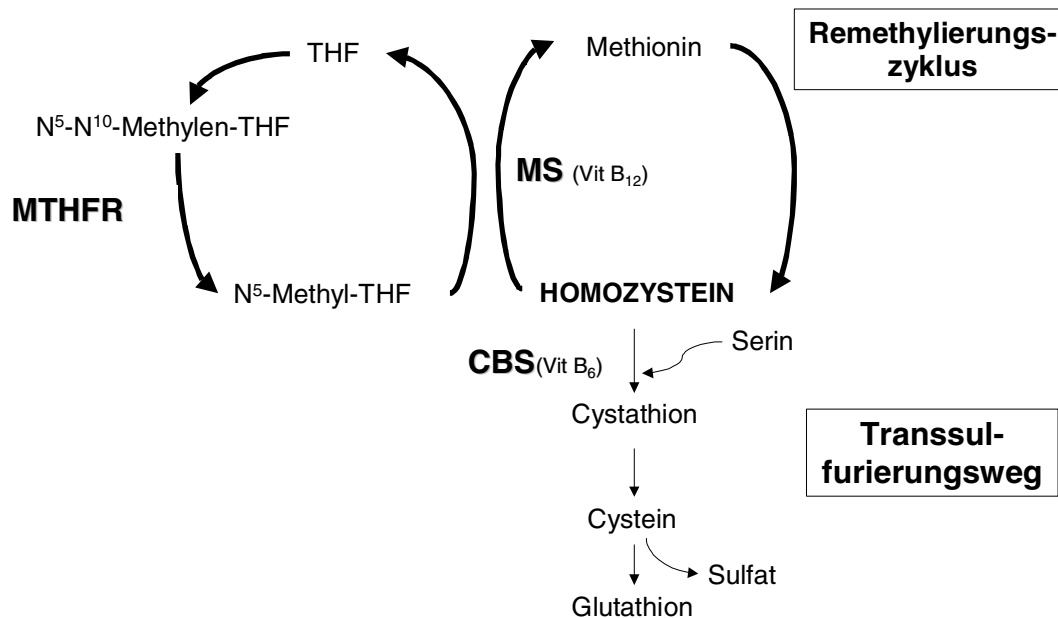


Abb. 1 Homozystein-Stoffwechselwege. MTHFR, 5,10-Methylentetrahydrofolatreduktase; MS, Methionin-Synthase; CBS, Cystathion-Betasynthetase, THF, Tetrahydrofolat.

Genetische Defekte der im Homozysteinstoffwechsel beteiligten Enzyme (Abb. 1) oder ein Mangel an deren Kofaktoren (Vitamin B₆, Vitamin B₁₂, Folsäure) resultieren in einer Erhöhung des Homozystein-Spiegels. Eine komplette Defizienz der 5,10-Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR) ist in der Pädiatrie bekannt und führt zur Homozystinurie, die durch eine progressive neurologische Symptomatik und frühzeitige Atherosklerose mit Myokardinfarkten und Schlaganfällen bereits im Kindes- und Adoleszentenalter gekennzeichnet ist¹⁵.

Viele epidemiologische Studien deuteten darauf hin, dass Patienten mit erhöhten Plasma-Homozystein-Spiegeln ein erhöhtes Risiko aufweisen, eine koronare Herzerkrankung zu erleiden¹⁶⁻²⁰. Es war allerdings unklar, ob diese Assoziation kausal durch Homozystein begründet war²¹, da auch eine Reihe von Beobachtungsstudien gezeigt hatte, dass ein inverser Zusammenhang zwischen der Menge der mit der Nahrung eingenommenen Folsäure, dem Plasmafolsäurespiegel und dem Risiko für eine koronare Herzerkrankung (KHK) besteht²²⁻²⁵.

Die MTHFR reduziert 5,10-Methyltetrahydrofolat zu 5-Methyltetrahydrofolat. 5-Methyltetrahydrofolat ist das Hauptfolsäurederivat im Plasma und wirkt als Methylgruppendonator für die Reaktion im Remethylierungszyklus, in der durch das Vitamin-B₁₂-abhängige Enzym Methionin-Synthase (MS) Homozystein zu Methionin methyliert wird. Daneben gibt es den irreversiblen Abbauweg von Homozystein zu Glutathion, dessen initialer Schritt durch die Vitamin B₆-abhängige Cystathion-Beta-Synthase (CBS) unter Serin-Verbrauch katalysiert wird.

Bereits 1988 wurde von Kang et al. eine thermolabile Form des Enzyms MTHFR beschrieben, welche bei 46°C eine etwa 50% reduzierte Enzymaktivität zeigte²⁶. Im Jahr 1995 konnte als hereditäre Ursache für Thermolabilität und reduzierte Enzymfunktion ein häufiger Polymorphismus (C⁶⁷⁷T) im Exon 4 des *MTHFR*-Gens nachgewiesen werden, der in Position 222 zu einem Austausch von Alanin gegen Valin führt, welche in der katalytischen Domäne des Enzyms lokalisiert ist²⁷. Bereits in dieser Publikation war das *MTHFR*-Gen als mögliches Kandidatengen für ein vaskuläres Risiko diskutiert worden.

Die funktionelle, klinische Charakterisierung dieser genetischen Variante in mehreren Assoziationsstudien zeigte, dass homozygote Träger der ⁶⁷⁷TT-Variante, verglichen mit heterozygoten und homozygoten Trägern der ⁶⁷⁷C-Variante, höhere Homozystein-Spiegel²⁸⁻³² und niedrigere Folsäurespiegel³³⁻³⁵ aufwiesen.

Epidemiologische Studien zur Assoziation des *MTHFR* Polymorphismus C⁶⁷⁷T mit dem Risiko, eine koronare Herzerkrankung oder einen Myokardinfarkt zu erleiden, führten zu widersprüchlichen Ergebnissen. In einigen Fall-Kontroll-Studien waren Träger des ⁶⁷⁷TT Genotyps in der KHK-Gruppe signifikant überrepräsentiert³⁶⁻⁴⁰. In der Mehrzahl der publizierten Studien jedoch fand sich keine Assoziation dieser genetischen Variante mit koronarer Herzerkrankung^{25, 32, 34, 41-48} oder Myokardinfarkt^{28, 31, 42, 43, 49-51}.

Neben dem häufigen C⁶⁷⁷T Polymorphismus, der im homozygoten Zustand bei etwa 8% bis 12% der kaukasischen Bevölkerung vorkommt, wurden zwei weitere Polymorphismen beschrieben: die im Exon 7 des *MTHFR* Gens gelegenen Varianten A¹²⁹⁸C und T¹³¹⁷C^{52, 53}. Die Variante T¹³¹⁷C führt zu keinem Aminosäureaustausch. Dagegen führt die Variante

A¹²⁹⁸C in Position 429 zu einem Austausch von Glutamat gegen Alanin und zu reduzierter MTHFR-Aktivität. Patienten, die für beide Varianten, C⁶⁷⁷T und A¹²⁹⁸C, heterozygot waren (sogenannte „*compound*“ Heterozygote), wiesen eine niedrigere lymphozytäre MTHFR-Aktivität auf als Patienten, die heterozygot nur für eine Variante waren⁵².

Neben den beschriebenen epidemiologischen Studien stützen auch experimentelle Arbeiten die Hypothese, dass Homozystein eine atherogene und prothrombotische Potenz besitzt. So wurde gezeigt, dass Homozystein die endotheliale Funktion über verschiedene Mechanismen beeinflusst, u.a. durch die Erhöhung des oxidativen Stresses durch LDL-Cholesterin-Oxidation und durch verschiedene procoagulatorisch und antifibrinolytisch wirksame Veränderungen⁵⁴⁻⁵⁶. Zusätzlich scheint Homozystein mit dem endothelialen Stickstoffmonoxid-System zu interagieren, indem die NO-Bioverfügbarkeit und die Aktivität der endothelialen NO-Synthase (eNOS, NOS3) und damit auch die Endothel-abhängige Vasodilatation reduziert wird^{57,58}.

Die eNOS ist ein Schlüsselenzym der vaskulären Homöostase. Ihr enzymatisches Produkt, Stickstoffmonoxid (NO), hat vasodilatatorische Eigenschaften und vermittelt eine Reihe von antiatherogenen und antithrombotischen Effekten. Wichtige NO-vermittelte Mechanismen sind a) Reduktion der Thrombozyten- und Leukozyten-Adhäsion an der Gefäßwand, b) Inhibition der Wachstumsfaktor-induzierten Proliferation, c) Reduktion der Migration der vaskulären glatten Muskelzellen, sowie d) Reduktion des extrazellulären Matrix-Umsatzes und der Neointima-Neubildung nach Gefäßverletzung⁵⁹⁻⁶³. Es gibt zunehmend Belege dafür, dass eine Beeinträchtigung des eNOS-Stoffwechselwegs mit der Pathogenese der Atherosklerose einhergeht⁶⁴. Genetische Polymorphismen in der eNOS sind bereits als genetische Risikofaktoren für die koronare Herzerkrankung beschrieben worden^{65,66}. Im Rahmen der hier zusammengefassten Arbeiten wurden Polymorphismen des *MTHFR*-Gens sowie die Interaktion von Homozystein mit einem eNOS-Polymorphismus untersucht.

1.3. Bedeutung von Polymorphismen in Genen des Gerinnungssystems für die koronare Herzerkrankung

Akute Koronarsyndrome, ischämischer Schlaganfall und periphere arterielle Verschlusskrankheit stellen wichtige Komplikationen atherothrombotischer Erkrankungen dar. Die Ruptur eines bestehenden atherosklerotischen Plaques, thrombozytäre Adhäsion und Aggregation und auf diesem Boden entstehende Thromben können zu instabiler Angina pectoris führen und in der Folge zu Myokardinfarkt oder Schlaganfall⁶⁷. Darüber hinaus spielen Thrombozyten in der Entstehung atherosklerotischer Läsionen eine wichtige Rolle.

Das Zerreißen der endothelialen Gefäßauskleidung, hervorgerufen durch eine atherosklerotische Plaqueruptur oder durch eine koronare Katheterintervention, löst eine komplexe Reaktionskaskade aus, in der die zirkulierenden Thrombozyten gleichzeitig als „Verletzungssensoren“ und als „erste Verteidigungslinie“ gegen möglichen Blutverlust agieren. Thrombozyten triggern die sich anschließende Reaktionskette, in die weitere Gerinnungsfaktoren und auch andere Zelltypen einbezogen sind, und die schließlich in der Bildung des Plättchenthrombus mündet. Die thrombozytären membranständigen Glycoproteinrezeptoren GP Ib α /IX/V, GP Ia/IIa, GP VI und GP IIb/IIIa sind entscheidend bei den Reaktionen beteiligt, die bei akuten thrombotischen Ereignissen und in der chronischen Atherogenese ablaufen.

Wird die Gefäßwand verletzt und werden so subendotheliale Strukturen freigelegt, haften Thrombozyten an der subendothelialen extrazellulären Matrix. Unter hoher Scherspannung wird dieses erste Anhaften durch den Kontakt zwischen dem immobilisierten subendothelialen von Willebrand Faktor und dem thrombozytären Glycoprotein Ib/IX/V-Rezeptor-Komplex vermittelt ⁶⁸. Diese Verbindung ist zunächst reversibel und erlaubt es den Thrombozyten, sich fester anzuheften und über die thrombogene Oberfläche zu rollen. Dennoch werden die Thrombozyten durch die in stenotischen Arterien herrschenden hohen Scherkräfte nicht abgelöst ⁶⁹.

Im nächsten Schritt wird der noch lose Kontakt zwischen den Thrombozyten und dem Subendothel zu einer stationären, stabilen Anheftung verstärkt. Zudem werden die Thrombozyten aktiviert, sie kleiden schließlich die thrombogene Oberfläche aus. Dieses feste Anhaften kann durch die Bindung von subendotheliale Kollagen an die thrombozytären Rezeptoren GP Ia/IIa und GP VI vermittelt werden ⁷⁰. Auch andere Thrombozyten-Liganden-Interaktionen sind möglich, wie die Interaktion zwischen von Willebrand Faktor und GP IIb/IIIa. In dieser Phase der Plättchenaktivierung ändern die Thrombozyten ihre Form, degranulieren, exprimieren P-Selectin und eine aktive Form von GP IIb/IIIa und bewirken so eine weitere Gerinnungsaktivierung ⁷¹. Der letzte Schritt, der durch die Bindung von divalenten oder multivalenten Liganden, Fibrinogen oder von Willebrand Faktor an aktiviertem GP IIb/IIIa vermittelt wird, ist die Plättchenaggregation (Kohäsion) und die Bildung eines Thrombozyten-reichen Thrombus.

Die Mehrzahl der am geschilderten Ablauf des Gerinnungsprozesses beteiligten Enzyme und Rezeptoren kodierenden Gene sind genetisch polymorph. Im Rahmen der vorliegenden Arbeiten wurden genetische Varianten in den thrombozytären Glycoproteinen Ib α und GP Ia/IIa sowie im Gerinnungsfaktor VII untersucht.

Glycoprotein Ib α

Der Glycoprotein Ib α -IX-V Rezeptorkomplex initiiert die Thrombusformation nach Endothelverletzung und ist mit ca. 25.000 Kopien pro Thrombozyt nach dem GP IIb/IIIa-Rezeptor der Plättchenrezeptor mit der höchsten thrombozytären Dichte ⁷². Die Bindungsstelle für den von Willebrand Faktor befindet sich auf der N-terminalen Domäne des Glycoprotein Ib α ⁷³.

Kongenitale Defekte des Glycoprotein Ib α -IX-V Rezeptorkomplexes führen zu Blutungsübeln, die durch verlängerte Blutungen nach operativen Eingriffen und Traumata, spontanes Nasenbluten und exzessive Menorrhagie gekennzeichnet sind. Die genetische Basis dieser hereditären Blutungsübel ist sehr heterogen. Gemeinsames Merkmal der Mutationen ist eine Änderung des Bindungsverhaltens des Glycoprotein Ib α -IX-V Rezeptorkomplexes an den von Willebrand Faktor. Beim Bernard-Soulier Syndrom liegt eine verringerte Bindung des von Willebrand Faktors vor, während bei der Pseudo-von Willebrand Erkrankung eine exzessive Bindung des von Willebrand Faktors zu dessen Verbrauch führt ⁷³⁻⁷⁵.

Das Glycoprotein Ib α -IX-V ist ein sehr polymorpher Rezeptor. Ein häufiger Längenpolymorphismus wurde erstmals 1984 für die japanische Bevölkerung beschrieben ⁷⁶. Die vier Varianten des Proteins enthalten eine, zwei, drei oder vier Tandem-Duplikationen einer Sequenz von 39 Basenpaaren in der Region des Glycoprotein Ib α , die für das Muzin-ähnliche Makroglycopeptid kodiert. Diese genetischen Varianten werden als D-, C-, B- oder A-Variante des VNTR (*variable number of tandem repeats*) bezeichnet ^{77, 78}. Die funktionellen Konsequenzen dieser Variante für die Rezeptorfunktion sind bisher nicht in vitro untersucht worden. Ein weiterer Polymorphismus (C⁴³⁴T), der sich im Linkage Disequilibrium mit dem VNTR-Polymorphismus befindet, ist durch einen Aminosäureaustausch von Threonin nach Methionin in Position 145 in der von Willebrand Faktor Bindungsregion des Polypeptids gekennzeichnet ⁷⁹⁻⁸¹. Im Jahr 1999 wurde ein T/C-Polymorphismus in der Kozak-Sequenz des thrombozytären Glycoproteins Ib α identifiziert, welcher in Position -5 upstream des Initiator-ATG lokalisiert ist. Das ⁻⁵C-Allel war mit erhöhter Glycoprotein Ib/IX/V-Rezeptordichte assoziiert, was aufgrund der besseren Annäherung an die von M. Kozak abgeleitete Konsensussequenz ⁸² auf eine effizientere mRNA-Translation zurückgeführt wurde ⁸³.

Während die Mehrzahl der epidemiologischen Untersuchungen keine Assoziation von Polymorphismen im Glycoproteins Ib α Gen mit der Entwicklung einer koronaren

Herzerkrankung gefunden haben⁸⁴⁻⁸⁸, waren die Ergebnisse beim akuten Koronarsyndrom widersprüchlich^{84, 89-92}.

Glycoprotein Ia/IIa

Das Glycoprotein Ia/IIa (Integrin $\alpha_2\beta_1$, VLA-2) ist ein wichtiger Kollagenrezeptor, der auf Thrombozyten und anderen Zellen in relativ niedriger Dichte (1000 bis 3000 Kopien auf Thrombozyten) exprimiert wird⁹³. Die Expressionslevel unterscheiden sich interindividuell bis um den Faktor 10. Diese Unterschiede korrelieren mit einer großen Variabilität der Kollagen-induzierten Plättchenaggregation⁹⁴. Es konnte gezeigt werden, dass in Vollblut unter hoher Scherspannung die Anlagerung von Thrombozyten an Typ-I-Kollagen mit der $\alpha_2\beta_1$ -Rezeptordichte steigt⁹⁵. Die Extremvariante der Variation der Rezeptorexpression, nämlich völlig fehlende Expression von GP Ia wirkte sich in einer Patientin als Blutungserkrankung mit extrem verlängerter Blutungszeit und komplett fehlender Kollagen-induzierter Plättchenaggregation und Adhäsion aus^{96, 97}.

Zwei stille Polymorphismen (C⁸⁰⁷T in Exon 7 und G⁸⁷³A in Exon 8) im humanen α_2 -Gen, die im kompletten Linkage Disäquilibrium zueinander stehen, sind mit der Expressionshöhe des Integrins $\alpha_2\beta_1$ assoziiert, wobei das ⁸⁰⁷C/⁸⁷³G-Allel mit niedrigerer Rezeptordichte vergesellschaftet ist⁹⁸. Kürzlich publizierte Daten deuten darauf hin, dass ein Polymorphismus in der proximalen 5' regulatorischen Region des humanen α_2 -Gens (⁻⁵²C->T), welches mit dem ⁸⁰⁷C Polymorphismus im Linkage Disäquilibrium steht, die für die reduzierte Expression kausale Variante sein könnte⁹⁹.

Die funktionelle Bedeutung des ⁸⁰⁷T Polymorphismus wird durch die Beobachtung unterstrichen, dass Patienten mit von Willebrand Erkrankung, die Träger des ⁸⁰⁷T Allels sind, und damit höhere Expressionslevel von GP Ia/IIa haben, ein niedrigeres Risiko für schwere Blutungen aufweisen¹⁰⁰. Das ⁸⁰⁷T Allel war in epidemiologischen Untersuchungen mit ischämischen Schlaganfällen bei jungen Frauen assoziiert und in einer populationsbasierten Kohortenstudie mit erhöhter kardiovaskulärer Mortalität bei Frauen, die wegen Nikotinabusus oder Diabetes ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko aufwiesen¹⁰¹⁻¹⁰³. Die Studienergebnisse zu akuten Koronarsyndromen waren jedoch widersprüchlich¹⁰⁴⁻¹⁰⁹.

Gerinnungsfaktor VII

Der Gerinnungsfaktor VII ist der für den extrinsischen Gerinnungsweg zentrale Gerinnungsfaktor. Er wird als inaktives Glycoprotein von 48 kD in der Leber synthetisiert. Nach Gewebsverletzung wird die Gerinnungskaskade durch die Aktivierung von Faktor VII

durch Gewebefaktor (tissue factor, TF) ausgelöst. Die Serin-Protease Faktor VII ist gleichzeitig der einzige bekannte TF-Ligand ¹¹⁰⁻¹¹⁴.

Eine starke Assoziation zwischen der Höhe der Faktor VII-Aktivität und dem Risiko tödlicher Myokardinfarkte war schon 1986 publiziert worden ¹¹⁵, während die Ergebnisse vieler Populations-basierter Studien aus der Folgezeit widersprüchlich waren (Übersicht in ¹¹⁶).

Auch das Faktor VII-Gen ist ausgesprochen polymorph. Es sind drei Promotorpolymorphismen bekannt, von denen eine Dekanucleotid-Insertion in Position -323 im Linkage Disäquilibrium mit dem Arg³⁵³Gln-Polymorphismus (G10.976A in Exon 8) steht. Darüber hinaus ist ein hypervariable Region mit einem Längenpolymorphismus in Intron 7 bekannt ¹¹⁷⁻¹¹⁹. Der Arg³⁵³Gln-Polymorphismus von Faktor VII ist mit einer Reduktion der Faktor-VII-Aktivität um 20-30% assoziiert ¹²⁰. Die Ergebnisse epidemiologischer Studien zur Assoziation genetischer Varianten des Faktor VII-Gens mit Myokardinfarkt sind teilweise widersprüchlich. Während einzelne Arbeiten darauf hindeuteten, dass Träger des Gln³⁵³-Allels ein reduziertes Myokardinfarkt-Risiko haben könnten ^{117, 121-123}, konnte dies in anderen großen Populationen nicht bestätigt werden ¹²⁴⁻¹²⁶.

2. Fragestellungen und zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse

2.1. Patientenpopulation und Studiendesign

Die hier vorgestellten eigenen Ergebnisse basieren auf einer Studie im Fall-Kontroll-Design, die mit dem Ziel durchgeführt wurde, die Assoziation zwischen genetischen Einflussfaktoren und dem Risiko einer koronaren Herzerkrankung und deren Komplikationen zu untersuchen. Es wurden insgesamt 1000 konsekutive Patienten mit angiographisch gesicherter koronarer Herzerkrankung eingeschlossen, die zur diagnostischen Koronarangiographie oder zu einer Koronarintervention in die Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie, Angiologie und Pneumologie, des Universitätsklinikums Charité, der Humboldt Universität eingewiesen wurden. Im gleichen Zeitraum wurden weitere 1000 Patienten, die nach Alter, Geschlecht und Zeitpunkt der Krankenhausaufnahme zu den KHK-Patienten gepaart waren, als Kontrollkollektiv eingeschlossen.

Von den 1000 Patienten mit koronarer Herzerkrankung unterzogen sich 673 Patienten einer Katheterintervention (PTCA, DCA, Stentimplantation). Diese Patienten-Kohorte wurde prospektiv über insgesamt 30 Tage hinsichtlich des Auftretens unerwünschter Ereignisse verfolgt, welche als Tod, Myokardinfarkt und der Notwendigkeit zur erneuten Revaskularisation (erneute PTCA oder Bypass-Operation) des Zielgefäßes definiert und als kombinierter 30-Tage-Endpunkt erfasst wurden.

Eine koronare Herzerkrankung sowie andere kardiovaskuläre Erkrankungen wurden bei den Kontroll-Patienten auf der Basis der Anamnese, der klinischen Untersuchung, von EKG, Echokardiogramm und Röntgen-Thorax ausgeschlossen. Weitere Ausschlusskriterien für die Patienten der Kontrollgruppe waren arterielle Verschlusskrankheit, schwere systemische Erkrankungen, die einen potentiellen Einfluss auf das kardiovaskuläre Risikoprofil oder den Gerinnungsstatus hatten, einschließlich Nierenversagen und Vaskulitis. Das Spektrum der Erkrankungen der Patienten in der Kontrollgruppe entsprach dem des Klientels eines großen Universitätsklinikums mit allen internistischen Subspezialitäten, Neurologie, Dermatologie und allen chirurgischen Fächer einschließlich Orthopädie, Gynäkologie, Geburtshilfe, HNO und Urologie. Alle Patienten waren deutsche Kaukasier aus Berlin und Umgebung. Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Charité genehmigt. Alle Studienteilnehmer hatten ihr schriftliches Einverständnis erklärt.

Die Definition der koronaren Herzerkrankung erfolgte nach angiographischen Kriterien. Die Auswertung der Koronarangiogramme erfolgte mittels quantitativer Angiographie durch erfahrene Kardiologen, die hinsichtlich der Identität und des Verlaufs der

Patienten verblindet waren. Koronare Herzerkrankung wurde definiert als eine $\geq 50\%$ Stenose in einer der drei großen Koronararterien oder in einem größeren Seitenast. Der Schweregrad der Erkrankung wurde nach der Anzahl der befallenen Arterien als 1-Gefäß-, 2-Gefäß- oder 3-Gefäß-Erkrankung erfasst. Die Diagnose „Myokardinfarkt“ wurde nach WHO-Kriterien¹²⁷ und durch Angiographie gestellt. Unter akuten Koronarsyndromen wurden der akute Myokardinfarkt und die instabile Angina pectoris subsumiert. Tabelle 2 gibt einen Überblick über klinische Charakteristika der Studienpopulation.

Tabelle 2. Klinische Charakteristika der Studienpopulation

	KHK-Gruppe		Vergleichsgruppe		P ¹
	n	%	n	%	
Patientenzahl	1.000	100,0	1.000	100,0	-
Alter (Jahre)*	60,6 (55,1- 67,1)		60,5 (54,5- 66,5)		
Frauen	241	24,1	241	24,1	-
Risikofaktoren					
Diabetes mellitus	228	22,8	114	11,4	<0,001
Arterielle Hypertonie	552	55,2	359	35,9	<0,001
Hypercholesterinämie	527	52,7	303	30,3	<0,001
Raucher	440	44,0	352	35,2	<0,001
Schweregrad					
1-Gefäß-Erkrankung	297	29,7	-	-	-
2-Gefäß-Erkrankung	365	36,5	-	-	-
3-Gefäß-Erkrankung	338	33,8	-	-	-
Akuter Infarkt	91	9,1	-	-	-
Instabile Angina pectoris	144	14,4	-	-	-
Manifeste KHK <50 J.	279	27,9	-	-	-

* Median, (25.-75. Perzentile); ¹ KHK vs. Kontrollen

2.2. Assoziation von Polymorphismen der Methyltetrahydrofolatreduktase (*MTHFR*) mit dem Homozystein-Spiegel und dem KHK-Risiko (V4, V6)

Zielstellung

Zum Zeitpunkt der Studiendurchführung existierten keine Daten über die Häufigkeit der *MTHFR* Varianten A¹²⁹⁸C und T¹³¹⁷C in der kaukasischen Population sowie über deren Allel-

und Haplotypzuordnung im Verhältnis zur Variante C⁶⁷⁷T. Zielstellungen der Studie waren daher die Untersuchung der 3 *MTHFR* Varianten C⁶⁷⁷T, A¹²⁹⁸C und T¹³¹⁷C in der beschriebenen Fall-Kontrollstudie, die Bestimmung ihrer allelischen Assoziation und der zugrundeliegenden Haplotypen sowie deren Assoziation mit dem Homozystein-Spiegel sowie dem Risiko für die koronare Herzerkrankung.

Ergebnisse

In der untersuchten Population von insgesamt 2000 Patienten fand sich lediglich ein Patient, der heterozygoter Träger der Variante T¹³¹⁷C war. Es bestand in der untersuchten Population ein komplettes Linkage Disäquilibrium zwischen den Varianten C⁶⁷⁷T und A¹²⁹⁸C. Zur weiteren Untersuchung wurde die DNA von 32 zufällig ausgewählten zusammengesetzt-heterozygoten Patienten mit dem *MTHFR*-Genotyp C⁶⁷⁷T und A¹²⁹⁸C einem zweistufigem Verfahren unterzogen. Dieses bestand aus einer Allel-spezifischen long-range PCR und einem anschließenden PCR/RFLP-Schritt und belegte, dass die Varianten C⁶⁷⁷T und A¹²⁹⁸C in der untersuchten Population immer in *trans*-Position vorkamen. Mit diesen Informationen wurde eine Haplotyp-basierte *MTHFR*-Nomenklatur vorgeschlagen, zudem konnten alle *MTHFR*-Genotypen eindeutigen Haplotyp-Paaren zugeordnet werden. Abbildung 2 zeigt die vorgeschlagene Nomenklatur sowie die in der Studie beobachteten *MTHFR*-Haplotypen.

	Nukleotid-Position	
	677	1298
<i>MTHFR*1</i>	<u>G</u> <u>C</u> <u>C</u>	<u>G</u> <u>A</u> <u>A</u>
	Ala	Glu
<i>MTHFR*2</i>	<u>G</u> <u>T</u> <u>C</u>	<u>G</u> <u>A</u> <u>A</u>
	Val	Glu
<i>MTHFR*3</i>	<u>G</u> <u>C</u> <u>C</u>	<u>G</u> <u>C</u> <u>A</u>
	Ala	Ala

Abb. 2 Häufige Haplotypen des *MTHFR*-Gens. Es ist das Aminosäure-codierende Tripletts bezeichnet, jeweils unterstrichen sind die beiden polymorphen Positionen in Nukleotid 677 und 1298.

Der Homozysteinspiegel war bei KHK-Patienten (Median 9,85 $\mu\text{mol/l}$) hochsignifikant höher als bei Kontrollpatienten (Median 9,60 $\mu\text{mol/l}$). In der Kontrollpopulation fand sich keine signifikante Assoziation der *MTHFR*-Varianten C⁶⁷⁷T und A¹²⁹⁸C mit dem Homozystein-Spiegel, während bei KHK-Patienten der Homozysteinspiegel bei heterozygoten und homozygoten Trägern des ⁶⁷⁷T-Allels signifikant höher war als bei homozygoten ⁶⁷⁷CC Trägern. Für die Variante A¹²⁹⁸C ergab sich keine signifikante Assoziation mit dem Homozysteinspiegel.

Weder bei der Untersuchung der Einzelnukleotidpolymorphismen C⁶⁷⁷T und A¹²⁹⁸C noch bei der Haplotyp-basierten Genotypzuordnung fand sich eine signifikante Assoziation von *MTHFR*-Varianten mit dem KHK-Risiko. Die weitere explorative Analyse ergab für die KHK-Gruppe, dass Patienten mit dem *MTHFR*-Genotyp *3/*3 ein um 60% reduziertes Risiko hatten (95% Konfidenzintervall 21-80%; P=0,009, nach Bonferroni-Korrektur P=0,064), akute Koronarsyndrome zu erleiden. Im übrigen fand sich weder eine Assoziation mit dem Schweregrad der KHK-Erkrankung noch mit dem Manifestationsalter noch mit einem Myokardinfarkt in der Anamnese.

Zum Publikationszeitpunkt umfasste unsere oben dargestellte Studie mit insgesamt 2000 Patienten die bisher größte Population, an der eine mögliche Assoziation zwischen *MTHFR*-Varianten und KHK-Risiko untersucht worden war. Dennoch war die Fallzahl auch dieser Arbeit wie auch bereits vorgelegter Metaanalysen^{28, 128} zu klein, um eine Assoziation eindeutig zu belegen oder auszuschließen¹²⁹. Deswegen wurde unter Führung einer niederländischen Arbeitsgruppe eine systematische Metaanalyse zur Frage der Assoziation des *MTHFR* C⁶⁷⁷T Polymorphismus mit dem KHK-Risiko unter Zugriff auf die Rohdaten der einzelnen einbezogenen Studien zur Klärung durchgeführt, an der wir uns mit unseren eigenen Daten sowie unserer Expertise auf dem Gebiet der *MTHFR*- und Homozysteinforschung beteiligten.

Für diese Metaanalyse wurden insgesamt 40 Fall-Kontroll-Studien (34 publizierte und 6 unpublizierte Studien) mit insgesamt 11.163 Fall-Patienten und 12.758 Kontrollen eingeschlossen. Diese Fallzahl war hinreichend groß, denn die Fallzahlab-schätzung bei einer erwarteten Odds Ratio für die KHK von 1,13 für die Patienten mit dem homozygoten ⁶⁷⁷TT-Genotyp, verglichen mit dem ⁶⁷⁷CC-Genotyp (Plasma-Homozysteinerhöhung um 1 $\mu\text{mol/l}$ entspricht einer 5%igen Erhöhung des KHK-Risikos¹³⁰) ergibt bei einer Prävalenz des ⁶⁷⁷TT-Genotyps von 12% in der Bevölkerung, dass mindestens 9526 Patienten notwendig sind, um eine Odds Ratio in dieser erwarteten Höhe mit einem zweiseitigen α von 0,05 und mit einer statistischen Power von 80% zu finden.

Die Analyse der eingeschlossenen Studien zeigte, dass Patienten mit dem 677TT Genotyp ein signifikant erhöhtes KHK-Risiko von 1,16 (95% Konfidenzintervall 1,05-1,28) hatten, während heterozygote 677CT Träger einen nicht-signifikanten Trend von 1,04 (95% Konfidenzintervall 0,98-1,10) für ein erhöhtes KHK-Risiko zeigten. Es fand sich eine signifikante Heterogenität zwischen Studien aus Europa und Nord-Amerika dergestalt, dass der beschriebene Zusammenhang zwischen dem *MTHFR* 677TT Genotyp und KHK sich nur in Studien aus Europa, nicht jedoch aus Nordamerika fand. Eine mögliche Erklärung kann auch hier in der Abhängigkeit vom Folsäurestatus liegen, denn es zeigte sich für Studien, die Informationen zum Folsäurestatus erfasst hatten (insgesamt 3262 KHK-Patienten und 4472 Kontrollen) die Assoziation zwischen *MTHFR* Genotyp und dem KHK-Risiko nur in Strata, in denen der Plasma-Folsäurespiegel niedriger als der Kontinent-spezifische Median war.

Diskussion:

Wesentliches Ergebnis der Studie war die Beobachtung, dass die beiden häufigen *MTHFR* Varianten C^{677}T und A^{1298}C in komplettem Linkage Disäquilibrium stehen und daher nur 3 der 4 theoretisch möglichen häufigen Haplotypen gesehen wurden. Die erwartete Assoziation zwischen dem C^{677}T Polymorphismus und dem Homozysteinspiegel war auch in dieser Population im Sinne eines Gen-Dosis-Effekts sichtbar, allerdings waren die Unterschiede im Homozysteinspiegel zwischen homozygoten 677CC -Trägern und homozygoten 677TT Trägern mit 12,5% Unterschied geringer als in verschiedenen vorherigen Studien²⁸. Als eine mögliche Erklärung kommen Unterschiede in der Ernährung insbesondere in der Einnahme von Folsäure, Vitamin B₆ und Vitamin B₁₂ in Betracht, zumal in einer italienischen Studie gezeigt worden war, dass bei Patienten mit adäquatem Folsäurespiegel der Einfluss der C^{677}T -Variante auf den Homozystein-Spiegel nicht mehr nachweisbar war³². Diese Hypothese konnte in unserer Population jedoch nicht überprüft werden, da keine Folsäurespiegel zur Verfügung standen.

Trotz des beobachteten Effekts auf den Homozysteinspiegels fand sich in unserer Studie keine signifikante Assoziation der Einzelnukleotidpolymorphismen oder der Haplotyp-basierten Genotypen mit dem KHK-Risiko. Bemerkenswert war ferner die Beobachtung, dass KHK-Patienten, die *MTHFR* Genotypen $*2/*3$ und $*3/*3$ trugen, ein signifikant verringertes Risiko aufwiesen, akute Koronarsyndrome zu entwickeln. Die Einordnung dieses Befundes ist derzeit nicht sicher möglich, möglicherweise ist er als Zufallsbefund im Rahmen multiplen Testens anzusehen. Allerdings berichtete bereits eine frühere Arbeit aus den Niederlanden⁴⁶ eine Assoziation der *MTHFR* 677T -Variante mit einem Trend zu niedrigerem Risiko für nicht-tödliche Myokardinfarkte.

Die Metaanalyse unterstützt die Hypothese, dass der gestörte Folsäure-Metabolismus, welcher sich in erhöhten Homozystein-Konzentrationen zeigt, eine kausale Rolle in der KHK-Entstehung spielen könnte. Zudem zeigt diese Metaanalyse, dass es notwendig ist, eine sehr große Anzahl von Patienten zu untersuchen, um eine Assoziation zwischen Genotyp und Erkrankung zu belegen, wenn das Genotyp-assoziierte Erkrankungsrisiko wie im Fall der *MTHFR* nur gering bis moderat ist.

Diese Metaanalyse bestätigt auch vorherige Studien, die zeigen konnten, dass die Assoziation zwischen dem *MTHFR* Genotyp und dem KHK-Risiko vorwiegend dann vorzuliegen scheint, wenn der Folsäurespiegel niedrig ist^{29-32, 35, 45}. Die beobachtete Heterogenität zwischen Studienergebnissen aus Europa und Nordamerika könnte auf unterschiedliche Nahrungszusammensetzung mit einem höheren Anteil einer Folsäuresupplementierung der Nahrung in Nordamerika beruhen. Hierfür spricht neben dem bekannt höheren Anteil an Nutzern von Vitaminsupplementierungen in Nordamerika (25-40%)¹³¹⁻¹³⁵ als in Europa mit 5-15%^{136, 137} auch die gefundenen Homozystein-Spiegel, die in den europäischen Studien mit 10,9 µmol/l höher waren als in den nordamerikanischen (10,5 µmol/l). Zudem waren die Unterschiede zwischen den *MTHFR*⁶⁷⁷TT und ⁶⁷⁷CC Genotypen in Europa sowohl für den Homozysteinspiegel (2,1 vs. 1,3 µmol/l) als auch für den Folsäurespiegel (2,5 vs. 1,7 nmol/l) höher als in Nordamerika.

Mit dieser Metaanalyse wurde in der selben Ausgabe der Zeitschrift *JAMA* eine Meta-Analyse von 30 Studien an insgesamt 5000 Patienten mit ischämischer Herzerkrankung veröffentlicht, die zeigte, dass ein um 25% niedrigerer Homozystein-Spiegel mit einem 11% niedrigeren Risiko für eine koronare Herzerkrankung assoziiert war¹³⁰. Die Konkordanz der Risikoschätzer dieser beiden Studien unterstützt indirekt die Hypothese einer kausalen Assoziation zwischen dem Homozystein-Spiegel und der KHK. Aus diesem Grund werden derzeit mehrere große Studien mit dem Ziel durchgeführt, die Hypothese zu untersuchen, dass eine Senkung des Homozystein-Spiegels mittels Folsäure oder B-Vitaminen das KHK-Risiko reduzieren kann¹³⁸. Die Studienergebnisse zeigen weiterhin, dass bei adäquatem Folsäurespiegel das Screening für den *MTHFR* C⁶⁷⁷T Polymorphismus in der unselektierten Allgemeinbevölkerung derzeit zur Abschätzung des KHK-Risikos nicht empfohlen werden kann.

2.3. Geschlechtsunterschiede in der Homozystein-abhängigen Gen-Umwelt Interaktion bei akuten Koronarsyndromen (V2)

Zielstellung:

Ausgehend von der oben geschilderten Interaktion zwischen Homozystein und dem endothelialen NO-System war die dieser Arbeit zugrundeliegende Hypothese, dass in Situationen, in denen der prothrombotischen Aktivierung eine besondere Rolle zukommt, wie bei akuten Koronarsyndromen, eine Interaktion zwischen dem Homozystein-Spiegel und dem funktionellen CA-Repeat-Polymorphismus in Intron 13 der endothelialen NO-Synthase (eNOS) bestehen könnte.

Ergebnisse:

Hierfür wurde an der beschriebenen Fall-Kontrollstudie die Gruppe der 1000 KHK-Patienten gesondert analysiert. Der Homozysteinspiegel selbst war in der untersuchten Gruppe der KHK-Patienten mit keinem erhöhten Risiko für akute Koronarsyndrome assoziiert. Die Untersuchung der Interaktion zwischen dem CA-Repeat Polymorphismus der eNOS und dem Homozystein-Spiegel zeigte jedoch, dass Frauen, die eine Hyperhomozysteinämie aufwiesen (Homozysteinspiegel größer als der Median von 9,4 $\mu\text{mol/l}$), mit steigender Anzahl der CA-Repeats im eNOS-Gen, beginnend bei einer Repeat-Anzahl von 36, ein signifikantes und ansteigendes Exzess-Risiko für akute Koronarsyndrome hatten (Abbildung 3). In der Gesamtgruppe der KHK-Patienten und in der Gruppe der Männer fand sich diese Assoziation jedoch nicht. Dieser Befund erhärtete sich auch nach Adjustierung der Ergebnisse für klassische Risikofaktoren, Marker der Gerinnungsaktivierung und Entzündungsparameter. Auch eine Adjustierung für weitere potentielle genetische Risikofaktoren akuter Koronarsyndrome, darunter *MTHFR*, Gerinnungsfaktor VII, thrombozytäres Glycoprotein IIIa, sowie thrombozytäres Glycoprotein Ib α (Kozak-Sequenz-Polymorphismus) führte nicht zu einer substantiellen Änderung des relativen Risikos.

Diskussion

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Homozystein möglicherweise ein geschlechtsspezifischer Modifikationsfaktor eines CA-Repeat-Polymorphismus-abhängigen hereditären Risikos für akute Koronarsyndrome darstellen könnte. Die funktionelle Relevanz dieses CA-Repeat-Polymorphismus im eNOS-Gen wurde kürzlich bestätigt. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Polymorphismus als *splicing enhancer* wirkt, indem das 65-kDa nukleäre Ribonucleoprotein L längenabhängig an diese CA-Repeats bindet und so als spezifischer Aktivator des eNOS-Splicings wirkt¹³⁹. Eine höhere Anzahl an CA-Repeats könnte daher das eNOS-Splicing erhöhen und zu erhöhter eNOS-Expression und Aktivität führen.

Während verschiedene Mechanismen bekannt sind, die bei Patienten mit Hyperhomozysteinämie die Tendenz zur Gerinnungsaktivierung verstärken⁵⁴, können diese

die in dieser Studie gefundenen geschlechtsspezifischen Unterschiede nicht erklären. Es gibt jedoch Hinweise aus mehreren epidemiologischen Studien, dass Homozystein zumindest für das KHK-Risiko eine größere Bedeutung als Risikofaktor für Frauen als für Männer besitzt¹⁴⁰. Diese Ergebnisse bedürfen neben einer epidemiologischen Bestätigung in unabhängigen Populationen, da in unserer Studie die Subgruppe der Frauen mit hohen Homozystein-Spiegeln nur eine relativ geringe Fallzahl enthielt und eine Vielzahl statistischer Tests angewandt wurde, auch einer Klärung möglicher zugrundeliegender funktioneller Mechanismen.



Abb. 3 Risiko für akute Koronarsyndrome bei Frauen in Abhängigkeit vom eNOS Polymorphismus. Odds Ratio und 95% Konfidenzintervall für akute Koronarsyndrome bei unterschiedlichen eNOS CA-Repeat-Werten bei Frauen mit koronarer Herzerkrankung und Homozystein-Werten über dem Median (9,4 mmol/l). Die P-Werte sind Bonferroni-korrigiert. Die Anzahl der Patientinnen mit ACS in den unterschiedlichen CA-Repeat cut-off Gruppen war: ≥ 34 : 14; ≥ 35 : 11; ≥ 36 : 10; ≥ 37 : 8; ≥ 38 : 4).

2.4. Assoziation des Kozak-Sequenz-Polymorphismus des thrombozytären Glycoproteins Ib α mit der koronaren Herzerkrankung und Frühkomplikationen nach Katheterinterventionen (V5, V10)

Zielstellung:

Die der Arbeit zugrundeliegende Hypothese war, dass Träger des ⁻⁵C-Allels aufgrund der höheren Glycoprotein Ib α -Rezeptordichte zu thrombotischen Ereignissen (akute Koronarsyndrome, Frühkomplikation nach koronaren Katheterinterventionen) prädisponiert sein könnten. Nachdem in einer kleinen Pilotstudie an 101 Patienten, die einen

Myokardinfarkt überlebt hatten, diese Hypothese nicht belegt werden konnte ⁸⁶, haben wir diese Hypothese an der 2000 Patienten umfassenden Fall-Kontroll-Studie überprüft.

Ergebnisse:

Es fand sich keine Assoziation dieses Polymorphismus mit dem Risiko, eine koronare Herzerkrankung zu erleiden. Allerdings hatten KHK-Patienten, die heterozygote oder homozygote Träger des ⁻⁵C-Allels waren, verglichen mit den homozygoten ⁻⁵TT-Genotypträgern ein um 43% (95% Konfidenzintervall 5-95%; P=0,02) erhöhtes Risiko, akute Koronarsyndrome zu entwickeln.

Von den 269 Patienten, die sich einer Herzkatheterintervention mittels PTCA unterzogen hatten, erlitten 14 Patienten innerhalb der ersten 30 Tage nach Intervention eine Frühkomplikation (Myokardinfarkt, Tod, Notwendigkeit zur erneuten Revaskularisation). Patienten, die heterozygote oder homozygote Träger des ⁻⁵C-Allels waren, hatten, verglichen mit den homozygoten ⁻⁵TT-Genotypträgern, ein um den Faktor 3,75 (95% Konfidenzintervall 1,15-12,27; P=0,029) erhöhtes Risiko, den kombinierten Endpunkt der 30-Tageskomplikation zu erreichen (Abb. 4). Bei Patienten, die sich einer DCA oder Stentimplantation unterzogen hatten, fand sich diese Assoziation nicht.

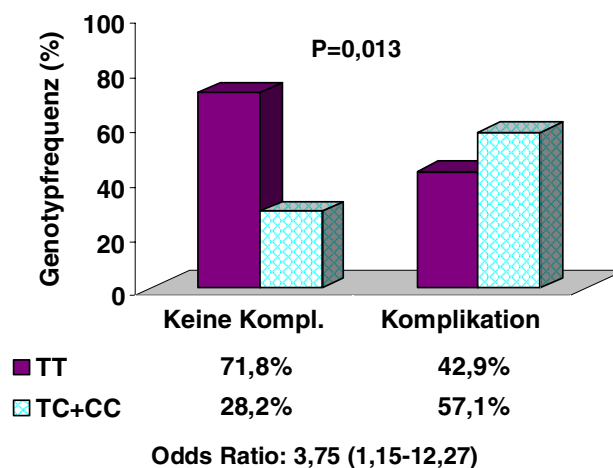


Abb. 4 Der Kozak-Sequenz Polymorphismus ⁻⁵C/T des GP Iβα als Prädiktor von Frühkomplikationen nach PTCA (n=269). Die Abbildung zeigt die Verteilung der Genotypfrequenzen bei Patienten, die sich einer PTCA unterzogen hatten, aufgeteilt nach dem Auftreten des zusammengesetzten 30-Tage-Endpunkts („Komplikation“: Tod, Myokardinfarkt, Notwendigkeit der Revaskularisation des Zielgefäßes). Die Gruppe der Träger des CT+CC Genotyps hatten ein 3,75-fach erhöhtes Risiko, den 30-Tagesendpunkt zu erreichen.

Diskussion

Die Ergebnisse dieser Studie deuten darauf hin, dass der Kozak-Sequenz Polymorphismus bei akuten Koronarsyndromen und nach PTCA klinische Bedeutung haben könnte. Offensichtlich besteht diese jedoch nach DCA und Stentimplantation nicht. Eine mögliche Erklärung könnte darin liegen, dass die Patienten nach Stentimplantation zusätzlich zur Gabe von Aspirin auch Ticlopidin erhalten hatten, von dem bekannt ist, dass es zusätzlich die Thrombozytenaggregation und die Aktivierung des thrombozytären Fibrinogenrezeptors GP IIb/IIIa hemmt¹⁴¹. Zudem waren die Gefäßdurchmesser der mit DCA behandelten Stenosen signifikant größer und die Vertrauensbereiche sehr groß.

Kürzlich zeigten unsere Koautoren, dass das thrombozytäre Glycoprotein Ib α einen Rezeptor für das endotheliale P-Selectin und für das leukozytäre Mac-1 darstellt^{142, 143}. Dennoch konnte in unserer Population keine Assoziation des Kozak-Sequenz Polymorphismus mit der Entstehung der koronaren Herzerkrankung nachgewiesen werden. Dies deckte sich auch mit der ersten Studie, die zu dieser Fragestellung publiziert wurde⁸⁶. Zusammenfassend deutet dieses Studienergebnis darauf hin, dass der Kozak-Sequenz⁻⁵C/T Polymorphismus ein Risikofaktor in klinischen Situationen darstellen könnte, in denen Thrombusentstehung eine wichtige Rolle spielt, wie in akuten Koronarsyndromen oder bei Komplikationen nach PTCA. Sollte sich dies in anderen Populationen bestätigen, könnte diese Variante zu einer verbesserten Risikostratifizierung von Patienten mit koronarer Herzerkrankung beitragen.

2.5. Assoziation des Polymorphismus C⁸⁰⁷T im thrombozytären Glycoprotein Ia mit Frühkomplikationen nach Koronarinterventionen (V7, V10)

Zielstellung

Die der Arbeit zugrundeliegende Hypothese war, dass Träger des C⁸⁰⁷T-Allels aufgrund der oben beschriebenen funktionellen Auswirkungen auf die Rezeptorexpression und die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation ein höheres Risiko haben könnten, Frühkomplikationen nach Koronarinterventionen zu erleiden. Eine erste Studie zu dieser Frage konnte in einer Kohorte von 1797 Patienten, die sich einer koronaren Stentimplantation unterzogen hatten, für den C⁸⁰⁷T Polymorphismus kein signifikant erhöhtes Risiko für Frühkomplikationen während der ersten 30 Tage nach Intervention nachweisen¹⁴⁴. Patienten, die sich einer reinen PTCA oder einer DCA unterzogen hatten, waren allerdings in dieser Studie nicht eingeschlossen, wir haben die Fragestellung daher auch in diesen Patientenpopulationen untersucht.

Ergebnisse

Wie Tabelle 3 zeigt, fand sich in der Kohorte der Patienten aus der beschriebenen Fall-Kontrollstudie, die nach Koronarintervention für 30 Tage prospektiv hinsichtlich des kombinierten Endpunkts beobachtet worden waren, keine Assoziation des GP Ia C⁸⁰⁷T-Genotyps mit Frühkomplikationen nach PTCA, DCA und Stentimplantation.

Tabelle 3. Frühkomplikationen während der ersten 30 Tage nach PTCA, DCA und Stentimplantation in Abhängigkeit vom GP Ia C⁸⁰⁷T-Genotyp.

		GP Ia Genotyp			P
		CC	CT	TT	
PTCA (n = 272)	Keine Komplikationen	92 (93,9%)	125 (94,7%)	41 (97,6%)	0,65
	30-Tage Komplikation	6 (6,1%)	7 (5,3%)	1 (2,4%)	
DCA (n = 104)	Keine Komplikationen	34 (97,1%)	49 (94,2%)	15 (88,2%)	0,43
	30-Tage Komplikation	1 (2,9%)	3 (5,8%)	2 (11,8%)	
Stent (n = 276)	Keine Komplikationen	88 (90,7%)	131 (93,6%)	35 (89,7%)	0,62
	30-Tage Komplikation	9 (9,3%)	9 (6,4%)	4 (10,3%)	

Diskussion

Dieses Ergebnis bestätigte die hinsichtlich der Frühkomplikationen nach Stentimplantation publizierten Vorergebnisse. Dennoch war es vor dem Hintergrund des bekannten Zusammenhangs zwischen der GP Ia/IIa-Rezeptordichte und der Thrombozyten-Kollageninteraktion^{95, 100} sowie des Befunds, dass Patienten, die homozygote Träger des ⁸⁰⁷TT-Genotyps sind, verglichen mit homozygoten ⁸⁰⁷CC-Trägern eine flowzytometrisch gemessene etwa doppelt so hohe GP Ia/IIa-Rezeptordichte besitzen^{145, 146}, zunächst überraschend.

Bereits in der ersten Arbeit von von Beckerath et al.¹⁴⁷ ist daher die Frage der möglicherweise bestehenden grundlegenden Unterschiede zwischen Katheter-induzierten oder spontanen koronaren Thrombosen diskutiert worden. Während spontane Koronarthrombosen auf dem Boden einer atherosklerotischen Plaqueruptur möglicherweise einer stärkeren Ausprägung der Thrombinbildung auf dem Boden der Gewebsfaktor-Aktivierung unterliegen, da atherosklerotische Plaques Gewebefaktor in großer Menge enthalten¹⁴⁸, ist von höhergradigen Koronarstenosen bekannt, dass diese oftmals weniger Gewebefaktor enthalten^{148, 149}. Zudem tragen die zur Intervention verwendeten Materialien selbst zur Gerinnungsaktivierung bei¹⁵⁰. Insgesamt scheint die untersuchte, durch den C⁸⁰⁷T Polymorphismus genetisch determinierte Expressionshöhe des thrombozytären GP Ia/IIa für die Entstehung thrombotischer Frühkomplikationen nach Koronarkatheterinterventionen nicht bedeutsam.

2.6. Assoziation des Gerinnungsfaktor VII-Polymorphismus Arg³⁵³Gln mit dem prozeduralen Risiko nach Koronarintervention (V9)

Zielstellung

Die der Arbeit zugrundeliegende Hypothese war, dass Träger des Gln³⁵³-Allels aufgrund der niedrigeren Faktor-VII-Aktivität ein niedrigeres Risiko haben könnten, Frühkomplikationen nach perkutanen Koronarinterventionen (PTCA, DCA, Stentimplantation) zu erleiden. Wir haben diese Hypothese an der Subgruppe von 666 Patienten der insgesamt 2000 Patienten umfassenden Fall-Kontroll-Studie überprüft, die sich einer Katheterintervention unterzogen hatten.

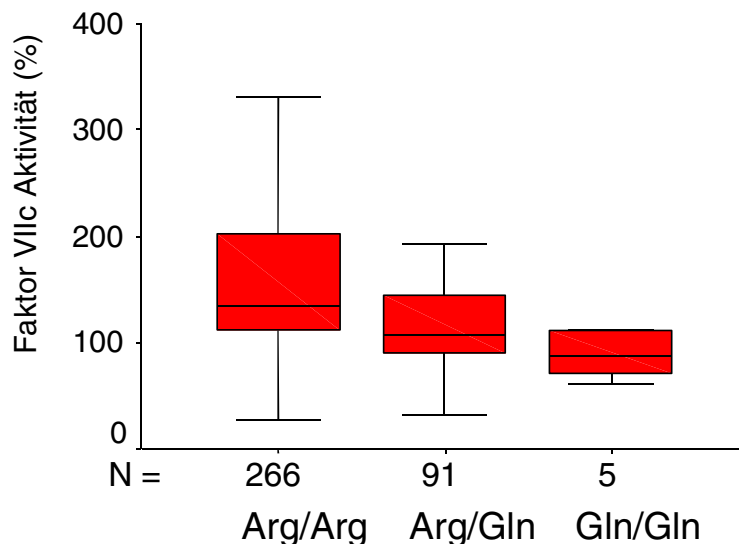


Abb. 5 Gerinnungsfaktor VIIc-Aktivität in Abhängigkeit vom Gerinnungsfaktor VII Arg³⁵³Gln Polymorphismus.

Ergebnisse

Homozygote Träger des Gln³⁵³-Allels hatten eine um 36% reduzierte Faktor VIIc-Aktivität während heterozygote Träger eine 21%-Reduktion aufwiesen, jeweils verglichen mit homozygoten Trägern des Arg³⁵³-Allels (Abb. 5). Der zusammengesetzte 30-Tage Endpunkt (Tod, Myokardinfarkt und Notwendigkeit der erneuten Revaskularisation des Zielgefäßes) wurde von 43 Patienten erreicht, 4 Patienten hatten den heterozygoten Arg³⁵³/Gln³⁵³-Genotyp, 39 Patienten hatten den homozygoten Arg³⁵³/Arg³⁵³-Genotyp. Insgesamt hatten nur 2,5% der Träger des Gln³⁵³-Allels eine 30-Tage-Komplikation erlitten, verglichen mit 7,7% der Träger

des Arg³⁵³-Allels, was einer Risikoreduktion von 68% (95% Konfidenzintervall 9%-81%; P=0,02) für Träger des Gln³⁵³-Allels entspricht. Die gefundene Risikoreduktion war unabhängig davon, ob eine PTCA oder Stentimplantation durchgeführt wurde, erreichte aber fallzahlbedingt nur in der Gesamtgruppe statistische Signifikanz. Für akute Koronarsyndrome und Myokardinfarkte hingegen fand sich keine Assoziation mit dem untersuchten Polymorphismus.

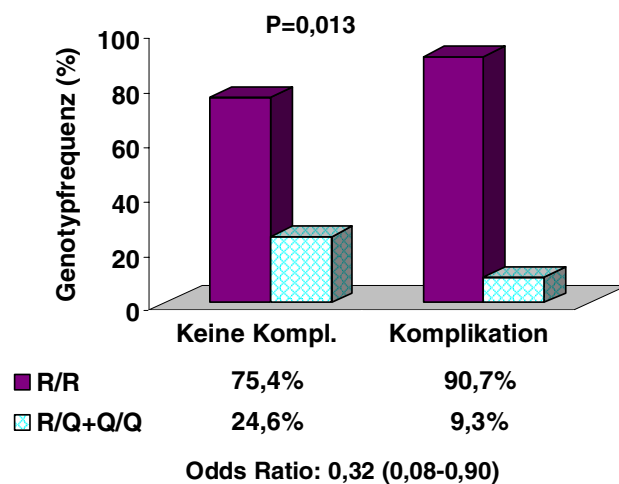


Abb. 6 Der Gerinnungsfaktor VII Polymorphismus R³⁵³Q als Prädiktor von Frühkomplikationen nach Koronarkatheterinterventionen (n=666). Die Abbildung zeigt die Verteilung der Genotypfrequenzen bei Patienten, die sich einer Koronarkatheterintervention (PTCA, DCA, Stentimplantation) unterzogen hatten, aufgeteilt nach dem Auftreten des zusammengesetzten 30-Tage-Endpunkts („Komplikation“: Tod, Myokardinfarkt, Notwendigkeit der Revaskularisation des Zielgefäßes). Patienten des R/Q+Q/Q Genotyps hatten ein um 68% reduziertes Risiko, den 30-Tage-Endpunkt zu erreichen.

Diskussion

Die gefundene Assoziation des Arg³⁵³Gln-Polymorphismus mit der Faktor VIIc-Aktivität im Sinne eines Gen-Dosis-Effekts kann als ein weiterer Hinweis auf die funktionelle Relevanz dieser genetischen Variante gewertet werden. Diese phänotypischen Unterschiede sind im Einklang mit der Literatur^{117, 121-123} und könnten einen Mechanismus für die beschriebene Risikoreduktion der 30-Tage-Komplikation nach koronaren Katheterinterventionen darstellen. Unsere Negativbefunde bezüglich der Assoziation mit akuten Koronarsyndromen decken sich mit den Ergebnissen weiterer Studien an großen Populationen¹²⁴⁻¹²⁶ und mit der prospektiven Framingham-Heart-Studie¹⁵¹.

Sollten sich unsere Ergebnisse bezüglich des prozeduralen Risikos bestätigen, könnte dieser Parameter zur verbesserten Einschätzung des Risikos nach Katheterinterventionen und einer individualisiert angepassten Therapie genutzt werden. Wenn der in präklinischer Entwicklung befindliche rekombinante FVIIai¹⁵², der ein blockiertes aktives Zentrum enthält, bis zur klinischen Anwendung entwickelt wird, sollte der Faktor VII-Genotyp für Indikation, Dosierung und Wirkabschätzung in Betracht gezogen werden.

2.7. Assoziation des C⁸²⁵T-Polymorphismus in dem für die β 3-Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins kodierenden Gen (*GNB3*) mit Frühkomplikationen nach Koronarinterventionen (V8)

Heterotrimere G-Proteine sind Schlüsselmoleküle in der Signaltransduktion von heptahelikalen Rezeptoren¹⁵³. Die β 3-Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins wird ubiquitär als Bestandteil von Pertussistoxin-sensitiven, die Adenylcyclase inhibierender G_(i)-Proteine exprimiert^{154, 155} und ist in die Signaltransduktion von einer Vielzahl von Rezeptoren involviert (darunter PAF und M2-Acetylcholinrezeptor), die potentiell das Wachstum von glatten Gefäßmuskelzellen und die Intimahyperplasie stimulieren können^{156, 157}. Auch für die ADP-abhängige Thrombozytenaggregation ist dieser Signaltransduktionsweg bedeutsam¹⁵⁸.

In dem für die β 3-Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins kodierenden Gen (*G β 3*) wurde kürzlich in Exon 10 ein C⁸²⁵T-Polymorphismus beschrieben. Das T-Allel war mit einer Spleißvariante (fehlende Nukleotide 498-620 in Exon 9) des Gens und mit erhöhter G_(i)-Protein-gekoppelter transmembranärer Signalaktivität assoziiert¹⁵⁹⁻¹⁶². In vivo-Untersuchungen der Hautmikrozirkulation bei gesunden jungen Männern deuten auf eine verstärkte Vasokonstriktionsantwort nach Injektion von jeweils 10⁻¹⁶ bis 10⁻¹⁰-molaren Substanzkonzentrationen von Endothelin-1, Noradrenalin und Angiotensin II bei heterozygoten und homozygoten Trägern der *GNB3*⁸²⁵T-Variante hin¹⁶³.

Bereits in der Erstbeschreibung der C⁸²⁵T-Variante war eine Assoziation dieses Polymorphismus mit der essentiellen arteriellen Hypertonie beim Menschen gefunden worden¹⁵⁹, die später in weiteren¹⁶⁴⁻¹⁶⁶, wenn auch nicht allen kaukasischen Kollektiven bestätigt wurde¹⁶⁷. Die Ergebnisse einer ersten pharmakogenetischen Studie deuten zudem darauf hin, dass der *GNB3* C⁸²⁵T-Polymorphismus für die Prädiktion der blutdrucksenkenden Wirkung nach Gabe von Thiaziddiuretika eingesetzt werden könnte, da eine stärkere blutdrucksenkenden Wirkung bei homozygoten⁸²⁵TT-Trägern gezeigt worden war¹⁶⁸.

Zielstellung

Die der Arbeit zugrundeliegende Hypothese war, dass Träger des 825T-Allels aufgrund der beschriebenen Auswirkungen auf die Signaltransduktion und möglicherweise auf die hierüber vermittelte Thrombozytenaggregation, Intimahyperplasie und Wachstum glatter Gefäßmuskelzellen ein höheres Risiko haben könnten, Frühkomplikationen nach Koronarinterventionen zu erleiden. Eine erste Studie zu dieser Frage konnte in einer Kohorte von 562 Patienten, die sich einer Stentimplantation unterzogen hatten, kein erhöhtes Risiko für Frühkomplikationen oder für eine Restenose nach einem Zeitraum von 6 Monaten nachweisen¹⁶⁹. Patienten, die sich einer reinen PTCA oder einer DCA unterzogen hatten, waren allerdings in dieser Studie nicht eingeschlossen.

Ergebnisse

Wir haben die Hypothese in der Kohorte von 673 KHK-Patienten aus der beschriebenen Fall-Kontrollstudie untersucht, die sich einer Koronarkatheterintervention unterzogen hatten. Die Frühkomplikationen wurden prospektiv als kombinierter 30-Tage-Endpunkt verfolgt. Der *GNB3*-Genotyp lag für die Auswertung von 277 Patienten, die sich einer PTCA unterzogen hatten, von 103 Patienten, die sich einer DCA unterzogen hatten sowie von 280 Patienten, die mit Stentimplantation versorgt worden waren, vor. Es ergab sich auch in unserer prospektiv verfolgten Kohorte kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem *GNB3*-Genotyp und Frühkomplikationen nach Koronarinterventionen, unabhängig vom Typ der erfolgten Intervention (PTCA, DCA, Stentimplantation).

Diskussion

Entgegen der Arbeitshypothese konnte in unserer Studie, wie auch schon in der Vorstudie von von Beckerath et al.¹⁶⁹, in vivo kein relevanter Einfluss des *GNB3*-Polymorphismus auf Frühkomplikationen nach Katheterintervention nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass die in vitro erhobenen Befunde in der komplexen Situation in vivo nach Koronarintervention entweder in keinem relevanten Umfang zum Tragen kamen oder, verglichen mit weiteren bekannten Einflussfaktoren, in den Hintergrund treten. Hierfür spricht neben der bekannten Rezeptor-Promiskuität der G-Proteine¹⁷⁰ indirekt auch die Tatsache, dass die seit unserer Publikation veröffentlichten Befunde zur Assoziation dieser genetischen Variante mit kardiovaskulären und metabolischen Phänotypen darauf hindeuten, dass sich reproduzierbar klinisch messbare Effekte oftmals nur in sehr spezifisch definierten Subgruppen zeigten¹⁷¹⁻¹⁷³.

3. Zusammenfassende Diskussion

3.1. Medizinische Anwendung

Die Ergebnisse der hier zusammengefassten Assoziationsstudien deuten darauf hin, dass sowohl der Kozak-Sequenz Polymorphismus (⁻⁵C/T) im thrombozytären Glycoprotein Iβα Gen als auch der Arg³⁵³Gln Polymorphismus im Gerinnungsfaktor VII Gen als mögliche Risikoprädiktoren für Frühkomplikationen nach Koronarinterventionen in Betracht kommen. Darüber hinaus war der Kozak-Sequenz Polymorphismus des GP Iβα in unserer Studienpopulation auch ein Risikoprädiktor für akute Koronarsyndrome. Die weiteren untersuchten Kandidatengene erwiesen sich in unserer Studienpopulation als nicht geeignet zur Risikoprädiktion der koronaren Herzerkrankung und für Komplikationen nach Katheterinterventionen.

Die positiven Ergebnisse hinsichtlich der möglichen hereditären Risikoprädiktoren nach Koronarinterventionen müssen jedoch als vorläufig betrachtet werden und bedürfen aus den weiter unten dargelegten Gründen einer Bestätigung in unabhängigen Studien. Diese liegen noch nicht vor. Eine unabhängige Bestätigung der Befunde vorausgesetzt, könnten die genannten hereditären Suszeptibilitätsfaktoren zu einer verbesserten Risikoeinschätzung nach Koronarinterventionen herangezogen werden. Im Sinne einer zunehmend individualisierten Therapie könnten mit diesen Faktoren Patientengruppen identifiziert werden, die einer intensiveren Überwachung und Therapie nach Katheterintervention bedürfen. Unsere Ergebnisse bezüglich des Faktor VII Arg³⁵³Gln Polymorphismus deuten zudem darauf hin, dass auf diese Weise auch Patientengruppen identifiziert werden könnten, die eine geringere Risikoneigung aufweisen und daher möglicherweise einer geringeren Therapieintensität bedürfen. Es ist allerdings evident, dass vor der Anwendung dieser Prinzipien in der klinischen Routine im Sinne einer Evidenz-basierten Medizin und zum Schutz der Patienten nicht nur zu fordern ist, dass diese Ergebnisse in unabhängigen Kollektiven repliziert werden, sondern dass prospektiv in kontrollierten Studien belegt wird, dass dieses individualisierte Vorgehen auf der Basis hereditärer Suszeptibilitätsfaktoren zu einer Verbesserung der Therapie beiträgt.

3.2. Methodische Aspekte genetischer Assoziationsstudien (V1, V3)

Die zusammenfassend vorgestellten Studienergebnisse zeigen exemplarisch Herausforderungen, die sich in Assoziationsstudien zur Untersuchung genetischer Einflüsse auf komplexe Erkrankungen ergeben können.

Assoziationsstudien bieten für die genetische Dissektion komplexer Erkrankungen praktische Vorteile, denn sie sind insbesondere für die Aufdeckung von Risikogenen mit kleinem bis moderatem relativen Risiko für einen komplexen Endpunkt statistisch effizienter als die Kopplungsanalyse ¹⁰. Zudem können in der Auswahl der Kandidatengene bereits bekannte biologische Mechanismen für die Erkrankung berücksichtigt werden. Dennoch findet sich derzeit eine Vielzahl genetischer Assoziationsstudien mit widersprüchlichen Ergebnissen.

In einer Metaanalyse von 370 Studien zur Assoziation von insgesamt 36 genetischen Varianten mit verschiedenen komplexen Endpunkten wurde überzeugend nachgewiesen, dass eine systematische und signifikante Heterogenität zwischen den Studienergebnissen bestand und dass, unabhängig vom untersuchten Endpunkt, die Initialstudie meist eine stärkere Assoziation der genetischen Variante mit dem Phänotyp nachwies als die nachfolgenden Studien ¹⁷⁴. Eine Replikation der in genetischen Assoziationsstudien gefundenen Ergebnisse in mindestens einer weiteren unabhängigen Population, und im Idealfall mit einer ergänzenden Analysestrategie, beispielsweise einer populationsbasierten, wenn die erste familienbasiert war und vice versa, ist daher zwingend notwendig, bevor klinische Konsequenzen in Erwägung gezogen werden.

Tabelle 4. Ursachen diskrepanter Studienergebnisse genetischer Assoziationsstudien

Zufallsfehler	Zufallsbefund durch multiples Testen Studiengröße zu gering Falsche Auswahl der genetischen Variante Genotypisierungsfehler
Confounding und Bias	Phänotyp wird durch verschiedene Allele in unterschiedlichen Genen beeinflusst (Allelische Heterogenität) Phänotyp kann durch verschiedene pathophysiologische Mechanismen hervorgerufen werden (Ätiologische Heterogenität) Unterschiedliche ethnische Zusammensetzung der Studienpopulation in Multizentrischen Studien Studienpopulation besteht aus verschiedenen Untergruppen mit unterschiedlichen Allelfrequenzen (Populationsstratifikation) Missklassifikation der Erkrankung oder Komplikation Zugrundeliegende Haplotypen nicht berücksichtigt Mischung aus inzidenten und prävalenten Fällen
Interaktion und Effektmodifizierung	Nicht identifizierte Gen-Gen-Interaktionen Nicht identifizierte Gen-Umwelt-Interaktionen Nicht identifizierte Gen-Lifestyle-Interaktionen

Ausgehend von den in Tabelle 4 zusammengefassten Hauptursachen für diskrepante Ergebnisse genetischer Assoziationsstudien lassen sich Qualitätskriterien definieren, die als

Leitlinien für valides Studiendesign und effiziente Studiendurchführung und Interpretation genetischer Kandidatengen-Assoziationsstudien genutzt werden können¹⁷⁵⁻¹⁷⁷. Hierzu gehören neben der notwendigen konfirmatorischen Replikation eine Reihe statistischer, biologischer und epidemiologischer Kriterien.

Der präzisen Definition und Erfassung des untersuchten Phänotyps und von Subphänotypen kommt bei der Untersuchung komplexer Erkrankungen entscheidende Bedeutung zu, um eine Vermischung ätiologisch unterschiedlicher Erkrankungsgruppen zu vermeiden und Vergleichbarkeit zwischen unterschiedlichen Studien zu gewährleisten. Bei der Erfassung müssen systematisch mögliche Confounder als Covariate erfasst werden und bei Fall-Kontrollstudien muss ein möglichst genaues *Matching* erfolgen. Wegen der überragenden Bedeutung einer exakten und standardisierten phänotypischen Charakterisierung für genetische Studien komplexer Erkrankungen ist kürzlich das *Human Phenome Project* vorgeschlagen worden, eine dem Humangenomprojekt vergleichbare internationale Initiative zur systematischen Sammlung von Phänom-Datenbanken und zur Entwicklung neuer Analysestrategien¹⁷⁸.

Zur Vermeidung einer Populationsstratifikation muss bereits die Rekrutierungsstrategie die ethnische Homogenität der Studienpopulationen sicherstellen. Für die Prüfung auf unerkannte Populationsstratifikation wurden multiallel-basierte Verfahren¹⁷⁹ erfolgreich angewandt¹⁸⁰.

Der Fallzahl der untersuchten Studienpopulation kommt besondere Bedeutung zu, da sie hinreichend groß sein muss, um mit der gewünschten statistischen Power die zu erwartenden kleinen bis mittleren genetischen Effekte auch unter den Bedingungen einer allelischen Heterogenität und des multiplen Testens nachweisen zu können. Eine kürzlich vorgestellte Metaanalyse von 301 publizierten genetischen Assoziationsstudien über 25 verschiedene Assoziationen mit komplexen Erkrankungen deutete darauf hin, dass die beschriebene Nicht-Replikation der in der ersten Studie gefundenen positiven Assoziation oftmals auf falsch-negative Folgestudien zurückzuführen ist, die eine zu geringe Power zur Detektion der Assoziation aufwiesen. Eine spätere Replikation der Studienergebnisse erwies sich in dieser Analyse als wahrscheinlich, wenn zwei Studien die Assoziation mit $P < 0,01$ oder eine einzelne Studie mit $P < 0,001$ nachgewiesen hatten¹⁸¹. Während unsere Population von 2000 Patienten zum Zeitpunkt der Rekrutierung eine der größten genetischen Assoziationsstudien zur koronaren Herzerkrankung überhaupt darstellte, dürften Studienpopulationen mit mehreren tausend phänotypisierten Patienten in Zukunft eher zur Regel als zur Ausnahme werden.

Neben der Beachtung der Regeln der guten epidemiologischen Praxis erfordern genetische Assoziationsstudien eine nach plausiblen biologischen Prinzipien erfolgende Auswahl geeigneter Kandidatengene. Zum Zeitpunkt der Durchführung unserer hier zusammengefassten und bereits publizierten Arbeiten war die Untersuchung eines oder weniger Einzelnukleotidpolymorphismen in großen Assoziationsstudien Stand der wissenschaftlichen Technik. Durch die Verbesserung der Genotypisierungstechniken ist heute die gleichzeitige Untersuchung einer wesentlich größeren Anzahl von Polymorphismen in großen Populationen möglich geworden.

Innerhalb einzelner Gene scheint das beobachtete Kopplungsungleichgewicht von polymorphen Markern ausgeprägte Unterschiede aufzuweisen. Dies erschwert die Vorhersage, ob ein ausgewähltes Panel an polymorphen Markern die genetische Variabilität innerhalb eines Gens ausreichend widerspiegelt¹⁸². Es ist daher wünschenswert, die gesamte genetische Variabilität eines Kandidatengens zum Beispiel durch direkte Sequenzierung zu untersuchen.

Solange dies wegen technischer oder finanzieller Begrenzungen nicht möglich ist, kommt der Auswahl der zu untersuchenden Polymorphismen für die Studienqualität entscheidende Bedeutung zu, zumal die Sequenzvariabilität in den bisher untersuchten Genen sich als sehr hoch erwiesen hat. Für die europäische Population ist für die exonischen Genbereiche sowie für die 5'- und 3'-angrenzenden Bereiche mit ca. einem Polymorphismus pro 2.300 Basenpaaren zu rechnen¹⁸³⁻¹⁸⁵. Für die Auswahl einzelner Polymorphismen sind bereits Strategien zur Priorisierung vorgeschlagen worden, die auf der Einteilung der Polymorphismen nach ihrer Lokalisation, dem Typ des Polymorphismus und dessen Populationsfrequenz beruhen und dessen potentielle Auswirkungen auf das Protein und die Genexpression berücksichtigen^{13, 176}.

Dies ist für genetische Assoziationsstudien bedeutsam, da es zunehmend Hinweise gibt, dass die Untersuchung genomischer Haplotypen, verglichen mit der Analyse einzelner Polymorphismen, bestehende Assoziationen effizienter nachweist und dass Haplotyp-basierte Assoziationsstudien möglicherweise weniger häufig zu zufälligen und teilweise widersprüchlichen Studienergebnissen führen könnten^{8, 186, 187}. Auch eigene, noch vorläufige Daten deuten darauf hin, dass die Analyse von Haplotypen des thrombozytären Glycoproteins I β , die neben der beschriebenen Kozak-Sequenz-Variante auch andere funktionelle Polymorphismen des Gens einschließen, zu einer verbesserten Risikoprädiktion koronarer Ereignisse im Vergleich zur Analyse der Einzelvarianten führen könnte.

3.3. Ausblick

Untersuchungen zur genomischen Variabilität und zur Verteilung des Kopplungsungleichgewichts haben gezeigt, dass Teile des menschlichen Genoms eine Haplotyp-Blockstruktur aufzuweisen scheinen, die es erlaubt, das Genom in diskrete chromosomale Sequenzbereiche unterschiedlicher Länge aufzuteilen, innerhalb derer es nur eine geringe Anzahl verschiedener Haplotypen gibt. Diese Haplotypblöcke stellen Sequenzbereiche mit nur geringer Rekombination dar und scheinen nach gegenwärtigem Kenntnisstand populationsspezifisch zu sein¹⁸⁸⁻¹⁹³. Eine Analyse des gesamten Chromosoms 21 zeigte, dass die durchschnittliche Länge eines Haplotypblocks 7,8 kb beträgt (der größte Block umfasste 115 kb), und dass 80% der gesamten genomischen Variabilität des humanen Chromosoms 21 durch die Genotypisierung von nur 3 SNPs pro Haplotypblock definiert werden konnte¹⁹⁰.

Bisher ist die Organisation des menschlichen Genoms in dieser Blockstruktur für die Chromosomenregion 5q31¹⁹⁴ sowie die gesamten Chromosomen 21¹⁹⁰ und 22¹⁹⁵ belegt. Sollte sie sich für das humane Genom insgesamt bestätigen, könnte sich für die Identifizierung von Erkrankungsgenen für komplexe Erkrankungen durch genetische Assoziationsstudien die Möglichkeit des *haplotype tagging* ergeben: die Detektion häufiger genetischer Varianten, die bei komplexen Erkrankungen beteiligt sind, durch die Genotypisierung von relativ wenigen, einen definierten Haplotyp „anzeigender“ SNPs¹⁹⁶. Als eine wichtige Voraussetzung hierfür wird neben der systematischen Sammlung von Polymorphismen in öffentlich zugänglichen Datenbanken, die z.B. durch das *TSC* (The SNP Consortium)¹⁹⁷ erfolgt, die genomweite Kartierung häufiger Haplotypblöcke im sogenannten *HapMap*-Projekt derzeit von den Amerikanischen National Institutes of Health mit sehr hohen Beträgen gefördert¹⁹⁸. Während seltene Haplotypen durch das *HapMap*-Projekt nicht kartiert werden dürften, könnte der Anteil komplexer Erkrankungen, der durch häufige Allele verursacht wird, einem *haplotype tagging* zugänglich sein, und damit ein genomweites Mapping von Erkrankungsgenen für komplexe Erkrankungen mit vertretbarem Genotypisierungsaufwand erleichtern¹⁹⁹.

Die Fortschritte der letzten Jahre sowie die rasch fortschreitende Entwicklung auf dem Gebiet molekular-epidemiologischer und genomischer Forschung lässt es für die Zukunft möglich erscheinen, dass die Abschätzung des individuellen Erkrankungs- und Komplikationsrisikos unter Einbeziehung genetischer Suszeptibilitätsfaktoren passgenauer erfolgen kann. Dies wäre ein weiterer wichtiger Schritt zu einer Patienten-individualisierten, präventionsorientierten Medizin.

4. Zusammenfassung

Die systematische Untersuchung genetischer Prädispositionsfaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen und ihrer Komplikationen hat sich zu einem besonders intensiv bearbeiteten Forschungsfeld im Bereich der Pharmakogenomik entwickelt. Im Rahmen der hier zusammengefassten eigenen Untersuchungen wurden Polymorphismen in Kandidatengenen des Gerinnungssystems (thrombozytäre Glycoproteine I β , Ia/IIa, Gerinnungsfaktor VII) sowie des Homozysteinstoffwechsels (MTHFR, Interaktion mit der endothelialen NO-Synthase) in ihrer Assoziation zur koronaren Herzerkrankung und deren Komplikationen untersucht.

Die Ergebnisse der hier zusammengefassten eigenen Assoziationsstudien deuten darauf hin, dass sowohl der Kozak-Sequenz Polymorphismus (⁻⁵C/T) im thrombozytären Glycoprotein I β Gen als auch der Arg³⁵³Gln Polymorphismus im Gerinnungsfaktor VII Gen als mögliche Risikoprädiktoren für Frühkomplikationen nach Koronarinterventionen in Betracht kommen. Träger der ⁻⁵C-Variante in der Kozak-Sequenz des thrombozytären Glycoproteins I β hatten ein 3,75-fach erhöhtes Risiko (95% Vertrauensintervall 1,15-12,27; P=0,013), nach PTCA Frühkomplikationen innerhalb der ersten 30 Tage zu erleiden. Darüber hinaus war der Kozak-Sequenz Polymorphismus des GP I β in unserer Studienpopulation auch ein Risikoprädiktor für akute Koronarsyndrome (relatives Risiko 1,43; 95% Vertrauensintervall 1,05-1,95; P=0,02). Träger des ³⁵³Gln-Variante des Gerinnungsfaktor VII Gens hatten, verglichen mit homozygoten Trägern der ³⁵³Arg-Variante, eine Risikoreduktion von 68% (95% Vertrauensintervall 9%-81%) bezüglich der kombinierten Endpunkts der Komplikationen innerhalb von 30 Tagen nach Koronarintervention. Ein weiterer interessanter Befund waren die ausgeprägten Geschlechtsunterschiede bezüglich des Risikos für akute Koronarsyndrome in Abhängigkeit vom CA-Repeat Polymorphismus im Intron 13 des endothelialen NO-Synthasegens (*eNOS*) bei Patienten mit Hyperhomozysteinämie. Hier zeigte sich, dass Frauen mit steigender Anzahl der CA-Repeats ein signifikantes und ansteigendes Exzess-Risiko für akute Koronarsyndrome hatten. Die anderen untersuchten Kandidatengene erwiesen sich in unserer Studienpopulation als nicht geeignet zur Risikoprädiktion von koronarer Herzerkrankung und Komplikationen nach Katheterinterventionen.

Die zusammenfassend vorgestellten Studienergebnisse zeigen exemplarisch auch methodische Herausforderungen für Assoziationsstudien zur Untersuchung genetischer Einflüsse auf komplexe Erkrankungen wie die koronare Herzerkrankung. Eine Bestätigung dieser Ergebnisse in unabhängigen Populationen ist daher notwendig. Wenn sich die Befunde bestätigen, könnten diese hereditären Suszeptibilitätsfaktoren zu einer verbesserten

Risikoeinschätzung nach Koronarinterventionen herangezogen werden. Im Sinne einer zunehmend individualisierten Therapie könnten sie zu einer Identifizierung von Patientengruppen beitragen, die einer intensiveren Überwachung und Therapie, z.B. nach Katheterintervention, bedürfen.

Abkürzungen

KHK	Koronare Herzerkrankung
MTHFR	Methylentetrahydrofolatreduktase
CBS	Cystathion- β -Synthetase
MS	Methionin-Synthase
eNOS	endotheliale NO-Synthase
TF	Tissue Factor
GP	Glycoprotein
PTCA	Perkutane transluminale Koronarangioplastie
DCA	Direktionale koronare Atherektomie

Referenzen

1. Dawber TR, Kannel WB. The Framingham study. An epidemiological approach to coronary heart disease. *Circulation* 1966; 34:553-5.
2. Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH. A prospective study of parental history of myocardial infarction and coronary heart disease in women. *Am J Epidemiol* 1986; 123:48-58.
3. Schildkraut JM, Myers RH, Cupples LA, Kiely DK, Kannel WB. Coronary risk associated with age and sex of parental heart disease in the Framingham Study. *Am J Cardiol* 1989; 64:555-9.
4. Scheuner MT. Genetic predisposition to coronary artery disease. *Curr Opin Cardiol* 2001; 16:251-60.
5. Marenberg ME, Risch N, Berkman LF, Floderus B, de Faire U. Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins. *N Engl J Med* 1994; 330:1041-6.
6. Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409:860-921.
7. Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291:1304-51.
8. Drysdale CM, McGraw DW, Stack CB, et al. Complex promoter and coding region beta 2-adrenergic receptor haplotypes alter receptor expression and predict in vivo responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:10483-8.
9. Collins FS. Shattuck lecture--medical and societal consequences of the Human Genome Project. *N Engl J Med* 1999; 341:28-37.
10. Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 1996; 273:1516-7.
11. Collins FS, Guyer MS, Charkravarti A. Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation. *Science* 1997; 278:1580-1.
12. Sham PC, Cherny SS, Purcell S, Hewitt JK. Power of linkage versus association analysis of quantitative traits, by use of variance-components models, for sibship data. *Am J Hum Genet* 2000; 66:1616-30.
13. Risch NJ. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature* 2000; 405:847-56.
14. Cambien F, Poirier O, Lecerf L, et al. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 1992; 359:641-4.
15. Sibani S, Christensen B, O'Ferrall E, et al. Characterization of six novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in patients with homocystinuria. *Hum Mutat* 2000; 15:280-7.
16. Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* 1995; 274:1049-57.
17. Nygard O, Nordrehaug JE, Refsum H, Ueland PM, Farstad M, Vollset SE. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 1997; 337:230-6.
18. Stampfer MJ, Malinow MR, Willett WC, et al. A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians. *JAMA* 1992; 268:877-81.
19. Stehouwer CD, Weijnenberg MP, van den Berg M, Jakobs C, Feskens EJ, Kromhout D. Serum homocysteine and risk of coronary heart disease and cerebrovascular disease in elderly men: a 10-year follow-up. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:1895-901.
20. Danesh J, Lewington S. Plasma homocysteine and coronary heart disease: systematic review of published epidemiological studies. *J Cardiovasc Risk* 1998; 5:229-32.
21. Brattstrom L, Wilcken DE. Homocysteine and cardiovascular disease: cause or effect? *Am J Clin Nutr* 2000; 72:315-23.
22. Voutilainen S, Rissanen TH, Virtanen J, Lakka TA, Salonen JT. Low dietary folate intake is associated with an excess incidence of acute coronary events: The Kuopio Ischemic Heart Disease Risk Factor Study. *Circulation* 2001; 103:2674-80.
23. Voutilainen S, Lakka TA, Porkkala-Sarataho E, Rissanen T, Kaplan GA, Salonen JT. Low serum folate concentrations are associated with an excess incidence of acute coronary events: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *Eur J Clin Nutr* 2000; 54:424-8.
24. Verhoef P, Stampfer MJ, Rimm EB. Folate and coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol* 1998; 9:17-22.
25. Folsom AR, Nieto FJ, McGovern PG, et al. Prospective study of coronary heart disease incidence in relation to fasting total homocysteine, related genetic polymorphisms, and B vitamins: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Circulation* 1998; 98:204-10.
26. Kang SS, Zhou J, Wong PW, Kowalisyn J, Strokosch G. Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet* 1988; 43:414-21.
27. Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10:111-3.

28. Brattstrom L, Wilcken D, Ohrvik J, Brudin L. Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease : the result of a meta-analysis. *Circulation* 1998; 98:2520-6.
29. Harmon DL, Woodside JV, Yarnell JW, et al. The common 'thermolabile' variant of methylene tetrahydrofolate reductase is a major determinant of mild hyperhomocysteinemia. *QJM* 1996; 89:571-7.
30. Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, et al. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996; 93:7-9.
31. Ma J, Stampfer MJ, Hennekens CH, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, plasma folate, homocysteine, and risk of myocardial infarction in US physicians. *Circulation* 1996; 94:2410-6.
32. Girelli D, Friso S, Trabetti E, et al. 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* 1998; 91:4158-63.
33. van der Put NM, Steegers Theunissen RP, Frosst P, et al. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida [see comments]. *Lancet* 1995; 346:1070-1.
34. Deloughery TG, Evans A, Sadeghi A, et al. Common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Correlation with homocysteine metabolism and late-onset vascular disease. *Circulation* 1996; 94:3074-8.
35. Schwartz SM, Siscovick DS, Malinow MR, et al. Myocardial infarction in young women in relation to plasma total homocysteine, folate, and a common variant in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Circulation* 1997; 96:412-7.
36. Arruda VR, von Zuben PM, Chiapparini LC, Annichino Bizzacchi JM, Costa FF. The mutation Ala677-->Val in the methylene tetrahydrofolate reductase gene: a risk factor for arterial disease and venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1997; 77:818-21.
37. Gallagher PM, Meleady R, Shields DC, et al. Homocysteine and risk of premature coronary heart disease. Evidence for a common gene mutation. *Circulation* 1996; 94:2154-8.
38. Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, Boers GH, et al. Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease. *Am J Hum Genet* 1996; 58:35-41.
39. Morita H, Kurihara H, Tsubaki S, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and ischemic stroke in Japanese. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:1465-9.
40. Ou T, Yamakawa Kobayashi K, Arinami T, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase and apolipoprotein E polymorphisms are independent risk factors for coronary heart disease in Japanese: a case-control study. *Atherosclerosis* 1998; 137:23-8.
41. Abbate R, Sardi I, Pepe G, et al. The high prevalence of thermolabile 5-10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) in Italians is not associated to an increased risk for coronary artery disease (CAD). *Thromb Haemost* 1998; 79:727-30.
42. Anderson JL, King GJ, Thomson MJ, et al. A mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is not associated with increased risk for coronary artery disease or myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30:1206-11.
43. Brugada R, Marian AJ. A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase gene is not a major risk of coronary artery disease or myocardial infarction. *Atherosclerosis* 1997; 128:107-12.
44. Dunn J, Title LM, Bata I, et al. Relation of a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase to plasma homocysteine and early onset coronary artery disease. *Clin Biochem* 1998; 31:95-100.
45. Verhoef P, Kok FJ, Kluijtmans LA, et al. The 677C-->T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: associations with plasma total homocysteine levels and risk of coronary atherosclerotic disease. *Atherosclerosis* 1997; 132:105-13.
46. Verhoef P, Rimm EB, Hunter DJ, et al. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and risk of coronary heart disease: results among U.S. men. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32:353-9.
47. van Bockxmeer FM, Mamotte CD, Vasikaran SD, Taylor RR. Methylenetetrahydrofolate reductase gene and coronary artery disease. *Circulation* 1997; 95:21-3.
48. Gardemann A, Weidemann H, Philipp M, et al. The TT genotype of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism is associated with the extent of coronary atherosclerosis in patients at high risk for coronary artery disease. *Eur Heart J* 1999; 20:584-592.
49. Adams M, Smith PD, Martin D, Thompson JR, Lodwick D, Samani NJ. Genetic analysis of thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for myocardial infarction. *QJM* 1996; 89:437-44.
50. Schmitz C, Lindpaintner K, Verhoef P, Gaziano JM, Buring J. Genetic polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase and myocardial infarction. A case-control study. *Circulation* 1996; 94:1812-4.

51. Thuillier L, Chadeaux-Vekemans B, Bonnefont JP, et al. Does the polymorphism 677C-T of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene contribute to homocysteine-related vascular disease. *J Inher Metab dis* 1998; 21:812-822.
52. van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* 1998; 62:1044-51.
53. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 1998; 64:169-72.
54. Rees MM, Rodgers GM. Homocysteinemia: association of a metabolic disorder with vascular disease and thrombosis. *Thromb Res* 1993; 71:337-59.
55. Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med* 1998; 338:1042-50.
56. Harpel PC, Zhang X, Borth W. Homocysteine and hemostasis: pathogenic mechanisms predisposing to thrombosis. *J Nutr* 1996; 126:1285S-9S.
57. Zhang X, Li H, Jin H, Ebin Z, Brodsky S, Goligorsky MS. Effects of homocysteine on endothelial nitric oxide production. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279:F671-8.
58. Upchurch GR, Jr., Welch GN, Fabian AJ, et al. Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1997; 272:17012-7.
59. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1987; 2:1057-8.
60. Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989; 83:1774-7.
61. Murrell GA, Jang D, Williams RJ. Nitric oxide activates metalloprotease enzymes in articular cartilage. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 206:15-21.
62. von der Leyen HE, Gibbons GH, Morishita R, et al. Gene therapy inhibiting neointimal vascular lesion: in vivo transfer of endothelial cell nitric oxide synthase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:1137-41.
63. Kelly RA, Balligand JL, Smith TW. Nitric oxide and cardiac function. *Circ Res* 1996; 79:363-80.
64. Cooke JP, Dzau VJ. Derangements of the nitric oxide synthase pathway, L-arginine, and cardiovascular diseases. *Circulation* 1997; 96:379-82.
65. Wang XL, Sim AS, Badenhop RF, McCredie RM, Wilcken DE. A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Nat Med* 1996; 2:41-5.
66. Stangl K, Cascorbi I, Laule M, et al. High CA repeat numbers in intron 13 of the endothelial nitric oxide synthase gene and increased risk of coronary artery disease. *Pharmacogenetics* 2000; 10:133-40.
67. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340:115-26.
68. Fredrickson BJ, Dong JF, McIntire LV, Lopez JA. Shear-dependent rolling on von Willebrand factor of mammalian cells expressing the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex. *Blood* 1998; 92:3684-93.
69. Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* 1996; 84:289-97.
70. Furihata K, Nugent DJ, Kunicki TJ. Influence of platelet collagen receptor polymorphisms on risk for arterial thrombosis. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126:305-9.
71. Reiner AP, Siscovick DS, Rosendaal FR. Platelet glycoprotein gene polymorphisms and risk of thrombosis: facts and fancies. *Rev Clin Exp Hematol* 2001; 5:262-87; discussion 311-2.
72. Lopez JA, Dong JF. Structure and function of the glycoprotein Ib-IX-V complex. *Curr Opin Hematol* 1997; 4:323-9.
73. Ware J. Molecular analyses of the platelet glycoprotein Ib-IX-V receptor. *Thromb Haemost* 1998; 79:466-78.
74. Miller JL. Platelet-type von Willebrand disease. *Thromb Haemost* 1996; 75:865-9.
75. Lopez JA, Andrews RK, Afshar Kharghan V, Berndt MC. Bernard-Soulier syndrome. *Blood* 1998; 91:4397-418.
76. Moroi M, Jung SM, Yoshida N. Genetic polymorphism of platelet glycoprotein Ib. *Blood* 1984; 64:622-9.
77. Ishida F, Furihata K, Ishida K, et al. The largest variant of platelet glycoprotein Ib alpha has four tandem repeats of 13 amino acids in the macroglycopeptide region and a genetic linkage with methionine145. *Blood* 1995; 86:1357-60.
78. Lopez JA, Ludwig EH, McCarthy BJ. Polymorphism of human glycoprotein Ib alpha results from a variable number of tandem repeats of a 13-amino acid sequence in the mucin-like macroglycopeptide region. Structure/function implications. *J Biol Chem* 1992; 267:10055-61.

79. Kuijpers RW, Faber NM, Cuypers HT, Ouwehand WH, von dem Borne AE. NH₂-terminal globular domain of human platelet glycoprotein Ib alpha has a methionine 145/threonine145 amino acid polymorphism, which is associated with the HPA-2 (Ko) alloantigens. *J Clin Invest* 1992; 89:381-4.
80. Kuijpers RW, Ouwehand WH, Bleeker PM, Christie D, von dem Borne AE. Localization of the platelet-specific HPA-2 (Ko) alloantigens on the N-terminal globular fragment of platelet glycoprotein Ib alpha. *Blood* 1992; 79:283-8.
81. Murata M, Furihata K, Ishida F, Russell SR, Ware J, Ruggeri ZM. Genetic and structural characterization of an amino acid dimorphism in glycoprotein Ib alpha involved in platelet transfusion refractoriness. *Blood* 1992; 79:3086-90.
82. Kozak M. Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes. *Nucleic Acids Res* 1981; 9:5233-62.
83. Afshar Kharghan V, Li CQ, Khoshnevis Asl M, Lopez JA. Kozak sequence polymorphism of the glycoprotein (GP) Ibalpha gene is a major determinant of the plasma membrane levels of the platelet GP Ib-IX-V complex. *Blood* 1999; 94:186-91.
84. Santoso S, Zimmermann P, Sachs UJ, Gardemann A. The impact of the Kozak sequence polymorphism of the glycoprotein Ib alpha gene on the risk and extent of coronary heart disease. *Thromb Haemost* 2002; 87:345-6.
85. Ishida F, Ito T, Takei M, Shimodaira S, Kitano K, Kiyosawa K. Genetic linkage of Kozak sequence polymorphism of the platelet glycoprotein Ib alpha with human platelet antigen-2 and variable number of tandem repeats polymorphism, and its relationship with coronary artery disease. *Br J Haematol* 2000; 111:1247-9.
86. Corral J, Lozano ML, Gonzalez-Conejero R, et al. A common polymorphism flanking the ATG initiator codon of GPIb alpha does not affect expression and is not a major risk factor for arterial thrombosis. *Thromb Haemost* 2000; 83:23-8.
87. Ito T, Ishida F, Shimodaira S, Kitano K. Polymorphisms of platelet membrane glycoprotein Ib alpha and plasma von Willebrand factor antigen in coronary artery disease. *Int J Hematol* 1999; 70:47-51.
88. Murata M, Matsubara Y, Kawano K, et al. Coronary artery disease and polymorphisms in a receptor mediating shear stress-dependent platelet activation. *Circulation* 1997; 96:3281-6.
89. Douglas H, Michaelides K, Gorog DA, et al. Platelet membrane glycoprotein Ibalpha gene -5T/C Kozak sequence polymorphism as an independent risk factor for the occurrence of coronary thrombosis. *Heart* 2002; 87:70-4.
90. Mikkelsen J, Perola M, Penttila A, Karhunen PJ. Platelet glycoprotein Ibalpha HPA-2 Met/VNTR B haplotype as a genetic predictor of myocardial infarction and sudden cardiac death. *Circulation* 2001; 104:876-80.
91. Gonzalez Conejero R, Lozano ML, Rivera J, et al. Polymorphisms of platelet membrane glycoprotein Ib associated with arterial thrombotic disease. *Blood* 1998; 92:2771-6.
92. Mercier B, Munier S, Bertault V, Mansourati J, Blanc JJ, Ferec C. Myocardial infarction: absence of association with VNTR polymorphism of GP Ibalpha. *Thromb Haemost* 2000; 84:921-2.
93. Santoro SA. Platelet surface collagen receptor polymorphisms: variable receptor expression and thrombotic/hemorrhagic risk. *Blood* 1999; 93:3575-7.
94. Kunicki TJ, Orzechowski R, Annis D, Honda Y. Variability of integrin alpha 2 beta 1 activity on human platelets. *Blood* 1993; 82:2693-703.
95. Kritzik M, Savage B, Nugent DJ, Santoso S, Ruggeri ZM, Kunicki TJ. Nucleotide polymorphisms in the alpha2 gene define multiple alleles that are associated with differences in platelet alpha2 beta1 density. *Blood* 1998; 92:2382-8.
96. Nieuwenhuis HK, Akkerman JW, Houdijk WP, Sixma JJ. Human blood platelets showing no response to collagen fail to express surface glycoprotein Ia. *Nature* 1985; 318:470-2.
97. Nieuwenhuis HK, Sakariassen KS, Houdijk WP, Nievelstein PF, Sixma JJ. Deficiency of platelet membrane glycoprotein Ia associated with a decreased platelet adhesion to subendothelium: a defect in platelet spreading. *Blood* 1986; 68:692-5.
98. Kunicki TJ, Annis DS, Felding Habermann B. Molecular determinants of arg-gly-asp ligand specificity for beta3 integrins. *J Biol Chem* 1997; 272:4103-7.
99. Jacquelin B, Tarantino MD, Kritzik M, et al. Allele-dependent transcriptional regulation of the human integrin alpha2 gene. *Blood* 2001; 97:1721-6.
100. Di Paola J, Federici AB, Mannucci PM, et al. Low platelet alpha2beta1 levels in type I von Willebrand disease correlate with impaired platelet function in a high shear stress system. *Blood* 1999; 93:3578-82.
101. Roest M, Banga JD, Grobbee DE, et al. Homozygosity for 807 T polymorphism in alpha(2) subunit of platelet alpha(2)beta(1) is associated with increased risk of cardiovascular mortality in high-risk women. *Circulation* 2000; 102:1645-50.
102. Carlsson LE, Santoso S, Spitzer C, Kessler C, Greinacher A. The alpha2 gene coding sequence T807/A873 of the platelet collagen receptor integrin alpha2beta1 might be a genetic risk factor for the development of stroke in younger patients. *Blood* 1999; 93:3583-6.

103. Reiner AP, Kumar PN, Schwartz SM, et al. Genetic variants of platelet glycoprotein receptors and risk of stroke in young women. *Stroke* 2000; 31:1628-33.
104. Casorelli I, De Stefano V, Leone AM, et al. The C807T/G873A polymorphism in the platelet glycoprotein Ia gene and the risk of acute coronary syndrome in the Italian population. *Br J Haematol* 2001; 114:150-4.
105. Moshfegh K, Wuillemin WA, Redondo M, et al. Association of two silent polymorphisms of platelet glycoprotein Ia/IIa receptor with risk of myocardial infarction: a case-control study. *Lancet* 1999; 353:351-4.
106. Morita H, Kurihara H, Imai Y, et al. Lack of association between the platelet glycoprotein Ia C807T gene polymorphism and myocardial infarction in Japanese. An approach entailing melting curve analysis with specific fluorescent hybridization probes. *Thromb Haemost* 2001; 85:226-30.
107. Benze G, Heinrich J, Schulte H, et al. Association of the GPIa C807T and GPIIIa P1A1/A2 polymorphisms with premature myocardial infarction in men. *Eur Heart J* 2002; 23:325-30.
108. Santoso S, Kunicki TJ, Kroll H, Haberbosch W, Gardemann A. Association of the Platelet Glycoprotein Ia C807T Gene Polymorphism With Nonfatal Myocardial Infarction in Young Patients. *Blood* 1999; 93:2449-2453.
109. Croft SA, Hampton KK, Sorrell JA, et al. The GPIa C807T dimorphism associated with platelet collagen receptor density is not a risk factor for myocardial infarction. *Br J Haematol* 1999; 106:771-6.
110. Furie B, Furie BC. The molecular basis of blood coagulation. *Cell* 1988; 53:505-18.
111. Rapaport SI, Rao LV. Initiation and regulation of tissue factor-dependent blood coagulation. *Arterioscler Thromb* 1992; 12:1111-21.
112. Nemerson Y. Tissue factor: then and now. *Thromb Haemost* 1995; 74:180-4.
113. Rao LV, Rapaport SI. Cells and the activation of factor VII. *Haemostasis* 1996; 26:1-5.
114. Muller YA, Ullsch MH, Kelley RF, de Vos AM. Structure of the extracellular domain of human tissue factor: location of the factor VIIa binding site. *Biochemistry* 1994; 33:10864-70.
115. Meade TW, Mellows S, Brozovic M, et al. Haemostatic function and ischaemic heart disease: principal results of the Northwick Park Heart Study. *Lancet* 1986; 2:533-7.
116. Lane DA, Grant PJ. Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. *Blood* 2000; 95:1517-32.
117. Green F, Kelleher C, Wilkes H, Temple A, Meade T, Humphries S. A common genetic polymorphism associated with lower coagulation factor VII levels in healthy individuals. *Arterioscler Thromb* 1991; 11:540-6.
118. Bernardi F, Marchetti G, Pinotti M, et al. Factor VII gene polymorphisms contribute about one third of the factor VII level variation in plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16:72-6.
119. Pollak ES, Hung HL, Godin W, Overton GC, High KA. Functional characterization of the human factor VII 5'-flanking region. *J Biol Chem* 1996; 271:1738-47.
120. Lane A, Cruickshank JK, Mitchell J, Henderson A, Humphries S, Green F. Genetic and environmental determinants of factor VII coagulant activity in ethnic groups at differing risk of coronary heart disease. *Atherosclerosis* 1992; 94:43-50.
121. Iacoviello L, Di Castelnuovo A, De Knijff P, et al. Polymorphisms in the coagulation factor VII gene and the risk of myocardial infarction [see comments]. *N Engl J Med* 1998; 338:79-85.
122. Ghaddar HM, Folsom AR, Aleksic N, et al. Correlation of factor VIIa values with factor VII gene polymorphism, fasting and postprandial triglyceride levels, and subclinical carotid atherosclerosis. *Circulation* 1998; 98:2815-21.
123. Hunault M, Arbini AA, Lopaciuk S, Carew JA, Bauer KA. The Arg353Gln polymorphism reduces the level of coagulation factor VII. In vivo and in vitro studies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:2825-9.
124. Doggen CJ, Manger Cats V, Bertina RM, Reitsma PH, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. A genetic propensity to high factor VII is not associated with the risk of myocardial infarction in men. *Thromb Haemost* 1998; 80:281-5.
125. Heywood DM, Ossei-Gerning N, Grant PJ. Association of factor VII:C levels with environmental and genetic factors in patients with ischaemic heart disease and coronary atheroma characterised by angiography. *Thromb Haemost* 1996; 76:161-5.
126. Lane A, Green F, Scarabin PY, et al. Factor VII Arg/Gln353 polymorphism determines factor VII coagulant activity in patients with myocardial infarction (MI) and control subjects in Belfast and in France but is not a strong indicator of MI risk in the ECTIM study. *Atherosclerosis* 1996; 119:119-27.
127. Nomenclature and criteria for diagnosis of ischemic heart disease. Report of the Joint International Society and Federation of Cardiology/World Health Organization task force on standardization of clinical nomenclature. *Circulation* 1979; 59:607-9.
128. Kluijtmans LA, Kastelein JJ, Lindemans J, et al. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in coronary artery disease. *Circulation* 1997; 96:2573-7.

129. Blom HJ, Verhoef DP. Hyperhomocysteinemia, MTHFR, and risk of vascular disease. *Circulation* 2000; 101:E171; author reply E173.
130. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *Jama* 2002; 288:2015-22.
131. Malinow MR, Nieto FJ, Kruger WD, et al. The effects of folic acid supplementation on plasma total homocysteine are modulated by multivitamin use and methylenetetrahydrofolate reductase genotypes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:1157-62.
132. Ma J, Stampfer MJ, Giovannucci E, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, dietary interactions, and risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 1997; 57:1098-102.
133. Rimm EB, Willett WC, Hu FB, et al. Folate and vitamin B6 from diet and supplements in relation to risk of coronary heart disease among women. *Jama* 1998; 279:359-64.
134. Tucker KL, Selhub J, Wilson PW, Rosenberg IH. Dietary intake pattern relates to plasma folate and homocysteine concentrations in the Framingham Heart Study. *J Nutr* 1996; 126:3025-31.
135. Jacques PF, Bostom AG, Wilson PW, Rich S, Rosenberg IH, Selhub J. Determinants of plasma total homocysteine concentration in the Framingham Offspring cohort. *Am J Clin Nutr* 2001; 73:613-21.
136. Graham IM, Daly LE, Refsum HM, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project. *Jama* 1997; 277:1775-81.
137. Amorim Cruz JA, Moreiras O, Brzozowska A. Longitudinal changes in the intake of vitamins and minerals of elderly Europeans. SENECA Investigators. *Eur J Clin Nutr* 1996; 50:S77-85.
138. Clarke R, Collins R. Can dietary supplements with folic acid or vitamin B6 reduce cardiovascular risk? Design of clinical trials to test the homocysteine hypothesis of vascular disease. *J Cardiovasc Risk* 1998; 5:249-55.
139. Hui J, Stangl K, Lane WS, Bindereif A. HnRNP L stimulates splicing of the eNOS gene by binding to variable-length CA repeats. *Nat Struct Biol* 2003; 10:33-7.
140. Verhoef P. Hyperhomocysteinemia and risk of vascular disease in women. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26:325-34.
141. Yeghiazarians Y, Braunstein JA, Askari A, Stone P. Medical Progress: Unstable Angina Pectoris. *N Engl J Med* 2000; 342:101-114.
142. Romo GM, Dong JF, Schade AJ, et al. The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. *J Exp Med* 1999; 190:803-14.
143. Simon DI, Chen Z, Xu H, et al. Platelet Glycoprotein Ibalpha Is a Counterreceptor for the Leukocyte Integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Exp Med* 2000; 192:193-204.
144. von Beckerath N, Koch W, Mehilli J, et al. Glycoprotein Ia C807T polymorphism and risk of restenosis following coronary stenting. *Atherosclerosis* 2001; 156:463-8.
145. Kunicki TJ, Kritzik M, Annis DS, Nugent DJ. Hereditary variation in platelet integrin alpha 2 beta 1 density is associated with two silent polymorphisms in the alpha 2 gene coding sequence. *Blood* 1997; 89:1939-43.
146. Corral J, Rivera J, Gonzalez-Conejero R, Vicente V. The number of platelet glycoprotein Ia molecules is associated with the genetically linked 807 C/T and HPA-5 polymorphisms. *Transfusion* 1999; 39:372-8.
147. von Beckerath N, Koch W, Mehilli J, Böttiger C, Schömig A, Kastrati A. Glycoprotein Ia gene C807T polymorphism and risk for major adverse cardiac events within the first 30 days after coronary artery stenting. *Blood* 2000; 95:3297-3301.
148. Toschi V, Gallo R, Lettino M, et al. Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 1997; 95:594-9.
149. Fuster V, Lewis A. Conner Memorial Lecture. Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology. *Circulation* 1994; 90:2126-46.
150. Gutensohn K, Beythien C, Bau J, Meinertz T, Kuehnl P. Flow cytometric analysis of coronary stent-induced alterations of platelet antigens in an in vitro model. *Thromb Res* 1997; 86:49-56.
151. Feng D, Tofler GH, Larson MG, et al. Factor VII gene polymorphism, factor VII levels, and prevalent cardiovascular disease: the Framingham Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:593-600.
152. Golino P, Ragni M, Cirillo P, et al. Antithrombotic effects of recombinant human, active site-blocked factor VIIa in a rabbit model of recurrent arterial thrombosis. *Circ Res* 1998; 82:39-46.
153. Nurnberg B, Gudermann T, Schultz G. Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 2. G proteins: structure and function. *J Mol Med* 1995; 73:123-32.
154. Levine MA, Smallwood PM, Moen PT, Jr., Helman LJ, Ahn TG. Molecular cloning of beta 3 subunit, a third form of the G protein beta-subunit polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87:2329-33.
155. Ansari-Lari MA, Muzny DM, Lu J, et al. A gene-rich cluster between the CD4 and triosephosphate isomerase genes at human chromosome 12p13. *Genome Res* 1996; 6:314-26.
156. Koch WJ, Hawes BE, Allen LF, Lefkowitz RJ. Direct evidence that Gi-coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by G beta gamma activation of p21ras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:12706-10.

157. Davies MG, Huynh TT, Fulton GJ, et al. G protein signaling and vein graft intimal hyperplasia: reduction of intimal hyperplasia in vein grafts by a Gbetagamma inhibitor suggests a major role of G protein signaling in lesion development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:1275-80.
158. Jin J, Kunapuli SP. Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:8070-4.
159. Siffert W, Roszkopf D, Siffert G, et al. Association of a human G-protein beta3 subunit variant with hypertension. *Nat Genet* 1998; 18:45-8.
160. Baumgart D, Naber C, Haude M, et al. G protein beta3 subunit 825T allele and enhanced coronary vasoconstriction on alpha(2)-adrenoceptor activation. *Circ Res* 1999; 85:965-9.
161. Virchow S, Ansorge N, Roszkopf D, Rubben H, Siffert W. The G protein beta3 subunit splice variant Gbeta3-s causes enhanced chemotaxis of human neutrophils in response to interleukin-8. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1999; 360:27-32.
162. Virchow S, Ansorge N, Rubben H, Siffert G, Siffert W. Enhanced fMLP-stimulated chemotaxis in human neutrophils from individuals carrying the G protein beta3 subunit 825 T-allele. *FEBS Lett* 1998; 436:155-8.
163. Wenzel RR, Siffert W, Bruck H, Philipp T, Schäfers RF. Enhanced vasoconstriction to endothelin-1, angiotensin II and noradrenaline in carriers of the GNB3 825T allele in the skin microcirculation. *Pharmacogenetics* 2002; 12:489-95.
164. Benjafield AV, Jeyasingam CL, Nyholt DR, Griffiths LR, Morris BJ. G-protein beta3 subunit gene (GNB3) variant in causation of essential hypertension. *Hypertension* 1998; 32:1094-7.
165. Schunkert H, Hense HW, Doring A, Riegger GA, Siffert W. Association between a polymorphism in the G protein beta3 subunit gene and lower renin and elevated diastolic blood pressure levels. *Hypertension* 1998; 32:510-3.
166. Beige J, Hohenbleicher H, Distler A, Sharma AM. G-protein beta3 subunit C825T variant and ambulatory blood pressure in essential hypertension. *Hypertension* 1999; 33:1049-1051.
167. Brand E, Herrmann SM, Nicaud V, et al. The 825C/T polymorphism of the G-protein subunit beta3 is not related to hypertension. *Hypertension* 1999; 33:1175-8.
168. Turner ST, Schwart GL, Chapman AB, Boerwinkle E. C825T polymorphism of the G protein beta3-subunit and antihypertensive response to a thiazide diuretic. *Hypertension* 2001; 37:739-743.
169. von Beckerath N, Kastrati A, Koch W, et al. G protein beta3 subunit polymorphism and risk of thrombosis and restenosis following coronary stent placement. *Atherosclerosis* 2000; 149:151-5.
170. Hildebrandt JD. Role of subunit diversity in signaling by heterotrimeric G proteins. *Biochem Pharmacol* 1997; 54:325-39.
171. Tomaszewski M, Charchar FJ, Padmanabhan S, Zukowska-Szczechowska E, Grzeszczak W, Dominiczak AF. Cardiovascular diseases and G-protein beta3 subunit gene (GNB3) in the era of genomewide scans. *J Hum Hypertens* 2003; 17:379-380.
172. Castellano M. Genetic association studies on gender- and age-related phenotypes: the case of GNB3 gene. *J Hypertens* 2003; 21:683-685.
173. Brand E, Wang J-G, Herrmann SM, Staessen JA. An epidemiological study of blood pressure and metabolic phenotypes in relation to the Gbeta3 C825T polymorphism. *J Hypertens* 2003; 21:729-737.
174. Ioannidis JP, Ntzani EE, Trikalinos TA, Contopoulos-Ioannidis DG. Replication validity of genetic association studies. *Nat Genet* 2001; 29:306-9.
175. Freely associating. *Nat Genet* 1999; 22:1-2.
176. Tabor HK, Risch NJ, Myers RM. Opinion: Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat Rev Genet* 2002; 3:391-7.
177. Hegele RA. SNP Judgments and Freedom of Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:1058-1061.
178. Freimer N, Sabatti C. The Human Phenome Project. *Nat Genet* 2003; 34:15-21.
179. Pritchard JK, Rosenberg NA. Use of unlinked genetic markers to detect population stratification in association studies. *Am J Hum Genet* 1999; 65:220-8.
180. Small KM, Wagoner LE, Levin AM, Kardia SL, Liggett SB. Synergistic polymorphisms of beta1- and alpha2C-adrenergic receptors and the risk of congestive heart failure. *N Engl J Med* 2002; 347:1135-42.
181. Lohmueller KE, Pearce CL, Pike M, Lander ES, Hirschhorn JN. Meta-analysis of genetic association studies support a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat Genet* 2003; 33:177-182.
182. Tiret L, Poirier O, Nicaud V, et al. Heterogeneity of linkage disequilibrium in human genes has implications for association studies of common diseases. *Hum Mol Genet* 2002; 11:419-429.
183. Cambien F, Poirier O, Nicaud V, et al. Sequence Diversity in 36 Candidate Genes for Cardiovascular Disorders. *Am J Hum Genet* 1999; 65:183-191.
184. Cargill M, Altshuler D, Ireland J, et al. Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet* 1999; 22:231-8.

185. Halushka MK, Fan JB, Bentley K, et al. Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis. *Nat Genet* 1999; 22:239-47.
186. Klerkx AH, Tanck MW, Kastelein JJ, et al. Haplotype analysis of the CETP gene: not TaqIB, but the closely linked -629C->A polymorphism and a novel promoter variant are independently associated with CETP concentration. *Hum Mol Genet* 2003; 12:111-23.
187. Zhang K, Calabrese P, Nordborg M, Sun F. Haplotype block structure and its applications to association studies: power and study designs. *Am J Hum Genet* 2002; 71:1386-94.
188. Stephens JC, Schneider JA, Tanguay DA, et al. Haplotype variation and linkage disequilibrium in 313 human genes. *Science* 2001; 293:489-93.
189. Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 2002; 296:2225-9.
190. Patil N, Bero AJ, Hinds DA, et al. Blocks of limited haplotype diversity revealed by high-resolution scanning of human chromosome 21. *Science* 2001; 294:1719-23.
191. Goddard KA, Hopkins PJ, Hall JM, Witte JS. Linkage disequilibrium and allele-frequency distributions for 114 single-nucleotide polymorphisms in five populations. *Am J Hum Genet* 2000; 66:216-34.
192. Ardlie KG, Kruglyak L, Seielstad M. Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. *Nat Rev Genet* 2002; 3:299-309.
193. Wang N, Akey JM, Zhang K, Chakraborty R, Jin L. Distribution of recombination crossovers and the origin of haplotype blocks: the interplay of population history, recombination, and mutation. *Am J Hum Genet* 2002; 71:1227-34.
194. Daly MJ, Rioux JD, Schaffner SF, Hudson TJ, Lander ES. High-resolution haplotype structure in the human genome. *Nat Genet* 2001; 29:229-32.
195. Dawson E, Abecasis GR, Bumpstead S, et al. A first-generation linkage disequilibrium map of human chromosome 22. *Nature* 2002; 418:544-8.
196. Johnson GC, Esposito L, Barratt BJ, et al. Haplotype tagging for the identification of common disease genes. *Nat Genet* 2001; 29:233-7.
197. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001; 409:928-33.
198. Couzin J. Genomics. New mapping project splits the community. *Science* 2002; 296:1391-1393.
199. Cardon LR, Abecasis GR. Using haplotype blocks to map human complex trait loci. *Trends Genet* 2003; 19:135-40.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Ivar Roots, Direktor des Instituts für Klinische Pharmakologie der Charité, der mich durch Großzügigkeit, Enthusiasmus, visionäres Denken und seine wissenschaftliche Tiefgründigkeit tief beeindruckt und meinen eigenen wissenschaftlichen Weg prägend begleitet hat.

Die vorliegenden Arbeiten sind Ergebnis nationaler und internationaler Kooperationen. Besonders bedanken möchte ich mich für die hervorragende Zusammenarbeit mit der Medizinischen Klinik für Kardiologie, Angiologie und Pneumologie der Charité, bei Herrn Prof. Dr. Gert Baumann, Herrn Prof. Dr. Karl Stangl, Frau PD Dr. Verena Stangl und Herrn Dr. Michael Laule.

Besonders anregend war die Kooperation mit Prof. Dr. José A López, Departments of Medicine and Molecular and Human Genetics, Baylor College of Medicine and Veterans Affairs, Houston, TX.

Ich danke meinen Kolleginnen und Kollegen am Institut für Klinische Pharmakologie für ihre Unterstützung. Für die vorliegenden Arbeiten gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. Michael Mrozikiewicz und Herrn Dr. Uwe Malzahn.

Meinen ehemaligen Kollegen, Herrn Prof. Dr. Jürgen Brockmöller und Herrn Prof. Dr. Ingolf Cascorbi danke ich für die vielen anregenden Diskussionen.

Meiner Frau, Dr. Sigrid Meisel, danke ich für ihre liebevolle Unterstützung, Verständnis und Geduld für meinen beruflichen Weg.

Die vorliegenden Arbeiten wären ohne die großzügige Förderung durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung „Leitprojektverbund Pharmakogenetische Diagnostik“ (FKZ EC 01 GG 9845/5), „Berliner Centrum für Genombasierte Bioinformatik“ (FKZ 031U209B) und die DFG „Graduiertenkolleg Molekularbiologische Grundlagen der Therapie“ nicht möglich gewesen.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- dem Bewerber die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den 06.06.2003

Dr. med. Christian Meisel