

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

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

ABO locus O^1 Allel und das Risiko für einen Myokardinfarkt

Elmar Amir Fakhoury

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

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. N. C. W. von Beckerath
2. Univ-Prof. Dr. H. Deppe

Die Dissertation wurde am 11.11.2009 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 22.09.2010
angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	4
1. EINLEITUNG	5
1.1 Pathogenese der koronaren Herzerkrankung	5
1.2 MI und arterielle Thrombose (Rolle des vWF)	7
1.3 Genpolymorphismus	11
1.4 Das ABO-Blutgruppen-System und dessen klinische Bedeutung	12
1.5 ABO Phänotyp/Genotyp und MI-Risiko	15
1.6 ABO Phäno und Genotyp und vWF Plasmaspiegel	17
1.7 Zielsetzung	18
2. PATIENTEN UND METHODEN	19
2.1 Patientenkollektiv	19
2.2 Genotypisierung und molekularbiologische Untersuchungsmethoden	20
2.2.1 Genotypisierung	23
2.2.2 Restriktionsenzymanalyse	24
2.2.3 TaqMan Verfahren	25
2.3 Die Bestimmung der vWF:Ag Blutplasma Konzentration	29
2.4 Statistische Auswertung	30
3. ERGEBNISSE	30
3.1. Patientencharakteristika	30
3.1.1 Einfluss des ABO Genotyps auf den vWF Plasmaspiegel bei Kontrollgruppe II	32
3.1.2 Dokumentation	32
3.2 Genotypisierung	33
3.2.1 Erzeugung homozygoter Referenzproben	33
3.2.2 Genotypisierung der Patienten	33
3.3 Risiko-Korrelation bei MI-Patienten	37

4. DISKUSSION	39
5. ABKÜRZUNGEN	46
6. LITERATURVERZEICHNIS	47

ZUSAMMENFASSUNG

Es gibt Hinweise dafür, dass ein Zusammenhang zwischen dem Phänotyp des ABO-Blutgruppensystems und dem Risiko für einen Myokardinfarkt besteht. Ziel dieser Studie war es herauszufinden, ob das Allel O^1 des ABO-Systems Schutz gegenüber einem Myokardinfarkt bietet.

Hierzu wurden 793 konsekutive, angiographisch untersuchte Patienten mit akutem oder vorausgegangenem Myokardinfarkt (MI) in die Studie eingeschlossen. Als Kontrollgruppe dienten 340 angiographisch untersuchte Patienten ohne Erkrankung der Koronararterien oder Anzeichen eines Myokardinfarkts. Die Genotypisierung der Ortsallele (A^1, A^2, B, O^1, O^2) der Patienten und der Kontrollprobanden erfolgte mit Hilfe eines TaqMan-Assays (PCR Amplifikation gekoppelt mit 5'-Assay). Die Verteilung der O^1 Allele in der MI Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe war (Angaben in %): kein O^1 Allele (15,4/10,0), ein O^1 Allel (49,7/50,0) und zwei O^1 Allel (34,9/40,0) ($P=0,035$).

Bei O^1 -Allel-Trägern war das MI Risiko um 39 % (Odds Ratio 0,61 [95% Konfidenzintervall, 0,41-0,91]) reduziert. Ein multivariates Modell, das eine Kodominanz voraussetzt, zeigte, dass ein Anstieg der Anzahl von O^1 Allelen mit einer Abnahme des MI Risikos assoziiert ist. Zudem konnte in einer gesonderten Kontrollgruppe ($n=164$) gezeigt werden, dass der Plasmaspiegel des von Willebrand-Faktors mit der Anzahl der O^1 Allele ($P=0,00003$) in einer Beziehung steht.

Somit konnte eindeutig dokumentiert werden, dass die Träger von O^1 -Allelen ein geringeres Risiko tragen einen MI zu erleiden als Nicht-Träger, erwartungsgemäß bietet eine O^1 -Homozygotie den größten Schutz.

1. EINLEITUNG

1.1 PATHOGENESE DER KORONAREN HERZERKRANKUNG

Die koronare Herzerkrankung ist eine Erkrankung bei der es durch arteriosklerotische Verengungen an den Herzkranzgefäßen zu einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffverbrauch des Herzmuskels kommt. Diese Krankheit ist gegenwärtig die häufigste zum Tode führende Erkrankung in den Industrienationen. Beim Herzinfarkt oder Myokardinfarkt selbst handelt es sich dann um Absterben oder Gewebsuntergang von Teilen des Herzmuskels (Myokard) auf Grund von mangelnder Durchblutung, die in der Regel länger als 20 Minuten besteht. Leitsymptom des Myokardinfarktes ist ein plötzlich auftretender, mehr als 20 Minuten anhaltender und meist starker Schmerz im Brustbereich, der in die Schultern, Arme, Unterkiefer und den Oberbauch ausstrahlen kann. Er wird oft von Schweißausbrüchen, Übelkeit und evtl. Erbrechen begleitet. Allerdings treten bei etwa 25 % aller Herzinfarkte nur geringe oder keine Beschwerden auf. Im Gegensatz zum Angina-Pectoris-Anfall kommt es beim Myokardinfarkt immer zum kompletten Gewebsuntergang eines Teils des Herzmuskels, in den meisten Fällen durch einen thrombotischen Verschluss im Bereich einer der arteriosklerotisch veränderten Engstellen eines Herzkranzgefäßes. In der Akutphase eines Herzinfarktes treten häufig gefährliche Herzrhythmusstörungen auf.

Etwa jeder zweite Herzinfarkt endet tödlich. Erschwerend kommt hinzu, dass diese Ereignisse zumeist völlig überraschend auftreten ,ohne, dass die Patienten zuvor über Beschwerden geklagt haben. Auch kleinere Infarkte führen nicht selten über Kammerflimmern zum Sekundenherztod, etwa 30 % aller Todesfälle beim Herzinfarkt ereignen sich vor jeder Laienhilfe oder medizinischen Therapie (Hengstenberg et al, 2004).

Der pathophysiologisch bei einem Myokardinfarkt auftretende Koronarverschluss resultiert dabei nicht aus einer drastischen Veränderung des Stenosegrades der vorliegenden Arteriosklerose, sondern aus einer plötzlich einsetzenden Gerinnselbildung. Bricht die instabile Läsion auf, kann durch die Freisetzung der Plaqueinhaltsstoffe eine thrombotische Reaktion ausgelöst werden. Die Mehrzahl dieser Läsionen enthält dabei einen großen lipidreichen Kern, der von einer dünnen entzündeten Kappe bedeckt ist. Die Anfälligkeit der

Kappe erhöht sich mit abnehmender Dicke der Kappe und zunehmender Makrophageninfiltration (Scharr et al. Herz. 2003). An diesem pathogenen Geschehen scheinen verschiedene Entzündungsmediatoren wie die Zytokine TNF α , IL-1 β und IL-6 beteiligt zu sein (Bermudez et al.2002).

Wegen der oft asymptomatischen Entwicklung der Erkrankung und der hohen Letalität beim Erstereignis eines MIs spielt eine Verbesserung der primären Prävention eine bedeutsame Rolle. Zur Steigerung der Effektivität der Prävention sind deshalb eine möglichst genaue Kenntnis der Pathophysiologie und der Möglichkeit zur Identifizierung von Menschen mit einem erhöhten Risiko nötig (Nydegger et al.,2002).

In epidemiologischen Studien wurden zunächst die exogenen Risikofaktoren wie Rauchen, erhöhtes Körpergewicht, körperliche Inaktivität, Bluthochdruck, erhöhter Cholesterinspiegel, Diabetes sowie das Geschlecht (Männer zwischen 45 und 50 erkranken wesentlich häufiger als Frauen) und natürlich auch eine familiäre Prädisposition ermittelt (Nydegger et al., 2002). Allerdings lassen sich bei weitem nicht alle individuellen Risiken durch exogene Faktoren erklären, insofern fokussiert sich die aktuelle Forschung auf die Bestimmung molekulargenetischer Risikofaktoren, um hier eventuell einen weiteren Ansatz für präventive Maßnahmen zu erhalten. Zurzeit geht man davon aus, dass bei ca. 30 % der Erkrankten eine familiäre Belastung vorliegt bzw. 50 % genetische Beeinflussung bei dem Krankheitsgeschehen zugrunde liegt. Allerdings scheint der Einfluss der genetischen Faktoren mit zunehmendem Alter abzunehmen und im Gegenzug dazu der Einfluss der exogenen Faktoren zuzunehmen (Hengstenberg et al. , 2002; Gorchakova O., Dissertation der Technischen Universität München). So scheint, z.B. gerade bei jüngeren MI-Patienten der Polymorphismus G20210A des Prothrombins mit dem Krankheitsgeschehen assoziiert zu sein, während er bei älteren Patienten nicht mehr so signifikant beteiligt ist (Flegel W.A., Habilitationsschrift, 1997).

Ermöglicht wurden die Analysen der molekulargenetischen Faktoren zu meist erst durch Anwendung der PCR-Methodik, die detaillierte Untersuchungen am Genom ermöglicht.

1.2 MI UND ARTERIELLE THROMBOSE (ROLLE DES VWF)

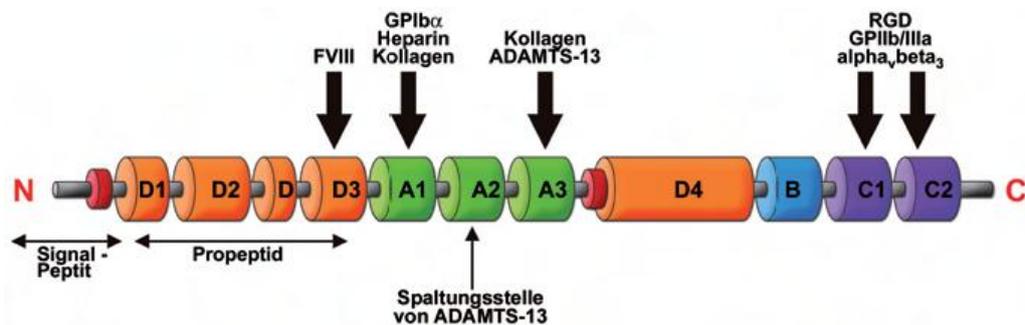
Der Myokardinfarkt beruht in den meisten Fällen auf dem thrombotischen Verschluss einer Koronararterie durch einen plättchenreichen Thrombus nach vorheriger Erosion oder Ruptur einer arteriosklerotischen Plaque. Durch histologische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die zugrunde liegende Plaque 1) oft nicht zu einer höhergradigen Koronararterienstenose führt, 2) einen weichen, lipidreichen Kern aufweist, der von einer fibrösen Kappe bedeckt ist, und 3) von Entzündungszellen infiltriert ist. Durch Erosion oder Ruptur der Plaque kommt es zu einem direkten Kontakt von Blutbestandteilen mit dem thrombogenen Kern der Plaque und in der Folge zur Bildung eines plättchenreichen Thrombus, der zum Verschluss des Gefäßes führt. Die Plaqueruptur ist ein komplexer pathologischer Prozess, der eine zentrale pathophysiologische Rolle im Rahmen der akuten Koronarsynndrome spielt. Nach Plaqueruptur kommt es im Rahmen einer komplexen Interaktion zwischen Lipidkern, glatten Muskelzellen, Makrophagen und kollagenem Bindegewebe zur lokalen Thrombusbildung. Aufgrund einer Interaktion zwischen „tissue factor“ und dem Blutgerinnungsfaktor VIIa kommt es zur Bildung von Thrombin und schließlich zur Ablagerung von Fibrin.

Durch ständig parallel ablaufende Mechanismen der Thrombose und der endogenen Fibrinolyse können Gefäßläsionen prinzipiell nach Abheilung der Plaquesfissur ohne Auftreten eines akuten, klinischen Ereignisses ausheilen. Über die Aktivierung der plasmatischen Gerinnung hinaus kommt es im Rahmen der Plaqueruptur zur Plättchenaggregation und zur Freisetzung von Plättchengranula, die ihrerseits wiederum eine weitere Plättchenaggregation, eine Vasokonstriktion und die Ausbildung von Thromben begünstigen.

Zusätzlich zur Aktivierung der plasmatischen Gerinnung kommt es im Rahmen der Plaqueruptur zur Plättchenaggregation und zur Freisetzung von Plättchengranula, die ihrerseits wiederum eine weitere Plättchenaggregation, eine Vasokonstriktion und die Ausbildung von Thromben begünstigen. Zusätzlich zu den beschriebenen lokalen Mechanismen kommen systemische Effekte und Prozesse der Inflammation als Kofaktoren für die Beeinflussung der Blutgerinnung in Betracht, und dürften zumindest teilweise eine Rolle bei der Ausbildung von Thromben im Rahmen der akuten Koronarsynndrome spielen. Zytokine, chronische Infektionen, Akute-Phase-Proteine und Katecholamine stellen einen

systemischen Stimulus für die gesteigerte Bildung von „tissue factor“ und für einen Zustand der Hyperkoagulabilität und der gesteigerten Plättchenaggregation dar.

Neben der Thrombozytenaggregation spielen auch plasmatische Gerinnungsfaktoren eine wichtige Rolle, u.a. auch, weil der lipidreiche Kern der Plaque reich an Tissue Factor ist. Belegend für die zentrale Rolle der Thrombozyten bei der Genese des Myokardinfarktes ist auch die Wirksamkeit von antithrombozytären Substanzen beim Versuch, diesen zu mindern.



Der von Willebrand-Faktor ist das längste und größte Protein in unserer Blutbahn. Erik Adolf von Willebrand war ein finnischer Arzt, der 1926 eine neue Form einer Blutungsneigung beschrieb, die er als „hereditäre Pseudo-Hämophilie“ bezeichnete. Ungefähr 20 Jahre später gelang es, den fehlenden Blutgerinnungsfaktor dieser Patienten zu identifizieren, der von Willebrand-Faktor genannt wurde. Der vWF wird nur von Endothelzellen (Zellen der inneren Gefäßwand) und von Megakaryozyten (Mutterzellen der Thrombozyten) synthetisiert und besitzt als Monomer ein Molekulargewicht von 260 kDa. In Thrombozyten wird der vWF gespeichert und nach der Thrombozytenaktivierung freigesetzt. In Endothelzellen findet man den vWF als Multimer von unterschiedlicher Größe (molekulare Masse bis zu 20 MDa) in langgestreckten Vesikeln gespeichert (Größe etwa $0,1 \times 2 \mu\text{m}$), den Weibel-Palade-Körperchen. Damit findet man VWF in Endothelzellen, Thrombozyten und, aufgrund endothelialer Sekretion, in der subendothelialen Matrix, sowie als lösliches Protein im Blutplasma (Konzentration ca. $10 \mu\text{g/ml}$).

Die wichtigste Funktion des vWF ist die Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten. Dabei ist nur der vWF in der Lage, Thrombozyten unter hohen Scherraten, wie sie im arteriellen Gefäßsystem vorliegen, zu binden. Zusätzlich bindet der im Blut gelöste vWF den Gerinnungsfaktor VIII und verlängert damit dessen Halbwertszeit um das Vierfache. Damit kommt es bei einem Mangel des vWF neben einer gesteigerten Blutungsneigung, auch zu einem Mangel an Faktor VIII. Diese Erkrankung wird von Willebrand-Jürgens-Syndrom

genannt und gehört zu den häufigsten Erberkrankungen, die wir kennen. Allerdings sind viele Patienten nahezu asymptomatisch, sodass die Erkrankung nicht immer diagnostiziert wird.

In den letzten Jahren hat die Forschung um den vWF einen neuen Aufschwung erhalten. Es konnte gezeigt werden, dass der vWF nach seiner Freisetzung aus den Gefäßzellen und unter Scherfluss bis zu 1 mm lange, fadenförmige Strukturen bildet. Diese haften an der Endothelzelloberfläche und können Thrombozyten binden (Abb). Dabei stellte sich heraus, dass die Struktur die Funktion bestimmt: „Gestreckt“ als Faden bindet das Protein Thrombozyten besser. Andererseits kann der vWF mit zunehmender Proteinelänge auch besser abgebaut werden. Das abbauende Enzym wurde 2001 identifiziert. Ein Mangel an diesem Enzym führt zum Auftreten riesiger vWF-Moleküle im Blut. Diese können ungehindert Thrombozyten binden und so zu einer unkontrollierten Gerinnung führen. Die Erkrankung wird als thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TTP) bezeichnet. Der vWF vermittelt die Plättchenadhäsion. Es wird nicht nur die Bindung an Kollagen gesteigert, sondern auch die Bindung von Thrombozyten an den gestreckten vWF-Fäden. Beim Strecken des Proteins werden die im Knäuel zunächst „vergraben“ Bindungsstellen der Umgebung exponiert, was die Bindungswahrscheinlichkeit mit der Gefäßwand enorm erhöht. Der vWF wird durch die mechanistischen Kräfte, die eine Verletzung der Gefäßwand hervorrufen, aktiviert und so auch die Bindung von Thrombozyten ermöglicht. Ein selbst organisiertes Wundheilungssystem.

Eine Aktivierung des Proteins könnte auch im intakten, nicht verletzten Gefäß auftreten. Bei entsprechend hohen Scherraten würde der im Blut schwimmende vWF in eine gestreckte Form übergehen und wäre somit „bindungsbereit“. Je höher die Scherrate ist, desto besser und effizienter wurde die Streckung der vWF-Moleküle erfolgen. In einem stenosierten Gefäß, z. B. im Rahmen einer Arteriosklerose, werden Scherraten bis zu 20.000 s⁻¹ angenommen. Hier sind optimale Voraussetzungen für eine Aktivierung des vWF gegeben. In seinem gestreckten Zustand kann er an der Gefäßwand leichter anhaften und mittels Thrombozytenbindung die Arteriosklerose weiter fördern oder sogar eine Thrombose generieren. Glücklicherweise kann auch das vWF-spaltende Enzym ADAMTS13 den gestreckten vWF-Faden besser degradieren als das globuläre, nicht gestreckte Protein. Damit hat die Natur in einer einzigartigen Weise dafür gesorgt, dass eine lebensbedrohliche Situation unter strenger Kontrolle steht.

Auch bei der Entzündung oder Tumorausbreitung kann die oben beschriebene Aktivierung des vWF eine Rolle spielen. In beiden Fällen müssen Zellen (Leukozyten oder Tumorzellen) an der Gefäßwand unter Scherfluss haften, um das Gefäßsystem verlassen zu können.

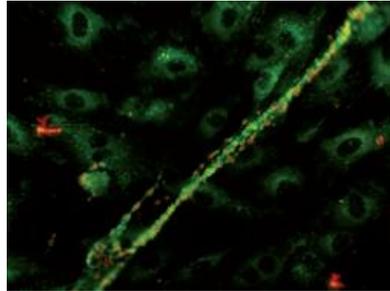


Abb. 2: Nach Stimulation der Endothelzellen (grüne Zellen im Hintergrund) wird ein ca. 400 μm langer vWF-Faden (grün, von links unten nach rechts oben) freigesetzt und an der luminalen Endothelzelloberfläche gebunden. Dieser vWF-Faden bindet Thrombozyten (rote, runde Zellen) unter Scherfluss.

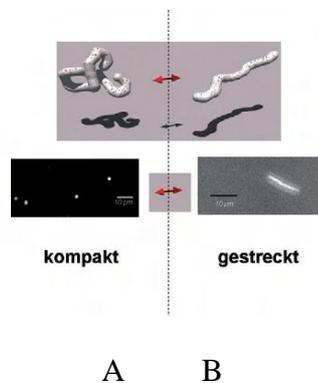


Abb. 4: Hydrodynamische Aktivierung des vWF. A, Unterhalb einer kritischen Scherrate liegt der vWF in seiner geknäuelten Form vor. Erst oberhalb $\approx 1.000 \text{ s}^{-1}$ kommt es zur Streckung. B, in diesem Zustand ist die Tendenz für vWF an ein Substrat zu binden um ein Vielfaches erhöht. Es ist deutlich zu erkennen, dass die mittlere Ausdehnung (Länge) sowie die Tendenz zur Adhäsion korreliert ansteigen.

1.3 GENPOLYMORPHISMUS

Bei Genpolymorphismen handelt es sich um häufig vorkommende Varianten der DNA. Die am häufigsten verwendete Definition beinhaltet, dass ein Gen dann polymorph genannt wird, wenn die Frequenz des/der selteneren Allels/Allele $> 0,01$ ist. Durch die Entdeckung der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction oder PCR) 1985 und der auf ihr aufbauenden Genotypisierungsverfahren sind Polymorphismen in den Vordergrund des Interesses gerückt, die wesentlich häufiger im menschlichen Genom vorkommen (etwa einmal pro 1000 Basen) und die auf dem Austausch oder der Deletion nur einer Base beruhen. Diese Polymorphismen werden Einzelbasenpolymorphismen (Single Nucleotid Polymorphisms) oder kurz SNPs genannt, und sind immer diallel. Da bei der Entstehung von komplexen Erkrankungen eine Vielzahl von Genen – und deren Interaktion untereinander – eine Rolle spielen, und dementsprechend der Einfluss einer einzelnen genetischen Variante relativ gering ist, ist es erforderlich, große Gruppen von Patienten (und Kontrollpersonen) zu genotypisieren, um diese Art der Forschung erfolgreich durchzuführen. Es gibt viele Beispiele dafür, dass SNPs einen Einfluss auf Expression oder Funktion des Genproduktes haben können und dadurch direkt zur Pathophysiologie des untersuchten Phänotyps beitragen können. Die entsprechenden molekularen Mechanismen sind vielfältig und beinhalten die differentielle Bindung von Transkriptionsfaktoren im Bereich des Promotors, die Aktivierung von kryptischen Splice Stellen, die Beeinflussung der Bindungseigenschaften eines Rezeptors durch Austausch einer Aminosäure und Veränderungen in der Sekundärstruktur der mRNA.

Arterielle Thrombosen und MI sind komplexe Erkrankungen, die auf einem lebenslangen Zusammenspiel zwischen genetischen und umweltbedingten Faktoren beruhen. Zur Bestimmung eines individuellen Risikos werden traditionelle Bewertungssysteme (US Framingham SCORE oder das European SCORE), die auf klinischen und biochemischen Risikofaktoren beruhen, herangezogen. Genotypische Informationen von Interesse beinhalten Polymorphismen, die von SNP, Insertionen oder Deletionen, einer variablen Anzahl von Wiederholungen von zwei oder mehr Nukleotiden (VNTRs) bis zu Haplotypen reichen (Fitzgerald AP et al.). Letzteres beinhaltet die Vorstellung der allelen Variationen, das auf der Suche nach mehreren Orten von Genvariationen innerhalb der DNA Sequenz eines Genes (oder des ganzen Chromosoms) eines vorgegeben Individuums beruht. (Wilson P. et al)

1.4 DAS ABO-BLUTGRUPPEN-SYSTEM UND DESSEN KLINISCHE BEDEUTUNG

Eine Blutgruppe ist Ausdruck der individuellen Zusammensetzung der als Antigene wirksamen Glykolipide und Proteine, die sich auf der Erythrozytenoberfläche höherer Lebewesen, speziell des Menschen, befinden. Beim Menschen gibt es eine Vielzahl verschiedener Blutgruppensysteme, davon sind 29 bei der ISBT (Internationale Gesellschaft für Bluttransfusion) anerkannt und beschrieben. Die wichtigsten Blutgruppensysteme sind das ABO-System und das Rhesussystem. Mittlerweile sind fast alle Gene für die klinisch relevanten Blutgruppenmerkmale identifiziert worden.

1901 hat der Wiener Arzt Karl Landsteiner anhand von Agglutinationsversuchen die ABO-Blutgruppenmerkmale entdeckt und das ABO-System mit den vier verschiedenen Hauptgruppen: A, B, AB und 0 etabliert. Bis heute ist das ABO-System das wichtigste Blutgruppenmerkmal in der Medizin; Die Auswahl verträglicher Blutkomponenten für die Hämotherapie und die Blutgruppenbestimmungen in der Transplantationsmedizin beruhen nach wie vor auf dem serologischen Blutgruppennachweis.

Die Häufigkeiten der Blutgruppen sind regional unterschiedlich. In bestimmten Gebieten Asiens kommt Blutgruppe B am häufigsten vor, in Europa Blutgruppe A (siehe z.B. Tabelle 1). Über die Häufigkeiten lassen sich Wanderungen der Bevölkerung in der Vergangenheit rekonstruieren. In der Allelefrequenz ist „0“ am häufigsten auftretend, als rezessives Merkmal jedoch nicht überall als häufigste Blutgruppe präsent. Dies deutet auf einen Selektionsvorteil hin.

Tabelle 1 Verteilung der AB0 Blutgruppen in Deutschland, Schweiz und Österreich

Blutgruppen- merkmal	Häufigkeit		
	Deutschland	Österreich	Schweiz
A	43%	41%	47%
0	41%	37%	41%
B	11%	15%	8%
AB	5%	7%	4%

Von außerordentlich seltenen Ausnahmen abgesehen, tragen die Erythrozyten aller Menschen das H-Antigen, welches als ein Zwischenprodukt von membranständigen Zuckerketten, die mit den entsprechenden A- bzw. B-Antigenen enden können. Die Antikörper gegen Faktoren im AB0-System werden beim Menschen während des ersten Lebensjahres ausgebildet. Die Faktoren A und B werden dabei kodominant zum Faktor 0 vererbt.

Die endständigen Zuckerreste der Kohlenhydratketten von den Oberflächen-Glykoproteinen und -Glykolipiden bestimmen dabei, wie bereits erwähnt die individuellen Merkmale im AB0-Blutgruppensystem. Spezifische Glykosyltransferasen katalysieren entsprechende Modifikationen. Die antigenen Eigenschaften im AB0-System werden deshalb nicht direkt vom genetischen Code, der die Epitope tragenden Proteine determiniert, sondern durch die genetisch festgelegte Präsenz und Aktivität der Glykosyltransferasen bestimmt. Die Übertragung des Substrates N-Acetylgalactosamin durch die α 1-3 N-Acetylgalactosaminyltransferase (kurz: A-Transferase) und von Galactose durch die α 1-3 Galactosyltransferase (kurz: B-Transferase) führt dabei zu den Blutgruppenmerkmalen A und B. Individuen, die weder über die A noch über die B-Transferase verfügen, gehören bis auf äußerst seltene Ausnahmen zur Blutgruppe 0. Personen, die nur eine der beiden Transferasen bilden, zeigen die Blutgruppe A beziehungsweise B. Menschen, die beide Transferasen

aufweisen, besitzen die Blutgruppe AB. Sowohl die A- als auch die B-Transferase werden vom Gen am ABO Locus kodiert.

Untersuchungen über einen Zusammenhang von verschiedenen Erkrankungen in Verbindung zu den einzelnen Blutgruppen des ABO-Systems wurden bereits seit den 60er Jahren von verschiedenen Autoren untersucht (Jesch U. 2005). Auch eine Assoziation zwischen dem Risiko für eine koronare Herzerkrankung und einem Myokardinfarkt mit dem ABO-Blutgruppensystem ist seit längerem Gegenstand der Forschung (Akhund et al., 2002). Dabei wurden in jüngster Zeit zunehmend die Polymorphismen in den für die ABO-Allele kodierenden Regionen als mögliche Einflussfaktoren auf die Entwicklung oder den Verlauf kardiovaskulärer Erkrankungen untersucht.

Definitionsgemäß handelt es sich bei einem Allelen um die unterschiedlichen Formen eines Gens, die an seinem Genlocus auftreten können. Die Allele für die Blutgruppeneigenschaften des ABO-Systems sind verschiedene Zustandsformen des Blutgruppen-Gens am ABO Locus. Bisher wurden etwa 100 ABO Locus Allele identifiziert. Jedoch scheinen das noch nicht alle ABO-Allele zu sein. (World Health Organisation Study Group, 2007)

Unter Genpolymorphismus versteht man das häufige Vorkommen von zwei oder mehr unterschiedlichen Allelen der genomischen DNA an einem Genort; häufig bedeutet hierbei, dass das häufigste Allel mit einer Frequenz $< 0,99$ in der untersuchten Population vorkommt und entsprechend die seltenen Allele mit einer Frequenz $> 0,01$. Bei den meisten der untersuchten Polymorphismen handelt es sich um Einzelbasenpolymorphismen (SNPs) oder um Insertions/Deletions-Polymorphismen, die im Abstand von durchschnittlich etwa 1000 Basen im menschlichen Genom vorkommen. Ein SNP ist gekennzeichnet durch den Austausch einer Base in der DNA-Sequenz. Diese können sowohl zu einer Änderung des jeweiligen Genproduktes führen oder aber auch ohne funktionelle Bedeutung sein. Ein Polymorphismus in einem Intron hat in der Regel keinen Einfluss auf das Genprodukt. Ebenso können die unterschiedlichen Allele eines Polymorphismus im Exon ein identisches Genprodukt ergeben. Heute geht man sogar davon aus, dass die Mehrzahl aller Genpolymorphismen keine klinische Bedeutung haben (Hoppmann Dissertation 2004)

1.5 ABO PHÄNOTYP/GENOTYP UND MI-RISIKO

Obwohl seit einiger Zeit ein Zusammenhang zwischen dem ABO Blutgruppensystem und dem MI-Risiko angenommen wurde, blieben die Einzelheiten dennoch umstritten. Bereits 1954 wurde ein Defizit der Blutgruppe O bei einer Gruppe von 81 jungen, männlichen Überlebenden eines MI erkannt. Diesem ersten Report folgten eine Reihe weiterer Fallkontrollstudien. So wurde in einer südafrikanischen ein signifikanter Anstieg der Verteilung der Blutgruppen A und B bei gleichzeitigem Mangel an Blutgruppe O unter einer Patientengruppe mit vorangegangenem MI im Vergleich zu einer Kontrollgruppe nachgewiesen. Ebenso wurde bei einer jüngeren Studie ein höheres MI-Risiko bei den unter 50 jährigen Frauen belegt. Auch wurden Studien veröffentlicht, die einen Mangel an Blutgruppe O bei den Überlebenden eines MI widerlegen. In 3 Prospektivstudien wurde eine Abhängigkeit zwischen dem Phänotyp des ABO Blutgruppensystems und dem MI erforscht. Medalie et al. konstatierten bei einer Gruppe von 10000 israelischen Männern ein vermehrtes Auftreten eines MI bei der Sparte mit der Blutgruppe A, B und AB. Dennoch erreichten diese Ergebnisse keine Signifikanz. In der britischen „Regional Heart Study“ unter 7662 Männern im Alter zwischen 40-59 konnte eine Tendenz hin zu mehr Ereignissen bei der Fraktion mit Blutgruppe A im Vergleich zu der Fraktion mit Blutgruppe O aufgezeigt werden. Letztendlich zeigte sich in der Northwick Park Heart Studie ein signifikant erhöhtes MI-Risiko für Blutgruppe AB verglichen mit den Gruppen O, A oder B. Die ersten Studien wurden von Mourant et al. nochmals durchgeführt. Das gesteigerte MI-Risiko bei den nicht O Blutgruppen wurde auf die erhöhten Plasmaspiegel des von Willebrand Faktors (vWF) und des Gerinnungsfaktors VIII (F VIII) zurückgeführt.

Obwohl bewährte Risikofaktoren für koronare Herzerkrankungen auf ein stark erhöhtes MI Risiko hinweisen , ist es dennoch so, dass nicht alle von KHE betroffenen Patienten eine MI erleiden. Es ist offensichtlich, dass zusätzliche Faktoren die Umwandlung einer stabilen arteriosklerotischen Plaque in eine instabile mit Ruptur und Thrombose begünstigen. Eine Vielzahl der genetischen Zusammenhangsstudien in Bezug auf den MI haben sich auf ein einziges Gen fokussiert. Folglich wurde die multifaktorielle Pathophysiologie beruhend sowohl auf dem restlichen Genom als auch auf den äusseren Umweltfaktoren ausser Acht gelassen.

Trotzdem haben jüngere Entwicklungen in der HOGT (high output genomic technology) ermöglicht mehrfache Genpolymorphismen zu untersuchen.

Die GeneQuest Studie analysierte 72 SNP innerhalb von 62 Genen bei 352 Fällen mit frühzeitigem familiären MI und bei einer Population von 418 weissen Amerikanern zur Kontrolle. Hierbei stellte man einen möglichen Zusammenhang mit 3 Varianten aus der Thrombospondin 5 Familie fest.

Zur Identifizierung prognostisch wichtiger Genvarianten bei einem Herzinfarkt untersuchten Yamada et al. beispielsweise 112 Polymorphismen in 71 Genen von betroffenen Patienten und verglichen die Genotyp-Frequenzen mit denen einer Kontrollgruppe ohne Herzinfarkt Die Analysen identifizierten eine statistisch signifikant unterschiedlich häufige Mutation bei Männern (einen C-zu-T-Polymorphismus an Nukleotidposition 1019 des Connexin-Gens) und zwei bei Frauen (die Insertion eines Guanins an Position -668 [-668 4G/5G] des Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1-Gens und die Insertion eines Adenins an Position -1171 [-1171 5A/6A] des Stromolysin-Gens). Diese Einzelnukleotid-Mutationen zeigten in dem untersuchten Kollektiv einen Einfluss auf das Auftreten von Herzinfarkten. Solche Studien unterstreichen den Wert der Genotypisierung. Fernziel ist es, Patienten entsprechend ihrem Risikoprofil mit einer individuellen Therapie zu behandeln. Die Pharmakogenetik nützt dieses Wissen, da es sich gezeigt hat, dass genetisch determinierte Proteinvarianten einen großen Einfluss auf die Wirkung von Medikamenten haben .

In eine Prospektivstudie aus dem Jahre 2004 (Duk-Hee Lee et.al.) unter 28000 Finnen im Alter zwischen 25 und 75 Jahren wurde ein Zusammenhang zwischen Serum Gamma-Glutamyltransferase (GGT) und dem nichttödlichen sowie tödlichem MI untersucht. Es wurde festgestellt, dass eine Bestimmung des GGT bei Diabetes Typ-2 Patienten hilfreich sein kann um das Risiko für eine schwere koronare Herzerkrankung einzuschätzen.

In der 2002 von Andresdottir et al. durchgeführten Studie wurde der Zusammenhang zwischen dem Risiko für ein Individuum eine Herzerkrankung im Laufe seines Lebens zu entwickeln und einem bereits erfolgten MI eines Verwandten ersten Grades untersucht. Es handelte sich um eine prospektive Kohortenstudie, welche unter 9328 Männern und 10062 Frauen im Alter zwischen 33 und 81 Jahren durchgeführt wurde. Der Untersuchungszeitraum reichte von 1967 bis 1996. Es wurde festgestellt, dass eine familiäre Vorgeschichte eines MI das Risiko für das Entwickeln einer koronaren Herzerkrankung sowohl bei Frauen als auch

bei Männern völlig unabhängig von klassischen Risikofaktoren steigert. Letztendlich sind ca. 15 Prozent der MI auf familiäre Faktoren zurückzuführen.

1.6 ABO PHÄNO UND GENOTYP UND VWF PLASMASPIEGEL

Bekannter Weise steht der Phänotyp des ABO-Blutgruppensystems im Zusammenhang mit den Plasmaspiegeln des vWF und des F VIII. Geringere vWF und F VIII Plasmaspiegel wurden bei Trägern der Gruppe O verglichen mit den anderen Blutgruppenträgern gefunden. Jüngst berichteten zwei Forschungsteams über eine Verbindung des ABO Genotyps und dem vWF Plasmaspiegel. In dem Report von Shima et al. konnte gezeigt werden, dass die vWF Plasmakonzentration bei den Individuen ohne O Allele am höchsten, bei den Trägern eines O1 Allels dazwischen und bei der Gruppe mit 2 O Allelen am niedrigsten ist. Diese Ergebnisse wurden von Souto et al. bestätigt, wobei sie zusätzlich einen direkten funktionellen Einfluss des ABO Genortes auf den vWF Plasmaspiegel nachweisen konnten. Der vWF ist entscheidend sowohl für den Beginn der Hämostase als auch bei der Thrombose im arteriellen Gefäßsystem. Auch wurde ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines thrombotischen Ereignisses und dem vWF Plasmaspiegel festgestellt.

In der Studie von Kausik K. Ray et al. aus dem Jahre 2004 wurden die für die Erhöhung des vWF-Spiegels bei einem ST-Hebungsinfarkt (STEMI) verantwortlichen Faktoren untersucht. Es wurde festgestellt, dass Enoxaparin unabhängig für eine Reduzierung des vWF-Spiegels und damit einhergehend für eine Reduzierung eines MI-Risikos bzw. eines tödlichen MI sorgt.

1.7 ZIELSETZUNG

Es bestand die Annahme, dass ein Zusammenhang zwischen dem Phänotyp des ABO-Blutgruppensystems und dem Myokardinfarkt besteht. Ziel dieser Studie war es herauszufinden, ob das Allel O1 des ABO-Systems Schutz gegenüber einem Myokardinfarkt bietet. Mit Hilfe des TaqMan-Verfahrens sollte eine mögliche genetische Assoziation zwischen den funktionell bedeutsamen Polymorphismen des ABO Locus und dem Risiko eines MI untersucht werden.

In verschiedenen Studien konnte auf einen Zusammenhang zwischen der ABO Blutgruppe und dem Myokardinfarkt-Risiko hingewiesen werden. Jedoch wurden diese Fall-Kontroll-Studien mit relativ kleinen Populationen durchgeführt.

Da mittlerweile auch gut dokumentiert wurde, dass die ABO-Phänotypen und der Plasma vWF-Spiegel sowie der Plasma Faktor-VIII-Spiegel in Relation zueinander stehen (geringste Werte bei Blutgruppe 0 verglichen mit den anderen Blutgruppen) und da in klinischen Untersuchungen die Hypothese untersucht wurde, dass ein erhöhter vWF- sowie Faktor-VIII Wert von den Phänotypen A, B und AB mit einem gesteigerten MI-Risiko assoziiert ist, sollten auch in der hier vorliegenden Studie die vWF-Werte ermittelt und ausgewertet werden.

2. PATIENTEN UND METHODEN

2.1 PATIENTENKOLLEKTIV

Das Patientenkollektiv bestand aus fortlaufend angiographisch untersuchten Patienten mit einem akuten oder vorausgegangenem Myokardinfarkt (MI). Als Kontrollgruppe dienten ebenfalls angiographisch untersuchte Patienten ohne Erkrankung der Koronararterien oder Anzeichen eines Myokardinfarkts. Ein akuter MI wurde definiert als anhaltende Thoraxschmerzen (> 30 min), verbunden mit einem Anstieg der Herzenzyme auf mindestens das Zweifache des oberen Normwertes und einer ST-Hebung (> 0,1 mV) in 2 oder mehr benachbarten 12-Kanal EKG Ableitungen. Die Diagnose eines durchgemachten MIs wurde durch die charakteristischen Veränderungen im 12-Kanal EKG festgestellt. Individuen wurden als krankheitsfrei und somit als geeignet für die Kontrollgruppe betrachtet, wenn ihre Koronararterien angiographisch unauffällig oder die Stenose weniger als 10 % betrug und sie keinerlei Symptome oder Zeichen für einen alten oder akuten MI zeigten.

Die Patienten wurden als Diabetiker eingestuft, wenn sie insulinpflichtig waren oder orale Antidiabetika einnahmen. Entsprechend den WHO Kriterien wurde diese Diagnose auch für diätisch eingestellte Diabetiker vergeben bei positivem Glukosetoleranztest und/oder wenn während des Klinikaufenthaltes bei zwei stressfreien Blutentnahmen (nüchtern) erhöhte Blutzuckerwerte (>126 mg/dl) festgestellt worden waren (Diabetes mellitus.WHO Tech Rep Ser, 1985).

Die Personen, die während der letzten 6 Monate regelmäßig rauchten, galten als Raucher. Eine arterielle Hypertonie wurde bei systolischen Blutdruckwerten >140 mm Hg und/oder diastolischen Blutdruckwerten >90 mm Hg bei mindestens zwei Messungen diagnostiziert (Society of Hypertension Guidelines for Management of Hypertension. J Hypertens 1999). Eine Hypercholesterinämie lag bei einer Serumcholesterinkonzentration (nüchtern) >240 mg/dl vor.

Es wurde eine weitere Kontrollgruppe benötigt, weil das Blutplasma der 340 Patienten der ersten Kontrollgruppe zur Bestimmung des ABO Genotyps nicht vorhanden war. Es handelte sich um eine konsekutive Gruppe von Patienten (n = 164), bei denen eine arterielle Blutprobe

einer früheren Koronarangiographie im deutschen Herzzentrum aufgehoben worden war. Mit Ausnahme von Alter (Durchschnittsalter 57 ± 12) und Geschlecht (Anteil der Frauen 44,5 %) hatten die Patienten dieser Gruppe vergleichbare Ausgangsparameter.

Alle Patienten, die an der Studie teilnahmen, wurden zuvor über die Studie aufgeklärt und mussten eine entsprechende Patienteninformation unterschreiben. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität München genehmigt; alle studienspezifischen Untersuchungen wurden gemäß den Vereinbarungen der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

2.2 GENOTYPISIERUNG UND MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGSMETHODEN

Das Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR: polymerase chain reaction) ist die enzymatische Vermehrung (Amplifikation) eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonucleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge gebunden sind. Anfang der 70er Jahre kam der Norweger Kjell Kleppe erstmalig auf den Gedanken, DNA durch zwei flankierende Primer zu vervielfältigen, jedoch geriet die Idee in Vergessenheit. Die PCR selber wurde 1983 von Kary Mullis erneut erfunden. Seine Absicht war es ein Verfahren zu entwickeln, das DNA durch wiederholte Verdopplung in mehreren Zyklen mit Hilfe eines Enzyms namens DNA-Polymerase künstlich vervielfältigt. Sieben Jahre nachdem er seine Idee veröffentlicht hatte, wurde Mullis hierfür 1993 der Nobelpreis für Chemie verliehen.

DNA-Polymerasen kommen in allen Lebewesen vor und verdoppeln bei diesen die DNA vor der Zellteilung. Dazu binden sie sich an einen einzelnen DNA-Strang und synthetisieren den dazu komplementären Strang. Bereits in Mullis' ursprünglichem PCR-Versuch wurde das Enzym *in vitro* verwendet. Die doppelsträngige DNA wurde zunächst durch Erhitzen auf 96°C in zwei Einzelstränge getrennt. Bei dieser Temperatur wurde die DNA-Polymerase zerstört und musste daher nach jedem Erhitzen erneut zugegeben werden. Diese Folge von Arbeitsschritten musste mehrere Dutzend mal in Folge wiederholt werden, um eine ausreichende Amplifikation zu erreichen. Mullis' ursprüngliches Verfahren war daher sehr ineffizient und Zeit aufwändig.

Eine entscheidende Verbesserung der PCR-Technologie brachte die Verwendung von thermostabilen DNA-Polymerasen, d. h. Enzymen, die Temperaturen von annähernd 100°C aushalten konnten, ohne ihre Polymerase-Aktivität zu verlieren. Eine der ersten thermostabilen DNA-Polymerasen wurde aus dem in heißen Quellen lebenden thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen und wird daher auch kurz als Taq-Polymerase bezeichnet. Durch die Verwendung thermostabiler Polymerasen bestand keine Notwendigkeit mehr ständig neue Polymerase zuzugeben und der ganze PCR-Prozess konnte erheblich vereinfacht und automatisiert werden (Rolf Knippers et al, 1999).

Ziel einer PCR ist die Vervielfachung eines kurzen DNA-Abschnittes. Dabei kann es sich um ein Gen, um einen Teil eines Gen, handeln oder auch um nicht kodierende DNA-Sequenzen. Im Gegensatz zu lebenden Organismen kann der PCR-Prozess nur relativ kurze DNA-Abschnitte kopieren. Bei einer Standard-PCR können dies bis zu etwa 3.000 Basenpaare (3 kb) lange DNA-Fragmente sein. Mit Hilfe bestimmter Polymerasen-Gemische, weiterer Additive in der PCR-Reaktion und optimalen Bedingungen können sogar Fragmente mit einer Länge von über 20–40 kb vervielfältigt werden, was immer noch sehr viel kürzer ist als die chromosomale DNA einer eukaryontischen Zelle (Hengstenberg et al. Herz. 2002)

Grundvoraussetzung für die Amplifikation eines DNA-Fragmentes sind Kenntnisse über die flankierenden Sequenzen, um für diese Bereiche komplementäre Oligonukleotide als Primer synthetisieren zu können. Bei klonierten, unbekanntem DNA-Fragmenten verwendet man dazu oft die Bereiche des Vektor jenseits der Schnittstelle, für genomische DNA muss die relevante Sequenz (zumindest teilweise) zuvor sequenziert worden sein. Die Primer werden dann im Überschuss unter Hybridisierungsbedingungen (ca. 70°C) zu der entsprechenden, isolierten DNA zugegeben und die DNA-Polymerase heftet Nukleotide an die 3'-OH-Primer-Enden und synthetisiert so in 3' – 5' Richtung komplementäre DNA Sequenzen. Die entstandenen DNA-Synthese-Produkte werden anschließend denaturiert (ca. 95°C), also die Doppelstränge wieder getrennt, und anschließend erneut amplifiziert. Die Zyklen Denaturierung, Hybridisierung und Amplifikation werden bis zu 50-mal wiederholt. Wichtig ist hierbei jeweils ein möglichst schneller und exakter Temperaturwechsel. Während hierzu in den Anfängen der PCR verschiedene Wasserbäder und ein Umsetzen der Reaktionsgefäße per Hand von Nöten waren, erfolgt dieses heute voll automatisch dank Thermoblocken (Hengstenberg et al. Herz. 2002)

Durch die Verfeinerung der Methode und Präzisierung der Reaktionsbedingungen ist es heute sogar möglich gemäß validierter Protokolle mit Hilfe der PCR amplifizierte DNA-Mengen zu quantifizieren. Hierbei handelt es sich um eine so genannte Real-time-PCR, bei der mit Hilfe von Nukleotiden, die mit Fluoreszenz-Farbstoffen markiert sind, der Einbau eben dieser Farbstoffe bereits während eines PCR-Zyklus erfasst wird. Dabei nimmt die Fluoreszenz proportional zur Menge des amplifizierten PCR-Produktes zu. Jedoch ist die korrekte Quantifizierung nur in der exponentiellen Phase der PCR (die jeweils nur relativ wenige Zyklen der Amplifikation umfasst) möglich, da nur während dieser Phase optimale Reaktionsbedingungen herrschen. Um immer am Anfang der exponentiellen Phase messen zu können, wird häufig der CT-Wert (Threshold Cycle) bzw. der Cp-Wert (Crossing Point) mit Hilfe von Amplifikationskurven ermittelt. Dieser beschreibt den Zyklus an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt (Pfaffl, 2004, Brakmann und Nöbel, 2003)

Darüber hinaus wird diese hochspezifische PCR-Technologie auch für viele derzeitige Genotypisierungsstrategien verwendet.

Außerdem wichtig für die Untersuchung von Allel-spezifischen DNA-Sequenzunterschieden sind sogenannte Restriktions-Längen-Polymorphismen (RFLP), die darauf beruhen, dass individuelle Unterschiede in den Nukleotid-Sequenzen Schnittstellen für bakterielle Restriktions-Nukleasen (Restriktionsenzyme schneiden DNA-Stränge Sequenz-spezifisch) betreffen können und somit diese Enzyme entsprechende Bereiche entweder schneiden können oder nicht. Eine anschließende Auftrennung der nach dem Restriktionsverdau entstandenen DNA-Fragmente, z.B. in einem Agarose-Gel lässt dann Rückschlüsse über die vorliegenden Sequenzen zu (Rolf Knippers et al, 2004).

Auch für die ABO-Blutgruppen werden vermehrt solche molekularbiologischen Analysen angewandt. So konnten Lee und Chang (1992) mit einer von ihnen weiterentwickelten PCR die ABO-Allele genotypisieren. Dabei wurden durch die Verwendung von zwei Primerpaaren allelspezifische Sequenzen amplifiziert und nach Restriktionsverdau auf einem Polyacrylamidgel mittels Silberfärbung dargestellt. Anhand von 20 Blutproben mit bekannter ABO-Typisierung wurden die Ergebnisse überprüft und in allen 20 Fällen eine Übereinstimmung zwischen Geno- und Phänotyp nachgewiesen (Lee and Chang, 1992)

Auch Gassner et al. (1996) entwickelten eine Methode von acht PCR-Ansätzen, um die spezifischen Nukleotidsequenzunterschiede zwischen den ABO-Allelen 01, 02, A1, A2 und B

detektieren zu können. Voraussetzung war das Vorliegen der Sequenz für die ABO Glykosyltransferase A1, die mittlerweile kloniert und sequenziert ist. Auch anhand dieses Versuchsansatzes konnten die Autoren eine 100 %ige Übereinstimmung mit den ebenfalls bestimmten 300 serologischen Phänotyp-Proben nachweisen (Gassner et al. Blood, 1996).

In jüngster Zeit wurde berichtet, dass gelegentlich Diskrepanzen zwischen dem Phänotyp und dem Genotyp des ABO Systems auftreten. Die Ursache für die bei ca. 10% der untersuchten Sequenzen, bei der der Genotyp mit der serologischen Bestimmung nicht übereinstimmen, sieht Hallensleben in einer veränderten Promoterregion oder grundsätzlich in einer Behinderung der Translation (Arbeitsgruppentagung der AG Molekulare Transfusionsmedizin; 2001).

2.2.1 GENOTYPISIERUNG

Für die Genotypisierung wurde die genomische DNA der Leukozyten aus 200 µL peripherem Blut mit Hilfe eines QIAamp Blood Mini Kit oder des High Pure PCR Template Preparation Kit gewonnen. Zur Lagerung wurden die gewonnenen DNA Proben bei -21°C eingefroren. Für die Genotypisierung selbst wurden die Methoden Restriktionsenzymanalyse und TaqMan Assay verwendet. Primer und Sonden wurden mit der Hilfe der „Primer Express“ Software (Applied Biosystems), hauptsächlich basierend auf den Sequenzen von Exon 6 und 7 der A101 (Yamamoto F. Molecular genetics of ABO) als Standard Referenz, ausgewählt. Dabei wurde die ABO Genotypisierung auf die Identifizierung der Allele A1, A2, B, O1 und O2 beschränkt. Für die Unterscheidung der zu identifizierenden Allele wurden die vier folgenden ABO Polymorphismen bestimmt. Die Deletion von G an Position 261 zeigte Allel O1 an. Die Genotypisierung von G703A ermöglichte die Unterscheidung von A1 (G703) von B (A703) und die Genotypisierung von G802A gab O2 (A802) und A1 (G802) zu erkennen. Die Deletion von C an Position 1060 gab Allel A2 gegenüber A1 an (die Positionen der Polymorphismen beziehen sich auf Yamamoto , Yamamoto F. Molecular genetics of ABO. Vox Sang 2000)

2.2.2 RESTRIKTIONSENZYMANALYSE

Voraussetzung für die Genotypisierung mit dem TaqMan Verfahren ist die Verfügbarkeit von Proben von homozygoten Trägern eines jeden Allels. Dazu sollten die Genotypen G261(-), G703A, G802A und C1060(-) von gesunden Probanden mit Hilfe von PCR und Restriktionsenzymanalyse bestimmt werden. Es wurden hierzu die folgenden Primerpaare und Restriktionsenzyme benutzt:

G261(-): Forward primer 5` CAC CGT GCA AGG ATG TCC TC 3`, reverse primer 5` GGT GGT GGT GAG CCT GTA CT 3`, Restriktionsenzym Rsa I.

G703A: Primer siehe Tabelle 2, Restriktionsenzym Alu I.

G802A: Primer siehe Tabelle 2, Restriktionsenzym Mnl I.

C1060(-):Primer siehe Tabelle 2, Restriktionsenzym Taa I.

2.2.3 TAQMAN VERFAHREN

Bei dem TaqMan Verfahren macht man sich die 5'-3'-Exonuclease-Eigenschaften der Taq-DNA-Polymerase zunutze, so dass man in einem Verfahren eine PCR und einen 5'-Nuklease-Assay vereinen kann. Dabei werden die in Polymerisationsrichtung befindlichen, mit dem Matrizenstrang hybridisierten Fragmente bereits während der PCR hydrolysiert (= 5'-Nuklease-Assay). Ferner sind die für dieses Verfahren verwendeten Sonden mit zwei fluoreszierenden Farbstoffen versehen, und zwar befindet sich am 5'-Ende ein so genannter Reporterfarbstoff (z.B. VIC (Farbstoff von Applied Biosystems) oder FAM (6 carboxy-fluorescein)) und am 3'-Ende der Quencher-Farbstoff (z.B. TAMRA (6-Carboxytetramethylrhodamin)). Quencher sind Moleküle, welche die Fluoreszenz von anderen Farbstoffen (wie dem Reporterfarbstoff) in ihrer Nähe abfangen und somit deren Fluoreszenzsignale fast vollständig unterdrückt (siehe Abbildung 1).

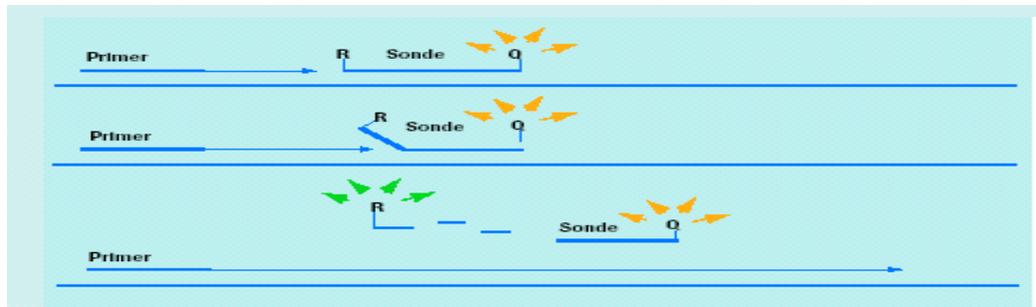
Die Sequenzen der Primer und Sonden für das TaqMan Verfahren sind in Tabelle 2 zu sehen.

Tabelle 2 *Oligonucleotide und verwendete Primer-Sequenzen*

Assay	Beschreibung	5'-Label-Sequenz-Label-3'
G261(-)	Forward	GAA TGT GCC CTC CCA GAC AA
G261(-)	Reverse	CCT CTC TCC ATG TGC AGT AGG AA
G261(-)	(-)-261 Probe	FAM-TGT CCT CGT ACC CCT TGG CT-TAMRA
G261(-)	G261 Probe	VIC-CCT CGT GGT GAC CCC TTG GCT-TAMRA
G703A	Forward Primer	GGA GAT CCT GAC TCC GCT GTT
G703A	Reverse Primer	CGG CGC TCG TAG GTC AAG

G703A	G703 Probe	FAM-TGC ACC CCG GCT TCT ACG GA-TAMRA
G703A	A703 Probe	VIC-CCT GCA CCC CAG CTT CTA CGG A-TAMRA
G802A	Forward Primer	CAA GGA CGA GGG CGA TTT C
G802A	Reverse Primer	TGA GCC GCA CCT CTT
G802A	G802 Probe	FAM-CCC GAA CCC CCC CAG GTA-TAMRA
G802A	A802 Probe	VIC-CCC CGA AGA ACC TCC CCA GGT AG-TAMRA
C1059 (-)	Forward Primer	CCT GAG GAA GCT GAG GTT CAC T
C1059 (-)	Reverse Primer	AAA GGA AAC AGA GTT TAC CCG TTC T
C1059 (-)	C1059 Probe	FAM-CCG CTC ACG GGT TCC GGA-TAMRA
C1059 (-)	(-)1059 Probe	VIC-CCG CTC GTT CCG GAC C-TAMRA

Abbildung 1 Schematische Darstellung der TaqMan Methode (Q: Quencher; R: Reporter)



Für die Allel-Differenzierung mit Hilfe des TaqMan Verfahrens werden neben dem Primerpaar zur Amplifikation des Genprodukts auch zwei eben für die beiden Allele spezifische DNA-Sonden mit einer Größe von ca. 20 Basenpaaren benötigt, deren Basensequenz komplementär zu dem DNA-Abschnitt, der die polymorphe Sequenz beinhaltet, sein müssen. Diese Sonden tragen entweder den fluoreszierenden Reporterfarbstoff VIC oder FAM am 5'-Ende, so dass die Sonden Allel-spezifisch unterschieden werden können. Am jeweiligen 3'-Ende befindet sich der Quencher-Farbstoff TAMRA. Eine schematische Darstellung einer Allel-Differenzierung mittels TaqMan Verfahren ist in nachfolgender Abbildung 2 gegeben.

passenden Sonde im Vergleich zu der Sonde mit einer Fehlpaarung favorisiert wird. Durch die Auswertung der allelspezifischen Fluoreszenzsignale erfolgt dann die Zuordnung zum jeweiligen Genotyp, wobei ein Signalanstieg eines Farbstoffes als charakteristisch für einen homozygoten Genotyp, der Anstieg von zwei Fluoreszenzsignalen kennzeichnend für einen heterozygoten Genotyp ist.

Für die vorliegende Genotypisierung wurden die Allel-spezifischen fluoreszierenden DNA-Proben vollautomatisch mit dem ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany) erzeugt und für die Genotypisierung der 4 Proben ein zweistufiges thermozyklisches Verfahren bestehend aus 40 Zyklen (95°C 15 sec/ 60°C 1 min) angewendet. Um die Ergebnisse zu bestätigen, wurde die Genotypisierung bei jedem 5. Patienten mit einer separat gewonnenen DNA wiederholt.

Wir führten die Genotypisierung, ohne die klinischen Befunde der Patienten zu kennen, durch.

2.3 DIE BESTIMMUNG DER vWF:AG BLUTPLASMA KONZENTRATION

Für die Bestimmung der vWF:Ag Blutplasmakonzentration wurden Plasmaproben in Natriumcitrat gesammelt und bei 2000g/10 min/4°C zentrifugiert (Jouan BR 4i Centrifuge, Unterhaching, Germany). Wenn notwendig wurden die Proben unmittelbar im Anschluss bei -21°C gelagert. Die vWF:Ag Blutplasmakonzentration wurde mittels eines kommerziellen ELISA mit einem ANTIHUMAN vWF Antikörper und einem Sollbereich von 40-200% bestimmt (Gradipore, Frenchs Forest, NSW, Australia). Mittels dreier Testproben wurde eine Messgenauigkeit anhand einer Koeffizientenvariation (cv) zwischen 4,95% bei einer vWF:Ag Konzentration von 87,7% und einem cv von 6,97% bei 124% (n=5) dokumentiert. Während der Versuchsreihen wurden die Abweichungen mittels eines Kontroll-Plasmas (cv 6,49% bei vWF:Ag Konzentration 137%; cv 18,9% bei vWF:Ag Konzentration 77% (n=5)) überprüft.

2.4 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Diskrete Variablen wurden als Prozentanteil (%) angegeben und wurden entweder mit dem Chi-Quadrat Test oder dem exakten Test nach Fisher verglichen. Kontinuierliche Variablen wurden mittels nicht gepaartem, zweiseitigen t-Test verglichen. Die Beziehung zwischen O1 Allelen und vWF:Ag Plasmakonzentrationen wurde mittels linearer Regression analysiert. Für die Analyse des Risikos wurde jeweils die Odds Ratio und das 95 % Konfidenzintervall (95 % KI) berechnet. Die unabhängige Relation zwischen der Anzahl der O1 Allele und dem MI-Risiko wurde unter Berücksichtigung der Patienten und Kontrollprobanden Ausgangscharakteristika mit Hilfe von zwei multivariaten Modellen, die Kodominanz bzw. Dominanz voraussetzen, ermittelt. Die Konsistenz des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts wurde anhand eines Chi-Quadrat-Tests nach Pearson berechnet. Die statistischen Auswertungen wurden mit dem Programm S-Plus (Mathsoft Inc. Seattle, WA) durchgeführt. Als signifikant wurden P-Werte kleiner 0,05 angenommen.

3. ERGEBNISSE

3.1. PATIENTENCHARAKTERISTIKA

In die Studie wurde ein Kollektiv von 1133 kaukasischen Patienten, bei denen eine Koronarangiographie im Deutschen Herzzentrum München oder in der 1. medizinischen Klinik, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, durchgeführt worden war, aufgenommen. Die konsekutiven Patienten (n=793) mit entweder vorangegangenen MI oder akutem MI bildeten die MI-Gruppe. Die Kontrollgruppe (n=340) wurde aus einer konsekutiven Reihe im gleichen Zeitraum ausgewählt, wobei Bezug auf Alter und Geschlecht der Fälle genommen wurde (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3 - Charakteristika des Patientenkollektivs

	MI-Gruppe n = 793	Kontrollgruppe n = 340	P
Alter (Jahre)	62,6 ± 11,6	63,4 ± 10,3	0,08
Frauen	22,6	24,7	0,44
arterielle Hypertension	62,7	60,6	0,51
Diabetes	21,6	10,3	<0,01
Raucher	34,3	18,8	<0,01
Hypercholesterinämie	37,8	40,6	0,38
BMI (Body Mass Index)	27,1 ± 3,6	26,6 ± 3,8	0,04

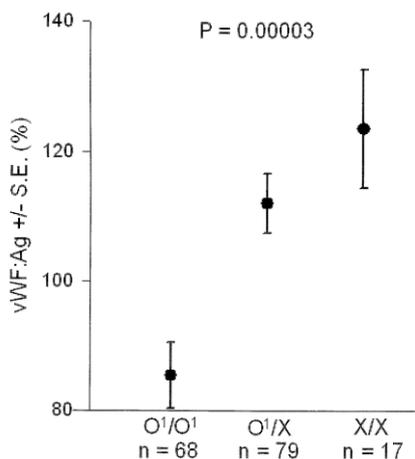
BMI und Alter in Durchschnittswerten, alle anderen Angaben in %

Wie aus Tabelle 3 ersichtlich unterscheiden sich die MI Gruppe und die Kontrollgruppe bezüglich der Charakteristika Diabetes mellitus, BMI und Raucher/Nichtraucher signifikant.

3.1.1 EINFLUSS DES ABO GENOTYPS AUF DEN VWF PLASMASPIEGEL BEI KONTROLLGRUPPE II

Der vWF:Ag Blutplasmakonzentrationsspiegel und die Anzahl der O^1 Allele bei den 164 Patienten der Kontrollgruppe II, die weder Anzeichen eines MI noch einer Erkrankung der Koronararterien zeigten, ist in Abbildung 3 dargestellt.

Abbildung 3: Einfluss der Anzahl der O^1 Allele auf die vWF:Ag Antigen Konzentration.



O^1/O^1 : homozygot; O^1/X : heterozygot; X/X : kein O^1 Allel

3.1.2 DOKUMENTATION

Anhand der Untersuchung konnte dokumentiert werden, dass der vWF:Ag Blutplasmakonzentrationsspiegel mit der Anzahl der O^1 Allele korreliert; der niedrigste vWF:Ag Blutplasmakonzentrationsspiegel liegt bei homozygoten O^1 Trägern, der höchste Spiegel bei Patienten ohne das O^1 Allel vor.

3.2 GENOTYPISIERUNG

3.2.1 ERZEUGUNG HOMOZYGOTER REFERENZPROBEN

Um die homozygoten DNA-Referenzproben für das TaqMan-Verfahren zu erhalten, wurden zunächst die G261(-), G703A, G802A und C1060 (-) Genotypen bei 100 gesunden Spendern (Klinik- und Labormitarbeiter) mit Hilfe von PCR und einer Restriktionsenzymanalyse bestimmt. Hiermit war eine Unterscheidung der Allele des ABO-Gens in die Gruppen A1 ,A2 ,B , O1 und O2 möglich und es lagen DNA Proben der beiden jeweiligen homozygoten Genotypen (in diesen Fällen 261GG/261--, 703GG/703AA, 802GG/802AA, 1060CC/1060--) vor.

3.2.2 GENOTYPISIERUNG DER PATIENTEN

Für die Genotypisierung des Allels A1 wurden zunächst alle MI- und Kontrollgruppen-Patienten in Hinsicht auf die G261 Deletion und den G703A Polymorphismus genotypisiert. In der Kontrollgruppe erfüllte die Genotypverteilung beider Polymorphismen die Hardy-Weinberg Gleichung. Die Allele O2 und A2 wurden nur bei A1 positiven Patienten (heterozygot oder homozygot) untersucht, da O2 und A2 sich von Allel A1 ableiten. Wie es zu erwarten war, übertraf die Anzahl von O2 bzw. A2 Allelen niemals die Anzahl der zuvor identifizierten A1 Allele. Die Genotypverteilung der MI Gruppe als auch in der Kontrollgruppe ist in Tabelle 4 dargestellt.

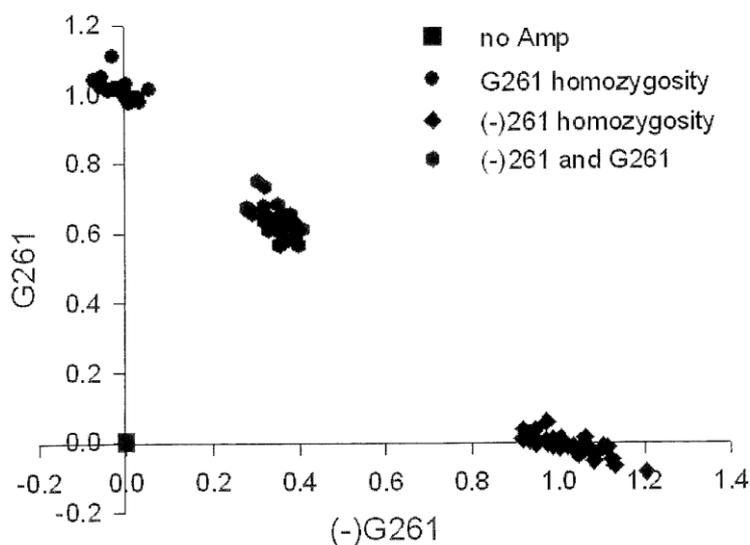
Tabelle 4 Verteilung der ABO Locus Allele bei MI-Patienten und der Kontrollgruppe

Allel	MI-Patienten n= 793*	Kontrollpatienten n=340*
A ¹ A ¹	31 (3,9)	10 (2,9)
A ¹ A ²	24 (3,0)	5 (1,5)
A ¹ B	32 (4,0)	14 (4,1)
A ¹ O ¹	231 (29,1)	88 (25,9)
A ¹ O ²	7 (0,9)	0 (0)
A ² A ²	3 (0,4)	0 (0)
A ² B	10 (1,3)	1 (0,3)
A ² O ¹	62 (7,8)	32 (9,4)
A ² O ²	4 (0,5)	2 (0,6)
BB	10 (1,3)	2 (0,6)
B O ¹	77 (9,7)	40 (11,8)
O ¹ O ¹	277 (35,0)	136 (40,0)
O ¹ O ²	24 (3,0)	10 (2,9)
O ² O ²	1 (0,1)	0 (0)

*Anzahl der Patienten, Angaben in () = Prozentuale Verteilung

Ein Beispiel für die automatische Genotypisierung eines Polymorphismus mit Hilfe von fluoreszierenden Sonden und dem TaqMan Verfahren ist in Abbildung 4 gegeben. Hier anhand des Beispiels des ABO Locus G261 mit dem Deletion-Polymorphismus G261(-). Die Allel Verteilung jeder Probe wurde mit der Software des Sequence Detection Systems ermittelt. Als fluoreszierende Sonden wurden die Farbstoffe FAM (6 carboxy-fluorescein) und VIV (Applied Biosystems, patent pending) verwendet, welche kovalent an das 5` Ende der Sonde gebunden sind, TAMRA (6-carboxytetramethylrhodamine) ist der kovalent an das 3` Ende gebundene Quencher Farbstoff. In dem Assay wurden jeweils die gewonnenen homozygoten Proben gesunder Probanden mit dem reinen Farbstoff-Spektrum im einem Multikomponenten-linearen Modell gleichgesetzt.

Abbildung 4 Analyse der Allel-Diskriminierungsdaten am Beispiel des G261 Deletionspolymorphismus



Theoretisch können bei der durchgeführten Genotypisierung 32 mögliche Allel-Kombinationen identifiziert werden. Tatsächlich wurden 14 in der untersuchten Population beobachtet; signifikante Unterschiede bezüglich der Gesamtverteilung zwischen der MI-Gruppe und der Kontrollgruppe ($P=0,29$) wurden nicht beobachtet. Die Analyse der 4 für die Genotypisierung verwendeten Polymorphismen zeigte, dass die Genotypen der G703A

(P=0,54), G802A (P=0,79) und C1060 Deletion (P=0,54) Polymorphismen gleichmäßig unter den MI- und Kontrollgruppenpatienten verteilt waren. Im Gegensatz dazu konnte dokumentiert werden, dass der Deletionspolymorphismus (G261 => kein O1, (-)261 => O1) zwischen der MI und der Kontrollgruppe ungleichmäßig (P=0,035) verteilt war (Tabelle 5).

Tabelle 5 Verteilung der O^1 Allele bei MI-Patienten und der Kontrollgruppe

	MI- Patienten n= 793*	Kontrollpatienten n=340*
kein O^1 Allel	122 (15,4)	34 (10,0)
heterozygot (O^1/X)	394 (49,7)	170 (50,0)
homozygot (O^1/O^1)	277 (34,9)	136 (40,0)

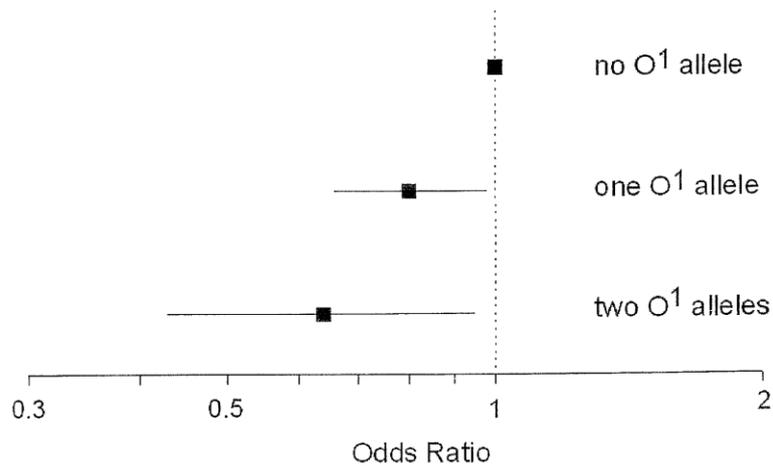
*Anzahl der Patienten, Angaben in () = Prozentuale Verteilung

3.3 RISIKO-KORRELATION BEI MI-PATIENTEN

Wie unter 3.2. bereits beschrieben, war das Vorkommen von O1 Allelen zwischen den beiden Studiengruppen (MI versus Kontrolle) ungleich verteilt mit einer signifikant erhöhten Häufigkeit in der Kontrollgruppe. Daraus ließ sich eine 39%ige Verringerung des Risikos einen MI zu erleiden (unadjusted Odds Ratio 0,61 [95% CI, 0,41-0,91]) für die Träger des O1 Allels ableiten.

Für die Risiko-Analyse wurden zwei verschiedene multivariate Modelle verwendet, wobei beide Modelle alle Patientencharakteristika, die in Tabelle 3 aufgeführt sind, berücksichtigten. Bei dem ersten Modell (unter der Annahme von Dominanz) wurde eine adjusted Odds Ratio von 0,64 [95% CI, 0,43-0,95] für (homo- und heterozygote) O1 Allel-Träger berechnet. Das zweite multivariate Modell (unter der Annahme von Kodominanz) dokumentierte, dass ein Anstieg der Anzahl der O1 Allele mit einer Verminderung des Standardrisikos für das Auftreten eines MIs korreliert. In diesem Modell betrug die Odds Ratio für heterozygote O1 Träger 0,79 (95% CI, 0,65-0,96) und 0,62 (95% CI, 0,43 – 0,92) für homozygote O1 Träger (Abbildung 5).

Abbildung 5 Korrelation zwischen Anzahl der O¹ Allele und dem Risiko eines MIs



In einer nachfolgenden Analyse wurden die zwei Kontrollgruppen der Studie mit 340 und 164 Patienten zusammengefasst. Die Verteilung von O¹ Allelen in dieser erweiterten Kontrollgruppe waren: kein O¹ Allel = 10,1%; heterozygot O¹ = 49,4% und homozygot O¹ Allel = 40,5%. Somit lag auch in dieser zusammengefassten Kontrollgruppe eine signifikante Abweichung ($P=0.01$) von der beobachteten Verteilung in der MI Gruppe vor.

4. DISKUSSION

Anhand der in dieser Studie durchgeführten Genotypisierung mit Hilfe des TaqMan Verfahrens konnte eindeutig dokumentiert werden, dass bei Trägern des O1 Allels ein um 39 % verringertes MI Risiko vorlag. Entsprechend der kodominanten Ausprägung eines multivariaten Modells ist das Risiko für homozygote Allel-Träger geringer als für heterozygote und demzufolge für Nicht-Träger am höchsten.

Das ABO Blutgruppensystem umfasst einen 18 kb großen Bereich auf dem langen Arm von Chromosom 9 (9q34) und trägt die Kodierung für eine Glykosyltransferase, welche eine Zucker-Gruppe an das H-Antigen heftet. Sowohl die Spezifität als auch die Aktivität dieses Enzyms bestimmt den ABO Blutgruppen Phänotyp.

Die kodierenden Sequenzen befinden sich dabei auf Exon 6 und 7 des ABO Allels. Die bislang identifizierten Polymorphismen für die ABO Allele befinden sich insbesondere auf dem Exon 6, aber auch auf Exon 7. Es sind zurzeit insgesamt 51 verschiedene Allele beschrieben worden, die in vielen Fällen mehrere Polymorphismen aufweisen. Von den bekannten Polymorphismen befinden sich 37 auf den Exons und ca. 20 im Bereich der Introns. Damit scheinen aber noch nicht alle Polymorphismen identifiziert worden zu sein, so konnte M. Hallensleben bei der 6. Arbeitsgruppentagung der AG Molekulare Transfusionsmedizin (Göttingen, 2001) berichten, dass es gelungen war 7 neue Polymorphismen zu identifizieren (Arbeitsgruppentagung der AG Molekulare Transfusionsmedizin; 2001). Die Allele A1 und B unterscheiden sich durch 7 einfache Nukleotid-Substitutionen, von denen vier den Austausch einer Aminosäure zur Folge haben. Charakteristisch für das O1 Allel ist die Deletion eines Guanins an Position 261. Diese Deletion führt zu einem Frameshift und als Folge dessen zum Verlust der Enzymaktivität. Im Gegensatz dazu führt die Deletion an C1060 des A2 Allels nur zu einer 10 – 20 %igen Reduktion der Enzymaktivität verglichen mit der Enzymaktivität des A1 Allels. Die nicht signifikante Aktivität der Glykosyltransferase, welche durch das Allel O2 codiert wird, leitet sich aus einem Aminosäure-Austausch ab, der aus der G802A Substitution resultiert.

Die funktionelle Bedeutung des ABO Polymorphismus ist nach wie vor Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen, da verschiedene Krankheitsbilder in direktem

Zusammenhang mit dem ABO System gebracht werden (Wu et al. J Thromb Haemost. 2008). Bereits in den 60er Jahren vermuteten Jaegermann (1962), Denbrough (1962), Bronste-Stewart et al. (1962) sowie Nefzger et al. (1969) ein erhöhtes MI-Risiko bei Patienten der Blutgruppen A oder B verglichen mit Patienten der Blutgruppe 0. Diese Ergebnisse wurden von Mourant et al. (1978) bestätigt, während Havlik et al. (1969) keine Inzidenz-Unterschiede zwischen Patienten der Blutgruppen 0 und A dokumentieren konnten. Anhand ihrer Erhebung an 300 Patienten konnten Akhund et al. (2001) die höchste Inzidenz für einen Myokardinfarkt bei Studienteilnehmern mit der Blutgruppe A (50 %) nachweisen, während bei Gruppe 0 das Risiko am geringsten war (9 %).

Mit Hilfe eines Kandidatengen- und eines genomweiten Ansatzes untersuchten auch Hengstenberg et al. (2002) die genetischen Einflüsse eines Myokardinfarktes. Hierzu wurden die Polymorphismen bei den Lipoproteinlipasegenen in den Genen der G-Protein- β 3-Untereinheit und in den Aldosteronsynthasegenen bei einem Kollektiv von Herzinfarktpatienten (n= 606) und Normalpersonen (n= 1675) untersucht. Auch wenn ein ungünstiges Lipidprofil oder ein erhöhter Blutdruck mit koronaren Herzerkrankungen assoziiert werden konnten, eine Korrelation der untersuchten Polymorphismen und den pathogenen Risikofaktoren eines MIs bzw. diesbezügliche signifikante Unterschiede zwischen Patientenkollektiv und Kontrollgruppe konnten die Autoren nicht dokumentieren. So lag , z.B. die Genotyp-Frequenz für den H2H2-Genotyp (= Hind-III-Polymorphismus der Lipoprotein-Lipase) in der Normalbevölkerung bei 51,3 % und bei den MI-Patienten bei 53,2 % (p = nicht signifikant).

Um weitere bislang nicht identifizierte, aber für die Pathogenese des Herzinfarktes relevante Gene identifizieren zu können, wendeten die Autoren in einem genomweiten Ansatz zusätzlich die sogenannte „Affected Sib-Pair“-Methode an, bei der betroffene Geschwisterpaare untersucht werden. Insgesamt wurden so 647 betroffene Geschwisterpaare aus 513 Familien (= 1407 Personen) mit 402 genetischen Markern, die in regelmäßigen Abständen über das gesamte Genom verteilt waren, analysiert. Die Auswertung der Genotypisierung dokumentierte einen hoch signifikanten chromosomalen MI-Locus (p<0,05) mit einem LodScore von 3,89 auf dem Chromosomen 14 (14q32). darüber hinaus bestand für die genomische Lokalisation der kardiovaskulären Risikofaktoren eine gewisse Überlappung mit bereits bekannten Genloci, aber nicht für den neu identifizierten MI-Locus (Hengstenberg et al. Herz. 2002)

In einer weiteren Fallstudie an 177 MI-Patienten und 89 Kontrollpersonen führten auch Nydegger et al. (2006) eine ABO-Genotypisierung der Allele O1, O2, A1, A2 und B durch und überprüften die Korrelation zur MI-Inzidenz mittels SSP-PCR (Exon 6 und 7/Chromosom 9). Anhand der Studiendaten kamen die Autoren zu dem Ergebnis, dass Träger des B-Allels ein ca. 2,5fach erhöhtes MI-Risiko haben verglichen mit entsprechenden Vergleichspersonen (Nydegger et al., 2003)

Jüngst konnten Samani et al. (2007) einen Genlocus, der eng mit koronalen Herzerkrankungen assoziiert ist, anhand einer Fallberichtsanalyse von 1926 erkrankten Patienten (Alter < 66Jahre, familiäre Prädisposition) und 2983 Kontrollpersonen aus England identifizieren. Zur Validierung der Ergebnisse wurden auch die Daten von 875 MI-Patienten und 1644 gesunden Probanden aus Deutschland analysiert. Die Genotypisierung wurde mit Hilfe der Biochip-Technologie durchgeführt, hierbei wurden insgesamt 377.857 SNPs der englischen Patienten bzw. 272.602 SNPs der deutschen Patienten in die Auswertung einbezogen.

Bei den englischen Patienten konnten insgesamt 396 SNPs, die in neun chromosomalen Bereichen lokalisiert waren, mit einer Inzidenz zu koronalen Erkrankungen identifiziert werden. Von diesen neun Loci zeigten wiederum drei (9p21,3, 6q25,1, 2q36,3) eine enge Korrelation zu einem erhöhten MI-Risiko bei den deutschen Patienten. Dabei erwies sich Locus 9p21.3 als stärkstes Signal in beiden Patientenkollektiven; ein SNP in diesem Genlocus (rs1333049) führte zu einem Anstieg des Risikos um 36 % (95 % CI von 27 auf 46) (Samani et al., 2007).

Auch in der Genom-Studie von Helgadottir et al. (2007) an 4.587 isländischen MI Patienten und 12.767 Kontrollprobanden wurden insgesamt 305.953 SNPs mit Hilfe der Biochip Technologie untersucht. Dabei konnten die Autoren ebenfalls nachweisen, dass drei SNPs (rs1333040, rs2383207, rs10116277), die alle zu einer Kopplungsgruppe (linkage disequilibrium) des Chromosom 9 (9p21) gehören, die stringenteste Korrelation mit einem erhöhten MI-Risiko aufwiesen. Zur weiteren Absicherung dieser Ergebnisse wurden die gefundenen, relevanten drei SNPs bei weiteren 665 isländischen MI-Patienten sowie bei 3533 Kontrollprobanden sowie in drei verschiedenen Probenserien aus den USA genotypisiert. Für alle genotypisierten Proben konnte initial ermittelte hohe Signifikanz bestätigt werden (Helgadottir et al. Science. 2007).

In Übereinstimmung dazu konnten McPherson et al. (2007) anhand einer genomweiten Assoziations-Analyse von je 6 unabhängigen Proben bei einem großen Patientenkollektiv (kaukasische Population) eine 58 kb große Region auf dem Chromosom 9 (9p21) identifizieren, die streng mit der Inzidenz von Herzerkrankungen korreliert war. Es wurden zwei SNPs identifiziert (rs 10757274, rs2383206), die sich auf einer Kopplungsgruppe (linkage disequilibrium, $r^2 = 0,89$) befanden, jedoch keine Korrelation zu anderen, bekannten MI-Risikofaktoren aufwiesen. Auch in dieser Studie wurden die Ergebnisse zur Validierung noch einmal an anderen Patientenpopulationen (Kopenhagen, Dallas, Ottawa) überprüft und bestätigt. Zusammenfassend konnte so nachgewiesen werden, dass bei Patienten, die heterozygot für die identifizierten SNPs waren, das MI-Risiko um ca. 15-20 % erhöht war, bei Individuen des entsprechend homozygoten Genotyps war es sogar um 30-40 % erhöht (McPherson et al. Science. 2007)

Darüber hinaus konnten Shen et al. (2007) ebenfalls anhand einer großangelegten Genomanalyse verschiedener Patienten-Kollektive nachweisen, dass eine genetische Variation (Substitution R952Q) des Gens für das „low density lipoprotein receptor-related protein 8“ des Lipidstoffwechsels (LRP8) sowohl mit dem Risiko einer koronaren Herzerkrankung als auch mit dem MI-Risiko streng korreliert ist. Auch für diese Untersuchungen wurde das hier beschriebene TaqMan Verfahren mit spezifischen Primern (Applied Biosystem) verwendet (Shen et al., 2007).

In Konsistenz zu diesen Ergebnissen, belegten auch die Daten der vorliegenden Studie, einige signifikante Korrelationen zwischen ABO-Genotyp und dem Risiko eines MIs. Allerdings unterschieden sich die verglichenen Patientenkollektive auch bezüglich der Risikofaktoren Rauchen, Diabetes und Körpergewicht. Dieses ist übereinstimmend mit der derzeitigen Auffassung, dass kardiovaskuläre Erkrankungen nicht nur einen polygenen Hintergrund haben, sondern begleitend auch von verschiedenen Risikofaktoren beeinflusst werden.

Um konsistente Studienergebnisse zu erhalten bzw. zur besseren Beurteilung des Patientenkollektivs, wurde in den vorliegenden Untersuchungen darauf geachtet, dass sowohl für alle Patienten als auch für die Probanden der Kontrollgruppe Gefäßangiografien vorlagen. Ferner waren alle eingeschlossenen Patienten kaukasischen Ursprungs, so dass eine relevante Verzerrung (BIAS) aufgrund einer stratifizierten Population nahezu ausgeschlossen werden konnte. Für die vorliegende Studie wurden geschlechts- und altersspezifische Kontroll-Probanden aus einer konsekutiven Patientengruppe innerhalb des

Patientenrekrutierungszeitraums ausgewählt. Die erwartete genotypische Aufteilung der Kontrollindividuen stimmte mit der phänotypischen Verteilung des ABO Blutgruppensystems in Süddeutschland (O: 41,21 %; A: 43,26 %; AB: 4,82 %; B: 10,71 %; n>600.000) überein. Da jedoch das Patientenkollektiv nur aus Überlebenden eines MI's bestand, kann nicht ausgeschlossen werden, dass der homozygote Allel O1 Genotyp nicht wie angenommen ein geringeres MI Risiko birgt, sondern vielmehr unterrepräsentiert war und somit tatsächlich ein erhöhtes Letalitätsrisiko darstellt (Tod in Folge eines MI Ereignisses). Allerdings trifft diese Problematik auf alle hier angeführten Studien mit ähnlicher Fragestellung zu. Unter Berücksichtigung der Konsistenz der Daten, kann dieser Punkt aber wohl eher vernachlässigt werden. Darüber hinaus war die Patientenanzahl nicht ausreichend um signifikante Aussagen über die wesentlich seltener auftretenden Allele A2 und O2 zu treffen.

Der von Willebrand Faktor ist ein von Endothelzellen gebildetes multimeres Plasma-Glycoprotein der ABO-Blutgruppen. Shima et al. (1995) konnten anhand von 330 analysierten Plasmaproben nachweisen, dass heterozygote Allel O-Träger (AO oder BO) über einen geringeren vWF Antigen-Titer verfügen als Individuen der Genotypen AA, AB oder BB. Entsprechend hatten Menschen mit dem Genotyp OO den geringsten Antigen-Titer (Shima et al, 2007). In der vorliegenden Studie sollte diese Korrelation überprüft werden. Für die 164 Patienten der Kontrollgruppe II konnte übereinstimmend auch nachgewiesen werden, dass die vWF:Ag Konzentration mit der Anzahl der O1 Allel-Träger korreliert (höchster Wert bei Patienten ohne dieses Allel; niedrigster bei homozygot O1). Für das eigentliche Patientenkollektiv sowie die Individuen der Kontrollgruppe I konnte diese Korrelation aufgrund fehlender Plasmaproben nicht überprüft werden, was als weiterer limitierender Faktor angesehen werden muss. Eine Abschätzung des MI Risikos aufgrund dieses Parameters konnte somit nicht vorgenommen werden.

Für die Bestimmung von Sequenzveränderungen wie Deletionen, Duplikationen oder Basensubstitutionen werden in der molekularen Diagnostik in zunehmendem Maße „Real-time-PCR“ Ansätze (RT-PCR) gewählt, d.h. die quantitative Verfolgung von Amplifikationsprodukten aus der PCR in Echtzeit. Grundvoraussetzung für diese Form der Analytik sind mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Nucleotide, die es mittlerweile für den Spektralbereich von 350 – 750 nm gibt (Brakmann S, 2006). Die RT-PCR bietet dabei die Möglichkeit die amplifizierten DNA-Produkte anhand der Amplifikationskurven parallel, sequenzspezifisch und direkt zu quantifizieren, ohne weitere Analyse der Produkte.

Bei einer allelspezifischen PCR ist es ausgesprochen wichtig, die Primersequenzen so zu wählen, dass das jeweilige 3'-Ende bei der Hybridisierung auf der polymorphen Stelle des Templates zu liegen kommt, so dass der selektive Primer idealerweise nur dann von der Taq Polymerase verlängert wird, wenn er 100 %ig komplementär ist. Die Templates mit anderen Sequenzen (z.B. der Basen-Deletion) sollten nicht kopiert werden. Da infolge der Diskriminierung das spezifisch amplifizierte Templat ungestört repliziert wird, kann dessen initiale Konzentration nach Detektion der Fluoreszenz anhand des CT-Wertes der Amplifikationskurve bestimmt werden. Auch wenn es sich bei der quantitativen RT-PCR um eine sehr sensitive Methode, die Messungen über einen Bereich von 7 bis 8 log-Stufen und den Nachweis von kleinsten DNA-Kopienmengen zulässt, (Wilfingseder D, 2006) handelt, verbleibt jedoch eine Restwahrscheinlichkeit, dass auch das zu diskriminierende Templat bzw. Nebenprodukte amplifiziert werden. Die Größe dieser Wahrscheinlichkeit hängt dabei vom Sequenzkontext und den Versuchsbedingungen ab. Die erreichbare Genauigkeit von Quantifizierungen mittels RT-PCR wird zurzeit noch kontrovers diskutiert und stellt einen limitierenden Faktor dieser Methode dar. Jedoch gibt es mittlerweile auch Untersuchungen, die nachweisen konnten, dass es durch die Optimierung der PCR-Bedingungen möglich war mit Hilfe dieser Methode die vollständige Diskriminierung eines im 10.000-fachen Überschusses befindlichen Allels bzw. der eindeutige Nachweis eines einzigen Templates möglich ist. Allerdings geht der lineare Zusammenhang zwischen Logarithmen der Templatekopienzahl und den CT-Werten verloren, so unter den gewählten Versuchsbedingungen nur ein qualitativer Nachweis möglich war (Wilhelm J. Dissertation, 2003).

Auch die Versuchsbedingungen für die vorliegenden Untersuchungen wurden in Anlehnung an bereits veröffentlichte Arbeiten (Gassner et al. Blood, 1996) möglichst stringent und optimal gewählt. Das 2 stufige thermozyklische Verfahren für die 4 Proben bestand aus 40 Zyklen von Denaturation bei 95 Grad Celsius für 15 Sekunden und einer Annealing/Erweiterung bei 60 Grad Celsius für eine Minute. Die jeweiligen Primer und die markierten Sonden wurden mit Hilfe der Primer Express Software ausgewählt (PE Biosystems, Weiterstadt). Neben den jeweiligen Patienten-spezifischen Proben wurden bei jedem PCR Durchgang auch Negativkontrollen mit Wasser sowie für das jeweilige Allel homozygote Standard DNA mit amplifiziert. Außerdem wurde bei 20 % der Patienten unter Verwendung von getrennt isolierter DNA von originalen Blutproben eine Kontrolle mittels unabhängiger Bestimmung des Genotyps durchgeführt. Auch stimmte die genotypische

Aufteilung der Kontrollgruppe mit der aus der phänotypischen Verteilung des ABO Blutgruppensystems in Süddeutschland(41.21% O, 43.26% A, 10.71% B, 4.82% AB), ermittelt unter über 600000 Spendern, erwarteten Aufteilung überein. So dass davon ausgegangen werden kann, dass die hier verwendete Methode valide Daten lieferte.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass es mit Hilfe des TaqMan Verfahrens möglich war, eine Korrelation zwischen ABO-Genotyp und dem Risiko eines MI zu dokumentieren und diese Ergebnisse mit denen anderer Untersuchungen ähnlicher Fragestellung übereinstimmen. Weiterführende Analysen sowohl der genomischen Prävalenzen als auch der Phänotypen und exogenen Risikofaktoren sind für das weitere Verständnis einer komplexen und polygenen Erkrankung wie dem Myokardinfarkt nötig.

5. ABKÜRZUNGEN

bp	Basenpaare
CI	Konfidenzintervall
cv	Koeffizientenvariation
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
IL	Interleukin
kb	Kilobasen
MI	Myokardinfarkt
PCR	polymerase chain reaction
rs	recombination signal
SNP	single nucleotid polymorphism
TNF	Tumor Nekrose Faktor
vWF	von Willebrand Faktor

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Akhund I.A., Alvi I.A., Ansari A.K. , Mughal M.A. , Akhund A.A.
A study of relationship of ABO blood groups with myocardial infarction and angina pectoris;
J Ayub Med Coll Abbottabad. 2001 Oct-Dec;13(4):25-6.
2. Allan TM, Dawson AA.,
ABO blood groups and ischaemic heart disease in men.
Br Heart J. 1968 May;30(3):377-82
3. Bermudez E.A., Rifai N., Buring J., Manson J.E., Ridker P.M.
Interrelationships Among Circulating Interleukin-6, C-Reactive Protein, and Traditional Cardiovascular Risk Factors in Women
Arterioscler Thromb Vasc Biol, Oct 2002; 22(10): 1668 – 1673
4. Blake GJ, Ridker PM.
Tumour necrosis factor-alpha, inflammatory biomarkers, and atherogenesis.
Eur Heart J. 2002 Mar;23(5):345-7
5. Degenhartt S., Reichert W., Mattern R.
AB0 genotyping of a southwest German population
RECHTSMEDIZIN, Volume 8, Number 6, 219-222

6. Denbrough, Bronste-Stewart, Nefzger, zitiert nach Akhund I.A. et al.
A study of relationship of ABO blood groups with myocardial infarction and angina pectoris;
J Ayub Med Coll Abbottabad. 2001 Oct-Dec;13(4):25-6.

7. Fitzgerald A.P., Conroy R.M., Sans S., Wilhelmsen L.
Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project.
Eur Heart J. 2003 Jun;24(11):987-1003.

8. Flegel W.A.
Häufigkeit sporadischer nicht-funktionaler Allele und ihre Bedeutung für die Genotypisierung am Beispiele des Polymorphismus im FUT1-Blutgruppengen
Habilitationsschrift, 1997, veröffentlicht unter <http://www.uni-ulm.de/~wflegel/HABIL/habil.pdf>

9. Gabriel S., Topol E.J., McCarthy J., Moliterno D.J., Rogers W.J., Newby K.
Single nucleotide polymorphisms in multiple novel thrombospondin genes may be associated with familial premature myocardial infarction.
Circulation. 2001;104:2641–2644

10. Gassner C., Schmarda A., Nussbaumer W., Schönitzer D.
AB0 glykosyltransferase genotyping by polymerase chain reaction using sequence-specific primers
Blood, 1996 : 88(5) : 1852-1856

11. Gorchakova O.

Influence of eNOS 894 G/T Polymorphism on clinical outcome after coronary stentimplantation

Dissertation der Technischen Universität München 2003, veröffentlicht unter <http://mediatum2.ub.tum.de/node?id=602245>

12. Guidelines Subcommittee, 1999 World Health Organization-International Society of Hypertension

Guidelines for the Management of Hypertension

J Hypertens. 1999 Feb;17(2):151-83.

13. Helgadottir A., Thorleifsson G., Manolescu A., Gretarsdottir M., Blondal T.,

Jonasdottir A., Jonasdottir A., Sigurdsson A., Baker A., Palsson A., Masson G.

A Common Variant on Chromosome 9p21 Affects the Risk of Myocardial Infarction
Science 8 June 2007; Vol. 316 no. 5830 pp. 1491-1493

14. Hengstenberg C., Bröckel U., Holmer S., Mayer B., Fischer M., Baessler A., Erdmann J., Lieb W., Löwel , H., Riegger G., Schunkert H.

Genetic Factors in Myocardial Infarction – Results from Candidate Gene and a Genome-Wide Approach

HERZ 2002;27:649-61 (Nr. 7)

15. Hoppmann Petra

matrixmetalloproteinases; stromelysin-1; polymorphisms; restenosis;
coronaryintervention

Dissertation 2004, <http://deposit.ddb.de/cgi->

bin/dokserv?idn=977968332&dok_var=d1&dok_ext=pdf&filename=977968332.pdf

16. Howell W., Calder P., Grimble R.

Genes polymorphisms, inflammatory diseases and cancer

Proc Nutr Soc 2002;61:447–56

17. Howell W., Rose-Zerilli J.

Cytokine Gene Polymorphisms

J. Nutr. 2007;137(1): 194S-199S

18. Incalcaterra E, Hoffmann E, Averna MR, Caimi G.

Genetic risk factors in myocardial infarction at young age

Minerva Cardioangiol. 2004;52:287–312

19. Jaegermann K., Roberts J., Denborough M.

Coronary arteriosclerosis and blood group characteristics

Kardiol Pol. 1962;5:215–222

20. Jesch U., Endler C., Wulkersdorfer B, Spranger H.

ABO Blood Group. Related Investigations and Their Association with Defined

Pathologies

TheScientificWorldJOURNAL (2007) 7, 1151–1154

21. Knippers, R.

Molekulare Genetik (molekulare genetic)

2006, 9., überarb. Aufl., XVII, 567; Thieme, Stuttgart

22. Lee J., Chang J

ABO genotyping by polymerase chain reaction

J. Forensic Sci 37:1269-1275

23. Mark B., Hamm W., Wolf A., Kannel W., Steinbeck G., Canto J., Peetz S. Janssens S.,

Ripa S., Zohlhofer D.

Myokardinfarkt

<http://de.wikipedia.org//w/index.php?title=myokardinfarkt&oldid=43161413>, 1. März 2008

24. McPherson R, Pertsemlidis A, Kavaslar N, Stewart A, Roberts R, Cox DR, Hinds DA,

Pennacchio LA, Tybjaerg-Hansen A, Folsom AR, Boerwinkle E, Hobbs HH, Cohen

JC.

A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease.

Science. 2007 Jun 8;316(5830):1488-91.

25. Nydegger U., Wuillemin W., Julmy F., Meyer B., Carrel T.

Association of ABO histo-blood group B allele with myocardial infarction.

European journal of immunogenetics : official journal of the British Society for

Histocompatibility and Immunogenetics 2003;30(3):201-6

26. Pfaffl, M.

Quantification strategies in real-time PCR

A-Z of quantitative PCR, Chaper 3 pages 87 – 112; 2004

27. Samani NJ, Erdmann J, Hall AS, Hengstenberg C, Mangino M, Mayer B, Dixon RJ, Meitinger T, Braund P, Wichmann HE, Barrett JH, König IR, Stevens SE, Szymczak S, Tregouet DA, Iles MM, Pahlke F, Pollard H, Lieb W, Cambien F, Fischer M, Ouwehand W, Blankenberg S, Baessler A, Ball S.
Genomewide association analysis of coronary artery disease
N Engl J Med. 2007 Aug 2;357(5):443-53. Epub 2007 Jul 18.
28. Schaar J., De Korte C., Mastik F.
Intravascular palpography for high risk vulnerable plaque assessment
Herz 2003;28: 488–95
29. Schlüter B, Raufhake C, Erren M, Schotte H, Kipp F, Rust S, Van Aken H, Assmann G, Berendes E.
Effect of the interleukin-6 promoter polymorphism (-174 G/C) on the incidence and outcome of sepsis.
Crit Care Med. 2002 Jan;30(1):32-7.
30. SDS Workshop
Introduction into Real-Time TaqMan PCR Technology
http://www.core-facility.uni-freiburg.de/lc480/lc480obj/sdsman/at_download/file,
2008
31. Shen G., Li L, Girelli D., Seidelmann S., Rao S., Fan C., Park J., Xi Q., Li J., Hu Y., Olivieri O., Marchant K., Barnard J., Corrocher R., Elston R., Cassano J., Henderson S., Hazen S., Plow E., Topol E., Wang Q.
An LRP8 variant is associated with familial and premature coronary artery disease and myocardial Infarction

Am J Hum Genet. 2007c;81:780–791

32. Shima M, Fujimura Y, Nishiyama T, Tsujiuchi T, Narita N, Matsui T, Titani K, Katayama M, Yamamoto F, Yoshioka A.

ABO blood group genotype and plasma von Willebrand factor in normal individuals.

Vox Sang. 1995;68:236–240

33. Tobin M., Braund P., Burton P., Thompson J., Steds R., Chaner K., Cheng S., Lindpaintner K., Samani N.

Genotypes and haplotypes predisposing to myocardial infarction: a multilocus case-control study

Eur Heart J 2004;25(6):459-467.

34. WHO 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;59:607–609

35. Wilfingseder D., Stoiber H.

Quantifizierung von PCR-Produktmengen durch real-time PCR-Verfahren

http://www.antibiotikamonitor.at/12_02/12_02_06.htm 2006

36. Wilhelm J.

Development of real-time PCR based methods for modern DNA analytics

Dissertation 2003; <http://geb.uni->

[giessen.de/geb/volltexte/2003/1072/pdf/WilhelmJochen-2003-03-14.pdf](http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2003/1072/pdf/WilhelmJochen-2003-03-14.pdf)

37. Wilson W., D'Agostino B., Levy D., Belanger A., Silbershatz H., Kannel W.

Prediction of Coronary Heart Disease Using Risk Factor Categories

Circulation. 1998;97:1837-1847

38. World Health Organisation Study Group

Diabetes Mellitus

WHO Tech Rep Ser 1985;727:1-104