

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Die Polymorphismen G20210A und G10253A des
Gerinnungsfaktors II (Prothrombin) als genetische Prädispositionsfaktoren
für die koronare Herzerkrankung und ihre Komplikationen**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Linda Verena Walther
aus Bautzen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. I. Roots
2. Prof. Dr. med. S. Harder
3. Priv.-Doz. Dr. med. M. Laule

Datum der Promotion: 18.09.2009

Meinen Kindern Hannah und Felix.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Bedeutung der Hämostase und hereditärer Prädispositionsfaktoren für die koronare Herzerkrankung und ihre Komplikationen	1
1.2. Der Gerinnungsfaktor II und die Serinprotease Thrombin	4
1.3. Genetische Mutationen des Gerinnungsfaktors II (Prothrombin)	7
1.3.1. FIIG20210A-Mutation	8
1.3.2. FIIG10253A-Mutation	10
1.4. Fragestellung	11
2. Material und Methoden	12
2.1. Patientenpopulation und Studiendesign	12
2.2. Materialien	13
2.3. DNA-Isolierung	15
2.4. Methoden der Genotypisierung	16
2.4.1. Echtzeit-Fluoreszenz-PCR und Schmelzkurvenanalyse mit dem LightCycler™	16
2.4.2. PCR-RFLP-Analyse bei der FIIG20210A-Mutation	20
2.4.3. DNA-Sequenzanalyse bei der FIIG10253A-Mutation	22
2.5. Bestimmung der Prothrombinaktivität	24
2.6. Statistische Methoden	25
3. Ergebnisse	26
3.1. Patientencharakteristik	26
3.1.1. Prothrombinaktivität	29
3.2. Genotypen- und Allelverteilung	30
3.2.1. Häufigkeit der kombinierten FII-Genotypen und Untersuchung auf allelische Assoziation zwischen G20210A und G10253A	31
3.3. Auswirkungen der FII-Mutationen auf die Prothrombinaktivität	33
3.3.1. FIIG20210A-Mutation	33
3.3.2. FIIG10253A-Mutation	34
3.3.3. Kombination der FII-Mutationen G20210A und G10253A	34

3.4.	Stratifizierung nach Geschlecht und kardiovaskulären Risiken	36
3.5.	Analyse der KHK-Untergruppen	37
3.5.1.	Stratifizierung nach ACS, Manifestationsalter und Schwere der KHK	37
3.5.2.	Stratifizierung nach Koronarintervention und Interventionstyp	39
3.6.	Überprüfung der Einflussfaktoren für KHK und deren Komplikationen in der logistischen Regression	41
3.7.	Beziehung der FII-Mutationen zu kardiovaskulären Risikofaktoren und anderen Parametern	42
3.8.	Korrelation zwischen Prothrombinaktivität und anderen Variablen	43
4.	Diskussion	45
4.1.	Prävalenz des FII-Polymorphismus G20210A und interethnische Differenzen	45
4.2.	Bedeutung der FIIG20210A-Mutation für die koronare Herzerkrankung	50
4.3.	Phänotypische Bedeutung der FIIG20210A-Mutation	55
4.3.1.	Verbindung des 20210A-Allels mit der Prothrombinaktivität	55
4.3.2.	Assoziation zwischen Prothrombinaktivität und koronarer Herzerkrankung	58
4.4.	Beurteilung des kardiovaskulären Risikos in KHK-Untergruppen	60
4.4.1.	FIIG20210A und Risiko für KHK nach Geschlecht	60
4.4.2.	FIIG20210A und Risiko für KHK bei jungen Individuen	62
4.4.3.	FIIG20210A und Risiko für KHK nach kardiovaskulären Risikofaktoren	63
4.4.4.	FIIG20210A und Risiko für KHK nach Schweregrad	66
4.4.5.	FIIG20210A und Risiko für akute Koronarsyndrome	68
4.4.6.	FIIG20210A und Risiko für Frühkomplikationen nach Koronarintervention	73
4.5.	FII-Polymorphismus G10253A: Prävalenz, Assoziation mit FIIG20210A und phänotypische Bedeutung	74
5.	Zusammenfassung	76
6.	Literatur	78
	Verzeichnis der Abkürzungen	88
	Danksagung	89
	Eidesstattliche Erklärung	90
	Lebenslauf	91

1 Einleitung

1.1 Bedeutung der Hämostase und hereditärer Prädispositionsfaktoren für die koronare Herzerkrankung und ihre Komplikationen

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen heute die wichtigste Todesursache in den entwickelten Industrieländern dar. Sowohl die Therapie der koronaren Herzerkrankung und ihrer Komplikationen als auch die Behandlung von Schlaganfall und peripherer arterieller Verschlusskrankheit beanspruchen einen großen Teil der Gesundheitsausgaben.

Seit mehr als 40 Jahren werden mit den Ergebnissen der Framingham Study Hypercholesterinämie, Nikotinabusus, Diabetes mellitus und arterielle Hypertonie als wesentliche kausale Risikofaktoren für die koronare Herzerkrankung und den Myokardinfarkt angesehen (Dawber und Kannel 1966). Es ist zweifellos 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, zeigten, dass die positive Familienanamnese erstgradiger Verwandter einen weiteren unabhängigen Risikofaktor für die koronare Herzerkrankung und den Myokardinfarkt darstellt (Colditz et al. 1986; Schildkraut et al. 1989).

Die systematische Untersuchung und Aufklärung genetischer Prädispositionsfaktoren für komplexe Krankheitsbilder wie kardiovaskuläre Erkrankungen und ihre Komplikationen könnten es ermöglichen, Patientenpopulationen mit einem besonderen Erkrankungsrisiko auf der Basis genetischer Informationen besser zu identifizieren. Neben der Einschätzung des Erkrankungsrisikos könnten durch die Einbeziehung genetischer Marker sowohl die Beratung und Indikationsstellung zur Therapie der Patienten wie auch die Auswahl und Dosierung von Arzneimitteln stärker individualisiert werden.

Zunehmend gibt es Beweise dafür, dass verschiedenen Komponenten des Gerinnungssystems eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose wie auch in der Entwicklung zur Plaqueruptur und Bildung okklusiver Thromben zugeschrieben werden kann (Meade et al. 1986; Hamsten et al. 1987; Kannel et al. 1987; Zaman et al. 2000). In den letzten Jahren konzentrierten sich zahlreiche Untersuchungen auf die Bedeutung hämostatischer Marker als thrombogene Risikofaktoren für die koronare Herzerkrankung und deren Komplikationen, und es wurden verschiedene genetische Mutationen, die Gerinnungsproteine beeinflussen, als prothrombotische Risikofaktoren vorgeschlagen (Cushman 1999; Lane und Grant 2000).

1996 beschrieben niederländische Untersucher erstmalig eine genetische Veränderung an der Nukleotidposition 20210 des Prothrombingens (FII G20210A), die mit einem fast dreifachen Risikoanstieg für venöse Thrombose und einem erhöhten Plasmaprothrombin assoziiert war (Poort et al. 1996). Diese Beobachtungen konnten nachfolgend in anderen europäischen Populationen bestätigt werden (Brown et al. 1997; Cumming et al. 1997; Ferraresi et al. 1997; Hillarp et al. 1997; Kyrle et al. 1998; Franco et al. 1999; von Ahsen et al. 2000; Soria et al. 2000; Russo et al. 2001).

Prothrombin ist Vorläufer der Serinprotease Thrombin, einem Schlüsselenzym in Prozessen der Hämostase und Thrombose (Jackson 1994). Welche potentielle Rolle der funktionell bedeutsame G20210A-Polymorphismus und Veränderungen des Plasmaprothrombins bezüglich eines erhöhten Risikos für den chronischen multifaktoriellen Prozess der koronaren Herzerkrankung und deren akute klinische Manifestationen spielen, ist jedoch bis dato umstritten.

Es wurde demonstriert, dass ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Aktivierung des Gerinnungssystems, einschließlich der übermäßigen Thrombinbildung, und einem hohen Risiko für eine schwerwiegende koronare Herzerkrankung besteht, und dass in der akuten Phase der instabilen Angina pectoris und des Myokardinfarktes eine gesteigerte Aktivität des Gerinnungssystems wie auch ein anhaltend hyperkoagulatorischer Zustand in den darauffolgenden sechs Monaten nachweisbar sind (Merlini et al. 1994; Miller et al. 1996). Ferner waren erhöhte Spiegel verschiedener Gerinnungsfaktoren und eine gesteigerte Gerinnungsaktivität mit Koronararterienstenose assoziiert (Kienast et al. 1993; Heinrich et al. 1995). Aufgrund dieser Erkenntnisse und der Beobachtung, dass die Prothrombinvariante G20210A nachweislich am Prozess der Arterienwandverdickung bei Individuen mit etablierter Atherosklerose beteiligt ist (Gerdes et al. 2002), scheint es plausibel, dass die G20210A-Mutation und die mit ihr in Verbindung stehende Hyperprothrombinämie auch zu einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen beitragen könnten. Zahlreiche Studien haben den Zusammenhang zwischen FII G20210A und koronarer Herzerkrankung untersucht und widersprüchliche Ergebnisse erzielt.

In einigen kleineren Untersuchungen kaukasischer Patienten- und Kontrollkollektive war die Trägerschaft der G20210A-Mutation mit einem erhöhten Risiko für die koronare Herzerkrankung beziehungsweise Myokardinfarkt assoziiert (Rosendaal et al. 1997; Watzke et al. 1997; Arruda et al. 1998; Doggen et al. 1998; Franco et al. 1999; Burzotta et al. 2002). Darüber hinaus konnte der FII-Polymorphismus in der bisher umfangreichsten Metaanalyse, die insgesamt 40 Studien involvierte, als moderater, aber signifikanter Risikofaktor für die koronare

Herzerkrankung gesichert werden (Ye et al. 2006). Im Gegensatz dazu schlossen prospektive Studien aus den USA, eine Vielzahl kleinerer Fall-Kontroll-Studien wie auch Metaanalysen aufgrund ihrer Ergebnisse diese Zusammenhänge aus (Corral et al. 1997; Ferraresi et al. 1997; Eikelboom et al. 1998; Ardissino et al. 1999; Croft et al. 1999; Prohaska et al. 1999; Redondo et al. 1999; Ridker et al. 1999; Coulet et al. 2000; Russo et al. 2001; Wu et al. 2001; Durante-Mangoni et al. 2002; Smiles et al. 2002; Kim et al. 2003; Zee et al. 2006).

Verschiedene Arbeiten deuteten aber auch darauf hin, dass das mit dem 20210A-Allel assoziierte Risiko für Koronararterienthrombose wesentlich von dem Alter der Patienten, dem Ausmaß der Atherosklerose und der Präsenz anderer kardiovaskulärer Risikofaktoren moduliert sein könnte. So waren besonders Mutationsträger mit zusätzlichen Hauptrisikofaktoren (Rosendaal et al. 1997; Doggen et al. 1998; Gardemann et al. 1999; Inbal et al. 1999), junge Patienten (Rosendaal et al. 1997; Arruda et al. 1997; Franco et al. 1999; Boekholdt et al. 2001; Burzotta et al. 2004 b) und Individuen mit begrenzter atherosklerotischer Beteiligung (Burzotta et al. 2000; van de Water et al. 2000; Burzotta et al. 2002; French et al. 2003) von einem gesteigerten kardiovaskulären Risiko betroffen. In anderen Studien wiederum ging die Präsenz des 20210A-Allels gerade bei den Individuen, die keine weiteren konventionellen Risikofaktoren aufwiesen, mit einem signifikant erhöhten Risiko für akute Koronarsyndrome wie auch einem ungünstigen Langzeitverlauf nach erstem akuten Koronarsyndrom einher (Burzotta et al. 2002; Burzotta et al. 2004 a). Die widersprüchlichen Resultate legen nahe, dass die Bedeutung der Prothrombinvariante G20210A als genetischer Risikofaktor in verschiedenen Patientengruppen und Populationen möglicherweise variieren kann und diesbezüglich noch Klärungsbedarf besteht.

Darüber hinaus existieren kaum Daten zur Bedeutung des prothrombotischen G20210A-Polymorphismus für das Auftreten schwerer Komplikationen (MACE) nach perkutaner Koronar-katheterintervention mit oder ohne Stenteinlage. Der Zusammenhang zwischen der FII-Variante G20210A und der Inzidenz unerwünschter kardialer Ereignisse (MACE) nach perkutaner Koronarintervention (PTCA, DCA, Stentimplantation) war bisher nur in einer einzigen Fall-Kontroll-Studie Untersuchungsgegenstand. Deren Ergebnisse indizierten, dass die G20210A-Mutation keinen Risikoprädiktor für unerwünschte kardiale Ereignisse nach erfolgreicher perkutaner Koronarintervention mit Stentimplantation darstellt (Marcucci et al. 2006).

1995 wurde bei einem tunesischen Patienten mit einem dysfunktionalen Prothrombin eine weitere Variante des FII-Gens, die G10253A-Mutation, beschrieben (Friezner Degen et al. 1995). Mit welcher Häufigkeit diese in der gesunden kaukasischen Allgemeinbevölkerung auftritt, und ob sie möglicherweise Auswirkungen auf die Aktivität des Gerinnungsfaktors II hat oder mit der

koronaren Herzerkrankung und deren klinischen Manifestationen assoziiert ist, ist bisher nicht untersucht worden. Es ist darüber hinaus unklar, ob ein Kopplungsungleichgewicht zwischen dem G20210A- und dem G10253A-Polymorphismus besteht.

1.2 Der Gerinnungsfaktor II und die Serinprotease Thrombin

Prothrombin ist das Vorläufermolekül des letzten proteolytischen Enzyms des Gerinnungsprozesses, Thrombin, dem eine zentrale Rolle in der Hämostase und Wundheilung zukommt, da es nicht nur prokoagulatorisch durch Plättchenaktivierung und Bildung von Fibrin und der Faktoren Va, VIIIa und XIIIa wirkt, sondern auch die Antikoagulation durch Aktivierung von zirkulierendem Protein C unterstützt und an der Herabregulierung der Fibrinolyse beteiligt ist (Bertina et al. 1992; Jackson 1994; Dang et al. 1995; Bajzar 2000).

Prothrombin wird in der Leber als einzelkettiges Glykoprotein synthetisiert und erfordert Vitamin K für seine korrekte Biosynthese (Stenflo et al. 1974). Das reife, aus 579 Aminosäuren, 10 γ -Carboxyglutaminsäureresten und drei Kohlenhydratketten bestehende Plasmaprotein ist im Blut in einer Konzentration von 100-200 $\mu\text{g/ml}$ nachweisbar (Nelsestuen et al. 1974; McDuffie et al. 1979; Friezner Degen et al. 1983; Furie und Furie 1988). Humanes Prothrombin wird von einem 21 kb langen Gen kodiert, das auf dem Chromosom 11 an der Position 11p11-q12 in der Nähe des Zentromers lokalisiert ist (Friezner Degen et al. 1983; Friezner Degen und Davie 1987; Royle et al. 1987). Das Prothrombingen besteht aus 14 Exons (25 bis 315 bp), die getrennt sind von 13 Introns (84 bis 9447 bp) mit der strangaufwärts gelegenen 5'-untranslatierten Region und der 3'-untranslatierten Region, die für die Regulation der Genexpression verantwortlich sein könnten (Friezner Degen und Davie 1987). In einem der letzten Schritte des Gerinnungsprozesses wird das Zymogen Prothrombin durch den FXa in Anwesenheit von FVa, Kalziumionen und einer Phospholipidoberfläche zu Thrombin aktiviert, das Fibrinogen zu Fibrin spaltet und zur Bildung eines Fibringerinnsels führt (Jackson 1978; Davie et al. 1991).

Neben seinen Effekten auf die Blutgerinnung induziert und moduliert Thrombin verschiedene zelluläre Ereignisse, die in vivo mit der Antwort auf Gefäßverletzung und Atherosklerose assoziiert sind (Ross 1994), wie zum Beispiel die Aktivierung von Plättchen zur Aggregation und Freisetzung von Serotonin (Vu et al. 1991; Vouret-Craviari et al. 1992), die Freisetzung von

PDGF-BB durch Endothelzellen (Harlan et al. 1986), die Erhöhung der Permeabilität des Gefäßendothels (Malik und Fenton 1992), die Induktion endothelialer Zellhyperadhäsivität und Neutrophilenadhäsion an Endothelzellen (Sugama und Malik 1992), die Stimulation der Kontraktion und Proliferation glatter Muskelzellen (Hollenberg et al. 1992; McNamara et al. 1993) und die Stimulation und Induktion der Chemotaxis und Proliferation von Monozyten (Bar-Shavit et al. 1986). Die vielfältigen Wirkungen von Thrombin sind in vereinfachter Weise in Abbildung 1 dargestellt (modifiziert nach Mann 1994).

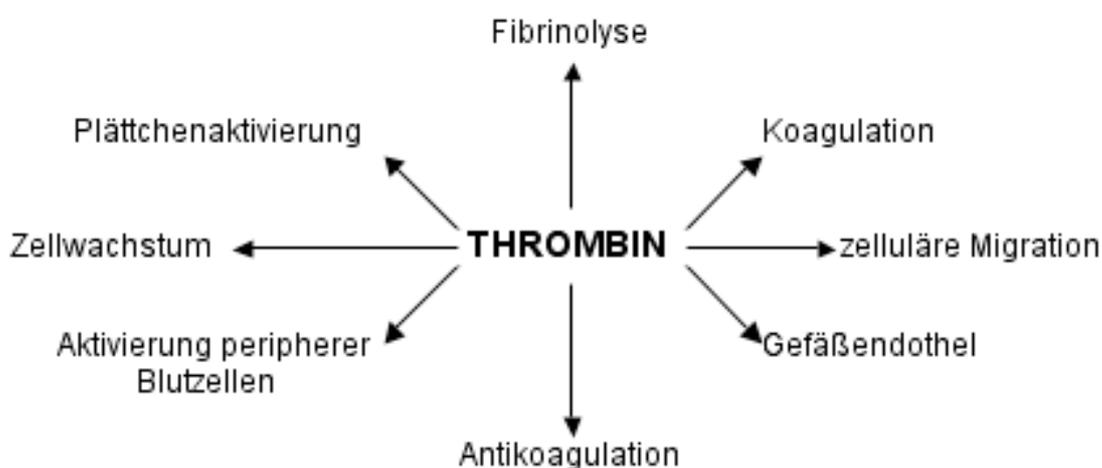


Abb. 1: Wirkungen der Serinprotease Thrombin

Die von Poort et al. identifizierte FII-Mutation G20210A geht sowohl mit erhöhter Immunoreaktivität und Aktivität des Plasmaprothrombins als auch mit einem gesteigerten Risiko für venöse Thrombose einher. Darüber hinaus stellt die Hyperprothrombinämie als solche einen moderaten Risikofaktor für venöse Thrombose dar (Poort et al. 1996).

Der zugrunde liegende Mechanismus, durch welchen die Hyperprothrombinämie zur Thrombose prädisponiert, ist jedoch noch ungeklärt. Es wird postuliert, dass die Hyperprothrombinämie in einer vermehrten Thrombinbildung beziehungsweise Gerinnungsaktivierung resultiert und so ein unverhältnismäßiges Wachstum von Fibringerinnseln fördert. Während verschiedene Studien anhand ihrer Ergebnisse die direkte Verbindung der G20210A-Mutation und der Hyperprothrombinämie mit einer vermehrten Thrombinbildung und Gerinnungsaktivierung stützten (Eikelboom et al. 1999; Franco et al. 1999; Bauer et al. 2000; Gouin-Thibault et al. 2002), ging

eine andere Untersuchungsgruppe von einer gesteigerten potentiellen Thrombinbildungskapazität nach Auslösung der Gerinnungskaskade bei Trägern der G20210A-Mutation aus (Kyrle et al. 1998). Ferner konnten sowohl eine durch die Hyperprothrombinämie hervorgerufene verminderte APC-unabhängige antikoagulatorische Aktivität von Protein S als auch eine hochregulierte Hemmung der Plasmafibrinolyse als mögliche Mechanismen für ein erhöhtes thrombotisches Risiko bei Trägern der Prothrombinvariante G20210A demonstriert werden (Koenen et al. 2003; Colucci et al. 2004).

Über den Zusammenhang von Veränderungen der Plasmaprothrombinaktivität mit dem Risiko für die koronare Herzerkrankung und ihre Komplikationen ist wenig bekannt, und es wurden diesbezüglich diskrepante Beobachtungen gemacht. Während die Prothrombinaktivität in einer italienischen Studie signifikant mit der koronaren Herzerkrankung assoziiert war (Russo et al. 2001), fand sich in derselben Untersuchung und in zwei weiteren Arbeiten kein Anhalt für eine Verbindung der FII-Gerinnungsaktivität mit akuten kardiovaskulären Ereignissen (Redondo et al. 1999; Russo et al. 2001; Smiles et al. 2002).

Die akute Koronarthrombose an der Stelle einer rupturierten atheromatösen Plaque wird als Hauptursache für den Myokardinfarkt und die instabile Angina pectoris angesehen (Fuster et al. 1992 a; Fuster et al. 1992 b). Sowohl die Ruptur einer atherosklerotischen Plaque als auch die schwere Gefäßverletzung nach Ballonangioplastie gehen unmittelbar mit der Bildung eines muralen Thrombus und großer Thrombinmengen einher (Harker et al. 1987; Marmur et al. 1994; Fuster et al. 1995). Die wichtige Rolle der Serinprotease Thrombin in der Bildung akuter plättchenreicher Thromben und in Heilungsprozessen nach Arterienverletzung ist zweifellos belegt (Eidt et al. 1989; Heras et al. 1990). Der plättchen- und fibrinreiche Thrombus und die freigelegte extrazelluläre Matrix können als Reservoir für aktives Thrombin dienen (Wilner et al. 1981; Bar-Shavit et al. 1989; Bar-Shavit et al. 1990), das wiederum auf viele verschiedene Proteine des Gerinnungssystems wirkt und ein sehr starker Aktivator der Thrombozyten ist (White et al. 1977; Bertina et al. 1992; Jackson et al. 1994; Dang et al. 1995), was es zu einem Schlüsselmediator in der pathologischen Entwicklung der plättchenabhängigen arteriellen Thrombose macht (Abb. 2 nach Maraganore 1993).

Die im Zusammenhang mit der FII G20210A-Mutation demonstrierten höheren Prothrombinspiegel könnten über eine vermehrte Thrombinbildung zur Thrombusbildung prädisponieren und damit einen potentiellen Risikofaktor nicht nur für die venöse, sondern auch für die arterielle Thrombose und das kardiovaskuläre Krankheitsgeschehen darstellen. Thrombin könnte aber auch über die von ihm vermittelten Zellaktivitäten, denen eine bedeutende Rolle in der

Entstehung und Ausbreitung atherosklerotischer Läsionen und der Vermittlung des Restenoseprozesses nach Ballonangioplastie zugeschrieben wird (Nobuyoshi et al. 1991; Ross 1994; Fagar 1995), zu einem erhöhten Risiko für die koronare Herzerkrankung beitragen.

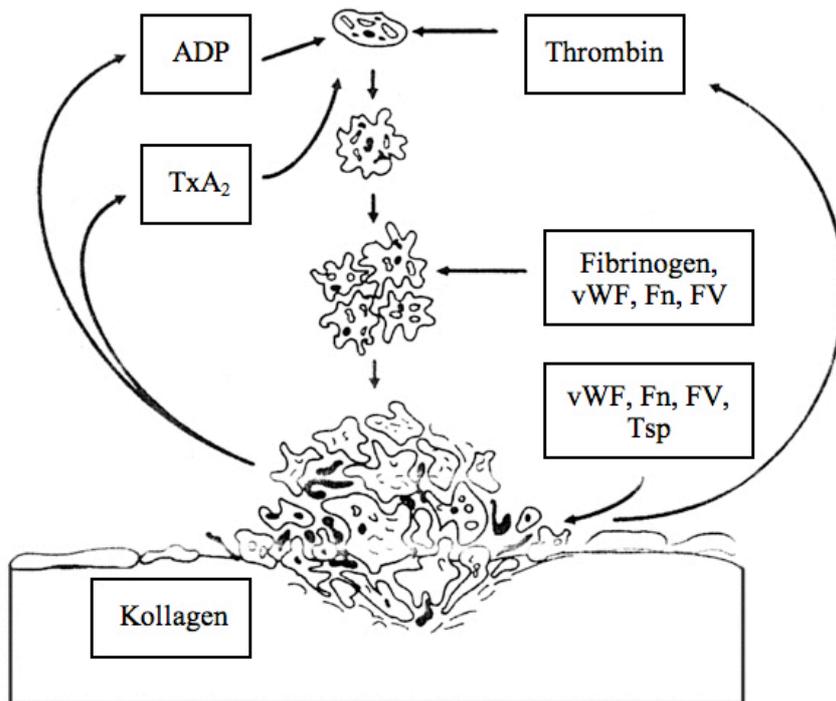


Abb. 2: Thrombin im arteriellen thrombotischen Prozess; ADP = Adenosindiphosphat, FV = Gerinnungsfaktor V, Fn = Fibronectin, vWF = von Willebrand Faktor, Tsp = Thrombospondin

1.3 Genetische Mutationen des Gerinnungsfaktors II (Prothrombin)

Prothrombinabnormalitäten wurden vor der Identifizierung der genetischen Variation G20210A eher mit seltenen Gerinnungsstörungen in Verbindung gebracht, die durch eine Hypo- oder Dysprothrombinämie verursacht sind. Erstere sind durch eine reduzierte Prothrombin-konzentration, letztere durch eine erniedrigte Aktivität und Konzentration des Gerinnungsfaktors II gekennzeichnet (Reiner und Davie 1995). Verschiedene dysfunktionale Prothrombine wurden

charakterisiert und aufgrund der Substitution einer einzelnen Aminosäure identifiziert (Roberts und Lefkowitz 1994).

1.3.1 FII G20210A-Mutation

Mit der Prothrombinvariante G20210A wurde die erste Mutation des FII-Gens beschrieben, die mit einer Hyperprothrombinämie assoziiert ist (Poort et al. 1996). Die Punktmutation führt zur Substitution der Purinbase Guanin durch Adenin (Transition) an der Position 20210, dem letzten Nukleotid der 3'-untranslatierten Region des Prothrombingens (Poort et al. 1996, Friezner Degen und Davie 1987). Die Position der G20210A-Mutation in der 3'-untranslatierten Region entspricht der Stelle, an der die prä-mRNA endonukleolytisch gespalten und polyadenyliert wird (Friezner Degen und Davie 1987).

Träger des 20210A-Allels hatten ein um bis zu 25 % höheres Plasmaprothrombin als Kontrollen mit dem normalen 20210GG-Genotyp (Poort et al. 1996). Die signifikante Variabilität der Aktivität und der Konzentration des Gerinnungsfaktors II als Funktion der G20210A-Genotypen fand in zahlreichen nachfolgenden Studien Bestätigung, wobei die höchsten Prothrombinaktivitäten bei Trägern des homozygoten 20210AA-Genotyps ermittelt wurden (Ferraresi et al. 1997; Kyrle et al. 1998; Franco et al. 1999; von Ahsen et al. 2000; Soria et al. 2000; Russo et al. 2001). Eine im Rahmen einer familienbasierten Studie durchgeführte Kopplungsanalyse stützte mit ihren Resultaten nachhaltig die Hypothese, dass FII G20210A einen funktionellen Polymorphismus darstellt (Soria et al. 2000).

In einer großen multizentrischen Studie wurde eine Prävalenz des Einzelnukleotidpolymorphismus G20210A von 2,0 % (95 % CI 1,4 % - 2,6 %) in der kaukasischen Allgemeinbevölkerung ermittelt, wobei sich innerhalb Europas keine einheitliche Verbreitung zeigte und in den südeuropäischen Populationen fast doppelt so viele Träger der Genvariante wie in den Populationen des nördlichen Europas (3,0 % vs. 1,7 %) identifiziert werden konnten (Rosendaal et al. 1998). Die höchsten Prävalenzwerte der FII-Mutation bei gesunden Individuen (5,5 % - 6,7 %) wurden in den seit Generationen ansässigen Populationen des Nahen Ostens, wie den Aschkenasim- oder Sephardim-Juden, beobachtet (Zivelin et al. 1998).

Neben den geographischen Differenzen innerhalb Europas wurden auch ethnische Verteilungsunterschiede deutlich, und verschiedene Arbeiten bestätigten die Annahme, dass die G20210A-Mutation eher auf kaukasische Populationen beschränkt ist. So fanden sich bei Individuen mit afrikanischem oder asiatischem Hintergrund sowie in stark isolierten Populationen wie den Grönland-Eskimos oder den brasilianischen Indianern keine beziehungsweise nur vereinzelt Mutationsträger (Arruda et al. 1997; de Maat 1998; Franco et al. 1998; Isshiki et al. 1998; Rosendaal et al. 1998; Rees et al. 1999; Garewal et al. 2003). Ergebnisse einer Analyse von Haplotypen, die mit G20210A assoziiert sind, unterstützten die Hypothese eines einzigen Ursprunges der FII-Mutation (Zivelin et al. 1998). Es wird angenommen, dass das Mutationsereignis vor ungefähr 24.000 Jahren auftrat, und dass die weite Verbreitung bei Kaukasiern auf selektiven evolutionären Vorteilen wie vermindertem Blut- und Eisenverlust durch Trauma, Menstruation oder Geburt beruhen könnte (Rees et al. 1999; Zivelin et al. 2006).

Es existieren verschiedene Vorstellungen zum molekularen Mechanismus, durch welchen die G20210A-Mutation in einer gesteigerten Prothrombinexpression resultiert. Die mit dem 20210A-Allel assoziierte vermehrte mRNA-Akkumulation und gesteigerte Proteinsynthese könnten sowohl durch eine effektivere mRNA-Bearbeitung, wie verbesserte Schnittstellen-erkennung und Bearbeitung des 3'-Endes, als auch durch eine verlängerte Halbwertszeit des Prothrombintranskriptes verursacht sein (Gehring et al. 2001; Carter et al. 2002; Ceelie et al. 2004). Andere Untersucher gingen anhand ihrer Ergebnisse davon aus, dass sich die G20210A-Mutation nicht wesentlich auf die Stabilität der Prothrombin-mRNA *in vivo* auswirkt, sondern die Position der 3'-Polyadenylierungsreaktion und damit die Translationseffizienz beeinflusst (Pollak et al. 2002). Eine alternative Erklärung lieferte eine Studie mit der Beobachtung, dass die Polyadenylierung an Position 20210, an der alle 20210A-mRNAs polyadenyliert werden, in der Synthese stärker glykosylierter Prothrombinformen mit größerer Stabilität und längerer Halbwertszeit resultiert (Pollak et al. 2002; Gelfi et al. 2004).

In familienbasierten Studien wurde demonstriert, dass die Prothrombinspiegel eine signifikante genetische Komponente aufweisen und somit genetische Faktoren eine entscheidende Rolle in der Festlegung der Prothrombinspiegel spielen (Soria et al. 2000; Souto et al. 2000).

Die Verbindung zwischen der G20210A-Mutation und der Höhe des Prothrombins könnte aber auch auf eine indirekte Korrelation aufgrund eines Kopplungsungleichgewichtes der G20210A-Stelle und einer anderen Sequenzvariation innerhalb des Prothrombingens zurückzuführen sein. Während in der Promotorregion (ab -1050 bp) keine Sequenzpolymorphismen identifiziert

werden konnten, die im Kopplungsungleichgewicht mit der G20210A-Mutation sind (Poort et al. 1996; Zivelin et al. 1998; Ceelie et al. 2001), wurde an der Nukleotidposition 19911 des Prothrombingens ein weitere DNA-Variante beschrieben, die sich im kompletten Kopplungsungleichgewicht mit der G20210A-Mutation befand (Zivelin et al. 1998; Perez-Ceballos et al. 2002). Der A19911G-Polymorphismus ging auch nachweislich mit einem leicht erhöhten Plasmaprothrombin einher, obwohl der Effekt des 19911G-Allels im Vergleich zum 20210A-Allel eher gering ausfiel (Ceelie et al. 2001; Perez-Ceballos et al. 2002). Der 19911AG-Genotyp modifizierte jedoch nicht wesentlich das Risiko für die Entwicklung einer arteriellen Thrombose bei gleichzeitiger Präsenz des heterozygoten 20210GA-Genotyps (Perez-Ceballos et al. 2002).

Obwohl die FII-Mutation G20210A einen hochsignifikanten Effekt auf die Prothrombinaktivität hat und für einen großen Teil der Varianz in der Prothrombinaktivität verantwortlich ist, verbleibt ein bedeutender Rest an genetischer Variation in der Prothrombinaktivität, was den Einfluss anderer unbekannter Gene auf die Prothrombinaktivität nahe legt (Soria et al. 2000).

1.3.2 FII G10253A-Mutation

Die durch DNA-Sequenzanalyse in der kodierenden Region des FII-Gens identifizierte G10253A-Mutation führt zur Substitution der Purinbase Guanin durch Adenin an der Nukleotidposition 10253 im Exon XII, das für einen Teil des katalytischen Thrombinbereiches kodiert. Die Mutation tritt an der dritten Position des Codons für die Aminosäure Prolin-491 auf (Friezner Degen et al. 1995). Vergleichbar mit verschiedenen anderen Sequenzvariationen, die sogenannte neutrale Polymorphismen darstellen, beeinflusst die Präsenz des 10253A-Allels nicht die Aminosäuresequenz des Prothrombins (Friezner Degen und Davie 1987).

Der G10253A-Polymorphismus fand Bestätigung in einer Arbeit, die das abnorme Prothrombingen eines italienischen Patienten mit schwerer Blutungsneigung und Hypoprothrombinämie mit den Prothrombingenen gesunder Kontrollen verglich (Poort et al. 1997). Bei insgesamt 68 getesteten Allelen wurde eine Allelfrequenz von 4 % für das A-Allel ermittelt, wobei die Sequenzvariation sowohl bei dem Patienten als auch bei den gesunden Kontrollen (66 Allele) nachgewiesen wurde (Poort et al. 1997). Die Positionen der G20210A- und der G10253A-Mutation auf dem FII-Gen sind vereinfacht in Abbildung 3 dargestellt.

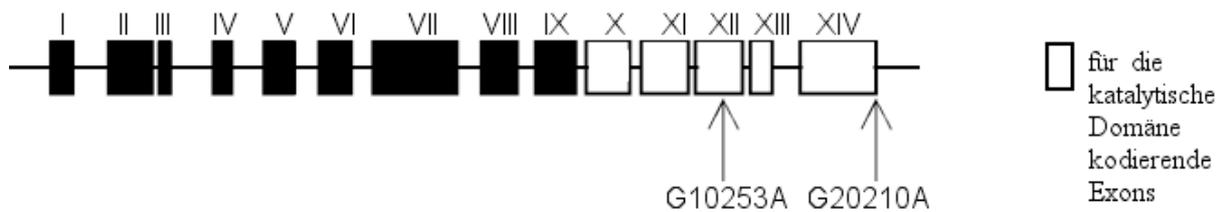


Abb. 3: Schematische Darstellung der Struktur des Prothrombingens und Position der Mutationen G20210A und G10253A

1.4 Fragestellung

Nachdem die G20210A-Mutation als genetischer Risikofaktor für die venöse Thrombose gesichert wurde (Poort et al. 1996), legten verschiedene Studienergebnisse nahe, dass die Prothrombinvariante auch einen genetischen Prädispositionsfaktor für das kardiovaskuläre Krankheitsgeschehen, insbesondere für die akuten Koronarsyndrome, darstellen könnte. Fänden die Positivresultate in der vorliegenden Arbeit Bestätigung, so könnte die FII-Mutation als hereditärer Suszeptibilitätsfaktor im Sinne einer individualisierten Therapie und Thromboseprophylaxe zur Identifizierung von Patientengruppen herangezogen werden, die einer intensiveren Überwachung und Therapie, beispielsweise nach Katheterintervention, bedürfen.

Ziel der vorliegenden Studie im Fall-Kontroll-Design ist es, zu untersuchen, ob eine Assoziation zwischen den FII-Mutationen G20210A und G10253A und dem Risiko für die koronare Herzerkrankung, vor allem dem Risiko für das Auftreten akuter Koronarsyndrome sowie dem erhöhten Risiko für schwere Komplikationen innerhalb der ersten 30 Tage nach perkutaner Koronarintervention (Tod, Myokardinfarkt, Notwendigkeit der erneuten Revaskularisation) besteht. Dafür wurden einer Gruppe von 1000 deutschen Patienten mit angiographisch gesicherter koronarer Herzerkrankung 1000 Kontrollen desselben geographischen und ethnischen Hintergrundes gegenübergestellt.

Darüber hinaus wird erstmalig in einem großen Patienten- und Kontrollkollektiv kaukasischer Herkunft die Prävalenz der FII-Mutation G10253A bestimmt und geprüft, ob eine Verbindung mit dem G20210A-Polymorphismus besteht.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenpopulation und Studiendesign

Zwischen Oktober 1995 und Januar 1997 wurden für eine große molekular-epidemiologische Fall-Kontroll-Studie konsekutiv 1000 Patienten mit angiographisch gesicherter koronarer Herzerkrankung rekrutiert, die zur diagnostischen Koronarangiographie oder zu einer Koronarintervention in die Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie, Angiologie und Pneumologie der Charité, dem Universitätsklinikum der Humboldt-Universität Berlin, eingewiesen wurden (Laule et al. 1999). Gleichzeitig konnten weitere 1000 Patienten, die nach Alter, Geschlecht und Zeitpunkt der Krankenhausaufnahme zu den KHK-Patienten gepaart waren, als Kontrollkollektiv gewonnen werden. Die Patienten der Kontrollgruppe stammten aus verschiedenen Abteilungen der Charité (Medizinische Klinik, Neurologie, Dermatologie, Chirurgie, Orthopädie, Gynäkologie, Geburtshilfe, Hals-Nasen-Ohren-Abteilung und Urologie) und deren Erkrankungsspektrum entsprach dem des Klientels eines großen Universitätsklinikums. Die Kontrollpatienten wiesen weder Zeichen einer koronaren Herzerkrankung noch einer anderen kardiovaskulären Erkrankung auf, was durch Anamnese, klinische Untersuchung, Elektrokardiogramm, Echokardiogramm und eine Röntgenaufnahme des Thorax gesichert wurde. Weitere Ausschlusskriterien waren die arterielle Verschlusskrankheit und schwere systemische Erkrankungen, einschließlich Nierenversagen und Vaskulitis, die potentiell Einfluss auf das kardiovaskuläre Risikoprofil oder den Gerinnungsstatus nehmen könnten. Alle Patienten waren deutsche Kaukasier aus Berlin und Umgebung.

673 der 1000 Patienten mit koronarer Herzerkrankung erhielten eine Katheterintervention (perkutane transluminale Koronarangioplastie, direktionale Atherektomie, Stentimplantation) und wurden prospektiv über 30 Tage hinsichtlich des Auftretens unerwünschter schwerer kardialer Ereignisse (MACE) beobachtet. Diese Ereignisse wurden als Tod, Myokardinfarkt und Notwendigkeit einer erneuten Revaskularisation des Zielgefäßes (PTCA oder Bypass-Operation) definiert und als kombinierter 30-Tage-Endpunkt erfasst. Die Indikationen für die Koronarangioplastie stimmten mit den Richtlinien der American Heart Association / American College of Cardiology Guidelines überein (Ryan et al. 1993). Innerhalb der KHK-Gruppe fand eine Einteilung nach quantitativen angiographischen Kriterien statt. Erfahrene Kardiologen, die hinsichtlich der Identität und des Verlaufs der Patienten verblindet waren, beurteilten die Angiogramme. Die Definition der KHK forderte die Stenose einer großen Koronararterie oder eines wichtigen Seitenastes von 50 % oder mehr.

Die Schwere der Erkrankung wurde nach der Anzahl der betroffenen Arterien (Ein-, Zwei- oder Dreifäßerkrankung) klassifiziert. Die Diagnose des Myokardinfarktes stützte sich neben den gültigen WHO-Kriterien (World Health Organization 1979) auf die angiographischen Befunde. Unter akuten Koronarsyndromen wurden der akute Myokardinfarkt und die instabile Angina pectoris subsumiert.

Alle an der Studie teilnehmenden Patienten wurden nach den bestehenden Ethikrichtlinien über den Einsatz des Probenmaterials aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis hierzu. Das Studienprotokoll wurde 1994 von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Charité genehmigt.

2.2 Materialien

Nachfolgend aufgeführte Materialien fanden Anwendung:

1. zur DNA-Extraktion

- Ethanol 99,5 % (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Phenol 99,5 % (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Chloroform (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Tris (Trishydroxymethylaminomethan HCl, Merck, Darmstadt, Deutschland)
- 1x Lyse-Puffer (1,15 mol/l Ammoniumchlorid, 0,1 mol/l Kaliumhydrogencarbonat, 1 mmol/l Na-EDTA)
- 1x TEN-Puffer (0,2 mol/l Tris HCl pH 7,5, 0,02 mol/l EDTA, 0,3 mol/l NaCl, ad 1 Liter H₂O)
- 1x TBE-Puffer (0,9 mol/l Tris, 0,9 mol/l Borsäure, 25 mmol/l EDTA ad 1 Liter H₂O, pH 8,0-8,3)
- Proteinase K (1-2 mg gelöst in 20 mmol/l Tris HCl, Boehringer-Mannheim, Mannheim, Deutschland)

2. zur PCR-Amplifikation und Schmelzkurvenanalyse mit dem LightCycler™

- dNTP mit dUTP (dATP, dCTP, dGTP je 2 mM, dUTP 4 mM, Rapidozym, Berlin, Deutschland)
- 10x BioTherm™ Puffer (Rapidozym, Berlin, Deutschland)
- BioTherm™ DNA-Polymerase (5 U/µl, Rapidozym, Berlin, Deutschland)
- Uracil-DNA-Glycosylase (1 U/µl, MBI Fermentas, Vilnius, Litauen)
- Magnesiumchlorid (MgCl₂, 25 mM, Perkin Elmer, Boston, USA)
- Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Bovines Serumalbumin (BSA, 10 mg/ml, New England Bio Labs, USA)
- Oligonukleotidprimer (10 µM, TIB Molbiol, Berlin, Deutschland)
- Hybridisierungssonden (10 µM, TIB Molbiol, Berlin, Deutschland)

3. zur PCR-RFLP-Analyse

- dNTP (2 mmol/l, Rapidozym, Berlin, Deutschland)
- 10x BioTherm™ Puffer (Rapidozym, Berlin, Deutschland)
- BioTherm™ DNA-Polymerase (Rapidozym, Berlin, Deutschland)
- Oligonukleotidprimer (10 µM, TIB Molbiol, Berlin, Deutschland)
- Magnesiumchlorid (MgCl₂, 50 mM, Rapidozym, Berlin, Deutschland)
- HINDIII (10 U/µl, MBI Fermentas, Vilnius, Litauen)
- Puffer R⁺ (10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0,1 mg/ml BSA, MBI Fermentas, Vilnius, Litauen)
- Qualex Gold™ Agarose (AGS, Heidelberg, Deutschland)
- Marker 50 bp (0,1 µg/µl, Basenpaarspektrum 50 bp-1031 bp, Fermentas, Vilnius, Litauen)
- Proben-Auftragspuffer (15 % FICOLL Typ 400 Pharmacia, Uppsala, Schweden, 0,25 % Bromphenolblau, 1x TBE)
- SYBR® Green (10.000x Konzentrat in DMSO, Eugene, Oregon, USA)

4. zur DNA-Sequenzierung

- dNTP mit dUTP (dATP, dCTP, dGTP je 2 mM, dUTP 4 mM, Rapidozym, Berlin, Deutschland)
- 10x BioTherm™ Puffer (Rapidozym, Berlin, Deutschland)

- BioTherm™ DNA-Polymerase (Rapidozym, Berlin, Deutschland)
- Uracil-DNA-Glycosylase (1 U/μl, MBI Fermentas, Vilnius, Litauen)
- Magnesiumchlorid (MgCl₂, 50 mM, Rapidozym, Berlin, Deutschland)
- Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Bovines Serumalbumin (BSA, 10 mg/ml, New England Bio Labs, USA)
- Oligonukleotidprimer, 10 μM (TIB Molbiol, Berlin, Deutschland)
- dNTP (2 mmol/l, Rapidozym, Berlin, Deutschland)
- DNA-Sequencing Kit Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, Warrington, United Kingdom)
- 310 Genetic Analyzer POP-4™ (Applied Biosystems, Warrington, United Kingdom)

5. zur Bestimmung der FII-Aktivität

- Thromboplastinreagenz (Immuno GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- FII-Mangelplasma (Immuno GmbH, Heidelberg, Deutschland)

Die Blutentnahmen erfolgten nach Möglichkeit morgens nach einer Nahrungskarenz von mindestens zehn Stunden. Zur Bestimmung der klinisch-chemischen Parameter und der Gerinnungsfaktoren fanden Anwendung:

- 4,9 ml Citrat-Röhrchen (Sarstedt, Deutschland)
- 10,0 ml EDTA-Röhrchen (Sarstedt, Deutschland)
- 10,0 ml Serum-Röhrchen (Sarstedt, Deutschland)
- 10,0 ml Plasma-Röhrchen (Sarstedt, Deutschland)

2.3 DNA-Isolierung

Von jedem Patienten wurden 3-10 ml venösen Blutes gewonnen, dessen Koagulation durch EDTA verhindert wurde. Die Gewinnung der genomischen DNA aus den Leukozyten erfolgte nach einem Proteinase-K-Verdau durch eine manuelle Standard-Phenol-Chloroform-Extraktion (Sambrook et al. 1989) oder mit Hilfe eines halbautomatischen DNA-Extraktors (Model 341A, Applied Biosystems, Weiterstadt). Die Aufbewahrung erfolgte bei 4 °C.

2.4 Methoden der Genotypisierung

Die Patienten- und Kontrollproben wurden auf die Anwesenheit der FII-Mutationen G20210A und G10253A mittels Echtzeit-Fluoreszenz-PCR und Schmelzkurvenanalyse mit dem LightCycler™ (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA) untersucht. Zur Qualitätskontrolle wurde bei der G20210A-Mutation eine PCR-RFLP-Analyse bei 230 konsekutiven Proben durchgeführt. Bei der G10253A-Mutation fand zur Bestätigung der mit dem LightCycler™ gewonnenen Ergebnisse eine DNA-Sequenzanalyse bei 14 ausgewählten Proben statt.

2.4.1 Echtzeit-Fluoreszenz-PCR und Schmelzkurvenanalyse mit dem LightCycler™

Für die Detektion der G20210A-Mutation wurde ein 270 bp langes DNA-Fragment des Prothrombingens amplifiziert. Die verwendeten Primer entsprachen der zuvor publizierten Methode von Aslanidis et al., die fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden der Methode von von Ahsen et al. (von Ahsen et al. 1999, Aslanidis et al. 1999). Bei der G10253A-Mutation erfolgte die Amplifikation eines 122 bp langen DNA-Fragmentes des FII-Gens. Primer- und Sondendesign stammten von TIB Molbiol, Berlin.

Tab. 1: Oligonukleotidprimer für die Amplifikation der Zielsequenzen des Prothrombingens

Primer	Primerlänge (nt)*	Fragmentlänge (bp)	Nukleotidsequenz	Spezifität
<u>G20210A</u>				
P 20210for	20064 - 20083	270	5'-TCCgCCTgAAgAAgTggATA	Prothrombin-Gen (5')
P 20210rev	20333 - 20311	-	5'-gAgTgCTCggACTACCAgCgTgC	Prothrombin-Gen (3')
<u>G10253A</u>				
P 10253for	10203 - 10219	122	5'-gggCAgCCCAGTgTCCT	Prothrombin-Gen (5')
P 10253rev	10324 - 10308	-	5'-CCgCCCTgCACAgACTT	Prothrombin-Gen (3')

* Nukleotidposition im humanen Prothrombingen

Die eingesetzten Oligonukleotidprimer und Hybridisierungssonden sind in der Tabelle 1 und 2 charakterisiert.

Tab. 2: Charakterisierung der fluoreszenzmarkierten Oligonukleotid-Hybridisierungssonden

Oligonukleotide	Bindungsposition (nt)*	Nukleotidsequenz
<u>G20210A</u>		
PT 20210 wt	20204 - 20220	5'-CTCAgCgAgCCTCAATg X
PT 20210 anchor	20222 - 20241	5'-LCRed640-TCCCAgTgCTATTCATgggC p
<u>G10253A</u>		
PT 10253 wt	10266 - 10249	5'-AgTCCTTgCAgACCggCC X
PT 10253 anchor	10247 - 10224	5'-LCRed640-CTCCACAATgggCAggTTCACCAC p

* Nukleotidposition im humanen Prothrombingen

Tab. 3: Reagenzien der Reaktionsansätze für die PCR-Amplifikation auf dem LightCycler™

Reagenzien	G20210A	G10253A
10x Puffer	2,0 µl	2,0 µl
dNTP mit dUTP	1,0 µl	1,0 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2,0 µl	-
MgCl ₂ (50 mM)	-	0,6 µl
DMSO (100 %)	1,0 µl	1,0 µl
BSA (1 mg/ml)	0,6 µl	0,6 µl
Biotherm Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl	0,2 µl
Uracil-DNA-Glycosylase	0,5 µl	0,5 µl
Vorwärtsprimer (10 µM)	0,4 µl	0,4 µl
Rückwärtsprimer (10 µM)	0,4 µl	0,4 µl
Sensorsonde	0,2 µl	0,2 µl
Ankersonde	0,2 µl	0,2 µl
H ₂ O	11,5 µl	12,9 µl
Endvolumen	20,0 µl	20,0 µl

Die Reaktionsansätze von 20 µl, denen 1 µl (100 ng/µl) genomische Proben-DNA hinzugefügt wurde, beinhalteten die in der Tabelle 3 aufgeführten Reagenzien. Die Reaktionsbedingungen für die PCR-Amplifikation beider Zielsequenzen sind in Tabelle 4 dargestellt.

Die Reaktionsbedingungen für die Aufnahme der Schmelzkurven waren für beide FII-Mutationen identisch: 40 s 95 °C (Heizrate 20 °C/s), 40 s 40 °C (Heizrate 20 °C/s) und 0 s 80 °C (Heizrate 0,2°C).

Tab. 4: Reaktionsbedingungen für die PCR-Amplifikation auf dem LightCycler™. Für die G10253A-Mutation abweichende Werte sind in Klammern angegeben.

	Anzahl Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Heizrate (°C/s)
Initiale Denaturierung	1	95	40	20
Denaturierung	-	94	0	20
Annealing	45 (40)	63 (60)	12	20
Elongation	-	72	12	2

Je nach vorliegendem Genotyp ergaben sich bei beiden FII-Varianten unterschiedliche Schmelztemperaturen T_m (Tab. 5) und Schmelzkurven (Abb. 4 und Abb. 5).

Tab. 5: Schmelztemperaturen T_m in Abhängigkeit der verschiedenen Genotypen an der Position 20210 und 10253 des Prothrombingens

Mutation	Genotyp	T_m (A-Allel)	T_m (G-Allel)	ΔT zwischen Schmelzpunkten
FIIG20210A	GG	-	59 °C	-
	GA	53 °C	59 °C	6 °C
FIIG10253A	GG	-	63 °C	-
	GA	54 °C	63 °C	9 °C
	AA	54 °C	-	-

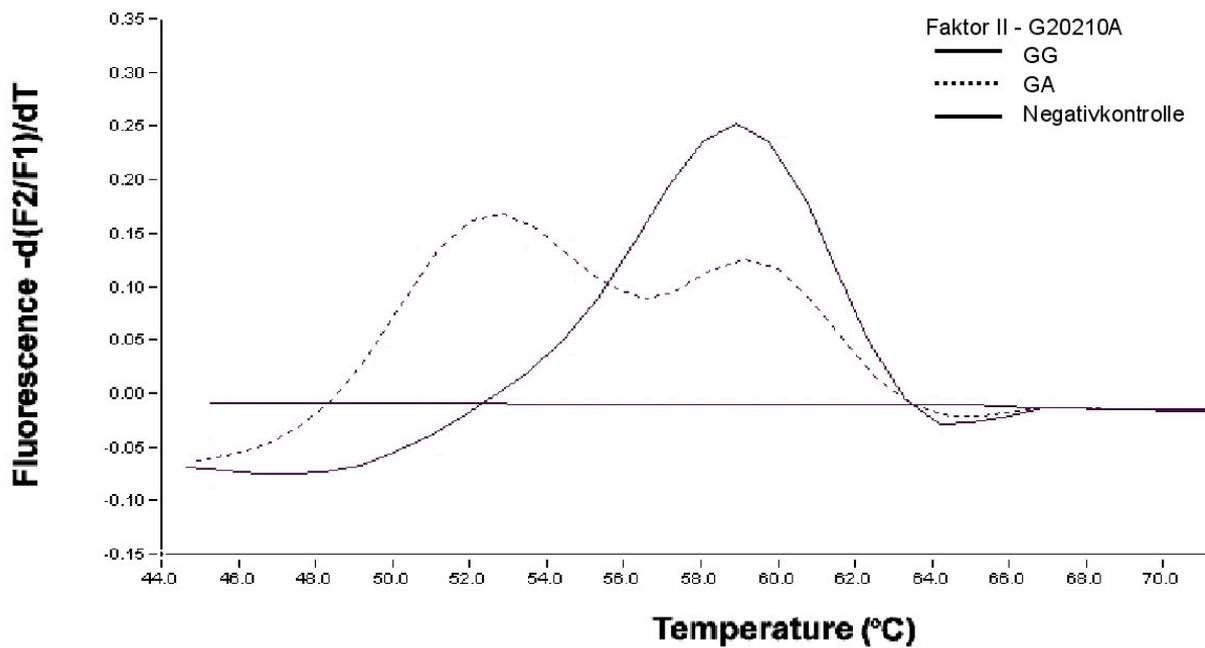


Abb. 4: Differenzierung der Genotypen an Position 20210 des Prothrombin-Gens mit der Schmelzkurvenanalyse

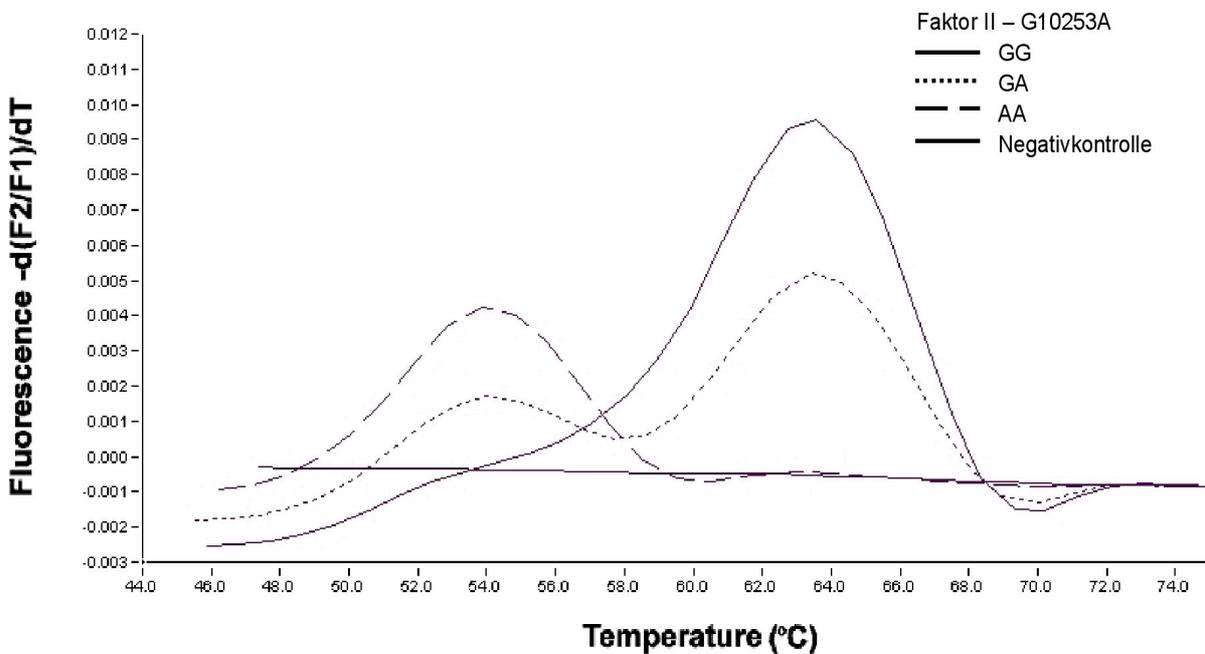


Abb. 5: Differenzierung der Genotypen an Position 10253 des Prothrombin-Gens mit der Schmelzkurvenanalyse

2.4.2 PCR-RFLP-Analyse bei der FIIG20210A-Mutation

Ein 345 bp langes Fragment des Prothrombingens wurde mittels PCR (Saiki et al. 1988) amplifiziert und anschließend mit dem Restriktionsenzym HINDIII verdaut. Die Zielsequenz wurde von den in der Tabelle 6 dargestellten Oligonukleotidprimern PT 1 und PT 2 eingegrenzt. Die Primer sowie der Verdau mit HINDIII entsprachen der von Poort und Kollegen publizierten Methode (Poort et al. 1994, Poort et al. 1996). Durch Einfügen einer Mismatch-Base in den 3'-Primer wurde in Abhängigkeit von der Präsenz der Mutation eine HINDIII-Schnittstelle geschaffen.

Der PCR-Ansatz von 30 µl, dem 1 µl (100 ng/µl) genomische Proben-DNA hinzugefügt wurde, bestand aus folgenden Reagenzien: 3 µl 10x Puffer, 0,8 µl MgCl₂ (50 mM), 1 µl dNTP, 0,2 µl Polymerase, 0,5 µl Primer PT 1, 0,5 µl Primer PT 2, 24 µl H₂O.

Die Reaktionsgefäße wurden in den auf 94 °C temperierten Thermocycler (Gene Amp[®] PCR System 9700, Perkin Elmer) überführt. Die PCR lief unter folgenden Bedingungen ab: 3 min initiale Denaturierung bei 94 °C; 35 Zyklen von je 30 s Denaturierung bei 94 °C, 30 s Primer-Annealing bei 60 °C und 30 s Elongation bei 72 °C; 4 min terminale Elongation bei 72 °C. Anschließend wurden die Proben auf 4 °C gekühlt.

Tab. 6: Oligonukleotidprimer für die PCR-Amplifikation des 345 bp Fragmentes. Das mit dem Pfeil markierte Nukleotid im 3'-Primer kennzeichnet die Mismatch-Base.

Primer	Primerlänge (nt)*	Fragmentlänge (bp)	Nukleotidsequenz	Spezifität
PT 1	19889-19908	345	5'-TCTAgAAACAgtTgCCTggC	Prothrombin-Gen (5')
PT 2	20233-20212	-	5'-ATAgCACTgggAgCATTgAAgC ↑	HINDIII-site 20210 (3')

* Nukleotidposition im humanen Prothrombingen

Der Erfolg der PCR wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Dafür wurden 5 µl des PCR-Produktes mit 10 µl Proben-Auftragspuffer versetzt und auf einem 2 % Agarosegel bei 100 V für 30 min aufgetrennt. Als Elektrophoresepuffer diente ein üblicher 1x TBE-Puffer. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden anschließend mithilfe der Restriktionsendonuklease

HINDIII (Erkennungssequenz 5'...A↓AGCTT...3') verdaut.

Diese Reagenzien fanden beim HINDIII-Verdau Anwendung: 15 µl PCR-Produkt (PT 1 / PT 2), 2,5 µl 10x Puffer R⁺, 1 µl HINDIII (10 U/µl), 6,5 µl H₂O. Inkubation über Nacht bei 37 °C.

12 µl des Reaktionsproduktes wurden mit 10 µl Laufpuffer versetzt und auf ein 3 % Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V für 150 min. Als Größenstandard wurden 4,5 µl des 50 bp DNA-Markers parallel aufgetrennt. Für die Gelfärbung fand Sybr[®]Green Anwendung (25 µl Farbstoff auf 500 ml 1x TBE-Puffer). Das Fragmentmuster wurde mit dem EagleEye[®] Still-Videosystem (Stratagene, La Jolla, USA) dokumentiert.

Der normale 20210GG-Genotyp zeigte aufgrund der fehlenden Schnittstelle ein 345-bp-Fragment, während zwei Banden (345 bp und 322 bp) für den 20210GA-Genotyp kennzeichnend waren (Abb. 6). Als Positiv-Kontrolle wurde bei jedem Reaktionsansatz eine bekannte heterozygote Probe mitgeführt.

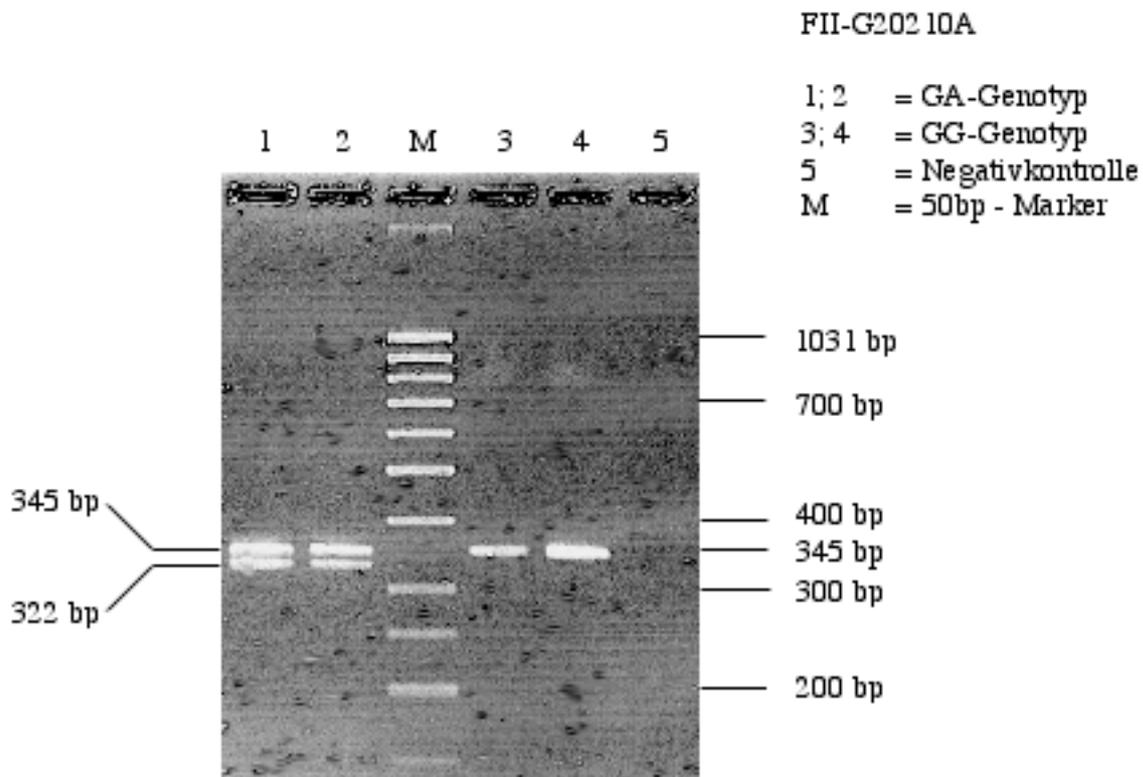


Abb. 6: 3 % Agarose-Gelelektrophorese von 345-bp-Fragmenten zur Detektion der Mutation an FII-Genposition 20210

2.4.3 DNA-Sequenzierung bei der FIIG10253A-Mutation

Ein 122 bp messendes Fragment des Prothrombingens wurde mit den in Tabelle 7 aufgeführten Primern auf dem LightCycler™ (Roche Diagnostics) amplifiziert.

Der PCR-Ansatz (20 µl) bestand aus folgenden Reagenzien: 2 µl 10x Puffer, 1 µl dNTP mit dUTP, 0,6 µl MgCl₂ (50 mM), 1 µl DMSO (100 %), 0,6 µl BSA (1 mg/ml), 0,5 µl Uracil-DNA-Glycosylase, 0,2 µl Taq-Polymerase, 0,4 µl 5'-Primer 10253F, 0,4 µl 3'-Primer 10253R, 13,3 µl H₂O. Dem Ansatz wurde 1 µl (100 ng/µl) genomische DNA hinzugefügt.

Die PCR-Amplifikationsbedingungen waren folgende: Nach initialer Denaturierung von 40 s bei 95 °C folgten 45 Zyklen von jeweils 0 s 94 °C, 12 s 60 °C und 12 s 72 °C. Der PCR-Erfolg wurde durch eine 2 % Agarose-Gelelektrophorese bei 100 V für 30 min überprüft.

Zur Verlängerung des PCR-Produktes und besseren Detektion der G10253A-Mutation wurde von dem bestehenden 122-bp-Fragment eine Reamplifikation mit den modifizierten Primern P 10253-52F und P 10253-100R auf dem Thermocycler (Gene Amp® PCR System 9700, Perkin Elmer) durchgeführt. Die zur PCR-Amplifikation und Reamplifikation eingesetzten Oligonukleotide sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tab. 7: Charakterisierung der Primer für die PCR-Amplifikation und Reamplifikation

Primer	Primerlänge (nt)*	Fragmentlänge (bp)	Sequenz	Spezifität
P 10253F	10203-10219	122	5'-gggCAgCCCAgTgTCCT	Prothrombin-Gen (5')
P 10253R	10324-10308	-	5'-CCgCCCTgCACAgACTT	Prothrombin-Gen (3')
P 10253-52F		188	5'-AgTCTggCTTCCTgggTTgggCTCCCAACgTTggTAAggggCAgCCCAgTgTCCT	5'
P 10253-100R		-	5'-ggggACAggATgAAgTggACgCCTCAgCCCgCCCTgCACAgACT	3'

* Nukleotidposition im humanen Prothrombingen

Der Ansatz für die Reamplifikation hatte ein Endvolumen von 20 µl und setzte sich wie folgt zusammen: 2,0 µl 10x Puffer, 2 µl dNTP, 0,6 µl MgCl₂ (50 mM), 0,2 µl Taq-Polymerase, 0,5 µl Primer P 10253-52F, 0,5 µl Primer P 10253-100R, 14,2 µl H₂O. 2 µl des 1:10 verdünnten PCR-Produktes wurden dem Ansatz zugesetzt.

Folgende Reaktionsbedingungen lagen der Reamplifikation zugrunde: Der initialen Denaturierung bei 94 °C für 2 min schlossen sich 15 Zyklen von jeweils 40 s 94 °C, 40 s 60 °C und 1 min 72 °C sowie abschließend für 4 min 72 °C an.

Es wurde eine Produktkontrolle mittels 2 % Agarose-Gelelektrophorese für 30 min bei 100 V durchgeführt.

Nach der Reamplifikation wurden die PCR-Produkte von nicht gebundenen Primern und Salzen gereinigt. Dafür wurden diese mit H₂O auf 50 µl aufgefüllt und quantitativ in eine Millipore-Multiscreen-PCR-Platte überführt. Nach Absaugen des Überstandes durch Anlage eines Vakuums wurden 200 µl H₂O in die Millipore-Platte pipettiert; wiederum wurde der Überstand durch Vakuum-Anlage abgesogen. Die PCR-Produkte wurden unter Spülen der Membran mit 30 µl H₂O aufgenommen und in eine Endproduktplatte überführt.

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach einer modifizierten Reaktion nach Sanger et al. (Sanger et al. 1977). Um eine hohe Sicherheit bei der Detektion heterozygoter Proben zu gewährleisten, wurde jedes Fragment sowohl vorwärts als auch rückwärts sequenziert. Die zur Sequenzierreaktion angewandten Primer finden in Tabelle 8 ihre Darstellung.

Tab. 8: Charakterisierung der Primer, die für die Sequenzierreaktion eingesetzt wurden

Oligonukleotid	Fragmentlänge (bp)	Sequenz	Spezifität
P 52F	188	5'-AgTCTggCTTCCTgggTTgggCTC	5'
P 100R		5'-ggggACAggATgAAgTggACg	3'

Der Ansatz (7 µl) für die Sequenzierreaktion setzte sich wie folgt zusammen: 0,4 µl Sequenzierprimer (Primer P 52F für die Vorwärtsreaktion, Primer P 100R für die Rückwärtsreaktion), 2,5 µl DNA-Sequencing Kit Big Dye™, 4,1 µl H₂O. Diesem wurden 2,0 µl gereinigtes PCR-Produkt hinzugefügt.

Die Bedingungen für die Sequenzierreaktion sahen wie folgt aus: Der initialen Denaturierung bei 94 °C für 2 min folgten 25 Zyklen mit jeweils 15 s 96 °C, 15 s 50 °C und 4 min 60 °C.

Die Reinigung der Sequenzierprodukte erfolgte mit Sephadex G50 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) auf einer Millipore-MAHV-N45-Platte (Millipore Corporation Micon Bioseparations, Bedford, USA). Die anschließende Zentrifugierung bei 2150 rpm (GS-6 Zentrifuge, Beckmann, München, Deutschland) lieferte ein Filtrat, das in einer Endproduktplatte aufgefangen wurde. Die Sequenzanalyse erfolgte mit dem ABI Prism[®] 310 DNA-Sequencer.

Die mithilfe der Sequenzanalyse detektierten Genotypen des entsprechenden Genabschnittes sind in der Abbildung 7 dargestellt.

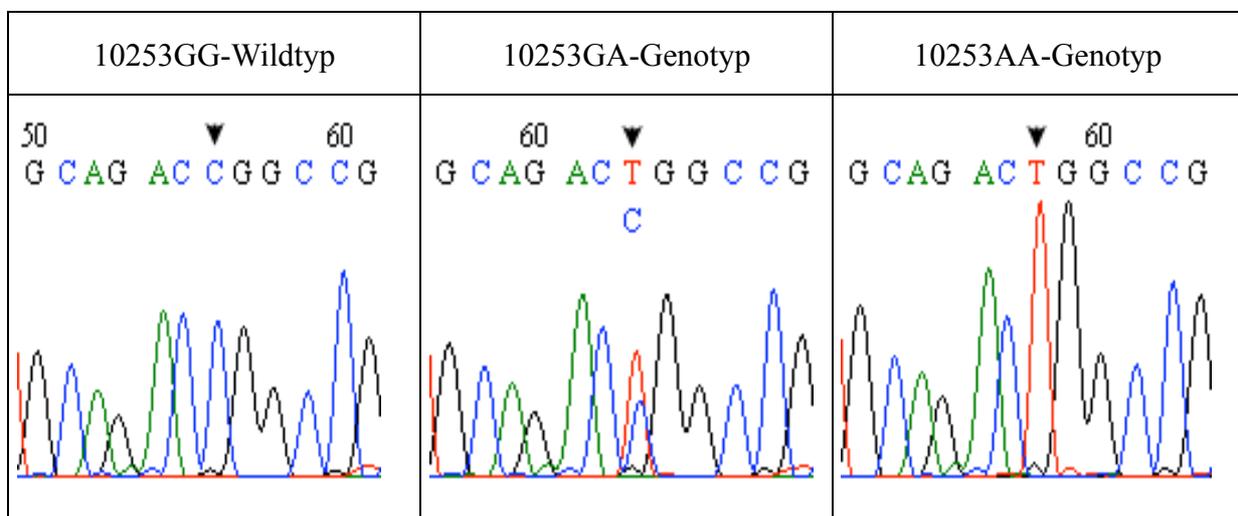


Abb. 7: FII G10253A-Mutation: Darstellung der drei Genotypen in der Rückwärts-Sequenzierung; der Pfeil kennzeichnet die Position des Basenaustausches

2.5 Bestimmung der Prothrombinaktivität

Die klinisch relevante Aktivität des Gerinnungsfaktors FII wurde mit einem sogenannten Einphasentest ermittelt (Lutze und Urbahn 1989). Untersuchungsmaterial waren 50 µl eines 1:10 verdünnten plättchenarmen Citratplasmas. Diesem wurden 50 µl eines spezifischen Mangelplasmas (Immuno GmbH) zugesetzt, dem der Gerinnungsfaktor FII fehlte. Die Aktivierung erfolgte mit 100 µl Calcium-Thromboplastinreagenz (Immuno GmbH). Die

Erfassung des gebildeten Fibrins erfolgte bei 37 °C mit einem Koagulometer. Das Ergebnis wurde in Prozenten der Norm angegeben, die aus einer Eichkurve ermittelt wurden. Der Referenzbereich für den FII liegt bei 70-120 % der Norm. Die Bestimmung der Prothrombinaktivität erfolgte am Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathologie des Universitätsklinikums Charité Campus Mitte.

2.6 Statistische Methoden

Die vorliegende Studie wurde als eine nicht gepaarte Fall-Kontroll-Studie angelegt. Es erfolgte lediglich eine Zuordnung der Probanden nach Alter und Geschlecht. Beide Gruppen sind auf Homogenität getestet worden. Die bei den KHK-Patienten und Kontrollen bestimmten Genotyp- und Allelfrequenzen wurden mit dem Chi-Quadrat-Test oder dem Fisher-Exakt-Test verglichen. Erwartete Genotyphäufigkeiten wurden auf der Basis der beobachteten Allelfrequenzen nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz berechnet. Um die Beziehung zwischen der KHK und den FII-Mutationen zu bewerten, wurden die Odds-Ratio mit 95 %-Konfidenzintervallen berechnet. Die Prothrombinaktivität und weitere stetige Werte wurden als Median mit den zugehörigen 25 %- und 75 %-Perzentilen ausgedrückt und mit dem Mann-Whitney U-Test verglichen. Ein zweiseitiger Wahrscheinlichkeitswert von $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Der Einfluss verschiedener Variablen auf die Entwicklung einer KHK vor dem 40. beziehungsweise 50. Lebensjahr, einer Mehrgefäßerkrankung, eines akuten Koronarsyndroms oder auf das Auftreten einer 30-Tage-Komplikation nach Koronarintervention wurde mithilfe der logistischen Regression untersucht.

Die statistische Analyse wurde teilweise am Institut für Medizinische Biometrie der Charité der Humboldt-Universität Berlin mit dem Programm SPSS 12.0 (SPSS GmbH Software) für Windows durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Patientencharakteristik

Die Tabelle 9 zeigt die demographischen und klinischen Charakteristika der KHK- und der Kontrollgruppe. Es wird deutlich, dass sich beide Gruppen hochsignifikant in der Prävalenz wichtiger kardiovaskulärer Risikofaktoren unterscheiden. Dabei ist der Anteil an Patienten mit Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, Hypertonie und Rauchen in der KHK-Gruppe signifikant höher als im Kontrollkollektiv. Diese Differenz lässt sich auch nach der getrennten Betrachtung von Männern und Frauen nachweisen.

Tab. 9: Demographische und klinische Charakteristika der Studienpopulation

	<u>KHK-Gruppe</u> (n=1000) n (%)	<u>Kontrollgruppe</u> (n=1000) n (%)	p*
Alter (Jahre) ¹	60,6 (55,0-67,2)	60,5 (54,4-66,5)	n.s.
Männer / Frauen	759 (75,9) / 241 (24,1)	759 (75,9) / 241 (24,1)	
<u>Diabetes mellitus</u>	228 (22,8)	114 (11,4)	< 0,001
Männer	161 (21,2)	79 (10,4)	< 0,001
Frauen	67 (27,8)	35 (11,4)	< 0,001
<u>Hypertonie</u>	552 (55,2)	359 (35,9)	< 0,001
Männer	394 (51,9)	269 (35,4)	< 0,001
Frauen	158 (65,6)	90 (37,3)	< 0,001
<u>Hypercholesterinämie</u>	527 (52,7)	303 (30,3)	< 0,001
Männer	389 (51,3)	224 (29,5)	< 0,001
Frauen	138 (57,3)	79 (32,8)	< 0,001
<u>Rauchen</u>	440 (44,0)	352 (35,2)	< 0,001
Männer	368 (48,5)	300 (39,5)	< 0,001
Frauen	72 (29,9)	52 (21,6)	0,037

* KHK versus Kontrollen, 1 = Median (25. und 75. Perzentile)

Doppelt so viele männliche wie weibliche Patienten haben bis zum fünfzigsten Lebensjahr eine KHK entwickelt (P < 0,001). Bedeutende Unterschiede finden sich auch in der Ausprägung der

koronaren Herzerkrankung. Eine 3-Gefäß-Erkrankung zeigt sich bei 36,7 % der Männer und nur bei 24,9 % der Frauen, während der Anteil für eine 1-Gefäß-Erkrankung bei den Frauen deutlich höher ist ($P < 0,001$). Hinsichtlich der Häufigkeit des Auftretens akuter Koronarsyndrome oder eines akuten Myokardinfarktes sind keine Differenzen zwischen Männern und Frauen der KHK-Gruppe nachweisbar. In Tabelle 10 sind die klinischen Charakteristika der KHK-Patienten verdeutlicht.

Tab. 10: Klinische Charakteristika der KHK-Gruppe

	<u>KHK_gesamt</u> (n=1000)	<u>Männer</u> (n=759)	<u>Frauen</u> (n=241)	<u>p*</u>
<u>Manifestationsalter (%)</u>				
Manifeste KHK < 40 Jahren	6,8	8,1	3,0	0,007
Manifeste KHK < 50 Jahren	27,9	31,9	15,2	< 0,001
<u>Angina (%)</u>				
Stabil	66,5	68,6	59,8	
Instabil	14,4	13,4	17,4	
ACS	23,5	22,4	27,0	n.s.
<u>Myokardinfarkt (%)</u>				
Anamnestisch	66,9	68,0	63,5	n.s.
Akut	57,8	59,0	53,9	
	9,1	9,0	9,5	n.s.
<u>Schweregrad der KHK (%)</u>				
1-Gefäßerkrankung	29,7	25,1	44,4	
2-Gefäßerkrankung	36,4	38,3	30,7	< 0,001
3-Gefäßerkrankung	33,8	36,7	24,9	

* Männer versus Frauen; ACS = akutes Koronarsyndrom

Bei der Sichtung der Laborparameter (Tab. 11) ist auffällig, dass sich die KHK-Patienten, auch nach getrennter Betrachtung von Männern und Frauen, durch signifikant höhere Werte für Triglyzeride, Leptin und Insulin als die Kontrollen auszeichnen. Darüber hinaus finden sich im Gesamt- und Männerkollektiv Differenzen für Cholesterin, LDL-Cholesterin und den Entzündungsmarker CrP zwischen der KHK- und Kontrollgruppe.

Tab. 11: Stetige Parameter und Laborwerte der KHK- und Kontrollgruppe

	<u>KHK</u> Median (25%-75% P.)	<u>Kontrollen</u> Median (25%-75% P.)	<u>p</u> (U-Test)
BMI (kg/m ²)	26,2 (24,2-28,6)	26,0 (24,0-28,7)	n.s.
RR syst. (mmHg)	130 (120-145)	135 (120-145)	0,003
RR diast. (mmHg)	80 (70-90)	80 (75-90)	< 0,001
Triglyzeride (mmol/l)	1,7 (1,2-2,3)	1,5 (1,1-2,0)	< 0,001
Männer	1,7 (1,3-2,5)	1,5 (1,1-2,0)	< 0,001
Frauen	1,6 (1,2-2,2)	1,5 (1,1-1,9)	0,008
Cholesterin (mmol/l)	5,8 (5,1-6,6)	5,5 (4,7-6,3)	< 0,001
Männer	5,8 (5,0-6,6)	5,4 (4,7-6,2)	< 0,001
Frauen	5,9 (5,2-6,7)	5,8 (5,0-6,8)	n.s.
HDL-Chol. (mmol/l)	1,1 (0,9-1,4)	1,1 (0,9-1,4)	n.s.
Männer	1,1 (0,9-1,3)	1,1 (0,9-1,3)	n.s.
Frauen	1,3 (0,9-1,6)	1,3 (1,1-1,6)	n.s.
LDL-Chol. (mmol/l)	3,8 (3,1-4,5)	3,6 (2,9-4,3)	< 0,001
Männer	3,8 (3,1-4,5)	3,5 (2,9-4,3)	< 0,001
Frauen	3,8 (3,2-4,5)	3,7 (3,0-4,6)	n.s.
Leptin (ng/ml)	6,8 (4,2-11,1)	6,4 (3,6-10,9)	< 0,001
Männer	5,9 (3,5-8,6)	5,1 (3,0-7,9)	0,001
Frauen	16,2 (9,9-24,2)	12,8 (8,3-19,1)	0,001
Glucose (mmol/l)	5,5 (5,0-6,7)	5,5 (5,0-6,5)	n.s.
Männer	5,5 (5,0-6,6)	5,6 (5,0-6,5)	n.s.
Frauen	5,6 (5,0-7,3)	5,5 (5,0-6,5)	n.s.
Insulin (µU/ml)	13,3 (9,0-21,2)	11,5 (8,6-16,6)	< 0,001
Männer	13,0 (9,0-19,7)	11,8 (8,6-16,7)	< 0,001
Frauen	14,2 (9,3-28,2)	11,0 (8,4-15,9)	< 0,001
CrP (mg/l)	6,0 (3,9-11,6)	7,7 (3,7-25,6)	< 0,001
Männer	5,9 (3,8-11,1)	8,9 (3,8-30,5)	< 0,001
Frauen	6,6 (4,0-13,2)	7,1 (3,3-18,3)	n.s.

BMI = Body Mass Index; Chol. = Cholesterin; CrP = C-reaktives Protein; HDL = High Density Lipoprotein; LDL = Low Density Lipoprotein; RR = Blutdruck nach Riva-Rocci

Die Werte für Triglyzeride, HDL-Cholesterin, Blutzucker und Insulin liegen jedoch sowohl in der KHK- als auch Vergleichsgruppe weitestgehend im Normbereich. Die Kontrollpatienten sind lediglich durch leicht erhöhte CrP-Werte gekennzeichnet, während LDL-Cholesterin und

Gesamtcholesterin in der KHK-Gruppe deutlich über den im Rahmen der Sekundärprävention angestrebten Werten liegen. Ferner lässt der Vergleich von Männern und Frauen signifikante Unterschiede sowohl in der KHK- als auch Kontrollgruppe für das HDL-Cholesterin und Leptin erkennen, wobei die höheren Leptinwerte der Frauen physiologisch sind. Innerhalb der Kontrollgruppe zeichnen sich die Frauen durch signifikant höhere Cholesterinwerte aus.

3.1.1 Prothrombinaktivität

Es kann ein geringer, aber signifikanter Unterschied in der FII-Aktivität zwischen KHK-Patienten und Kontrollen verzeichnet werden (Tab. 12). Die KHK-Patienten weisen, auch nach Geschlechtsstratifizierung, eine um 2,1 % bis 4,3 % niedrigere FII-Aktivität als die entsprechenden Kontrollpatienten auf ($P < 0,001$). Die Aktivität des Prothrombins liegt jedoch in der KHK- wie auch Kontrollgruppe im Referenzbereich (70-120 % der Norm).

Ein Vergleich der FII-Aktivitäten der Frauen mit denen der Männer erbrachte im weiblichen Patienten- und Kontrollkollektiv eine signifikant höhere Gerinnungsaktivität als in den entsprechenden männlichen Kollektiven ($P = 0,002$; $P < 0,001$). Es findet sich jedoch kein signifikanter Unterschied in den FII-Aktivitäten zwischen Patienten mit und denen ohne akute Koronarsyndrome (Median 91,0 % versus 94,0 %; $P = \text{n.s.}$) beziehungsweise zwischen Patienten mit und ohne Frühkomplikation nach Koronarintervention (Median 91,5 % versus 94,0 %; $P = \text{n.s.}$).

Tab. 12: Prothrombinaktivität bei KHK-Patienten und Kontrollen

FII-Aktivität (%)	<u>KHK</u>	<u>Kontrollen</u>	<u>p*</u>
	Median (25%-75% P.)	Median (25%-75% P.)	(U-Test)
Gesamtgruppe	94,0 (84,0-101,0)	96,0 (88,0-104,0)	< 0,001
Männer	92,0 (83,0-101,0)	96,0 (86,0-103,0)	< 0,001
Frauen	96,0 (87,3-103,0)	100,0 (92,0-107,5)	< 0,001

* KHK versus Kontrollen; P. = Perzentile

3.2 Genotypen- und Allelverteilung

Bezüglich der G20210A-Mutation konnte eine Genotypisierung bei 978 Patienten der KHK-Gruppe sowie bei 984 Proben der Kontrollgruppe durchgeführt werden. Bei der G10253A-Mutation war eine Genotypisierung bei 966 KHK-Proben und 990 Kontrollproben möglich. In der Genotypen- wie auch Allelverteilung war für beide FII-Varianten kein signifikanter Unterschied zwischen der KHK- und Kontrollgruppe erkennbar (Tab. 13, Tab. 14).

Tab. 13: Verteilung der FII 20210- und 10253-Genotypen bei KHK-Patienten und Kontrollen

Genotyp	<u>KHK</u>		<u>Kontrollen</u>		OR* (95% CI)	p
	beobachtet n (%; 95 % CI)	erwartet n	beobachtet n (%; 95 % CI)	erwartet n		
<u>20210</u>						
GG	948 (96,9; 95,6-97,9)	948,2	964 (98,0; 96,9-98,9)	964,1	1,53 (0,83-2,85)	n.s.
GA	30 (3,1; 2,1-4,4)	29,5	20 (2,0; 1,2-3,1)	19,8		
AA	0 (0,0)	0,2	0 (0,0)	0,1		
<u>10253</u>						
GG	910 (94,2; 92,5-95,6)	910,8	940 (94,9; 93,4-96,2)	939,7	1,16 ¹ (0,77-1,75)	n.s.
GA	56 (5,8; 4,4-7,5)	54,4	49 (4,9; 3,7-6,5)	49,7		
AA	0 (0,0)	0,8	1 (0,1)	0,7		

* KHK-Patienten versus Kontrollen, 1 = GA- und AA-Genotyp zusammengefasst

Tab. 14: Allelfrequenzen der G20210A- und G10253A-Mutation bei KHK-Patienten und Kontrollen

		<u>KHK</u> n (%; 95 % CI)	<u>Kontrollen</u> n (%; 95 % CI)	OR* (95% CI)	p
<u>20210</u>	G-Allel	1926 (98,5; 97,8-99,0)	1948 (99,0; 98,4-99,4)	1,52 (0,83-2,82)	n.s.
	A-Allel	30 (1,5; 1,0-2,2)	20 (1,0; 0,6-1,6)		
<u>10253</u>	G-Allel	1876 (97,1; 96,3-97,8)	1929 (97,4; 96,6-98,1)	1,13 (0,75-1,69)	n.s.
	A-Allel	56 (2,9; 2,2-3,7)	51 (2,6; 1,9-3,4)		

* KHK versus Kontrollen

Bei der G10253A-Mutation konnte in der Kontrollgruppe ein homozygot mutierter AA-Genotyp detektiert werden. Alle erhaltenen Genotypfrequenzen waren in guter Übereinstimmung mit den erwarteten Häufigkeiten, die auf der Basis der Allelfrequenzen aus dem Hardy-Weinberg-Gesetz resultierten.

3.2.1 Häufigkeit der kombinierten FII-Genotypen und Untersuchung auf allelische Assoziation zwischen G20210A und G10253A

Die häufigste Genotypenkombination stellte 10253GG/20210GG mit 92,2 % dar, gefolgt von 10253GA/20210GG mit 5,2 % und 10253GG/20210GA mit 2,4 %. Aufgrund der Seltenheit der A-Allele waren die Genotypkonstellationen 10253GA/20210GA und 10253AA/20210GG nur bei 0,15 % beziehungsweise 0,05 % der Fälle, 10253AA/20210GA, 10253GG/20210AA, 10253GA/20210AA und 10253AA/20210AA bei keinem Fall nachweisbar (Tab. 15, Tab. 16). Für die FII-Varianten G20210A und G10253A konnte keine allelische Assoziation aufgezeigt werden. Die Unterschreitung des kritischen Tabellenwertes im Test auf Linkage-Disäquilibrium führte zur Annahme der Nullhypothese.

Tab. 15: Frequenzen der Genotypen der FII-Mutationen G20210A und G10253A

	<u>Genotyp</u>	<u>G20210A</u>			gesamt
		GG	GA	AA	
<u>G10253A</u>	GG	1786	46	0	1832
	GA	101	3	0	104
	AA	1	0	0	1
	gesamt	1888	49	0	1937

Die Verteilung der 10253G- und 10253A-Allele bei den 20210GA-Heterozygoten (96,9 % G-Allel; 3,1 % A-Allel) entsprach der bei den 20210GG-Wildtypen (97,3 % G-Allel; 2,7 % A-Allel; P = n.s.) (Tab. 17).

Tab. 16: Häufigkeit der kombinierten FII-Genotypen, abgeleitet aus den Einzelnukleotidpolymorphismen G10253A und G20210A

<u>Kombination der FII-Genotypen</u>	<u>Häufigkeit</u>		
	n	%	95 % CI
10253GG / 20210GG	1786	92,2	90,0-93,4
10253GA / 20210GG	101	5,2	4,3-6,3
10253GG / 20210GA	46	2,4	1,7-3,2
10253GA / 20210GA	3	0,15	0,03-0,5
10253AA / 20210GG	1	0,05	-
10253AA / 20210GA	-	-	-
10253GG / 20210AA	-	-	-
10253GA / 20210AA	-	-	-
10253AA / 20210AA	-	-	-

Tab. 17: Verteilung der 10253A- und G-Allele bei 20210GG-Wildtypen und 20210GA-Heterozygoten

		<u>FIIG20210A</u>				<u>p</u>
		<u>GG-Genotyp (n=1888)</u>		<u>GA-Genotyp (n=49)</u>		
		n	% (95 % CI)	n	% (95 % CI)	
<u>FIIG10253A</u>	G-Allel	3673	97,3 (96,7-97,8)	95	96,9 (91,3-99,3)	n.s.
	A-Allel	103	2,7 (2,2-3,3)	3	3,1 (0,6-8,7)	

Im Vergleich zu den Kontrollen wiesen doppelt so viele KHK-Patienten sowohl die G20210A- als auch die G10253A-Mutation auf (0,2 % versus 0,1 %). Und die resultierende Odds-Ratio von 2,04 (95 % CI 0,11 - 120,54; P = n.s.) zeigte ein zweimal so hohes Risiko für die koronare Herzerkrankung bei Trägern beider FII-Mutationen wie bei Nichtträgern an, doch waren lediglich 2 KHK-Patienten und ein Kontrollindividuum Träger beider FII-Varianten, sodass keine statistische Signifikanz erreicht wurde und das 95 % Konfidenzintervall sehr weit war (tabellarisch nicht dargestellt).

3.3 Auswirkungen der FII-Mutationen auf die Prothrombinaktivität

3.3.1 FIIG20210A-Mutation

Die Präsenz des heterozygoten 20210GA-Genotyps ging sowohl in der Gesamtgruppe als auch in der KHK-Gruppe und der Vergleichsgruppe mit einer signifikanten Erhöhung der FII-Aktivität einher (Tab. 18, Abb. 8).

Tab. 18: FIIG20210A: Prothrombinaktivität (%) in Abhängigkeit vom Genotyp

	<u>20210GG-Genotyp</u>		<u>20210GA-Genotyp</u>		p* (U-Test)
	n	Median (25%-75% P.)	n	Median (25%-75% P.)	
Gesamt	1903	94,0 (86,0-102,0)	50	106,5 (100,75-120,25)	< 0,001
KHK	946	92,0 (84,0-101,0)	30	104,0 (86,75-119,25)	< 0,001
Kontrollen	957	96,0 (88,0-103,0)	20	111,0 (102,25-122,5)	< 0,001

* GG-Genotyp versus GA-Genotyp; P. = Perzentile

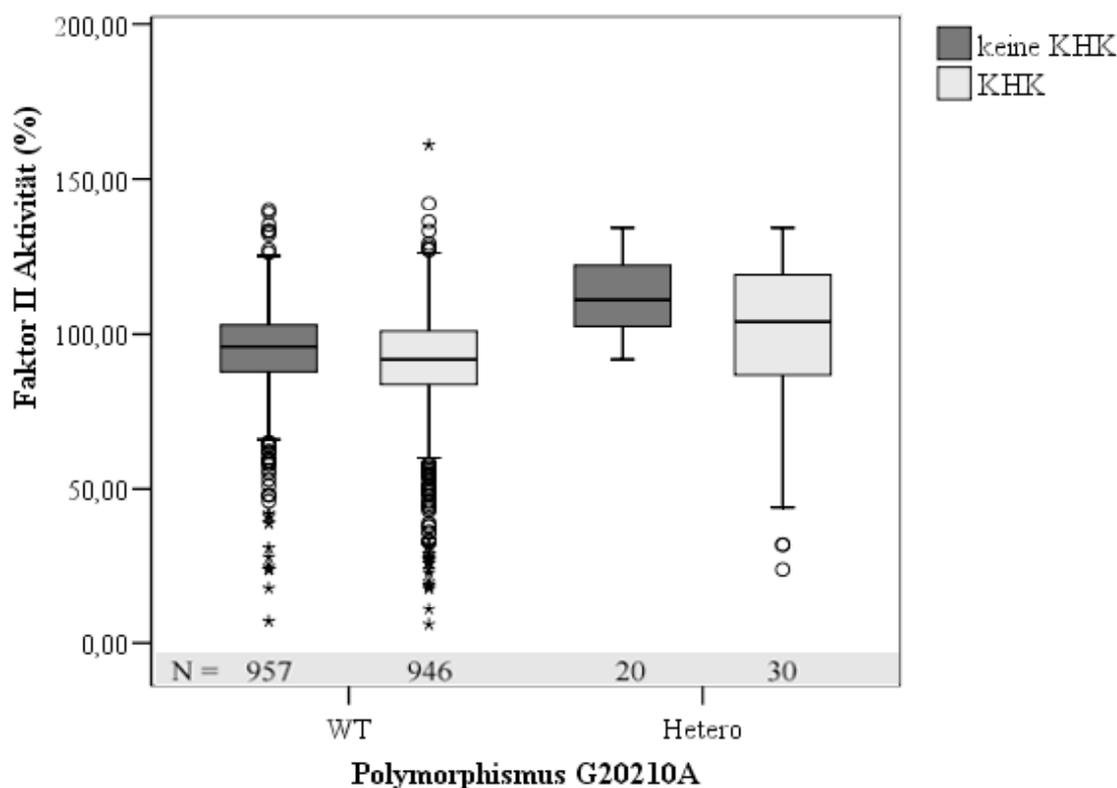


Abb. 8: Prothrombinaktivität in Abhängigkeit vom FIIG20210A-Genotyp

Träger des 20210GA-Genotyps hatten in der Gesamt- und KHK-Gruppe eine um 13 %, in der Kontrollgruppe eine um 15 % höhere Prothrombinaktivität als Träger des 20210GG-Wildtyps.

3.3.2 FIIG10253-Mutation

In der Gesamtgruppe und in der Vergleichsgruppe war zwischen Trägern des 10253GG-Wildtyps und Trägern des 10253GA-/AA- Genotyps kein signifikanter Unterschied in der Prothrombinaktivität nachweisbar (Tab. 19). Lediglich in der KHK-Gruppe konnte eine geringe, aber statistisch signifikante Erniedrigung der FII-Aktivität um zirka 5 % in Anwesenheit des heterozygoten GA-Genotyps beobachtet werden ($P = 0,012$).

Tab. 19: FIIG10253A: Prothrombinaktivität (%) in Abhängigkeit vom Genotyp

	<u>10253GG-Genotyp</u>		<u>10253GA-/AA-Genotyp</u>		<u>p*</u> (U-Test)
	n	Median (25%-75% P.)	n	Median (25%-75% P.)	
Gesamt	1842	95,5 (86,0-103,0)	105	94,0 (85,0-101,0)	n.s.
KHK	908	94,0 (84,0-101,0)	56	89,5 (79,5-96,0)	0,012
Kontrollen	934	96,0 (88,0-104,0)	49	98,0 (89,5-104,5)	n.s.

* GG-Genotyp versus GA-/AA-Genotyp; P. = Perzentile

3.3.3 Kombination der FII-Mutationen G20210A und G10253A

Sowohl in der Gesamtgruppe als auch nach getrennter Betrachtung der KHK- und Kontrollgruppe waren signifikante Unterschiede in der Prothrombinaktivität zwischen den verschiedenen Kombinationen der G20210A- und G10253A-Genotypen nachweisbar (Tab. 20, Abb. 9). Die Genotypkonstellation 20210GA/10253GG wies dabei im Median die höchsten Prothrombinaktivitätswerte auf, während die gleichzeitige Präsenz der heterozygoten Genotypen 20210GA und 10253GA in den niedrigsten Prothrombinwerten resultierte ($P < 0,001$). Da nur 3 Individuen als Träger beider FII-Mutationen identifiziert wurden, basierten die FII-Werte auf dieser sehr geringen Probandenzahl. Bis auf die mediane Prothrombinaktivität von 65,5 % in der

KHK-Gruppe bei Präsenz der G20210A- wie auch G10253A-Mutation, befanden sich alle anderen medianen FII-Aktivitäten im Referenzbereich (70-120 %).

Tab. 20: FIIG20210A und FIIG10253A: Prothrombinaktivität (%) in Abhängigkeit von den Genotypen

	<u>FIIG20210A / FIIG10253A</u>				p*
	WT/WT	WT/Mu	Mu/WT	Mu/Mu	
<u>Gesamt</u> (n)	1778	101	46	3	
Median	94,0	94,0	107,5	87,0	< 0,001
(25%-75% P.)	(86,0-102,25)	(85,0-101,0)	(101,75-121,0)	(44,0- -)	
<u>KHK</u> (n)	874	54	27	2	
Median	94,0	90,0	104,0	65,5	< 0,001
(25%-75% P.)	(84,0-101,0)	(80,5-96,25)	(100,0-120,0)	(44,0- -)	
<u>Kontrollen</u> (n)	904	47	19	1	
Median	96,0	98,0	113,0	94,0	< 0,001
(25%-75% P.)	(88,0-103,0)	(89,0-105,0)	(103,0-123,0)	-	

* Kruskal-Wallis-Test; WT = Wildtyp; Mu = Mutation; P. = Perzentile

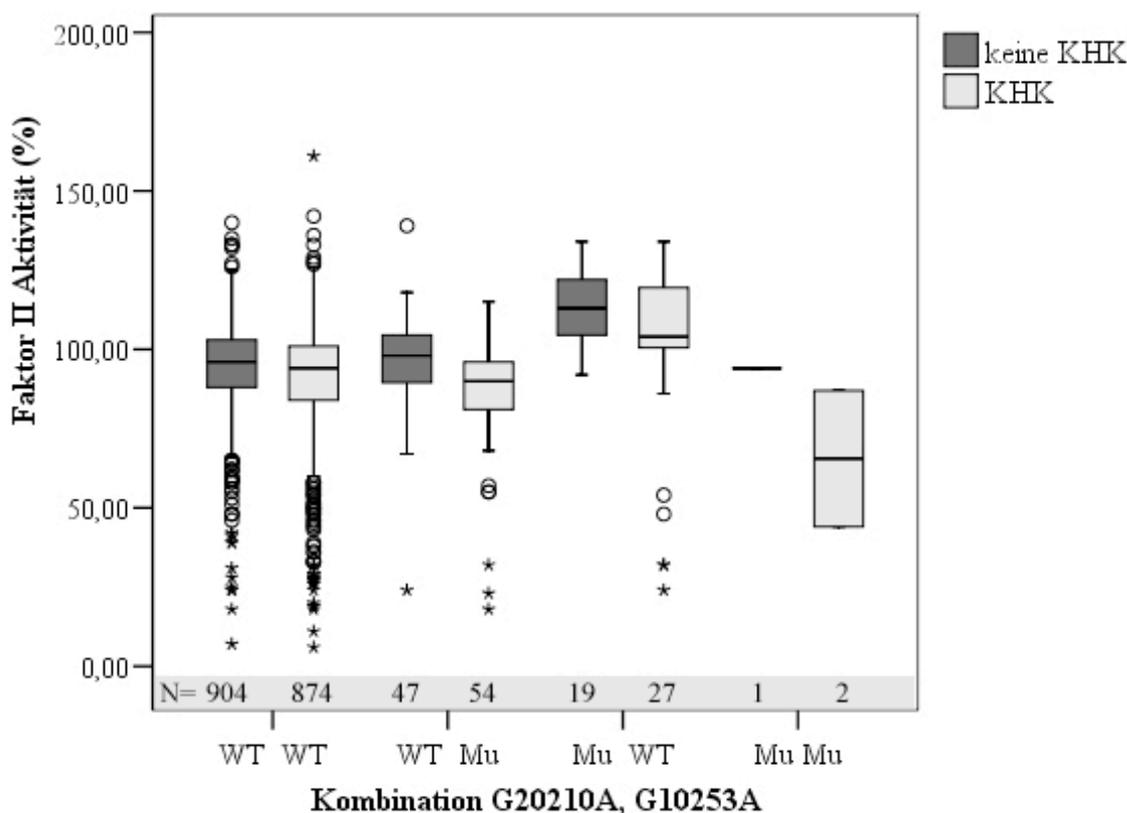


Abb. 9: Prothrombinaktivität bei Kombination der Polymorphismen G20210A und G10253A

3.4 Stratifizierung nach Geschlecht und kardiovaskulären Risiken

Wie schon in Tabelle 14 gezeigt, sind Mutationsträger der FII-Varianten bei den KHK-Patienten nicht überrepräsentiert. Auch die Trennung nach Geschlecht erbrachte für die untersuchten FII-Mutationen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Genotyphäufigkeiten beim Vergleich der KHK-Patienten mit den entsprechenden Kontrollen. Es fand sich weiterhin keine Effektmodifikation, wenn Fälle und Kontrollen nach der Präsenz wichtiger kardiovaskulärer Risikofaktoren stratifiziert beziehungsweise in Gering- und Hochrisiko-Kategorien beurteilt wurden (Tab. 21 und Tab. 22).

Tab. 21: G20210A-Mutation: Prävalenz des GA-Genotyps nach Stratifizierung nach Geschlecht und kardiovaskulären Risiken

		<u>KHK</u> GA-Genotyp n (%)	<u>Kontrollen</u> GA-Genotyp n (%)	<u>OR*</u> (95%-CI)	<u>p</u>
Männer		27 (3,7)	15 (2,0)	1,86 (0,04-3,78)	0,06
Frauen		3 (1,3)	5 (2,1)	0,58 (0,09-3,05)	n.s.
Diabetes mellitus		3 (1,3)	0 (0,0)	-	n.s.
Hypercholesterinämie		13 (2,5)	6 (2,0)	1,25 (0,44-3,02)	n.s.
Hypertonie		13 (2,4)	10 (2,8)	0,84 (0,33-2,17)	n.s.
Nikotin		17 (4,0)	10 (2,9)	1,38 (0,59-3,42)	n.s.
Hoch-Risiko ¹	ja	3 (2,7)	1 (2,9)	0,95 (0,07-51,49)	n.s.
	nein	27 (3,1)	19 (2,0)	1,57 (0,83-3,01)	n.s.
Gering-Risiko ²	ja	2 (2,8)	3 (1,3)	2,14 (0,18-19,04)	n.s.
	nein	28 (3,1)	17 (2,3)	1,38 (0,72-2,72)	n.s.

* KHK vs. Kontrollen; 1 = Hoch-Risiko-Gruppe (Patienten mit Hypertonie, Hypercholesterinämie und Rauchen), 2 = Gering-Risiko-Gruppe (Patienten ohne Hypertonie, Hypercholesterinämie, Rauchen und Diabetes)

Tab. 22: G10253A-Mutation: Prävalenz des GA-Genotyps nach Stratifizierung nach Geschlecht und kardiovaskulären Risiken

		<u>KHK</u> GA-Genotyp n (%)	<u>Kontrollen</u> GA-Genotyp n (%)	<u>OR*</u> (95%-CI)	<u>p</u>
Männer		44 (6,0)	37 (4,9)	1,21 (0,75-1,94)	n.s.
Frauen		12 (5,1)	12 (5,1)	1,00 (0,40-2,49)	n.s.
Diabetes mellitus		14 (6,3)	4 (3,5)	1,76 (0,53-7,51)	n.s.
Hypercholesterinämie		18 (3,6)	14 (4,7)	0,75 (0,35-1,66)	n.s.
Hypertonie		35 (6,6)	21 (5,9)	1,11 (0,62-2,05)	n.s.
Nikotin		24 (5,7)	17 (4,9)	1,17 (0,59-2,36)	n.s.
Hoch-Risiko ¹	ja	6 (5,6)	1 (2,7)	2,14 (0,25-101,1)	n.s.
	nein	50 (5,8)	49 (5,1)	1,14 (0,74-1,75)	n.s.
Gering-Risiko ²	ja	7 (10,0)	12 (5,2)	2,01 (0,64-5,80)	n.s.
	nein	49 (5,5)	38 (5,0)	1,10 (0,70-1,75)	n.s.

* KHK vs. Kontrollen; 1 = Hoch-Risiko-Gruppe (Patienten mit Hypertonie, Hypercholesterinämie und Rauchen), 2 = Gering-Risiko-Gruppe (Patienten ohne Hypertonie, Hypercholesterinämie, Rauchen und Diabetes)

3.5 Analyse der KHK-Untergruppen

3.5.1 Stratifizierung nach ACS, Manifestationsalter und Schwere der KHK

Die Genotypenverteilung in den aufgeführten KHK-Untergruppen, verglichen zu den entsprechenden KHK-Kontrolluntergruppen, zeigt bei beiden FII-Mutationen keine relevanten Unterschiede (Tab. 23 und Tab. 24). Darüber hinaus war auch keine signifikante Differenz in der Prävalenz des heterozygoten GA-Genotyps beider FII-Mutationen nachweisbar, wenn die KHK-Untergruppen mit den Kontrollen verglichen wurden. Die Odds-Ratio ließen weder in der Gegenüberstellung der KHK-Untergruppen und der entsprechenden Kontrollgruppen der KHK-Patienten noch in der Analyse der KHK-Untergruppen versus Kontrollen ein erhöhtes Risiko erkennen (letzteres nicht tabellarisch dargestellt).

Tab. 23: FIIG20210A: Genotypenverteilung in KHK-Untergruppen

	n	<u>G20210A</u>		<u>OR (95%-CI)*</u>	p
		GG (%)	GA (%)		
ACS	224	98,7	1,3	0,37 (0,07-1,21)	n.s.
Myokardinfarkt ges.	652	96,9	3,1	1,00 (0,44-2,42)	n.s.
Man. < 40 Jahre	66	98,5	1,5	0,48 (0,01-3,02)	n.s.
Man. < 50 Jahre	268	97,4	2,6	0,83 (0,29-2,04)	n.s.
1-Gef.-Erkrankung	295	96,9	3,1	0,99 (0,39-2,29) ¹	
2-Gef.-Erkrankung	357	97,5	2,5	1,01 (0,44-2,54) ²	n.s.
3-Gef.-Erkrankung	325	96,3	3,7		

* KHK-Untergruppe vs. entsprechende KHK-Kontrolluntergruppe (zum Beispiel: KHK-Patienten mit ACS vs. KHK-Patienten ohne ACS); 1 = 1-Gefäßerkrankung versus 2- und 3-Gefäßerkrankung, 2 = 2- und 3-Gefäßerkrankung versus 1-Gefäßerkrankung; Man. = Manifestationsalter; Gef. = Gefäß

Tab. 24: FIIG10253A: Genotypenverteilung in KHK-Untergruppen

	n	<u>G10253A</u>		<u>OR (95%-CI)*</u>	p
		GG (%)	GA (%)		
ACS	225	93,8	6,2	1,10 (0,55-2,11)	n.s.
Myokardinfarkt ges.	647	94,1	5,9	1,04 (0,57-1,98)	n.s.
Man. < 40 Jahre	65	92,3	7,7	1,37 (0,41-3,61)	n.s.
Man. < 50 Jahre	262	94,7	5,3	0,88 (0,44-1,68)	n.s.
1-Gef.-Erkrankung	292	93,5	6,5	1,16 (0,64-2,18) ¹	
2-Gef.-Erkrankung	350	95,4	4,6	0,84 (0,46-1,57) ²	n.s.
3-Gef.-Erkrankung	323	93,5	6,5		

* KHK-Untergruppe vs. entsprechende KHK-Kontrolluntergruppe (zum Beispiel: KHK-Patienten mit ACS vs. KHK-Patienten ohne ACS); 1 = 1-Gefäßerkrankung versus 2- und 3-Gefäßerkrankung, 2 = 2- und 3-Gefäßerkrankung versus 1-Gefäßerkrankung; Man. = Manifestationsalter; Gef. = Gefäß

3.5.2 Stratifizierung nach Koronarintervention und Interventionstyp

Der kombinierte 30-Tage-Endpunkt (Tod, Myokardinfarkt, erneute Revaskularisation des Zielgefäßes) wurde von 43 der 656 Interventionspatienten (6,6 %) erreicht. Davon wies nur ein Patient den heterozygoten 20210GA-Genotyp auf. Es fand sich kein relevanter Unterschied in der Prävalenz des 20210GA-Genotyps zwischen Patienten mit und ohne eine 30-Tage-Komplikation (2,3 % vs. 3,3 %). Bezüglich der Inzidenz des 30-Tage-Endpunktes bei Trägern des heterozygoten GA-Genotyps waren im Vergleich zu Trägern des 20210GG-Wildtyps auch keine signifikanten Differenzen erkennbar. Insgesamt erlitten 4,8 % der Träger des A-Allels und 6,6 % der Träger des Wildtyps eine 30-Tage-Komplikation (OR = 0,71) (Tab. 25). In der Untergruppe der Patienten mit Stenteinlage hatten zwar fast doppelt so viele Mutationsträger eine Frühkomplikation wie die Träger des Wildtyps (14,3 % vs. 7,7 %; OR = 1,98), doch wurde keine statistische Signifikanz erzielt.

Tab. 25: Frühkomplikationen innerhalb der ersten 30 Tage nach perkutaner Koronarintervention (PTCA, DCA und Stentimplantation) in Abhängigkeit vom G20210A-Genotyp

	<u>20210GG-Genotyp</u> n (%)	<u>20210GA-Genotyp</u> n (%)	<u>OR*</u> (95%-CI)	<u>p</u>
<u>Gesamt (n=656)</u>				
Keine Komplikationen	593 (93,4 %)	20 (95,2 %)	0,71	n.s.
30-Tage-Komplikation	42 (6,6 %)	1 (4,8 %)	(0,02-4,64)	
<u>PTCA (n=277)</u>				
Keine Komplikationen	250 (94,3 %)	12 (100,0 %)	-	n.s.
30-Tage-Komplikation	15 (5,7 %)	0 (0,0 %)		
<u>DCA (n=101)</u>				
Keine Komplikationen	93 (93,9 %)	2 (100,0 %)	-	n.s.
30-Tage-Komplikation	6 (6,1 %)	0 (0,0 %)		
<u>Stent (n=278)</u>				
Keine Komplikationen	250 (92,3 %)	6 (85,7 %)	1,98	n.s.
30-Tage-Komplikation	21 (7,7 %)	1 (14,3 %)	(0,04-17,54)	

* 20210GG- versus 20210GA-Genotyp; DCA = direktionale koronare Atherektomie, PTCA = perkutane transluminale Koronarangioplastie

Bezüglich der G10253A-Mutation trat bei 43 von 646 Patienten mit Koronarintervention eine Frühkomplikation (Tod, Myokardinfarkt, erneute Revaskularisation des Zielgefäßes) auf (6,7 %). Davon trugen zwei Patienten die G10253A-Mutation, 41 Patienten waren Träger des homozygoten GG-Wildtyps. Auch hier waren in der Gesamtgruppe und in den Interventions-Untergruppen keine signifikanten Unterschiede in der G10253A-Genotypenverteilung zwischen Patienten mit und ohne eine 30-Tage-Komplikation nachweisbar. In der Gesamtgruppe war die Inzidenz des kombinierten 30-Tage-Endpunktes bei Trägern des 10253GA-Genotyps mit der bei Trägern des GG-Wildtyps (5,1 % vs. 6,8 %; OR = 0,75) vergleichbar (Tab. 26).

Tab. 26: Frühkomplikationen innerhalb der ersten 30 Tage nach perkutaner Koronarintervention (PTCA, DCA und Stentimplantation) in Abhängigkeit vom G10253A-Genotyp

	<u>10253GG-Genotyp</u> n (%)	<u>10253GA-Genotyp</u> n (%)	<u>OR*</u> (95 % CI)	<u>p</u>
<u>Gesamt (n=646)</u>				
Keine Komplikationen	566 (93,2 %)	37 (94,9 %)	0,75	n.s.
30-Tage-Komplikation	41 (6,8 %)	2 (5,1 %)	(0,08-3,08)	
<u>PTCA (n=269)</u>				
Keine Komplikationen	240 (94,1 %)	14 (100,0 %)	-	n.s.
30-Tage-Komplikation	15 (5,9 %)	0 (0,0 %)		
<u>DCA (n=102)</u>				
Keine Komplikationen	89 (94,7 %)	7 (87,5 %)	2,54	n.s.
30-Tage-Komplikation	5 (5,3 %)	1 (12,5 %)	(0,05-27,75)	
<u>Stent (n=275)</u>				
Keine Komplikationen	237 (86,2 %)	16 (94,1 %)	0,70	n.s.
30-Tage-Komplikation	21 (13,8 %)	1 (5,9 %)	(0,02-5,01)	

* 10253GG- versus 10253GA-Genotyp; DCA = direktionale koronare Atherektomie, PTCA = perkutane transluminale Koronarangioplastie

3.6 Überprüfung der Einflussfaktoren für KHK und deren Komplikationen in der logistischen Regression

In der logistischen Regressionsanalyse wurde auf Assoziationen zwischen den Prothrombinvarianten G20210A und G10253A sowie der Prothrombinaktivität und der frühen Manifestation, dem Schweregrad der koronaren Herzerkrankung und deren akuten Komplikationen untersucht. Den Ergebnissen zufolge stellen weder die FII-Mutationen noch die Prothrombinaktivität unabhängige Risikofaktoren für die koronare Herzerkrankung vor dem 40. beziehungsweise vor dem 50. Lebensjahr, für eine schwere Mehrgefäßerkrankung, ein akutes Koronarsyndrom oder für das Auftreten einer 30-Tage-Frühkomplikation nach Koronarintervention dar (Tab. 27).

Für die Manifestation der koronaren Herzerkrankung vor dem 40. Lebensjahr konnten das männliche Geschlecht (OR = 2,55; 95 % CI 1,13 - 5,75; P = 0,024) und der Nikotinabusus (OR = 1,85; 95 % CI 1,09 - 3,12; P = 0,023) als relevante Einflussfaktoren gesichert werden. Mit zunehmendem Lebensalter der KHK-Patienten gewinnt neben dem männlichen Geschlecht (OR = 2,49; 95 % CI 1,65 - 3,76; P < 0,001) und dem Nikotinabusus (OR = 1,96; 95 % CI 1,45 - 2,65; P < 0,001) zusätzlich die Hypercholesterinämie (OR = 1,57; 95 % CI 1,16 - 2,12; P = 0,004) an Bedeutung (nicht tabellarisch dargestellt).

Tab. 27: Odds-Ratio für die koronare Herzerkrankung und ihre Komplikationen bei heterozygoten Trägern der FII-Mutationen G20210A und G10253A in der logistischen Regressionsanalyse

	<u>FII20210 GA</u>		<u>FII10253 GA</u>	
	OR (95 % CI)*	p	OR (95 % CI)*	p
Manifestation < 40 Jahre	0,39 (0,05-2,97)	n.s.	1,42 (0,54-3,79)	n.s.
Manifestation < 50 Jahre	0,56 (0,22-1,42)	n.s.	1,02 (0,54-1,95)	n.s.
Schwere der KHK (3-Gefäß versus 1-Gefäß)	1,27 (0,47-3,43)	n.s.	1,05 (0,53-2,10)	n.s.
Akute Koronarsyndrome	0,40 (0,12-1,32)	n.s.	1,10 (0,58-2,07)	n.s.
30-Tage-Komplikation	0,94 (0,12-7,43)	n.s.	0,74 (0,17-3,23)	n.s.

* Logistische Regressionsanalyse unter Einschluss der unabhängigen Variablen Alter, männliches Geschlecht, BMI, Diabetes mellitus, Hypertonie, Hypercholesterinämie, Nikotin, Prothrombinaktivität.

Die Variablen Alter (OR = 1,07; 95 % CI 1,05 - 1,09), männliches Geschlecht (OR = 4,71; 95 % CI 3,06 - 7,26), Diabetes mellitus (OR = 1,71; 95 % CI 1,11 - 2,61) und Hypertonus (OR = 1,47; 95 % CI 1,02 - 2,12) gingen mit einem erhöhten Risiko bezüglich der Entwicklung einer 3-Gefäßerkrankung einher, wobei die P-Werte für das Alter und das männliche Geschlecht hoch signifikant waren ($P < 0,001$).

3.7 Beziehung der FII-Mutationen zu kardiovaskulären Risikofaktoren und anderen Parametern

Innerhalb der KHK-Gruppe wurde auf Beziehungen zwischen den FII-Polymorphismen G20210A und G10253A und den konventionellen kardiovaskulären Risiken untersucht. Weder für die Risikofaktoren Diabetes mellitus, Hypertonie und Nikotinkonsum noch für die Hoch-Risiko- (Patienten mit Hypertonie, Hypercholesterinämie und Rauchen) und Gering-Risiko-Kategorien (Patienten ohne Hypertonie, Hypercholesterinämie, Rauchen und Diabetes) waren Assoziationen mit den untersuchten Prothrombinvarianten nachweisbar. Es fanden sich keine signifikanten Differenzen in der Prävalenz der erwähnten Risikofaktoren zwischen den G20210A- beziehungsweise G10253A-Wildtypen und Mutationsträgern. Auch die Genotypenverteilung beider FII-Varianten zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den KHK-Patienten mit und denen ohne die erwähnten Risikofaktoren (nicht tabellarisch dargestellt).

Es fand sich lediglich eine Assoziation zwischen der FII-Variante G10253A und dem Risikofaktor Hypercholesterinämie. Dabei hatten deutlich weniger Träger des heterozygoten 10253GA-Genotyps eine Hypercholesterinämie als Träger des 10253GG-Wildtyps (32,1 % versus 53,5 %; $P = 0,002$), und Patienten ohne Hypercholesterinämie hatten, im Vergleich zu denen mit Hypercholesterinämie, einen signifikant höheren Anteil an Trägern der G10253A-Mutation zu verzeichnen (8,2 % versus 3,6 %; $P = 0,002$). Für die G20210A-Variante ließ sich dieser Zusammenhang mit dem Risikofaktor Hypercholesterinämie nicht erkennen.

Für die Variablen Alter, BMI, systolischer und diastolischer Blutdruck und für die Laborparameter Triglyzeride, Cholesterin, HDL-Cholesterin, LDL-Cholesterin, Apo-B, Apo-A1, Fibrinogen, vWF, Insulin und Homocystein waren sowohl in der KHK- Gruppe als auch in der Kontrollgruppe keine Beziehungen zu der G20210A-Mutation und der G10253A-Mutation

nachweisbar. Es fanden sich für die genannten Parameter keine signifikanten Unterschiede zwischen Trägern der Wildtypen und der entsprechenden FII-Mutation. Innerhalb der KHK-Gruppe war lediglich der Blutzucker bei den 20210GG-Wildtypen signifikant höher als bei den Trägern der Mutation ($P = 0,038$).

3.8 Korrelation zwischen Prothrombinaktivität und anderen Variablen

In der zweifaktoriellen nicht parametrischen Varianzanalyse fand sich ein signifikanter Zusammenhang des Gerinnungsfaktors II mit der koronaren Herzerkrankung und dem Geschlecht, jedoch keine Wechselwirkung zwischen KHK und Geschlecht.

Lineare Zusammenhänge zwischen Prothrombinaktivität und anderen Variablen wurden durch die Korrelation nach Pearson bestimmt: Für die Variablen BMI, Triglyzeride, Cholesterin, LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin, Apo-B, Apo-A1 und Fibrinogen konnte jeweils eine signifikante, jedoch nur sehr geringe positive Korrelation mit der Prothrombinaktivität gefunden werden. Die stärkste positive Korrelation wiesen dabei das Gesamtcholesterin ($r = 0,19$; $P < 0,001$) und das LDL-Cholesterin ($r = 0,17$; $P < 0,001$) auf. Ein negativer Zusammenhang fand sich für das Alter und den Blutzucker. Auch hier war anhand des ermittelten r-Wertes nur von einer sehr geringen Korrelation auszugehen. Keine signifikante Korrelation mit der Prothrombinaktivität ergab sich für die Variablen CrP, Lipoprotein a und Homocystein.

Anhand der Ergebnisse wird deutlich, dass die FII-Mutationen G20210A und G10253A, sowohl einzeln als auch in Kombination, keine genetischen Risikofaktoren für die koronare Herzerkrankung in der untersuchten Studienpopulation kaukasischer Herkunft darstellen. Die Stratifizierung nach Geschlecht und kardiovaskulären Risiken erbrachte diesbezüglich auch keine Effektmodifikation. Darüber hinaus sprechen die Resultate gegen einen Zusammenhang der Prothrombinvarianten mit einer frühen Manifestation der KHK (< 40 Jahre beziehungsweise < 50 Jahre) und dem Schweregrad der koronaren Herzerkrankung sowie gegen ein erhöhtes

Risiko für akute Koronarsyndrome oder Auftreten kardialer Frühkomplikationen nach perkutaner Koronarintervention bei Mutationsträgern.

Zwischen den FII-Mutationen G20210A und G10253A konnte keine allelische Assoziation nachgewiesen werden.

Es fand sich lediglich eine Beziehung zwischen der FII-Variante G10253A und dem Risikofaktor Hypercholesterinämie, während der FII-Polymorphismus G20210A in keinem Zusammenhang mit den konventionellen kardiovaskulären Risikofaktoren stand.

Ferner konnte der signifikante Einfluss der G20210A-Mutation auf die Prothrombinaktivität demonstriert werden. Träger des heterozygoten 20210GA-Genotyps hatten eine um 13-15 % höhere Prothrombinaktivität als Nichtträger ($P < 0,001$). Der G10253A-Polymorphismus hatte in der Gesamtgruppe jedoch keine Auswirkungen auf die FII-Aktivität. Die gleichzeitige Präsenz der FII-Mutationen ging zwar mit einer verringerten medianen Prothrombinaktivität einher, doch beruhte dieses Resultat nur auf 3 Messwerten, da lediglich 3 Individuen Träger beider FII-Mutationen waren, was diesbezüglich keine verlässliche Aussage erlaubt.

4 Diskussion

4.1 Prävalenz des FII-Polymorphismus G20210A und interethnische Differenzen

Die in dieser Fall-Kontroll-Studie bei 978 Patienten mit angiographisch gesicherter koronarer Herzerkrankung ermittelte Prävalenz der G20210A-Mutation (3,1 %; 95 % CI 2,1 % - 4,4 %) war nicht signifikant verschieden von der bei 984, nach Alter und Geschlecht gepaarten, Kontrollen gefundenen Mutationshäufigkeit (2,0 %; 95 % CI 1,2 % - 3,1 %). Die Kontrollprävalenz von 2,0 % steht sowohl im Einklang mit der in einer großen multizentrischen Studie für die gesunde kaukasische Allgemeinbevölkerung gesicherten Gesamtprävalenz von 2,0 % (95 % CI 1,4 % - 2,6 %) als auch mit der Häufigkeit von 1,7 % (95 % CI 1,3 % - 2,2 %), die für die G20210A-Mutation in den Populationen Mittel- und Nordeuropas beschrieben wurde (Rosendaal et al. 1998). In der umfangreichen Untersuchung von Rosendaal et al., die insgesamt 5527 gesunde Individuen vorwiegend kaukasischer Herkunft einschloss, variierten die Prävalenzwerte jedoch von 0,7 % bis 4,0 % zwischen den 11 beteiligten Zentren und waren in Südeuropa mit 3,0 % (95 % CI 2,3 % - 3,7 %) fast doppelt so hoch wie in den nordeuropäischen Ländern (Rosendaal et al. 1998). Darüber hinaus entsprechen die in der jetzigen Arbeit ermittelten Häufigkeiten und die Verteilung der FII G20210A-Mutation auch denen zweier vorheriger deutscher Studien, die die Prothrombinvariante bei 2210 Männern mit angiographisch definierter Koronaranatomie und koronarer Herzerkrankung in 2,8 % der Fälle beziehungsweise bei 2,1 % der 284 Patienten mit koronarer Herzerkrankung und 2,0 % der 340 gesunden Kontrollindividuen nachwies (Gardemann et al. 1999; Prohaska et al. 1999).

In einigen anderen Untersuchungen nord- und mitteleuropäischer Populationen wurden Prävalenzwerte gesichert, die sowohl von denen in dieser Studie als auch von der für die Länder Nord- und Zentraleuropas beschriebenen Prävalenz abweichen (Rosendaal et al. 1998). So fanden sich in zwei niederländischen Fall-Kontroll-Studien innerhalb der gesunden Kontrollpopulationen vergleichsweise niedrige Prävalenzen des heterozygoten 20210GA-Genotyps von 1,0 % beziehungsweise 1,2 %, wobei in einer dieser Untersuchungen nur Männer betrachtet wurden (Doggen et al. 1998; Franco et al. 1999). Im Gegensatz dazu trugen in einer schweizerischen Fall-Kontroll-Studie 4,5 % der 89 gesunden Kontrollen die FII-Variante, jedoch nur 0,6 % der 177 Myokardinfarktpatienten (Redondo et al. 1999). Vergleichbar hohe Prävalenzen für die G20210A-Mutation (4,0 % und 5,1 %) wurden hingegen bei österreichischen und niederländischen Patienten mit koronarer Herzerkrankung beobachtet (Watzke et al. 1997; Gerdes et al. 2002).

Weiterhin lieferten zahlreiche Studien anderer kaukasischer Populationen aus Südeuropa und verschiedenen Ländern außerhalb Europas (USA, Australien, Neuseeland, Israel, Brasilien) Prävalenzdaten für die FIIIG20210A-Mutation, die auch nicht im Einklang mit den Ergebnissen der jetzigen Untersuchung und der für die kaukasische Allgemeinbevölkerung ermittelten Gesamtprävalenz stehen (Rosendaal et al. 1998). Abgesehen von den gesunden südeuropäischen und nordamerikanischen Populationen, die allgemein etwas häufiger die Prothrombinvariante aufweisen (Rosendaal et al. 1998; Feng et al. 1999; Ridker et al. 1999, Smiles et al. 2002), zeichnen sich hier vorwiegend Patientenkollektive mit kardiovaskulären Erkrankungen durch eine höhere Prävalenz des heterozygoten 20210GA-Genotyps aus, was auf ein erhöhtes Krankheitsrisiko bei Mutationsträgern hindeuten könnte. Die Prävalenzwerte innerhalb dieser Patientenkollektive, die zwischen 41 und 436 Individuen umfassten, variierten von 5,1 % bis 10,6 % bei Patienten mit Myokardinfarkt (Arruda et al. 1997; Rosendaal et al. 1997; Feng et al. 1999; Inbal et al. 1999; van de Water et al. 2000; French et al. 2003; Segev et al. 2005), akuten Koronarsyndromen (Burzotta et al. 2002) und schwerer Koronarsklerose (Russo et al. 2001). Die höchste Prävalenz für den G20210A-Polymorphismus (10,6 %) wurde bei 85 jungen Patienten aus Israel beobachtet, die einen ersten Myokardinfarkt vor dem 50. Lebensjahr erlitten hatten (Segev et al. 2005), wobei auch innerhalb der Populationen, die seit Generationen im Nahen Osten ansässig sind, die bisher höchsten Prävalenzen bei gesunden Individuen von bis zu 6,7 % beobachtet wurden (Zivelin et al. 1998). Es wird deutlich, dass vor allem weniger umfangreiche und stärker selektierte Patientenpopulationen durch eine höhere Anzahl an Mutationsträgern gekennzeichnet sind (Arruda et al. 1997; Rosendaal et al. 1997; van de Water et al. 2000; French et al. 2003; Segev et al. 2005).

Bezüglich der Prävalenz der FII-Mutation G20210A sind jedoch nicht nur Differenzen zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen und kaukasischen Populationen sondern auch innerhalb sehr ähnlicher Populationsgruppen nachweisbar. So zeigten gesunde Kontrollindividuen aus den Niederlanden Frequenzen des heterozygoten 20210GA-Genotyps (1,0 %; 1,2 %; 2,3 %), die über das Zweifache variierten (Poort et al. 1996; Doggen et al. 1998; Franco et al. 1999), und in drei Kontrollkollektiven aus den USA reichten die Prävalenzen des 20210GA-Genotyps von 1,6 % bis 4,0 % (Rosendaal et al. 1997; Feng et al. 1999; Ridker et al. 1999).

Die Gründe für die Diskrepanzen zwischen den Studien sind nicht immer eindeutig und offensichtlich. Neben Populationsvariation und Genotypisierungsfehlern können voneinander abweichende Kriterien für die Rekrutierung von Individuen und die Betrachtung oftmals sehr selektierter Kollektive unterschiedlichen Alters und Geschlechtes für die Differenzen

verantwortlich sein. In der multizentrischen Studie von Rosendaal et al., die die Prävalenz der G20210A-Mutation bei gesunden, kaukasischen Individuen aus 9 verschiedenen Ländern untersuchte, variierte die Auswahl der Individuen zwischen den beteiligten Zentren. Das Spektrum der Stichproben reichte von Klinikangestellten, Blutspendern, Neugeborenen bis hin zu verschiedenen Patienten- und Kontrollgruppen aus der Allgemeinbevölkerung, wobei versucht wurde, Individuen mit kardiovaskulären Erkrankungen oder Thrombose in der Anamnese auszuschließen (Rosendaal et al. 1998).

Wie in der Mehrzahl der erwähnten Fall-Kontroll-Studien umfasste auch die Vergleichsgruppe der vorliegenden Arbeit nur Individuen ohne anamnestische kardiovaskuläre und schwere systemische Erkrankungen. Das könnte allgemein zu geringeren Prävalenzwerten in den Kontrollkollektiven führen als in einer theoretisch idealen, unselektierten Gruppe von konsekutiv rekrutierten Neugeborenen. Dieser Aspekt scheint jedoch eher unbedeutend zu sein, da in einer österreichischen Studie bei 102 zentraleuropäischen Neugeborenen eine Mutationshäufigkeit von 1,96 % gesichert wurde, die der für kaukasische Populationen Mitteleuropas publizierten Prävalenz vergleichbar ist (Watzke et al. 1997; Rosendaal et al. 1998).

Mit Ausnahme von vier Studien, die entweder nur Frauen oder nur Männer analysierten (Rosendaal et al. 1997; Doggen et al. 1998; Inbal et al. 1999; Ridker et al. 1999), rekrutierten die übrigen Studien, einschließlich der hier vorliegenden, Individuen beider Geschlechter in unterschiedlichen Anteilen.

Auch die homogene ethnische Zusammensetzung der Studienpopulationen ist entscheidend, um einen Einfluss des ethnischen Hintergrundes auf die Prävalenzdaten zu vermeiden. Aus diesem Grund waren in der jetzigen Studie ausschließlich kaukasische Individuen aus Berlin und Umgebung eingeschlossen, während die Studienpopulationen zweier amerikanischer Arbeiten durch eine ethnische Heterogenität gekennzeichnet waren (Rosendaal et al. 1997; Ridker et al. 1999).

Abgesehen von der multizentrischen Studie von Rosendaal et al. (5527 Individuen) und der prospektiven Studie von Ridker et al., in der 1774 US-amerikanische Männer als Kontrollkollektiv betrachtet wurden (Rosendaal et al. 1998; Ridker et al. 1999), umfassten viele der aufgeführten Studien nur kleine Fallzahlen, was in Anbetracht der relativ geringen Prävalenz des G20210A-Polymorphismus in ungenauen und weniger verlässlichen Frequenzschätzungen resultieren könnte (Arruda et al. 1997; Rosendaal et al. 1997; Watzke et al. 1997; Feng et al. 1999; Inbal et al. 1999; Redondo et al. 1999; van de Water et al. 2000; French et al. 2003;

Segev et al. 2005). Während einzelne Untersuchungen sogar weniger als 100 gesunde Kontrollprobanden einschlossen (Feng et al. 1999; Redondo et al. 1999), zeichnet sich die vorliegende Arbeit auch durch eine vergleichsweise große Studienpopulation von insgesamt 2000 Patienten aus.

Die Tabelle 28 zeigt die wichtigsten Fall-Kontroll-Studien und prospektiven Studien, die die Prävalenz der FIIG20210A-Mutation bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung und Kontrollen untersuchten. Die Metaanalysen zur Assoziation der Prothrombinvariante G20210A mit der koronaren Herzerkrankung sind in Tabelle 29 aufgeführt.

Tab. 28: Hauptcharakteristika der wichtigsten Fall-Kontroll-Studien zu FIIG20210A und Prävalenz des 20210GA-/ AA-Genotyps bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung und Kontrollen.

Studie	Herkunft / Geschlecht	Phänotyp	Patienten GA-/ AA n (%)	Kontrollen GA-/ AA n (%)	OR (95 % CI)
Arruda 1997	Brasilien F, M (Kaukasier)	MI, CVD, PAVK	4/70 (5,7)	2/295 (0,7)	8,4 (1,58-45)
Corral 1997	Spanien F, M	MI, IAP	4/101 (4,0)	2/101 (2,0)	2,0 (0,4-11,4)
Ferraresi 1997	Italien F, M	KHK (MI, AP)	3/90 (3,3)	3/70 (4,3)	0,8 (0,2-3,9)
Rosendaal 1997	USA F (11% Nichtweiße)	MI	4/79 (5,1)	6/381 (1,6)	4,0 (1,1-15,1)
Watzke 1997	Österreich F, M	KHK	5/98 (5,1)	2/102 (1,96)	2,7 (0,5-14,0)
Arruda 1998	Brasilien F, M (Kaukasier)	MI	7/220 (3,2)	2/295 (0,7)	4,8 (1,0-23,4)
Doggen 1998	Niederlande M	MI	10/560 (1,8)	8/646 (1,2)	1,5 (0,6-3,8)
Eikelboom 1998	Australien F, M (vorw. Kaukasier)	KHK	16/644 (2,5)	22/679 (3,2)	0,8 (0,35-1,83)
		MI	9/402 (2,2)	7/242 (2,9)	0,7 (0,27-2,05)
Ardissino 1999	Italien F, M	MI	11/200	8/200	1,4 (0,5-3,92)
Croft 1999	Großbritannien F, M	MI	11/539 (2,0)	14/498 (2,8)	0,72 (0,32-1,60)

Feng 1999	USA F, M (keine Angabe zur Ethnizität)	MI, IAP	6/100 (6,0)	1/25 (4,0)	n.a.
Franco 1999	Niederlande F, M	KHK, pAVK MI	7/263 (2,7) 7/173 (4,0)	4/400 (1,0)	2,7 (0,8-9,4) 4,2 (1,2-14,6)
Inbal 1999	Israel M	MI	7/112 (5,9)	6/187 (3,4)	1,78 (0,46-6,94)
Prohaska 1999	Deutschland F, M	KHK	6/284 (2,1)	7/340 (2,0)	1,03
Redondo 1999	Schweiz F, M	MI	1/177 (0,6)	4/89 (4,5)	0,1 (0,01-1,1)
Ridker 1999	USA M (6% Nichtweiße)	MI	12/404 (3,0)	69/1774 (3,9)	RR=0,8 (0,4-1,4)
Vargas 1999	Spanien M	KHK	7/175 (4,0)	7/200 (3,5)	n.a.
Coulet 2000	Kaukasier M	MI	19/599 (3,2)	19/663 (2,9)	n.a.
Russo 2001	Italien F, M	KHK MI	23/436 (5,3) 11/244 (4,5)	7/224 (3,1) 8/152 (5,3)	1,72 (0,72-4,08) 0,85 (0,33-2,16)
Burzotta 2002	Italien F, M	ACS (MI, IAP)	16/247 (6,5)	7/247 (2,8)	2,4 (1,0-5,9)
Ital. Study Gr. 2003 ¹	Italien F, M	MI	40/1210 (3,3)	39/1210 (3,2)	1,0 (0,6-1,5)
Almawi 2004	Libanon F, M	KHK	3/96 (3,1)	12/404 (3,0)	1,1 (0,3-3,8)

ACS = Akutes Koronarsyndrom; AP = Angina pectoris; CVD = Zerebrovaskuläre Erkrankung; IAP = instabile Angina pectoris; KHK = Koronare Herzerkrankung; MI = Myokardinfarkt; PAVK = periphere arterielle Verschlusskrankheit; RR = relatives Risiko; F = Frauen; M = Männer; 1 = Atherosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology Italian Study Group; n.a. = nicht angegeben

Tab. 29: Ergebnisse der Metaanalysen, die die Assoziation zwischen der FIIG20210A-Mutation und der koronaren Herzerkrankung untersuchten

Metaanalyse	Phänotyp	Patienten mit 20210GA-/ AA	Kontrollen mit 20210GA-/ AA	OR (95 % CI)
Boekholdt 2001	MI	36/1535	92/2943	0,89 (0,59-1,35)
	MI < 55 J.	22/391	20/768	1,86 (0,99-3,51)
	gesamt	58/1926	112/3711	1,11 (0,79-1,56)
Wu 2001	ACS (IAP, AMI)	n.a./1818	n.a./3789	1,15 (0,84-1,59)
Kim 2003	AMI	157/4887	229/7840	1,28 (0,94-1,73)
Burzotta 2004 b	KHK	160/4944	181/7090	1,21 (0,99-1,58)
	MI	n.a./3687	n.a./6078	1,19 (0,93-1,58)
	MI < 45 Jahre	n.a./394	n.a./965	2,30 (1,27-4,59)
	MI < 55 Jahre	n.a./624	n.a./1307	1,77 (1,16-3,42)
	ACS	n.a./3965	n.a./6275	1,24 (0,98-1,63)
Ye 2006	KHK	n.a./11625	n.a./14462	1,31 (1,12-1,52)
	MI	n.a./8211	n.a./12356	1,25 (1,05-1,50)

ACS = Akutes Koronarsyndrom; AMI = akuter Myokardinfarkt; IAP = instabile Angina pectoris; KHK = Koronare Herzerkrankung; MI = Myokardinfarkt; n.a. = nicht angegeben

4.2 Bedeutung der FIIG20210A-Mutation für die koronare Herzerkrankung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese, dass die Prothrombinvariante G20210A einen genetischen Risikofaktor für die koronare Herzerkrankung darstellt, in einer Studienpopulation von 1000 Patienten mit angiographisch nachgewiesener koronarer Herzerkrankung und 1000 alters- und geschlechtsgepaarten Kontrollen überprüft. Diese kann anhand der Resultate der aktuellen Studie jedoch nicht unterstützt werden. Damit werden die Ergebnisse verschiedener Autoren bestätigt, die auch keine Assoziation der FII-Mutation G20210A mit angiographisch diagnostizierter koronarer Herzerkrankung und / oder schwerer Koronarsklerose bei Patienten kaukasischer Herkunft fanden (Watzke et al. 1997; Eikelboom et al. 1998; Gardemann et al. 1999; Prohaska et al. 1999; Vargas et al. 1999; Russo et al. 2001; Almawi et al. 2004). Über diese Einzelstudien hinaus konnten auch die Metaanalysen von Burzotta et al. (4944 Fälle und 7090 Kontrollen) und von Wu et al. (1818 Fälle und 3789 Kontrollen) keine Assoziation zwischen dem G20210A-Polymorphismus und der koronaren Herzerkrankung (OR = 1,21;

95 % CI 0,99 - 1,58; OR = 1,31; 95 % CI 0,84 - 1,59) sowie angiographisch nachgewiesener koronarer Herzerkrankung (OR = 1,08, 95 % CI 0,70 - 1,64) sichern (Wu et al. 2001; Burzotta et al. 2004). Gegen eine Bedeutung der Prothrombinvariante G20210A als hereditärer Prädispositionsfaktor für KHK spricht auch, dass in der jetzigen Untersuchung keine Verbindung der G20210A-Mutation mit der koronaren Herzerkrankung bei jungen Individuen und bei Patienten mit akuten Koronarsyndromen gesehen wurde, bei denen nicht nur die genetische Komponente von besonderer Bedeutung und die frühe Krankheitsmanifestation das Resultat einer stärkeren genetischen Prädisposition ist, sondern auch die Gerinnung eine vorrangige Rolle in der Pathogenese spielt (Shea et al. 1984; Marenberg et al. 1994). Darüber hinaus stand die, mit der FII-Mutation nachweislich einhergehende, gesteigerte Prothrombinaktivität weder im Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko für KHK noch mit akuten Koronarsyndromen.

Die unselektierte Population von KHK-Patienten der jetzigen Studie wies sowohl das herkömmliche Spektrum an Risikofaktoren (Diabetes mellitus, Hypertonie, Hypercholesterinämie und Rauchen) als auch einen hohen Anteil dieser konventionellen kardiovaskulären Risiken auf und ist als repräsentativ für die Patienten anzusehen, die den klinischen Alltag bestimmen. Aus diesem Grund können Resultate dieser Untersuchung am ehesten für die allgemeine Population von KHK-Patienten gelten.

Die Beziehung zwischen dem Prothrombin-20210A-Allel und der koronaren Herzerkrankung wird in der vorhandenen Literatur jedoch kontrovers beurteilt, und verschiedene Studien haben mit ihren Ergebnissen nahegelegt, dass eine Assoziation zwischen der genetischen Variante G20210A und der koronaren Herzerkrankung, insbesondere den akuten koronaren Syndromen, vorhanden sein kann.

Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit zeichnete sich die Mehrzahl der Untersuchungen, die eine Verbindung zwischen der Prothrombinvariante G20210A und der koronaren Herzerkrankung demonstrierten, durch vergleichsweise kleine Studiengrößen und stärker selektierte Patientengruppen aus. In diesen Fall-Kontroll-Studien wie auch Metaanalysen waren vorwiegend Mutationsträger mit zusätzlichen Hauptrisikofaktoren (Rosendaal et al. 1997; Doggen et al. 1998; Gardemann et al. 1999; Inbal et al. 1999), junge Patienten (Arruda et al. 1997; Rosendaal et al. 1997; Franco et al. 1999; Boekholdt et al. 2001; Burzotta et al. 2004 b) oder Studienteilnehmer mit begrenzter atherosklerotischer Beteiligung (Burzotta et al. 2000; van de Water et al. 2000; Burzotta et al. 2002; French et al. 2003) durch ein gesteigertes Risiko für die koronare Herzerkrankung, vor allem für Myokardinfarkt beziehungsweise akute Koronarsyndrome gekennzeichnet. So wurde bei jungen, vorwiegend weißen Frauen aus den

USA ein vierfach erhöhtes Risiko für Myokardinfarkt bei Trägerinnen des FII20210A-Allels gefunden, insbesondere bei denen mit zusätzlichen Risikofaktoren (Rosendaal et al. 1997). Auch zwei männliche Patientenkollektive aus den Niederlanden und Israel zeigten eine signifikante Risikosteigerung für Myokardinfarkt, wenn konventionelle kardiovaskuläre Hauptrisikofaktoren gleichzeitig präsent waren (Doggen et al. 1998; Inbal et al. 1999). In der Studie von Rosendaal et al. wurden jedoch auch nicht weiße Frauen betrachtet, was die Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung wie auch zahlreicher weiterer Studien erschwert. Andere Untersucher beobachteten wiederum, dass die Präsenz des 20210A-Allels ein signifikant erhöhtes Risiko für ein arterielles thrombotisches Geschehen oder akute Koronarsyndrome bei Patienten mit günstigem kardiovaskulären Risikoprofil erzielte (Arruda et al. 1997; Burzotta et al. 2002), und dass die Frequenz der Prothrombinvariante bei den Myokardinfarktpatienten erhöht war, die normale Koronarien aufwiesen (van de Water et al. 2000; French et al. 2003).

Neben dem Nachweis, dass die Prothrombinvariante G20210A am Prozess der Arterienwandverdickung bei Individuen mit etablierter Atherosklerose beteiligt ist (Gerdes et al. 2002), wiesen auch Ergebnisse der jüngsten und größten Metaanalyse von Ye et al., die mit insgesamt 11625 Fällen und 14462 Kontrollen (40 Studien, inklusive vier unveröffentlichte Arbeiten) dreimal so viele Daten wie die vorherige Metaanalyse von Burzotta et al. berücksichtigte (Burzotta et al. 2004 b), auf eine moderate, aber signifikante Assoziation der G20210A-Variante des Prothrombingens mit der koronaren Herzerkrankung hin (OR = 1,31; 95 % CI 1,12 - 1,52) (Ye et al. 2006). Dieses Resultat unterliegt natürlich den mit diesem Verfahren verbundenen Nachteilen und ist deshalb mit Vorsicht zu interpretieren, zumal eine Heterogenität zwischen den 40 eingeschlossenen Studien nachweisbar war. Nach Angaben der Untersucher wurde zwar der Publikationsbias durch Identifizierung und Einschluss unveröffentlichter Daten deutlich reduziert, trotzdem ist eine Verzerrung der metaanalytischen Daten durch einen Restbias nicht vollständig auszuschließen (Ye et al. 2006).

Diese sehr unterschiedlichen Beobachtungen spiegeln die Kontroverse um die Klärung des klinisch so bedeutenden Sachverhaltes wider. Die widersprüchlichen Ergebnisse der Studien könnten sowohl auf ihre Heterogenität bezüglich der Endpunktdefinition (KHK, Myokardinfarkt, akute Koronarsyndrome, Koronarstenose), des Studiendesigns und der Studiengröße, als auch auf verschiedene Auswahlstrategien, Unterschiede im Grad der Paarung von Fällen und Kontrollen und abweichende Genotypisierungsprozeduren zurückzuführen sein.

Ferner kommt der genetischen Zusammensetzung der analysierten Population sowie der Interaktion mit erworbenen Faktoren oder Umweltfaktoren große Bedeutung zu. In der jetzigen Arbeit wurde zur Vermeidung einer Populationsstratifikation die ethnische Homogenität der Studienpopulation sichergestellt, indem nur kaukasische Individuen aus Berlin und Umgebung rekrutiert wurden. Im Gegensatz dazu war beispielsweise die weibliche Studienpopulation einer US-amerikanischen Untersuchung, die eine Assoziation zwischen dem FII20210A-Allel und dem Risiko für Myokardinfarkt aufzeigen konnte, ethnisch heterogen zusammengesetzt (Rosendaal et al. 1997).

Ein Schlüsselpunkt bei genetischen Studien ist weiterhin die präzise Definition und Erfassung der Phänotypen bei Fällen und Kontrollen, um eine Vermischung ätiologisch unterschiedlicher Erkrankungsgruppen zu vermeiden und die Vergleichbarkeit zwischen den Studien zu gewährleisten. Es ist möglich, dass die divergenten Ergebnisse in der Literatur die breite klinische Heterogenität der Patienten mit koronarer Herzerkrankung reflektieren, die in die publizierten Arbeiten eingeschlossen wurden (KHK, anamnestischer und / oder akuter Myokardinfarkt, akute Koronarsynndrome, Koronarstenose). In der vorliegenden Arbeit wurden nur Fälle mit angiographisch bestätigter koronarer Herzerkrankung in die Patientengruppe einbezogen. Begrenzung dieser wie auch vieler anderer Assoziationsstudien ist jedoch, dass einige der Kontrollen möglicherweise eine asymptomatische KHK haben könnten, da diese anhand der klinischen Anamnese und ohne angiographischen Beweis für normale Koronarien ausgewählt wurden, was die Möglichkeit von Nullresultaten erhöht. Dieser Aspekt scheint allerdings für diese Studie nicht von großer Relevanz zu sein, da die Frequenz der Prothrombinvariante in der Kontrollpopulation der in der kaukasischen Allgemeinbevölkerung entspricht (Rosendaal et al. 1998). Und in einer italienischen Arbeit, in der ausschließlich kaukasische Individuen mit angiographischer Dokumentation des Koronarstatus sowohl in die Patienten- als auch Kontrollgruppe eingeschlossen wurden, war auch keine Assoziation zwischen der G20210A-Variante und der koronaren Herzerkrankung nachweisbar (Russo et al. 2001).

Auf der Grundlage der Beobachtung, dass die Frequenzen der Prothrombinvariante G20210A in verschiedenen Populationen schwanken und bei gesunden Kaukasiern zwischen 1 % und 4 % liegen (Rosendaal et al. 1998), könnten zudem signifikante Populationsvariationen wie auch Unterschiede in der Prävalenz anderer genetischer und umgebungsbedingter prädisponierender Risikofaktoren wichtige Ursachen für die diskrepanten Resultate darstellen.

Um mit der gewünschten statistischen Aussagekraft die zu erwartenden kleinen bis mittelgroßen genetischen Effekte, auch unter den Bedingungen einer allelischen Heterogenität und des multiplen Testens, nachweisen zu können, muss die Fallzahl der untersuchten Studienpopulation hinreichend groß sein. Während die Population dieser Studie von 2000 Patienten zum Zeitpunkt der Rekrutierung eine der größten genetischen Assoziationsstudien zur KHK darstellte, waren die meisten aufgeführten Studien, trotz der geringen Prävalenz der FII-Transition, durch eher kleine Stichprobenumfänge charakterisiert. Bedingt durch die inadäquate Studiengröße basierten die Risikoschätzungen vieler Arbeiten auf einer geringen Zahl von Mutationen, sodass Assoziationen möglicherweise durch Stichprobenvariation und / oder Zufall, negative Ergebnisse durch den begrenzten statistischen Informationswert der kleinen Gruppen verursacht sein könnten. Zusätzlich waren in vielen Untersuchungen durch die kleinen Stichprobenumfänge und die Seltenheit des A-Allels getrennte Betrachtungen von männlichen und weiblichen Individuen wie auch Analysen in Untergruppen von Patienten mit günstigem oder ungünstigem Risikoprofil nicht möglich.

Wie auch die vorliegende Arbeit haben die meisten der erwähnten Studien einen retrospektiven Ansatz und unterliegen damit den mit diesem Verfahren verbundenen Nachteilen. Der „allele drop out“ scheint aber keine allzu große Rolle zu spielen. Zwar wurde in einer kleinen Autopsiestudie eine erhöhte Prävalenz des 20210GA-Genotyps bei Patienten mit tödlichem Myokardinfarkt beobachtet (OR = 7,0; 95 % CI 0,6 - 82), doch waren wiederum in einer Gruppe von 2689 gesunden Kaukasiern keine signifikanten altersabhängigen Prävalenzunterschiede beziehungsweise kein zeitabhängiger gesundheitsschädlicher Einfluss für den G20210A-Polymorphismus nachweisbar (Hessner et al. 2001, Mikkelsen und Karhunen 2002).

Die jetzigen Ergebnisse wie auch die bestehende Kontroverse um die Hypothese, ob die FIIG20210A-Mutation einen genetischen Risikofaktor für die koronare Herzerkrankung darstellt, stützen die Notwendigkeit, viel größere Untersuchungen mit Studienpopulationen von mehreren tausend phänotypisierten Patienten durchzuführen, um einen moderaten, aber potentiell wichtigen Effekt, auch in komplexen Zusammenhängen wie der koronaren Herzerkrankung, verlässlich beurteilen zu können.

4.3 Phänotypische Bedeutung der FIIG20210A-Mutation

4.3.1 Verbindung des 20210A-Allels mit der Prothrombinaktivität

Die erstmalig von Poort et al. beschriebene signifikante Variabilität der Aktivität wie auch der Konzentration des Prothrombins als Funktion der G20210A-Genotypen konnte von mehreren nachfolgenden Studien, einschließlich der jetzigen Studie, bestätigt werden (Poort et al. 1996; Ferraresi et al. 1997; Kyrle et al. 1998; Franco et al. 1999; Soria et al. 2000; von Ahsen et al. 2000; Russo et al. 2001). Die höchsten Prothrombinaktivitäten wurden bei Trägern des homozygoten 20210AA-Genotyps ermittelt (Soria et al. 2000). In der hier vorliegenden Untersuchung ging die Präsenz des heterozygoten 20210GA-Genotyps sowohl in der Gesamtgruppe als auch nach getrennter Betrachtung der KHK-Gruppe und der Kontrollgruppe mit einer signifikanten Erhöhung der FII-Aktivität um 13,0 - 15,0 % einher ($P < 0,001$).

Während Konsens über die gesteigerte Prothrombinaktivität bei Trägern der FII-Variante in der Literatur besteht, sind bezüglich der Konzentration des Prothrombinantigens widersprüchliche Ergebnisse gefunden worden (Poort et al. 1996; Kyrle et al. 1998; Franco et al. 1999; von Ahsen et al. 2000; Smiles et al. 2002). In Tabelle 30 sind Studien dargestellt, die verschiedene Prothrombinparameter in Abhängigkeit vom FIIG20210A-Genotyp beurteilten.

Der in einigen Studien berichtete signifikante Einfluss des Geschlechtes auf die Prothrombinaktivität fand auch in der jetzigen Studie Bestätigung (von Ahsen et al. 2000; Russo et al. 2001). Frauen hatten sowohl in der KHK- als auch in der Kontrollgruppe deutlich höhere Werte für die Prothrombinaktivität als die entsprechenden Männer (siehe Tab. 12). Gründe dafür könnten im hormonellen Status wie auch in der Verwendung oraler Kontrazeptiva zu suchen sein. So ist bekannt, dass weibliche Geschlechtshormone die Prothrombinzeit durch Modulation verschiedener Gerinnungsparameter verkürzen können (Stadel 1981).

In der jetzigen Arbeit wurden bei 976 Patienten mit angiographisch gesicherter KHK (Altersmedian 60,6 Jahre) und 977 alters- und geschlechtsgepaarten Kontrollen (Altersmedian 60,5 Jahre) im Vergleich zu drei anderen Studien, die die Prothrombinaktivität auch durch einen Gerinnungs-Assay bestimmten (Soria et al. 2000; von Ahsen et al. 2000; Russo et al. 2001), eher niedrige und sich im Normbereich befindende FII-Aktivitätswerte ermittelt. Die vier Studienpopulationen waren insofern vergleichbar, als sie alle kaukasischer Herkunft waren und sich aus beiden Geschlechtern zusammensetzten, doch hatten zwei der Untersuchungen einen größeren Frauen- als Männeranteil zu verzeichnen, was die höheren Prothrombinaktivitäten in

den Gesamtgruppen begründen kann (Soria et al. 2000; von Ahsen et al. 2000). Das Probandenspektrum variierte zudem erheblich zwischen den Studien und reichte von Individuen mit früherer venöser oder arterieller Thrombose (Soria et al. 2000) über Patienten mit angiographisch nachgewiesener koronarer Herzerkrankung und Kontrollpatienten (Russo et al. 2001; jetzige Studie) bis hin zu gesunden Blutspendern (von Ahsen et al. 2000).

Tab. 30: Studien, die verschiedene Marker des Prothrombinmetabolismus in Abhängigkeit vom FIIG20210A-Genotyp untersuchten.

Studie	PT-Marker	FIIG20210A-Genotyp			p*
		GG	GA	AA	
Poort 1996 ¹	PT-Ant. (U/ml)	1,05±0,15	1,32±0,18		<0,001
Ferraresi 1997 ²	PT-Akt. (U/ml)	1,08±0,15	1,23±0,14		0,0002
Kyrle 1998 ³	PT-Akt. (U/ml)	1,06±0,21	1,41±0,26		<0,0001
	PT-Ant. (U/ml)	0,99±0,16	1,24±0,25		<0,0001
	F1+2 (nmol/l)	1,2±0,45	1,5±0,9		>0,05
	ETP (nmol/l*min)	387±50,1	527,8±114,9		<0,0001
Franco 1999 ⁴	PT-Ant. (%)	103±1	126±10		0,02
	TAT (µg/l)	6±1	16±9		0,02
	F1+2 (nmol/l)	1±0,1	1,5±0,3		0,02
	D-Dimer (µg/l)	253±14	334±101		n.s.
von Ahsen 2000 ⁵	PT-Akt. (%)	114± 18,3	131±7,1		0,017
	PT-Ant. (mg/l)	107±20,6	122±30,7		0,245
Soria 2000 ⁶	PT-Akt. (%)	123,6±1,8	141,1±3,7	167,7±8,4	<1*10 ⁻⁷
Russo 2001 ⁷	PT-Akt. (%)	122,2±1,8	153,2±38,6		<0,001
Smiles 2002 ⁸	PT-Konz. (µg/ml)	139,5	166,3		<0,001
	F1+2 (nM)	0,40	0,44		n.s.
Jetzige Studie ⁹	PT-Akt. (%)	94,0	106,5		<0,001
	(Median, 25.-75. Perz.)	(86,0-102,0)	(100,8-120,3)		

* GG-Genotyp versus GA-/AA-Genotyp; 1 = Patienten mit tiefer Beinvenenthrombose, gesunde Kontrollen; 2 = Patienten mit venöser Thrombose; 3 = Patienten mit tiefer Beinvenenthrombose mit GA-Genotyp, alters- und geschlechtsgepaarte, gesunde Kontrollen; 4 = junge Patienten mit atherosklerotischer Erkrankung; 5 = gesunde Blutspender; 6 = Familienmitglieder mit oder ohne thrombotischem Ereignis, Kontrollen; 7 = KHK-Patienten mit schwerer Koronarsklerose, Kontrollen mit normalen Koronarien; 8 = Patienten mit Myokardinfarkt, Angina oder Apoplex, Kontrollen; 9 = KHK-Patienten, Kontrollen. ETP = endogenes Thrombinpotential; F1+2 = Prothrombinfragment 1+2; PT-Akt. = Prothrombinaktivität; PT-Ant. = Prothrombinantigen; TAT = Thrombin-Antithrombin-Komplex

In der vorliegenden Studie wurden auch KHK-Patienten mit akuten Koronarsyndromen in die Gerinnungsanalyse einbezogen, während solche Patienten von Russo et al. ausgeschlossen wurden, da diese Autoren keine vorübergehenden Veränderungen der Prothrombinaktivität berücksichtigen wollten (Russo et al. 2001). Im Gegensatz zur jetzigen Arbeit, in der zur Beschreibung der Prothrombinaktivität der Median Anwendung fand, wurde in den anderen Studien der Mittelwert der FII-Aktivität angegeben, der anfälliger für Ausreißer ist und bei schiefen Verteilungen unter Umständen auch höhere Werte annehmen kann.

Allgemein können Unterschiede in der Höhe der Prothrombinparameter nicht nur in dem unterschiedlichen Alter, der differierenden Probandenauswahl oder den voneinander abweichenden Bedingungen der Probenentnahme, sondern auch in der unterschiedlichen Herkunft der Studienpopulationen begründet sein, obwohl sich in einer der Publikationen kein signifikanter Unterschied in der Prothrombinkonzentration zwischen Individuen kaukasischer Herkunft und Amerikanern afrikanischen Ursprungs fand (Smiles et al. 2002). In der Mehrzahl der Studien, einschließlich der vorliegenden, wurde versucht, nur Individuen ohne vorherige Einnahme von Antikoagulanzen in die Analyse des Gerinnungsfaktors FII einzubeziehen, um mögliche Medikamenteninteraktionen zum Abnahmezeitpunkt zu vermeiden, wobei diese jedoch nicht in jedem Fall vollständig ausgeschlossen werden können. Neben Medikamententherapie, Ernährung und sportlicher Betätigung spielen aber auch zirkadiane Rhythmen eine wichtige Rolle bei der Modulation der Gerinnungsfaktoraktivitäten, einschließlich der des Prothrombins (Soulban 1989; Labrecque 1991). Aufgrund der intraindividuellen Variabilität ist es möglich, dass Spiegel von Gerinnungsfaktoren nicht jederzeit den eigentlichen Gerinnungsstatus korrekt reflektieren, zumal die angegebenen mittleren Aktivitäten oder Konzentrationen des Prothrombins auch meist nur auf einmaligen Bestimmungen und einer relativ kleinen Anzahl von G20210A-Mutationsträgern basierten. Differenzen zwischen den Untersuchungen können darüber hinaus auch auf fehlerhaften Laborbestimmungen und der Anwendung unterschiedlicher Nachweisverfahren beruhen. Zwar konnte vier verschiedenen funktionellen Testen (Gerinnungs-Assay, chromogene Teste) eine ähnlich hohe Effizienz im Nachweis erhöhter Prothrombinspiegel bei G20210A-Heterozygoten bestätigt werden, doch war beispielsweise die ELISA-Methode diesbezüglich deutlich weniger zuverlässig (Delahousse et al. 2002).

Trotz der Unterschiede in der Höhe der gemessenen Prothrombinaktivitäten und Prothrombinkonzentrationen wurde bei allen erwähnten Studien, einschließlich der hier vorliegenden Untersuchung, der signifikante Einfluss der FIIG20210A-Mutation auf diese Parameter des Prothrombinmetabolismus deutlich (Tab. 31). Da sich in der jetzigen Arbeit

sowohl die FII-Aktivitäten der 20210GG-Wildtypen als auch die der Mutationsträger im Referenzbereich befanden, ist es fraglich, ob die G20210A-assoziierten, gesteigerten FII-Aktivitäten überhaupt von klinischer Relevanz sind, da kein Zusammenhang zwischen der Prothrombinaktivität und einem erhöhten Risiko für die koronare Herzerkrankung, dem Auftreten akuter Koronarsyndrome und der Inzidenz von Frühkomplikationen nach Koronarintervention aufgezeigt werden konnte.

Der Effekt der kombinierten Prothrombinvarianten G20210A und G10253A auf die Aktivität des Gerinnungsfaktors II kann anhand der Resultate der jetzigen Studie nicht zuverlässig beurteilt werden. Zwar ging die gleichzeitige Präsenz der FII-Mutationen G20210A und G10253A mit einer verringerten medianen Prothrombinaktivität einher, doch waren lediglich 3 Individuen Träger beider Mutationen, sodass dieses Ergebnis nur auf 3 Messwerten beruhte.

4.3.2 Assoziation zwischen Prothrombinaktivität und koronarer Herzerkrankung

Während ein erhöhtes Plasmaprothrombin als moderater Risikofaktor für venöse Thrombose identifiziert werden konnte (Poort et al. 1996), ist bezüglich des Zusammenhangs zwischen hohen, mit der FII G20210A-Variante assoziierten Prothrombinspiegeln und kardiovaskulären Erkrankungen wenig bekannt. Die Studien, die zu dieser Fragestellung durchgeführt wurden, erzielten widersprüchliche Ergebnisse.

In der vorliegenden Arbeit fand sich weder eine Assoziation der gesteigerten Prothrombinaktivität mit einem erhöhten Risiko für die koronare Herzerkrankung noch eine relevante Verbindung zwischen der FII-Aktivität und dem Auftreten eines Myokardinfarkts oder akuter Koronarsyndrome. Die Patienten mit angiographisch gesicherter koronarer Herzerkrankung wiesen sogar eine signifikant niedrigere Prothrombinaktivität als die Kontrollpatienten auf (Median 92 % versus 96 %; $P < 0,001$). Diese Beobachtung ist jedoch mit Vorsicht zu betrachten und zu interpretieren, da die Differenz aufgrund des großen Probenumfangs zwar signifikant, aber insgesamt eher gering ist, und sich sowohl die FII-Aktivität der Patienten als auch die der Kontrollen im Referenzbereich des Gerinnungsfaktors II (70 - 120 % der Norm) befinden. Ferner können verschiedene Einflüsse auf die Plasmaprothrombinaktivität wie Ernährung, Bewegung und medikamentöse Therapie zum Zeitpunkt der Probenentnahme nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Im Gegensatz dazu zeichneten sich in einem italienischen Studienkollektiv 436 Patienten mit angiographisch nachgewiesener schwerer Koronarsklerose (mittleres Alter 60,6 Jahre) durch eine signifikant höhere Prothrombinaktivität als die 224 Kontrollen aus (132,8 % versus 123,3 %, $P < 0,005$) (Russo et al. 2001). In einer Untergruppenanalyse fand sich aber kein Anhalt dafür, dass die Prothrombinaktivität einen Risikofaktor für den Myokardinfarkt darstellt (130,7 % in der MI-Gruppe versus 135,1 % in der Nicht-MI-Gruppe), was mit den Ergebnissen einer vorherigen Untersuchung von 200 Überlebenden eines Myokardinfarktes (Altersmedian 57 Jahre) und 100 gesunden Kontrollen konform geht (Redondo et al. 1999; Russo et al. 2001). Dieser Aspekt fand nochmals Bestätigung in einer prospektiven Studie, in der bei älteren Individuen (≥ 65 Jahre) keine Assoziation der Höhe des Prothrombins mit der Inzidenz akuter kardiovaskulärer Ereignisse (Angina pectoris, Myokardinfarkt) nachgewiesen werden konnte (Smiles et al. 2002).

Ergebnisse einer Untersuchung von Patienten mit akuter myokardialer Ischämie oder akutem Myokardinfarkt bekräftigten die Präsenz eines, mit einem aktivierten Gerinnungs- und Fibrinolysesystem in Verbindung stehenden, prothrombotischen Status (Vaziri et al. 1992). So waren bei 24 US-amerikanischen Patienten sowohl die FII-Gerinnungsaktivitäten ($86 \pm 5,5$ % und $98 \pm 5,6$ % versus $118 \pm 2,3$ %) als auch die FII-Antigenkonzentrationen ($74 \pm 5,7$ % und $65 \pm 7,0$ % versus $125 \pm 3,6$ %), verglichen mit denen normaler Kontrollen, signifikant reduziert. Die Untersucher gingen von einem erhöhten Verbrauch verschiedener hämostatischer Faktoren, einschließlich des Gerinnungsfaktors II, im Rahmen der Akutereignisse aus. Dieser Aspekt kann zudem eine mögliche Erklärung für die signifikant geringeren FII-Aktivitäten der KHK-Patienten der aktuellen Arbeit darstellen, die im Gegensatz zur Studie von Russo et al. auch Patienten mit akuten kardialen Ereignissen in die Gerinnungsanalyse einschloss.

Anhand der von Russo et al. beobachteten signifikanten Assoziation der Prothrombinaktivität mit der koronaren Herzerkrankung, aber ähnlichen Verteilung der FII G20210A-Genotypen auf KHK-Patienten und Kontrollen, wird deutlich, dass neben dem 20210A-Allel noch andere, unbekannte Umweltfaktoren und genetische Faktoren für die hohe Prothrombinaktivität verantwortlich sein können (Russo et al. 2001). Eine gesteigerte Thromboseneigung scheint aufgrund der schwachen oder fehlenden Verbindung der, mit dem 20210A-Allel assoziierten, erhöhten Prothrombinaktivität zu den akuten ischämischen Ereignissen in den meisten Studien, einschließlich der jetzigen, nicht überzeugend.

Bezüglich der Korrelation zwischen der Prothrombinaktivität und anderen Parametern konnten

Beobachtungen vorheriger Studien bestätigt werden, die auch eine signifikante positive Korrelation des Prothrombins vor allem mit Parametern des Fettstoffwechsels wie dem Gesamtcholesterin, LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin und den Triglyzeriden fanden (Hoffman et al. 1994; Russo et al. 2001; Smiles et al. 2002).

4.4 Beurteilung des kardiovaskulären Risikos in KHK-Untergruppen

4.4.1 FIIG20210A und Risiko für KHK nach Geschlecht

In dieser Studie fand sich nach getrennter Analyse der Geschlechter sowohl bei den Frauen (OR = 0,58; 95 % CI 0,09 - 3,05) als auch bei den Männern (OR = 1,86; 95 % CI 0,04 - 3,78) kein Hinweis auf eine bedeutsame Risikosteigerung für die koronare Herzerkrankung bei Mutationsträgern. Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen auch die meisten der Fall-Kontroll-Studien zu ischämischer Herzerkrankung, die entweder nur Frauen oder Männer untersuchten oder Daten für beide Geschlechter lieferten, sowie eine Metaanalyse, die die Ergebnisse verschiedener Einzelstudien zusammenfasste (Burzotta et al. 2004 b).

Innerhalb der KHK-Gruppe der vorliegenden Assoziationsstudie war der heterozygote 20210GA-Genotyp häufiger bei Männern als bei den Frauen anzutreffen (3,7 % versus 1,3 %), doch erzielte diese Differenz keine statistische Signifikanz, möglicherweise auch aufgrund der insgesamt niedrigen Prävalenz des 20210A-Allels. Bei den Kontrollen war der GA-Genotyp annähernd gleich auf Männer und Frauen verteilt (2,0 % versus 2,1 %).

Unter den drei Fall-Kontroll-Studien, die ausschließlich weibliche Studienteilnehmer einschlossen oder Daten für das weibliche Geschlecht analysierten (Rosendaal et al. 1998; Croft et al. 1999; Burzotta et al. 2002), war nur eine Studie, die in einem kleinen und stark selektierten Kollektiv von 79 jungen Frauen (18 - 44 Jahre) mit erstem akuten Myokardinfarkt eine höhere Prävalenz der FII-Mutation als bei 381 Kontrollen (5,1 % versus 1,6 %) und ein signifikant gesteigertes Risiko für Myokardinfarkt bei jungen Trägerinnen der Prothrombinvariante (OR = 4,0; 95 % CI 1,1 - 15,1; P = 0,038) beschrieb (Rosendaal et al. 1998). Im Gegensatz zu dem Resultat dieser US-amerikanischen Arbeit war das A-Allel in den zwei anderen Studien aus Großbritannien und Italien und in der Metaanalyse, die die Daten der drei erwähnten

Einzelstudien kombinierte (OR = 1,23; 95 % CI 0,54 - 3,42), nicht mit einem erhöhten Risiko für Myokardinfarkt beziehungsweise für akute Koronarsyndrome bei Frauen assoziiert (Croft et al. 1999; Burzotta et al. 2002; Burzotta et al. 2004 b).

In einer anderen Metaanalyse fand sich ein Hinweis darauf, dass die Prothrombinvariante bei Frauen stärker mit einem akuten arteriellen Verschlussgeschehen assoziiert war als in der Gesamtgruppe (OR = 1,73; 95 % CI 0,99 - 3,02 versus OR = 1,32; 95 % CI 1,03 - 1,69), doch wurden in dieser Metaanalyse nicht nur Patienten mit akutem Myokardinfarkt, sondern auch mit ischämischem Schlaganfall und peripherer arterieller Verschlusskrankheit betrachtet, was die Vergleichbarkeit der Studien erschwert (Kim et al. 2003).

Dass der FII G20210A-Mutation bei ganz speziellen Patientengruppen wie zum Beispiel jungen Frauen Bedeutung als Risikofaktor für den Myokardinfarkt zukommen kann, fand in den Ergebnissen einer anderen US-amerikanischen Fall-Kontroll-Studie Unterstützung, in der die Prothrombinvariante bei hypertensiven, postmenopausalen Frauen (30 - 79 Jahre) einen Risikofaktor für Myokardinfarkt darstellte (OR = 4,32; 95 % CI 1,52 - 12,1) (Psaty et al. 2001). Hypertensive Frauen mit Hormonersatztherapie und Prothrombinvariante hatten im Vergleich zu den Frauen, die keine Hormonersatztherapie erhielten und den G20210A-Wildtyp trugen, ein fast 11-fach erhöhtes Risiko für einen Myokardinfarkt (OR = 10,9; 95 % CI 2,15 - 55,2). Wie in der Studie von Rosendaal et al. basierten aber auch diese Beobachtungen auf einer kleinen Zahl von Mutationsträgern, und die statistische Unsicherheit fand in den großen Konfidenzintervallen ihren Ausdruck (Rosendaal et al. 1997; Psaty et al. 2001).

Die sieben Studien, die entweder nur Männer einschlossen (Doggen et al. 1998; Inbal et al. 1999; Ridker et al. 1999; Vargas et al. 1999; Coulet et al. 2000) oder Daten zum männlichen Geschlecht lieferten (Croft et al. 1999; Burzotta et al. 2002), wie auch die Metaanalyse von Burzotta et al., die diese Einzelstudien zusammenfassend bewertete (Burzotta et al. 2004 b), kamen nahezu übereinstimmend zu dem Ergebnis, dass die genetische Variation im Prothrombingen nicht das Risiko für einen Myokardinfarkt oder ein akutes Koronarsyndrom bei Männern erhöht. Niederländische Untersucher gingen zwar anhand ihrer Ergebnisse bei 560 männlichen Patienten mit erstem Myokardinfarkt vor dem 70. Lebensjahr und 646 altersgepaarten Kontrollen davon aus, dass Träger der FII-Variante ein bedeutend höheres Risiko für Myokardinfarkt als Nichtträger haben, doch unterschied sich die Prävalenz der FII-Mutation bei den Patienten nicht signifikant von der bei den Kontrollen (1,8 % versus 1,2 %) (Doggen et al. 1998). Weiterhin erreichte die Odds-Ratio (OR = 1,5; 95 % CI 0,6 - 3,8) keine statistische Signifikanz und das 95 % Konfidenzintervall schloss sogar einen geringen protektiven Effekt

nicht aus (Doggen et al. 1998). Fänden die Ergebnisse der zwei Untersuchungen, die in ausgewählten weiblichen Patientenpopulationen ein signifikant erhöhtes Myokardinfarkttrisiko bei Trägerinnen der G20210A-Mutation sicherten, in nachfolgenden, umfangreicheren Studien Bestätigung, könnte ein Screening auf die Prothrombinvariante eine bessere Beurteilung des Nutzens und der Risiken erlauben, die beispielsweise mit der Hormonersatztherapie bei postmenopausalen Frauen assoziiert sind (Rosendaal et al. 1997; Psaty et al. 2001).

4.4.2 FIIG20210A und Risiko für KHK bei jungen Individuen

In der vorliegenden Arbeit konnte die Prothrombinvariante G20210A nicht als genetischer Risikofaktor für eine Manifestation der koronaren Herzerkrankung vor dem 40. beziehungsweise 50. Lebensjahr gesichert werden (OR = 0,39; 95 % CI 0,05 - 2,97; OR = 0,56; 95 % CI 0,22 - 1,42).

Diese Ergebnisse gehen mit denen anderer Fall-Kontroll-Studien einher, die entweder ausschließlich junge Patienten oder, wie in der jetzigen Studie, Untergruppen junger Individuen mit angiographisch nachgewiesener koronarer Herzerkrankung untersuchten (Watzke et al. 1997; Eikelboom et al. 1998; Taymaz et al. 2006). Ferner fand sich auch bei jungen spanischen Männern mit klinisch manifester koronarer Herzerkrankung, bei Patienten mit verschiedenen atherosklerotischen Erkrankungen (KHK, PAVK, Kombination von KHK und PAVK) und jungen Individuen mit akuten Koronarsyndromen keine Assoziation zwischen FIIG20210A und einem gesteigerten Risiko für eine frühe Krankheitsmanifestation (Doggen et al. 1998; Eikelboom et al. 1998; Ardissino et al. 1999; Croft et al. 1999; Franco et al. 1999; Gardemann et al. 1999; Inbal et al. 1999; Vargas et al. 1999; Burzotta et al. 2002; Atherosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology Italian Study Group 2003; Segev et al. 2005).

Nur einige Assoziationsstudien, die eher kleine und stärker ausgewählte Kollektive junger Individuen mit Myokardinfarkt beziehungsweise akuten Koronarsyndromen betrachteten, sowie zwei Metaanalysen lieferten ein Anhalt für einen Zusammenhang zwischen der Prothrombinvariante und frühzeitiger Erkrankung. So waren sowohl junge US-amerikanische Frauen zwischen 18 und 44 Jahren mit erstem akuten Myokardinfarkt, eine Untergruppe niederländischer Myokardinfarktpatienten (mittleres Alter 40 Jahre) als auch Individuen mit verschiedenen arteriellen Erkrankungen und günstigem kardiovaskulären Risikoprofil

(Altersmedian 39,8 Jahre; kein Diabetes mellitus, Hypertonie und Hyperlipoproteinämie) durch ein höheres Erkrankungsrisiko als die entsprechenden Kontrollen gekennzeichnet, wenn sie die FII-Variante trugen (Arruda et al. 1997; Rosendaal et al. 1997; Franco et al. 1999). Darüber hinaus waren die, in der Metaanalyse von Burzotta et al. ermittelten, signifikanten Risikosteigerungen für Myokardinfarkt bei Individuen unter 45 und unter 55 Jahren (OR = 2,3; 95 % CI 1,27 - 4,59; OR = 1,77; 95 % CI 1,16 - 3,42) in Übereinstimmung mit dem Ergebnis einer weiter zurückliegenden Metaanalyse, die Myokardinfarktpatienten unter 55 Jahren betrachtete (OR = 1,86; 95 % CI 0,99 - 3,51) (Boekholdt et al. 2001; Burzotta et al. 2004 b).

Neben den Studien, die eine Assoziation zwischen der Prothrombinvariante und der koronaren Herzerkrankung bei jungen Individuen berichteten, waren auch die Untergruppen zahlreicher anderer Studien, einschließlich der jetzigen, durch kleine Stichprobenumfänge gekennzeichnet, was in einer geringen statistischen Aussagekraft resultierte. In der vorliegenden Untersuchung trug nur einer der 66 Patienten mit einer Krankheitsmanifestation vor Vollendung des 40. Lebensjahres den heterozygoten 20210GA-Genotyp (1,5 %).

4.4.3 FIIG20210A und Risiko für KHK nach kardiovaskulären Risikofaktoren

Da die Entwicklung der koronaren Herzerkrankung nicht einem einzelnen Gen oder Umweltfaktor zugeschrieben werden kann und sich die komplexe Pathologie auf verschiedene Interaktionen zwischen genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen gründet, wurde in zahlreichen Studien der Effekt konventioneller Risikofaktoren in die Analyse einbezogen, um so mögliche Beziehungen zwischen traditionellen kardiovaskulären und neuen genetischen Risikofaktoren aufzeigen zu können.

In der jetzigen Untersuchung waren sowohl unter Rauchern, Patienten mit Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie oder Hypertonie als auch in den Schichten mit hohem Risiko (Patienten mit Hypertonie, Hypercholesterinämie und Rauchen) und geringem Risiko (Patienten ohne Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus und Rauchen) keine signifikanten Differenzen in der Verteilung des 20210A-Allels zwischen KHK-Patienten und Kontrollen nachweisbar. Innerhalb der KHK-Gruppe fand sich darüber hinaus kein Anhalt für eine Interaktion der Prothrombinvariante G20210A mit den konventionellen Risikofaktoren Diabetes mellitus, Hypertonie, Hypercholesterinämie oder Rauchen.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Untersuchung entsprechen somit den Resultaten zweier anderer Studien, die in verschiedenen Hochrisikokategorien (Raucher, > 55 Jahre, Hypercholesterinämie, Hypertension oder Adipositas) und in Untergruppen mit günstigem Risikoprofil (< 55 Jahre, keine konventionellen Risikofaktoren) auch keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung des 20210A-Allels zwischen Patienten mit angiographisch dokumentierter koronarer Herzerkrankung und den Kontrollen sichern konnten (Russo et al. 2001; Almawi et al. 2004). Weiterhin war innerhalb verschiedener Populationen von Myokardinfarktpatienten kein signifikant erhöhtes Risiko für ein, mit dem 20210A-Allel assoziiertes, akutes Koronareignis erkennbar, wenn die Patienten gleichzeitig traditionelle kardiovaskuläre Risikofaktoren aufwiesen (Eikelboom et al. 1998; Ardissino et al. 1999; Ridker et al. 1999).

Die Resultate einiger anderer Studien indizierten jedoch, dass das Risiko für die koronare Herzerkrankung durch die Kombination des 20210A-Allels mit anderen wichtigen kardiovaskulären Risikofaktoren erhöht sein kann und die Bedeutung der FII-Transition auf Individuen beschränkt ist, die zusätzliche kardiovaskuläre Risikofaktoren haben (Rosendaal et al. 1997; Doggen et al. 1998; Gardemann et al. 1999; Inbal et al. 1999).

Bei jungen, vorwiegend weißen Frauen aus den USA (18 - 44 Jahre) war das Myokardinfarktrisiko besonders hoch, wenn sie neben der FII-Transition andere Hauptrisikofaktoren für die koronare Herzerkrankung aufwiesen (Rosendaal et al. 1997). Es zeigten hier nicht nur die Raucherinnen, die die G20210A-Mutation trugen, ein vielfach höheres Risiko als nicht rauchende Frauen ohne FII-Variante (OR = 43,3; 95 % CI 6,7 - 281), auch die Mutations-trägerinnen mit einem oder mehreren metabolischen Risikofaktoren (Adipositas, Hypertension, Hypercholesterinämie oder Diabetes mellitus) waren durch ein signifikant höheres Risiko als die Frauen ohne FII-Transition und ohne metabolische Risiken gekennzeichnet (OR = 33,8; 95 % CI 5,5 - 209).

Der in dieser Kohorte junger US-amerikanischer Frauen demonstrierte synergistische Effekt von atherogenen und thrombogenen Risikofaktoren in der Pathogenese des akuten Myokardinfarkts wurde ebenfalls in zwei Fall-Kontroll-Studien beobachtet, die ausschließlich Männer einschlossen (Doggen et al. 1998; Inbal et al. 1999). Innerhalb dieser Studienpopulationen junger beziehungsweise älterer Männer mit erstem Myokardinfarkt zeigten die Patienten, die neben einem prothrombotischen Polymorphismus (FII G20210A, FV Leiden Mutation 1691 oder MTHFR 677T) einen metabolischen Risikofaktor (Adipositas, Diabetes mellitus, Hypertonus oder Hypercholesterinämie) aufwiesen oder rauchten, ein signifikant höheres Myokardinfarktrisiko als die Männer ohne den jeweiligen kardiovaskulären Risikofaktor und

ohne Gerinnungsdefekt. Vor allem die Kombination eines prothrombotischen Polymorphismus mit gegenwärtigem Nikotinkonsum steigerte das Risiko (OR = 17,6; 95 % CI 6,3 - 48,9), während in den beiden Gesamtstudienpopulationen kein signifikant erhöhtes Risiko für einen Myokardinfarkt gesichert werden konnte (OR = 1,5; 95 % CI 0,6 - 3,8; OR = 1,78; 95 % CI 0,46 - 6,94) (Doggen et al. 1998; Inbal et al. 1999).

Um akzeptierte Risikofaktoren für die koronare Herzerkrankung bestätigen und genauere Aussagen hinsichtlich unbekannter Risikofaktoren machen zu können, wurde in einer umfangreichen deutschen Arbeit bewusst auf eine separate Kontrollgruppe ohne klinische Symptome einer Herzerkrankung verzichtet (Gardemann et al. 1999). Während in der unselektierten Studienpopulation von 2210 Männern mit angiographisch definierter Koronaranatomie und Standardrisikofaktoren die FII-Genvariation nicht mit der Präsenz oder Schwere der koronaren Herzerkrankung in der Gesamtgruppe assoziiert war, zeigten die Individuen mit ungünstigen Lipidprofilen ausgeprägte Differenzen in den CHD-Scores (Coronary Heart Disease-Score nach Gensini) zwischen 20210GA-Heterozygoten und GG-Homozygoten, wobei sich die Träger des A-Allels durch deutlich höhere CHD-Scores auszeichneten. Diese Beobachtung traf besonders für jüngere Patienten (< 62 Jahren) zu, die gleichzeitig eine kleine Apo AI/Apo B-Ratio (< 1,19) und hohe Lp(a)-Plasmaspiegel (> 28 mg/dl) hatten. Eine weitere Beschränkung auf Raucher, auf Patienten mit hohen Fibrinogenplasmaspiegeln oder hohen Glukosekonzentrationen erhöhte außerdem die Differenz in den CHD-Scores zwischen den G20210A-Genotypen (Gardemann et al. 1999). Vergleichbar mit der jetzt vorliegenden Untersuchung umfasste die große Studienpopulation zwar Individuen deutscher Herkunft mit Standardrisikofaktoren, jedoch wurde die Studie von Gardemann et al. nicht im Fall-Kontroll-Design durchgeführt.

Im Gegensatz zu den Studien, die eine Interaktion zwischen der Prothrombinmutation und konventionellen Risikofaktoren demonstrieren oder diesbezüglich keinen Anhalt finden konnten, erzielte die Präsenz des 20210A-Allels in einer italienischen Studie bei jenen Patienten mit akutem Koronarsyndrom ein signifikant erhöhtes Risiko, die keine zusätzlichen kardiovaskulären Risiken hatten (OR = 5,1; 95 % CI 1,2 - 21,4) (Burzotta et al. 2002). Ferner gab es in einer prospektiven Untersuchung einen Hinweis darauf, dass die G20210A-Variante einen bedeutenden Risikofaktor für einen ungünstigen Langzeitverlauf bei Patienten darstellen kann, die ein erstes akutes Koronarsyndrom in Abwesenheit metabolischer Risikofaktoren (Diabetes mellitus, Hypertonie, Hypercholesterinämie) entwickelten (OR = 5,64; 95 % CI 1,07 - 29,84) (Burzotta et al. 2004 a). Die Träger des 20210A-Allels zeichneten sich dabei in einer zwei-jährigen Beobachtungszeit durch einen signifikant schlechteren klinischen Verlauf als Träger des

20210G-Allels aus, während bei Patienten mit mindestens einem metabolischen Risikofaktor (RR = 0,95; 95 % CI 0,13 - 6,65) oder bei Rauchern (RR = 0,97; 95 % CI 0,13 - 6,8) keine bedeutsame Risikomodulation durch den G20210A-Genotyp gesehen wurde (Burzotta et al. 2004 a).

In allen Studien, einschließlich der jetzigen, waren die Untergruppen der Patienten, die zusätzliche kardiovaskuläre Risikofaktoren aufwiesen beziehungsweise einer Hochrisiko- oder Geringrisiko-Kategorie angehörten, durch einen relativ kleinen Probenumfang und sehr wenige Mutationsträger gekennzeichnet, sodass die Ergebnisse der Interaktionsanalysen aufgrund der schwachen statistischen Aussagekraft durchweg mit Vorsicht interpretiert werden müssen. Untersuchungsergebnisse, die entweder nur bei Frauen (Rosendaal et al. 1997) oder Männern (Doggen et al. 1998; Gardemann et al. 1999; Inbal et al. 1999) gewonnen wurden, sind nicht vorbehaltlos auf das andere Geschlecht übertragbar.

Die kontroversen Resultate hinsichtlich der Bedeutung der FII-Transition für das Risiko für die koronare Herzerkrankung oder ein akutes Koronargeschehen bei gleichzeitiger Präsenz oder Abwesenheit kardiovaskulärer Hauptrisikofaktoren erfordern eine weitere Beurteilung dieses Aspektes in größeren Studien.

4.4.4 FII G20210A und Risiko für koronare Herzerkrankung nach Schweregrad

In der vorliegenden Studie fand sich kein Zusammenhang zwischen dem 20210GA-Genotyp und dem Schweregrad der koronaren Herzerkrankung. Die Verteilung der G20210A-Genotypen auf die Patienten mit 1-, 2- oder 3-Gefäßerkrankung zeigte keinen signifikanten Unterschied, und die FII-Mutation konnte in der logistischen Regressionsanalyse nicht als unabhängiger Risikofaktor für eine schwere Mehrgefäßerkrankung identifiziert werden.

Es werden damit die Ergebnisse zweier zurückliegender Studien bestätigt, die bei 2210 männlichen Kaukasiern deutscher Herkunft beziehungsweise 644 australischen Patienten unter 50 Jahren auch keine Assoziation zwischen dem angiographischen Ausmaß der koronaren Herzerkrankung und der Prothrombinmutation G20210A aufzeigen konnten (Eikelboom et al. 1998; Gardemann et al. 1999).

Im Gegensatz dazu deuteten Beobachtungen italienischer und neuseeländischer Untersucher auf eine signifikante Assoziation zwischen der G20210A-Variante und akuten Koronarsyndromen

bei Patienten mit limitierter koronarer Atherosklerose hin (van de Water et al. 2000; Burzotta et al. 2002; French et al. 2003). So hatten 81 italienische Patienten < 65 Jahren mit erstem akuten Koronarsyndrom und nicht signifikanter Koronarstenose oder einer 1-Gefäßerkrankung eine höhere Prävalenz des 20210A-Allels als die Patienten mit einer Mehrgefäßerkrankung (9,9 % versus 2,7 %) (Burzotta et al. 2002). Auch das Erkrankungsrisiko war erhöht, wenn nur die Patienten mit einer nicht signifikanten oder einer 1-Gefäßerkrankung mit den gesunden Kontrollen verglichen wurden (OR = 3,8; 95 % CI 1,3 - 10,8), aber nicht, wenn nur Patienten mit einer Mehrgefäßerkrankung betrachtet wurden (OR = 0,9; 95 % CI 0,2 - 4,7). Die zwei Studien aus Neuseeland berichteten von 41 Patienten < 50 Jahren beziehungsweise 60 Patienten ohne Altersbeschränkung mit Myokardinfarkt und nicht flusslimitierender Stenose, die eine höhere Prävalenz der Prothrombinvariante aufwiesen als die Myokardinfarktpatienten mit einer oder mehr Koronarstenosen > 50 %, wobei hier aufgrund der relativ geringen Patientenzahl keine statistische Signifikanz erreicht wurde und die Patientengruppen heterogen hinsichtlich des Schweregrades der angiographischen KHK waren (van de Water et al. 2000; French et al. 2003). Auch die gemeinsame Analyse der zwei Untersuchungen, die Genotypfrequenzen für Patienten mit nicht signifikanter beziehungsweise 1-, 2- oder 3-Gefäßerkrankung lieferten (Gardemann et al. 1999; Burzotta et al. 2002), erbrachte eine höhere Prävalenz des GA-Genotyps bei Patienten mit nicht signifikanter oder 1-Gefäßerkrankung als bei denen mit einer Mehrgefäßerkrankung (4,4 % versus 2,2 %, relatives Risiko = 2,0; 95 % CI 1,2 - 3,1) (Burzotta et al. 2000). Während drei der Studien kein Fall-Kontroll-Design aufwiesen (Gardemann et al. 1999; van de Water et al. 2000; French et al. 2003), blieben in der vorliegenden und in der australischen Fall-Kontroll-Studie wiederum Patienten mit nicht signifikanter Koronarstenose (Stenose < 50 %) unberücksichtigt (Eikelboom et al. 1998).

Es ist gesichert, dass Individuen mit frühzeitigem Myokardinfarkt, insbesondere junge Frauen, oft eine begrenzte koronare Atherosklerose zeigen (Choudhury und Marsh 1999). Die These, dass prothrombotische genetische Faktoren wie auch die, mit der FIIG20210A-Mutation in Verbindung stehende, vermehrte Gerinnungsneigung eine wesentliche Rolle in der Entwicklung des Myokardinfarktes bei Patienten mit angiographisch intakten Koronararterien beziehungsweise mit weniger abnormalen Koronarien spielen können, wird zusätzlich von den Beobachtungen der zwei Arbeiten gestützt, die bei jungen US-amerikanischen Frauen zwischen 18 und 44 Jahren und jungen niederländischen Myokardinfarktpatienten (mittleres Alter 40 Jahre) eine signifikante Assoziation zwischen der G20210A-Mutation und dem Risiko für Myokardinfarkt fanden (Rosendaal et al. 1997; Franco et al. 1999).

Anhand der Ausführungen wird deutlich, dass weitere Beurteilungen dieses Aspektes in Studien mit größeren Probenumfängen notwendig sind, da einige der kleinen Studien einem Publikationsbias zugunsten eines positiven Resultates unterliegen können.

4.4.5 FIIIG20210A und Risiko für akute Koronarsyndrome

Obwohl zahlreiche Einzelstudien und Metaanalysen versucht haben, die Prothrombinvariante G20210A mit dem Risiko für Myokardinfarkt oder Auftreten akuter Koronarsyndrome sowohl bei jüngeren als auch älteren Individuen zu korrelieren, konnten bis dato keine eindeutigen Beziehungen aufgezeigt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese, dass Träger der prothrombotischen FII-Variation G20210A ein erhöhtes Risiko für das Auftreten eines Myokardinfarktes oder eines akuten Koronarsyndroms haben, bei 652 KHK-Patienten mit Myokardinfarkt und 224 Patienten mit akutem Koronarsyndrom untersucht. Diese fand jedoch keine Bestätigung, da Träger des heterozygoten 20210GA-Genotyps weder für einen Myokardinfarkt (OR = 1,0; 95% CI 0,44 - 2,42) noch für ein akutes Koronarsyndrom (OR = 0,37; 95 % CI 0,07 - 1,21) eine signifikante Risikoerhöhung aufwiesen.

Die jetzigen Ergebnisse gehen mit Resultaten einer Reihe anderer Studien konform, die ebenfalls keine Assoziation der FII-Variante G20210A mit einem erhöhten Risiko für Myokardinfarkt (Corral et al. 1997; Dilley et al. 1998; Croft et al. 1999; Gardemann et al. 1999; Prohaska et al. 1999; Redondo et al. 1999; Ridker et al. 1999; Coulet et al. 2000; Russo et al. 2001; Durante-Mangoni et al. 2002), akute Koronarsyndrome (Ferraresi et al. 1997; Feng et al. 1999; Araujo et al. 1999; Smiles et al. 2002) oder plötzlichen Herztod (Reiner et al. 2002) demonstrieren konnten. Ferner erzielten auch die fünf Metaanalysen, die die Korrelation der Prothrombinmutation G20210A mit dem Gesamtrisiko für Myokardinfarkt oder akute Koronarsyndrome beurteilten (ohne Altersbeschränkung), übereinstimmend negative Ergebnisse (Boekholdt et al. 2001; Wu et al. 2001; Kim et al. 2003; Burzotta et al. 2004 b; Ye et al. 2006). Jedoch sollten die negativen Resultate einiger Studien aus verschiedenen Gründen mit Vorsicht interpretiert werden. So war das Studienkollektiv der prospektiven Studie aus den USA (Physicians' Health Study) nicht nur ethnisch heterogen zusammengesetzt, sondern umfasste auch eine sehr spezielle, initial gesunde Gruppe von männlichen Ärzten zwischen 41 - 84 Jahren

mit einem geringen kardiovaskulären Risiko (Ridker et al. 1999). Darüber hinaus wurden die Physicians' Health Study und drei Fall-Kontroll-Studien in Populationen mit relativ hohen Frequenzen des FII-Polymorphismus durchgeführt, was zu den Nullresultaten beigetragen haben könnte (Araujo et al. 1999; Feng et al. 1999; Redondo et al. 1999; Ridker et al. 1999). Abgesehen von einem nicht auszuschließenden Publikationsbias zeigte sich in allen Metaanalysen eine signifikante Heterogenität für die Gesamtgruppe der Studien zu Myokardinfarkt und akuten Koronarsyndromen, was die Aussagekraft der kalkulierten Odds-Ratio in Frage stellen könnte (Boekholdt et al. 2001; Wu et al. 2001; Kim et al. 2003; Burzotta et al. 2004 b; Ye et al. 2006).

Die in der vorliegenden Studie herangezogene, nicht selektierte Patientenpopulation mit Standardrisikofaktoren ist repräsentativ für die Patienten, die in der klinischen Praxis gesehen werden. Da aber die meisten Fall-Kontroll-Studien, einschließlich der jetzigen, vorwiegend Überlebende eines Myokardinfarkts untersuchten, könnte der Effekt auf das Myokardinfarktrisiko möglicherweise unterbewertet sein, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass Patienten, die während der akuten Phase des Myokardinfarktes starben, die Prothrombinvariante häufiger trugen. Die Hypothese, dass die prothrombotische FII-Mutation mit schwerem Myokardinfarkt assoziiert sein könnte, wurde auch von Ergebnissen einer kleinen Autopsiestudie untermauert, die eine Tendenz zu erhöhter Prävalenz des 20210GA-Genotyps bei Patienten mit tödlichem Myokardinfarkt beobachtete (OR = 7,0; 95 % CI 0,6 - 82) (Mikkelsen und Karhunen 2002).

Einige andere Untersuchungen, die oftmals stärker ausgewählte Gruppen oder Untergruppen als in der aktuellen Studie analysierten, lieferten jedoch einen Anhalt für eine Verbindung des heterozygoten 20210GA-Genotyps mit dem Risiko für Myokardinfarkt beziehungsweise für akute Koronarereignisse (Rosendaal et al. 1997; Arruda et al. 1998; Doggen et al. 1998; Franco et al. 1999; van de Water et al. 2000; Boekholdt et al. 2001; Burzotta et al. 2002; Gerdes et al. 2002; French et al. 2003; Burzotta et al. 2004 a; Burzotta et al. 2004 b). So gingen brasilianische wie auch niederländische Untersucher anhand ihrer Studienergebnisse davon aus, dass die Prothrombinvariante mit einem erhöhten Risiko für Myokardinfarkt assoziiert ist, doch war in der Studie von Doggen et al. die Prävalenz der FII-Mutation bei den 560 Männern mit erstem Myokardinfarkt vor dem 70. Lebensjahr nicht signifikant verschieden von der Prävalenz bei den Kontrollen (1,8 % versus 1,2 %) (Arruda et al. 1998; Doggen et al. 1998). Die resultierende Odds-Ratio (OR = 1,5; 95 % CI 0,6 - 3,8) beruhte außerdem auf einer geringeren Prävalenz der Prothrombinvariante bei den Kontrollen (1,2 %) als in der gesunden niederländischen Allgemeinbevölkerung (2 %) (Poort et al. 1996; Rosendaal et al. 1998). Ebenso war die

brasilianische Studie, die ein fast fünffach höheres Risiko bei 220 Überlebenden eines Myokardinfarkts (OR = 4,8; 95 % CI 1,0 - 23,4) ermittelte, durch eine sehr niedrige Prävalenz der Prothrombinvariante innerhalb der Kontrollgruppe gekennzeichnet (0,7 %), auf der die Positivresultate basieren können (Arruda et al. 1998).

Auch bei jungen Frauen (18 - 44 Jahre) mit erstem akutem Myokardinfarkt fand sich im Zusammenhang mit der G20210A-Mutation ein vierfach höheres Erkrankungsrisiko als bei den gesunden Kontrollen (OR = 4,0; 95 % CI 1,1 - 15,1), wobei das Risiko besonders hoch war, wenn andere kardiovaskuläre Risikofaktoren gleichzeitig präsent waren (Rosendaal et al. 1997). Die Ergebnisse dieser Studie aus den USA basierten aber auf sehr wenigen Mutationsträgern (4 von 79 Frauen), sodass eine erhebliche statistische Ungenauigkeit in den Risikoschätzungen resultierte und die Konfidenzintervalle, besonders in den Interaktionsanalysen, weit waren. Auch wenn das relative Risiko in dieser ausgewählten Patientenpopulation junger Frauen hoch war, wird das absolute Risiko viel geringer sein als zum Beispiel bei älteren Individuen beziehungsweise älteren Männern, da der Myokardinfarkt ein eher seltenes Ereignis bei jungen Frauen darstellt (Rosendaal et al. 1997).

Den verschiedenen Resultaten zwischen den Geschlechtern liegen möglicherweise Faktoren wie Hormonstatus oder die Einnahme oraler Kontrazeptiva zugrunde. Die Risikofaktoren bei jungen Individuen, insbesondere bei jungen Frauen, können sich in ihrer Ausprägung von denen älterer Individuen unterscheiden, sodass die bei ihnen gewonnenen Ergebnisse nicht auf ältere oder männliche Patientenpopulationen übertragen werden können. Es ist nicht auszuschließen, dass die Prothrombinvariante eine Rolle in der Ätiologie des Myokardinfarkts in diesen selektierten Populationen spielt, doch können die Effekte bei älteren Individuen schwieriger zu erfassen sein, da mit zunehmendem Alter sowohl die Präsenz als auch die Schwere der Atherosklerose zunehmen und eine höhere Hintergrundinzidenz von Myokardinfarkten bei Menschen ohne spezielle Risikofaktoren resultiert.

In Anbetracht der Tatsache, dass jüngere Patienten mit frühzeitigem Myokardinfarkt normalerweise eine geringere atherosklerotische Beteiligung der Koronarien und eine höhere Prävalenz normaler oder fast normaler Koronararteriogramme aufweisen (Zimmermann et al. 1995), und dass schwächere Risikofaktoren für akute Koronarereignisse nur in Populationen mit geringem Risiko sichtbar sind, untersuchten zahlreiche Studien junge Individuen beziehungsweise Individuen mit günstigem kardiovaskulärem Risikoprofil und kamen auch in diesem Punkt zu widersprüchlichen Ergebnissen.

So konnte die G20210A-Mutation nicht nur bei den 79 jungen Frauen aus den USA (Rosendaal et al. 1997), sondern auch in einer Untergruppe von 173 niederländischen Patienten mit frühzeitiger atherosklerotischer Erkrankung (mittleres Alter 40 Jahre) als genetischer Risikofaktor für Myokardinfarkt ermittelt werden (OR = 4,2; 95 % CI 1,2 - 14,6) (Franco et al. 1999). Ferner war die FII-Mutation in einer selektierten Gruppe von 71 jungen Individuen ohne Hyperlipoproteinämie, Hypertension und Diabetes mellitus (Median 39,8 Jahre), die aber verschiedene arterielle Erkrankungen aufwiesen (Myokardinfarkt, zerebrale arterielle Verschlusskrankheit, periphere arterielle Verschlusskrankheit), mit einer gesteigerten thrombotischen Tendenz assoziiert (OR = 8,4; 95 % CI 1,58 - 45,0) (Arruda et al. 1997). Nicht zu vernachlässigen sind jedoch die geringen Prävalenzen der Prothrombinvariante innerhalb der gesunden brasilianischen und niederländischen Kontrollpopulationen von 0,7 % und 1,0 %, die möglicherweise den Positivresultaten zugrunde liegen könnten (Arruda et al. 1997; Franco et al. 1999). Zwar bestätigten auch zwei Metaanalysen, dass die Prothrombinvariante bei jungen Individuen mit Myokardinfarkt vor dem 55. Lebensjahr (OR = 1,77; 95 % CI 1,16 - 3,42), und insbesondere vor dem 45. Lebensjahr (OR = 2,3; 95 % CI 1,27 - 4,59), mit einer deutlichen Risikosteigerung verbunden war (Boekholdt et al. 2001, Burzotta et al. 2004 b), doch sprachen die Ergebnisse zahlreicher Einzelstudien bei jungen Individuen beziehungsweise der Analysen von Untergruppen junger Patienten gegen eine Assoziation des 20210A-Allels mit einem erhöhten Risiko für Myokardinfarkt oder akute Koronarsyndrome (Doggen et al. 1998; Eikelboom et al. 1998; Ardissino et al. 1999; Croft et al. 1999; Gardemann et al. 1999; Inbal et al. 1999; Burzotta et al. 2002; Atherosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology Italian Study Group 2003).

Beobachtungen anderer Studien zufolge könnte der Prothrombinvariante sogar eine bedeutende Rolle bei Individuen mit Myokardinfarkt oder akuten Koronarsyndromen zukommen, die eine begrenzte atherosklerotische Beteiligung oder keine zusätzlichen kardiovaskulären Risikofaktoren aufweisen (van de Water et al. 2000; Burzotta et al. 2002; French et al. 2003; Burzotta et al. 2004 a). So zeigten sowohl 41 junge (< 50 Jahre) als auch 60 Patienten ohne Altersbegrenzung, bei denen 3 - 4 Wochen nach einem Myokardinfarkt keine flusslimitierende Koronarstenose nachweisbar war, eine höhere Frequenz der G20210A-Mutation als Myokardinfarktpatienten mit mindestens einer angiographischen Stenose > 50 % (7,3 % versus 1,8 %, OR = 4,4; 95 % CI 0,7 - 27,5 und 6,7 % versus 2,1 %, OR = 3,4; 95 % CI 0,95 - 11,8) (van de Water et al. 2000; French et al. 2003). In beiden Studien wurde keine statistische Signifikanz erreicht, möglicherweise bedingt durch die relativ geringe Anzahl von Patienten mit nicht signifikanter Koronarstenose, doch gingen die Untersucher von einem starken Trend aus. Ferner

erzielte die Präsenz des 20210A-Allels bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom (Altersmedian 51 Jahre) ein signifikant erhöhtes Risiko im Vergleich zu den gesunden Kontrollen, wenn die Patienten entweder eine positive Familienanamnese für Myokardinfarkt, eine geringe atherosklerotische Beteiligung oder keine zusätzlichen kardiovaskulären Risikofaktoren hatten (Burzotta et al. 2002). Zwei prospektive Studien demonstrierten, dass die G20210A-Variante nicht nur einen signifikanten Risikofaktor für ein ungünstiges Langzeit-Outcome bei Patienten darstellen könnte, die ein erstes akutes Koronarsyndrom vor dem 65. Lebensjahr in Abwesenheit metabolischer kardiovaskulärer Risiken entwickelten (relatives Risiko = 5,64; 95 % CI 1,07 - 29,84; P = 0,016) (Burzotta et al. 2004 a), sondern auch mit dem Auftreten neuer ischämischer Ereignisse bei älteren Individuen mit etablierter Atherosklerose assoziiert sein könnte (Gerdes et al. 2002). In der letztgenannten niederländischen Studie zeigten zwar die Träger der G20210A-Mutation während der mittleren Beobachtungszeit von 3,5 Jahren mehr ischämische Ereignisse (Myokardinfarkt, Apoplex, peripherer arterieller Verschluss) als die Nichtträger (36 % versus 18 %), doch wurde keine statistische Signifikanz erreicht (P = 0,06). Zusätzlich beschränkte sich die Analyse auf männliche Daten, da unter den eingeschlossenen Frauen keine Mutationsträger identifiziert wurden (Gerdes et al. 2002).

Anhand der Resultate der jetzigen und vieler anderer Fall-Kontroll-Studien wird deutlich, dass die Variation im Prothrombigen und die damit verbundene Veränderung in der hämostatischen Funktion anscheinend weniger zu arterieller als zu venöser Thrombose beiträgt. Die fehlende Assoziation des G20210A-Polymorphismus mit dem Gesamtrisiko für Myokardinfarkt beziehungsweise akute Koronarsyndrome ist nicht unbedingt überraschend, da die Bedeutung einer einzelnen ätiologischen Komponente in einer unselektierten Population durch die Prävalenz anderer dominanter Faktoren abgeschwächt werden könnte. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die FII-Transition in selektierteren Patientenpopulationen diesbezüglich von Relevanz sein kann. Es demonstrierten einige Studien, dass die G20210A-assoziierte Risikoerhöhung für Myokardinfarkt beziehungsweise akute Koronarsyndrome stark vom Alter der Patienten, dem Ausmaß der koronaren Herzerkrankung und von der Patientenstratifizierung nach traditionellen Risikofaktoren abhängt (Arruda et al. 1997; Rosendaal et al. 1997; Franco et al. 1999; van de Water et al. 2000; Boekholdt et al. 2001; Burzotta et al. 2002; French et al. 2003; Burzotta et al. 2004 a; Burzotta et al. 2004 b).

4.4.6 FIIG20210A und Risiko für Frühkomplikationen nach Koronarintervention

Die dieser Arbeit zugrunde liegende Hypothese war, dass Träger der FII-Variation G20210A aufgrund der gesteigerten Prothrombinaktivität ein höheres Risiko haben könnten, Frühkomplikationen nach Koronarkatheterintervention (PTCA, DCA, Stentimplantation) zu erleiden. Verschiedene Studien unterstrichen mit ihren Resultaten die Bedeutung der direkten spezifischen Thrombinhemmung für die Reduktion akuter thrombotischer Komplikationen wie auch für die Verminderung der Neointimabildung nach perkutaner transluminaler Koronarangioplastie (Bittl et al. 1995; Serruys et al. 1995; Gallo et al. 1998).

Die Hypothese wurde an der Untergruppe von 656 KHK-Patienten überprüft, die sich einer Katheterintervention unterzogen hatten. Die Ergebnisse der univariaten Analyse als auch der multiplen logistischen Regression lieferten keinen Anhalt dafür, dass die FIIG20210A-Mutation einen Risikofaktor für das Auftreten einer Frühkomplikation innerhalb der ersten 30 Tage nach perkutaner Koronarintervention darstellt.

Zu ähnlichen Resultaten kam eine italienische Studie, die erstmalig das Auftreten unerwünschter kardialer Ereignisse (MACE) und die Präsenz der FII-Variante bei 520 Patienten mit akutem Myokardinfarkt oder instabiler Angina pectoris nach erfolgreicher perkutaner Koronarintervention mit Stentimplantation beurteilte (Marcucci et al. 2006). Nach einer deutlich längeren, durchschnittlichen Beobachtungszeit von 22,2 Monaten hatten 109 der 520 Patienten ein unerwünschtes Ereignis (21 %). Die Anzahl der Mutationsträger unterschied sich jedoch auch hier nicht signifikant zwischen Patienten mit und ohne eine schwere Komplikation (3,7 % versus 4,1 %, $P = 0,8$). Die höheren Prävalenzen des heterozygoten GA-Genotyps sowohl bei Patienten mit und ohne unerwünschtes Ereignis (3,7 %; 4,1 %) als auch im gesamten italienischen Patienten- und Kontrollkollektiv (4,0 %; 3,6 %) stimmten mit der in südeuropäischen Populationen beobachteten Häufigkeit von FIIG20210A überein (Rosendaal et al. 1998).

Wurden in der vorliegenden Untersuchung wie bei Marcucci et al. nur die Patienten mit Stent-einlage betrachtet, so war bezüglich der Verteilung der G20210A-Genotypen kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten mit und ohne Frühkomplikation erkennbar (GA-Genotyp 4,5 % versus 2,3 %), wobei beachtet werden muss, dass nur ein Mutationsträger in der MACE-Gruppe identifiziert werden konnte und das Konfidenzintervall für die Odds-Ratio sehr weit war (OR = 1,98; 95 % CI 0,04 - 17,54). Die beiden Studienpopulationen waren insofern vergleichbar, als alters- und geschlechtsgepaarte Patienten und Kontrollen ähnlichen Alters und mit annähernd gleicher Geschlechtsverteilung untersucht wurden (Altersmedian 60,6 Jahre beziehungsweise

67 Jahre). Weiterhin zeichneten sich die Patienten der italienischen Arbeit, wie in der jetzigen Studie, durch einen signifikant höheren Anteil an konventionellen kardiovaskulären Risikofaktoren als die Kontrollen aus. Den Ergebnissen beider Studien zufolge scheint dem Prothrombinpolymorphismus G20210A keine signifikante Rolle als prognostischer Parameter für das Auftreten von unerwünschten kardialen Ereignissen nach perkutaner Koronarkatheterintervention oder für eine individuell angepasste Thromboseprophylaxe und Therapie zuzukommen. Für definitive Schlüsse ist jedoch die Zahl der Mutationsträger in den MACE-Gruppen beider Arbeiten zu gering.

4.5 FII-Polymorphismus G10253A: Prävalenz, Assoziation mit FIIG20210A und phänotypische Bedeutung

Zum Zeitpunkt der Studiendurchführung existierten keine Daten über die Häufigkeit der Prothrombinvariante G10253A in der kaukasischen Allgemeinbevölkerung. Zielsetzung der Fall-Kontroll-Studie war die Untersuchung dieser FII-Variante in der Studienpopulation kaukasischer Herkunft, die Prüfung auf allelische Assoziation mit FIIG20210A sowie auf Assoziation mit dem FII-Spiegel und dem Risiko für die koronare Herzerkrankung und deren Komplikationen.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig in einem großen deutschen Kollektiv von 1000 Patienten mit angiographisch gesicherter koronarer Herzerkrankung und in einem Kontrollkollektiv von weiteren 1000, nach Alter und Geschlecht gepaarten, Patienten die Prävalenz des GA-Polymorphismus an der Nukleotidposition 10253 des Prothrombingens analysiert. Die Häufigkeit des heterozygoten GA-Genotyps im Patientenkollektiv (5,8 %; 95 % CI 4,4 - 7,5) entsprach dabei der Mutationsprävalenz in der Kontrollgruppe, in der ein homozygoter AA-Genotyp detektiert werden konnte (5,0 %; OR = 1,16; 95 % CI 0,77 - 1,75). Die für das A-Allel ermittelten Frequenzen von 2,9 % (95 % CI 2,2 - 3,7) in der Patientengruppe und 2,58 % (95 % CI 1,9 - 3,4) in der entsprechenden Kontrollgruppe waren etwas niedriger als die in einer vorherigen Untersuchung bei italienischen Patienten mit schwerer Blutungsneigung und Hypoprothrombinämie und 33 gesunden Kontrollen detektierte Allelfrequenz von 4 % (Poort et al. 1997). Möglicherweise bestehen für den G10253A-Polymorphismus, vergleichbar mit der G20210A-Variante, geographische oder ethnische Unterschiede, die für die Differenzen

verantwortlich sein können. Aufgrund der sehr geringen Anzahl getesteter Allele (n=68) könnte aber auch die Häufigkeit des 10253A-Allels in der italienischen Studienpopulation etwas überschätzt sein.

Darüber hinaus konnte keine allelische Assoziation zwischen den FII-Mutationen G20210A und G10253A nachgewiesen werden. Es wurden insgesamt nur 3 Individuen identifiziert, die beide FII-Varianten trugen. Aufgrund dieser sehr geringen Zahl an Trägern beider FII-Mutationen sind Analysen hinsichtlich der Auswirkung auf die Prothrombinaktivität oder des Risikos für die koronare Herzerkrankung bei Kombination der Mutationen nicht sinnvoll und deren Ergebnisse nicht aussagekräftig.

Da die Präsenz des 10253A-Allels nicht die Aminosäuresequenz des Prothrombins beeinflusst, war davon auszugehen, dass die Prothrombinvariante allein keine Auswirkungen auf die FII-Aktivität beziehungsweise auf das Risiko für die koronare Herzerkrankung hat (Friezner Degen und Davie 1987). In der Gesamt- und in der Kontrollgruppe war auch kein signifikanter Unterschied in der Prothrombinaktivität zwischen den 10253GG- und GA-Genotypen ersichtlich, während sich innerhalb der KHK-Gruppe eine um 5 % niedrigere FII-Aktivität bei den Mutationsträgern fand (94 % versus 89,5 %; $P = 0,012$). Diese Differenz war zwar fallzahlbedingt signifikant, doch im Vergleich zur G20210A-Mutation eher gering. Die medianen Prothrombinaktivitäten befanden sich zudem im Referenzbereich des Gerinnungsfaktors II. Sowohl die Stratifizierung nach Geschlecht, den kardiovaskulären Risiken Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, Hypertonie und Rauchen als auch die Betrachtung der Hoch-Risiko- und Gering-Risiko-Kategorien ließen keinen Unterschied in der Genotypenverteilung zwischen KHK-Patienten und Kontrollen erkennen. Darüber hinaus fand sich bei Trägern der FII-Mutation G10253A kein erhöhtes Risiko für die Manifestation der koronaren Herzerkrankung vor dem 40. beziehungsweise vor dem 50. Lebensjahr, für einen Myokardinfarkt oder ein akutes Koronarsyndrom. Es war auch keine signifikante Assoziation der G10253A-Mutation mit dem Schweregrad der koronaren Herzerkrankung und dem Auftreten einer Frühkomplikation nach perkutaner Koronarintervention nachweisbar. Die Ergebnisse der univariaten Analyse fanden Bestätigung in der logistischen Regressionsanalyse. Es wurde lediglich ein Zusammenhang zwischen der FII-Mutation G10253A und dem Risikofaktor Hypercholesterinämie gesichert, der unklar und möglicherweise zufällig ist.

Es wird deutlich, dass die FII-Variante G10253A, allein und in Kombination mit FIIIG20210A, keinen Effekt auf die Prothrombinaktivität hat und keinen genetischen Risikofaktor für die koronare Herzerkrankung und deren Komplikationen darstellt.

5 Zusammenfassung

Die systematische Untersuchung genetischer Prädispositionsfaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen und ihre Komplikationen hat sich zu einem umfangreichen und intensiv bearbeiteten Forschungsgebiet entwickelt. In der vorliegenden Fall-Kontroll-Studie wurden die zwei Polymorphismen G20210A und G10253A im Gen des Gerinnungsfaktors II (Prothrombin), einem Kandidatengen des Gerinnungssystems, auf ihre Assoziation zur koronaren Herzerkrankung und deren Komplikationen in einer großen deutschen Studienpopulation untersucht. Prothrombin ist das Vorläufermolekül der Serinprotease Thrombin, die über ihre zentrale Position in der Hämostase hinaus ein potenter Aktivator vieler, an der Entstehung atherosklerotischer Plaques beteiligter Zellantworten ist. Die Bedeutung des funktionellen G20210A-Polymorphismus und der mit ihm assoziierten Veränderungen des Plasmaprothrombins für die koronare Herzerkrankung wurde in einer wachsenden Zahl klinischer Studien unterschiedlicher Größe und Designs untersucht, doch es sind oft widersprüchliche und nicht eindeutige Ergebnisse erzielt worden.

1000 konsekutiv rekrutierte Patienten mit angiographisch nachgewiesener koronarer Herzerkrankung und 1000 alters- und geschlechtsgepaarte Kontrollen derselben Herkunft wurden mit Hilfe der Echtzeit-Fluoreszenz-PCR und Schmelzkurvenanalyse genotypisiert; die Qualitätskontrolle erfolgte durch eine PCR-RFLP-Methode sowie DNA-Sequenzanalyse.

Die Prävalenz des heterozygoten 20210GA-Genotyps in der KHK-Gruppe unterschied sich nicht signifikant von der in der Kontrollgruppe (3,1 %; 95 % CI 2,1 - 4,4 versus 2,0 %; 95 % CI 1,2 - 3,1). Auch die erstmalig in einer großen kaukasischen Studienpopulation ermittelte Prävalenz der G10253A-Variante zeigte keine signifikante Differenz zwischen KHK-Patienten und Kontrollen (5,8 %; 95 % CI 4,4 - 7,5 versus 4,9 %; 95 % CI 3,7 - 6,5), ein Kontrollindividuum trug den homozygoten 10253AA-Genotyp. Zwischen den Einzelnukleotidpolymorphismen G20210A und G10253A war ferner keine allelische Assoziation nachweisbar; es konnten nur 3 Individuen identifiziert werden, die für beide Mutationen heterozygot waren (0,15 %, 95 % CI 0,03 - 0,5).

Die Ergebnisse dieser Assoziationsstudie deuten darauf hin, dass die FII-Mutationen G20210A und G10253A, sowohl einzeln als auch in Kombination, keine Risikofaktoren für die koronare Herzerkrankung und akute Koronarsyndrome darstellen. Nach der Stratifizierung in Geschlecht und konventionelle kardiovaskuläre Risiken fand sich diesbezüglich auch keine Effektmodifikation. Darüber hinaus war weder eine Assoziation mit dem Schweregrad noch mit

dem Manifestationsalter der koronaren Herzerkrankung nachweisbar. Den Resultaten zufolge kommen die untersuchten FII-Polymorphismen auch nicht als mögliche Risikoprädiktoren für 30-Tage-Komplikationen (Tod, Myokardinfarkt, erneute Revaskularisation des Zielgefäßes) nach Koronarkatheterintervention (PTCA, DCA oder Stenteinlage) in Betracht.

Die als Funktion der G20210A-Genotypen beschriebene signifikante Variabilität der Prothrombinaktivität fand in der jetzigen Arbeit Bestätigung. Träger des heterozygoten 20210GA-Genotyps hatten um 13 % bis 15 % höhere FII-Aktivitäten als Träger des homozygoten Wildtyps (94 % versus 106,5 %; $P < 0,001$), wobei alle Aktivitäten im Referenzbereich des FII lagen, was die klinische Relevanz dieser Differenz in Frage stellt. Die FII-Mutation G10253A hatte in der Gesamtgruppe keine Auswirkungen auf die Prothrombinaktivität. Hinsichtlich des Effektes der Kombinationen der Prothrombinvarianten auf die FII-Aktivität zeigten die zusammengesetzt heterozygoten Individuen zwar eine um 8 % niedrigere Prothrombinaktivität als die Träger der Wildtypen (87 % versus 94 %), jedoch beruhte dieses Resultat nur auf drei Messwerten, was keine eindeutige und verlässliche Aussage zulässt.

Darüber hinaus war eine signifikant höhere Prothrombinaktivität im weiblichen Patienten- und Kontrollkollektiv als in den entsprechenden männlichen Kollektiven ($P = 0,002$; $P < 0,001$) sowie ein signifikanter Zusammenhang des Gerinnungsfaktors II mit der koronaren Herzerkrankung nachweisbar. Die KHK-Patienten hatten dabei eine niedrigere mediane Prothrombinaktivität als die Kontrollen zu verzeichnen. Diese Differenz war zwar gering, aber fallzahlbedingt signifikant (94 % versus 96 %; $P < 0,001$).

Die fehlende Assoziation der FIIG20210A-Variante und der, mit dem 20210A-Allel assoziierten, erhöhten Prothrombinaktivität zu den akuten ischämischen Ereignissen legt nahe, dass der FII-Polymorphismus G20210A und die damit verbundene Veränderung in der hämostatischen Funktion offensichtlich weniger zu arterieller als zu venöser Thrombose beitragen.

Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der bisherigen Studien verdeutlichen exemplarisch die methodischen Herausforderungen für Assoziationsstudien zur Untersuchung genetischer Einflüsse auf komplexe Erkrankungen wie die koronare Herzerkrankung. Wenn sich die Resultate der Studien, in denen die Prothrombinvariante G20210A als genetischer Risikofaktor für die koronare Herzerkrankung, insbesondere für die akuten Koronarsyndrome, demonstriert werden konnte, in unabhängigen Populationen bestätigten, könnte der G20210A-Polymorphismus als hereditärer Suszeptibilitätsfaktor zu einer verbesserten Risikoeinschätzung in ausgewählten Patientenpopulationen herangezogen werden.

6 Literatur

- Ahsen von N, Schütz E, Armstrong VW, Oellerich M. Rapid detection of prothrombotic mutations of prothrombin (G20210A), factor V (G1691), and methylenetetrahydrofolate reductase (C677) by real-time fluorescence PCR with the LightCycler. *Clin Chem* 1999; 694-696.
- Ahsen von N, Lewczuk P, Schütz E, Oellerich M, Ehrenreich H. Prothrombin activity and concentration in healthy subjects with and without the prothrombin G20210A mutation. *Thromb Res* 2000; 99:549-556.
- Almawi WY, Ameen G, Tamim H, Finan RR, Irani-Hakime N. Factor V G1691A, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase [MTHFR C677T] gene polymorphism in angiographically documented coronary artery disease. *Thromb Thrombolysis* 2004; 17:199-205.
- Araujo F, Santos A, Araujo V et al. Genetic risk factors in acute coronary disease. *Haemostasis* 1999; 29:212-218.
- Arduino D, Mannucci PM, Merlini PA et al. Prothrombotic genetic risk factors in young survivors of myocardial infarction. *Blood* 1999; 1:46-51.
- Arruda VR, Annichino-Bizzacchi JM, Goncalves MS, Costa FF. Prevalence of the prothrombin gene variant (nt20210A) in venous thrombosis and arterial disease. *Thromb Haemost* 1997; 78:1430-1433.
- Arruda VR, Siquiera LH, Chiaparini LC et al. Prevalence of the prothrombin gene variant 20210 G → A among patients with myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 1998; 37:42-45.
- Aslanidis C, Nauck M, Schmitz G. High-speed prothrombin G→A 20210 and methylenetetrahydrofolate reductase C→T 677 mutation detection using real-time fluorescence PCR and melting curves. *BioTechniques* 1999; 27:234-238.
- Atherosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology Italian Study Group. No evidence of association between prothrombotic gene polymorphisms and the development of acute myocardial infarction at a young age. *Circulation* 2003; 107:1117-1122.
- Bajzar L. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and an antifibrinolytic pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:2511-2518.
- Bar-Shavit R, Kahn AJ, Mann KG, Wilner GD. Identification of a thrombin sequence with growth factor activity on macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:976-980.
- Bar-Shavit R, Eldor A, Vlodavsky L. Binding of thrombin to subendothelial extracellular matrix: Protection and expression of functional properties. *J Clin Invest* 1989; 84:1096-1104.
- Bar-Shavit R, Benezra M, Eldor A et al. Thrombin immobilized to extracellular matrix is a potent mitogen for vascular smooth muscle cells: Nonenzymatic mode of action. *Cell regulation* 1990; 1:453-463.
- Bauer KA, Humphries S, Smillie B et al. Prothrombin activation is increased among asymptomatic carriers of the prothrombin G20210A and factor V Arg 506 Gln mutations. *Thromb Haemost* 2000; 84:396-400.
- Bertina RM, Tilburg van NH, Fuw de NJ, Haverkate F. Thrombin, a link between coagulation activation and fibrinolysis. *Ann NY Acad Sci* 1992; 667:239-248.

Bittl JA, Strong J, Brinker JA et al. Treatment with bivalirudin (hirulog) as compared with heparin during PTCA for unstable or postinfarction angina: Hirulog Angioplasty Study Investigators. *N Engl J Med* 1995; 12:764-769.

Boekholdt SM, Bijsterveld NR, Moons AHM, Levi M, Büller HR, Peters RJG. Genetic variation in coagulation and fibrinolytic proteins and their relation with acute myocardial infarction: A Systematic review. *Circulation* 2001; 104:3063-3086.

Brown K, Luddington R, Williamson D, Baker P, Baglin T. Risk of venous thromboembolism associated with a G to A transition at position 20210 in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene. *Br J Haematol* 1997; 98:907-909.

Burzotta F, Paciaroni K, Andreotti F, Casorelli I, Stefano de V. G20210A prothrombin gene polymorphism and extent of coronary disease. *Thromb Haemost* 2000; 84:142-143.

Burzotta F, Paciaroni K, Stefano de V et al. Increased prevalence of the G20210A prothrombin gene variant in acute coronary syndromes without metabolic or aquired risk factors or with limited extent of disease. *European Heart Journal* 2002; 23:26-30.

Burzotta F, Leone AM, Paciaroni K et al. G20210A prothrombin gene variant and clinical outcome in patients with a first acute coronary syndrome. *Haematologica* 2004; 89:1134-1138. (a)

Burzotta F, Paciaroni K, Stefano de V et al. G20210A prothrombin gene polymorphism and coronary ischaemic syndromes: a phenotype-specific meta-analysis of 12034 subjects. *Heart* 2004; 90:82-86. (b)

Carter AM, Sachchithanathan M, Stasinopoulos S, Maurer F, Medcalf RL. Prothrombin G20210A is a bifunctional gene polymorphism. *Thromb Haemost* 2002; 87:846-853.

Ceelig H, Bertina RM, Hylekama Vlieg van A, Rosendaal FR, Vos HL. Polymorphisms in the prothrombin gene and their association with plasma prothrombin levels. *Thromb Haemost* 2001; 85:1066-1070.

Ceelig H, Spaargaren-van Riel CC, Bertina RM, Vos HL. G20210A is a functional mutation in the prothrombin gene; effect on protein levels and 3'-formation. *J Thromb Haemost* 2004; 12:119-127.

Choudhury L, Marsh JD. Myocardial infarction in young patients. *Am J Med* 1999; 107:254-261.

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.

Colucci M, Binetti BM, Tripodi A, Chantarangkul V, Semeraro N. Hyperprothrombinemia associated with prothrombin G20210A mutation inhibits plasmafibrinolysis through a TAFI-mediated mechanism. *Blood* 2004; 103:2157-2161.

Corral J, Gonzalez-Conejero R, Lozano ML, Rivera J, Heras I, Vicente V. The venous thrombosis risk factor 20210 A allele of the prothrombin gene is not a major risk factor for arterial di-sease. *Br J Haematol* 1997; 99:304-307.

Coulet F, Godard V, Verdy E, Soubrier F. Lack of association of the prothrombin gene variant G20210A with myocardial infarction in caucasian males. *Thromb Haemost* 2000; 83:796-797.

- Croft SA, Daly ME, Steeds RP, Channer KS, Samani NJ, Hampton KK. The prothrombin 20210A allele and its association with myocardial infarction. *Thromb Haemost* 1999; 81:861-864.
- Cumming AM, Keeney S, Salden A, Bhavnani M, Shwe KH, Hay CRM. The prothrombin gene G20210A variant: Prevalence in a U.K anticoagulant clinic population. *Br J Haematol* 1997; 98:353-355.
- Cushman N. Hemostatic risk factors for cardiovascular disease. In: Schechter GP, Hoffman R, Schrier SL et al., eds. *Hematology* 1999. Washington, DC: American Society of Hematology, 1999:236-242.
- Dang QD, Vindigni A, Di Cera E. An allosteric switch controls the procoagulant and anticoagulant activities of thrombin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:5977-5981.
- Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry* 1991; 30:10363-10370.
- Dawber TR, Kannel WB. The Framingham study. An epidemiological approach to coronary heart disease. *Circulation* 1966; 34:553-555.
- Delahousse B, Gilbert M, Nicham F, Thirion C, Giraudeau B, Gruel Y. Comparative evaluation of five different methods for the measurement of plasma factor II levels in carriers of the 20210A prothrombin variant. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002; 13:465-470.
- Dilley A, Austin H, Hooper WC et al. Prevalence of the prothrombin 20210 G-to-A variant in blacks: Infants, patients with venous thrombosis, patients with myocardial infarction, and control subjects. *J Lab Clin Med* 1998; 132:452-455.
- Doggen CJM, Manger Cats V, Bertina RM, Rosendaal FR. Interaction of coagulation defects and cardiovascular risk factors: Increased risk of myocardial infarction associated with factor V Leiden or prothrombin 20210A. *Circulation* 1998; 97:1037-1041.
- Dönmez Y, Kanadasi M, Tanriverdi K et al. Prothrombin 20210GA and factor V Leiden mutations in patients less than 55 years old with myocardial infarction. *Jpn Heart J* 2004; 45:505-512.
- Durante-Mangoni E, Davies GJ, Ahmed N, Ruggiero G, Michaelides K. The prothrombin G20210A polymorphism in patients with myocardial infarction. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002; 13:603-608.
- Eidt JF, Allison P, Noble S et al. Thrombin is an important mediator of platelet aggregation in stenosed coronary arteries with endothelial injury. *J Clin Invest* 1989; 84:18-27.
- Eikelboom JW, Baker RI, Parsons R, Taylor RR, Bockxmeer van FM. No association between the 20210 G/A prothrombin gene mutation and premature coronary artery disease. *Thromb Haemost* 1998; 80:878-880.
- Eikelboom JW, Ivey L, Ivey J, Baker RI. Familial thrombophilia and the prothrombin 20210A mutation: association with increased thrombin generation und unusual thrombosis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1999; 10:1-5.
- Fagar G. Thrombin and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1995; 77:645-650.

Feng YJ, Draghi A, Linfert DR, Wu AHB, Tsongalis GJ. Polymorphisms in the genes for coagulation factors II, V, and VII in patients with ischemic heart disease. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 123:1230-1235.

Ferraresi P, Marchetti G, Legnani C et al. The heterozygous 20210 G/A prothrombin genotype is associated with early venous thrombosis in inherited thrombophilias and is not increased in frequency in artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:2418-2422.

Franco RF, Santos SEB, Elion J, Tavella MH, Zago MA. Prevalence of the G20210A polymorphism in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene in different human populations. *Acta Haematol* 1998; 100:9-12.

Franco RF, Trip MD, Cate ten H et al. The 20210G →A mutation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene and the risk for arterial thrombotic disease. *Br J Haematol* 1999; 104:50-54.

French JK, Water van de NS, Sutton TM et al. Potential thrombophilic mutations/polymorphisms in patients with no flow-limiting stenosis after myocardial infarction. *Am Heart J* 2003; 145:118-124.

Friezner Degen SJ, MacGillivray RTA, Davie EW. Characterization of the complementary deoxyribonucleic acid and gene coding for human prothrombin. *Biochemistry* 1983; 22:2087-2097.

Friezner Degen SJ, Davie EW. Nucleotide sequence of the gene for human prothrombin. *Biochemistry* 1987; 26:6165-6177.

Friezner Degen SJ, McDowell SA, Sparks LM, Scharrer I. Prothrombin Frankfurt: a dysfunctional prothrombin characterized by substitution of Glu-466 by Ala. *Thromb Haemost* 1995; 73:203-209.

Furie B, Furie BC. The molecular basis of blood coagulation. *Cell* 1988; 53:505-518.

Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. Mechanism of disease: The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 1992; 326:242-250 (part 1). (a)

Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. Mechanism of disease: The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 1992; 326:310-318 (part 2). (b)

Fuster V, Falk E, Fallon JT, Badimon L, Chesebro JH, Badimon JJ. The three processes leading to post PTCA restenosis: dependence on the lesion substrate. *Thromb Hemost* 1995; 14:552-559.

Gallo R, Padurean A, Toschi V et al. Prolonged thrombin inhibition reduces restenosis after balloon angioplasty in porcine coronary arteries. *Circulation* 1998; 97:581-588.

Gardemann A, Arsic T, Katz N, Tillmanns H, Hehrlein FH, Haberbosch W. The factor II G20210A and factor V G1691A gene transitions and coronary heart disease. *Thromb Haemost* 1999; 81:208-213.

Garewal G, Das R, Ahluwalia J, Mittal N, Varma S. Prothrombin G20210A is not prevalent in North India. *J Thromb Haemost* 2003; 1:2253-2254.

Gehring NH, Frede U, Neu-Yilik G et al. Increased efficiency of mRNA 3' end formation: a new genetic mechanism contributing to hereditary thrombophilia. *Nature Genet* 2001; 28:389-392.

Gelfi C, Viganò A, Ripamonti M et al. A proteomic analysis of changes in prothrombin and plasma proteins associated with the G20210A mutation. *Proteomics* 2004; 4:2151-2159.

Gerdes VEA, Cate ten H, Groot de E et al. Arterial wall thickness and the risk of recurrent ischemic events in carriers of the prothrombin G20210A mutation with clinical manifestations of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2002; 163:135-140.

Gouin-Thibault I, Arkam R, Nassiri S et al. Markers of activated coagulation in patients with factor V Leiden and/or G20210A prothrombin gene mutation. *Thromb Hemost* 2002; 107:7-11.

Hamsten A, Wiman B, Faire de U, Blömbäck M. Increased plasma levels of a rapid inhibitor of tissue plasminogen activator in young survivors of myocardial infarction. *N Engl J Med* 1985; 313:1557-1563.

Harker LA. Role of platelets and thrombosis in mechanisms of acute occlusion and restenosis after angioplasty. *Am J Cardiol* 1987; 60:20B-28B.

Harlan JM, Thompson PJ, Ross RR, Bowen-Pope DF. Alpha-thrombin induces release of platelet-derived growth factor-like molecule(s) by cultured human endothelial cells. *J Cell Biol* 1986; 103:1129-1133.

Heinrich J, Schulte H, Schönfeld R, Köhler E, Assmann G. Association of variables of coagulation, fibrinolysis and acute-phase with atherosclerosis in coronary and peripheral arteries and those supplying the brain. *Thromb Haemost* 1995; 73:374-379.

Heras M, Chesebro J, Webster M et al. Hirudin, heparin and placebo during deep arterial injury in the pig: the in vivo role of thrombin in platelet-mediated thrombosis. *Circulation* 1990; 82:1476-1484.

Hessner MJ, Dinanuer DM, Kwiatkowski R, Neri B, Raife TJ. Age-dependent prevalence of vascular-disease-associated polymorphisms among 2689 volunteer blood donors. *Clin Chem* 2001; 47:1879-1884.

Hillarp A, Zöller B, Svensson PJ, Dahlbäck B. The 20210 A allele of the prothrombin gene is a common risk factor among Swedish outpatients with verified deep vein thrombosis. *Thromb Haemost* 1997; 78:990-992.

Hoffman C, Lawson W, Miller R, Hultin M. Correlation of vitamin K-dependent clotting factors with cholesterol and triglycerides in healthy young adults. *Arterioscler Thromb* 1994; 14:1737-1740.

Hollenberg MD, Yang SG, Laniyonu AA, Moore GJ, Saifeddine M. Action of thrombin receptor polypeptide in gastric smooth muscle: Identification of a core pentapeptide retaining full thrombin-mimetic intrinsic activity. *Mol Pharmacol* 1992; 42:186-191.

Hultin MB, Grimson RC. Factor V Leiden, Prothrombin 20210 gene variant, and risk of myocardial infarction. *Circulation* 1999; 99:457-458.

Inbal A, Freimark D, Modan B et al. Synergistic effects of prothrombotic polymorphisms and atherogenic factors on the risk of myocardial infarction in young males. *Blood* 1999; 93:2186-2190.

Isshiki I, Murata M, Watanabe R et al. Frequencies of prothrombin 20210 G→A mutation may be different among races – studies on Japanese populations with various forms of thrombotic disorders and healthy subjects. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998; 9:105-106.

Jackson CM. The biochemistry of prothrombin activation. *Br J Haematol* 1978; 39:1-8.

- Jackson CM. Physiology and biochemistry of prothrombin. In: Bloom AL, Forbes CD, Thomas DP, Tuddenham EGD, eds. *Haemostasis and Thrombosis*. Edinburg, Schottland: Churchill Livingstone, 1994:397.
- Kannel WB, Wolf PA, Castelli WP, D'Agostino RB. Fibrinogen and the risk of cardiovascular disease: the Framingham Study. *JAMA* 1987; 258:1183-1186.
- Kienast J, Thompson SG, Raskino C et al. Prothrombin activation fragment 1+2 and thrombin antithrombin III complexes in patients with angina pectoris: relation to the presence and severity of coronary atherosclerosis. *Thromb Haemost* 1993; 70:550-553.
- Kim RJ, Becker RC. Association between factor V Leiden, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolatereductase C677T mutations and events of the arterial circulatory system: a meta-analysis of published studies. *Am Heart J* 2003; 146: 948-957.
- Koenen RR, Tans G, Oerle van R, Hamulyak K, Rosing J, Hackeng TM. The APC-independent anticoagulant activity of proteins in plasma is decreased by elevated prothrombin levels due to prothrombin G20210A mutation. *Blood* 2003; 102:1686-1692.
- Kyrle PA, Mannhalter C, Béguin S et al. Clinical studies and thrombin generation in patients homozygous or heterozygous for the G20210A mutation in the prothrombin gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:1287-1291.
- Labrecque G, Soulban G. Biological rhythms in the physiology and pharmacology of blood coagulation. *Chronobiol Int* 1991; 8:361-372.
- Lane DA, Grant PJ. Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial disease. *Blood* 2000; 95:1517-1532.
- Laule M, Cascorbi I, Stangl V et al. A1/A2 polymorphism of glycoprotein IIIa and association with excess procedural risk for coronary catheter interventions: a case-controlled study. *Lancet* 1999; 353:708-712.
- Lutze G, Urbahn H. One-stage determinations of blood clotting factors – methodological aspects and quality criteria of deficient plasmas. *Lab Med* 1989; 13:457-463.
- Maat de MPM, Bladbjerg EM, Johansen LG, Gram J, Jespersen J. Absence of prothrombin mutation in Inuit (Greenland Eskimos). *Thromb Haemost* 1998; 79:882.
- Malik AB, Fenton JW II. Thrombin-mediated increase in vascular endothelial permeability. *Semin Thromb Hemostas* 1992; 18:193-199.
- Mann KG. Prothrombin and thrombin. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, eds. *Hemostasis and thrombosis: Basic principles and clinical practice*. Third edition. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1994:184-198.
- Maraganore JM. Thrombin, thrombin inhibitors, and the arterial thrombotic process. *Thromb Haemost* 1993; 70:208-211.
- Marcucci R, Brogi D, Sofi F et al. PAI-1 and homocysteine, but not lipoprotein (a) and thrombophilic polymorphisms are independently associated with occurrence of major adverse cardiac events after successful coronary stenting. *Heart* 2006; 92:377-381.
- Marenberg ME, Risch N, Berkman LF, Floderus B, Faire de U. Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins. *N Engl J Med*. 1994; 330:1041-1046.

- Marmur JD, Merlini PA, Sharma SK et al. Thrombin generation in human coronary arteries after percutaneous transluminal angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1994; 24:1484-1491.
- McDuffie FC, Giffin C, Niedringhaus R et al. Prothrombin, thrombin and prothrombin fragments in plasma of normal individuals and of patients with laboratory evidence of disseminated intravascular coagulation. *Thromb Res* 1979; 16: 759-773.
- McNamara CA, Sarembock IJ, Gimple LW, Fenton JW II, Coughlin SR, Owens GK. Thrombin stimulates proliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells by a proteolytically activated receptor. *J Clin Invest* 1993, 91:94-98.
- Meade TW, Mellow S, Brozovic M et al. Haemostatic function and ischaemic heart disease: principal results of the Northwick Park Heart Study. *Lancet* 1986; 2:533-537.
- Merlini PA, Bauer KA, Oltrona L et al. Persistent activation of coagulation mechanism in unstable angina and myocardial infarction. *Circulation* 1994; 90:61-68.
- Mikkelsen J, Karhunen PJ. Genetic variation in coagulation factors II, V, VII and fatal MI. *Thromb Haemost* 2002; 87: 349-350.
- Miller GJ, Bauer KA, Barzegar S, Cooper JA, Rosenberg RD. Increased activation of the haemostatic system in men at high risk of fatal coronary heart disease. *Thromb Haemost* 1996; 75:767-771.
- Nelsestuen GL, Zytkevich TH, Howard JB. The mode of action of vitamin K: Identification of gamma-carboxyglutamic acid as a component of prothrombin. *J Biol Chem* 1974, 249:6347-6350.
- Nobuyoshi M, Kimura T, Ohishi H et al. Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty: Pathologic observations in 20 patients. *J Am Coll Cardiol* 1991; 17:433-439.
- Pérez-Ceballos E, Corral J, Alberca I et al. Prothrombin A19911G and G20210A polymorphisms' role in thrombosis. *Br J Haematol* 2002; 118:610-614.
- Pollak ES, Lam HS, Russell JE. The G20210A mutation does not affect the stability of prothrombin mRNA in vivo. *Blood* 2002; 100:359-362.
- Poort SR, Michiels JJ, Reitsma PH, Bertina RM. Homozygosity for a novel missense mutation in the prothrombin gene causing a severe bleeding disorder. *Thromb Haemost* 1994; 72:819-824.
- Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996; 88:3698-3703.
- Poort SR, Landolfi R, Bertina RM. Compound heterozygosity for two novel missense mutations in the prothrombin gene in a patient with a severe bleeding tendency. *Thromb Haemost* 1997; 77: 610-615.
- Prohaska W, Schmidt M, Mannebach H, Gleichmann U, Kleesiek K. The prevalence of the prothrombin 20210 G→A mutation is not increased in angiographically confirmed coronary artery disease. *Thromb Haemost* 1999; 81:161-162.
- Psaty BM, Smith NL, Lemaitre RN et al. Hormone replacement therapy, prothrombotic mutations, and the risk of incident nonfatal myocardial infarction in postmenopausal women. *JAMA* 2001; 285:906-913.

Redondo M, Watzke HH, Stucki B et al. Coagulation factors II, V, and X, prothrombin gene 20210G→A transition, and factor V Leiden in coronary artery disease: High factor V clotting activity is an independent risk factor for myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:1020-1025.

Rees DC, Chapman NH, Webster MT, Guerreiro JF, Rochette J, Clegg JB. Born to clot: the European burden. *Br J Haematol* 1999; 105:564-566.

Reiner AP, Davie EW. Introduction to hemostasis and the vitamin K-dependent coagulation factors. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 7 ed. New York: McGraw-Hill, 1995:3181-3221.

Reiner AP, Rosendaal FR, Reitsma PH et al. Factor V Leiden, prothrombin G20210A, and risk of sudden coronary death in apparently healthy persons. *Am J Cardiol* 2002; 90:66-68.

Ridker PM, Hennekens CH, Miletich JP. G20210A mutation in prothrombin gene and risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in a large cohort of US men. *Circulation* 1999; 99:999-1004.

Roberts HR, Lefkowitz JB. Inherited disorders of Prothrombin conversion. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman, eds. *Hemostasis and thrombosis: Basic principles and clinical practice*. Third edition. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1994:200-218.

Rosendaal FR, Siscovick DS, Schwartz SM, Psaty BM, Raghunathan TE, Vos HL. A common prothrombin variant (20210 G to A) increases the risk of myocardial infarction in young women. *Blood* 1997; 90:1747-1750.

Rosendaal FR, Doggen CJM, Zivelin A et al. Geographic distribution of the 20210G to A prothrombin variant. *Thromb Haemost* 1998; 79:706-708.

Ross R. Pathogenesis of atherosclerosis. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, eds. *Hemostasis and thrombosis: Basic principles and clinical practice*. Third edition. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1994:861-869.

Royle NJ, Irwin DM, Koschinsky ML, MacGillivray RT, Hamerton JL. Human genes encoding prothrombin and ceruloplasmin map to 11p11-q12 and 3q21-24, respectively. *Somat Cell Mol Genet* 1987; 13:285-292.

Russo C, Girelli D, Olivieri O et al. G20210A Prothrombin gene polymorphism and prothrombin activity in subjects with or without angiographically documented coronary artery disease. *Circulation* 2001; 103:2436-2440.

Ryan TJ, Baumann WB, Kennedy JW et al. Guidelines for percutaneous transluminal coronary angioplastie. A report of the American Heart Association/ American College of Cardiology Task Force on Assessment of Diagnostic and Therapeutic Cardiovascular Procedures (Committee on Percutaneous Transluminal Coronary Angioplastie). *Circulation* 1993; 88:2987-3007.

Saiki RK, Gelfland DH, Stoffel S et al. Primer-detected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-491.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Second edition. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.

Sanger F, Nicklen S, Coulsen AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74:5463-5467.

- 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: 555-559.
- Segev A, Ellis MH, Segev F et al. High prevalence of thrombophilia among young patients with myocardial infarction and few conventional risk factors. *Int J Cardiol* 2005; 98:421-424.
- Serruys P, Herrmann J, Simon R et al. A comparison of hirudin with heparin in the prevention of restenosis after PTCA. *N Engl J Med* 1995; 333:757-763.
- Shea S, Ottman R, Gabrieli C, Stein Z, Nichols A. Family history as an independent risk factor for coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 1984; 4:793-801.
- Smiles AM, Jenny NS, Tang Z, Arnold A, Cushman M, Tracy RP. No association of plasma prothrombin concentration or the G20210A mutation with incident cardiovascular disease: results from the Cardiovascular Health Study. *Thromb Haemost* 2002; 87:614-621.
- Soria JM, Almasy L, Souto JC et al. Linkage analysis demonstrates that the prothrombin G20210A mutation jointly influences plasma prothrombin levels and risk of thrombosis. *Blood* 2000; 95:2780-2785.
- Soulban G, Labrecque G. Circadian rhythms of blood clotting time and coagulation factors II, VII, IX and X in rats. *Life Sci* 1989; 45:2485-2489.
- Souto JC, Almasy L, Montserrat B et al. Genetic determinants of hemostasis phenotypes in Spanish families. *Circulation* 2000; 101:1546-1551.
- Stadel BV. Oral contraceptives and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1981; 305:612-618.
- Stenflo J, Fernlund P, Egan W, Roepstorff P. Vitamin K-dependent modifications of glutamic acid residues in prothrombin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71:2730-2733.
- Sugama Y, Malik AB. Thrombin receptor 14-amino acid peptide mediates endothelial hyperadhesivity and neutrophil adhesion by P-selectin-dependent mechanism. *Circ Res* 1992; 71:1015-1019.
- Taymaz H, Erarslan S, Toksoy Ones E, Alkan T, Agirbasli M, Kirdar B. Sequence variations within the genes related to hemostatic imbalance and their impact on coronary artery disease in Turkish population. *Thromb Res* 2006.
- Vargas M, Soto I, Pinto CR et al. The prothrombin 20210A allele and the factor V Leiden are associated with venous thrombosis but not with early coronary disease. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1999; 10:39-41.
- Vaya A, Trenor R, Molla S et al. Acute myocardial infarction is associated with the prothrombin G20210A mutation. *Clin Appl Thromb Hemost* 2000; 6:111-112.
- Vouret-Craviari V, Obberghen-Schilling van E, Rasmussen UB, Pavirani A, Lecocq JP, Pouyssegur J. Synthetic alpha thrombin receptor peptides activate G protein-coupled signaling pathways but are unable to induce mitogenesis. *Mol Cell Biol* 1992; 3:95-102.
- Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 1991; 64:1057-1068.
- Walz D, Fenton JW II, Shuman M. Bioregulatory functions of thrombin. *Ann NY Acad Sci* 1986; 485:1-449.

- Water van de NS, French JK, Lund M, Hyde TA, White HD, Browett PJ. Prevalence of factor V Leiden and prothrombin variant G20210A in patients age <50 years with no significant stenoses at angiography three to four weeks after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36:714-722.
- Watzke HH, Schüttrumpf J, Graf S, Huber K, Panzer S. Increased prevalence of a polymorphism in the gene coding for human prothrombin in patients with coronary heart disease. *Thromb Res* 1997; 87:521-526.
- White GC, Workman EF, Lundblad RL. Platelet-thrombin interactions. The platelet as a substrate for thrombin. In: Lundblad RL, Fenton JW, Mann KG, eds. *The chemistry and biology of thrombin*. Ann Arbor: Ann Arbor Press, 1977: 479-498.
- Wilner GD, Danitz MP, Mudd MS, Hsieh KH, Fenton JW II. Selective immobilization of alpha-thrombin by surface-bound fibrin. *J Lab Clin Med* 1981;97:403-411.
- World Health Organization. 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.
- Wu AHB, Tsongalis GJ. Correlation of polymorphisms to coagulation and biochemical risk factors for cardiovascular diseases. *Am J Cardiol* 2001; 87:1361-1366.
- Ye Z, Liu EH, Higgins JP et al. Seven hemostatic gene polymorphisms in coronary disease: meta-analysis of 66,155 cases and 91,307 controls. *Lancet* 2006; 367:651-658.
- Zaman AG, Helft G, Worthley SG, Badimon JJ. Review article. The role of plaque rupture and thrombosis in coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2000; 149:251-266.
- Zee RY, Cook NR, Cheng S, Erlich HA, Lindpaintner K, Ridker PM. Multi-locus candidate gene polymorphisms and risk of myocardial infarction: a population-based, prospective genetic analysis. *J Thromb Haemost* 2006; 4:341-348.
- Zimmerman FH, Cameron A, Fisher LD, Ng G. Myocardial infarction in young adults: Angiographic characterization, risk factors and prognosis. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26:654-661.
- Zivelin A, Rosenberg N, Faier S et al. A single genetic origin for the common prothrombotic G20210A polymorphism in the prothrombin gene. *Blood* 1998; 92:1119-1124.
- Zivelin A, Mor-Cohen R, Kovalsky V et al. Prothrombin G20210A is an ancestral prothrombotic mutation that occurred in caucasians approximately 24,000 years ago. *Blood* 2006; 107:4666-4668.

Verzeichnis der Abkürzungen

APC	Activated protein C (aktiviertes Protein C)
BMI	Body mass index (Körpermasseindex)
Bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumine (bovines Serumalbumin)
CI	Confidence interval (Konfidenzintervall)
DCA	Directional coronary atherectomy (direktionale Atherektomie)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP's	Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
ETP	Endogenous thrombin potential (endogenes Thrombinpotential)
KHK	Koronare Herzerkrankung
MACE	Major adverse cardiac events (schwerwiegende kardiale Ereignisse)
MgCl	Magnesiumchlorid
MTHFR	Methylentetrahydrofolatreduktase
mRNA	Messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
n.s.	nicht signifikant
OR	Odds ratio (Chancenquotient)
PAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PDGF-BB	Platelet derived growth factor (Thrombozyten-Wachstumsfaktor)
PTCA	Percutaneous transluminal coronary angioplasty (perkutane transluminale Koronarangioplastie)
RFLP	Restriction fragment length polymorphism (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus)
RR	Blutdruck nach Riva-Rocci [mmHg]
TAFI	Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (Thrombin-aktivierbarer-Fibrinolyse-Inhibitor)
UTR	Untranslated region (nicht translatierte Region)
vs.	versus
WHO	World Health Organization

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Ivar Roots, Direktor des Instituts für Klinische Pharmakologie der Charité, für die freundliche Überlassung des Themas und die Möglichkeit, die Arbeit am Institut für Klinische Pharmakologie anzufertigen.

Ich danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Klinische Pharmakologie, mit denen ich während der Doktorarbeit zusammengearbeitet habe und die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meinen Betreuern Herrn Dr. med. Przemyslaw M. Mrozikiewicz, Herrn Dr. med. Christian Meisel, Frau Dr. med. Konstanze Diefenbach und Frau Dr. Gabriele Laschinski möchte ich vor allem für das Interesse an meiner Arbeit und die sehr gute Zusammenarbeit danken. Ihre Bereitschaft zur Durchsicht des Manuskripts, ihre auf umfangreichem Fachwissen und Erfahrung basierende konstruktive Kritik sowie die zahlreichen Anregungen und Ideen waren eine außerordentlich hilfreiche Unterstützung und unverzichtbar für diese Arbeit.

Frau Dr. Isabella Gashaw (geb. Nowakowski), Herrn Mark Goldammer und Herrn Farhad Arjomand-Nahad, die jederzeit verlässliche und geduldige Ansprechpartner waren, bin ich sehr für ihre fachlichen Ratschläge, Denkanstöße und ihren Optimismus dankbar. Nicht vergessen möchte ich darüber hinaus die medizinisch-technischen Assistentinnen des Instituts, deren ständige Hilfsbereitschaft und unermüdlicher Einsatz halfen, die Tücken der Laborarbeit zu meistern und Arbeitsabläufe zu optimieren.

Meinem Mann danke ich für die jahrelange liebevolle Unterstützung. Ohne seine Motivation sowie Geduld bei computertechnischen Problemen wäre die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Nicht zuletzt bin ich meiner Mutter sehr dankbar für die Ermöglichung des Medizinstudiums und der Dissertation.

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Linda Verena Walther, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: *Die Polymorphismen G20210A und G10253A des Gerinnungsfaktors II (Prothrombin) als genetische Prädispositionsfaktoren für die koronare Herzerkrankung und ihre Komplikationen* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

24.01.2009

Lebenslauf

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

Brandenburg, 24.01.2009