

Aus der Forschungsgruppe Geriatrie
der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin
im Evangelischen Geriatriezentrum Berlin

DISSERTATION

**Assoziation des *Sma* I-Polymorphismus im
von-Willebrand-Faktor-Gen mit ischämischem
Schlaganfall**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Stefan Bardella
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. E. Steinhagen-Thiessen

2. Prof. Dr. med. M. Endres

3. Prof. Dr. med. A. Pfeiffer

Datum der Promotion: 26.11.2007

Zusammenfassung

Der Schlaganfall stellt die verbreitetste lebensbedrohende neurologische Erkrankung dar, die klinischen Folgen sind oft schwerwiegend. Es handelt sich um eine multifaktorielle Erkrankung mit starken Wechselwirkungen zwischen genetischen und Umweltfaktoren. Da Schlaganfälle und deren Folgen enorme Ressourcen im Gesundheitswesen verbrauchen, kommt der Prävention eine große Bedeutung zu. Dabei müssen zuerst Personen mit hohem Schlaganfall-Risiko identifiziert werden, wozu zunehmend Suszeptibilitätsallele in der Bevölkerung gesucht werden. Der von-Willebrand-Faktor (vWF) spielt eine bedeutende Rolle im Zusammenspiel der primären und sekundären Hämostase, im vWF-Gen sind verschiedene Polymorphismen bekannt. Der im Intron 2 gelegene *Sma* I-Polymorphismus zeigte in einer chinesischen Fall-Kontroll-Studie eine signifikante Assoziation zum Auftreten ischämischer Schlaganfälle. Ob dieser Polymorphismus bei Weißen ebenfalls einen möglichen Risikofaktor für Hirninfarkte darstellt, wurde bisher nicht untersucht. Bekannt ist lediglich, dass zwischen den Ethnien deutlich differente Allelfrequenzen vorliegen.

In einem geriatrisch-internistischen Krankenhaus in Berlin wurden 140 Patienten mit nicht kardiogenem Hirninfarkt sowie 209 gleichaltrige Kontrollprobanden rekrutiert und hinsichtlich des *Sma* I-Polymorphismus untersucht. Ziel war es, im Rahmen einer Fall-Kontroll-Studie den Zusammenhang zwischen diesem Polymorphismus und dem Auftreten ischämischer Schlaganfälle bei Weißen zu ermitteln und mit dem Ergebnis der in der chinesischen Population ermittelten Assoziation zu vergleichen.

Der C/C-Genotyp trat in der Fallgruppe nicht signifikant häufiger auf als in der Kontrollgruppe (OR=1,14; $p=0,56$), ebenso zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der C-Allel-Frequenz (OR=1,21; $p=0,41$), welche in beiden Gruppen etwa der in der Literatur beschriebenen Allelfrequenz bei Weißen entsprach. Selbst wenn nur Hirninfarkt-Patienten mit nachgewiesenen atherosklerotischen Läsionen der hirnversorgenden Arterien berücksichtigt wurden, zeigte sich zwar eine Tendenz zur Häufung des C/C-Genotyps, jedoch keine Signifikanz (OR=1,32; $p=0,25$). Auffällig war allerdings ein signifikanter Unterschied der Genotyp-Häufigkeiten zwischen der untersuchten Berliner und der o. g. chinesischen Population ($p=0,018$).

Zusammenfassend kann man feststellen, dass keine Assoziation des *Sma* I-Polymorphismus im vWF-Gen mit nicht kardiogenem Hirninfarkt bei einer Berliner Population besteht und sich diese

Population damit signifikant von einer chinesischen unterscheidet. Dieser Polymorphismus scheint also bei Weißen, im Gegensatz zu Chinesen, keinen Risikofaktor für ischämische Schlaganfälle darzustellen. Das Ergebnis reiht sich ein in zahlreiche molekulargenetische Untersuchungen zu Hämostase-Faktoren und Atherothrombose sowie -sklerose, welche in der Gesamtheit keine eindeutigen, teils widersprüchliche Ergebnisse erbrachten.

Abstract

Stroke is the most common life-threatening neurological disease, the clinical sequelae are serious. The genesis is multifactorial with strong interactions between genetic and environmental factors. As stroke and its sequelae consume huge resources of the public health the prevention is of great importance. The first step for that is the identification of people with high stroke risk to which more and more alleles of susceptibility are searched for. The von Willebrand factor (vWF) plays an important role in the interaction of primary and secondary haemostasis. Various polymorphisms of the gene encoding vWF are known. The *Sma* I polymorphism is located in intron 2 of vWF, and is strongly associated with increased risk of acute ischaemic stroke in a Chinese case-control study. But until now there is no investigation of this association in a Caucasian population. It is merely known that the allele frequencies between both ethnic groups differ considerably.

In a geriatric hospital in Berlin, 140 patients with non-cardioembolic cerebral infarction and 209 control subjects of the same age were recruited and examined for the *Sma* I polymorphism. The aim of the present case-control study was to determine the correlation between that polymorphism and ischaemic strokes among Caucasians as well as to compare the result with the Chinese study.

The prevalence of the CC genotype in stroke patients was not significantly higher than that of the controls (OR=1.14; $p=0.56$). As well there was no significant difference with regard to the frequencies for the C allele (OR=1.21; $p=0.41$) that correspond in both groups to the published frequency among Caucasians. Even after exclusion of the stroke patients without documented carotid atherosclerosis there was a trend to a higher prevalence of the CC genotype, but no significance (OR=1.32; $p=0.25$). However, a significant difference regarding the genotype prevalences was found between the Berlin population and the Chinese one ($p=0.018$).

In conclusion, the *Sma* I polymorphism in the vWF gene is not associated with non-cardiogenic

cerebral infarction in a Berlin population. With it, this population differs significantly from a Chinese one. That polymorphism may represent a risk factor for ischaemic stroke in Chinese, but not in Caucasians. This result joins numerous molecular genetic investigations into the correlation between haemostatic factors and atherothrombosis or atherosclerosis which altogether showed inconsistent results.

Schlagwörter:

Sma I-Polymorphismus, von-Willebrand-Faktor, ischämischer Schlaganfall, arterielle Thrombose

Keywords:

Sma I polymorphism, von Willebrand factor, Ischaemic stroke, Arterial thrombosis

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	9
1 EINLEITUNG.....	11
1.1 DER SCHLAGANFALL	11
1.1.1 <i>Definition und Pathophysiologie.....</i>	<i>11</i>
1.1.2 <i>Epidemiologie des Schlaganfalls</i>	<i>13</i>
1.1.3 <i>Risikofaktoren für Schlaganfälle.....</i>	<i>15</i>
1.2 GENETISCHE ASPEKTE ZEREBROVASKULÄRER ERKRANKUNGEN	18
1.2.1 <i>Monogenetische, mit Schlaganfall assoziierte Erkrankungen</i>	<i>18</i>
1.2.2 <i>Der polygenetische Schlaganfall.....</i>	<i>19</i>
1.3 VON-WILLEBRAND-FAKTOR	24
1.3.1 <i>Struktur und Funktion</i>	<i>24</i>
1.3.2 <i>von-Willebrand-Faktor und Hirninfarkt</i>	<i>26</i>
1.3.3 <i>Sma I-Polymorphismus des vWF.....</i>	<i>27</i>
1.4 ZIELSETZUNG.....	29
2 MATERIAL UND METHODEN.....	30
2.1 PROBANDEN.....	30
2.2 MATERIAL	33
2.2.1 <i>Chemikalien.....</i>	<i>33</i>
2.2.2 <i>Biochemikalien.....</i>	<i>33</i>
2.2.3 <i>Primersequenzen.....</i>	<i>33</i>
2.2.4 <i>Kits</i>	<i>33</i>
2.2.5 <i>Laborgeräte.....</i>	<i>34</i>
2.2.6 <i>Software.....</i>	<i>34</i>
2.2.7 <i>Verbrauchsmaterialien.....</i>	<i>34</i>
2.3 METHODEN	35
2.3.1 <i>DNA-Extraktion.....</i>	<i>35</i>
2.3.2 <i>Polymerase-Kettenreaktion.....</i>	<i>36</i>
2.3.3 <i>Sma I-Digestion.....</i>	<i>39</i>

2.3.4	<i>Gelelektrophorese</i>	39
2.3.5	<i>Statistische Methoden</i>	41
3	ERGEBNISSE	43
3.1	BASISCHARAKTERISTIKA	43
3.2	VERTEILUNG DES <i>SMA I</i> -GENOTYPS	45
3.3	VERGLEICH MIT DER CHINESISCHEN POPULATION.....	51
4	DISKUSSION	53
4.1	GENETISCHE UNTERSUCHUNGEN AM MENSCHEN	53
4.2	VON-WILLEBRAND-FAKTOR UND KARDIOVASKULÄRE ERKRANKUNGEN.....	55
4.3	FEHLENDE ASSOZIATION DES <i>SMA I</i> -POLYMORPHISMUS MIT HIRNINFARKT BEI WEIBEN	58
4.4	UNTERSCHIED ZWISCHEN CHINESISCHER UND BERLINER POPULATION.....	59
4.5	LIMITATIONEN UND AUSBLICK	60
5	ZUSAMMENFASSUNG	62
	LITERATURVERZEICHNIS	64
	DANKSAGUNG	69
	LEBENS LAUF	71
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	72

Widmung

Für meine Eltern und für Azouka

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
APC	Aktives Protein C
Arg	Arginin
Asp	Aspartat
AT III	Antithrombin
BMI	Body Mass Index
BRD	Bundesrepublik Deutschland
CRP	C-reaktives Protein
Cys	Cystein
DM	Deutsche Mark
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGZB	Evangelisches Geriatriezentrum Berlin
Gly	Glycin
GP	Glykoprotein
ICB	Intrazerebrale Blutung
KHK	Koronare Herzkrankheit
KI	Konfidenzintervall
Met	Methionin

Mrd.	Milliarde
OR	Odds Ratio
PAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RFLP	Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus
RR	Relatives Risiko
SAB	Subarachnoidalblutung
SD	Standardabweichung
TIA	Transitorische ischämische Attacke
Tyr	Tyrosin
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
vWF	von-Willebrand-Faktor
WHO	Weltgesundheitsorganisation

Danksagung

Nach dem Abschluss der Untersuchung und der Fertigstellung der Dissertation ist es mir ein besonderes Bedürfnis, mich bei den nachfolgend aufgeführten Personen zu bedanken.

Mein erster und besonderer Dank geht an meine Doktormutter, Frau Prof. Dr. med. Elisabeth Steinhagen-Thiessen, Ärztliche Leiterin des Evangelischen Geriatriezentrums Berlin, Leiterin der Forschungsgruppe Geriatrie der Charité und Ärztliche Leiterin der Lipidambulanz und Lipidapherese im Interdisziplinären Stoffwechsel-Centrum der Charité, Campus Virchow-Klinikum, für die Überlassung des Dissertationsthemas, die uneingeschränkt engagierte Unterstützung und die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Von Herzen danke ich meinem Betreuer, Herrn Dr. med. Dipl.-Pharm. Bert Hanke, ehemals Mitglied der Forschungsgruppe Geriatrie der Charité, für die stetige motivierende Zusammenarbeit und die ermutigende Begleitung von Anfang an.

Ebenfalls zu großem Dank verpflichtet bin ich Herrn Prof. Dr. med. Andreas F. H. Pfeiffer, Direktor der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Endokrinologie, Diabetes und Ernährungsmedizin der Charité, Campus Benjamin Franklin, und Leiter der Abteilung Klinische Ernährung des Deutschen Instituts für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke, der mir in hervorragender Weise die Durchführung der umfangreichen Laborarbeiten im Deutschen Institut für Ernährungsforschung ermöglichte.

Mein allerherzlichster Dank geht an meine Betreuer im Deutschen Institut für Ernährungsforschung, Frau Dr. rer. nat. Simone Kaiser und Herrn Dr. med. Martin Osterhoff, für die leidenschaftliche und unermüdliche Unterstützung der Laborarbeiten. In diesem Zusammenhang danke ich allen Mitarbeitern im Labor der Abteilung Klinische Ernährung, insbesondere Frau Katrin Sprengel, für die unkomplizierte und tatkräftige Hilfestellung.

Für die geduldige Beratung der statistischen Analyse der Ergebnisse danke ich in besonderem Maße Herrn Prof. Dr. rer. nat. Peter Martus, Leiter des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie der Charité, Campus Benjamin Franklin und Campus Charité Mitte.

Weiterhin danke ich meinen ärztlichen Kollegen des Evangelischen Geriatriezentrums Berlin, namentlich Herrn Andreas Fischer, jetzt Oberarzt der Abteilung für Geriatrie im Krankenhaus

Bethel Berlin, und den Kollegen der Lipidambulanz und Lipidapherese im Interdisziplinären Stoffwechsel-Centrum der Charité, Campus Virchow-Klinikum, sowie allen Pflegekräften, Physiotherapeuten, Ergotherapeuten, Neuropsychologen und Sozialarbeitern im Evangelischen Geriatriezentrum Berlin für ihre verständnisvolle Unterstützung meiner Arbeit.

Abschließend möchte ich den Patienten des Evangelischen Geriatriezentrums Berlin danken, die durch ihre Bereitwilligkeit zur Teilnahme diese Arbeit überhaupt erst möglich machten.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Dr. Hella Bardella und Dipl.-Ing. Otto Bardella, ohne deren geduldige geistige und praktische Unterstützung weder mein Studium noch meine Dissertation möglich gewesen wären, gebührt mein letzter und innigster Dank.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Stefan Bardella, erkläre an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Assoziation des *Sma* I-Polymorphismus im von-Willebrand-Faktor-Gen mit ischämischen Schlaganfall“ 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.

Berlin, den 31.05.2007

Stefan Bardella