

## **4 Diskussion**

Der Schlaganfall stellt die verbreitetste lebensbedrohende neurologische Erkrankung dar und ist nach der KHK und Krebserkrankungen die dritthäufigste Todesursache in der westlichen Welt. Es handelt sich um eine Erkrankung, die enorme Ressourcen im Gesundheitswesen verbraucht und in der westlichen Welt die Hauptursache für schwere Behinderung (12, 14, 15, 17, 27) sowie die zweitwichtigste Ursache für Demenz ist (33). Die effektivste Strategie zur Bekämpfung dieser Krankheit schließt Prävention ein, zu welcher die Identifikation von Risikofaktoren und die Suche nach Personen mit hohem Schlaganfall-Risiko gehören (55).

### **4.1 Genetische Untersuchungen am Menschen**

Das Assessment der klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren erlaubt oft nicht die genaue Identifikation von Patienten, die eine beschleunigte Atherosklerose oder ein kardiovaskuläres Ereignis entwickeln. Selbst ein Teil der Patienten, deren Risikofaktoren gut eingestellt sind, die also antihypertensiv, lipidsenkend und antidiabetisch behandelt werden, nicht rauchen usw., erleidet eine Progression der Atherosklerose mit entsprechenden klinischen Manifestationen. Aus diesem Grund wird seit langem nach weiteren Risikofaktoren gesucht, die eine Identifikation solcher Risikopersonen ermöglicht. Hierzu bietet die Molekularbiologie weitreichende Möglichkeiten. Allerdings gestaltet sich die Identifikation genetischer Faktoren beim polygenetischen Schlaganfall um einiges schwieriger als eine Untersuchung zu einer monogenetischen Erkrankung mit ihrem spezifischen Vererbungsmuster. Dafür gibt es verschiedene Gründe (2, 19):

1. Spätes Auftreten: Das späte Auftreten eines Schlaganfalls erschwert genetische Vergleiche zwischen Verwandten, da die Eltern und teilweise auch Geschwister des Indexpatienten nicht selten schon verstorben sind und somit nicht mehr untersucht werden können.
2. Phänotypische Heterogenität: Die Vielfalt der Schlaganfall-Subtypen oder -Phänotypen könnte Ausdruck unterschiedlicher Ätiologien sein.
3. Genetische Heterogenität: Identische Phänotypen können Ergebnis von Mutationen in verschiedenen Genen sein.

4. Phänokopie: Obwohl sie ein prädisponierendes Allel der Eltern nicht geerbt haben, erleiden einige Individuen einen Schlaganfall, z. B. aufgrund von Umweltfaktoren.
5. Variable Penetranz: Bei einigen Individuen, die ein prädisponierendes Allel geerbt haben, kommt es nicht zur Manifestation der Krankheit. Mögliche Ursachen schließen Gendosis, Gen-Umwelt-Interaktion sowie epistatische Phänomene ein.
6. Einflussfaktoren: Das gleichzeitige Vorhandensein von Risikofaktoren, wie arterieller Hypertonie und Diabetes mellitus, kann die Bewertung von Genwirkungen erschweren.

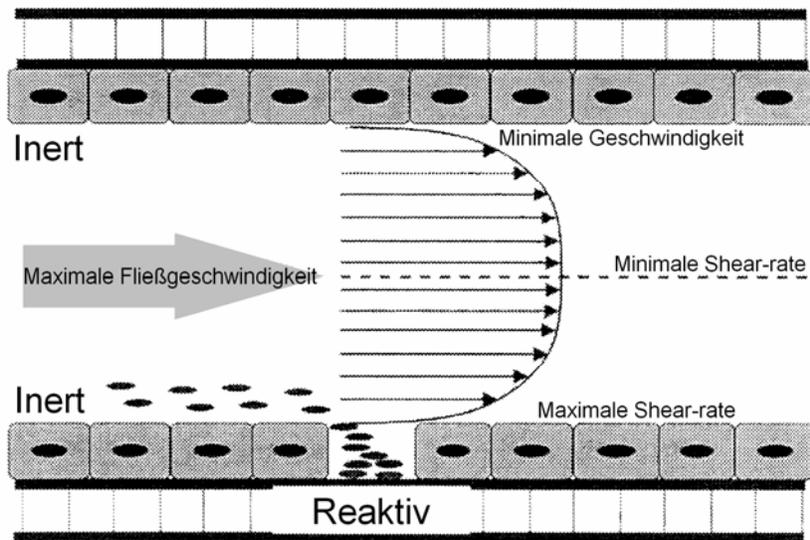
So werden zur Identifizierung verantwortlicher Gene im Wesentlichen drei Untersuchungsstrategien gebraucht: das QTL-Mapping („Quantitative Trait Locus Mapping“) bei speziellen, zu Schlaganfall neigenden Tieren, das Screening des humanen Genoms bezüglich auffälliger Gene sowie Kandidatengen-Untersuchungen bei Menschen. Die Letztgenannten stellen momentan die Hauptstütze der genetischen Schlaganfall-Studien am Menschen dar und erfordern zunächst die Identifikation einer molekularen Variante innerhalb eines funktionell relevanten Gens und dann die Bestimmung deren Rolle hinsichtlich des Schlaganfall-Risikos, indem mittels einer Fall-Kontroll- oder einer Kohortenstudie die Assoziation zum Phänotyp untersucht wird. Es gibt eine Reihe von Kandidatengenen mit möglicher Assoziation zu atherosklerotischen Erkrankungen (40). Diese Gene können z. B. über den Fettstoffwechsel, über die endotheliale Funktion, über inflammatorische Mechanismen oder das Renin-Angiotensin-System wirken. Auch für Genpolymorphismen, welche die Gerinnung, Fibrinolyse und Plättchenaggregation beeinflussen, konnte eine Assoziation zu Thrombose und/oder Atherosklerose gezeigt werden. Dies betrifft beispielsweise die Gene für Fibrinogen, Plasminogenaktivator-Inhibitor 1 (PAI-1), Faktor II, Faktor V, Glykoprotein IIIa oder Thrombomodulin (54), wobei das Atherogeneserisiko insbesondere bei gleichzeitigem Vorliegen mehrerer prokoagulatorischer Faktoren deutlich ansteigt (53). Insgesamt lassen sich die bisher untersuchten Kandidatengene in fünf Gruppen einteilen: (a) Hämostase, (b) Renin-Angiotensin-System, (c) Stickstoffmonoxid-Produktion, (d) Homocystein-Metabolismus und (e) Lipidstoffwechsel (19). Zur Hämostase-Gruppe gehört der von-Willebrand-Faktor, dessen Rolle in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde.

## 4.2 von-Willebrand-Faktor und kardiovaskuläre Erkrankungen

Der vWF übernimmt eine duale Funktion in der Hämostase, indem er einerseits in die zelluläre, andererseits in die plasmatische Gerinnung involviert ist (38, 45, 52). Im Rahmen der zellulären Gerinnung spielt der vWF eine entscheidende Rolle bei der Plättchenadhäsion und -aggregation. Die Thrombozytenadhäsion an das Subendothel ist vor allem bei hohen Scherkräften im Blutgefäß vom intakten vWF abhängig. Die Scherkräfte nehmen aufgrund unterschiedlicher Fließgeschwindigkeiten von der Gefäßmitte zum Rand hin zu (**Abbildung 11**), am größten sind sie in den kleinen Arteriolen sowie in stenotischen Gefäßen. Hier heftet sich der vWF zuerst über seine A3-Domäne (**Abbildung 4**) an Kollagen der Gefäßwand an, wodurch er immobilisiert wird. Als nächstes bindet er über seine A1-Domäne an GP Iba des GP Ib/IX/V-Komplexes der Blutplättchen. Die Aggregation der Thrombozyten erfolgt mittels GP IIb/IIIa, wobei neben dem vWF auch andere Plasmaproteine wie Fibrinogen und Fibronectin an den GP IIb/IIIa-Komplex der Plättchen binden können. Gemeinsam ist all diesen Proteinen das Tripeptid Arg-Gly-Asp (RGD-Sequenz), welches die Bindungsstelle darstellt und sich beim vWF an der Position 1.744-1.746 in der C1-Domäne findet. Voraussetzung für die Anlagerung an den GP IIa/IIIb-Komplex ist eine Stimulation der Thrombozyten, z. B. durch ADP oder Thrombin (45, 52).

In der plasmatischen Gerinnung greift der vWF am Gerinnungsfaktor VIII an. Die Bindung von vWF an Faktor VIII ist dabei essenziell für das Bestehen von Faktor VIII im Plasma, diese erfolgt über die D<sup>2</sup>-Domäne des vWF. Die Freisetzung des Faktor VIII geschieht nach Aktivierung durch Thrombin, wobei der vWF selbst nicht gespalten wird. Störungen in der Faktor VIII-Bindung gehen mit erniedrigten Faktor VIII-Konzentrationen und plasmatischen Gerinnungsstörungen einher (45, 52).

Verschiedene Studien untersuchten die Rolle des vWF bezüglich kardiovaskulärer Erkrankungen und erbrachten teilweise eine positive Assoziation, sowohl bei KHK als auch beim Schlaganfall (37). Dabei ist noch unklar, ob ein erhöhter vWF-Spiegel Ursache der kardiovaskulären Erkrankung oder lediglich ein Marker der dabei bestehenden endothelialen Dysfunktion ist. Weiterhin ist noch nicht geklärt, ob die Schnittstelle zwischen vWF und kardiovaskulären Erkrankungen die Entstehung der Plaque, die Progression der Atherosklerose oder eher die Thrombose ist, die dann das kardiovaskuläre Ereignis auslöst.



**Abbildung 11:** Flussprofil im Blutgefäß und Thrombozytenantwort auf Gefäßwandveränderungen (nach 38)

Fließgeschwindigkeit und Scherkräfte verhalten sich innerhalb des Blutgefäßes umgekehrt proportional. Somit herrschen am Gefäßrand bei minimaler Geschwindigkeit maximale Scherkräfte. Liegt eine Endothelläsion vor, kommt es dort zu einer Reaktion der Thrombozyten mit Adhäsion und Aggregation. Die Plättchenadhäsion hängt dabei in entscheidender Weise vom Vorhandensein von intaktem vWF ab.

Zusätzlich zum vWF-Spiegel wurden molekulargenetische Untersuchungen zum vWF durchgeführt. Dabei konnte eine Assoziation zwischen dem Thr789Ala-Polymorphismus im vWF-Gen sowie zwei Polymorphismen in der Promotorregion und arteriell thrombotischen Ereignissen festgestellt werden. Der Thr789Ala-Polymorphismus wurde in einer französischen Untersuchung bei 493 Typ I-Diabetikern und 359 gesunden Kontrollprobanden bestimmt. Der Polymorphismus war signifikant assoziiert sowohl mit koronarer Herzkrankheit ( $p=0,002$ ) als auch mit dem vWF-Plasmaspiegel ( $p=0,03$ ). Das maximale Risiko für Myokardinfarkt bzw. Angina pectoris hatten dabei die Ala/Ala-Homozygoten mit  $OR=4,2$  ( $p=0,0008$ ), sodass der Thr789Ala-Polymorphismus in dieser Untersuchung einen unabhängigen Risikofaktor für koronare Herzkrankheit darstellte (30). Der -1793 C/G-Polymorphismus im Promotor des vWF-Gens wurde in einer holländischen Studie untersucht. Dabei wurde für Träger des G-Allels ein erhöhtes Myokardinfarkt-Risiko festgestellt, allerdings nur für Personen mit bestehender fortgeschrittener Atherosklerose, weshalb die These aufgestellt wurde, dass die Rolle des vWF nicht in der Plaquentstehung, sondern vielmehr in der Thrombusformation bei schon bestehender Atherosklerose zu sehen wäre (32). Bezüglich des *Sma I*

Polymorphismus konnte eine starke Assoziation zum Schlaganfall, nicht jedoch zum Myokardinfarkt aufgezeigt werden, wobei allerdings kein Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus und dem vWF-Plasmaspiegel bestand. Insgesamt deutet das Ergebnis jedoch an, dass dieser Polymorphismus einen neu identifizierten Risikofaktor für akute ischämische Schlaganfälle bei Chinesen darstellt (8).

### 4.3 Fehlende Assoziation des *Sma* I-Polymorphismus mit Hirninfarkt bei Weißen

Im EGZB, einem geriatrischen Krankenhaus in Berlin, wurde Ende der 1990er und Anfang der 2000er Jahre eine Studienpopulation von 140 Patienten mit ischämischem, nicht kardiogenem Schlaganfall sowie 209 gleichaltrigen Kontrollprobanden ohne Hirninfarkt rekrutiert. Diese wurden auf den Genotyp bezüglich des *Sma* I-Polymorphismus im vWF-Gen hin untersucht und in einem Fall-Kontroll-Design verglichen. Der C/C-Genotyp dieses Polymorphismus war in einer chinesischen Fall-Kontroll-Studie bei Schlaganfall-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant gehäuft aufgetreten (OR=3,29;  $0,01 > p > 0,001$ ) (8). Da allerdings interethnische Unterschiede in den C/T-Allelfrequenzen bekannt waren (4, 34, 44, 48), konnte dieses Ergebnis nicht einfach auf eine weiße Population übertragen werden. In der Berliner Population zeigte sich, im Gegensatz zur o. g. chinesischen Untersuchung, kein signifikanter Unterschied in der Genotyp-Verteilung der Fälle und der Kontrollen (Odds Ratio für C/C-Genotyp: OR=1,14;  $p=0,56$ ). Lediglich wenn im Nachhinein ausschließlich die 102 Schlaganfall-Patienten mit nachgewiesener Atherosklerose der hirnversorgenden Arterien, das heißt doppler- oder duplexsonographisch bzw. angiographisch dokumentierte Plaques bzw. Stenosen, mit der Kontrollgruppe (n=209) verglichen wurden, zeigte sich eine Tendenz zur Häufung des C/C-Genotyps, die jedoch keine Signifikanz erreichte (OR=1,32;  $p=0,25$ ). Möglicherweise wäre hier eine deutlichere und signifikante Assoziation bei der Untersuchung größerer Fallzahlen zu ermitteln.

Auch in Subgruppenanalysen von Probanden mit einzelnen kardiovaskulären Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und Hypercholesterinämie, bestanden keine signifikanten Differenzen in der Genotyp-Verteilung. Dasselbe gilt für die ermittelten Frequenzen des C-Allels, die sich weder in der gesamten untersuchten Studienpopulation, noch in einzelnen Untergruppen (Geschlecht, kardiovaskuläre Risikofaktoren) zwischen den Schlaganfall-Patienten und den Kontrollprobanden signifikant unterschieden. Insgesamt konnte keine signifikante Assoziation des *Sma* I-Polymorphismus im vWF-Gen mit dem Auftreten von ischämischen Schlaganfällen ermittelt werden, sodass der C/C-Genotyp nicht als Risikofaktor für das Auftreten von Hirninfarkten bei Weißen bezeichnet werden kann.

#### 4.4 Unterschied zwischen chinesischer und Berliner Population

Anteil an diesem unterschiedlichen Ergebnis zwischen den beiden Populationen hat mit großer Wahrscheinlichkeit die zwischen den Ethnien differente Allelverteilung. So verhalten sich die C/T-Allelfrequenzen bei Weißen mit 0,66:0,34 (4, 44, 48) reziprok zu denen von Chinesen, welche je nach Nationalitätszugehörigkeit zwischen 0,36:0,64 und 0,43:0,57 liegen (34). Diese Frequenzen bestätigten sich in den Untersuchungen: In der Berliner Population betragen sie 0,66:0,34 für die Hirninfarkt-Patienten resp. 0,62:0,38 für die Kontrollgruppe und waren damit nicht signifikant voneinander verschieden (Odds Ratio für C-Allel-Frequenz: OR=1,21;  $p=0,41$ ). Allerdings kann allein die deutlich unterschiedliche „Normalverteilung“ der Allele zwischen verschiedenen Ethnien die Bedeutung einzelner Genotypen für die mögliche Ausbildung eines Phänotyps im Allgemeinen bzw. einer Erkrankung im Speziellen in erheblichem Maße beeinflussen. So könnte man einerseits annehmen, dass durch das insgesamt häufige Vorkommen des C-Allels bzw. des C/C-Genotyps bei Weißen die Unterschiede hinsichtlich dieses Polymorphismus zwischen einzelnen Subpopulationen kleiner werden. Andererseits könnte möglicherweise auch das häufige Auftreten des C-Allels bei Weißen mit einer generell höheren Hirninfarkt-Inzidenz bei Weißen verknüpft sein, wohingegen sich ischämische Schlaganfälle bei Chinesen, bei denen das C-Allel insgesamt eher selten vorkommt, vor allem bei C/C-Homozygoten häufen. Diese These würde durch eine höhere Schlaganfall-Inzidenz in Deutschland unterstützt, welche im Gesundheitsbericht für Deutschland mit 317 pro 100.000 Einwohner und Jahr angegeben wird (47). In China liegt die Inzidenz je nach Region bei 76 in Shanghai, 135 in Peking und 150 pro 100.000 und Jahr in Changsha in Südchina (21).

Man kann also schlussfolgern, dass der *Sma* I-Polymorphismus des vWF-Gens in der untersuchten weißen Population keine Assoziation zum Auftreten ischämischer Schlaganfälle aufzeigte, während der C/C-Genotyp dieses Polymorphismus bei Chinesen ein Risikofaktor für Hirninfarkte zu sein scheint (8). Diese unterschiedlichen Ergebnisse in den ethnisch differenten Populationen werden durch signifikant voneinander verschiedene Genotyp-Häufigkeiten zwischen den Fällen (OR=2,00;  $p=0,015$ ) und den Kontrollen (OR=5,75;  $p<0,001$ ) gestärkt.

#### 4.5 Limitationen und Ausblick

Es existieren auch Limitationen der vorliegenden Untersuchung. So wurden praktisch alle diagnostischen Untersuchungen, die insbesondere die Klassifizierung der Patienten nach der Schlaganfall-Genese betrafen, in den vorbehandelnden Kliniken durchgeführt. Lediglich die Elektrokardiographie erfolgte bei allen Patienten bei Aufnahme im EGZB, sodass zumindest Patienten mit permanentem Vorhofflimmern, was als Ausschlusskriterium galt, verlässlich identifiziert werden konnten. Wünschenswert wäre eine einheitliche Diagnostik sowohl für die Patienten als auch für die Kontrollprobanden, was jedoch im Rahmen der vorliegenden Untersuchung nicht umsetzbar war, sodass dieser Informationsfehler in Kauf genommen werden musste. Weiterhin bestanden bei einigen ausgewählten Risikofaktoren (arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie) signifikante Unterschiede zwischen den Schlaganfall-Patienten und den Kontrollprobanden, was das Ergebnis beeinflussen konnte, auch wenn innerhalb dieser Subgruppen keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich der Genotyp-Verteilung existierten. Diese Unterschiede sind als Folge des Studiendesigns zu verstehen und wären in einer Fall-Kontroll-Studie lediglich mit einem Matched Design zu vermeiden. Ein solches Design wäre jedoch mit einer verringerten Zahl von Fall- und Kontrollprobanden bzw. einer verlängerten Studiendauer verbunden und außerdem auch nicht frei von der Gefahr von Verzerrungen.

Außerdem gibt es bei der Durchführung von Kandidatengen-Studien einige methodologische Schwierigkeiten bzw. Grenzen (19). Die Probandenzahl ist relativ klein, was die Verallgemeinerungsfähigkeit der Ergebnisse limitiert. Selektionsfehler sind auch bei sorgfältiger Auswahl der Fall- und Kontroll-Probanden nicht gänzlich zu vermeiden. Nicht zuletzt spielt hier auch das krankenhausbasierte Studiendesign eine Rolle, da bei den Kontroll-Probanden zwar nicht die in Frage stehende Zielkrankheit, aber eine andere Erkrankung vorliegt. Die Kontrollen stellen also keine Stichprobe aus der Allgemeinbevölkerung dar. Um dieses Problem zu reduzieren, ist ein bevölkerungsbasierter Ansatz, bei dem andere Krankheiten in der Kontrollgruppe nur vereinzelt und zufällig auftreten, erforderlich, was jedoch einen erheblich größeren Aufwand bedeutet. Außerdem kann nicht vorhergesagt werden, ob ein Kontrollproband im weiteren Lebensverlauf einen Hirninfarkt erleidet und somit bezüglich der vorliegenden Untersuchung im Prinzip der falschen Gruppe zugeordnet wurde. Dieser mögliche Selektionsfehler ist aufgrund des Studiendesigns nicht auszuschließen, insbesondere da es sich beim Schlaganfall allgemein um eine Erkrankung mit

spätem Auftreten handelt. Der Zeitpunkt der Krankheitsmanifestation hängt außerdem nicht vom bloßen Vorhandensein eines Genotyps, sondern zusätzlich von dessen Penetranz ab, weshalb Personen, trotzdem sie dasselbe prädisponierende Allel besitzen, einen Hirninfarkt zu verschiedenen Zeitpunkten oder auch gar nicht im Laufe ihres Lebens erleiden können. Dies gilt insbesondere für multifaktorielle Erkrankungen, deren Auftreten durch weitere genetische und nichtgenetische Faktoren beeinflusst wird. Die dadurch entstehende Verzerrung der Ergebnisse könnte durch eine Kohortenstudie mit einem möglichst langen Beobachtungszeitraum reduziert werden, welche allerdings ebenfalls mit einem deutlich größeren Aufwand verbunden wäre.

Eine andere Möglichkeit der Ermittlung genetischer Risikofaktoren wäre eine Screening-Untersuchung des humanen Genoms bezüglich auffälliger Gene an erkrankten Geschwisterpaaren. Dies ist gerade bei polygenetischen Erkrankungen eine effiziente Methode, entsprechende Gen-Auffälligkeiten ausfindig zu machen, erfordert jedoch ebenso einen enormen Aufwand, da in meist multizentrischen Studien eine sehr große Anzahl von Probanden eingeschlossen werden muss.

Beim ermittelten fehlenden Zusammenhang zwischen dem *Sma* I-Polymorphismus und dem Auftreten von Schlaganfällen muss auch berücksichtigt werden, dass gerade bei multifaktoriellen, genetisch komplexen Krankheiten, zu denen der Hirninfarkt zählt, eben auch andere genetische Faktoren sowie nichtgenetische Komponenten (exogene Noxen, Zufallsfaktoren) die Manifestationswahrscheinlichkeit bestimmen. In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass der prädiktive Wert einzelner Dispositionsallele bei multifaktoriellen Erkrankungen zwar grundsätzlich als gering einzustufen ist, jedoch könnten mehrere identifizierte „Risikogene“ zur Erstellung eines genetischen Risikoprofils für multifaktorielle Krankheitsdispositionen und zur wesentlich gezielteren Prävention eingesetzt werden (3). Insgesamt ist es also durchaus sinnvoll, solche Suszeptibilitätsallele zu erforschen.