

Aus der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München
Direktor Prof. Dr. med. C. Hagl

Untersuchung potentieller genetischer
Risikovarianten der arteriellen Hypertonie im
Hinblick auf deren Auswirkung auf die koronare
Herzkrankheit

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Laura de Vries

aus
München

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Sandra Eifert

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Helmut Habazottl
Priv. Doz. Dr. Florian Krötz
Priv. Doz. Dr. Tim Strom

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Priv. Doz. Dr. Sandra Eifert

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 26.07.2012

Untersuchung potentieller genetischer Risikovarianten der arteriellen Hypertonie im Hinblick auf deren Auswirkung auf die koronare Herzkrankheit

Die koronare Herzkrankheit ist eine der multifaktoriellen Erkrankungen, die im Mittelpunkt der aktuellen Genforschung stehen. Die Weiterentwicklung der technischen Möglichkeiten hat dazu geführt, dass mittlerweile eine große Anzahl an genetischen Varianten in kurzer Zeit untersucht werden kann.

Diese Arbeit beschäftigt sich aber noch mit der Untersuchung einzelner sogenannter Kandidatengene. Wir untersuchten dabei Gene, die in Zusammenhang mit arterieller Hypertonie und damit mit der Entstehung und insbesondere auch dem Progress einer KHK stehen könnten. Für die untersuchten Polymorphismen hatten vorhergehende Studien zum Teil widersprüchliche Ergebnisse geliefert. In unserer Arbeit gingen wir speziell auch der Frage nach, ob die einzelnen Polymorphismen bei Männern und Frauen unterschiedlich häufig auftreten und vor allem unterschiedliche Auswirkungen auf die Erkrankung und ihren Progress haben. Patientinnen und Patienten der Herzchirurgischen Klinik Großhadern waren die Probanden. Die Vergleichskohorte waren Patienten des Klinikums Großhadern, die ihre Blutproben für weitere genetische Untersuchungen zur Verfügung gestellt hatten, und bei denen keine Gefäßerkrankungen bekannt waren.

Untersucht wurden die relevanten Polymorphismen des Angiotensin-converting-enzyme (ACE), des Angiotensinogen (AGT), des Angiotensin-1-Rezeptors (AT1R) und des Endothelin-converting-enzyme (ECE). Durchgeführt wurde zunächst eine Polymerasekettenreaktion und im Anschluss für die Polymorphismen des AGT, AT-1R und ECE spezifische Enzymverdau. Die einzelnen Ausprägungen wurden mittels Elektrophorese und anschließender Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht.

Die Verteilung der Genotypen zwischen Patienten und Kontrollen war nicht signifikant unterschiedlich. Auch bei genauerer Untersuchung auf Zusammenhänge bezüglich der Ausprägung des Krankheitsprogresses gab es keine signifikanten Unterschiede. Ein Ergebnis war auffallend, aber gerade nicht signifikant: Der als negativ postulierte Polymorphismus des ECE kam bei keiner einzigen der weiblichen Kontrollen, aber bei vier der Patientinnen vor. Auch wenn dieser Unterschied gerade nicht statistisch signifikant war könnte es doch ein Hinweis darauf sein, dass geschlechtsspezifische Variationen in der Verteilung der Genvarianten zu unterschiedlicher Ausprägung und Progress der koronaren Herzkrankheit führen.

Mithilfe der neuen Methoden auf dem Gebiet der Genforschung werden nun auch Zusammenhänge mit Genloci entdeckt, die zunächst nicht in eindeutiger Verbindung mit der Entstehung und dem Progress einer KHK vermutet wurden.

Laura de Vries

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Zielsetzung der Arbeit	6
1.2	Koronare Herzkrankheit	6
1.2.1	Definition	6
1.2.2	Epidemiologie	6
1.2.3	Pathophysiologie	8
1.2.4	Risikofaktoren	8
1.2.5	Pathogenetisch in Frage kommende Gene	9
1.2.6	Einteilung der KHK	10
1.2.7	Therapie der KHK	10
1.3	Arterielle Hypertonie	16
1.3.1	Definition	16
1.3.2	Pathogenese	16
1.3.3	Regulation des Blutdrucks	17
1.3.4	Bedeutung der an der Blutdruckregulation beteiligten Systeme	18
1.4	Genetische Grundbegriffe	21
1.4.1	Mutationen	21
1.4.2	Ursache von Mutationen	23
1.4.3	Polymorphismen	24
1.5	Untersuchte Varianten	24
2	Materialien und Methoden	26
2.1	Ausgewählte Patienten	26
2.1.1	Patientenkollektiv mit KHK nach bereits erfolgter Bypassoperation	26
2.1.2	Kontrollkollektiv ohne KHK	27
2.2	Methoden	27
2.2.1	DNA-Präparation	27
2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion	29
3	Ergebnisse	37
3.1	Verteilung der Genotypen	37
3.1.1	Verteilung der Genotypen im Einzelnen	37
3.1.2	Verteilung der Genotypen zusammengefasst	38
3.2	Zusammenhang zwischen Hypertonie und Genotyp	38
3.3	Zusammenhang zwischen Genotyp und Geschlecht	39
3.4	Kombination der krankheitsverursachenden Genotypen	40
3.5	Zusammenhang zwischen Genotyp, Hypertonie und klinischen Endpunkten	41
3.5.1	Variante - Hypertonie - Symptome	41
3.5.2	Genotyp - Hypertonie - PTCA	42
3.5.3	Genotyp - Hypertonie - Reoperation	43
3.6	Zusammenhang zwischen Genotyp, Hypertonie und Kombinationen der klinischen Endpunkte	45
3.6.1	ACE	45
3.6.2	AGT	46
3.6.3	AT-1R	46
3.6.4	ECE	47

INHALTSVERZEICHNIS

4	Diskussion	48
5	Ausblick	50
6	Danksagung	51

1 Einleitung

1.1 Zielsetzung der Arbeit

Die koronare Herzkrankheit ist eine der am weitesten verbreiteten Krankheiten in unseren Breitengraden. Die Folgen dieser „Volkskrankheit“ sind die als „Herzschmerzen“ bezeichnete Angina pectoris und der Herzinfarkt. Die Forschung widmet sich seit langem dieser Krankheit. Trotzdem sind immer noch viele Fragen offen. Diese Arbeit beschäftigt sich mit Patienten, die aufgrund einer ausgeprägten koronaren Herzkrankheit eine Bypass-Operation erhalten haben. Die Atherosklerose schreitet auch nach erfolgter Operation häufig fort. Nach 10 Jahren sind nur noch 60 % aller Bypässe durchgängig und nur 50 % weisen keine signifikante Stenosierung auf. Das bedeutet für viele Patienten eine erneute Intervention: entweder eine PTCA oder Stent-Implantation oder eine erneute Bypass-Operation, bei der ein erhöhtes Operationsrisiko und ein schlechteres postoperatives Outcome bestehen. Die klassischen Risikofaktoren, die die Entstehung einer Atherosklerose begünstigen, sind bereits bekannt. Ein wichtiger Risikofaktor ist die arterielle Hypertonie. Auch für die Entstehung einer arteriellen Hypertonie gibt es diverse Risikofaktoren, wie z.B. Übergewicht. Es stellt sich mit den neuen Möglichkeiten auf dem Gebiet der genetischen Diagnostik die Frage, ob es auch sogenannte „genetische Risikofaktoren“ gibt. Mittlerweile wurden in genomweiten Analysen immer neue Genloci entdeckt, für die ein Zusammenhang mit einer koronaren Herzerkrankung besteht. Der Wirkmechanismus der meisten dieser Genloci ist aber noch unklar. Diese Arbeit untersucht eine Gruppe von Genen, die möglicherweise in Zusammenhang mit der arteriellen Hypertonie stehen. Über die Beeinflussung der Blutdruckregulation könnten diese mittelbar an der Entstehung und insbesondere dem Progress einer koronaren Herzkrankheit beteiligt sein.

1.2 Koronare Herzkrankheit

1.2.1 Definition

„Die koronare Herzkrankheit (KHK) ist eine Erkrankung, bei der durch eine Arteriosklerose der Herzkranzgefäße ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffverbrauch des Herzmuskels entsteht“ [1]. Diese Minderversorgung des Herzmuskels äußert sich in einer Angina pectoris, einem Herzinfarkt oder Herzrhythmusstörungen, die zum Tode führen können. Die WHO definiert die Arterio- oder Atherosklerose folgendermaßen: „Atherosklerose ist eine variable Kombination von Veränderungen der Intima, bestehend aus einer herdförmigen Ansammlung von Fettsubstanzen, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia.“

1.2.2 Epidemiologie

In der westlichen Welt steht die KHK in der Rangliste der Todesursachen auf Platz Nummer 1 (siehe Tabelle 1). Das Statistische Bundesamt Deutschland gab in seiner Pressemitteilung vom 21. September 2006 bekannt, dass „im Jahr 2005 in Deutschland insgesamt 367 361 Personen an Krankheiten des Kreislaufsystems“ starben. Dabei spielte der Herzinfarkt eine große Rolle: „Im Berichtsjahr starben 61 056 Personen (28 083 Frauen und 32 973 Männer) an einem akuten Herzinfarkt; das waren 6,4 % aller gestorbenen Frauen und 8,5 % der verstorbenen Männer“ [2].

1 EINLEITUNG

Sterbefälle nach den 10 häufigsten Todesursachen insgesamt und nach Geschlecht 2005 ¹			
ICD-10 ² Pos. Nr.	Todesursache	Gestorbene insgesamt	
		Anzahl	Anteil in %
I25	Chronische ischämische Herzkrankheit	80 998	9,8
I21	Akuter Myokardinfarkt	61 056	7,4
I50	Herzinsuffizienz	47 939	5,8
C34	Bösartige Neubildung der Bronchien und der Lunge	40 641	4,9
I64	Schlaganfall, nicht als Blutung oder Infarkt bezeichnet	30 092	3,6
C18	Bösartige Neubildung des Dickdarmes	20 976	2,5
J44	Sonstige chronische obstruktive Lungenkrankheit	20 895	2,5
J18	Pneumonie, Erreger nicht näher bezeichnet	18 970	2,3
C50	Bösartige Neubildung der Brustdrüse (Mamma)	17 700	2,1
E14	Nicht näher bezeichneter Diabetes mellitus	16 760	2,0
ICD-10 ² Pos. Nr.	Todesursache	Gestorbene männlich	
		Anzahl	Anteil an insgesamt in %
I25	Chronische ischämische Herzkrankheit	35 017	9,0
I21	Akuter Myokardinfarkt	32 973	8,5
C34	Bösartige Neubildung der Bronchien und der Lunge	28 959	7,5
I50	Herzinsuffizienz	15 084	3,9
J44	Sonstige chronische obstruktive Lungenkrankheit	12 407	3,2
I64	Schlaganfall, nicht als Blutung oder Infarkt bezeichnet	11 203	2,9
C61	Bösartige Neubildung der Prostata	10 276	2,6
C18	Bösartige Neubildung des Dickdarmes	9 095	2,3
J18	Pneumonie, Erreger nicht näher bezeichnet	8 982	2,3
K70	Alkoholische Leberkrankheit	7 216	1,9
ICD-10 ² Pos. Nr.	Todesursache	Gestorbene weiblich	
		Anzahl	Anteil an insgesamt in %
I25	Chronische ischämische Herzkrankheit	45 981	10,4
I50	Herzinsuffizienz	32 855	7,4
I21	Akuter Myokardinfarkt	28 083	6,4
I64	Schlaganfall, nicht als Blutung oder Infarkt bezeichnet	19 816	4,5
C50	Bösartige Neubildung der Brustdrüse [Mamma]	17 455	4,0
I11	Hypertensive Herzkrankheit	12 277	2,8
C34	Bösartige Neubildung der Bronchien und der Lunge	11 881	2,7
J18	Pneumonie, Erreger nicht näher bezeichnet	11 682	2,6
C18	Bösartige Neubildung des Dickdarmes	9 988	2,3
E14	Nicht näher bezeichneter Diabetes mellitus	9 815	2,2
¹ Ohne Totgeborene und ohne gerichtliche Todeserklärungen.			
² Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme (10. Revision)			

Tabelle 1: Sterbefälle nach den 10 häufigsten Todesursachen

1 EINLEITUNG

Das Risiko, an einer KHK zu erkranken, steigt für Männer ab dem 45., für Frauen ab dem 60. Lebensjahr deutlich an. Das Verhältnis erkrankter Männer zu erkrankten Frauen beträgt 2:1. Äußert sich die KHK in einem Herzinfarkt, liegt die Letalität bei 40–50 %.

1.2.3 Pathophysiologie

Die Atherosklerose beginnt mit einer Dysfunktion des Gefäßendothels. Diese kann mechanisch durch Scherkräfte verursacht sein, die vor allem an Bifurkationen oder Gefäßabgängen auftreten. Dazu kommen verschiedene biochemische Schädigungen, im Besonderen kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Rauchen, Diabetes und Hyperlipoproteinämie. Das gesunde Endothel wirkt als Schranke zwischen dem Blutfluss und der Gefäßwand. Außerdem reguliert es den Gefäßtonus und hat antithrombotische Eigenschaften, das heißt es inhibiert die Plättchenaggregation und die Gerinnung, um eine Gerinnselbildung des Blutes zu verhindern. An geschädigten Abschnitten wird das Endothel „klebrig“ und es lagern sich Monozyten ab. Zudem wird es durchlässig für die im Blut zirkulierenden Lipoproteine. Diese ersten Läsionen werden als “fatty streaks” bezeichnet. Sie enthalten Monozyten und T-Lymphozyten sowie oxidierte Lipoproteine. Die Monozyten wandeln sich in Makrophagen um, die das umgebende oxidierte Lipoprotein aufnehmen. Sie werden als Schaumzellen bezeichnet. Durch die

Grad	Prozent verschlossen	Bemerkungen
I	25-49 %	
II	50-74 %	Signifikante Stenose
III	75-99 %	Kritische Stenose
IV	100 %	Kompletter Verschluss

Tabelle 2: Einteilung Koronarstenosen

Entzündung werden glatte Muskelzellen dazu angeregt, in die Intima einzuwandern. Sie verlieren ihre Kontraktilität und werden fibrös. Bis hier kann man den Prozess noch als Wundheilung ansehen, die Läsion ist noch nicht schädlich. Da die Schädigung des Endothels bei der Entstehung der Atherosklerose aber kein einmaliges Ereignis, sondern ein chronischer Zustand ist, hält die Entzündung im betreffenden Bereich an. So kommt es zur Entstehung eines arteriellen Plaques. Er besteht aus einem Lipid-Kern, Kollagen und elastischem Gewebe und wird von einer fibrösen „Kappe“ bedeckt [3]. Die Plaques kalzifizieren und exulzieren. Das Lumen des Gefäßes wird dadurch eingeengt. Außerdem verliert die Gefäßwand an der betroffenen Stelle ihre Elastizität und wird starr. Dadurch kann es in den angrenzenden Gebieten zu weiteren kleinen Einrissen kommen. Die Arteriosklerose schreitet fort. Ab einer Gefäßeinengung von 75 % kommt es zu einer relevanten Minderdurchblutung des Herzmuskels bei Belastung. Schreitet die Einengung weiter fort, wird der Herzmuskel auch schon in Ruhe zu wenig durchblutet.

1.2.4 Risikofaktoren

Die Anzahl sowie die Ausprägung der folgenden Faktoren beeinflussen das Risiko, an einer KHK zu erkranken. Man unterscheidet Risikofaktoren erster und zweiter Ordnung:

1 EINLEITUNG

Risikofaktoren erster Ordnung:

- Nikotinabusus: Langjähriger Nikotinabusus führt zu einer Versteifung der Gefäßwände und fördert die Entstehung einer Arteriosklerose.
- Hyperlipoproteinämie: Durch erhöhte Spiegel an Blutfetten wird die Entstehung der Atherosklerose begünstigt. Eine wichtige Rolle spielt vor allem das Verhältnis von LDL und HDL: hohe HDL-Spiegel wirken protektiv, hohe LDL-Spiegel haben eine negative Auswirkung.
- Diabetes mellitus: Eine diffuse Gefäßverkalkung ist eine Spätfolge des Diabetes, die man mit großer Häufigkeit antrifft. Sie betrifft alle arteriellen Gefäße des Kreislaufsystems; ihre Manifestationsformen sind unter anderem die KHK und die periphere arterielle Verschlusskrankheit (PAVK).
- Arterielle Hypertonie: Auf die Mechanismen, durch die die Hypertonie zu einer Atherosklerose führt, wird im Folgenden noch ausführlich eingegangen.

Risikofaktoren zweiter Ordnung:

- familiäre Disposition: Bei vielen Patienten mit KHK lässt sich anamnestisch eine familiäre Häufung von Angina pectoris und Myokardinfarkt erfragen.
- Männliches Geschlecht: Männer sind von der KHK häufiger betroffen als Frauen (2:1).
- Alter: Mit steigendem Alter kommt es in zunehmendem Maße zu einer Verkalkung der Koronargefäße. Gefördert wird dieser Prozess u.a. durch Nikotinabusus, Hyperlipidämie und mangelnde körperliche Aktivität.

Die familiäre Disposition spielt bei der koronaren Herzkrankheit eine wichtige Rolle. Der Anteil der Erbllichkeit wird auf 40-60 % geschätzt. An der Arteriosklerose sind, wie oben bereits geschildert, verschiedene Organe, Zelltypen und physiologische Vorgänge beteiligt. Ebenso komplex ist die genetische Basis. Es ist in der Regel nicht davon auszugehen, dass ein einzelnes Gen die Krankheit hervorruft. Eher handelt es sich um ein Zusammenspiel mehrerer Genmutationen, die jeweils nur eine geringe Auswirkung haben; zudem wird ihre phänotypische Penetranz noch von Umweltfaktoren beeinflusst [4].

1.2.5 Pathogenetisch in Frage kommende Gene

Bei der Identifizierung von Risiko-Genen stellt sich die Frage, welche Gene eine Rolle bei der Entstehung der KHK spielen könnten. In Experimenten mit transgenen Mäusen wurden mehr als hundert solcher Gene entdeckt [4]. Diese Arbeit beschäftigt sich mit einer Auswahl von Genen, die für die Blutdruckregulierung von Bedeutung sind. Da aber nicht nur der Blutdruck eine Rolle bei der Pathogenese der Atherosklerose spielt, wird im Folgenden ein Überblick über weitere in Frage kommende Gene gegeben.

Fettstoffwechsel Relativ ausführlich wurden bereits die Gene untersucht, die mit dem Fettstoffwechsel im Zusammenhang stehen. Von Atherosklerose besonders betroffen sind z.B. Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie. Bei dieser Erkrankung ist infolge von Mutationen die Fähigkeit des LDL-Rezeptors beeinträchtigt, das Andocken, die Aufnahme in die Zelle und den Abbau der LDL zu vermitteln [5]. Folge ist ein erhöhter LDL-Spiegel, insbesondere bei Individuen die für die Mutation heterozygot oder homozygot sind. Allerdings ist die Penetranz der KHK bei Personen mit familiärer Hypercholesterinämie abhängig von Genen mit modifizierendem Einfluss,

1 EINLEITUNG

der individuellen Lebensführung und Umweltfaktoren, die auch das KHK-Risiko bei Nicht-Trägern beeinflussen [6]. Neben dieser ausgeprägten Störung des Lipidstoffwechsels gibt es noch viele weitere Ansatzpunkte, an denen Genmutationen die Lipidspiegel im Blutkreislauf beeinflussen können.

Ebenfalls von Interesse sind die Gene, die eine Rolle beim sogenannten „Metabolischen Syndrom“ spielen. Das Metabolische Syndrom ist gekennzeichnet durch Insulinresistenz, Hypertriglyzeridämie, niedriges HDL, kleine dichte LDL, viszerale Adipositas und einen systemischen proinflammatorischen Zustand. Es ist prädisponierend für KHK und Diabetes mellitus Typ 2 [14]. Wie bei der Atherosklerose handelt es sich auch beim Metabolischen Syndrom um ein komplexes Krankheitsbild, zu dem genetische Einflüsse wie auch Umweltbedingungen beitragen. Eine wichtige Rolle spielt der „nuclear receptor peroxisome proliferator-activator receptor-gamma“ (PPAR-gamma). PPAR-gamma-Agonisten können einige der Symptome des Metabolischen Syndroms beseitigen [15]. Auch Mutationen der Lipoproteinlipase (LPL) tragen möglicherweise zum metabolischen Syndrom bei. LPL kommt auf der Oberfläche von Kapillar-Endothelzellen vor und hydrolysiert Triglyzeride in Chylomikronen und VLDL; dabei werden Fettsäuren zur Aufnahme in das periphere Gewebe frei [16].

Entzündung Wie aus der Pathophysiologie der Atherosklerose hervorgeht, spielt die Entzündung im Bereich der Läsion eine wichtige Rolle. In wieweit ist aber eine genetisch bedingte Entzündungsneigung prädisponierend für Atherosklerose? Bereits untersucht wurde ein Polymorphismus des 5-Lipoxygenase-Gens. Das Enzym spielt eine Rolle bei der Bildung von Leukotrienen und wirkt somit pro-entzündlich. Zwei Promotor-Polymorphismen des Gens waren mit erhöhter Media-Dicke und einer stärkeren Ausprägung von systemischer Entzündung assoziiert. Letzteres wurde mittels „high-sensitivity“CRP gemessen [22]. In einem Experiment wiesen Mäuse, denen das LDL-Rezeptor-Gen vollständig und außerdem eine Kopie des Lipoxygenase-Gens fehlte, deutlich weniger Plaque-Bildung auf als normale Mäuse [23]. Dieses Ergebnis konnte in einer weiteren Studie jedoch nicht repliziert werden [24]. Die aktuellen genomweiten Studien zeigen, dass die koronare Herzkrankheit noch über etliche weitere, bisher noch nicht erschlossene Mechanismen beeinflusst wird.

1.2.6 Einteilung der KHK

Das Leitsymptom der KHK ist die Angina pectoris. Sie äußert sich mit retrosternalen Schmerzen oder Druckgefühl, oft mit Ausstrahlung in den linken Arm oder die Schulter. Man unterscheidet eine belastungsabhängige Angina pectoris von einer Ruhe-Angina. Die belastungsabhängige Angina tritt bei körperlicher oder seelischer Belastung auf. Sie verschwindet nach 10 bis 15 Minuten bzw. kurz nach dem Ende der auslösenden Belastung. Die Ruheangina tritt unabhängig von Belastung auf. In der Regel empfindet der Patient in Schüben retrosternale Schmerzen, die auch in Ruhe auftreten. Eine besondere Form ist die Kälte-Angina, die vor allem bei Kälteexposition auftritt.

1.2.7 Therapie der KHK

Medikamentöse Therapie der KHK Um die Entstehung von weiteren atherosklerotischen Plaques zu verhindern, erhalten die Patienten eine Therapie mit Antikoagulantien. Als Mittel der Wahl gilt hier die Acetylsalicylsäure. Sie hemmt die

1 EINLEITUNG

thrombozytäre Cyclooxygenase und verhindert damit eine Aggregation der Thrombozyten. Nach einem Herzinfarkt senkt die Verwendung von Acetylsalicylsäure die Mortalität der KHK erheblich [1]. Des Weiteren stehen verschiedene Substanzen zur antianginösen Therapie zur Verfügung:

a) Betablocker: Der Wirkmechanismus besteht in einer kompetitiven Hemmung endo- oder exogener adrenerger Substanzen an den Betarezeptoren. Sie wirken:

- negativ inotrop (Abnahme der Myokardkontraktilität)
- negativ chronotrop (Abnahme der Herzfrequenz)
- negativ dromotrop (Verzögern der Erregungsleitung)
- und vermindern die Automatie.

Dadurch werden Herzfrequenz, Blutdruck und die Auswurfleistung des Herzens gesenkt und der Sauerstoffverbrauch des Myokards verringert. Die Wirksamkeit der Betablocker ist umso ausgeprägter, je höher der Sympathikotonus des Patienten ist. Besonders effektiv sind sie also bei körperlicher und psychischer Belastung. Betablocker wirken allerdings nicht ausschließlich auf das Herz. Sie wirken auch auf die Betarezeptoren der Bronchien und führen zu einer Bronchokonstriktion. Zudem blockieren sie die Lipolyse im Fettgewebe und die Glykogenolyse im Skelettmuskel. Auch hemmen sie die Dilatation der glatten Muskulatur und bedingen eine Erhöhung des Gefäßtonus. Außerdem führen sie über eine herabgesetzte Renin-Freisetzung zu einer verminderten Nierenperfusion und verringern die Insulinsekretion der Bauchspeicheldrüse. Beta1-selektive Betablocker sind kardioselektiv, haben also eine gesteigerte Affinität zu Beta1-Rezeptoren am Herzmuskel. Das führt zu geringeren extrakardialen Nebenwirkungen. Vor allem treten seltener obstruktive Ventilationsstörungen auf und der Glucosestoffwechsel wird weniger beeinflusst. Das Risiko peripherer Durchblutungsstörungen wird vermindert. Allerdings lässt die Rezeptorselektivität mit steigender Dosis nach. Cave: Rebound-Effekt: Nach plötzlichem Absetzen einer längeren Betablocker-Therapie kann eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber Betamimetika bestehen. Ursache ist die Erhöhung der Betarezeptor-Dichte unter Betablocker-Therapie. Der Rebound-Effekt äußert sich mit Unruhe, Schweißausbrüchen, Blutdruckanstieg, Tachyarrhythmien und Angina pectoris bis hin zum Herzinfarkt. Aus diesem Grund sollte die Betablocker-Gabe bei Beendigung der Therapie ausgeschlichen und nicht abrupt abgesetzt werden. Im akuten Rebound werden Betablocker gegeben. Kontraindiziert sind Betablocker bei:

- Bradykardie ($<50/\text{min}$)
- manifeste/dekompensierte Herzinsuffizienz, akute Herzinsuffizienz
- AV-Block über Grad 2
- obstruktive Atemwegserkrankungen
- Schocksymptomatik oder metabolische Azidose (Bedarfstachykardie!)
- Phäochromozytom vor Gabe von Alpha-Rezeptoren-Blockern (Gefahr hypertensiver Krisen)
- vasospastische Angina pectoris.

Relative Kontraindikationen bestehen bei Diabetes mellitus, peripheren Durchblutungsstörungen, Hypothyreose und Schwangerschaft oder Stillzeit. Betablocker führen zu einer Besserung der Symptomatik und verbessern außerdem die Prognose bei KHK.

b) Nitrate: Vom unverletzten Gefäßendothel wird Stickstoffmonoxid (NO) freigesetzt. Es führt zu einer Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur, vor allem in den

1 EINLEITUNG

großen Koronararterien und im venösen System, und hemmt die Thrombozytenaggregation. Ist das Endothel wie bei der Arteriosklerose verletzt, wird an dieser Stelle kein NO mehr freigesetzt, während aber "Gegenspieler" des NO wie Acetylcholin, Serotonin oder Histamin weiterhin vasokonstriktorisch und aggregationsfördernd wirken. Um der Verengung des betroffenen Gefäßes entgegenzuwirken, kann man NO exogen zuführen. Dieses aktiviert die Guanylatecyclase. Dadurch kommt es zur Bildung von GMP, einem "second messenger", der zur Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur und damit zur Vasodilatation führt.

Es gibt zwei verschiedene Arten des Zuführens von NO:

1. Organische Nitrate: Dabei handelt es sich um sogenannte "Prodrugs", die erst nach Verstoffwechslung NO freisetzen. Dazu müssen entweder SH-Donatoren anwesend sein, oder sie werden enzymatisch verstoffwechselt.
2. Molsidomin: Sein aktiver Metabolit SIN 1 und Natriumnitroprussid setzen NO direkt frei.

Ein wichtiger Aspekt ist die Nitrattoleranz. Wird kontinuierlich Nitrat zugeführt, verliert es an Wirkung. Vermutlich liegt das an einer beschleunigten Inaktivierung des NO durch reaktive Sauerstoffspezies, die durch eine beteiligte Oxygenase gebildet werden. Die Toleranz entwickelt sich innerhalb von 24 bis 48 Stunden bei kontinuierlicher Zufuhr. Um dies zu verhindern, ist ein nitratfreies Intervall vonnöten. Man verabreicht Nitrat in Retardform morgens und mittags, so dass die Nacht nitratfrei ist. Bei Molsidomin ist dies nicht der Fall, da es NO spontan freisetzt und es so nicht zur Erschöpfung eines Stoffwechselweges und damit zur Toleranzentwicklung kommt. Wirkung der Nitrate:

- Dilatation der glatten Muskulatur
- Senkung der Vorlast (durch venöse Dilatation)
- Senken der Nachlast durch art. Vasodilatation in höheren Dosen
- Verstärkung der regionalen Myokardperfusion, v.a. subendokardial
- Thrombozyten-Aggregationshemmung
- Bronchodilatation
- Schmerzlinderung bei Koliken, aber nur kurzfristig.

Die Vasodilatation und die Thrombozyten-Aggregationshemmung sind besonders deutlich in Gefäßabschnitten, die funktionell gestört sind. Kontraindiziert sind Nitrate bei ausgeprägten hypotonen Kreislaufzuständen und bei stenosierenden Herzvitien, da dabei die Gefahr der Dekompensation besteht. Bei Verwendung weiterer blutdrucksenkender Substanzen kann es zu einer additiven Blutdrucksenkung kommen. Das ist auch der Fall bei gleichzeitiger Gabe von Phosphodiesterase-Hemmern, wie z.B. Sildenafil. Dihydroergotamin hingegen steigert den Blutdruck. Speziell Glycerolnitrat i.v. schwächt die Wirkung von Heparin ab. Wirkung von Molsidomin:

- Verringerung der Vorlast
- stärkeres venöses "pooling" als bei Nitraten
- geringere Senkung der Nachlast
- Zunahme der regionalen Myokarddurchblutung, v.a. subendokardial
- Thrombozyten-Aggregationshemmung.

1 EINLEITUNG

Die Nebenwirkungen von Molsidomin sind die gleichen wie die der Nitrate. Als zusätzliche Kontraindikation kommt eine Schwangerschaft hinzu, da eine teratogene Wirkung von Molsidomin nicht ausgeschlossen werden kann. Im Gegensatz zu Betablockern verbessern Nitrate nur die Symptomatik der KHK, haben aber keine Auswirkung auf die Prognose.

c) Calciumantagonisten: Im menschlichen Organismus werden zwei Arten von Calciumkanälen unterschieden: solche, die sich spannungsabhängig öffnen oder schließen, und solche, die dies rezeptorabhängig tun. Von den spannungsabhängigen Kanälen sind vier Subtypen bekannt: L-, N-, P- und T- Kanäle. Die üblichen Calciumantagonisten blockieren die Kanäle vom L-Typ. Die Wirkung der Calciumkanäle besteht darin, die Calciumkonzentration in der Zelle zu erhöhen; das führt zu einer gesteigerten Kontraktilität kardialer und vaskulärer glatter Muskelzellen. Die Calciumantagonisten verhindern den Calciumeinstrom und bewirken damit:

- eine Dilatation der epikardialen Koronarien
- eine "afterload" und auch in geringerem Maße eine "preload"-Senkung (durch Dilatation der Widerstandgefäße)
- eine reduzierte Kontraktilität des Myokards (negativ inotrop)
- eine Senkung des myokardialen Sauerstoffverbrauches
- eine verlangsamte AP-Bildung im Sinusknoten (negativ chronotrop)
- eine verlangsamte Überleitung im AV-Knoten (negativ dromotrop).

Außerdem wirken Dihydropyridine natriuretisch.

Calciumantagonisten eignen sich durch ihre epikardiale Vasodilatation auch zur Therapie der vasospastischen Angina pectoris. Es gibt verschiedene Calciumantagonisten auf dem Markt, die sich bezüglich ihrer Wirkungen unterscheiden:

- Nifedipin-Typ: Wirkungsschwerpunkt glatte Gefäßmuskulatur
- Diltiazem-Typ: wirkt an der glatten Gefäßmuskulatur, dem Myokard, auf die Erregungsbildung und -überleitung
- Verapamil-Typ: wirkt v.a. auf Myokard, Erregungsbildung und -überleitung.

Nifedipin ist das Mittel der Wahl bei der hypertensiven Krise. Es wird dann sublingual oder als Beißkapsel gegeben. Bei der i.v. Gabe muss es lichtgeschützt appliziert werden, da Nifedipin unter UV-Licht zerfällt. Verapamil wird häufig als Antiarrhythmikum verwendet, vor allem bei supraventrikulären Tachyarrhythmien. Außerdem findet es seine Anwendung in der antianginösen und antihypertensiven Therapie, v.a. im angloamerikanischen Raum. Diltiazem ist zwischen Nifedipin und Verapamil angeordnet: Es führt zu einer geringeren Vasodilatation als Nifedipin und hat eine geringere kardiodepressive Wirkung als Verapamil. Kontraindikationen für Nifedipin:

- Herzinsuffizienz
- instabile Angina pectoris
- schwere stenosierende Herzvitien, hypertrophe obstruktive Kardiomyopathie (HOCM) (verminderte Koronarperfusion durch Blutdruckabfall)
- schwere Hypotension
- Schwangerschaft (teratogen).

1 EINLEITUNG

Kontraindikationen für Verapamil und Diltiazem:

Im Gegensatz zu Nifedipin ist Verapamil bei hypertropher obstruktiver Kardiomyopathie (HOCM) indiziert, da es durch seine negativ inotrope Wirkung zu einer ökonomischeren Herzarbeit führt.

- dekompensierte Herzinsuffizienz
- AV-Block höher als Grad 1
- Sick-Sinus-Syndrom
- nicht-arrhythmiebedingter kardiogener Schock
- Vorhofflimmern/-flattern mit Präexzitationssyndrom
- Kombination mit Betablockern.

Abhängig vom ausgewählten Calciumantagonisten müssen auch unterschiedliche Interaktionen mit anderen Medikamenten beachtet werden:

Nifedipin:

- Antihypertensiva und Narkotika: additive Blutdrucksenkung
- Chinidin: Verringerung des Chinidin-Spiegels
- Digoxin, Theophyllin: Gesteigerter Plasmaspiegel dieser Substanzen durch CYP-3A4-Inhibierung
- NSAID: verminderte Blutdrucksenkung (Hemmung der Prostaglandinsynthese, Natrium- und Wasserretention).

Verapamil und Diltiazem

- Antiarrhythmika, Inhalationsanästhetika: Bradykardie, AV-Block, Kardiodepression
- Antihypertensiva, Narkotika: additive Blutdrucksenkung
- Carbamazepin, Cyclosporin, Digitalis, Theophyllin: Plasmaspiegelerhöhung dieser Substanzen (s.o.)
- CYP-3A4-Inhibitoren: Abbau der Calciumantagonisten gehemmt; Plasmaspiegelerhöhung
- NSAID: verminderte Blutdrucksenkung (s.o.)
- Lithium: erhöhte Neurotoxizität, ggfs. Lithiumspiegelverminderung
- Muskelrelaxantien: verstärkte Muskelrelaxation.

Weitere Ziele in der Therapie der KHK sind das Verringern bzw. das Ausschalten der vorhandenen Risikofaktoren. Das bedeutet für den Patienten das Beenden eines eventuell bestehenden Nikotinkonsums und eine Gewichtsreduktion mit Hilfe einer möglichst fettarmen Ernährung und ausreichender Bewegung. Außerdem sollte der Patient Stress vermeiden. Des weiteren müssen die Hyperlipoproteinämie, der Blutdruck und ggf. ein bestehender Diabetes mellitus medikamentös behandelt werden. Ziel sind dabei dem Risikoprofil des Patienten entsprechende Laborwerte.

Interventionelle Therapie der KHK

1.PTCA: Bei der perkutanen transluminalen Coronarangioplastie wird eine Koronarstenose mittels eines Ballonkatheters aufgeweitet. In die Arteria femoralis wird ein Führungsdraht bis hinauf in das Ostium der Herzkranzgefäße eingeführt. Dann wird ein Katheter, an dessen Spitze sich ein Ballon befindet, in das betreffende Gefäß eingeführt. An der verengten Stelle wird der Ballon mit 6-10 Atmosphären aufgeblasen und für 30-120 Sekunden belassen. Diese Methode wird bei hämodynamisch signifikanten Stenosen über 75 % angewendet. Sie eignet sich nicht, wenn der Hauptstamm betroffen ist. Es können mit dieser Methode auch Rekanalisationen nach dem Verschluss einer Koronararterie durchgeführt werden. Die Erfolgsquote liegt bei 90 % für Stenosen und ca. 50 % für Rekanalisationen. Die Restenoserate innerhalb von 6 Monaten beträgt bei einer PTCA 30-40 %.

2. Stentimplantation: Bei ca. 80 % der PTCA's wird gleichzeitig eine Stentimplantation durchgeführt.[28] [29] Der Ballonkatheter wird wie oben beschrieben eingeführt. Nach der Aufdehnung wird in das Gefäß ein Drahtgitternetz eingepasst. So wird das Gefäß offengehalten. Mit diesem Eingriff kann auch eine eventuelle Gefäßdissektion verhindert werden. Der primäre Erfolg der Stentimplantation liegt bei über 95 %. Die Restenoserate ist mit 20-30% niedriger als bei einer alleinigen PTCA. Grund für die Rezidivstenosen ist in bis zu 50 % der Fälle eine Hyperplasie der Neointima. Bei 10 bis 30 % wird ein erneuter Eingriff notwendig. [30] [31] Eine vielversprechende Gegenmaßnahme ist die Verwendung antiproliferativ oder immunsuppressiv beschichteter Stents. Sie geben über einen längeren Zeitraum hinweg Substanzen ab, die die Hyperplasie der Neointima verhindern. In mehreren Studien ergab sich keine höhere Komplikationsrate als bei herkömmlicher Stentimplantation. Im Gegenteil zeigten sich sogar deutliche initiale Vorteile der beschichteten gegenüber den herkömmlichen Stents. Zur Zeit in der klinischen Anwendung sind die Stents Cypher der Firma Cordis/JJ, ein mit dem Immunsuppressivum Sirolimus beschichteter Stent, und Taxus der Firma Boston Scientific, der mit dem Zytostatikum Paclitaxel beschichtet ist. Als Indikationen für diese Stents ergaben sich:

- Diabetes mellitus
- stabile/instabile Angina pectoris
- ischämie-induzierende de-novo-Stenosen (<100 % Diameterstenose)

Des Weiteren wird differenziert in Gefäße mit Diameter 2,5-3,5 mm, Stenosenlänge <15-30 mm für Cypher bzw. Diameter 2,5-3,75 mm, Stenosenlänge 10-28 mm für Taxus. [32] Nach der Stentimplantation müssen die Patienten für einen längeren Zeitraum thrombozytenaggregationshemmenden Substanzen einnehmen. Es werden Kombinationen aus ASS (100-375 mg/d) und Clopidogrel (75 mg/d) oder Ticlopidin (2 x 250 mg/d) angewendet. In den Studien zum Cypher-Stent wurden sie 2-3 Monate, in den Studien zu Taxus 6 Monate verabreicht.[33] Danach wurde auf eine Monotherapie mit ASS umgestellt.

3. Aortokoronare Bypass-Operation: Ziel ist hier die Überbrückung der Stenose. René Favoloro entwickelte 1967 an der Herzchirurgie der Cleveland Clinic eine Methode, durch Venenbypässe verschlossene Koronararterien zu überbrücken. Es wird damit eine Verbindung zwischen der Aorta und dem Gefäß distal der Stenose geschaffen. Man verwendet dazu eine Vene (v.a. Abschnitte der Vena saphena magna), oder

1 EINLEITUNG

auch Arterien, in der Regel die Arteria thoracica interna (ITA). Vorteil der ITA ist, dass sie als Arterie durch die andere Wandbeschaffenheit dem Blutdruck in den Koronargefäßen besser standhält und eine längere Lebensdauer hat als ein venöser Bypass. Bypässe mit einer IMA bleiben Studien zufolge länger offen und wirken sich somit positiv auf das Outcome der Patienten aus. Angewendet wird die Bypassoperation bei Patienten mit einer Hauptstammstenose oder einer schweren koronaren 3-Gefäß-Erkrankung. Mittlerweile werden in Deutschland jedes Jahr ca. 70 000 Bypassoperationen durchgeführt. Die Bypassoperation gehört damit zu den häufigsten Eingriffen. In ca. 7 bis 10 % werden diese Operationen am schlagenden Herzen durchgeführt.

Nach einer medianen Sternotomie wird das Herz über die Aorta ascendens und den rechten Vorhof an die Herz-Lungen-Maschine angeschlossen. Während der Zeit, in der die Aorta abgeklemmt ist, wird das Herz auf 28 bis 32°C abgekühlt (Hypothermie) und zum Stillstand gebracht (Kardioplegie). Der Körper wird in dieser Zeit über die extrakorporale Zirkulation durch die Herz-Lungen-Maschine versorgt. Für das Konduit wird entweder eine Vene (meist die Vena saphena magna), oder eine Arterie (meistens die Arteria mammaria interna (IMA)) verwendet. Die IMA wird häufig mit der left anterior descending artery (LAD) verbunden. Die betroffene Koronararterie wird längs eröffnet und die Gefäßanastomose wird Seit-zu-Seit oder End-zu-Seit angenäht; anschließend wird sie mit der Aorta verbunden. Nach vollendeter Anastomosierung wird der Blutfluss wieder durch das Herz geleitet.

1.3 Arterielle Hypertonie

1.3.1 Definition

Die WHO definiert die arterielle Hypertonie mittlerweile nicht mehr mit starren Richtwerten. Die neue Einteilung respektiert den Umstand, dass das kardiovaskuläre Risiko bereits bei einem Blutdruck zunimmt, der eigentlich noch im hochnormalen Bereich liegt. (siehe Tabelle 3)

Kategorie	systolisch (mmHg)	diastolisch (mmHg)
optimal	< 120	< 80
normal	120 – 129	80 – 84
hochnormal	130 – 139	85 – 89
Grad-1-Hypertonie	140 – 159	90 – 99
Grad-2-Hypertonie	160 – 179	100 – 109
Grad-3-Hypertonie	> 180	> 110
Isolierte systolische Hypertonie	> 140	< 90

Tabelle 3: Definition der Hypertonie laut WHO

1.3.2 Pathogenese

Bei ca. 5-10 % der Erkrankten handelt es sich um eine sekundäre Hypertonie. Das bedeutet, dass der Blutdruck aufgrund einer anderen Erkrankung erhöht ist. Als Ursache kommen Perfusionsstörungen der Niere in Frage wie z.B. eine Aortenisthmusstenose oder eine Nierenarterienstenose. Außerdem können endokrine Ursachen zu einem erhöhten Blutdruck führen, wie z.B. ein Phäochromozytom, eine Hyperthyreose, ein

1 EINLEITUNG

Cushing-Syndrom oder der primäre Hyperaldosteronismus. Des Weiteren gibt es Medikamente, die den Blutdruck steigern: Sympathomimetika, Ovulationshemmer, Antirheumatika. In ca. 90 % der Fälle aber handelt es sich um eine essentielle Hypertonie, für den erhöhten Blutdruck kann keine Ursache gefunden werden. Zur Entstehung einer essentiellen Hypertonie können verschieden äußere Faktoren beitragen (s.u.). Speziell in der Gruppe der Patienten mit einer essentiellen Hypertonie ist die mögliche genetische Prädisposition von Interesse. Bei ca. 50-60 % dieser Hypertoniker gibt es einen Anhaltspunkt für eine genetische Hochdruckgenese.

Folgende Risikofaktoren tragen bei genetischer Disposition zur Entstehung einer arteriellen Hypertonie bei:

- hoher Kochsalzverzehr
- Adipositas
- Regelmäßiger Alkoholkonsum
- Nikotinabusus
- Stress
- Diabetes mellitus

Ein Mechanismus ist eine gestörte renale Natrium-Exkretion: Es kommt zu einer Zunahme des intravasalen Blutvolumens. Als Gegenmaßnahme wird vermehrt natriuretischer Faktor gebildet, der die Natrium-Kalium-ATPase im Tubulus und in der glatten Muskulatur der Widerstandsgefäße der Niere hemmt. Damit steigt die renale Natrium-Exkretion wieder und somit die Wasserausscheidung. Es erhöhen sich aber auch die Natrium- und die Calcium-Konzentration in den Widerstandsgefäßen, was zu einer Tonzunahme der glatten Gefäßmuskulatur führt. Dadurch steigt der arterielle Blutdruck.

1.3.3 Regulation des Blutdrucks

Kurzfristig wird der Blutdruck über sinoaortale Pressorezeptoren reguliert. Sie werden durch Gefäßdehnung erregt. Es liegt eine gewisse Grundaktivität vor. Davon ausgehend registrieren die Rezeptoren einen Abfall oder Anstieg der Gefäßdehnung und steigern bzw. hemmen dementsprechend den Sympathikotonus. Ziel ist die Dämpfung von Spontanschwankungen des Blutdrucks. Längerfristig ist aber auch eine Verstellung des Regelniveaus möglich, so dass die Rezeptoren z.B. einen eigentlich erhöhten Blutdruck als normal registrieren.

Mittelfristig wird der Blutdruck über das Renin-Angiotensin-System geregelt, auf das unten noch näher eingegangen wird.

Die langfristige Blutdruckregulation erfolgt über eine Regulation des Salz-Wasser-Haushaltes des Körpers, über Nierenfunktion, Druckdiurese, Antidiuretisches Hormon und Aldosteron. Nimmt der periphere Druck zu, steigt der Blutdruck an. Das venöse Angebot nimmt ab, weil es durch die Druckdiurese zu einer erhöhten Flüssigkeitsausscheidung kommt. Dadurch nimmt das Herzzeitvolumen (HZV) ab, der Blutdruck sinkt wieder. Nimmt der periphere Druck ab, fällt auch der Blutdruck. Es kommt zu einer Volumenretention durch Ausschüttung von ADH, das Blutvolumen steigt an, ebenso das HZV. Der Blutdruck normalisiert sich wieder. Im Folgenden wird ein Überblick über verschiedene Systeme gegeben, die zur Blutdruckregulation beitragen. Die Unterteilung dient aber nur der Vereinfachung, denn die Systeme wirken nicht isoliert, sondern greifen ineinander und beeinflussen so den Blutdruck.

1 EINLEITUNG

1.3.4 Bedeutung der an der Blutdruckregulation beteiligten Systeme

Das Renin–Angiotensin–System: Das Renin-Angiotensin-System reguliert mittelfristig den Blutdruck. Verschiedene Auslöser führen dabei zu einer vermehrten Ausschüttung von Renin:

- eine verringerte Rückresorption von Natrium im distalen Tubulus
- ein Abfall des intraarteriellen Druckes im juxtaglomerulären Apparat um 10-15 mmHg
- ein erhöhter Sympathikotonus

Renin ist ein proteolytisches Enzym, das am juxtaglomerulären Apparat freigesetzt wird. Es spaltet Angiotensinogen aus der Leber zu Angiotensinogen I. Dieses wird seinerseits durch das angiotensin-converting enzyme (ACE), das vor allem in der Lunge vorkommt, durch enzymatische Hydrolyse in Angiotensin II umgewandelt. Angiotensin II (AT2) bindet an den Angiotensin-Rezeptor 1(AT-1R). Dieser ist über ein G-Protein an die Phospholipase C gekoppelt und bewirkt einen Calciumeinstrom in die Zelle. AT2 wirkt vasokonstriktorisch und setzt aus der Nebennierenrinde Aldosteron frei; außerdem erhöht es die Ausschüttung von adrenocorticotropem Hormon (ACH), Norepinephrin und Vasopressin. Insgesamt führt das zu einer geringeren glomerulären Filtrationsrate und zu einer vermehrten Retention von Natrium und konsekutiv von Wasser. Das extrazelluläre Volumen steigt und damit der Blutdruck. Angiotensin II und Vasopressin regulieren über einen negativen Feedback-Mechanismus die Ausschüttung von Renin. [34] [3] Mäuse, die über keine Kopie des AT-1R-Gens verfügen, sind hypotoner als solche mit mindestens einer Kopie. [35] Diese Beobachtung macht man sich in der Hochdrucktherapie durch Blockade des AT-1R zunutze. Auch ACE-Hemmer werden in der Therapie des Bluthochdrucks effektiv eingesetzt. Umso überraschender ist es, dass die Studien, die einen Zusammenhang zwischen der Plasmakonzentration des ACE, die durch eine Mutation im ACE-Gen mitbestimmt wird, untersuchten, keine eindeutigen Korrelation feststellen konnten.

Das Endothelin-System: Das Endothelin-System wirkt vasokonstriktorisch und wachstumsfördernd.[36] [37] Endothelin-1 (ET-1) ist ein Peptid aus 21 Aminosäuren. Es wird durch endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1) aus einer gering aktiven Vorstufe, dem big - Endothelin, das aus 38 Aminosäuren besteht, gespalten. Endothelin wird in der Wand der Blutgefäße von den Endothelzellen in Richtung der glatten Gefäßmuskulatur sezerniert. Die glatten Muskelzellen können aber auch selbst Endothelin sezernieren, das dann auf sie zurückwirkt. ET-1 wirkt über die Gi-Proteingesteuerten Rezeptoren ETa und ETb.[38] Es führt zu einer starken Vasokonstriktion durch Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur. Man nimmt eine Beteiligung des ET-1 bei der Regulation des basalen Gefäßtonus an: In Versuchen mit Mäusen, denen das Endothelin-Gen fehlte, wurde eine Verringerung des mittleren, des systolischen und des diastolischen Blutdrucks um 15 mm Hg festgestellt.[39] Außerdem senkte die Verwendung eines Antagonisten des ET-1-Rezeptors beim Menschen sowohl den peripheren Gefäßwiderstand als auch in geringerem Maße den Blutdruck.[36] Zudem fanden Boulanger et al. heraus, dass die Expression von ET-1 von verschiedenen Stoffen angeregt wird, die auch an der Entstehung atherosklerotischer Plaques beteiligt sind, z.B. von Interleukin-1 und oxidiertem low-density-Lipoprotein (oxLDL). [40] Dieses Ergebnis deutet auf eine Beteiligung des ET-1 im Entstehungsprozess der Atherosklerose hin.

1 EINLEITUNG

Das adrenerge System: Wie bereits oben erwähnt, spielt das sympathische Nervensystem eine wichtige Rolle bei der Blutdruckregulation. Es besteht die Theorie, dass ein erhöhter Natriumspiegel im Plasma zu einer Steigerung der sympathischen Aktivität führt. [41] Das wiederum bewirkt eine Steigerung der Herzauswurfleistung und eine Erhöhung des peripheren Gefäßwiderstandes. Letzteres betrifft auch die Nierenarterie. Durch die Vasokonstriktion werden die Nieren weniger durchblutet. Dies löst eine verstärkte Reninausschüttung aus. Alle diese Mechanismen führen zu einem Anstieg des Blutdrucks. Seine Wirkung entfaltet das sympathische Nervensystem über verschiedene Rezeptoren. Es sind neun Untergruppen bekannt. Am besten erforscht sind die folgenden vier Haupttypen: α_1 1 und 2, β_1 und 2. Sie unterscheiden sich in ihrem Verteilungsmuster und den Effekten, die ihre Stimulation auslöst: Stimulation von α_1 -Rezeptoren führt zur Kontraktion glatter Gefäßmuskelzellen und zu deren Proliferation. Sie bewirken eine Vasokonstriktion. α_2 -Rezeptoren kommen sowohl zentral als auch peripher vor. Zentrale Anregung bewirkt einen Blutdruckabfall und Sedierung [42], periphere eine Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur. Werden α_2 -Rezeptoren erregt, zeigt sich deshalb zunächst ein Anstieg des Blutdrucks, hervorgerufen durch die periphere Vasokonstriktion, bevor es durch die zentrale Wirkung zu einem Abfall des Blutdrucks kommt. Unterschiedliche Subtypen dieses Rezeptors bewirken die verschiedenen Effekte. $\alpha_2 B$ ist verantwortlich für die initiale hypertensive Reaktion, $\alpha_2 A$ dagegen vermittelt die nachfolgende blutdrucksenkende Wirkung. β_1 -Rezeptoren wirken am Herzen positiv chronotrop und inotrop, β_2 -Rezeptoren vermitteln eine Relaxation der glatten Gefäß- und Bronchialmuskulatur, β_3 -Rezeptoren bewirken bei manchen Spezies eine Relaxation der Gefäßmuskulatur. [3]

Das dopaminerge System: Dieses System beeinflusst den Blutdruck über verschiedene Wege. Es wirkt auf die Niere und die Nebennierenrinde, den Magen- Darm-Trakt und zentral. Es wird von Zellen des proximalen Tubulus der Niere und von Zellen im Jejunum sezerniert und wirkt auto- und parakrin. Bei vermehrter Zufuhr von Kochsalz verringert es die Natrium-Rückresorption im renalen Tubulus und bewirkt eine verminderte Aufnahme von Natrium im Darm; so wird der Salzhaushalt des Körpers wieder ausgeglichen. Die dopaminerge Wirkung wird von zwei unterschiedlichen Rezeptorfamilien vermittelt. Es handelt sich dabei um G-Protein-Rezeptoren. Die D1-Rezeptorgruppe umfasst die Subtypen D1 und D5. Sie sind mit den stimulierenden G-Proteinen G α_s und G α_{olf} gekoppelt und erhöhen das intrazelluläre cAMP. Die D2-Rezeptorgruppe besteht aus den Subtypen D2, D3 und D4. Sie wirken über die inhibitorischen G-Proteine G α_i und G α_o . Diese blockieren die Adenylcyclase und verhindern somit die Umwandlung von ATP in cAMP. Die Aktivierung des D1-Rezeptors in den tubulären Zellen führt zu einer Blockade der Natrium-Transporter NHE1, NHE3, Na/HCO₃ und der Na/K-ATPase. Dadurch wird die Natriumrückresorption in der Niere verringert. Auf diesem Wege könnten Störungen im dopaminergen System zu einem erhöhten Blutdruck führen. Bei Patienten mit Bluthochdruck könnte ein Mangel an renalem Dopamin vorliegen. Bei normalem oder erhöhtem Dopaminspiegel besteht die Möglichkeit eines Fehlers in der Signaltransduktion wie zum Beispiel eine zu schwache cAMP-Antwort auf D1-Stimulierung. Des Weiteren beeinträchtigt exzessive Phosphorylierung durch die G-Protein-abhängige Rezeptorkinase GRK4 die Aktivität des D1-Rezeptors. Dies könnte die Ursache für eine verminderte Sensibilität des renalen D1-Rezeptors bei manchen Bluthochdruckpatienten sein. [3] Die Aktivierung des D2-Rezeptors vermindert im Gegenzug die Sekretion von Renin durch die juxtaglomerulären Zellen. Der D3-Rezeptor im juxtaglomerulären Apparat

1 EINLEITUNG

von Ratten bewirkt bei Stimulation eine gesteigerte Sekretion von Renin. Zudem weisen Ratten, denen das D3-Gen fehlt, einen Salz-sensitiven Bluthochdruck auf. [43] Auch Mäuse, denen das Gen für den D4-Rezeptor fehlt, sind hypertensiv. [44]

NO: NO wird von der NOS synthetisiert und ist ein Vasodilatator. Es gibt drei Isoformen der NOS: Die endotheliale (eNOS), die neuronale (nNOS) und die induzierbare (iNOS). eNOS ist vor allem für die Regulation des Gefäßtonus verantwortlich. Wird sie inhibiert, führt das zu Vasokonstriktion und damit zu einem Anstieg des systemischen Widerstandes. [45] Mäuse, denen das eNOS-Gen fehlt, haben einen höheren Blutdruck als ihre genetisch normalen Artgenossen. Es wird auch angenommen, dass die NO-Aktivität bei Bluthochdruck beeinträchtigt ist. [27] Zudem hat NO plättchenaggregationshemmende Wirkung. Blockade der NOS führt beim Menschen zu einer verringerten Blutungszeit, welche ein Maß für die Thrombozytenfunktion darstellt. Somit ist NO eventuell das Verbindungsglied zwischen Hypertonie und thrombotischen Komplikationen wie Myokardinfarkt und Apoplex. [3] Ein weiterer Aspekt ist die Tatsache, dass Mäuse mit einem Mangel an eNOS die Trias des metabolischen Syndroms - Hypertonie, Insulinresistenz und Dyslipidämie - aufweisen. [46] eNOS beeinflusst möglicherweise die Aufnahme von Glucose in die quergestreifte Muskulatur über einen gesteigerten Blutfluss und eventuell auch direkt. Ihre Rolle im Fettstoffwechsel ist aber noch unklar. [3]

Natriuretische Peptide: Es gibt drei verschiedene Typen von natriuretischen Peptiden, das atriale (ANP), das "brain" (BNP) und das C-Typ natriuretische Peptid (CNP). Sie sind beteiligt an der Regulation des Salzhaushaltes und des Gefäßtonus und beeinflussen die Zellproliferation. Sie entfalten ihre Wirkung über drei verschiedene Rezeptoren: An NPRA binden bevorzugt ANP und BNP, an NPRB vor allem CNP, und an NPRC binden alle drei Typen natriuretischer Peptide. NPRA und NPRB kommen vor allem in den Gefäßwänden, den Nieren, Lungen und in der Nebennierenrinde vor. Zudem ist NPRB der vorherrschende Rezeptor für natriuretische Peptide im Gehirn. NPRA und NPRB bewirken eine Aktivierung der Guanylatcyclase und damit die Produktion von cGMP. NPRC kommt in den meisten Geweben vor und vermittelt dort die Clearance. ANP und BNP werden im Atrium und in den Ventrikeln als Antwort auf die Dehnung der Herzwand freigesetzt. CNP wird vom Gefäßendothel produziert und soll an der Regulation des Gefäßtonus beteiligt sein. Wird der Vorläufer von ANP auf andere Weise prozessiert, entsteht in der Niere Urodilantin. Es wird in das Lumen des distalen Nephrons sezerniert und fördert die Ausscheidung von Natrium. Die natriuretischen Peptide bewirken sowohl eine venöse als auch eine arterielle Dilatation. Dadurch werden die Vorlast und der periphere Widerstand gemindert, was zu einem Abfall des arteriellen Blutdrucks führt. Zudem verstärken die NPs die Ausscheidung von Natrium. Dazu kommt es durch Vasodilatation der afferenten Arteriolen bei gleichzeitiger Konstriktion der efferenten Arteriolen, wodurch die glomeruläre Filtrationsrate steigt. Außerdem wird die Reabsorption von Natrium in den Tubuli blockiert. NPs antagonisieren die Wirkung von ADH und Angiotensin II. [3]

Kallikrein-Kinin-System: Kinine (z.B. Bradykinin, Lysylbradykinin) werden durch Kallikreine aus Kininogenen gebildet. Zirkulierendes Kininogen wird vor allem in der Leber gebildet. Zudem werden Kininogene in verschiedenen Geweben gefunden, in denen sie auch direkt gebildet werden. Kallikreine kann man in Plasma- und Gewebs- Kallikrein unterscheiden. Die im Blut befindliche Form ist inaktiv und wird

1 EINLEITUNG

durch Fragmente des Gerinnungsfaktors XII aktiviert. Umgekehrt kann es auch selbst Faktor XII aktivieren. Das Gewebs-Kallikrein befindet sich in im Blut zirkulierenden Zellen, die für den Elektrolyttransport verantwortlich sind. Inaktiviert werden die Kinine durch Peptidaseen wie Kininase I und ACE. Kinin bindet an zwei Rezeptoren, B1 und B2. B1 lässt sich nur in pathologischen Situationen, wie z.B. einer Entzündung, nachweisen. B2 dagegen wird in den meisten Geweben exprimiert. Es ist verantwortlich für den Natriumtransport in der Niere und vermittelt die Freisetzung von NO und Prostacyclin durch das Endothel. So bewirkt z.B. die Gabe von Bradykinin eine vermehrte Natriurese. Bei Patienten mit essentiellen Bluthochdruck ist die Ausscheidung von Kallikreinen im Urin vermindert. Genetisch veränderte Mäuse, die eine verstärkte Expression von Kallikrein aufwiesen, waren hypoton. [3] Im Gegensatz dazu reagierten Mäuse, die keine Gene für den B2-Rezeptor aufwiesen, auf verstärkte Salzzufuhr hyperten. [47]

Oxidativer Stress: In Bluthochdruckmodellen wurde festgestellt, dass erhöhter oxidativer Stress vorliegt. [48] Das zeigten auch Marker für oxidativen Stress wie beispielsweise 8-Epi-Isoprostane bei Patienten mit starkem Hypertonus. Die mögliche Rolle des oxidativen Stresses bei der Entstehung des Bluthochdrucks liegt in der Zerstörung von NO. Zudem fördern reaktive Sauerstoffgruppen auch Entzündung, Proliferation glatter Gefäßmuskulatur und Ablagerung von Matrixproteinen. Diese Prozesse tragen entscheidend zu der Gefäßschädigung, die mit dem Bluthochdruck einhergeht, bei. In Tiermodellen konnten Antagonisten reaktiver Sauerstoffgruppen die Entwicklung eines Hypertonus verzögern. In groß angelegten Studien beim Menschen hat sich die Gabe von Antioxidantien allerdings als wirkungslos erwiesen. [3]

Entzündung: Bestimmt man bei hypertensiven Patienten den Plasmaspiegel von CRP, erhält man höhere Werte als bei Nicht-Hypertensiven. [49] Auch viele Risikofaktoren, die mit einer Entzündung der Gefäße im Zusammenhang stehen, können zur Entwicklung eines arteriellen Hypertonus beitragen. Eine bestehende Entzündung könnte außerdem einen schon erhöhten peripheren Gefäßwiderstand weiter steigern. Die Entzündung führt zu einer Abnahme von NO und einer Zunahme von Isoprostanen, was eine zusätzliche Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur bewirkt. [27] Auch Komplikationen des Bluthochdrucks wie Myokardinfarkt und Schlaganfall stehen in Zusammenhang mit dem prothrombotischen Zustand, der auch bei Entzündungen herrscht.

1.4 Genetische Grundbegriffe

1.4.1 Mutationen

Eine Mutation ist eine "Veränderung der genetischen Struktur einzelner Gene (Genmutation) oder der Struktur und Anzahl von Chromosomen (Chromosomenmutation bzw. Genommutation)". [50] Mutationen können in drei Gruppen eingeteilt werden:

Genommutation: Bei einer Genommutation ist die Gesamtzahl der Chromosomen verändert. Durch sogenannte Non-disjunction in der Meiose oder Mitose oder durch Chromosomenverlust verfügen die Zellen über zu viele (hyperploide), oder über zu wenige Chromosomen (hypoploide). Es handelt sich in der Regel um neu aufgetretene Mutationen.

1 EINLEITUNG

Chromosomenmutation: Chromosomenmutationen betreffen die Struktur der einzelnen Chromosomen. Sie kommen beim Menschen seltener vor als Genommutationen. Es gibt verschiedene Formen:

- **Deletion:** Geht ein Teil eines Chromosoms verloren, spricht man von einer Deletion. Sie kann sowohl terminal, also an einem Ende des Chromosoms, auftreten, als auch interstitiell. Bei letzterer kommt es zu zwei Bruchereignissen und es geht ein Teil aus der Mitte eines Chromosoms verloren. Dabei kann auch das Zentromer des Chromosoms betroffen sein. Es entstehen dann ein zentrisches Fragment, in dem sich das Zentromer befindet, und ein azentrisches Fragment. Das azentrische Fragment geht in der Regel in der Mitose oder Meiose verloren, da es keine Ansatzstelle für die Spindelfasern aufweist. Ist eine Deletion mit dem Leben vereinbar liegen bei dem Betroffenen häufig schwere Fehlbildungen vor.
- **Translokation:** Translokationen sind Veränderungen in der Struktur eines Chromosoms. Dabei wird entweder ein Fragment im gleichen Chromosom an einer anderen Position eingebaut, oder das Fragment wird auf ein anderes Chromosom übertragen. Es kann auch zu einem Austausch von Segmenten zwischen zwei homologen oder inhomologen Chromosomen kommen (reziproke Translokation). Auch hier kann chromosomales Material verloren gehen, wenn bei der Translokation ein azentrisches und ein dizentrisches Chromosom entstehen. Das azentrische Chromosom geht wie oben beschrieben verloren, das dizentrische Chromosom zerreißt dadurch, dass es zwei Ansatzstellen für die Spindelfasern aufweist. Die Translokation kann aber auch stabil sein, d.h. die neu entstandenen Chromosomen sind weder a- noch dizentrisch. In diesem Fall macht sich die Translokation nicht bemerkbar, da kein Genmaterial verloren geht.
- **Duplikation:** Tritt das gleiche Chromosomensegment zweimal auf, spricht man von einer Duplikation. Dazu kommt es vermutlich durch ein sogenanntes „illegitimes Crossing over“, d.h. zwei homologe Chromosomen tauschen Segmente an einer nicht-homologen Stelle. Das Chromosom verfügt danach über ein Segment in doppelter Ausführung. Zu einer Duplikation kann es außerdem kommen, wenn ein Fragment von einem Chromosom abbricht und an einer Bruchstelle des homologen Chromosoms wieder angeheftet wird. Die Duplikation ist ein Mechanismus, der in der Evolution eine wichtige Rolle bei der Entstehung neuer Gene spielt.
- **Inversion:** Dabei kommt es zu zwei Brüchen innerhalb eines Chromosoms. Das Bruchstück dreht sich um 180° und wird wieder eingebaut.

Genmutation: Die Genmutation steht im Mittelpunkt dieser Arbeit. Sie betrifft das einzelne Gen. Häufigste Mutation ist die Punktmutation: Sie betrifft nur ein einziges Basenpaar.

- **Substitution:** Eine einzelne Base im Triplet wird ausgetauscht. Dabei unterscheidet man zwischen dem Austausch einer Purinbase (Adenin oder Guanin) gegen eine Pyrimidinbase (Cytosin oder Thymin) oder umgekehrt = Transversion, und dem Austausch einer Purin- gegen eine Purin- oder Pyrimidin- gegen Pyrimidinbase = Transition. Die Transition ist der häufigste Mutationstyp unter den Punktmutationen. Eine Substitution kann verschiedene Auswirkungen haben: Wird eine andere Aminosäure in die Polypeptidkette eingesetzt, bezeichnet man das als Missense-Mutation. Führt die Punktmutation zu einem Stoppkodon

1 EINLEITUNG

(TAG), heißt das Nonsense-Mutation. Dadurch, dass der genetische Code degeneriert ist, kann der Basenaustausch aber auch folgenlos bleiben und es wird die richtige Aminosäure in die Polypeptidkette eingebaut (Same-sense-Mutation).

- Deletion: Eines oder mehrere Basenpaare oder eines oder mehrere Triplettkodons gehen verloren. Tritt letzteres auf, fehlen Aminosäuren in der Polypeptidkette. Geht nur ein Basenpaar verloren, führt das zu einer Verschiebung des Leserasters (Frame-shift-Mutation). In der Regel kommt es dadurch zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz am 3'-Ende der Deletion und zum vorzeitigen Auftreten eines Stoppcodons.
- Insertion: Kommt sehr selten vor. Ein oder mehrere Basenpaare werden neu in die Sequenz eingefügt. Auch hierbei kommt es zu einer Verschiebung des Leserasters (s.o.).
- Duplikation: Auch diese Duplikationen entstehen durch nicht-homologes Crossing over (s.o.), nur dass sie diesmal die Genebene betreffen.
- Trinukleotidwiederholung: Drei Basenpaare (Triplets) liegen amplifiziert vor. Wie es dazu kommt, ist nicht vollständig geklärt. Die Anzahl dieser Triplets bestimmt die Ausprägung der daraus resultierenden Krankheit. Gesunde Personen haben nur wenige, Kranke viele dieser repetitiven Sequenzen. Von einer Generation zur nächsten kann die Anzahl der Wiederholungen zunehmen; die Krankheit manifestiert sich dadurch früher und schwerer (z.B. Chorea Huntington). Die Repeats wirken sich offenbar auf die Methylierung der DNA und die Chromatinstruktur aus. So entstehen bruchanfällige Abschnitte (z.B. fragiles X-Syndrom).

1.4.2 Ursache von Mutationen

Spontanmutation: Mutationen können ohne äußere Ursache spontan auftreten. Es handelt sich dann um eine Neumutation. Grund dafür kann ein Fehler bei der DNA-Replikation sein. Zwar verfügt die menschliche Zelle über ein Reparatursystem, das die replizierte DNA auf falsch eingesetzte Basen überprüft, aber manchmal entgehen diesem System Fehler. Eine wichtige Rolle bei Neumutationen spielt das Alter des Vaters. Das liegt vermutlich daran, dass in höherem Alter die Spermien - im Gegensatz zu den Oozyten - bereits zahlreiche Zellteilungen durchgemacht haben und sich so die Wahrscheinlichkeit eines nicht-korrigierten Fehlers bei der DNA-Replikation erhöht.

Induzierte Mutationen: Mutationen können auch durch sogenannte Mutagene zustande kommen. Ionisierende Strahlen (z.B. Röntgen-, Gamma- oder kosmische Strahlen) wirken mutagen. Sie erhöhen die Häufigkeit von Spontanmutationen. Auch nicht-ionisierende Strahlen wie UV-Licht können Mutationen induzieren. Das Wirkungsmaximum des UV-Lichtes liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm und damit beim Absorptionsmaximum der DNA. Es kommt zur Bildung von Thymidin-Dimeren zwischen benachbarten Basen. Chemische Stoffe, die als Mutagene gelten, sind u.a. DNA- oder RNA-Analoga (z.B. 5-Bromuracil), Akridin-Farbstoffe, alkylierende Substanzen (z.B. Senfgas) und Karzinogene (Benzpyren, Nitrite etc.). Sie rufen alle Arten von Mutationen hervor; im Gegensatz zur Strahlung können sie auch Hyper- oder Hypoploidien verursachen. Dies kommt vor allem dadurch zustande, dass die Noxen länger in der Zelle verweilen. Zudem erhöhen sie das Tumorrisiko (kanzerogene Wirkung). Auch Viren, Schimmelpilze und Mykoplasmen können mutagen wirken. Sie bewirken u.a. Chromosomenbrüche und erhöhen die Häufigkeit von Spontanmutationen. Die

1 EINLEITUNG

zusätzlichen, durch Mutagene verursachten Schäden überfordern das Reparatursystem der DNA. Deshalb kommt es bei Exposition zu vermehrten Mutationen.[51]

1.4.3 Polymorphismen

Ein Polymorphismus ist das Auftreten einer oder mehrerer Varianten desselben Gens in einer Population. Sie müssen mit einer Häufigkeit von mindestens 1% vorkommen. Treten sie seltener auf, spricht man von einer Mutation (s.o.) Die Enzymvarianten, die aus verschiedenen Varianten eines Gens resultieren, bezeichnet man als Alloenzyme. [51]

1.5 Untersuchte Varianten

Angiotensinogen: Angiotensinogen (AGT) ist das Ausgangpeptid des Renin-Angiotensin-Systems. Es wird in der Leber gebildet und durch Renin in Angiotensin I (AT I) umgewandelt. AT I wird vom „Angiotensin-converting enzyme“ (ACE) zu Angiotensin II (AT II) gespalten. Ein Polymorphismus des AGT befindet sich in Exon 2. In Position 235 der Aminosäurekette ist Methionin durch Threonin ersetzt.[52] Dieser Polymorphismus beeinflusst die Konzentration von AGT im Plasma. Homozygote für T235 haben die höchsten, Homozygote für M235 die niedrigsten Plasma-Spiegel. Auf diese Weise könnte die Generierung von AT I beeinflusst werden. [53] Der Polymorphismus wurde mit erhöhtem Blutdruck[54] und der Entwicklung einer Präeklampsie [55] in Zusammenhang gebracht. Des Weiteren ist ein Polymorphismus im proximalen Promotor des AGT-Gens bekannt. Sechs Nukleotide stromaufwärts der Transkriptions-Startsequenz ist Guanin gegen ein Adenin ausgetauscht. Untersuchungen haben ergeben, dass dies Auswirkungen auf die spezifische Interaktion von mindestens einem nukleären Faktor mit dem AGT-Promotor hat. [56] Die Polymorphismen A(-6)G und M235T stehen in starkem Kopplungs-Ungleichgewicht. Die Konsequenzen des M235T-Polymorphismus könnten also auch aus der durch A(-6)G modifizierten Promotoraktivität resultieren.

Angiotensin-converting enzyme: Die Effizienz von ACE-Hemmern bei der Therapie der KHK lenkten das Interesse auf die Rolle dieses Enzyms bei der Entstehung und Progression der Erkrankung. Hauptaufgabe des „angiotensin-converting enzyme“ (ACE) ist die Umwandlung von Angiotensin I in Angiotensin II. Es ist ein Polymorphismus im Intron 16 des ACE-Gens bekannt. Dabei handelt es sich um die Insertion oder Deletion einer 287 Basen langen Sequenz. Die Deletion führt bei homozygoter Ausprägung zu erhöhten ACE-Spiegeln im Blut. Cambien fand als Erster einen Zusammenhang zwischen ACE-DD und Myokardinfarkt vor allem bei Personen, die nach üblicher Einschätzung eher ein geringes Risiko für KHK hatten.[57] Einige darauffolgende Studien bestätigten dies [58] [59], andere wiederum nicht. [60], [61] Die Deletion wurde außerdem als Risikofaktor für linksventrikuläre Hypertrophie[62], [63], sowie für dilatative und hypertrophe Kardiomyopathie beschrieben. Hohe Plasmakonzentrationen von ACE scheinen mit einer Wandverdickung der Carotiden einherzugehen.[72] Es gibt aber auch Hinweise auf alternative Wege der AT II-Generierung. Wolny et al. fanden ein Chymase-ähnliches Enzym. Es handelt sich um eine Serin-Protease, über die AT I in Koronargefäßen eine Konstriktion bewirkt.[64]

Angiotensin-I-Rezeptor 2: AT II reguliert den Gefäßtonus und den Blutdruck. Es ist beteiligt an der Endotheldysfunktion, der Apoptose, der Peroxidation von Li-

1 EINLEITUNG

poproteinen, der Produktion proinflammatorischer Cytokine, der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und der Synthese vaskulärer Matrix. In frühen Stadien der Atherosklerose stimuliert AT II Adhäsionsmoleküle und trägt zur Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen in die Gefäßwand bei. [65] Die Wirkungen von AT II werden durch zwei strukturell unterschiedliche Rezeptoren vermittelt: AT-1R und AT-2R. Es handelt sich dabei um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. AT-1R ist ausführlich erforscht. Über ihn entfaltet AT II die meisten seiner bekannten Wirkungen. Er wird in der glatten Gefäßmuskulatur und im Myokard exprimiert und vermittelt die kardiovaskulären Wirkungen von Angiotensin II. [66] [67] Aufgrund der physiologischen Rolle des AT-1R zählen seine Polymorphismen zu den möglichen Mitverursachern einer KHK. Über AT-2R ist dagegen relativ wenig bekannt. Er inhibiert die Zellproliferation und vermittelt den programmierten Zelltod.[68] Der Polymorphismus, der in dieser Arbeit untersucht wurde, befindet sich in der 3' - nicht-translatierten Region des AT-1R-Gens, an Position 1166. Es handelt sich um den Austausch eines Adenosin gegen ein Cytosin. Er wurde von Bonnardeaux bereits mit der essentiellen Hypertonie in Verbindung gebracht.[69]. Weiterhin wurden Assoziationen mit Aortensteifigkeit bei Hypertensiven [69], gesteigerter koronarer Vasokonstriktion [70] und kardialer Hypertrophie [71] beschrieben. In weiteren Studien zeigten sich Zusammenhänge zwischen Kombinationen des AT-1R-Polymorphismus und Mutationen beispielsweise des ACE-Gens und der koronaren Herzkrankheit.[68] [72]

”Endothelin-converting enzyme”: Beim ”Endothelin-converting enzyme”(ECE) handelt es sich um eine Protease, die big-Endothelin-1 zu Endothelin-1 (ET-1) spaltet (siehe oben). Außerdem spielt das ECE eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Vertebraten. Fehlt das Gen, kommt es bei Mäusen zu intestinaler Aganglionose und kraniofazialen und kardiovaskulären Fehlbildungen.[37] Es gibt zwei Formen des ECE: ECE-1 und ECE-2. ECE-1 kommt vor allem im Gefäßendothel vor, ECE-2 vorwiegend in neuronalem Gewebe. Kodiert wird das ECE-1 von einem Gen auf Chromosom 1 (1p36), das aus 20 Exons besteht. Es gibt vier Isoformen, ECE-1a, ECE-1b, ECE-1c und ECE-1d, die sich durch ihren N-ständigen Aminosäurerest unterscheiden. Dazu kommt es, weil das Gen vier verschiedene isoformspezifische Promotorregionen besitzt. ECE-1b wird in Endothel- und Gefäßmuskelzellen exprimiert und könnte deshalb an der Blutdruckregulation beteiligt sein. Es ist vorstellbar, dass eine verstärkte Expression zu einer Erhöhung des Blutdrucks führt.[73] Funke-Kaiser fanden fünf Varianten in der Region, die für das ECE-1-Gen codiert; zwei davon in der 5' - flankierenden Regionen (T-839G, C-338A) und drei in Exonabschnitten (Exon 3: L75F C/T; Exon 17: A677V C/T; Exon 19: C+295T). Die Mutationen in den Exonabschnitten kommen allerdings sehr selten vor. Zwei von ihnen (L75F und A677V) sind Missense-Mutationen. Die Häufigkeit der Polymorphismen C-338A und T-839G betrug 26% und 8%. Der Polymorphismus C-338A befindet sich in der 5'-Regulationsregion des Gens, 338 bp stromaufwärts der ECE-1b-Translations-Startsequenz. [74] Der Polymorphismus -338A führt zu einer Übereinstimmung mit der Bindungssequenz von Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie; das heißt, dass diese Transkriptionsfaktoren an die veränderte Sequenz binden und die Transkription des Gens einleiten. Bei dem -338C-Wildtyp stimmt die Sequenz mit der von GATA-Transkriptionsfaktoren überein. Es kommt somit zu einem Austausch des eigentlichen Transkriptionsfaktors GATA-2. Zwar spielt E2F-2 auch beim Wildtyp -338C eine untergeordnete Rolle als Transkriptionsfaktor, E2F-2 bindet aber mit einer höheren Affinität an -338A als an -338C; das Gen wird also durch E2F-2 verstärkt transskribiert. Die Familie der E2F-Transskriptionsfaktoren

2 MATERIALIEN UND METHODEN

Patienten (Anzahl)	194, davon 34 Frauen
Alter (Jahre)	60,9 ± 7,4
Ejektionsfraktion(%)	63,0 ± 14,5
CCS-Score	3,0 ± 1,0
Bypässe (Anzahl)	1,0 ± 1,0
LIMA (Anzahl)	1,0 ± 0,5
VSM-Graft (Anzahl)	1,5 ± 1,0
Andere Grafts (Anzahl)	0,4 ± 0,5

Tabelle 4: Demographische Daten des Patientenkollektivs
(CCS = Canadian Cardiovascular Society; LIMA = linke Arteria thoracica (mammaria) interna; VSM = Vena saphena magna)

umfasst sechs Mitglieder (E2F-1 bis E2F-6), die eine wichtige Rolle im Zellzyklus spielen. E2F-1 bis E2F-3 gelten als aktivierende, E2F-4 bis E2F-6 als repressiv wirkende Transkriptionsfaktoren. E2F-1 gilt sowohl als Tumorsuppressor- als auch als Onkogen. Auch der T-839G-Polymorphismus beeinflusst die Promotoraktivität, allerdings nur in geringem Maße (Aktivität von 11,7%) und dies nur in Kombination mit -338C. Deshalb beschäftigt sich diese Arbeit nur mit dem Polymorphismus -338A.[73]

2 Materialien und Methoden

2.1 Ausgewählte Patienten

2.1.1 Patientenkollektiv mit KHK nach bereits erfolgter Bypassoperation

Das Kollektiv umfasste 194 Patienten, die sich zwischen 1979 und 1999 am Klinikum Großhadern ihrer ersten Bypassoperation unterzogen hatten. 18 % davon waren Frauen. Nachdem die Zustimmung der Ethikkommission vorlag, wurden die Patienten zwischen März und Oktober 2004 schriftlich zu einer Verlaufskontrolle und Blutentnahme ins Klinikum einbestellt. Dort wurden sie zunächst ausführlich über das Studienkonzept und die genetische Untersuchung aufgeklärt. Alle Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis zu der Studie. Die anamnestisch erhobenen Daten umfassten die klassischen Risikofaktoren arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie, Nikotinabusus, Hyperurikämie und Adipositas. Zusätzlich wurden Ejektionsfraktion, CCS-Score und Art und Anzahl der Bypässe erfasst (siehe Tabelle 4).

2 MATERIALIEN UND METHODEN

Ereignis	n/(%)	Zeitraum nach Erstoperation (Jahre)
1. Reoperation (PTCA/Stentimplantation)	88,0 (45,8)	9,3 ± 3,3
2. Reintervention	54,0 (28,1)	10,4 ± 5,9
3. Angina Pectoris	80,0 (41,7)	10,5 ± 5,8
4. Kombination der Ereignisse 1 - 3	137,0 (71,4)	12,6 ± 5,8

Tabelle 5: Klinische Endpunkte

Kontrollen (Anzahl)	200 (davon 35 Frauen)
Alter (Jahre)	66,5 ± 16,5

Tabelle 6: Demographische Daten des Kontrollkollektivs

Die klinischen Endpunkte, die zum Zeitpunkt des "Follow-Up" erfasst wurden, waren erneute Bypassoperation, Reinterventionen (PTCA und/oder Stenteinlage) oder erneute Einweisung in eine Klinik wegen eines Herzinfarktes oder Angina-pectoris-Symptomatik oder eine Kombination der möglichen Endpunkte. 71,4% (n = 137) der Patienten hatten erneut Beschwerden und benötigten ärztliche Behandlung. Bei 45,8% (n = 88) von ihnen war eine zweite Operation erforderlich, bei 28,1% (n = 54) eine Stentimplantation oder PTCA und 41,7% (n = 80) litten wieder unter Angina-pectoris-Beschwerden. (Tabelle 5)

Zum Zeitpunkt des "Follow-Up" erhielten die Patienten folgende Medikamente: Thrombozytenaggregationshemmer (87%), Betablocker (70%), Statine (50%), ACE-Hemmer (35%) und Calciumantagonisten (24%).

2.1.2 Kontrollkollektiv ohne KHK

Die Kontrollgruppe umfasste 200 Probanden, davon 28 Frauen. Voraussetzung zur Aufnahme in die Kontrollgruppe waren kein Hinweis auf hämatologische oder vaskuläre Erkrankungen und das schriftliche Einverständnis zur genetischen Untersuchung.

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Präparation

Die DNA der Patienten und Kontrollen wurde mit dem "QIAGEN blood-mini" Kit aus EDTA-Vollblut extrahiert:

- 20 µl QIAGEN-Protease (oder Proteinase K) wurden in ein 15 µl Eppendorf-Gefäß gegeben; dazu wurden 200 µl Vollblut und 200 µl Lysispuffer AL pipettiert und gut gemischt; anschließend inkubierte man bei 56 °C für 10 Minuten. In diesem Schritt werden die Zellmembranen aufgelöst.
- Das Eppendorfgefäß wurde kurz anzentrifugiert; dann wurden 200 µl Ethanol (96-100 %) dazugegeben, gemischt und zentrifugiert.
- Die Mischung wurde auf eine QIAamp-spin column geladen und bei 8000 U/min 1 Minute lang zentrifugiert. Dabei wird die DNA an die Silikamembran der Säule adsorbiert.

2 MATERIALIEN UND METHODEN

- Anschließend gab man 500 μl Waschpuffer AW1 hinzu und zentrifugierte 1 Minute bei 8000 U/min.; das Filtrat wurde verworfen. Auf diese Weise wurden Verunreinigungen beseitigt.
- Nun wurden 500 μl Waschpuffer AW zugegeben und bei 14 000 U/min für 3 Minuten zentrifugiert.
- Die Säule wurde in ein 1,5 μl Reaktionsgefäß gesetzt und es wurden 200 μl Buffer AE (Elutionspuffer) zugegeben. Der Puffer löste die an der Membran gebundene DNA ab. Es wurde 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 1 Minute bei 8000 U/min zentrifugiert.

Die extrahierte DNA kann bei 4 °C über einen längeren Zeitraum gelagert werden.

2 MATERIALIEN UND METHODEN

”QIAamp blood minikit ”QIAamp spin columns”, collection tubes (2 ml) Lysispuffer AL Elutionspuffer AE Waschpuffer AW1/AW2 QIAGEN-Protease
--

Tabelle 7: Verwendete Materialien zur DNA-Präparation

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Bei der PCR werden genau definierte DNA-Abschnitte amplifiziert.

Prinzipien

- Es müssen kurze Sequenzen an beiden Enden des gesuchten Fragments bekannt sein. Zu diesen werden komplementäre Oligonukleotide (Primer) synthetisiert.
- Amplifiziert wird die DNA durch das hitzestabile Enzym Taq-Polymerase, das aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen wird.
- Um die DNA amplifizieren zu können, sind Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs) im Überschuss nötig.

Ablauf

- Die spezifischen Primer, die Desoxyribonukleotidtriphosphate (C,T,A,G) und die hitzestabile Taq-Polymerase werden zu der zu untersuchenden DNA hinzugegeben; diese Mischung wird auf 95 °C erhitzt. Dadurch trennen sich die DNA-Doppelstränge in zwei Einzelstränge auf. Dieser Vorgang wird als Denaturierung bezeichnet.
- Anschließend wird das Gemisch auf 55-70 °C abgekühlt, wodurch die spezifischen Primer sich an die zu ihnen komplementären Abschnitte der DNA anlagern (Annealing).
- Bei 72 °C erfolgt nun die komplementäre Anlagerung der dNTPs durch die Taq-Polymerase, ausgehend von den gebundenen Primern. Der jeweilige DNA-Einzelstrang dient dabei als Matrize. Es entstehen zu den originalen DNA-Einzelsträngen komplementäre Stränge.

Diese Schritte werden 30 bis 45mal wiederholt, wobei die entstehenden Produkte wiederum als Matrizen dienen. Dies führt zu einer exponentiellen Vermehrung der DNA. Die PCR läuft aber nicht endlos weiter; die immer größer werdende DNA-Menge hemmt die Enzymaktivität und der Substratverbrauch limitiert die Reaktion ebenfalls. Man erhält deshalb nach n Zyklen nicht 2^n Moleküle, sondern nur ca. 80 % dieser Menge. Am Ende wird das Gemisch auf 8 °C abgekühlt. Die einzelnen Schritte laufen in einem Thermocycler mit Deckelheizung ab. Die Temperaturschritte sind nicht für jeden DNA-Abschnitt gleich. Der Thermocycler muss entsprechend vorher programmiert werden. Im Abschnitt ‘‘Oligonukleotidprimer‘‘ wird darauf noch näher eingegangen.

2 MATERIALIEN UND METHODEN

ACE

	Temperatur	Dauer	
Initial	95°C	3 min	40 Zyklen
Denaturierung	95°C	20 sec	
Annealing	56°C	30 sec	
Extension	72°C	30 sec	
Abschlussextension	72°C	2 min	

Tabelle 8: Temperaturschritte ACE

AGT/ECE

	Temperatur	Dauer	
Initial	95°C	3 min	40 Zyklen
Denaturierung	95°C	20 sec	
Annealing	62°C	20 sec	
Extension	72°C	20 sec	
Abschlussextension	72°C	5 min	

Tabelle 9: Temperaturschritte AGT/ECE

Charakteristika Die PCR hat eine hohe Selektivität und Spezifität. Außerdem ist sie ein schnelles Verfahren und hat eine hohe Erfolgsrate bei geringem technischen und finanziellem Aufwand. Mit ihr ist der Nachweis auch geringster Mengen von DNA möglich. Diese hohe Sensitivität macht die PCR aber auch anfällig für kleinste Verunreinigungen. Die Taq-Polymerase hat eine hohe Fehlerquote, also eine geringe Präzision. Es kommt vor allem zu sog. Frameshift-Fehlern (1/41000) und zur falschen Substitution von einzelnen Basenpaaren (1/9000); die Fehlerrate ist dabei abhängig von der Konzentration des Enzyms und der dNTPs. Zur Vergrößerung der Präzision werden hohe Temperaturen in den Annealing- und Elongationsphasen angestrebt. Für jedes Produkt wird außerdem ein eigenes PCR-Protokoll erarbeitet, um die Bildung spezifischer Fragmente zu gewährleisten. (Tabellen 8-10)

AT-1R

	Temperatur	Dauer	
Initial	95°C	10 min	40 Zyklen
Denaturierung	94°C	30 sec	
Annealing	63°C	30 sec	
Extension	72°C	30 sec	
Abschlussextension	72°C	2 min	

Tabelle 10: Temperaturschritte AT-1R

2 MATERIALIEN UND METHODEN

Oligonukleotidprimer: Ziel der PCR ist die Amplifizierung eines spezifischen Abschnittes der DNA. Dazu müssen Sequenzen im Randbereich dieses Abschnittes bekannt sein. Komplementär zu diesen Abschnitten synthetisiert man Primer, in der Regel etwa 20 bis 24 Nukleotide lange Nukleotideinzelstränge. Einer davon ist identisch mit dem 5'- (Primer 1), der andere mit dem 3'- Ende (Primer 2) der zu untersuchenden Sequenz ("forward und "reverse Primer). Die Primerpaare weisen mit ihren 3'-Enden aufeinander zu, so dass die DNA dazwischen repliziert werden kann. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 11 aufgeführt. Die Primer lagern sich bei einer bestimmten Temperatur, der Annealing-Temperatur, an die zu ihnen komplementären DNA-Abschnitte an. Diese Temperatur ist je nach Primerpaar unterschiedlich. Für die in dieser Studie verwendeten Primer waren Annealing-Temperaturen von 56 °C für die ACE-Primer, 63°C für die AT-1R-Primer und von 62 °C für AGT- und ECE-Primer optimal. Die genauen PCR-Temperaturschritte sind aus den Tabellen 8 bis 10 zu ersehen. Folgendes ist bei der Synthese der Primer zu beachten:

- die eingesetzten Primer dürfen nicht zueinander komplementär sein, da sich sonst Primerpaare bilden;
- das Verhältnis der Basen GC zu AT sollte ausgewogen sein;
- bei einer Konzentration der Basen GC von 45-55% und einer hohen Anlagerungstemperatur erreicht man eine hohe Spezifität. Die GC-Konzentrationen der in dieser Studie verwendeten Primer lag zwischen 43 % (AR1) und 68 % (AGT 2-2). Die einzelnen Primer-Sequenzen und die GC-Konzentrationen sind in Tabelle 11 aufgeführt;
- die optimale Primerkonzentration im PCR-Ansatz beträgt 0,1 bis 1 μ M; Ist die Konzentration kleiner führt das zu einer niedrigeren Effizienz, ist sie höher kommt es verstärkt zu Fehlanlagerungen (Mispriming);
- evtl. können künstliche Schnittstellen eingeführt werden, um mit einem nachfolgenden Restriktionsverdau Nukleotidaustausche nachzuweisen.

2 MATERIALIEN UND METHODEN

Primer	Sequenz	Länge	GC-Konzentration
ACE-1 (5'-3')	CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT	24 Bp	54,2%
ACE-2 (3'-5')	GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC GTC	25 Bp	48%
AGT 2-1 (5'-3')	TGA AGC AGC CGT TTG TGC AG	20 Bp	55%
AGT 2-2 (3'-5')	CAG GGT GCT GTC CAC ACT GGC TCG C	25 Bp	68%
AR 1 (5'-3')	AGA ACA TTC CTC TGC AGC ACT TCA CTA CCA AAT GAT C	37 Bp	43%
AR 2 (3'-5')	GTC AGG GAG ATT GCA TTT CTG TCA G	25 Bp	48%
ECE P-1 (5'-3')	GAA CTC TGG CTT AAA GGC CTC TG	23 Bp	52,2%
ECE P-2 (3'-5')	GTG GCA GAT AAC AAA AGT ATC AGG AAG GTG CCC TCA AT	38 Bp	44,7%

Tabelle 11: Sequenzen der synthetischen Primer (Thermo Electron Corporation)

Durchführung

PCR-Ansatz: Für jeden zu untersuchenden Nukleotidaustausch gibt es ein spezifisches PCR-Protokoll, das die optimale Konzentration der verwendeten Reagenzien vorgibt (Tab. 8). Man setzt zunächst in einem Eppendorf-Gefäß den sogenannten „Master-Mix“ an. Er enthält je nach PCR-Protokoll pro Probe je 1 μl der beiden Primer, 10 μl Reaktionspuffer, 5 μl dNTP und 0,25 μl der Taq-Polymerase. Für die PCR der AGT- und ECE- Fragmente waren zusätzlich noch 2,5 μl DMSO (AGT) und 5 μl Q-Solution (Qiagen) (ECE) nötig. Dies diente zur Optimierung der Reaktionsbedingungen. Der Ansatz wird mit Wasser aufgefüllt, so dass sich für jede einzelne Probe ein Volumen von 45 μl vor Zugabe der zu untersuchenden DNA ergibt. Der Master-Mix entspricht dann vom Gesamtvolumen der Anzahl der Proben, die man untersuchen möchte, der Positiv- und Negativkontrolle und zusätzlich einer Probe zum Ausgleich des Pipettierverlustes. Pro Ansatz wurden 28 Proben, eine Positiv- und eine Negativkontrolle bearbeitet. Man pipettierte für jede Probe 45 μl Master-Mix und je 5 μl zu untersuchende DNA in ein PCR-Reaktionsgefäß, abgesehen von dem mit der Negativkontrolle. Somit erhielt man ein Reaktionsvolumen von insgesamt 50 μl je Probe. Der Reaktionsansatz wurde gemischt und in den Thermocycler gestellt. Dieser führte nach entsprechender Programmierung die geeigneten Temperaturschritte zur Amplifizierung der gewünschten Genabschnitte durch.

2 MATERIALIEN UND METHODEN

ACE	AT-1	AGT	ECE
5 μ l DNA	5 μ l DNA	5 μ l DNA	5 μ l DNA
5 μ l dNTP	5 μ l dNTP	5 μ l dNTP	5 μ l dNTP
10 μ l RB 5x	10 μ l RB 5x	10 μ l RB 5x	10 μ l RB5x
1 μ l ACE-1	1 μ l AR-1	1 μ l AGT 2-1	1 μ l ECE P-1
1 μ l ACE-2	1 μ l AR-2	1 μ l AGT 2-2	1 μ l ECE P-2
0,25 μ l TaqGo	0,25 μ l TaqGo	2,5 μ l DMSO	5 μ l QSol
27,75 μ l H ₂ O	27,75 μ l H ₂ O	0,25 μ l TaqGo	0,25 μ l TaqGo
gesamt 50 μ l	gesamt 50 μ l	gesamt 50 μ l	gesamt 50 μ l

Tabelle 12: spezifische PCR-Protokolle
(DMSO und Q-Solution dienen der Optimierung der Reaktionsbedingungen)

5x Polymerase-Reaktionspuffer
dNTP (200 μ M dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
Q-Solution
DMSO
Taq-Polymerase

Tabelle 13: Reagenzien zur Durchführung der PCR

Fällung des PCR-Produktes: Um die Restriktionsverdau durchführen zu können, muss das Produkt der PCR zunächst ausgefällt werden. Zu jeder Probe wurden 2,5 μ l 4M NaCl und 125 μ l Eisäthanol (-20°C) zugegeben. Anschließend wurden die Proben bei -80°C für 30 Minuten gekühlt und für weitere 30 Minuten in der Kühlzentrifuge bei 4 °C und 12.000 U/min zentrifugiert. Die positiv geladenen Salzionen binden an die Phosphatgruppen der Nukleinsäuren. Durch die Zugabe von Äthanol wird Wasser entzogen, die DNA fällt aus. Durch das Zentrifugieren entstand ein DNA-Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes. Der flüssige Überstand wurde abgekippt und die Proben über Kopf ca. 15 Minuten getrocknet.

Reagenzien zur Fällung der DNA

- 4M NaCl
- Eisäthanol (99,9% Äthanol)

Restriktionsverdau: Die Restriktionsenzyme erkennen definierte Sequenzen in der DNA und schneiden diese. Die Sequenzen sind in der Regel 4-8 Nukleotide lang und werden hochspezifisch erkannt. Die Spaltung erfolgt durch Hydrolyse. Dadurch entstehen ein 3'-Hydroxy- und ein 5'-Phosphatende. Durch den Restriktionsverdau können bekannte Nukleotidaustausche nachgewiesen werden, durch die eine Schnittstelle verloren gegangen oder hinzugekommen ist. In dieser Studie wurden Enzymverdau für die Varianten des AT-1R, des AGT und des ECE-Gens durchgeführt. Für den Insertions-Deletions-Polymorphismus des ACE war dies nicht notwendig. Für jede Variante wurden spezifische Restriktionsenzyme verwendet. (Tabelle 14) Die Verdau wurden mit dem ausgefallenen DNA-Pellet angesetzt. Zu jeder DNA wurden das entsprechende Enzym, der zugehörige Puffer (Tabelle 15) und Wasser gegeben. Die

2 MATERIALIEN UND METHODEN

Protokolle sind bei jedem Enzym verschieden. Es werden immer 1 μl Puffer zugegeben; die Enzymkonzentrationen reichen von 0,1 μl Lwe I für AGT bis zu 1 μl Bcl I für AT-1R. (siehe Tabelle 16). Jeder Ansatz wurde mit H₂O auf ein Volumen von 10 μl aufgefüllt. Die Proben wurden gründlich gemischt und anzentrifugiert. Anschließend wurden sie bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur für mindestens vier Stunden inkubiert. Durch den Verdau entstanden DNA-Fragmente in unterschiedlichen Größen. Diese wurden durch Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Anfärbung sichtbar gemacht.

Enzym	Polymorphismus	Erkennungsstelle	Lagerung
Bcl I	AT-1R	5'... T,GATCA... 3' 3'... ACTAG·T... 5'	-20°C
Lwe I	AGT	5'... GCATC(N)5,... 3' 3'... ACTAG·T... 5'	-20°C
Tas I	ECE	5'... ,AATT... 3' 3'... TTAA... 5'	-20°C

Tabelle 14: Verwendete Enzyme: Fermentas

Puffer	Puffer für	Zusammensetzung
Buffer G	Bcl I	10 mM Tris-HCl (pH 7,5 bei 37°C), 10 mM MgCl ₂ , 50 mM NaCl, 0,1mg/ml BSA
Buffer Tango	Lwe I	33 mM Tris-acetate (pH 7,9 bei 37°C), 10 mM Mg-acetate, 66 mM K-acetate, 0,1mg/ml BSA
Buffer B	Tas I	10 mM Tris-HCl, (pH7,5 bei 37°C), 10 mM MgCl ₂ , 0,1mg/ml BSA)

Tabelle 15: Verwendete Puffer: Fermentas

	Enzym	Puffer	H ₂ O	Temperatur
AT-1R	1 μl Bcl I	1 μl Buffer G	8 μl	50 °C
AGT	0,1 μl Lwe I	1 μl Tango	8,5 μl	37 °C
ECE	0,5 μl Tas I	1 μl Buffer B	8,5 μl	65 °C

Tabelle 16: Protokolle der einzelnen Restriktionsverdaus

Gelelektrophorese: Die DNA-Fragmente sind durch ihre Phosphatgruppen negativ geladen. Im elektrischen Feld wandern sie deshalb vom Minus- zum Pluspol. Als Basis dient ein Agarosegel, das passend zur Größe der zu untersuchenden Fragmente ausgewählt wird. Für größere Fragmente verwendet man 1,5 %ige oder 2 %ige Agarose, für kleine Fragmente 2 %ige oder 3 %ige sogenannte LMP-Agarose. Sie bietet eine bessere Auflösung.

Verwendete Gele:

2 MATERIALIEN UND METHODEN

- ACE: 1,5 % Agarose
- AT-1R, AGT, ECE: 2 % LMP-Agarose

Gelherstellung: Die Agarose liegt in Pulverform vor. Es wurden je nach gewünschter Konzentration Agarose und Marathonpuffer gemischt und in einer Mikrowelle aufgekocht. Dabei wurde die Mischung mehrmals herausgenommen und geschwenkt, bis die Agarose sich vollkommen aufgelöst hatte und keine Schlieren mehr sichtbar waren. Die flüssige Agarose wurde anschließend auf einen Gelträger gegossen, dessen Öffnungen zuvor mit Tesafilm abgeklebt wurden. Dabei war darauf zu achten, dass beim Eingießen keine Luftblasen entstanden, die die Qualität des Gels beeinträchtigen könnten. An einem Ende und in der Mitte des Gelträgers wurden Käbme eingesetzt, die Taschen freihalten, in die später die DNA gefüllt wird. Nun ließ man die flüssige Agarose erkalten, wodurch ein festes Agarosegel entstand. Die Käbme und der Tesafilm wurden entfernt und das Gel auf dem Träger in eine Elektrophoresekammer mit Marathonpuffer gelegt.

Laden: Die verdaut DNA wurde mit 1,5 μ l Ficoll-Auftragspuffer vermengt. Der Puffer beschwert die Proben und soll so ein Aufschwimmen und Austreten aus den Taschen verhindern. Zudem dient er als Farbmarkierung. In die erste Tasche wurden 6 μ l DNA-Größen-Marker gegeben, in die folgenden Taschen die jeweiligen Proben. Je nach Gelgröße wurden 40-100 mA Spannung angelegt. Nach erfolgter Auftrennung wurde das Gel in einem Ethidiumbromid-Bad angefärbt. Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der an die DNA bindet. Er ist höchst mutagen. Hautkontakt muss deshalb unbedingt vermieden werden! Das angefärbte Gel wurde auf einem UV-Transilluminator durchleuchtet. Die der Größe nach aufgetrennten DNA-Fragmente werden so sichtbar. Zur Dokumentation wurde das Gel fotografiert.

Materialien Elektrophorese:

- Agarose/"low-melting-point" Agarose
- 10x TBE-Marathon-Puffer: 1,35 M Tris, 25 mM EDTA, 0,45 M Borsäure
- Ethidiumbromid (0,5 ng/ml)
- "DNA molecular weight marker" (1kb-Marker; 75-12216 Bp Fragmentgröße): 10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 10 mM EDTA, 0,015 % Bromphenolblau, 0,015 % Xylenecyanol FF, 10 % Glycerin
- Ficoll-Auftragspuffer: 15% Ficoll, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylenecyanol

Kontrolle und Kontaminationsvermeidung

Positiv- und Negativkontrollen: Bei jedem Ansatz wird eine sogenannte Negativkontrolle mitgeführt. Das bedeutet, dass sich in dem entsprechenden PCR-Reaktionsgefäß alle Komponenten des PCR-Protokolls befinden, aber keine DNA. Wird bei der Elektrophorese trotzdem eine Bande sichtbar, bedeutet dies, dass der Ansatz entweder mit genomischer DNA oder (wahrscheinlicher) mit PCR-Produkten kontaminiert ist. Die Positivkontrolle enthält die DNA eines Patienten, dessen Genotyp bekannt ist, und bei dem alle zu erwartenden Fragmente entstehen. Diese Kontrolle dient zur besseren Auswertung vor allem bei Ansätzen mit geringer Probenanzahl, bei denen der Genotyp möglicherweise nicht in allen Ausprägungen vorliegt.

2 MATERIALIEN UND METHODEN

Kontaminationsvermeidung: Wegen ihrer hohen Sensitivität können mittels PCR auch kleinste Mengen an DNA nachgewiesen werden. Das macht die PCR aber auch anfällig für Kontaminationen. Deshalb ist es notwendig, einige Vorkehrungen zu treffen: Zuerst werden die Reagenzien aliquotiert. Das dient dazu, dass im Falle einer Kontamination nicht das ganze Reagenz verunreinigt wird. Vor Gebrauch werden die Reagenzgefäße zentrifugiert, damit sich keine Tropfen mehr an der Verschlusskappe befinden. Außerdem darf die Innenseite der Verschlusskappe nicht berührt werden. Beim Erstellen des Mastermixes werden für jeden Arbeitsschritt ungebrauchte Einmalpipettenspitzen mit Aerosolfilter verwendet, damit die einzelnen Reagenzien und der Pipettenschaft nicht kontaminiert werden. Für das Pipettieren der DNA stehen eigene Pipetten bereit. Beim Arbeiten sind Einmalhandschuhe zu tragen, die häufig gewechselt werden sollten, vor allem nach dem Kontakt mit DNA. Des Weiteren werden Prä- und Post-PCR-Bereich streng räumlich getrennt.

Herstellernachweis

Präparation genomischer DNA

1,5 ml-Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Proteinase K	Qiagen, Hilden
”QuiaAmp blood minikit	Qiagen, Hilden
Pipetten ”Pipetman“	Gilson, Bad Camberg
Pipettenspitzen	Kisker, Steinfurt
Tischzentrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg

PCR

Pipetten ”Pipetman“	Gilson, Bad Camberg
Pipettenspitzen	Kisker, Steinfurt
PCR-Reaktionsgefäß	ABgene, Hamburg
Taq-DNA-Polymerase/ Reaktionspuffer	Promega, Mannheim
Primer	Thermo Electron Corporation, Ulm
DMSO	Sigma/Aldrich, Taufkirchen
Q-Solution	Qiagen, Hilden
dNTPs	Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler MJ-Research PTC 225	Biozym, Hess. Oldendorf

Restriktionsendonukleasen und Puffer

Bcl I	Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot
Lwe I	
Tas I	
Buffer Tango	
Buffer B	
Buffer G	

3 ERGEBNISSE

Post-PCR

Pipetten "Pipetman"	Gilson, Bad Camberg
Pipettenspitzen	Kisker, Steinfurt
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Gelträger	Invitrogen, Karlsruhe
Elektrophoresekammern	Invitrogen, Karlsruhe
Spannungsgeräte	Amersham Biosciences, Freiburg
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
"low melting point"-Agarose	Helena Biosciences, Heidelberg
Bromphenolblau	Sigma/Aldrich, Taufkirchen
Xylencyanol	Sigma/Aldrich, Taufkirchen
"DNA molecular weight marker"	Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot
Ficoll	Sigma/Aldrich, Taufkirchen
Äthanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma/Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Invitrogen, Karlsruhe
Video-Photo-Anlage	MWG-Biotech, Ebersberg

3 Ergebnisse

3.1 Verteilung der Genotypen

3.1.1 Verteilung der Genotypen im Einzelnen

- ACE: Homozygot für die Insertion waren 42 Kontrollen (21,00 %) und 41 Patienten (21,35 %). Heterozygot waren 99 Kontrollen (49,5 %), aber nur 79 Patienten (41,15 %). Das zeigt zwar nur eine Tendenz auf, läuft aber entgegen der Annahme, dass das D-Allel eine negative Auswirkung auf den Blutdruck hätte. Der deutlichste Unterschied zeigte sich bezüglich der Homozygotie für die Deletion: Sie kam bei 72 Patienten (37,50 %), aber nur bei 59 Kontrollen (29,50 %) vor. Dieser Unterschied war nicht statistisch signifikant ($p=0,1838$).
- AGT: In der Genotypverteilung ergaben sich keine nennenswerten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen ($p=0,9878$). Homozygot für den Wildtyp MM waren 68 der Kontrollen (34,00 %) und 64 der Patienten (33,33 %). Heterozygot MT waren 84 Kontrollen (42,00 %) und 82 Patienten (42,71 %). Noch geringer waren die Unterschiede bezüglich der Homozygotie für die Mutation mit 48 bei den Kontrollen (24,00 %) und 46 bei den Patienten (23,96 %).
- AT-1R: Homozygotie für den Wildtyp AA wiesen 93 Kontrollen (46,5 %) und 93 Patienten (48,44 %) auf. Heterozygot AC waren von den Kontrollen 82 (41,0 %) und von den Patienten 83 (43,23 %). Dagegen waren 25 (12,50 %) der Kontrollen homozygot für die Mutation CC und nur 16 (8,33 %) der Patienten. Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant ($p=0,4027$).
- ECE: Der Wildtyp CC kam bei 109 (54,5 %) der Kontrollen und 108 (56,25 %) der Patienten vor. Heterozygot waren 80 (40,0 %) der Kontrollen und 69 (35,94 %) der Patienten. Die Mutation AA war mit 15 (7,81 %) gegenüber 11 (5,50 %)

3 ERGEBNISSE

bei den Kontrollen bei den Patienten häufiger. Auch dieser Unterschied erwies sich als nicht statistisch relevant ($p=0,5301$).

3.1.2 Verteilung der Genotypen zusammengefasst

- ACE: In mehreren Studien wurde festgestellt, dass sich schon das Vorkommen eines Allels mit der Deletion auf die Plasmakonzentration des ACE auswirkt. Aus diesem Grunde haben wir die Genotyp-Verteilung nochmals genauer untersucht und dieses Mal DD und DI gegen II gesetzt. Die Konstellationen DD oder DI wiesen 158 (79 %) der Kontrollen und 151 (78,65 %) der Patienten auf. Homozygot für II waren 42 (21,0 %) der Kontrollen und 41 (21,35 %) der Patienten. Es konnten also erneut keine signifikanten Unterschiede in der Genotypverteilung zwischen Patienten und Kontrollen festgestellt werden ($p=0,9316$).
- AGT: Für das AGT haben wir ebenfalls die Allele so zusammengefasst, dass der Wildtyp MM den mutierten Allelen MT und TT gegenübergestellt wurde. Von den Kontrollen wiesen 68 (34,0 %) und von den Patienten 64 (33,33 %) den Wildtyp auf. MT oder TT kamen bei 132 (66,00 %) Kontrollen und 128 (66,67 %) Patienten vor. Auch hier konnten wir keinen signifikanten Unterschied feststellen ($p=0,8890$).
- AT-1R: Auch hier wurde postuliert, dass schon ein mutiertes Allel sich negativ auswirke. Deshalb haben wir den Wildtyp AA mit den Kombinationen AC und CC verglichen. Der Wildtyp kam bei 93 Kontrollen (46,5 %) und 93 Patienten (48,44 %) vor. AC oder CC wiesen 107 Kontrollen (53,50 %) und 99 Patienten (51,56 %) auf. Auch hier zeigte sich die Tendenz zur stärkeren Verbreitung des mutierten Allels bei den Kontrollen, doch auch dieses Mal war der Unterschied nicht signifikant ($p=0,7010$).
- ECE: In diesem Fall wurde die Mutation AA isoliert dem Wildtyp und der heterozygoten Form gegenübergestellt. Wie bereits in der vorhergehenden Untersuchung ergab sich ein Unterschied zwischen Kontrollen und Patienten von 11 (5,50 %) zu 15 (7,81 %). CA oder CC wiesen 189 Kontrollen (94,50 %) und 177 Patienten (92,19 %) auf. Der Unterschied in der Verteilung von AA war wie vorher nicht signifikant ($p=0,3577$).

3.2 Zusammenhang zwischen Hypertonie und Genotyp

- ACE: Postuliert wird eine negative Auswirkung des D-Allels. Zu dieser Untersuchung ließen sich aber keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der Genotypen zwischen Patienten mit und ohne Hypertonus finden ($p=0,7639$). Homozygot für die Deletion waren 17 der normotonen (36,96 %) und 45 der hypertonen Patienten (36,00 %). Heterozygotie wiesen 21 (45,65 %) der Patienten ohne und 52 (41,6 %) der Patienten mit Bluthochdruck auf. Von den Patienten mit normalem Blutdruck waren 8 (17,39 %) homozygot für die Insertion, bei denen mit erhöhtem Blutdruck waren es 28 (22,40 %).
- AGT: Die Mutation TT kam bei 29 hypertonen Patienten (23,2 %) und bei 9 nicht-hypertonen Patienten (19,57 %) vor. Die heterozygote Variante wiesen 20 (43,48 %) Patienten ohne und 53 (42,4 %) Patienten mit Bluthochdruck auf. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ($p=0,8730$). Der Wildtyp kam bei 17 (36,95 %) Normotonen und 43 (34,4 %) Hypertonen vor.

3 ERGEBNISSE

- AT-1R: Das mutierte Allel mit den möglicherweise negativen Auswirkungen ist hier C. Der Wildtyp AA kam bei 25 (54,35 %) Patienten ohne und 58 (46,40 %) mit Bluthochdruck vor. Heterozygot waren 18 (39,13 %) der Normotonen und 55 (44,0 %) der Hypertonen. Am deutlichsten war der Unterschied bezüglich der CC-Homozygoten: 12 (9,60 %) der hypertonen Patienten, aber nur 3 (6,52 %) der normotonen Patienten wiesen diesen Genotyp auf. Dieser Unterschied war aber wiederum nicht signifikant ($p=0,6103$).
- ECE: Der Wildtyp CC kam bei 29 (63,04 %) Patienten mit normalem und 66 (52,80 %) mit erhöhtem Blutdruck vor. Heterozygot waren 15 (32,61 %) der Normotonen und 48 (38,40 %) der Hypertonen. Ein deutlicher Unterschied fiel in der Verteilung der Mutation AA auf: 11 (8,80 %) der Patienten mit Bluthochdruck wiesen diesen Genotyp auf, und damit mehr als doppelt so viele als in der Gruppe der normotonen Patienten mit nur 2 (4,35 %). Auch das kann man aber nur als eine Tendenz sehen, denn der Unterschied erwies sich nicht als statistisch signifikant ($p=0,4029$).

3.3 Zusammenhang zwischen Genotyp und Geschlecht

Frauen sind insgesamt seltener als Männer von KHK betroffen. Gibt es eine unterschiedliche Verteilung von Risikovarianten bei Männern und Frauen und vor allem auch bei betroffenen und gesunden Frauen? Dieser Frage gingen wir nach, indem wir die Verteilung unterschiedlicher Genotypen bezüglich des Geschlechts bei Patienten und Kontrollen untersuchten. Für diesen Schritt fassten wir die Genotypen wieder wie bereits oben beschrieben zusammen.

- ACE: In der Gruppe der Patienten (158 Männer und 34 Frauen) waren 7 Patientinnen (20,59 %) homozygot für die Insertion. 27 (79,41 %) waren entweder homozygot für die Deletion oder heterozygot. Bei den männlichen Patienten waren 34 (21,52 %) homozygot für die Insertion und 124 (78,48 %) homozygot für die Deletion oder heterozygot. Innerhalb der Patientengruppe gab es also keine signifikanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern ($p=0,9044$). Bei den Kontrollen (171 Männer und 29 Frauen) waren 4 Frauen (13,79 %) homozygot für die Insertion und 25 (86,21 %) homozygot für die Deletion oder heterozygot. Bei den Männern waren es 38 (22,22 %) bzw. 133 (77,78 %). Auch hier waren die Unterschiede nicht nennenswert ($p=0,3028$). Auch beim Vergleich der Genotyp-Häufigkeiten zwischen den Patienten und Kontrollen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ($p=0,4789$ bei den weiblichen und $p=0,8775$ bei den männlichen Probanden).
- AGT: Von den Patientinnen waren 15 (44,12 %) homozygot für den Wildtyp, 19 (55,88 %) waren homozygot für die Mutation oder heterozygot. Bei den männlichen Patienten waren es 49 (31,01 %) und 109 (68,99 %) ($p=0,1414$). Von den weiblichen Kontrollen wiesen 10 (34,48 %) den Wildtyp auf und 19 (65,52 %) waren entweder homozygot für die Mutation oder heterozygot. Von den Männern in der Kontrollgruppe waren es 58 (33,92 %) und 113 (66,08 %) ($p=0,9527$). Die Unterschiede in der geschlechtsspezifischen Verteilung innerhalb der Gruppen waren nicht signifikant. Auch beim geschlechtsbezogenen Vergleich zwischen den Gruppen kam es zu keinem signifikanten Unterschied ($p=0,4359$ für die Frauen und $p=0,5741$ für die Männer).
- AT-1R: 22 Frauen in der Patientengruppe (64,71 %) waren homozygot für den Wildtyp AA. 12 (35,29 %) trugen die Ausprägungen AC oder CC. Bei

3 ERGEBNISSE

den Männern waren es 71 (44,94 %) und 87 (55,06 %). Dieser Unterschied in der Genotyp-Verteilung zwischen den Geschlechtern war statistisch signifikant ($p=0,0364$). In der Kontrollgruppe ergab sich eine ähnliche Verteilung der Genotypen mit 11 (37,93 %) Frauen die homozygot oder heterozygot für die Mutation waren im Vergleich zu 96 (56,14 %) Männern. Homozygot für den Wildtyp waren 18 (62,07 %) Frauen und 75 (43,86 %) Männer. In der Kontrollgruppe war dieser Unterschied aber knapp nicht signifikant ($p=0,0691$). Nichtsdestotrotz zeigt sich hier ein deutlicher Unterschied in der Verteilung des mutierten Allels zwischen Männern und Frauen generell, der in unserer Studie bei den Patienten noch ausgeprägter war. Der Unterschied zwischen den weiblichen Patienten und Kontrollen war aber nicht signifikant ($p=0,8258$).

- ECE: In der Gruppe der Patienten waren 4 (11,76 %) Frauen und 11 (6,96 %) Männer homozygot für das A-Allel. Homozygot für den Wildtyp oder heterozygot waren 30 (88,24 %) der Frauen und 147 (93,04 %) der Männer ($p=0,3438$). In der Kontrollgruppe gab es keine einzige Frau, die homozygot für die Mutation war. 29 (100 %) waren homozygote Träger des Wildtyps oder heterozygot. Bei den Männern waren es 11 (6,43 %) und 160 (93,57 %). Die Unterschiede waren nicht statistisch signifikant ($p=0,1600$). Auffallend war, dass in der Patientengruppe 4 Frauen homozygote Trägerinnen der Mutation waren, während es in der Kontrollgruppe keine einzige Frau mit dem Genotyp gab. Dieser Unterschied war knapp nicht signifikant ($p=0,0563$), zeigt aber eine Tendenz an.

3.4 Kombination der krankheitsverursachenden Genotypen

Um ein genetisches Risikoprofil zu erstellen, untersuchten wir Kombinationen von als negativ angesehenen Genotypen.

- Für die Gene des ACE und AT-1R untersuchten wir die Häufigkeit der Allel-Kombinationen DD oder DI und AC oder CC. Einen dieser Genotypen wiesen 83 (41,50 %) der Kontrollen und 77 (40,10 %) der Patienten auf. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit der als negativ postulierten Allele zwischen Kontrollen und Patienten ($p=0,7786$). Bei der genauen Aufschlüsselung ergaben sich folgende Häufigkeiten:
 - Träger beider Wildtypen: II/AA: 18 (9,0 %) Kontrollen, 19 (9,9 %) Patienten
 - Träger eines mutierten Allels: DD/AA: 32 (16,0 %) Kontrollen, 37 (19,27 %) Patienten DI/AA: 43 (21,5 %) Kontrollen, 37 (19,27 %) der Patienten II/CC: 7 (3,5 %) Kontrollen, 3 (1,56 %) Patienten II/AC: 17 (8,5 %) Kontrollen, 19 (9,9 %) Patienten
 - Träger zweier mutierter Allele: DD/AC: 21 (10,5 %) Kontrollen, 30 (15,62 %) Patienten; DD/CC: 6 (3,0 %) Kontrollen, 5 (2,6 %) Patienten; DI/AC: 44 (22,0 %) der Kontrollen, 34 (17,71 %) Patienten; DI/CC: 12 (6,0 %) Kontrollen, 8 (4,17 %) Patienten.

Auch diese Aufschlüsselung hatte keine signifikanten Unterschiede zum Ergebnis ($p=0,6303$).

- ACE - AGT: Hier standen im Zentrum des Interesses die Kombinationen DD oder DI und MT oder TT. 101 (50,50 %) Kontrollen und 98 (51,04 %) Patienten waren Träger einer dieser Konstellationen ($p=0,9146$).

3 ERGEBNISSE

- Träger beider Wildtypen: II/MM: 11 (5,5%) Kontrollen, 11 (5,73%) Patienten
- Träger eines mutierten Allels: DD/MM: 20 (10,0 %) Kontrollen, 23 (11,98 %) Patienten DI/MM: 37 (18,5 %) Kontrollen, 30 (15,62 %) Patienten II/MT: 17 (8,5 %) Kontrollen, 18 (9,38 %) Patienten II/TT: 14 (7,0 %) Kontrollen, 12 (6,25 %) Patienten
- Träger zweier mutierter Allele: DD/MT: 28 (14,0 %) Kontrollen, 35 (18,23 %) Patienten DD/TT: 11 (5,5 %) Kontrollen, 14 (7,29 %) Patienten DI/MT: 39 (19,5 %) Kontrollen, 29 (15,10 %) Patienten DI/TT: 23 (11,5 %) Kontrollen, 20 (10,42 %) Patienten

Weder bei den Genotyp-Kombinationen noch bei der Betrachtung der einzelnen Genotypen ergaben sich signifikante Unterschiede in der Verteilung ($p=0,8765$).

- AGT - AT-1R: Die Kombinationen der Allele MT oder TT mit AC oder CC wiesen 34,0 % ($n=68$) der Kontrollen und 36,46 % ($n=70$) der Patienten auf. Auch hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ($p=0,5417$).
 - Träger beider Wildtypen: MM/AA: 29 (14,5 %) Kontrollen, 35 (18,23 %) Patienten
 - Träger eines mutierten Allels: MM/AC: 29 (14,5 %) Kontrollen, 22 (11,46 %) Patienten; MM/CC: 10 (5,0 %) Kontrollen, 7 (3,65 %) Patienten; AA/MT: 43 (21,5 %) Kontrollen, 41 (21,35 %) Patienten; AA/TT: 21 (10,5 %) Kontrollen, 17 (8,85 %) Patienten.
 - Träger zweier mutierter Allele: MT/AC: 31 (15,5 %) Kontrollen, 38 (19,79 %) Patienten; MT/CC: 10 (5,0 %) Kontrollen, 3 (1,56 %) Patienten; TT/AC: 22 (11,0 %) Kontrollen, 23 (11,98 %) Patienten; TT/CC: 5 (2,5 %) Kontrollen, 6 (3,12 %) Patienten.

3.5 Zusammenhang zwischen Genotyp, Hypertonie und klinischen Endpunkten

Von den 192 Patienten des Kollektivs wurden nicht alle bezüglich der Endpunkte Symptome, Intervention oder Reoperation nachverfolgt. Auch die Daten zum Hypertonus waren nicht bei allen Patienten vorhanden. Wie viele Patienten für den jeweiligen Endpunkt untersucht wurden wird in jedem Abschnitt angegeben.

3.5.1 Variante - Hypertonie - Symptome

Zunächst untersuchten wir, ob es einen Zusammenhang zwischen bestimmten Varianten, Hypertonus und dem erneuten Auftreten von Angina-pectoris-Symptomen nach der Bypass-Operation gibt. Nachverfolgt wurden insgesamt 171 Patienten.

ACE 46 der 171 Patienten hatten keinen Hypertonus. Bei 31 dieser Patienten traten nach erfolgter Operation wieder Beschwerden auf. 12 von ihnen (38,71 %) waren homozygot für die Deletion, 14 (45,16 %) heterozygot und 5 (16,13 %) waren homozygot für die Insertion. Keine erneuten Beschwerden hatten 5 (33,33 %) Patienten mit Homozygotie für die Deletion, 7 (46,67 %) Heterozygote und 3 (20,0 %), die homozygot für die Insertion waren, also insgesamt 15 der 46 Patienten ohne Hypertonie. Die Gruppe der Patienten mit Hypertonus war mit 125 wesentlich größer. Von den

3 ERGEBNISSE

Patienten, die keine weiteren Beschwerden nach der Operation hatten, waren 14 (40,0 %) homozygot für die Deletion, 15 (42,86 %) heterozygot und 6 (17,14 %) homozygot für die Insertion. Prozentual gesehen ergaben sich keine nennenswerten Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen in Kombination mit Bluthochdruck und dem Endpunkt Symptome.

AGT Was auffiel war, dass über die Hälfte der Patienten ohne Hypertonus und ohne erneute Beschwerden (n=15) den Wildtyp MM aufwiesen (n=8, 53,33%). Bei den Patienten ohne Hypertonus und mit erneuten Beschwerden waren nur 9 (29,03 %) Träger des Wildtyps. 10 (28,57 %) der hypertonen Patienten ohne erneute AP-Symptomatik und 33 (36,67 %) mit Schmerzen auch nach der Operation trugen den Wildtyp. Dazu passende Unterschiede in der Verteilung der Mutation ließen sich aber nicht feststellen: Von den normotonen Patienten ohne Beschwerden waren 3 (20,0 %) homozygot für die Mutation. Bei den Normotonikern mit Beschwerden waren es 6 (19,35 %). In der Gruppe der Hypertoniker wiesen 13 (37,14 %) der Patienten ohne Beschwerden und 16 (17,78 %) mit erneuter Symptomatik die Mutation in homozygoter Form auf. Einen deutlichen Unterschied gab es bei den heterozygoten Patienten: 4 (26,67 %) der Normotonen ohne Symptome gegenüber 16 (51,61 %) derer mit erneuter Symptomatik waren heterozygot für die Mutation. Bei den Hypertonikern fiel die Differenz geringer aus: 12 (34,29 %) ohne und 41 (45,56 %) mit Beschwerden waren heterozygote Träger.

AT-1R 8 (53,33 %) der Patienten ohne Hypertonie und ohne Beschwerden waren Träger des Wildtyps AA, 6 (40,0 %) waren heterozygot und ein einziger Patient (6,67 %) war homozygot für die Mutation. Bei den Patienten mit erneuten Beschwerden trugen 17 (54,84 %) den Wildtyp. 12 (38,71 %) wiesen eine Heterozygotie und 2 (6,45 %) eine Homozygotie für die Mutation auf. Bei den Patienten mit Bluthochdruck waren 35 beschwerdefrei, davon 14 (40,0 %) mit dem Wildtyp, 18 (51,43 %) Heterozygote und 3 (8,57 %) Homozygote. Beschwerden nach der Operation hatten 90 Patienten, davon 44 (48,89 %), die den Wildtyp trugen, 37 (41,11 %) Heterozygote und 9 (10,0 %) Homozygote für die Mutation. Der Wildtyp war in allen Gruppen ähnlich häufig, wenngleich er in den normotonen Untergruppen etwas häufiger auftrat. Dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant.

ECE Auffallend war, dass kein einziger der Patienten ohne Bluthochdruck, die nach der Operation keine Beschwerden mehr hatten, die Mutation AA trug. Den Wildtyp trugen in dieser Gruppe 9 Patienten (60,0 %), 6 waren heterozygot (40,0 %). Von den Patienten mit Beschwerden waren 20 (64,52 %) Träger des Wildtyps, 9 (29,03 %) heterozygot und 2 (6,45 %) homozygot für die Mutation. Bei den Hypertonikern ohne Beschwerden trugen 17 (48,57 %) den Wildtyp. 14 (40,0 %) waren heterozygot und 4 (11,43 %) homozygot für die Mutation. Beschwerden hatten 49 (54,44 %) Patienten die den Wildtyp trugen, 34 (37,78 %) Heterozygote und 7 (7,78 %) Homozygote.

3.5.2 Genotyp - Hypertonie - PTCA

Als nächsten Schritt untersuchten wir die Patienten, die nicht nur Symptome hatten, sondern sich zudem einer PTCA unterziehen mussten. Es handelte sich dabei um insgesamt 160 Patienten.

3 ERGEBNISSE

ACE 42 dieser Patienten hatten keinen Bluthochdruck. 35 von ihnen mussten sich außerdem keiner weiteren PTCA unterziehen. 12 davon (34,29 %) waren homozygot für die Deletion, 18 (51,43 %) heterozygot und 5 (14,29 %) homozygot für die Insertion. Von den Patienten mit PTCA wiesen 4 (57,14 %) eine Homozygotie für die Deletion und ein einziger Patient (14,29 %) eine Homozygotie für die Insertion auf; 2 Patienten (28,57 %) waren heterozygot. Bei den Hypertonikern benötigten 78 keine PTCA; 33 (42,31 %) waren homozygot für die Deletion und 13 (16,67 %) für die Insertion. 32 (41,03 %) waren heterozygot. 9 Patienten (22,5 %) benötigten eine PTCA und waren homozygot für die Deletion, 17 (42,5 %) waren heterozygot und 14 (35,0 %) homozygot für die Insertion.

AGT Von den 35 normotonen Patienten ohne weitere PTCA waren 12 (34,29 %) Träger des Wildtyps, 17 (48,57 %) heterozygot und 6 (17,14 %) homozygot für die Mutation. Von den Patienten mit PTCA waren es 3 (42,86 %) und jeweils 2 (28,57 %). Von den Hypertonikern ohne PTCA hatten 30 (38,46 %) den Wildtyp. 29 (37,18 %) waren heterozygot und 19 (24,36 %) homozygot für die Mutation. Bei den Hypertonikern mit PTCA waren es 12 (30,0 %), 20 (50,0 %) und 8 (20,0 %).

AT-1R 17 (48,57 %) waren Träger des Wildtyps, 15 (42,86 %) heterozygot und 3 (8,57 %) homozygot für die Mutation. Von den 7 normotonen Patienten, die eine PTCA hatten, waren 4 (57,14 %) Träger des Wildtyps und 3 (42,86 %) heterozygot, aber kein einziger war homozygot für die Mutation. Von den Hypertonikern (n=118) brauchten 78 keine weitere PTCA. 35 von ihnen (44,87 %) trugen den Wildtyp, 36 (46,15 %) waren heterozygot und 7 (8,97 %) wiesen eine Homozygotie für die Mutation auf. Bei den übrigen 40, die sich einer PTCA unterziehen mussten, waren 19 (47,5 %) Träger des Wildtyps, 16 (40,0 %) heterozygot und 5 (12,5 %) homozygot für die Mutation. Eine geringe Häufung der Mutation bei den Patienten mit Bluthochdruck und PTCA war aber nicht signifikant. Ansonsten ist das Fehlen der Mutation bei den normotonen Patienten mit PTCA am ehesten durch die kleine Gruppe zu erklären.

ECE Über die Hälfte der normotonen Patienten, nämlich 23 (65,71 %), mussten sich keiner PTCA unterziehen und waren Träger des Wildtyps CC. 10 Patienten (28,57 %) waren heterozygot und nur 2 (5,71 %) homozygot für die Mutation. Von den Normotonen, die eine PTCA benötigten, trugen 4 (57,14 %) den Wildtyp, 3 (42,86 %) waren heterozygot und kein einziger war Träger der Mutation. Von den PTCA-freien hypertonen Patienten waren 40 (51,28 %) Träger des Wildtyps, 31 (39,74 %) heterozygot und 7 (8,97 %) homozygote Träger der Mutation. 23 (57,5 %) der Bluthochdruck-Patienten, die noch eine PTCA benötigten, trugen den Wildtyp, 14 (35,0 %) beide Allele und 3 (7,5 %) waren homozygot für die Mutation. Der Wildtyp kam somit geringfügig häufiger bei den normotonen Patienten ohne PTCA vor; außer dem vollkommenen Fehlen von Mutationsträgern bei den normotonen Patienten mit PTCA fielen keine Besonderheiten auf.

3.5.3 Genotyp - Hypertonie - Reoperation

In dieser Gruppe wurden wieder 171 Patienten bezüglich des Endpunktes "Reoperation" nachverfolgt. 125 davon hatten Bluthochdruck.

3 ERGEBNISSE

ACE Von den Patienten (n=171) hatten 46 eine Hypertonie und eine Reoperation. Davon waren 19 (33,33%) homozygot für die Deletion und 27 (47,37 %) heterozygot. 51 Hypertoniker mit mindestens einem D-Allel hatten keine Reoperation, 26 (38,24 %) davon waren DD und 25 (36,76 %) DI. 17 (25,0 %) Hypertoniker waren homozygot für die Insertion und hatten keine Reoperation, 11 (19,30 %) waren II und hatten eine Reoperation. 46 Patienten insgesamt hatten keine arterielle Hypertonie. Davon hatten 26 auch keine Reoperation; 9 (34,62 %) von ihnen wiesen den Genotyp DD auf, 13 (50,0 %) waren DI und 4 (15,38 %) den Genotyp II. Von den 20 Patienten (11,70 %) mit Reoperation waren 8 (40,0 %) Träger der Deletion, weitere 8 (40,0 %) waren heterozygot und 4 (20,0 %) homozygot für die Insertion.

AGT Träger des Wildtyps MM waren 12 (46,15 %) normotone Patienten ohne Reoperation und 5 (25,0 %) Patienten mit normalem Blutdruck und einer weiteren Bypass-Operation. Bei den Heterozygoten waren es jeweils 10 (38,46 % und 50,0 %). 4 (15,38 %) der Normotonen ohne Re-Op waren homozygot für die Mutation, bei den Patienten mit Operation waren es 5 (25,0 %). In der Gruppe der Hypertoniker benötigten 17 (25,0 %) keine weitere Operation und wiesen den Wildtyp auf. Bei den Heterozygoten waren es 32 (47,06 %). 19 Patienten in dieser Gruppe (27,94 %) trugen die Kombination TT. Von den Hypertonikern mit Reoperation wiesen 26 (45,61 %) den Wildtyp auf; 21 (36,84 %) waren heterozygot und 10 (17,54 %) homozygot für die Mutation.

AT-1R Von den normotonen Patienten ohne weitere Operation waren 14 (53,84 %) Träger des Wildtyps; 10 (38,46 %) waren heterozygot und 2 (7,69 %) homozygot für die Mutation. Bei den Patienten mit Reoperation waren 11 (55,0 %) homozygot für den Wildtyp, 8 (40,0 %) heterozygot und nur einer (5,0 %) homozygot. Bei den Hypertonikern ohne Reoperation wiesen 25 (36,76 %) den Wildtyp auf, 34 (50,0 %) waren heterozygot und 9 (13,24 %) homozygot für die Mutation. In der Gruppe der Re-Operierten trugen 33 (57,89 %) den Wildtyp, 21 (36,84 %) die heterozygote Konstellation und 3 (5,26 %) homozygot die Mutation. Auffälligkeiten in der Verteilung gab es bezüglich des Wildtyps in der Gruppe der Hypertoniker ohne Reoperation: Nur 25 (36,76 %) der Patienten wiesen diesen Genotyp auf, während er in allen anderen Untergruppen mit einer Häufigkeit von über 50 % vorkam. Im Gegenzug war der heterozygote Genotyp in dieser Gruppe häufiger als in den anderen Gruppen (n=34, 50,0 % vs. ca. 40 % in den anderen Gruppen). Auch die Mutation trat in dieser Gruppe häufiger auf als in den anderen; dabei war der Unterschied deutlicher als bei der heterozygoten Variante: 13,24 % (n=9) vs 5,0-7,69 %. Diese Unterschiede waren statistisch jedoch nicht signifikant.

ECE Wie auch schon zuvor bei der Untersuchung der Genotypen im Zusammenhang mit dem Endpunkt "erneute Symptome" trug in der Gruppe der normotonen Patienten ohne Reoperation keiner der Patienten die Mutation AA. In der Gruppe der Normotonen mit erneuter Operation waren es 2 Patienten (10,0 %), bei den operationsfreien Hypertonikern 5 (7,35 %) und bei den Bluthochdruckpatienten mit Operation 6 (10,53 %). Des Weiteren gab es keine besonderen Unterschiede: Von den Normotonen, operationsfreien Patienten waren 8 (30,77 %) heterozygot und 18 (69,23 %) homozygot für den Wildtyp. Bei denjenigen mit Reoperation waren es 7 (35,0 %) und 11 (55,0 %). Von den Patienten mit Bluthochdruck ohne Operation waren 26 (38,24 %) heterozygot und 37 (54,41 %) homozygot für den Wildtyp. In der Gruppe der Re-Operierten waren

3 ERGEBNISSE

es 22 (38,59 %) und 29 (50,88 %). Der Wildtyp trat somit geringfügig häufiger in der Gruppe der normotonen Patienten ohne erneute Operation auf (69,23 % vs 50,88 - 55 %). Dieser Unterschied erwies sich aber als nicht signifikant.

3.6 Zusammenhang zwischen Genotyp, Hypertonie und Kombinationen der klinischen Endpunkte

Zuletzt untersuchten wir die Zusammenhänge zwischen den einzelnen Genotypen, dem Vorhandensein eines Bluthochdrucks und Kombinationen einzelner Endpunkte. 160 Patienten wurden bezüglich aller Endpunkte nachverfolgt.

3.6.1 ACE

normotone Patienten

- keine klinischen Endpunkte: 12 Patienten wiesen keinen der Endpunkte „erneute AP-Symptomatik, PTCA oder Reoperation“ auf. Vier von ihnen (33,33 %) waren homozygot für die Deletion, 6 (50,0 %) heterozygot und zwei (16,67 %) homozygot für die Insertion.
- „erneute Symptome“: Insgesamt 9 Patienten ohne Bluthochdruck hatten erneut Symptome. Davon waren zwei (22,22 %) Träger der Deletion, sechs (66,67 %) heterozygot und ein Patient (11,11 %) homozygot für die Insertion.
- „erneute Symptome“ und PTCA: In diese Gruppe fielen nur zwei Patienten und beide waren homozygot für die Deletion.
- „erneute Symptome“ und Reoperation: Von 14 Patienten in dieser Gruppe waren sechs (42,86 %) homozygote Träger der Deletion, ebensoviele waren heterozygot und nur zwei Patienten (14,28 %) waren homozygote Träger der Insertion.
- „Kombination der drei Endpunkte“: Fünf Patienten wiesen alle drei Endpunkte auf. Von ihnen waren jeweils zwei (40,0 %) homozygot für die Deletion oder heterozygot, nur ein Patient (20,0 %) war homozygot für die Insertion.

hypertone Patienten

- keine klinischen Endpunkte: Vollkommen ohne erneute Beschwerden oder Eingriffe waren 33 Patienten. Davon waren 13 (39,39 %) homozygot für die Deletion, 14 (42,42 %) heterozygot und sechs (18,18 %) homozygot für die Insertion.
- „erneute Symptome“: Von 14 Patienten mit erneuter AP-Symptomatik waren acht (57,14 %) homozygot für die Deletion und jeweils drei (21,43 %) heterozygot und homozygot für die Insertion.
- „erneute Symptome“ und PTCA: Dies traf auf 19 Patienten zu, von denen vier (21,05 %) homozygot für die Deletion, sieben (36,84 %) heterozygot, und acht (42,11 %) homozygot für die Insertion waren.
- „erneute Symptome“ und Reoperation: Von 31 Patienten trugen 12 (38,71 %) die Deletion in homozygoter Form, 15 (48,39 %) waren heterozygot und vier (12,90 %) homozygot für die Insertion.
- „Kombination der drei Endpunkte“: Insgesamt 21 Patienten hatten einen Hypertonus und wiesen alle Endpunkte auf. Fünf (23,81 %) waren Träger der Deletion, 10 (47,62 %) waren heterozygot und sechs (28,57 %) homozygot für die Insertion.

3 ERGEBNISSE

3.6.2 AGT

normotone Patienten

- keine klinischen Endpunkte: In dieser Untergruppe von 12 Patienten waren die Hälfte (n=6, 50,0 %) Träger des Wildtyps. Vier Patienten (33,33 %) waren heterozygot und zwei (16,67 %) homozygot für die Mutation.
- „erneute Symptome“: Von 9 Patienten trugen drei (33,33 %) den Wildtyp, fünf (55,56 %) waren heterozygot und nur einer (11,11 %) war homozygot für die Mutation.
- „erneute Symptome“ und PTCA: Von den zwei Patienten in dieser Gruppe war einer Träger des Wildtyps und einer heterozygot (jeweils 50,0 %).
- „erneute Symptome“ und Re-Op: In der Gruppe mit 14 Patienten waren je drei (21,43 %) Träger des Wildtyps bzw. homozygot für die Mutation. Acht Patienten (57,14 %) waren heterozygot.
- „Kombination der drei Endpunkte“: Von den fünf Patienten in dieser Gruppe trugen je zwei (40,0 %) den Wildtyp bzw. die Mutation in der homozygoten Form. Heterozygot war ein Patient (20,0 %).

hypertone Patienten

- keine klinischen Endpunkte: Von den 33 Patienten in dieser Untergruppe waren jeweils 10 (30,30 %) Träger des Wildtyps oder heterozygot. 13 (39,39 %) waren homozygot für die Mutation.
- „erneute Symptome“: 14 Patienten hatten nach der ersten Operation wieder AP-Beschwerden. Davon waren vier (28,57 %) Träger des Wildtyps, acht (57,14 %) heterozygot und zwei (14,29 %) homozygot für die Mutation.
- „erneute Symptome“ und PTCA: Drei der 19 Patienten (15,79 %) wiesen den Wildtyp auf, 12 (63,16 %) waren heterozygot und vier (21,05 %) homozygot.
- „erneute Symptome“ und Re-Op: 16 der 31 Patienten (51,61 %) trugen den Wildtyp, 11 (35,48 %) waren heterozygot und vier (12,90 %) wiesen eine Homozygotie für die Mutation auf.
- „Kombination der drei Endpunkte“: Homozygot für die Mutation waren vier (19,05 %) der 21 Patienten. Eine Heterozygotie wiesen acht (38,10 %) und den Wildtyp neun (42,85 %) auf.

3.6.3 AT-1R

normotone Patienten

- keine klinischen Endpunkte: Von 12 Patienten waren fünf (41,67 %) Träger des Wildtyps. Von den übrigen sieben waren sechs (50,0 %) heterozygot und nur einer (8,33 %) homozygot für die Mutation.
- „erneute Symptome“: Jeweils vier von insgesamt neun Patienten (44,44 %) trugen den Wildtyp oder waren heterozygot. Wieder nur ein Patient (11,11 %) war homozygot für die Mutation.
- „erneute Symptome“ und PTCA: Alle beiden Patienten in dieser Gruppe waren Träger des Wildtyps.

3 ERGEBNISSE

- „erneute Symptome“ und Re-Op: Nur ein Patient (7,14 %) der 14 in dieser Gruppe war homozygot für die Mutation, fünf (35,71 %) waren heterozygot und acht (57,14 %) trugen den Wildtyp.
- „Kombination der drei Endpunkte“: Von den fünf Patienten waren drei (60,0 %) heterozygot. Die anderen zwei (40,0 %) waren Träger des Wildtyps.

hypertone Patienten

- keine klinischen Endpunkte: Von den 33 Patienten, die keine weiteren Endpunkte aufwiesen, waren über die Hälfte, nämlich 18 (54,54 %) heterozygot. 12 (36,36 %) waren Träger des Wildtyps und drei (9,09 %) homozygote Träger der Mutation.
- „erneute Symptome“: Auch hier war der überwiegende Teil heterozygot (n= 7, 50,0 %). Vier Patienten (28,57 %) trugen den Wildtyp und drei (21,43 %) die Mutation in der homozygoten Form.
- „erneute Symptome“ und PTCA: Von den 19 Patienten waren neun (47,37 %) heterozygot, 7 (36,84 %) Träger des Wildtyps und drei (15,79 %) homozygot für die Mutation.
- „erneute Symptome“ und Re-Op: Die Mutation kam in dieser Gruppe nur bei einem Patienten vor (3,23 %). Heterozygot waren 11 (35,48 %) der Patienten und 19 (61,29 %) trugen den Wildtyp.
- „Kombination der drei Endpunkte“: 12 Patienten (57,14 %) waren Träger des Wildtyps, sieben (33,33 %) heterozygot und zwei (9,52 %) homozygot für die Mutation.

3.6.4 ECE

normotone Patienten

- keine klinischen Endpunkte: Kein einziger der 12 Patienten ohne weitere Beschwerden wies den Genotyp AA auf. Heterozygot waren vier (33,33 %) und Träger des Wildtyps waren acht (66,67 %) der Patienten.
- „erneute Symptome“: Auch in der Gruppe der Patienten mit erneuter AP - Symptomatik war kein Patient homozygot für die Mutation. Den Wildtyp trugen acht der neun Patienten (88,89 %) und heterozygot war ein Patient (11,11 %).
- „erneute Symptome“ und PTCA: Von den zwei Patienten in dieser Gruppe war jeweils einer (50,0 %) heterozygot bzw. Träger des Wildtyps.
- „erneute Symptome“ und Re-Op: In dieser Gruppe von 14 Patienten trugen sieben (50,0 %) den Wildtyp, fünf (35,71 %) waren heterozygot und zwei (14,29 %) waren homozygot für die Mutation.
- „Kombination der drei Endpunkte“: Nur fünf Patienten wiesen eine Kombination aller drei Endpunkte auf. Wieder war keiner homozygot für die Mutation. Zwei Patienten waren heterozygot (40,0 %). Die weiteren drei waren Träger des Wildtyps (60,0 %).

hypertone Patienten

- keine klinischen Endpunkte: 33 Patienten hatten nach der Operation keine weiteren Symptome. Drei von ihnen (9,09 %) waren homozygot für die Mutation, 14 (42,42 %) waren heterozygot und 16 (48,48 %) Träger des Wildtyps.

4 DISKUSSION

- „erneute Symptome“: AP-Symptome nach der Operation hatten 14 Patienten. Keiner von ihnen war homozygot für die Mutation. 10 (71,43 %) wiesen den Wildtyp auf und vier (28,57 %) waren heterozygot.
- „erneute Symptome“ und PTCA: In dieser Gruppe waren 19 Patienten. 10 (52,63 %) trugen den Wildtyp, acht (42,11 %) wiesen eine Heterozygotie und ein einziger (5,26 %) eine Homozygotie für die Mutation auf.
- „erneute Symptome“ und Re-Op: Eine Reoperation ohne vorhergehende PTCA wiesen 31 Patienten mit Hypertonus auf. 14 von ihnen trugen den Wildtyp CC (45,16 %), 13 (41,94 %) waren heterozygot und vier (12,90 %) waren homozygot für das A-Allel.
- „Kombination der drei Endpunkte“: Eine Kombination der drei Endpunkte wiesen 21 Patienten auf. 13 von ihnen (61,90 %) waren Träger des Wildtyps, sechs (28,57 %) waren heterozygot und zwei (9,52 %) waren homozygot.

Insgesamt gab es bei der Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen den Genotypen und verschiedenen Kombinationen von Endpunkten keine signifikanten Unterschiede.

4 Diskussion

Die koronare Herzkrankheit ist eine multifaktorielle Erkrankung, bei der neben verschiedenen Umwelteinflüssen auch genetische Faktoren eine wichtige Rolle spielen. Die Liste der potentiellen Risikogene ist lang und oft gibt es von einem Gen nicht nur eine Variante. In dieser Studie wurden Nukleotidaustausche untersucht, die in Zusammenhang mit arterieller Hypertonie stehen. Im Zentrum des Interesses stand vor allem der Zusammenhang zwischen den einzelnen Genvarianten und dem Progress der KHK nach erfolgter Bypassoperation. In den bisherigen Studien kam es zu widersprüchlichen Ergebnissen. So fanden Tiet al. in der groß angelegten PEGASE-Study einen Zusammenhang zwischen AT-1R-Polymorphismen und dem Auftreten eines arteriellen Hypertonus.[72] Andere Studien konnten dies nicht bestätigen.[68] Das Gleiche gilt auch für die weiteren Polymorphismen des Renin-Angiotensin-Systems, von denen in dieser Studie der Deletions-/Insertions-Polymorphismus des ACE-Gens und der T235M-Polymorphismus des Angiotensinogen untersucht wurden.

Die Auswahl der untersuchten Varianten wurde anhand ihrer Relevanz in bereits durchgeführten Studien getroffen. So ergab die Studie von Funke-Kaiser [73] beispielsweise einen Zusammenhang zwischen dem C338A-Polymorphismus des ECE und der KHK; ein anderer Polymorphismus des ECE, T839G, hatte geringere Auswirkungen und diese nur in Zusammenspiel mit C338A.[73] Aus diesem Grund wurde hier nur der C338A-Polymorphismus untersucht. Die gleiche Vorauswahl wurde auch bei den anderen Genen getroffen.

Mittlerweile werden Untersuchungen zu Risikogenen anhand von groß angelegten genomweiten Studien durchgeführt. Diese Arbeit konzentriert sich auf Kandidatengene, also Gene, denen eine Rolle bei der Pathogenese der Atherosklerose zugesprochen wird. Im Zentrum unserer Untersuchungen stand eine Gruppe von Patienten mit manifester KHK, die bereits Bypass-Operationen hinter sich hatten und von denen viele im Bezug auf ihre Erkrankung progredient waren. Die Häufigkeiten der einzelnen Genotypen wurden verglichen mit der einer Gruppe von Kontrollpatienten, die nicht an koronarer Herzkrankheit oder einer Erkrankung litten, die sich in irgendeiner Weise auf die Blutgerinnung auswirkt. Bei der Verteilung der einzelnen Genotypen der

4 DISKUSSION

Gene ACE, AGT, AT-1R und ECE ergaben sich keine Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen. Da bereits in mehreren Studien postuliert wurde, dass sich schon das Vorhandensein eines mutierten Allels negativ auswirke, fassten wir die Individuen zusammen, die entweder homozygot oder heterozygot für die Mutation waren und stellten sie denen gegenüber, die den Wildtyp trugen. Allerdings kamen wir auch durch diese Gegenüberstellungen nicht zu signifikanten Ergebnissen.

Nachdem ein wichtiger Aspekt unserer Untersuchungen der Bluthochdruck war, betrachteten wir den Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein eines arteriellen Hypertonus und der Allel-Häufigkeit. Auch hier ließ sich kein Zusammenhang finden. Die Untersuchung von Kombinationen der als negativ postulierten Allele ergab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Zusätzlich untersuchten wir den Zusammenhang zwischen verschiedenen Genotypen und dem Auftreten unterschiedlicher Endpunkte, also unterschiedlichem Fortschreiten der KHK. Unsere Patienten waren nach erfolgter Bypassoperation zum Follow-up erschienen und es wurden erneute AP-Beschwerden, erneute Interventionen (PTCA oder Stent) und erneute Bypass-Operation als Endpunkte erfasst. Einen signifikanten Unterschied im Vorkommen der verschiedenen untersuchten Genvarianten bei unterschiedlichen Endpunkten gab es aber nicht. Das Gleiche galt für den Zusammenhang zwischen Genotyp, Bluthochdruck und einer Kombination verschiedener Endpunkte. Bei letzteren Untersuchungen bestand das Problem vor allem darin, dass durch das Aufteilen der Patienten in die Untergruppen nach Endpunkten und nach Endpunkt-Kombinationen die einzelnen Gruppen sehr klein wurden. Solch kleine Kollektive machen es beinahe unmöglich, eine signifikante Aussage zu erhalten. Die einzigen deutlichen Unterschiede gab es bei der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Genotyp und Geschlecht: Eine Homozygotie des A338-Allels des endothelin-converting enzyme" (ECE) wurde bei keiner einzigen weiblichen Kontrollperson, aber immerhin bei vier weiblichen Patienten gefunden. Der Unterschied fiel zwar nur sehr klein aus und war gerade nicht statistisch signifikant ($p=0,0563$), er entsprach aber der Erwartung, dass diese Mutation einen Einfluss auf die Entstehung von Atherosklerose und koronarer Herzkrankheit hat.[73] Dass in der aktuellen Studie der Unterschied nur so gering ausfiel, lag vor allem an der zu kleinen Anzahl untersuchter Frauen. Um eine Aussage machen zu können, müsste man eine deutlich größere Gruppe von Frauen untersuchen, so wie es in der EVA-Study von Funalot et al. erfolgte.[74] Dennoch zeigte sich auch in dieser Studie nur eine Tendenz in diese Richtung.

Die zweite Auffälligkeit bezog sich auf den Zusammenhang zwischen Geschlecht und den Varianten des AT-1R-Gens: Hier fiel ein deutlicher Unterschied in der Verteilung des mutierten Allels zwischen Männern und Frauen auf: Homozygot für die Mutation oder heterozygot waren sowohl in der Gruppe der Patienten als auch bei den Kontrollen über 55 % der Männer (Patienten 55,06 %, Kontrollen 56,14 %). Bei den Frauen dominierte der Wildtyp mit über 60 % (Patienten 64,17 %, Kontrollen 62,07 %). Statistisch signifikant war der Unterschied aber nur bei den Patienten ($P=0,0364$, bei den Kontrollen $p=0,0691$). Zwischen Patienten und Kontrollen gab es keinen nennenswerten Unterschied in der Häufigkeit der einzelnen Genotypen. Ergebnisse dieser Art eröffnen eine weitere Perspektive in der Genomforschung: Nicht nur der Unterschied in der Ausprägung verschiedener Genotypen zwischen Gesunden und Kranken, sondern vor allem auch zwischen Männern und Frauen sollten ein wichtiger Aspekt bei der Suche nach Risikogenen sein, insbesondere bei einer so komplexen Erkrankung wie der koronaren Herzkrankheit, die Männer häufiger betrifft als Frauen, dafür bei den Patientinnen deutlich ungünstiger verläuft.

5 Ausblick

Die Weiterentwicklung der technischen Möglichkeiten hat in den vergangenen Jahren zu immer neuen Ansätzen in der Genforschung geführt. Die aktuellen Studien beschäftigen sich nicht mehr primär mit einzelnen "Kandidaten-Genen". Es handelt sich um genomweite Analysen, die bei der Suche nach einem Zusammenhang zwischen Gen und Erkrankung unabhängig von bekannten Pathomechanismen erfolgen. So kam es zu der Entdeckung verschiedener neuer Genloci, die in Zusammenhang mit der koronaren Herzkrankheit stehen. Die Studie von Schunkert et al. identifizierte 13 neue Loci in Zusammenhang mit der KHK. Dabei wurden außerdem 10 von 12 bereits bekannten Genloci bestätigt. Nur drei der neu entdeckten Loci stehen Zusammenhang mit den klassischen Risikofaktoren, die meisten anderen liegen in Bereichen, die bisher nicht mit der KHK assoziiert wurden. In dieser Studie ergaben sich keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Verteilung der Risikoallele.[75] Der bisher am häufigsten reproduzierte Genlocus in Zusammenhang mit KHK liegt im Abschnitt p21.3 des Chromosom 9. Die beschriebene Region kodiert für zwei Cyclin-Kinase-abhängige Inhibitoren (CDKN2A, CDKN2B), die an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind. Dieser Genlocus ist ebenfalls mit Diabetes mellitus Typ II assoziiert. Möglicherweise liegt ein gemeinsamer, bisher noch ungeklärter Pathomechanismus zugrunde.[76] Auffallend war, dass 22 Prozent der Studienteilnehmer homozygot und 50 Prozent heterozygot für diesen Genlocus waren.[76] Es handelt sich dabei also um einen in der westlichen Bevölkerung weit verbreiteten Polymorphismus. Dies war auch bei einigen weiteren, in genomweiten Studien entdeckten Polymorphismen der Fall. Die Risikoerhöhung, bei Vorhandensein eines dieser Allele an einer KHK zu erkranken, scheint für den Einzelnen gering zu sein. Dennoch kommt es insgesamt in der Population zu einem deutlich erhöhten KHK-Risiko.[77] Der Genlocus 9p21.3 wurde auch in Zusammenhang mit Apoplex, Aneurysmata und pAVK gesehen. Mutmaßlich hat jede dieser Erkrankungen ein genetisches Risikoprofil, in dem neben anderen Allelen auch der 9p21.3-Polymorphismus eine Rolle spielt.[77] Ein wesentlicher Vorteil der genomweiten Analysen mittels Genchip-Arrays ist die Möglichkeit, große Kollektive zu untersuchen, was die Voraussetzung für eine hohe Aussagekraft ist. Entscheidend dafür ist aber auch, dass die untersuchten Kollektive homogen sind.[78] Andererseits kann eine zu große Homogenität des untersuchten Kollektivs, beispielsweise eine Selektion nach positiver Familienanamnese oder extremer Ausprägung der Erkrankung, die Anwendbarkeit der Ergebnisse für die Allgemeinbevölkerung beeinträchtigen.[76] Ein weiterer Schritt ist die Identifizierung der Pathomechanismen, über die die neu entdeckten Loci ihre Wirkung entfalten. Nur wenige dieser Loci befinden sich in Abschnitten bereits bekannter Polymorphismen. Die aktuell identifizierten Loci spielen häufig eine Rolle bei der Regulation des Zellwachstums. Auf diese Weise könnten sie eine Auswirkung auf die Entstehung, das Fortschreiten und auch die Instabilität von atherosklerotischen Plaques haben.[76] Noch ist unklar, ob die Kenntnis der Risikoallele zu neuen Präventions- oder Therapiemethoden führen kann.[77] Trotz der großen Fortschritte in der Genforschung ist weiterhin erst ein geringer Teil der genetischen Komponente der KHK geklärt. Jeder einzelne Polymorphismus scheint nur zu einem kleinen Teil zur Entstehung der Krankheit beizutragen. Insbesondere der Mechanismus, der bei der familiär gehäuften KHK eine Rolle spielt, ist weiterhin unentdeckt. Ihm liegt offenbar ein bisher noch nicht entdeckter Polymorphismus zugrunde.[77] Auffallend ist auch, dass sich in den aktuellen repräsentativen Studien kein wesentlicher Unterschied in der Allelhäufigkeit zwischen Männern und Frauen zeigte. Obwohl die Krankheit geschlechtsabhängig unterschiedlich verläuft, ist noch keine Erklärung dafür auf genetischer Basis gefunden worden.

6 DANKSAGUNG

Die aktuelle Entwicklung der Genforschung hat zu vielen neuen und zum Teil unerwarteten Ergebnissen geführt. Für die Umsetzung in die medizinische Praxis müssen aber noch weitere Zusammenhänge geklärt werden.

6 Danksagung

Mein Dank gilt Frau PD Dr. med S. Eifert, Herzchirurgische Klinik und Poliklinik der LMU München für ihre unermüdliche Unterstützung und Motivation auch über diesen langen Zeitraum hinweg. Außerdem danke ich PD. Dr. med. P. Lohse, Institut für Klinische Chemie des Klinkums Großhadern, LMU München, für die Einführung in die Methoden der Genreplikation, und seinem Team für die Unterstützung bei meiner Tätigkeit im Labor. Frau Dr. rer.nat. D. Nagel, Institut für Klinische Chemie des Klinkums Großhadern, LMU München, danke ich für die Hilfe bei der statistischen Analyse meiner Ergebnisse.

Literatur

- [1] *Duale Reihe Innere Medizin, Sonderausgabe MLP; H.-W. Baenkler et al., 2001, Thieme Verlag*
- [2] Statistisches Bundesamt: Statistik zu Todesursachen in Deutschland 2005
- [3] Dzau VJ, Liew CC. Cardiovascular Genetics and Genomics for the Cardiologist *Blackwell Futura*
- [4] Lusis AJ, Fogelman AM, Fonarow GC. Genetic Basis of Atherosclerosis: Part I - New Genes and Pathways *Circulation* 2004 **110**, 1868-1873
- [5] Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986 **232** 34-47
- [6] Sijbrands EJ, Westendorp RG, Defesche JC, et al. Mortality over two centuries in large pedigree with familial hypercholesterolaemia: family tree mortality study. *BMJ* 2001 **322** 1019-1023
- [7] Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 1988 **240**, 622-630
- [8] Cohen JC, Vega GL, Grundy SM. Hepatic lipase: new insights from genetic and metabolic studies. *Curr Opin Lipidol.* 1999 **10** 259-267
- [9] Boerwinkle E, Leffert CC, Lin J, et al. Apolipoprotein(a) gene accounts for greater than 90% of the variation in plasma lipoprotein(a) concentrations. *J Clin Invest.* 1992 **90** 52-60
- [10] Lusis AJ, Ivandic B, Castellani LW. Lipoprotein and lipid metabolism. In: *Rimoin DL, Conner JM, Pyeritz RE, et al, eds. Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics. 4th ed. London, England: Churchill Livingstone; 2002* 2500-2537
- [11] Tward A, Xia YR, Wang XP, et al. Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. *Circulation.* 2002 **106** 484-490
- [12] Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001 **21** 473-480
- [13] Shih DM, Reddy S, Lusis AJ. CHD and atherosclerosis: human epidemiological studies and transgenic mouse models. In: *Costa LG, Furlong CE, eds. Paraoxonase (PON1) in Health and Disease: Basic and Clinical Aspects. Boston, Mass: Kluwer Academic Publishers; 2002* 93-117
- [14] Reilly MP, Rader DJ. The metabolic syndrome: more than the sum of its parts? *Circulation* 2003 **108** 1546-1551
- [15] Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, et al. The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat Genet.* 2000 **26** 76-80
- [16] Goodarzi MO, Guo X, Taylor KD, et al. Lipoprotein lipase is a gene for insulin resistance in Mexican Americans. *Diabetes* 2004 **53** 214-220
- [17] Hingorani AD. Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase and atherogenesis: John French Lecture 2000 *Atherosclerosis* 2000 **154** 521-27
- [18] Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J et al. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298 - Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK *Circulation* 1999 **100** 1515-20

LITERATUR

- [19] Cai H, Wilcken DEL, Wang XL. The glu198-asp (894G-T) mutation at exon 7 of the endothelial nitric oxide synthase gene and coronary artery disease. *J Mol Med* 1999 **77** 511-14
- [20] Nakayama M, Yasue H, Michihiro Y et al. T786-C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm *Circulation* 1999 **99** 2864-70
- [21] Albrecht EWJA, Stegeman CA, Heeringa P et al. Protective role of endothelial nitric oxide synthase *J Pathol* 2003 **199** 8-17
- [22] Dwyer JH, Allayee H, Dwyer KM et al. Arachidonate 5-lipoxygenase promoter genotype, dietary arachidonic acid, and atherosclerosis. *N Engl J Med* 2004 **350** 29-37
- [23] Mehrabian M, Allayee H, Wong J et al. Identification of 5-lipoxygenase as a major gene contributing to atherosclerosis susceptibility in mice. *Circ Res* 2002 **91** 120-26
- [24] Lotzer K, Funk CD, Habenicht AJ. The 5-lipoxygenase pathway in arterial wall biology and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta* 2005 **1736** 30-37
- [25] Yamada A, Ichihara S, Murase Y et al. Lack of association of polymorphisms of the lymphotoxin alpha gene with myocardial infarction in Japanese. *J Mol Med* 2004 **82** 477-83
- [26] Maresca G, DiBlasio A, Marchioli R et al. Measuring plasma fibrinogen to predict stroke and myocardial infarction: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999 **19** 1368-1377
- [27] Tan KT, Lip GY. Platelets, atherosclerosis and the endothelium: new therapeutic targets? *Expert Opin Invest Drugs* 2003 **12** 1765-76
- [28] Boy O, Behrenbeck DW, Breithardt G et al. Perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA). BQS Bundesgeschäftsstelle für Qualitätssicherung GmbH *BQS Qualitätsreport* 2002, 150-165
- [29] Bruckenberg E *Herzbericht* 2002, 28
- [30] Bauters C, Hubert E, Prat A et al. Predictors of restenosis after coronary stent implantation *J Am Coll Cardiol* 1998 **31**, 1291-1298
- [31] Kastrati A, Schönig A, Elezi S et al. Predictive factors of restenosis after coronary stent placement *J Am Coll Cardiol* 1997 **30**, 1428-1436
- [32] Mudra H, Levenson B, Bode C et al. Positionspapier zum Einsatz von medikamenten-freisetzenden Stents bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit *Z Kardiol* 2004 **93**, 416-422
- [33] Silber S, Albertson P, Aviles FF et al. European guidelines for percutaneous coronary interventions (PCI) *Eur Heart J* 2004
- [34] R. Klinke, S. Silbernagl *Lehrbuch der Physiologie, 4. Auflage* 2003, Thieme Verlag
- [35] Crowley SD, Gurley SB, Oliverio MI et al. Distinct roles for the kidney and systemic tissues in blood pressure regulation by the renin-angiotensin system. *J Clin Invest* 2005 **115**, 1092-99
- [36] Haynes WG, Ferro CJ et al.: Systemic endothelin receptor blockade decreases peripheral vascular resistance and blood pressure in humans. *Circulation* 1996 **93** 1860-1870.

LITERATUR

- [37] Yanigasawa H, Yanigasawa M. et al.: Dual genetic pathways of endothelin-mediated intercellular signaling revealed by targeted disruption of endothelin converting enzyme- 1 gene. *Development* **125** 825-836.
- [38] Sakurai T, Yanigasawa M, Takuwa Y et al. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor *Nature* **1990** **348** 732-735
- [39] Kedzierski RM, Yanigasawa M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2001** **41**, 851-876
- [40] Boulanger CM, Tanner FC, Bea ML et al. Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. *Circ Res.* **1992** **70** 1191-1197
- [41] Qui N, Rapp JP, Brabd PH et al. Body fluid expansion is not essential for salt induced hypertension in SS/Jr rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **1999** **277**, R1392 - R1400
- [42] Guimaraes S, Moura D. Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol Rev* **2001** **53**, 319 - 356
- [43] Asico LD, Ladines C, Fuchs S et al. Disruption of the dopamine D3 receptor produces renin-dependent hypertension. *J Clin Invest* **1998** **102**, 493-498
- [44] Bek MJ, Wang X, Asico LD et al. Angiotensin II type I receptor-mediated hypertension in D4 dopamine receptor-deficient mice. *Hypertension* **2006** **47**, 288-95
- [45] Huang PL, Huang Z, Mashimo H et al. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthetase *Nature* **1995** **377**, 196-97
- [46] Duplain H, Burcelin R, Sartori C et al. Insulin resistance, hyperlipidemia and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* **2001** **104**, 342-45
- [47] Alfie ME, Sigmon DH, Pomposiello SI et al. Effect of high salt intake in mutant mice lacking bradykinin-B2 receptors. *Hypertension* **1997** **29**, 483-87
- [48] Touyz R. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress and redox signalling in hypertension. *Hypertension* **2004** **44**, 248-52
- [49] Schillaci G, Pirro M, Gemelli L et al. Increased C-reactive protein concentrations in never-treated hypertension: the role of systolic and pulse pressures. *J Hypertens* **2003** **21**, 1841-46
- [50] Murken J, Cleve H. *Humangenetik, 6. Auflage* 1996 S.18, Ferdinand Enke Verlag Stuttgart
- [51] Buselmaier W, Tariverdian G. *Humangenetik, 4. Auflage* 2007 Springer Verlag
- [52] Ortega EH, Fernandez-Aceituno AM, Esparragon FJR et al. The involvement of the renin-angiotensin system gene polymorphisms in coronary heart disease. *Rev Esp Cardiol* **2002** **55** 92-99
- [53] Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV et al. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell* **1992** **71** 169-180
- [54] Niu T, Xu X, Rogus J et al. Angiotensinogen gene and hypertension in Chinese. *J Clin Invest* **1998** **101** 188-194
- [55] Ward K, Hata A, Jeunemaitre X et al. A molecular variant of angiotensinogen is associated with preeclampsia. *Nat Genet* **1993** **4** 59-61

LITERATUR

- [56] Inoue I, Nakajima T, Williams C.S. et al. A nucleotide substitution in the promoter of human angiotensinogen is associated with essential hypertension and affects basal transcription in vitro. *J Clin Invest* 1997 **99** 1786-1797
- [57] Cambien F, Poirier O, Leclerc L et al. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 1992 **359** 641-644
- [58] Evans AE, Poirier O, Kee F et al. Distribution of the angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in subjects who die of coronary heart disease. *QJ Med* 1994 **87** 211-214
- [59] Ludwig EH, Corneli PS, Anderson JL et al. The ACE insertion/deletion polymorphism is independently associated with myocardial infarction and body mass index but not stenosis. *Circulation* 1993 **88** I-364
- [60] Bohn M, Berge KE, Bakken A et al. Insertion/deletion (I/D) polymorphism at the locus for angiotensin I-converting enzyme and myocardial infarction. *Clin Genet* 1993 **44** 292-297
- [61] Kreutz T, Lindpaintner K, Pfeiffer MA et al. Angiotensin-converting enzyme genotype and risk for coronary heart disease. *Circulation* 1993 **88** I-510
- [62] Schunkert H, Hense HW, Homer SR et al. Association between a deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and left ventricular hypertrophy. *New England Journal of Medicine* 1994 **330** 1634-1638
- [63] Montgomery HE, Clarkson P, Dollery CM et al. Association of angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism with change in left ventricular mass in response to physical training. *Circulation* 1997 **96** 741-747
- [64] Wolny A, Clozel JP, Rein J et al. Functional and biochemical analysis of angiotensin II-forming pathways in the human heart. *Circ. Res.* 1997 **80** 219-227
- [65] Pastore L, Tessitore A, Martinotti S et al. Angiotensin II stimulates intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by human vascular endothelial cells and increases soluble ICAM-1 release in vivo. *Circulation* 1999 **100** 1646-1652
- [66] Herzig TC, Jobe SM, Aoki H et al. Angiotensin II type 1a receptor gene expression in the heart: AP1 and GATA-4 participate in the response to pressure overload. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 **94** 7543-7548
- [67] Inoue Y, Nakamura N, Inagami T. A review of mutagenesis studies of angiotensin II type 1 receptor, the three-dimensional receptor model in search of the agonist and antagonist binding site and the hypothesis of a receptor activation mechanism. *J Hypertens* 1997 **15** 703-714
- [68] Alvarez R, Reguero JR, Batalla A et al. Angiotensin-converting enzyme and angiotensin II receptor 1 polymorphisms: association with early coronary disease. *Cardiovascular Research* 1998 **40** 375-379
- [69] Bonnardeaux A, Davis E, Jeunemaitre X et al. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. *Hypertension* 1994 **24** 63-69
- [70] Amant C, Hamon M, Bauters C et al. The angiotensin-II type I receptor gene polymorphism is associated with coronary artery vasoconstriction. *J Am Coll Cardiol* 1997 **29** 486-490
- [71] Osterop AP, Kofflard MJM, Sandkuijl LA et al. AT1 receptor A/C 1166 polymorphism contributes to cardiac hypertrophy in subjects with hypertrophic cardiomyopathy. *Hypertension* 1998 **32** 825-830

LITERATUR

- [72] Tiret L, Bonnardeaux A, Poirier O et al. Synergistic effects of angiotensin-converting enzyme and angiotensin-II type 1 receptor gene polymorphisms on risk of myocardial infarction. *The Lancet* 1994 **344** 910-913
- [73] Funke-Kaiser H, Reichenberger F, Köpke K et al. Differential binding of transcription factor E2F-2 to the endothelin-converting enzyme-1b promotor affects blood pressure regulation. *Human Molecular Genetics* 2003 **12**;4 423-433
- [74] Funalot, Benoit, Courbon et al. Genes encoding endothelin-converting enzyme and endothelin-1 interact to influence blood pressure in women: The EVA study. *J Hypertens* 2004 **22** 739-743
- [75] Schunkert H, König I, Kathiresan S et al. Large scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease. *Nature Genetics* 2011 **6**
- [76] Samani N, Erdmann J, Hall A et al. Genomewide association analysis of coronary artery disease. *The New England Journal of Medicine* 2007 **357**,5 443-453
- [77] Erdmann J, Linsel-Nitschke P, Schunkert H. Genetic causes of myocardial infarction *Deutsches Ärzteblatt International* 2010 **107(40)** 694-699
- [78] Preuss M, König I, Thompson J, Erdmann J et al. Design of Coronary Artery Disease Genome-Wide Replication And Meta-Analysis (CARDIOGRAM) Study *Circ Cardiovasc Genet* 2010 **3** 475-483