

Aus dem Institut für Klinische Chemie - Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Dietrich Seidel

**Einfluss von Risikofaktoren auf die Progression der Atherosklerose nach erfolgter
aortokoronarer Bypassoperation: Prädisposition durch
Genvarianten**

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

vorgelegt von
Astrid Rasch
aus
München

2007

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. med. habil. Peter Lohse

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. M. Weis

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Sandra Eifert

Dekan: Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 15. März 2007

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	6
1.1	Zielsetzung und Hintergrund der Arbeit	6
1.2	Koronare Herzerkrankung	6
1.2.1	Definition und Epidemiologie	6
1.2.2	Ätiologie	7
1.2.3	Pathogenese	7
1.2.4	Symptomatik	8
1.2.5	Genetik	8
1.2.6	Analysierte Polymorphismen und Mutationen	9
1.2.6.1	Apolipoprotein E (Apo E)	9
1.2.6.2	Hepatische Lipase (HL)	11
1.2.6.3	Cholesteryl-Ester-Transfer-Protein (CETP)	12
1.2.6.4	Faktor V-Leiden (FVL)/Aktivierte Protein C (APC)-Resistenz	13
1.2.6.5	Prothrombin (PT)	14
1.2.6.6	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI-1)	16
1.2.6.7	Endotheliale Nitroxid-Synthase (eNOS)	17
1.2.7	Therapie	19
1.2.7.1	Medikamentöse Therapie	19
1.2.7.2	Operative Revaskularisation	19
1.3	Aortokoronare Bypassoperation	20
1.4	Perkutane transluminale koronare Angioplastie (PTCA)	21
2.	Material und Methoden	22
2.1	Patientenkollektiv	22
2.2	Methoden	24
2.2.1	Präparation genomischer DNA aus EDTA-Vollblut	24
2.2.2	Arbeitsschritte zur Durchführung der PCR	25
2.2.2.1	Präzipitation der DNA mit Äthanol	27
2.2.2.2	Restriktionsverdau	27
2.2.2.3	Agarose-Gelelektrophorese zur Charakterisierung der PCR-Produkte	27
2.2.3	Mitführen von Positiv- und Negativkontrollen	29

2.2.4	Vorsichtsmaßnahmen zur Kontaminationsvermeidung	29
2.3	Material	30
2.3.1	Genomische DNA	30
2.3.2	Oligonukleotidprimer	30
2.3.3	Enzyme	32
2.3.4	Herstellernachweis	33
2.4	Analyse der Mutationen und Polymorphismen	35
2.4.1	Apolipoprotein E (ApoE)	36
2.4.2	Hepatische Lipase (HL)	37
2.4.3	Cholesteryl-Ester-Transfer-Protein (CETP)	37
2.4.4	Faktor V-Leiden (FVL)-Mutation	38
2.4.5	Prothrombin (PT)-/Gerinnungsfaktor II-G20210A-Mutation	38
2.4.6	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1)	39
2.4.7	Endotheliale Nitroxid-Synthase (eNOS)	39
2.5	Statistische Auswertung und verwendete Computerprogramme	40
2.5.1	Erfassung klinischer Endpunkte	40
3.	Ergebnisse	41
3.1	Demographische Daten	41
3.1.1	Klinische Endpunkte	41
3.2	Präoperative Risikofaktoren und Fortschreiten der KHK	42
3.3	Perioperative Daten und Fortschreiten der KHK	44
3.4	Einzelne Genvarianten und Fortschreiten der KHK	46
3.4.1	Apolipoprotein E (ApoE)	47
3.4.2	Hepatische Lipase (HL)	48
3.4.3	Endotheliale Nitroxid-Synthase (eNOS)	48
3.4.4	PAI-1/FVL/PT/CETP	50
3.5	Genetisches Risikoprofil und Fortschreiten der KHK	51
4.	Diskussion	55
4.1	Der Apo E-Polymorphismus	56
4.2	Der HL-T202T-Polymorphismus	56
4.3	Die -629C/A-Mutation im Promotor des CETP-Gens	57

4.4	Die FVL-G1691A- und die PT-G20210A-Mutation	58
4.5	Der PAI-1 -675 4G/5G-Polymorphismus	59
4.6	Der NOS3-4ab-Polymorphismus	61
4.7	Erstellung eines genetischen Risikoprofils	62
5.	Literaturverzeichnis	65
6.	Anhang	75
6.1	Tabellenverzeichnis	75
6.2	Abbildungsverzeichnis	77
7.	Danksagung	78
8.	Lebenslauf	79

1. Einleitung

1.1 Zielsetzung und Hintergrund der Arbeit

Die koronare Herzerkrankung schreitet auch nach primärer aortokoronarer Bypassoperation häufig fort und kann zu erneuten pektangiösen Beschwerden führen, so dass eine Reintervention indiziert ist. Grundlage dieser Arbeit ist die Hypothese, dass sowohl die bekannten klassischen Risikofaktoren der Atherosklerose als auch genetische Dispositionen mit dem Fortschreiten der koronaren Herzkrankheit assoziiert sein können (53, 60). Ziel der vorliegenden Untersuchung ist es, den Einfluss bestimmter Genvarianten auf die Progression der KHK zu analysieren.

1.2 Koronare Herzerkrankung (KHK)

1.2.1 Definition und Epidemiologie

Die Definition der WHO für Atherosklerose lautet:

„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.“

Die KHK ist die Manifestation der Atherosklerose an den Herzkranzarterien. Bedingt durch Gefäßwandveränderungen kommt es zu flusslimitierenden Koronarstenosen und folglich zur Koronarinsuffizienz, d.h. einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und –angebot im Herzmuskel. Die dadurch hervorgerufene Myokardischämie hat verschiedene Manifestationen wie Angina pectoris, Herzinfarkt, Herzrhythmusstörungen und plötzlichen Herztod zur Folge.

Kardiovaskuläre Erkrankungen stehen in den Industrienationen an erster Stelle der Todesursachen. Die koronare Herzkrankheit (KHK) und der Myokardinfarkt sind die Hauptkomplikationen der Atherosklerose und die häufigste Todesursache in der westlichen Welt (68). Die Lebenszeitprävalenz für eine koronare Herzerkrankung (KHK) beträgt in

Deutschland für Männer 30 %, für Frauen 15 % (m : w = 2 : 1). Am häufigsten tritt eine Angina pectoris oder ein Herzinfarkt als Erstmanifestation auf.

1.2.2 Ätiologie

Durch eine Vielzahl von epidemiologischen und experimentellen Untersuchungen sind die Faktoren, die eine Atherosklerose begünstigen (sogenannte Risikofaktoren), bekannt. Man unterscheidet dabei Risikofaktoren erster und zweiter Ordnung. Zu den Risikofaktoren erster Ordnung zählen Hyperlipidämie, Bluthochdruck, Diabetes mellitus und Zigarettenrauchen. Zu den Risikofaktoren zweiter Ordnung zählen erhöhtes Lipoprotein (a), Hyperfibrinogenämie, Hyperhomocysteinämie, Antiphospholipid-Antikörper, genetisch bedingte Gewebe-Plasminogen-Aktivator (t-PA-)-Defekte sowie die Adipositas. Unbeeinflussbar hingegen sind familiäre Disposition, Lebensalter und das männliche Geschlecht.

1.2.3 Pathogenese

Am Anfang der Pathogenese der koronaren Herzkrankheit steht eine endotheliale Dysfunktion. Durch die Störung der Endothelfunktion kommt es einerseits zu einer Einschwemmung von LDL-Cholesterin in die Intima und andererseits zu einer Einwanderung von Monozyten infolge einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen. Diese wandeln sich in der Intima zu Makrophagen um, die über LDL-Rezeptoren Cholesterin aufnehmen. Das Cholesterin kann zusammen mit ApoE sezerniert werden. Es wird an "high density"-Lipoproteine (HDL) im Plasma gebunden und gelangt mit diesen Lipoproteinpartikeln in die Leber, wo es verstoffwechselt wird. Dieser sogenannte reverse Cholesterintransport stellt einen Schutzmechanismus vor einer Atherosklerose dar. Bei einem Überangebot von Cholesterin werden die Makrophagen jedoch in Schaumzellen umgewandelt. Die Makrophagen sezernieren u.a. Interleukin-1 und den Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF- α). Ein weiterer Mechanismus ist die Adhäsion von Thrombozytenthromben. Der von Thrombozyten und auch von Makrophagen sezernierte "platelet-derived growth factor" (PDGF) regt die glatten Muskelzellen zur Proliferation an. Sie wandeln sich um, bilden u.a. Kollagen, Elastin und Proteoglykane und führen somit zu einem bindegewebigen Umbau. Die Matrix kann sekundär verkalken.

Entsprechend der Querschnittsverminderung unterscheidet man vier Schweregrade der Koronarstenosen:

Grad I:	25 – 49 %	
Grad II:	50 – 74 %	(signifikante Stenose)
Grad III:	75 – 99 %	(kritische Stenose)
Grad IV:	100 %	(kompletter Verschluss)

1.2.4 Symptomatik

Sind > 75 % des Gefäßlumens eingeengt, manifestiert sich eine Angina pectoris (Stenokardie). Sie ist das Leitsymptom der Koronarinsuffizienz und zeigt sich durch retrosternal lokalisierte Schmerzen bzw. ein Druck- oder Engegefühl, das durch körperliche und psychische Belastungen ausgelöst wird und innerhalb von 5 bis 15 Minuten wieder aufhört. Die Schmerzen können in Hals, Unterkiefer, Schultergegend, linken Arm und Rücken ausstrahlen. In typischen Fällen verschwinden die Schmerzen nach Nitratmedikation sowie nach Beendigung der auslösenden körperlichen Anstrengung.

Bei den Verlaufsformen der Angina pectoris (AP) unterscheidet man die stabile AP, bei der Schmerzen nach reproduzierbaren körperlichen Belastungen auftreten, von den Patienten vorhergesagt werden und auf Nitrate ansprechen, von der instabilen AP. Dazu wird jede Erstangina, eine zunehmende Schwere, Häufigkeit und Dauer der Anfälle, eine Ruhe-Angina und ein zunehmender Bedarf an antianginösen Medikamenten gezählt.

1.2.5 Genetik

Wie bereits erwähnt, ist die KHK eine multifaktorielle Erkrankung, bei deren Entstehung auch bestimmte Genvarianten eine Rolle spielen (37).

Eine Veränderung der DNA-Basensequenz wird Mutation genannt. Es gibt drei verschiedene Arten von Mutationen, die ein einzelnes (Punktmutation) oder mehrere Nukleotide betreffen können:

1. Substitution (Austausch von Nukleotidpaaren. Die Anzahl der Basenpaare bleibt unverändert);
2. Deletion (Verlust von Nukleotidpaaren; Rasterverschiebung ("frameshift") möglich);
3. Insertion (Hinzufügen von Nukleotidpaaren; Rasterverschiebung ("frameshift") möglich).

Welche Folge eine Genmutation in Strukturgenen hat, hängt davon ab, welche Art der Mutation vorliegt. Es kann zu einem Austausch einer Aminosäure sowie zur Verkürzung bzw. Verlängerung einer von dem Strukturgen kodierten Polypeptidkette kommen. Bedingt durch die Degeneration des genetischen Codes kann allerdings der Austausch der dritten Base eines Triplets auch folgenlos bleiben, d.h. nicht zu einer Veränderung der kodierten Aminosäure führen (stumme Mutation).

Ein Polymorphismus ist dagegen *per definitionem* eine genetische Variante, die im Gegensatz zu einer Mutation nicht zu einer Veränderung der Struktur oder Expression des Genproduktes und damit nicht zu Unterschieden in der Proteinfunktion (z.B. der Enzymaktivität oder der Bindungsaffinität) führt.

Für die folgenden Polymorphismen und Mutationen des NO-Donor-Systems, des Lipidmetabolismus und des Gerinnungssystems wurden bereits Zusammenhänge mit der Entstehung, nicht aber mit der Progression der koronaren Herzerkrankung gezeigt. Bis jetzt ist auch nicht bekannt, ob sie das Risiko einer Restenose nach einer Bypass-Operation erhöhen.

1.2.6 Analytierte Polymorphismen und Mutationen

1.2.6.1 Apolipoprotein E (ApoE)

Das Gen für das Apolipoprotein E ist im humanen Genom auf dem langen Arm des Chromosom 19 lokalisiert. Es besteht aus vier Exons, von denen drei für das 299 Aminosäuren lange ApoE kodieren. Drei kodominante Allele (ϵ_2 , ϵ_3 und ϵ_4) enthalten den Bauplan für die Isoformen E2, E3 und E4. Dementsprechend kommen drei homozygote (E2/E2, E3/E3 und E4/E4) und drei heterozygote (E2/E3, E2/E4 und E3/E4) Phänotypen vor. Strukturell unterscheiden sich die drei Isoformen durch den Austausch der Aminosäuren Cystein und

Arginin an den Positionen 112 und 158. Die nachfolgende Tabelle 1 zeigt die Häufigkeiten der einzelnen ApoE-Genotypen in der deutschen Gesamtbevölkerung:

Genotyp	Häufigkeiten in Deutschland in [%]
2/2	0,9
2/3	10,7
3/3	63,8
3/4	21,3
4/4	1,3
4/2	2,1

Tabelle 1: Häufigkeit der Apolipoprotein E-Genotypen in der deutschen Bevölkerung (Quelle: Schwandt P, Richter WO. Handbuch der Fettstoffwechselstörungen. Schattauer Verlag, Stuttgart, New York, 1995)

Apolipoproteine besitzen Lipid-komplexierende Eigenschaften und spielen im Fettstoffwechsel eine bedeutende Rolle. Sie bringen die wasserunlöslichen Lipide im Blut in eine wasserlösliche Form und ermöglichen damit sämtliche Transportprozesse von Lipiden im Organismus. Sie dienen darüberhinaus als Liganden für spezifische Lipoprotein-Rezeptoren. Die Bindung an einen solchen Rezeptor ist der erste Schritt für die zelluläre Aufnahme von Lipiden.

ApoE ist ein Ligand für den "low density"-Lipoprotein (LDL)-Rezeptor und reguliert den Katabolismus von triglyzerid- und cholesterinreichen Lipoproteinen. ApoE wird vor allem in der Leber, aber auch in Niere, Gehirn und Nebenniere gebildet (31). Als Einzelkettenprotein (34,2 kD) trägt es am N-terminalen Ende den die Hauptfunktion ausmachenden Rezeptorteil. ApoE ist die Hauptproteinkomponente der "very low density"-Lipoproteine (VLDL) und der "high density"-Lipoproteine (HDL). Der Apolipoprotein E-Polymorphismus macht mehr als 10 % des interindividuellen Unterschiedes des Plasmacholesterins aus. Verglichen mit ApoE3 besitzt ApoE4 eine höhere und ApoE2 eine sehr viel niedrigere Affinität zum LDL-Rezeptor. Demzufolge werden die Lipoproteine bei ϵ 4-Trägern wesentlich schneller aus dem Plasma entfernt. Dies bewirkt eine Herunterregulation des hepatischen LDL-Rezeptors, woraus ein Anstieg des Plasma-LDL-Cholesterins resultieren kann. ApoE4 ist somit potentiell atherogen, während ApoE2 einen eher protektiven Effekt hat. Dadurch erklärt sich das erhöhte kardiovaskuläre Risiko bei ϵ 4-Trägern (17). Zahlreiche Studien, unter anderem auch von Baroni et al., konnten einen Zusammenhang des ApoE4-Polymorphismus mit dem Auftreten der koronaren Herzerkrankung zeigen (4). Allelfrequenzstudien zeigten, dass die Häufigkeit

des $\epsilon 4$ -Allels in Europa von Norden nach Süden graduell abnimmt. In der asiatischen Bevölkerung ist die $\epsilon 4$ -Frequenz allgemein niedrig. Daraus wurden Schlüsse auf die unterschiedliche Prävalenz von kardiovaskulären Erkrankungen in den verschiedenen Populationen gezogen. Auch ein Zusammenhang des Morbus Alzheimer und anderer neurodegenerativer Erkrankungen mit dem ApoE-Polymorphismus und hier vor allem dem E4/E4-Phänotyp ist beschrieben worden (67).

1.2.6.2 Hepatische Lipase (HL)

Die HL ist ein lipolytisches Enzym, das in den Hepatozyten synthetisiert wird. Das Protein ist hauptsächlich an Heparansulfatproteoglykane auf der Oberfläche von Hepatozyten, aber auch von sinusoidalen Endothelzellen gebunden. Hepatische Lipase findet sich zudem noch in anderen Organen wie z.B. Ovarien und Hoden. Diese stammt aber vermutlich aus der Leber und gelangt über den Blutkreislauf dorthin, da die 1,7 kb lange HL-mRNA nur in der Leber gefunden wurde (35). Die hepatische Lipase ist ein Glykoprotein, das eine wichtige Rolle im HDL-Metabolismus spielt. Sie ist beteiligt an der Hydrolyse von Triacylglyceriden und Phospholipiden der HDL₂ zu antiatherogenen, cholesterinreichen HDL₃ sowie bei der Katalysierung der Hydrolyse von großen triacylglyceridreichen LDL zu kleinen, dichten und atherogenen LDL-Partikeln. Die Konzentration der kleinen, dichten LDL korreliert positiv mit der Aktivität der HL. Studien, in denen der Einfluss von Statinen auf die HL untersucht wurde, zeigten, dass die Aktivität der HL *in vivo* durch Statine gesenkt werden kann (5, 38).

Der für die HL kodierende LIPC-Genlocus befindet sich auf Chromosom 15 (q21-q23). Das Gen hat eine Länge von 60 kb und besteht aus 9 Exons und 8 Introns (12). Für das HL-Protein wurden bereits zahlreiche polymorphe Aminosäureaustausche (V73M, R186H, N193S, S267F, L334F und T383M) beschrieben. Für die R186H-, S267F-, L334F- und T383M-Varianten wurde eine stimulierende Wirkung von Heparin auf die Plasmaaktivität der HL gezeigt (44). Nukleotidaustausche, die keine Aminosäuresubstitution bewirken, sind dagegen für folgende Triplet-Codons beschrieben: V133V, G175G, T202T und T334T. Auch in der Promotorregion sind zahlreiche weitere Basenaustausche beschrieben. So konnten z.B. de Andrade et al. bei männlichen Patienten für den -250G/A-Polymorphismus einen signifikanten Zusammenhang mit einem erhöhten KHK-Risiko unabhängig von den klassischen Risikofaktoren nachweisen (19). Bei dem in unserer Studie untersuchten T202T-Polymorphismus handelt es sich um einen

Basenaustausch von Cytosin zu Guanin an Aminosäureposition 202 des HL-Gens, der nicht zu einer Substitution der von diesem Triplet kodierten Aminosäure Threonin führt. Diese Nukleotidsubstitution ist einer Studie von Baroni et al. zufolge mit höheren Triglyzeridspiegeln und niedrigeren HDL-Cholesterin-Werten assoziiert (4).

1.2.6.3 Cholesteryl-Ester-Transfer-Protein (CETP)

CETP kann an nahezu alle Lipoproteine binden, vor allem aber an HDL (33, 86). Das Protein ermöglicht den Transfer von Cholesterinestern aus HDL in die Triglyzerid-reichen, Apolipoprotein B-haltigen LDL- und VLDL-Partikel. Dadurch spielt CETP eine Schlüsselrolle im reversen Cholesterintransport. Während die VLDL und LDL für den Cholesterin-Transport von der Leber in die Peripherie (zu denen auch die Makrophagen in den Gefäßwänden gehören) verantwortlich sind, erfolgt durch die HDL der Rücktransport zur Leber mit anschließender Ausscheidung des Cholesterins über die Galle. Dies hat eine gefäßprotektive Wirkung zur Folge und ist auch der Grund, weshalb man bei den HDL oftmals vom »guten« Cholesterin spricht. Die Förderung dieses Rücktransportes unterstützt daher die Atheroskleroseprophylaxe. Die in den Zellen der Darmmukosa gebildeten HDL-Partikel enthalten vor allem die Apolipoproteine ApoA-I und A-II. Den HDL wird aus den Membranen nicht-hepatischer Zellen freies Cholesterin übertragen, das durch die Lecithin-Cholesterol-Acyltransferase (LCAT) der HDL verestert wird. Es entstehen zunächst Partikel des Dichtebereichs HDL₃, aus denen durch weitere Cholesterinaufnahme weniger dichte HDL₂ gebildet werden können. Nach der Anreicherung mit anderen Apoproteinen (vor allem ApoE) können die HDL entweder über die Leber aus dem Blutkreislauf entfernt werden, oder sie geben über das CETP Cholesterinester teilweise im Austausch gegen Triglyzeride an die ApoB-haltigen Lipoproteine ab. Über diesen Recycling-Mechanismus können die Cholesterinester in den LDL-Stoffwechsel eingeschleust und wieder zur Leber oder zu peripheren Geweben transportiert werden. Zu einem kleinen Teil werden die Cholesterinester über ApoE-haltige HDL (HDL_E) rezeptorvermittelt in die Leber aufgenommen. Über die Leber wird das Cholesterin entweder direkt oder nach Umbau zu Gallensäuren über die Galle ausgeschieden.

Ein Problem resultiert aus der Tatsache, dass nicht das gesamte überschüssige Cholesterin zur Leber rückgeführt wird, sondern ein Teil über die LDL-Rezeptoren wieder in den Cholesterin-Pool gelangt bzw. an die VLDL und LDL zurückgegeben wird. Eine erhöhte CETP-Aktivität

führt dementsprechend zu einem erhöhten Gehalt der LDL an Cholesterinestern. Außerdem wird die Konzentration des protektiven HDL-Cholesterins gesenkt und somit der LDL/HDL-Quotient, der ein Maß für das KHK-Risiko darstellt, negativ beeinflusst. In einer Studie von Saku et al. hatten Patienten, die an einer KHK erkrankt waren, signifikant niedrigere HDL-Spiegel (65). Vor allem Diabetiker weisen erhöhte Triglyzerid-Werte und einen niedrigen HDL-Spiegel auf (14). Die TaqI B-Mutation beispielsweise führt zu einer erhöhten Aktivität des CETP und damit zur negativen Beeinflussung des Cholesterinstoffwechsels und somit zu einem erhöhten KHK-Risiko (48). Besteht dagegen ein Mangel an CETP oder wird das Protein blockiert, so hat dies zur Folge, dass die LDL-Werte sinken und im Gegenzug die HDL-Werte steigen. Dieses Prinzip findet bereits in der Pharmakotherapie Anwendung.

Das CETP-Gen befindet sich auf dem langen Arm des Chromosoms 16 (16q12-21) und besteht aus 16 Exons, die sich über 25 kb genomische DNA verteilen. Der von mir untersuchte Polymorphismus befindet sich in der Promotorregion des CETP-Gens und führt an Position -629 zu einem Austausch von Cytosin durch Adenin. Blankenberg et al. konnten bereits einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem -629C/A-Polymorphismus und kardiovaskulären Ereignissen zeigen (6). Dieser Polymorphismus spielt eine entscheidende Rolle in der Modulation der HDL- und CETP-Spiegel. Dabei hatten Träger des -629A-Allels ein signifikant niedrigeres Risiko als homozygote CC-Träger, eine kardiale Komplikation zu erleiden. Diese Ergebnisse ließen auch Rückschlüsse auf den Effekt einer Statintherapie zu. Nur Patienten, die homozygot für das -629C-Allel waren, profitierten von dieser Behandlung. Dabei konnte die Mortalität der Patienten, die eine Statintherapie bekamen, sogar halbiert werden, wohingegen für Träger des -629A-Allels kein Unterschied gezeigt werden konnte. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für den CETP-I405V-Polymorphismus erhalten, allerdings ohne statistische Signifikanz.

1.2.6.4 Faktor V-Leiden (FVL)/Aktivierte Protein C (APC)-Resistenz

Beim Faktor V-Leiden führt eine Punktmutation an Nukleotidposition 1691 zu einem Austausch von Arginin durch Glutamin an Position 506 im Faktor V-Molekül. Zwischen den Aminosäuren 506 und 507 liegt die Spaltstelle zur Inaktivierung des Faktor Va durch aktiviertes Protein C. Der mutierte Faktor Va wird weniger rasch durch Protein C inaktiviert (Resistenz gegen aktiviertes Protein C, APC-Resistenz).

Protein C ist das Zymogen einer Serinprotease und neben Antithrombin der wichtigste Inhibitor der Thrombinbildung. Es wird in der Leber gebildet und benötigt wie die Faktoren des Prothrombinase-Komplexes zur postribosomalen Carboxylierung C-terminaler Glutamyreste Vitamin K. Nach Bindung des Thrombins an das Endothelmembran-gebundene Thrombomodulin aktiviert Thrombin das Protein C.

Patienten mit APC-Resistenz weisen ein erhöhtes Thromboserisiko auf, müssen aber nicht obligat erkranken. Häufig kommt es erst zu einem thromboembolischen Ereignis, wenn weitere Risikofaktoren vorliegen (z.B. die Prothrombin-G20210A-Mutation, ein Protein C-, S- oder Antithrombin-Mangel, Alter, Immobilisation, Operation, Zeit nach der Geburt, orale Kontrazeptiva, eine Hormonersatztherapie, Malignome, Phospholipid-Antikörper, myeloproliferative Erkrankungen, eine Polyzythämia vera).

Die Faktor V-Leiden-Mutation tritt mit einer Allelhäufigkeit zwischen zwei und sieben Prozent in der europäischen Bevölkerung auf und wurde in 20 bis 50 Prozent der Patienten mit venösen thromboembolischen Erkrankungen beobachtet (32, 45, 70). Sie hat eine inkomplette Penetranz und variable Expression. Die meisten der homozygoten und etwa 10 Prozent der heterozygoten Personen werden einmal im Leben ein thromboembolisches Ereignis haben (30, 59). Unter den Heterozygoten sind Patienten mit einem Alter ≥ 60 Jahre am stärksten gefährdet (36). Dagegen ist das Risiko für Ereignisse in der arteriellen Strombahn (Myokardinfarkt, ischämischer Schlaganfall, periphere arterielle Verschlusskrankheit (PVK)) nur gering erhöht. Das Risiko für alle arteriellen Ereignisse ist bei Heterozygoten im Mittel um den Faktor 1,21 (21 %) und in der Subgruppe der Patienten unter 55 Jahren im Mittel um den Faktor 1,37 (37 %) erhöht. Besonders ausgeprägt ist die Beziehung zum Schlaganfall, während sie zur PVK fehlt (42).

1.2.6.5 Prothrombin (PT)

Prothrombin ist das Proenzym der Serinprotease Thrombin, die Fibrinogen zu Fibrin umwandelt. Das Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 71 600 Dalton wird von der Leber synthetisiert und durch einen membrangebundenen Faktor Xa-/Faktor Va (Prothrombinase)-Komplex gespalten und aktiviert. Das Prothrombin-Gen ist 21 Kilobasen

groß und auf Chromosom 11 lokalisiert. Es besteht aus 14 Protein-kodierenden Exons und 13 Introns sowie flankierenden 5'- und 3'-nichttranslatierten Regionen.

Bei der untersuchten Prothrombin-Mutation handelt es sich um eine Guanin-zu-Adenin-Substitution an Position 20210 im 3'-nichttranslatierten Teil des Gens. Diese Region wird nicht in eine Aminosäuresequenz umgesetzt, sondern ist an der Regulation der Gen-Expression beteiligt. Heterozygotie für den G→A-Austausch lässt sich bei 1,2-2,8 % der gesunden Kontrollen, bei etwa 5-8 % der Patienten mit einer venösen Thrombose und in ca. 16-19 % der Fälle mit einer familiären Thrombophilie nachweisen. Die Prothrombin-Mutation führt im Plasma zu höheren Prothrombin-Spiegeln und geht mit einem etwa 3-fach höheren Thromboserisiko einher. Damit ist das Prothrombin-A-Allel der zweithäufigste, wenn auch moderate Risikofaktor für eine venöse Thrombose. Bei Afrikanern, Asiaten und Indianern Südamerikas ist diese Mutation dagegen, wie auch das Faktor V-Leiden, nicht vorhanden. Heterozygotie für das A-Allel tritt häufig in Kombination mit einer Hetero- oder Homozygotie für die Faktor V-Leiden-Mutation auf. Die zusammengesetzten Heterozygoten sind häufiger von einer Thrombose betroffen und zum Zeitpunkt des thrombotischen Ereignisses im Durchschnitt jünger als Individuen mit einer alleinigen heterozygoten Faktor V-Leiden-Mutation. Auch scheinen die Thrombosen bei doppelt Betroffenen häufiger an ungewöhnlichen Stellen aufzutreten. Darüberhinaus haben diese Patienten ein wesentlich höheres Risiko, eine Rezidivthrombose zu erleiden (20). A/A-Homozygote sind ebenfalls bereits in der Literatur beschrieben worden, von denen etwa ein Viertel asymptomatisch waren (29). Wie bei den Heterozygoten scheinen auch bei Homozygoten zumindestens in einem Teil der Fälle zusätzliche Umweltfaktoren (Alter, Immobilisation, Operation, Schwangerschaft, Zeit nach der Geburt, orale Kontrazeptiva, Hormonersatztherapie, Malignome, myeloproliferative Erkrankungen, Polyzythämia vera) und/oder Gendefekte (Faktor V-Leiden, Antithrombin-, Protein C- oder Protein S-Defizienz) notwendig zu sein, um eine Thrombose auszulösen.

Darüberhinaus haben heterozygote Merkmalsträger möglicherweise ein höheres Risiko, einen Myokardinfarkt zu erleiden, insbesondere, wenn gleichzeitig mindestens ein weiterer kardiovaskulärer Risikofaktor (z. B. Rauchen) vorhanden ist. Auch das Risiko eines ischämischen Schlaganfalls könnte erhöht zu sein. Andere Studien haben dagegen für G/A-Heterozygote kein höheres zerebro- oder kardiovaskuläres Risiko nachweisen können. Eine Meta-Analyse des Einflusses der G20210A-Mutation auf Ereignisse in der arteriellen

Strombahn (Myokardinfarkt, ischämischer Schlaganfall, periphere arterielle Verschlusskrankheit) zeigte, dass das Risiko für alle arteriellen Ereignisse bei Heterozygoten im Mittel um den Faktor 1,32 (32 %) und in der Subgruppe der Patienten unter 55 Jahren im Mittel um den Faktor 1,66 (66 %) erhöht ist (42).

1.2.6.6 Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI-1)

Die Serinprotease PAI-1 ist der wichtigste Regulator des endogenen fibrinolytischen Systems. Sie ist als einziger Plasminogen-Aktivator-Inhibitor direkt an den "tissue plasminogen activator" (t-Pa) sowie an Urokinase gebunden und hemmt dadurch die Fibrinolyse (7, 54), d.h. die körpereigene Auflösung eines Blutgerinnsels durch das Enzym Plasmin. Dabei spaltet Plasmin die Fibrinpolymere, welche den Thrombus zusammenhalten, in kleine Fibrinabbauprodukte, und der Thrombus zerfällt.

Die Aktivierung der Fibrinolyse beinhaltet im Wesentlichen die Umwandlung des inaktiven Vorläuferproteins Plasminogen in die aktive Serinprotease Plasmin. An der physiologischen Aktivierung sind hauptsächlich zwei Enzyme beteiligt, der gewebespezifische Plasminogenaktivator (t-PA) und Urokinase.

Neben PAI-1 konnten bis jetzt noch drei weitere Inhibitoren der Plasminogen-Aktivatoren identifiziert werden, welche als PAI-2 bis PAI-4 bezeichnet werden (3, 27, 40, 46). PAI-2 wird hauptsächlich von der Plazenta und von Neutrophilen gebildet, während PAI-3 mit dem Protein C-Inhibitor gleichzusetzen ist. PAI-4 inaktiviert Thrombin, wird von glatten Muskelzellen sezerniert und findet sich auf der Oberfläche von Thrombozyten. Die systemische Bedeutung dieser Proteine ist bis jetzt jedoch noch unvollständig geklärt.

PAI-1 ist der wichtigste Inhibitor der Fibrinolyseaktivierung. Es ist ein Akute-Phase-Protein, das v.a. aus Gefäßendothelzellen freigesetzt wird. Die Synthese des PAI-1-Proteins wird auf Transkriptionsebene reguliert. So wird die Expression von PAI-1 beispielsweise durch proinflammatorische Zytokine (TNF- α , IL-1 β) verstärkt (63). Durch die PAI-1-Freisetzung aus Endothelzellen, Thrombozyten und Leberparenchymzellen (18, 77) kommt es zu einer Fibrinolysehemmung und folglich zu Mikrozirkulationsstörungen, die in einer Hypoxie resultieren.

Der PAI-1-Genlocus ist auf dem Chromosom 7 (q21,3-q22) lokalisiert. Bisher sind für das PAI-1-Gen drei Polymorphismen beschrieben, die Auffälligkeiten in ihrer Verteilung bei bestimmten Erkrankungen zeigen. In dieser Studie wurde der Insertions-/Deletions-Polymorphismus mit einer variablen Zahl von Guanosinen an Position -675 innerhalb der Promotorregion des PAI-1-Gens (51, 69, 89) untersucht. Dieser allelische Polymorphismus besteht entweder aus einem Guanosinquartett (4G) oder einem Guanosinquintett (5G). Das 4G-Allel hat eine höhere PAI-1-Aktivität und somit eine verminderte fibrinolytische Aktivität zur Folge. In einer an KHK-Patienten durchgeführten und von Anvari et al. publizierten Studie hatten vor allem Träger des 4G-Allels ein signifikant höheres Risiko eines plötzlichen Herztodes, und hier insbesondere Patienten mit dem homozygoten 4G/4G-Genotyp (2).

1.2.6.7 Endotheliale NO-Synthase (eNOS)

Stickstoffmonoxid (NO) gehört zu den wichtigsten vom Endothel freigesetzten Mediatoren und wird durch die von der NO-Synthase katalysierte Umwandlung von L-Arginin zu L-Citrullin ständig freigesetzt (41). NO bindet an die lösliche Guanylatcyclase und katalysiert die Umwandlung von GTP zu cGMP (21). Der erhöhte cGMP-Spiegel bildet die Grundlage für die Regulation verschiedener physiologischer Funktionen einschließlich der Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur und der Vasodilatation (81). So vermittelt NO die Streß-induzierte Endothelzell-abhängige Vasodilatation. NO verhindert ebenfalls die Proliferation glatter Muskelzellen sowie die Adhäsion von Plättchen und Monozyten, was besonders in Herzkranzgefäßen eine Schutzfunktion gegen Thrombosen darstellt. Dies sind pathophysiologisch wichtige Vorgänge, die am Anfang einer Atherosklerose stehen (56, 61). Zusätzlich wirkt NO noch antiinflammatorisch (55). In der nachfolgenden Tabelle 2 sind die wichtigsten kardiovaskulären Wirkungen von NO noch einmal aufgelistet.

Zelltyp	NO-Wirkung
Thrombozyten	<u>Inhibierung:</u> <ul style="list-style-type: none"> • Thrombozytendegranulierung - Freisetzung von Wachstumsfaktoren (PDGF, EGF) und vasoaktiven Substanzen • Expression von Adhäsionsmolekülen (P-Selektin, Glykoproteine)
Leukozyten	<u>Inhibierung:</u> <ul style="list-style-type: none"> • Chemotaxis • Expression von Adhäsionsmolekülen und "tissue factor" • Freisetzung von Zytokinen
Glatte Muskelzellen	<ul style="list-style-type: none"> • Relaxation • Hemmung der Aktivierung und dadurch der Migration und der Proliferation (vermehrte Expression des Zellzyklusinhibitors p21, Inhibierung der Ribonukleotid-Reduktase) • Hemmung der Synthese extrazellulärer Matrix
Kardiomyozyten	<ul style="list-style-type: none"> • Senkung des Sauerstoffverbrauchs

Tabelle 2: Wirkung von NO auf Zellen, die eine wichtige Rolle im Herzkreislaufsystem spielen

Die NO-Produktion ändert sich, wenn sich die Enzym-Aktivität oder die verfügbare Menge an eNOS-Protein ändert. Letztere wird durch die Expression des NOS3-Gens reguliert. Für das NOS3-Gen und eNOS-Protein sind eine ganze Reihe von Polymorphismen beschrieben und deren Assoziation mit kardiovaskulären Erkrankungen untersucht worden. So konnten Studien beispielsweise zeigen, dass der Glu₂₉₈→Asp-Austausch wahrscheinlich funktionelle Auswirkungen auf das eNOS-Protein hat, da er mit einem erhöhten Risiko für Koronarspasmus, Myokardinfarkt, Hypertonie, Linksherzhypertrophie, Atherosklerose und zerebrale Ischämie in Verbindung gebracht wurde (71).

Der von mir untersuchte Insertions-/Deletionspolymorphismus liegt im Intron 4 des NOS3-Gens, das sich auf Chromosom 7q36 befindet. Wang et al. konnten ein signifikant häufigeres Auftreten des seltenen, homozygoten Trägerstatus für das NOS3-4a-Allel bei Patienten mit hochgradig stenosierten Arterien im Vergleich zu Patienten ohne oder mit nur geringgradigen Stenosen zeigen (79). Andere gut beschriebene NOS3-Polymorphismen sind die -786T/C- und -894G/T-Austausche. Das -786C-Allel ist mit einer reduzierten Transkription des Gens

assoziiert, was vermutlich eine verminderte NO-Bildung nach sich zieht. Es konnte gezeigt werden, dass das C-Allel auch mit einem erhöhten Risiko einer Atherosklerose (28) und Koronarspasmen korreliert (87). Für den -894G/T-Polymorphismus zeigte sich, dass die Gegenwart des -894T-Allels zu einer verringerten eNOS-Aktivität führt (80). Zuvor war bereits ein signifikanter Einfluss dieses Polymorphismus auf die NO-Freisetzung von Thrombozyten, die ebenfalls eNOS exprimieren, nachgewiesen worden. Thrombozyten von T/T-Homozygoten setzten nach Stimulation mehr NO frei als Thrombozyten von gesunden Personen mit dem G/G-Genotyp (72).

1.2.7 Therapie

Bei der Behandlung der koronaren Herzerkrankung unterscheidet man zwischen einer symptomatischen und einer kausalen Therapie. Bei der kausalen Therapie steht vor allem die Ausschaltung von Risikofaktoren im Vordergrund. Dazu gehören Rauchverbot, optimale Einstellung einer Hyperlipoproteinämie, eines Diabetes oder einer Hypertonie, Gewichtsnormalisierung, Stressabbau, körperliches Training und gesunde Ernährung. Die symptomatische Therapie der stabilen AP gliedert sich einerseits in einen medikamentös-konservativen Ansatz und andererseits in die operative oder interventionelle Revaskularisationsbehandlung.

1.2.7.1 Medikamentöse Therapie

Die Basistherapie besteht aus der Gabe von Thrombozytenaggregationshemmern zur Prophylaxe einer Koronarthrombose und von Statinen, um das LDL-Cholesterin auf einen Wert < 100 mg/dl zu senken. Bei der antianginösen Therapie kommen Betarezeptorenblocker zur Senkung des myokardialen Sauerstoffbedarfes durch ihre negativ chrono- und ionotrope Wirkung, Nitrate zur Vasodilatation und Kalziumantagonisten zur Senkung des peripheren Gefäßwiderstandes zum Einsatz.

1.2.7.2 Operative Revaskularisation

Die Ziele der Revaskularisation sind die Verbesserung der AP-Symptomatik, die Senkung des Infarkttrisikos und die Verbesserung der Belastbarkeit und Prognose bei KHK. Dazu stehen

zum einen die perkutane transluminale coronare Angioplastie (PTCA) und die operative Koronarrevaskularisation (Bypässe) zur Verfügung. Des Weiteren werden auch Therapien wie Gen- und Stammzelltherapie experimentell angewandt. Auch die Erforschung der Beteiligung verschiedener Genvarianten an der Pathogenese der Atherosklerose könnte in naher Zukunft möglicherweise zu neuen Therapiekonzepten führen.

1.3 Aortokoronare Bypassoperation

Die koronare Bypassoperation ist die am häufigsten durchgeführte Operation der westlichen Welt. Ein entscheidender Fortschritt in der Behandlung der KHK ergab sich 1967, als Garrett und seine Mitarbeiter (25) sowie wenig später Favaloro (23) erstmals Venenbypässe aus der Vena saphena zur Umgehung stenosierter Koronararterien einsetzten. Die aortokoronare Bypassoperation zählt mittlerweile zu den häufigsten chirurgischen Eingriffen. Alleine in Deutschland werden jährlich ca. 70 000 koronare Bypassoperationen in über 70 Kliniken vorgenommen. Indiziert ist eine aortokoronare Bypassoperation bei signifikanter Stenose eines oder mehrerer Koronargefäße. Die Indikation wird anhand von angiographischen und ventrikulographischen Kriterien gestellt.

Operative Technik:

Die Koronarstenosen werden mittels Arterien oder Venen überbrückt. Es wird unterschieden zwischen dem aortokoronaren Venenbypass, bei dem als Überbrückungsgefäß Teilstücke der Vena saphena magna verwendet werden, und dem arteriellen Bypass. Das am häufigsten verwendete arterielle Gefäßconduit ist die Arteria mammaria interna (IMA), die deutlich häufiger links- als rechtsseitig zum Einsatz kommt. Studien (49) zeigen, dass die IMA-Bypässe länger offen bleiben und mit einem längeren Überleben der Patienten assoziiert sind als die Venenbypässe.

Die koronaren Anastomosen werden unter extrakorporaler Zirkulation am stillstehenden Herzen ausgeführt, wobei die Herz-Lungen-Maschine an die Aorta ascendens und den rechten Vorhof angeschlossen wird. Die Myokardprotektion erfolgt in der Phase der Aortenabklemmung und Unterbrechung der Koronardurchblutung durch Hypothermie (28 – 32°C) und Kardioplegie des Herzmuskels über die extrakorporale Zirkulation mit einer Herz-

Lungen-Maschine. Der Zugang erfolgt über eine mediane Längssternotomie. Die Anastomosen werden End-zu-Seit oder Seit-zu-Seit an die längs eröffneten Koronararterien angenäht und anschließend mit der Aorta ascendens verbunden. Nach Anlegen aller Anastomosen wird der Blutfluss freigegeben.

Allerdings sind nach 10 Jahren nur noch 60 % der Bypassgrafts offen und nur 50 % haben keine Anzeichen einer signifikanten Stenose (8, 13, 24). Die weitere Therapie besteht folglich aus einer PTCA und Stentimplantation oder einer erneuten Bypassoperation mit einem erhöhten intraoperativen Risiko sowie einem schlechteren postoperativen "outcome" im Vergleich zur ersten Operation. Somit spielt die Stenose von Bypassgrafts eine wichtige medizinische und ökonomische Rolle und damit auch die Erforschung genetischer Varianten, die darauf einen Einfluss haben.

1.4 Perkutane transluminale koronare Angioplastie (PTCA)

Die PTCA ist vor allem indiziert bei einer 1- oder 2-Gefäßerkrankung mit proximalen kurzstreckigen Stenosen, nicht hingegen bei einer Hauptstammstenose. Die unmittelbare Erfolgsquote (Verminderung der Stenose $< 50\%$) liegt bei 90-95 %, wobei es in bis zu 40 % der Fälle innerhalb der ersten sechs Monate zu Restenosierungen kommt. Die PTCA kann auch mit einer Stentimplantation kombiniert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv umfasste 192 Patienten, die zwischen 1979 und 1999, also vor mindestens 5 Jahren, am Klinikum Großhadern ihre erste Bypassoperation erhalten hatten. Davon waren 18 % (Alter: $59,2 \pm 8,4$ Jahre) Frauen. Die demographischen Daten sowie die operative Therapie sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Patienten [Anzahl]	192, davon 34 (18 %) Frauen
Alter [Jahre]	$60,9 \pm 7,4$
Ejektionsfraktion (EF) [%]	$63,0 \pm 14,5$
CCS-Score	$3,0 \pm 1,0$
Bypässe [Anzahl]	$2,4 \pm 1,0$
LIMA [Anzahl]	$1,0 \pm 0,5$
VSM-Graft [Anzahl]	$1,5 \pm 1,0$
Andere Grafts [Anzahl]	$0,4 \pm 0,5$

Tabelle 3: Demographische Daten

(CCS = Canadian Cardiovascular Society; LIMA = linke A. thoracica (mammaria) interna; VSM = Vena saphena magna)

Alle Patienten kamen zwischen März und Oktober 2004 zu einer Verlaufskontrolle in die Klinik. Die Patienten waren per Post angeschrieben und zur Blutentnahme ins Klinikum Großhadern einbestellt worden, nachdem die Zustimmung zu dieser Studie durch die hiesige Ethikkommission vorlag. Die Patienten wurden ausführlich über das Studienkonzept und die genetischen Untersuchungen aufgeklärt. Die anamnestisch erhobenen Daten wurden in einen Datenerfassungsbogen eingetragen. Dabei wurden die klassischen Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie, Nikotinabusus, Hyperurikämie sowie Adipositas berücksichtigt. Zusätzlich wurde noch die Ejektionsfraktion, der CCS-Score sowie die Art und Anzahl der Bypässe registriert (Tab. 3 und 13). Alle Probanden gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an der Studie.

Klinische Endpunkte für das Fortschreiten der KHK waren eine erneute Bypassoperation, eine Reintervention (PTCA und/oder Stenteinlage und/oder erneute Krankenhauseinweisung wegen Herzinfarkt), eine Angina pectoris-Symptomatik zum Zeitpunkt der "follow-up"-Untersuchung sowie eine Kombination der drei genannten klinischen Endpunkte (Tab. 4). Die meisten Patienten (n = 137; 71,4 %) wiesen erneute Beschwerden auf und mussten sich in ärztliche Behandlung begeben. Davon erhielten 45,8 % (n = 88; 9,3 ± 3,3 Jahre p.o.) eine Zweit-Operation, 28,1 % (n = 54; 10,4 ± 5,9 Jahre p.o.) eine Reintervention im Sinne einer Stentimplantation bzw. PTCA und 41,7 % (n = 80; 12,6 ± 5,8 Jahre p.o.) litten erneut unter Angina pectoris-Beschwerden zum Zeitpunkt des "follow-up".

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. Symptomatik (Kombination 1, 2 und/oder 3)	137,0 (71,4)	12,6 ± 5,8

Tabelle 4: Klinische Endpunkte

Alle Patienten erhielten zum Zeitpunkt des "follow-up" eine medikamentöse Therapie, vor allem mit Aspirin oder alternativen Thrombozytenaggregationshemmern (87 %), Betablockern (70 %), Statinen (50 %), ACE-Hemmern (35 %) und Calciumantagonisten (24 %; Abb. 7).

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation genomischer DNA aus EDTA-Vollblut

Aus den gewonnenen 2 ml Na₂-EDTA-Vollblut wurde entsprechend den Herstellerangaben die genomische DNA mit Hilfe des "QIAamp blood mini"-Kits präpariert (Tab. 5: Bestandteile des "QIAamp blood mini"-Kits).

"QIAamp blood mini"- Kit enthält	QIAamp Spin Columns QIAGEN-Protease Elutionspuffer AE Lysispuffer AL Waschpuffer AW1 und AW 2
----------------------------------	---

Tabelle 5: Bestandteile des "QIAamp blood mini"-Kits

In einem 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde zu 200 µl Na₂-EDTA-Patientenvollblut das gleiche Volumen an Lysispuffer hinzupipettiert. Der Lysispuffer dient zum Auflösen der Zellmembranen. Danach folgte der Proteinverdau. Hierbei wurden jeweils 20 µl QIAGEN-Protease pro 200 µl Ansatz hinzugefügt, gemischt und anschließend für 10 min bei 60 °C inkubiert. Als nächstes wurde die Probe mit 200 µl Äthanol vermischt. Das gesamte Volumen wurde auf eine zentrifugierbare Chromatographiesäule geladen und eine Minute bei 8000 U/min zentrifugiert. Dabei wird die DNA von der Silika-Membran der QIAamp-Säule gebunden. Zur Beseitigung von Verunreinigungen wurde dann mit 500 µl Waschpuffer 1 min bei 8000 U/min zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen, und es folgte ein zweiter Waschschrift bei 14000 U/min für drei Minuten. Die DNA wurde anschließend mit 200 µl Elutionspuffer abgelöst, indem nochmals eine Minute bei 8000 U/min zentrifugiert wurde.

Die so präparierte genomische DNA stand nun für die PCR zur Verfügung und konnte bei 4 °C gelagert werden.

2.2.2 Arbeitsschritte zur Durchführung der PCR

Die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction = PCR) ist eine einfache und schnelle Methode, um eine definierte DNA-Sequenz zu vermehren. Die Reaktion endet durch den Substratverbrauch und die immer größer werdende DNA-Menge, die schließlich die Enzymaktivität hemmt (64, 66).

Die PCR erlaubt die exponentielle Vervielfältigung definierter doppelsträngiger Nukleinsäureabschnitte, die durch zwei Oligonukleotid-Startermoleküle („Primer“) flankiert werden. Die entstehenden Amplifikationsprodukte können anschließend analysiert werden. Die Kettenreaktion besteht in der Regel aus 35-40 sich wiederholenden Zyklen, die sich aus drei Teilschritten zusammensetzen und in einem Thermocycler mit Deckelheizung durchgeführt werden. Im ersten Schritt wird der DNA-Doppelstrang bei 94-95 °C in die beiden Einzelstränge aufgetrennt (Hitzedenaturierung). Im zweiten Schritt, bei etwa 55-65 °C, binden die beiden Primer an die ihnen komplementären Zielsequenzen auf den beiden DNA-Einzelsträngen. Diese kurzen, doppelsträngigen Bereiche dienen im dritten Teil, der Extension, als Startblöcke für eine hitzestabile, aus dem Organismus *Thermus aquaticus* isolierte Taq-DNA-Polymerase. Diese Polymerase ist thermostabil, so dass das Enzym die Hitzedenaturierung übersteht (66). Sie synthetisiert bei 72 °C unter Einbau von Desoxyribonukleotidtriphosphaten mit einer Geschwindigkeit von 1000-2000 Nukleotiden pro Minute den zur Vorlage komplementären DNA-Strang. Durch wiederholte Denaturierung werden die neu entstandenen DNA-Doppelstränge immer wieder voneinander getrennt und dienen als Vorlage für die Synthese weiterer komplementärer Stränge. Theoretisch verdoppelt jeder Zyklus die Menge an DNA-Produkten, so dass man nach n Zyklen 2^n doppelsträngige Moleküle synthetisiert hat. Die tatsächliche Ausbeute beträgt allerdings nur ca. 80 % dessen, da die Reaktion nach der exponentiellen Vermehrung in eine Plateau-Phase übergeht.

Um eine optimale Ausbeute an amplifizierten PCR-Produkten sowie größtmögliche Sensitivität und Spezifität zu erhalten, wurden Annealing-Temperatur, Dauer der einzelnen Reaktionsschritte und Zykluszahl optimiert (Tab. 6: PCR-Bedingungen).

	ApoE			HL		
PCR-Schritte	Temp.	Dauer	Zyklen	Temp.	Dauer	Zyklen
Denaturierung	95°C	20 sec	40	95°C	20 sec	40
Anlagerung	58-68°C	20 sec		62°C	20 sec	
Extension	72°C	20 sec		72°C	30 sec	
	FVL/PT			CETP		
PCR-Schritte	Temp.	Dauer	Zyklen	Temp.	Dauer	Zyklen
Denaturierung	95°C	20 sec	40	95°C	20 sec	40
Anlagerung	60°C	20 sec		62°C	20 sec	
Extension	72°C	20 sec		72°C	30 sec	
	PAI-1			eNOS		
PCR-Schritte	Temp.	Dauer	Zyklen	Temp.	Dauer	Zyklen
Denaturierung	95°C	30 sec	35	95°C	30 sec	40
Anlagerung	72°C	1 min		63°C	30 sec	
Extension				72°C	30 sec	

Tabelle 6: Verwendete PCR-Bedingungen

Nachfolgend ist ein typisches PCR-Protokoll dargestellt:

5 µl	genomische DNA (~ 100-200 ng)
5 µl	10x Reaktionspuffer
5 µl	dNTP-Mix
1 µl	Vorwärts-Primer (20 µM)
1 µl	Rückwärts-Primer (20 µM)
0,25 µl	Taq-Polymerase
32,75 µl	Aqua bidest.
<hr/>	
50,00 µl	Gesamtvolumen

2.2.2.1 Präzipitation der DNA mit Äthanol

Die Ausfällung der DNA erfolgt durch Bindung positiv geladener Salzionen an die Phosphatgruppen der Nukleinsäuren. Durch die Zugabe von absolutem Äthanol kommt es zum Wasserentzug und damit zur Präzipitation.

Für die Fällung wurden zu jeder 50 µl-PCR-Reaktion 2,5 µl 4 M NaCl und 125 µl Eisäthanol (- 20°C) pipettiert. Anschließend wurden die Proben 5 Minuten in flüssigem Stickstoff gekühlt. Durch die folgende dreißigminütige Zentrifugation bei 4 °C und 14000 U/min in der Kühlzentrifuge pelletierte die DNA, so dass der Überstand abgekippt und verworfen werden konnte. Danach wurde das DNA-Pellet bei Raumtemperatur getrocknet.

2.2.2.2 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die in Prokaryonten zur Abwehr eingedrungener Fremd-DNA dienen. Diese Enzyme sind auch für die Molekularbiologie wichtig, da sie doppelsträngige DNA an definierten Stellen schneiden. Sie spalten die Phosphodiesterbindungen der DNA zumeist im Bereich einer Erkennungssequenz hydrolytisch, wodurch ein 3'-Hydroxy- und ein 5'-Phosphat-Ende entstehen. Die Erkennungssequenzen, für die die jeweiligen Restriktionsenzyme hochspezifisch sind, haben in der Regel eine Länge von 4-8 Nukleotiden.

Mit Hilfe des Restriktionsverdaus ist es möglich, bekannte Polymorphismen bzw. Mutationen nachzuweisen, durch die eine Schnittstelle verloren gegangen oder neu entstanden ist. Dazu wurden die für die Mutation spezifischen Restriktionsenzyme zu dem getrockneten PCR-Produkt pipettiert. Nach Lösen des DNA-Pellets und Mischen wurden die Proben gemäß den Herstellerempfehlungen bei der empfohlenen Temperatur inkubiert.

2.2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese zur Charakterisierung der PCR-Produkte

Der Restriktionsverdau liefert DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe, die gelelektrophoretisch aufgetrennt und sichtbar gemacht werden können. Dabei wandern die DNA-Fragmente im elektrischen Feld (Stromstärke zwischen 40-100 mA) aufgrund ihrer

negativ geladenen Phosphatgruppen vom Minus- zum Pluspol. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt dabei von der Fragmentlänge, der angelegten Spannung, der Konzentration und der Schichtdicke des Agarosegels und der Zusammensetzung des Laufpuffers ab.

Die mit 1x-TBE-Puffer versetzte Agarose wurde in einer Mikrowelle gekocht und in einen Gelträger gegossen. Nach dem Aushärten und Überschichten des Gels mit Laufpuffer wurden die mit jeweils 2 µl Ficoll-Ladepuffer (15 % Ficoll, 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol) beschwerten Proben in die Taschen des Gels pipettiert. Der Ladepuffer soll das Aufschwimmen der Proben verhindern sowie als Farbstoffmarker dienen. Nach der Auftrennung wurde das Gel für einige Minuten mit Ethidiumbromid-Lösung gefärbt. Ethidiumbromid ist ein im UV-Licht fluoreszierender Farbstoff, dessen Fluoreszenz durch Interkalation in die DNA 200fach verstärkt wird, wodurch die DNA sichtbar gemacht wird (16). Zum Entfernen überschüssigen Farbstoffs wurde die elektrophoretische Auftrennung noch ca. 5 Minuten fortgesetzt.

Die Produkte können dann im Agarosegel unter UV-Licht auf einem Transilluminator mit langwelliger UV-Bestrahlung ($\lambda = 302 \text{ nm}$) sichtbar gemacht werden. Das Gel wird außerdem zu Dokumentationszwecken und zur Auswertung photographiert. Die Größe der aufgetrennten Fragmente kann durch Vergleich mit einem mitgelaufenen Größenmarker abgeschätzt werden.

Für eine Auftrennung etwas größerer Fragmente ($> 300 \text{ bp}$) wurde 1,5%ige oder 2%ige Agarose verwendet. Für kleinere Fragmente wurde eine 2%ige oder 3%ige "low melting point" (LMP)-Agarose benutzt, welche eine bessere Auflösung ermöglicht (Tab. 7).

Polymorphismus	Agarose
ApoE	3% LMP-Agarose
HL	2% LMP-Agarose
CETP	2% LMP-Agarose
FVL/PT	2% LMP-Agarose
PAI-1	2% LMP-Agarose
eNOS	1,5% Agarose

Tabelle 7: Verwendete Agarosen

2.2.3 Mitführen von Negativ- und Positivkontrollen

Es muss bei jedem Versuchsansatz überprüft werden, ob Produkt- oder DNA-Verunreinigungen die Ergebnisse verfälschen. Aus diesem Grund wurde bei jeder PCR eine Negativkontrolle (= Reagenzienkontrolle) mitgeführt. Da dieser PCR-Ansatz alle Komponenten außer der DNA enthält, darf kein Produkt entstehen. Ist dennoch eine Bande zu sehen, so ist dies ein Hinweis auf eine Kontamination.

Die Positivkontrolle enthält dagegen die DNA eines Patienten mit einem bekannten Genotyp, dessen PCR-Produkt komplett verdaut wird. Damit überprüft man, ob das verwendete Enzym auch vollständig schneidet.

2.2.4 Vorsichtsmaßnahmen zur Kontaminationsvermeidung

Die PCR ist aufgrund ihrer hohen Sensitivität für eine Kontaminierung extrem anfällig. Deshalb ist es wichtig, entsprechende Vorsichtsmaßnahmen einzuhalten. Zunächst erfolgt eine Aliquotierung der Reagenzien. Daher kann man im Falle einer Verunreinigung zum einen die Kontaminationsquelle leichter finden. Zum anderen bleibt der verursachte Schaden gering. Vor Gebrauch müssen die benötigten Reagenzien sowie die Reaktionsgefäße mit der DNA kurz zentrifugiert werden, um den Kontaminationsweg über die Verschlusskappe zu verhindern. Die Deckelinnenseite darf nicht berührt werden. Weiterhin wird eine strenge räumliche Trennung von Prä- und Post-PCR-Phase eingehalten. Das heißt, das Ansetzen der PCR und die weitere Bearbeitung der fertigen PCR-Produkte wird in verschiedenen Räumen durchgeführt. Für jeden PCR-Arbeitsschritt sind zudem unterschiedliche Pipetten zu verwenden. Für Arbeitsschritte mit genomischer DNA stehen separate Pipetten zur Verfügung. Der Gebrauch von Einwegpipettenspitzen ist selbstverständlich. In der Prä-PCR-Phase sind die Pipettenspitzen zusätzlich mit einem Aerosolfilter versehen, um die Verschmutzung der Pipette sowie die Kontamination des Reaktionsansatzes zu verhindern. Bei sämtlichen Arbeiten sind Einmalhandschuhe zu tragen, wobei ein häufiger Handschuhwechsel erfolgen sollte.

2.3 Material

2.3.1 Genomische DNA

Die DNA wird aus EDTA-Vollblut isoliert und kann langfristig bei 4 °C gelagert werden. Damit steht sie jederzeit für eine weitere Diagnostik zur Verfügung. Voraussetzung ist, daß die DNA nicht mit Fremd-DNA oder PCR-Produkten kontaminiert ist. Deshalb sind entsprechende Vorsichtsmaßnahmen zur Vermeidung einer Verunreinigung einzuhalten.

2.3.2 Oligonukleotid-Primer

Das Prinzip der PCR beruht auf der Amplifizierung eines beliebigen DNA-Abschnittes durch die Taq-DNA-Polymerase. Zwei Nukleotideinzelstränge mit einer Kettenlänge von 17-24 Nukleotiden, die man als Primer bezeichnet, werden komplementär zu den ausgewählten flankierenden 5'-und 3'-Sequenzen chemisch synthetisiert. Die Oligonukleotidprimer weisen also mit ihren 3'-Enden aufeinander zu, so dass nun die DNA zwischen den Primern repliziert werden kann. Bei Erreichen der Anlagerungs-Temperatur hybridisieren beide hochspezifisch an ihre komplementären Sequenzen. Sie dienen dann als gegenläufige Startermoleküle für die DNA-Polymerase bei der DNA-Synthese (66).

Die Oligonukleotideinzelstränge sollten ein möglichst ausgewogenes GC/AT-Basenverhältnis haben. Der Guanin (G)- und Cytosin (C)-Anteil sollte dementsprechend bei 45-55 % liegen. Durch eine hohe Anlagerungstemperatur wird zudem eine hohe Spezifität gewährleistet (16).

Die optimale Primer-Konzentration liegt zwischen 0,1 bis 1 µM. Höhere Konzentrationen führen zu Fehlanlagerungen und zur Generierung unspezifischer Produkte, während zu niedrige Konzentrationen die Effizienz der PCR reduzieren (64). Die Oligonukleotide stammten von der Firma Thermo Electron Corporation, Ulm. Die gefriergetrockneten Primer wurden mit 1xTE-Puffer gelöst, um eine Stocklösung mit einer Konzentration von 200 pmol/µl herzustellen. Diese wurde dann mit Aqua bidest auf eine Gebrauchslösung von 20 pmol/µl verdünnt.

Führt eine Genvariante nicht zu dem Verlust oder Entstehen einer Schnittstelle, für die ein Enzym erhältlich ist, so läßt sich in die Sequenz eines Primers zudem durch Austausch

einzelner Nukleotide ein Teil einer künstlichen Schnittstelle für eine bestimmte Restriktionsendonuklease einfügen. Diese wird dann durch eine der beiden Genvarianten komplettiert. Restriktionsverdau und elektrophoretische Auftrennung machen es so wie bei einem „normalen“ Verdau möglich zu unterscheiden, ob ein Basenaustausch bzw. eine Insertion oder Deletion vorliegt oder nicht. Hierauf beruht beispielsweise der Nachweis des 4G/5G-Polymorphismus im PAI-1-Gen (Tab. 8: Verwendete Oligonukleotidprimer im Überblick).

Primer	5'→3'-Orientierung	Basenlänge	% GC
PAI-1 (Vorwärts-Primer)	AGCCCTCAGGGGCACAGAGAGGT CTGGCCACGT	34	65
PAI-2 (Rückwärts-Primer)	TCTAGGTTTTGTCTGTCTAGGACT TGGGGCCA	32	50
NOS-1 (Vorwärts-Primer)	ÄGGCCCTATGGTAGTGCCTTG	21	57
NOS-2 (Rückwärts-Primer)	TCCTGCTACTGACAGCACCG	20	60
ERI-1 (Vorwärts-Primer)	GCTGTCCAAGGAGCTGCAGGCGG TGCAGGCCCGGCTGGGTGC	42	74
ERI-4 (Rückwärts-Primer)	CTCGCGGGCCCCGGCCTGGTA	21	81
HL 5-1 (Vorwärts-Primer)	GCTTTCCCATTAGGGCTGGATG	22	55
HL 5-2 (Rückwärts-Primer)	TCATTCTCACCATTGAAGCCGTG	23	48
APC-1 (Vorwärts-Primer)	GGAACAACACCATGATCAGAGCA	23	48
APC-2 (Rückwärts-Primer)	TAGCCAGGAGACCTAACATGTTC	23	48
PT-3 (Vorwärts-Primer)	GGCTGTGACCGGGATGGGAAATA TGGC	39	54
PT-2M (Rückwärts-Primer)	CAGAGAGCTGCCCATGAATAGCA CTGGGAGCATTGAAGC	27	59
CETP-3 (Vorwärts-Primer)	CATCTGGTCACAGTTGCTGCAG	22	55
CETP-4 (Rückwärts-Primer)	GTAGACTTTCCTTGATATGCATA AAATACCACTGGG	36	39

Tabelle 8: Verwendete Oligonukleotidprimer im Überblick (% GC = prozentualer Basenanteil an Cytosin und Guanin)

2.3.3 Enzyme

Die Eigenschaften der verwendeten Restriktionsenzyme sowie die dazugehörigen Puffer sind in den Tabellen 9 und 10 aufgeführt.

NEBuffer 2 (für FVL/PT/HL)	10 mM Tris-HCl 10 mM MgCl ₂ 50 mM NaCl 1 mM Dithiothreitol (pH 7,9 bei 25 °C)
NEBuffer 3 (für PAI-1)	50 mM Tris-HCl 10 mM MgCl ₂ 100 mM NaCl 1 mM Dithiothreitol (pH 7,9 bei 25 °C)
TANGO-Puffer (für ApoE)	33 mM Tris-Acetat (pH 7,9 bei 37 °C) 10 mM Mg-Acetat 66 mM K-Acetat 0.1 mg/ml BSA
10x Buffer R ⁺ (für CETP)	10 mM Tris-HCl (pH 8,5) 10 mM MgCl ₂ 100 mM KCl 0,1 mg/ml BSA

Tabelle 9: Zusammensetzung der Puffer für die Restriktionsendonukleasen

Bsl I	Benötigter Puffer:	NEBuffer 3
	Bestimmung von:	PAI-1-4G/5G
	Erkennungsstelle:	5'-CCNNNNN*NNGG-3' 3'-GGNN*NNNNNCC-5'
	Inkubation bei:	55 °C über Nacht
Hin6 I	Benötigter Puffer:	Tango
	Polymorphismus:	ApoE
	Erkennungsstelle:	5'-G*CGC-3' 3'-CGC*G-5'
	Inkubation bei:	37 °C über Nacht
Msp I	Benötigter Puffer:	NEBuffer 2
	Polymorphismus:	HL
	Erkennungsstelle:	5'-C*CGG-3' 3'-GGC*C-5'
	Inkubation bei:	37 °C über Nacht

Mnl I	Benötigter Puffer:	NEBuffer2 + BSA
	Polymorphismus:	FVL
	Erkennungsstelle:	5'-CCTC(N) ₇ *-3' 3'-GGAG(N) ₆ *-5'
	Inkubation bei:	37 °C über Nacht

Hind III	Benötigter Puffer:	NEBuffer 2
	Polymorphismus:	PT
	Erkennungsstelle:	5'-A*AGCTT-3' 3'-TTCGA*A-5'
	Inkubation bei:	37 °C über Nacht

Van91 I	Benötigter Puffer:	Buffer R ⁺
	Polymorphismus:	CETP
	Erkennungsstelle:	5'-CCANNNN`*NTGG-3' 3'-GGTN*NNNNACC-5'
	Inkubation bei:	37 °C über Nacht

Tabelle 10: Eigenschaften der verwendeten Restriktionsenzyme
(N = Adenin oder Thymin oder Guanin oder Cytosin)

2.3.4 Herstellernachweis

In Tabelle 11 finden sich die Hersteller der verwendeten Chemikalien und Geräte, gegliedert nach den einzelnen Arbeitsschritten.

Präparation genomischer DNA

1,5 ml-Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Proteinase K	Qiagen, Hilden
QiaAmp blood mini kit	Qiagen, Hilden
Pipetten „Pipetman“	Gilson, Bad Camberg
Pipettenspitzen	Kisker, Steinfurt
Tischzentrifuge 5417 C	Eppendorf, Hamburg

PCR

Pipetten „Pipetman“	Gilson, Bad Camberg
Pipettenspitzen	Kisker, Steinfurt
PCR-Reaktionsgefäß	ABgene, Hamburg
Taq-DNA-Polymerase/Reaktionspuffer	Promega, Mannheim (für NOS3 ,PAI-1, ApoE, CETP; HL)
Hot-Start-Taq-DNA-Polymerase/ Reaktionspuffer	ABgene, Hamburg (für FVL/PT)
Primer	Thermo Electron Corporation, Ulm
DMSO (Apo E)	Sigma/Aldrich, Taufkirchen
dNTPs	Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler MJ-Research PTC 225	Biozym, Hess. Oldendorf

Restriktionsendonukleasen mit Puffer

Bsl I	New England BioLabs, Frankfurt am Main
Hin6 I	Fermentas, St. Leon-Rot
Msp I	New England BioLabs, Frankfurt am Main
Mnl I	New England BioLabs, Frankfurt am Main
Hind III	New England BioLabs, Frankfurt am Main
Van91 I	Fermentas, St. Leon-Rot

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" (LMP)-Agarose	Helena BioSciences, Heidelberg
Bromphenolblau	Sigma/Aldrich, Taufkirchen
Xylencyanol	Sigma/Aldrich, Taufkirchen
DNA molecular weight marker	Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot
Äthanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma/Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Tris (Trishydroxymethylaminomethan)	Invitrogen, Karlsruhe
Video-Photo-Anlage	MWG-Biotech, Ebersberg
Ficoll	Sigma/Aldrich, Taufkirchen

Tabelle 11: Herstellernachweis

2.4 Analyse der Mutationen und Polymorphismen

Es wurden sieben Mutationen bzw. Polymorphismen untersucht, von denen bekannt ist, dass sie eine Rolle bei der Entstehung der KHK spielen. Darunter befinden sich Varianten, die einen Einfluss auf den Lipidmetabolismus (ApoE, HL, CETP), das Gerinnungssystem (PAI-1, FVL, PT) und das NO-System (eNOS) haben. Tabelle 12 zeigt eine Übersicht der untersuchten Mutationen und Polymorphismen und ihrer Lage sowie der verwendeten Restriktionsenzyme.

	Mutation/ Polymorphismus	Lage	Restriktionsenzym
ApoE	Position 112 Cys/Arg Position 158 Cys/Arg	Exon 4 des ApoE-Gens	Hin6 I
HL	T202T/C→G- Polymorphismus	Exon 5 des LIPC-Gens	Msp I
CETP	-629 C→A- Polymorphismus	Promotorregion des CETP- Gens	Van91 I
APC	G1691A-Mutation	Exon 10 des Faktor V-Gens	Mnl I
PT	G20210A-Mutation	3'-nichttranslatierte Region des Prothrombin-Gens	Hind III
PAI-1	Guanin-Insertions/ Deletions- Polymorphismus (- 675 4G/5G)	Promotorregion des PAI-1- Gens	Bsl I
NOS3- 4ab	Insertions-/Deletions- Polymorphismus	Intron 4 des NOS3-Gens	

Tabelle 12: Übersicht über die analysierten Mutationen und Polymorphismen und ihre Lage sowie die verwendeten Restriktionsenzyme

2.4.1 Apolipoprotein E (ApoE)

ApoE ist ein polymorphes Protein, das in den drei Isoformen E2, E3 und E4 vorkommt. Die molekulare Basis bilden Cystein-Arginin-Substitutionen an den Positionen 112 und 158, die zu sechs unterschiedlichen Phänotypen des ApoE, drei homozygoten (E2/E2, E3/E3 und E4/E4) und drei heterozygoten (E2/E3, E2/E4 und E3/E4), führen.

Dabei steht: E3 für Cys₁₁₂/Arg₁₅₈,
E4 für Arg₁₁₂/Arg₁₅₈ und
E2 für Cys₁₁₂/Cys₁₅₈.

Die erwarteten Banden haben eine Größe zwischen 132 und 18 bp. Die Auftrennung erfolgte dementsprechend in 3%igen LMP-Agarosegelen.

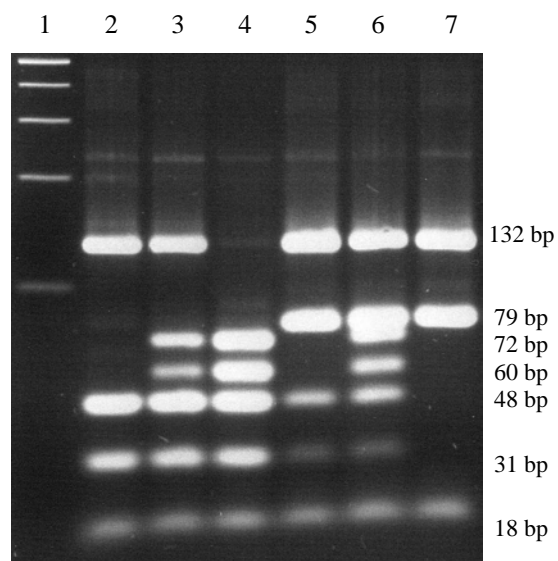


Abbildung 1: Gelelektrophorese ApoE

Spur 1: 1kb DNA ladder

Spur 2: Genotyp ε3/ε3

Spur 3: Genotyp ε3/ε4

Spur 4: Genotyp ε4/ε4

Spur 5: Genotyp ε3/ε2

Spur 6: Genotyp ε2/ε4

Spur 7: Genotyp ε2/ε2

2.4.2 Hepatische Lipase (HL)

Bei dem untersuchten Polymorphismus handelt es sich um einen Basenaustausch von Cytosin zu Guanin an Aminosäure-Position 202 der HL (Thr202Thr). Die Fragmente sind 257, 146 und 111 Basenpaare lang.

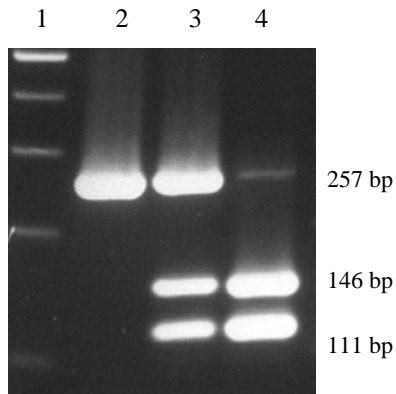


Abbildung 2: Gelelektrophorese HL

Spur 1: 1 kb DNA ladder

Spur 2: homozygot CC

Spur 3: heterozygot CG

Spur 4: homozygot GG

2.4.3 Cholesteryl-Ester-Transfer-Protein (CETP)

Untersucht wurde ein C→A-Austausch an Position -629 der Promotorregion des CETP-Gens. Das -629A-Allel hat eine signifikant geringere CETP-Aktivität und höhere HDL-Spiegel im Plasma zur Folge (6).

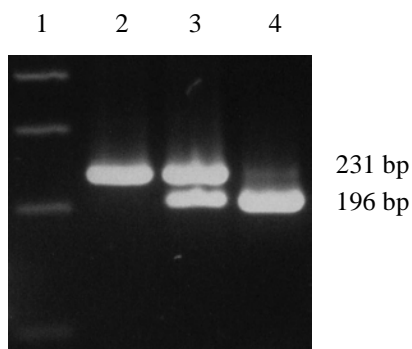


Abbildung 3: Gelelektrophorese CETP

Spur 1: 1 kb DNA ladder

Spur 2: homozygot CC

Spur 3: heterozygot CA

Spur 4: homozygot AA

2.4.4 Faktor V-Leiden (FVL)-Mutation

Bei der Faktor V-Leiden-Mutation handelt es sich um eine Guanin-zu-Adenin-Substitution an Nukleotidposition 1691 im Faktor V-Gen. Dadurch wird im Faktor V-Molekül das Arginin an Position 506 durch Glutamin ersetzt. Zwischen den Aminosäuren 506 und 507 liegt jedoch die Spaltstelle zur Inaktivierung des Faktors Va durch aktiviertes Protein C. Der mutierte Faktor Va wird weniger rasch inaktiviert (Resistenz gegen aktiviertes Protein C oder kurz APC-Resistenz).

2.4.5 Prothrombin (PT)-/Gerinnungsfaktor II-G20210A-Mutation

Das Prothrombin-Gen ist auf Chromosom 11 lokalisiert. An Position 20210 der 3'-nichttranslatierten Sequenz findet sich ein G→A-Austausch. Die Prothrombin-PCR wurde als Duplex-PCR zusammen mit der FVL-PCR angesetzt und auch in einem Ansatz verdaut.

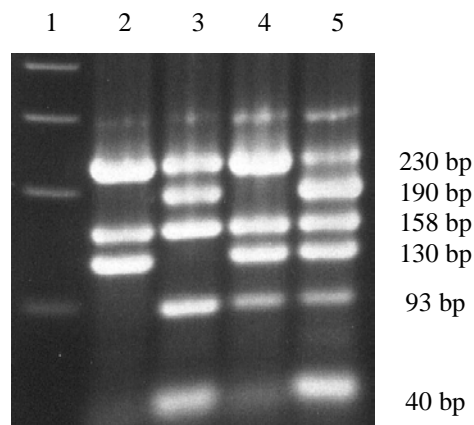


Abbildung 4: Gelelektrophorese APC/PT

Spur 1: 1kb DNA ladder

Spur 2: obere Bande: PT Wildtyp / untere 2 Banden: FVL homozygot

Spur 3: obere 2 Banden: PT heterozygot / untere 3 Banden: FVL Wildtyp

Spur 4: obere Bande: PT Wildtyp / untere 4 Banden: FVL heterozygot

Spur 5: obere Bande: PT homozygot / untere 4 Banden: FVL heterozygot

2.4.6 Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1)

Bei dem zu analysierenden Guanin-Insertions-/Deletions-Polymorphismus des PAI-1-Gens handelt es sich um eine Abfolge von 4 oder 5 Gs an Position -675 in der Promotorregion des PAI-1-Gens (4G/5G). Der modifizierte Primer PAI 1-1 lieferte in Kombination mit dem 5G-Allel die Schnittstelle für das Restriktionsenzym Bsl I (51). Da die Fragmente relativ klein sind (141, 106 und 35 bp), erfolgte die Auftrennung in 2%igen LMP-Agarosegelen.

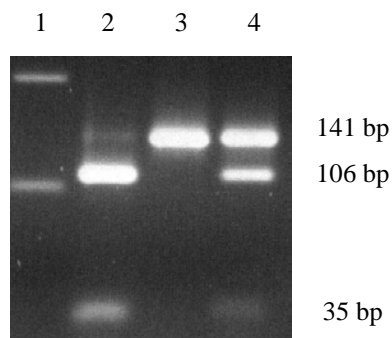


Abbildung 5: Gelelektrophorese PAI-1

Spur 1: 1 kb DNA ladder

Spur 2: homozygot 5G/5G-Insertions-Genotyp

Spur 3: homozygot 4G/4G-Deletions-Genotyp

Spur 4: heterozygoter Genotyp 4G/5G

2.4.7 Endotheliale Nitroxid- Synthase (eNOS)

Analysiert wurde ein im Intron 4 des für eNOS kodierenden NOS3-Gens gelegener Insertions-/Deletions-Polymorphismus. Dabei ist b der Wildtyp und a das polymorphe Allel. Ein Verdau mit einer Restriktionsendonuklease erfolgte nicht. Wegen der Größe der erwarteten Banden (420 bp und 393 bp) wurde 1,5 %ige Agarose zur elektrophoretischen Auftrennung verwendet.

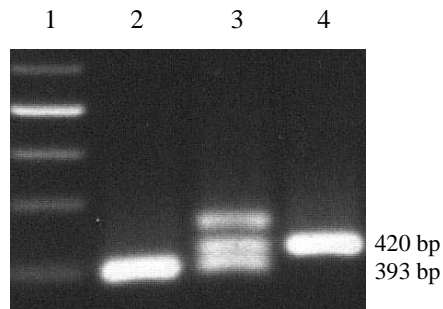


Abbildung 6: Gelelektrophorese eNOS

Spur 1: 1kb DNA ladder

Spur 2: homozygoter Genotyp aa

Spur 3: heterozygoter Genotyp ab

Spur 4: homozygoter Genotyp bb

2.5 Statistische Auswertung und verwendete Computerprogramme

Für die statistischen Auswertungen wurden die Programme Microsoft® EXCEL 2002 und SPSS für Windows (Version 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) verwendet. Die für PCR-Analysen verwendeten Primer wurden mittels des Computerprogramms PrimerExpress der Firma Applied Biosystems ausgewählt.

Die Ergebnisse werden als Mittelwert und Standardabweichung vom Mittelwert angegeben. Um Absolutwerte zu vergleichen, wurde der Student-t-Test verwendet.

2.5.1 Erfassung klinischer Endpunkte

Das Auftreten einer Angina pectoris-Symptomatik wurde am Tag des "follow-up" registriert. Operations- und Reinterventionsfreiheit sowie das Fehlen von Angina pectoris-Beschwerden wurden mittels Überlebenszeitkurven nach Kaplan-Meier berechnet und anschließend auf statistische Signifikanz mit dem Log-Rank-Test überprüft.

Alle Werte $p < 0,05$ wurden als signifikant betrachtet. Für hochsignifikante Unterschiede wurde $p < 0,01$ gewählt. Die Werte, die $p < 0,2$ erreichten bzw. sich annäherten, wurden mit der Cox-Multivarianz-Analyse getestet.

3. Ergebnisse

3.1 Demographische Daten

Es wurden 192 Patienten untersucht. Das durchschnittliche Alter zum Zeitpunkt der Erst-Operation betrug $60,9 \pm 7,4$ Jahre. Von den untersuchten Patienten waren 34 (18 %) Frauen. Die Auswurfleistung des Herzens (EF) lag im Durchschnitt bei $63 \pm 14,5$ %. Der CCS-Score, eine Einteilung der Angina pectoris-Symptomatik, lag bei $3,0 \pm 1,0$. Das entspricht einer erheblichen Beeinträchtigung bei Alltagsaufgaben. Im Mittel wurden bei der Erstoperation zwei bis drei Bypässe pro Patient angelegt. Davon waren ein bis zwei Venenbypässe, meist in Kombination mit einer Arteria thoracica (mammaria) interna (Tab. 3).

Patienten [Anzahl]	192, davon 34 (18%) Frauen
Alter [Jahre]	$60,9 \pm 7,4$
Ejektionsfraktion (EF) [%]	$63,0 \pm 14,5$
CCS-Score	$3,0 \pm 1,0$
Bypässe [Anzahl]	$2,4 \pm 1,0$
LIMA [Anzahl]	$1,0 \pm 0,5$
VSM-Graft [Anzahl]	$1,5 \pm 1,0$
andere Grafts [Anzahl]	$0,4 \pm 0,5$

Tabelle 3: Demographische Daten

(CCS = Canadian Cardiovascular Society; LIMA = linke A: thoracica (mammaria) interna; VSM = Vena saphena magna)

3.1.1 Klinische Endpunkte

Klinische Endpunkte für das Fortschreiten der KHK waren eine erneute Bypassoperation, eine Reintervention (PTCA und/oder Stenteinlage und/oder erneute Krankenhauseinweisung wegen Herzinfarkt), eine Angina pectoris-Symptomatik zum Zeitpunkt des "follow-up" oder eine Kombination der drei erstgenannten Ereignisse. Die meisten Patienten ($n = 137$; 71 %) wiesen erneute Beschwerden auf und mussten sich deshalb erneut wieder in ärztliche Behandlung begeben. Davon erhielten 46 % ($n = 88$; $9,3 \pm 3,3$ Jahre p.o.) eine Zweit-OP, 28,1 % ($n = 54$; $10,4 \pm 5,9$ Jahre p.o.) eine Reintervention und 41,7 % ($n = 80$; $12,6 \pm 5,8$ Jahre

p.o.) litten erneut unter Angina pectoris-Beschwerden zum Zeitpunkt des "follow-up" (Tab. 4). Die Beschwerden traten durchschnittlich ca. 10 Jahre nach der ersten Bypassoperation auf.

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. Symptomatik (Kombination 1, 2 und/oder 3)	137,0 (71,4)	12,6 ± 5,8

Tabelle 4: Klinische Endpunkte

3.2 Präoperative Risikofaktoren und Fortschreiten der KHK

Im Rahmen des "follow-up" wurden die Patienten auch bezüglich der klassischen Risikofaktoren befragt und diese mit dem Fortschreiten der KHK korreliert (Abb. 10). Dabei zeigte sich, dass die Risikofaktoren nur einen geringen Einfluss auf die KHK hatten. Lediglich eine Hypercholesterinämie scheint das Risiko einer wiederholten Symptomatik zu erhöhen ($p = 0,077$; Tab.13). Vermutlich waren die Patienten postoperativ suffizient medikamentös bezüglich der klassischen Risikofaktoren eingestellt, so dass diese keinen signifikanten Einfluss auf das Fortschreiten der KHK hatten. Alle Patienten erhielten zum Zeitpunkt des "follow-up" eine medikamentöse Therapie, vor allem mit Aspirin oder alternativen Thrombozytenaggregationshemmern (87 %), Betablockern (70 %), Statinen (50 %), ACE-Hemmern (35 %) und Calciumantagonisten (24 %; Abb. 7).

Risikofaktor	Definition	n	"Outcome"	Anzahl der Patienten in [%] ohne Reintervention nach			p
				5 Jahren	10 Jahren	15 Jahren	
Diabetes	Ja	33	Reoperation	100	56.9	32.5	0.49
	Nein	159		94.2	73.3	20.8	
	Ja	33	Reintervention	100	95.7	81.8	0.095
	Nein	159		90.1	81.1	67.5	
	Ja	33	Kombination	100	51.0	24.3	0.26
	Nein	159		83.6	52.3	10.2	
Adipositas	BMI < 24	136	Reoperation	96.6	69.6	22.6	0.79
	BMI > 24	56		91.7	69.7	30.1	
	BMI < 24	136	Reintervention	91.1	84.3	70.0	0.37
	BMI > 24	56		93.7	81.8	78.4	
	BMI < 24	136	Kombination	87.6	52.4	10.4	0.39
	BMI > 24	56		83.8	50.5	13.7	
Hypercholesterinämie	Ja	159	Reoperation	94.2	64.7	21.5	0.11
	Nein	33		100	89.7	34.4	
	Ja	159	Reintervention	90.8	83.5	67.6	0.19
	Nein	33		96.4	89.3	89.3	
	Ja	159	Kombination	84.4	46.2	10.0	0.073
	Nein	33		96.7	76.7	18.5	
Nikotinabusus	Ja	86	Reoperation	96.1	77.2	28.4	0.33
	Nein	106		94.5	63.6	20.1	
	Ja	86	Reintervention	90.3	83.1	69.0	0.75
	Nein	106		93.1	83.9	74.0	
	Ja	86	Kombination	87.0	61.5	12.2	0.34
	Nein	106		86.2	44.1	10.4	
Hypertonie	Ja	140	Reoperation	94.2	69.9	31.4	0.27
	Nein	52		97.8	70.3	0	
	<i>Ja</i>	<i>140</i>	<i>Reintervention</i>	<i>90.6</i>	<i>81.7</i>	<i>66.4</i>	<i>0.04</i>
	<i>Nein</i>	<i>52</i>		<i>95.2</i>	<i>88.9</i>	<i>88.9</i>	
	Ja	140	Kombination	83.9	50.7	15.3	0.62
	Nein	52		93.5	55.4	0	

Tabelle 13: Präoperative Risikofaktoren der KHK und ihre Progression. Signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) sind kursiv gedruckt.

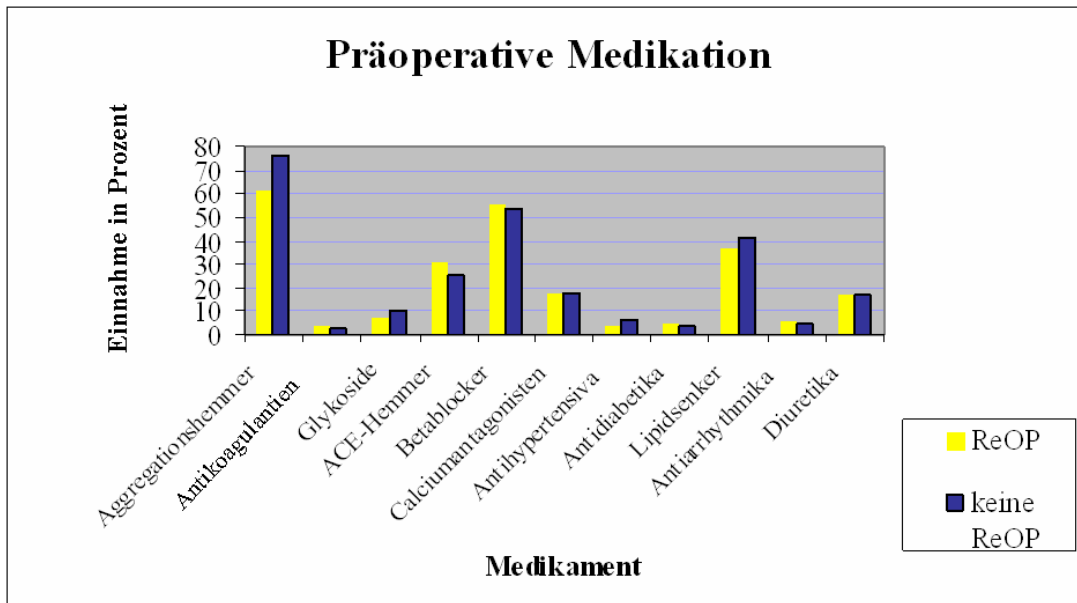


Abbildung 7: Präoperative Medikation

3.3 Perioperative Daten und Fortschreiten der KHK

Perioperative Daten (Tab. 14) geben einen Anhaltspunkt bezüglich der individuellen Auswirkungen der Therapie. Es zeigte sich, dass ältere Patienten (> 60 Jahre zum Zeitpunkt der Erstoperation) seltener eine Reoperation ($p = 0,05$) hatten, jedoch öfters für eine Reintervention ($p = 0,15$) ausgewählt wurden. Bei der Geschlechterverteilung hatten Frauen insgesamt ein niedrigeres Risiko, sich einer erneuten Operation unterziehen zu müssen. Jedoch waren nach 15 Jahren nur 39 % ohne eine Reintervention. Zudem hatten Patienten mit drei oder mehr Bypassen weniger Reoperationen ($p = 0,005$) und seltener eine Reintervention ($p = 0,36$) als Patienten mit zwei oder weniger Bypassgrafts. Auch die Verwendung der Arteria mammaria interna scheint einen positiven Einfluss auf die Reoperationsfreiheit zu haben ($p = 0,34$).

Faktor	Definition	n	"Outcome"	Anzahl der Patienten in [%] ohne Reintervention nach			p
				5 Jahren	10 Jahren	15 Jahren	
Alter	≤60 Jahre	110	Reoperation	95.3	65.7	19.9	0.052
	>60 Jahre	82		93.8	78.7	46.3	
	≤60 Jahre	110	Reintervention	93.2	88.6	77.4	0.15
	>60 Jahre	82		90.8	79.1	58.1	
	≤60 Jahre	110	Kombination	88.0	55.0	12.4	0.40
	>60 Jahre	82		85.5	47.2	15.0	
Geschlecht	Männlich	158	Reoperation	96.1	70.4	21.5	0.69
	Weiblich	34		87.8	70.9	23.6	
	Männlich	158	Reintervention	92.5	85.5	75.6	0.12
	Weiblich	34		90.6	78.9	38.6	
	Männlich	158	Kombination	88.6	53.2	11.3	0.49
	Weiblich	34		79.2	45.3	10.1	
Bypässe (Anzahl)	< 3	110	Reoperation	91.6	61.8	24.8	0.005
	≥ 3	82		98.7	81.6	22.2	
	< 3	110	Reintervention	91.4	83.1	70.0	0.36
	≥ 3	82		93.2	84.7	77.2	
	< 3	110	Kombination	83.6	47.1	14.1	0.24
	≥ 3	82		91.4	58.1	11.7	
LIMA (Anzahl)	Ja	151	Reoperation	97.3	74.6	22.8	0.34
	Nein	41		85.4	55.4	18.3	
	Ja	151	Reintervention	91.5	82.5	76.9	0.43
	Nein	41		94.7	91.6	70.9	
	Ja	151	Kombination	88.1	52.6	12.5	0.57
	Nein	41		82.9	49.3	11.1	

Tabelle 14: Perioperative Parameter und Progression der KHK. Signifikante Unterschiede (p<0.01) sind fett gedruckt.

3.4 Einzelne Genvarianten und Fortschreiten der KHK

Mutation/ Polymorphismus	Genotyp	n	"Outcome"	Anzahl der Patienten in [%] ohne Reintervention nach			p
				5 Jahren	10 Jahren	15 Jahren	
ApoE	23/33/34	182	Reoperation	94.4	71.0	22.6	0.63
	22/24/44	10		100	52.5	52.5	
	23/33/34	182	Reintervention	92.3	84.5	75.1	0.001
	22/24/44	10		90.0	64.3	32.1	
	23/33/34	182	Kombination	87.3	53.3	12.3	0.077
	22/24/44	10		80.0	30.0	0.0	
HL	CC/CG	144	Reoperation	96.4	74.6	27.5	0.049
	GG	48		89.5	54.5	9.9	
	CC/CG	144	Reintervention	91.1	84.7	69.2	0.97
	GG	48		95.5	79.4	70.5	
	CC/CG	144	Kombination	87.5	55.5	12.9	0.24
	GG	48		85.4	40.2	4.8	
CETP	CC/CA	152	Reoperation	93.9	68.7	23.2	0.31
	AA	40		97.4	51.2	0	
	CC/CA	152	Reintervention	90.1	81.5	68.9	0.82
	AA	40		100	91.2	76.7	
	CC/CA	152	Kombination	85.4	49.9	14.0	0.73
	AA	40		92.5	34.7	0	
FVL	GG	177	Reoperation	94.8	71.5	24.0	0.63
	GA/AA	15		93.3	53.9	26.9	
	GG	177	Reintervention	92.1	83.3	70.6	0.55
	GA/AA	15		93.3	85.6	71.3	
	GG	177	Kombination	87.0	53.5	11.1	0.43
	GA/AA	15		86.7	32.5	10.8	
PT	GG	189	Reoperation	94.6	70.6	24.6	0.17
	GA/AA	3		100	50	0	
	GG	189	Reintervention	92.0	83.2	71.6	0.80
	GA/AA	3		100	100	100	
	GG	189	Kombination	86.7	51.9	11.4	0.78
	GA/AA	3		100	50	0	
PAI-1	4G/4G	162	Reoperation	94.4	68.9	22.3	0.13

	4G/5G 5G/5G	30		96.4	76.9	36.1	
	4G/4G 4G/5G 5G/5G	162 30	Reintervention	90.9	85.0	73.6	0.14
	4G/4G 4G/5G 5G/5G	162 30	Kombination	85.8	50.0	11.0	0.24
eNos 4ab	bb aa/ab	141 51	Reoperation	95.6	69.5	26.1	0.87
	<i>bb</i> <i>aa/ab</i>	<i>141</i> <i>51</i>	<i>Reintervention</i>	<i>93.9</i>	<i>88.7</i>	<i>75.9</i>	<i>0.041</i>
	<i>bb</i> <i>aa/ab</i>	<i>141</i> <i>51</i>	<i>Kombination</i>	<i>89.3</i>	<i>56.0</i>	<i>13.2</i>	<i>0.042</i>
	<i>bb</i> <i>aa/ab</i>	<i>141</i> <i>51</i>		<i>80.4</i>	<i>40.6</i>	<i>5.1</i>	

Tabelle 15: Untersuchte Genvarianten und Fortschreiten der KHK. Signifikante Unterschiede sind kursiv ($p < 0.05$) oder fett ($p < 0.01$) gedruckt.

3.4.1 Apolipoprotein E (ApoE)

Patienten, denen das häufigste Allel $\epsilon 3$ des ApoE-Polymorphismus fehlte (5,2 %), waren durch ein vermehrtes Auftreten von Symptomen ($p = 0,077$) charakterisiert und mussten sich öfter einer Reintervention ($p = 0,001$) unterziehen (Tab. 15).

ApoE	$\epsilon 2/2$	$\epsilon 2/3$	$\epsilon 3/3$	$\epsilon 3/4$	$\epsilon 4/4$	$\epsilon 4/2$	Gesamt
[n]	0	22	114	46	2	8	192
[%]	0	11,5	59,4	24,0	1,0	4,2	100

Tabelle 16: Häufigkeitsverteilung der drei ApoE-Allele

3.4.2 Hepatische Lipase (HL)

Die HL-Analyseergebnisse zeigten für homozygote Träger des G-Allels eine höhere Inzidenz einer Reoperation ($p = 0,049$; Tab. 13).

HL	CC	CG	GG	Gesamt
Anzahl [n]	49	95	48	192
Prozent [%]	25,5	49,5	25,0	100

Tabelle 17: Häufigkeitsverteilung der Genotypen in Bezug auf einen C→G-Austausch im Kodon 202 des HL-Gens

3.4.3 Endotheliale NO-Synthase (eNOS)

Der homozygote bb-Genotyp (Wildtyp = Insertion/Insertion) des NOS3-4ab-Insertions-/Deletionspolymorphismus wurde bei 73,4% gefunden. Das wesentlich seltenere a-Allel mit der Deletion wurde bei 26,6 % der Patienten nachgewiesen, wobei bei 1,6 % der homozygote Genotyp aa (Deletion/Deletion) und bei 25 % der heterozygote Genotyp ab (Deletion/Insertion) auftrat.

NOS3	bb	ab	aa	Gesamt
Anzahl [n]	141	48	3	192
Prozent [%]	73,4	25,0	1,6	100

Tabelle 18: Häufigkeitsverteilung der NOS3-a/b (Deletions-/Insertions-) Genotypen

Das a-Allel des NOS3-Gens war mit einer signifikanten Erhöhung des Risikos einer Reintervention ($p = 0,041$) und des erneuten Auftretens von Symptomen assoziiert ($p = 0,042$). Nach 15 Jahren waren lediglich 5,1 % der Patienten mit einem a-Allel symptomfrei (Tab. 13). Heterozygote Träger hatten eine 30 % höhere Wahrscheinlichkeit, reoperiert zu werden, während homozygote Patienten eine 30 % höhere Wahrscheinlichkeit aufwiesen, sich nicht einer Reoperation unterziehen zu müssen ($p = 0,04$; Abb. 8 und 9).

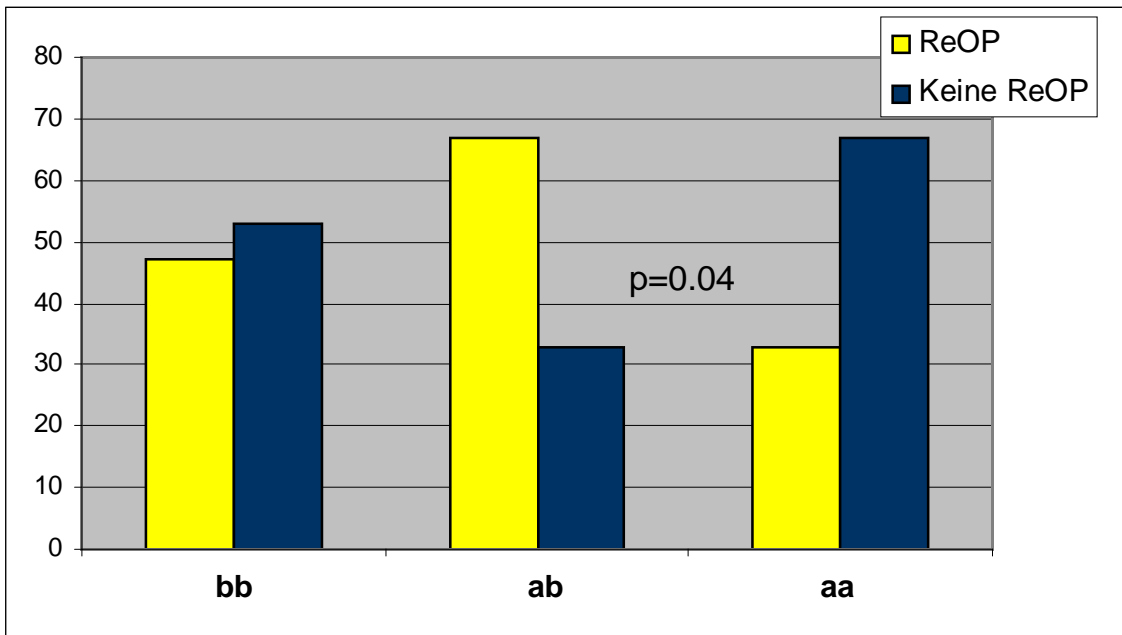


Abbildung 8: NOS3-Genpolymorphismus als Prädiktor für eine Reoperation

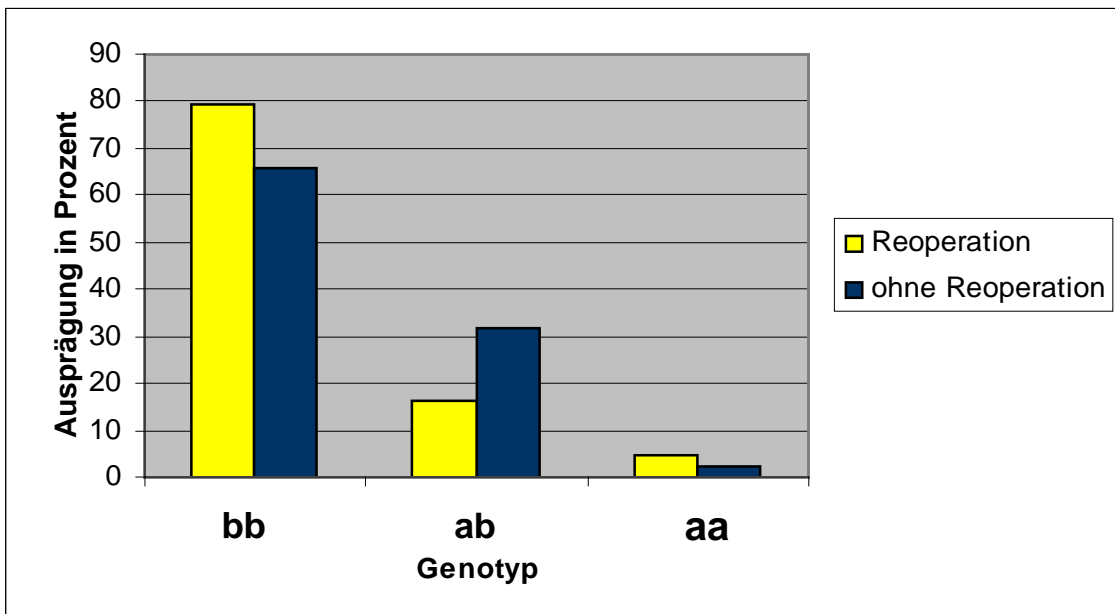


Abbildung 9: Häufigkeitsverteilung der unterschiedlichen NOS3-Genotypen in Prozent in dem untersuchten Kollektiv

3.4.4 PAI-1/FVL/PT/CETP

Für den PAI-1- und CETP-Polymorphismus sowie die FVL- und PT-Mutation wurden in dieser Studie keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich erneuter Symptomatik oder Reintervention gefunden (Tab.15). Bis auf die FVL-Mutation wurden aber alle im Risikoprofil berücksichtigt.

PAI-1	4G/4G	4G/5G	5G/5G	Gesamt
Anzahl [n]	61	101	48	192
Prozent [%]	31,8	52,6	25	100

Tabelle 19: Häufigkeitsverteilung der PAI-1-4G/5G-Genotypen

FVL	G/G	G/A	A/A	Gesamt
Anzahl [n]	177	15	0	192
Prozent [%]	92,2	7,8	0	100

Tabelle 20: Häufigkeitsverteilung der FVL-G1691A-Mutation

PT	ww (G/G)	wm (G/A)	mm (A/A)	Gesamt
Anzahl [n]	189	3	0	192
Prozent [%]	98,4	1,6	0	100

Tabelle 21: Häufigkeitsverteilung der PT-G20210A-Mutation

CETP	C/C	C/A	A/A	Gesamt
Anzahl [n]	57	95	40	192
Prozent [%]	29,7	49,5	20,8	100

Tabelle 22: Häufigkeitsverteilung der CETP-C-629A-Genotypen

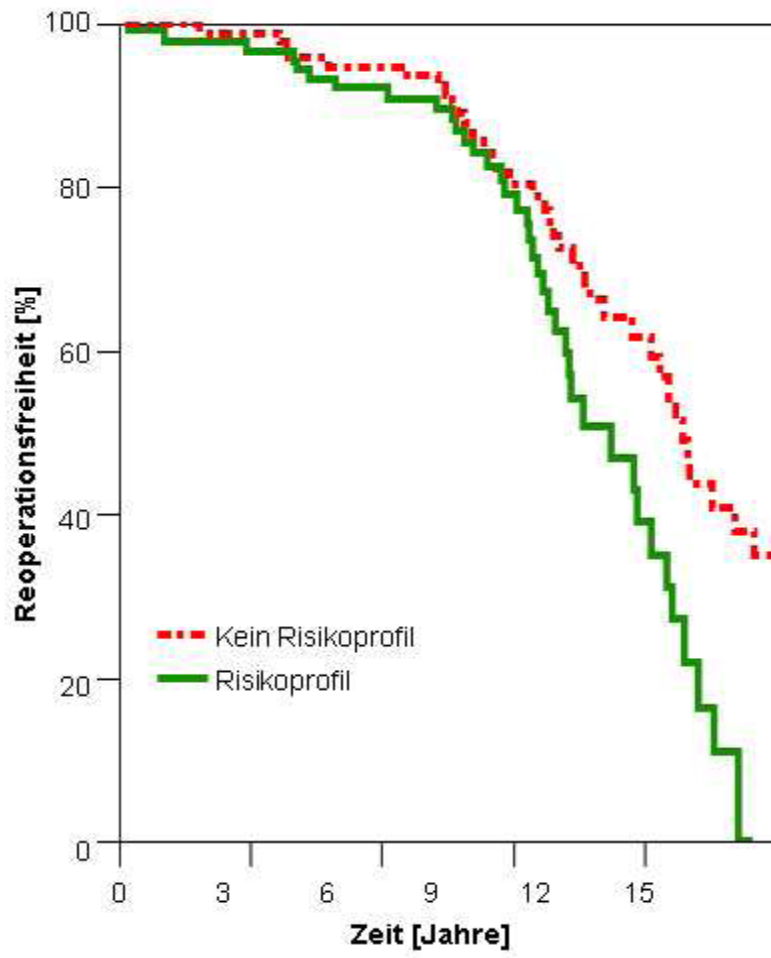
3.5 Genetisches Risikoprofil und Fortschreiten der KHK

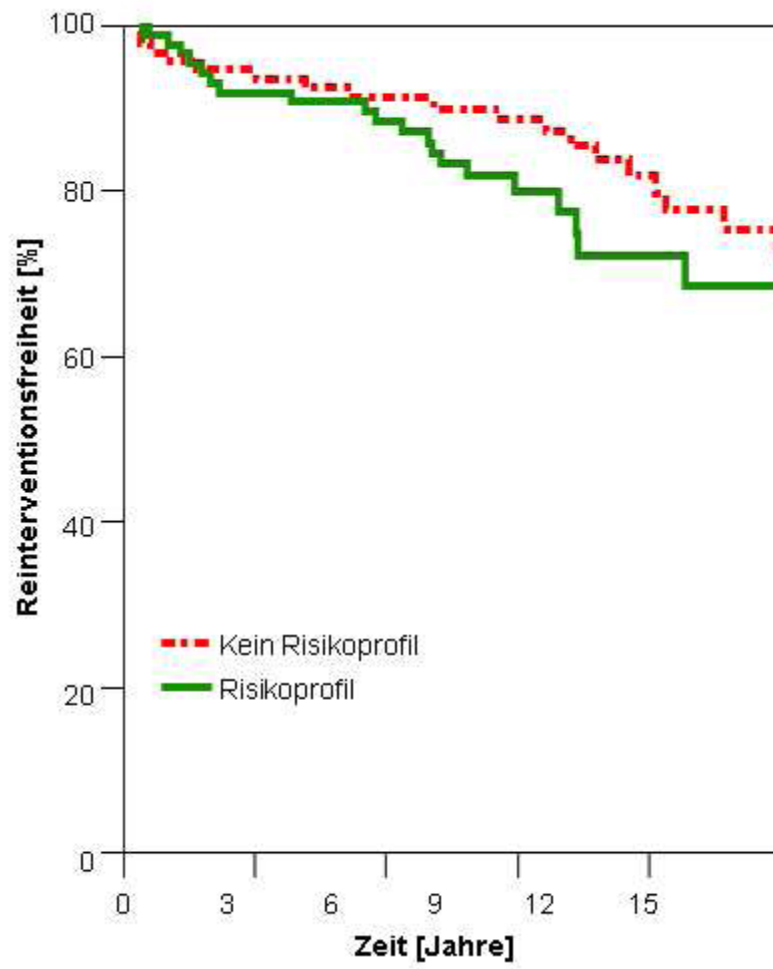
Einzelne Mutationen und Polymorphismen hatten nur eine sehr geringe Aussagekraft in der begrenzten Patientenkohorte. Da die KHK eine multifaktorielle Erkrankung ist, wurde deshalb ein genetisches Risikoprofil erstellt, um eine bessere Abschätzung der Progression zu ermöglichen. Aus den sieben untersuchten Polymorphismen wurden sechs ausgewählt und kombiniert.

Patienten mit dem Risikoprofil mussten einen der folgenden Genotypen besitzen:

1. sie mußten die ApoE-Allelkombination $\epsilon 2/4$ oder $\epsilon 4/4$ aufweisen,
2. hetero- oder homozygot für das a-Allel des NOS3-4ab-Polymorphismus sein,
3. homozygote Träger des G-Allels an Aminosäure-Position 202 der hepatischen Lipase sein,
4. homozygote Träger des -629A-Allels des Cholesteryl-Ester-Transfer-Protein-Gens
5. sowie hetero- oder homozygot für die Prothrombin-G20210A-Mutation sein.
6. Die Patienten durften gleichzeitig nicht homozygot für den Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1-5G-Polymorphismus an Position -675 sein.

Träger des genetischen Risikoprofils ($n = 44$) mussten sich signifikant häufiger einer Reoperation ($p = 0,012$) unterziehen und litten öfters unter einer erneuten Symptomatik ($p = 0,0012$). Bei der Inzidenz kardiologischer Interventionen (PTCA, Stentimplantation, Myokardinfarkt) war dagegen kein Unterschied zwischen den Gruppen ($p = 0,38$) festzustellen. Die Cox-Multivarianz-Analyse zeigte, dass nur dieses Risikoprofil eine signifikante Aussage über eine Progression der KHK nach einer Bypassoperation machen kann ($p = 0,004$). Somit gestatten genetische Risikoprofile eine Individualisierung der Sekundärprävention von Patienten mit koronarer Herzerkrankung (Abb. 10: Risikoprofil und Progression der koronaren Herzerkrankung).





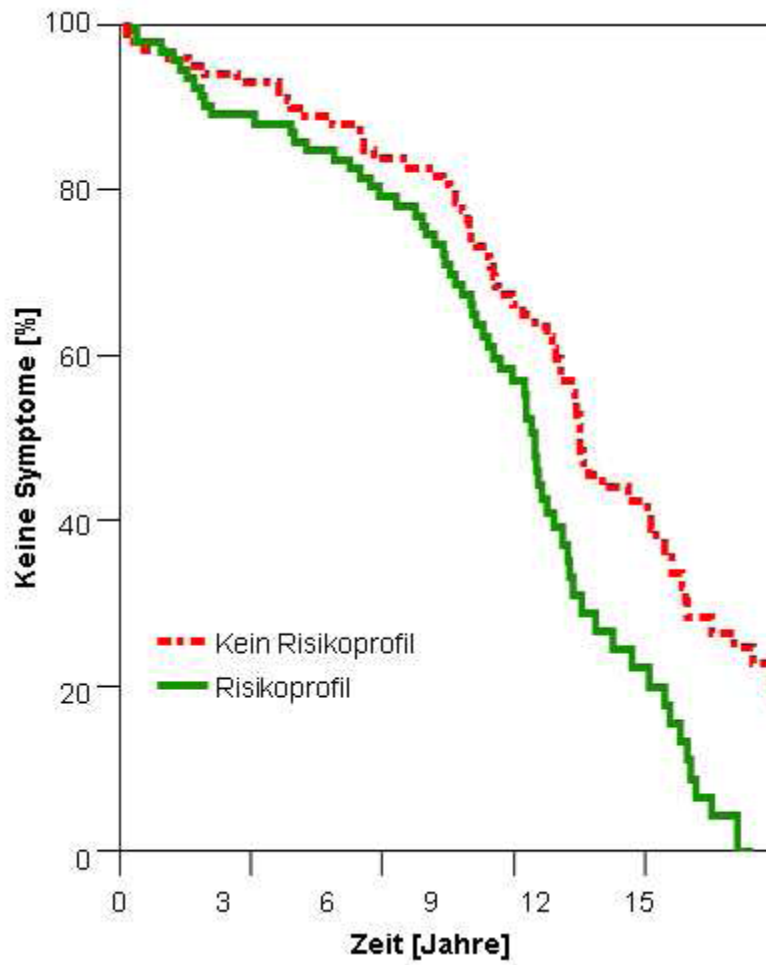


Abbildung 10: Genetisches Risikoprofil und Progression der koronaren Herzerkrankung

4. Diskussion

Mit der Sequenzierung des menschlichen Genoms hat die Medizin eine neue Ära erreicht, in der das Genom jedes Einzelnen dazu beitragen kann, eine individuelle Interventionsmöglichkeit für den Patienten zu finden, sei sie nun präventiv, diagnostisch oder therapeutisch. Zahlreiche Studien befassen sich jetzt damit, DNA-Varianten zu identifizieren, die beispielsweise eine Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose spielen. Diese sollen es ermöglichen, ein individuelles genetisches Risikoprofil zu erstellen und nach diesem die Therapie auszurichten.

Zur Identifizierung prognostisch wichtiger Genvarianten bei einem Herzinfarkt untersuchten Yamada et al. beispielsweise 112 Polymorphismen in 71 Genen von betroffenen Patienten und verglichen die Genotyp-Frequenzen mit denen einer Kontrollgruppe ohne Herzinfarkt (84). Die Analysen identifizierten eine statistisch signifikant unterschiedlich häufige Mutation bei Männern (einen C-zu-T-Polymorphismus an Nukleotidposition 1019 des Connexin-Gens) und zwei bei Frauen (die Insertion eines Guanins an Position -668 [-668 4G/5G] des Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1-Gens und die Insertion eines Adenins an Position -1171 [-1171 5A/6A] des Stromolysin-Gens). Diese Einzelnukleotid-Mutationen zeigten in dem untersuchten Kollektiv einen Einfluss auf das Auftreten von Herzinfarkten. Solche Studien unterstreichen den Wert der Genotypisierung. Fernziel ist es, Patienten entsprechend ihrem Risikoprofil mit einer individuellen Therapie zu behandeln. Die Pharmakogenetik nützt dieses Wissen, da es sich gezeigt hat, dass genetisch determinierte Proteinvarianten einen großen Einfluss auf die Wirkung von Medikamenten haben (22, 83).

In der vorliegenden Studie haben wir sieben bereits bekannte Genvarianten analysiert, für die es in der Literatur schon Hinweise auf einen Zusammenhang mit dem Fortschreiten einer Artherosklerose gibt. Es wurden dabei Proteine ausgewählt, die in Stoffwechselwege involviert sind, die in der Pathogenese der koronaren Herzerkrankung eine entscheidende Rolle spielen. Dazu gehören der Lipidmetabolismus (ApoE, CETP; HL), die Blutgerinnung (FVL, PT, PAI-1) und der NO-Metabolismus (eNOS), der für die Erweiterung der Blutgefäße und die Regulation des Blutdrucks wichtig ist. Ziel dieser Arbeit war es, einen möglichen Zusammenhang zwischen genetisch determinierten Varianten und dem Auftreten und Fortschreiten einer KHK zu finden, um somit für Patienten, die bereits eine Bypassoperation hatten, postoperativ ein genetisches Risikoprofil zu generieren. Dieses könnte dazu dienen,

eine individuelle Prognose zu erstellen und möglicherweise auch die Therapieintensität zu modulieren. Nachfolgend sollen noch einmal die Auswahl der einzelnen Polymorphismen, unsere Daten sowie die bereits in der Literatur beschriebenen Ergebnisse diskutiert und kritisch betrachtet werden.

4.1 Der ApoE-Polymorphismus

Bezogen auf die Gesamtbevölkerung hat kein anderes Genprodukt einen so großen Einfluß auf den individuellen Cholesterinspiegel wie das des Apolipoprotein E-Gens. Dabei erhöht das $\epsilon 4$ -Allel den Plasma-LDL-Spiegel. In zahlreichen Untersuchungen wurde der ApoE-Polymorphismus mit dem gehäuften Auftreten einer Atherosklerose in Verbindung gebracht. Baroni et al. führten zum Beispiel eine Studie durch, bei der sechs Polymorphismen in Genen, deren Proteinprodukte einen Einfluss auf den Lipidstoffwechsel haben (ApoE, ApoAI, ApoCIII, ApoB, LPL und HL), untersucht wurden (4). An der Studie nahmen 102 Patienten mit gesicherter koronarer Herzerkrankung und 104 Kontrollen teil. Es konnte nur für ApoE, ApoB und die HL ein Unterschied zwischen Erkrankten und Gesunden gezeigt werden. Dabei war das ApoE- $\epsilon 4$ -Allel mit der Manifestation einer KHK assoziiert. Die Ergebnisse unserer Studie waren ähnlich: Patienten denen das häufigste Allel $\epsilon 3$ fehlte, also die Kombinationen $\epsilon 2/4$ und $\epsilon 4/4$ aufwiesen (Homozygotie für die Isoform $\epsilon 2$ ist in der Bevölkerung selten, so dass sie bei keinem unserer Patienten zu finden war), mussten sich häufiger einer Reintervention unterziehen. Da auch die beiden Genotypen $\epsilon 2/4$ und $\epsilon 4/4$ sehr selten (3 % bzw. 2 %) vorkommen, ist diese Aussage allerdings kritisch zu bewerten. Bestätigt werden die Ergebnisse jedoch dadurch, daß sich hier die gleiche Tendenz wie bei anderen Studien zeigt. Wünschenswert wären dennoch Untersuchungen an einem noch größeren Patientenkollektiv.

4.2 Der HL-T202T-Polymorphismus

Die Enzymaktivität der hepatischen Lipase spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation des Lipidmetabolismus. In der bereits genannten Studie von Baroni et al. konnten bezüglich des T202T (ACC/ACG)-Polymorphismus im HL-Gen bei Trägern des G-Allels ein niedrigeres HDL-Cholesterin und erhöhte Triglyzeride beobachtet werden (4). Interessanterweise konnte auch ein unabhängiger Zusammenhang zwischen den klinischen

Endpunkten und dem HL-Polymorphismus beobachtet werden. Homo- oder heterozygote Träger des G-Allels hatten signifikant häufiger ein zweites kardiovaskuläres Ereignis. Unsere Zahlen zeigen ein ähnliches Ergebnis. Homozygote Träger des G-Allels (n = 48) mussten sich wesentlich häufiger einer Reoperation unterziehen. Murtoimaki et al. konnten für den T202T-Polymorphismus ein Kopplungsungleichgewicht mit L334F, T457T und schwächer mit der Promotor-Mutation -480C/T nachweisen. Das -480T-Allel ist mit einer niedrigeren HL-Aktivität assoziiert und führt zu erhöhten HDL- und ApoAI-Spiegeln (52). Somit dient der T202T-Polymorphismus, auch wenn er selber keinen Einfluß auf Synthese, Struktur oder Funktion der HL hat, als Marker für andere, funktionell relevante Mutationen im HL-Genlocus.

4.3 Die -629C/A-Mutation im Promotor des CETP-Gens

Für das CETP-Gen ist eine beachtliche Anzahl von Polymorphismen bekannt. In einer großen Multicenter-Studie untersuchten Corbex et al. zum Beispiel zehn Polymorphismen und deren Zusammenhang mit Myokardinfarkten in 568 Infarkt- und 668 Kontrollpatienten (15). Dabei konnte für drei Polymorphismen, darunter auch die -629C/A-Mutation, ein signifikanter Zusammenhang mit Myokardinfarkten gezeigt werden. Der CC-Genotyp, der als potentiell atherogen gilt, war mit einer erhöhten CETP-Masse im Plasma sowie einem erniedrigten HDL-Cholesterin assoziiert. Unsere Ergebnisse zeigen ebenfalls, dass sich Träger des C-Allels 5 Jahre postoperativ häufiger einer Reoperation bzw. Reintervention unterziehen mussten, verglichen mit dem homozygoten AA-Genotyp (Tabelle 15). Jedoch war die Assoziation der -629C/A-Mutation mit der CETP-Masse und dem HDL-Cholesterin bei Abstinenzlern nicht nachweisbar und war umgekehrt umso ausgeprägter, je mehr Alkohol der Patient konsumierte. Dies zeigt, welchen komplexen Einflüssen solche genetisch determinierten Varianten unterliegen und dass viele, wahrscheinlich zum Teil bislang noch unbekannte Faktoren eine Rolle in der phänotypischen Ausprägung dieser Mutationen spielen. Somit wird man durch die Analyse eines einzelnen Polymorphismus keine Aussage über das Risiko machen können, sondern erst durch die Analyse mehrerer genetischer Faktoren eine realistische Prognose abgeben können.

Blankenberg et al. (6) konnten ebenfalls zeigen, dass das -629A-Allel einen protektiven Effekt im Hinblick auf kardiovaskuläre Ereignisse hat. Zusätzlich wurde die Hypothese

bestätigt, dass vor allem Träger des C-Allels von einer Statintherapie profitierten. Bei ihnen reduzierte sich das Risiko eines kardiovaskulären Ereignisses um die Hälfte, wohingegen sich bei Trägern des A-Allels mit bzw. ohne Statintherapie kein Unterschied in der Mortalität zeigen ließ. In unserer Studiengruppe erhielten viele, aber nicht alle Bypasspatienten eine lipidsenkende Therapie, was unsere Ergebnisse beeinflussen könnte, da wir keinen Vergleich der Verläufe mit bzw. ohne Statintherapie haben. Allerdings ließen sich in der Einzelanalyse (Tabelle 15) keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der klinischen Endpunkte finden, so daß ein wesentlicher Einfluß der Statintherapie ausgeschlossen erscheint.

4.4 Die FVL-G1691A- und die PT-G20210A-Mutation

Bestimmte Mutationen in für die Hämostase wichtigen Genen wie zum Beispiel die G1691A-Mutation im Gerinnungsfaktor V-Gen und die G20210A-Mutation im Prothrombin-Gen spielen eine gesicherte Rolle in der Entstehung venöser Thrombosen. Über die Rolle dieser beiden Mutationen bei der Entstehung der koronaren Herzerkrankung gibt es allerdings noch kontroverse Ergebnisse. In einer Meta-Analyse von Ye et al. wurden 191 Studien mit sieben Genen, deren Produkte an der Gerinnung beteiligt sind, untersucht. Dabei musste jede Studie mindestens 5000 Patienten mit KHK und 5000 Kontrollen beinhalten. Insgesamt wurden 66155 KHK-Fälle und 91307 Kontrollen eingeschlossen. Dabei zeigte sich, dass beide Mutationen mit dem Risiko einer koronaren Herzerkrankung assoziiert sind (85). In einer weiteren Untersuchung von Almawi et al. hingegen zeigte sich sowohl für die Faktor V-Leiden- als auch für die PT-Mutation kein Zusammenhang mit dem KHK-Risiko (1). Zwei weitere Studien lieferten ebenfalls gegensätzliche Ergebnisse (10, 76). Dabei konnten Tuntun et al. an 25 Patienten, die jünger als 35 Jahre waren und bereits eine Bypassoperation hatten, zeigen, dass die Faktor V-Leiden-Mutation ein Fortschreiten der koronaren Restenose fördert. Burzotta et al. hingegen stellten fest, dass das 20210A-PT-Allel einen vererbaren Risikofaktor für ein akutes Koronarsyndrom darstellt. Für die FVL-Mutation gab es dagegen keine Unterschiede in der Häufigkeit zwischen Patienten und Kontrollpersonen. In unserer Studie war bei heterozygoten Trägern der PT-Mutation zehn Jahre postoperativ nur noch die Hälfte der Patienten reoperationsfrei bzw. ohne erneute Symptomatik und nach 15 Jahren keiner. Für die FVL-Mutation ergaben sich in unserer Studie dagegen keine statistisch signifikanten Unterschiede, so dass diese bei der Erstellung des genetischen Risikoprofils nicht berücksichtigt wurde.

4.5 Der PAI-I -675 4G/5G-Polymorphismus

Aufgrund zahlreicher Studien wird das 4G-Allel des PAI-1-Polymorphismus häufig als thromboembolischer Risikofaktor bezeichnet (51). Es führt zu einer verstärkten PAI-1-Expression, was mit einer verminderten Plasmin- und Fibrinolyseaktivität und folglich einem gesteigerten Thromboserisiko einhergeht. Yamada et al. (84) kamen jedoch zu kontroversen Ergebnissen. In ihrer Studie wurden 2819 Patienten mit Myokardinfarkt mit 2242 Kontrollpersonen, die mindestens einen klassischen Risikofaktor für eine koronare Herzerkrankung hatten, verglichen. Es wurden insgesamt 37 Polymorphismen untersucht, wobei zusätzlich noch zwischen Männern und Frauen unterschieden wurde. Die Ergebnisse zeigten nur für weibliche Patientinnen, die Trägerinnen des 5G-Allels waren, ein signifikant höheres Risiko, einen Myokardinfarkt zu erleiden. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Roest et al. (58), die von einem niedrigeren Risiko eines zerebrovaskulären Ereignisses für den 4G/4G-Genotyp berichteten. In unserer Studie zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Frequenz der beiden Allele. Dennoch war eine Homozygotie für das 5G-Allel mit einem niedrigeren Risiko einer erneuten Bypassoperation assoziiert. Fünf und zehn Jahre postoperativ ergaben sich für den homozygoten 5G/5G-Genotyp geringere Häufigkeiten sowohl hinsichtlich einer erneuten Reintervention als auch der Kombination der klinischen Endpunkte (Tabelle 15). Hierbei wurde jedoch nicht zwischen Männern und Frauen unterschieden. Diese unterschiedlichen Ergebnisse machen deutlich, dass das Patientenkollektiv weiter vergrößert und z.B. in Untergruppen von Männern und Frauen unterteilt werden muss. Leider waren die Frauen in unserer Studie mit 34 versus 158 Männer deutlich unterrepräsentiert.

Dies rührt daher, dass unter den behandelten Patienten mit koronarer Herzkrankheit Frauen sehr viel seltener sind als Männer, besonders in der Altersgruppe vor den Wechseljahren. Dennoch ist die KHK derzeit die führende Todesursache bei Frauen in Industriestaaten. Als ursächlich für das auffallend seltenere Vorkommen der KHK und anderer atherosklerotisch bedingter Erkrankungen bei prämenopausalen Frauen wird allgemein der sog. „Östrogenschutz“ angesehen. Ursprünglich wurden Unterschiede im Risikoprofil (geringerer Nikotinkonsum, weniger Streß) dafür verantwortlich gemacht. Doch fiel auf, daß sich bei Frauen, bei denen es z.B. durch eine operative Entfernung der Eierstöcke zu einem früheren Beginn der Menopause kam, das Risiko für eine KHK rasch dem der Männer angleich. Hieraus

wurde die Vermutung abgeleitet, dass weibliche Geschlechtshormone und hier insbesondere die Östrogene einen schützenden Effekt hinsichtlich der Atherosklerose-Entstehung haben. Der Mechanismus dieser Wirkung ist noch nicht vollständig geklärt. Mögliche Ansatzpunkte wurden sowohl experimentell als auch in großen epidemiologischen Beobachtungen und Placebo-kontrollierten Substitutionsstudien an tausenden postmenopausaler Frauen überprüft. Die meisten der zahlreichen Fall-Kontroll-Studien sowie die prospektiven Kohorten-Studien mit postmenopausalen Frauen fanden eine Verringerung des Risikos kardiovaskulärer Erkrankungen durch eine Östrogensubstitution um 30 bis 50 % (47). In der Studie des amerikanischen "Lipid Research Clinics Program" mit 2270 Frauen wurde nach durchschnittlich 8,5 Jahren eine Senkung der Mortalität um 63 Prozent beobachtet, wobei nur ein Prozent der mit Östrogenen behandelten Patientinnen zusätzlich ein Gestagen erhielten (11).

Bezüglich möglicher Einflüsse des Östrogens auf die Atherosklerose wurden folgende Beobachtungen gemacht:

1. An glatten Gefäßmuskelzellen menschlicher Koronararterien und anderer Gefäße läßt sich ein funktionell wirksamer Östrogen (E₂)-Rezeptor nachweisen. Experimentell verstärken Östrogene ferner die NO-vermittelte, endothelabhängige Gefäßrelaxation und reduzieren eine durch andere Mediatoren (Serotonin, Histamin, Angiotensin II, Acetylcholin) ausgelöste Vasokonstriktion. Bei kurzfristiger Gabe von 17 β -Östradiol konnte eine Verbesserung des koronaren Blutflusses und eine Verlängerung der ischämiefreien Zeit unter Belastung dokumentiert werden.
2. Ferner wurde ein günstiger Einfluss auf das Blutgerinnungssystem im Sinne einer Erhöhung der endogenen Fibrinolyse (u.a. durch erniedrigte Spiegel des Plasminogen-Aktivator-Inhibitors Typ 1 (PAI-1)) und einer Senkung des Fibrinogens und der Plasmaviskosität dokumentiert.
3. Wesentlich ist auch eine Verbesserung des Lipidprofils durch die Östrogengabe. Dies zeigt sich an einer Senkung des Gesamt-Cholesterins mit Abnahme des LDL-Anteils um mehr als 20 % und einer relativen wie auch absoluten Erhöhung der als protektiv geltenden HDL. Diese Effekte waren in den Studien umso stärker, je ausgeprägter die vorbestehende Fettstoffwechselstörung war. Zusätzlich kommt es zu einer Absenkung des

Lp(a), eines weiteren Risikofaktors der Atherosklerose. Ein begleitender leichter Anstieg der Triglyzeride wird dagegen durch die Kombination mit einem Progesteron abgemildert.

Obwohl eine generelle Empfehlung zur Hormonsubstitution bei postmenopausalen Frauen zum heutigen Zeitpunkt nicht ausgesprochen werden kann, ist wegen der beeindruckenden Wirkung der Östrogene mit nahezu einer Halbierung der kardiovaskulären Sterblichkeit bei jeder Patientin an dieses zusätzliche Therapieprinzip zu denken. Am stärksten profitieren dabei Frauen mit mehr als einem koronaren Risikofaktor.

4.6 Der NOS3- 4ab-Polymorphismus

In einem Übersichtsartikel von Wang und Wang aus dem Jahre 2000 (81) wurden die Ergebnisse der zahlreichen Studien, die bisher über die NOS3-Genpolymorphismen und deren Zusammenhang mit vaskulären Erkrankungen publiziert worden sind, zusammengefaßt. Bezüglich eines Zusammenhangs zwischen dem 4ab-Polymorphismus und der KHK zeigten fünf von elf Studien signifikante Korrelationen. Darüberhinaus schienen einige der Assoziationen innerhalb bestimmter Subgruppen (z. B. Raucher, Nichtraucher oder Jugendliche) ausgeprägter zu sein.

Diese Widersprüche sind ein Phänomen, das häufig bei genetischen Studien beobachtet wird. So spielen zum Beispiel Umweltfaktoren und Gen-Gen-Interaktionen für die große Variabilität des klinischen Phänotyps eine wichtige Rolle. Auch müssen die Untersuchungen nicht nur krankheits-, sondern auch populationsspezifisch erfolgen. Für Japaner und Weiße wurden ähnliche Allelhäufigkeiten nachgewiesen (78), während bei Afro-Amerikanern z.B. hinsichtlich des 4ab-Polymorphismus ein viel häufigeres Auftreten des 4a-Allels beobachtet wurde als bei Australiern oder Japanern (39).

Zudem sind Umweltfaktoren wie z. B. das Rauchen in einer Studie oftmals schwierig exakt zu erfassen, da diese Informationen nur anamnestisch erhoben werden können. Da diese aber für den Einfluß einer Gen-Variante eine entscheidende Rolle spielen könnten, muss auf eine genaue Datenerhebung sehr viel Wert gelegt werden. In unserer Studie war das a-Allel des NOS3-4ab-Polymorphismus mit einem signifikant erhöhten Risiko einer Reintervention und

des erneuten Auftretens von Symptomen assoziiert (Tabelle 15, Abbildungen 8 und 9). Dabei hatten erstaunlicherweise Heterozygote (ab) eine 30 % höhere Wahrscheinlichkeit, reoperiert zu werden, wohingegen homozygote Patienten (aa) eine 30 % höhere Wahrscheinlichkeit aufwiesen, sich nicht einer erneuten Operation unterziehen zu müssen. Diese Aussage muss allerdings sehr kritisch betrachtet werden, da der homozygote 4aa-Genotyp extrem selten ist. In unserer Untersuchung waren lediglich drei Patienten (1,6 %) homozygote Träger des 4a-Allels.

4.7 Erstellung eines genetischen Risikoprofils

Da die Einzelanalyse der Polymorphismen und Mutationen nur eine geringe Aussagekraft und zum Teil widersprüchliche Ergebnisse lieferte, haben wir durch Kombination von genetischen Faktoren ein genetisches Risikoprofil erstellt. Dazu wurden diejenigen Allele der Polymorphismen und Mutationen ausgewählt, die in unserer Analyse mit einem erhöhten Reoperations- bzw. Reinterventionsrisiko oder mit einer erneuten Symptomatik assoziiert waren (siehe Tabelle 15). Die Patienten mussten mindestens einen der folgenden Genotypen aufweisen. Sie mussten hetero- oder homozygot für das a-Allel des NOS3-4ab-Polymorphismus sein, da diese Patienten ein signifikant erhöhtes Risiko für eine Reintervention sowie das Auftreten einer erneuten Symptomatik hatten. In Bezug auf das Apolipoprotein E mussten sie positiv für das ϵ 4-Allel sein (d.h. ϵ 2/4 oder ϵ 4/4), da das ϵ 4-Allel als potentiell atherogen gilt, wie sich auch in unserer Studie zeigte. Homozygote Träger des G-Allels des HL-T202T-Polymorphismus zeigten eine erhöhte Rate an Reoperationen sowie einer Kombination der klinischen Endpunkte. Deshalb mussten Träger des genetischen Risikoprofils eine homozygote Expression des G-Allels aufweisen. In Bezug auf das Cholesteryl-Ester-Transfer-Protein sollten die Patienten homozygot für die -629A-Mutation sein. Die Patienten mussten ebenfalls hetero- oder homozygote Träger der PT-G20210A-Mutation sein, da nach 10 bzw. 15 Jahren nur noch 50 % bzw. 0 % der Heterozygoten reoperationsfrei bzw. frei von erneuter Symptomatik waren. Bezüglich des PAI-1-Polymorphismus durften Träger des Risikoprofils nicht homozygot 5G/5G sein, da homozygote Träger fünf Jahre postoperativ weniger Reoperationen bzw. Reinterventionen hatten und auch seltener unter einer erneuten Symptomatik litten. Die FVL-Mutation wurde dagegen im Risikoprofil nicht berücksichtigt, da sich in meiner Studie keine signifikante Assoziation zeigte.

Die Ergebnisse dieser Analysen bestätigten, dass genetische Varianten die Progression einer Restenose nach einer primären Bypassoperation beeinflussen. Von den sieben untersuchten Polymorphismen hatten der NOS3-4a/b-Polymorphismus sowie die $\epsilon 2$ - und $\epsilon 4$ -Allele des Apolipoproteins E den größten Einfluss auf die Notwendigkeit einer Reoperation und Reintervention. Der untersuchte NOS3-Polymorphismus war bereits bei Rauchern in einen Zusammenhang mit einem häufigeren Auftreten von Schäden an den Koronarien gebracht worden (79). Patienten mit dem homozygoten 4aa-Genotyp zeigten eine Verminderung der NO-Stoffwechselmetabolite von 20 % (75). Verschiedene Studien befassten sich mit den Auswirkungen des ApoE-Polymorphismus auf eine Bypassoperation und berichteten bei Patienten mit dem $\epsilon 4$ -Allel von einer höheren Inzidenz an Entzündungen (34) und Nephropathien (50). Neurologische Komplikationen zeigten sich dagegen gehäuft in Verbindung mit dem $\epsilon 2$ -Allel. Interessanterweise hatten in unserer Studie Patienten, denen das häufigste Allel $\epsilon 3$ fehlte, also nur Träger der Risikoallele $\epsilon 2$ und $\epsilon 4$ waren, eine aggressivere Form der KHK.

Die positiven Effekte der medikamentösen Therapie auf den weiteren Verlauf der KHK sind unumstritten, insbesondere die Senkung des LDL-Cholesterinspiegels (43). Aufgrund des Designs meiner retrospektiv angelegten Studie war es jedoch nicht möglich, den Einfluß der medikamentösen Therapie zu untersuchen, da diese nach der Bypassoperation durch Kardiologen festgesetzt worden war, und Patienten mit wiederkehrender Symptomatik eine intensivere Therapie erhielten. Aus diesem Grunde ist auch die Rolle der klassischen Risikofaktoren schwer zu interpretieren. Die Risikofaktoren wurden bereits zum Zeitpunkt der Erstoperation behandelt. Patienten hörten auf zu rauchen und begannen mit Trainingsprogrammen. Deshalb hatten die klassischen Risikofaktoren wie Nikotinabusus, Hypercholesterinämie, Adipositas und Diabetes bei suffizienter medikamentöser Therapie keinen so großen Einfluss auf die Progression der KHK. Außerdem bestand das Patientenkollektiv nur aus Langzeitüberlebenden nach koronarer Bypassoperation, die bereit waren, an dieser Studie teilzunehmen.

Das Wissen über Genvarianten und ihre Auswirkungen auf den weiteren Verlauf einer KHK nach Bypassoperation steigt ständig. Die meisten Studien untersuchten allerdings die akuten Einflüsse während der postoperativen Phase. Somit sind die Daten, die eine Aussage für das weitere Fortschreiten der KHK nach einer Operation machen können, sehr limitiert. Erst

kürzlich berichteten Taylor et al. (73) von einem Zusammenhang zwischen dem Lipoproteinlipase-Genlocus und dem Fortschreiten der Artherosklerose in arteriellen Bypassgrafts und identifizierten den LPL-Hind III-2/2-Genotyp als unabhängigen Risikofaktor.

Aufgrund der beschränkten Patientenzahl sowie einer nur sehr kleinen Zahl analysierter Mutationen und Polymorphismen sind weitere Untersuchungen wünschenswert, die mit großer Wahrscheinlichkeit den prädiktiven Wert genetischer Analysen bestätigen werden. Für eNOS beispielsweise sind mindestens vier häufige Polymorphismen (G894T, Glu298Asp, T786C, 4ab) als Risikofaktoren im Zusammenhang mit einer KHK beschrieben worden. Der Einwand, nur einen und nicht auch weitere Polymorphismen innerhalb eines Genlokus bestimmt zu haben, ist richtig. In der Auswahl der zu untersuchenden Varianten liegt sicher eine Schwierigkeit und auch ein Problem solcher Studien. Wir haben uns bei der Selektion der in dieser Arbeit untersuchten Mutationen und Polymorphismen auf Literaturdaten gestützt, die für den/die jeweilige(n) Basenaustausch/Deletion/Insertion bereits einen Einfluss auf das Entstehen einer KHK demonstrieren konnten, so daß eine funktionelle Relevanz dieser Genalterationen wahrscheinlich war. Dennoch war die Aussagekraft der einzelnen Genvarianten bezüglich der Progression der KHK nur gering und erst die Erstellung eines genetischen Risikoprofils aus sechs ausgewählten Mutationen und Polymorphismen erlaubte eine Unterscheidung der Patienten hinsichtlich Symptom-, Reinterventions- und Reoperationsfreiheit (Abbildung 10).

Zusammenfassend konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Risikoabschätzung der KHK-Progression mittels einfacher genetischer Tests möglich ist. Dieses Konzept ist deshalb so interessant, weil die betrachteten Genmutationen Hinweise auf die individuelle Pathophysiologie jedes einzelnen Patienten geben könnten (82), was für das Verständnis der Genese eines multifaktoriellen Leidens wie der koronaren Herzerkrankung eine wichtige Rolle spielen könnte. Möglicherweise wird diese einfache und billige diagnostische Methode in naher Zukunft auch helfen, die Therapie nach erfolgter Bypassoperation zu individualisieren und folglich zu verbessern.

5. Literaturverzeichnis

1. Almawi WY, Ameen G, Tamim H, Finan RR, Irani-Hakime N. Faktor V G1691A, prothrombin G20210A, and methylenetrahydrofolate reductase [MTHFR] C677T gene polymorphism in angiographically documented coronary artery disease. *J Thromb Thrombolysis*. 2004; 17: 199-205.
2. Anvari A, Schuster E, Gottsauner-Wolf M, Wojta J, Huber K. PAI-I 4G/5G polymorphism and sudden cardiac death in patients with coronary artery disease. *Thromb Res*. 2001; 103: 103-107.
3. Astedt B, Lecander I, Ny T. The placental type plasminogen activator inhibitor, PAI 2. *Fibrinolysis* 1987; 1: 203-207.
4. Baroni MG, Berni A, Romeo S, Arca M, Tesorio T, Sorropago G, et al. Genetic study of common variants at the Apo E, Apo AI, Apo CIII, Apo B, lipoprotein lipase (LPL) and hepatic lipase (LIPC) genes and coronary artery disease (CAD): variation in LIPC gene associates with clinical outcomes in patients with established CAD. *BMC Med Genet* 2003; 4: 8-16.
5. Berk P, Hoogerbrugge N, Stolk RP, Bootsma AH, Jansen H. Atorvastatin dose-dependently decreases hepatic lipase activity in type 2 diabetes: effect of sex and the LIPC promoter variant. *Diabetes Care* 2003; 26: 427-432.
6. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Jiang XC, Poirier O, Lackner KJ, Meyer J, Cambien F, Tiret L; AtheroGene Investigators. Common genetic variation of the cholesteryl ester transfer protein gene strongly predicts future cardiovascular death in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 1983-1989.
7. Blasi F. uPA, uPAR, PAI-1: key intersection of proteolytic, adhesive and chemotactic highways? *Immunol Today* 1997; 18: 415-417.
8. Bourassa MG. Long-term clinical results after coronary artery bypass surgery. *Cardiovasc Clin* 1991; 21:101-121.
9. Buchholz T, Lohse P, Kosian E, Thaler CJ. Vasoconstrictively acting AT1R A1166C and NOS3 4/5 polymorphisms in recurrent spontaneous abortions (RSA). *Am J Reprod Immunol* 2004; 51: 323-328.

10. Burzotta F, Paciaroni K, De Stefano V, Chiusolo P, Manzoli A, Casorelli I, Leone AM, Rossi E, Leone G, Maseri A, Andreotti F. Increased prevalence of the G20210A prothrombin gene variant in acute coronary syndromes without metabolic or acquired risk factors or with limited extent of disease. *Eur Heart J* 2002; 23: 26-30.
11. Bush TL, Barrett-Connor E, Cowan LD et al: Cardiovascular mortality and noncontraceptive use of estrogen in women: results from the Lipid Research Clinics Program Follow-up Study. *Circulation* 1987; 75: 1102-1109.
12. Cai SJ, Wong DM, Chen SH, Chan L. Structure of the human hepatic triglyceride lipase gene. *Biochemistry* 1989; 28: 8966-8971.
13. Campeau L, Enjalbert M, Lesperance J, Bourassa MG, Kwiterovich P Jr, Wacholder S, Sniderman A. The relation of risk factors to the development of atherosclerosis in saphenous-vein bypass grafts and the progression of disease in the native circulation. A study 10 years after aortocoronary bypass surgery. *N Engl J Med* 1984; 311: 1329-1332.
14. Chaaba R, Smaoui M, Hammami S, Attia N, Ben Hamda K, Masmoudi AS, et al. Role of cholesteryl ester transfer protein activity and genetic polymorphism in ischemic heart disease in type II diabetic patients. *Tunis Med* 2004; 82: 282-288.
15. Corbex M, Poirier O, Fumeron F, Betoulle D, Evans A, Ruidavets JB, Arveiler D, Luc G, Tiret L, Cambien F. Extensive association analysis between the CETP gene and coronary heart disease phenotypes reveals several putative functional polymorphisms and gene-environment interaction. *Genetic Epidemiology* 2000; 19: 64-80.
16. Creighton T E. *Encyclopedia of Molecular Biology* Volume 3. John Wiley & Sons, Inc., New York. 1999.
17. Curtiss LK, Boisvert WA. Apolipoprotein E and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11: 243-251.
18. Dawson SJ, Wiman B, Hamsten A, Green F, Humphries S, Henney AM. The two allele sequences of a common polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene respond differently to interleukin-1 in HepG2 cells. *J Biol Chem* 1993; 268: 10739-10745.

19. de Andrade FM, Silveira FR, Arsand M, Antunes AL, Torres MR, Zago AJ, et al. Association between -250G/A polymorphism of the hepatic lipase gene promoter and coronary artery disease and HDL-C levels in a Southern Brazilian population. *Clin Genet* 2004; 65: 390-395.
20. De Stefano V, Martinelli I, Mannucci PM, Paciaroni K, Chiusolo P, Casorelli I, Rossi E, Leone G. The risk of recurrent deep venous thrombosis among heterozygous carriers of both factor V Leiden and the G20210A prothrombin mutation. *N Engl J Med* 1999; 341: 801-806.
21. Denninger JW, Marletta MA. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* 1999, 1411: 334-350.
22. Evans WE, McLeod HL. Pharmacogenomics - drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med* 2003; 348: 538-549.
23. Favaloro RG. Saphenous vein graft in the surgical treatment of coronary artery disease. Operative technique. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1969; 58: 178-185.
24. Fitzgibbon GM, Kafka HP, Leach AJ, Keon WJ, Hooper GD, Burton JR. Coronary bypass graft fate and patient outcome: angiographic follow-up of 5,065 grafts related to survival and reoperation in 1,388 patients during 25 years. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28: 616-626.
25. Garrett HE, Dennis EW, DeBakey ME. Aortocoronary bypass with saphenous vein graft. Seven-year follow-up. *JAMA* 1973; 223: 792-794.
26. Gaynor JW, Gerdes M, Zackai EH, Bernbaum J, Wernovsky G, Clancy RR, et al. Apolipoprotein E genotype and neurodevelopmental sequelae of infant cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 126: 1736-1745.
27. Geiger M. Protein C inhibitor/plasminogen activator inhibitor 3. *Fibrinolysis* 1988; 2: 183-188.
28. Ghilardi G, Biondi ML, DeMonti M, Bemini M, Turri O, Massaro F, Guagnellini E, Scorza R. Independent risk factor for moderate to severe internal carotid artery stenosis: T786C mutation of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Clin Chem* 2002; 48: 989-993.

29. Girolami A, Scarano L, Tormene D, Cella G. Homozygous patients with the 20210G to A prothrombin polymorphism remain often asymptomatic in spite of the presence of associated risk factors. *Clin. Appl. Thromb. Hemost* 2001; 7: 122-125.
30. Greengard JS, Eichinger S, Griffin JH, Bauer KA. Variability of thrombosis among homozygous siblings with resistance to activated protein C due to an Arg→Gln mutation in the gene for factor V. *N Engl J Med* 1994; 331: 1559-1562.
31. Greiling H, Gressner M. *Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie*. 3. Aufl. Schattauer Verlag, Stuttgart, New York 1995.
32. Griffin JH, Evatt B, Wideman C, Fernández JA. Anticoagulant protein C pathway defective in majority of thrombophilic patients. *Blood* 1993; 82: 1989-1993.
33. Groener JE, Van Rozen AJ, Erkelens DW. Cholesteryl ester transfer activity. Localization and role in distribution of cholesteryl ester among lipoproteins in man. *Atherosclerosis* 1984; 50: 261-271.
34. Grunenfelder J, Umbehr M, Plass A, Bestmann L, Maly FE, Zund G, et al. Genetic polymorphisms of apolipoprotein E4 and tumor necrosis factor beta as predisposing factors for increased inflammatory cytokines after cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004; 128: 92-97.
35. Hegele RA, Tu L, Connelly PW. Human hepatic lipase mutations and polymorphisms. *Hum Mutat* 1992; 1: 320-324.
36. Heit JA, Sobell JL, Li H, Sommer SS. The incidence of venous thromboembolism among Factor V Leiden carriers: a community-based cohort study. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 305-311.
37. Hirashiki A, Yamada Y, Murase Y, Suzuki Y, Kataoka H, Morimoto Y, Tajika T, Murohara T, Yokota M. Association of gene polymorphisms with coronary artery disease in low- or high-risk subjects defined by conventional risk factors. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 1429-1437.
38. Hoogerbrugge N, Jansen H. Atorvastatin increases low-density lipoprotein size and enhances high-density lipoprotein cholesterol concentration in male, but not in female patients with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1999; 146: 167-174.

39. Hooper WC, Lally C, Austin H, Benson J, Dilley A, Wenger NK, Whitsett C, Rawlins P, Evatt BL. The relationship between polymorphisms in the endothelial cell nitric oxide synthase gene and the platelet GPIIIa gene with myocardial infarction and venous thromboembolism in African Americans. *Chest* 1999; 116: 880-886.
40. Kawano T, Morimoto K, Vemura Y. Urokinase inhibitor in human placenta. *Nature* 1968; 217: 253-254.
41. Kawashima S. The two faces of endothelial nitric oxide synthase in the pathophysiology of atherosclerosis. *Endothelium* 2004; 11: 99-107.
42. Kim RJ, Becker RC. Association between factor V Leiden, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations and events of the arterial circulatory system: a meta-analysis of published studies. *Am Heart J* 2003; 146: 948-957.
43. Knatterud GL, Rosenberg Y, Campeau L, Geller NL, Hunninghake DB, Forman SA, Forrester JS, Gobel FL, Herd JA, Hickey A, Hoogwerf BJ, Terrin ML, White C. Long-term effects on clinical outcomes of aggressive lowering of low-density lipoprotein cholesterol levels and low-dose anticoagulation in the post coronary artery bypass graft trial. Post CABG Investigators. *Circulation* 2000; 102: 157-165.
44. Knudson P, Antikainen M, Uusi-Oukari M, Ehnholm S, Lahdenperä S, Bensadoun A, Funke H, Wiesbusch H, Assmann G, Taskinen M-R, Ehnholm C. Heterozygous hepatic lipase deficiency, due to two missense mutations R186H and L334F, in the HL gene. *Atherosclerosis* 1996; 128: 165-174.
45. Koster T, Rosendaal FR, de Ronde H, Briët E, Vandenbroucke JP, Bertina RM. Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. *Lancet* 1993; 342: 1503-1506.
46. Kruithof EKO, Vassalli JD, Schleuning WD, Mattalio RJ, Bachmann F. Purification and characterization of a plasminogen activator inhibitor from the histiocytic lymphoma cell U-937. *J Biol Chem* 1986; 261: 11207-11213.
47. Kuhl H: Atherosklerose-Prophylaxe durch Östrogensubstitution. *Geburtsh Frauenheilk* 1988; 48: 747-756.

48. Kuivenhoven JA, Jukema JW, Zwinderman AH, de Knijff P, McPherson R, Bruschke AV, Lie KI, Kastelein JJ. The role of a common variant of the cholesteryl ester transfer protein gene in the progression of coronary atherosclerosis. The Regression Growth Evaluation Statin Study Group. *N Engl J Med* 1998; 338: 86-93.
49. Loop FD, Lytle BW, Cosgrove DM. Influence of the internal-mammary-artery-graft on 10-year survival and other cardiac events. *N Engl J Med* 1986, 314: 1-6.
50. Mackensen GB, Swaminathan M, Ti LK, Grocott HP, Phillips-Bute BG, Mathew JP, et al. Perioperative Outcomes Research Group; Cardiothoracic Anesthesiology Research Endeavors (C.A.R.E.) Investigators of the Duke Heart Center. Preliminary report on the interaction of apolipoprotein E polymorphism with aortic atherosclerosis and acute nephropathy after CABG. *Ann Thorac Surg* 2004; 78: 520-526.
51. Margaglione M, Cappucci G, Colaizzo D, Giuliani N, Vecchione G, Grandone E, Pennelli O, Di Minno G. The PAI-1 gene locus 4G/5G polymorphism is associated with a family history of coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 152-156.
52. Murtomaki S, Tahvanainen E, Antikainen M, Tiret L, Nicaud V, Jansen H, Ehnholm C. Hepatic lipase gene polymorphisms influence plasma HDL levels. Results from Finnish EARS participants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1879-1884.
53. Nabel EG. Cardiovascular Disease. *N Engl J Med* 2003; 349: 60-72.
54. Nordt T, Bode C. Endogene Fibrinolyse bei Diabetes mellitus und koronarer Herzkrankheit. *Dt Arztebl.* 2002; 99: 354-64.
55. Pabla R, Buda AJ, Flynn DM, Blesse SA, Shin AM, Curtis MJ, Lefer DJ. Nitric oxide attenuates neutrophil-mediated myocardial contractile dysfunction after ischemia and reperfusion. *Circ Res* 1996; 78: 65-72.
56. Quyyumi AA, Dakak N, Andrews NP, Husain S, Arora S, Gilligan DM, Panza JA, Cannon RO. Nitric oxide activity in the human coronary circulation: Impact of risk factors for coronary atherosclerosis. *J Clin Invest* 1995, 95: 1747-1755.
57. Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, Stampfer MJ, Eisenberg PR, Miletich JP. Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1995; 332: 912-917.

58. Roest M, van der Schouw YT, Banga JD. Plasminogen activator inhibitor 4G polymorphism is associated with decreased risk of cerebrovascular mortality in older women. *Circulation* 2000; 101: 67-70.
59. Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP, Reitsma PH. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood* 1995; 85: 1504-1508.
60. Rossi GP, Maiolino G. Association of gene polymorphisms with coronary artery disease in low- or high-risk subjects defined by conventional risk factors. *J Am Coll Cardiol* 2004, 44: 209.
61. Rudic RD, Sessa WC. Nitric oxide in endothelial dysfunction and vascular remodeling: Clinical correlates and experimental links. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 673-677.
62. Russo C, Girelli D, Olivieri O, Guarini P, Manzato F, Pizzolo F, Zaia B, Mazzucco A, Corrocher R. G20210A prothrombin gene polymorphism and prothrombin activity in subjects with or without angiographically documented coronary artery disease. *Circulation* 2001; 103: 2436-2440.
63. Ryan MP, Kutz SM, Higgins PJ. Complex regulation of plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) gene expression by serum and substrate adhesion. *Biochem J* 1996; 314: 1041-1046.
64. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Ehrlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-491.
65. Saku K, Zhang B, Ohta T, Arakawa K. Quantity and function of high density lipoprotein as an indicator of coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 1999; 33: 436-443.
66. Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2. Auflage. 1989.
67. Scarmeas N, Habeck CG, Hilton J, Anderson KE, Flynn J, Park A, Stern Y. APOE related alterations in cerebral activation even at college age. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; 76: 1440-1444.

68. Statistisches Jahrbuch für Deutschland. Hrsg. Statistisches Bundesamt. Kohlhammer Verlag, Stuttgart, Mainz. 1995.
69. Stegnar M, Uhrin P, Peternel P, Mavri A, Salobir PB, Stare J, Binder BR. The 4G/5G sequence polymorphism in the promoter of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene: relationship to plasma PAI-1 level in venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 1998; 79: 975-979.
70. Svensson PJ, Dahlbäck B. Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis. *N Engl J Med* 1994; 330: 517-522.
71. Takaoka M. NOS gene polymorphism. *Nippon Rinsho* 2004; 62: 103-109.
72. Tanus-Santos JE, Desai M, Deak LR, Pezzullo JC, Abernethy DR, Flockhart DA, Freedman JE. Effects of the endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on platelet function, nitric oxide release and interactions with estradiol. *Pharmacogenetics* 2002; 12: 407-413.
73. Taylor KD, Scheuner MT, Yang H, Wang Y, Haritunians T, Fischel-Ghodsian N, et al. Lipoprotein lipase locus and progression of atherosclerosis in coronary-artery bypass grafts. *Genet Med* 2004; 6: 481-486.
74. Tindall KR, Kunkel TA. Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* 1988; 27: 6008-6013.
75. Tsukada T, Yokoyama K, Arai T, Takemoto F, Hara S, Yamada A, et al. Evidence of association of the eNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 245: 190-193.
76. Tuntun U, Aksoyek A, Ulus AT, Misirlioglu M, icekcioglu F, Ozisik K, Ihsan Parlar A, Baran Budak A, Gedik S, Katircioglu SF. Gene polymorphisms in patients below 35 years of age who underwent coronary artery bypass surgery. *Coron Artery Dis* 2006; 17: 35-39.
77. van Hinsbergh V, Kooistra T, van den Bergh E, Princen H, Fiers W, Emeis J. TNF increases the production of PAI in human endothelial cells in vitro and rats in vivo. *Blood* 1988; 72: 1467-1473.
78. Wang XL. Cigarette smoking, DNA variants in endothelial nitric oxide synthase gene and vascular disease. *Contribution Nephrology* 2000; 130: 53-67.

79. Wang XL, Sim AS, Badenhop RF, McCredie RM, Wilcken DE. A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Nat Med* 1996; 2: 41-45.
80. Wang XL, Sim AS, Wang MX, Murrell GA, Trudinger B, Wang J. Genotype dependent and cigarette specific effects on endothelial nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. *FEBS Lett* 2000; 471: 45-50.
81. Wang XL, Wang J. Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. *Mol Genet Metab* 2000, 70: 241-251.
82. Wattanapitayakul SK, Mihm MJ, Young AP, Bauer JA. Therapeutic implications of human endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism. *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22: 361-368.
83. Weinshilboum R. Inheritance and drug response. *N Engl J Med* 2003; 348: 529-537.
84. Yamada Y, Izawa H, Ichihara S, Takatsu F, Ishiara H, Hirayama H, Sone T, Tanaka M, Yokota M. Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes. *N Engl J Med* 2002; 347: 1916-1923.
85. Ye Z, Liu EH, Higgins JP, Keavney BD, Lowe GD, Collins R, Danesh J. Seven haemostatic gene polymorphisms in coronary disease: meta-analysis of 66,155 cases and 91,307 controls. *Lancet* 2006; 367: 651-658.
86. Yen MH, Sheu YZ, Chiou WF, Wu CC. Differential modulation by basilar and mesenteric endothelium of angiotensin-induced contraction in canine arteries. *Eur J Pharmacol* 1990; 180: 209-216.
87. Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, Shimasaki Y, Ogawa H, Kugiyama K, Saito Y, Miyamoto Y, Ogawa Y, Kaneshige T, Hiramatsu H, Yoshioka T, Kamitani S, Teraoka H, Nakao K. Genetic risk factors for coronary artery spasm: significance of endothelial nitric oxide synthase gene T-786→C and missense Glu298Asp variants. *J Investig Med* 2000; 48: 367-374.
88. Zahn R, Beeck H, Winkelmann BR, Seidl K, Schneider S, Hellstern P, et al. Prospective cross-sectional study of haemostatic factors in patients with and without coronary artery disease. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002; 13: 81-87.

89. Zoller B, Garcia DF, Dahlbäck B. A common 4G allele in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene as a risk factor for pulmonary embolism and arterial thrombosis in hereditary protein S deficiency. *Thromb Haemost* 1998; 79: 802-807.

6. Anhang

6.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Häufigkeit der Apolipoprotein E-Genotypen in der deutschen Bevölkerung

Tabelle 2: Wirkung von NO auf Zellen, die eine wichtige Rolle im Herzkreislaufsystem spielen

Tabelle 3: Demographische Daten

Tabelle 4: Klinische Endpunkte

Tabelle 5: Bestandteile des "QIAamp blood mini"-Kits

Tabelle 6: Verwendete PCR-Bedingungen

Tabelle 7: Verwendete Agarosen

Tabelle 8: Verwendete Oligonukleotidprimer im Überblick

Tabelle 9: Zusammensetzung der Puffer für die Restriktionsendonukleasen

Tabelle 10: Eigenschaften der verwendeten Restriktionsenzyme

Tabelle 11: Herstellernachweis

Tabelle 12: Übersicht über die Mutationen und Polymorphismen und ihre Lage sowie die verwendeten Restriktionsenzyme

Tabelle 13: Präoperative Risikofaktoren der KHK und ihre Progression

Tabelle 14: Perioperative Parameter und Progression der KHK

Tabelle 15: Untersuchte Genvarianten und Fortschreiten der KHK

Tabelle 16: Häufigkeitsverteilung der drei ApoE-Allele

Tabelle 17: Häufigkeitsverteilung der Genotypen in Bezug auf einen C→G-Austausch im Kodon 202 des HL-Gens

Tabelle 18: Häufigkeitsverteilung der NOS3-a/b (Deletions-/Insertions-) Genotypen

Tabelle 19: Häufigkeitsverteilung der PAI-1-4G/5G-Genotypen

Tabelle 20: Häufigkeitsverteilung der FVL-G1691A-Mutation

Tabelle 21: Häufigkeitsverteilung der PT-G20210A-Mutation

Tabelle 22: Häufigkeitsverteilung der CETP-C-629A-Genotypen

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gelektrophorese ApoE

Abbildung 2: Gelelektrophorese HL

Abbildung 3: Gelelektrophorese CETP

Abbildung 4: Gelelektrophorese APC/PT

Abbildung 5: Gelelektrophorese PAI-1

Abbildung 6: Gelelektrophorese NOS3

Abbildung 7: Präoperative Medikation

Abbildung 8: NOS3-Genpolymorphismus als Prädiktor für eine Reoperation

Abbildung 9: Häufigkeitsverteilung der unterschiedlichen NOS3-Genotypen in Prozent in dem untersuchten Kollektiv

Abbildung 10: Genetisches Risikoprofil und Progression der koronaren Herzerkrankung

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum erfolgreichen Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders herzlich bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. habil. Peter Lohse für die außerordentlich engagierte und konstruktive wissenschaftliche Betreuung sowie die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Mein Dank gilt auch meiner Betreuerin Frau Dr. med. Sandra Eifert für die wertvolle Unterstützung bei dem klinischen Teil der Arbeit, der Patientenrekrutierung und für die vielfältigen Anregungen beim Verfassen der Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Frau Pia Lohse für die geduldige, immer freundliche Einarbeitung und Hilfe bei der Laborarbeit sowie das Korrekturlesen der Arbeit. Ebenso gilt mein Dank Heike Rübsamen und Gabi Simon für die Unterstützung bei den Experimenten und die nette Zusammenarbeit.

Herrn PD Dr. med. Nollert danke ich für die Überlassung des Themas und die Durchführung der Statistik.

Schließlich danke ich allen Patienten, ohne deren Einverständnis und Mitarbeit diese Studie nicht möglich gewesen wäre.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Geburtsdatum	22.02.1981
Geburtsort	München

Schulbildung

1987 – 1991	Grundschule Lochham
1991 – 2000	Feodor-Lynen-Gymnasium, Planegg
Juli 2000	Allgemeine Hochschulreife

Studium

Oktober 2000	Beginn des Medizinstudiums an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
September 2002	Ärztliche Vorprüfung
August 2003	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
September 2005	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
November 2006	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen

Innere Medizin, Krankenhaus Barmherzige Brüder, München
Herzchirurgie, Klinikum Großhadern, München
Plastische- und Wiederherstellungschirurgie, Universitätsklinik Innsbruck
Pädiatrie, Hospital del Niño, Ecuador

Praktisches Jahr

Oktober 2005 – Februar 2006	1. Terial an den Medizinischen Kliniken II und III des Klinikums Großhadern, München
Februar – Mai 2006	2. Terial an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der LMU, München
Mai – August 2006	3. Terial in der chirurgischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses München-Schwabing

Promotion

Klinische Studie zur Evaluation des Einflusses von genetischen Risikofaktoren auf die Progression der Atherosklerose nach erfolgter aortokoronarer Bypassoperation, Institut für Klinische Chemie und Klinik für Herzchirurgie der LMU München

Sprachen

Englisch
Französisch
Spanisch