

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III
(Direktor: Prof. Dr. K. Werdan) und dem Institut für Humangenetik und
Medizinische Biologie (Direktor: Prof. Dr. I. Hansmann)
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



**Untersuchungen zum Stellenwert von
polymorphen genetischen Markern bei
koronarer Atherosklerose unter Berücksichtigung
einer Restenosierung nach PTCA**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

Vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Lorenz Arndt Weidhase
geboren am 22. April 1975 in Halle/Saale

Gutachter:

1. Prof. Teichmann
2. Prof. Hansmann
3. Prof. Voss

Verteidigungsdatum: 27.06.2002

urn:nbn:de:gbv:3-000003624

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000003624>]

„Eine jegliche Krankheit hat ihre eigene Arznei“

Philipp Theophrast Bombast von Hohenheim (Paracelsus)

Widmung

Diese Dissertation widme ich meinen Eltern. Schon frühzeitig weckten sie mein Interesse für die Naturwissenschaften, zeigten mir wichtige Grundlagen wissenschaftlichen Denkens und legten somit die geistige Grundlage dieser Arbeit. Außerdem erhielt ich von ihnen während der Durchführung der Dissertation zu jeder Zeit viel Verständnis, Geduld und großzügige Unterstützung, wofür ich mich ganz herzlich bedanken will.

Lorenz Arndt Weidhase

Referat

Zielstellung: Zahlreiche Publikationen weisen auf die Bedeutung der Proteine Angiotensinogen, Apo E und *p22-phox* bei der Pathogenese atherosklerotischer Gefäßveränderungen hin. Daher erfolgte in der vorliegenden Dissertation anhand einer mitteldeutschen Bevölkerungsstichprobe die Analyse des AGT (C659T)-, Apo E (112, 158)- und *p22-phox* (C242T)-Polymorphismus bei Koronarpatienten unter Berücksichtigung einer Restenosierung nach PTCA.

Material und Methoden: Für die Untersuchung wurden 123 KHK-Patienten (Alter: $46,6 \pm 5,9$ Jahre; 83,7 % männlich) mit nachgewiesenem Myokardinfarkt, erfolgter PTCA oder nach ACVB/IMAB konsekutiv rekrutiert. Als Vergleichsgruppe dienten 260 gesunde Langzeitblutspender (Alter: $46,6 \pm 8,0$ Jahre; 78,8 % männlich). Alle Studienteilnehmer gehörten der kaukasischen Rasse an. Nach klinischer Charakterisierung und Analyse ausgewählter Laborparameter erfolgte die Typisierung der genomischen DNA aus Leukozyten mit Hilfe von PCR- und RFLP-Techniken. Als Restenose wurde eine interventionspflichtige Wiederverengung eines bereits ballongedehnten Gefäßes innerhalb von 6 Monaten nach dem Primäreingriff definiert.

Ergebnisse und Schlussfolgerungen: Der AGT (C659T)-Polymorphismus zeigte keine Assoziation zur KHK. Allerdings zeichneten sich T-Allel-Träger durch signifikant erhöhte Plasmaspiegel für Protein C ($p=0,033$) und Faktor VII ($p=0,013$) aus. Möglicherweise weist diese Beziehung zu wichtigen Faktoren des Gerinnungssystems auf eine funktionelle Relevanz bei der Entwicklung atherosklerotischer Erkrankungen hin. Die Apo E (112, 158)- $\epsilon 3/\epsilon 4 + \epsilon 4/\epsilon 4$ -Genotypen waren unter den Koronarpatienten signifikant häufiger nachweisbar ($p=0,044$; OR=1,787), insbesondere bei isolierter Betrachtung des weiblichen Geschlechts ($p=0,017$; OR=6,000). Des Weiteren neigten $\epsilon 4$ -Allelträger in einer prospektiven Untersuchung stärker zur Entwicklung einer Restenose ($p_{\text{exact}}=0,035$). Offensichtlich erhöht diese Genvariante unter bestimmten Bedingungen die Empfänglichkeit für die Ausbildung pathologischer Veränderungen an den Herzkranzgefäßen. Für den *p22-phox* (C242T)-Polymorphismus konnte insgesamt keine Assoziation zur KHK beobachtet werden. Ungeachtet dessen häuften sich die Träger des T-Allels unter den koronarchirurgisch therapierten Patienten ($p=0,011$; OR=2,823) sowie in einer Gruppe aus Langzeitüberlebenden nach MI ($p=0,013$; OR=3,058) signifikant. Dieser Befund lässt eine koronarprotektive Wirkung dieser Genvariante vermuten. Die Analyse genetischer Cluster ergab Hinweise auf eine potentielle Interaktion der untersuchten Genotypen. Zur Validierung der Ergebnisse dieser Dissertation sind weitere Studien erforderlich.

Weidhase, Lorenz Arndt: Untersuchungen zum Stellenwert von polymorphen genetischen Markern bei koronarer Atherosklerose unter Berücksichtigung einer Restenosierung nach PTCA Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 76 Seiten, 2001

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Angiotensinogen	3
1.2. Apolipoprotein E	5
1.3. <i>p22-phox</i>	7
2. Fragestellung	11
3. Material und Methoden	12
3.1. Das Patientenkollektiv	12
3.2. Die Kontrollgruppe	12
3.3. Erhebung der Patientendaten	12
3.4. Labordiagnostik	14
3.5. Genotypisierung	15
3.5.1. Der Angiotensinogen (C659T)-Polymorphismus	16
3.5.2. Der Apolipoprotein E (112, 158)-Polymorphismus	17
3.5.3. Der <i>p22-phox</i> (C242T)-Polymorphismus	17
3.6. Statistische Methoden	18
4. Ergebnisse	20
4.1. Gruppencharakterisierung	20
4.1.1. Die Patienten	20
4.1.2. Vergleich zwischen Blutspendern und Patienten	25
4.2. Untersuchungen zu den Genpolymorphismen	26
4.2.1. Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	26
4.2.2. Der Angiotensinogen (C659T)-Polymorphismus	26
4.2.3. Der Apolipoprotein E (112, 158)-Polymorphismus	30
4.2.4. Der <i>p22-phox</i> (C242T)-Polymorphismus	35
4.2.5. Potentielle Interaktionen zwischen den untersuchten Genpolymorphismen	39
4.3. Analyse der KHK-Interventionsgruppen	40

5.	Diskussion	41
5.1.	Der Angiotensinogen (C659T)-Polymorphismus	41
5.2.	Der Apolipoprotein E (112, 158)-Polymorphismus	45
5.2.1.	Der Apolipoprotein E (112, 158)-Polymorphismus und KHK	45
5.2.2.	Der Apolipoprotein E (112, 158)-Polymorphismus und Restenose nach PTCA	48
5.2.3.	Der Apolipoprotein E (112, 158)-Polymorphismus und Laborwerte	49
5.3.	Der <i>p22-phox</i> (C242T)-Polymorphismus	50
5.4.	Potentielle Interaktionen zwischen den untersuchten Genpolymorphismen	54
5.5.	Fehlerdiskussion	58
5.6.	Klinische Anwendung und Perspektiven	60
6.	Zusammenfassung und Schlussfolgerungen	63
7.	Literaturverzeichnis	65
8.	Thesen	74

Verzeichnis der Tabellen

		Seite
Tabelle 1	Bestimmungsmethoden und dadurch analysierte Laborwerte	15
Tabelle 2	Verwendete Primer bei der Genotypisierung des AGT (C659T)-, Apo E (112, 158)- und <i>p22-phox</i> (C242T)-Polymorphismus	16
Tabelle 3	Technologische Daten bei der Genotypisierung des AGT (C659T)-, Apo E (112, 158)- und <i>p22-phox</i> (C242T)-Polymorphismus	16
Tabelle 4	Analysierte Rechenmodelle für den Apo E (112, 158)-Polymorphismus	19
Tabelle 5	Klinische Zusammensetzung der Patientengruppe (n=123)	20
Tabelle 6	Medikamentöse Behandlung der KHK-Patienten (n=123)	21
Tabelle 7	Laborwerte der Patienten	23
Tabelle 8	Angiotensinogen (C659T)-Polymorphismus: PAI-1- und Protein C-Plasmaspiegel in Abhängigkeit vom Genotyp unter Annahme eines dominanten genetischen Modells für das T-Allel	28
Tabelle 9	Angiotensinogen (C659T)-Polymorphismus: Fibrinogen- und Faktor VII-Plasmaspiegel in Abhängigkeit vom Genotyp unter Annahme eines dominanten genetischen Modells für das T-Allel	28
Tabelle 10	Apo E (112, 158)-Polymorphismus: ausgewählte Lipidparameter unter Annahme eines dominanten genetischen Modells für das ϵ 2- bzw. ϵ 4-Allel	34

Verzeichnis der Abbildungen

		Seite
Abbildung 1	Endogene und exogene Risikofaktoren der KHK	1
Abbildung 2	Schematische Darstellung des Renin-Angiotensin-Systems	4
Abbildung 3	Die Bedeutung von Apo E beim Transport exogener und endogener Lipide	6
Abbildung 4	Vaskuläre NAD(P)H-Oxidase im aktivierten Zustand	8
Abbildung 5	Pathophysiologische Bedeutung der vaskulären NAD(P)H-Oxidase	10
Abbildung 6	RFLP-Analyse der Angiotensinogen (C659T)-Genotypen nach Spaltung des 526 bp-großen, spezifischen PCR-Produktes mit dem Enzym <i>Nco I</i>	17
Abbildung 7	Fragmentmuster der RFLP-Analyse zur Identifizierung der Apo E (112, 158)-Genotypen nach Spaltung des 330 bp-großen, spezifischen PCR-Produktes mit dem Restriktionsenzym <i>Hha I</i>	17
Abbildung 8	Genotypisierung des <i>p22phox</i> (C242T)-Polymorphismus mittels RFLP-Analyse: Spaltung des 886 bp-großen, spezifischen PCR-Produktes mit dem Enzym <i>Rsa I</i>	18
Abbildung 9	Primärversorgung der MI-Patienten (n=94)	22
Abbildung 10	Weitere Therapie aller KHK-Patienten (n=123)	22
Abbildung 11	Typische familiäre Konstellation in den Sippen zweier Patienten aus der untersuchten KHK-Gruppe (n=123)	24
Abbildung 12	Angiotensinogen (C659T)-Polymorphismus: KHK-Patienten und gesunde Blutspender	26

Abbildung 13	Angiotensinogen (C659T)-Polymorphismus: KHK-Patienten und gesunde Blutspender unter Annahme eines dominanten genetischen Modells für das T-Allel	27
Abbildung 14	Angiotensinogen (C659T)-Polymorphismus: Protein C-Plasmaspiegel in Abhängigkeit vom Genotyp unter Annahme eines dominanten genetischen Modells für das T-Allel	29
Abbildung 15	Angiotensinogen (C659T)-Polymorphismus: Faktor VII-Plasmaspiegel in Abhängigkeit vom Genotyp unter Annahme eines dominanten genetischen Modells für das T-Allel	29
Abbildung 16	Apo E (112, 158)-Polymorphismus: KHK-Patienten und gesunde Blutspender	31
Abbildung 17	Apo E (112, 158)-Polymorphismus: KHK-Patienten und gesunde Blutspender unter Annahme eines dominanten genetischen Modells für das $\epsilon 2$ - bzw. $\epsilon 4$ -Allel	31
Abbildung 18	Apo E (112, 158)-Polymorphismus: Weibliche KHK-Patienten und gesunde weibliche Blutspender unter Annahme eines dominanten genetischen Modells für das $\epsilon 2$ - bzw. $\epsilon 4$ -Allel	32
Abbildung 19	Apo E (112, 158)-Polymorphismus: Restenose nach PTCA unter Annahme eines dominanten genetischen Modells für das $\epsilon 2$ - bzw. $\epsilon 4$ -Allel	33
Abbildung 20	Apo E (112, 158)-Polymorphismus: Apo B-Serumspiegel unter Annahme eines dominanten genetischen Modells für das $\epsilon 2$ - bzw. $\epsilon 4$ -Allel	34
Abbildung 21	<i>p22-phox</i> (C242T)-Polymorphismus: KHK-Patienten und gesunde Blutspender	35

Abbildung 22	<i>p22-phox</i> (C242T)-Polymorphismus: KHK-Patienten und gesunde Blutspender unter Annahme eines dominanten genetischen Modells für das T-Allel	36
Abbildung 23	<i>p22-phox</i> (C242T)-Polymorphismus: Patienten nach erfolgtem koronarchirurgischen Eingriff (ACVB/IMAB) und gesunde Blutspender unter Annahme eines dominanten genetischen Modells für das T-Allel	37
Abbildung 24	<i>p22-phox</i> (C242T)-Polymorphismus: Langzeitüberlebende nach Myokardinfarkt und gesunde Blutspender unter Annahme eines dominanten genetischen Modells für das T-Allel	37
Abbildung 25	<i>p22-phox</i> (C242T)-Polymorphismus: Patienten mit koronarer Ein- oder Mehrgefäßerkrankung unter Annahme eines dominanten genetischen Modells für das T-Allel	38
Abbildung 26	Gencluster aus Apo E (112, 158): $\epsilon 3/\epsilon 4 + \epsilon 4/4$, <i>p22-phox</i> (C242T): CT+TT und Angiotensinogen (C659T): CC im Vergleich mit allen übrigen Genkombinationen bei KHK-Patienten und gesunden Blutspendern	39
Abbildung 27	Therapieentscheidung in Abhängigkeit von der Ausdehnung der KHK	40
Abbildung 28	Potentielle Interaktionen von Angiotensinogen (C659T)-, Apo E (112, 158)- und <i>p22-phox</i> (C242T)-Polymorphismus bei der Pathogenese der Atherosklerose	57

Verzeichnis der Abkürzungen

A	Adenin
ACE	„angiotensin converting enzyme“
ACVB	aortokoronarer Venenbypass
ADH	antidiuretisches Hormon
ALAT	Alaninaminotransferase
AGT	Angiotensinogen
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
AP-1	„phorbol ester responsive element activator protein 1“
Apo A1	Apolipoprotein A1
Apo B	Apolipoprotein B
Apo B 48	Apolipoprotein B 48
Apo B 100	Apolipoprotein B 100
Apo E	Apolipoprotein E
ASAT	Aspartataminotransferase
AT ₁	Angiotensin II-Rezeptor Typ 1
AT III	Antithrombin III
BMI	„body mass index“
C	Cytosin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CE	Cholesterolester
CI	95 %-Konfidenzintervall
CM	Chylomikronen
CMR	„Chylomikronenremnants“
CMV	Zytomegalie-Virus
CRP	C-reaktives Protein
D	Deletion
DNA	„desoxyribonucleic acid“
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
et al.	et alias
G	Guanin
G	G-Protein (nur in Abbildung 4 und 28 entsprechend der international gebräuchlichen Nomenklatur)
γ-GT	γ-Glutamyltranspeptidase

<i>gp</i>	„glycosylated protein“
Gp IIIa	Glykoprotein IIIa
Hb	Hämoglobin
HDL	„high density lipoproteins“
HDLC	HDL-Cholesterol
Hk	Hämatokrit
HMG-CoA	β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-Coenzym-A
HSR	Hälftespielraum
I	Insertion
IDL	„intermediate density lipoproteins“
IL-6	Interleukin-6
IMAB	„internal mammary artery bypass“
INR	„international normalized ratio“
IP ₃	Inositoltriphosphat
KHK	koronare Herzkrankheit
LDL	„low density lipoproteins“
LDL (ox.)	oxidierte LDL
LDLC	LDL-Cholesterol
Lk	Leukozyten
Lp(a)	Lipoprotein(a)
LRP	„low density lipoprotein receptor-related protein“
M	Methionin
MCP-1	„monocyte chemotactic protein-1“
M-CSF	„monocyte colony-stimulating factor“
MI	Myokardinfarkt
<i>mox</i>	mitogene Oxidase
MLU	Martin-Luther-Universität
NAD, NADH	Nikotinsäureamindinukleotid, reduziertes NAD
NADP, NADPH	Nikotinsäureamindinukleotidphosphat, reduziertes NADP
NF κ B	Nukleärer Faktor κ B
•NO	Stickstoffmonoxidradikal
NYHA	„New York Heart Association“
•O ₂ ⁻	Superoxidradikal
OR	„odds ratio“
p	Irrtumswahrscheinlichkeit

p_{exact}	Irrtumswahrscheinlichkeit nach Durchführung von „Fisher’s <i>exact test</i> “
p	„ <i>protein</i> “
P	Phosphat
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-Komplex-1
PAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PAG	Polyacrylamidgel
PCR	„ <i>polymerase chain reaction</i> “
PDGF	„ <i>platelet derived growth factor</i> “
Q	Quartil
<i>phox</i>	„ <i>phagocyte oxidase</i> “
PTCA	perkutane transluminale Koronarangioplastie
RAS	Renin-Angiotensin-System
<i>Rap1a</i>	Regulormolekül aus der Familie der G-Proteine
<i>Rac2</i>	Regulormolekül aus der Familie der G-Proteine
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
σ	Standardabweichung
Serpin	Serinproteaseinhibitor
SOD	Superoxiddismutase
SPSS	„ <i>Superior Performing Software System</i> “
T	Thymin (als Nukleobase)
T	Threonin (als Aminosäure; nur in Zusammenhang mit dem AGT T174M- und AGT M235T-Polymorphismus entsprechend der international gebräuchlichen Nomenklatur)
Tab.	Tabelle
TC	Total-Cholesterol
TG	Triglyzeride
TF	„ <i>tissue factor</i> “
Th	Thrombozyten
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TZ	Thrombinzeit
VCAM-1	„ <i>vascular cell adhesion molecule 1</i> “
VLDL	„ <i>very low density lipoproteins</i> “
Z	Median

1. Einleitung

Atherosklerose ist die Hauptursache für Myokardinfarkte und apoplektische Insulte. Sie ist vor allem dadurch für etwa 50 % aller Todesfälle in den westlichen Industrienationen verantwortlich und stellt somit ein epidemiologisches und gesundheitspolitisches Kernproblem dar. In den letzten Jahren kam es zu einem bedeutenden Erkenntniszuwachs über die komplexen pathogenetischen Zusammenhänge der Entstehung atherosklerotischer Gefäßerkrankungen. Ein multifaktorielles Zusammenspiel von Umwelt und erblicher Veranlagung führt zur Manifestation dieser krankhaften Veränderungen insbesondere im Bereich der hirnversorgenden, der Herzkranz- und der Extremitätenarterien (68, 13). In Abbildung 1 ist eine Übersicht mit Wichtung endogener (dunkler Hintergrund) und exogener (heller Hintergrund) Komponenten etablierter koronarer Risikofaktoren dargestellt.

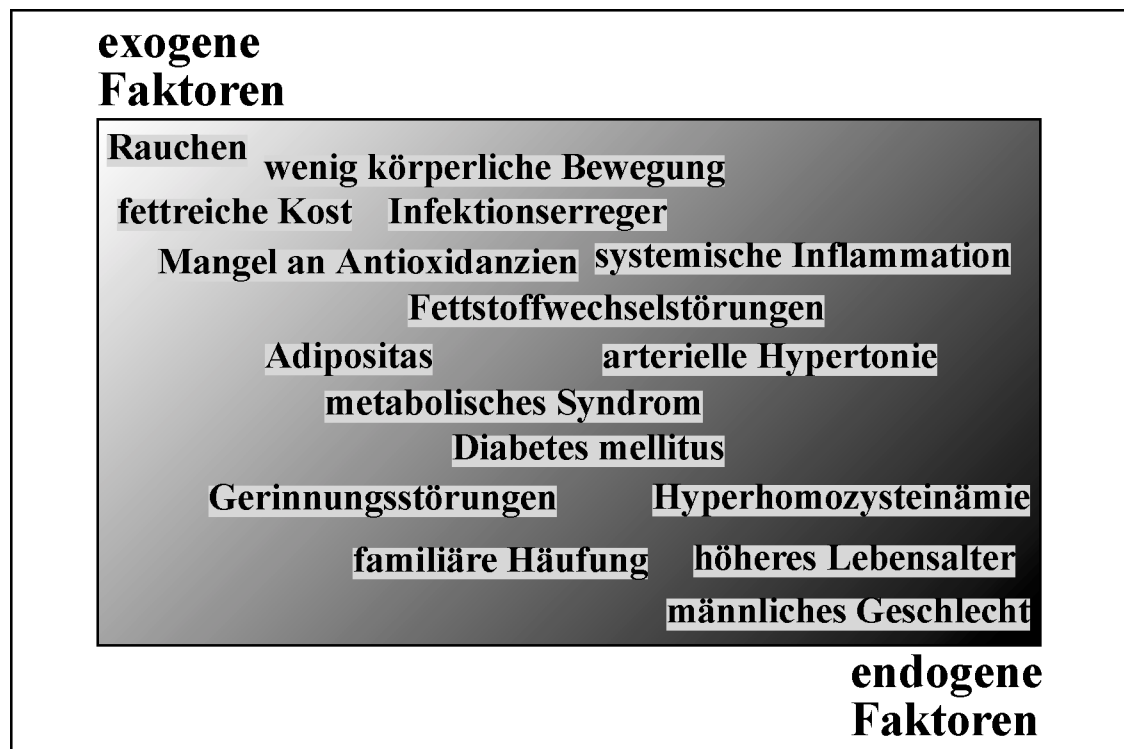


Abb. 1: Endogene und exogene Risikofaktoren der KHK, modifiziert nach Lusis (68)

Initialereignis der Entwicklung atherosklerotischer Plaques ist die subendotheliale Ablagerung cholesterolreicher Lipoproteine, vor allem von LDL. Gefäßbiegungen und -verzweigungen weisen eine erhöhte Permeabilität des Endothels auf und sind somit für Lipoproteindepositionen besonders anfällig. Bis zu einem Total-Cholesterol (TC)/HDL-Cholesterol (HDLC)-Quotienten von etwa vier sind die HDL-Partikel in der Lage, das überschüssige Cholesterol aus der Intima herauszuwaschen. Wird dieser Quotient überschritten ($TC/HDLC \geq 4$), ist die Rücktransportkapazität der HDL-Partikel unzureichend. Es kommt zwangsläufig zur

subendothelialen Anreicherung der cholesterinreichen Lipoproteine, die daraufhin einer Modifikation unterliegen und als minimal-oxidierte LDL bezeichnet werden. Das darüber liegende Endothel reagiert auf diese Veränderung und exprimiert verstärkt VCAM-1, MCP-1 und M-CSF. In dessen Folge findet eine Rekrutierung von Monozyten und T-Lymphozyten aus der Blutbahn statt. Monozyten wandeln sich zu Makrophagen um und produzieren verstärkt Zytokine. Eine dadurch induzierte, gesteigerte Radikalbildung ist für die Umwandlung minimal-oxidierter in stark-oxidierte LDL-Partikel verantwortlich. Koronare Risikofaktoren, wie zum Beispiel Hypertonie und Zigarettenrauchen, potenzieren diesen Prozess. Stark-oxidierte LDL sind nicht mehr regulär über den LDL-Rezeptor endozytierbar und werden deshalb mit Hilfe der „Scavenger-Rezeptoren“ von den Makrophagen aufgenommen. Persistieren atherosklerotische Risikofaktoren weiter, dann wird die Aufnahmekapazität der Makrophagen überschritten, die sich daraufhin in cholesterolgefüllte Schaumzellen umwandeln. Da dieser Prozess keiner „Feedback-Regulation“ unterliegt, phagozytieren die Makrophagen unkontrolliert weiter bis zum Zelltod. Durch die darauf zurückzuführenden nekrotischen Veränderungen entstehen extrazelluläre Lipidseen aus Cholesterol und Cholesterolestern, die das Endothel zu noch stärkerer Produktion von Gewebshormonen anregen. Danach wandern Mediamyozyten in den subendothelialen Raum ein, proliferieren und wandeln sich in faser- und matrixbildende Myofibroblasten um. Eine typische atherosklerotische Läsion aus lipidreichem Kern („core“) und bindegewebiger Hülle („cap“) entsteht. Je nach Verhältnis und Zusammensetzung dieser zwei Komponenten werden stabile und instabile Plaques unterschieden. Instabile Plaques mit einer dünnen fibrösen Hülle, degenerierter Matrix, ausgedehntem Lipidkern und zahlreichen Entzündungszellen neigen stark zu Endothelrissen mit nachfolgender Thrombosierung des Lumens. Dies stellt das morphologische Korrelat akuter Gefäßverschlüsse dar, die dann zum Beispiel als akuter Myokardinfarkt oder apoplektischer Insult klinisch manifest werden (7, 13, 68, 101, 116).

Bei der Therapie akuter und chronischer Verengungen im Bereich der Herzkranzgefäße hat in den letzten beiden Jahrzehnten die Bedeutung perkutaner transluminaler Koronarangioplastien (PTCA) ständig zugenommen. Der wichtigste Limitationsfaktor einer PTCA ist das Phänomen der Restenose. Insgesamt sind etwa 20-50% aller ballondilatierten Koronarpatienten von diesem komplexen, multifaktoriellen Prozess betroffen, der innerhalb der ersten sechs Monate nach dem interventionellen Eingriff abgeschlossen ist. Die Restenose ist Hauptursache für Morbidität und Mortalität im 1. Jahr nach erfolgter PTCA. Als beste Prophylaxe hat sich in letzter Zeit immer mehr die intrakoronare Stentimplantation etabliert (58). Aktuelle Untersuchungen demonstrieren eine weitere Senkung der Restenoserate durch die Anwendung einer intravasalen Brachytherapie (63, 91, 114).

Für viele der mit der Atheroskleroseentstehung, Plaqueruptur und Restenosierung in Zusammenhang stehenden Proteine und Peptide wurden auf genomischer Ebene bereits Mutationen und Polymorphismen beschrieben. Diese Kandidatengene sind meist elementare Funktionsträger im Fettstoffwechsel, in der Blutdruckregulation oder Blutgerinnung. Nur eine geringe Anzahl erblicher Herz-Kreislauf-Erkrankungen lassen sich bisher durch monogene Defekte, die einem klassischen Mendelschen Erbgang folgen, erklären. Ein Beispiel hierfür ist die durch einen LDL-Rezeptordefekt gekennzeichnete Hypercholesterolämie Typ IIa (104). In den meisten Fällen familiärer Häufung atherosklerotischer Prozesse steht ein multifaktorielles Geschehen im Vordergrund. Hierbei spielt die Interaktion aus Lebensstil, Umwelt und genetischer Disposition eine entscheidende Rolle. Die Suche nach entsprechenden Kandidatengenen, die das kardiovaskuläre Risiko beeinflussen, ist ein wichtiger Bestandteil der klinisch-genetischen Forschung. Zahlreiche Genpolymorphismen werden zur Zeit kontrovers als Risikofaktoren für eine KHK diskutiert. Verschiedene Varianten des ACE-, Lp(a)- und Fibrinogen-Genes sind Beispiele hierfür (68, 104). In der vorliegenden Arbeit soll der Stellenwert des Angiotensinogen (C659T)-, Apo E (112, 158)- und *p22-phox* (C242T)-Polymorphismus bei koronarer Atherosklerose unter Berücksichtigung der Restenosierung nach interventioneller Dilatation verengter Herzkranzgefäße untersucht werden.

1.1. Angiotensinogen

Angiotensinogen (AGT) ist ein 452 Aminosäuren umfassendes Glykoprotein. Die molare Masse dieses globoiden Moleküles beträgt je nach Glykosylierungsgrad 55-65 kD. Phylogenetisch gehört es zur Superfamilie der Serinproteaseinhibitoren (Serpine). Dies erklärt auch die ausgeprägte Strukturhomologie zum α_1 -Antitrypsin (36, 42, 87).

Der bedeutsamste Bildungsort des Angiotensinogens ist das Leberparenchym. Eine geringere Syntheserate ist aber auch in Gehirn, Rückenmark, Aortenwand, Niere, Vorhof, Milz und Fettgewebe nachweisbar (55). Östrogene, Glucocorticoide, Schilddrüsenhormone, Zytokine und Angiotensin II (Ang II) können die Produktion dieses Proteins steigern (87). Angiotensinogen ist als Ausgangssubstanz des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) von zentraler Bedeutung für die Aufrechterhaltung von Blutdruck, Wasser- und Elektrolythaushalt. Alle Komponenten des RAS zirkulieren im Blutplasma. Es verdichten sich jedoch auch Hinweise auf lokale, gewebebeständige Renin-Angiotensin-Systeme (42).

Bei jeder Form der renalen Minderdurchblutung, einem Abfall der NaCl-Plasmakonzentrationen und β -adrenerger Stimulation durch sympathische Nierennerven kommt es in den

juxtaglomerulären, granulierten Zellen der Vasa afferentia zu einer verstärkten Freisetzung der Aspartylprotease Renin. Das Enzym spaltet vom Angiotensinogen N-terminal das Dekapeptid Angiotensin I (Ang I) ab. Diese Reaktion ist gleichzeitig der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des gesamten RAS (12, 72). Ang I wird daraufhin unter Einwirkung der Dipeptidylcarboxypeptidase „*Angiotensin converting enzyme*“ (ACE) in die physiologisch aktive Form Ang II umgewandelt. Vor allem durch Interaktion mit dem Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 (AT₁) werden Vasokonstriktion, Aldosteronsekretion, Anstieg von Blutdruck und Herzfrequenz, Durst und ADH-Freisetzung vermittelt. Als „*second messenger*“ dienen hierbei die Phospholipasen C und D, sowie cAMP. Dieses lebenswichtige, physiologische System kann unter bestimmten Bedingungen bei der Genese von Hypertonie, Restenose nach PTCA, Herzhypertrophie und „*Remodeling*“ nach Myokardinfarkt eine pathologische Bedeutung erlangen (42). In Abbildung 2 ist die Interaktion der entscheidenden Elemente des RAS dargestellt.

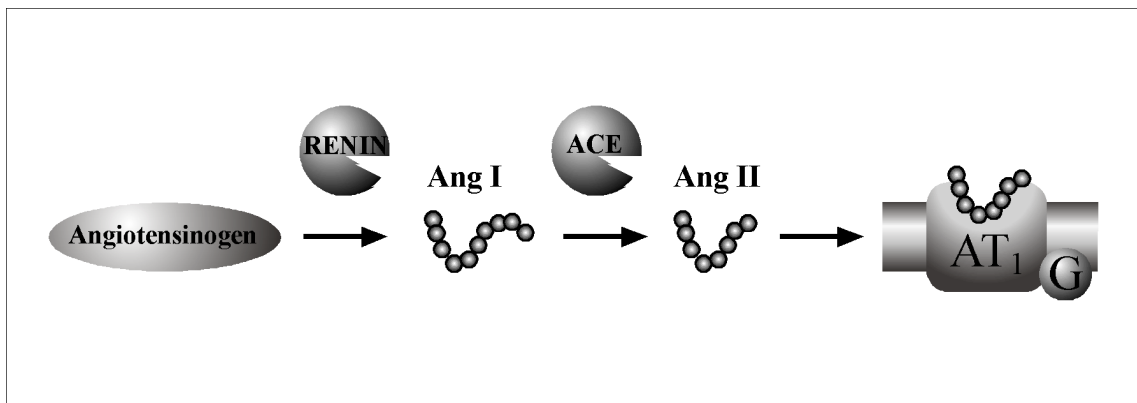


Abb. 2: Schematische Darstellung des Renin-Angiotensin-Systemes, modifiziert nach Griendling et al. (42)

Das kodierende Gen für Angiotensinogen wurde auf Chromosom 1q42-43 detektiert (16). Es hat eine Länge von 13,4 kb und umfasst 5 Exons und 4 Introns. Im Bereich des 5'-Endes befinden sich die Regulatorstrukturen für Initiation und Promotion der Transkription, sowie Bindungsstrukturen für Glucocorticoide, Östrogene und Schilddrüsenhormone und weitere Botenstoffe (36). Xavier Jeunemaitre et al. lokalisierten 1992 insgesamt 15 verschiedene Polymorphismen auf dem Angiotensinogen-Gen. Zwei dieser Polymorphismen, T174M (C659T) und M235T, zeigten in der gleichen Arbeit eine Assoziation zur essentiellen arteriellen Hypertonie (57).

Gene, die für Komponenten des RAS kodieren, können als Kandidatengene für verschiedenste kardiovaskuläre Erkrankungen betrachtet werden (106). Beim in der vorliegenden Arbeit untersuchten T174M-Proteinpolymorphismus erfolgt eine Substitution der Aminosäure

Threonin gegen Methionin an Position 174 des Angiotensinogenmoleküls. Dies entspricht einem Basenaustausch von Cytosin (C) nach Thymin (T) an Stelle 659 im Exon 2 (57). Da in der hier präsentierten Untersuchung das Angiotensinogen-Gen analysiert wurde, wird in den weiteren Ausführungen anstelle des T174M- nur noch der C659T-Terminus verwendet.

1.2. Apolipoprotein E

Das Apolipoprotein E (Apo E) ist ein essentielles Struktur- und Regulatoreiweiß zahlreicher Lipoproteine (70). Dies sind insbesondere VLDL, IDL, HDL und Chylomikronenremnants (118). Das Molekulargewicht dieses argininreichen, alkalisch reagierenden Glykoproteins beträgt 34,2 kD (2, 109). Innerhalb der 299 Aminosäuren umfassenden Polypeptidkette befindet sich die rezeptorbindende Domäne aminoterminal (Position 136-150) und die lipidbindende Region carboxyterminal (Position 244-272) (81). Der durchschnittliche Apo E-Serumspiegel beträgt etwa 5 mg/l (70).

Im Organismus ist Apo E fast ubiquitär anzutreffen. Hauptbildungsort sind die Hepatozyten, wo dieses Apolipoprotein zum Beispiel als Bestandteil der VLDL-Partikel synthetisiert wird. Weiterhin erfolgt eine quantitativ bedeutsame Apo E-Synthese in den Astrozyten des Zentralnervensystems. Im Liquor cerebrospinalis stellt Apo E das wichtigste Apolipoprotein dar. Des weiteren produzieren Makrophagen größere Mengen dieses Moleküls, das dann auf HDL-Partikel übertragen eine zentrale Stellung beim reversen Cholesteroltransport einnimmt (70).

Eine besondere Bedeutung hat Apo E als Erkennungsmolekül auf verschiedenen Lipoproteinen bei Verteilung endogener und exogener Lipide, wobei die Leber eine zentrale Position einnimmt (Abb. 3). Als Rezeptoren für Apo E wurden der Apo B/E-Rezeptor (LDL-Rezeptor) und Apo E-Rezeptor (LRP) identifiziert (53, 81). Außerdem finden Apo E-medierte Lipidtransporte zwischen den Zellen innerhalb eines Organes statt. Ein Beispiel hierfür ist die Regeneration verletzter Nervenzellen. Des weiteren wird in der Literatur über regulatorische Eigenschaften des Apo E bei Wachstum und Differenzierung berichtet (70). Es wird vermutet, dass eine Beeinflussung der Wirkung von Wachstumsfaktoren durch Interaktion dieses alkalischen Apolipoproteins mit sauren Glucosaminoglykanen der extrazellulären Matrix erfolgt. Auch immunmodulatorische Effekte Apo E-haltiger Lipoproteine bei systemischen Inflammationsreaktionen sind Gegenstand kontroverser Diskussionen (70).

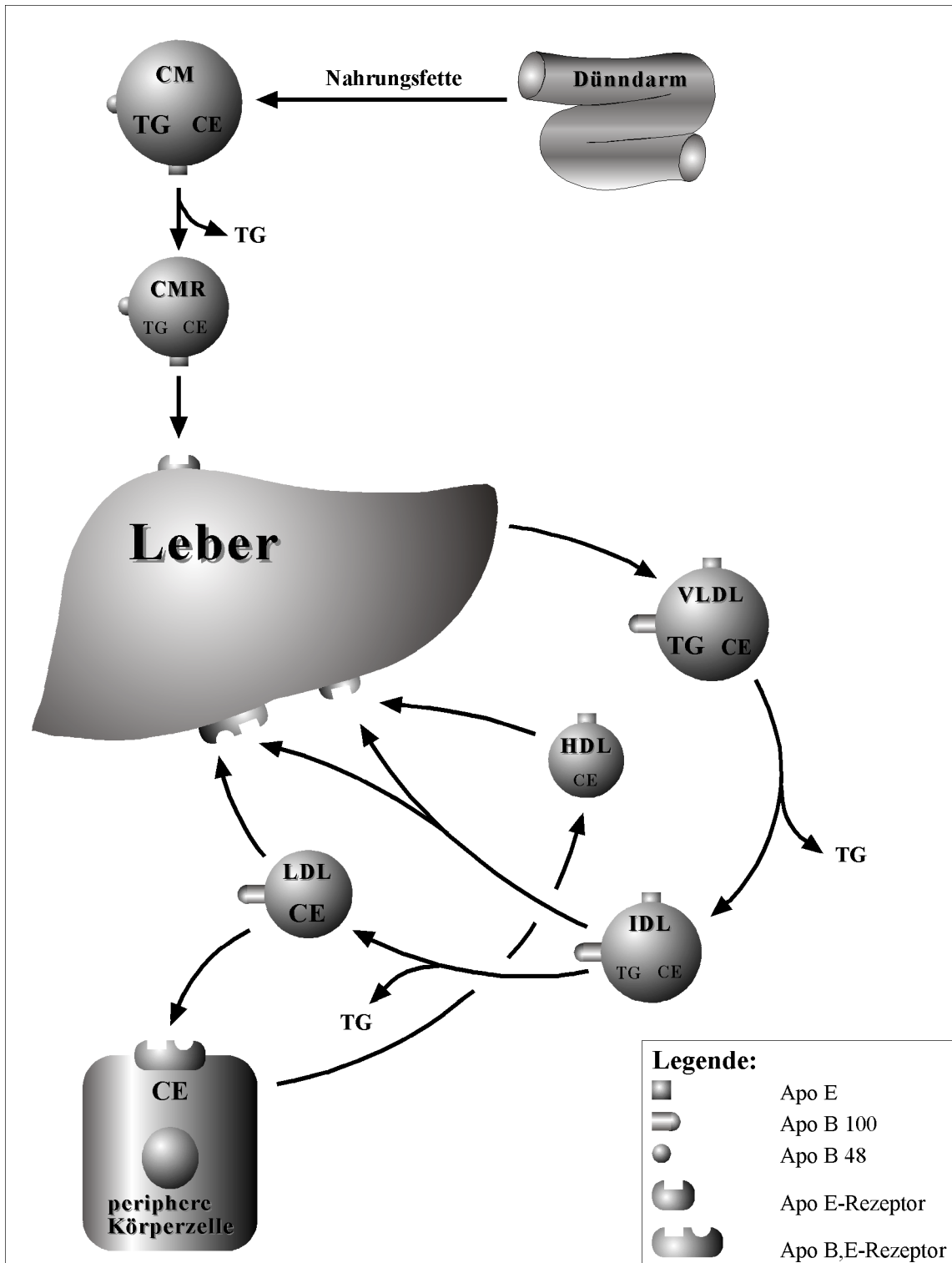


Abb. 3: Die Bedeutung von Apo E beim Transport exogener und endogener Lipide, modifiziert nach Walden et al. (118)

Das Apo E-Gen wurde auf Chromosom 19q32 lokalisiert. Es hat eine Länge von 3,7 kb und umfasst vier Exons (70). 1977 entdeckten Utermann et al. durch isoelektrische Fokussierung drei verschiedene Varianten des Apolipoprotein E (E2, E3, E4) (110). Sie entsprechen den kodominanten, polymorphen Allelen $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ und $\epsilon 4$. Demzufolge ergeben sich sechs verschiedene Phänotypen des Apolipoprotein E (E2/E2, E2/E3, E2/E4, E3/E3, E3/E4, E4/E4).

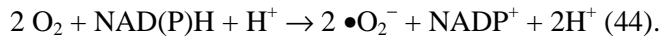
Die Isoformen des Moleküls unterscheiden sich an den Aminosäurepositionen 112 und 158. Apo E3 zeichnet sich durch Arginin auf Stelle 112 und Cystein in Position 158 aus, ist weltweit die häufigste Apo E-Variante und wird meist als Wildtyp angesehen. Apo E4 trägt an beiden eben erwähnten Positionen Arginin, zeigt demzufolge die stärkste alkalische Reaktion und besitzt dadurch eine höhere Rezeptoraffinität als Apo E3. Das führt zu einem effektiveren Metabolismus der Apo E4-haltigen Lipoproteine mit einem verbesserten intrazellulären Cholesterolangebot. Aufgrund der konsekutiven „*Downregulation*“ von LDL-Rezeptoren kann ein pathologisches Lipidprofil entstehen. Die in diesem Zusammenhang erhöhten Werte für LDL-Cholesterol (LDLC), TC, Triglyzeride (TG) und Apo B machen das für Apo E4 kodierende ϵ 4-Allel zu einem Kandidatengen für atherosklerotische Gefäßveränderungen. Apo E2 (112 Cys, 158 Cys) reagiert saurer als Apo E3 und besitzt nur etwa 2% von dessen Rezeptorbindungsvermögen. Durch stark beeinträchtigte rezeptormediierte Endozytose kommt es zur Akkumulation triglyzeridreicher Lipoproteine im Plasma. Dem darauffolgend verminderten intrazellulären Cholesterolangebot folgt die „*Upregulation*“ der LDL-Rezeptoren. Infolge dessen kommt es zu einem sehr effizienten LDL-Katabolismus mit konsekutiv erniedrigten Serumspiegeln für LDLC, TC und Apo B. Die Triglyzeridwerte sind durch VLDL-, IDL- und Chylomikronenremnantretention erhöht. Obwohl das günstigere Lipidprofil mit niedrigeren Cholesterolwerten einen protektiven Effekt auf die Entwicklung atherosklerotischer Erkrankungen vermuten läßt, ist dieser Zustand instabil. Unter bestimmten Umweltbedingungen entwickeln besonders homozygote Träger des ϵ 2- Allels eine Typ III-Hyperlipidämie mit massiv erhöhten, atherogenen VLDL-Cholesterolwerten (2, 111).

Insgesamt wurde bisher eine Vielzahl seltener Apo E-Varianten entdeckt (27). Zum Beispiel tritt in Äthiopien und im Sudan Apo E5 mit einer Häufigkeit von etwa einem Prozent auf (18), währenddessen in Deutschland Apo E4_{Freiburg} bei 0,2-1,0 % aller untersuchten Probanden nachweisbar ist (81). In der vorliegenden Arbeit wurden die Varianten E2, E3 und E4 untersucht.

1. 3. p22-phox

p22-phox ist ein 22 kD schweres, prolinreiches Polypeptid, das vermutlich über die Histidinreste an Position 72 und 94 ein Hämolekül bindet. In neutrophilen Granulozyten aggregiert *p22-phox* gemeinsam mit dem Glykoprotein *gp91-phox* zu einem membrangebundenen Komplex, dem Zytochrom b558, und dient dort als Elektronentransferelement (86). Zusammen mit den zytosolischen Untereinheiten *p40-phox*, *p47-phox* und *p67-phox* sowie den G-Proteinen *Rap1a* und *Rac2* bildet es das Enzym NAD(P)H-Oxidase (4).

Das Molekül *p22-phox* wurde primär in polymorphkernigen Phagozyten beschrieben (86). Später erfolgte der strukturelle und funktionelle Nachweis dieses Polypeptides in zahlreichen anderen Geweben. Gegenstand intensiver Forschung waren hierbei insbesondere Endothelzellen (6), Mediamyozyten (26) und Adventitiafibroblasten (83). Die biologische Hauptaufgabe der NAD(P)H-Oxidase besteht in der Bildung von Superoxidradikalen nach der Reaktionsgleichung



Sie leisten in neutrophilen Granulozyten einen entscheidenden Beitrag bei der Eliminierung phagozytierter Mikroorganismen. Defekte dieser Funktion führen zu chronisch-granulomatösen Erkrankungen (25, 29). Auch in den verschiedenen Wandschichten der Blutgefäße wurde die NAD(P)H-Oxidase als entscheidendes superoxidgenerierendes Enzym identifiziert (44). Während in Phagozyten NADPH als Substrat bevorzugt wird, dient in vaskulären Geweben vor allem NADH als Elektronendonator (108). Die fehlende Detektion der *gp91-phox*-Untereinheit und statt dessen der Nachweis von *p65-mox* in Mediamyozyten (122) lässt hier an eine Isoform des Enzymes denken (Abb. 4).

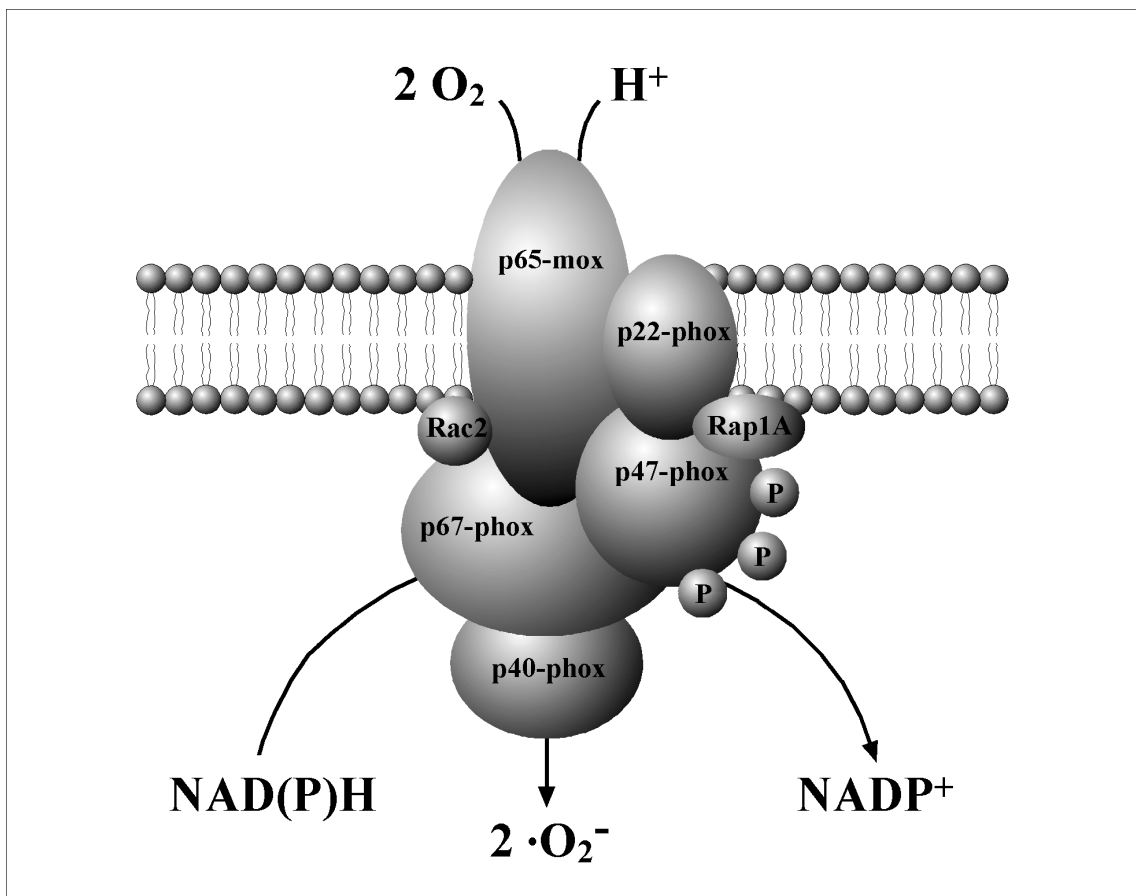


Abb. 4: Vaskuläre NAD(P)H-Oxidase im aktivierten Zustand, modifiziert nach Babior (4) und Griendling et al. (44)

Hormone (Ang II) (34), Zytokine (TNF- α) (26), Wachstumsfaktoren (PDGF) (41) und mechanischer Stress (44) können die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase durch Phosphorylierung von *p47-phox* erhöhen (4) und die mRNA-Expression, zum Beispiel für die *p22-phox*-Untereinheit, steigern (108). $\bullet\text{O}_2^-$ und vor allem das durch die Superoxiddismutase-reaktion entstehende Folgeprodukt H_2O_2 fungieren als „*second messenger*“ und regulieren dabei zahlreiche physiologische Prozesse wie Wachstum, Proliferation und Apoptose (43). Die Neutralisation des Wasserstoffperoxids erfolgt durch Peroxidasen und Katalasen zu H_2O bzw. H_2O und O_2 . Klassischen Risikofaktoren, wie Hypercholesterolämie (80), Hypertonie (1), Zigarettenrauchen (88) und Diabetes mellitus (19) erhöhen die $\bullet\text{O}_2^-$ -Produktion in vaskulären Geweben. Überschreitet diese Radikalbildung eine bestimmte Grenze, dann kann sie durch $\bullet\text{NO}$ -Inaktivierung, Bildung von Peroxinitrit, Lipidperoxidation, Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und Modulation von Signalkaskaden zu Endotheldysfunktion, LDL-Oxidation, Membranschädigung, Hypertrophie glatter Muskelzellen und Adhäsion von Abwehrzellen mit nachfolgender Inflammation führen (61, 90). Hierdurch gewinnen diese Prozesse eine pathogenetische Bedeutung für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen, wie zum Beispiel der Atherosklerose und der Hypertonie (123). Abbildung 5 veranschaulicht die potentielle pathophysiologische Bedeutung der vaskulären NAD(P)H-Oxidase.

Das *p22-phox*-Gen ist auf Chromosom 16q24 lokalisiert. Das Transkript beinhaltet 8,5 kb und umfasst 6 Exons, die für ein 195 Aminosäuren großes primäres Translationsprodukt kodieren. Innerhalb des Gens wurden verschiedene Polymorphismen identifiziert. Der in dieser Arbeit untersuchte C242T-Polymorphismus ist durch eine Transition von Histidin (CAC) an Position 72 zu Tyrosin (TAC) charakterisiert und betrifft eine der beiden potentiellen Häm-bindungsstellen (28). Daraus ergeben sich ein CC-Wildtyp, eine heterozygote (CT) und eine homozygote (TT) Mutante. Träger des *p22-phox* (C242T)-T-Allels zeigen, verglichen mit dem Wildtyp, eine um 30% reduzierte NAD(P)H-Oxidase-Aktivität (45) und eine signifikant gesteigerte Vasodilatation nach $\bullet\text{NO}$ -Gabe (97). Nach diesen Befunden könnte ein protektiver Effekt des T-Allels dieser Enzymuntereinheit auf die Entwicklung atherosklerotischer Gefäßveränderungen vermutet werden.

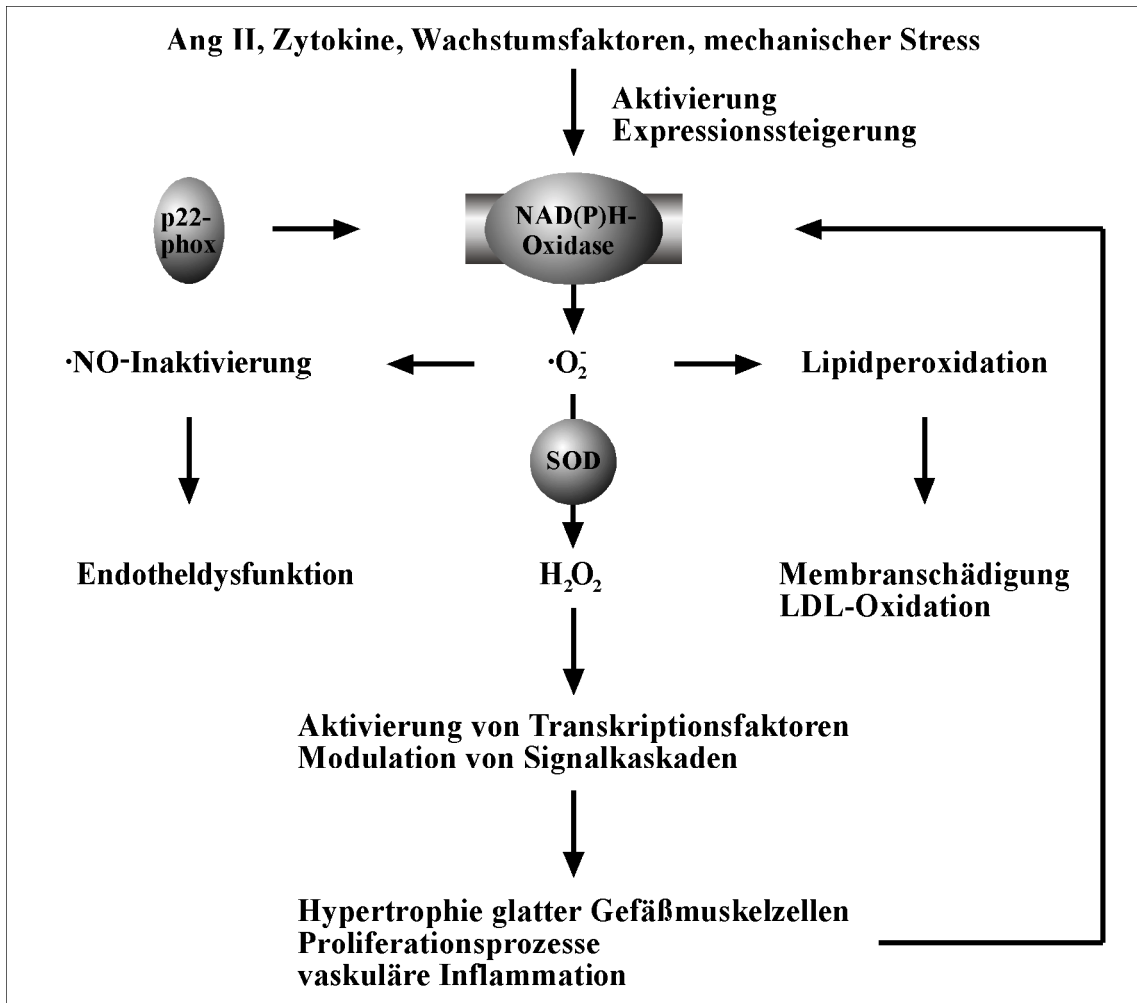


Abb. 5: Pathophysiologische Bedeutung der vaskulären NAD(P)H-Oxidase, modifiziert nach Griending et al. (43, 44), Kojda et al. (61), Mügge (74), Ruef et al. (90) und Yokoyama et al. (123)

2. Fragestellung

In der vorliegenden Promotionsarbeit sollte der Stellenwert des Angiotensinogen (C659T)-, Apo E (112, 158)- und *p22-phox* (C242T)-Polymorphismus bei koronarer Atherosklerose untersucht werden. Dazu wurde eine Stichprobe von KHK-Patienten aus dem mitteldeutschen Raum anhand einer Fall-Kontroll-Studie analysiert und anschließend über einen Zeitraum von mindestens sechs Monaten beobachtet. Als Vergleichsgruppe standen gesunde Langzeitblutspender der gleichen Population zur Verfügung. Folgende zentrale Fragen standen hierbei im Vordergrund:

1. Wie lässt sich das Studienkollektiv klinisch und demographisch charakterisieren?
2. Gibt es beim Vergleich der Allel- und Genotypfrequenzen Unterschiede zwischen Koronarpatienten und klinisch gesunden Referenzpersonen?
3. Zeigen die untersuchten Polymorphismen Besonderheiten im Hinblick auf die Ausbildung einer Restenose nach PTCA?
4. Lassen sich Assoziationen der analysierten Genotypen zu klassischen koronaren Risikofaktoren und pathologischen Laborwertkonstellationen nachweisen?
5. Gibt es möglicherweise eine Beziehung zwischen dem Angiotensinogen (C659T)-, Apo E (112, 158)- und *p22-phox* (C242T)-Polymorphismus und klinisch definierten Subgruppen innerhalb der KHK-Patienten?
6. Haben genetische Cluster eine potentielle Bedeutung bei der Ausbildung einer KHK?
7. Was für diagnostische, prognostische, therapeutische und prophylaktische Konsequenzen könnten aus den Ergebnissen dieser Arbeit abgeleitet werden?
8. Welche Fehlerquellen sind bei der Auswertung besonders zu beachten?
9. Wie können weiterführende Studien die Resultate dieser Untersuchung validieren?

3. Material und Methoden

3.1. Das Patientenkollektiv

Von Januar 1997 bis Juni 1998 wurden 123 Patienten mit koronarer Herzkrankheit von den Stationen 7, 8 und 9 aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III der Martin-Luther-Universität (MLU) Halle-Wittenberg (Prof. Dr. Teichmann, Prof. Dr. Werdan) konsekutiv rekrutiert. Für die Aufnahme in das Studienprotokoll galten folgende Einschlusskriterien:

1. - Patientenalter < 55 Jahre
2. - enzymatisch gesicherter Myokardinfarkt oder
 - erfolgreiche PTCA bzw. Indikationstellung für eine PTCA (angiographisch gesicherte Koronarstenose $\geq 75\%$) oder
 - Zustand nach revaskularisierender Operation an den Koronargefäßen

Die Hospitalisation der Probanden im Klinikum Kröllwitz zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Studie erfolgte nach akutem Myokardinfarkt, Ballondilatation oder kardiochirurgischen Eingriffen, zur Koronarangiographie oder klinischen Nachkontrolle. Alle Patienten wurden nach genauer Prüfung der Einschlusskriterien in einem ausführlichen Gespräch über Art und Durchführung der Untersuchungen, sowie die Weiterverwendung von Blutproben und anonymisiertem Datenmaterial aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Für die Studie lag ein positives Votum seitens der Ethikkommission der medizinischen Fakultät vor.

3.2. Die Kontrollgruppe

Als Referenzgruppe standen im Institut für Humangenetik und Medizinische Biologie genotypisierte gesunde Langzeitblutspender des Blutspendedienstes der MLU Halle-Wittenberg zur Verfügung. Sie standen mindestens 3 Jahre unter medizinischer Kontrolle und zeigten dabei keinerlei Symptome einer KHK. Die Auswahl der 260 Probanden aus diesem Vergleichskollektiv erfolgte durch eine Zufallsstichprobe. Bezüglich der Alters- und Geschlechtsverteilung bestanden, verglichen mit den Koronarpatienten, keine signifikanten Unterschiede.

3.3. Erhebung der Patientendaten

Die Patientendaten wurden mit Hilfe eines halbstandardisierten Fragebogens zur Dokumentation relevanter koronarer Risikofaktoren und assoziierter Erkrankungen in einem

ausführlichen Gespräch festgehalten. Weitere wesentliche Befunde konnten den Krankenakten entnommen werden. Besondere Berücksichtigung fanden die unbeeinflussbaren (familiäre Disposition, Lebensalter, Geschlecht) und beeinflussbaren koronaren Risikofaktoren 1. (Fettstoffwechselstörungen, Hypertonie, Rauchen, Diabetes mellitus) und 2. Ordnung (Adipositas, Ernährung, Alkoholabusus, körperliche Inaktivität, psychosozialer Streß, Bildungsgrad und ausgewählte Laborwerte) entsprechend den aktuellen Ergebnissen prospektiver Kohortenstudien (20, 21). Außerdem wurden NYHA-Stadium, linksventrikuläre Ejektionsfraktion (ventrikulographische Bestimmung), diastolische interventrikuläre Septumdicke (echokardiographische Messung), Begleiterkrankungen und Medikamenteneinnahmen erfasst.

Lagen erhöhte Serumkonzentrationen für Cholesterol bzw. Triglyzeride zum Untersuchungszeitpunkt oder in der Vorgeschichte vor, dann wurde dies als Kriterium für das Vorliegen einer Fettstoffwechselstörung gewertet.

Studienteilnehmer, die anamnestisch über Blutdruckwerte von mindestens 160/95 mm Hg über einen Zeitraum von mehr als fünf Jahren berichteten, wurden als Hypertoniker klassifiziert. Transiente oder grenzwertige Befunde fanden keine Berücksichtigung. Ergänzend erfolgte am Ende der Befragung eine aktuelle Blutdruckmessung.

Die Einschätzung der Rauchgewohnheiten berücksichtigte die Zahl der täglich gerauchten Zigaretten, die Dauer des bisherigen Nikotinkonsums, das Verhalten vor und nach dem Koronarereignis und zur Beurteilung der Lebenszeitbelastung die Anzahl der „*pack years*“ (Päckchen pro Tag x Raucherjahre) jeweils nach Angaben der Patienten.

Diabetes mellitus wurde nur dann als Risikofaktor gewertet, wenn eine positive Eigenanamnese vorlag oder die Medikation von Insulin bzw. oralen Antidiabetika erfolgte. Ein einmalig erhöhter Blutglucosespiegel war für die Einstufung als Diabetiker nicht ausreichend.

Zur Festlegung der Ausprägung einer Adipositas erfolgte die Bestimmung von Körpergröße und Körpergewicht, Berechnung des BMI (kg/m^2) sowie die Einschätzung von Fettverteilung und Statur.

Nur das gemeinsame Zusammentreffen von Adipositas ($\text{BMI} > 24,9 \text{ kg/m}^2$), Diabetes mellitus, Hypertonie und Hyperlipidämie entsprechend den eben geschilderten Kriterien wurde als metabolisches Syndrom gewertet.

Neben den klassischen Manifestationsformen der koronaren Herzkrankheit wurde bei der Befragung der Patienten ein besonderes Augenmerk auf andere Herz-Kreislauf-Erkrankungen, sowie metabolische und endokrinologische, gastroenterologische und nephrologische, neurologische, genetische und Infektionskrankheiten gelegt.

Nach der Befragung der Untersuchungsteilnehmer erfolgte ein ausführliches Studium der Patientenunterlagen, insbesondere in Bezug auf koronarangiographische und andere technische Befunde. Im Juni 1998 wurden sämtliche Krankenakten noch einmal eingesehen. Dadurch war eine prospektive Auswertung des klinischen Verlaufes nach dem interventionellem Eingriff möglich. Als Restenose wurde hierbei eine angiographisch PTCA-pflichtige, erneute Verengung eines bereits ballongedehnten Gefäßabschnittes innerhalb von sechs Monaten nach primärer Intervention gewertet. Die Beurteilung erfolgte durch zwei in Durchführung und Begutachtung der Koronarangiographie erfahrene Kardiologen der MLU Halle-Wittenberg. Akutthrombosierung und Gefäßkollaps durch elastische Rückstellkräfte in den Tagen unmittelbar nach PTCA wurden nicht als Restenose charakterisiert. Patienten, die sechs Monate nach Ballondehnung noch klinisch beschwerdefrei waren oder einen lokal nicht therapiebedürftigen Koronarangiographiebefund aufwiesen, wurden als restenosefrei klassifiziert. Erfolgte innerhalb eines halben Jahres keine weitere Untersuchung in der Universitätsklinik, so wurden diese Probanden nicht mit in die prospektive Analyse einbezogen.

3.4. Labordiagnostik

Die Blutgewinnung erfolgte am Tag nach der Befragung zwischen 7⁰⁰ – 8⁰⁰ Uhr frei fließend aus einer Kubitalvene nach kurzer, schonender Stauung am Oberarm. Alle Probanden waren zu diesem Zeitpunkt nüchtern (zwölfstündige Nahrungskarenz). Dabei befanden sich die Patienten bei liegender Körperlage im physischen Ruhezustand.

Das Blut zur Bestimmung der Laborparameter wurde in standardisierten Serum-, EDTA- und Citratmonovetten gesammelt. Für genetischen Analysen erfolgte die zusätzliche Abnahme einer Heparin- (7,5 ml) und EDTA-Monovette (9,0 ml).

Im Zentrallabor des Klinikum Kröllwitz erfolgte die klinisch-chemische Analytik. Routineparameter wie Blutbild (Hb, Hk, Lk, Th), Glucose, Gerinnung (INR, PTT, TZ), Elektrolyte (Na⁺, K⁺, Ca²⁺), Harnsäure, ALAT, ASAT, γ -GT, Bilirubin und CRP sowie die ausgewählten Serumlipide TG, TC, HDLC, LDLC, Lp(a), Apo A1, Apo B100 wurden unter Nutzung von Routinemethoden bestimmt. Spezielle Gerinnungsparameter (PAI-1, AT III, D-Dimere, Fibrinogen, Protein C und Protein S-Aktivität, Faktor VII, α_2 -Makroglobulin) konnten unter Verwendung kommerziell erhältlicher Testverfahren analysiert werden. Außerdem erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung der Lipoproteine (Auftragungsort: Chylomikronen; β -Bande: LDL; prä- β -Bande: VLDL, Lp(a); α -Bande: HDL) mit prozentualer Quantifizierung der einzelnen Fraktionen. In der folgenden Tabelle sind die genutzten Bestimmungsmethoden und die dadurch analysierten Laborwerte aufgeführt (Tab. 1).

Tab. 1: Bestimmungsmethoden und dadurch analysierte Laborwerte

Bestimmungsmethode	Laborwerte
Enzymatischer Farbttest	Triglyzeride, Total-Cholesterol, Harnsäure
Enzymatischer homogener Test	HDL-Cholesterol
Friedewald-Formel	LDL-Cholesterol
Immunnephelometrie	Lp(a), Apo A1, Apo B 100
Lipoproteinelektrophorese	Chylomikronen, β -, prä- β - und α -Lipoproteine
Modifizierte Methode nach Clauss	Fibrinogen
Kinetischer Test	PAI-1, Protein C
Koagulometrie	Protein S-Aktivität
Modifizierter Quick-Test	Faktor VII
Glucoseoxidasemethode	Glucose
Immunturbidimetrie	CRP

3. 5. Genotypisierung

Die Genotypisierung der Koronarpatienten und Blutspender erfolgte im Institut für Humangenetik und Medizinische Biologie der MLU Halle-Wittenberg. Entsprechend des Präparationsprotokolls vom Hersteller wurde die Isolation der genomischen DNA mit dem „QIAamp DNA Blood Maxi Kit“ (Qiagen, Hilden) aus Leukozyten, gewonnen aus 2,7 ml EDTA-Blut venösen Ursprungs, durchgeführt. Eine Kontrolle des Präparationsproduktes erfolgte durch Auftrennung in einem 1,2-prozentigen ethidiumbromidhaltigen Agarosegel (0,5 μ g/ml Ethidiumbromid) unter UV-Anregung (254 nm) und durch spektrometrische Vermessung (Absorptionsmessung bei 260 nm).

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler „Eppendorf Gradient“ durchgeführt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2 vermerkt. Mittels elektrophoretischer Trennung der PCR-Produkte im ethidiumbromidhaltigen Agarosegel und Vergleich mit einer 100-Basenpaar-Leiter wurde unter UV-Anregung die Qualität und Quantität der Amplifikate geprüft. Durch Spaltung der PCR-Produkte mit spezifischen Restriktionsendonukleasen und anschließender Auftrennung der Spaltprodukte in Agarose- [AGT (C659T)- und *p22phox* (C242T)-Polymorphismus; Ethidiumbromidmarkierung] bzw. Polyacrylamidgel [Apo E (112, 158)-Polymorphismus; Silberfärbung] wurden die zu untersuchenden polymorphen Eigenschaften der drei analysierten Gene bestimmt. In Tabelle 3 sind die Reaktionsbedingungen für die enzymatischen Spaltungen der spezifischen PCR-Produkte der drei untersuchten Gene zusammengefasst.

Tab. 2: Verwendete Primer bei der Genotypisierung des AGT (C659T)-, Apo E (112, 158)- und *p22-phox* (C242T)-Polymorphismus (46, 99)

Gen	Primer
AGT (C659T)-Polymorphismus	5'-Primer: 5'- TCG CTG CAA AAC TTG ACA CC -3' 3'- Primer: 5'- GAG CAG CCA GTC TTC CAT CC -3'
Apo E (112, 158)-Polymorphismus	5'-Primer: 5'- TGT AAA ACG ACG GCC AGT ATG GAC GAG ACC ATG AAG GAG TTG -3' 3'- Primer: 5'- AAT TCG CCC GGC CTG GTA CAC - 3'
<i>p22-phox</i> (C242T)-Polymorphismus	5'-Primer : 5'- GTG CAG CTG TGA CTC ATG GC -3' 3'- Primer: 5'- CAG AGC CAG GGA CCC GAA TT - 3'

Tab. 3: Technologische Daten bei der Genotypisierung des AGT (C659T)-, Apo E (112, 158)- und *p22-phox* (C242T)-Polymorphismus

Gen	Annealing- temperat./ Zyklenzahl	Größe des PCR- Produktes	Restriktions- endonuklease	elektro- phoretische Auftrennung	Visualisierung
AGT (C659T)- Polymorphismus	53 °C/ 32 Zyklen	526 bp	<i>Nco I</i>	Agarosegel (1,2 %)	Ethidiumbromid- markierung (UV-Anregung)
Apo E (112, 158)- Polymorphismus	60°C/ 30 Zyklen	330 bp	<i>Hha I</i>	PAG (10,4 %)	Silberfärbung
<i>p22-phox</i> (C242T)- Polymorphismus	52 °C/ 26 Zyklen	886 bp	<i>Rsa I</i>	Agarosegel (2 %)	Ethidiumbromid- markierung (UV-Anregung)

3. 5. 1. Der Angiotensinogen (C659T)-Polymorphismus

Der Untersuchung des C659T-Polymorphismus des Angiotensinogen-Gens lag die Methode von Jeunemaitre et al. (57) zu Grunde. Der Basenaustausch C nach T an Position 659 wird durch Spaltung des spezifischen PCR-Produkts von 526 bp (Tab. 3) mit der Restriktionsendonuklease *Nco I* (Erkennungssequenz „5'-C/CATGG-3'“) und anschließende Fragmentanalyse nachgewiesen (Abb. 6).

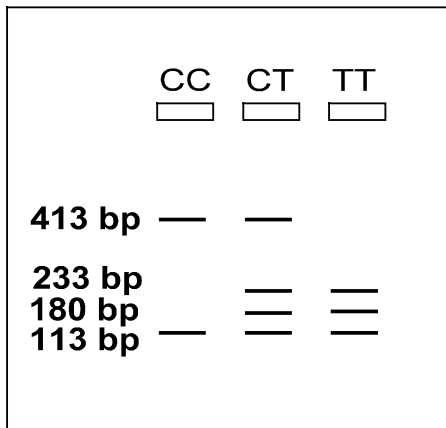


Abb. 6:

RFLP-Analyse der Angiotensinogen (C659T)-Genotypen nach Spaltung des 526 bp-großen, spezifischen PCR-Produktes mit dem Enzym *Nco* I

3. 5. 2. Der Apolipoprotein E (112, 158)-Polymorphismus

Entsprechend der Methode von Handschug (46) wurde die Genotypisierung des Apo E (112, 158)-Polymorphismus durchgeführt. Es wird ein Basenaustausch T nach C an Position 448 bzw. C nach T an Position 586 der kodierenden DNA-Sequenz nachgewiesen. Durch Spaltung des spezifischen PCR-Produktes von 330 bp (Tab. 3) mit dem Enzym *Hha* I (Erkennungssequenz „5'-GCG/C-3'“) entstehen, charakteristische Fragmente, die eine Differenzierung in die Apo E-Genotypen 2/2, 2/3, 3/3, 2/4, 3/4 und 4/4 ermöglichen. In Abbildung 7 sind die daraus resultierenden, spezifischen Bandenmuster schematisch dargestellt.

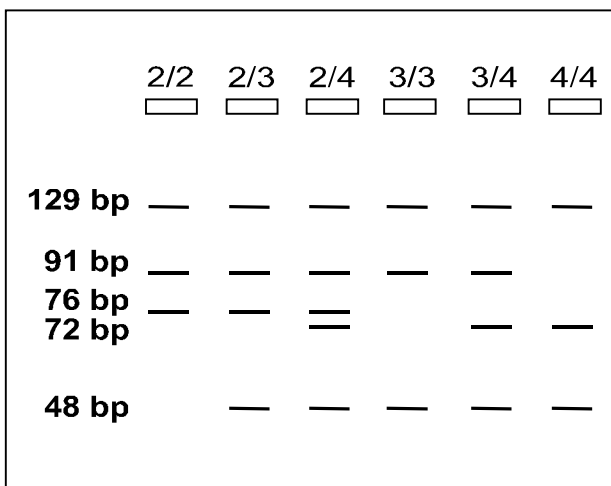


Abb. 7:

Fragmentmuster der RFLP-Analyse zur Identifizierung der Apo E (112, 158)-Genotypen nach Spaltung des 330 bp-großen, spezifischen PCR-Produktes mit dem Restriktionsenzym *Hha* I (Auftrennung im PAG; die kurzen Fragmente von weniger als 30 bp, die zur Genotypidentifikation nicht benötigt werden, wurden auf Grund der Laufzeit und Länge des PAG nicht detektiert)

3. 5. 3. Der p22-phox (C242T)-Polymorphismus

Die Analyse des C242T-Polymorphismus wurde nach der Methode von Schulz (99) durchgeführt. Das 886 bp-große, spezifische PCR-Produkt (Tab. 3) wurde mit Hilfe des Enzyms *Rsa* I (Erkennungssequenz „5'-GT/AC-3'“) gespalten. Den entstehenden, charakteristischen DNA-Fragmenten konnten nach elektrophoretischer Trennung die entsprechenden Genotypen zugeordnet werden (Abb. 8).

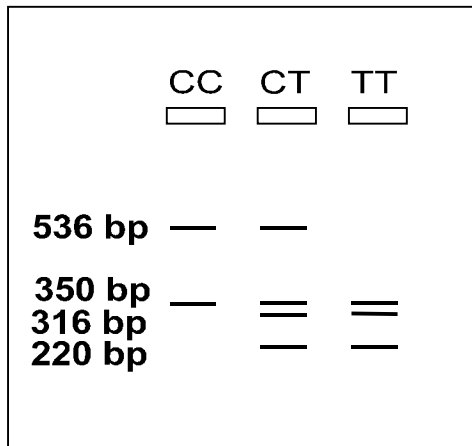


Abb. 8:

Genotypisierung des *p22phox* (C242T)-Polymorphismus mittels RFLP-Analyse: Spaltung des 886 bp-großen, spezifischen PCR-Produktes mit dem Enzym *Rsa I*

3. 6. Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programmes SPSS 10.0 für Windows. Die deskriptive Statistik umfasste für normalverteilte metrische Merkmale Mittelwert und Standardabweichung (σ), für nicht normalverteilte Merkmale Median (Z) und Hälftespielraum (HSR). Bei der graphischen Darstellung mit Hilfe von Boxplots wurden Extremwerte außerhalb des 1,5-fachen Hälftespielraumes zur Verbesserung der Übersichtlichkeit nicht berücksichtigt. Die Prüfung auf Normalverteilung erfolgte mit dem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest. Mittelwerte stetiger, normalverteilter Merkmale wurden mit Hilfe des Student-T-Testes verglichen unter Angabe des 95 %-Konfidenzintervalles (CI). Bei nicht normalverteilten stetigen Größen erfolgte die einfaktorische Analyse nach Kruskal-Wallis. Kategoriale Merkmale wurden mit dem Chi-Quadrat-Test auf Unabhängigkeit geprüft. Bei geringen Fallzahlen in einzelnen Untergruppen fand „*Fisher's exact test*“ Verwendung. Die Einschätzung der Bedeutung von Einflußfaktoren auf den Effekt der Genpolymorphismen erfolgte durch mehrfaktorische logistische Regression. Für statistische Vergleiche zwischen Koronarpatienten und Blutspendern wurden hierbei die Variablen Alter bei Manifestation der KHK bzw. Rekrutierung als Kontrolle, Geschlecht, sowie die oben beschriebenen Genpolymorphismen einbezogen. Bei Untersuchungen innerhalb der Patientengruppe fand zusätzlich die Integration von Hyperlipidämie, Hypertonie, gerauchten „*pack years*“, Diabetes mellitus, familiärer Belastung und des BMI in das Regressionsmodell statt. Veränderungen des Gesundheitsverhaltens vor und nach der Erkrankungsmanifestation wurden mit dem Vorzeichenstest untersucht, eine Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 5 % ($p < 0,05$) als statistisch signifikant definiert. Als Maß der Risikoschätzung nominaler und ordinaler Größen diente die Bestimmung des „*odds ratio*“ (OR).

Für die analysierten AGT (C659T)-, Apo E (112, 158)- und *p22-phox* (C242T)-Polymorphismen fand die statistische Überprüfung kodominanter, dominanter und rezessiver genetischer Modelle statt.

Unter der Annahme eines kodominanten Effektes der AGT (C659T)-Varianten mit den Genotypen CC, CT und TT erfolgte der Vergleich CC vs. CT vs. TT, im Rahmen eines dominanten Rechenmodells für Allel T TT+TC vs. CC sowie bei Annahme einer rezessiven Wirkung des T-Allels TT vs. CT+CC. Für die *p22-phox* (C242T)-Polymorphismus wurde bei gleichen Voraussetzungen analog vorgegangen.

Der Apo E (112, 158)-Polymorphismus ermöglicht die Bildung von sechs verschiedenen Genotypen ($\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 4$, $\epsilon 4/\epsilon 4$). Da zahlreiche Publikationen den häufigen $\epsilon 3/\epsilon 3$ -Wildtyp als Referenzkategorie verwendeten (51, 67), wurde dieses mathematische Modell auch in der vorliegenden Arbeit überprüft. Die sehr seltene Kombination aus dem $\epsilon 2$ - und $\epsilon 4$ -Allel fand bei einigen Berechnungen keine Berücksichtigung. In Tabelle 4 sind die analysierten Modelle für den Apo E-Polymorphismus zusammengefasst.

Tab. 4: Analysierte Rechenmodelle für den Apo E (112, 158)-Polymorphismus

Statistisches Modell	Genotypenvergleich
Kodominante Modelle:	
1. Kodominanz aller Genotypen	$2/2$ vs. $2/3$ vs. $3/3$ vs. $2/4$ vs. $3/4$ vs. $4/4$
2. Kodominanz des $\epsilon 2$ - und $\epsilon 4$ -Allels	$2/2+2/3$ vs. $3/3$ vs. $3/4+4/4$
Dominante Modelle:	
1. Dominanz für $\epsilon 2$ Referenz: $\epsilon 3/\epsilon 3$	$2/2+2/3+(2/4)$ vs. $3/3+3/4+4/4^*$ $2/2+2/3+(2/4)$ vs. $3/3^*$
2. Dominanz für $\epsilon 3$	$2/3+3/3+3/4$ vs. $(2/4)+2/2+4/4^*$
3. Dominanz für $\epsilon 4$ Referenz: $\epsilon 3/\epsilon 3$	$(2/4)+3/4+4/4$ vs. $2/2+2/3+3/3^*$ $(2/4)+3/4+4/4$ vs. $3/3^*$
Rezessive Modelle:	
1. Rezessivität für $\epsilon 2$ Referenz: $\epsilon 3/\epsilon 3$	$2/2$ vs. $2/3+3/3+(2/4)+3/4+4/4^*$ $2/2$ vs. $3/3$
2. Rezessivität für $\epsilon 3$	$3/3$ vs. $2/2+2/3+(2/4)+3/4+4/4^*$
3. Rezessivität für $\epsilon 4$ Referenz: $\epsilon 3/\epsilon 3$	$4/4$ vs. $2/2+2/3+3/3+(2/4)+3/4^*$ $4/4$ vs. $3/3$

* Diese Operationen wurden unter Einbeziehung bzw. Ausschluss des seltenen $\epsilon 2/\epsilon 4$ -Genotypes durchgeführt.

4. Ergebnisse

4. 1. Gruppencharakterisierung

4. 1. 1. Patienten

Die 123 Patienten hatten bei klinischer Erstmanifestation der koronaren Herzkrankheit (Myokardinfarkt oder interventionspflichtige Stenose) ein Durchschnittsalter von $46,64 \pm 5,89$ Jahren. 83,7 % (n=103) waren männlichen und 16,3 % (n=20) weiblichen Geschlechts. 76,4 % (n=94) hatten mindestens einen Myokardinfarkt erlitten und überlebt. Bei 65,0 % (n=80) dieser Probanden wurden Ballondehnungen und bei 34,1 % (n=42) operative Revaskularisationen im Bereich der Herzkranzgefäße durchgeführt (Tab. 5).

Tab. 5: Klinische Zusammensetzung der Patientengruppe (n=123)

	KHK	AMI	PTCA	ACVB/IMAB
KHK	123	94	80	42
AMI	94	94	63	27
PTCA	80	63	80	13
ACVB/IMAB	42	27	13	42

Bei 122 Studienteilnehmern erfolgten koronarangiographische Untersuchungen. Ein Proband verweigerte diese Diagnostik trotz eines nachgewiesenen Myokardinfarktes. Es stellten sich 17,2 % (n=21) koronare Ein-, 22,1 % (n=27) Zwei- und 60,7 % (n=74) Dreifäßerkrankungen dar. Zwei- und Dreifäßerkrankungen wurden in den weiteren Ausführungen zu Mehrgefäßerkrankungen (82,8 %; n=101) zusammengefasst. 91,8 % (n=113) aller Patienten befanden sich in Herzinsuffizienzstadien NYHA I-II. Die ventrikulographisch ermittelte linksventrikuläre Ejektionsfraktion betrug im Mittel $60,1 \pm 18,4$ %, die echokardiographisch bestimmte interventrikuläre Septumdicke $11,0 \pm 0,2$ mm. 85,4 % der Patienten (n=105) berichteten über pektanginöse Beschwerden, weitere 42,3 % (n=52) über Herzrhythmusstörungen. Begleitend bestanden bei 1,6 % (n=2) Aorten- und 3,3 % (n=4) Mitralvitien.

Die 80 Patienten mit erfolgreicher PTCA wurden prospektiv weiterbeobachtet. In 44 Fällen konnte hierbei das therapeutische Ergebnis nach sechs Monaten eindeutig verifiziert werden. Dabei traten bei 63,6 % der Probanden in dieser Untergruppe (n=28) interventionspflichtige Restenosen auf. Die übrigen 36,4 % (n=16) waren nach diesem Zeitraum entweder beschwerdefrei oder zeigten in der Koronarangiographie keinen lokalen Therapiebedarf.

Ein Teil der Fälle wies zusätzlich pathologische Veränderungen in anderen Bereichen des Gefäßsystems auf. Bei 12,2 % (n=15) war eine PAVK bekannt, bei 6,5 % (n=8) eine duplexsonographisch signifikante oder bereits operativ versorgte Carotisstenose. Weitere 5,7 % der KHK-Patienten (n=7) gaben anamnestisch apoplektische Insulte und ebenfalls 5,7 % (n=7) Phlebothrombosen an.

Innerhalb des Patientenkollektivs konnten häufig typische Begleiterkrankungen der koronaren Herzkrankheit beobachtet werden. Dies waren insbesondere Hyperlipidämie (80,5 %; n= 99), arterielle Hypertonie (47,2 %; n=58), Diabetes mellitus (25,2 %; n=31), Gallenwegserkrankungen (17,9 %; n=22), das metabolische Syndrom (8,1 %; n=10) und die Hyperthyreose (4,1 %; n=5). Der BMI als Marker für eine Adipositas betrug durchschnittlich $27,2 \pm 4,3 \text{ kg/m}^2$.

Die häufigsten Medikationen zum Zeitpunkt der Patientenbefragung sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tab. 6: Medikamentöse Behandlung der KHK-Patienten (n=123)

Medikamentengruppe	Prozentwert	Absolute Patientenzahl
Thrombozytenaggregationshemmer	87,0	107
Betablocker	77,2	95
Nitrate / Molsidomin	73,2	90
ACE-Hemmer	54,5	67
Lipidsenker	38,9	49
Antikoagulanzen	36,6	45
Diuretika	29,3	36
Ca ²⁺ - Antagonisten	15,4	19
Orale Antidiabetika	13,0	16
Insulin	12,2	15
Digitalisglykoside	12,2	15

Abbildung 9 gibt eine Übersicht über die erfolgte Primärbehandlung der 94 Myokardinfarktpatienten. Bei 19 von diesen Probanden wurde eine systemische Thrombolyse durchgeführt, während in 25 Fällen eine Akut-PTCA erforderlich war. Weitere 20 Studienteilnehmer wurden nach dem MI zunächst rein konservativ medikamentös behandelt. In 4 Fällen wurde die Infarzierung erst zu einem späteren Zeitpunkt diagnostiziert, so dass keine primäre Therapie erfolgte. Bei den übrigen Patienten (n=27) war die Art der Erstversorgung nicht mehr genau eruierbar, da sie an einem auswärtigen Krankenhaus stattgefunden hatte bzw. schon längere Zeit zurück lag. Nach klinischer Stabilisierung, Abschluß diagnostischer Maßnahmen und interdisziplinärer Beratung wurden bei allen 123 Koronarpatienten weitere therapeutische Schritte eingeleitet, die in Abbildung 10 dargestellt sind.

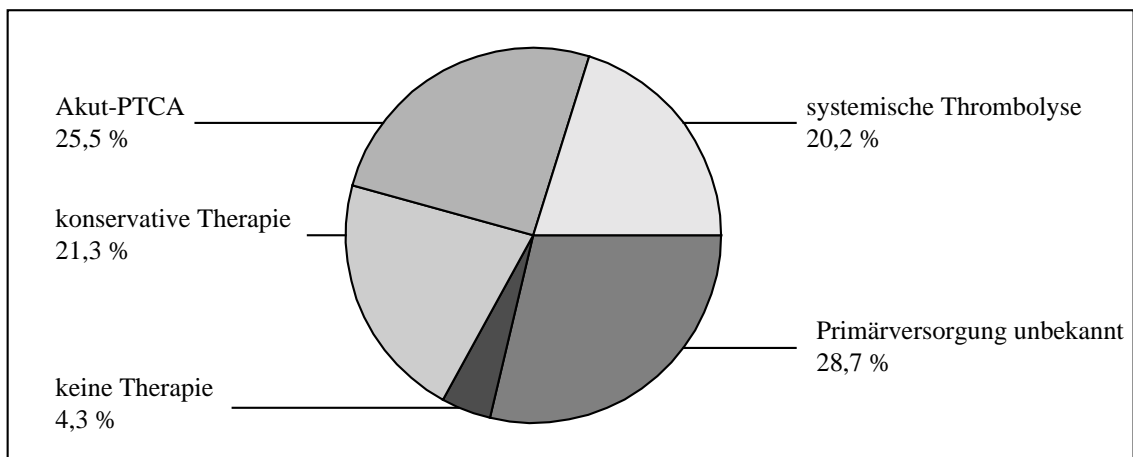


Abb. 9: Primärversorgung der MI-Patienten (n=94)

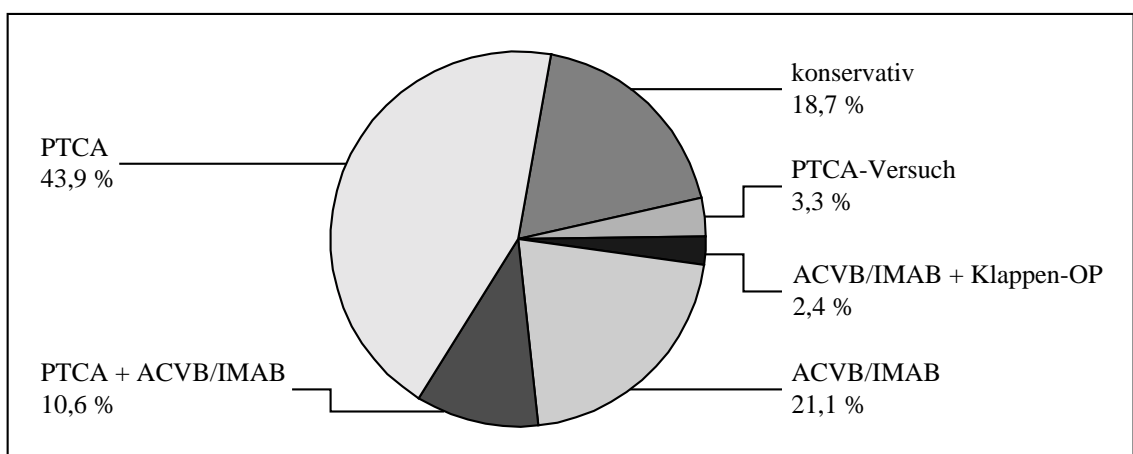


Abb. 10: Weitere Therapie aller KHK-Patienten (n=123)

Im Rahmen der Studie wurden kardiovaskulär relevante Laborwerte zur Patientencharakterisierung bestimmt. Dabei fand eine Schwerpunktanalyse von Lipidparametern und ausgewählten Gerinnungsfaktoren statt. Für TC, HDLC, Lp(a), den TC /HDLC und LDLC/HDLC-Quotienten, die Lipidelektrophorese, Fibrinogen, PAI-1, Glucose und CRP lag bereits der berechnete Mittelwert außerhalb des Referenzbereiches (Tab. 7).

Tab. 7: Laborwerte der Patienten

Laborparameter	Mittelwert $\pm \sigma$	Referenzbereich	
<i>Serumlipide:</i>			
Triglyzeride	2,21 \pm 1,49	< 2,30 mmol/l	
Total – Cholesterol	5,54 \pm 1,13	< 5,20 mmol/l	1
LDL – Cholesterol	3,41 \pm 0,99	< 3,90 mmol/l	
HDL – Cholesterol	1,16 \pm 0,41	> 1,50 mmol/l	
Lp(a)	0,34 \pm 0,36	< 0,20 g/l	
Apolipoprotein A1	1,30 \pm 0,26 (insgesamt)		
	1,26 \pm 0,23 (männlich)	0,80 - 1,75 g/l (männlich)	
	1,51 \pm 0,33 (weiblich)	0,90 - 1,90 g/l (weiblich)	
Apolipoprotein B	1,24 \pm 0,31	0,80 – 1,40 g/l	
TC / HDLC	5,64 \pm 6,42	\leq 4,40	2
LDLC / HDLC	3,17 \pm 1,21	\leq 3,00	2
<i>Lipoproteinelektrophorese:</i>			
Chylomikronen	0,6 \pm 1,1	0,0 %	
β - Fraktion	46,2 \pm 8,2	49,0 - 60,0 %	
Prä - β - Fraktion	29,3 \pm 9,9	14,0 - 24,0 %	
α - Fraktion	23,8 \pm 7,0	21,0 - 32,0 %	
<i>Gerinnungsparameter:</i>			
Fibrinogen	4,03 \pm 1,53	1,50 - 4,00 g/l	
PAI – 1	3,91 \pm 2,36	0,30 - 3,50 E/ml	
Protein C	119 \pm 19	> 70 %	
Protein S – Aktivität	100 \pm 34	65 - 140 %	
Faktor VII	110 \pm 23	> 70 %	
α_2 –Makroglobulin	1,73 \pm 0,53	1,30 - 3,00 g/l	
<i>Sonstige Laborwerte:</i>			
Glucose	6,1 \pm 2,6	3,9 - 5,9 mmol/l	
CRP	17,69 \pm 41,04	< 5,00 mg/l	
Harnsäure	368 \pm 96 (insgesamt)		
	381 \pm 92 (männlich)	200-420 μ mol/l (männlich)	
	299 \pm 82 (weiblich)	140-340 μ mol/l (weiblich)	

1) Zielwert mit einem weiteren ausgeprägten oder mehreren Risikofaktoren (75)

2) Oberhalb dieser Werte steigt das koronare Risiko >1,0 an (75).

Bei 53,7 % (n = 66) aller Koronarpatienten lag eine familiäre Häufung atherosklerotischer Erkrankungen vor. In Abbildung 11 sind zwei exemplarische Stammbäume mit typischen Risikokonstellationen für eine KHK dargestellt.

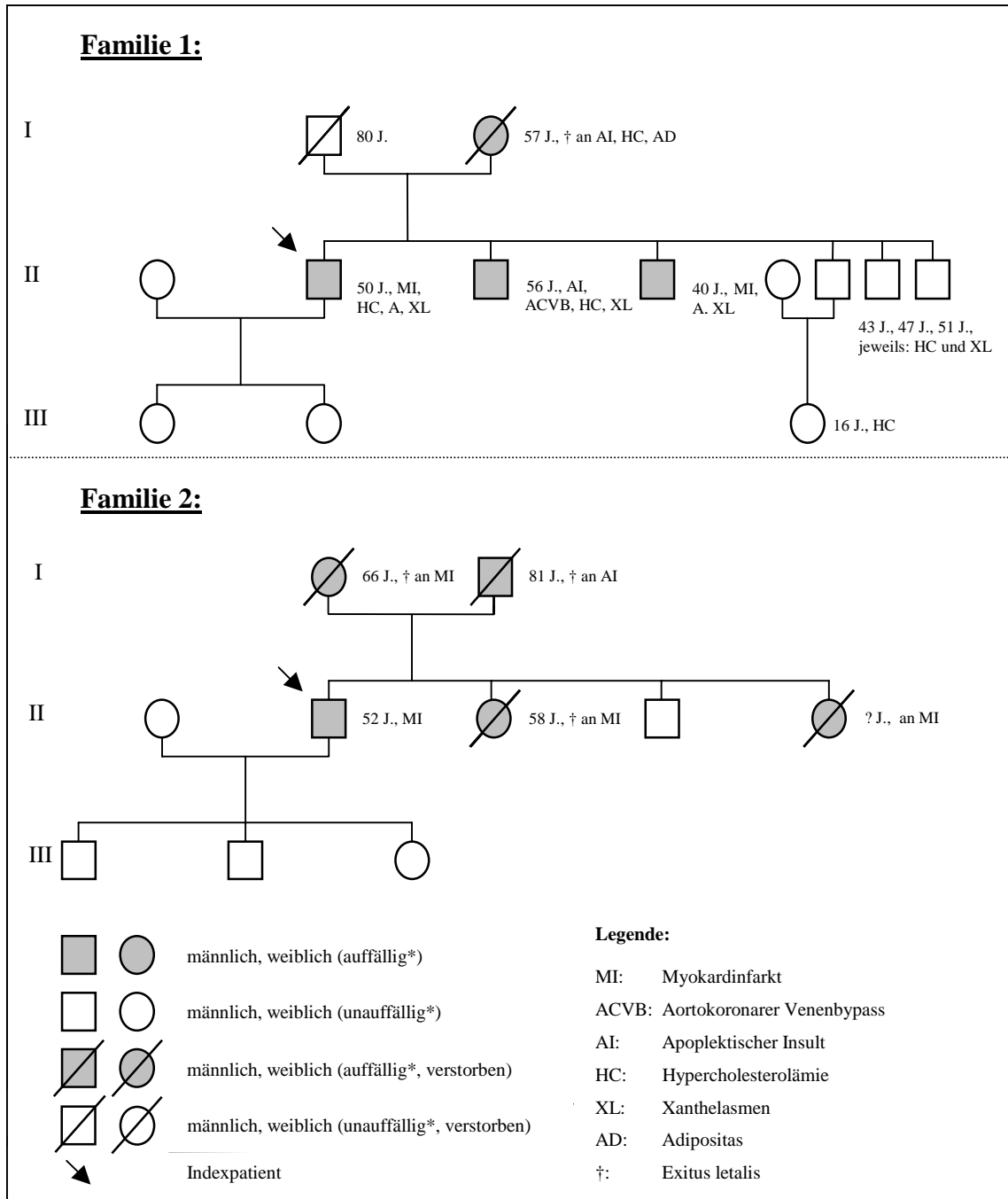


Abb. 11: Typische familiäre Konstellation in den Sippen zweier Patienten aus der untersuchten KHK-Gruppe (n=123)

*) Die Kriterien auffällig und unauffällig beziehen sich ausschließlich auf die klinische Manifestation von Myokardinfarkten und apoplektischen Insulten.

In Familie 1 ist eine Hypercholesterolämie über drei Generationen erkennbar. Alle Geschwister des Indexpatienten wiesen als phänotypisches Merkmal Xanthelasmen am medialen Lidwinkel auf. Zwei der Brüder sowie die Mutter erlitten außerdem myokardiale oder zerebrovaskuläre Infarkte. Außerdem zeigte sich bei diesem Probanden eine stark erhöhte β -Lipoproteinfraktion (62,80 %) und hochpathologische TC/HDLC- (8,00) und LDLC/HDLC-Quotienten (6,14). Anhand von Familie 2 lässt sich ebenfalls die erbliche Häufung akuter Gefäßverschlüsse, die hier bei vier Familienmitgliedern die Todesursache darstellten, demonstrieren.

81,3 % der Koronarpatienten (n=100) hatten eine abgeschlossene Ausbildung, 16,3 % (n=20) einen Hochschulabschluß und 2,4 % (n=3) waren ohne berufliche Qualifikationen. 70,7 % (n=87) berichteten über keine oder nur geringfügige, 26,8 % (n=33) über mittlere und 2,4 % (n=3) über stärkere körperliche Aktivitäten. Des Weiteren wurden die Patienten gezielt zu privaten und beruflichen Problemen befragt. Danach schätzten 75,6 % (n=93) ihre aktuelle Situation als psychisch belastend ein.

Zur Vervollständigung des Risikoprofils fand außerdem die Dokumentation von Ernährungsgewohnheiten und Genussmittelkonsum vor und nach der KHK-Manifestation statt. Durchschnittlich wurden bis zur Befragung $24,3 \pm 16,0$ „*pack years*“ geraucht. Die tägliche Zigarettenanzahl nach Erkrankungsbeginn wurde von $19,4 \pm 12,4$ auf $3,5 \pm 8,2$ reduziert. Insgesamt rauchten dann 74,0 % (n=91) der Patienten weniger und 26,0 % (n=32) genauso viel. Hinsichtlich der Ernährung und des Alkoholkonsums zeigten sich ähnliche Tendenzen. Nach Diagnose einer KHK nahmen 37,4 % (n=46) der Studienteilnehmer gesündere, 61,8 % (n=76) ähnliche und nur 0,8 % (n=1) ungesündere Kost zu sich. 26,0 % (n=32) tranken geringere und 74,0 % (n=91) vergleichbare Alkoholmengen. Die Zahl der regelmäßig täglich Alkohol trinkenden Probanden sank dadurch von 48,0 % (n=59) vor Manifestation der KHK auf 25,2 % (n=31). Alle diese Verhaltensänderungen waren statistisch signifikant ($p < 0,001$).

4. 1. 2. Vergleich zwischen Blutspendern und Patienten

Die 260 Blutspender wurden mit einem Durchschnittsalter von $46,63 \pm 7,98$ Jahren rekrutiert. Unter ihnen waren 78,8 % (n=205) Männer und 21,2 % (n=55) Frauen. Zwischen Fällen und Kontrollen bestanden sowohl hinsichtlich der Alters- ($p=0,978$), als auch in der Geschlechtsverteilung ($p=0,260$) keine signifikanten Unterschiede.

4. 2. Untersuchungen zu den Genpolymorphismen

4. 2. 1. Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Alle untersuchten Polymorphismen wurden auf eine Hardy-Weinberg-Verteilung sowohl in der KHK-, als auch in der Blutspendergruppe untersucht. Innerhalb der 123 Koronarpatienten kam es bei keinem der untersuchten Polymorphismen zu einer signifikanten Abweichung von dieser Gesetzmäßigkeit (Apo E (112, 158): $p=0,957$; *p22-phox* (C242): $p=0,692$; AGT (C659T): $p=0,927$). Die 260 klinisch gesunden Referenzpersonen zeigten ebenfalls eine erwartungsgemäße Aufspaltung der Allele (Apo E (112, 158): $p=0,986$; *p22-phox* (C242T): $p=0,702$; AGT (C659T): $p=1,000$).

4. 2. 2. Der Angiotensinogen (C659T)-Polymorphismus

Das C-Allel zeigte sich bei den Koronarpatienten mit 83,48 % deutlich häufiger als die veränderte Thymin-Variante (16,52 %). In der Blutspendergruppe war die Häufigkeitsverteilung der Allele ähnlich (C: 85,28 %; T: 14,72 %). Die entsprechenden Genotypfrequenzen sind in der folgenden graphischen Darstellung wiedergegeben (Abb. 12).

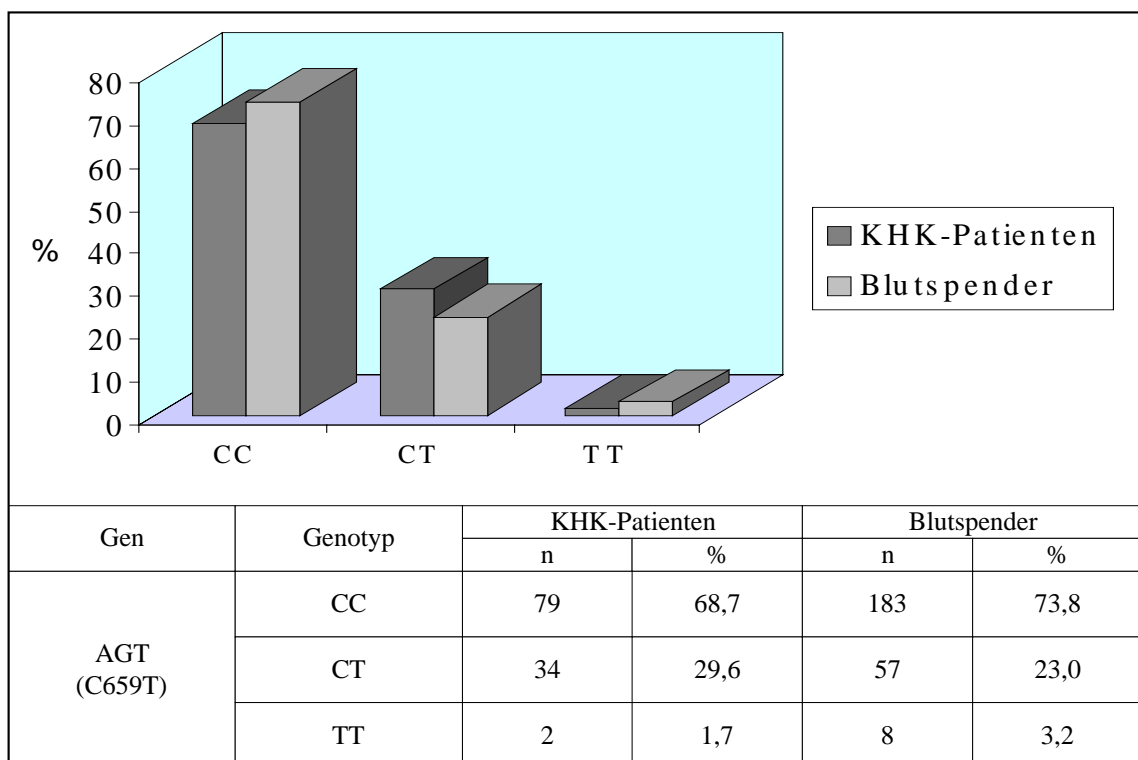


Abb. 12: Angiotensinogen (C659T)-Polymorphismus: KHK-Patienten und gesunde Blutspender

Bei der Überprüfung eines dominanten genetischen Modells für das mutierte T-Allel zeigten sich keine wesentlichen Differenzen zwischen den KHK-Patienten und gesunden Blutspendern ($p=0,481$; $OR=1,202$; Abb. 13). Aufgrund der Seltenheit des TT-Genotypes war eine statistisch valide Aussage zur potentiellen Dominanz des C-Allels oder einer kodominanten Wirkung beider Genvarianten nicht möglich. Die CT+TT-Varianten waren weder mit der Manifestation eines Myokardinfarktes ($p=0,311$; $OR=1,327$), noch mit der Entwicklung einer Restenose nach PTCA ($p_{\text{exact}}=1,000$) signifikant assoziiert.

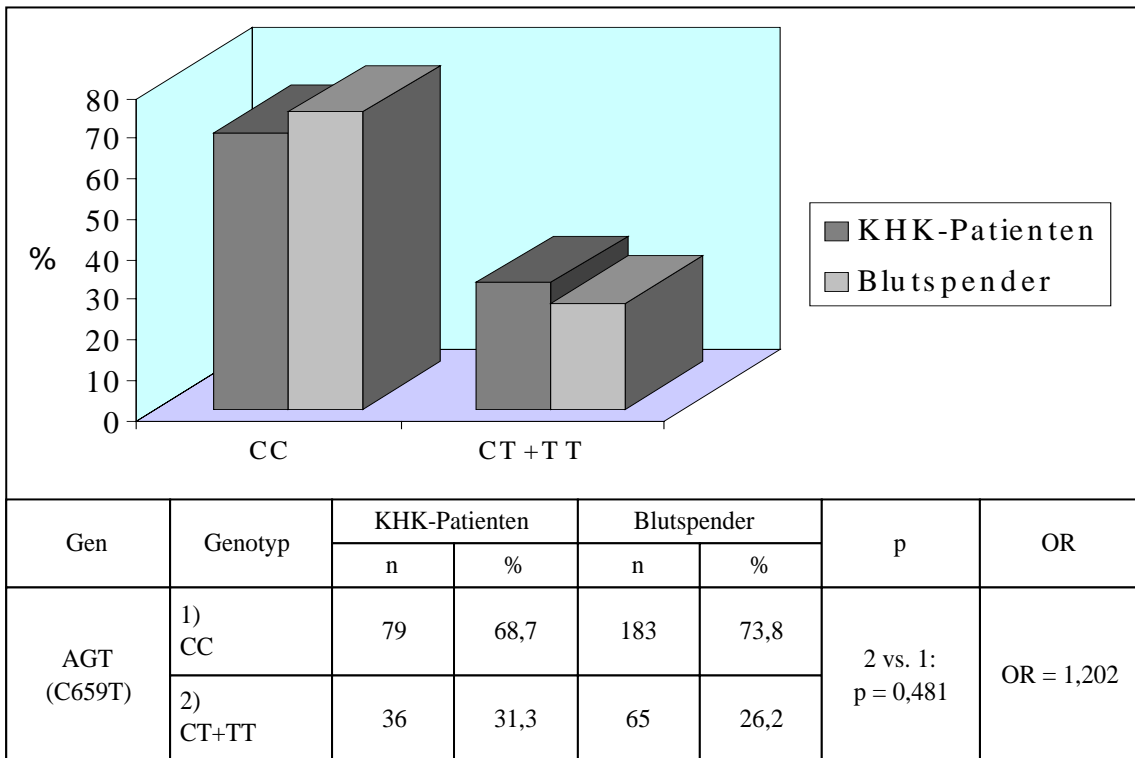


Abb. 13: Angiotensinogen (C659T)-Polymorphismus: KHK-Patienten und gesunde Blutspender unter Annahme eines dominanten genetischen Modells für das T-Allel

In der Untergruppe der Patienten mit Eingefäßerkrankungen waren Träger des mutierten T-Allels häufiger anzutreffen. Dieses Ergebnis verfehlte jedoch das geforderte statistische Signifikanzniveau ($p=0,086$; $OR=3,165$).

Im Rahmen der Analyse klassischer koronarer Risikofaktoren (Hyperlipidämie, arterielle Hypertonie, Zigarettenkonsum, Diabetes mellitus, Alter, Geschlecht, Familienanamnese und BMI) innerhalb der Gruppe der KHK-Patienten war lediglich eine tendenzielle Assoziation der Angiotensinogen (C659T)-T-Allelträger zur arteriellen Hypertonie nachweisbar ($p=0,112$; $OR=4,092$).

Bei der genotypspezifischen Untersuchung der Laborparameter fiel eine Beziehung der C659T-Variation des Angiotensinogen-Gens zu einigen Faktoren des Gerinnungssystems auf. T-Allelträger zeigten signifikant erhöhte Plasmakonzentrationen für Protein C und Faktor VII, sowie tendenziell gesteigerte PAI-1- und erniedrigte Fibrinogenwerte. Diese Resultate sind in den Tabellen 8 und 9 dargestellt. Zur besseren Veranschaulichung erfolgt die Präsentation der beschriebenen, signifikanten Ergebnisse mit Hilfe von „Boxplots“ (Abb. 14 und 15).

Tab. 8: Angiotensinogen (C659T)-Polymorphismus: PAI-1- und Protein C-Plasmaspiegel in Abhängigkeit vom Genotyp unter Annahme eines dominanten genetischen Modells für das T-Allel

Laborwert	Genotyp	Mittelwert	σ	p	CI (95 %)
PAI-1 (E/ml)	1) CC	3,72	2,30	2 vs. 1:	CI =
	2) CT+TT	4,34	2,47	$p = 0,198$	-0,33 - 1,55
Protein C (%)	1) CC	116,54	19,27	2 vs. 1:	CI =
	2) CT+TT	125,02	17,93	$p = 0,033$	0,68 - 16,28

Tab. 9: Angiotensinogen (C659T)-Polymorphismus: Fibrinogen- und Faktor VII-Plasmaspiegel in Abhängigkeit vom Genotyp unter Annahme eines dominanten genetischen Modells für das T-Allel

Laborwert	Genotyp	Z	HSR (Q ₂₅ -Q ₇₅)	p
Fibrinogen (g/l)	1) CC	3,70	2,93-5,05	2 vs. 1:
	2) CT+TT	3,40	2,75-4,55	$p = 0,431$
Faktor VII (%)	1) CC	100,00	92,00-119,50	2 vs. 1:
	2) CT+TT	129,60	98,00-144,10	$p = 0,013$

*) Für Fibrinogen und Faktor VII als nicht normalverteilte Merkmale wurde kein 95 %-Konfidenzintervall für den Mittelwert angegeben.

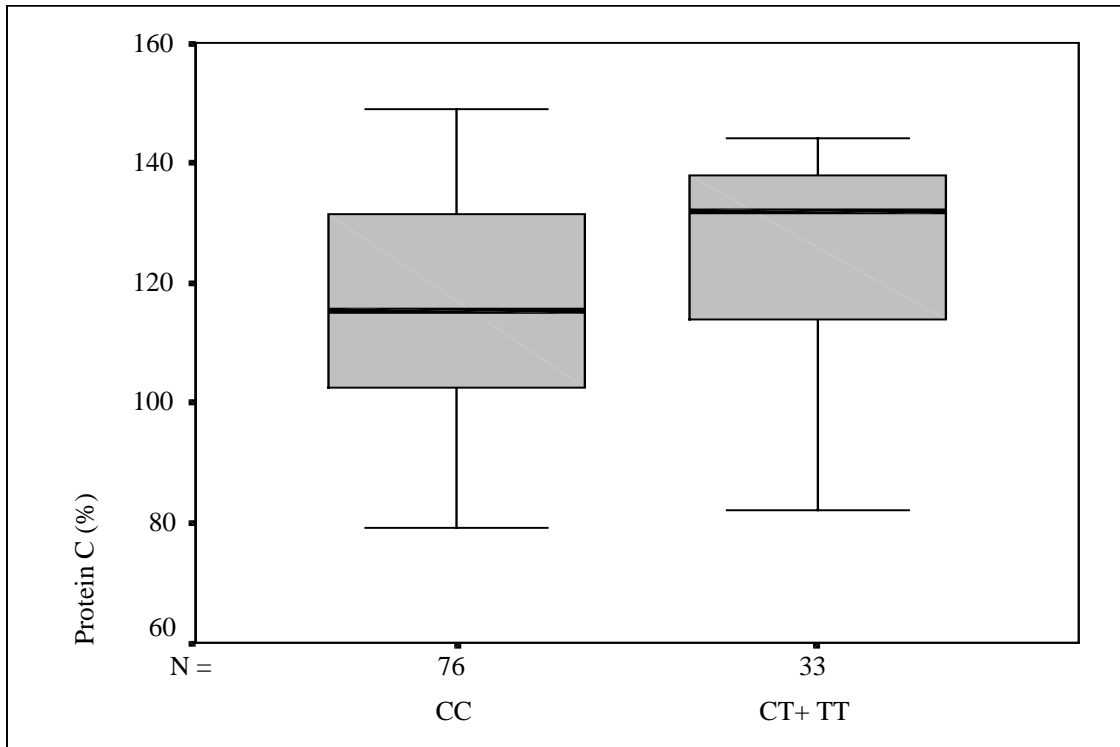


Abb. 14: Angiotensinogen (C659T)-Polymorphismus: Protein C-Plasmaspiegel in Abhängigkeit vom Genotyp unter Annahme eines dominanten genetischen Modells für das T-Allel

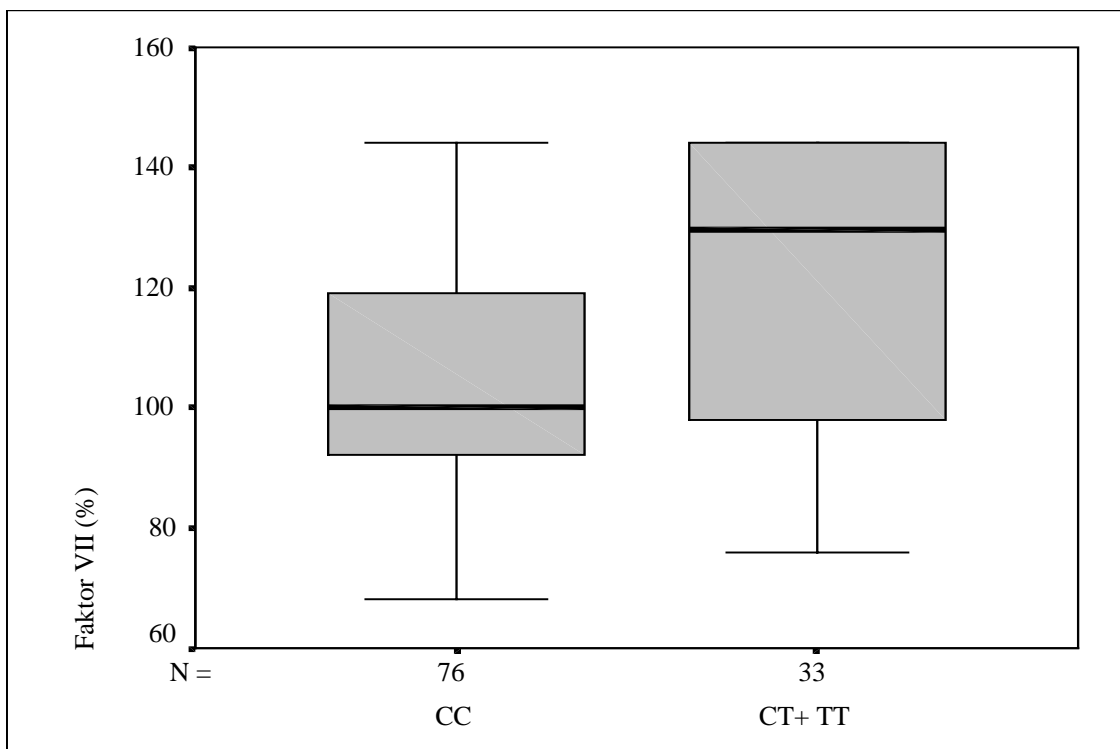


Abb. 15: Angiotensinogen (C659T)-Polymorphismus: Faktor VII-Plasmaspiegel in Abhängigkeit vom Genotyp unter Annahme eines dominanten genetischen Modells für das T-Allel (Werte > 144,1 % konnten labortechnisch nicht weiter differenziert werden. Deswegen ergibt sich hier eine schiefe Verteilung.)

4. 2. 3. Der Apolipoprotein E (112, 158)-Polymorphismus

In der Patientengruppe wurden 9,9 % ϵ 2-, 76,9 % ϵ 3- und 13,2 % ϵ 4-Allele detektiert. Bei den Blutspendern beinhaltete der untersuchte Genpool 7,9 % ϵ 2, 82,1 % ϵ 3 und 10,0 % ϵ 4. Nach statistischer Prüfung aller genetischen Modelle zeigte sich eine Häufung des ϵ 2- und ϵ 4-Allels in der KHK-Gruppe. Unter der Annahme, dass beide Varianten einen dominanten Risikofaktor darstellen könnten, wurde in den folgenden Darstellungen der ϵ 3/ ϵ 3-Wildtyp als Referenzkategorie verwendet und die seltene ϵ 2/ ϵ 4-Variante (n=5) vernachlässigt. Danach waren ϵ 2-Allelträger gegenüber diesem Wildtyp unter den KHK-Patienten tendenziell ($p=0,148$; OR=1,611), die ϵ 4-Allelträger sogar signifikant häufiger nachweisbar ($p=0,044$; OR=1,787). Die Assoziation zwischen ϵ 3/ ϵ 4+ ϵ 4/ ϵ 4 und koronarer Herzkrankheit zeigte eine ausgeprägte Geschlechtsabhängigkeit. Für die weiblichen Probanden war diese Beziehung besonders auffällig ($p=0,017$; OR=6,000), währenddessen sich bei isolierter Betrachtung der männlichen Studienteilnehmer nur ein tendenzieller Zusammenhang zwischen KHK und ϵ 4-Allelträger demonstrieren ließ ($p=0,642$; OR=1,180). Bei separater Untersuchung der Patienten mit Myokardinfarkt zeigten sich im Vergleich mit den Blutspendern für ϵ 2/ ϵ 2+ ϵ 2/3 ($p=0,121$; OR=1,723) und ϵ 3/ ϵ 4+ ϵ 4/ ϵ 4 ($p=0,101$; OR=1,680) ähnliche, wenn auch nicht signifikante Ergebnisse. Wesentliche Resultate der Apo E-Genotypisierung sind in den folgenden Abbildungen zusammengefasst (Abb. 16, 17, 18).

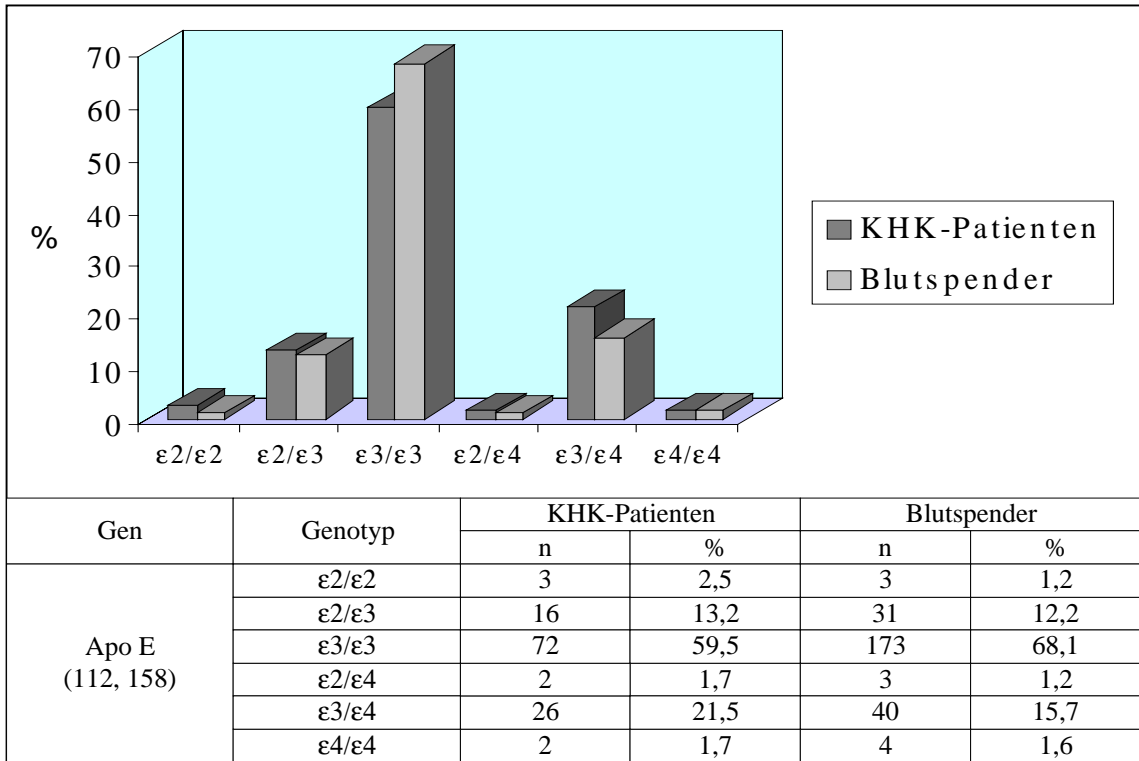


Abb. 16: Apo E (112, 158)-Polymorphismus: KHK-Patienten und gesunde Blutspender

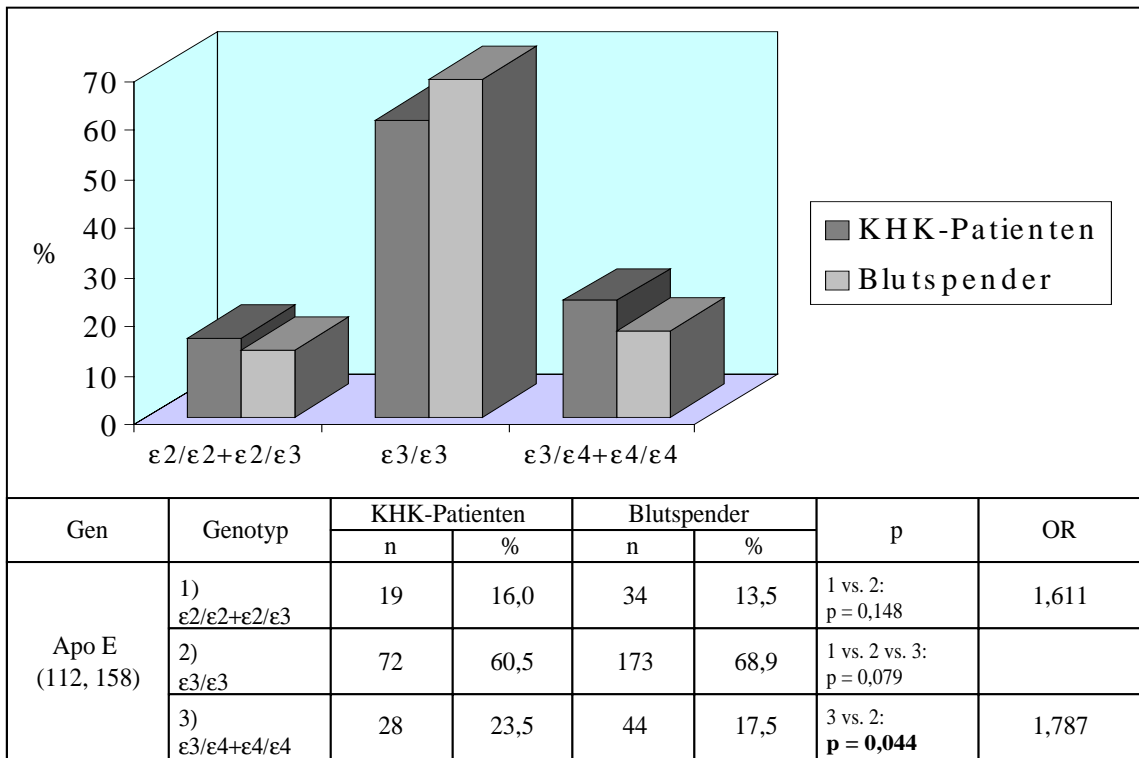


Abb. 17: Apo E (112, 158)-Polymorphismus: KHK-Patienten und gesunde Blutspender unter Annahme eines dominanten genetischen Modells für das ε2- bzw. ε4-Allel

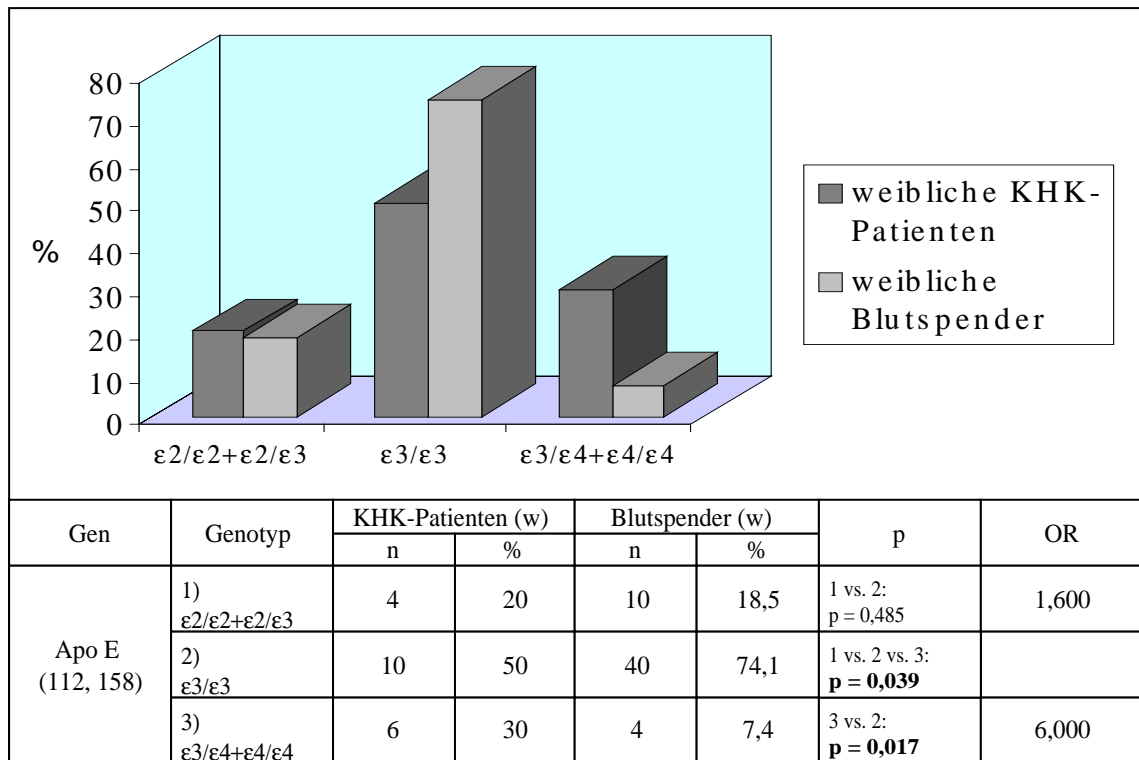


Abb. 18: Apo E (112, 158)-Polymorphismus: Weibliche KHK-Patienten und gesunde weibliche Blutspender unter Annahme eines dominanten genetischen Modells für das $\epsilon 2$ - bzw. $\epsilon 4$ -Allel

Träger des $\epsilon 4$ -Allels entwickelten im Zeitraum der prospektiven Beobachtung häufiger eine Restenose nach PTCA als Patienten ohne diese Genvariante. Diese Assoziation war sowohl im Vergleich mit den homozygoten $\epsilon 3$ -Probanden ($p_{\text{exact}}=0,035$), als auch im globalen Vergleich signifikant ($p_{\text{exact}}=0,028$). Aufgrund der verhältnismäßig geringen Fallzahl ($n=44$) wurden diese Ergebnisse mit „Fisher’s exact test“ ermittelt. Da die wissenschaftliche Interpretation der hier dargestellten Resultate als Einzelvergleich erfolgte, konnte auf eine Bonferroni-Korrektur verzichtet werden. Aussagen über Unterschiede zwischen Homozygotie und Heterozygotie für die $\epsilon 4$ -Variante in dieser speziellen Fragestellung waren wegen der Seltenheit des $\epsilon 4/\epsilon 4$ -Isoform nicht möglich. In Abbildung 19 ist die genotypspezifische Entwicklung einer Restenose graphisch dargestellt.

Die altersabhängige Analyse des Apo E (112, 158)-Polymorphismus ergab innerhalb der Koronarpatienten lediglich bei Patienten unter 41 Jahren, was in der vorliegenden Arbeit dem ersten Quartil entspricht, eine tendenzielle Häufung des $\epsilon 4$ -Allels ($p_{\text{exact}}=0,246$; OR=2,673).

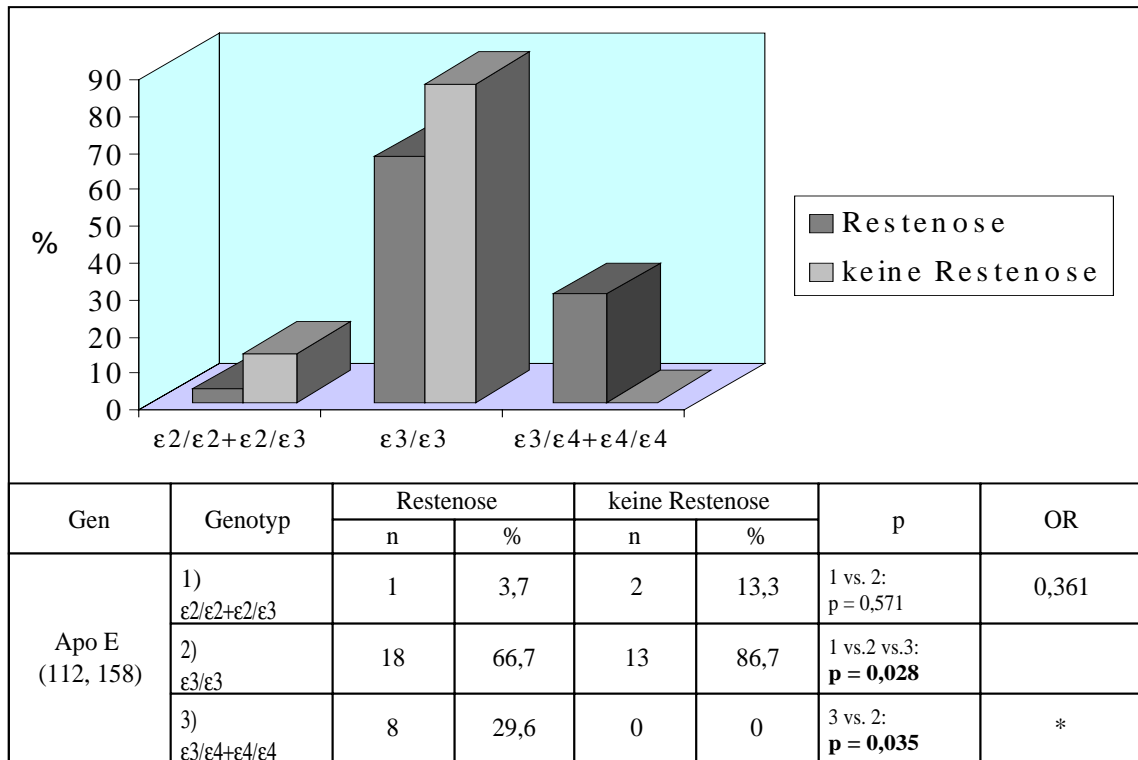


Abb. 19: Apo E (112, 158)-Polymorphismus: Restenose nach PTCA unter Annahme eines dominanten genetischen Modells für das $\epsilon 2$ - bzw. $\epsilon 4$ -Allel

*) Für diesen Vergleich ist kein „odds ratio“ ermittelbar.

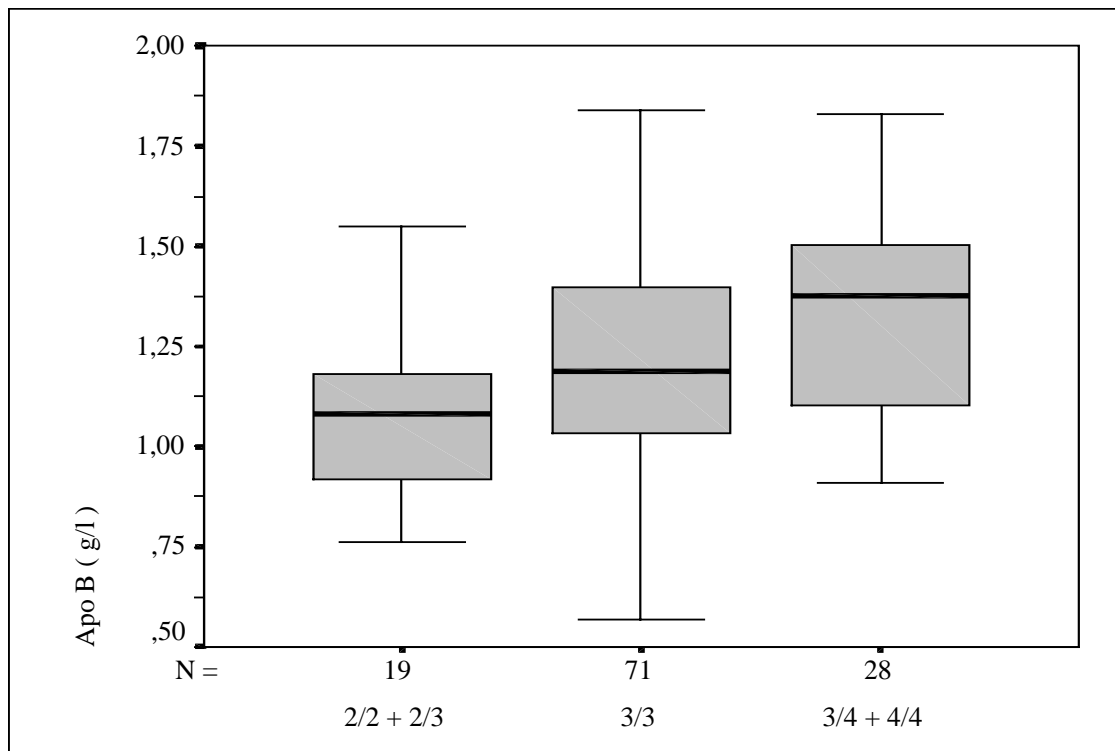
Bei der genotypabhängigen Untersuchung der klassischen koronaren Risikofaktoren Hyperlipidämie, arterielle Hypertonie, Zigarettenkonsum, Diabetes mellitus, Alter, Geschlecht, Familienanamnese und BMI zeigte sich, dass hypertone im Vergleich mit normotonen KHK-Patienten seltener das $\epsilon 4$ -Allel trugen ($p=0,046$; $OR=0,379$) unter Berücksichtigung der $\epsilon 3$ -Homozygoten als Referenz. Weitere signifikante Unterschiede waren bei dieser Analyse nicht feststellbar.

Die Auswertung der Laborparameter in Abhängigkeit vom Apo E (112, 158)-Polymorphismus zeigte für TC, Lp(a), LDLC und Apo B eine ansteigende Tendenz von den $\epsilon 2$ -Allelträgern über die $\epsilon 3/\epsilon 3$ -Patienten zu den $\epsilon 3/\epsilon 4+\epsilon 4/\epsilon 4$ -Genotypen. Für TG und HDLC waren in der gleichen Richtung eher absteigende Werte zu beobachten. Bei Trägern des $\epsilon 4$ -Allels waren die Apo B-Serumspiegel im Vergleich mit Trägern des $\epsilon 2$ -Allels signifikant erhöht ($p=0,002$). In Tabelle 10 wird eine genotypspezifische Darstellung ausgewählter Lipidparameter präsentiert. Die beschriebenen Tendenzen sind anhand von Apo B mit Hilfe eines „Boxplots“ exemplarisch veranschaulicht (Abb. 20).

Tab. 10: Apo E (112, 158)-Polymorphismus: ausgewählte Lipidparameter unter Annahme eines dominanten genetischen Modells für das $\epsilon 2$ - bzw. $\epsilon 4$ -Allel

Laborwert		$\epsilon 2/\epsilon 2+\epsilon 2/\epsilon 3$	$\epsilon 3/\epsilon 3$	$\epsilon 3/\epsilon 4+\epsilon 4/\epsilon 4$
		Mittelwert $\pm \sigma$	Mittelwert $\pm \sigma$	Mittelwert $\pm \sigma$
Triglyzeride	(mmol/l)	2,26 \pm 0,87	2,12 \pm 1,20	1,95 \pm 0,72
Total-Cholesterol	(mmol/l)	5,33 \pm 1,01	5,48 \pm 1,10	5,68 \pm 0,97
LDL-Cholesterol	(mmol/l)	3,07 \pm 0,87	3,41 \pm 1,04	3,66 \pm 0,92
HDL-Cholesterol	(mmol/l)	1,22 \pm 0,48	1,17 \pm 0,42	1,14 \pm 0,34
Lp(a)	(g/l)	0,22 \pm 0,25	0,34 \pm 0,38	0,42 \pm 0,38
Apo A1	(g/l)	1,35 \pm 0,33	1,29 \pm 0,25	1,30 \pm 0,25
Apo B	(g/l)	1,10\pm0,23	1,21\pm0,30	1,34\pm0,26*

* $\epsilon 3/\epsilon 4+\epsilon 4/\epsilon 4$ vs. $\epsilon 2/\epsilon 2+\epsilon 2/\epsilon 3$: **p = 0,002**; CI = -0,39- (-0,09)

Abb. 20: Apo E (112, 158)-Polymorphismus: Apo B-Serumspiegel unter Annahme eines dominanten genetischen Modells für das $\epsilon 2$ - bzw. $\epsilon 4$ -Allel

4. 2. 4. Der *p22-phox* (C242T)-Polymorphismus

Bei diesem polymorphen Marker wurde das C-Allel zu etwa zwei Dritteln in der Patientengruppe vorgefunden (C: 65,68 %; T: 34,32 %). Unter den Blutspendern war diese Variante etwas häufiger, das T-Allel entsprechend seltener anzutreffen (C: 69,60 %; T: 30,40 %). In Abbildung 21 sind die sich daraus ergebenden Genotypenverteilungen dargestellt.

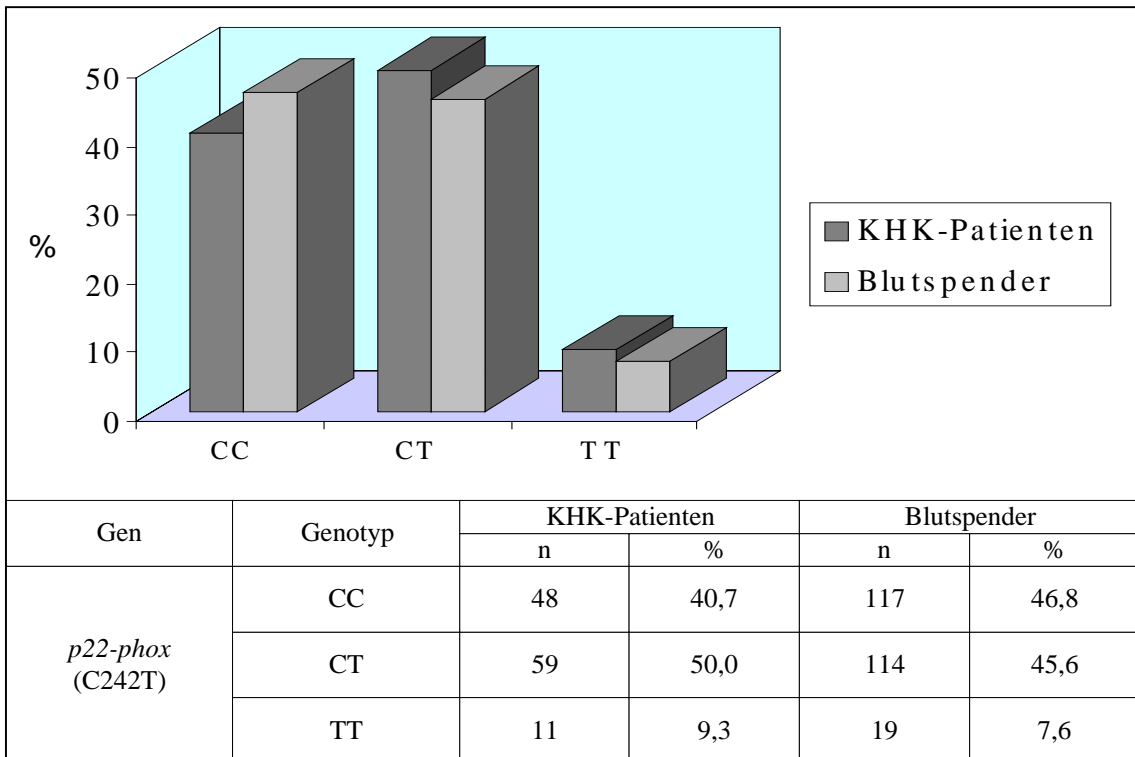


Abb. 21: *p22-phox* (C242T)-Polymorphismus: KHK-Patienten und gesunde Blutspender

Die Überprüfung des kodominanten und der beiden dominanten Modelle für das C- und T-Allel ergab keine signifikante Assoziation dieser genomischen Variante zur koronaren Herzkrankheit, auch nicht nach geschlechtsgetrennter Analyse. Unter der Annahme einer dominanten Wirkung ergab sich lediglich eine tendenzielle Häufung des T-Allels (CT+TT/CC: $p=0,367$; OR=1,239) in der KHK-Gruppe (Abb. 22). Auch für die Ausbildung eines Myokardinfarktes (CT+TT/CC: $p=0,715$; OR=1,099) und einer Restenose nach PTCA (CT+TT/CC: $p_{\text{exact}}=1,000$) war keine signifikante Beziehung zum *p22-phox* (C242T)-Polymorphismus nachweisbar.

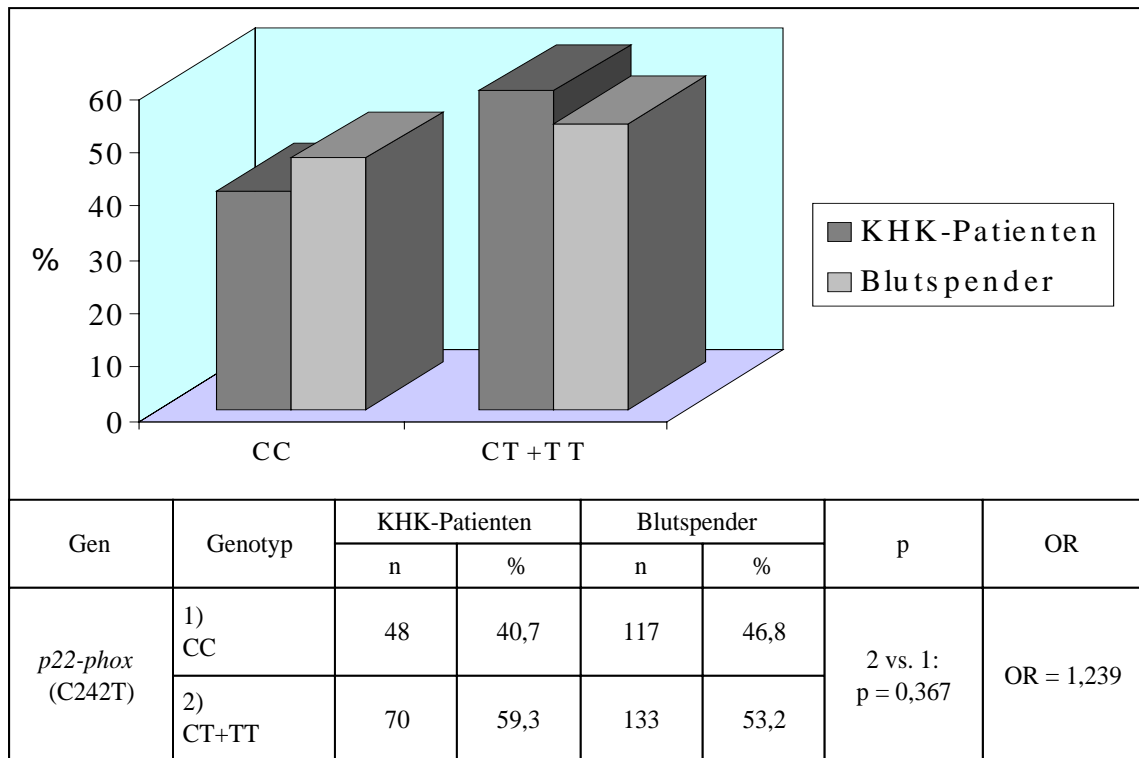


Abb. 22: *p22-phox* (C242T)-Polymorphismus: KHK-Patienten und gesunde Blutspender unter Annahme eines dominanten genetischen Modells für das T-Allel

Entsprechend den verschiedenen Eingangskriterien zur Aufnahme in diese Studie (MI, PTCA, ACVB/IMAB) erfolgten auch separate Untersuchungen in diesen Untergruppen. Dabei zeigte sich, dass Patienten nach erfolgreichem koronarchirurgischen Eingriff signifikant häufiger das *p22-phox* (C242T)-T-Allel trugen als die Blutspender ($p=0,011$; $OR=2,823$). Dieses Ergebnis war unabhängig von Alter, Geschlecht und den anderen untersuchten Polymorphismen (Abb. 23).

Zum Zeitpunkt der Befragung hatten 36 Probanden einen bereits längere Zeit zurückliegenden Myokardinfarkt ($5,83 \pm 4,78$ Jahre) überlebt. Auch in dieser Untergruppe konnte eine signifikante Assoziation zu den CT+TT-Genotypen im Vergleich mit den Blutspendern demonstriert werden ($p=0,013$; $OR=3,058$), die in Abbildung 24 dargestellt ist.

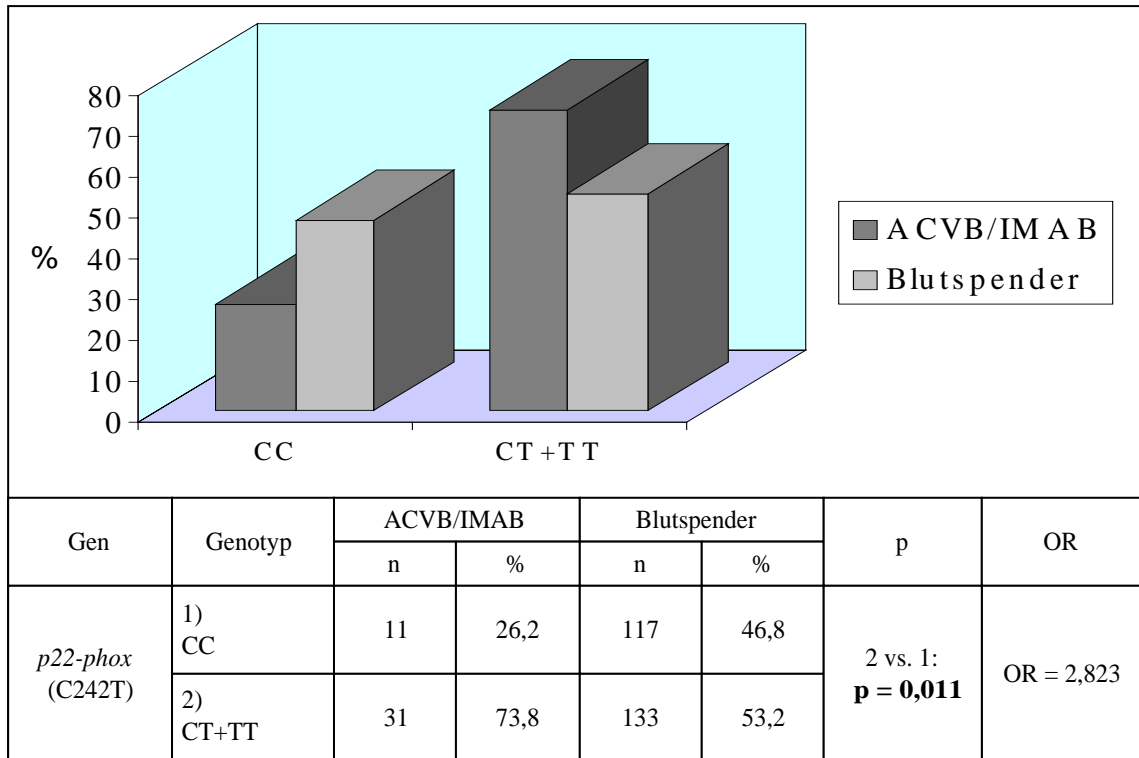


Abb. 23: *p22-phox* (C242T)-Polymorphismus: Patienten nach erfolgreichem koronarchirurgischen Eingriff (ACVB/IMAB) und gesunde Blutspender unter Annahme eines dominanten genetischen Modells für das T-Allel

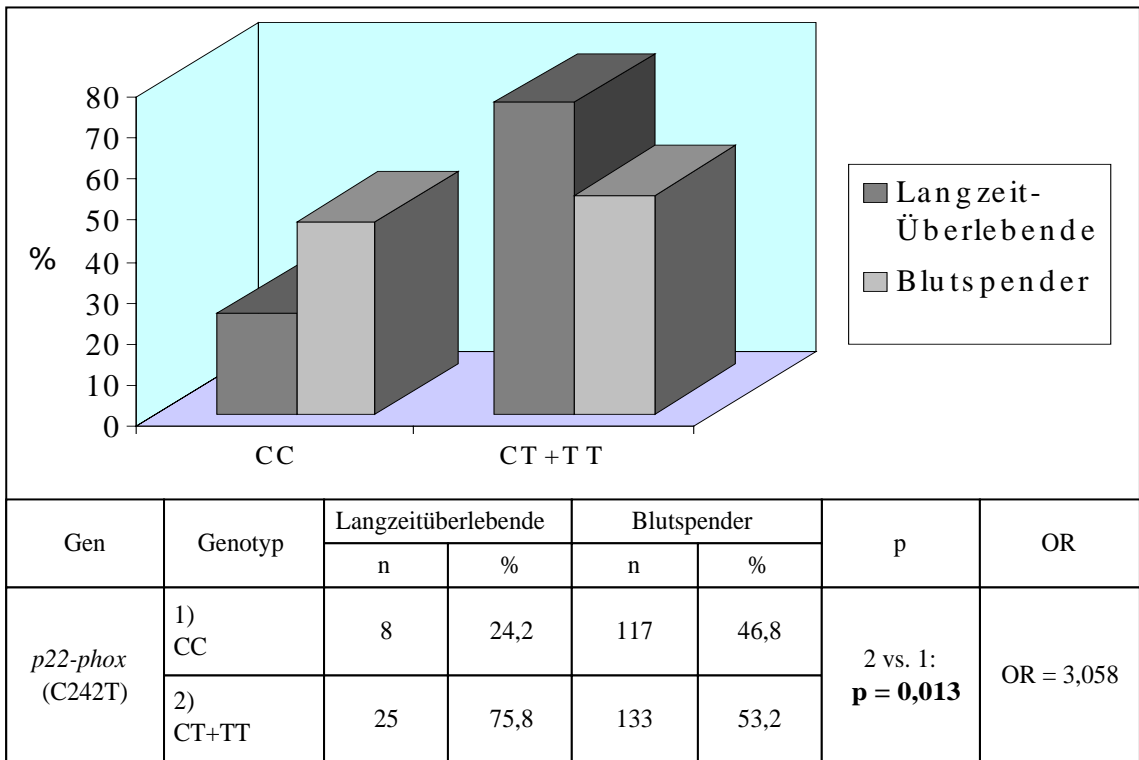


Abb. 24: *p22-phox* (C242T)-Polymorphismus: Langzeitüberlebende nach Myokardinfarkt und gesunde Blutspender unter Annahme eines dominanten genetischen Modells für das T-Allel

Des weiteren zeigten die *p22-phox* (C242T)-T-Allelträger beim Vergleich zwischen Patienten mit koronarer Eingefäß- und Mehrgefäßerkrankung eher einen diffuseren Befall der Herzkranzgefäße, was in Abb. 25 demonstriert wird. Tendenziell war in dieser Untergruppe auch eine bessere linksventrikuläre Ejektionsfraktion (CT+TT: $61,8 \pm 20,5$ %; CC: $58,1 \pm 16,8$ %; $p=0,293$) sowie eine niedrigere diastolische interventrikuläre Septumdicke (CT+TT: $10,6 \pm 2,3$ mm; CC: $11,5 \pm 2,6$ mm; $p=0,136$) nachweisbar.

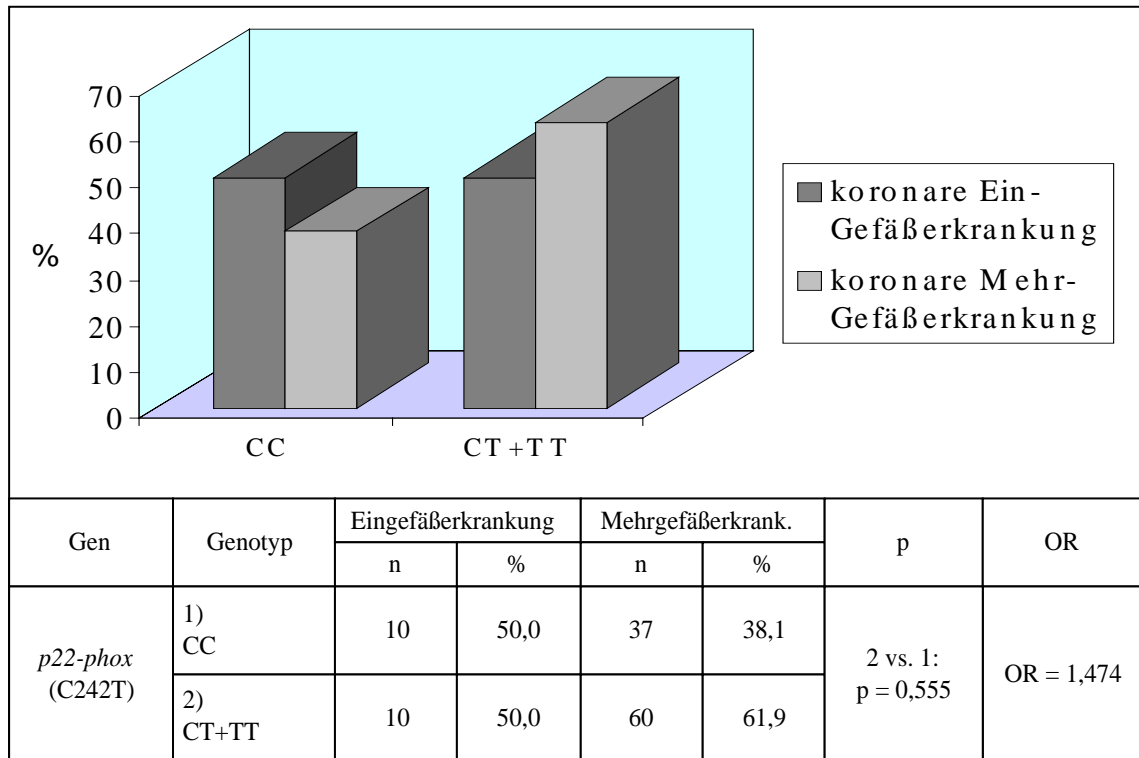


Abb. 25: *p22-phox* (C242T)-Polymorphismus: Patienten mit koronarer Ein- oder Mehrgefäßerkrankung unter Annahme eines dominanten genetischen Modells für das T-Allel

Eine Assoziation zwischen den etablierten Risikofaktoren einer KHK (Hyperlipidämie, arterielle Hypertonie, Zigarettenkonsum, Diabetes mellitus, Alter, Geschlecht, Familienanamnese und BMI) und dem *p22-phox* (C242T)-Polymorphismus konnte in der vorliegenden Arbeit nicht festgestellt werden.

4. 2. 5. Potentielle Interaktionen zwischen den untersuchten Genpolymorphismen

Zur Untersuchung der Frage, ob sich die in der vorliegenden Arbeit analysierten Genvarianten möglicherweise in ihrer Wirkung beeinflussen, erfolgte die Bildung von Genclustern. Dabei ließ sich demonstrieren, dass ein gleichzeitiges Vorliegen des Apo E (112, 158)- $\epsilon 4/\epsilon 4$ - und *p22-phox* (C242T)-T-Allels zusammen mit einer Homozygotie für die AGT (C659T)-C-Variante mit einem erhöhten koronaren Risiko assoziiert ist (Abb. 26). Dieses signifikante Ergebnis war alters- und geschlechtsunabhängig.

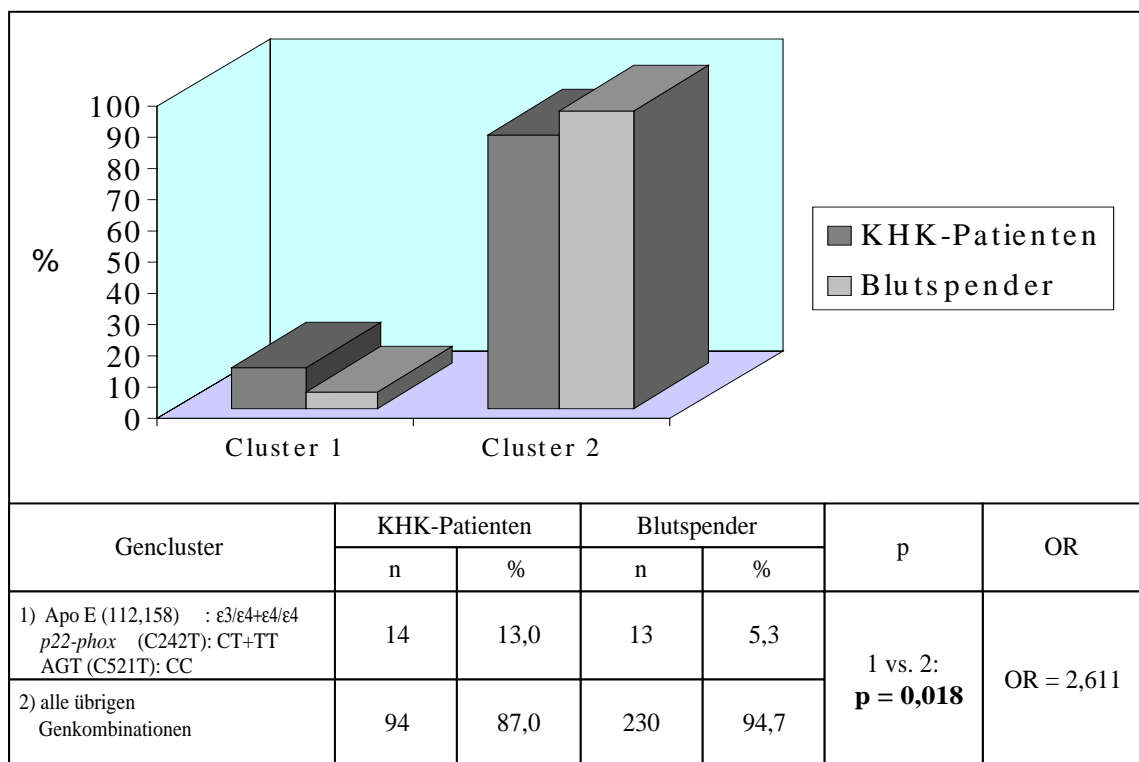


Abb. 26: Gencluster aus Apo E (112, 158): $\epsilon 3/\epsilon 4+\epsilon 4/\epsilon 4$, *p22-phox* (C242T): CT+TT und Angiotensinogen (C659T): CC im Vergleich mit allen übrigen Genkombinationen bei KHK-Patienten und gesunden Blutspendern

Für die Ausbildung eines Myokardinfarktes lag in diesem Zusammenhang kein signifikantes Ergebnis vor ($p=0,108$; $OR=2,075$). Des weiteren zeigte sich, dass Studienteilnehmer mit einer gleichzeitigen Homozygotie für das *p22-phox* (C242T)-C- und AGT (C659T)-C-Allel tendenziell seltener in der KHK-Gruppe zu finden waren ($p=0,068$; $OR=0,630$).

4.3. Analyse der KHK-Interventionsgruppen

Für fortgeschrittene Stadien der koronaren Herzkrankheit stehen neben der rein konservativen Betreuung die zwei invasiven Therapieoptionen PTCA und ACVB/IMAB zur Verfügung. In der hier präsentierten Studie wurde die Patientengruppe ebenfalls in Abhängigkeit von der jeweiligen Behandlungsform untersucht. Dabei zeigte sich, dass Patienten, bei denen eine operative Revaskularisation durchgeführt wurde, eher durch eine diffuse KHK charakterisiert waren (Abb. 27). Außerdem zeichnete sich diese Gruppe, verglichen mit den PTCA-Patienten, durch eine signifikant stärkere Präsentation der Hypertoniker ($p=0,019$; $OR=3,155$) und eine tendenzielle Häufung der *p22-phox* CT+TT-Genotypen aus ($p=0,057$; $OR=2,566$).

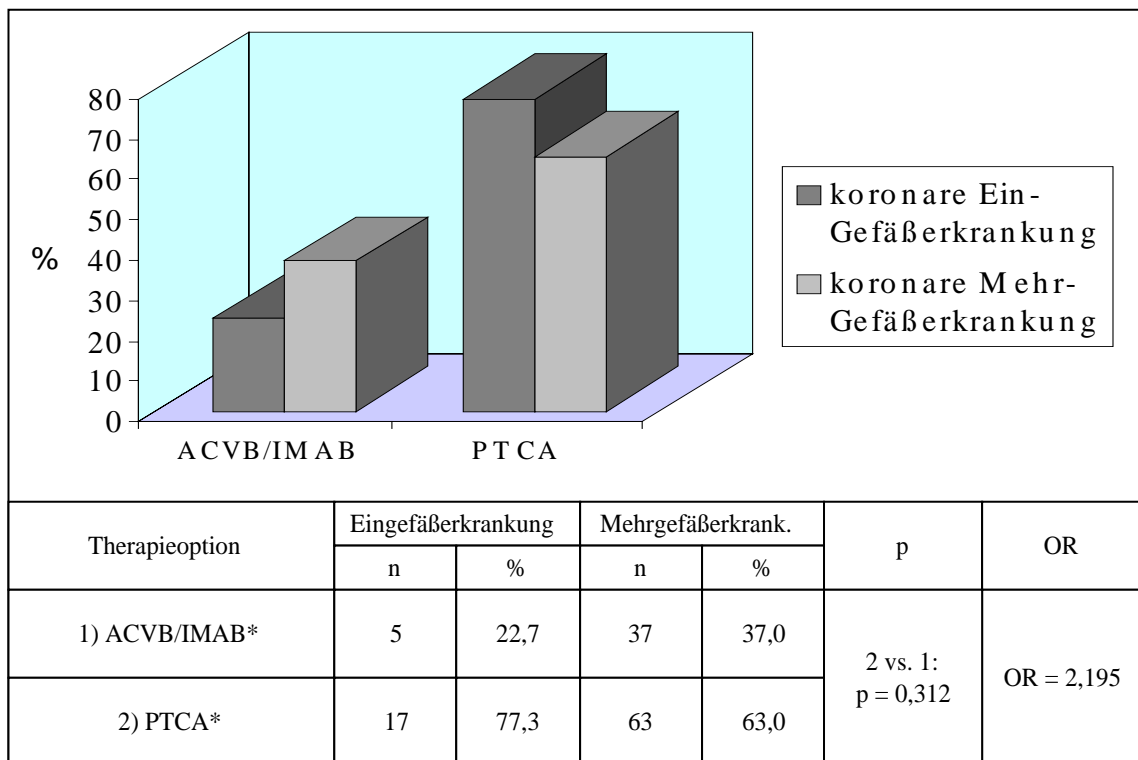


Abb. 27: Therapieentscheidung in Abhängigkeit von der Ausdehnung der KHK

*) Patienten, die sowohl eine PTCA, als auch eine ACVB/IMAB-Operation erhielten ($n=13$), wurden in jeder der beiden Gruppen (1 und 2) berücksichtigt.

Neben der tendenziellen Häufung von Mehrgefäßerkrankungen unter den Bypasspatienten, zeigten auch Probanden mit familiärer Belastung ($p=0,009$; $OR=6,329$) und die männlichen erkrankten Studienteilnehmer ($p=0,014$; $OR=8,415$) eine signifikante Neigung zur Ausbildung einer diffusen KHK.

5. Diskussion

5.1. Der Angiotensinogen (C659T)-Polymorphismus

Zwischen Angiotensinogenplasmaspiegel und Hypertonie besteht eine direkte Korrelation (119). Kim et al. konnten dies 1995 in einem Tierexperiment eindrucksvoll nachvollziehen. Labormäuse wurden mit null bis vier Kopien des Angiotensinogen-Gens transfiziert. Mit jeder zusätzlichen Genkopie war hier ein Anstieg des arteriellen Blutdruckes um 8 mmHg nachweisbar (59). Wenn der blutdrucksteigernde Effekt des Ang II direkt von der Angiotensinogenkonzentration abhängt, dann läßt sich vermuten, dass auch noch andere Partialwirkungen des Angiotensin II mit dem Angiotensinogenplasmaspiegel korrelieren. Ang II fördert beispielsweise auch die Hyperplasie von glatten vaskulären Muskelzellen, die Fibroblastenproliferation und die Konstriktion der Koronargefäße (89). Diese Prozesse sind elementare Bausteine in der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen (68). Demnach ist sowohl ein direkter (Promotion der Koronarsklerose), als auch ein indirekter (Modulation des Risikofaktors Hypertonie) Zusammenhang zwischen Angiotensinogen und koronarer Herzkrankheit denkbar. Polymorphe Varianten des Angiotensinogen-Gens, die die Expression oder funktionelle Aktivität dieses Proteins beeinflussen, sind deshalb für die Beurteilung der individuellen Risikokonstellation für eine KHK von großem Interesse. Von den mehr als zehn verschiedenen Genpolymorphismen des Angiotensinogens (57) gehört die C659T-Mutation zu den am häufigsten untersuchten Formen.

Die Häufigkeit des Angiotensinogen (C659T)-C-Alleles betrug 83,48 % bei den Koronarpatienten und 85,28 % in der Blutspendergruppe der in der vorliegenden Arbeit untersuchten mitteldeutschen Population. Dieses Ergebnis konnte durch andere Untersuchungen an Populationen gleicher ethnischer Zusammensetzung bestätigt werden (38, 103, 106). Unter der kaukasischen Bevölkerung Europas und Nordamerikas beträgt die C-Allelfrequenz 82-92 %, in Schwarzafrika etwa 95 % und bei den Asiaten in China und Japan 91-95 % (100). Es konnte keine Assoziation des potentiell pathogenen T-Allels zur koronaren Herzkrankheit insgesamt ($p=0,481$; $OR=1,202$) und zur Ausbildung eines nicht letalen Myokardinfarktes ($p=0,311$; $OR=1,327$) im Untersuchungskollektiv nachgewiesen werden. Auch eine Stratifizierung der Patientengruppe nach den Risikofaktoren Hyperlipidämie, Hypertonie, Diabetes mellitus, Zigarettenkonsum, BMI, Alter, Geschlecht und Familienanamnese zeigte keine Unterschiede in der Genotypenverteilung. Auffällig war lediglich, dass T-Allel-Träger tendenziell seltener zu Mehrgefäßerkrankungen neigten ($p=0,086$; $OR=3,165$). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Ko et al. und Tired et al., die ebenfalls keine Assoziation dieses Polymorphismus zu den verschiedenen klinischen Erscheinungsbildern der KHK nachwiesen (60, 106). Christiakov et

al. hingegen fanden eine Beziehung des T-Allels zur Manifestation eines Myokardinfarktes und zur linksventrikulären Hypertrophie (15). In einer anderen Arbeit konnte an 2250 kaukasischen Männern eine signifikante Häufung des seltenen TT-Genotyps bei höherem, koronarangiographisch ermittelten Schweregrad der KHK demonstriert werden (38). Dem gegenüber stellten Cong et al. fest, dass japanische Koronarpatienten mit einem Niedrigrisikoprofil häufiger homozygote Träger des C-Allels sind (16).

Auch für die Ausbildung einer Restenose nach PTCA lieferte die vorliegende Arbeit, im Einklang mit anderen Untersuchungen (117), keine Assoziation zum Angiotensinogen (C659T)-Polymorphismus ($p_{\text{exact}}=1,000$). Tendenziell häuften sich jedoch T-Allelträger in der Gruppe hypertensiver KHK-Patienten ($p=0,112$; $OR=4,092$). Eine Beziehung des T-Allels zur essentiellen arteriellen Hypertonie ist von zahlreichen Autoren nachgewiesen worden (49, 57, 73, 106), obwohl auch dies nicht konstant bestätigt werden konnte (14, 79).

Bisher konnte nicht demonstriert werden, dass der C659T-Polymorphismus eine Auswirkung auf den Plasmaspiegel oder die Aktivität des Angiotensinogens besitzt (57). Da die beschriebenen Assoziationen zur KHK, aber auch zur essentiellen arteriellen Hypertonie sehr widersprüchlich sind, ist es vorstellbar, dass der Austausch von Cytosin durch Thymin an Position 659 möglicherweise ohne funktionelle Auswirkungen bleibt. Die C659T-T-Variante ist häufig mit der M235T-T-Isoform des Angiotensinogens gekoppelt (57, 106). Threonin an Position 235 geht mit erhöhten AGT-Spiegeln einher (57). Demzufolge ist es auch möglich, dass ein Teil der in der Literatur beschriebenen Assoziationen des C659T-Polymorphismus durch eine Kopplung mit M235T bedingt ist. Jedoch auch bei der M235T-Isoform, ist die potentielle Beziehung zur KHK und essentiellen arteriellen Hypertonie noch nicht übereinstimmend geklärt (14, 55, 57, 106).

Jeunemaitre et al. und Caulfield et al. konnten für einen Mikrosatelliten am 3'-Ende des AGT-Gens zeigen, dass hypertensive Verwandte signifikant häufiger die gleiche Anzahl von GT-„Repeats“ aufwiesen, als es statistisch zu erwarten wäre (14, 57). Diese Befunde sind ein Indiz dafür, dass Hypertoniker innerhalb einer Familie häufig die gleiche Angiotensinogenvariante tragen. Nach wie vor konnte jedoch nicht definitiv geklärt werden, welche Veränderungen am Angiotensinogenen genau für erhöhte Blutdruckwerte und eventuell auch eine verstärkte Disposition zur Entwicklung einer KHK verantwortlich sind. Gegenstand aktueller Diskussion sind verschiedene Polymorphismen im Bereich der Promotorregion, die eventuell durch Modulation der Affinität von Transkriptionsfaktoren die Angiotensinogenexpression beeinflussen. So konnten Sato et al. 1997 demonstrieren, dass die AGT (C-18T)-CC-Variante einen Risikofaktor für die essentielle arterielle Hypertonie in der japanischen Bevölkerung

darstellt. Die Träger des AGT (C-18T)-T-Allels hingegen zeigten eine geringere Angiotensinogentranskriptionsrate und wiesen niedrigere Blutdruckwerte auf (96).

In der vorliegenden Arbeit fiel bei der genotypspezifischen Analyse der Gerinnungsparameter auf, dass Koronarpatienten, die das AGT (C659T)-T-Allel trugen, signifikant erhöhte Werte sowohl für das Protein C ($p=0,033$), als auch für den Faktor VII ($p=0,013$) zeigten. Eine solche Assoziation ist bisher in der Literatur noch nicht dargestellt worden. Ein derartiger Zusammenhang könnte über verschiedene theoretische Modelle erklärbar sein.

Das Glykoprotein Angiotensinogen besteht aus 452 Aminosäuren, von denen lediglich die zehn N-terminalen der Synthese von Ang I dienen. Es ist bemerkenswert, dass der Organismus ein solch großes Protein ausschließlich als Vorstufe eines Dekapeptides synthetisiert. Eine vom RAS unabhängige, physiologische Funktion der übrigen 442 Aminosäuren erscheint somit durchaus denkbar.

Angiotensinogen gehört in die Familie der Serinproteaseinhibitoren (42). Zu dieser Gruppe zählt neben dem α_1 -Antitrypsin auch das Eiweiß Protein C-Inhibitor, das eine dem AGT sehr verwandte Genstruktur aufweist. Diese Erkenntnis ist ein Hinweis darauf, dass Angiotensinogen, Protein C-Inhibitor und einige andere Serpine in der Phylogenese aus einem gemeinsamen Muttergen hervorgegangen sein könnten (48). Möglicherweise konnte AGT einen Teil der ursprünglichen Serinproteaseinhibitoraktivität konservieren. Unter dieser Annahme wäre Angiotensinogen in der Lage, die Serinprotease Protein C, ähnlich wie der Protein C-Inhibitor, zu neutralisieren. Erhöhte Protein C-Konzentrationen, wie in der vorliegenden Arbeit bei den untersuchten T-Allel-Trägern beobachtet, könnten durch eine reduzierte Serinproteaseinhibitorkapazität des Angiotensinogens verursacht sein. Das würde bedeuten, dass Patienten mit der AGT (C659T)-T-Variante Protein C möglicherweise schlechter in seiner Wirksamkeit hemmen. In dessen Folge wären zwangsläufig die gemessenen, erhöhten Protein C-Konzentrationen im Blutplasma zu erwarten. Faktor VII ist ebenfalls eine Serinprotease, so dass man hier das gleiche pathophysiologische Erklärungsmodell verwenden könnte.

Außerdem sind sowohl Protein C, als auch Faktor VII Vitamin K-abhängige Gerinnungsfaktoren. Demnach wäre eine Interaktion zwischen Vitamin K und Angiotensinogen denkbar. Phyllochinon (Vitamin K1) wird als lipophiles Molekül vor allem in triglyzeridreichen Lipoproteinen transportiert (62). Angiotensinogen weist Strukturhomologien mit Transportproteinen lipophiler Hormone, wie zum Beispiel dem corticosteroidbindenden Globulin, auf (5). Dementsprechend könnte auch Angiotensinogen an der Plasmaeiweißbindung

des Vitamin K beteiligt sein. Würden beispielsweise Träger des AGT (C659T)-T-Allels Vitamin K schlechter binden, dann könnte dies Ursache für einen erhöhten Wirkspiegel des Phyllochinons sein. Infolgedessen würde es zu einer effektiveren γ -Carboxylierung von Protein C und Faktor VII mit einem konsekutiven Aktivitätsanstieg dieser beiden Gerinnungsfaktoren kommen, wie es letztlich in der hier dargestellten Untersuchung bei den T-Allel-Trägern beobachtet wurde .

Bei erhöhten Protein C- und Faktor VII-Plasmaspiegeln sind unterschiedliche klinische Konsequenzen zu erwarten. Aktiviertes Protein C ist im Komplex mit Protein S ein wirksamer Inhibitor von Faktor Va und Faktor VIII:C. Faktor VII ist ein zentrales Glied des extrinsischen Systems der Blutgerinnung. Gesteigerte Protein C-Spiegel lassen demnach einen antikoagulatorischen Effekt erwarten, hohe Faktor VII-Spiegel erhöhen eher das Risiko für Gefäßverschlüsse (107). Ob diese beiden gegensätzlichen Prozesse sich nun neutralisieren oder einer der beiden überwiegt, konnte bisher nicht geklärt werden. Außerdem ist zu erwarten, dass unter der Annahme, dass Angiotensinogen wirklich ein effektiver Serinproteaseinhibitor ist, noch zahlreiche andere Serinproteasen in ihrer Wirkung beeinflusst werden könnten. Da fast alle Gerinnungsfaktoren zu dieser Enzymfamilie zählen, sollte neben den in dieser Arbeit untersuchten Faktoren Fibrinogen, Protein C, Protein S und Faktor VII die Gesamtwirkung einer möglichen, verminderten Serinproteaseinhibitorwirkung durch die AGT (C659T)-T-Isoform auf das Blutgerinnungssystem durch weitere biochemisch-genetische Assoziationsstudien geklärt werden. Auch durch Modifikation der Verfügbarkeit von freiem Vitamin K würden sich zahlreiche weitere pro- und antikoagulatorischer Proteine gegenseitig beeinflussen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen keine direkte Assoziation des AGT (C659T)-Polymorphismus zum klinischen Befund einer KHK, zur Manifestation eines Myokardinfarktes und zu Ausbildung einer Restenose im untersuchten Patientenkollektiv erkennen. Wohl aber weisen signifikante Bezüge zu wichtigen Faktoren des Gerinnungssystems, wie zum Beispiel Protein C und Faktor VII, auf eine funktionelle Relevanz im komplexen Geschehen der multifaktoriell verursachten koronaren Atherosklerose hin.

5.2. Der Apolipoprotein E (112, 158)-Polymorphismus

5.2.1. Der Apolipoprotein E (112, 158)-Polymorphismus und KHK

Besonders homozygote, aber auch heterozygote Träger des $\epsilon 4$ -Allels weisen, verglichen mit reinerbigen $\epsilon 3$ -Individuen, erhöhte Serumspiegel für LDLC, TC, Apo B und Triglyzeride sowie erniedrigte Werte für Apo E auf (9, 17, 24, 67). Dieser Effekt ist in verschiedenen ethnischen Gruppen nachweisbar (18, 51, 124). Aufgrund der pathologischen Lipidprofile mit insbesondere gesteigerten, atherogenen LDLC-Werten, ist bei den Trägern dieser Genotypen ein erhöhtes koronares Risiko zu vermuten.

In der vorliegenden Arbeit häuften sich erwartungsgemäß $\epsilon 4$ -Allelträger signifikant in der Gruppe der KHK-Patienten ($p=0,044$; $OR=1,787$) unter Berücksichtigung der Apo E3/E3-Isoform als Referenzkategorie zur Abschätzung des relativen Risikos (51, 67). Für die Manifestation eines Myokardinfarktes zeigte sich ein tendenziell ähnliches Resultat ($p=0,101$; $OR=1,680$). Diese Ergebnisse stehen im Einklang zum aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnisstand (17, 22, 77, 82, 124). Allerdings konnte die Beziehung des Apo E4 zur koronaren Herzkrankheit nicht in jeder der publizierten Studien nachgewiesen werden (8). Die atherogene Wirkung des Apo E4 wird vor allem den gesteigerten LDLC-Spiegeln zugeschrieben. Eine signifikante Senkung der genspezifisch gesteigerten Sterblichkeit durch den HMG-CoA-Reduktasehemmer Simvastatin unterstreicht diese These (40). Da sich Apo E4 jedoch in verschiedenen Untersuchungen als von den Blutfettwerten unabhängiger Risikofaktor präsentierte, ist es denkbar, dass neben den Veränderungen der Serumcholesterolspiegel noch andere pathophysiologische Mechanismen für die erhöhte KHK-Prävalenz in der Gruppe der $\epsilon 4$ -Allel-Träger verantwortlich sind (40).

Insbesondere bei isolierter Betrachtung der weiblichen Studienteilnehmer scheint Apo E4 einen koronaren Risikofaktor darzustellen ($p=0,017$; $OR=6,000$). So konnten Wilson et al. ebenfalls eine besonders strenge Assoziation des $\epsilon 4$ -Allels zur KHK bei isolierter Betrachtung des weiblichen Geschlechts demonstrieren (121). Ein denkbare Ursache für dieses Phänomen könnte an dem Einfluss des Sexualhormons Östrogen liegen. Jüngere Frauen vor Vollendung des 55. Lebensjahres bilden im Vergleich zu gleichaltrigen Männern viel seltener eine manifeste KHK aus. Der relativ geringe Frauenanteil unter den Koronarpatienten (16,3 %) in der vorliegenden Studie unterstreicht das. Ein protektiver Effekt des Östrogens ist unter anderem durch die günstigen Wirkungen auf den Serumlipidspiegel erklärbar (112). Es ist demzufolge durchaus möglich, dass in einem solchem weiblichen Niedrigrisikokollektiv erbliche Faktoren mit Einfluss auf den Fettstoffwechsel eine wesentlich größere Bedeutung gewinnen könnten.

Möglicherweise spielen deshalb bei prämenopausalen Frauen genetische Risikokonstellationen eine stärkere Rolle bei der Erreichung des atherogenen Potentials für die vorzeitige Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit als bei Männern.

Altersabhängige Untersuchungen zeigten eine deutlichere Assoziation von Apo E4 zur koronaren Herzkrankheit bei jüngeren Patienten (51, 77). In diesem Lebensalter ist der Einfluss exogener Risikofaktoren durch die verkürzte Expositionszeit noch relativ gering. Demzufolge erscheint hier eine größere Bedeutung erblicher Faktoren plausibel. In der vorliegenden Arbeit war ein dementsprechender Vergleich zwischen jüngeren und älteren KHK-Patienten nicht gegeben, da ausschließlich junge Patienten mit einer klinisch manifesten, schweren koronaren Herzkrankheit vor Vollendung des 55. Lebensjahres in die Studie aufgenommen wurden. Des Weiteren scheint das ϵ 4-Allel für eine erhöhte kardiovaskuläre Mortalität verantwortlich zu sein (31, 40). Außerdem stellt es einen Risikofaktor für die vorzeitige Manifestation des Morbus Alzheimer dar (102).

Die Apo E2-Isoform präsentierte sich bei der Analyse der vorliegenden Arbeit zumindest tendenziell verstärkt innerhalb der Gruppe der Koronarpatienten ($p=0,148$; $OR=1,611$) und bei den Überlebenden eines Myokardinfarktes ($p=0,121$; $OR=1,723$). Nur wenige Arbeiten können dieses Ergebnis stützen. Zum Beispiel wurde eine von anderen Einflussfaktoren unabhängige Assoziation des ϵ 2-Allels zur Atherosklerose der Arteria carotis interna nachgewiesen (23, 47), was für einen potentiell atherogenen Effekt der Apo E2-Isoform spricht. Ungeachtet dessen wird der gleichen genetischen Variante in verschiedenen Publikationen auch eine koronarprotektive Wirkung zugesprochen (22, 67).

Probanden mit dem ϵ 2-Allel zeichnen sich durch ein günstigeres Lipidprofil aus. Im Vergleich zu den homozygoten ϵ 3-Trägern sind die Werte für LDL-C, TC und Apo B erniedrigt, die Apo E-Spiegel hingegen erhöht (9, 24, 35, 67). Tendenziell konnten diese Befunde auch in der vorliegenden Arbeit nachvollzogen werden. Allerdings kommt es, wie auch in der hier präsentierten Studie beobachtet, durch die Akkumulation pathologischer β -VLDL zu einer mehr oder weniger ausgeprägten Hypertriglyzeridämie (111). Aufgrund der niedrigeren LDL-C-Serumlevel wird die Apo E2-Variante von den meisten Autoren insgesamt als kardiovaskulär protektiv eingeschätzt (22, 67). Trotzdem kann das Gleichgewicht zwischen den einzelnen Lipoproteinfraktionen, besonders bei Homozygotie für das ϵ 2-Allel, dekomensieren. Durch übermäßigen Anstau von β -VLDL und Chylomikronenremnants entwickelt sich gelegentlich eine Typ III-Hyperlipidämie mit erhöhten Gesamtcholesterol- und exzessiv gesteigerten Triglyzeridwerten. Dieser Zustand manifestiert sich als multifaktorielle Erkrankung allerdings nur unter bestimmten Umweltbedingungen, wie zum Beispiel fettreicher Kost, Diabetes

mellitus, Adipositas und Hypothyreose. Klinisch zeigen diese Patienten pathognomonische Handlinienxanthome und ein erhöhtes Atheroskleroserisiko (111, 118). Möglicherweise ist diese Form der Fettstoffwechselstörung eine Ursache für die tendenzielle Häufung der $\epsilon 2$ -Allelträger unter den Koronarpatienten. Die genspezifische Analyse der Lipidwerte in der vorliegenden Arbeit spricht jedoch eher dagegen. Allerdings wären auch andere Ursachen für die beobachtete Assoziation denkbar. $\epsilon 2$ -Allelträger könnten beispielsweise aufgrund eines hypothetisch labileren allgemeinen Gesundheitszustandes seltener zur Blutspende gehen. Die Vergleichsgruppe würde in diesem Fall kein repräsentatives Referenzkollektiv mehr darstellen. Klarheit über derartige Zusammenhänge kann nur durch weiterführende Studien geschaffen werden. Zusammenfassend betrachtet sind die Aussagen zu einem möglichen Zusammenhang zwischen Apolipoprotein E2 und koronarer Herzkrankheit aufgrund des einerseits mit der LDL-C-Senkung verknüpften protektiven Effektes und dem andererseits erhöhten Risiko für eine Hyperlipidämie Typ III widersprüchlich und sicherlich stark von anderen Einflussfaktoren abhängig.

In der hier präsentierten Regionalstichprobe aus dem Raum Halle-Merseburg-Bitterfeld lag die Apo E-Allelfrequenz sowohl bei den klinisch gesunden Blutspendern ($\epsilon 2=0,079$; $\epsilon 3=0,821$; $\epsilon 4=0,100$), als auch bei den KHK-Patienten ($\epsilon 2=0,099$; $\epsilon 3=0,769$; $\epsilon 4=0,132$) im Bereich anderer kaukasischer Populationen ($\epsilon 2=0,05-0,10$; $\epsilon 3=0,70-0,85$; $\epsilon 4=0,10-0,20$)(66). Corbo et al. stellten 1999 eine Übersicht aus 29 Originalarbeiten zusammen, die die Allelverteilung des Apo E-Polymorphismus in verschiedenen Populationen untersuchten. Apo E4 häufte sich hierbei besonders in Gebieten, die in der Evolution als Nahrungsmangelregionen bezeichnet werden können, währenddessen Apo E3 vor allem in alten Ackerbaukulturen (Mittelmeerraum, Ostchina) akkumulierte. Beide Genotypen korrelierten streng negativ miteinander, so dass eine gegenseitige Verdrängung anzunehmen ist. Der Autor postulierte das $\epsilon 4$ -Allel als sogenannten sparsamen Genotyp (18). Es ist durchaus denkbar, dass Apo E4 in solchen Nahrungsmangelregionen aufgrund einer effizienteren Lipidresorption einen Selektionsvorteil darstellte. In Europa sind die Lappen mit einem $\epsilon 4$ -Anteil von 0,310 (31,0 %) gleichzeitig die Population mit der höchsten KHK-Prävalenz, währenddessen bei Sarden die Häufigkeit für dieses Allel nur 0,052 (5,2 %) beträgt. Unter der Annahme, dass Apo E4 einen Risikofaktor darstellt, ist es nicht verwunderlich, dass die koronare Herzkrankheit im mediterranen Raum weitaus seltener vorkommt (18). In anderen Gebieten der Erde, zum Beispiel in Schwarzafrika, ist die KHK trotz hoher $\epsilon 4$ -Frequenz (0,285) eine seltene Erkrankung (66). Mögliche Ursachen hierfür sind energiearme und ballaststoffreiche Ernährung, ausreichende körperliche Aktivität und die insgesamt geringere Lebenserwartung in diesen Regionen. Apo E4 erlangt seine pathogene Wirksamkeit wahrscheinlich nur unter den klassischen Lebensbedingungen der Industriestaaten. Für das $\epsilon 2$ -Allel ist keine positive oder negative Selektion in

Nahrungsmangelgebieten erkennbar. Die extreme Seltenheit dieser Variante bei ostsibirischen Ureinwohnern (0,004) und das vollständige Fehlen bei den Indianern (18) liefert aber einen interessanten Hinweis auf die Völkerwanderung von Ostasien über die Behringstraße nach Nordamerika.

5. 2. 2. Der Apolipoprotein E (112, 158)-Polymorphismus und Restenose nach PTCA

Die Restenose ist aus pathophysiologischer Sicht eine Reaktion auf iatrogene Verletzungen der Gefäßwand im Rahmen einer Angioplastie. Thrombusformation, Neointimabildung und „*Remodeling*“ führen nach dem initialen, interventionellen Trauma zu einer Einengung des Gefäßlumens. Dieser, mit einer Entzündungsreaktion vergleichbare Vorgang ist nach sechs Monaten abgeschlossen. Bei isolierter PTCA sind vor allem „*Remodelingprozesse*“ im Bereich der Media, nach Stentimplantationen insbesondere Intimahyperplasien für die Manifestation einer Restenose verantwortlich (58).

Es ist klinisch von großer Bedeutung, das individuelle Risiko eines Patienten für die Ausbildung einer solchen Wiederverengung der Herzkranzgefäße abzuschätzen. In Rahmen zahlreicher Studien konnten patientenbezogene, interventionsbedingte und vom Koronarbefund abhängige Risikofaktoren identifiziert werden. Arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus (58), CMV-Infektion (32), erhöhte IL-6-Spiegel im Sinus coronarius nach PTCA (50) und starke Pulsationen der Aorta ascendens (76) scheinen die Disposition zur Entwicklung einer Restenose zu verstärken. Auch hohe Implantationsdrücke bei der Ballondehnung und ein Verzicht auf die Applikation von intrakoronaren „*Stents*“ erhöhen das Restenoserisiko (52). Koronarangiographisch betrachtet sind langstreckige und komplexe Läsionen, sowie englumige Gefäße (< 3,1 mm) besonders gefährdet (58). Zunehmend häufen sich Hinweise für mögliche genetische Ursachen. So tragen Kranke, die bereits eine Restenose entwickelt haben, nach erneuter Dehnung ein deutlich höheres Wiederholungsrisiko. Zur Zeit werden besonders die ACE-DD und Gp IIIa PI^{A2}-Genotypen als Risikofaktoren für eine „*In-Stent-Restenose*“ diskutiert (58).

In der vorliegenden Arbeit entwickelten die ε4-Allel-Träger während der prospektiven Beobachtung signifikant häufiger eine Restenose als Patienten mit Homozygotie für die ε3-Variante ($p_{\text{exact}}=0,035$). Da keine routinemäßige Kontrollkoronarangiographie durchgeführt wurde, konnte nur bei einer relativ kleinen Fallzahl (n=44) ein eindeutiges Sechsmatsergebnis verifiziert werden. Aufgrund der dadurch eingeschränkten statistischen Testmöglichkeiten ist eine Aussage zur Unabhängigkeit des Ergebnisses von anderen Einflussgrößen nicht möglich.

Da sich dieses Resultat jedoch im Konsens zu anderen Publikationen befindet (30, 113), erscheint eine Assoziation zwischen $\epsilon 4$ -Allel und Ausbildung einer Restenose wahrscheinlich, auch wenn die bisher publizierten Studienergebnisse nicht immer einheitlich und nachvollziehbar waren (94). Unter der Annahme einer kausalen Verknüpfung von Apo E4 zur Entwicklung dieser postinterventionellen Komplikation sind mehrere pathophysiologische Hypothesen zur Interpretation dieses Phänomens denkbar.

Apo E4 könnte indirekt durch seine ungünstige Wirkung auf die Serumlipide oder durch primäre Ausbildung komplizierterer Läsionen das Restenoserisiko a priori erhöhen. Andererseits ist auch eine direkte Beeinflussung von „*Remodeling*“ und Intimahyperplasie möglich. Die Makrophagen in den atherosklerotischen Plaque produzieren in größeren Mengen Apo E. Dieses alkalische Protein bindet saure Glucosaminoglykane der extrazellulären Matrix. Durch die Interaktion können Wirkungen von Wachstumsfaktoren moduliert werden. Apo E4 ist durch den Argininreichtum besonders alkalisch (70). Demnach ist eine stärkere Wechselwirkung mit den Matrixmolekülen und konsekutiv auch mit den Wachstumsfaktoren zu erwarten. Denkbare Folgen wären eine ausgeprägtere Beeinflussung von Proliferation und Differenzierung glatter Gefäßmuskelzellen („*Remodeling*“) oder Fibroblastenaktivierung (Intimahyperplasie) durch die Apo E4-Isoform. Das Apolipoprotein E besitzt außerdem die Fähigkeit, T-Zellen zu aktivieren, die dann durch Zytokinproduktion eine lokale Inflammation auslösen können (70). Auch eine Beteiligung solcher Prozesse an der Manifestation einer Restenose ist denkbar.

5. 2. 3. Der Apolipoprotein E (112, 158)-Polymorphismus und Laborwerte

Beim Vergleich der Laborparameter zwischen den einzelnen Apo E-Isoformen waren lediglich die Apo B-Werte bei $\epsilon 4$ -Trägern, verglichen mit $\epsilon 2$ -Trägern, signifikant erhöht ($p=0,002$). Da Apo B das wichtigste Apolipoprotein der LDL-Partikel darstellt und sich LDL-Partikel bei $\epsilon 4$ -Allelträgern durch „*Downregulation*“ der LDL-Rezeptoren im Serum anreichern, entspricht dieses Ergebnis den Erwartungen und steht im Einklang mit den Resultaten anderer Autoren (67, 111, 118). Die Werte für TC, LDL-C und Lp(a) waren bei Patienten mit dem $\epsilon 4$ -Allel nur tendenziell gesteigert. Durch Medikation mit Lipidsenkern ($n=49$; 39,8 %) muss man in diesem Zusammenhang von einer Verzerrung der Blutfettspiegel ausgehen. $\epsilon 2$ -Allelträger zeigten die höchsten Triglyzeridkonzentrationen. Diese nicht signifikante Beobachtung könnte durch die Akkumulation pathologischer β -VLDL-Partikel aufgrund der verminderten Affinität der Apo E2-Isoform zum Apo E-Rezeptor erklärt werden und entspricht dem aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnisstand (30, 111).

5.3. Der *p22-phox* (C242T)-Polymorphismus

Der entscheidende $\bullet\text{O}_2^-$ -Generator in den Blutgefäßen ist die NAD(P)H-Oxidase. Ein elementarer Bestandteil dieses Enzymes ist *p22-phox* (44), das in atherosklerotisch verändertem vaskulären Gewebe verstärkt exprimiert wird (3). Da ein intrazellulärer Überschuss an Radikalen als Promotor für die Atherosklerose fungiert (115), könnte ein Genpolymorphismus, der die *p22-phox*-Aktivität beeinflusst, die Wirkung anderer koronarer Risikofaktoren modulieren oder sich als eigenständiger Risikofaktor präsentieren.

In der vorliegenden Arbeit, in der Probanden aus der mitteldeutschen Region untersucht wurden, ergab die Analyse des *p22-phox* (C242T)-Polymorphismus keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen KHK-Patienten und Blutspendern. Auch die Manifestation eines Myokardinfarktes und einer Restenose war nicht mit dieser genetischen Variation assoziiert. Gardemann et al. erzielten in einer männlichen, kaukasischen Population (n=2205) vergleichbare Resultate (39). Saha et al., die getrennt Inder und Chinesen in Singapur untersuchten, stellten gleichfalls keine Differenzen bezüglich der *p22-phox* (C242T)-Genotypenverteilung zwischen Patienten mit koronarer Herzkrankheit und gesunden Kontrollprobanden fest (92). In einer Arbeit von Li et al. konnten innerhalb einer US-amerikanischen Bevölkerungsstichprobe (83 % Kaukasier) die Befunde der vorliegenden Arbeit ebenso bestätigt werden. Die genotypspezifische Gefäßantwort auf Acetylcholin und Nitroprussidnatrium zeigte hier keine auffälligen Unterschiede (64). Dem gegenüber detektierten Inoue et al. bei einer Untersuchung von 201 japanischen, angiographisch gesicherten Koronarpatienten (Stenose $\geq 75\%$) im Vergleich mit 201 symptomfreien Probanden (keine Angina pectoris, keine Claudicatio intermittens) des gleichen Einzugsgebietes das *p22-phox* (C242T)-T-Allel als koronarprotektiven Faktor (54). Ito et al. hingegen beschrieben dieselbe genetische Variante als Risikofaktor für zerebrovaskuläre Ischämien und lieferten somit trotz eines gleichen ethnischen Hintergrundes (ausschließlich Japaner) konträre Resultate zu den eben erwähnten Befunden (56). Ein ähnliches Ergebnis erzielten Cai et al., die das C242T-T-Allel als Risikofaktor für die Ausprägung einer koronaren Herzkrankheit bei jungen (≤ 45 Jahre), männlichen, kaukasischen Australiern (n=44) charakterisierten. In der dort untersuchten Gesamtpopulation (n=689) war diese Beziehung allerdings nicht mehr nachweisbar (11). Des weiteren zeigte sich in einer Kohortenstudie, dass Patienten mit der *p22-phox* (C242T)-T-Variante stärker zur angiographischen Progression der KHK neigen, ohne jedoch häufiger akute Koronarereignisse zu entwickeln. Dieser Effekt war jedoch unter der Therapie mit Statinen nicht mehr nachweisbar (10).

Die Frequenz des Aminosäureaustausches von Histidin nach Tyrosin an Position 72 lag in der vorliegenden Arbeit bei den Koronarpatienten bei 34,3 %, bei den Blutspendern bei 30,4 %. Diese Werte befinden sich im Bereich anderer Studien an kaukasischen Probanden, wo eine T-Allel-Häufigkeit zwischen 34 % (39) und 38 % (92) festgestellt wurde. Bemerkenswert ist jedoch, dass diese Genvariante unter Asiaten mit 9-13 % (54, 92) weitaus seltener anzutreffen ist.

Insgesamt betrachtet sind die bisherigen Ergebnisse zur Untersuchung des *p22-phox* (C242T)-Polymorphismus bei koronarer Herzkrankheit sehr widersprüchlich. Es wird in diesem Zusammenhang von nicht nachweisbaren (wie in der vorliegenden Arbeit), protektiven und auch risikosteigernden Effekten des T-Allels berichtet. Annähernd gleiche Befunde liefern die Angaben über Genotypenhäufigkeiten in verschiedenen ethnischen Gruppen. Angehörige der kaukasischen Rasse tragen die Mutation drei bis vier mal häufiger (ca. 30-40 %) als chinesische oder japanische Individuen (ca. 10 %).

Patienten nach erfolgtem koronarchirurgischen Eingriff wiesen in der vorliegenden Arbeit die mutierte Genvariante signifikant häufiger auf als die Blutspender ($p=0,011$; $OR=2,823$). Zu derartigen Untersuchungen zwischen Therapieform und Genotyp gibt es bis jetzt in der Literatur noch keine verfügbaren Daten. Wird die Indikation zu einer solchen Bypassoperation gestellt, dann liegt eher, wie auch in der vorliegenden Arbeit, eine diffuse KHK mit ungünstiger Morphologie für eine Ballondilatation vor. Zumindest tendenziell ließ sich in der hier präsentierten Studie, unabhängig von der gewählten Behandlungsoption, eine Assoziation zwischen T-Allel und Mehrgefäßbefall demonstrieren. Diese Patienten wären damit wahrscheinlich eher Kandidaten für eine operative Revaskularisierung als für eine PTCA (85). Andererseits häuften sich die T-Allel-Träger in der hier präsentierten Untersuchung auch innerhalb einer Population von Langzeitüberlebenden nach Myokardinfarkt ($p=0,013$; $OR=3,058$). Eventuell laufen bei der Ausbildung einer diffusen KHK pathophysiologische Prozesse ab, die vor letalen Koronarereignissen schützen. Eine Möglichkeit hierfür ist eine funktionell wirksame, parallel zur voranschreitenden multifokalen Gefäßverengung ablaufende Kollateralisierung der stenosierten Herzkranzarterien. Das Myokard distal der vaskulären Engstellen könnte somit bei plötzlichen Okklusionen durch Gewährleistung einer Restperfusion geschützt werden. Damit wäre die Senkung der koronaren Akutsterblichkeit durch weniger letale Myokardinfarkte denkbar (95). Ob die Bildung dieser Kollateralen allerdings wirklich die Langzeitprognose einer KHK bessert, ist zur Zeit Gegenstand kontroverser Diskussionen (78). Des weiteren könnte man auch vermuten, dass Patienten, die homozygote Träger des C242T-C-Allels sind, aufgrund einer genetisch determinierten, erhöhten Mortalität seltener das Stadium

einer Mehrgefäßerkrankung erreichen und unter anderem dadurch seltener kardiochirurgisch versorgt werden.

Etwa 70 % aller Myokardinfarkte betreffen koronarangiographisch unauffällig erscheinende Regionen. Stenosen gelten nur als Indikator einer KHK, nicht aber als Hauptinfarktregionen (13). Die scheinbar nicht betroffenen Gefäßareale zwischen den radiologisch sichtbaren Engstellen enthalten oft auf die Intima beschränkte, konfluierende Lipidanreicherungen, sogenannte Typ IV-Läsionen. Sie entwickeln sich durch oberflächliche Einrisse, Hämatome und Thrombusformationen besonders häufig zu Typ VI-Läsionen, die ihrerseits das typische morphologische Korrelat eines akuten Myokardinfarktes darstellen. Durch regressive Prozesse können sich Typ IV-, V- (fibröse Kappe) und VI-Läsionen in Typ VII- (Kalzifizierung) und VIII-Läsionen (Fibrose) umwandeln, die wiederum Endstufen der Evolution atherosklerotischer Formationen repräsentieren. Diese kalzifizierten oder fibrosierten Veränderungen stellen zwar einen relativ stabilen Zustand mit geringer Akutgefahr für das Leben des Patienten dar, erscheinen jedoch am radiologisch visualisierten koronaren Gefäßbaum sehr auffällig (101). Auch deshalb muss eine für PTCA's ungünstige Gefäßmorphologie, die dann die Therapieentscheidung eher in Richtung operative Revaskularisation lenkt, nicht zwangsläufig mit einer schlechteren Prognose einhergehen. Möglicherweise entwickeln *p22-phox* (C242T)-T-Allel-Träger häufiger die relativ infarktresistenten, aber koronarangiographisch besonders auffälligen Typ VII- und VIII-Läsionen. Fänden sich in dieser Untergruppe überwiegend diffuse und stabile Plaqueformationen, dann wäre das eine plausible Erklärung für die gemeinsame Häufung von Bypasspatienten und Langzeitüberlebenden innerhalb der Gruppe der T-Allel-Träger. Zur Überprüfung der eben aufgestellten Hypothese sind postmortale histologische Untersuchungen erforderlich.

Des weiteren ließ sich in der vorliegenden Arbeit bei den Trägern der CT+TT-Genotypen eine tendenziell größere linksventrikuläre Ejektionsfraktion und geringere enddiastolische Septumdicke demonstrieren. Auch zu dieser Fragestellung liegen noch keine vergleichbaren, publizierten Ergebnisse vor. Risikofaktoren für den plötzlichen Herztod sind eine eingeschränkte linksventrikuläre Ejektionsfraktion (<40 %), ventrikuläre Ektopien, Spätpotentialen im hochverstärkten EKG und eine reduzierte Herzfrequenzvariabilität (37). Unterschiede in der Prognose nach Myokardinfarkt müssen sich somit nicht direkt aus koronarangiographischen Befunden erklären lassen. Oxidativer Stress verschlechtert die Myokardfunktion und somit auch die linksventrikuläre Ejektionsfraktion. Superoxid beeinträchtigt kalziumabhängige Herzmuskelkontraktionen. Peroxynitrit inhibiert Enzyme des oxidativen Kardiomyozytenstoffwechsels (61). Auch Angiotensin-II-medierte, kardiale „*Remodelingprozesse*“ nutzen Sauerstoffradikale als „*second messenger*“ (44) und leisten

potentiell einen Beitrag zur Verschlechterung der myokardialen Pumpfunktion bei oxidativem Stress. Eine geringere Radikalbildung aufgrund der *p22-phox* (C242T)-T-Mutation könnte demnach ein verlängertes Überleben nach Myokardinfarkt auch durch verlangsamte Progression einer Herzinsuffizienz erklären.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine allgemeingültige Assoziation zwischen koronarer Herzkrankheit und *p22-phox* (C242T)-Polymorphismus zur Zeit nicht nachgewiesen werden kann. Als Ursachen für die kontroversen Resultate kommen zahlreiche Möglichkeiten in Frage.

Ein entscheidender Punkt ist die eingeschränkte Vergleichbarkeit der Studien. Alters- und Geschlechtsverteilung, zwei potentielle Selektionsfaktoren, sind in den verschiedenen Arbeiten nicht einheitlich. Außerdem werden unterschiedliche ethnische Gruppen untersucht. Die drei- bis viermal häufigere Präsenz des T-Allels in der kaukasischen Rasse, verglichen mit ostasiatischen Populationen, unterstreicht die Bedeutung dieser Fehlerquelle. Auch zwischen statistischen Verfahren, wie zum Beispiel den Regressionsmodellen, zeigen sich deutliche Unterschiede. Weiterhin bestehen Differenzen bei der Auswahl der Vergleichsgruppe. Es wurden koronarangiographierte Patienten mit geringen (<50 %) oder nicht nachweisbaren Stenosen sowie bezüglich einer KHK symptomfreie Krankenhauspatienten oder gesunde Blutspender als Referenz herangezogen.

In der vorliegenden Studie konnte demonstriert werden, dass koronarchirurgisch therapierte sowie längere Zeit nach einem Infarkt überlebende Patienten signifikant häufiger Träger der hetero- und homozygoten Form der *p22-phox* (C242T)-T-Mutation sind. Trotz allgemein anerkannter Richtlinien (98) ist die Indikationsstellung zur Bypassoperation nicht einheitlich und stark vom behandelnden Kardiologen- und Herzchirurgenteam abhängig. Demzufolge erscheint es sinnvoll, diese Patientengruppe anhand reproduzierbarer Parameter zu definieren, um vergleichbare Ergebnisse in anderen Arbeiten zu ermöglichen. Eine Überprüfung des potentiellen Zusammenhanges zwischen besserer Überlebensprognose nach Myokardinfarkt und CT+TT-Genotyp sollte nur durch prospektive Untersuchungen erfolgen.

Während der *p22-phox* (C242T)-Polymorphismus in der hier vorgestellten Untersuchung insgesamt keine signifikante Assoziation zur KHK zeigte, häufte sich das T-Allel bei den Bypasspatienten und Langzeitüberlebenden. Es ist anzunehmen, dass die Penetranz einiger Genvarianten nur unter bestimmten Umweltbedingungen feststellbar ist. Eventuell hat auch diese genetische Variation nur bei ausgewählten Patienten mit einer speziellen Manifestation der koronaren Herzkrankheit eine pathogene oder protektive Bedeutung. Trotzdem erscheint es

unklar, warum eine Mutation, die mit geringerer NAD(P)H-Oxidaseaktivität einhergeht und somit zu einer geringeren $\bullet\text{O}_2^-$ -Bildung führt (45), mit einer vermehrten KHK-Progression einhergehen soll (10). Normalerweise wäre zu erwarten, dass eine verminderte Aktivität dieses Enzymes die intrazelluläre Menge hochreaktiver Sauerstoffverbindungen verringert. Dies müsste die Atheroskleroseprogression eher hemmen (74).

Oxidativer Stress induziert selbst autoregulatorisch die Synthese radikaleliminierender Enzyme. Zum Beispiel steigert Wasserstoffperoxid als „*second messenger*“ die Expression der Superoxiddismutase und Katalase (44). Auch Angiotensin II erhöht die Konzentration der extrazellulären SOD (34). Die $\bullet\text{O}_2^-$ -sensitive Genexpression dieser Enzyme könnte interindividuell auf unterschiedliche Niveaus eingestellt sein. Theoretisch ist es demnach denkbar, dass eine unter bestimmten Bedingungen verminderte Radikalbildung (*p22-phox* (C242T)-T-Mutation) durch unangemessen reduzierte Induktion radikaleliminierender Enzyme zu einer im Endeffekt höheren Konzentration hochreaktiver Sauerstoffverbindungen führt. Eine insuffiziente Gegenregulation könnte imstande sein, den primär erwarteten Effekt ins Gegenteil umzukehren. Unter Einbeziehung dieser spekulativen Gedanken erscheint das Ausmaß des oxidativen Stresses bei isolierter Betrachtung der Aktivität der NAD(P)H-Oxidase ungewiss. Dies könnte zumindest teilweise die widersprüchlichen Ergebnisse des *p22-phox* (C242T)-Polymorphismus und seiner potentiellen Assoziation zur KHK deuten. Zur Klärung der Problematik sollten weitere Arbeiten unter Berücksichtigung der Superoxiddismutase- und Katalasepolymorphismen durchgeführt werden.

5. 4. Potentielle Interaktionen zwischen den untersuchten Genotypen

Die KHK ist eine multifaktorielle Erkrankung, bei der das Zusammenwirken zahlreicher einzelner Risikofaktoren zur Krankheitsmanifestation führt. Nur etwa 50 % der klinischen Koronarereignisse lassen sich allein durch die bekannten klassischen Risikofaktoren erklären (104). Dies ist ein Hinweis auf die potentielle Bedeutung genetischer Varianten von Proteinen mit zentralen Funktionen im Lipidmetabolismus, Gerinnungssystem oder bei der Blutdruckregulation. Eine ungünstige Konstellation verschiedener polymorpher Formen, sogenannte Risikocluster, könnten demnach einen Einfluss bei der Ausbildung einer koronaren Herzkrankheit gewinnen. Durch Aufsummation oder gegenseitige Potenzierung unterschwelliger Effekte ist die Entstehung neuer pathogener Konstellationen denkbar.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Bildung von Genclustern zur Untersuchung einer möglichen Interaktion zwischen den verschiedenen Genotypen. Dabei wurde die Kombinationen aus Apo E (112, 158)- ϵ 4-, *p22-phox* (C242T)-T-Allelträger und AGT (C659T)-CC-Homozygoten unter Einbeziehung von Alter und Geschlecht als signifikantes Risikocluster für die Entwicklung einer KHK identifiziert ($p=0,018$; OR=2,611). Hierbei ist einschränkend zu bemerken, dass dieses Ergebnis im Wesentlichen die in der hier präsentierten Studie bereits beobachteten Effekte der Apo E-Isoformen darstellt. Trotzdem scheinen das *p22-phox* (C242T)-T-Allel und die AGT (C659T)-CC-Isoform die atherogene Wirkung der Apo E ϵ 4-Variante diskret zu verstärken. Eine Untersuchung mit dieser konkreten Fragestellung ist bis jetzt von keinem anderen Autor beschrieben worden. Besonders unter diesem Gesichtspunkt sind die Ergebnisse der Analyse der genetischen Cluster sehr vorsichtig zu interpretieren, da die Gefahr der Addition zufälliger Effekte zu signifikanten Ergebnissen sehr groß ist.

Entsprechend den aus der hier präsentierten Studie gewonnenen Hinweisen gibt es zahlreiche Anhaltspunkte für eine Interaktion der untersuchten polymorphen Formen im Rahmen der Atherogenese. Durch Wechselwirkung der Proteine Angiotensinogen, Apo E und *p22-phox* ist eine Modulation bei der Genese koronarsklerotischer Prozesse anzunehmen, die wie folgt interpretiert werden könnte:

Angiotensinogen ist das geschwindigkeitsbestimmende Ausgangssubstrat des RAS. Am Ende dieser Enzymkaskade reagiert Ang II mit dem an ein G-Protein gekoppelten AT_1 . Durch „*second messenger*“, wie zum Beispiel IP_3 und Ca^{2+} kommt es zur Aktivierung der vaskulären NAD(P)H-Oxidase, deren elementarer Bestandteil die Untereinheit *p22-phox* ist. Das Produkt dieses Enzymkomplexes sind Superoxidanionen ($\bullet O_2^-$). Sie führen zur Inaktivierung von $\bullet NO$ und zur Oxidation von LDL-Partikeln (44). Die Entgiftung des hochreaktiven $\bullet O_2^-$ durch die Superoxiddismutase erfolgt durch Bildung von H_2O_2 , das seinerseits durch Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF κ B eine redoxsensitive Genexpression einleitet. Dadurch steigt die Syntheserate für Wachstumsfaktoren, Zytokine, E-Selektin, VCAM-1, TF, PAI-1 und zahlreiche andere Proteine (74). Folgen dieser redoxsensitiven Genexpression sind die klassischen Ang II-Wirkungen Hypertrophie glatter Muskelzellen, Zellproliferation, Inflammation, Zelladhäsion und -migration, Apoptose und „*Remodeling*“ (61). Da Inhibition von *p22-phox*-mRNA die Ang II-vermittelte Hypertrophie reduziert (108) und umgekehrt Ang II die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase steigert (83), ist die untrennbare Verknüpfung von *p22-phox* zum RAS als elementares Glied in der Signalkaskade mittlerweile als bewiesenes Faktum zu betrachten. Angiotensinogenvarianten könnten den Prozess der Angiotensin II-Bildung, *p22-phox*-Isoformen die Ang II-Wirkung beeinflussen. Die Untersuchung von Clustern des AGT (C659T)- und *p22-phox* (C242T)-Polymorphismus ergab, dass CC-Homozygotie für beide der

untersuchten Genotypen tendenziell vor der Ausbildung einer KHK schützt ($p=0,068$; $OR=0,630$). Das, wenn auch nicht signifikante, Resultat deutet auf eine Interaktion dieser beiden polymorphen Varianten bei der Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen hin.

Die Apo E4-Isoform führt zu erhöhten LDL-Serumkonzentrationen, die konsekutiv eine vermehrte Deposition dieser Lipoproteine im subendothelialen Raum bedingen. Bei insuffizientem Rücktransport dieser cholesterolreichen Partikel, zum Beispiel durch zu niedrige HDL-Spiegel, kommt es zur Oxidation der LDL. Diese Reaktion gilt als Promotor und initialer Elementarschritt der Atherosklerose (68, 90). Die Hauptquelle der reaktiven Sauerstoffverbindungen für diesen oxidativen Prozess ist die *p22-phox*-enthaltende und durch Ang II-stimulierbare NAD(P)H-Oxidase (44). Daraus wäre zu schlussfolgern, dass die Menge der gebildeten oxidierten LDL-Partikel zumindest indirekt von den Proteinen Angiotensinogen, Apo E und *p22-phox* wesentlich beeinflusst wird. Das unterstreicht die potentielle Bedeutung dieser drei Eiweiße für die Atherogenese und somit auch für die Ausbildung einer KHK. Des Weiteren scheinen LDL direkt die Radikalbildung zu fördern (1), den AT_1 hochzuregulieren (120) und auf diese Weise die eigene Oxidation zu beschleunigen. In letzter Zeit häuften sich auch Hinweise über eine atherogene Apo E4-Wirkung unabhängig vom Cholesterolserspiegel (40, 67, 113). Ursachen hierfür könnten einerseits die bereits beschriebene Modulation von Wachstumsfaktoren durch besonders ausgeprägte Interaktion dieser Proteinvariante mit den sauren Glucosaminoglykanen der Matrix oder andererseits ein immunstimulativer Effekt mit vermehrter Invasion von Monozyten und T-Lymphozyten in das subendotheliale Gefäßbett sein (70).

Abbildung 28 fasst die komplexen pathophysiologischen Wechselwirkungen bei der Atherogenese unter Einbindung der untersuchten Kandidatengene AGT, Apo E und *p22-phox* schematisch zusammen.

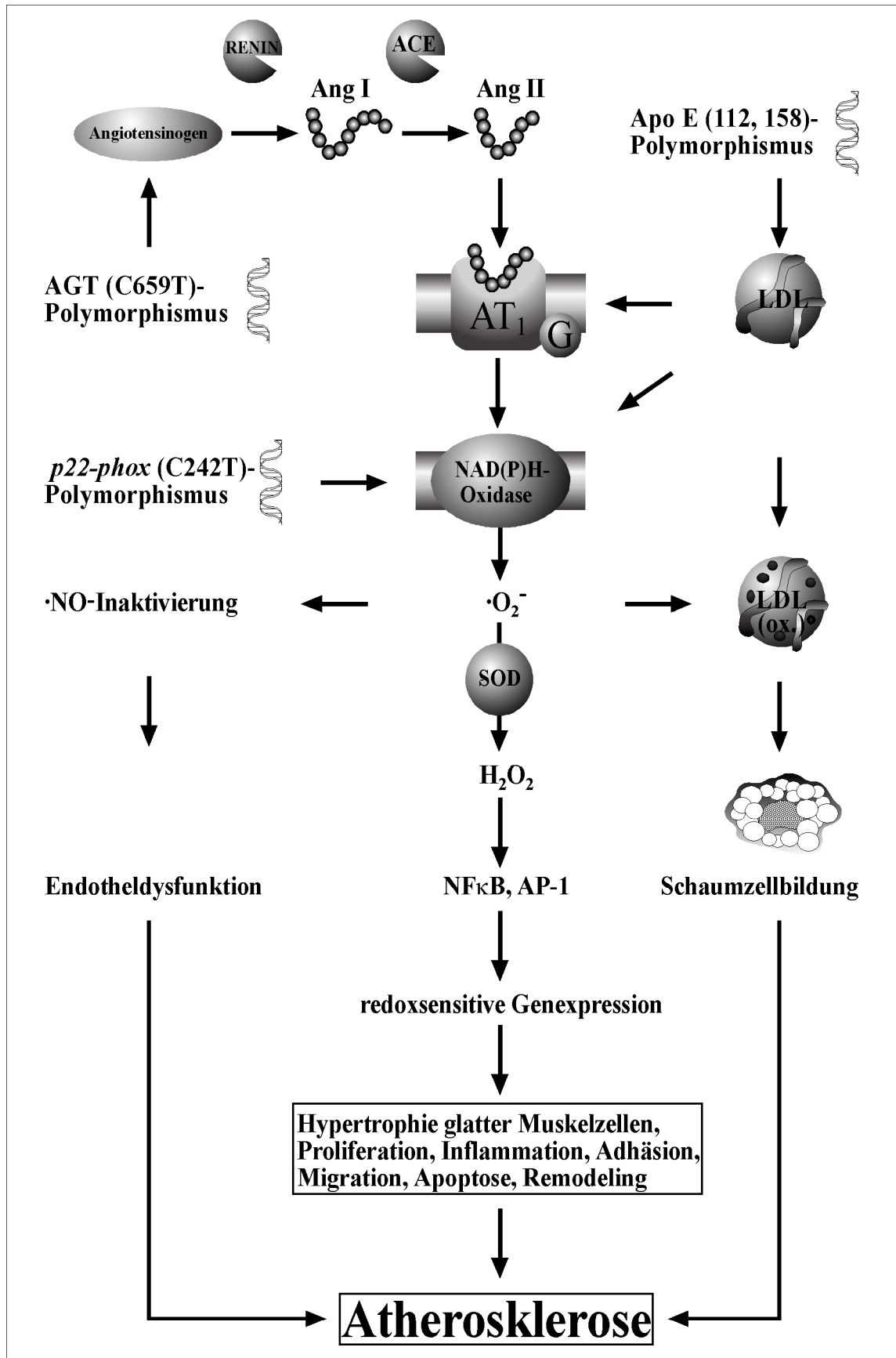


Abb. 28: Potentielle Interaktionen von Angiotensinogen (C659T)-, Apo E (112, 158)- und p22-phox (C242T)-Polymorphismus bei der Pathogenese der Atherosklerose modifiziert nach Griendling et al. (42, 43, 44), Kojda et al. (61), Lusis (68), Mügge (74), Ruef et al. (90), Walden et al. (118) und Yokoyama et al. (123)

5. 5. Fehlerdiskussion

Abweichende Ergebnisse aus eigenen Daten und den Veröffentlichungen in der Literatur zwingen zu einer intensiven Suche nach den Ursachen für diese Differenzen. Assoziationsstudien, wie die vorliegende Arbeit, müssen dabei einer besonders kritischen Analyse unterzogen werden, da es durch soziale, geographische und ethnische Differenzen sowie unberücksichtigte Einflussfaktoren innerhalb der Studienpopulationen zu Verzerrungen kommen kann (118). Außerdem ist eine eindeutige und einfache Unterscheidung zufälliger und kausaler Assoziationen oft nicht ohne weiteres möglich. Für die Anerkennung einer polymorphen Genvariante als Risikofaktor einer Erkrankung sind daher strenge Forderungen notwendig.

Jeder Mensch ist Träger einer Vielzahl polymorpher Erbanlagen, die nur zum Teil eine direkte Auswirkung auf den Phänotyp haben. Solche genetischen Varianten können jedoch auch mit einer erhöhten Empfänglichkeit oder auch Resistenz gegenüber Erkrankungen einhergehen. Um eine kausale Verknüpfung zwischen Polymorphismus und Krankheit zu beweisen, müssen deshalb verschiedene Kriterien erfüllt sein.

Erstens ist eine plausible Beziehung zwischen kodiertem Protein und Pathogenese der Erkrankung notwendig. Dies trifft für Angiotensinogen (42), Apo E (111) und *p22-phox* (44) zu. Zweitens sollte das potentiell pathogene Allel durch qualitative oder quantitative Veränderung des kodierten Proteins eine funktionellen Auswirkung zur Konsequenz haben. Für Angiotensinogen (C659T) gibt es diesbezüglich bis jetzt keine sicheren Hinweise (57). Die *p22-phox* (C242T)-T-Variante könnte die Ursache für eine reduzierte Radikalbildung sein (45). Bei Apo E (112, 158)- ϵ 4-Allelträgern sind eine effektivere Cholesterolaufnahme und die durch „*LDL-Rezeptordownregulation*“ erhöhten LDL-C-Serumspiegel mittlerweile bewiesene Fakten (111). Drittens wird eine ausreichende Studiengröße gefordert. In kleinen Studien zeigen sich immer wieder eindrucksvolle Ergebnisse, die nach einer Analyse von A. Kastrati et al. möglicherweise nur dadurch bedingt sind, dass diese „guten“ Resultate besser publizierbar sind (58). So konnten Samani et al. 1996 in einer Metaanalyse anhand der ACE I/D-Polymorphismus nachweisen, dass mit zunehmender Zahl der Probanden die Assoziation des DD-Genotyps zur Manifestation eines MI abnimmt (93). Allerdings ist zu berücksichtigen, dass die bei großen Studienpopulationen stärkere Unschärfe bei der Patientenselektion ihrerseits wieder zur Abschwächung der beobachteten Effekte führen kann. Viertens spielt die ethnische Zugehörigkeit und Homogenität der untersuchten Gruppe eine entscheidende Rolle bei der Begutachtung der Ergebnisse. Die starken Schwankungen der Genotypenfrequenzen zwischen den verschiedenen menschlichen Rassen für alle der in der vorliegenden Untersuchung

analysierten Genpolymorphismen unterstreichen diese Notwendigkeit. Mit 123 Koronarpatienten und 260 gesunden Blutspendern als Vergleichsgruppe ist die hier vorliegende Arbeit zwar relativ klein, zeichnet sich aber dafür durch eine klare klinische Charakterisierung und geographische Begrenzung aus.

In der hier präsentierten Arbeit erfolgte die Patientenrekrutierung streng aus der Region Halle-Merseburg-Bitterfeld. Einschlusskriterien waren eine schwere KHK (MI, PTCA oder ACVB/IMAB) und ein Manifestationsalter unter 55 Jahren. In anderen Studien wurden jedoch bei der Probandenselektion oft andere Schwerpunkte gesetzt. Zum Beispiel definierten viele Autoren die KHK-Patienten nur anhand eines koronarangiographisch ermittelten Stenosegrades von über 50 % (38, 39, 100). Durch Unterschiede bei Alter, Geschlechtsverteilung, Begleiterkrankungen, ethnischer Zugehörigkeit und Lebensweise waren die Studienpopulationen insgesamt nur eingeschränkt miteinander vergleichbar. Einige Arbeiten schlossen zum Beispiel ausschließlich männliche Probanden in ihre Beobachtung ein (38, 39, 106). Die deutlich ausgeprägtere signifikante Assoziation des Apo E (112, 158)-ε4-Allels zur KHK bei isolierter Betrachtung des weiblichen Geschlechts in der hier dargestellten Untersuchung ($p=0,017$; $OR=6,000$) unterstreicht die Bedeutung derartiger Selektionsunterschiede. Eine weitere Schwachstelle bei der Auswahl der Patienten in fast allen Publikationen, wie auch in der vorliegenden Arbeit, ist die fehlende Erfassung der primär letalen Myokardinfarkte, da die überwiegend retrospektiven Analysen fast ausschließlich nur die Überlebenden nach MI rekrutierten. Unter diesem Gesichtspunkt könnte spekuliert werden, dass diese Patienten über protektive Eigenschaften verfügen müssten.

Die Kontrollgruppe der hier präsentierten Studie setzte sich aus Blutspendern gleicher Alters- und Geschlechtszusammensetzung der selben geographischen Region zusammen und wurde durch das Fehlen jeglicher Hinweise auf kardiovaskuläre Erkrankungen definiert. Zwei Punkte schränken die Eignung der Blutspender als Referenzkollektiv ein. Erstens handelt es sich hierbei um freiwillige Personen, die bereit sind etwas für andere zu spenden. Das heißt, dass schon eine gewisse Selektion mit potentiellen Verzerrungen stattgefunden haben könnte. Zweitens ist der definitive Koronarstatus unbekannt. Das führt möglicherweise durch potentielle KHK-Kandidaten unter den Blutspendern zu einer Verminderung des Kontrastes zwischen Fällen und Kontrollen. Allerdings konnte dieses Problem durch eine mindestens dreijährige Nachbeobachtungszeit, in der keine kardiovaskulären Ereignisse auftraten, vermindert werden. Andere Arbeiten verwendeten Patienten mit definiertem Koronarstatus als Vergleichsgruppe (30, 38, 39). Jedoch auch hier sind durch verschiedene Begleiterkrankungen und Unterschiede in der Alters- und Geschlechtszusammensetzung (38, 39) Schwierigkeiten bei der Vergleichbarkeit beider Gruppen offensichtlich. Auch die Zuordnung von Patienten mit

Koronarstenosen <50 % in die Kontrollgruppe, wie zum Beispiel in den Veröffentlichungen von Gardemann et al. (38, 39), führt zu einer Reduktion der Aussagekraft der Studien, da diese Probanden sicherlich nicht eine KHK-freie Population repräsentieren. Die ideale Vergleichsgruppe wäre sicherlich eine randomisierte Zufallsauswahl aus der gesunden Bevölkerung mit einem den Koronarpatienten identischen Risikofaktorprofil sowie einer völlig unauffälligen Koronarangiographie. Doch schon allein aus ethischen Gesichtspunkten erscheint dies als undurchführbar. Aufgrund der eben erörterten Aspekte stellen die in der hier präsentierten Arbeit als Referenz verwendeten Blutspender eine inhaltlich guten und durch minimale Invasivität gekennzeichneten Kompromiss dar.

5. 6. Klinische Anwendung und Perspektiven

Die KHK ist eine heterogene Erkrankung. Bei allen Manifestationsformen kommt es zu pathologischen Veränderungen oder funktionellen Störungen im Bereich der Herzkranzgefäße. Trotzdem stellen die verschiedenen klinischen Bilder die Kardiologie vor völlig unterschiedliche Probleme. Beispielsweise erfordert ein akutes Koronarsyndrom eine völlig andere Behandlung als eine stabile Angina pectoris. Um Inzidenz und Letalität der koronaren Herzkrankheit zu senken, sowie Prognose und Lebensqualität dieser Patienten zu verbessern, ist eine Optimierung von Prophylaxe und Therapie erforderlich (68). Das setzt eine stärkere Berücksichtigung der ätiologischen Vielfalt dieses Krankheitsbildes voraus. Es gilt, die Patienten durch klinische, paraklinische, technische und eventuell auch genetische Untersuchungen präziser zu charakterisieren. Nur so ist es möglich, eine effizientere und individuellere Differentialtherapie durchzuführen.

In zahlreichen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass ASS, β -Blocker, ACE-Hemmer, HMG-CoA-Reduktaseinhibitoren (71) und Vitamin E (74) die Mortalität nach einem Myokardinfarkt senken. Dies führte zu einer breiten Empfehlung dieser Medikamente. Bemerkenswert hierbei ist, dass bestimmte Untergruppen offensichtlich von dem jeweiligen Pharmakon besonders profitieren, was zu signifikanten Gesamtergebnissen in den Therapiestudien führt. Andere Patienten hingegen haben möglicherweise jedoch keinen Nutzen von dieser Behandlungsform. Um für jeden Erkrankten die beste Therapie auswählen zu können, ist es notwendig zu analysieren, wodurch die „Responder“ und „Non-Responder“ einer bestimmten Behandlungsoption charakterisiert sind. Möglicherweise spielen hierbei genetische Untersuchungen in Zukunft eine wesentliche Rolle.

Die therapeutischen Möglichkeiten zur Beeinflussung des Verlaufes der koronaren Herzkrankheit erstrecken sich von rein konservativen, über interventionelle bis hin zu operativen Maßnahmen. Durch immer ausgefeiltere technische Verfahren ist die Indikationsstellung für angioplastische und koronarchirurgische Behandlungen in den letzten Jahren ständig erweitert worden. Die intrakoronare Gefäßrekonstruktion langstreckiger, diffuser und verzweigter Stenosen durch die Verwendung multipler „Stents“ (65, 84) auf der einen und minimalinvasive Bypassoperationen (69) auf der anderen Seite sind Beispiele für diese Entwicklung. Die sich früher fast ausschließlich ergänzenden werden dadurch auch immer mehr zu konkurrierenden Therapieverfahren (85). Zur Verbesserung der Langzeitergebnisse ist es erforderlich nach Kriterien zu suchen, die den Einsatz der einen oder anderen Methode favorisieren. Möglicherweise könnte die Bestimmung ausgewählter Genpolymorphismen diese interdisziplinäre Entscheidungsfindung bei klinischen Grenzfällen erleichtern.

In der vorliegenden Arbeit war die Apo E4-Isoform mit der Entwicklung einer Restenose nach PTCA assoziiert. Demzufolge könnte spekuliert werden, dass bei diesen Patienten eher eine operative Revaskularisation anzustreben wäre, da hier möglicherweise die Angioplastie mit einer schlechteren Prognose einhergeht. Das *p22-phox* (C242T)-T-Allel häufte sich signifikant in der Gruppe der Patienten mit erfolgreicher Bypassoperation. Vor dem Eingriff wurden diese Patienten vor allem aufgrund der bei der Herzkatheteruntersuchung gewonnenen Befunde für die koronarchirurgische Therapie ausgewählt. Eventuell ist das *p22-phox* (C242T)-T-Allel häufig mit der Konstellation des typischen „Bypasspatienten“ verknüpft (z. B. diffusere KHK). Wenn dies so sein sollte, dann wäre es denkbar, dass *p22-phox* (C242T)-T-Allelträger eher von dem operativen Eingriff, als von einer PTCA profitieren könnten. Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Hinweise bei Apo E (112, 158)-ε4- und *p22-phox* (C242T)-T-Allelträgern eher für eine Bypassoperation sprechen.

Auch das Ansprechen auf medikamentöse Therapieformen könnte durch polymorphe Varianten von Kandidatengen beeinflusst werden. So wird zum Beispiel die durch Apo E4 verursachte, erhöhte kardiovaskuläre Mortalität durch die Gabe von HMG-CoA-Reduktaseinhibitoren gesenkt (40). Da dieser Effekt unabhängig von den Serumlipiden beobachtbar war, ist zu vermuten, dass diese pharmakologische Substanzklasse möglicherweise auch andere Wirkungen des Apo E, wie zum Beispiel Wachstumsfaktormodulation und Inflammationspromotion (70), beeinflussen könnte.

Das Protein *p22-phox* ist ein zentrales Element bei der Produktion toxischer Sauerstoffradikale (44). Das lässt vermuten, dass sogenannte Radikalfänger die Wirkung von *p22-phox* modifizieren könnten. Diese auch als Antioxidanzien bekannte Substanzgruppe gewinnt bei

Therapie und Prophylaxe atherosklerotischer Erkrankungen eine immer stärkere Beachtung (68, 74). Besonders die antioxidativ wirkenden Vitamine A, C und E sind zur Zeit Gegenstand intensiver Forschung. Das lipophile α -Tocopherol (Vitamin E) reichert sich in Membranen und Lipoproteinen an und schützt dort vor der Lipidperoxidation (74, 116). Ascorbinsäure (Vitamin C) ist eine hydrophile chemische Verbindung, die dazu befähigt ist, oxidiertes Vitamin E wieder in die biologisch aktive Form zurückzuverwandeln. In verschiedenen Untersuchungen waren beide Substanzen in der Lage, die durch eine Hyperlipidämie beeinträchtigte Vasodilatation zu verbessern (13, 61), vermutlich aufgrund einer verminderten radikalischen \bullet NO-Eliminierung. Fall-Kontroll-Studien zeigten eine inverse Relation zwischen Vitaminspiegel und KHK. Außerdem konnte durch Applikation von α -Tocopherol in prospektiven Analysen eine Senkung der KHK-Mortalität demonstriert werden (74). *p22-phox* (C242T)-CC-Homozygote produzieren mehr Superoxidradikale als T-Allelträger (45). Es ist zu vermuten, dass sie dadurch stärker von einer Therapie mit solchen Antioxidanzien profitieren.

Angiotensinogen ist Ausgangssubstrat und geschwindigkeitsbestimmender Faktor des RAS (42). Träger genetischer Varianten, die mit einer erhöhten Konzentration dieses Proteins einhergehen, würden möglicherweise besonders von der ACE- oder AT₁-Hemmung profitieren. Allerdings konnte bis jetzt kein Einfluss des AGT (C659T)-Polymorphismus auf den Angiotensinogenserumspiegel nachgewiesen werden (57).

Eine Überprüfung der hier aufgestellten Hypothesen über Zusammenhänge zwischen polymorphen Genvarianten und modifizierten Therapieansätzen bei koronarer Herzkrankheit ist nur durch prospektive, klinische Studien möglich. Ob die in der vorliegenden Studie untersuchten Varianten dabei eine wesentliche Rolle spielen werden, bleibt abzuwarten. In jedem Fall sollte aber berücksichtigt werden, dass genetische Untersuchungen auch ethische Probleme aufwerfen können. Zum Beispiel haben Apo E (112, 158)- ϵ 4-Allelträger ein vierfach erhöhtes Risiko, an Morbus Alzheimer zu erkranken (104). Ob der diagnostische Gewinn einer exakteren koronaren Risikocharakterisierung für den Patienten mehr Vorteile bietet als die Kenntnis, möglicherweise einmal an dieser heute noch unheilbaren Erkrankung zu leiden, ist ein Thema, das zum Nachdenken veranlassen sollte. Auch die Möglichkeit der Durchführung von Gentests zur Einschätzung des individuellen Krankenversicherungsrisikos könnte sich in Zukunft zu einem ethischen Problem entwickeln. Zusammenfassend betrachtet ist jedoch zu erwarten, dass die Erkenntnisse genetischer Untersuchungen zur Erweiterung der Klassifikation und Verbesserung der Therapie der KHK, aber auch zahlreicher anderer Erkrankungen, führen werden. Ungeachtet dessen wird eine effiziente, routinemäßige Durchführung von Genscreeninguntersuchungen nach kardiovaskulären Risikofaktoren in der nächsten Zeit als eher unwahrscheinlich angesehen (68).

6. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Die Resultate der vorliegenden Arbeit liefern Hinweise über die Bedeutung genetischer Faktoren bei der Ausbildung einer koronaren Herzkrankheit und Restenosierung nach PTCA anhand von Probanden aus dem mitteldeutschen Raum.

Für den AGT (C659T)-Polymorphismus konnte keine Assoziation zur Ausbildung einer KHK, zur Manifestation eines MI oder zur Entwicklung einer Restenose nach PTCA beobachtet werden. Dieser Befund ist konsistent mit den Ergebnissen anderer Autoren. Eine in mehreren Arbeiten beschriebene Beziehung des T-Allels zur essentiellen arteriellen Hypertonie lässt sich in der hier präsentierten Studie tendenziell belegen. Des Weiteren hatten Träger dieser polymorphen Variante signifikant erhöhte Plasmaspiegel für Protein C und den Gerinnungsfaktor VII. Dieses erstmalig dokumentierte Ergebnis könnte durch Wechselwirkungen des Angiotensinogens mit Serinproteasen oder Vitamin K bedingt sein und sollte durch weitere Studien verifiziert werden. Die Beziehung des AGT (C659T)-Polymorphismus zu wichtigen Faktoren des Gerinnungssystems weist auf eine funktionelle Relevanz im komplexen Geschehen der multifaktoriell verursachten koronaren Atherosklerose hin.

Träger der Apo E4-Isoform waren im Rahmen dieser Studie im mitteldeutschen Raum signifikant häufiger in der KHK-Gruppe zu finden, insbesondere bei isolierter Betrachtung des weiblichen Geschlechts. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit den internationalen Publikationen und es ist davon auszugehen, dass Apo E4 (und damit das dafür kodierende $\epsilon 4$ -Allel) in den Industrieländern einen koronaren Risikofaktor darstellt. Außerdem konnte bei diesen Patienten prospektiv eine verstärkte Entwicklung von Restenosierungen nach PTCA demonstriert werden. Da die Fallzahl hierbei relativ klein war, muss das Resultat durch weitere Studienanlagen mit einer größeren Probandenzahl validiert werden. Das $\epsilon 2$ -Allel häufte sich tendenziell unter den KHK-Patienten. Da zahlreiche Arbeiten diese Variante eher als koronarprotektiv charakterisieren, besteht diesbezüglich noch weiterer Forschungsbedarf.

Auch für den *p22-phox* (C242T)-Polymorphismus konnte keine Assoziation zur Ausbildung einer KHK, zur Manifestation eines MI oder zur Entwicklung einer Restenose nach PTCA demonstriert werden. Da die Literaturangaben diesbezüglich sehr widersprüchlich sind, ist zu diesem Problem noch keine definitive Aussage möglich. *p22-phox* (C242T)-T-Allelträger waren signifikant häufiger unter den koronarchirurgisch versorgten KHK-Patienten zu finden. Möglicherweise könnte die gleichzeitige, wenn auch nur tendenzielle Häufung von Mehrgefäßerkrankungen in dieser Untergruppe dieses Phänomen teilweise erklären. Patienten

mit dem eben beschriebenen T-Allel zeigten auch einen signifikant höheren Anteil unter den Langzeitüberlebenden nach MI. Die beobachteten Befunde bei Trägern dieser genetischen Variante könnten sich durch stärkere Kollateralbildung, stabilere Plaueformationen oder langsamere Progression einer Herzinsuffizienz erklären lassen. Die Häufung der T-Allelträger unter den Bypasspatienten und Langzeitüberlebenden nach MI wurde nur an relativ kleinen Patientenzahlen demonstriert. Außerdem gab es bis jetzt zu diesem konkreten Problem keine weiteren Untersuchungen. Assoziationsstudien, wie die vorliegende Arbeit, sind gut geeignet, mögliche Beziehungen aufzudecken. Die endgültige Klärung des vermuteten Zusammenhanges erfordert aber in der Regel weitere Untersuchungen, wie hier zur Beantwortung einer prognostischen Fragestellungen eine prospektive „*Follow-up*“-Studie.

Es gibt eindeutige pathophysiologische Hinweise, dass die Produkte der analysierten Genvarianten sich bei der Atherogenese gegenseitig beeinflussen. Unter Berücksichtigung verschiedener Kombinationen der polymorphen Formen konnten Cluster mit einerseits signifikant erhöhtem Risiko und andererseits einem tendenziell protektiven Effekt auf die Entwicklung einer KHK detektiert werden. Eine Darstellung möglicher Wechselwirkungen des AGT (C659T)-, Apo E (112, 158)- und *p22-phox* (C242T)-Polymorphismus in bezug auf die Ausbildung der koronaren Herzkrankheit wurde in dieser Dissertation erstmalig durchgeführt. Allerdings ist hierbei einschränkend zu bemerken, dass durch die große Zahl an Kombinationsmöglichkeiten die Gefahr der Entstehung zufälliger Signifikanzen relativ groß ist. Insbesondere diese Ergebnisse müssen daher durch weitere Untersuchungen überprüft werden.

Die Ergebnisse humangenetischer Analysen können wichtige Anhaltspunkte für eine effizientere Differentialtherapie liefern. In der vorliegenden Arbeit wurde demonstriert, dass Apo E (112, 158)- ϵ 4- und *p22-phox* (C242T)-T-Allelträger möglicherweise eher von einer Bypass-Operation, als von einer PTCA profitieren könnten. Auch genotypenspezifische Unterschiede im Ansprechen auf eine medikamentöse Therapie erscheinen denkbar. Diese wichtigen klinischen Fragestellungen gilt es jetzt, zum Beispiel anhand von Kohortenstudien, zu beantworten.

7. Literaturverzeichnis

1. Alexander RW: Theodore Cooper Memorial Lecture. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective. *Hypertension*. 1995 Feb;25(2):155-61.
2. Assmann G, Funke H, Jabs HU: Analytical procedures for the detection and characterization of apolipoprotein E mutants. *Am Heart J*. 1987 Feb;113(2 Pt 2):598-603.
3. Azumi H, Inoue N, Takeshita S, Rikitake Y, Kawashima S, Hayashi Y, Itoh H, Yokoyama M: Expression of NADH/NADPH oxidase p22phox in human coronary arteries. *Circulation*. 1999 Oct 5;100(14):1494-8.
4. Babior BM: NADPH oxidase: an update. *Blood*. 1999 Mar 1;93(5):1464-76.
5. Bardin CW, Gunsalus GL, Musto NA, Cheng CY, Reventos J, Smith C, Underhill DA, Hammond G: Corticosteroid binding globulin, testosterone-estradiol binding globulin, and androgen binding protein belong to protein families distinct from steroid receptors. *J Steroid Biochem*. 1988;30(1-6):131-9.
6. Bayraktutan U, Blayney L, Shah AM: Molecular characterization and localization of the NAD(P)H oxidase components gp91-phox and p22-phox in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 Aug;20(8):1903-11.
7. Becker BF, Heindl B, Kupatt C, Zahler S: Endothelial function and hemostasis. *Z Kardiol*. 2000 Mar;89(3):160-7.
8. Benes P, Muzik J, Benedik J, Frelich M, Elbl L, Vasku A, Znojil V, Vacha J: Single effects of apolipoprotein B, (a), and E polymorphisms and interaction between plasminogen activator inhibitor-1 and apolipoprotein(a) genotypes and the risk of coronary artery disease in Czech male caucasians. *Mol Genet Metab*. 2000 Feb;69(2):137-43.
9. Braeckman L, De Bacquer D, Rosseneu M, De Backer G : The effect of age and lifestyle factors on plasma levels of apolipoprotein E. *J Cardiovasc Risk*. 1998 Jun;5(3):155-9.
10. Cahilly C, Ballantyne CM, Lim DS, Gotto A, Marian AJ: A variant of p22(phox), involved in generation of reactive oxygen species in the vessel wall, is associated with progression of coronary atherosclerosis. *Circ Res*. 2000 Mar 3;86(4):391-5.
11. Cai H, Duarte N, Wilcken DE, Wang XL: NADH/NADPH oxidase p22 phox C242T polymorphism and coronary artery disease in the Australian population. *Eur J Clin Invest*. 1999 Sep;29(9):744-8.
12. Campbell DJ, Lawrence AC, Towrie A, Kladis A, Valentijn AJ: Differential regulation of angiotensin peptide levels in plasma and kidney of the rat. *Hypertension*. 1991 Dec;18(6):763-73.
13. Castelli WP: The new pathophysiology of coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 1998 Nov 26;82(10B):60T-65T.
14. Caulfield M, Lavender P, Farrall M, Munroe P, Lawson M, Turner P, Clark AJ: Linkage of the angiotensinogen gene to essential hypertension. *N Engl J Med*. 1994 Jun 9;330(23):1629-33.

15. Chistiakov DA, Turakulov RI, Moiseev VS, Nosikov VV: Polymorphism of angiotensinogen T174M gene and cardiovascular diseases in the Moscow population. *Genetika*. 1999 Aug;35(8):1160-4.
16. Cong ND, Hamaguchi K, Saikawa T, Hara M, Sakata T: A polymorphism of angiotensinogen gene codon 174 and coronary artery disease in Japanese subjects. *Am J Med Sci*. 1998 Nov;316(5):339-44.
17. Corbo RM, Vilaro T, Ruggeri M, Gemma AT, Scacchi R: Apolipoprotein E genotype and plasma levels in coronary artery disease. A case-control study in the Italian population. *Clin Biochem*. 1999 Apr;32(3):217-22.
18. Corbo RM, Scacchi R: Apolipoprotein E (APOE) allele distribution in the world. Is APOE*4 a 'thrifty' allele? *Ann Hum Genet*. 1999 Jul;63 (Pt 4):301-10.
19. Cosentino F, Luscher TF: Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1998;32 Suppl 3:S54-61.
20. Cremer P, Nagel D, Mann H, Labrot B, Muller-Berninger R, Elster H, Seidel D: Ten-year follow-up results from the Goettingen Risk, Incidence and Prevalence Study (GRIPS). I. Risk factors for myocardial infarction in a cohort of 5790 men. *Atherosclerosis*. 1997 Mar 21;129(2):221-30.
21. D'Agostino RB, Russell MW, Huse DM, Ellison RC, Silbershatz H, Wilson PW, Hartz SC: Primary and subsequent coronary risk appraisal: new results from the Framingham study. *Am Heart J*. 2000 Feb;139(2 Pt 1):272-81.
22. Davignon J, Gregg RE, Sing CF: Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis*. 1988 Jan-Feb;8(1):1-21.
23. De Andrade M, Thandi I, Brown S, Gotto A, Patsch W, Boerwinkle E: Relationship of the apolipoprotein E polymorphism with carotid artery atherosclerosis. *Am J Hum Genet*. 1995 Jun;56(6):1379-90.
24. De Backer G, De Henauw S, Sans S, Nicaud V, Masana L, Visvikis S, Gerdes C, Wilhelmsen L: A comparison of lifestyle, genetic, bioclinical and biochemical variables of offspring with and without family histories of premature coronary heart disease: the experience of the European Atherosclerosis Research Studies. *J Cardiovasc Risk*. 1999 Jun;6(3):183-8.
25. De Boer M, de Klein A, Hossle JP, Seger R, Corbeel L, Weening RS, Roos D: Cytochrome b558-negative, autosomal recessive chronic granulomatous disease: two new mutations in the cytochrome b558 light chain of the NADPH oxidase (p22-phox). *Am J Hum Genet*. 1992 Nov;51(5):1127-35.
26. De Keulenaer GW, Alexander RW, Ushio-Fukai M, Ishizaka N, Griendling KK: Tumour necrosis factor alpha activates a p22phox-based NADH oxidase in vascular smooth muscle. *Biochem J*. 1998 Feb 1;329 (Pt 3):653-7.
27. De Knijff P, van den Maagdenberg AM, Frants RR, Havekes LM: Genetic heterogeneity of apolipoprotein E and its influence on plasma lipid and lipoprotein levels. *Hum Mutat*. 1994;4(3):178-94.

28. Dinauer MC, Pierce EA, Bruns GA, Curnutte JT, Orkin SH: Human neutrophil cytochrome b light chain (p22-phox). Gene structure, chromosomal location, and mutations in cytochrome-negative autosomal recessive chronic granulomatous disease. *J Clin Invest.* 1990 Nov;86(5):1729-37.
29. Dinauer MC, Pierce EA, Erickson RW, Muhlebach TJ, Messner H, Orkin SH, Seger RA, Curnutte JT: Point mutation in the cytoplasmic domain of the neutrophil p22-phox cytochrome b subunit is associated with a nonfunctional NADPH oxidase and chronic granulomatous disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Dec 15;88(24):11231-5.
30. Dzimir N, Meyer BF, Hussain SS, Basco C, Afrane B, Halees Z: Relevance of apolipoprotein E polymorphism for coronary artery disease in the Saudi population. *Arch Pathol Lab Med.* 1999 Dec;123(12):1241-5.
31. Eichner JE, Kuller LH, Orchard TJ, Grandits GA, McCallum LM, Ferrell RE, Neaton JD: Relation of apolipoprotein E phenotype to myocardial infarction and mortality from coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 1993 Jan 15;71(2):160-5.
32. Fong IW: Emerging relations between infectious diseases and coronary artery disease and atherosclerosis. *CMAJ.* 2000 Jul 11;163(1):49-56.
33. Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Griendling KK, Harrison DG: Modulation of extracellular superoxide dismutase expression by angiotensin II and hypertension. *Circ Res.* 1999 Jul 9;85(1):23-8.
34. Fukui T, Ishizaka N, Rajagopalan S, Laursen JB, Capers Q, Taylor WR, Harrison DG, de Leon H, Wilcox JN, Griendling KK: p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circ Res.* 1997 Jan;80(1):45-51.
35. Fulton JE, Dai S, Grunbaum JA, Boerwinkle E, Labarthe DR: Apolipoprotein E affects serial changes in total and low-density lipoprotein cholesterol in adolescent girls: Project HeartBeat! *Metabolism.* 1999 Mar;48(3):285-90.
36. Gaillard I, Clauser E, Corvol P: Structure of human angiotensinogen gene. *DNA.* 1989 Mar;8(2):87-99.
37. Garcia Garcia J, Serrano Sanchez JA, del Castillo Arrojo S, Cantalapiedra Alsedo JL, Villacastin J, Almendral J, Arenal A, Gonzalez S, Delcan Dominguez JL: Predictors of sudden death in coronary artery disease. *Rev Esp Cardiol.* 2000 Mar;53(3):440-62.
38. Gardemann A, Stricker J, Humme J, Nguyen QD, Katz N, Philipp M, Tillmanns H, Hehrlein FW, Haberbosch W: Angiotensinogen T174M and M235T gene polymorphisms are associated with the extent of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 1999 Aug;145(2):309-14.
39. Gardemann A, Mages P, Katz N, Tillmanns H, Haberbosch W: The p22 phox A640G gene polymorphism but not the C242T gene variation is associated with coronary heart disease in younger individuals. *Atherosclerosis.* 1999 Aug;145(2):315-23.
40. Gerdes LU, Gerdes C, Kervinen K, Savolainen M, Klausen IC, Hansen PS, Kesaniemi YA, Faergeman O: The apolipoprotein epsilon4 allele determines prognosis and the effect on prognosis of simvastatin in survivors of myocardial infarction: a substudy of the Scandinavian simvastatin survival study. *Circulation.* 2000 Mar 28;101(12):1366-71.

41. Gorlach A, Brandes RP, Bassus S, Kronemann N, Kirchmaier CM, Busse R, Schini-Kerth VB: Oxidative stress and expression of p22phox are involved in the up-regulation of tissue factor in vascular smooth muscle cells in response to activated platelets. *FASEB J*. 2000 Aug;14(11):1518-28.
42. Griendling KK, Murphy TJ, Alexander RW: Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Circulation*. 1993 Jun;87(6):1816-28.
43. Griendling KK, Ushio-Fukai M: Redox control of vascular smooth muscle proliferation. *J Lab Clin Med*. 1998 Jul;132(1):9-15.
44. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M: NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. 2000 Mar 17;86(5):494-501.
45. Guzik TJ, West NE, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM: Functional effect of the C242T polymorphism in the NAD(P)H oxidase p22phox gene on vascular superoxide production in atherosclerosis. *Circulation*. 2000 Oct 10;102(15):1744-7.
46. Handschug, K: Dissertation „Molekularbiologische Untersuchungen zur genetischen Risikokonstellation atherosklerotischer Gefäßerkrankungen bei Patienten mit Koronarsklerose“, Univ. Halle, 1998
47. Hanon O, Girerd X, Luong V, Jeunemaitre X, Laurent S, Safar ME: Association between the apolipoprotein E polymorphism and arterial wall thickness in asymptomatic adults. *J Hypertens*. 2000 Apr;18(4):431-6.
48. Hayashi T, Suzuki K: Gene organization of human protein C inhibitor, a member of SERPIN family proteins encoded in five exons. *Int J Hematol*. 1993 Oct;58(3):213-24.
49. Hegele RA, Brunt JH, Connelly PW: A polymorphism of the angiotensinogen gene associated with variation in blood pressure in a genetic isolate. *Circulation*. 1994 Nov;90(5):2207-12.
50. Hojo Y, Ikeda U, Katsuki T, Mizuno O, Fukazawa H, Kurosaki K, Fujikawa H, Shimada K: Interleukin 6 expression in coronary circulation after coronary angioplasty as a risk factor for restenosis. *Heart*. 2000 Jul;84(1):83-7.
51. Ilveskoski E, Perola M, Lehtimäki T, Laippala P, Savolainen V, Pajarinen J, Penttilä A, Lalo KH, Mannikko A, Liesto KK, Koivula T, Karhunen PJ: Age-dependent association of apolipoprotein E genotype with coronary and aortic atherosclerosis in middle-aged men: an autopsy study. *Circulation*. 1999 Aug 10;100(6):608-13.
52. Iniguez Romo A, Garcia Belenguer R, Navarro del Amo LF, Ibarra Hernandez R, Fernandez Rozas I, Marcos-Alberca Moreno P, Rodriguez RC, de la Paz J: The predictive factors of intra-stent restenosis. *Rev Esp Cardiol*. 1999 Dec;52(12):1035-44.
53. Innerarity TL, Weisgraber KH, Rall SC, Mahley RW: Functional domains of apolipoprotein E and apolipoprotein B. *Acta Med Scand Suppl*. 1987;715:51-9.
54. Inoue N, Kawashima S, Kanazawa K, Yamada S, Akita H, Yokoyama M: Polymorphism of the NADH/NADPH oxidase p22 phox gene in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 1998 Jan 20;97(2):135-7.

55. Ishigami T, Umemura S, Iwamoto T, Tamura K, Hibi K, Yamaguchi S, Nyuui N, Kimura K, Miyazaki N, Ishii M: Molecular variant of angiotensinogen gene is associated with coronary atherosclerosis. *Circulation*. 1995 Feb 15;91(4):951-4.
56. Ito D, Murata M, Watanabe K, Yoshida T, Saito I, Tanahashi N, Fukuuchi Y: C242T polymorphism of NADPH oxidase p22 PHOX gene and ischemic cerebrovascular disease in the Japanese population. *Stroke*. 2000 Apr;31(4):936-9.
57. Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charru A, Hunt SC, Hopkins PN, Williams RR, Lalouel JM, et al: Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell*. 1992 Oct 2;71(1):169-80.
58. Kastrati A, Dirschinger J, Schomig A: Genetic risk factors and restenosis after percutaneous coronary interventions. *Herz*. 2000 Feb;25(1):34-46.
59. Kim HS, Kregge JH, Kluckman KD, Haganan JR, Hodgins JB, Best CF, Jennette JC, Coffman TM, Maeda N, Smithies O: Genetic control of blood pressure and the angiotensinogen locus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Mar 28;92(7):2735-9.
60. Ko YL, Ko YS, Wang SM, Chu PH, Teng MS, Cheng NJ, Chen WJ, Hsu TS, Kuo CT, Chiang CW, Lee YS: Angiotensinogen and angiotensin-I converting enzyme gene polymorphisms and the risk of coronary artery disease in Chinese. *Hum Genet*. 1997 Aug;100(2):210-4.
61. Kojda G, Harrison D: Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res*. 1999 Aug 15;43(3):562-71.
62. Lamon-Fava S, Sadowski JA, Davidson KW, O'Brien ME, McNamara JR, Schaefer EJ: Plasma lipoproteins as carriers of phyloquinone (vitamin K1) in humans. *Am J Clin Nutr*. 1998 Jun;67(6):1226-31.
63. Leon MB, Teirstein PS, Moses JW, Tripuraneni P, Lansky AJ, Jani S, Wong SC, Fish D, Ellis S, Holmes DR, Kerieakes D, Kuntz RE: Localized intracoronary gamma-radiation therapy to inhibit the recurrence of restenosis after stenting. *N Engl J Med*. 2001 Jan 25;344(4):250-6.
64. Li A, Prasad A, Mincemoyer R, Satorius C, Epstein N, Finkel T, Quyyumi AA: Relationship of the C242T p22phox gene polymorphism to angiographic coronary artery disease and endothelial function. *Am J Med Genet*. 1999 Sep 3;86(1):57-61.
65. Liu MW, Luo JF, Dean LS, Baxley WA, Iyer SS, Sutor RJ, Negus B, Roubin GS: Long-term follow-up study of coronary reconstruction with multiple stents. *Am Heart J*. 1999 Feb;137(2):292-7.
66. Loktionov A, Vorster H, O'Neill IK, Nell T, Bingham SA, Runswick SA, Cummings JH: Apolipoprotein E and methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms in relation to other risk factors for cardiovascular disease in UK Caucasians and Black South Africans. *Atherosclerosis*. 1999 Jul;145(1):125-35.
67. Luc G, Bard JM, Arveiler D, Evans A, Cambou JP, Bingham A, Amouyel P, Schaffer P, Ruidavets JB, Cambien F, et al: Impact of apolipoprotein E polymorphism on lipoproteins and risk of myocardial infarction. The ECTIM Study. *Arterioscler Thromb*. 1994 Sep;14(9):1412-9.

68. Lusis AJ: Atherosclerosis. *Nature*. 2000 Sep 14;407(6801):233-41.
69. Mack MJ: Is there a future for minimally invasive cardiac surgery? *Eur J Cardiothorac Surg*. 1999 Nov;16 Suppl 2:S119-25.
70. Mahley RW: Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*. 1988 Apr 29;240(4852):622-30.
71. Mehta RH, Bossone E, Eagle KA: Current concepts in secondary prevention after acute myocardial infarction. *Herz*. 2000 Feb;25(1):47-60.
72. Menard J, Bouhnik J, Clauser E, Richoux JP, Corvol P: Biochemistry and regulation of angiotensinogen. *Clin Exp Hypertens A*. 1983;5(7-8):1005-19.
73. Morise T, Takeuchi Y, Takeda R: Rapid detection and prevalence of the variants of the angiotensinogen gene in patients with essential hypertension. *J Intern Med*. 1995 Feb;237(2):175-80.
74. Mügge A: The role of reactive oxygen species in atherosclerosis. *Z Kardiol*. 1998 Nov;87(11):851-64.
75. Müller G: *Klinisch-chemische Diagnostik*. Gustav Fischer Verlag Jena. 1993.
76. Nakayama Y, Tsumura K, Yamashita N, Yoshimaru K, Hayashi T: Pulsatility of ascending aortic pressure waveform is a powerful predictor of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Circulation*. 2000 Feb 8;101(5):470-2.
77. Nassar BA, Dunn J, Title LM, O'Neill BJ, Kirkland SA, Zayed E, Bata IR, Cantrill RC, Johnstone J, Dempsey GI, Tan MH, Breckenridge WC, Johnstone DE: Relation of genetic polymorphisms of apolipoprotein E, angiotensin converting enzyme, apolipoprotein B-100, and glycoprotein IIIa and early-onset coronary heart disease. *Clin Biochem*. 1999 Jun;32(4):275-82.
78. Nicolau JC, Nogueira PR, Pinto MA, Serrano CV, Garzon SA: Early infarct artery collateral flow does not improve long-term survival following thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 1999 Jan 1;83(1):21-6.
79. Niu T, Xu X, Rogus J, Zhou Y, Chen C, Yang J, Fang Z, Schmitz C, Zhao J, Rao VS, Lindpaintner K: Angiotensinogen gene and hypertension in Chinese. *J Clin Invest*. 1998 Jan 1;101(1):188-94.
80. Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG: Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest*. 1993 Jun;91(6):2546-51.
81. Orth M, Weng W, Funke H, Steinmetz A, Assmann G, Nauck M, Dierkes J, Ambrosch A, Weisgraber KH, Mahley RW, Wieland H, Luley C: Effects of a frequent apolipoprotein E isoform, ApoE4Freiburg (Leu28-->Pro), on lipoproteins and the prevalence of coronary artery disease in whites. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 May;19(5):1306-15.
82. Ou T, Yamakawa-Kobayashi K, Arinami T, Amemiya H, Fujiwara H, Kawata K, Saito M, Kikuchi S, Noguchi Y, Sugishita Y, Hamaguchi H: Methylene tetrahydrofolate reductase and apolipoprotein E polymorphisms are independent risk factors for coronary heart disease in Japanese: a case-control study. *Atherosclerosis*. 1998 Mar;137(1):23-8.

83. Pagano PJ, Clark JK, Cifuentes-Pagano ME, Clark SM, Callis GM, Quinn MT: Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Dec 23;94(26):14483-8.
84. Pan M, Suarez de Lezo J, Medina A, Romero M, Hernandez E, Segura J, Castroviejo JR, Pavlovic D, Melian F, Ramirez A, Castillo JC: Simple and complex stent strategies for bifurcated coronary arterial stenosis involving the side branch origin. *Am J Cardiol*. 1999 May 1;83(9):1320-5.
85. Park JW: Interventional cardiology versus minimally invasive cardiac surgery. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1999 Nov;16 Suppl 2:S117-8.
86. Parkos CA, Dinauer MC, Walker LE, Allen RA, Jesaitis AJ, Orkin SH: Primary structure and unique expression of the 22-kilodalton light chain of human neutrophil cytochrome b. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 May;85(10):3319-23.
87. Paul M: The renin-angiotensin system as the basic principle for hypertension and coronary heart diseases--role of genetic factors. *Z Kardiol*. 2000 Apr;89(4):264-8.
88. Reilly M, Delanty N, Lawson JA, FitzGerald GA: Modulation of oxidant stress in vivo in chronic cigarette smokers. *Circulation*. 1996 Jul 1;94(1):19-25.
89. Riegger GA: Role of the renin-angiotensin system as a risk factor for control of morbidity and mortality in coronary artery disease. *Cardiovasc Drugs Ther*. 1996 Nov;10 Suppl 2:613-5.
90. Ruef J, Peter K, Nordt TK, Runge MS, Kubler W, Bode C: Oxidative stress and atherosclerosis: its relationship to growth factors, thrombus formation and therapeutic approaches. *Thromb Haemost*. 1999 Sep;82 Suppl 1:32-7.
91. Sabate M, van Der Giessen WJ: Restenosis and Brachytherapy. *Current interventional cardiology reports*. 2000 Nov;2(4):293-302.
92. Saha N, Sanghera DK, Kamboh MI: The p22 phox polymorphism C242T is not associated with CHD risk in Asian Indians and Chinese. *Eur J Clin Invest*. 1999 Dec;29(12):999-1002.
93. Samani NJ, O'Toole L, Martin D, Rai H, Fletcher S, Lodwick D, Thompson JR, Morice AH, Channer K, Woods KL: Insertion/deletion polymorphism in the angiotensin-converting enzyme gene and risk of and prognosis after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 1996 Aug;28(2):338-44.
94. Samani NJ, Martin DS, Brack M, Cullen J, Wallis R, Lodwick D, Chauhan A, Harley A, Thompson JR, Gershlick AH, de Bono DP: Apolipoprotein E polymorphism does not predict risk of restenosis after coronary angioplasty. *Atherosclerosis*. 1996 Sep 6;125(2):209-16.
95. Sasayama S, Fujita M: Recent insights into coronary collateral circulation. *Circulation*. 1992 Mar;85(3):1197-204.
96. Sato N, Katsuya T, Rakugi H, Takami S, Nakata Y, Miki T, Higaki J, Ogihara T: Association of variants in critical core promoter element of angiotensinogen gene with increased risk of essential hypertension in Japanese. *Hypertension*. 1997 Sep;30(3 Pt 1):321-5.

97. Schachinger V, Britten MB, Dimmeler S, Zeiher AM: NADH/NADPH oxidase p22 phox gene polymorphism is associated with improved coronary endothelial vasodilator function. *Eur Heart J.* 2001 Jan 1;22(1):96-101.
98. Schmid C, Scheld HH: Trends and strategies for myocardial revascularization. *Thorac Cardiovasc Surg.* 1996 Jun;44(3):113-7.
99. Schulz, S: Dissertation „Proteinbiochemie und molekulargenetische Untersuchungen zu metabolischen Risikofaktoren bei Myokardinfarkt“, Univ. Halle, 2001
100. Sheu WH, Lee WJ, Jeng CY, Young MS, Ding YA, Chen YT: Angiotensinogen gene polymorphism is associated with insulin resistance in nondiabetic men with or without coronary heart disease. *Am Heart J.* 1998 Jul;136(1):125-31.
101. Stary HC: Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 May;20(5):1177-8.
102. Strittmatter WJ, Roses AD: Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci.* 1996;19:53-77.
103. Tarnow L, Cambien F, Rossing P, Nielsen FS, Hansen BV, Ricard S, Poirier O, Parving HH: Angiotensinogen gene polymorphisms in IDDM patients with diabetic nephropathy. *Diabetes.* 1996 Mar;45(3):367-369.
104. Thiery J, Teupser D: Genetic factors in the development of atherosclerosis. *Z Kardiol.* 1998 Oct;87(10):777-88.
105. Tiret L, de Knijff P, Menzel HJ, Ehnholm C, Nicaud V, Havekes LM: ApoE polymorphism and predisposition to coronary heart disease in youths of different European populations. The EARS Study. European Atherosclerosis Research Study. *Arterioscler Thromb.* 1994 Oct;14(10):1617-24.
106. Tiret L, Ricard S, Poirier O, Arveiler D, Cambou JP, Luc G, Evans A, Nicaud V, Cambien F: Genetic variation at the angiotensinogen locus in relation to high blood pressure and myocardial infarction: the ECTIM Study. *J Hypertens.* 1995 Mar;13(3):311-7.
107. Tracy RP, Arnold AM, Ettinger W, Fried L, Meilahn E, Savage P: The relationship of fibrinogen and factors VII and VIII to incident cardiovascular disease and death in the elderly: results from the cardiovascular health study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999 Jul;19(7):1776-83.
108. Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griendling KK: p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1996 Sep 20;271(38):23317-21.
109. Utermann G: Isolation and partial characterization of an arginine-rich apolipoprotein from human plasma very-low-density lipoproteins: apolipoprotein E. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1975 Jul;356(7):1113-21.
110. Utermann G, Hees M, Steinmetz A: Polymorphism of apolipoprotein E and occurrence of dysbetalipoproteinaemia in man. *Nature.* 1977 Oct 13;269(5629):604-7.
111. Utermann G: Apolipoprotein E polymorphism in health and disease. *Am Heart J.* 1987 Feb;113(2 Pt 2):433-40.

112. van Beek AP, de Ruijter-Heijstek FC, Erkelens DW, de Bruin TW: Menopause is associated with reduced protection from postprandial lipemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999 Nov;19(11):2737-41.
113. van Bockxmeer FM, Mamotte CD, Gibbons FR, Taylor RR: Apolipoprotein epsilon 4 homozygosity--a determinant of restenosis after coronary angioplasty. *Atherosclerosis.* 1994 Oct;110(2):195-202.
114. Verin V, Popowski Y, de Bruyne B, Baumgart D, Sauerwein W, Lins M, Kovacs G, Thomas M, Calman F, Disco C, Serruys PW, Wijns W: Endoluminal beta-radiation therapy for the prevention of coronary restenosis after balloon angioplasty. The Dose-Finding Study Group. *N Engl J Med.* 2001 Jan 25;344(4):243-9.
115. Violi F, Marino R, Milite MT, Loffredo L: Nitric oxide and its role in lipid peroxidation. *Diabetes Metab Res Rev.* 1999 Jul-Aug;15(4):283-8.
116. Vogel RA, Corretti MC, Gellman J: Cholesterol, cholesterol lowering, and endothelial function. *Prog Cardiovasc Dis.* 1998 Sep-Oct;41(2):117-36.
117. Volzke H, Hertwig S, Rettig R, Motz W: The angiotensinogen gene 235T variant is associated with an increased risk of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Clin Sci (Colch).* 2000 Jul;99(1):19-25.
118. Walden CC, Hegele RA: Apolipoprotein E in hyperlipidemia. *Ann Intern Med.* 1994 Jun 15;120(12):1026-36.
119. Walker WG, Whelton PK, Saito H, Russell RP, Hermann J: Relation between blood pressure and renin, renin substrate, angiotensin II, aldosterone and urinary sodium and potassium in 574 ambulatory subjects. *Hypertension.* 1979 May-Jun;1(3):287-91.
120. Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E, Macharzina R, Brasen JH, Skatchkov M, Heitzer T, Stasch JP, Griendling KK, Harrison DG, Bohm M, Meinertz T, Munzel T: Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation.* 1999 Apr 20;99(15):2027-33.
121. Wilson PW, Myers RH, Larson MG, Ordovas JM, Wolf PA, Schaefer EJ: Apolipoprotein E alleles, dyslipidemia, and coronary heart disease. The Framingham Offspring Study. *JAMA.* 1994 Dec 7;272(21):1666-71.
122. Wolin MS: How could a genetic variant of the p22(phox) component of NAD(P)H oxidases contribute to the progression of coronary atherosclerosis? *Circ Res.* 2000 Mar 3;86(4):365-6.
123. Yokoyama M, Inoue N, Kawashima S: Role of the vascular NADH/NADPH oxidase system in atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2000 May;902:241-7; discussion 247-8.
124. Zhu T, Wang Z, Zhao S: Effect of apolipoprotein E gene plasma levels of lipids, lipoproteins, apolipoproteins and its relation with coronary heart disease. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 1998;23(2):149-51.

8. Thesen

1. Die Entwicklung der KHK ist ein multifaktorielles Geschehen, bei dem das Zusammenspiel von Umwelt und individueller genetischer Disposition zur Krankheitsmanifestation führt.
2. Da die Einbeziehung bekannter koronarer Risikofaktoren nur etwa die Hälfte aller akuten Koronareignisse und einen noch geringeren Anteil der interindividuellen Ausprägung der KHK erklärt, gewinnt die Suche nach genetischen Ursachen eine ständig wachsende klinische Bedeutung. Dabei finden neben den seltenen monogenen immer stärker auch polygene Vererbungsmuster Beachtung.
3. Polymorphe Genvarianten, insbesondere von Genprodukten mit zentraler Bedeutung bei Blutdruckregulation, Lipidmetabolismus und Blutgerinnung geraten dabei zunehmend in den Mittelpunkt des Interesses.
4. Die Proteine Angiotensinogen, Apolipoprotein E und *p22-phox* sind pathophysiologisch in den Prozess der koronaren Atherosklerose involviert. Ihre kodierenden DNA-Sequenzen sind daher als mögliche Kandidatengene für die Entwicklung einer KHK zu betrachten.
5. Für das AGT-, Apo E- und *p22-phox*-Gen sind verschiedene Polymorphismen beschrieben worden.
6. AGT ist das geschwindigkeitslimitierende Ausgangssubstrat des Renin-Angiotensin-Systemes. Bei strukturellen und funktionellen Veränderungen dieses Proteins ist mit einer Veränderung der Aktivität des RAS und entsprechenden pathophysiologischen Konsequenzen zu rechnen.
7. Der AGT (C659T)-Polymorphismus war in der vorliegenden Arbeit nicht mit einem erhöhten Risiko für die Ausbildung einer KHK, eines Myokardinfarktes und einer Restenose nach PTCA assoziiert.
8. Mutationsträger (CT & TT) des AGT (C659T)-Polymorphismus zeigten signifikant erhöhte Plasmaspiegel für Protein C und Faktor VII. Diese erstmalig demonstrierte Assoziation könnte durch genotypabhängige serinproteaseinhibierende oder Vitamin K bindende Eigenschaften des Angiotensinogens verursacht sein. Des Weiteren waren bei diesen Patienten tendenziell erhöhte Blutdruckwerte nachweisbar.

9. Die signifikanten Bezüge zu wichtigen Faktoren des Gerinnungssystems weisen auf eine funktionelle Relevanz des AGT (C659T)-Polymorphismus im komplexen Geschehen der multifaktoriell verursachten koronaren Atherosklerose hin. Zur Überprüfung möglicher pathophysiologischer Konsequenzen dieser Beobachtungen sind weitere biochemisch-genetische Assoziationsstudien nötig.
10. Apo E besitzt eine zentrale Bedeutung beim Transport endogener und exogener Lipide.
11. In der hier präsentierten Studie waren Träger des Apo E (112, 158)-ε4-Allels signifikant häufiger unter den Koronarpatienten, insbesondere bei isolierter Betrachtung des weiblichen Geschlechts.
12. Unter den jüngeren, weiblichen Koronarpatienten scheint den genetischen Faktoren aufgrund einer protektiven Wirkung der Östrogene eine besondere Bedeutung zuzukommen.
13. Apo E4 wird aufgrund seiner Fähigkeit zur effizienteren Lipidmetabolisierung als sparsamer Genotyp betrachtet. In Populationen aus Nahrungsmangelgebieten kam es daher zur Positivselektion dieser Variante. Unter den modernen Lebensbedingungen in den Industriestaaten mit fettreicher und ballaststoffarmer Kost scheint Apo E4 mit einer erhöhten KHK-Inzidenz assoziiert zu sein.
14. Apo E2 häufte sich in der vorliegenden Arbeit tendenziell unter den Koronarpatienten. Aufgrund widersprüchlichen Ergebnisse verschiedener Autoren sind weitere Studien zur Klärung der Bedeutung dieser Genvariante bei Entwicklung einer KHK erforderlich.
15. Für die Ausbildung einer Restenose nach PTCA wurden intraindividuelle, interventionsbedingte und vom Koronarbefund abhängige Risikofaktoren identifiziert. Nach den Resultaten dieser Dissertation könnte auch Apo E4 bei der Wiederverengung eines ballondilatierten Herzkranzgefäßes durch Beeinflussung der Serumlipidspiegel, „*Remodelingprozesse*“ und Intimahyperplasien eine wichtige Rolle spielen.
16. Das Protein *p22-phox* ist entscheidend an der Bildung toxischer Sauerstoffradikale beteiligt, die ihrerseits einen Promotor der Atherosklerose darstellen.

17. In der vorliegenden Arbeit konnte weder eine Assoziation des *p22-phox* (C242T)-Polymorphismus zur KHK, noch zur Manifestation eines Myokardinfarktes bzw. der Entwicklung einer Restenose nach PTCA nachgewiesen werden.
18. Ungeachtet dessen häuften sich jedoch die *p22-phox* (C242T)-T-Allelträger unter den koronarchirurgisch Therapierten, sowie in einer Gruppe von Langzeitüberlebenden nach Myokardinfarkt. Möglicherweise bilden diese Patienten verstärkt Kollateralen oder stabilere Plaques aus. Auch die Beeinflussung der Progression einer Herzinsuffizienz erscheint denkbar.
19. Die Proteine AGT, Apo E und *p22-phox* beeinflussen sich bei der Ausbildung einer KHK gegenseitig. Die Detektion von Clustern des AGT (C659T)-, Apo E (112, 158) und *p22-phox* (C242T)-Polymorphismus mit erhöhtem, bzw. erniedrigtem koronarem Risiko in der vorliegenden Arbeit deutet auf die funktionelle Relevanz der untersuchten Genvarianten bei dieser Interaktion hin.
20. Um Inzidenz und Letalität der koronaren Herzkrankheit zu senken, sowie Prognose und Lebensqualität der betroffenen Patienten zu verbessern, ist eine Optimierung von Prophylaxe und Therapie erforderlich. Dies setzt eine stärkere Berücksichtigung der ätiologischen Vielfalt dieses Krankheitsbildes voraus. Die Ergebnisse genetischer Untersuchungen können mit großer Wahrscheinlichkeit zu einer differenzierteren Klassifizierung und individuelleren Therapie der KHK führen.
21. Die Ergebnisse dieser Dissertation deuten darauf hin, dass Träger des Apo E (112, 158)- ϵ 4- und *p22-phox* (C242T)-T-Allels möglicherweise eher von einer Bypassoperation, als von einer PTCA profitieren.
22. Genotypspezifische Unterschiede in Bezug auf den Erfolg medikamentöser Therapieoptionen sind im Rahmen der untersuchten Polymorphismen durchaus denkbar. Hierbei ist die Durchführung prospektiver Studien notwendig.
23. In retrospektiven Studien ist es zum Teil schwierig zwischen zufälligen und kausalen Assoziationen zu differenzieren. Daher sind für die Anerkennung einer Genvariante als eigenständigen, unabhängigen Risikofaktor strenge Forderungen zu stellen.

Verzeichnis der Publikationen

Weidhase L, Schulz S, Handschug K, Schagdarsurengin U, Greiser P, Nordwig A, Schnürer C, Archoukieh E, Werdan K, Gläser C: Novel C+241T-polymorphism and G+19A-, G+97C-mutations in exon 1 of FGF2 in patients with coronary atherosclerosis. *European J Hum Genet* 8 (suppl 1),116 (2000)

Nordwig A, Schulz S, **Weidhase L**, Schnuerer C, Archoukieh E, Greiser P, Schagdarsurengin U, Werdan K, Teichmann W, Taute BM, Podhaisky H, Glaeser C: Importance of the C242T polymorphism of the p22phox gene for essential hypertension. *Circulation* 100, No 18 (Suppl), I-411 (1999)

Archoukieh E, Greiser P, Schulz S, Schagdarsurengin U, **Weidhase L**, Nordwig A, Rehfeld D, Schnürer C, Kabisch A, Werdan K, Gläser C: Basic fibroblast growth factor (FGF2) and its genetic variants in patients with coronary obstruction. *J Mol Med* 78(3), B11 (2000)

Schulz S, Schagdarsurengin U, Schnürer C, Archoukieh E, Greiser P, **Weidhase L**, Nordwig A, Kabisch A, Rehfeld D, Werdan K, Gläser C: Importance of a novel genomic variant, a creation of an additional SP1 binding-site in the promoter of the LDL receptor-related protein (LRP) gene, for myocardial infarction. *J Mol Med* 78(3), B16 (2000)

Schulz S, Schagdarsurengin U, Schnürer C, Archoukieh E, Greiser P, **Weidhase L**, Nordwig A, Werdan K, Gläser C: A novel polymorphism in the promoter region of the LDL receptor related protein (LRP) and its importance as a risk factor for myocardial infarction. *medgen* 12, 140 (2000)

Schulz S, Schnürer C, Schagdarsurengin U, Greiser P, Archoukieh E, **Weidhase L**, Nordwig A, Taute BM, Werdan K, Gläser C: Der C242T Polymorphismus des p22phox-Gens und der ACE-I/D-Polymorphismus als Risikomarker bei Myokardinfarkt. *German J Cardiology* 89, Suppl 5, 194 (2000)

Greiser P, Schagdarsurengin U, Schulz S, Müller-Werdan U, Schnürer C, Süß T, Rehfeld D, Nordwig A, **Weidhase L**, Werdan K, Gläser C: Investigation of the relation between gene expression and genetic variants of FGF2 in patients with coronary artery disease (CAD). *European J of Human Genetics* 9 (Suppl 1), 178 (2001)

Schagdarsurengin U, Greiser P, Schulz S, Müller-Werdan U, Kabisch A, Rehfeld D, Schnürer C, Süß T, **Weidhase L**, Nordwig A, Werdan K, Gläser C: Investigation of genetic variants of the tumor necrosis factor alpha and their importance in the risk profile of CAD. *European J of Human Genetics* 9 (Suppl 1), 368 (2001)

Schagdarsurengin U, Schulz S, Schnuerer C, Greiser P, U Mueller-Werdan, Kabisch A, **Weidhase L**, Nordwig A, Suess T, Archoukieh E, Werdan K, Glaeser C. Investigation of genetic variants of the tumor necrosis factor and their importance in the risk profile of CAD. *Circulation (suppl)* 102, No 18, 354 (2000)

Tabellarischer Lebenslauf

von Lorenz Arndt Weidhase

1. Persönliche Daten:

- Geburtstag: 22.04.1975
- Geburtsort: Halle/Saale
- Familienstand: ledig

2. Schulausbildung:

- 1981-1983: „Wilhelm-Koenen-Oberschule“
- 1983-1990: „Dr.-Kurt-Fischer-Oberschule“
- 1990-1993: „Latina August-Hermann-Francke“ in Halle/Saale
- 1993: Abitur, Abschlussnote: „sehr gut“ (1,0)

3. Wehrdienst:

- 1993-1994: Grundwehrdienst als Sanitätssoldat im
9.Sanitätsbataillon 131 in Halle/Saale

4. Studium:

- 10/1994-10/2000: Studium der Humanmedizin an der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

4.1. Famulaturen/Praktika:

- molekularbiologisches Laborpraktikum (Institut für Humangenetik und Medizinische Biologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)
- Innere Medizin/Onkologie (Harz-Klinikum-Wernigerode GmbH)
- Anästhesie und Intensivmedizin (HELIOS Klinik Gotha)
- Allgemeinchirurgie (Klinikum Bernburg)
- Innere Medizin/Kardiologie (Martin-Luther-Universität)
- Pädiatrie (Harz-Klinikum-Wernigerode GmbH)
- Allgemeinmedizin (Praxis Dr. med. R. Skiba, Könnern)

- Orthopädie (Praxis Dr. med. H. Kothe, Halle)
- Kinderchirurgie (Klinikum Schwerin)

4. 2. Praktisches Jahr:

- 10/1999-01/2000: Chirurgie im Spital Thuis (Schweiz)
Schwerpunkt: Traumatologie
- 02/2000-05/2000: Innere Medizin im Städtischen Krankenhaus
Martha-Maria Halle/Dölau gGmbH
Schwerpunkte: Pulmologie, Intensivmedizin
- 06/2000-09/2000: Kinderchirurgie an der Martin-Luther-
Universität Halle-Wittenberg

4. 3. Prüfungen:

- 13.09.1996: Ärztliche Vorprüfung, Note: sehr gut
- 28.08.1997: Ärztliche Prüfung Teil 1, Note: sehr gut
- 13.09.1999: Ärztliche Prüfung Teil 2, Note: sehr gut
- 27.10.2000: Ärztliche Prüfung Teil 3, Note: sehr gut

5. Berufspraxis:

- seit 01.04.2001: Arzt im Praktikum in der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin
des Städtischen Krankenhauses Martha Maria Dölau gGmbH

6. Hobbys:

- Sport (Langstreckenlauf, Skilanglauf, Abfahrtslauf, Volleyball), Musik
(Gitarre, Klavier), Wandern, Trekking, Reisen

Lorenz Arndt Weidhase

Selbständigkeitserklärung und Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Dissertation selbständig und ohne kommerzielle Hilfe durchgeführt habe. Es gab keine weiteren Promotionsversuche.

Lorenz Arndt Weidhase

Danksagung

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Teichmann. Als Direktor der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III der MLU ermöglichte er erst durch die intensive Zusammenarbeit mit dem Institut für Humangenetik und Medizinische Biologie (Dr. Gläser) die Durchführung einer solchen Arbeit. Insbesondere für die ständige Diskussionsbereitschaft und die guten Lösungsvorschläge bei Problemen während der Durchführung der Arbeit möchte ich mich hier ganz herzlich bedanken.

Auch Herrn Prof. Dr. Werdan, der nach der Emeritierung von Prof. Dr. Teichmann die Leitung der Klinik übernahm, sei hier noch einmal ganz herzlich für seine Unterstützung und wertvollen Diskussionen gedankt, die zum Gelingen dieser Dissertation beitrugen.

Herrn Prof. Dr. Hansmann, dem Direktor des Instituts für Humangenetik und medizinische Biologie danke ich besonders für die ausgezeichneten Nutzungsmöglichkeiten der genetischen Labore des Instituts, in denen die molekularbiologischen Untersuchungen durchgeführt werden konnten.

Besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Gläser bedanken, die als Leiterin der Forschungsgruppe „Herz-Kreislauf“ für die schnelle und komplikationslose Durchführung der Genotypisierungen sorgte. In schwierigen Situationen erhielt ich hier stets großzügige Unterstützung und nach kritischen Diskussionen wurde mir der richtige Weg gewiesen. Die besonders engagierte Unterstützung durch Frau Dr. Gläser war entscheidend am Erfolg dieser Arbeit beteiligt. An dieser Stelle sei auch allen anderen Mitarbeitern der Forschungsgruppe ganz herzlich gedankt.

Für die freundliche Hilfe bei der Analyse klinisch-chemischer Laborparameter gilt an dieser Stelle Frau Dr. Heider sowie allen anderen Mitarbeitern des Zentrallabors ein spezielles Dankeschön.

Des weiteren möchte ich Frau Dr. Lautenschläger für die Empfehlungen bei der Durchführung statistischer Tests meinen besonderen Dank aussprechen.

Während der Patientenrekrutierung auf den Stationen 7, 8, 9 der Klinik für Innere Medizin III gilt den Schwestern für Ihre Geduld und Kooperationsbereitschaft mein ausdrücklicher Dank.

Im Rahmen der Befragung der Probanden, der Blutabnahmen und -transporte sowie bei der Eingabe und Verarbeitung des umfangreichen Datenmaterials sei hier Antje Nordwig für Ihre Sorgfältigkeit, Korrektheit und Motivation besonders gedankt.

Detlef Neumann, Frank Lippert und mein Bruder Henning Weidhase haben mich durch Ihre ausgezeichneten Spezialkenntnisse bei der elektronischen Datenverarbeitung und -verwaltung, bei Softwareproblemen und der gestalterischen Umsetzung graphischer Darstellungen ganz entscheidend unterstützt, wofür ich mich an dieser Stelle bedanken will.

Aufgrund seiner Erfahrungen auf dem Gebiet genetischer Untersuchungen bei der koronaren Herzkrankheit konnte mir Herr Dr. Rauchhaus sehr gute Ratschläge geben, für die ich hier meinen Dank aussprechen möchte.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt auch allen freiwilligen Probanden. Ohne sie wäre die Durchführung einer solchen Arbeit nicht möglich gewesen.

Lorenz Arndt Weidhase