

Untersuchungen zu den statistischen Beziehungen des AT<sub>1</sub>-Rezeptor A1166C-Genpolymorphismus und des ACE I/D-Genpolymorphismus zum Risiko und Schweregrad der koronaren Herzkrankheit und zum Risiko des Myokardinfarktes

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Vorgelegt von : Nguyen Quoc Dung

aus Krefeld

Giessen 2007

Aus dem Medizinischen Zentrum für Klinische Chemie, Klinische Immunologie und  
Humangenetik

Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie

Leiter: Prof. Dr. Dr. N. Katz

des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Giessen

Gutachter: Prof. Dr. Dr. A. Gardemann

Gutachterin: PD Dr. Nolte

Tag der Disputation: 21.05.2007

Teile dieser Doktorarbeit wurden in den Zeitschriften *Atherosclerosis* und *European Heart Journal* veröffentlicht:

1. Gardemann A., Fink M., Stricker J., Nguyen Q. D., Humme J., Katz N., Tillmanns H., Hehrlein F. W., Rau M., Haberbosch W.  
ACE I/D gene polymorphism: Presence of the ACE D allele increases the risk of coronary artery disease in younger individuals.  
*Atherosclerosis* 139 (1998) 153-159.
2. Gardemann A., Nguyen Q. D., Humme J., Stricker J., Katz N., Tillmanns H., Hehrlein F. W., Rau M., Haberbosch W.  
Angiotensin II type 1 receptor A1166C gene polymorphism: Absence of an association with the risk of coronary artery disease and myocardial infarction and of a synergistic effect with angiotensin-converting enzyme gene polymorphism on the risk of these diseases.  
*European Heart Journal* (1998) 19, 1657-1665.

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

	Seite
Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungen	VI
Tabellen	VII
Abkürzungen	IX
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Material</b>	<b>7</b>
2.1 Technische Hilfsmittel	7
2.1.1 Kleinmaterial	7
2.1.2 Geräte	7
2.2 Reagenzien	8
2.3 Enzyme	8
2.4 Primer	9
<b>3. Methoden</b>	<b>10</b>
3.1 Erhebung der Patientendaten	10
3.2 Definition der koronaren Herzkrankheit (KHK)	10
3.3 Definition von Hoch- und Niedrigrisikogruppen	11
3.4 Koronarangiographie	12
3.5 Messung der Serumsubstrate / -enzyme	15
3.5.1 Lipide	15
3.5.1.1 Cholesterin	15
3.5.1.2 Triglyzeride	16
3.5.1.3 Lipoprotein (a)	16

3.5.1.4	Apolipoprotein AI und Apolipoprotein B	17
3.6	Nachweis des A1166C-Polymorphismus im Angiotensin II Typ 1-18 Rezeptor	
3.6.1	DNA-Präparation aus EDTA-Blut	18
3.6.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	18
3.6.2.1	Prinzip der Polymerasekettenreaktion	19
3.6.2.2	Prinzip des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)	19
3.6.2.3	Prinzip der Agarose-Gelelektrophorese	19
3.6.3	PCR-abhängiger Nachweis des AT <sub>1</sub> -Rezeptor-Genpolymorphismus	20
3.6.3.1	Amplifikation eines Genabschnittes mit dem AT <sub>1</sub> R-A1166C-Gen- polymorphismus	20
3.6.3.2	Restriktionsbehandlung mit Hae III	22
3.6.3.3	Elektrophoretischer Nachweis des AT <sub>1</sub> -Rezeptor Genpolymorphismus	22
3.6.4	Nachweis des ACE I/D-Genpolymorphismus	23
3.6.4.1	PCR-abhängige Amplifikation des ACE/DNA-Segmentes	23
3.6.4.2	Agarose-Gel-Elektrophorese zur Trennung der DNA-Sequenzen des ACE-Gens	25
3.6.4.3	Kontroll-PCR zur Typisierung des ACE-I/D Genpolymorphismus	26
3.6.4.4	Agarose-Gel-Elektrophorese der Kontroll-PCR zur Typisierung des ACE-I/D Genpolymorphismus	28
<b>3.7</b>	<b>Statistik</b>	<b>29</b>
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>30</b>
4.1	Charakterisierung der Studienpopulation	30
4.1.1	Altersabhängigkeit des Auftretens der koronaren Herzerkrankung und des Myokardinfarktes	30
4.1.2	Verhältnis zwischen Koronarer Herzkrankheit und Myokardinfarkt	33
4.1.3	Nachweis etablierter Risikofaktoren und protektiver Faktoren der koronaren Herzkrankheit	36
4.2	AT <sub>1</sub> -Rezeptor A1166C Genpolymorphismus	37

### III

4.2.1	Überprüfung der AT <sub>1</sub> R A1166C Genpolymorphismus auf Übereinstimmung mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	37
4.2.2	Nachweis etablierter Risikofaktoren und protektiver Faktoren des Myokardinfarktes	38
4.2.3	Etablierte Risikofaktoren und protektive Faktoren der koronaren Herzkrankheit in Abhängigkeit vom AT <sub>1</sub> -Rezeptor A/C Genpolymorphismus	39
4.2.4	Beziehung zwischen dem AT <sub>1</sub> -A1166C-Genpolymorphismus und dem Risiko bzw. dem Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit	40
4.2.5	Beziehung zwischen AT <sub>1</sub> -A1166C-Genpolymorphismus und dem Myokardinfarkttrisiko	41
4.3	ACE I/D Genpolymorphismus	42
4.3.1	Überprüfung des ACE I/D Genpolymorphismus auf Übereinstimmung mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	42
4.3.2	Etablierte Risikofaktoren und protektive Faktoren der koronaren Herzkrankheit in Abhängigkeit vom ACE I/D-Genpolymorphismus	42
4.3.3	Beziehung zwischen dem ACE I/D Genpolymorphismus und dem Risiko und Schweregrad der koronaren Herzkrankheit	43
4.3.4	Beziehung zwischen dem ACE I/D-Genpolymorphismus und dem Schweregrad der koronaren Herzkrankheit in Hoch- und Niedrigrisikogruppen	44
4.3.5	Beziehung zwischen ACE I/D-Genpolymorphismus und dem Myokardinfarkttrisiko	45
4.3.6	Beziehung zwischen ACE I/D-Genotyp und Myokardinfarkt in Niedrigrisikogruppen	46
4.4	Interaktionen zwischen dem AT <sub>1</sub> -Rezeptor A1166C Genpolymorphismus und dem ACE I/D-Genpolymorphismus auf die koronare Herzkrankheit	46
4.5	Interaktionen zwischen dem AT <sub>1</sub> -Rezeptor A1166C Genpolymorphismus und dem ACE I/D-Genpolymorphismus auf das Myokardinfarkttrisiko	49

<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>52</b>
5.1	Zusammenfassende Kurzdarstellung der Studienergebnisse	52
5.2	Bedeutung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) für die Entstehung und Progression der Atherosklerose	52
5.3	Darstellung der Studien, die eine Assoziation des AT <sub>1</sub> -Rezeptor-Genpolymorphismus zur arteriellen Hypertonie zeigten	53
5.4	Darstellung der Studien, die eine Assoziation des AT <sub>1</sub> -Rezeptor-Genpolymorphismus zur koronaren Herzkrankheit bzw. zum Myokardinfarkt zeigten	54
5.5	Darstellung der Studien, die keine Assoziation des AT <sub>1</sub> -Rezeptor-Genpolymorphismus zur arteriellen Hypertonie und zur koronaren Herzkrankheit bzw. zum Myokardinfarkt zeigten	54
5.6	Darstellung der Studien, die eine Assoziation des ACE I/D-Genpolymorphismus zur koronaren Herzkrankheit bzw. zum Myokardinfarkt zeigten	55
5.7	Darstellung der Studien, die keine Assoziation des ACE I/D-Genpolymorphismus zur koronaren Herzkrankheit bzw. zum Myokardinfarkt zeigten	57
5.8	Vergleich der verschiedenen Studien zur statistischen Beziehung zwischen dem ACE I/D-Genpolymorphismus und der koronaren Herzkrankheit bzw. dem Myokardinfarkt	58
5.9	Darstellung der Studien, die eine Interaktion zwischen dem AT <sub>1</sub> -Rezeptor-Genpolymorphismus und dem ACE I/D-Genpolymorphismus auf das Risiko der koronaren Herzkrankheit bzw. des Myokardinfarktes zeigten	59
5.10	Darstellung der Studien, die keine Assoziation des AT <sub>1</sub> -Rezeptor-Genpolymorphismus und des ACE I/D-Genpolymorphismus zur koronaren Herzkrankheit bzw. zum Myokardinfarkt zeigten	61



<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>63</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>67</b>

**Danksagung**

**Lebenslauf**

## Abbildungen

		Seite
Abb. 1:	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)	1
Abb. 2:	Schematische Darstellung der Herzkranzgefäße	11
Abb. 3:	Nomenklatur der Koronararterienäste	12
Abb. 4:	Graphische Darstellung der Verteilung der Multiplikationsfaktoren zur Berechnung des Gensini Scores	14
Abb. 5:	Schematische Darstellung der Restriktionsbehandlung der DNA mit Hae III	22
Abb. 6:	Photographische Dokumentation der Restriktionsbehandlung mit Hae III	22
Abb. 7:	Photographische Dokumentation der Polymerasekettenreaktion des ACE-Gens mittels Agarosegelelektrophorese	26
Abb. 8:	Photographische Dokumentation der Polymerasekettenreaktion des ACE-Gens mittels Agarosegelelektrophorese	28
Abb. 9:	Anzahl der Probanden ohne signifikante Gefäßerkrankung oder mit Ein- bzw. Mehrgefäßerkrankung in der jeweiligen Alterskategorie	32
Abb. 10:	Anzahl der Probanden in der jeweiligen Alterskategorie mit oder ohne Myokardinfarkt	33
Abb. 11:	Anzahl der Probanden mit oder ohne Myokardinfarkt in Abhängigkeit vom koronaren Gefäßstatus	34
Abb. 12:	Beziehung zwischen der Höhe des Gensini Scores und der Schwere der koronaren Herzkrankheit	35
Abb. 13:	Verhältnis zwischen der Höhe des Gensini Scores und der Inzidenz eines Myokardinfarktes	36
Abb. 14:	Verhältnis zwischen dem Gensini Score und den ACE I/D-Genotypen	45
Abb. 15:	Interaktionen zwischen dem AT <sub>1</sub> -Rezeptor A1166C Genpolymorphismus und dem ACE I/D-Genpolymorphismus auf die koronare Herzkrankheit	49

Tabellen		Seite
Tab. 1:	Beispiele für stoffwechselrelevante Genpolymorphismen bzw. –mutationen mit möglichem bzw. gesichertem Einfluss auf die Inzidenz und Progression der koronaren Herzkrankheit und das Risiko eines Myokardinfarktes	3
Tab. 2:	Severity score in Abhängigkeit vom Stenosegrad der Koronararterien	13
Tab. 3:	Ermittlung des Gensini-Severity-Scores anhand des Gefäßstatus	14
Tab. 4:	Zusammensetzung der Probe zur Amplifikation des AT <sub>1</sub> R-DNA-Segmentes	20
Tab. 5:	Amplifikationszyklus des AT <sub>1</sub> R-A1166C-Genpolymorphismus	21
Tab. 6:	Zusammensetzung der Probe zur Amplifikation des ACE-DNA-Segmentes	24
Tab. 7:	Amplifikationszyklen der PCR des ACE-DNA-Segmentes	25
Tab. 8:	Zusammensetzung der Probe zur Amplifikation des ACE-I-Allels	27
Tab. 9:	Nukleotidsequenzen für die Kontroll-PCR des ACE I/D Genpolymorphismus	27
Tab. 10:	Amplifikationszyklus der Kontroll-PCR des ACE I/D Genpolymorphismus	27
Tab. 11:	Durchschnittsalter der Patienten entsprechend ihrem koronaren Gefäßstatus	31
Tab. 12:	Durchschnittsalter der Patienten in Abhängigkeit vom Auftreten eines Myokardinfarktes	31
Tab. 13:	Nachweis etablierter Risikofaktoren und protektiver Faktoren der koronaren Herzkrankheit	37
Tab. 14:	Nachweis etablierter Risikofaktoren und protektiver Faktoren des Myokardinfarktes	38
Tab. 15:	Etablierte Risikofaktoren und protektive Faktoren der koronaren Herzkrankheit in Abhängigkeit von den A1166C-Genotypen	39
Tab. 16:	Etablierte Risikofaktoren und protektive Faktoren der koronaren Herzkrankheit in Abhängigkeit von den A1166C-Genotypen, hier in der Kontrollgruppe ohne koronare Herzkrankheit	40

## VIII

Tab. 17:	Verteilung der AT <sub>1</sub> R-Genotypen bei Personen ohne signifikante Koronarstenose und Patienten mit 1-, 2- und 3-Gefäßerkrankung	42
Tab. 18:	Verteilung der AT <sub>1</sub> R-Genotypen bei Personen ohne signifikante Koronarstenose und Patienten mit mindestens einem Myokardinfarkt	43
Tab. 19:	Etablierte Risikofaktoren und protektive Faktoren der koronaren Herzkrankheit in Abhängigkeit von den ACE I/D-Genotypen	44
Tab. 20:	Verteilung der ACE-I/D-Genotypen bei Kontrollprobanden und Patienten mit 1-, 2- und 3-Gefäßerkrankung	44
Tab. 21:	Verteilung der ACE-I/D-Genotypen bei Personen ohne Myokardinfarkt und bei Patienten mit mindestens einem Myokardinfarkt	46
Tab. 22:	Keine Interaktionen zwischen dem ACE I/D-Genpolymorphismus und dem AT <sub>1</sub> -Rezeptor A1166C Genpolymorphismus auf das KHK-Risiko	47
Tab. 23:	Keine Interaktionen zwischen dem AT <sub>1</sub> -Rezeptor A1166C Genpolymorphismus und dem ACE I/D-Genpolymorphismus auf das KHK-Risiko	48
Tab. 24:	Keine Interaktionen zwischen dem ACE I/D-Genpolymorphismus und dem AT <sub>1</sub> -Rezeptor A1166C Genpolymorphismus auf das Myokardinfarkttrisiko	50
Tab. 25:	Keine Interaktionen zwischen dem AT <sub>1</sub> -Rezeptor A1166C Genpolymorphismus und dem ACE I/D-Genpolymorphismus auf das Myokardinfarkttrisiko	51

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin I-Converting-Enzym
ACVB	Aorto-coronarer Venenbypass
AGT <sub>1</sub> R	Angiotensin II Typ 1 Rezeptor
AGT T235M	Angiotensinogen-T235M
Apo-AI	Apolipoprotein AI
Apo-B	Apolipoprotein B
Aqua dest.	Aqua destillata
AVK	Arterielle Verschlusskrankheit
BM	Boehringer Mannheim
BMI	Body-mass-index
Bp	Basenpaar
Bpb	Bromphenolblau
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiographie
GE	Gefäßerkrankung
GS	Gensini Score
J	Jahre
JLU	Justus-Liebig-Universität
KHK	Koronare Herzkrankheit
Lp(a)	Lipoprotein (a)
MI	Myokardinfarkt
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
μmol	Mikromol
NaCl	Natriumchlorid
NTP	Nukleosidtriphosphat
pH	Negativer Logarithmus der H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> -Ionenkonzentration
py	pack year
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

PTCA	Perkutane transluminale koronare Angioplastie
sec	Sekunde
ssDNA	single-stranded DNA
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit

# 1. Einleitung

Die koronare Herzkrankheit (KHK) stellt nach Angaben der WHO die häufigste Todesursache in den Industrieländern dar [82, 7]. Sie ist die Manifestation der Atherosklerose an den Koronararterien, die schließlich zur Myokardischämie führt und sich klinisch als Angina pectoris, Herzrhythmusstörung, Herzinsuffizienz oder Myokardinfarkt manifestieren kann [82, 7]. Die Erkrankung kann jedoch auch stumm verlaufen. Sie tritt gehäuft bei Männern zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr auf. Allerdings nimmt die Inzidenz unter den Frauen im Vergleich zu früher stetig zu. Steigender Nikotinabusus und die Einnahme von Kontrazeptiva spielen hierbei eine wesentliche Rolle [32, 84]. Eine Reihe von Faktoren sind bekannt, die das Risiko einer KHK-Manifestation erhöhen. Hierbei stehen sich die unbeeinflussbaren Risikofaktoren wie familiäre Disposition, höheres Lebensalter und männliches Geschlecht den beeinflussbaren gegenüber, die in Risikofaktoren 1. Ordnung (Fettstoffwechselstörungen, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, metabolisches Syndrom und Nikotinabusus) und 2. Ordnung (negativer Stress, Bewegungsmangel, Übergewicht, Hyperfibrinogenämie und genetisch bedingte t-PA (tissue plasminogen activator)-Defekte unterteilt werden [61, 4, 8]. Die Kombination dieser Faktoren zeigt einen potenzierenden Effekt auf das KHK-Risiko. So wird das Risiko durch inhalatives Rauchen plus Hypercholesterinämie vervierfacht, durch eine zusätzliche Hypertonie um das Achtfache erhöht [5].

Die Bedeutung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) für die Entstehung der KHK ist in den letzten Jahren in zunehmendem Maße erkannt worden (Abb.1). Das RAAS re-

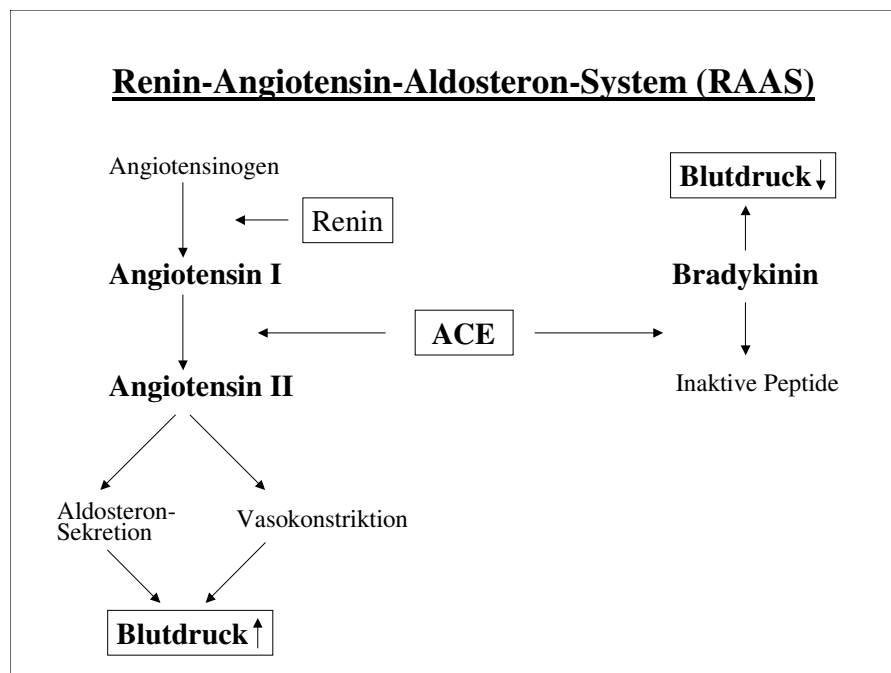


Abb. 1: **Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)**

guliert das Plasmavolumen und den Blutdruck, indem es bei Hypovolämie oder bei Hyponatriämie eine Kaskade in Gang setzt, in deren Folge der Flüssigkeitshaushalt und der Blutdruck im Körper wieder normalisiert werden [27, 31]. Aus dem in der Leber produzierten  $\alpha$ -Globulin Angiotensinogen wird unter dem Einfluss von Renin, das aus juxtaglomerulären Zellen der Niere sezerniert wird, das Decapeptid Angiotensin I gebildet [66, 38]. Das Angiotensin I-converting-Enzym (ACE), das sich vor allem in den Endothelzellen der Lunge nachweisen lässt, spaltet vom carboxyterminalen Ende des Angiotensin I zwei Aminosäuren ab, woraufhin das Angiotensin II entsteht [66, 38]. ACE ist außerdem identisch mit dem Bradykinin abbauenden Enzym Kininase II und greift damit synergistisch mit dem Angiotensin II in die Blutdruckregulation ein, da Bradykinin im Gegensatz zu Angiotensin II eine Vasodilatation mit Blutdruckabfall bewirkt. Angiotensin II bewirkt eine Zunahme des peripheren und zentralen Sympathikotonus, die sich in der Erhöhung des totalen peripheren Gefäßwiderstandes widerspiegelt, und führt durch Konstriktion der Nierenarterien zur Abnahme der Filtrationsrate in der Niere [27, 31]. Außerdem ist Angiotensin II der wichtigste Stimulator für die Sekretion von Aldosteron aus der Nebennierenrinde, wodurch die Rückresorption von Natrium und Wasser in der Niere gesteigert und folglich der Bestand derselben im Körper erhöht wird [99, 98, 100, 105]. Diese Effekte haben zum Ziel, das Blutvolumen und den Blutdruck zu erhöhen.

Tierexperimente geben Hinweise darauf, dass das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) für die Entstehung der koronaren Herzkrankheit von Bedeutung ist. ACE-Hemmer wie z.B. Captopril konnten die Atherosklerose hemmen, indem sie die Proliferation von Neointima [67, 96] und fibrotischem Material [67, 96] in der Media nach einer Gefäßverletzung einschränkten. Darüber hinaus senkten sie die Cholesterin-Konzentration in der Zelle trotz einer Hypercholesterinämie im Serum [1] und wirkten dadurch der Plaque-Bildung in den Gefäßwänden entgegen [1]. Die Arterien wiesen unter der Captopril-Medikation weniger atherosklerotische Läsionen [1, 22] auf und führten zu einer Reduzierung der Wandhypertrophie [96]. Da ACE-Hemmer die Umwandlung des Angiotensin I zu Angiotensin II hemmen, muss dem Letztgenannten eine bedeutende Rolle in der Atherogenese beigemessen werden. Angiotensin II führte in der Tat zu einer Hyperplasie und Hypertrophie der glatten Muskulatur des Menschen in vitro [20] und aktivierte den Sympathikus mit konsekutiv erhöhter Noradrenalinausschüttung, starker Gefäßkonstriktion und steigendem Blutdruck [26]. Es erhöhte die Konzentration des platelet derived growth factor [58] in den glatten Muskelzellen von Ratten und zeigte überdies eine direkte wachstumsstimulierende Wirkung auf Gefäße [31]. Eine regulatorische Wirkung des



Angiotensin II auf das Zellwachstum wurde über eine vermehrte Expression an Protoonkogenen (c-fos, c-myc) nachgewiesen [58, 44, 57].

Die vorliegende Studie stellt einen Beitrag zur Klärung der Frage nach der Bedeutung von Genpolymorphismen für die Entstehung und Progression der koronaren Herzkrankheit und der Ausbildung des Myokardinfarktes dar. Von besonderer Bedeutung sind Genvariationen in Kandidatengen von Stoffwechselprozessen, die eine hohe Relevanz für die Inzidenz und Progression der koronaren Herzkrankheit und das Risiko eines Myokardinfarktes besitzen (Tab. 1):

**Tab. 1: Beispiele für stoffwechselrelevante Genpolymorphismen bzw. –mutationen mit möglichem bzw. gesichertem Einfluss auf die Inzidenz und Progression der koronaren Herzkrankheit und das Risiko eines Myokardinfarktes**

<b>Fettstoffwechsel- störung</b>	<b>Gerinnungs-/ Fibrinolyse- system</b>	<b>Renin-Angiotensin- Aldosteron-System</b>
LDL-Rezeptor-Mutation [14]	Fibrinogen-H1/H2- Genpolymorphismus [34]	ACE-I/D-Gen- polymorphismus [17, 35]
ApoE-Genpolymorphismus [72]	Glykoprotein IIIa-Rezeptor- Mutation [128]	
	APC-Resistenz mit der Mutation im Faktor V-Gen [46, 133]	

Darstellung der Stoffwechselprozesse, die in Abhängigkeit von ihrer genetischen Ausprägung einen Einfluss auf die KHK und das Myokardinfarktrisiko haben. LDL = Low Density Lipoprotein, ApoE = Apolipoprotein E.

Die Fehlregulation eines dieser KHK-relevanten Stoffwechselprozesse lässt die ischämische Herzerkrankung eher beginnen und stärker ausprägen. Bis weit in die Neunziger Jahre hinein wurden verschiedene Metabolite der oben genannten Stoffwechselwege daraufhin untersucht, ob sie die Prädisposition zur Ausbildung der KHK steigern oder nicht. Durch die großen Fortschritte in den molekularbiologischen Techniken (z.B. PCR) ist es möglich geworden, die Bedeutung von Veränderungen der Gensequenzen verschiedener KHK-Kandidaten-Gene für die Entstehung und Progression der ischämischen Herzerkrankung zu untersuchen. Die Untersuchung der Genpolymorphismen hat den entscheidenden Vorteil, dass die früher gemessenen Plasmaspiegel verschiedener Metabolite erheblichen Konzentrationsänderungen unterworfen sein können und ein gemessener Wert oft nur eine Momentaufnahme für den

Risikostatus des Patienten bzw. Probanden darstellt. Dagegen unterliegen die Genpolymorphismen nicht derartigen Fluktuationen. Die genetischen Prädispositionsfaktoren sind von Geburt an vorhanden und ändern sich während des ganzen Lebens nicht. Der Vorhersagewert eines genetischen Risikomarkers müsste daher größer als der eines Stoffwechselmarkers sein.

1990 wurde der Genpolymorphismus im ACE von Cambien et al. zum ersten Mal beschrieben. Es handelt sich um einen Insertions-/Deletionspolymorphismus. Das D-Allel des ACE-I/D-Genpolymorphismus ist durch einen Verlust von 300 Basenpaaren im Intron 16 im Vergleich zum normalen I-Allel charakterisiert. Diese Genvariation war mit einer erhöhten Aktivität des ACE im Serum [34, 88] und einem höheren Herzinfarktrisiko, insbesondere unter "low-risk" Patienten (BMI < 26 kg/m<sup>2</sup>, Nikotinabusus < 5 pack-years) [34], assoziiert.

Die auf den Seiten 1 und 2 beschriebenen Wirkungen des Angiotensin II wird durch den Angiotensin II Typ 1-Rezeptor (AT<sub>1</sub>R) vermittelt. Dieser Rezeptor ist beim Menschen auf dem Chromosom 3 lokalisiert und findet sich in Lunge, Leber, Niere, Herz, Aorta, glatter Muskulatur der Gefäße, Nebenniere, Hypophyse, Gehirn und Uterus [25, 65]. Die Angiotensin-II-Bindung an den Rezeptor induziert eine Konformationsänderung im Rezeptormolekül, das über eine Interaktion mit G-Proteinen die Signaltransduktion über verschiedene Plasmamembraneffektorsysteme vermittelt [74]. Die zelluläre Reaktion auf AT<sub>1</sub>Rezeptorsignale führt zu Kontraktionen der glatten Muskulatur, zur Aldosteronsekretion sowie zu Zellwachstum und -proliferation. Die Forschergruppe um Chiu et al. [21] entdeckte 1989 zwei Angiotensin II-Rezeptorsubtypen, den Angiotensin II Typ 1-Rezeptor (AT<sub>1</sub>R) und den Angiotensin II Typ 2-Rezeptor (AT<sub>2</sub>R). Die Wissenschaftler konnten zeigen, dass die meisten Effekte des Angiotensin II über den AT<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelt wurden [21, 65]. Von den fünf bisher nachgewiesenen Genpolymorphismen des AT<sub>1</sub>R wurde der AT<sub>1</sub>R-A1166C-Genpolymorphismus besonders intensiv auf seine klinische Bedeutung untersucht [17]. Bonnardeaux et al. [17] wiesen z.B. eine Häufung dieses Genpolymorphismus unter Hypertonikern nach. Der Genpolymorphismus dieses Rezeptors ist dadurch gekennzeichnet, dass das Nukleotid Adenin gegen Cytosin an der Position 1166 auf der mRNA ausgetauscht wurde. Tiret et al. untersuchten als erste Forschergruppe 1994 die DNA von 613 weißen, europäischen Herzinfarktpatienten in Hinblick auf das Entstehungsrisiko eines Myokardinfarkts (MI) [88]. Eine direkte Assoziation des AT<sub>1</sub>R-A1166C-Genpolymorphismus zum MI-Risiko war nicht nachweisbar. Allerdings hatte diese Genvariation einen indirekten Einfluss auf das MI-Risiko, da das C-Allel des AT<sub>1</sub>R-A1166C-Genpolymorphismus die

Assoziation des ACE-I/D-Genpolymorphismus zum MI-Risiko deutlich verstärkte: In einer Subpopulation von Probanden ohne das AT<sub>1</sub>R C-Allel wurde für Individuen mit ACE DD-Genotyp ein Odds ratio von 1,05 (0,75 - 1,49; nicht signifikant) ermittelt. Dagegen ergab sich für Individuen mit ACE DD-Genotyp und einem AT<sub>1</sub>R C-Allel ein relatives Risiko von 1,52 (1,06 – 2,18; p=0,02). Die stärkste Assoziation der Probanden mit ACE DD-Genotyp wurde in einer Subpopulation von AT<sub>1</sub>R CC Homozygoten gefunden: Hier wurde ein Odds ratio von 3,95 (1,26 – 12,4; p=0,02) ermittelt. Diese relativen Risiken verstärkten sich bei Probanden mit "low-risk" Faktoren (Apolipoprotein B < 1,25 g/l, BMI < 26 kg/m<sup>2</sup>) für den Myokardinfarkt (MI). In dieser low-risk Gruppe wurde bei den Probanden mit dem ACE DD-Genotyp und ohne das AT<sub>1</sub>R C-Allel ein Odds ratio von 1,64 (0,68 – 3,92; nicht signifikant) bestimmt. Für Individuen mit einem ACE DD-Genotyp und einem AT<sub>1</sub>R C-Allel wurde ein relatives Risiko von 7,03 (2,61 – 19,0; p<0,0001) ermittelt. Das ausgeprägteste, relative Risiko von 13,3 (0,79 – 707; p=0,05) wurde dabei in der Gruppe der Probanden mit ACE DD-Genotyp und AT<sub>1</sub>R CC-Genotyp gefunden. In der Subpopulation mit "high-risk" Faktoren für MI war eine verstärkte Assoziation des ACE DD-Genotyps zum MI-Risiko nur bei AT<sub>1</sub>R CC Homozygoten nachzuweisen. Die potentielle Assoziation zwischen dem A1166C-Genpolymorphismus des Angiotensin II Typ 1-Rezeptors und dem Risiko bzw. dem Schweregrad der koronaren Herzkrankheit wurde in dieser Studie nicht untersucht [88].

Wie aus der Abbildung 1 ersichtlich wird, erfolgt die Bildung des Angiotensin I unter dem Einfluss von Renin aus dem Angiotensinogen, welches in der Leber gebildet wird. Man unterscheidet zwei Angiotensinogen (AGT)-Genpolymorphismen T174M und M235T. Durch eine Mutation am Codon 174 auf dem AGT-Gen wird die Aminosäure Threonin durch Methionin ersetzt. Es konnte in einer genetisch-isoliert lebenden Population, bestehend aus 741 Hutterern, Angehörige einer isoliert lebenden Glaubensgemeinschaft in Nordamerika, beobachtet werden, dass diese Variation einen erhöhten systolischen Blutdruck unter den männlichen Probanden hervorrief [39]. Eine weitere Studie, die sich mit prädisponierenden genetischen Faktoren für den Herzinfarkt beschäftigte, namentlich die Etude Cas-Témoin de l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) Studie, konnte einen Zusammenhang zwischen diesem Genpolymorphismus und einem 2,4fach erhöhten Risiko für die Entstehung eines Bluthochdrucks bei Patienten mit einem Body-mass-index (BMI) < 26 kg/m<sup>2</sup> feststellen [90]. Beim Genpolymorphismus M235T handelt es sich um den Austausch der Aminosäure Methionin durch Threonin am Codon 235 des AGT-Gens auf dem Chromosom 1q42-43 [43]. Das mutierte Allel korrelierte mit dem Bluthochdruck in Patienten mit diabetischer

Nephropathie [85] und einem deutlich erhöhten Risiko für die koronare Herzkrankheit [43, 51].

**Ziel der Untersuchung:**

Das Ziel der vorliegenden Untersuchung war die Beantwortung der Frage, ob in einer Studienpopulation, bestehend aus 2267 männlichen Probanden, der A1166C-Genpolymorphismus im Angiotensin II Typ 1-Rezeptor-Gen mit dem Risiko und dem Schweregrad der koronaren Herzkrankheit (KHK) und dem Myokardinfarktrisiko (MI) assoziiert war und ob ein additiver oder synergistischer Effekt mit dem ACE-I/D-Genpolymorphismus auf das Risiko der genannten Krankheitsbilder nachgewiesen werden konnte.

## 2. Material

### 2.1 Technische Hilfsmittel

#### 2.1.1 Kleinmaterial

Mikroreaktionsgefäße, (Ultra-Tubes), 0,65 ml, silikonisiert, Fa. Roth, Karlsruhe

Mikroreaktionsgefäße, (Ultra-Tubes), 1,7 ml, silikonisiert, Fa. Roth, Karlsruhe

Parafilm, Fa. American Can, Greenwich, USA

Pipettenspitzen, weiß, Fa. Sarstedt, Nürnberg

Pipettenspitzen, gelb, Fa. Sarstedt, Nürnberg

Pipettenspitzen, blau, Fa. Sarstedt, Nürnberg

Polaroidfilm, Typ 667 Professional, Fa. Sigma, Deisenhofen

#### 2.1.2 Geräte

Autoklav, (Melag), Fa. Kalensee, Gießen

Behring-Nephelometer, Behringwerke AG, Marburg

BM/Hitachi System 717, Fa. Boehringer, Mannheim

Elektrophorese-Kammern (Agagel Mini), Fa. Biometra, Göttingen

Feinwaage, Fa. Mettler-Toledo, Gießen

Grobwaage, Fa. Sartorius, Göttingen

Kamera, Fa. Polaroid, Offenbach

Mikrowelle, Fa. Bosch, München

Netzgerät, Fa. Shandon, Frankfurt

pH-Meter CG 840, Fa. Schott, Hofheim a. Taunus

Pipette, 0,5-10 µl, (Gilson), Fa. Abimed, Langenfeld

Pipette, 10-100 µl, (Gilson), Fa. Abimed, Langenfeld

Pipette, 100-1000 µl, (Gilson), Fa. Abimed, Langenfeld

Thermocycler (Crocodile I und II), Fa. Appligene, Heidelberg

UV-Tisch (DNA-Transilluminator), Fa. Renner, Darmstadt

Vortex-Schüttler IKA-VIBRO-FIX VF2, Fa. IKA, Staufen

Wasserbad, Fa. Julabo, Seelbach

Zentrifuge (Biofuge 13), Fa. Heraeus, Osterode

## 2.2 Reagenzien

Agarose-Gel, Fa. Pharmacia, Freiburg

Apolipoprotein-Kontroll-Serum CHD (human), Behringwerke AG, Marburg

Aqua dest., Fa. Braun, Melsungen

100 bp DNA Ladder, Fa. Pharmacia, Freiburg

Bromphenolblau, Fa. Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

Cholesterin-Reagenz, Fa. Boehringer GmbH, Mannheim

Desoxynukleotide (dNTPs), Fa. Pharmacia, Freiburg

Ethidiumbromid, Fa. Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

Lysis-Puffer K: Gelatine, Fa. Merck, Darmstadt

KCl, Fa. Merck, Darmstadt

MgCl<sub>2</sub>, Fa. Merck, Darmstadt

Tris-HCl, Fa. USB, Bad Homburg

Tween 20, Fa. Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

N Antiserum gegen Human-Apolipoprotein AI, Behringwerke AG, Marburg

N Antiserum gegen Apolipoprotein B, Behringwerke AG, Marburg

N Apolipoprotein-Standard-Serum (human), Behringwerke AG, Marburg

N Latex Lp(a) Reagenz, Behringwerke AG, Marburg

N Lp(a) Kontrolle/Standard SY (human), Behringwerke AG, Marburg

Paraffin-Öl, Fa. Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

PIPES-Puffer, Fa. Boehringer GmbH, Mannheim

TAE-Puffer: EDTA, Fa. Merck, Darmstadt

Tris-HCl, Fa. USB, Bad Homburg

TE-Puffer: EDTA, Fa. Merck, Darmstadt

Tris-HCl, Fa. USB, Bad Homburg

Triglyzerid-Reaktionsgemisch, Fa. Boehringer GmbH, Mannheim

## 2.3 Enzyme

Taq-Polymerase, Fa. Pharmacia, Freiburg

## **2.4 Primer**

AT<sub>1</sub>-Rezeptor-sense-Primer, Fa. Roth, Karlsruhe

AT<sub>1</sub>-Rezeptor-antisense-Primer, Fa. Roth, Karlsruhe

ACE-sense-Primer, Fa. Roth, Karlsruhe

ACE-antisense-Primer, Fa. Roth, Karlsruhe

ACE-H5a-Primer, Fa. Roth, Karlsruhe

ACE-H5c-Primer, Fa. Roth, Karlsruhe

## 3. Methoden

### 3.1 Erhebung der Patientendaten

Die Studienpopulation setzte sich aus 2267 männlichen, europäischen Patienten zusammen, die alle ihr Einverständnis zur Teilnahme an dieser Untersuchung gegeben hatten. Zur koronarangiographischen Diagnostik wurden die Patienten für diese Studie aus der Klinik für Kardiologie der Medizinischen Universitätsklinik Gießen und aus der Kerckhoff-Klinik in Bad Nauheim rekrutiert. Alle gewonnenen Patientendaten über Geburtsdatum, Körpergröße, -gewicht, Nikotinabusus, Diabetes mellitus, Hypertonie, Angina pectoris, Herzinfarkt, medikamentöse Therapie und sonstige Herzerkrankungen wurden in einem Dokumentationsbogen festgehalten. Größe und Gewicht wurden in Body-mass-index (BMI =  $\text{kg/m}^2$ ), und der Zigarettenkonsum in "pack-years" (Beispiel: 1 py = 20 Zigaretten/Tag/Jahr) umgerechnet. Patienten mit insulinabhängigem (IDDM) bzw. insulinunabhängigem Diabetes mellitus (NIDDM) wurden zur Gruppe der Diabetiker zusammengefasst, da nahezu alle Diabetiker einen NIDDM aufwiesen. Sofern die Patienten über Angina pectoris klagten, wurde dieses Symptom in stabile und instabile Angina pectoris unterschieden. Die Anamnese über den Herzinfarkt erstreckte sich über dessen Anzahl, Lokalisation und Zeitpunkt, an dem die Patienten den Infarkt erlitten hatten. Schließlich wurde eine Medikamentenanamnese unter besonderer Berücksichtigung der Medikation mit ACE-Antagonisten erhoben.

### 3.2 Definition der koronaren Herzkrankheit (KHK)

Die koronare Herzkrankheit stellt das Ergebnis einer durch die Atherosklerose bedingten Einengung oder eines Verschlusses der Koronararterien dar, in deren Folge es zu einer Minderversorgung des Myokards mit Sauerstoff und lebenswichtigen Nährstoffen distal der Stenose kommt. Die Atherosklerose beginnt zunächst an bestimmten Prädilektionsstellen des Koronarsystems und kann bei längerem Krankheitsverlauf die epikardialen Arterien auch diffus befallen (Abb. 2).



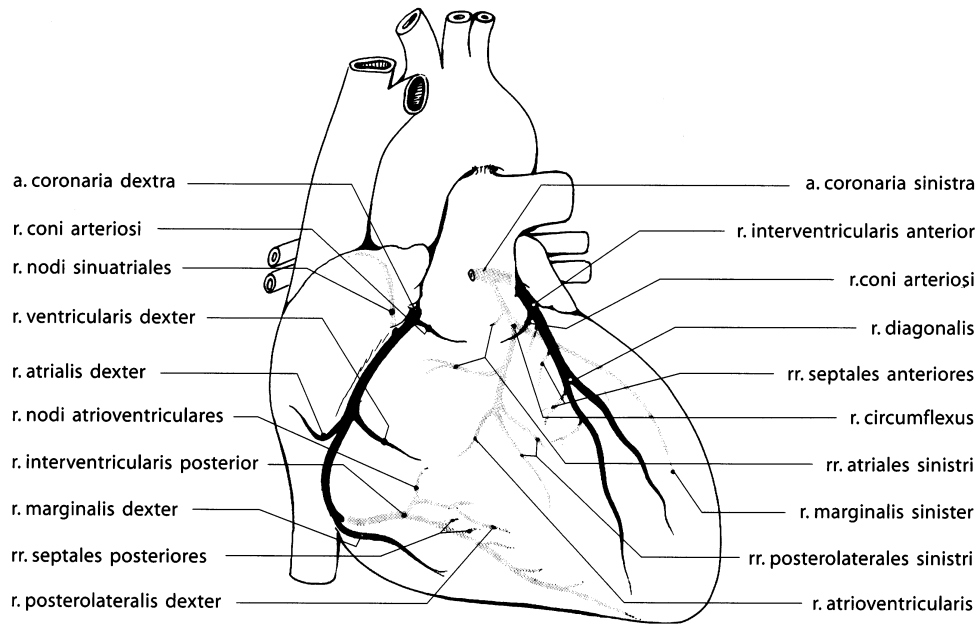


Abb. 2 : Schematische Darstellung der Herzkranzgefäße [28]

### 3.3 Definition von Hoch- und Niedrigrisikogruppen

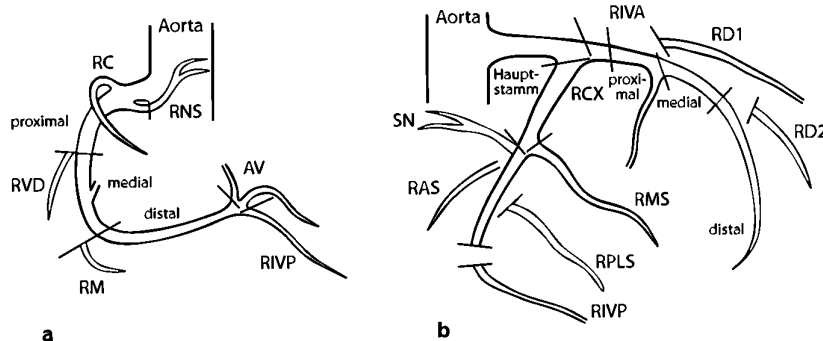
Risikofaktoren der KHK spielen eine große Rolle bei der Inzidenz und Prävalenz der KHK und des Myokardinfarktes. Dabei unterscheidet man zwischen unbeeinflussbaren und beeinflussbaren Risikofaktoren. Zu den erstgenannten gehören das männliche Geschlecht, das Lebensalter und die familiäre Disposition. Bei den beeinflussbaren Risikofaktoren unterscheidet man zwischen den Risikofaktoren 1. Grades, wie Hypertonus, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, metabolisches Syndrom und Zigarettenrauchen, und den Risikofaktoren 2. Grades. Darunter werden die Faktoren Hyperfibrinogenämie, Hyperhomocysteinämie, hohes Lipoprotein (a), Bewegungsmangel und psychosoziale Faktoren wie negativer Stress sowie niedriger sozialer Status zusammengefasst.

Niedrigrisikogruppen wurden durch das Fehlen der etablierten Risikofaktoren für die KHK definiert. Durch Unterschreiten der Mittelwerte der kontinuierlichen Parameter bzw. durch das Fehlen der Risikofaktoren wurden verschiedene Niedrigrisikogruppen unterteilt. Folgende Niedrigrisikogruppen wurden nach den jeweiligen Medianen bzw. Mittelwerten formuliert: Zigarettenkonsum < 5 py, kein Hypertonus, kein Diabetes mellitus, BMI < 26,9 kg/m<sup>2</sup>, Apo-AI > 1,43 mg/dl, Apo-B < 1,25 mg/dl, Lp(a) < 10 mg/dl, Triglyceride < 154 mg/dl, Cholesterin < 209 mg/dl und Fibrinogen < 3,47 mg/dl. Durch Kombination der genannten Parameter ergaben sich folgende Niedrigrisikogruppen : Kein Hypertonus und kein Diabetes,

BMI < 26,9 kg/m<sup>2</sup> und Apo-AI > 1,43 mg/dl, Apo-AI/Apo-B > 1,12 sowie Triglyceride < 154 mg/dl und Cholesterin < 209 mg/dl. Die entsprechenden Hochrisikogruppen wurden entsprechend durch das Überschreiten der Mittelwerte bzw. Mediane oder durch das Vorhandensein eines oder mehrerer Risikofaktoren definiert.

### 3.4 Koronarangiographie

Die selektive Koronarangiographie ermöglicht die Darstellung der Herzkranzgefäße mit ihren Verzweigungen und Veränderungen. In Giessen und Bad Nauheim wurde die weit verbreitete Methode nach Seldinger angewandt. Dabei wird nach Punktion der rechten oder linken Arteria femoralis unter Lokalanästhesie eine Führungssonde (Drahtspirale) eingeführt und über diese der eigentliche Katheter geschoben. Anschließend wird die Führungssonde entfernt. Unter Röntgenkontrolle erfolgt das weitere Vorschieben des kontrastgebenden Katheters über die Arteria iliaca und die Aorta descendens, den Aortenbogen und die Aorta ascendens retrograd durch die Aortenklappe bis in den linken Ventrikel. Mit besonders gebogenen Kathetern (nach Judkins) werden selektiv die Ostien der linken oder rechten Koronararterie aufgesucht, in die dann Kontrastmittel unter Durchleuchtungs-, Druck- und EKG-Kontrolle injiziert wird. Stenosen, Kollaterale oder Verschlüsse können mit einer 35 mm-Filmkamera dokumentiert werden. Nach der Untersuchung wird die Punktionsstelle mit einem Druckverband für 24 Stunden belastet, um Nachblutungen zu verhindern.



RC = Right Coronary Artery  
 RNS = Ramus nodi sinuatrialis  
 RM = Ramus marginalis  
 RIVP = Ramus interventricularis posterior  
 AV = Ramus nodi atrioventricularis

RCX = Ramus circumflexus  
 RAS = Rami atriales  
 RMS = Ramus marginalis sinister  
 RPLS = Ramus posterolateralis sinister  
 RIVP = Ramus interventricularis posterior

RIVA = Ramus interventricularis anterior  
 RD1 = Ramus diagonalis 1  
 RD2 = Ramus diagonalis 2

Abb. 3: Schema zur Nomenklatur der Koronararterienäste

Die koronare Herzkrankheit wurde zum einen über den durch die Koronarangiographie bestimmten Gefäßstatus der Patienten und zum anderen über den Gensini Score [37] definiert. Nach klinischer Definition gelten Koronargefäße ab einem Stenosegrad von mindestens 50 % als erkrankt. Je nach Lokalisation der Stenose wurde die koronare Herzkrankheit in eine 0-, 1-, 2- und 3-Gefäßerkrankung eingeteilt. Dieser klinischen Einteilung lagen die rechte Koronararterie (RCA) und die beiden Hauptäste, Ramus interventricularis anterior (RIVA) und Ramus circumflexus (RCX), der linken Koronararterie (LCA) zugrunde (Abb. 3).

Zur genaueren Graduierung der koronaren Herzkrankheit hinsichtlich Lokalisation und Ausmaß der Stenosen entwickelte Gensini den so genannten Gensini Score [36, 37]. Abhängig von Stenosegrad einer Koronararterie wurde ein Score von 1 bis 32 vergeben, der anschließend mit einem Faktor von 0,5, 1, 2,5 oder 5 multipliziert wurde. Dieser Faktor erhöhte sich mit zunehmender Bedeutung des betreffenden Segmentes für die vitale Funktion des Herzens (Tab. 2; 3, Abb. 4). Eine z.B. 90 %ige Stenose des Ramus circumflexus wird mit einem Gensini Score von  $8 \times 1 = 8$  berechnet.

**Tab. 2: Severity score in Abhängigkeit vom Stenosegrad der Koronararterien**

<b>Grad der Stenose</b>	<b>Severity Score</b>
25 %	1
50 %	2
75 %	4
90 %	8
99 %	16
100 %	32

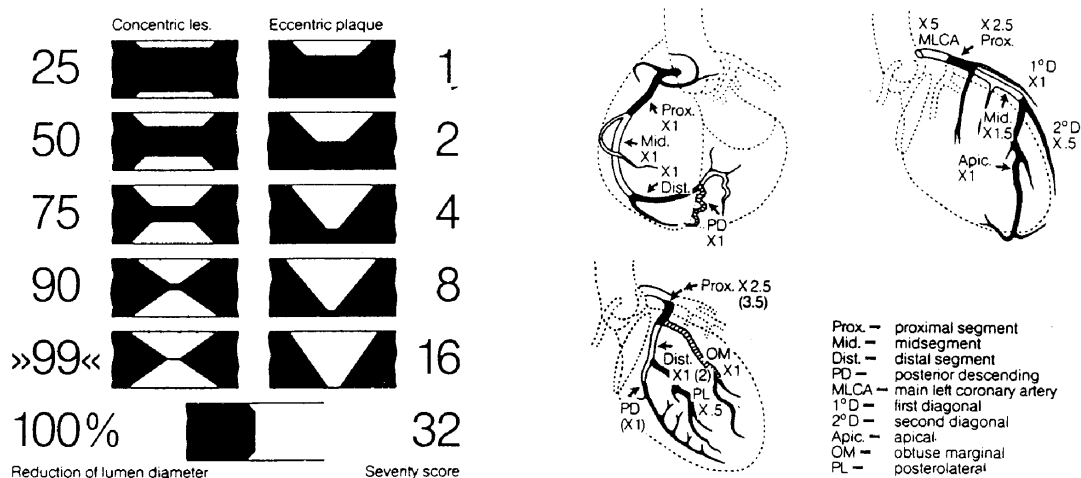
In Abhängigkeit vom Stenosegrad der Koronararterien von 25 % bis zum kompletten Verschluss eines Gefäßes, welches einem Wert von 100 % entspricht, wird jeweils ein Score von 1 bis 32 zugeteilt.

Tab. 3: Ermittlung des Gensini-Severity-Scores anhand des Gefäßstatus

Stenose Lokalisation	Multiplikationsfaktor
LCA	5
LAD	2,5
RCX	1
RCA	1
Weitere Äste	0,5

Abkürzungen: LCA = Stamm der linken Koronararterie; LAD = Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie; RCX = Ramus circumflexus der linken Koronararterie; RCA = Stamm der rechten Koronararterie

Abb. 4: Graphische Darstellung der Verteilung der Multiplikationsfaktoren zur Berechnung des Gensini Scores



Die Zuordnung eines Multiplikationsfaktors von 0,5; 1; 2,5 und 5 erfolgt in Abhängigkeit von der funktionellen Bedeutung eines Gefäßabschnittes der rechten Koronararterie, des Ramus interventricularis anterior und des Ramus circumflexus der linken Koronararterie.

### 3.5 Messung der Serums substrate / -enzyme

Vor der koronarangiographischen Diagnostik wurde jedem Patienten jeweils Blutproben entnommen. Während die EDTA-Probe der Bestimmung des kleinen Blutbildes und der DNA-Gewinnung aus Leukozyten diente, wurde die Konzentration folgender Bestandteile aus dem Serum bestimmt: Triglyceride, Cholesterin, Apolipoprotein AI (Apo-AI), Apolipoprotein B (Apo-B)) und Lipoprotein (a) (Lp (a)). Das Citratröhrchen diente zur Bestimmung der Gerinnungsparameter.

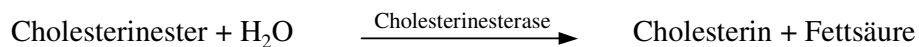
#### 3.5.1 Lipide

Lipide zeichnen sich durch ihre schlechte Löslichkeit in Wasser und ihre gute Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln aus.

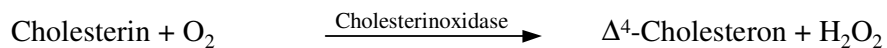
##### 3.5.1.1 Cholesterin

Die Cholesterinkonzentration im Serum wurde mit dem enzymatischen Farbttest am BM/Hitachi 717 der Firma Boehringer gemessen. Dazu wurden 3 µl Probevolumen mit 250 µl Cholesterin-Reagenz (PIPES-Puffer: 75 mmol/l, pH 6.8, Mg<sup>2+</sup>: 10 mmol/l, Natriumcholat: 0,2 mmol/l, 4-Aminophenazon ≥ 0,15 mmol/l, Phenol ≥ 4,2 mmol/l, Fettalkoholpolyglycoether: 1 %, Cholesterin-Esterase ≥ 0,5 U/ml, Cholesterin-Oxidase ≥ 0,15 U/ml, Peroxidase ≥ 0,25 U/ml) bei einer Temperatur von 37°C versetzt. Der entstandene gelbe Farbstoff 4-(p-Benzochinon-monoimino)-phenazon, dessen Intensität der Cholesterinkonzentration entspricht, wurde bei 700 nm photometrisch gemessen.

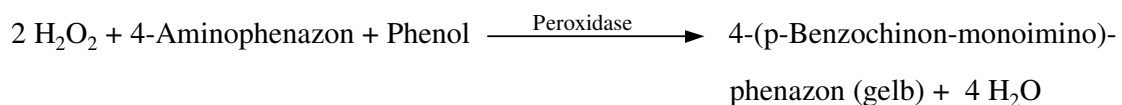
#### a) Hilfsreaktion



#### b) Messreaktion



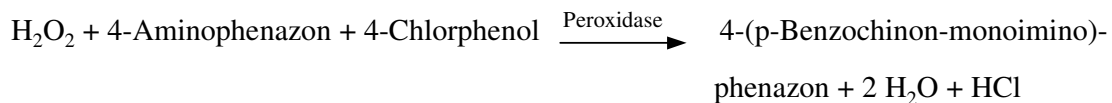
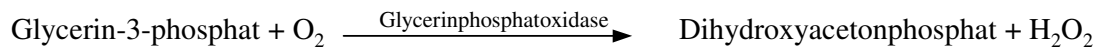
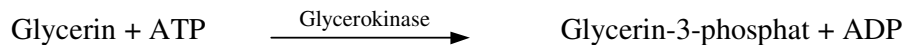
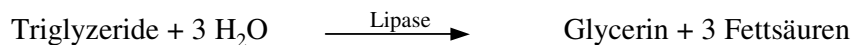
#### c) Indikatorreaktion



### 3.5.1.2 Triglyzeride

Serumtriglyzeride sind ab einer Serumkonzentration über 150 mg/dl beim nüchternen Patienten als pathologisch anzusehen. Im Gegensatz zum Serumcholesterin ist es unklar, ob sie zu den unabhängigen Risikofaktoren der KHK gehören.

Die Triglyzeridkonzentration im Serum wurde am BM/Hitachi 717 der Firma Boehringer gemessen. Das Prinzip besteht in der enzymatischen Spaltung der Triglyzeride mit nachfolgender Bestimmung des entstandenen Glycerin-3-phosphats mittels enzymatischer Farbreaktion. Dazu wurden 3 µl Probevolumen mit 300 µl Reaktionsgemisch (Tris-Puffer: 150 mmol/l, pH 7,6, Magnesiumsulfat: 17,5 mmol/l, EDTA, Dinatriumsalz: 10 mmol/l, 4-Chlorphenol: 3,5 mmol/l, Natriumchololat: 0,15 %, Kaliumhexacyanoferrat (II): 6 µmol/l, Fettalkoholpolyglykoläther: 0,12 %, ATP 0,5 mmol/l, 4-Aminophenazon: 0,35 mmol/l, Lipase ≥ 3 U/ml, Glycerinphosphatoxidase ≥ 2,5 U/ml, Glycerokinase ≥ 0,2 U/ml, Peroxidase ≥ 0,15 U/ml) versetzt und nach unten stehender Reaktionsgleichung bei 700 nm gemessen.



### 3.5.1.3 Lipoprotein (a)

Lipoprotein (a) setzt sich aus zwei Anteilen zusammen, dem Low Density Lipoprotein (LDL) und einem Glykoprotein, dem Apolipoprotein (a) [Apo(a)], welche über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Apo(a) kann aufgrund seiner hohen Strukturhomologie zu Plasminogen die Fibrinolyse beeinflussen und damit zusätzlich atherogen wirken. Lp(a) ist ein von exogenen Einflüssen unabhängiger Risikofaktor für die koronare Atherosklerose und stellt damit einen guten Indikator für die Früherkennung eines erhöhten Atherosklerose-

Risikos dar. Es wirkt vor allem bei gleichzeitig erhöhter LDL-Konzentration atherogen [106]. Die quantitative Bestimmung von Lp(a) erfolgte am Behring-Nephelometer. Lp(a)-haltige Serumproben wurden mit Polystyrol-Partikeln versetzt, die Antikörper gegen Human Lp(a) enthielten, sodass sie agglutinierten. Aus patentrechtlichen Gründen hatte sich die Firma Dade Behring jedoch geweigert, die einzelnen Reaktionsschritte und die Konzentrationen der einzelnen Reaktionspartner anzugeben.

#### 3.5.1.4 Apolipoprotein AI und Apolipoprotein B

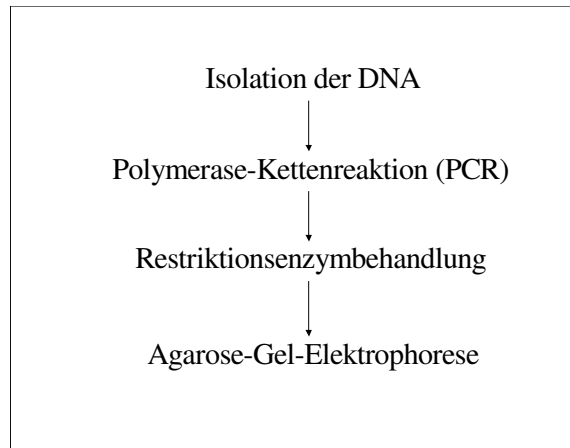
Das Apolipoprotein (Apo-AI) AI stellt ein wichtiges Strukturprotein des HDL (High Density Lipoprotein) dar. Es aktiviert die extrazelluläre Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) und macht damit die Veresterung von freiem Cholesterin möglich. Die entstandenen Cholesterinester werden auf VLDL (Very Low Density Lipoprotein) übertragen und können über die Bildung von Apolipoprotein (Apo) B-haltigem LDL (Low Density Lipoprotein) internalisiert werden. Erniedrigtes Apo-AI weist daher auf ein erhöhtes Atherosklerose-Risiko hin.

Zur Abschätzung des atherogenen Risikos wurde auch das Apo-B, die Hauptproteinkomponente im cholesterinreichen, triglyceridarmen LDL, bestimmt. Es bindet an spezifische Rezeptoren auf Hepatozyten und peripheren Zellen und leitet die Aufnahme des LDL in die genannten Zellen ein. Erhöhte LDL-Konzentrationen stellen ein Risikofaktor für die Atherosklerose dar, während Apolipoprotein AI als protektiver Faktor gegen die Arteriosklerose nachgewiesen werden konnte [69].

Die Apolipoproteine wurden am Nephelometer von Dade Behring gemessen. Dabei können die Apolipoproteine mit spezifischen Antikörpern Immunkomplexe bilden, an denen eingestrahktes Licht gestreut wird. Die Intensität des Streulichts hängt von der Konzentration des Apolipoproteins in der Probe ab. Die einzelnen Reaktionsschritte und die Konzentrationen der einzelnen Komponenten können nicht angegeben werden, da die Firma Dade Behring aus patentrechtlichen Gründen keine genauen Angaben zu machen bereit war.

### 3.6 Nachweis des A1166C-Polymorphismus im Angiotensin II Typ 1-Rezeptor

Der Nachweis des A1166C-Polymorphismus im AT<sub>1</sub>R-Gen geschieht in 4 Schritten:



#### 3.6.1 DNA-Präparation aus EDTA-Blut

Zunächst wurden 100 µl EDTA-Blut mit 500 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) in ein Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß gegeben und gerüttelt. Nach der Zentrifugation bei 13000 xg für 10 Sekunden wurde der Überstand verworfen und das Sediment in 500 µl TE-Puffer resuspendiert und gerüttelt. Nach erneuter Zentrifugation bei 13000 xg für 10 Sekunden wurde das Pellet vom restlichen Überstand befreit und in 100 µl Lysis-Puffer K (100 mM Tris-HCl [pH 8,3]), 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 % Gelatine, 5 % Tween 20) gegeben und gerüttelt. Danach wurden 10 µl Proteinase K (10 mg/ml) hinzupipettiert. Nach erneutem Rütteln und leichtem Anzentrifugieren wurde die Probe für 45 Minuten bei 56° C inkubiert und anschließend zur Inaktivierung der Proteinase K für 10 Minuten bei 95° C erhitzt. Anschließend wurden die DNA-Proben bei -20° C tiefgekühlt aufbewahrt.

#### 3.6.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist die enzymatische *in vitro* Vermehrung (Amplifikation) eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die jeweils gegenläufig an komplementäre DNA-Einzelstränge gebunden werden. Ihr Entdecker war der amerikanische Wissenschaftler Kary B. Mullis, der erkannte, dass mit Hilfe der PCR jede beliebige DNA exponentiell amplifiziert werden kann.



### 3.6.2.1 Prinzip der Polymerasekettenreaktion

Voraussetzung für den Einsatz der PCR ist die Kenntnis der meist 16 bis 20 Basenpaare langen Nukleotidsequenzen, die am Randbereich des zu untersuchenden DNA-Abschnittes anbinden. Ein Amplifikationszyklus läuft in drei Schritten ab, bestehend aus Denaturierung, Hybridisierung und DNA-Synthese, und kann 20-30 mal (oder ggf. öfter) wiederholt werden (Tab. 4).

Der 1. Schritt zerlegt die doppelsträngige DNA bei hohen Temperaturen (ca. 94°C) in ihre Einzelstränge und ermöglicht dadurch die Anlagerung (Hybridisierung) der im Überschuss vorhandenen Oligonukleotide, auch Primer genannt, bei ca. 50-60°C an die entstandenen DNA-Einzelstränge. Die Primer grenzen so die zu amplifizierende DNA-Sequenz jeweils am Anfang und am Ende ein. Zu Reaktionsbeginn sind die Primer im Überschuss vorhanden, um eine Primer-DNA-Einzelstrang-Hybridisierung und nicht eine Hybridisierung zwischen den denaturierten DNA-Einzelsträngen zu erreichen. Anschließend fügt die DNA-Polymerase Nukleotide, die zum ursprünglichen DNA-Einzelstrang komplementär sind, an das 3`OH-Ende des Primers an und synthetisiert auf dieser Weise den komplementären DNA-Strang. Dieses geschieht bei einer Umgebungstemperatur von ca. 72°C. Heutzutage ist es möglich, eine DNA in entsprechenden Thermocyclern z.B. mittels der hitzestabilen Taq-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* um den Faktor  $10^6$  bis  $10^7$  zu amplifizieren. In der Zwischenzeit gibt es eine Vielzahl anderer Polymerasen, die ebenfalls hitzebeständig sind und die unter anderem das so genannte Proof-Reading beherrschen, zu der die klassische Taq-Polymerase nicht in der Lage ist.

### 3.6.2.2 Prinzip des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)

Bei der RFLP handelt es sich um ein gezieltes Zerschneiden eines DNA- bzw. RNA-Stranges mit Hilfe eines Restriktionsenzym. Es werden die Restriktionsenzyme ausgewählt, welche die jeweilige spezifische Sequenz erkennen, an der die DNA gespalten werden soll [87]. Dabei erkennt das Restriktionsenzym entweder die Sequenz des Wildtyp-Allels oder des mutierten Allels, sodass nur eines der beiden Allele vom Restriktionsenzym geschnitten wird. Mittels der Restriktionsenzymbehandlung ist daher eine Unterscheidung zwischen Wildtyp und mutiertem Allel möglich.

### 3.6.2.3 Prinzip der Agarose-Gelelektrophorese

Die Elektrophorese beruht auf der Bewegung geladener Moleküle in einem elektrischen Feld. Als Trägermatrix dient das Agarose-Gel zur Trennung helikaler DNA, DNA-Fragmenten. Aufgrund ihrer Phosphatgruppen sind die DNA-Fragmente negativ geladen und werden bei der Elektrophorese von der Kathode abgestoßen und zur Anode hingezogen. Die Trennung erfolgt bei konstantem Ladung/Masse-Verhältnis proportional zum Molekulargewicht, sodass kleine Fragmente schneller als große wandern können. Zusätzlich hängt die Geschwindigkeit von der Porengröße der Gel-Matrix und der Oberflächenbeschaffenheit (Reibungsverluste) der DNA-Fragmente ab.

### 3.6.3 PCR-abhängiger Nachweis des AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Genpolymorphismus

#### 3.6.3.1 Amplifikation eines Genabschnittes mit dem AT<sub>1</sub>R-A1166C-Genpolymorphismus

Die meisten Effekte des Angiotensin II werden durch den AT<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelt. Im Jahre 1989 wurden zum ersten Mal die Angiotensin II-Rezeptoren in Angiotensin II-Typ<sub>1</sub>-Rezeptor (AT<sub>1</sub>-Rezeptor) und Angiotensin II- Typ<sub>1</sub>-Rezeptor (AT<sub>2</sub>-Rezeptor) klassifiziert. Das den aus 359 Aminosäuren bestehenden AT<sub>1</sub>-Rezeptor codierende Gen befindet sich auf dem Exon 5 des Chromosoms 3 in q21-25 [23-25]. Seine Länge beträgt 47 kb. Der Probenansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 µl bestand aus 20 pmol eines jeden Primers, 50 mmol eines jeden Desoxynucleosidtriphosphats (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 1 U Taq-Polymerase, 10 mmol/l Tris-HCl (pH 9), 50 mmol/l KCl, 2,5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl Triton X 100 und 2,5 µl DMSO (Tab. 4).

Tab. 4: **Zusammensetzung der Probe zur Amplifikation des AT<sub>1</sub>R-DNA-Segmentes**

<b>Reagenzien</b>	<b>Endkonzentration ( in 50 µl)</b>
Sense-Primer	20 pmol
Antisense-Primer	20 pmol
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	50 mmol
Taq-Polymerase	1 U
PCR-Puffer	10 mmol/l Tris-HCl, pH 9,0 50 mmol/l KCl 2,5 mmol/l MgCl <sub>2</sub> 0,5 µl Triton X 100 2,5 µl DMSO
Proben	100 ng DNA
Negative Kontrolle	destilliertes, autoklaviertes Wasser

Die eingesetzten Primer bestanden aus dem sense oligonucleotide primer und dem antisense oligonucleotide primer:

*Sense-Primer: (5') TCC TCT GCA GCA CTT CAC TAC CAA ATG GGC (3')*  
*(MG = 9058,0 g/mol)*

*Antisense-Primer: (5') TTC ATC GAG TTT CTG ACA TT (3').*  
*(MG = 6054,0 g/mol)*

Die extrahierte DNA durchlief im Thermocycler insgesamt 30 Zyklen: Denaturierung für 45 sec bei 95 °C, Hybridisierung der Primer für 45 sec bei 52 °C, DNA-Synthese für 1,5 min bei 72 °C (Tab. 5).

**Tab. 5: Amplifikationszyklus des AT<sub>1</sub>R-A1166C-Genpolymorphismus**

Vorgang	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95°C	45 sec	30
Hybridisierung	52°C	45 sec	30
DNA-Synthese	72°C	1,5 min	30

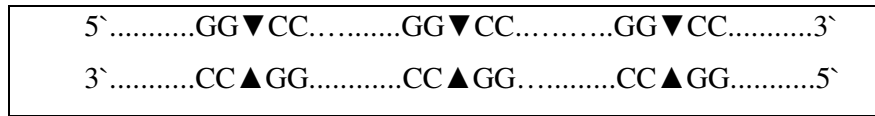
Nach Abschluss der PCR wurde das amplifizierte Produkt über Nacht mit dem Restriktionsenzym Hae III inkubiert.

### 3.6.3.2 Restriktionsbehandlung mit Hae III

Das Amplifikat wurde mit dem Restriktionsenzym Hae III behandelt. Bei Vorliegen des Wildtyp-Allels wurde das Amplifikat durch das Restriktionsenzym nicht geschnitten, sodass bei Vorliegen eines homozygoten Wildtyps eine Bande von 201 Basenpaaren in der Gelelektrophorese nachgewiesen werden konnte. Bei Vorliegen eines Austausches des Adenins gegen das Cytosin wurde das Amplifikat in zwei Fragmente (170 Basenpaare und 31 Basenpaare) aufgetrennt. Bei homozygot Mutierten wurden also in der Elektrophorese 2 Banden (170 bp und 31 bp) nachgewiesen. Bei Vorliegen einer heterozygoten Mutation kamen somit 3 Banden zur Darstellung: eine Bande bei 201 Basenpaaren zum Nachweis des

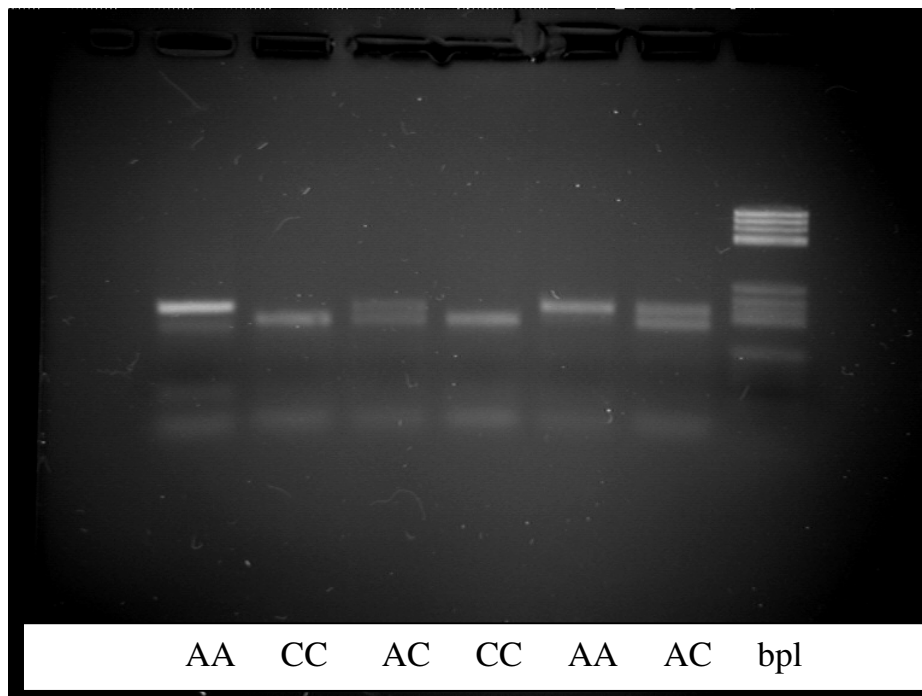
nichtmutierten Allels und zwei Banden bei 170 Basenpaaren und 31 Basenpaaren zum Nachweis des mutierten Allels. Der AT<sub>1</sub>R A1166C Genpolymorphismus konnte aus der DNA von 2244 der 2267 Probanden bestimmt werden (Abb. 5, 6).

Abb. 5: Schematische Darstellung der Restriktionsbehandlung der DNA mit Hae III



- CC-Genotyp: Vorhandensein einer 170 bp-Bande und 31 bp-Bande
- AC-Genotyp: Vorhandensein einer 201 bp-Bande, 170 bp-Bande und 31 bp-Bande
- AA-Genotyp: Vorhandensein einer 201 bp-Bande

Abb. 6: Photographische Dokumentation der Restriktionsbehandlung mit Hae III



Unter UV-Licht wurde jedes PCR-Produkt des AT<sub>1</sub>R-Gens in einer 2 %igen Agarosegelelektrophorese sichtbar gemacht. bpl entspricht den Basenpaarleitern: Linien 1 und 5 zeigen ein PCR-Produkt von AT<sub>1</sub>R-Homozygoten mit Vorhandensein einer 201 bp AA-Bande. Linien 3 und 6 zeigen PCR-Produkte von Heterozygoten mit einer Länge von 201 bp, 170 bp und 31 bp. Linien 2 und 4 zeigen jeweils ein PCR-Produkt von AT<sub>1</sub>R CC-Homozygoten mit einer Basenlänge von 170 bp und 31 bp. Abkürzungen: bp, Basenpaar.

### 3.6.3.3 Elektrophoretischer Nachweis des AT<sub>1</sub>-Rezeptor Genpolymorphismus

Die elektrophoretische Auftrennung der amplifizierten DNA-Sequenzen wurde in 4%igen horizontalen Agarosegelen (Agagel Mini von Biometra/ Gelgröße 6,5 × 9,0 cm) durchgeführt. Zur Herstellung eines Agarosegels wurden 1,2 g Agarose in 30 ml TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, pH 8,4, 1 mM EDTA) durch vorsichtiges Erhitzen in der Mikrowelle vollständig gelöst und nach Abkühlung auf Zimmertemperatur in die Mini-Gelkammer gegossen. Anschließend wurde ein Kamm mit 12 Zähnen à 1mm zur Herausbildung von Geltaschen an das eine Ende des Gels gesteckt. Nach Erstarren des Agarosegels wurde der Laufpuffer (TAE-Puffer: 40 mM Tris-Acetat, pH 8,4, 1 mM EDTA) in die Mini-Gelkammer gefüllt. In jede Geltasche wurde ein Probevolumen von 5 µl pipettiert, das zuvor in einem Verhältnis von 5:1 mit einem Farbmix (0,6 % Bromphenolblau, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 50 % Glycerol v/v) gelöst worden war. Zur Darstellung des Molekulargewichtes wurde ein 100-base pair (bp)-Ladder (bp-ladder = Basenpaarleiter) von Pharmacia (1:4-Verdünnung mit Bidest) verwendet, der in eine separate Geltasche pipettiert wurde. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V für etwa 80 Minuten. Zur Darstellung der DNA-Banden wurde das Gel in Ethidiumbromid (2 µg/ml) für 10 Minuten gefärbt und anschließend für 10 Minuten in TAE-Puffer entfärbt (Abb. 4). Mittels eines Fotoapparates (Blende: 8-11, Belichtungszeit: 1 sec) wurde das Ergebnis auf einen Polaroidfilm Typ 667 Professional fest gehalten.

### 3.6.4 Nachweis des ACE I/D-Genpolymorphismus

#### 3.6.4.1 PCR-abhängige Amplifikation des ACE/DNA-Segmentes

Im Jahre 1990 entdeckten Cambien et al. zum ersten Mal den Genpolymorphismus im Angiotensin II-converting enzym [70]. Das ACE-Gen liegt im Chromosom 17 in q23 und ist ca. 21 kb lang. Bei dem ACE Insertions-/Deletions-Genpolymorphismus wurde dieser Polymorphismus als eine 287 Basenpaare lange DNA-Sequenz innerhalb des Introns 16 (Insertion, I-Allel; Deletion, D-Allel) charakterisiert. Daraus resultierten drei Genotypen: II, ID und DD. Probanden mit dem mutierten D-Allel hatten erhöhte ACE-Serumspiegel [3, 70]. Die Amplifikation der DNA-Proben incl. Kontroll-PCR der ersten 960 der insgesamt 2240 Patienten wurde von Frau Tanja Weiß und Herrn Oliver Schwartz durchgeführt [3]. Die Amplifikation des ACE/DNA-Segmentes fand bei einem Gesamtvolumen von 50 µl mit folgender Zusammensetzung statt: 20 pmol eines jeden Primers, 250 µmol/l eines jeden

Desoxynukleosidtriphosphats (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 1 U Taq Polymerase, 1,5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 50 mmol/l KCl, 10 mmol/l Tris-HCl (pH 8,4) und 0,01 mg/ml Gelatine (Tab. 6).

Die Primer hatten folgende Sequenzen:

*Sense-Primer: (5`)* CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT (3`)

(MG = 7276,5 g/mol)

*Antisense-Primer: (5`)* GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T (3`).

(MG = 7739,2 g/mol)

Tab. 6: Zusammensetzung der Probe zur Amplifikation des ACE-DNA-Segmentes

Reagenzien	Endkonzentration ( in 50 µl)
Sense-Primer	20 pmol
Antisense-Primer	20 pmol
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	250 µmol/l
Taq-Polymerase	1 U
PCR-Puffer	10 mmol/l Tris-HCl, pH 8,4 50 mmol/l KCl 1,5 mmol/l MgCl <sub>2</sub> 0,01 mg/ml Gelatine
Proben	100 ng DNA
Negative Kontrolle	destilliertes. autoklaviertes Wasser

Die Amplifikation erfolgte in einem Thermocycler in 30 Zyklen, wobei jeder Zyklus aus Denaturierung (1 min bei 94°C), Hybridisierung (1 min bei 58°C) und DNA-Synthese (1 min bei 72°C) bestand (Tab. 7). Die Amplifikate wurden anschließend entsprechend ihrer Länge in einem 2 %igen Agarose-Gel aufgetrennt und durch Zusatz von Ethidiumbromid dargestellt:

- I-Allel: Vorhandensein einer 490 bp-Bande
- D-Allel: Vorhandensein einer 190 bp-Bande

Tab. 7: **Amplifikationszyklen der PCR des ACE-DNA-Segmentes**

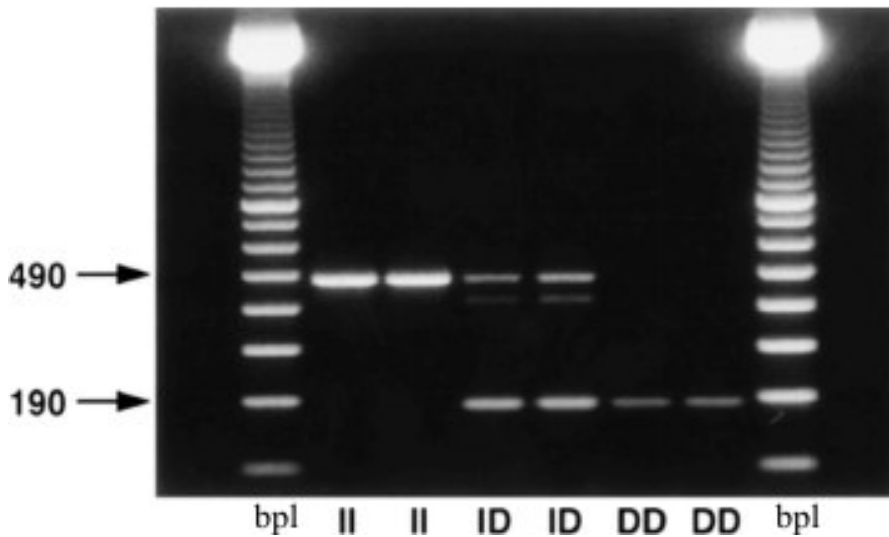
Vorgang	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	94°C	1 min	30
Hybridisierung	58°C	1 min	30
DNA-Synthese	72°C	1 min	30

#### 3.6.4.2 Agarose-Gel-Elektrophorese zur Trennung der DNA-Sequenzen des ACE-Gens

Die Agarose-Gel-Elektrophorese der amplifizierten DNA des ACE-Gens benötigte 2 %ige horizontale Agarosegele (Agagel Mini von Biometra/ Gelgröße 6,5 × 9,0 cm).

Aus jeder PCR-Probe wurde 5 µl entnommen und mit 1 µl Farbmix (0,6 % Bromphenolblau, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 50 % Glycerol v/v) vermischt. Mittels einer Gilson-Pipette wurde davon jeweils 5 µl in eine Geltasche pipettiert. Als Molekulargewichtsmarker diente ein „100 bp ladder“ von Pharmacia (1:4-Verdünnung mit H<sub>2</sub>O), der in einer eigenen Spur aufgetragen wurde. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 100 V für ca. 80 Minuten. Nach Anfärbung des Gels in einer Ethidiumbromid-Lösung (2 µg/ml Ethidiumbromid) und Waschung in einer TAE-Lösung wurden die entstandenen Banden unter UV-Licht betrachtet. Anschließend erfolgte die Photodokumentation (Polaroidfilm Typ 667 Professional, Blende 8-11, Belichtungszeit 1 sec.). Das Vorhandensein einer 490 bp-Bande zeigte ein I-Allel, die 190 bp-Bande konnte dem D-Allel zugeordnet werden (Abb. 7).

Abb. 7: **Photographische Dokumentation der Polymerasekettenreaktion des ACE-Gens mittels Agarosegelelektrophorese**



Unter UV-Licht wurde jedes PCR-Produkt des ACE-Gens in einer 2 %igen Agarosegelelektrophorese sichtbar gemacht. M entspricht den Basenpaarleitern: Linien 1 und 2 zeigen ein PCR-Produkt von ACE II-Homozygoten mit Vorhandensein einer 490 bp I-Bande. Linien 3 und 4 zeigen PCR-Produkte von Heterozygoten mit einem 190 bp D-Allel und einem 490 bp I-Allel (ID-Genotyp). Linien 5 und 6 zeigen jeweils ein PCR-Produkt von ACE DD-Homozygoten mit einem 190 bp langen D-Allel. Abkürzungen: bp, Basenpaar.

### 3.6.4.3 Kontroll-PCR zur Typisierung des ACE-I/D Genpolymorphismus

Lindpaintner et al. [49] konnte nachweisen, dass mit den herkömmlichen Amplifikationsverfahren eine bevorzugte Vermehrung des D-Allels erfolgte. Heterozygote wurden daher in etwa 5 % der Fälle als Homozygote mit DD-Genotyp fehltypisiert. Es wurde daher eine Kontroll-PCR durchgeführt, bei der mittels eines insertionsspezifischen Primers nur das I-Allel, nicht jedoch das D-Allel amplifiziert wurde. Die selektive Amplifikation des I-Allels wurde somit dadurch ermöglicht, dass ein Teil der Primer spezifisch zur Insertionssequenz war [76]. Es wurden daher die DNA von Probanden, bei denen in der ersten PCR zum Nachweis des ACE I/D Genotyps eine DD-Homozygotie festgestellt wurde (siehe Abschnitt 3.6.4), einer Kontroll-PCR unterzogen.

Der Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 µl enthielt 28 pmol sense-Primer, 27 pmol antisense-Primer (Tab. 9), 250 µl eines jeden Nukleosidtriphosphats (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 U Taq-Polymerase, 10 mmol/l Tris-HCl (pH 8,4), 50 mmol/l KCl, 1,5 mmol/l MgCl<sub>2</sub> und 0,01 mg/ml Gelatine (Tab. 8).



Tab. 8: **Zusammensetzung der Probe zur Amplifikation des ACE-I-Allels**

Reagenzien	Endkonzentration ( in 50 µl)
Sense-Primer	28 pmol
Antisense-Primer	27 pmol
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	250 µmol/l
Taq-Polymerase	1 U
PCR-Puffer	10 mmol/l Tris-HCl, pH 8,4 50 mmol/l KCl 1,5 mmol/l MgCl <sub>2</sub> 0,01 mg/ml Gelatine
Proben	100 ng DNA
Negative Kontrolle	destilliertes. autoklaviertes Wasser

Tab. 9: **Nukleotidsequenzen für die Kontroll-PCR des ACE I/D Genpolymorphismus**

ACE-H5a-Primer:	<b>(5') TGG GAC CAC AGC GCC CGC CAC TAA (3')</b> (MG = 7263,8 g/mol)
ACE-H5c-Primer:	<b>(5') TCG CCA GCC CTC CCA TGC CCA TAA (3')</b> (MG = 7176,8 g/mol)

Die PCR wurde nach 35 Zyklen beendet ( Denaturierung für 30 sec bei 94°C, Hybridisierung für 45 sec bei 67°C sowie Synthese für 2 min bei 72°C) [Tab. 10]. Anschließend wurden die elektrophoretisch getrennten DNA-Produkte mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht: Eine 335 bp-Bande wies das I-Allel nach.

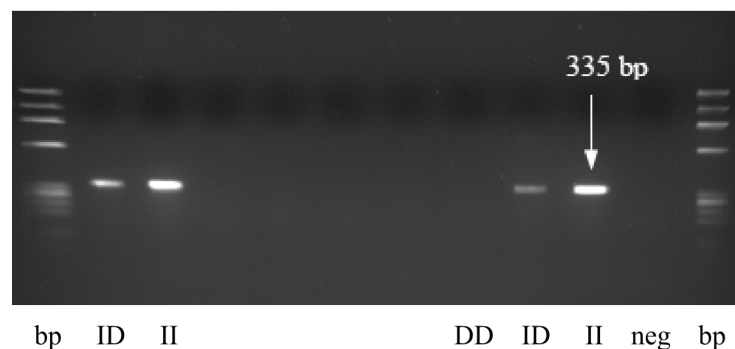
Tab. 10: **Amplifikationszyklus der Kontroll-PCR des ACE I/D Genpolymorphismus**

Vorgang	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	94°C	30 sec	35
Hybridisierung	67°C	45 sec	35
DNA-Synthese	72°C	2 min	35

#### 3.6.4.4 Agarose-Gel-Elektrophorese der Kontroll-PCR zur Typisierung des ACE-I/D Genpolymorphismus

Die Agarose-Gel-Elektrophorese der amplifizierten DNA des ACE-Gens benötigte 1,5 %ige horizontale Agarosegele (Agagel Mini von Biometra/ Gelgröße 6,5 × 9,0 cm). Aus jeder PCR-Probe wurde 2 µl entnommen und mit 5 µl Farbmix (40 mM Tris, 2 mM EDTA, 50 % Glycerol) vermischt. Mittels einer Gilson-Pipette wurde davon jeweils 7 µl in eine Geltasche pipettiert. Als Molekulargewichtsmarker diente ein „100 bp ladder“ von Pharmacia (1:4-Verdünnung mit H<sub>2</sub>O), der in einer eigenen Spur aufgetragen wurde. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 5 V/cm in TAE-Puffer. Nach Anfärbung des Gels in einer Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml Ethidiumbromid) wurden die entstandenen Banden unter UV-Licht betrachtet. Anschließend erfolgte die Photodokumentation (Polaroidfilm Typ 667 Professional, Blende 8-11, Belichtungszeit 1 sec.). Das Vorhandensein einer 335 bp-Bande zeigte ein I-Allel an (ID-Heterozygote und II-Homozygote), während ein Fehlen dieser Bande jeweils einen DD-Genotyp nachwies (Abb. 8).

Abb. 8: Photographische Dokumentation der Polymerasekettenreaktion des ACE-Gens mittels Agarosegelelektrophorese



Mittels UV-Lichts wurden die Banden in einer 1,5 %igen Agarosegelelektrophorese illuminiert. Das insertionsspezifische Produkt mit einer Länge von 335 Basenlängen entsprach dem II- bzw. ID-Allel. Abkürzungen: neg, negativ; DD, DD-Allel; ID, ID-Allel; II, II-Allel; bp, Basenpaar.

Durch die Kontroll-PCR konnte ermittelt werden, dass 31 Probanden, bei denen nach der ersten Methode (siehe 3.6.4.1) ein heterozygoter Genotyp festgestellt worden war, tatsächlich eine II-Homozygotie aufwiesen.

## 3.7 Statistik

Für die statistischen Analysen wurde das Programm SPSS für Windows (Version 7.52) verwendet. Auf Genotyp-abhängige Unterschiede wurden mittels Kruskal-Wallis-1-Way Anova (kontinuierliche Variablen) bzw. mittels  $\chi^2$ -Test (binäre Variablen) überprüft. Etablierte Risikofaktoren der KHK und des Myokardinfarktes wurden mit der multiplen Regressionsanalyse (Schweregrad der KHK, Gensini Score), oder mit der multiplen logistischen Regression (An/Abwesenheit von KHK, MI) bestimmt. Ein zweiseitiger p-Wert kleiner als 0,05 wurde als signifikanter Unterschied definiert. Die Verteilung von kontinuierlichen Variablen wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov Goodness of Fit Test analysiert. Mit Hilfe des  $\chi^2$ -Testes wurde die Übereinstimmung der Genotypverteilung mit dem Hardy-Weinberg Gleichgewicht überprüft. Die Beziehung der AT<sub>1</sub>R- und ACE I/D-Genpolymorphismen zum Risiko der KHK und des Myokardinfarktes wurde mit Hilfe der multiplen logistischen Regression unter Berücksichtigung der etablierten Risikofaktoren bestimmt. Es wurden daher koronare Risikofaktoren, die eine signifikante Assoziation zur KHK zeigten, in die Berechnung mit einbezogen. So genannte Odds ratios wurden zur Einschätzung des relativen Risikos des AA- Alles zum KHK-Risiko oder MI-Risiko berechnet. Für jede Odds ratio wurde ein zweiseitiger p-Wert und ein 95 %iges Konfidenzintervall unter Berücksichtigung der koronaren Risikofaktoren bestimmt. Potenzielle Assoziationen der AT<sub>1</sub>R- und ACE I/D-Genpolymorphismen zum Schweregrad der KHK wurden – ebenfalls unter Berücksichtigung koronarer Risikofaktoren – mittels multipler Regressionsanalysen untersucht.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung der Studienpopulation

Die vorliegende Studie setzte sich aus 2244 männlichen Patienten zusammen, die in der Klinik für Kardiologie und Angiologie des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Giessen sowie in der Kerckhoff-Klinik der Max-Planck-Gesellschaft in Bad Nauheim koronarangiographiert worden waren. Alle Patienten gaben ihr Einverständnis zu dieser Studie und wurden über ihr kardiovaskuläres Risikoprofil, wie z.B. Zigarettenrauchen, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, familiäre Disposition, ausführlich befragt. Bei etwa 80 % der Patienten bestand vor der Koronarangiographie bereits eine verifizierte, koronare Herzkrankheit (KHK), oder zumindest ein dringender Verdacht auf eine signifikante Stenosierung der Herzkranzarterien (> 50 %). Die restlichen 20 % der Probanden wurden zur Klärung der linksventrikulären Funktion invasiv diagnostiziert. Abhängig vom Stenosegrad der Koronarien ließ sich die Studienpopulation in 4 Gruppen einteilen, wobei ein Koronarbefund mit weniger als 50 %iger Verengung der Herzkranzarterien den Ausschluss einer signifikanten KHK bedeutete. Das Durchschnittsalter aller Probanden betrug  $61,5 \pm 9,7$  Jahre.

#### 4.1.1 Altersabhängigkeit des Auftretens der koronaren Herzerkrankung und des Myokardinfarktes

Die erste Gruppe bestand aus 505 Patienten ohne stenosierende KHK (Koronargefäßstenosen < 50%), das Durchschnittsalter betrug  $58,5 \pm 10,6$  (Tab. 11). Patienten mit koronarer 1-Gefäßerkrankung (n = 448) waren durchschnittlich  $61,1 \pm 9,7$  Jahre alt. Die dritte Gruppe mit koronarer 2-Gefäßerkrankung enthielt 487 Patienten. Hier betrug das Durchschnittsalter  $62,6 \pm 9,7$  Jahre. Die vierte Gruppe bestand aus 804 Patienten mit koronarer 3-Gefäßerkrankung und einem Durchschnittsalter von  $63,6 \pm 8,6$  Jahren. Alle Angaben wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben (Tab. 11).

**Tab. 11: Durchschnittsalter der Patienten entsprechend ihrem koronaren Gefäßstatus**

	Anzahl (n)	Alter (MW ± SA)
0-GE	505	58,5 ± 10,6
1-GE	448	61,1 ± 9,7
2-GE	487	62,6 ± 9,7
3-GE	804	63,6 ± 8,6

Die Studienpopulation setzte sich aus 2267 männlichen Probanden zusammen, die in der Klinik für Kardiologie und Angiologie des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Giessen sowie in der Kerckhoff-Klinik der Max-Planck-Gesellschaft in Bad Nauheim koronarangiographiert wurden. Dargestellt ist das mittlere Alter ± Standardabweichung in Patientengruppen mit Null-, Ein-, Zwei- und Dreifäßerkrankung. Abkürzungen: 0-GE, Patienten ohne Gefäßerkrankung (Koronarstenosen < 50%); 1-GE, Patienten mit Eingefäßerkrankung; 2-GE, Patienten mit Zweifäßerkrankung; 3-GE, Patienten mit Dreifäßerkrankung; MW, Mittelwert; SA, Standardabweichung; n, Anzahl.

Zusätzlich wurde die Studienpopulation in eine Gruppe mit Myokardinfarkt und eine Gruppe ohne Myokardinfarkt unterteilt (Tab. 12). Die erste Gruppe bestand aus 1057 Patienten mit einem Durchschnittsalter von 62,1 ± 9,5. Dagegen fanden sich 1187 Patienten ohne abgelaufenen Myokardinfarkt mit einem Durchschnittsalter von 61,4 ± 9,9. Alle Angaben wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben.

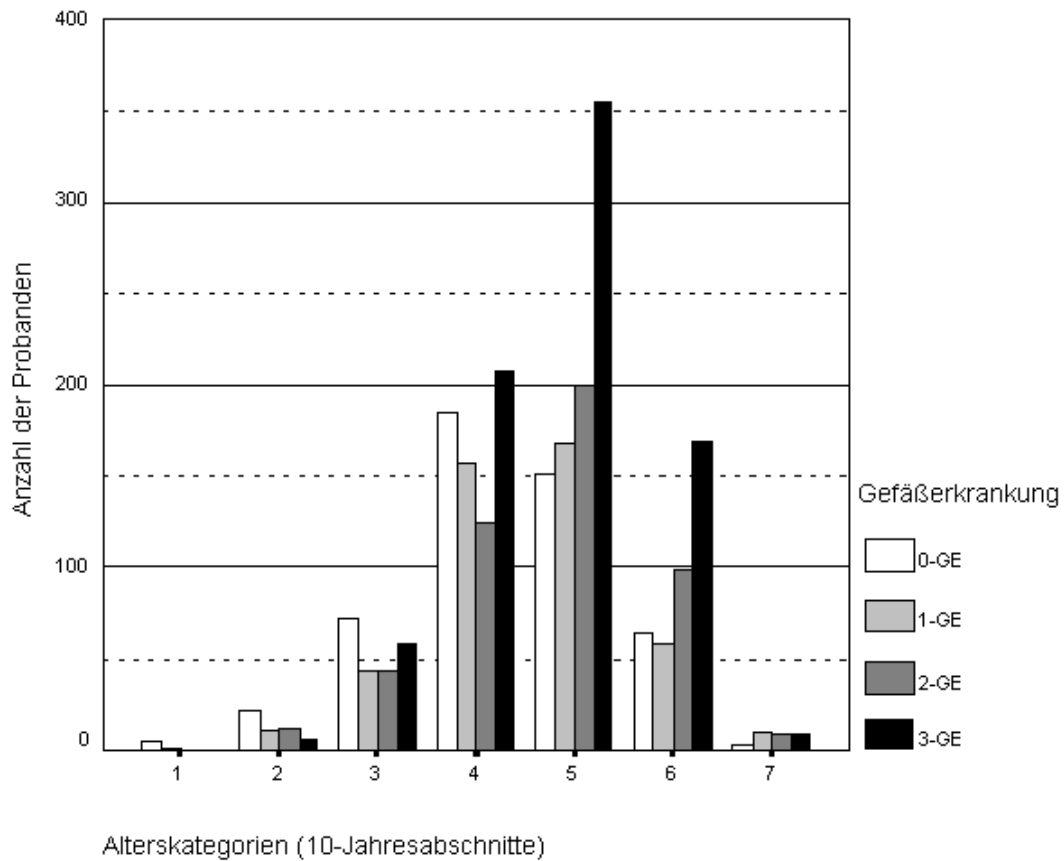
**Tab. 12: Durchschnittsalter der Patienten in Abhängigkeit vom Auftreten eines Myokardinfarkts**

	Anzahl (n)	Alter (MW ± SA)
+ Myokardinfarkt	1057	62,1 ± 9,5
- Myokardinfarkt	1187	61,4 ± 9,9

In Abhängigkeit vom Auftreten bzw. Fehlen eines Myokardinfarkts wurde das Durchschnittsalter der Patienten ermittelt. Das mittlere Alter mit entsprechender Standardabweichung ist in beiden Gruppen dargestellt. Abkürzungen: + Myokardinfarkt, Patienten mit einem Myokardinfarkt; - Myokardinfarkt, Patienten ohne einen Myokardinfarkt; MW, Mittelwert; SA, Standardabweichung; n, Anzahl.

Weiterhin wurden die Patienten in Abhängigkeit vom koronaren Gefäßstatus in 7 Alterskategorien eingeteilt (Abb. 9): Alterskategorie 1: 11 – 20 Jahre; Alterskategorie 2: 21 – 30 Jahre; Alterskategorie 3: 31 – 40 Jahre; Alterskategorie 4: 41 – 50 Jahre; Alterskategorie 5: 51 – 60 Jahre; Alterskategorie 6: 61 – 70 Jahre; Alterskategorie 7: 71 – 80 Jahre. Auffällig war dabei die Zunahme der 2- und 3-Gefäßerkrankungen mit zunehmendem Alter. Dementsprechend sank der relative Anteil der Patienten ohne signifikante Stenose mit zunehmendem Alter.

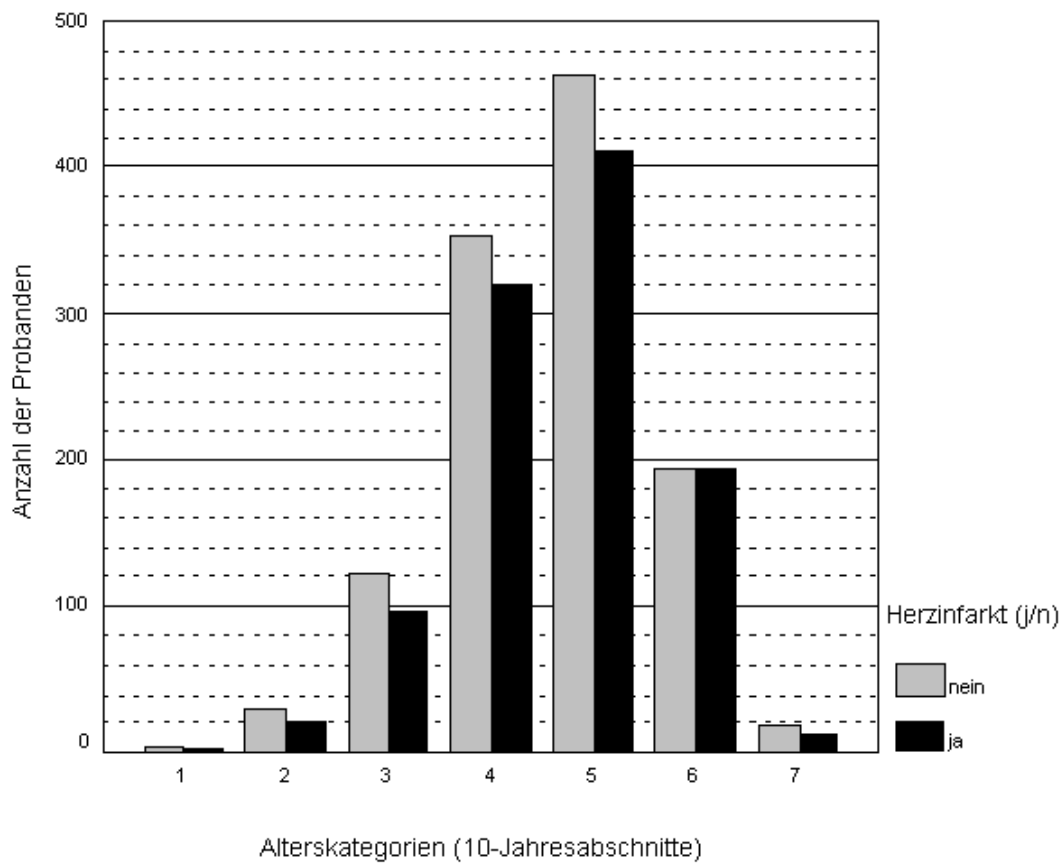
Abb. 9: **Anzahl der Probanden ohne signifikante Gefäßerkrankung oder mit Ein- bzw. Mehrgefäßerkrankung in den jeweiligen Alterskategorien**



Abkürzungen: 0-GE, Patienten ohne Koronarstenosen > 50 %; 1-GE, Patienten mit Eingefäßerkrankung; 2-GE, Patienten mit 2-Gefäßerkrankung; 3-GE, Patienten mit 3-Gefäßerkrankung. Alterskategorie 1: 11 – 20 Jahre; Alterskategorie 2: 21 – 30 Jahre; Alterskategorie 3: 31 – 40 Jahre; Alterskategorie 4: 41 – 50 Jahre; Alterskategorie 5: 51 – 60 Jahre; Alterskategorie 6: 61 – 70 Jahre; Alterskategorie 7: 71 – 80 Jahre.

Zusätzlich wurde die Studienpopulation abhängig von der Alterskategorie in eine Gruppe von Patienten mit Myokardinfarkt und eine Probandengruppe ohne Myokardinfarkt unterteilt (Abb. 10). Es konnte in relativ jungen Lebensabschnitten eine relativ hohe Häufigkeit des Auftretens eines Myokardinfarktes beobachtet werden. Der höchste relative Anteil der Myokardinfarktpatienten wurde in der Altersgruppe zwischen 61 und 70 Jahren beobachtet.

Abb. 10: **Anzahl der Probanden in der jeweiligen Alterskategorie mit oder ohne Myokardinfarkt**

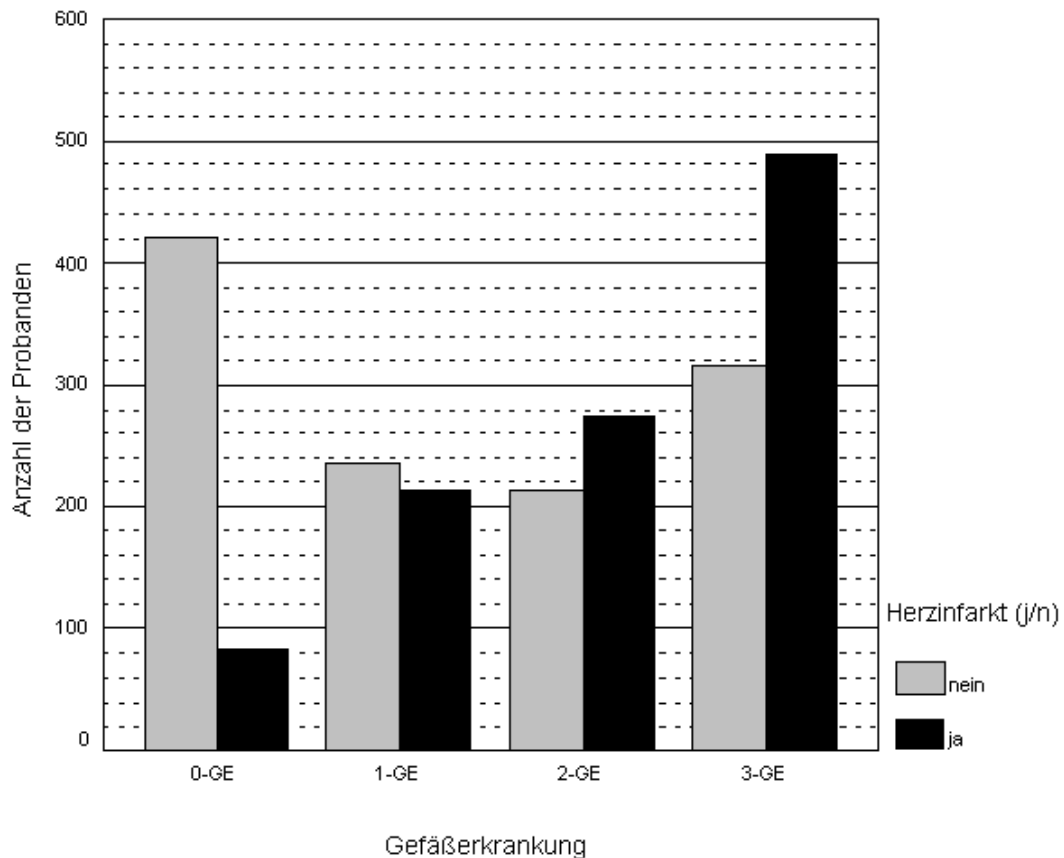


Die Gesamtpopulation bestand aus 2244 Patienten. Das Alter der Probanden wurde in 7 Zehnjahreskategorien eingeteilt. Alterskategorie 1: 11-20 Jahre; 2: 21-30 Jahre; 3: 31-40 Jahre; 4: 41-50 Jahre; 5: 51-60 Jahre; 6: 61-70 Jahre; 7: 71-80 Jahre. Eine Koronargefäßstenosierung  $\geq 50\%$  wurde als erkrankt definiert.

#### 4.1.2 Verhältnis zwischen Koronarer Herzkrankheit und Myokardinfarkt

Die vorliegende Studie zeigte wie erwartet eine ausgeprägte Assoziation zwischen der koronaren Herzerkrankung und dem Auftreten eines Myokardinfarktes ( $p = 0,00001$ ). Wie aus Abbildung 11 ersichtlich wird, nahm die Inzidenz an Herzinfarkten mit steigender Zahl der atherosklerotisch veränderten Herzkranzgefäße deutlich zu.

Abb. 11: **Anzahl der Probanden mit oder ohne Myokardinfarkt in Abhängigkeit vom koronaren Gefäßstatus**

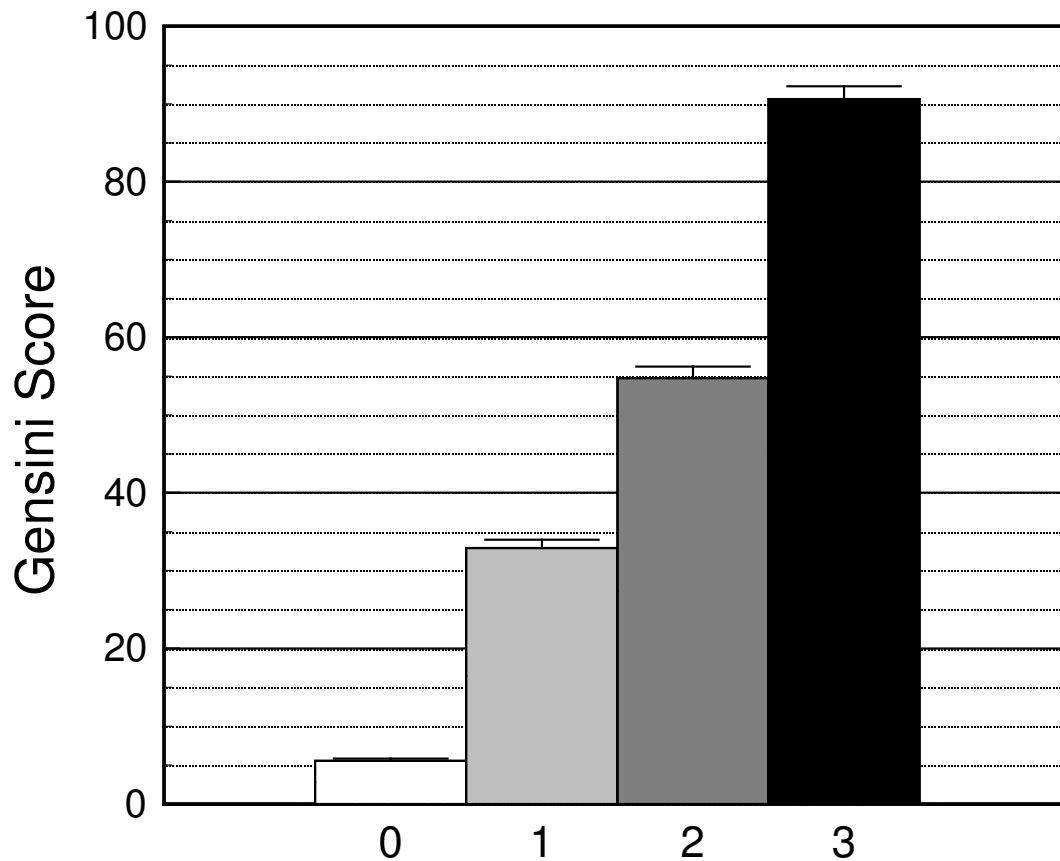


Die Myokardinfarktinzidenz nahm mit steigender Zahl der atherosklerotisch veränderten Koronarien zu. Die Diagnose des Myokardinfarktes erfolgte nach den Kriterien der WHO. Abkürzungen: 0-GE, Patienten ohne Herzkranzgefäßverengungen > 50 %; 1-GE, Patienten mit Ein-Gefäßkrankung; 2-GE, Patienten mit 2-Gefäßkrankung; 3-GE, Patienten mit 3-Gefäßkrankung.

Durch die Berechnung des Gensini Scores konnte eine genauere Einteilung der koronaren Herzkrankheit bezüglich der Lokalisation und des Schweregrades der Verengungen an den Koronarien vorgenommen werden. Dabei ließ sich jeweils eine positive Korrelation zwischen der Höhe des Gensini Scores und der Schwere der koronaren Herzkrankheit bzw. der Inzidenz eines Myokardinfarktes beobachten ( $p = 0,00001$ ) (Abb. 12, 13). Ein mittlerer Gensini Score von 5 wurde für 505 Patienten ohne signifikante, koronare Gefäßkrankung (Koronarstenosen < 50%) berechnet, dagegen hatten z.B. 804 Patienten mit einer koronaren Dreifäßkrankung einen mittleren Gensini Score von 90 (Abb. 12).



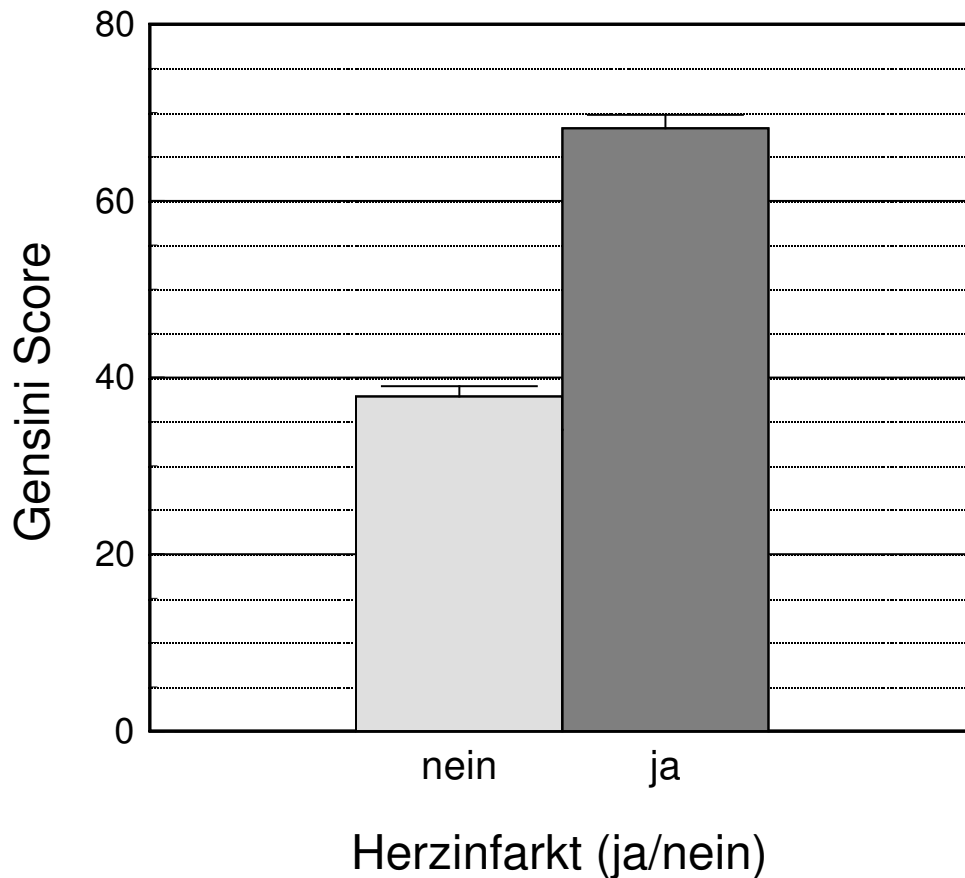
Abb. 12: **Beziehung zwischen der Höhe des Gesini Scores und der Schwere der koronaren Herzkrankheit**



Eine Zunahme der Schwere der koronaren Herzkrankheit bedeutete auch eine Erhöhung des Gensini Scores. Der mittlere Gensini Score lag zwischen 0 und 92,5. Patienten mit 0-, 1-, 2- und 3-Gefäßerkrankung wurden miteinander verglichen. Abkürzungen: 0-GE, Patienten ohne Koronarstenosen  $\geq 50\%$ ; 1-GE, Patienten mit Eingefäßerkrankung; 2-GE, Patienten mit 2-Gefäßerkrankung; 3-GE, Patienten mit 3-Gefäßerkrankung.

Auch hinsichtlich eines Myokardinfarktes konnte eine deutliche Korrelation zwischen der Höhe des Gensini Scores und der Inzidenz eines Myokardinfarktes beobachtet werden ( $p = 0,00001$ ). Patienten mit Myokardinfarkt hatten einen nahezu doppelt so hohen Gensini Score wie Probanden ohne MI (Abb. 13).

Abb. 13: **Verhältnis zwischen der Höhe des Gensini Scores und der Inzidenz eines Myokardinfarktes**



Die Studienpopulation wurde in Patienten mit Myokardinfarkt (n = 1057) und Probanden ohne Myokardinfarkt (n = 1187) unterschieden. Die Diagnose eines Myokardinfarktes erfolgte nach WHO-Kriterien. Je höher der Gensini Score, umso höher war das Risiko, einen Myokardinfarkt zu erleiden.

#### **4.1.3 Nachweis etablierter Risikofaktoren und protektiver Faktoren der Koronaren Herzkrankheit**

Die vorliegende Studie konnte eine positive Korrelation zwischen dem Risiko der koronaren Herzkrankheit und den Parametern Alter, Apolipoprotein B, Lipoprotein (a), Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie und Nikotinabusus aufzeigen. Apolipoprotein AI wurde als protektiver Faktor identifiziert. Die Gegenüberstellung der Probandengruppe ohne koronare Herzkrankheit (< 50 %) zur Patientengruppe mit koronarer Ein- oder Mehrgefäßerkrankung ergab höhere Mittelwerte für Apolipoprotein B (p = 0,005), Lipoprotein (a) (p = 0,0001), Nikotinabusus (p = 0,01) und Alter der Patienten (p = 0,0001). Zudem fanden sich Patienten

mit koronarer Herzkrankheit prozentual häufiger unter den Diabetikern ( $p = 0,02$ ) und Hypertonikern ( $p = 0,01$ ) (Tab. 13).

Tab. 13: **Nachweis etablierter Risikofaktoren und protektiver Faktoren der koronaren Herzkrankheit**

<b>Parameter</b>	<b>Kontrollgruppe (0-GE)</b>	<b>Fallgruppe (1-3 GE)</b>	<b>Signifikanz</b>
<b>Alter (Jahre)</b>	58,5 ± 11	63,2 ± 9	0,0001
<b>Apo-AI (g/l)</b>	1,47 ± 0,3	1,41 ± 0,3	0,001
<b>Apo-B (g/l)</b>	1,21 ± 0,3	1,32 ± 0,4	0,005
<b>Lp(a) (mg/dl)</b>	21 ± 31	31 ± 39	0,0001
<b>Cholesterin (mg/dl)</b>	205 ± 44	213 ± 43	ns
<b>Triglyceride (mg/dl)</b>	143 ± 90	156 ± 90	ns
<b>Diab. mellitus (%)</b>	11	22	0,02
<b>Arterieller Hypertonus (%)</b>	54	65	0,01
<b>Nikotinabusus (py)</b>	19,2 ± 23	22,5 ± 25	0,01
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	26,9 ± 4	26,9 ± 3	ns

Alle Patienten wurden ausführlich über Risikofaktoren wie Zigarettenrauchen, Hypertonie, Diabetes mellitus u.a. befragt. Die Angaben wurden anhand der vorliegenden Krankenakten verifiziert. Zigarettenkonsum wurde als „pack-years“ (1 py = 20 Zigaretten/Tag über ein Jahr) angegeben. Arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus wurden als binäre Variablen definiert. Größe und Gewicht der Patienten wurden als Body-mass-index (kg/m<sup>2</sup>) angegeben. Alle Werte wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung oder in Prozent angegeben. Die Beziehung der Parameter zur KHK wurde mit der multiplen logistischen Regression berechnet. Abkürzungen: KHK, koronare Herzkrankheit; 0-GE, Patienten ohne Koronarstenosen > 50%; Apo-AI, Apolipoprotein AI; Apo-B, Apolipoprotein B; BMI, Body-mass-index; Lp(a), Lipoprotein (a); py, pack-year; ns, nicht signifikant.

## 4.2 AT<sub>1</sub>-Rezeptor A1166C Genpolymorphismus

### 4.2.1 Überprüfung der AT<sub>1</sub>R A1166C Genpolymorphismus auf Übereinstimmung mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Für die Gesamtpopulation und für alle untersuchten Subpopulationen wurde die Übereinstimmung der Genotypverteilung mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht überprüft.

Diese Analysen ergaben, dass sowohl in der Gesamtpopulation als auch in den einzelnen Untergruppen keine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht beobachtet werden konnte.

#### 4.2.2 Nachweis etablierter Risikofaktoren und protektiver Faktoren des Myokardinfarktes

Eine positive Korrelation zwischen dem Myokardinfarktisiko und den Parametern Alter der Probanden, Apo-B und Nikotinabusus wurde beobachtet. Die Gegenüberstellung der Probandengruppe ohne und mit Myokardinfarkt ergab höhere Mittelwerte für das Alter der Probanden ( $p < 0,002$ ), den Nikotinabusus ( $p < 0,002$ ) und Apo-B ( $p < 0,0002$ ). Apo-A1 ( $p < 0,0001$ ) wurde als protektiver Faktor mit niedrigerem Wert in der MI-Gruppe nachgewiesen (Tab. 14).

Tab. 14: Nachweis etablierter Risikofaktoren und protektiver Faktoren des Myokardinfarktes

Risikofaktor	- MI	+ MI	2P
Alter (J)	61,3 ± 9,9	62,2 ± 9,5	< 0,002
Apo-AI (g/l)	1,45 ± 0,29	1,40 ± 0,29	< 0,0001
Apo-B (g/l)	1,26 ± 0,34	1,29 ± 0,35	< 0,0002
Lp(a) (mg/dl)	27,2 ± 38	29,2 ± 37	n.s.
Cholesterin (mg/dl)	210 ± 43	209 ± 44	n.s.
Triglyceride (mg/dl)	152 ± 95	156 ± 88	n.s.
Diab. mellitus (%)	17	19	n.s.
Arterieller Hypertonus (%)	63	61	n.s.
Nikotinabusus (py)	19,9 ± 24	24,4 ± 26	< 0,002
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26,9 ± 3,4	26,9 ± 3,3	n.s.

Alle Patienten wurden über Nikotinabusus, Hypertonus und Diabetes mellitus befragt. Menge und Dauer des Zigarettenkonsums wurden als „pack-years“ (1 py = 20 Zigaretten/Tag über ein Jahr) angegeben. Die Angaben über Hypertonus und Diabetes mellitus wurden als binäre Variablen definiert. Größe und Gewicht der Patienten wurden in den Body-Mass-Index (kg/m<sup>2</sup>) umgerechnet. Alle Werte wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung oder in Prozent angegeben. Die Beziehung der Parameter zur KHK wurde mit der multiplen logistischen Regression berechnet. Signifikantes Ergebnis bei  $p < 0,05$ .

Abkürzungen: Apo-AI, Apolipoprotein AI; Apo-B, Apolipoprotein B; BMI, Body-mass-index; Lp(a), Lipoprotein (a); py, pack-year; ns, nicht signifikant; - MI, Probanden ohne Myokardinfarkt; + MI, Patienten mit Myokardinfarkt.

#### 4.2.3 Etablierte Risikofaktoren und protektive Faktoren der koronaren Herzkrankheit in Abhängigkeit vom AT<sub>1</sub>-Rezeptor A/C Genpolymorphismus

Bezüglich der koronaren Risikofaktoren bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen des AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Genpolymorphismus (Tab. 15). Auch z.B. in der Kontrollgruppe ohne signifikante Stenose wurden bezüglich der klassischen koronaren Risikofaktoren keine Genotyp-abhängigen Unterschiede gefunden (Abb. 16).

Tab. 15: Etablierte Risikofaktoren und protektive Faktoren der koronaren Herzkrankheit in Abhängigkeit von den A1166C-Genotypen

Risikofaktor	AA	AC	CC	2p
Alter (J)	63,2 ± 9	63,2 ± 9	63,5 ± 9	ns
Apo-AI (g/l)	1,41 ± 0,3	1,42 ± 0,3	1,41 ± 0,3	ns
Apo-B (g/l)	1,32 ± 0,3	1,32 ± 0,4	1,30 ± 0,3	ns
Lp(a) (mg/dl)	30 ± 38	32 ± 41	31 ± 39	ns
Cholesterin (mg/dl)	214 ± 43	212 ± 45	216 ± 40	ns
Triglyceride (mg/dl)	156 ± 88	157 ± 95	154 ± 75	ns
Diab. mellitus (%)	22	21	23	ns
Hypertonus (%)	64	66	63	ns
Nikotinabusus (py)	22,9 ± 25	23,2 ± 27	17,0 ± 21	ns
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26,9 ± 3	26,8 ± 3	26,9 ± 3	ns

Alle Patienten wurden über Risikofaktoren wie Alter, Gewicht, Nikotinabusus, Diabetes mellitus, Hypertonus, befragt. Die Angaben wurden z.B. durch Krankenunterlagen überprüft. Apolipoprotein AI und B, Body-mass-index, Cholesterin, Lipoprotein (a), Nikotinabusus und Triglyceride wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben. Die Angaben zur Hypertonie und zum Diabetes mellitus wurden als relative Häufigkeiten (Prozent) angegeben. Auf Genotyp-abhängige Unterschiede wurden mittels Kruskal-Wallis-1-Way Anova (kontinuierliche Variablen) bzw. mittels  $\chi^2$ -Test (binäre Variablen) überprüft. Abkürzungen: Apo-AI, Apolipoprotein AI; Apo-B, Apolipoprotein B; BMI, Body-mass-index; Lp(a), Lipoprotein (a); ns, nicht signifikant.

Tab. 16: **Etablierte Risikofaktoren und protektive Faktoren der koronaren Herzkrankheit in Abhängigkeit von den A1166C-Genotypen, hier in der Kontrollgruppe ohne koronare Herzkrankheit**

Risikofaktor	AA	AC	CC	2p
Alter (J)	58,6 ± 11	58,5 ± 10	57,6 ± 11	ns
Apo-AI (g/l)	1,46 ± 0,3	1,49 ± 0,3	1,44 ± 0,3	ns
Apo-B (g/l)	1,19 ± 0,3	1,22 ± 0,3	1,22 ± 0,3	ns
Lp(a) (mg/dl)	20 ± 30	22 ± 29	23 ± 38	ns
Cholesterin (mg/dl)	204 ± 42	206 ± 45	209 ± 44	ns
Triglyceride (mg/dl)	149 ± 101	137 ± 77	139 ± 74	ns
Diab. mellitus (%)	10	12	14	ns
Hypertonus (%)	52	55	57	ns
Nikotinabusus (py)	19,6 ± 25	18,4 ± 22	20,1 ± 21	ns
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26,8 ± 4	26,9 ± 3	27,5 ± 4	ns

Alle Patienten wurden über Risikofaktoren, wie Alter, Gewicht, Nikotinabusus, Diabetes mellitus, Hypertonus befragt. Die Angaben wurden z.B. durch Krankenunterlagen überprüft. Apolipoprotein AI und B, Body-mass-index, Cholesterin, Lipoprotein (a), Nikotinabusus und Triglyceride wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben. Die Angaben über Hypertonie und Diabetes mellitus wurden als relative Häufigkeiten (Prozent) angegeben. Auf Genotyp-abhängige Unterschiede wurden mittels Kruskal-Wallis-1-Way Anova (kontinuierliche Variablen) bzw. mittels  $\chi^2$ -Test (binäre Variablen) überprüft. Abkürzungen: Apo-AI, Apolipoprotein AI; Apo-B, Apolipoprotein B; BMI, Body-mass-index; Lp(a), Lipoprotein (a).

#### 4.2.4 **Beziehung zwischen dem AT<sub>1</sub>-A1166C-Genpolymorphismus und dem Risiko bzw. dem Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit**

Abhängig vom koronaren Gefäßstatus wurden die A- und C-Allelfrequenzen der 2244 Studienteilnehmer miteinander verglichen. Die koronare Herzkrankheit wurde zum einen über den Gefäßstatus der Probanden und zum anderen über den Gensini Score definiert (Abb. 12). Probanden mit einem Stenosierungsgrad der Herzkranzgefäße  $\geq 50\%$  wurden als erkrankt angesehen. Im Vergleich der Probanden mit 0- (Koronarstenosen  $< 50\%$ , n = 505), 1- (n = 448), 2- (n = 487) oder 3-Gefäßerkrankung (n = 804) konnten keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der A- und C-Alle festgestellt werden (Tab. 17). Auch bezüglich des Gensini Scores als Parameter des KHK-Schweregrades ergaben sich keine Unterschiede zwischen den AT<sub>1</sub>-R-Genotypen (Ergebnisse nicht dargestellt). Die C-Allelfrequenz bei KHK-Patienten (0,28) unterschied sich nicht signifikant von der C-

Allelfrequenz der gesunden Probanden (0,27). Patienten mit Ein- (0,28), Zwei- (0,27) oder Dreigefäßerkrankung (0,28) hatten praktisch die gleichen C-Allelfrequenzen (Tab. 17). Bei zusätzlichen Untersuchungen in Niedrig- und Hochrisikogruppen fand sich ebenso keine Assoziationen des AT<sub>1</sub>-A1166C-Genpolymorphismus zum KHK-Risiko bzw. zum KHK-Schweregrad (Ergebnisse nicht dargestellt). Gleichartige Ergebnisse wurden auch bezüglich des Gensini Scores erhalten. Alle drei Genotypen wiesen in Niedrig- und Hochrisikogruppen nahezu identische Gensini Scores auf (Ergebnisse nicht dargestellt).

Tab. 17: **Verteilung der AT<sub>1</sub>R-Genotypen bei Personen ohne signifikante Koronarstenose und Patienten mit 1-, 2- und 3-Gefäßerkrankung**

Erkrankung	Durchschnitts- alter	Genotypen n	Genotypen			Allelfrequenzen	
			AA	AC	CC	A (95% CI)	C (95% CI)
<b><i>KHK(≥50%Stenose)</i></b>							
0-Gefäßerkrankung	58,5 ± 10,6	505	264	194	47	0,71 (0,69-0,74)	0,29 (0,26-0,31)
1-Gefäßerkrankung	61,1 ± 9,7	448	238	173	37	0,72 (0,69-0,75)	0,28 (0,25-0,31)
2-Gefäßerkrankung	62,6 ± 9,7	487	256	196	35	0,73 (0,70-0,76)	0,27 (0,25-0,30)
3-Gefäßerkrankung	63,6 ± 8,6	804	427	307	70	0,72 (0,70-0,74)	0,28 (0,26-0,30)

Die koronare Herzkrankheit wurde mittels des durch Koronarangiographie erhobenen Gefäßstatus der 2244 Probanden definiert. Koronargefäße ab einem Stenosegrad von  $\geq 50\%$  wurden als erkrankt angesehen und entsprechend der Anzahl der erkrankten Gefäße in 1-, 2- oder 3-Gefäßerkrankungen unterteilt. Der AT<sub>1</sub>R-Genpolymorphismus wurde mittels Polymerasekettenreaktion, Restriktionsenzymbehandlung und anschließender Elektrophorese typisiert (AA-, AC-, CC-Genotyp). Die Konfidenzintervalle sind in Klammern angegeben.

Abkürzungen: KHK, koronare Herzkrankheit; CI, Konfidenzintervall.

#### 4.2.5 **Beziehung zwischen dem AT<sub>1</sub>-A1166C-Genpolymorphismus und dem Myokardinfarkttrisiko**

Bei den Patienten mit oder ohne abgelaufenen Myokardinfarkt konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich des AT<sub>1</sub>-A1166C-Genotypus festgestellt werden (Tab. 18). Hier standen sich 1187 Probanden ohne Myokardinfarkt 1057 Patienten mit mindestens einem abgelaufenen Herzinfarkt gegenüber. Die C-Allelfrequenzen waren weder in der Kontrollgruppe noch im Krankenkollektiv über- bzw. unterrepräsentiert. Weder in den Niedrig- noch in den Hochrisikogruppen fand sich eine Assoziation des AT<sub>1</sub>-A1166C-Genpolymorphismus zum Myokardinfarkttrisiko (Ergebnisse nicht dargestellt).

Tab. 18: **Verteilung der AT<sub>1</sub>R-Genotypen bei Personen ohne Herzinfarkt und Patienten mit mindestens einem Myokardinfarkt**

Erkrankung	Durchschnitts- alter	Genotypen n	Genotypen			Allelfrequenzen	
			AA	AC	CC	A (95% CI)	C (95% CI)
<i>Myokardinfarkt</i>							
Probandengruppe	61,4 ± 9,9	1187	633	456	98	0,73 (0,71-0,74)	0,27 (0,26-0,29)
≥ 1 Myokardinfarkt	62,1 ± 9,5	1057	552	414	91	0,72 (0,70-0,74)	0,28 (0,26-0,30)

Patienten mit Myokardinfarkt wurden mit den ohne abgelaufenen Myokardinfarkt verglichen. Die AT<sub>1</sub>R-Genotypen der Patienten (AA, AC, CC) wurden mittels Polymerasekettenreaktion, Restriktionsenzymbehandlung und anschließender Elektrophorese typisiert. Die Konfidenzintervalle sind in Klammern angegeben.

Abkürzungen: n, Anzahl der Patienten; CI, Konfidenzintervall.

### 4.3 ACE I/D Genpolymorphismus

#### 4.3.1 Überprüfung des ACE I/D Genpolymorphismus auf Übereinstimmung mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Die Beziehung zwischen dem ACE I/D Genpolymorphismus und der koronaren Herzkrankheit wurde in der vorliegenden Studie an insgesamt 2267 Probanden untersucht [46]. Für die Gesamtpopulation und für alle untersuchten Subpopulationen wurde die Übereinstimmung der Genotypverteilung mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht überprüft. Diese Analysen ergaben, dass sowohl in der Gesamtstudie, als auch in den einzelnen Untergruppen keine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht beobachtet werden konnte (Ergebnisse nicht dargestellt).

#### 4.3.2 Etablierte Risikofaktoren und protektive Faktoren der koronaren Herzkrankheit in Abhängigkeit vom ACE I/D-Genpolymorphismus

2267 Probanden wurden auf die Verteilung der etablierten Risikofaktoren der koronaren Herzkrankheit (Apolipoprotein B, Body-mass-index, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, Hypertonie, Lipoprotein (a) und Nikotinabusus) untersucht. Die Altersverteilung der Probanden mit einem II-, ID- oder DD-Genotyp war praktisch gleich. In Bezug auf die Parameter Body-mass-index, Cholesterin, Apolipoprotein AI, Apolipoprotein B, Hypertonus, Triglyzeride, Diabetes mellitus, Lipoprotein (a) und Nikotinabusus konnten praktisch gleiche Durchschnittswerte bzw. relative Häufigkeiten beobachtet werden (Tab. 19). Gleichartige



Beobachtungen wurden in allen Niedrig- und Hochrisikogruppen gemacht (Ergebnisse nicht dargestellt)..

Sowohl in der Gesamtpopulation als auch in allen Subpopulationen wurden keine Abweichungen der Genotypverteilung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht beobachtet.

Tab. 19: **Etablierte Risikofaktoren und protektive Faktoren der koronaren Herzkrankheit in Abhängigkeit von den ACE I/D-Genotypen**

Risikofaktor	II	ID	DD	2p
Alter (J)	60,6 ± 9	61,8 ± 9	61,4 ± 9	ns
Apo-AI (g/l)	1,59 ± 0,29	1,56 ± 0,27	1,60 ± 0,28	ns
Apo-B (g/l)	1,39 ± 0,35	1,42 ± 0,41	1,40 ± 0,34	ns
Lp(a) (mg/dl)	29,24 ± 41,0	27,42 ± 35,53	23,94 ± 31,79	ns
Cholesterin (mg/dl)	211,7 ± 42,7	219,1 ± 42,6	212,9 ± 37,8	ns
Triglyceride (mg/dl)	155,1 ± 105,3	182,2 ± 143	173,2 ± 94	ns
Diab. mellitus (%)	14	14	15	ns
Hypertonus (%)	48	56	67	ns
Nikotinabusus (py)	13,5 ± 28,3	13,1 ± 28	14,5 ± 24,1	ns
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26,7 ± 3,5	26,7 ± 3,2	26,7 ± 3	ns

Alle Patienten wurden über Risikofaktoren wie Alter, Gewicht, Nikotinabusus, Diabetes mellitus, Hypertonus, befragt. Apolipoprotein AI und B, Body-mass-index, Cholesterin, Lipoprotein (a), Nikotinabusus und Triglyceride wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung, Hypertonie und Diabetes mellitus wurden als relative Häufigkeiten (Prozent) angegeben. Auf Genotyp-abhängige Unterschiede wurden mittels Kruskal-Wallis-1-Way Anova (kontinuierliche Variablen) bzw. mittels  $\chi^2$ -Test (binäre Variablen) überprüft. Signifikant war ein Ergebnis bei  $p < 0,05$ .

Abkürzungen: Apo-AI, Apolipoprotein AI; Apo-B, Apolipoprotein B; BMI, Body-mass-index; Lp(a), Lipoprotein (a); ns, nicht signifikant.

#### 4.3.3 **Beziehung zwischen dem ACE I/D Genpolymorphismus und dem Risiko und Schweregrad der koronaren Herzkrankheit**

Die I- und D-Allelfrequenzen von Probanden ohne signifikante Koronarstenose (n = 512) und Patienten mit koronarer 1- (455), 2- (490) und 3- (810) Gefäßerkrankung wurden miteinander verglichen. Die D-Allelfrequenzen der gesunden Probanden (0-Gefäßerkrankung = 0,51) zeigten im Vergleich zu den der Patienten mit koronarer 1- (0,53), 2- (0,55) und 3- Gefäßerkrankung (0,54) keine signifikanten Unterschiede (Tab. 20). Analoge Aussagen können somit auch für die I-Allelfrequenzen getroffen werden. In Bezug auf den KHK-

Schweregrad konnten ebenfalls keine Assoziationen zwischen dem ACE I/D Genpolymorphismus und dem KHK-Schweregrad identifiziert werden (Tab. 20).

Tab. 20: **Verteilung der ACE-I/D-Genotypen bei Kontrollprobanden und Patienten mit 1-, 2- und 3-Gefäßerkrankung**

Erkrankung	Durchschnitts- alter	ACE I/D-Genotyp n	Allelfrequenzen				
			II	ID	DD	I (95% CI)	D (95% CI)
<b><i>KHK(≥50%Stenose)</i></b>							
0-Gefäßerkrankung	58,5 ± 10,6	512	124	250	138	0,49(0,46-0,52)	0,51(0,48-0,54)
1-Gefäßerkrankung	61,2 ± 9,7	455	97	236	122	0,47(0,44-0,50)	0,53(0,50-0,56)
2-Gefäßerkrankung	62,6 ± 9,7	490	106	229	155	0,45(0,42-0,48)	0,55(0,52-0,58)
3-Gefäßerkrankung	63,6 ± 8,6	810	171	400	239	0,46(0,44-0,48)	0,54(0,52-0,57)

Die koronare Herzkrankheit wurde mittels des durch Koronarangiographie erhobenen Gefäßstatus der 2267 Probanden definiert. Koronargefäße ab einem Stenosegrad von  $\geq 50\%$  wurden als erkrankt angesehen und entsprechend der Anzahl der erkrankten Gefäße in 1-, 2- oder 3-Gefäßerkrankung unterteilt. Der Insertions-/Deletionspolymorphismus des ACE-Gens wurde mittels zweier Typisierungsmethoden untersucht (II-, ID-, DD-Genotyp). Die Konfidenzintervalle sind in Klammern angegeben.

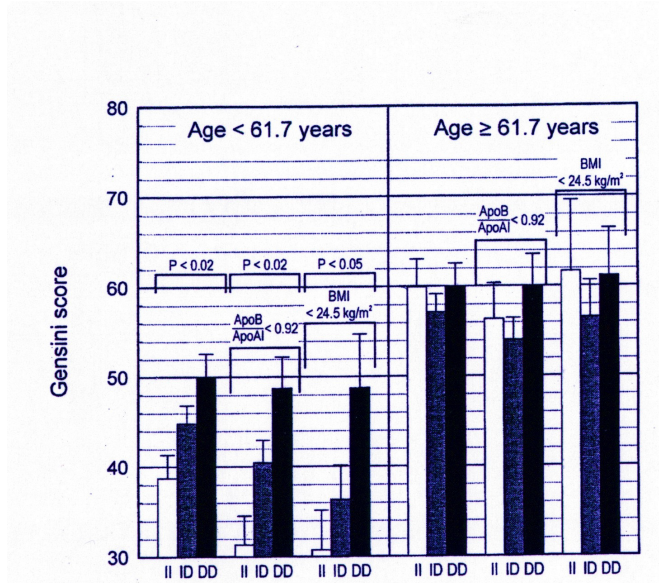
Abkürzungen: KHK, koronare Herzkrankheit; n, Anzahl der Patienten; CI, Konfidenzintervall.

#### 4.3.4 **Beziehung zwischen dem ACE I/D-Genpolymorphismus und dem Schweregrad der koronaren Herzkrankheit in Hoch- und Niedrigrisikogruppen**

Wurde der KHK-Schweregrad nach der Anzahl der erkrankten Gefäße (0-3-Gefäßerkrankung) eingeteilt, konnten auch in Niedrig- und Hochrisikogruppen keine Unterschiede bei den I- und D-Allelfrequenzen nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

Wurde der KHK-Schweregrad gemäß dem Gensini Score definiert, so zeigte sich jedoch, dass (a) jüngere Patienten mit ACE II-Genotyp ( $\leq 61,7$  Jahre, Mittelwert), (b) zusätzlich mit einem niedrigen Apo-B/Apo-AI Verhältnis von  $< 0,92$  oder (c) mit niedrigem BMI ( $< 24,5 \text{ kg/m}^2$ ) deutlich niedrigere Gensini Scores aufwiesen als DD-Homozygote. ID-Heterozygote wiesen intermediäre Gensini Scores auf (Abb. 14). Bei älteren Probanden wurden diese Unterschiede nicht beobachtet (Abb. 14).

Abb. 14: Verhältnis zwischen dem Gensini Score und den ACE I/D-Genotypen



Vergleich von Gensini Scores von ACE I/D-Genotypen bezüglich des Schweregrades der koronaren Herzkrankheit in Hoch- und Niedrigrisikogruppen. Der Gensini Score wurde wie beschrieben [44, 45] berechnet und als Durchschnittswert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Das Verhältnis vom ACE I/D-Genpolymorphismus zum durchschnittlichen Gensini Score der Probanden mit II-, ID und DD-Genotyp wurde mit der multiplen Regression berechnet. Koronare Risikofaktoren (Alter, Cholesterin, Triglyzeride, Apolipoprotein AI, Apolipoprotein B, Lipoprotein (a), Fibrinogen, Body-mass-index, Nikotinkonsum, Diabetes mellitus und arterielle Hypertonie) wurden bei der Berechnung mit berücksichtigt. Anzahl der Probanden: 236 (II), 524 (ID) und 315 (DD) Probanden jünger als 61,7 Jahren; 134 (II), 302 (ID) und 173 (DD) Probanden jünger als 61,7 Jahren mit einem Apo-B/Apo-AI Verhältnis von  $< 0,92$ ; 54 (II), 116 (ID) und 66 (DD) Probanden jünger als 61,7 Jahren mit niedrigem BMI ( $< 24,5 \text{ kg/m}^2$ ); 262 (II), 591 (ID) und 339 (DD) Probanden  $\geq 61,7$  Jahren; 160 (II), 399 (ID) und 202 (DD) Probanden  $\geq 61,7$  Jahren mit einem Apo-B/Apo-AI Verhältnis von  $< 0,92$ ; 52 (II), 132 (ID) und 88 (DD) Probanden  $\geq 61,7$  Jahren mit niedrigem BMI ( $< 24,5 \text{ kg/m}^2$ ).

Abkürzungen: Apo-AI, Apolipoprotein AI; Apo-B, Apolipoprotein B; BMI, Body-mass-index; ns, nicht signifikant.

#### 4.3.5 Beziehung zwischen ACE I/D-Genpolymorphismus und dem Myokardinfarktrisiko

Bei der Betrachtung der Allelverteilung des ACE I/D-Genpolymorphismus ergaben sich bei den I- und D-Allelfrequenzen zwischen den Probanden ohne Myokardinfarkt und den Patienten mit mindestens einem abgelaufenen Myokardinfarkt keine signifikanten Unterschiede (Tab. 21): Die D-Allelfrequenz der Infarktpatienten betrug 0,55, gleichzeitig lag diese Frequenz für die Nichtinfarktpatienten bei 0,52. Für die I-Allelfrequenz der Myokardpatienten wurde ein Wert von 0,45 bestimmt, diese betrug bei Probanden ohne abgelaufenen Myokardinfarkt 0,48 (Tab. 21).

Tab. 21: **Verteilung der ACE-I/D-Genotypen bei Personen ohne Myokardinfarkt und bei Patienten mit mindestens einem Myokardinfarkt**

Erkrankung	ACE I/D Genotyp		Allelfrequenzen				
	Durchschnitts- alter	n	II	ID	DD	I (95% CI)	D (95% CI)
<i>Myokardinfarkt</i>							
Probandengruppe	61,4 ± 9,9	1201	277	598	326	0,48(0,46-0,50)	0,52(0,50-0,54)
≥ 1 Myokardinfarkt	62,1 ± 9,5	1066	221	517	328	0,45(0,43-0,47)	0,55(0,53-0,57)

Patienten mit Myokardinfarkt wurden von denjenigen ohne abgelaufenen Myokardinfarkt unterschieden. Der Insertions-/Deletionspolymorphismus der Patienten (II-, ID-, DD-Genotyp) wurden mittels Polymerasekettenreaktion bestimmt. Die Konfidenzintervalle sind in Klammern angegeben. Abkürzungen: n, Anzahl der Patienten; CI, Konfidenzintervall.

#### 4.3.6 **Beziehung zwischen ACE I/D-Genotyp und Myokardinfarkt in Niedrigrisikogruppen**

Zur weiteren Korrelationsanalyse wurde die Studienpopulation in Niedrig- und Hochrisikogruppen unterteilt. Diese Gruppen wurden wie die Gesamtpopulation hinsichtlich einer Assoziation zwischen dem ACE I/D-Genpolymorphismus und dem Myokardinfarktrisiko untersucht. Auch hier ergaben sich keine signifikanten Assoziationen zwischen dem ACE I/D-Genpolymorphismus und dem Myokardinfarktrisiko (Ergebnisse nicht dargestellt).

#### 4.4 **Interaktionen zwischen dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor A1166C Genpolymorphismus und dem ACE I/D-Genpolymorphismus auf die koronare Herzkrankheit**

Nachdem die Assoziationen zwischen dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor A1166C-Genpolymorphismus und der koronaren Herzkrankheit und zwischen dem ACE I/D-Genpolymorphismus und der KHK untersucht worden waren, wurde die Frage nach der Interaktion zwischen diesen beiden Genpolymorphismen auf das KHK-Risiko und den KHK-Schweregrad untersucht. Bei der statistischen Analyse wurden alle Risikofaktoren berücksichtigt.

KHK-Risiko: Bei den Untersuchungen zur Interaktion beider Genpolymorphismen auf das KHK-Risiko wurden im Gegensatz zu den vorhergehenden Analysen Gefäße mit Stenosen ≥ 70 % als erkrankt definiert. Diese in den asiatischen Staaten übliche Definition vermindert das Ungleichgewicht zwischen der Anzahl „gesunder“ und erkrankter Gefäße und führt daher möglicherweise eher zu statistisch signifikanten Unterschieden. Die Analysen belegen jedoch,

dass in der untersuchten Studienpopulation keine Interaktionen zwischen dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor A1166C Genpolymorphismus und der ACE I/D Genvariation auf das KHK-Risiko nachzuweisen waren (s. Tab. 22, 23). Das relative KHK-Risiko für einen AT<sub>1</sub>-Rezeptor C Allelträger betrug 0,88 (0,45-1,74) bei gleichzeitiger ACE II Homozygotie, 0,92 (0,57-1,47) bei ACE ID Heterozygoten und 0,97 (0,50-1,89) bei ACE DD Homozygoten (Tab. 22). Gleichartige Beobachtungen wurden in Niedrig- und Hochrisikopopulationen und auch dann gemacht, wenn Gefäße mit einer Stenose  $\geq 50\%$  als erkrankt definiert wurden (Ergebnisse nicht dargestellt).

Tab. 22: **Keine Interaktionen zwischen dem ACE I/D-Genpolymorphismus und dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor A1166C Genpolymorphismus auf das KHK-Risiko**

### ACE I/D Genotyp

	II		ID		DD	
	Kontrolle	KHK	Kontrolle	KHK	Kontrolle	KHK
AT <sub>1</sub> R AA + AT <sub>1</sub> R AC	43	112	86	249	39	150
AT <sub>1</sub> R CC	4	8	6	23	6	19
Relatives Risiko (95% CI)	0,78 (0,22-2,68)		1,32 (0,52-1,79)		0,82 (0,31-2,20)	
	Kontrolle	KHK	Kontrolle	KHK	Kontrolle	KHK
AT <sub>1</sub> R AA	24	65	44	136	25	95
AT <sub>1</sub> R AC + AT <sub>1</sub> R CC	23	55	48	136	20	74
Relatives Risiko (95% CI)	0,88 (0,45-1,74)		0,92 (0,57-1,47)		0,97 (0,50-1,89)	

Die Population wurde in eine Kontrollgruppe ohne koronare Herzkrankheit und eine Gruppe mit schwerer koronarer Herzkrankheit (Stenosen  $\geq 70\%$ ) unterteilt. Die Anwesenheit des AT<sub>1</sub>-Rezeptor-CC-Genotyps und des C-Allels wurde in Abhängigkeit von den 3 Genotypen des ACE I/D-Genpolymorphismus zwischen den Probanden mit oder ohne schwere koronare Herzkrankheit verglichen. Für jede Odds ratio wurde ein zweiseitiger p-Wert und ein 95 % Konfidenzintervall bestimmt.

Abkürzungen: KHK, Koronare Herzkrankheit; CI, Konfidenzintervall.

Tab. 23: **Keine Interaktionen zwischen dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor A1166C Genpolymorphismus und dem ACE I/D-Genpolymorphismus auf das KHK-Risiko**

**AT<sub>1</sub>R A1166C Genotyp**

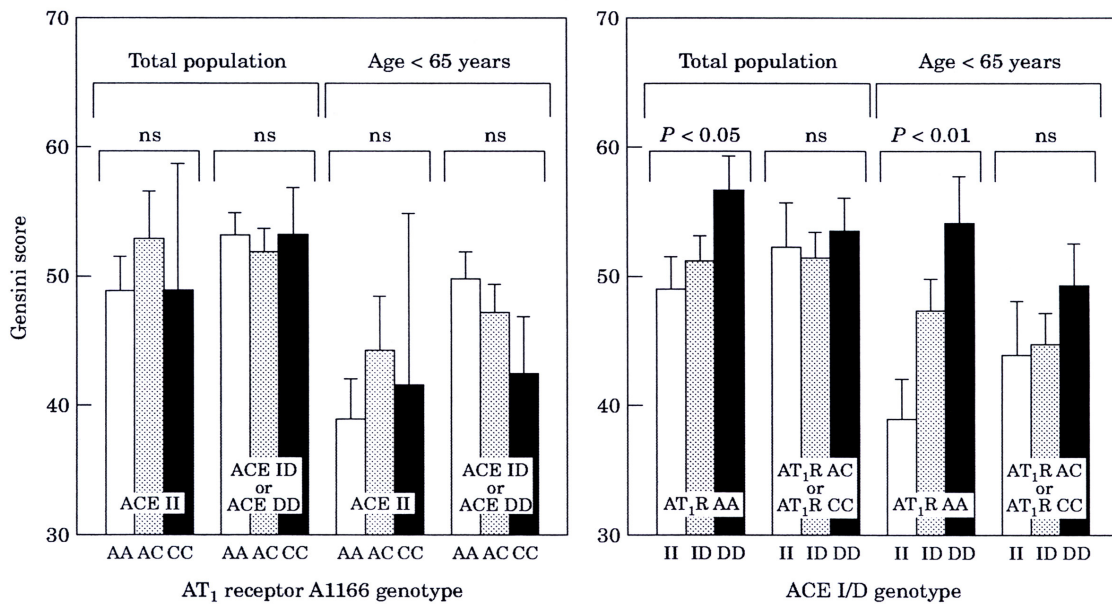
	AA		AC		CC	
	Kontrolle	KHK	Kontrolle	KHK	Kontrolle	KHK
ACE II + ACE ID	68	201	61	160	10	31
ACE DD	25	95	14	55	6	19
Relatives Risiko (95% CI)	1,29 (0,77-2,16)		1,49 (0,78-2,89)		1,02 (0,32-3,27)	
	Kontrolle	KHK	Kontrolle	KHK	Kontrolle	KHK
ACE II	24	65	19	47	4	8
ACE ID + ACE DD	65	234	56	168	12	42
Relatives Risiko (95% CI)	1,24 (0,72-2,12)		1,21 (0,66-2,24)		1,75 (0,50-6,83)	

Die Population wurde in eine Kontrollgruppe ohne koronare Herzkrankheit und eine Gruppe mit schwerer koronarer Herzkrankheit (Stenosen  $\geq 70\%$ ) unterteilt. Die Anwesenheit des ACE DD-Genotyps und des D-Allels wurde in Abhängigkeit von den 3 Genotypen des AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Genpolymorphismus zwischen den Probanden mit oder ohne schwere koronare Herzkrankheit verglichen. Für jede Odds ratio wurde ein zweiseitiger p-Wert und ein 95 % Konfidenzintervall bestimmt.  
Abkürzungen: KHK, Koronare Herzkrankheit; CI, Konfidenzintervall.

KHK-Schweregrad: Wurde der KHK-Schweregrad nach Gensini eingeteilt, so zeigte sich, dass Probanden mit einem ACE DD-Genotyp bei gleichzeitig vorhandenem AT<sub>1</sub>-Rezeptor AA-Genotyp einen höheren Gensini Score ( $P < 0,05$ ) als Probanden mit einem II- oder ID-Genotyp aufwiesen (Abb. 15). Diese Beobachtung wurde bei Patienten mit einem AC- oder CC-Genotyp im AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Gen nicht gemacht (Abb. 15). Wurden die Probanden nach den Genotypen des AT<sub>1</sub>-Rezeptor A1166C Genpolymorphismus unterteilt, so ergab sich unabhängig vom AT<sub>1</sub>R Genotyp keine Assoziationen zwischen dem ACE I/D Genpolymorphismus und dem KHK-Schweregrad (klinische Definition, 0-3-Gefäßerkrankung), wenn die Studienpopulation in 3 Gruppen gemäß der Genotypen des ACE I/D Genpolymorphismus eingeteilt wurde (Ergebnisse nicht dargestellt).

Gleichartige Beobachtungen wurden gemacht, wenn die Population auf jüngere Probanden ( $< 65$  Jahre) begrenzt wurde (Abb. 15).

Abb. 15: **Interaktionen zwischen dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor A1166C Genpolymorphismus und dem ACE I/D-Genpolymorphismus auf die koronare Herzkrankheit**



Vergleich von Gensini Scores von AT<sub>1</sub>-Rezeptor A1166C-Genotypen zwischen ACE I/D-Genotypen bzw. von ACE I/D-Genotypen zwischen AT<sub>1</sub>-Rezeptor A1166C-Genotypen bezüglich des Schweregrades der koronaren Herzkrankheit. Der Gensini Score wurde wie beschrieben [44, 45] berechnet und als Durchschnittswert ± Standardabweichung angegeben. Das Verhältnis vom AT<sub>1</sub>-Rezeptor A1166C-Genpolymorphismus zum durchschnittlichen Gensini Score der Probanden mit II-, ID und DD-Genotyp und vom ACE I/D-Genpolymorphismus zum durchschnittlichen Gensini Score der Patienten mit AA-, AC- und CC-Allel wurde mit der multiplen Regression berechnet. Koronare Risikofaktoren (Alter, Cholesterin, Triglyzeride, Apolipoprotein AI, Apolipoprotein B, Lipoprotein (a), Fibrinogen, Body-mass-index, Nikotinkonsum, Diabetes mellitus und arterielle Hypertonie) wurden bei der Berechnung mit berücksichtigt. Anzahl der Probanden: 277 (AA), 182 (AC) und 33 (CC) für ACE II-Homozygote, 908 (AA), 688 (AC) und 156 (CC) für ACE ID/DD-Genotypen, 153 (AA), 118 (AC) und 18 (CC) für ACE II-Homozygote jünger als 65 Jahre; 277 (II), 568 (ID) und 340 (DD) für AT<sub>1</sub>-Rezeptor AA-Homozygote, 215 (II), 537 (ID) und 307 (DD) für AT<sub>1</sub>-Rezeptor AC/CC-Genotypen, 153 (II), 330 (ID) und 194 (DD) für AT<sub>1</sub>-Rezeptor AA-Homozygote jünger als 65 Jahre, 136 (II), 312 (ID) und 178 (DD) für AT<sub>1</sub>-Rezeptor AC/CC-Genotypen jünger als 65 Jahre. Abkürzungen: ns, nicht signifikant.

#### 4.5 Interaktionen zwischen dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor A1166C Genpolymorphismus und dem ACE I/D-Genpolymorphismus auf das Myokardinfarkttrisiko

In der vorliegenden Studienpopulation wurde die Interaktion zwischen dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor A1166C Genpolymorphismus und dem ACE I/D Genpolymorphismus auch auf das Myokardinfarkttrisiko untersucht (Tab. 24, 25).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass weder in der Gesamtpopulation noch in den so genannten Niedrig- und Hochrisikogruppen (Ergebnisse nicht dargestellt) Interaktionen zwischen dem AT<sub>1</sub>R A1166C-Genpolymorphismus und dem ACE I/D-Genpolymorphismus auf das Myokardinfarkttrisiko nachgewiesen werden konnten (Tab. 24). Es ließen sich folgende relative Risiken berechnen:

Das relative Myokardinfarkttrisiko für einen Patienten mit einem AT<sub>1</sub>-Rezeptor C-Allel betrug 1,3 (0,91 – 1,86) bei gleichzeitig vorhandener ACE II-Homozygotie, 0,97 (0,77 – 1,23) bei ACE ID-Genotyp und 1,0 (0,73 – 1,35) bei ACE DD-Homozygotie (Tab. 24). Die relativen Risiken, einen Myokardinfarkt zu erleiden, betragen für einen Patienten mit mindestens einem ACE D-Allel und einem AT<sub>1</sub>-Rezeptor AA-Allel 1,28 (0,96 – 1,68), bei AT<sub>1</sub>-Rezeptor AC-Allel 0,84 (0,60- 1,16) und bei AT<sub>1</sub>-Rezeptor CC-Genotyp 2,21 (0,96 – 4,63) (Tab. 25).

Tab. 24: **Keine Interaktionen zwischen dem ACE I/D-Genpolymorphismus und dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor A1166C Genpolymorphismus auf das Myokardinfarkt-risiko**  
**ACE I/D Genotyp**

	II		ID		DD	
	Kontrolle	MI	Kontrolle	MI	Kontrolle	MI
AT <sub>1</sub> R AA + AT <sub>1</sub> R AC	250	209	545	464	294	293
AT <sub>1</sub> R CC	22	11	48	48	28	32
Relatives Risiko (95% CI)	0,60 (0,29-1,26)		1,17 (0,77-1,79)		1,15 (0,67-1,95)	
	Kontrolle	MI	Kontrolle	MI	Kontrolle	MI
AT <sub>1</sub> R AA	161	116	303	265	169	171
AT <sub>1</sub> R AC + AT <sub>1</sub> R CC	111	104	290	247	153	154
Relatives Risiko (95% CI)	1,30 (0,91-1,86)		0,97 (0,77-1,23)		1,00 (0,73-1,35)	

Die Population wurde in eine Kontrollgruppe ohne Myokardinfarkt und eine Gruppe mit mindestens einem Myokardinfarkt unterteilt. Schließlich wurden die AT<sub>1</sub>-Rezeptor-CC-Homozygoten den beiden Genotypen dieses Polymorphismus, den 3 Genotypen des ACE I/D-Genpolymorphismus bei Probanden ohne Myokardinfarkt und bei Myokardinfarktpatienten gegenübergestellt. Für jede Odds ratio wurde ein zweiseitiger p-Wert und ein 95 % Konfidenzintervall bestimmt. Akuter Myokardinfarkt wurde nach den Kriterien der Weltgesundheitsorganisation definiert. Abkürzungen: MI, Myokardinfarkt; CI, Konfidenzintervall.



Tab. 25: **Keine Interaktionen zwischen dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor A1166C Genpolymorphismus und dem ACE I/D-Genpolymorphismus auf das Myokardinfarktrisiko**  
**AT<sub>1</sub>R A1166C Genotyp**

	AA		AC		CC	
	Kontrolle	MI	Kontrolle	MI	Kontrolle	MI
ACE II + ACE ID	464	381	331	292	70	59
ACE DD	169	171	125	122	28	32
Relatives Risiko (95% CI)	1,23 (0,96-1,59)		1,11 (0,82-1,49)		1,36 (0,73-2,51)	
	Kontrolle	MI	Kontrolle	MI	Kontrolle	MI
ACE II	161	116	89	93	22	11
ACE ID + ACE DD	472	436	367	321	76	80
Relatives Risiko (95% CI)	1,28 (0,98-1,68)		0,84 (0,60-1,16)		2,21 (0,96-4,63)	

Die Population wurde in eine Kontrollgruppe ohne Myokardinfarkt und eine Gruppe mit mindestens einem Myokardinfarkt unterteilt. Schließlich wurden die ACE DD-Homozygoten den beiden Genotypen dieses Polymorphismus, den 3 Genotypen des AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Genpolymorphismus bei Probanden ohne Myokardinfarkt und bei Myokardinfarktpatienten gegenübergestellt. Für jede Odds ratio wurde ein zweiseitiger p-Wert und ein 95 % Konfidenzintervall bestimmt. Akuter Myokardinfarkt wurde nach den Kriterien der Weltgesundheitsorganisation definiert. Abkürzungen: MI, Myokardinfarkt; CI, Konfidenzintervall.

## 5. Diskussion

### 5.1 Zusammenfassende Kurzdarstellung der Studienergebnisse

Die vorliegende Studie beschäftigte sich mit den potentiellen Assoziationen des AT<sub>1</sub>Rezeptor A1166C-Genpolymorphismus (2244 koronarangiographierte, männliche Probanden) und des ACE I/D-Genpolymorphismus (2267 koronarangiographierte, männliche Probanden) zum Risiko bzw. zum Schweregrad der koronaren Krankheit und zum Myokardinfarktisiko. Ein möglicher Zusammenhang zwischen dem A1166C-Genpolymorphismus und dem ACE I/D-Genpolymorphismus hinsichtlich der oben genannten Erkrankungen des Herzens wurde ebenso in dieser Studie untersucht. Die klassischen, etablierten Risikofaktoren und protektiven Faktoren der koronaren Herzkrankheit konnten in der vorliegenden Studie weitgehend identifiziert werden. Weder in der Gesamtpopulation noch in den Niedrig- und Hochrisikogruppen konnte eine Assoziation zwischen dem AT<sub>1</sub>R A1166C-Genpolymorphismus und der koronaren Herzkrankheit bzw. dem Myokardinfarkt beobachtet werden [35]. Ähnlich verhielt sich der ACE I/D-Genpolymorphismus hinsichtlich der oben genannten Erkrankungen in einer aus 2267 männlichen Probanden bestehenden Population [33]. Für eine mögliche Interaktion zwischen dem AT<sub>1</sub>R A1166C-Genpolymorphismus und dem ACE I/D-Genpolymorphismus zum Auftreten und zur Progression der koronaren Herzerkrankung und zum Risiko des Myokardinfarktes fanden sich keine Hinweise [35].

### 5.2 Bedeutung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) für die Entstehung und Progression der Atherosklerose

Die koronare Herzkrankheit ist eine der Haupttodesursachen in den industrialisierten Ländern. Verschiedene Faktoren spielen eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose. Im Zusammenhang mit der arteriellen Hypertonie als eine der Ursachen steht das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System im Mittelpunkt unseres Augenmerks. Diese Enzymkaskade endet schließlich in der Bildung des Hormonpeptids Angiotensin II, welches seine Wirkung hauptsächlich über den Angiotensin II Typ 1 Rezeptor (AT<sub>1</sub>-Rezeptor) ausübt. Es führt zu einer direkten Vasokonstriktion und induziert das Wachstum der glatten Gefäßmuskulatur

[86]. Ebenso wurde in mehreren Studien die Vermutung geäußert, dass die über den AT<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelten Wirkungen des Angiotensin II zu einer Erhöhung des Plasminogen Aktivator Inhibitors-1 (PAI-1) führen [30, 62, 68, 95]. Alle diese Wirkungen sollten das Risiko der Atherosklerose erhöhen und damit die Entstehung der koronaren Herzkrankheit fördern. Seit der genetischen Entschlüsselung des AT<sub>1</sub>-Rezeptors im Jahre 1992 [83] stellte sich die Frage nach einer genetischen Beeinflussung des AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Genpolymorphismus am Genlocus 1166 auf die ischämische Herzerkrankung und den Myokardinfarkt. Die Messung von Genotypen im Rahmen eines identifizierten Genpolymorphismus hat den entscheidenden Vorteil, dass die früher gemessenen Plasmaspiegel verschiedener Metabolite erheblichen Konzentrationsänderungen unterworfen sind und ein gemessener Wert nur eine Momentaufnahme für den Risikostatus des Patienten bzw. Probanden darstellt. Dagegen unterliegen die Genpolymorphismen nicht derartigen Fluktuationen. Die genetischen Prädispositionsfaktoren sind von Geburt an vorhanden und ändern sich während des ganzen Lebens nicht. Der Vorhersagewert eines genetischen Risikomarkers müsste daher größer als der eines Stoffwechselmarkers sein.

### **5.3 Darstellung der Studien, die eine Assoziation des AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Genpolymorphismus zur arteriellen Hypertonie zeigten**

Benetos et al. [10] untersuchten in einer Studie mit 82 Probanden mit arterieller Hypertonie das Blutdruckverhalten unter der Therapie mit dem ACE-Antagonisten Perindopril und dem Calciumantagonisten Nitrendipin in Abhängigkeit vom A1166C-Polymorphismus des AT<sub>1</sub>-Rezeptors. Unter der Therapie mit dem ACE-Antagonisten war bei den homozygoten CC-Allelträgern ein 3fach stärkerer Abfall des Blutdruckes als bei den homozygoten AA-Allelträgern zu beobachten. Weiterhin fanden Benetos et al. einen direkten positiven Zusammenhang zwischen dem A1166C-Genpolymorphismus des AT<sub>1</sub>-Rezeptors und der Gefäßwandhypertrophie und -hyperplasie an der Aorta bei den Patienten mit Hypertonie, die bis zur Aufnahme in die Studie unbehandelt waren [12]. Wang et al. beobachteten eine Häufung des C-Allels (0,40; p = 0,0015) bei 108 Patienten mit arterieller Hypertonie im Gegensatz zu 84 Kontrollprobanden ohne arterielle Hypertonie (0,29; p = 0,023) [97, 42]. Zu dem gleichen Ergebnis kam eine andere Studiengruppe um Bonnardeux et al., die 206 Patienten mit arteriellem Hypertonus untersucht hatten [17]. Die Allelfrequenzen betragen 0,36 für Hypertoniker und 0,28 für Normotoniker. In diesem Zusammenhang ist die

SILVHIA-Studie von Kurland et al. [46] erwähnenswert, welche die Entwicklung der Linksherzhypertrophie bei 115 Patienten mit Hypertonus unter der Therapie mit dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten Irbesartan und dem  $\beta$ -Blocker Atenolol in Abhängigkeit von ihrem genetischen Phänotyp des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems untersuchten. Dabei zeigte es sich, dass Patienten mit dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Genpolymorphismus besonders von der Therapie mit dem AT<sub>1</sub>-Antagonisten Irbesartan profitierten. Ähnlich sah es für Patienten mit dem T-Allel des M235T-Angiotensinogen-Genpolymorphismus aus. In einer serbischen Population fanden Stankovic et al. heraus, dass unter den männlichen Hypertonikern das C1166-Allel signifikant häufiger auftritt als das A1166-Allel [79]. Die Studie bestand aus 100 Hypertonikern, wobei davon 49 männlichen Geschlechts waren.

#### **5.4 Darstellung der Studien, die eine Assoziation des AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Genpolymorphismus zur koronaren Herzkrankheit bzw. zum Myokardinfarkt zeigten**

In einer niederländischen Studie untersuchten van Geel et al. [94] anhand von 112 Patienten das Ansprechverhalten der Arterien unter der Therapie mit einem ACE-Hemmer. Patienten (n = 17), die homozygot für das C-Allel waren, zeigten ein deutlich erhöhtes Ansprechen auf das Angiotensin II als solche Patienten mit einem AA- oder AC-Genotyp (n = 95, p < 0,05). Berge et al. zeigten eine Häufung des CC-Genotyps bei männlichen Myokardinfarktpatienten (p = 0,01). Dabei wurden insgesamt 619 norwegische Probanden untersucht; darunter befanden sich 235 Patienten mit mindestens einem Myokardinfarkt [14]. Unabhängig vom Geschlecht der Probanden wurde eine minimale Häufung von Infarktpatienten mit einem homozygoten C-Allel beobachtet (p = 0,05). In den Niedrigrisiko-Gruppen (BMI < 24,8 kg/m<sup>2</sup>, ApoB < 113,8 mg/dl) stellten die Wissenschaftler eine signifikante Assoziation zwischen der CC-Homozygotie des AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Genpolymorphismus und dem Auftreten eines Myokardinfarktes unter den männlichen Patienten fest (p = 0,001).

#### **5.5 Darstellung der Studien, die keine Assoziation des AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Genpolymorphismus zur arteriellen Hypertonie und zur koronaren Herzkrankheit bzw. zum Myokardinfarkt zeigten**

Eine chinesische Forschergruppe um Liu et al. [50] untersuchte den Zusammenhang zwischen dem A1166C-Genpolymorphismus und der essentiellen Hypertonie unter den Han-Chinesen,

Tibetern und der Yi-Population. Dabei wurden 446 Hypertoniker 302 Normotensiven gegenübergestellt. Es fand sich ein gehäuftes Auftreten des A-Allels unter den tibetanischen Hypertonikern im Vergleich zu tibetanischen Normotensiven. Der diastolische Blutdruck war unter den tibetanischen, homozygoten A-Allelträgern besonders ausgeprägt. Schmidt et al. untersuchten einen möglichen Zusammenhang zwischen dem AT<sub>1</sub> Rezeptor-Genpolymorphismus und arterieller Hypertonie [75]. Die Studie bestand aus 414 kaukasischen Patienten mit arterieller Hypertonie und 172 normotensiven Kontrollprobanden. Unter den Normotensiven kam das C-Allel genauso oft wie in der Studiengruppe von Bonnardeux et al. vor [17]. Die Allelfrequenzen betragen jeweils 0,28 bzw. 0,31.

### **5.6 Darstellung der Studien, die eine Assoziation des ACE I/D-Genpolymorphismus zur koronaren Herzkrankheit bzw. zum Myokardinfarkt zeigten**

Cambien und Mitarbeiter [19] waren die ersten, die in der so genannten ECTIM-Studie über eine Assoziation zwischen dem Insertions-/Deletionspolymorphismus des ACE-Gens und einem erhöhten Myokardinfarkttrisiko berichteten. Die Studie bestand aus 610 Myokardinfarktpatienten und 733 Kontrollprobanden aus vier europäischen Städten (Belfast, Lille, Strasbourg und Toulouse). Probanden mit einem ACE DD-Genotyp hatten häufiger einen Myokardinfarkt bei gleichzeitig höheren ACE-Konzentrationen [70, 92]. In der Niedrigrisikogruppe, die sich durch eine niedrige ApoB-Serumkonzentration (Apo-B < 1,25 mg/dl) und einen geringen Body-mass-index (BMI < 26 kg/m<sup>2</sup>) auszeichnete, war diese Assoziation noch ausgeprägter. Weiterhin war der ACE I/D-Genpolymorphismus mit einer familiären Häufung von Myokardinfarkten assoziiert [91]. In einer japanischen Studie aus dem Jahr 1994 bestehend aus 278 Probanden, darunter 70 Patienten mit Angina pectoris, 108 mit Myokardinfarkt und 100 gesunde Kontrollprobanden, fanden Nakai et al. [59] eine signifikant höhere D-Allelfrequenz in der Gruppe der Patienten mit KHK (0,58) im Vergleich zur Kontrollgruppe (0,42). Außerdem wurden höhere D-Allelfrequenzen bei Patienten mit koronarer Dreifäßerkrankung (0,72, n = 29) als bei den Patienten mit Eingefäßerkrankung (0,54, n = 95) gefunden. Die D-Allelfrequenz bei Patienten mit einem abgelaufenen Myokardinfarkt (0,58-0,59) war höher als in der Probandengruppe ohne Myokardinfarkt (0,42). Ludwig et al. [52] beobachteten 1995, dass der ACE-I/D-Genpolymorphismus mit dem Myokardinfarkt, jedoch nicht mit der KHK assoziiert war. Die Studie enthielt 402 Männer und 295 Frauen, die koronarangiographiert wurden, sowie 203 Kontrollpersonen. Die

koronare Herzkrankheit wurde ab einem Stenosegrad  $> 60\%$  in einem der großen Kranzgefäße definiert. Auch konnte keine Niedrigrisiko-Gruppe identifiziert werden, in der ein Zusammenhang zwischen dem besagten Genpolymorphismus und der KHK festzustellen war. Nakauchi et al. [60] beobachteten anhand von 133 Patienten mit Myokardinfarkt oder Angina pectoris und 258 gesunden Kontrollprobanden eine Assoziation zwischen dem ACE-I/D-Genpolymorphismus und dem Myokardinfarkt sowohl in der Gesamtpopulation als auch in Niedrigrisiko-Gruppen (LDL-Cholesterin  $< 160$  mg/dl, HDL-Cholesterin  $> 35$  mg/dl und BMI  $< 26$  kg/m<sup>2</sup>). Auch hier konnte kein Zusammenhang zwischen dem DD-Genotyp des ACE-I/D-Genpolymorphismus und der koronaren Herzkrankheit, definiert ab einem Stenosegrad von  $> 75\%$ , beobachtet werden. Nakai et al. [59] fanden in einer japanischen Studienpopulation von 278 Probanden eine Assoziation zwischen dem DD-Genotyp des ACE-I/D-Genpolymorphismus und der KHK. Unter den 278 Probanden wiesen 70 eine Angina pectoris, 108 einen Myokardinfarkt auf, die restlichen Probanden waren bezüglich der ischämischen Herzerkrankung unauffällig. In der Gruppe der Patienten mit KHK wurde eine signifikant höhere D-Allelfrequenz (0,58) als in der Kontrollgruppe (0,42) beobachtet. Außerdem verzeichneten Nakai et al. eine höhere D-Allelfrequenz bei Patienten mit koronarer Dreifäßerkrankung (0,72, n = 29) im Vergleich zu Patienten mit Eingefäßerkrankung (0,54, n = 95). Die Studienpopulation von Keavney et al. [45] bestand aus 173 britischen Patienten mit einem nicht-insulinabhängigen Diabetes mellitus, die einen Myokardinfarkt erlitten hatten, und 297 gesunde Kontrollprobanden. Es wurde eine Assoziation zwischen dem ACE-DD-Genotyp und dem Myokardinfarkt sowohl in der Gesamtpopulation als auch in Niedrigrisiko-Gruppen, die durch niedrige Serumkonzentrationen von LDL-Cholesterin und/oder Triglyceriden charakterisiert waren, beobachtet. Die Forschergruppe um Oike et al. [63] untersuchte den Zusammenhang zwischen dem ACE-DD-Genotyp und Koronarspasmen als Auslöser eines Myokardinfarktes. Sie fanden ein häufigeres Auftreten des ACE-DD-Genotyp bei Patienten mit koronarangiographisch auslösbaren Koronarspasmen als bei Patienten ohne auslösbare Koronarspasmen. Beohar et al. [13] beschrieben ein gehäuftes Auftreten des ACE DD-Genotyps bei Patienten mit KHK im Vergleich zur Gesamtpopulation. Die Studienpopulation bestand aus insgesamt 520 Probanden, darunter waren 182 Patienten mit einer KHK und 338 gesunde Kontrollprobanden. Arbustini et al. [6] konnten ein Zusammenhang zwischen dem ACE-I/D-Genpolymorphismus und sowohl der KHK ( $p < 0,001$ ) als auch dem Myokardinfarkt ( $p < 0,007$ ) feststellen. An der Studie nahmen 281 männliche und 107 weibliche Probanden teil. Darunter hatten 154 Patienten bereits einen Myokardinfarkt erlitten,

255 hatten eine koronare Herzkrankheit und 133 zeigten einen unauffälligen Koronarbefund. Die obige Auflistung der bisherigen Studienergebnisse, die eine Assoziation des ACE I/D-Genpolymorphismus zur koronaren Herzkrankheit bzw. zum Myokardinfarkt zeigen, stellt nur ein Teil aller Studien dar.

### **5.7 Darstellung der Studien, die keine Assoziation des ACE I/D-Genpolymorphismus zur koronaren Herzkrankheit bzw. zum Myokardinfarkt zeigten**

Im Gegensatz zu den oben geschilderten Forschungsarbeiten werden im Folgenden die Studien beschrieben, die weder in der Gesamtpopulation noch in Niedrigrisiko-Gruppen eine Assoziation zur koronaren Herzkrankheit bzw. zum Myokardinfarkt erkannten [41, 16, 43, 49, 73, 103, 106]. Dabei kann nur ein Teil aller Studien aufgelistet werden, die mit diesem Thema in unmittelbarem Zusammenhang stehen.

Die Forschergruppe um Katsuya et al. untersuchten 1995 406 Kontrollpersonen ohne koronare Stenosen und 422 männliche und weibliche Patienten mit KHK. 50 % der KHK-Patienten erlitten einen Myokardinfarkt. Katsuya et al. konnten keine Assoziation zwischen dem ACE-I/D-Genpolymorphismus und der KHK bzw. dem Myokardinfarkt nachweisen, weder in der Gesamtpopulation noch in Niedrigrisiko-Gruppen [43]. Sie fanden lediglich einen Zusammenhang zwischen dem Angiotensinogen-M235T-Genpolymorphismus und der KHK bzw. dem Myokardinfarkt. In einer norwegischen Studie von Bohn et al. aus dem Jahr 1993 wurden 185 männliche und 49 weibliche Myokardinfarktpatienten mit 366 Patienten ohne Myokardinfarkt hinsichtlich des ACE-I/D-Genpolymorphismus verglichen. Sowohl in der Gesamtpopulation als auch in Niedrigrisiko-Gruppen wurden sogar niedrigere DD-Genotypfrequenzen bei männlichen Patienten gegenüber gesunden Probanden festgestellt (22,7 % versus 34,9 %) [52]. Zu ähnlichen Ergebnissen kam die prospektive Studie von Lindpaintner et al. [49], die aus 1250 Patienten mit ischämischer Herzerkrankung und 2340 gesunden Kontrollpatienten bestand. Auch hier fand sich ein häufigeres Auftreten des D-Allels in der Patientengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe weder in der Gesamtpopulation noch in Niedrigrisiko-Gruppen. Die Forschungsgruppe um Zhang et al. [106] untersuchten Patienten mit Angina pectoris ohne nachweisbaren koronaren Gefäßstenosen. Auch hier fand sich keine Assoziation des ACE-I/D-Genpolymorphismus zur KHK bzw. zum Myokardinfarkt. Im gleichen Jahr kam eine Forschergruppe um Winkelmann et al. zum gleichen Ergebnis [103]. 209 männliche Patienten wurden mittels Koronarangiographie als erkrankt diagnostiziert, während 92 Probanden einen unauffälligen

Koronarbefund aufwiesen. Saha und Kollegen untersuchten eine Studienpopulation von Chinesen und Indern [73]. Dabei waren 276 Chinesen und 102 Inder an der KHK erkrankt, während 147 Chinesen und 166 Inder einen koronaren Normalbefund hatten. Unter den Patienten mit KHK hatten 155 Chinesen und 72 Inder einen Myokardinfarkt erlitten. Auch hier konnten die Kollegen keine Assoziation zwischen dem Insertions-/Deletionspolymorphismus des ACE-Gens und der KHK oder dem Myokardinfarkt nachweisen. In einer Studie von Jeunemaitre et al. [41], bestehend aus 463 koronarangiographierten Kaukasiern, war weder für den ACE I/D-Genpolymorphismus noch für eine Genvariation des Angiotensinogens (AGT M235T) oder für den Polymorphismus des Angiotensin Typ II Rezeptors (AGT<sub>1</sub>R) feststellbar. Lediglich in einer Niedrigrisiko-Gruppe war ein Zusammenhang zwischen dem AGT M235T-Genpolymorphismus und der KHK zu verzeichnen gewesen. Agerholm-Larsen et al. [2] untersuchten 1997 eine Population von 10150 dänischen Männern und Frauen ihrer Fall-Kontroll- und retrospektiven Kohorten-Studie, die auf der „Copenhagen City Heart Study“ basierte. Weder in der Gesamtpopulation noch in Niedrigrisiko-Gruppen konnte eine Assoziation zwischen dem ACE-I/D-Genpolymorphismus und dem Auftreten ischämischer Herzerkrankungen festgestellt werden. Die Verteilung des D-Allels zeigte keinen geschlechtsspezifischen Unterschied innerhalb der erkrankten oder der gesunden Gruppe. Die D-Allelfrequenz betrug für Frauen 0,512 bzw. 0,509 für Männer.

### **5.8 Vergleich der verschiedenen Studien zur statistischen Beziehung zwischen dem ACE I/D-Genpolymorphismus und der koronaren Herzkrankheit bzw. dem Myokardinfarkt**

Die konträren Ergebnisse lassen sich sicherlich teilweise auf die methodischen Unterschiede der verschiedenen Untersuchungen zurückführen.

Die Definition der koronaren Herzkrankheit unterschied sich in vielen Studien. Tiret et al. [88] wählten ihre Patienten mit Myokardinfarkt aus einem Personenregister aus vier Städten in Frankreich und Nordirland. Die Patienten der Kontrollgruppe wurden lediglich auf ihre Symptomfreiheit bezüglich einer Angina pectoris befragt. Ein objektivierbarer, kardiologischer Status wurde nicht mittels einer Koronarangiographie erhoben.

Andere Studien hielten ihre Kontrollgruppen ohne Koronarangiographie für gesund [90, 19, 55]. Die Kontrollgruppe wurde lediglich anhand einer Befragung hinsichtlich etwaiger abgelaufener Myokardinfarkte oder pectanginöser Beschwerden ausgewählt.



Die Studie von Beohar et al. [13] umfasste sogar eine Kontrollgruppe, die in anderen Studien derselben Forschergruppe hinsichtlich der hypertrophen Kardiomyopathie als gesund klassifiziert wurde [54], jedoch nicht koronarangiographiert wurden. Ebenso wurde in der Studie von Mattu et al. die Definition der koronaren Herzkrankheit anhand von Fragebögen und Elektrokardiogrammen vorgenommen.

In der vorliegenden Studie wurden alle Patienten in der Klinik für Kardiologie und Angiologie des Klinikums der Justus-Liebig-Universität und der Kerckhoff-Klinik in Bad Nauheim koronarangiographiert. Neben der kardiovaskulären Anamneseerhebung konnten objektiv von jedem Probanden, auch unter Einbeziehung des Gensini Scores, Ausmaß und Grad der koronaren Herzkrankheit bestimmt werden.

Auch hinsichtlich der Medikamentenanamnese machten wir Einschränkungen, falls Patienten einen ACE-Antagonisten länger als 3 Monate eingenommen hatten. ACE-Hemmer haben erwiesenermaßen einen protektiven Einfluss auf die Inzidenz eines Myokardinfarktes und die Progredienz der KHK [3]. Zahlreiche, andere Studien schlossen diese Patienten nicht ein [13, 19, 52, 55].

Die vorliegende Studie bestand ausschließlich aus männlichen Patienten, die kaukasischen Ursprungs waren. Mögliche Interaktionen von weiblichen Hormonen mit der Inzidenz und Progredienz der koronaren Herzkrankheit und des Myokardinfarktes wurden somit ausgeschlossen. Eine Vereinheitlichung bei der Erhebung und Analyse der Probandendaten dürfte die Vergleichbarkeit der Studien untereinander erheblich erhöhen.

Diese Studie bestand aus Patienten kaukasischen Ursprungs, im Gegensatz dazu war die Studie von Lindpaintner aus Nordamerika durch heterogene Zusammensetzung charakterisiert. Insofern könnten die rassischen Unterschiede auch einen Einfluss auf die Ergebnisse haben.

### **5.9 Darstellung der Studien, die eine Interaktion zwischen dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Genpolymorphismus und dem ACE I/D-Genpolymorphismus auf das Risiko der koronaren Herzkrankheit bzw. des Myokardinfarktes zeigten**

Tiret et al. untersuchten die Assoziation zwischen dem ACE I/D-Genpolymorphismus und dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Genpolymorphismus im Hinblick auf ein erhöhtes Risiko für einen Myokardinfarkt. An der Studie nahmen 1336 männliche, weiße Europäer im Alter zwischen 25 bis 64 Jahren aus 4 unterschiedlichen europäischen Städten (Belfast, Lille, Strasbourg, Toulouse) teil. Darunter befanden sich 613 Patienten mit einem durchgemachten

Myokardinfarkt in den letzten 3 bis 9 Monaten. Tiret et al. betrachteten dabei die Patientendaten der so genannten ECTIM (Etude Cas-Temoin de l'infarctus du myocarde) – Studie [88].

Dabei fand sich eine Zunahme des Myokardinfarkttrisikos bei den Patienten mit einem homozygoten DD-Genotyp des ACE-Genpolymorphismus, die gleichzeitig Träger des C-Allels des AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Genpolymorphismus waren. Die relativen Risiken betragen für homozygote AT<sub>1</sub>-CC-Allelträger 3,95, für AT<sub>1</sub>-AC-Heterozygote 1,52 und für AT<sub>1</sub>-AA-Homozygote 1,05. AT<sub>1</sub>-CC-Homozygotie bedingte also ein erhebliches Myokardinfarkttrisiko, wenn die jeweilige Person zusätzlich einen DD-Genotyp des ACE I/D-Genpolymorphismus aufwies. Das Risiko war in einer Untergruppe besonders ausgeprägt, die hinsichtlich der koronaren Herzkrankheit und des Myokardinfarktes zu einer so genannten Niedrigrisiko-Gruppe gehörte (Apolipoprotein B < 1,25 g/l, Body-mass-index < 26 kg/m<sup>2</sup>) [88].

Im Gegensatz zur Studie von Tiret et al. haben wir zusätzlich potentielle Interaktionen des AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Genpolymorphismus und des ACE I/D-Genpolymorphismus im Hinblick auf die koronare Herzkrankheit und den Myokardinfarkt untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde keine signifikante Interaktion zwischen dem C-Allel des AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Genpolymorphismus und dem ACE DD-Genotyp im Hinblick auf das Myokardinfarkttrisiko beobachtet. In der Studie von Tiret et al. betrug der Anteil der Probanden mit einem homozygoten ACE DD-Genotyp und AT<sub>1</sub>-Rezeptor CC-Genotyp lediglich 2,5%. Dabei entsprach die Verteilung der Probanden mit einer AT<sub>1</sub>-Rezeptor CC-Homozygotie in Lille und Strassburg, also zwei von insgesamt vier Städten, aufgrund der geringen Patientenzahl nicht dem Hardy-Weinberg-Verteilung. Vor diesem Hintergrund diskutierten Tiret et al. die Möglichkeit einer Selektion durch Überleben von solchen Patienten, die weder ACE DD-homozygot noch AT<sub>1</sub>-Rezeptor CC-homozygot waren. Wir verzichteten auf eine „klassische“ Kontrollgruppe, anstatt dessen wurden alle Patienten koronarangiographiert. Beide Studien sind dennoch miteinander vergleichbar, weil sowohl in dieser als auch in der von Tiret et al. vorgelegten Studie die etablierten Risikofaktoren der koronaren Herzkrankheit und des Myokardinfarkts wie Alter, Hypercholesterinämie, Apolipoprotein B, Zigarettenrauchen und protektive Faktoren wie Apolipoprotein AI als solche nachgewiesen werden konnten. Ebenso war die Häufigkeit der A- und C-Allele in der Untergruppe von Patienten ohne Myokardinfarkt und atherosklerotische Gefäßveränderungen in beiden Studien ähnlich verteilt.

### **5.10 Darstellung der Studien, die keine Assoziation des AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Genpolymorphismus und des ACE I/D-Genpolymorphismus zur koronaren Herzkrankheit bzw. zum Myokardinfarkt zeigten**

In einer britischen Studie aus dem Jahre 2001 von Steeds et al. [80], die insgesamt 1048 Patienten auf eine mögliche Interaktion zwischen dem A1166C-Genpolymorphismus und dem ACE I/D-Genpolymorphismus auf das Myokardinfarktrisiko untersuchten, konnte keine Korrelation gefunden werden. Die Studie bestand aus 541 Patienten, die akut einen Myokardinfarkt erlitten hatten, und aus 507 Probanden einer Kontrollgruppe ohne Myokardinfarkt. Es gab keinen Unterschied bezüglich der Allelfrequenzen zwischen den beiden Gruppen. Bei der Betrachtung des ACE I/D-Genpolymorphismus gab es weder in der Patientengruppe noch in der Kontrollgruppe einen Unterschied in der Verteilung der Genotypen ( $P = 0,48$ ) oder der Allelfrequenzen ( $P = 0,35$ ). Betrachtete man den A1166C-Genpolymorphismus, so unterschieden sich auch hier die Patientengruppe nicht von der Probandengruppe hinsichtlich der Verteilung der Genotypen ( $P = 0,35$ ) und der Allelfrequenzen ( $P = 0,21$ ). Das relative Risiko, einen Myokardinfarkt zu erleiden, betragen für den ACE DD-Genotyp 1,09 (95% CI; 0,82-1,45;  $p = 0,57$ ) und für den AT<sub>1</sub>R CC-Genotyp 1,06 (95% CI; 0,67- 1,68;  $p = 0,86$ ). Steeds et al. fanden unter den Probanden mit ACE DD-Genotyp und AT<sub>1</sub>R CC-Genotyp kein höheres Risiko (0,76 (0,30 – 1,88)), einen Myokardinfarkt zu erleiden, im Vergleich zu denjenigen Probanden mit einem ACE DD-Genotyp und AT<sub>1</sub>R AA-Genotyp (1,19 (0,81 – 1,73 )) oder ACE DD-Genotyp und AT<sub>1</sub>R AC-Genotyp (0,99 (0,65 – 1,51)). Auch bei der Betrachtung der Subpopulationen, die durch eine niedrige Cholesterinkonzentration und einen niedrigen Body-mass-index definiert waren, zeigte sich keine Häufung der Myokardinfarktrate. Entsprechend betragen die relativen Häufigkeiten für Probanden mit einem niedrigen Body-mass-index, die gleichzeitig einen ACE DD-Genotyp und AT<sub>1</sub>R CC-Genotyp aufwiesen, 1,40 (0,35 – 5,63), bei denjenigen mit ACE DD-Genotyp und AT<sub>1</sub>R AC-Genotyp 1,42 (0,77 – 2,62) und den Probanden mit ACE DD-Genotyp und AT<sub>1</sub>R AA-Genotyp 1,25 (0,73 – 2,14).

In der französischen CORGENE-Studie [41] untersuchten Jeunemaitre et al. anhand von 463 kaukasischen Patienten, die alle koronarangiographiert wurden, den Einfluss des ACE I/D-Genpolymorphismus und des AT<sub>1</sub>R A1166C-Genpolymorphismus auf die koronare Herzkrankheit. Unter den Patienten hatten bereits 156 einen Myokardinfarkt erlitten. Bei einem Stenosegrad der Koronarien von mehr als 75% galten diese Patienten als erkrankt.

Jeunemaitre et al. fanden ebenfalls keine Wechselwirkung zwischen dem ACE I/D-Genpolymorphismus und dem AT<sub>1</sub>R-A1166C-Genpolymorphismus auf das KHK-Risiko.

In einer norwegischen Studie mit 619 Probanden stellten Berge et al. [14] ebenfalls keine Interaktion zwischen den oben genannten Genpolymorphismen auf das Myokardinfarkttrisiko fest.

Die Ergebnisse der in diesem Abschnitt benannten und der vorliegenden Studie bezüglich potentieller Interaktionen zwischen dem ACE I/D-Genpolymorphismus und der AT<sub>1</sub>R-A1166C-Genvariation auf das Risiko für das Auftreten einer koronaren Herzkrankheit und eines Myokardinfarktes widersprechen den Ergebnissen um die Forschergruppe um Tiret et al. [88].

Eine aktuellere Studie [80] der Forschergruppe Steeds et al. Aus dem Jahr 2001 konnte ebenfalls keine Wechselwirkung zwischen dem ACE I/D-Genpolymorphismus und AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Genpolymorphismus auf das Myokardinfarkttrisiko feststellen, weder in der Gesamtpopulation noch in den Untergruppen. Es nahmen 541 Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt und 507 Kontrollpersonen an der Studie teil [80]. Anders als die Studie von Tiret et al. wurden in der Studie von Steeds et al. [80] Patienten unmittelbar nach dem Akutereignis hinsichtlich ihres Genotyps untersucht. Dadurch konnte eine mögliche Assoziation zum Myokardinfarkttrisiko besser nachgewiesen werden, als wenn ein Zeitraum von 3 bis 9 Monaten nach dem Ereignis verstrichen war. Mögliche letale Ausgänge aufgrund z.B. einer kongestiven koronaren Herzkrankheit konnten durch die zeitnahe Untersuchung der Patienten vernachlässigt werden.

Weitere, vor allem prospektive Studien müssen in Zukunft zeigen, ob der AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Genpolymorphismus und der ACE I/D-Genpolymorphismus hinsichtlich der koronaren Herzkrankheit und des Myokardinfarkts miteinander interagieren. Insbesondere wäre zu klären, ob der ACE D-Genotyp oder ACE DD-Genotyp mit dem AT<sub>1</sub>-C-Allel interagiert. Die laufenden Studien von Lindpaintner et al. [49] und von Agerholm-Larsen et al. [2] sind groß angelegte prospektive Studien. In beiden Studien konnte keine Assoziation zwischen dem ACE I/D-Genpolymorphismus und dem Myokardinfarkt beobachtet werden.

## 6. Zusammenfassung

### **Fragestellungen:**

Die vorliegende Studie beschäftigte sich mit den Fragen, ob die Angiotensin II Typ 1-Rezeptor (AT<sub>1</sub>R) A1166C- und Angiotensin I-converting-enzym (ACE) Insertions-/Deletions Genpolymorphismen mit dem Risiko und dem Schweregrad der koronaren Herzkrankheit (KHK) und dem Myokardinfarktrisiko assoziiert waren. Zudem sollte geprüft werden, ob Wechselwirkungen zwischen beiden Genvariationen auf die ischämische Herzerkrankung nachweisbar waren.

### **Methoden:**

Alle männlichen Patienten kaukasischen Ursprungs unterzogen sich einer diagnostischen Koronarangiographie. Der KHK-Schweregrad wurde durch die klinische Einteilung in Null-, Eins-, Zwei- und Dreifäßerkrankungen, wobei ein Stenosierungsgrad der Koronarien von mehr als 50 % des Lumens als erkrankt galt, und durch den Gensini Score definiert. Dieser Score diente der genaueren Graduierung der koronaren Herzkrankheit hinsichtlich Lokalisation und Ausmaß der Koronarstenosen. Die Erhebung klinischer und klinisch-chemischer Daten diente zur Charakterisierung des individuellen Risikostatus und zum Nachweis etablierter koronarer Risikofaktoren. Die jeweiligen Genotypen wurden durch Agarose Gelelektrophorese amplifizierter DNA ohne (ACE I/D Genpolymorphismus) bzw. mit vorhergehender Restriktionsbehandlung (AT<sub>1</sub>R A1166C Genvariation) ermittelt.

### **Ergebnisse:**

Die Verteilungen der Genotypen beider Genpolymorphismen stimmten jeweils mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht überein.

AT<sub>1</sub>R A1166C Genpolymorphismus: Die Untersuchungen an 2244 männlichen Probanden ergaben keine Assoziationen zwischen dem Genpolymorphismus und dem KHK- bzw. Myokardinfarktrisiko. Die AT<sub>1</sub>R A1166C Genvariation war auch nicht mit dem KHK-Schweregrad assoziiert. Diese Aussage traf sowohl auf die klinische Definition als auch auf den Gensini Score zu.

ACE I/D Genpolymorphismus: Der ACE I/D Genotyp wurde von 2267 männlichen, koronarangiographierten Probanden kaukasischen Ursprungs bestimmt.

In der Gesamtpopulation bestand keine statistische Abhängigkeit des KHK- und des Myokardinfarkttrisikos vom ACE I/D Genpolymorphismus. Eine Assoziation wurde ebenfalls nicht zwischen der Genvariation und dem KHK-Schweregrad (klinische Definition, Gensini Score) beobachtet. Lediglich in wenigen Niedrigrisikogruppen z.B. von Probanden mit einem Alter unter 61,7 Jahren, niedrigem Apolipoprotein-B/Apolipoprotein-A-Verhältnis unter 0,92 oder niedrigem Body-Mass-Index unter 24,5 kg/m<sup>2</sup> hatten Probanden mit einem ACE DD-Homozygote einen höheren Gensini Score als ACE II-Homozygote.

Potentielle Interaktionen zwischen dem AT<sub>1</sub>R A1166C- und dem ACE I/D-Genpolymorphismen: Interaktionen zwischen den beiden Genpolymorphismen auf das Risiko der KHK oder des Myokardinfarktes im Sinne z.B. eines additiven oder synergistischen Effektes konnten nicht identifiziert werden.

### **Schlussfolgerungen:**

Entgegen ursprünglichen Erwartungen, die durch wenige Publikationen geweckt wurden, und im Einklang mit vielen veröffentlichten Untersuchungen, die nach der vorliegenden Studie publiziert wurden, weisen die Ergebnisse dieser Arbeit daraufhin, dass beide Genpolymorphismen – entweder alleine oder in Kombination – für das Risiko und den Schweregrad der ischämischen Herzerkrankung keine Bedeutung haben.

## Summary

### Aims of the study:

It was the aim of the present study to analyse potential associations between either the angiotensin II type 1-receptor (AT<sub>1</sub>R) A1166C- und angiotensin I-converting-enzyme (ACE) insertions-/deletions (I/D) gene polymorphisms and risk and degree of ischemic heart disease. In addition, we investigated potential interactions between both gene variations on risk and degree of coronary heart disease (CAD) and on risk of acute myocardial infarction.

### Methods:

All Caucasian participants underwent coronary angiography for diagnostic purposes. The degree of CAD was either defined by number of diseased vessels (>50% stenosis) and also by the Gensini Score which provides a more accurate stratification of patients according to the functional significance of their disease. Coronary risk status of patients was evaluated with a detailed questionnaire and by measuring clinical chemical parameters such as cholesterol, apolipoprotein B, apolipoprotein A-I and lipoprotein (a). Genotypes were detected by agarose gel electrophoresis of amplified DNA without (ACE I/D gene polymorphism) or with previous digestion by restriction enzyme (AT<sub>1</sub>R A1166C gene variation).

### Results:

A deviation of AT<sub>1</sub>R A1166C and ACE I/D genotypes were not observed in the total sample or any subpopulation.

AT<sub>1</sub>R A1166C gene polymorphism: In the total sample of 2244 male Caucasians, an association of this gene variation to the risk of coronary heart disease and myocardial infarction was not detected. This conclusion also applies to the degree of coronary heart disease irrespective whether CAD was defined by the number of diseased vessels or by the Gensini Score.

ACE I/D gene polymorphism: The ACE I/D genotypes were identified in 2267 male Caucasians. Similar to the AT<sub>1</sub>R A1166C gene polymorphism, any association was detected neither to the risk nor to the extent of ischemic heart disease. Only in few low-risk groups, ACE DD homozygotes had significantly higher Gensini scores than ACE II genotype carriers. This observation was e.g. made in subgroups of individuals with apolipoprotein

B/apolipoprotein-A-I ratio lower than 0.92, with body-mass indices lower than 24,5 kg/m<sup>2</sup> and of participants younger than 61.7 years.

Potential interactions between AT<sub>1</sub>R A1166C- and ACE I/D gene polymorphisms: Not any – e.g. additive or synergistic – interaction was observed between both gene variations on risk and extent of ischemic heart disease. This observation applied to the total sample and also to low- and high-risk groups.

**Conclusions:**

In contrast to few published observations at the beginning of our study, but in line with a large amount of subsequent investigations, the present results clearly indicate that neither the AT<sub>1</sub>R A1166C gene variation nor the ACE I/D gene polymorphism – alone or in combination – have any significant impact on risk and extent of ischemic heart disease.



## 7. Literaturverzeichnis

1. Aberg G, Ferrer P. *Effects of captopril on atherosclerosis in cynomolgus monkeys*. J Cardiovasc Pharmacol 1990; 15 (Suppl. 5): 65-72.
2. Agerholm-Larsen B, Nordestgaard BG, Steffensen R et al. (1997) *ACE gene polymorphism: ischemic heart disease and longevity in 10150 individuals. A case-referent and retrospective cohort study based on the Copenhagen City Heart Study*. Circulation 95, 2358-67.
3. Ambrosioni E, Bacchelli S, Degli Esposti D, Borghi C. *ACE-inhibitors and atherosclerosis*. Eur J Epidemiol 1992; 8 (Suppl 2): 129-133.
4. Anderson KM, Castelli WP, Levy D. *Cholesterol and mortality: 30 years of follow-up from the Framingham study*. JAMA. 1987;257:2176–2180.
5. Anderson KM, Wilson PW, Odell PM, Kannel WD. *An updated coronary risk profile: a statement for health professionals*. Circulation. 1991;83:356-362.
6. Arbustini E, Grasso M, Fasani R et al. (1995) *Angiotensin converting enzyme gene deletion allele is independently and strongly associated with coronary atherosclerosis and myocardial infarction*. Br Heart J 74, 584-591.
7. Assmann G, Cullen P, Jossa F, Lewis B, Mancini M, *for the International Task Force for the Prevention of Coronary Heart Disease. Coronary heart disease: Reducing the risk. The scientific background to primary and secondary prevention of coronary heart disease. A worldwide view*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999;19:1819-1824.
8. Assmann G, Cullen P, Schulte H. *The Munster Heart Study (PROCAM): results of follow-up at 8 years*. Eur Heart J. 1998;19:A2–A11.
9. Badenhop RF, Wang XL, Wilcken DEL. (1995) *Angiotensin-converting enzyme genotype in children and coronary events in their grandparents*. Circulation 91: 1655-8.
10. Benetos A, Cambien F, Gautier S, Ricard S, Safar M, Laurent S, Lacolley P, Poirier O, Topouchian J, Asmar R. *Influence of the angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism on the effects of perindopril and nitrendipine on arterial stiffness in hypertensive individuals*. Hypertension 1996; 28: 1081-4.
11. Benetos A, Gautier S, Ricard S, Topouchian J, Asmar R, Poirier O, Larosa E, Guize L, Safar M, Soubrier F, Cambien F. *Influence of angiotensin converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism on aortic stiffness in normotensive and hypertensive patients*. Circulation. 1996; 94: 698-703.
12. Benetos A, Topouchian J, Ricard S, Gautier S, Bonnardeux A, Asmar R, Poirier O, Soubrier F, Safar M, Cambien F. *Influence of angiotensin II type 1 receptor*

*polymorphism on aortic stiffness in never-treated hypertensive patients. Hypertension 1995; 26: 44-7.*

13. Beohar N, Daramaju S, Prather A et al. (1995) *Angiotensin-I converting enzyme genotyp DD is a risk factor for coronary artery disease. J Investig Med 43(3), 275-80.*
14. Berge KE, Bakken A, Bohn M et al. (1997) *A DNA polymorphism at the angiotensin II type 1 receptor (AT1R) locus and myocardial infarction. Clin Genet 52, 71-76.*
15. Bohn M, Berge KE, Bakken A et al. (1993) *Insertion/deletion (I/D) polymorphism at the locus for angiotensin I-converting enzyme and parental history of myocardial infarction. Clin Genet 44: 298-301.*
16. Bohn M, Berge KE, Bakken A et al. (1993) *Insertion/deletion polymorphism at the locus for angiotensin I-converting enzyme and myocardial infarction. Clin Genet 44, 292-297.*
17. Bonnardeux A, Davies E, Jeunemeitre X, Fery I, Charru A, Clauser E, Tiret L, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. *Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism in human essential hypertension. Hypertension 1994; 24: 63-69.*
18. Cambien F, Costerousse O, Tiret L et al. (1994) *Plasma level and gene polymorphism of angiotensin-converting enzyme in relation to myocardial infarction. Circulation 90: 669-74.*
19. Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D, Luc G, Bard JM, Bara L, Ricard S, Tiret L, Amouyel P, Alhenc-Gelas F, Soubrier F. *Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. Nature 1992; 359: 641-4.*
20. Campbell-Boswell M, Robertson AL. *Effects of angiotensin II and vasopressin on human smooth muscle cells in vitro. Exp Mol Pathol 1981; 35: 265-276.*
21. Chiu AT, Herblin WF, McCall DE et al. (1989) *Identification of angiotensin II receptor subtypes. Biochem Biophys Res Commun 165: 196-203.*
22. Chobanian AV, Haudenschild CC, Nickerson C, Drago R. *Antiatherogenic effect of captopril in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. Hypertension 1990; 15: 327-331.*
23. Cornow K. *Human type-1 angiotensin II (AT<sub>1</sub>) receptor gene structure and function. Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl 1996; 3: S67-S73.*
24. Curnow K, Pascoe L, Davies E et al. (1995) *Alternatively spliced human type 1 angiotensin II receptor mRNA are translated at different efficiencies and encode two novel receptor isoforms. Mol Endocrinol 9: 1250-62.*
25. Curnow K, Pascoe L, White P. *Genetic analysis of the human type 1 angiotensin II receptor. Mol Endocrinol 1992; 6: 1113-8.*

26. Dzau VJ. *Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis*. Circulation 1988; 77 (Suppl. I): 4-13.
27. Dzau VJ. *Vascular angiotensin pathways: a new therapeutic target*. J Cardiovasc Pharmacol 1987; 10 (Suppl. 7): 9-16.
28. Erdmann E., Riecker G. *Klinische Kardiologie, Kapitel 5 Koronare Herzkrankheit und Herzinfarkt*. 4. Auflage. Springer Verlag.
29. Evans AE, Poirier O, Kee F et al. (1994) *Polymorphisms of the angiotensin-converting enzyme gene in subjects who die from coronary artery disease*. Q J Med 87: 211-4.
30. Feener EP, Northrup JM, Aiello LP et al. (1995) *Angiotensin II induces plasminogen activator inhibitor-1 and -2 expression in vascular smooth muscle cells*. J Clin Invest 95: 1353-62.
31. Fernandez LA, Twickler J, Mead A. *Neovascularization produced by angiotensin II*. J Lab Clin Med 1985; 105: 141-145.
32. Frank B. Hu, MD; Francine Grodstein, ScD; Charles H. Hennekens, MD; Graham A. Colditz, MD; Michelle Johnson, MD; JoAnn E. Manson, MD; Bernard Rosner, PhD; Meir J. Stampfer, MD. *Age at Natural Menopause and Risk of Cardiovascular Disease Arch Intern Med*. 1999;159:1061-1066.
33. Gardemann A, Fink M, Stricker J, et al. *ACE I/D gene polymorphism: presence of the ACE D allele increases the risk of coronary artery disease in younger individuals*. Atherosclerosis 1998; 139:153-159.
34. Gardemann A, Weiß T, Schwartz O, Eberbach A, Katz N, Hehrlein FW, Tillmanns H, Waas W, Haberbosch W. *Gene polymorphism but not catalytic activity of Angiotensin I-converting enzyme is associated with coronary artery disease and myocardial infarction in low-risk patients*. Circulation 1995; 92: 2796-2799.
35. Gardemann A., Nguyen QD, Humme J. et al. *Absence of an association with the risk of coronary artery disease and myocardial infarction and of a synergistic effect with angiotensin-converting enzyme gene polymorphism on the risk of these diseases*. European Heart Journal (1998) 19, 1657-1665.
36. Gensini GG (1980). *Coronary arteriography*. In: Braunwald E, ed. Heart disease. Philadelphia, WB Saunders Co, 352- 353.
37. Gensini GG. *A more meaningful scoring system for determining the severity of coronary heart disease*. Am J Cardiol 1983; 51: 606.
38. Griendling KK, Murphy TJ, Alexander RW: *Molecular biology of the renin-angiotensin system*. Circulation 1993, 87: 1816-1828.

39. Hegele RA, Brunt JH, Connelly PW. *A polymorphism of the angiotensinogen gene associated with variation in blood pressure in a genetic isolate.* *Circulation* 1994; 90: 2207-2212.
40. Hingorani AD, Brown MJ. *A simple molecular assay for the C1166 variant of the angiotensin II type I receptor gene.* *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 213: 725-9.
41. Jeunemaitre X, Ledru F, Battaglia S, Guillanneuf MT, Courbon D, Dumont C, Darmon O, Guize L, Gueronprez JL, Diebold B, Ducimetiere P. *Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system and angiographic extent and severity of coronary artery disease: the CORGENE study.* *Hum Genet* (1997); 99: 66-73.
42. Kainulainen K, Perola M, Terwilliger J, Kaprio J, Koskenvuo M, Syvanen AC, Vartiainen E, Peltonen L, Kontula K. *Evidence for involvement of the type I angiotensin II receptor locus in essential hypertension.* *Hypertension* 1999; 33: 844-9.
43. Katsuya T, Koike G, Yee TW et al. (1995) *Association of angiotensin gene T235 variant with increased risk of coronary heart disease.* *Lancet* 345, 1600-1603.
44. Kawahara Y, Sunako M, Tsuda T, Fukuzaki H, Fukumoto Y, Takai Y. *Angiotensin II induces expression of the c-fos gene through protein kinase C activation and calcium ion mobilization in cultured vascular smooth muscle cells.* *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 150: 52-59.
45. Keavney BD, Dudley CR, Stratton IM et al. (1995) *UK prospective diabetes study (UKPDS) 14: association of angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism with myocardial infarction in NIDDM.* *Diabetologia* 38, 948-952.
46. Kurland L, Melhus H, Karlsson J, Kahan T, Malmqvist K, Öhman P, Nyström F, Hägg A, Lind L. *Polymorphisms in the angiotensinogen and angiotensin II type I receptor gene are related to change in left ventricular mass during antihypertensive treatment: results from the Swedish Irbesartan Left Ventricular Hypertrophy Investigation versus Atenolol (SILVHIA) trial.* *J Hypertens* 2002; 20: 657-663.
47. Kurtz TW. *The ACE of hearts.* *Nature* 1992; 359: 588-9.
48. Levy BI. *The potential role of angiotensin II in the vasculature.* *J Hum Hypertens* 1998; 12: 283-287.
49. Lindpaintner K, Pfeffer KA, Kreutz R et al (1995) *A prospective evaluation of an angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease.* *N England J Med* 332, 706-711.
50. Liu Y, Zhuoma C, Shan G, Cui C, Hou S, Qin W, Cai D, Gesang L, Xiao Z, Pingcuo Z, Zheng H, Wu Z, Zhou W, Qiu C. *A1166C Polymorphism of the Angiotensin II Type I Receptor Gene and Essential Hypertension in Han, Tibetan and Yi Populations.* *Hypertens Res* 2002; 25: 515-521.

51. Ludwig EH, Borecki IB, Ellison RC, Folsom AR, Heiss G, Higgins M, Lalouel JM, Province MA, Rao DC. *Associations between candidate loci angiotensin-converting enzyme and angiotensinogen with coronary heart disease and myocardial infarction: The NHLBI family heart study.* Ann Epidemiol 1997; 7: 3-12.
52. Ludwig EH, Comeli PS, Anderson JL, et al. (1995) *Angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism is associated with myocardial infarction but not with development of coronary stenosis.* Circulation 91, 2120-2124.
53. Madhavan S, Ooi WL, Cohen H, Alderman MH. *Relation of pulse pressure and blood pressure reduction to the incidence of myocardial infarction.* Hypertension. 1994; 23: 395-401.
54. Marian AJ, Yu QT, Workman R et al. (1993) *Angiotensin-converting enzyme polymorphism in hypertrophic cardiomyopathy and sudden cardiac death.* Lancet 342, 1085-1086.
55. Mattu RK, Needham EWA, Galton DJ et al. (1995) *A DNA variant at the angiotensin-converting enzyme gene locus associates with coronary artery disease in the Caerphilly heart study.* Circulation 91, 270-274.
56. Moeller I et al. *Bioactive angiotensin peptides.* J Hum Hypertens 1998; 12: 289-293.
57. Muller R, Brovo R, Burckhardt J, Curran T. *Induction of c-fos gene and protein by growth factors precedes activation of c-myc.* Nature 1984; 312: 716-720.
58. Naftilan AJ, Pratt RE, Dzau VJ. *Induction of platelet-derived growth factor A-chain and c-myc gene expressions by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells.* J Clin Invest 1989; 83: 1419-1424.
59. Nakai K, Itoh C, Miura Y et al. (1994) *Deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with serum ACE concentration and increased risk for CAD in the Japanese.* Circulation 90, 2199-2202.
60. Nakauchi Y, Suehiro T, Yamamoto M et al. (1996) *Significance of angiotensin I-converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism as risk factors for coronary heart disease.* Atherosclerosis 125, 161-169.
61. Neaton JD, Wentworth D. *Serum-cholesterol, blood-pressure, cigarette-smoking, and death from coronary heart-disease: overall findings and differences by age for 316 099 white men.* Arch Intern Med. 1992;152:56-64.
62. Nishimura H, Tsuji H, Masuda H et al. (1997) *Angiotensin II increases plasminogen activator inhibitor-1 and tissue factor mRNA expression without changing that of tissue type plasminogen activator or tissue factor pathway inhibitor in cultured rat aortic endothelial cells.* Thromb Haemost 77: 1189-95.
63. Oike Y, Hata A, Ogata Y et al. (1995) *Angiotensin converting enzyme as a genetic risk factor for coronary artery spasm. Implication in the pathogenesis of myocardial infarction.* J Clin Invest 96, 2975-2979.

64. Owen NE, Villereal ML. *Lys-bradykinin stimulates Na<sup>+</sup> influx and DNA synthesis in cultured human fibroblasts*. Cell 1983; 32: 979-985.
65. Paxton WG, Runge M, Horaist , Cohen C, Alexander RW, Bernstein KE. *Immunohistochemical localization of rat angiotensin II AT1 receptor*. Am J Physiol 1993; 264: F989-95.
66. Poulsen K, Jaconsen J. *Enzymatic reactions of the renin-angiotensin system*. In: Robertson JI, Nicholls Medical Publishing: New York, 1993, pp 5,1-5,12.
67. Powell JS, Clozel JP, Muller RKM, Kuhn H, Hefti F, Hosang M, Baumgartner HR. *Inhibitors of angiotensin-converting enzyme prevent myointimal proliferation after vascular injury*. Science 1989; 245: 186-188.
68. Ridker PM, Gaboury CL, Conlin PR et al. (1993) *Stimulation of PAI-1 by in vivo infusion of angiotensin II*. Circulation 87: 1969-73.
69. Riesen WF, Mordasini R, Salzmann C, Theler A, Gurtner HP (1980) *Apoproteins and lipids as discriminators of severity of coronary heart disease*. Atherosclerosis 37, 157-162.
70. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F et al. (1990) *An insertion/deletion polymorphism in the converting I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels*. J Clin Invest 86: 1343- 1346.
71. Ross R, Glomset J, Kariya B, Harker L. *A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro*. Proc Natl Acad Sci USA 1974; 71: 1207-1210.
72. Ruiz J, Blanche H, Cohen N et al. (1994) *Insertion/deletion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene is strongly associated with coronary heart disease in subjects in non insulin dependent diabetes mellitus*. Proc Natl Acad Sci USA 91: 3662-5.
73. Saha N, Talmud PJ, Tay JSH et al. (1996) *Lack of association of angiotensin converting enzyme (ACE): gene insertion/deletion polymorphism with CAD in two asian population*. Clinical Genetics 50, 121-125.
74. Sakaki K, Yamano Y, Bardhan S, et al. *Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type 1 receptor*. Nature 1991; 351:230.
75. Schmidt S, Beige J, Walla-Friedel M, Michel MC, Sharma AM, Ritz E. *A polymorphism in the gene of the angiotensin II type 1 receptor is not associated with hypertension*. Journal of Hypertension 1997, 15: 1385-1388.
76. Shanmugam V, Sell K, Saha B. *Mistyping ACE heterozygotes*. PCR Methods and Applications 1993; 3: 120-121.

77. Sigusch HH, Vogt S, Gruber U et al. (1997) *Angiotensin I converting enzyme DD genotype is a risk factor of coronary artery disease*. Scand J Clin Lab Invest 57: 127-32.
78. Stangl K, Cascorbi I, Stangl V, Laule M, Mrozikiewicz PM, Schwarz M, Felix SB, Theres H, Baumann G, Roots I. *A1166C polymorphism of the angiotensin II type I receptor gene and risk of adverse events after coronary catheter interventions*. Am Heart J 2000; 140: 170-5.
79. Stankovic A, Zivkovic M, Glisic S, Alavantic D. *Angiotensin II type I receptor gene polymorphism and essential hypertension in Serbian population*. Clinica chimica Acta 327 (2003): 181-185.
80. Steeds RP, Wardle A, Smith PD, Martin D, Channer KS, Samani NJ. *Analysis of the postulated interaction between the angiotensinogen II sub-type I receptor gene A1166C polymorphism and the insertion/deletion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene on the risk of myocardial infarction*. Atherosclerosis 2001, 154: 123-128.
81. Steering Committee of the Physicians Health Study Research Group. *Final Report on the aspirin component of the ongoing Physicians Health Study*. N Engl J Med 1989; 321: 129-35.
82. Sytkowski PA, Kannel WB, d'Agostino RB. *Changes in risk factors and the decline in mortality from cardiovascular diseases: the Framingham Heart Study*. N Engl J Med. 1990;322:1635–1641.
83. Takanayagi R, Ohnaka K, Sakai Y, et al. *Molecular cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding human type-I angiotensin II receptor*. Biochem Biophys Res Commun 1992; 183: 910-16.
84. Tanis BC, van den Bosch MAAJ, Kemmeren JM, Manger Cats V, Helmerhorst FM, Algra A, van der Graaf Y, Rosendaal FR. *Oral contraceptives and the risk of myocardial infarction*. N Engl J Med 2001; 345: 1787-1793.
85. 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; 45: 367-369.
86. Timmermans PBMWM, Wong PC, Chiu AT, et al. *Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists*. Pharmacol Rev 1993; 45: 205-25.
87. Tired L, Blanc H, Ruidavets JB, Arveiler D, Luc G, Jeunemaitre X, Tichet J, Mallet C, Poirier O, Plouin PF, Cambien F. *Gene polymorphisms of the renin-angiotensin system in relation to hypertension and parental history of myocardial infarction and stroke : the PEGASE study*. Journal of Hypertension 1998; 16: 37-44.
88. Tired L, Bonnardeaux A, Poirier O, Ricard S, Marques-Vidal P, Evans A, Arveiler D, Luc G, Kee F, Ducimetière P, Soubrier F, Cambien F. *Synergistic effects of*

*angiotensin-converting enzyme and angiotensin-II type I receptor gene polymorphisms on risk of myocardial infarction.* Lancet 1994; 344: 910-913.

89. Tiret L, Kee F, Poirier O et al. (1993) *Deletion polymorphism in angiotensin-converting enzyme gene associated with parental history of myocardial infarction.* Lancet 341: 991-992.
90. 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.* Journal of Hypertension 1995; 13: 311-317.
91. Tiret L, Rigat B, Poirier O et al. (1993) *Deletion polymorphism in the angiotensin-converting enzyme gene associated with parental history of myocardial infarction.* Lancet 341: 991-2.
92. Tiret L, Rigat B, Visvikis S et al. (1992) *Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels.* Am J Hum Genet 51: 197-205.
93. Unger T, Gohlke P. *Tissue renin-angiotensin systems in the heart and vasculature: possible involvement in the cardiovascular actions of converting enzyme inhibitors.* Am J Cardiol 1990; 65: 31-101.
94. Van Geel PP, Pinto YM, Voors AA et al. (2000) *Angiotensin II Type I Receptor A1166C Gene Polymorphism is associated with an increased response to Angiotensin II in human arteries.* Hypertension 35, 717-721.
95. Vaughan DE, Lazos SA, Tong K. *Angiotensin regulates the expression of PAI-1 in cultured endothelial cells. A potential link between the renin-angiotensin system and thrombosis.* J Clin Invest 1995; 95: 995-1001.
96. Wang DH, Prewitt RL. *Captopril reduces aortic and microvascular growth in hypertensive and normotensive rats.* Hypertension 1990; 15: 68-77.
97. Wang WYS, Zee RYL, Morris BJ. *Assoziation of angiotensin II type I receptor gene polymorphism with essential hypertension.* Clin Genet 1997; 51: 31-34.
98. Weber KT et al. *Vascular remodeling and mineralocorticoids.* J Endocrinol Invest 1995; 18: 533-539.
99. Weber KT, Brilla CG. *Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone-system.* Circulation 1991; 83: 1849-1865.
100. Weber KT. *Aldosterone and spironolactone in heart failure.* N Engl J Med 1999; 341: 753-755.
101. Weinstock JV. *The significance of angiotensin I converting enzyme in granulomatous inflammation. Functions of ACE in granulomas.* Sarcoidosis 1986; 3: 19-26.



102. Wiklund O, Angelin B, Olofsson SO, Eriksson M, Fager G, Berglund L, Bondjers G (1990) *Apolipoprotein (a) and ischaemic heart disease in familial hypercholesterolaemia*. Lancet 335, 1360-1363.
103. Winkelmann BR, Nauck M, Klein B et al (1996) *Deletion polymorphism of the angiotensin converting enzyme is associated with increased plasma angiotensin-converting-enzyme activity but not with increased risk for myocardial infarction and coronary artery disease*. Ann-Intern-Med 125, 19-25.
104. Witteman JCM, Grobbee DE, Valkenburg HA, van Hemert AM, Stijnen T, Burger H, Hoffman A. *J-shape relation between change in diastolic blood pressure and progression of aortic atherosclerosis*. Lancet. 1994; 343: 504-507.
105. Young M. *Adrenal steroids and cardiac fibrosis*. Steroids 1995; 60: 133-136.
106. Zhang Y, Jeffrey S, Barley J et al (1996) *Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism in angina pectoris with normal coronary arteriograms*. Am J Cardiol 77, 877-879.

## Danksagung

Herrn Professor Dr. Dr. N. Katz möchte ich für die Überlassung des Themas danken.

Herrn Professor Dr. Dr. A. Gardemann danke ich besonders für die jederzeit herzliche und anregende Auseinandersetzung mit dem Thema, für die großartige Hilfestellung beim Erstellen der Arbeit und nicht zuletzt für seine verlässliche Betreuung.

Und nicht zuletzt danke ich meiner Familie, besonders meinen Eltern, für die jahrelange, liebevolle Unterstützung und Ermöglichung meines Medizinstudiums.

## Lebenslauf

Name: Nguyen  
Vorname: Quoc Dung  
Wohnort: Lohstraße 181  
47798 Krefeld, Germany

Geburtsdatum: 14.09.1973  
Geburtsort: Ho-Nai, Vietnam  
Nationalität: deutsch  
Konfession: katholisch  
Familienstand: ledig  
Geschlecht: männlich

Schulen: 1979-1983: Grundschule in Ho-Nai, Vietnam  
03.1983: Ankunft in Krefeld im Rahmen der Familienzusammenführung  
1983-1984: Grundschule und intensive Deutschkurse in Krefeld  
1984-1993: Ricarda-Huch-Gymnasium in Krefeld,  
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Studium: 11.1993: Studium der Humanmedizin an der  
Justus-Liebig-Universität Gießen  
03.1996: ärztliche Vorprüfung an der Justus-Liebig-Universität,  
Gießen  
08.1997: 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
08.1999: 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
1999-2000: Praktisches Jahr in den Bereichen Chirurgie, Anästhesie  
und Innere Medizin am Klinikum Wetzlar-Braunfels,  
Akademisches Lehrkrankenhaus der Justus-Liebig-  
Universität Gießen

Klin. Laufbahn: 01.2001-06.2002: Arzt im Praktikum in der Inneren Abteilung, Johanniter-  
Krankenhaus Duisburg-Rheinhausen  
07.2002- 31.03.2005: Assistenzarzt in der Inneren Abteilung, Hospital z. Hl.  
Geist Kempen  
01.04.2005- 31.03.2007: Assistenzarzt in der Inneren Abteilung, Maria-Hilf  
Krankenhaus Krefeld  
03.2007: Anerkennung als Facharzt für Innere Medizin