

**Untersuchung zur Assoziation
der Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G Genvariation
zur Koronaren Herzkrankheit und
zum Myokardinfarkt**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**vorgelegt von Hamami, Monia
aus Siegen**

Gießen, 2005

Aus dem Medizinischen Zentrum für Klinische Chemie,
Klinische Immunologie und Humangenetik
Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie
Leiter: Prof. Dr. Dr. N. Katz
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Dr. A. Gardemann

Gutachter: Frau PD Dr. Nolte

Tag der Disputation: 20.03.2006

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die ich 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 in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Teile dieser Doktorarbeit wurden in der Zeitschrift Atherosclerosis publiziert:

Gardemann A, Hamami M, Katz N, Tillmanns H, Haberbosch W.

The Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G gene polymorphism is not associated with the risk and extent of coronary heart disease.

Atherosclerosis 2000; 150: 445-446.

Elmar und meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen	V
Abbildungen	VI
Tabellen	VII
 Einleitung	 1
 1 Material	 7
 1.1 Technische Hilfsmittel	 7
1.1.1 Kleinmaterial	7
1.1.2 Geräte	7
1.2 Reagenzien	8
1.3 Enzyme	8
1.4 Primer	8
 2 Methoden	 9
2.1 Erhebung der Patientendaten	9
2.2 Definition der Koronaren Herzkrankheit	10
2.3 Durchführung der Koronarangiographie	12
2.4 Messung von Serums substratkonzentrationen	12
2.4.1 Bestimmung des Cholesterins	13
2.4.2 Bestimmung der Triglyzeride	14
2.4.3 Bestimmung von Lipoprotein (a)	15
2.4.4 Bestimmung von Apolipoprotein AI und Apolipoprotein B	15

2.5	Nachweis des Polymorphismus im Chymase-Gen	16
2.5.1	Grundprinzip der DNS-Präparation	16
2.5.2	Grundprinzip der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase-chain-reaction)	17
2.5.3	Grundprinzip der Agarose-Gel-Elektrophorese (AGE)	17
2.5.4	DNS-Präparation aus EDTA-Blut	17
2.5.5	PCR-abhängige Amplifikation des Chymase-DNS-Segments	18
2.5.6	Behandlung des Amplifikates mit einem Restriktionsenzym	20
2.5.6.1	Prinzip der Restriktionsenzyme	20
2.5.6.2	Restriktionsbehandlung des Chymase-Amplifikates mit dem Enzym BstXI	20
2.5.7	Durchführung der Agarose-Gel-Elektrophorese	21
2.6	Definition von Niedrig- und Hochrisiko-Gruppen	23
2.7	Statistik	23
3	Ergebnisse	25
3.1	Charakterisierung der Studienpopulation	25
3.1.1	Altersverteilung innerhalb der Studienpopulation	25
3.1.2	Verhältnis zwischen Koronarer Herzkrankheit und Myokardinfarkt	26
3.1.3	Verhältnis zwischen Gensini Score und Myokardinfarkt	27
3.1.4	Etablierte Risikofaktoren und protektive Faktoren der Koronaren Herzkrankheit	28
3.1.5	Verteilung der Risikofaktoren und protektiven Faktoren in Abhängigkeit vom Ausmaß der Koronaren Herzkrankheit	30
3.1.6	Verteilung der Risikofaktoren und protektiven Faktoren in Abhängigkeit vom Myokardinfarktrisiko	31
3.2	CMA A₍₋₁₉₀₃₎G Genpolymorphismus	32
3.2.1	Verteilung des Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G Genpolymorphismus in der Gesamtpopulation	32
3.2.2	Klinisch-chemische und klinische Variablen in Abhängigkeit vom Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G Genotyp	33

3.3	Beziehung zwischen Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G Genotyp und Koronarer Herzkrankheit	34
3.3.1	Statistische Beziehung zwischen dem Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G Genpolymorphismus und dem KHK-Risiko	35
3.3.2	Beziehung zwischen Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G Genotypen und Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit	35
3.3.3	Beziehung zwischen Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G Genotyp und dem Risiko und Schweregrad der KHK in Hoch- und Niedrig-Risikogruppen	37
3.3.4	Potentielle Interaktionen zwischen der CMA A₍₋₁₉₀₃₎G Genvariation und Genpolymorphismen des Renin-Angiotensin-Systems in Bezug auf Risiko und Schweregrad der KHK	38
3.4	Verhältnis zwischen dem Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G Genpolymorphismus und Myokardinfarkt	38
3.4.1	Verhältnis zwischen CMA A₍₋₁₉₀₃₎G Genpolymorphismus und Myokardinfarkt in Hoch- und Niedrig-Risikogruppen	39
3.4.2	Potentielle Interaktionen zwischen CMA A₍₋₁₉₀₃₎G Genpolymorphismus und anderen Genpolymorphismen des RAAS auf das Myokardinfarktrisiko	39
4	Diskussion	40
4.1	Zusammenfassung der Studienergebnisse	40
4.2	Herz-Chymase: Publikationen, die sich mit der Entdeckung und Charakterisierung der Chymase befassen	40
4.3	Publizierte Untersuchungen zur potentiellen Assoziation des ACE I/D Genpolymorphismus zur ischämischen Herzerkrankung	42
4.4	CMA A₍₋₁₉₀₃₎G Genpolymorphismus: Darstellung der bisherigen Ergebnisse anderer Publikationen	43
5	Zusammenfassung	46

6	Abstract	47
7	Literaturverzeichnis	48

Lebenslauf

Danksagung

Abkürzungen

ACE	Angiotensin I Converting Enzym
ACVB	Aorto-coronarer Venenbypass
A.p.	Angina pectoris
ApoAI	Apolipoprotein AI
ApoB	Apolipoprotein B
BMI	body mass index
bp	base pair (Basenpaare)
CMA	Chymase
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
HDL	high density lipoprotein
Kb	Kilobasen
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	low density lipoprotein
MI	Myokardinfarkt
Min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
PY	pack-years
PCR	Polymerase-chain-reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	Negativer Logarithmus der H^+ -Ionenkonzentration („Potentia hydrogenii“)
PTCA	Perkutane transluminale koronare Angioplastie
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
TAE	Tris-acetat-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

Abbildungen

	Seite
Abbildung 1 Schematische Darstellung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems	3
Abbildung 2 Schematische Darstellung des CMA-Gens	5
Abbildung 3 Schematische Darstellung der Herzkranzgefäße	11
Abbildung 4 Spezifische Spaltung von DNS durch Restriktionsenzyme	20
Abbildung 5 Schematische Darstellung der Amplifikation des Chymase-DNS-Segments mit nachfolgender Restriktionsbehandlung des amplifizierten Chymase-DNS-Fragments mit dem Enzym BstXI	21
Abbildung 6 Photographische (A) und schematische (B) Dokumentation der Polymerase-Kettenreaktion des Chymase-Gens mittels Agarose-Gel-Elektrophorese	22
Abbildung 7 Vergleich des durchschnittlichen Lebensalters gesunder Personen und Patienten mit Koronarer Herzkrankheit bzw. Myokardinfarkt	26
Abbildung 8 Verhältnis zwischen Koronarer Herzkrankheit und Myokardinfarkt	27
Abbildung 9 Verhältnis zwischen Gensini Score-Kategorien und Myokardinfarkt	28
Abbildung 10 Verhältnis zwischen Gensini Score und Myokardinfarkt	28
Abbildung 11 Zusammenhang zwischen Chymase-Genotypen und dem Gensini Score	36
Abbildung 12 Vergleich der durchschnittlichen Gensini Scores zwischen den Chymase G-Allel-Trägern und Chymase AA-Homozygoten in der Gesamtpopulation und in der Population der Nichtraucher	37

Tabellen

		Seite
Tabelle 1	Berechnung des Gensini Scores anhand des Gefäßstatus	11
Tabelle 2	Zusammensetzung des Reaktionsgemisches zur Amplifikation des Chymase-DNS-Segments mittels Polymerase-Kettenreaktion	19
Tabelle 3	Amplifikationsbedingungen	19
Tabelle 4	Nachweis von Risikofaktoren und protektiven Faktoren der Koronaren Herzerkrankung	29
Tabelle 5	Verteilung der Risikofaktoren und protektiven Faktoren in Abhängigkeit vom Ausmaß der Koronaren Herzkrankheit	30
Tabelle 6	Verteilung der Risikofaktoren und protektiven Faktoren in Abhängigkeit vom Myokardinfarktrisiko	32
Tabelle 7	Etablierte Risikofaktoren und protektive Faktoren in Abhängigkeit vom Chymase A ₍₋₁₉₀₃₎ G Genotyp	34
Tabelle 8	Verteilung der Chymase A ₍₋₁₉₀₃₎ G Genotypen in Abhängigkeit vom Risiko der Koronaren Herzerkrankung	35
Tabelle 9	Verteilung der Chymase A ₍₋₁₉₀₃₎ G Genotypen in Abhängigkeit vom Ausmaß der Koronaren Herzkrankheit	36
Tabelle 10	Verteilung der Chymase A ₍₋₁₉₀₃₎ G Genotypen bei Patienten mit und ohne Myokardinfarkt	38

Einleitung

Der akute Myokardinfarkt ist in den westlichen Ländern eine der häufigsten Todesursachen. In der Bundesrepublik Deutschland rechnet man jährlich mit etwa 400.000 Fällen eines akuten Myokardinfarktes [97].

In fast allen Fällen kommt der Infarkt durch den akuten, thrombotischen Verschuß einer Herzkranzarterie zustande [13]. Der Koronararterienverschuß ist in den meisten Fällen der Endpunkt einer Kaskade von Ereignissen, an deren Anfang die Ruptur einer vorbestehenden arteriosklerotischen Plaque steht [13]. Folge der Plaqueruptur ist die lokale Aktivierung von Thrombozyten. Endstrecke der Thrombozytenaktivierung ist die Umformung des Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptors in seine aktive Form. Hierdurch kommt es zur Vernetzung der lokal aktivierten Thrombozyten. Die Vernetzung der Thrombozyten stellt die Matrix dar, welche einerseits zur Aktivierung des intravasalen Gerinnungssystems führt, andererseits die Grundlage für einen verschließenden Thrombus bildet. Innerhalb weniger Minuten nach Entstehung des Thrombus kommt es zur Nekrose der distal gelegenen Myokardabschnitte, d.h. zu einem Myokardinfarkt. Ziel einer anschließenden Thrombolyse ist es, den Nekrosebereich so klein wie möglich zu halten. Kurz gefaßt kann man sagen, daß die Koronare Herzkrankheit (KHK) eine stenosierende Veränderung des Herzkranzgefäßsystems auf dem Boden einer Arteriosklerose darstellt, die zu einem Mißverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot im abhängigen Herzmuskelareal führen kann. Männer erkranken zwei- bis dreimal häufiger als Frauen. Klinische Manifestationen der KHK sind Angina pectoris, Myokardinfarkt, Herzrhythmusstörungen und Herzinsuffizienz.

Viele Ursachen für die Entstehung der KHK sind schon seit längerem als inzwischen etablierte Risikofaktoren bekannt. Entsprechend der Framingham-Studie unterscheidet man *unbeeinflussbare* Risikofaktoren wie familiäre Disposition (z.B. Infarkte in der Familienanamnese), Lebensalter und männliches Geschlecht von den *beeinflussbaren* Risikofaktoren 1. Ordnung (Hypercholesterinämie, Nikotinabusus, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Hyperurikämie) [3,7,15,16,100] und 2. Ordnung (Übergewicht, Bewegungsmangel, emotionaler Streß, Persönlichkeitsstruktur A) [87,29]. Sind zwei Risikofaktoren 1. Ordnung vorhanden, ist das Infarktrisiko im Vergleich zu einer Normalperson vierfach erhöht, bei Vorliegen von drei Risikofaktoren 1. Ordnung steigt das Infarktrisiko auf das Zehnfache.

Von den Patienten, die außerhalb des Krankenhauses einen akuten Myokardinfarkt erleiden, verstirbt ca. ein Drittel noch vor der Krankenhausaufnahme [97]. Nach der Krankenhausaufnahme beträgt die Mortalität innerhalb der ersten 30 Tage etwa 5-10% [14,98]. Die jährliche Mortalität nach Krankenhausentlassung liegt bei ca. 5% [18,27,76,84,93,104]. Die Hälfte bis zwei Drittel der Todesfälle nach Myokardinfarkt ist kardial bedingt. Hiervon entfällt etwa ein Drittel auf maligne Herzrhythmusstörungen [5]. Weitere, häufige kardiale Todesursachen in der Postinfarktphase sind die Herzinsuffizienz und der Reinfarkt [40,56]. Zur Vorbeugung einer terminalen Herzinsuffizienz hat sich die Gabe von β -Blockern [4] und ACE-Hemmern [40] bewährt. Zur Prophylaxe eines Reinfarktes bzw. zur Verhinderung der Progression der Grunderkrankung spielen zum Beispiel die Thrombozytenaggregationshemmung durch Acetylsalicylsäure [39] sowie die effiziente Senkung erhöhter Cholesterinspiegel eine wichtige Rolle [45].

Die Behandlung der nachgewiesenen Risikofaktoren hat zwar zu einer Erniedrigung der KHK-Inzidenz geführt [14,33,97]. Trotzdem stellt die Koronare Herzkrankheit in den westlichen Ländern weiterhin die häufigste Todesursache dar. Daher wurden in den letzten Jahren zunehmend auch Genpolymorphismen in Kandidatengenomen als potentielle Risikoindikatoren der Koronaren Herzkrankheit sowie des Myokardinfarktes untersucht. Der Nachweis von genetischen Risikoindikatoren im Sinne einer erfolgreichen Primärprävention weist den wichtigen Vorteil auf, daß genetische Risikokonstellationen im Prinzip schon bei Kindern bzw. Jugendlichen lange vor Ausbruch der Erkrankung nachgewiesen werden können. Dies eröffnet in Zukunft die Möglichkeit, diagnostische und therapeutische Strategien zu entwickeln, die den Ausbruch der KHK verhindern oder hinauszögern. Bisherige Untersuchungsergebnisse beziehen sich zum Beispiel auf Polymorphismen im *Gerinnungs- und Fibrinolysesystem* (z.B. β -Fibrinogen H1/H2- [24,86], Glykoprotein a-Rezeptormutation [95]), im *Lipidstoffwechselsystem* (z.B. Low Density Lipoprotein-Rezeptormutation [9], Lipoprotein (a)-Polymorphismen [67¹], Apolipoprotein E-Polymorphismen [35,36,37,83] sowie im *Renin-Angiotensin-Aldosteron-System* (z.B. ACE I/D [37-45], Angiotensinogen-Gen-Polymorphismen [25,81]).

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) existiert als zirkulierendes und gewebständiges System in Myokard, Gefäßwänden, Nieren und anderen Organen. Es dient der Konstanthaltung bzw. Normalisierung von Plasmavolumen, Plasmaosmolarität und Blutdruck,

dessen biologisch wirksame Substanzen Angiotensin II und das von ihm in der Nebennierenrinde direkt freigesetzte Aldosteron sind (Abb. 1).

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

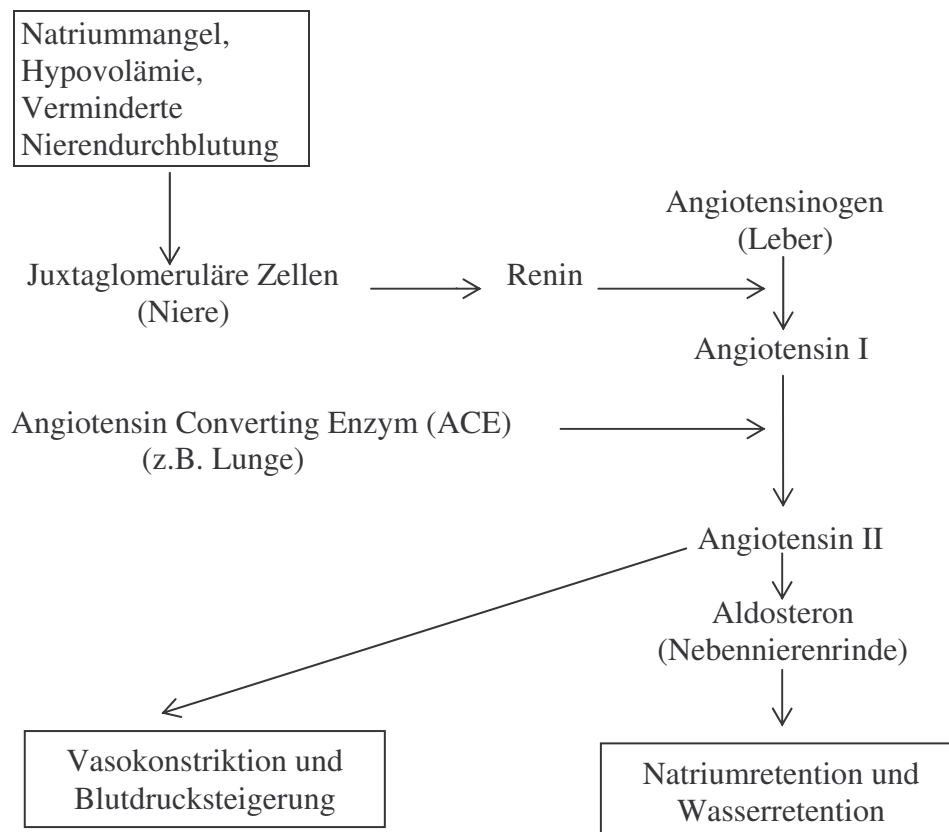


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems

Im Mittelpunkt des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems steht das Angiotensin I Converting Enzym (ACE), welches Angiotensin I zu Angiotensin II umwandelt. Angiotensin II, eine der am stärksten blutdrucksteigernden Substanzen im Organismus, wirkt direkt über die glatte Gefäßmuskulatur vasokonstriktorisch und führt über eine vermehrte Aldosteronausschüttung zu einer Steigerung der Natrium-Retention und damit zu einer Erhöhung des Plasmavolumens.

Eine akute Erniedrigung des Blutdrucks (oder eine akute Erniedrigung des effektiven Plasmavolumens) führt zur Ausschüttung des proteinspaltenden Enzyms Renin, welches in den Granulazellen des juxtaglomerulären Apparates der Niere gebildet wird. Dieses Enzym spaltet vom Reninsubstrat *Angiotensinogen* (aus der Leber) ein Dekapeptid (Peptid mit zehn Aminosäuren) ab, das sogenannte *Angiotensin I*. Das in der Lunge und anderen Geweben vorkommende Angiotensin Converting Enzym (ACE) spaltet vom Angiotensin I zwei Aminosäuren ab, wodurch das hochaktive Oktapeptid *Angiotensin II* entsteht, das in Leber und

Niere durch Angiotensinasen wieder inaktiviert wird. Angiotensin II wirkt als eine der stärksten vasokonstriktorischen Substanzen einerseits direkt an den Arteriolen. Andererseits stimuliert es die Nebennierenrinde (NNR) zur direkten Freisetzung von Aldosteron, das die Natrium- und Wasserresorption im distalen Tubulus erhöht. Beide Wirkungsweisen tragen zu einer Blutdruckerhöhung bei [47].

In den letzten zehn Jahren untermauerten mehrere Studien die Annahme, daß das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System an der Pathogenese der KHK und des Myokardinfarktes beteiligt ist [10,21,51,67,78,79,80,85]. In vitro-Studien zeigten, daß Angiotensin II eine Hyperplasie und Hypertrophie von menschlichen glatten Muskelzellen induzierte [97], die Expression des platelet-derived growth factors steigerte [57], die Expression der Protoonkogene c-fos und c-myc aktivierte [43,57] und eine Neovaskularisierung verursachte [19]. Im Jahre 1990 beschrieben Rigat et al. zum ersten Mal den Genpolymorphismus im Angiotensin I Converting Enzym. Dabei handelt es sich um einen Insertions-/Deletionspolymorphismus, bei dem ein 250 Basenpaar langes Desoxyribonukleinsäure (DNS)-Segment im Intron 16 des ACE-Gens im mutierten D-Allel im Gegensatz zum normalen I-Allel fehlt. Diese beiden Allele bedingen drei verschiedene Genotypen (II, ID, DD). Die Forschungsgruppe konnte einen Zusammenhang zwischen dem Insertions-/Deletionspolymorphismus des ACE-Gens und der Höhe des ACE-Spiegels nachweisen [70]. Dabei war der ACE-Genotyp mit zwei Deletions-Allelen (DD) mit den höchsten ACE-Aktivitäten assoziiert, während die beiden anderen möglichen Genotypen II und ID niedrigere ACE-Aktivitäten aufwiesen. Cambien et al. fanden in ihrer Studie von 1992, daß Herzinfarktpatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen gehäuft ein D-Allel aufwiesen [10]. Ihre Studienpopulation setzte sich aus 610 Herzinfarktpatienten und 733 gesunden Kontrollpersonen aus vier verschiedenen europäischen Städten (Belfast, Lille, Strasbourg, Toulouse) zusammen. Eine besonders ausgeprägte Assoziation zeigte sich bei Patienten, die in Bezug auf etablierte Risikofaktoren ischämischer Herzerkrankungen als gering herzinferktgefährdet einzuschätzen waren. Diese Niedrigrisiko-Gruppe setzte sich aus Patienten zusammen, die niedrige ApoB-Serumkonzentrationen ($\text{ApoB} < 1,25 \text{ mg/dl}$), einen niedrigen Body Mass Index ($\text{BMI} < 26 \text{ kg/m}^2$) aufwiesen und keine lipidsenkenden Medikamente einnahmen. Sie folgerten aus ihren Untersuchungen, daß die Assoziation des ACE DD-Genotyps mit dem Myokardinfarktrisiko besonders bei jenen Personen ausgeprägt war, die ein niedriges Risiko für diese Erkrankung aufwiesen.

1989 entdeckten Urata et al. [91], daß ACE nicht das Hauptenzym zur *kardialen* Angiotensin II-Produktion ist. Sie beschrieben, daß Serin-Proteinase-Inhibitoren diese ACE-unabhängigen Angiotensin II bildenden Aktivitäten vollständig hemmten. Außerdem wurde demonstriert, daß

sich die Herz-Chymase zusätzlich durch ihre hohe Substratspezifität für Angiotensin I signifikant von anderen Angiotensin II bildenden Enzymen wie ACE, Tonin und Kallikrein unterschied [44]. Analoge Ergebnisse wurden später von Nishimura et al. [60] und Husain et al. [38] veröffentlicht. Als Synthese- und Speicherorte der Herz-Chymase wurden kardiale Mastzellen, Endothelzellen und interstitiell gelegene Zellen identifiziert, die ihr Enzymprodukt in das myokardiale Interstitium ausschütten [101].

Alle genetischen Veränderungen von Enzymen, die zu einer Veränderung der plasmatischen, interstitiellen und/oder intrazellulären Angiotensin II-Spiegel führen, könnten über diesen Mechanismus die Entstehung der KHK beeinflussen. Es lag daher nahe, nach Genvariationen im CMA-Gen zu suchen. Die Beschreibung eines CMA $A_{(-1903)}G$ Genpolymorphismus gelang 1996 Pfeufer et al. [65]. Sie identifizierten unter anderem eine $A_{(-1903)}G$ -Transition in der 5'-untranslatierten Region des CMA-Gen. Das CMA-Gen ist mit einer Länge von 3 kb auf dem langen Arm des Chromosom 14 (14q11.2) mitten in einem Cluster von verschiedenen Serin-Proteinase-Genen lokalisiert. Es besteht aus 5 kodierenden (Exons) und 4 intervenierenden Blöcken (Introns). Die 5'-untranslatierte Region beinhaltet eine CAAT- und eine TATA-Box. Die 3'-untranslatierte Region weist einen Poly-A-Schwanz auf (Abb.2).

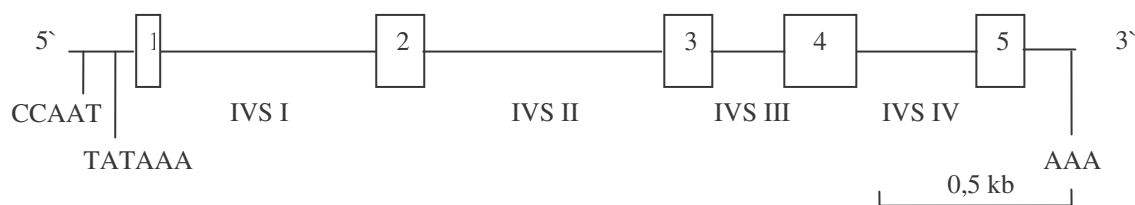


Abbildung 2: Schematische Darstellung des CMA-Gen

Das CMA-Gen ist etwa 3 kb lang und besteht aus 5 kodierenden Abschnitten, die hier als Sequenz-Boxen dargestellt sind, und 4 intervenierenden Sequenzen.

Abkürzungen: A, Adenosin; C, Cytosin; IVS, intervenierende Sequenz; kb, kilobasen; T, Thyrosin.

Die Studien von Pfeufer et al. [65] sowie Schuster et al. [80] stellen die Grundlage für die hier vorgestellte Untersuchung dar, in der folgende Fragestellungen bearbeitet werden sollten:

- 1) Besteht in einer Studienpopulation von 2514 männlichen Probanden eine Beziehung zwischen der CMA $A_{(-1903)}G$ Genvariation und dem KHK-Risiko bzw. dem KHK-Schweregrad?
- 2) Kann eine Assoziation zwischen dem CMA $A_{(-1903)}G$ Genvariation und einem erhöhten Myokardinfarkt-Risiko nachgewiesen werden?

- 3) Besteht eine Interaktion zwischen der CMA A₍₋₁₉₀₃₎G Genvariation und dem ACE I/D Genpolymorphismus in Hinblick auf das KHK- und MI-Risiko?

1 **Material**

1.1 ***Technische Hilfsmittel***

1.1.1 **Kleinmaterial**

Pipettenspitzen, weiß, Fa. Sarstedt, Nürnberg
 Pipettenspitzen, gelb, Fa. Sarstedt, Nürnberg
 Pipettenspitzen, blau, Fa. Sarstedt, Nürnberg
 Polaroidfilm, Typ 667 Professional, Fa. Sigma, Deisenhofen

1.1.2 **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 (DNS-Transilluminator), Fa. Renner, Darmstadt
 Vortex-Schüttler IKA-VIBRO-FIX VF2, Fa. IKA, Staufen
 Wasserbad, Fa. Julabo, Seelbach
 Zentrifuge (Biofuge 13), Fa. Heraeus, Osterode

1.2 *Reagenzien*

Agarose-Gel, Fa. Pharmacia, Freiburg

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

50 bp DNS Ladder, Fa. Pharmacia, Freiburg

Ethidimbromid, Fa. Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

Paraffin-Öl, Fa. Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

PIPES-Puffer, Fa. Boehringer, Mannheim

Q-Solution, Fa. Qiagen GmbH

Triglyzerid-Reaktionsgemisch, Fa. Boehringer GmbH, Mannheim

1.3 *Enzyme*

Taq-Polymerase, Fa. Pharmacia Freiburg

Proteinase K, Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

BstXI, Fa. New England Biolabs, Frankfurt am Main

1.4 *Primer*

Chymase-sense-Primer, Fa. Roth, Karlsruhe

Chymase-anti-sense-Primer, Fa. Roth, Karlsruhe

2 Methoden

2.1 Erhebung der Patientendaten

Dieser Untersuchung liegt ein Kollektiv von 2514 männlichen Patienten zugrunde, die im Zeitraum von Mai 1994 bis Juni 1997 für eine koronarangiographische Untersuchung in der Kerckhoff-Klinik von Bad Nauheim und der Medizinischen Klinik der Justus-Liebig-Universität in Gießen (Abteilung für Kardiologie und Angiologie) stationär aufgenommen worden waren. Voraussetzung für die Teilnahme an der Studie war die Einverständniserklärung der Probanden.

Eine detaillierte Anamneseerhebung der Patienten erfolgte bereits zu Beginn ihres Klinikaufenthaltes mit einem strukturierten Fragebogen. Sie beinhaltete Fragen über Angina pectoris, Herz-infarkte, arterielle Hypertonie, Nikotinabusus, Diabetes mellitus, Körpergröße und -gewicht, Vorerkrankungen sowie bereits vorgenommene Medikationen und Therapien. Angina pectoris wurde in stabile und instabile Formen eingeteilt. Hinsichtlich der Frage nach abgelaufenen Herzinfarkten wurden sowohl Anzahl, Lokalisation und Zeitpunkt als auch das Lebensalter, in dem Herzinfarkte aufgetreten waren, vermerkt. Bezugnehmend auf den Zigarettenkonsum wurde nach Menge und Dauer desselben gefragt. Damit war eine Umrechnung in „pack-years“ möglich (z.B. 1 PY = 20 Zigaretten/Tag über 1 Jahr). Der Body Mass Index (BMI = kg/m²) wurde aus Körpergröße (in Meter) und Gewicht (in kg) errechnet:

$$\text{Body Mass Index} = \text{BMI} = \text{Körpergewicht (kg)} : [\text{Körpergröße}]^2 (\text{m}^2)$$

Gewichtsklassifikation nach WHO:

Untergewicht: BMI < 18,5 kg/m²

Normbereich: BMI 18,5-24,9 kg/m²

Präadipositas: BMI 25,0-29,9 kg/m²

Adipositas Grad 1: BMI 30,0-34,9 kg/m²

Adipositas Grad 2: BMI 35,0-39,9 kg/m²

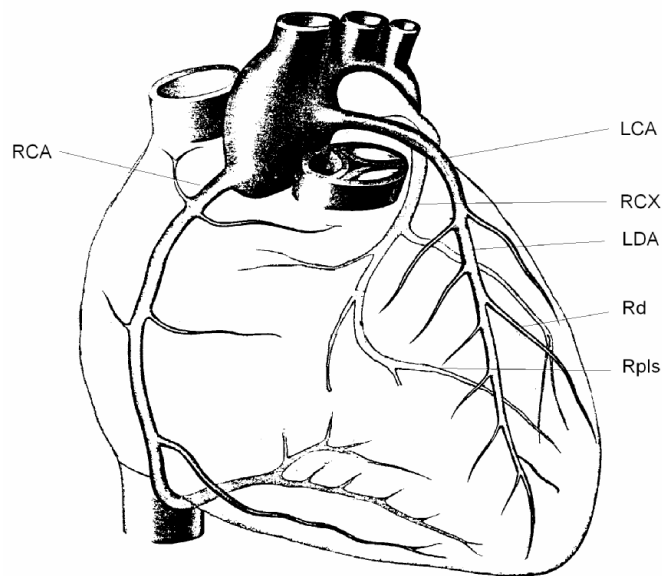
Adipositas Grad 3: BMI > 40 kg/m²

Anhand von Patientenunterlagen (Elektrokardiogrammen, Echokardiographien, Herzsintigraphien, Arztbriefen und Blutuntersuchungsergebnissen) wurden die Angaben des Patienten überprüft und damit objektiviert.

2.2 *Definition der Koronaren Herzkrankheit*

Die Koronare Herzkrankheit (KHK, syn. ischämische Herzerkrankung) ist eine Herzerkrankung, die sich durch den pathologischen Mechanismus der Koronarinsuffizienz auszeichnet. Ursache dieser Koronarinsuffizienz ist vor allem die stenosierende Arteriosklerose der Herzkranzgefäße (90%), die zu einem Mißverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und –angebot führt. Die Folge ist eine Minderversorgung des Herzmuskels mit Sauerstoff und energieliefernden Substraten. Sowohl der durch selektive Koronarangiographie ermittelte Stenosegrad der epikardial gelegenen großen Koronargefäße als auch der Gensini Score [28] dienen zur Erfassung des Schweregrades der Koronaren Herzkrankheit. Koronarstenosen ab 50% wurden als „erkrankt“ definiert. Je nach Lokalisation der Stenose (Ramus circumflexus und Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie und rechte Koronararterie) wurde die KHK in Null-, Ein-, Zwei- und Drei-Gefäßerkrankungen unterteilt, wobei eine Dreigefäßerkrankung eine Stenosierung beider Äste der linken Koronararterie (Ramus circumflexus und Ramus interventricularis anterior), sowie der rechten Koronararterie bedingte.

Die Verwendung des Gensini Scores ermöglichte eine genauere Beurteilung der Schwere der KHK, indem sowohl Lokalisation als auch Stenosierungsgrad mittels Punktwerte und Multiplikationsfaktoren miteinander verrechnet wurden. Je nach Ausmaß der Stenosen wurden 1 bis 32 Punkte vergeben, die in Abhängigkeit von der Lokalisation des betroffenen Segmentes mit einem Faktor von 0,5, 1, 2,5 oder 5 multipliziert wurden [28].



LCA = Left coronary artery

RCA = Right coronary artery

RCX = Ramus circumflexus

LAD = Left anterior descendent

Rd = Ramus diagonalis II

Rpls = Ramus posterolateralis sinister

Abbildung 3: Schematische Darstellung der Herzkranzgefäße

Tabelle 1: Berechnung des Gensini Scores anhand des Gefäßstatus

Stenosierungsgrad	Punktewert
25	1
50	2
75	4
90	8
99	16
100	32

Stenose-lokalisation	Multiplikationsfaktor
LCA	5
LAD	2,5
RCX	1
RCA	1
Rpls	0,5
Alle übrigen Segmente	0,5

2.3 *Durchführung der Koronarangiographie*

Die koronarangiographischen Untersuchungen der 2514 dieser Studie zugrundeliegenden Patienten wurden in den Katheterlaboratorien der Kerckhoff-Klinik von Bad Nauheim und der Medizinischen Universitätsklinik Gießen durchgeführt.

Zunächst wurde unter Lokalanästhesie die Arteria femoralis dextra ungefähr 1-2 cm unterhalb des Leistenbandes mit einer Hohlnadel punktiert (Judkin-Technik) und ein Führungsdraht retrograd in das arterielle System eingeführt. Nach Entfernung der Hohlnadel wurden verschieden geformte Katheter über den liegenden Führungsdraht in die Aorta vorgeschoben (Seldinger-Technik). Die Herzkranzgefäße wurden selektiv dargestellt, indem man je nach Gefäßgröße 3-10 ml Kontrastmittel direkt in ihren Abgangsteil aus dem Bulbus aortae injizierte. Die hierbei verwendeten Katheter besitzen nur eine endständige Öffnung.

Sowohl Lokalisation als auch Schweregrad einer Koronarstenose wurden dokumentiert, indem man die Herzkranzgefäße unter anderem zur Berechnung des Gensini Scores in 15 Teilabschnitte untergliederte und den jeweiligen Gensini Score zuordnete.

Zusätzlich wurde die Ventrikelgröße in Systole und Diastole (Ventrikulographie) ermittelt und mit Hilfe der dabei gewonnenen Ejektionsfraktion der Funktionszustand des linken Ventrikels beurteilt [46].

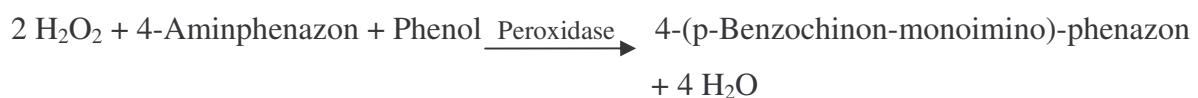
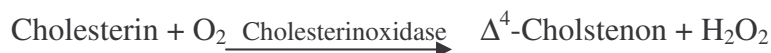
2.4 *Messung von Serumsubstratkonzentrationen*

Für die Isolierung der DNS und Messung des Blutbildes waren EDTA-Blutproben notwendig. Ferner wurden Serum- und Plasmaproben für die Bestimmung von klinisch-chemischen Parametern wie Gesamtcholesterin, Apolipoprotein B, Apolipoprotein AI und Lipoprotein (a) gewonnen. Diese wurden nach den herkömmlichen klinisch-chemischen Methoden gemessen, die im Folgenden näher erläutert bzw. genau beschrieben werden. Die verschiedenen Blutproben wurden nach Einwilligung der Patienten und Abarbeitung des strukturierten Fragebogens entweder am Aufnahmetag oder am Morgen des Tages, an dem die Koronarangiographie durchgeführt worden war, entnommen.

2.4.1 Bestimmung des Cholesterins

Bedeutung des Cholesterins: Cholesterin ist ein wichtiges strukturelles Element von Membran- und Plasmalipoproteinen und stellt die Vorstufe für eine ganze Reihe von Substanzen wie z.B. der Gallensäuren, der Steroidhormone und des Vitamin D₃ dar. Das wasserunlösliche Cholesterin wird im Plasma überwiegend im Low Density Lipoprotein (LDL) transportiert, in geringerem Umfang im High Density Lipoprotein (HDL) und im Very Low Density Lioprotein (VLDL). Die Ausscheidung erfolgt hauptsächlich über die Leber als Cholesterin in der Galle mit dem Stuhl und als Gallensäuren, von denen der größte Teil (~95%) aus dem Dünndarm rückresorbiert (enterohepatischer Kreislauf) wird. Bei erhöhten Cholesterinspiegeln im Blut (Hypercholesterinämie) läßt sich ein gehäuftes Auftreten von Arteriosklerose, und deren Komplikationen wie periphere arterielle Verschlusskrankheit, Herzinfarkt und Schlaganfall nachweisen. Für eine individuelle Abschätzung des kardiovaskulären Risikos ist der LDL/HDL-Quotient sinnvoll. Er sollte unter optimalen Bedingungen unter 2 liegen [62].

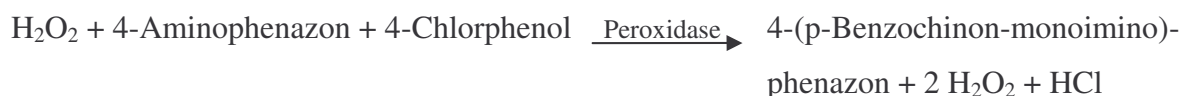
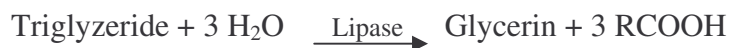
Die Gesamtcholesterinkonzentration im Serum wurde an dem Gerät BM/Hitachi 917 (Firma Boehringer, Mannheim) bestimmt, indem man 3 µl des Probevolumens mit 250 µl Cholesterin-Reagenz (PIPES-Puffer: 75 mmol/l, pH 6,8; Mg²⁺: 10 mmol/l; Natriumcholat: 0,2 mmol/l; 4-Aminphenazon ≥ 0,15 mmol/l; Phenol ≥ 4,2 mmol/l; Fettalkoholglykolether: 1%; Cholesterinesterase ≥ 0,5 U/ml; Cholesterinoxidase ≥ 0,25 U/ml) versetzte. Bei dieser Bestimmungsmethode wurden Cholesterinester durch Cholesterinesterase in freies Cholesterin und Fettsäuren hydrolysiert. Anschließend wurde das Cholesterin durch die Cholesterinoxidase unter Sauerstoffverbrauch in Δ⁴-Cholstenon und Wasserstoffperoxid oxidiert. Wasserstoffperoxid wurde anschließend unter Zusatz von 4-Aminphenazon und Phenol reduziert und das entstandene 4-(p-Benzochinon-monoimino)-phenazon photometrisch bei 700 nm und 37 °C gemessen.



2.4.2 Bestimmung der Triglyzeride

Bedeutung der Triglyzeride: Die Triglyzeride sind Ester des dreiwertigen Alkohols Glycerin. Wegen ihrer geringen Wasserlöslichkeit liegen Triglyzeride im Serum ausschließlich an Lipoproteinen gebunden vor. Die Hauptfunktion der Triglyzeride ist die eines effektiven Energiespeichers. Prospektive epidemiologischen Studien [3,34] ergaben, daß erhöhte Triglyzeridspiegel [$> 180 \text{ mg/dl}$] vor allem in Verbindung mit erniedrigten HDL- und erhöhten LDL-Spiegeln ein erhöhtes Risiko für vorzeitige kardiovaskuläre Erkrankungen bedingen.

Die Triglyzeridkonzentration im Serum wurde an dem Gerät BM/Hitachi 917 (Firma Boehringer, Mannheim) ermittelt: $3 \mu\text{l}$ Probevolumen wurden mit $300 \mu\text{l}$ Reaktionsgemisch (PIPES-Puffer: 50 mmol/l , pH 6,8; Mg^{2+} : 40 mmol/l ; Natriumcholat: $0,2 \text{ mmol/l}$; $\text{ATP} \geq 1,4 \text{ mmol/l}$; 4-Aminophenazon $\geq 0,13 \text{ mmol/l}$; 4-Chlorphenol: $4,7 \text{ mmol/l}$; Kaliumhexacyanoferrat (2): $1 \mu\text{mol}$; Fettalkoholpolyglykolether: $0,65\%$; Lipoproteinlipase $\geq 5,0 \text{ U/ml}$; Glycerinkinase $\geq 0,19 \text{ U/ml}$; Glycerinphosphatoxidase $\geq 2,5 \text{ U/ml}$; Peroxidase $\geq 0,1 \text{ U/ml}$) versetzt. Bei dieser Bestimmungsmethode wurden die Triglyzeride zunächst durch Lipase und Esterase in freie Fettsäuren und Glycerin gespalten. Das entstandene Glycerin wurde mit ATP in Gegenwart von Glycerinkinase zu Glycerin-3-phosphat und ADP umgesetzt. Glycerin-3-phosphat wurde mit Glycerinphosphatoxidase zu Dihydroacetonphosphat und Wasserstoffperoxid oxidiert. Wasserstoffperoxid wurde anschließend unter Zusatz von 4-Aminophenazon und 4-Chlorphenol reduziert und das entstandene 4-(p-Benzochinon-monoimino)-phenazon photometrisch bei 700 nm und 37°C gemessen.



2.4.3 Bestimmung von Lipoprotein (a)

Bedeutung des Lipoprotein (a): Lipoprotein (a) ist eine Plasmafraktion, die das Low Density Lipoprotein (LDL) und das Glykoprotein Apolipoprotein (a) enthält. Das LDL, bestehend aus Phospholipiden, Cholesterin und Apolipoprotein B-100, ist über Disulfidbrücken mit Apolipoprotein (a) [Apo(a)] verbunden. Wegen seiner hohen strukturellen Übereinstimmung mit Plasminogen werden dem Apo(a) thrombogene Eigenschaften zugeschrieben [32]. Als Plasminogen-ähnliches Protein kann Apolipoprotein (a) in die Fibrinolyse eingreifen und die Aktivierung von Plasminogen zum Plasmin kompetitiv inhibieren. Die Konzentration von Apo(a) im Serum ist genetisch festgelegt und weist ab etwa 30 mg/dl auf ein erhöhtes atherogenes Risiko hin. Lipoprotein (a) ist daher einer der wesentlichsten Risikofaktoren für Atherosklerose und Herzinfarkt [⁹,¹³]. Da weder Diät noch lipidsenkende Medikamente die Konzentration von Lp(a) nennenswert senken können, müssen bei Patienten mit erhöhten Lp(a)-Spiegeln die übrigen Risikofaktoren verstärkt reduziert werden [99].

Prinzip der Bestimmungsmethode: Das Prinzip der quantitativen Bestimmung von Lp(a) in Humanserum mit Hilfe des Dade-Behring-Nephelometers beruht auf der Agglutination von Lp(a)-haltigen Proben nach Mischung mit Polysterol-Latex-Partikeln, die mit Antikörpern gegen Human Lp(a) beladen sind [20]. Aus patentrechtlichen Gründen wurden die Komponenten und Reaktionsschritte von der Firma nicht preisgegeben.

2.4.4 Bestimmung von Apolipoprotein AI und Apolipoprotein B

Bedeutung des Apolipoprotein AI: Apolipoprotein AI (ApoAI) stellt die Hauptproteinkomponente des High Density Lipoproteins (HDL) dar. Der Anteil von ApoAI am Gesamtprotein des HDL beträgt ca. 65 % [69]. ApoAI aktiviert die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase, die die Veresterung von Cholesterin katalysiert [30]. Das so veresterte Cholesterin kann zur Leber transportiert, teils zu Gallensäuren umgewandelt und ausgeschieden werden. Bei Personen mit arteriosklerotischen Gefäßveränderungen liegen häufig erniedrigte ApoAI-Konzentrationen vor [68]. Auch bei normalen Apolipoprotein B-Konzentrationen stellt ein erniedrigter ApoAI-Spiegel ein Risikofaktor für die Entstehung der Arteriosklerose dar.

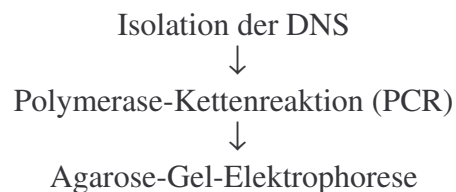
Bedeutung des Apolipoprotein B: Apolipoprotein B (ApoB) ist die Hauptproteinkomponente des Low Density Lipoproteins (LDL). ApoB ist für die Reaktion mit LDL-Rezeptoren notwendig

und somit am Transport von Cholesterin u.a. in Zellen der Gefäßwand beteiligt. Erhöhte ApoB-Konzentrationen kommen gehäuft bei arteriosklerotischen Gefäßveränderungen vor und stellen einen Risikofaktor der Arteriosklerose dar.

Prinzip der Bestimmungsmethode: Die quantitative Messung der Apolipoproteine AI und B erfolgte mit Hilfe einer immunchemischen Reaktion mit spezifischen Antikörpern, bei der Immunkomplexe gebildet werden, an denen eingestrahktes Licht in einem Nephelometer der Fa. Dade-Behring gestreut wurde. Die Intensität des Streulichts ist abhängig von der Konzentration des jeweiligen Apolipoproteins in der Probe. Die Auswertung erfolgte durch Vergleich mit einem Standard bekannter Konzentration [50]. Aus patentrechtlichen Gründen wurden die einzelnen Komponenten und die genauen Reaktionsschritte von der Fa. Dade-Behring nicht preisgegeben.

2.5 Nachweis des Polymorphismus im Chymase-Gen

Zum Nachweis des Polymorphismus im Chymase-Gen benötigt man folgende Schritte



2.5.1 Grundprinzip der DNS-Präparation

Die für die Polymerase-Kettenreaktion benötigte DNS wurde aus den im EDTA-Blut enthaltenen Leukozyten gewonnen. Um möglichst viele potentielle Hemmstoffe in der PCR zu entfernen und damit eine sichere und reproduzierbare Amplifikation der Ziel-DNS zu ermöglichen, erfolgte eine Aufreinigung und Isolierung der DNS. Dabei wurden die korpuskulären Anteile des Blutes von der DNS getrennt. Dies geschieht durch Zell-Lyse mittels Proteasen und mehrmaliges Zentrifugieren.

2.5.2 Grundprinzip der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase-chain-reaction)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde 1985 von Kary Mullis erfunden [54,55]. Sie stellt eine in vitro-Technik dar, mit der man unter anderem gezielt DNS-Abschnitte vermehrt (amplifiziert), die von zwei bekannten DNS-Sequenzen (Oligonukleotidprimer) definiert werden. Bei dieser Methode wird die DNS durch Erhitzen zunächst in Einzelstränge gespalten (Denaturierung). Die anschließende Anlagerung der Oligonukleotidprimer (Annealing) dient als Starthilfe für eine hitzestabile DNS-Polymerase, die nun mit Hilfe von Desoxyribonukleotiden komplementäre DNS-Stränge produziert (DNS-Synthese/Extension). Alle drei Schritte zusammen bilden einen PCR-Zyklus, den man normalerweise 25-30mal wiederholt [17]. Die Amplifikate werden in einer Agarose-Gelelektrophorese nach ihrer Größe getrennt und mittels Ethidiumbromid bei UV-Licht sichtbar gemacht.

2.5.3 Grundprinzip der Agarose-Gel-Elektrophorese (AGE)

Die Gelelektrophorese dient der analytischen und präparativen Auftrennung verschiedener Substanzgemische durch Anlegen eines elektrischen Gleichstroms.

Da Nukleinsäuren aufgrund der Phosphatgruppen beim pH-Wert des Elektrophorese-Puffers negativ geladene Moleküle darstellen, wandern sie im elektrischen Feld zur positiven Elektrode (Anode). Die Auftrennung der DNS-Fragmente beruht auf ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld. Diese hängt von der angelegten Spannung, der Größe der zu trennenden DNS-Moleküle sowie der Porengröße des Trägermediums ab.

2.5.4 DNS-Präparation aus EDTA-Blut

Zur DNS-Präparation wurden 100 µl EDTA-Blut und 500 µl TE-Puffer (pH 8,0, 10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA) in ein Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß gegeben, gerüttelt und für eine Minute bei 13000 xg zentrifugiert. Das Pellet wurde nach Verwerfen des Überstandes in weiteren 500 µl TE-Puffer resuspendiert, gerüttelt und nochmals bei 13000 xg 1 Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 100 µl Lysis-Puffer K (100 mM Tris-HCl pH 8,3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0,1% Gelatine, 5% Tween 20) gelöst und gerüttelt. Nach Zugabe von

10 µl Proteinase K (10 mg/ml), Durchmischen und leichtem Anzentrifugieren erfolgte eine 45 minütige Inkubation bei 56 °C zum Verdau der Proteine. Zur Inaktivierung von der Proteinase K wurden die Proben abschließend noch für 10 Minuten bei 95 °C inkubiert, sofort danach auf Eis gelegt und bis zur Analyse bei -20°C aufbewahrt.

2.5.5 PCR-abhängige Amplifikation des Chymase-DNS-Segments

Die PCR wurde mit 0,28 µmol eines jeden Primers in einem Volumen von 50 µmol mit je 0,22 µmol eines jeden Desoxynukleosidtriphosphats, 0,7 µmol Taq-Polymerase, 10 mmol/l Tris-HCl (pH 8,4), 50 mmol/l KCl, 1,5 mmol/l Mg^{2+} , 0,01 mg/ml Gelatine und 5,6 µl Q-Solution durchgeführt (Tabelle 2).

Die eingesetzten Primer bestanden aus dem sense-oligo-Primer (5`) GGA AAT GTG AGC AGA TAG TGC AGT C (3`) und dem antisense-oligo-Primer (5`) AAT CCG GAG CTG GAG AAC TCT TGT C (3`) (Abb. 4).

Die extrahierte DNS wurde in einem DNS-Thermocycler in jeweils 30 Zyklen (Denaturierung: 1 min bei 94 °C, Annealing: 1 min bei 58 °C, Extension: 1 min) bei 72 °C amplifiziert (Tabelle 3). Die unterschiedlichen Banden ergeben sich durch die Behandlung mit dem Restriktionsenzym. Durch den Polymorphismus (Austausch A→G) wird eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym geschaffen [65].

Tabelle 2: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches zur Amplifikation des Chymase/DNS-Segments mittels Polymerase-Kettenreaktion

Reagenzien	Endkonzentrationen (in 50 µl)
sense-oligo-Primer	0,28 µl
antisense-oligo-Primer	0,28 µl
dNTP (dATP/dCTP/dGTP/dTTP)	0,22 µl
Taq-Polymerase	0,7 µl
PCR-Puffer	10 mmol/l Tris-HCl pH 8,4 50 mmol/l KCl 1,5 mmol MgCl ₂ 0,01 mg/ml Gelatine
Q-Solution	5,6 µl
Proben	aus DNS-Präparation ca. 100 ng genomische DNS
negative Kontrolle	destilliertes, autoklaviertes Wasser

Tabelle 3: Amplifikationsbedingungen

Programm	Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit (min)
1	1	94	5
1	30	94	1
1	30	60	1
1	30	72	1
1	1	72	10

2.5.6 Behandlung des Amplifikates mit einem Restriktionsenzym

2.5.6.1 Prinzip der Restriktionsenzyme

Für den Nachweis von Genpolymorphismen können Restriktionsenzyme eingesetzt werden, die das PCR-Amplifikat an spezifischen Stellen schneiden (Erkennungssequenzen). Beispielsweise schneidet das Restriktionsenzym *EcoR* I (Escheria coli Restriktionsenzym I) jede DNS überall dort, wo die Sequenz GAATTC vorkommt. Das entstandene DNS-Fragment endet mit einem einsträngigen Abschnitt AATT (Abb. 4).

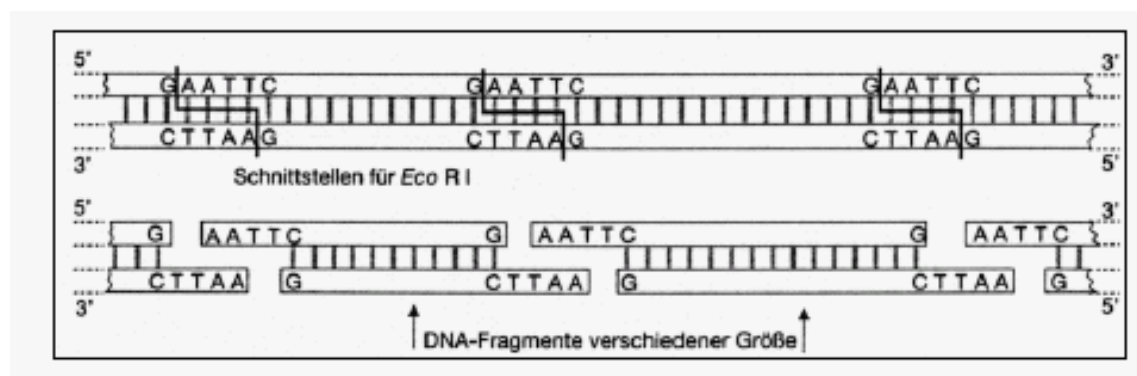


Abbildung 4: Spezifische Spaltung von DNS durch Restriktionsenzyme (aus [61]).

2.5.6.2 Restriktionsbehandlung des Chymase-Amplifikates mit dem Enzym BstXI

Das amplifizierte DNS-Produkt zum Nachweis des CMA A₍₋₁₉₀₃₎G Genpolymorphismus hat eine Länge von 285 Basenpaaren (bp) [65]. Das Amplifikat wurde mit dem Restriktionsenzym BstXI geschnitten. Das Restriktionsenzym BstXI erkennt die Sequenz CCA(N)₅^NTGG (Abb. 5). Durch den Austausch A→G wird eine Schnittstelle für BstXI geschaffen. Bei Vorhandensein eines A-Allels konnte daher eine 285 bp-Bande nachgewiesen werden. DNS, die homozygot bezüglich des G-Allels war (GG-Genotyp), war durch zwei Banden bei 90 und 195 bp charakterisiert [65].

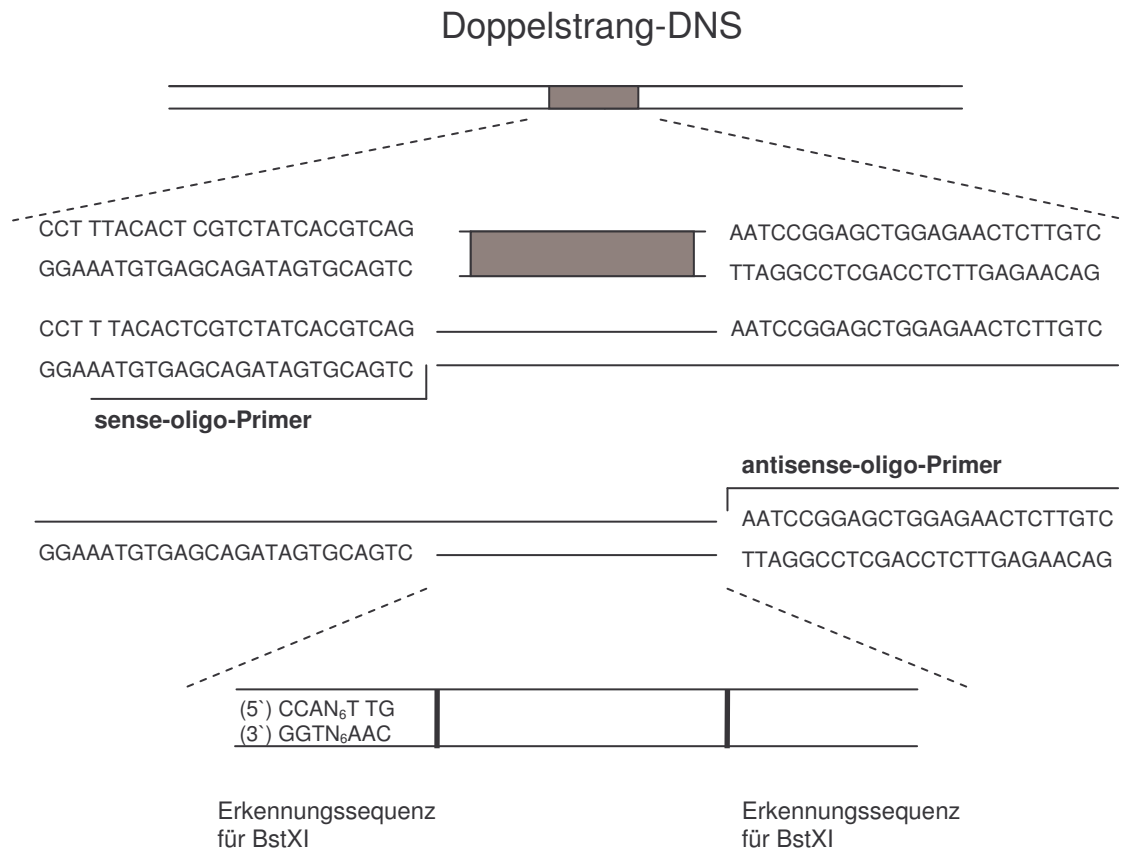


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Amplifikation des Chymase-DNS-Segments mit nachfolgender Restriktionsbehandlung des amplifizierten Chymase-DNS-Fragments mit dem Enzym BstXI

Im Rahmen der PCR findet eine Amplifikation des Chymase-DNS-Segments unter Verwendung der sense-oligo-Primer und antisense-oligo-Primer statt. Das Restriktionsenzym BstXI erkennt die Sequenz CCAN₆TTG. In Abhängigkeit von den Allelen ergaben sich unterschiedlich große Fragmente (95, 195 oder 285 bp).

2.5.7 Durchführung der Agarose-Gel-Elektrophorese

Die DNS-Proben wurden mit Hilfe der Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennt, indem man 0,9 g Agarose in 30 ml TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, pH 8,4, 50 mM EDTA) durch Erhitzen in der Mikrowelle vollständig löste, nach Abkühlung auf etwa 50 °C in die Mini-Gelkammer goß und damit 3 %-ige horizontale Agarosegele (Agagel Mini von Biometra, Gelgröße 6,5 x 9,0 cm) herstellte. Neben Mini-Gelkammern, in welche Kämme mit 12 Zähnen à 1mm zum Herstellen von Geltaschen eingebracht wurden, kamen auch größere Elektrophoresekammern zum Einsatz. Es handelte sich dabei um Elektrophoresekammern einer Größe von 20 x 10 cm (Agagel Midi-Wide von Biometra) bzw. 20 x 20 cm (Agagel Maxi von Biometra), in welche Kämme mit 40 bzw. 160 Zähnen eingesetzt werden konnten. 5 µl eines Basenpaarleiters („50 bp Ladder“) wurden als Molekulargewichtsmarker jeweils in eine Geltasche pipettiert. Die Negativ-Kontrolle

wurde mit 10 µl in eine Geltasche gegeben. In weitere 10 Geltaschen wurden jeweils 10 µl Probenvolumen gegeben (Mini-Gelkammern). Bei Verwendung der Midi-Wide- und Maxi-Elektrophorese-Kammern wurden 5 µl des Basenpaarleiters im Abstand von etwa 20 Proben in eine Geltasche pipettiert, um eine möglichst genaue Beurteilung der Banden der Probanden-DNS zu gewährleisten. 10 µl der Negativ-Kontrolle wurden in eine weitere Geltasche pipettiert, so daß in die restlichen 151 bzw. 37 Geltaschen jeweils 10 µl Probenvolumen eingebracht werden konnten. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 100 Volt für ca. 80 Minuten. Daraufhin wurde das Gel zur Anfärbung für 10 Minuten in eine Ethidiumbromid-Lösung (2 µg/ml Ethidiumbromid) gelegt und sodann in TAE-Puffer gewaschen. Im Anschluß daran wurde die DNS mit Hilfe eines Transluminators unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit einem Polaroidphoto (Polaroidfilm Typ 667 Professional (Blende: 8-11, Belichtungszeit 1 sec) dokumentiert (Abb. 6).

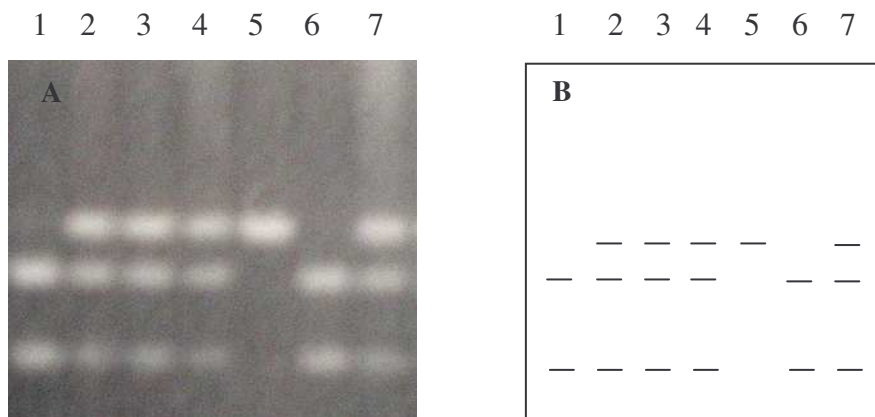


Abbildung 6: Photographische (A) und schematische (B) Dokumentation der Polymerase-Kettenreaktion des Chymase-Gens mittels Agarose-Gel-Elektrophorese

Das jeweilige Produkt der Polymerase-Kettenreaktion des Chymase-Gens wurde in einer 3%-igen Agarose-Gel-Elektrophorese unter ultravioletter Transilumination sichtbar gemacht. Linie 1 und 6 zeigen den GG-Genotyp. 5 zeigt einen Homozygoten mit zwei A-Allelen (285 bp). 2, 3, 4 und 7 zeigen Heterozygote mit einem A-Allel (285 bp) und einem G-Allel (95 und 195 bp).

2.6 *Definition von Niedrig- und Hochrisiko-Gruppen*

Hinsichtlich der etablierten Risikofaktoren für die Entstehung der Koronaren Herzkrankheit wurde die Studienpopulation in Niedrigrisiko- und Hochrisiko-Gruppen bezüglich der ischämischen Herzerkrankung unterteilt. Diese wurden durch das Unterschreiten bzw. Überschreiten der Mittelwerte der kontinuierlichen Parameter und durch das Fehlen bzw. das Vorhandensein von koronaren Risikofaktoren (Nikotinkonsum, Hypertonie, Diabetes mellitus) ermittelt. Folgende Niedrigrisiko-Gruppen wurden aufgrund dieser Definitionen formuliert: kein Nikotinkonsum, keine arterielle Hypertonie, kein Diabetes mellitus, BMI < 26.95 kg/m², ApoB < 1.26 g/l, ApoAI > 1.45 g/l, Lp(a) < 24.7 mg/dl, Triglyzeride < 149.5 mg/dl und Gesamtcholesterin < 207.5 mg/dl. Die Hochrisiko-Gruppen ergaben sich dementsprechend aufgrund folgender Definitionen: Nikotinkonsum, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, BMI ≥ 26.95 kg/m², ApoB ≥ 1.26 g/l, ApoAI ≥ 1.45 g/l, Lp(a) ≥ 24.7 mg/dl, Triglyzeride ≥ 149.5 mg/dl und Gesamtcholesterin ≥ 207.5 mg/dl. Durch Kombination der genannten Parameter ergaben sich weitere Niedrigrisiko-Gruppen.

2.7 *Statistik*

Die statistischen Berechnungen dieser Arbeit wurden mit Hilfe von SPSS für Windows (Version 7.5) durchgeführt. Die Auswahl der im Folgenden beschriebenen statistischen Verfahren wurde nach eingehender Beratung mit Herrn W. Pabst (Abteilung für Medizinische Informatik der Universitätsklinik Gießen) getroffen.

Die Werte für Gesamtcholesterin, Triglyzeride, Apolipoprotein AI, Apolipoprotein B, Lipoprotein (a), Gensini Score, Body Mass Index und Alter wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben. Die Verteilung der Parameter in der Studienpopulation wurde mittels des Kolmogorov-Smirnov Goodness of Fit Test berechnet. Das Verhältnis der quantitativen Risikofaktoren Cholesterin, Triglyzeride, Apolipoprotein B, Lipoprotein (a), Body Mass Index und Alter zu den Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G Genotypen wurde mit Hilfe des Kruskal-Wallis 1-Way Anova-Test überprüft. Für die Parameter Diabetes und Hypertonie fand der χ^2 -Test Anwendung.

Die etablierten Risikofaktoren der koronaren Herzkrankheit und des akuten Myokardinfarktes wurden mit Hilfe der multiplen Regressionsanalyse oder der multiplen logistischen Regression

identifiziert. Die Beziehung zwischen der Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G Genvariation und dem Ausmaß der koronaren Herzkrankheit wurde mit Hilfe der multiplen Regressionsanalyse bestimmt. Als Abschätzung des relativen Risikos der Koronaren Herzkrankheit und des Myokardinfarktes wurden odds ratios mit 95%-Konfidenzintervallen mittels multipler logistischer Regression berechnet. Die Analyse der statistischen Beziehung zwischen dem Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G Genpolymorphismus und der ischämischen Herzerkrankung erfolgte also unter Berücksichtigung der etablierten koronaren Risikofaktoren. Potentielle Interaktionen zwischen der Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G Genvariation mit Polymorphismen des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems auf das Risiko und das Ausmaß der Koronaren Herzkrankheit und auf das Risiko des Myokardinfarktes wurden mit Hilfe des 2-way Anova-Tests anhand eigener Daten aus bereits publizierten Studien berechnet [21,23,25]. Mit Einverständnis der Autoren wurden das Angiotensinogen-Gen, der ACE I/D Genpolymorphismus und die AT₁-Rezeptor-A₁₁₆₆C-Genvariation in diese Berechnungen einbezogen. Ein zweiseitiger p-Wert von < 0.05 wurde als signifikant definiert.

3 Ergebnisse

3.1 *Charakterisierung der Studienpopulation*

Dieser Untersuchung liegt ein Kollektiv von 2514 männlichen Patienten zugrunde, die im Zeitraum von Mai 1994 bis Juli 1997 im Rahmen einer koronarangiographischen Diagnostik in der Medizinischen Universitätsklinik in Gießen und der Kerckhoff-Klinik in Bad Nauheim stationär aufgenommen worden waren.

Die Mehrzahl der Patienten (80%) wurde aufgrund einer vermuteten oder bereits vorbekannten koronaren Herzkrankheit koronarangiographisch untersucht; in nahezu allen anderen Fällen gaben Zeichen einer Linksherzinsuffizienz Anlaß für diese Untersuchung.

3.1.1 Altersverteilung innerhalb der Studienpopulation

Das Altersspektrum der vorliegenden Population erstreckte sich von 17 bis 88 Jahren; das Durchschnittsalter betrug 61.6 Jahre. Zum einen erfolgte eine Einteilung der Studienpopulation in Kontrollpersonen ohne Myokardinfarkt ($n = 1332$, Durchschnittsalter = 61.2 ± 10.1 Jahre) und in Patienten mit mindestens einem Myokardinfarkt ($n = 1182$, Durchschnittsalter = 62.2 ± 9.5) (Abb. 7).

Eine weitere Einteilung der Studienpopulation erfolgte anhand des koronarangiographisch ermittelten Gefäßstatus. Personen ohne KHK (Koronargefäßstenosierungen $< 50\%$) waren durchschnittlich 58.2 ± 11.0 Jahre alt ($n = 584$), Patienten mit Eingefäßerkrankung 61.0 ± 9.7 Jahre alt ($n = 500$), Patienten mit Zweigefäßerkrankung 62.6 ± 9.6 Jahre alt ($n = 560$) und Patienten mit Dreigefäßerkrankung 63.7 ± 8.6 Jahre alt ($n = 870$). Alle Angaben wurden als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung angegeben (Abb. 7).

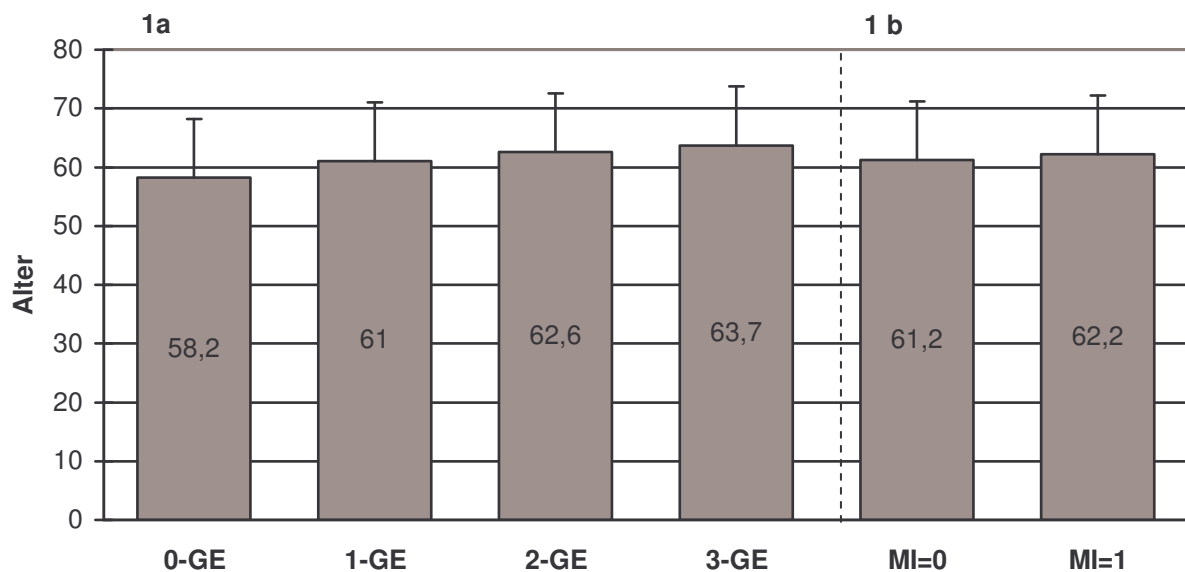


Abbildung 7: Vergleich des durchschnittlichen Lebensalters gesunder Personen und Patienten mit Koronarer Herzkrankheit bzw. Myokardinfarkt

Die Studie umfaßt eine Population von 2514 männlichen Patienten, die zur koronarangiographischen Diagnostik in der Kerckhoff-Klinik von Bad Nauheim oder in der Medizinischen Universitätsklinik in Gießen stationär aufgenommen worden waren. Weiterhin konnte die Studienpopulation in Patienten ohne Myokardinfarkt und mit mindestens einem Herzinfarkt unterteilt werden.

Das Durchschnittsalter in den jeweiligen Untergruppen ist an der Ordinate abzulesen.

Abkürzungen: MI = 0, Patienten ohne Myokardinfarkt; MI = 1, Patienten mit mindestens einem Myokardinfarkt; 0-GE, Patienten ohne Herzkranzgefäßstenosierung (< 50 % Stenosierungsgrad); 1-GE, Patienten mit Eingefäßerkrankung; 2-GE, Patienten mit Zweigefäßerkrankung; 3-GE, Patienten mit Dreigefäßerkrankung.

3.1.2 Verhältnis zwischen Koronarer Herzkrankheit und Myokardinfarkt

In der vorliegenden Studienpopulation konnte die bereits bekannte Beziehung zwischen dem Bestehen einer Koronaren Herzerkrankung und der Häufigkeit des Auftretens eines Myokardinfarktes nachgewiesen werden. Wie Abb. 8 zeigt, stieg mit zunehmender Schwere der Koronaren Herzkrankheit auch der Anteil der Patienten, die mindestens einen Myokardinfarkt erlitten hatten ($p < 0,00001$). Bei den Patienten mit Koronargefäßstenosen < 50 % war der Anteil der Myokardinfarktpatienten bei 16 % und stieg in der Patientengruppe mit Dreigefäßerkrankung auf 62 % an. Patienten mit Eingefäßerkrankung hatten in 49 %, Patienten mit Zweigefäßerkrankung in 56 % der Fälle bereits mindestens einen Herzinfarkt erlitten.

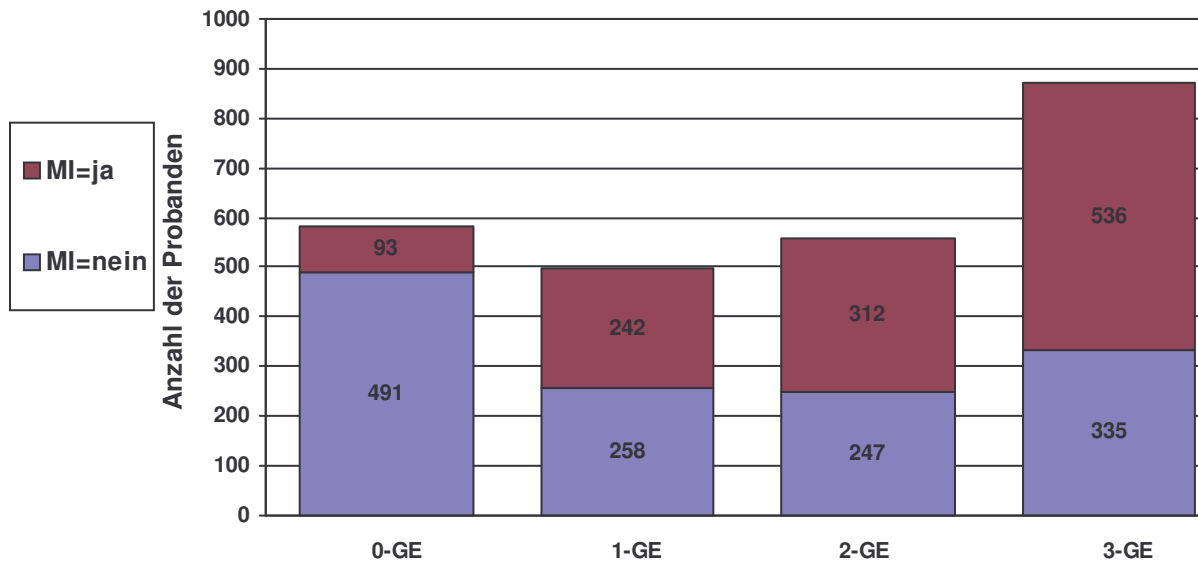


Abbildung 8: Verhältnis zwischen Koronarer Herzkrankheit und Myokardinfarkt

Die Studienpopulation von 2514 Patienten wurde in verschiedene Unterpopulationen (0-bis 3-Gefäßerkrankung) unterteilt. In jeder Subpopulation wurde die Anzahl der Patienten, die keinen oder mindestens einen Myokardinfarkt erlitten hatten, ermittelt und den Probanden ohne MI gegenübergestellt. Abkürzungen: MI, Myokardinfarkt; 0-GE, Probanden ohne Stenose oder mit Koronargefäßstenosierung < 50 %; 1-GE, Patienten mit Eingefäßerkrankung; 2-GE, Patienten mit Zweigefäßerkrankung; 3-GE, Patienten mit Dreigefäßerkrankung.

3.1.3 Verhältnis zwischen Gensini Score und Myokardinfarkt

Um eine genauere Einschätzung hinsichtlich des Ausmaßes einer Koronaren Herzkrankheit vornehmen zu können, wurde als zusätzlicher Parameter der Gensini Score [28] eingeführt, welcher sich in der Studienpopulation von 0 bis 289 erstreckte. Zur vereinfachten Ermittlung eines Zusammenhangs zwischen Myokardinfarkt und der Höhe des Gensini Scores, wurde der Gensini Score in 4 Kategorien unterteilt (Kategorie 1 = Gensini Score von 0 - 49,99; Kategorie 2 = Gensini Score von 50 - 99,99; Kategorie 3 = Gensini Score von 100 - 149,99; Kategorie 4 = Gensini Score von 150 – 289). Während in Kategorie 1 36 % aller Patienten einen Myokardinfarkt erlitten hatten, betrug der Anteil an Patienten mit erlittenem Myokardinfarkt in Kategorie 4 bereits 71 % ($p < 0,00001$) (Abb. 9). Patienten mit mindestens einem Myokardinfarkt ereignis wiesen durchschnittlich einen höheren Gensini Score auf als Personen, die keinen Myokardinfarkt erlitten hatten: Die durchschnittlichen Gensini Scores lagen bei Herzinfarktpatienten mit $63,5 \pm 46,7$ durchschnittlich höher als bei Probanden ohne erlittenem Myokardinfarkt (Gensini Score $35,10 \pm 39,3$; $p < 0,00001$) (Abb. 10). Es zeigte sich demnach ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Höhe des Gensini Scores und dem Auftreten eines Myokardinfarktes.

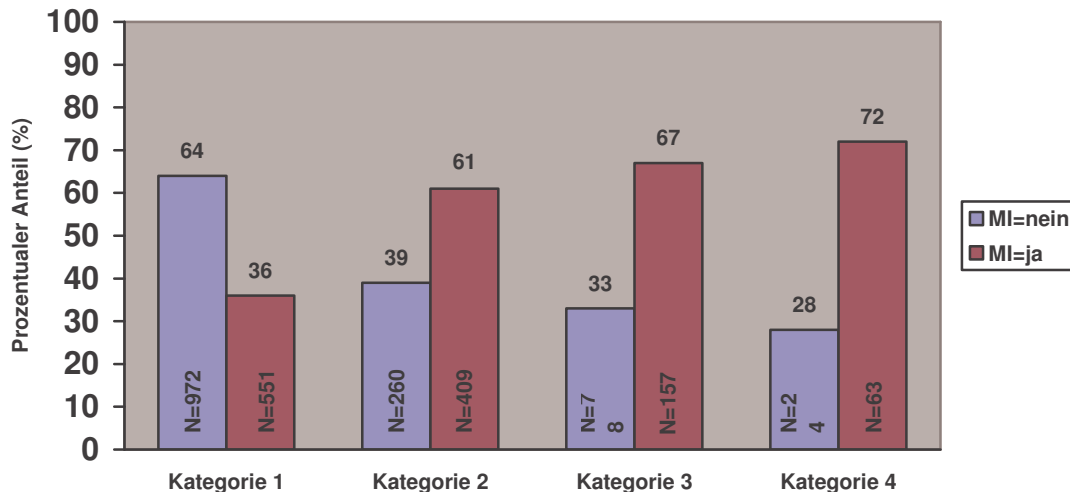


Abbildung 9: Verhältnis zwischen Gensini Score-Kategorien und Myokardinfarkt

Der Gensini Score wurde wie unter 2.2 beschrieben errechnet und zur Ermittlung des Zusammenhangs zwischen Myokardinfarkt und Gensini Score in 4 Kategorien unterteilt: Kategorie 1 = Gensini Score von 0 - 49,99; Kategorie 2 = Gensini Score von 50 - 99,99; Kategorie 3 = Gensini Score von 100 - 149,99; Kategorie 4 Gensini Score von 150 - 289. Alle Patienten wurden zum Zeitpunkt der stationären Aufnahme über Myokardinfarkte befragt. Die dabei erhobenen Daten wurden mit Hilfe der Krankenakten verifiziert. Das Diagramm gibt jeweils die relative Anzahl von Probanden mit und ohne Myokardinfarkt in den verschiedenen Kategorien an. Die absoluten Zahlen sind jeweils innerhalb der Säulen angegeben. Abkürzungen: MI = 0, Probanden ohne Myokardinfarkt; MI = 1, Patienten mit mindestens einem Myokardinfarkt.

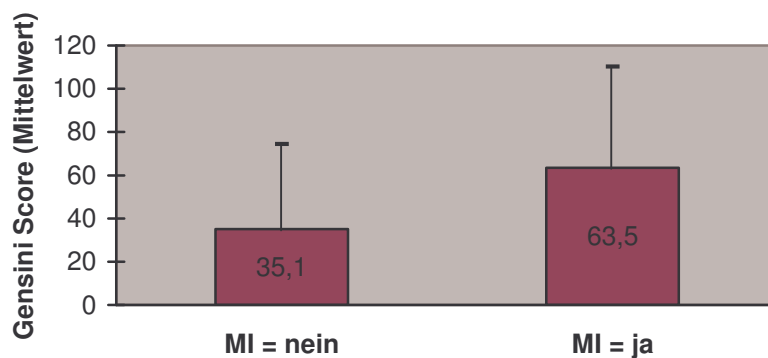


Abbildung 10: Verhältnis zwischen Gensini Score und Myokardinfarkt

Das Diagramm gibt jeweils den Mittelwert des Gensini Scores bei Probanden mit und ohne abgelaufenen Myokardinfarkt $\pm$ Standardabweichung an.

3.1.4 Etablierte Risikofaktoren und protektive Faktoren der Koronaren Herzkrankheit

Die etablierten Risikofaktoren der koronaren Herzkrankheit Alter, Body Mass Index, Nikotinkonsum, Diabetes mellitus, Hypertonie, Cholesterin, Triglyzeride, Lipoprotein (a) und Apolipoprotein B wurden in der vorliegenden Studienpopulation zwischen Kontrollprobanden

und KHK-Patienten verglichen (Tabelle 4). Dabei wurden Alter, Nikotinabusus, Diabetes mellitus, Hypertonie, Lipoprotein (a) und Apolipoprotein B als koronare Risikofaktoren identifiziert. Als protektiver Faktor wurde Apolipoprotein AI ermittelt.

Tabelle 4: Nachweis von Risikofaktoren und protektiven Faktoren der Koronaren Herzerkrankung

Parameter	Kontrollgruppe (0-GE) (n = 584)	KHK (1-3-GE) (n = 1930)	Signifikanz
Alter	58,2 ± 11,0	62,7 ± 9,3	0,00001
BMI (kg/m ²)	27,0 ± 3,7	26,9 ± 3,3	n.s.
Nikotinabusus (PY)	20,4 ± 25	23,7 ± 27	0,043
Diabetes mellitus (%)	11	20	0,0004
Hypertonie (%)	54	65	0,00001
Gesamtcholesterin	205 ± 43	211 ± 42	n.s.
Triglyzeride (mg/dl)	143 ± 93	156 ± 93	n.s.
Apolipoprotein AI (g/l)	1,47 ± 0,31	1,42 ± 0,28	0,00001
Apolipoprotein B (g/l)	1,22 ± 0,32	1,30 ± 0,35	0,0001
Lipoprotein (a) (mg/dl)	21 ± 30	30 ± 38	0,00001

Koronarstenosierungen $\geq 50\%$ wurden als „erkrankt“ definiert. Je nach Lokalisation der Stenose wurde die Koronare Herzkrankheit in Null-, Ein-, Zwei- oder Drei-Gefäßerkrankung eingeteilt. Zur Kontrollgruppe wurden Patienten ohne KHK, d.h. mit Gefäßstenosen $< 50\%$, zusammengefaßt. Apolipoprotein AI, Apolipoprotein B, Lipoprotein (a), Cholesterin und Triglyzeride, der Body Mass Index und das Alter der Patienten wurden als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung angegeben. Arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus wurden jeweils als relative Häufigkeiten in Prozent angegeben. Die Beziehung zwischen den unabhängigen Variablen und der Koronaren Herzkrankheit wurde mit Hilfe der multiplen logistischen Regression analysiert. Ein Ergebnis war signifikant bei $p < 0,05$. Abkürzungen: BMI, Body Mass Index; PY, pack-years; 0-GE, Probanden ohne Stenose oder mit Koronargefäßstenosierung $< 50\%$; 1-3-GE, Ein-, Zwei- oder Dreigefäßerkrankung.

3.1.5 Verteilung der Risikofaktoren und protektiven Faktoren in Abhängigkeit vom Ausmaß der Koronaren Herzkrankheit

Die vorliegende Studienpopulation von 2514 Patienten wurde hinsichtlich eines Zusammenhangs zwischen etablierten koronaren Risikofaktoren wie Alter, Body Mass Index, Cholesterin, Triglyzeride, Diabetes, Hypertonus, Nikotinabusus, Apolipoprotein B und Lipoprotein (a) und dem Ausmaß einer KHK untersucht. Dabei wurden ansteigende Durchschnittswerte für die Parameter Alter ($p = 0,00001$), Zigarettenkonsum ($p = 0,046$), Apolipoprotein B ($p = 0,00001$) und Lipoprotein (a) ($p = 0,00001$) mit zunehmendem Ausmaß der koronaren Herzerkrankung beobachtet (Tabelle 5). Außerdem befanden sich in der Patientengruppe mit Ein- und Mehrgefäßerkrankung deutlich mehr Patienten mit Diabetes ($p = 0,00001$) oder Hypertonie ($p = 0,00001$). Des weiteren war ein kontinuierlicher Abfall der Apolipoprotein AI-Konzentrationen bei steigendem Ausmaß der KHK nachzuweisen ($p = 0,0001$).

Somit konnten in der vorliegenden Studienpopulation nahezu sämtliche etablierten Risikofaktoren, sowie Apolipoprotein AI als protektiver Faktor der KHK nachgewiesen werden.

Tabelle 5: Verteilung der Risikofaktoren und protektiven Faktoren in Abhängigkeit vom Ausmaß der Koronaren Herzkrankheit

	<i>Grad der Koronaren Herzkrankheit</i>				2p
	0-GE	1-GE	2-GE	3-GE	
Alter (Jahre)	58,2 ± 11,0	61,0 ± 9,7	62,6 ± 9,6	63,7 ± 8,6	0,00001
BMI (kg/m ²)	27,0 ± 3,7	26,9 ± 3,5	26,9 ± 3,6	26,9 ± 3,1	n.s.
Cholesterin (mg/dl)	205 ± 43	205 ± 41	211 ± 42	214 ± 43	n.s.
Triglyzeride (mg/dl)	143 ± 93	154 ± 95	159 ± 98	155 ± 88	n.s.
Diabetes (%)	11	15	21	23	0,00001
Bluthochdruck (%)	54	62	65	66	0,00001
Zigarettenkonsum (PY)	20,4 ± 25	75	75	77	0,046
Apolipoprotein AI (g/l)	1,47 ± 0,31	1,43 ± 0,28	1,43 ± 0,28	1,41 ± 0,28	0,00001
Apolipoprotein B (g/l)	1,22 ± 0,32	1,23 ± 0,33	1,29 ± 0,34	1,33 ± 0,35	0,00001
Lipoprotein (a) (mg/dl)	21 ± 30	28 ± 37	31 ± 38	30 ± 40	0,00001

Von 2514 Patienten wurden Angaben hinsichtlich Alter, arterieller Hypertonie, Körpergröße und -gewicht, Diabetes mellitus und Nikotinkonsum erhoben. Apolipoprotein AI, Apolipoprotein B, Lipoprotein (a), Cholesterin und Triglyzeride, der Body Mass Index und das Alter der Patienten wurden

als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung angegeben. Arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus wurden als relative Häufigkeiten in Prozent angegeben. Die Beziehung zwischen den einzelnen unabhängigen Variablen und der Schwere der Koronaren Herzkrankheit wurde mit Hilfe multipler Regressionsanalysen überprüft. Ein Ergebnis war signifikant mit $p < 0,05$.

Abkürzungen: BMI, Body Mass Index; 0-GE, Probanden ohne Stenose oder mit Koronargefäßstenosierung $< 50\%$; 1-GE, Patienten mit Eingefäßerkrankung; 2-GE, Patienten mit Zwei-Gefäßerkrankung; 3-GE, Patienten mit Drei-Gefäßerkrankung; PY, pack-years.

3.1.6 Verteilung der Risikofaktoren und protektiven Faktoren in Abhängigkeit vom Myokardinfarktrisiko

Die vorliegende Studienpopulation von 2514 Patienten wurde hinsichtlich eines Zusammenhangs zwischen etablierten koronaren Risikofaktoren wie Alter, Body Mass Index, Cholesterin, Triglyzeride, Diabetes, Hypertonus, Nikotinabusus, Apolipoprotein B und Lipoprotein (a) und dem Myokardinfarktrisiko untersucht. Dabei wurden höhere Durchschnittswerte für die Parameter Alter ($p = 0,00001$), Apolipoprotein B ($p = 0,0001$) und Lipoprotein (a) ($p = 0,00001$), sowie niedrigere Apolipoprotein AI-Konzentrationen ($0,00001$) bei Myokardinfarktpatienten beobachtet. Auch der prozentuale Anteil an (Ex)-Rauchern ($p = 0,0001$), Diabetikern ($p = 0,0014$) und Hypertonikern ($p = 0,0022$) war in der Myokardinfarktgruppe signifikant höher als in der Gruppe ohne Myokardinfarkt (Tabelle 6).

Somit konnten in der vorliegenden Studienpopulation wesentliche Risikofaktoren, sowie Apolipoprotein AI als protektiver Faktor für das Myokardinfarktrisiko nachgewiesen werden.

Tabelle 6: Verteilung der Risikofaktoren und protektiven Faktoren in Abhängigkeit vom Myokardinfarktrisiko

<i>Parameter</i>	<i>MI = 0 (n= 492)</i>	<i>MI = 1 (n=1182)</i>	<i>2 p</i>
Alter (Jahre)	58,1 ± 11,0	62,1 ± 9,5	0,00001
BMI (kg/m ²)	27,0 ± 3,8	26,9 ± 3,4	n.s.
Cholesterin (mg/dl)	207 ± 43	208 ± 43	n.s.
Triglyzeride (mg/dl)	145 ± 96	154 ± 88	n.s.
Diabetes (%)	11	19	0,0014
Bluthochdruck (%)	53	61	0,0022
(Ex-)Raucher (%)	69	79	0,0001
Apolipoprotein AI (g/l)	1,48 ± 0,31	1,41 ± 0,28	0,00001
Apolipoprotein B (g/l)	1,22 ± 0,32	1,29 ± 0,35	0,0001
Lipoprotein (a) (mg/dl)	20,3 ± 28	29,1 ± 37	0,00001

Apolipoprotein AI, Apolipoprotein B, Lipoprotein (a), Cholesterin und Triglyzeride, der Body Mass Index und das Alter der Patienten wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben. Arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und (Ex-)Raucher wurden als relative Häufigkeiten in Prozent dargestellt. Die Beziehung zwischen den unabhängigen Variablen und dem Risiko eines Myokardinfarktes wurde mit Hilfe multipler Regressionsanalyse überprüft. Ein Ergebnis war signifikant mit $p < 0,05$. Die Patienten ohne Myokardinfarkt hatten jeweils keine Stenose ≥ 50 %.

Abkürzungen: MI = 0, Probanden ohne Myokardinfarkt; MI = 1, Patienten mit mindestens einem Myokardinfarkt; BMI, Body Mass Index; n.s., nicht signifikant.

3.2 CMA A₍₋₁₉₀₃₎G Genpolymorphismus

Der CMA A₍₋₁₉₀₃₎G Genpolymorphismus der menschlichen Herz-Chymase ist in drei verschiedene Genotypen (AA-, AG- und GG-Genotyp) zu unterteilen, die mit unterschiedlicher Häufigkeit in der Gesamtpopulation von 2514 Patienten aufzufinden waren.

3.2.1 Verteilung des Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G Genpolymorphismus in der Gesamtpopulation

Bei 723 Patienten (28,75%) wurde der AA-Genotyp, bei 1253 Patienten (49,84%) der AG-Genotyp und bei 538 (21,4%) Patienten der GG-Genotyp ermittelt. Daraus ergaben sich Allelfrequenzen von 0,53 für das A-Allel und von 0,47 für das G-Allel. Die Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G Genotyp-Verteilung war sowohl in der Gesamtpopulation als auch bei Unterteilung in den Hoch-

und Niedrigrisiko-Gruppen jeweils im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (Ergebnisse nicht dargestellt).

3.2.2 Klinisch-chemische und klinische Variablen in Abhängigkeit vom Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G Genotyp

Die Verteilung der etablierten Risikofaktoren und des Protektivfaktors Apolipoprotein AI in den Gruppen der drei Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G Genotypen (AA, AG, GG) wurde ermittelt (Tabelle 7). Innerhalb der drei Genotyp-Gruppen der Studienpopulation zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Werten dieser Parameter (Tabelle 7). So war das Durchschnittsalter in den drei Genotyp-Gruppen annähernd gleich. Auch der relative Anteil der Patienten mit arterieller Hypertonie und Diabetes mellitus war in allen drei Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G Genotypen unterschied sich nicht. Bezugnehmend auf die Verteilung der klinisch-chemischen Parameter wie Cholesterin, Apolipoprotein AI, Apolipoprotein B, Lipoprotein (a) und Triglyzeride waren über die gesamte Studienpopulation hinweg gleiche Durchschnittswerte zu beobachten (Tabelle 7). Bei der Betrachtung der Hoch- und Niedrigrisiko-Gruppen konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt werden (Daten nicht dargestellt).

Tabelle 7: Etablierte Risikofaktoren und protektive Faktoren in Abhängigkeit vom Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G Genotyp

	<i>Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G Genotyp</i>			2p
	AA(n = 723)	AG(n = 1253)	GG(n = 538)	
Alter (Jahre)	61,8 ± 9,9	61,7 ± 9,7	62,3 ± 10,0	0,618
Cholesterin (mg/dl)	210 ± 44	208 ± 42	210 ± 42	0,762
Triglyzeride (mg/l)	152 ± 97	152 ± 91	154 ± 94	0,94
Apolipoprotein AI (g/l)	1,43 ± 0,29	1,43 ± 0,28	1,45 ± 0,30	0,379
Apolipoprotein B (g/l)	1,28 ± 0,34	1,27 ± 0,34	1,27 ± 0,34	0,911
Apolipoprotein AI/ Apolipoprotein B	1,18 ± 0,35	1,20 ± 0,51	1,21 ± 0,38	0,277
Lipoprotein (a) (mg/dl)	27 ± 36	29 ± 38	26 ± 35	0,128
Glukose (mg/dl)	113 ± 48	112 ± 49	111 ± 40	0,788
Diabetes (%)	18	18	17	0,887
Bluthochdruck (%)	62	63	62	0,864
BMI (kg/m ²)	26,9 ± 3,5	26,9 ± 3,4	27,0 ± 3,4	0,859
Zigarettenkonsum (PY)	23 ± 27	22 ± 26	23 ± 27	0,796

Die Angaben über Hypertonie und Diabetes mellitus wurden als binäre Variablen definiert und als relative Häufigkeiten in Prozent angegeben. Die anderen Werte sind Durchschnittswerte ± Standardabweichung. Das Verhältnis der kontinuierlichen Variablen zu den Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G Genotypen wurde mit Hilfe des Kruskal-Wallis 1-Way Anova-Test überprüft. Für die Parameter Diabetes und Hypertonus fand der χ^2 -Test Anwendung. Die Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G Genotypen der Probanden wurden mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion und angeschlossener Elektrophorese aus EDTA-Blut ermittelt. Abkürzungen: PY, pack-years; BMI, Body Mass Index.

3.3 Beziehung zwischen Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G Genotyp und Koronarer Herzkrankheit

Durch die Ermittlung des Gefäßstatus mit Hilfe der selektiven Koronarangiographie konnte die Studienpopulation in eine Gruppe von Patienten ohne Koronare Herzerkrankung (Koronargefäßstenosierung < 50 %) und eine weitere mit 1- bis 3-Gefäßerkrankung unterteilt werden. Häufigkeiten der Genotypen des Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G Genpolymorphismus und der sich daraus ergebenden Allelfrequenzen wurden zwischen den Probanden ohne signifikante KHK und KHK-Patienten verglichen.

3.3.1 Statistische Beziehung zwischen dem Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G Genpolymorphismus und dem KHK-Risiko

Die Häufigkeit der A-Allelfrequenz bei Probanden ohne signifikante Stenose war mit $p = 0,53$ annähernd genauso groß wie in der Gruppe der Ein- bis Dreifäßerkranken mit $p = 0,54$ (Tabelle 8). Die G-Allelfrequenzen bei Patienten mit Ein-bis Dreifäßerkrankung ($p = 0,46$) unterschieden sich von denjenigen des Kontrollkollektivs ($p = 0,47$) nicht. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß kein signifikanter Zusammenhang zwischen A- bzw. G-Allelfrequenz und dem Risiko der Koronaren Herzkrankheit ermittelt werden konnte.

Tabelle 8: Verteilung der Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G Genotypen in Abhängigkeit vom Risiko der Koronaren Herzerkrankung

	Verteilung					
	Chymase A ₍₋₁₉₀₃₎ G Genotypen				Chymase A ₍₋₁₉₀₃₎ G Allele	
	n	n (AA)	n (AG)	n (GG)	A (95% KI)	G (95 % KI)
Kontrollgruppe (0-GE)	584	162	298	124	0,53 (0,50-0,53)	0,47 (0,44-0,50)
1-3-GE	1930	561	955	414	0,54 (0,52-0,55)	0,46 (0,46-0,48)

Das Verhältnis des Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G Genpolymorphismus zum KHK-Risiko wurde mit Hilfe der multiplen logistischen Regression, also unter Berücksichtigung der nachgewiesenen koronaren Risikofaktoren, analysiert.

Abkürzungen: 0-GE, Personen ohne Koronargefäßstenosierung ≥ 50 %; 1-3-GE, Patienten mit Ein-, Zwei- oder Dreifäßerkrankung; KI, Konfidenzintervall.

3.3.2 Beziehung zwischen den Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G Genotypen und dem Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit

Innerhalb der Gruppe der KHK-Patienten wurden die Allelfrequenz zwischen Patienten mit Ein- ($n = 500$), Zwei- ($n = 560$) und Dreifäßerkrankung ($n = 870$) verglichen (Tabelle 9). Dabei zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen A- bzw. G-Allelfrequenzen und dem Ausmaß der Koronaren Herzkrankheit. Probanden ohne signifikante Koronarstenose (0,53) und Patienten mit Ein- (0,53), Zwei- (0,54) und Dreifäßerkrankung (0,54) hatten annähernd die gleichen Allelfrequenzen.

Aus Abbildung 11 geht hervor, dass auch in Bezug auf den Gensini Score kein statistischer Zusammenhang zwischen dem Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G Genpolymorphismus und dem Schweregrad der koronaren Herzerkrankung bestand ($p = 0,42$).

Tabelle 9: Verteilung der Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G Genotypen in Abhängigkeit vom Ausmaß der Koronaren Herzkrankheit

	Verteilung					
	Chymase A ₍₋₁₉₀₃₎ G Genotyp				Chymase A ₍₋₁₉₀₃₎ G Allel	
	n	n (AA)	n (AG)	n (GG)	A (95 % KI)	G (95% KI)
0-GE	584	162	298	124	0,53 (0,50-0,53)	0,47 (0,44-0,50)
1-GE	500	137	260	103	0,53 (0,50-0,64)	0,47 (0,44-0,47)
2-GE	560	164	279	117	0,54 (0,51-0,57)	0,46 (0,43-0,49)
3-GE	870	260	416	194	0,54 (0,51-0,57)	0,46 (0,44-0,49)

2514 Patienten hatten sich einer koronarangiographischen Untersuchung unterzogen und wurden je nach ermitteltem Stenosegrad in vier verschiedene Subpopulationen von 0-3-Gefäßerkrankten eingeteilt. Ein Patient mit einem Stenosegrad von $\geq 50\%$ wurde als „erkrankt“ definiert. Kontrollgruppe: Patienten mit Koronarstenosen $< 50\%$. Die statistischen Untersuchungen erfolgten mit Hilfe multipler Regressionsanalysen. Abkürzungen: 0-GE, Null-Gefäßerkrankung; 1-GE, Ein-Gefäßerkrankung; 2-GE, Zwei-Gefäßerkrankung; 3-GE, Drei-Gefäßerkrankung; n, Anzahl der Patienten in der jeweiligen Subpopulation.

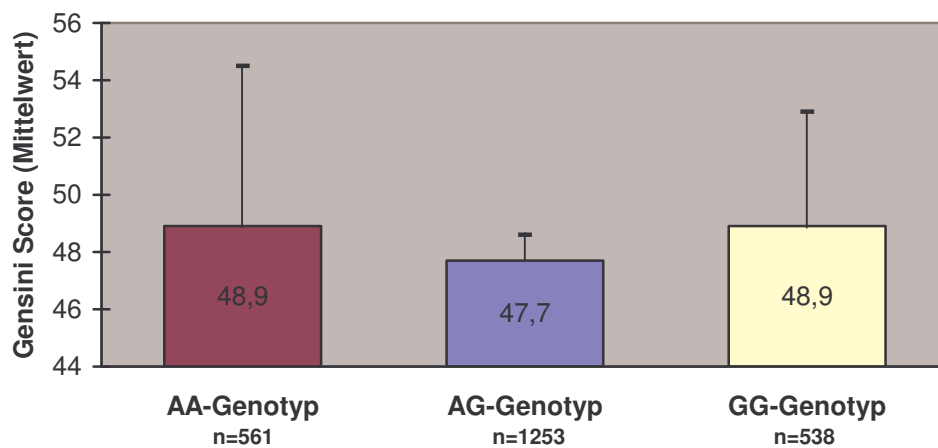


Abbildung 11: Zusammenhang zwischen Chymase-Genotypen und dem Gensini Score

Der Gensini Score [61] wurde nach Lokalisation und Schweregrad der Koronarstenosen berechnet (siehe 2.2) und als Durchschnittswert $\pm$ Standardabweichung angegeben. Die statistische Beziehung zwischen den Chymase-Genotypen und dem Gensini Score wurde mit Hilfe der multiplen Regressionsanalyse ermittelt.

3.3.3 Beziehung zwischen Chymase A_{(-1903)G} Genotyp und dem Risiko und Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit in Hoch- und Niedrig-Risikogruppen

Es wurde kein Zusammenhang zwischen dem Chymase A_{(-1903)G} Genpolymorphismus und dem Risiko bzw. dem Ausmaß einer KHK in der Gesamtpopulation gefunden. Auch in den Hochrisiko-Gruppen wurde ein solcher Zusammenhang nicht beobachtet.

Lediglich in der Niedrigrisiko-Gruppe der Nichtraucher wurde ein Zusammenhang zwischen dem Chymase G-Allel und dem Risiko der KHK ($p = 0,004$; Odds ratio 1,89 (95 % KI 1,22-2,91)) entdeckt. Nichtraucher G-Allelträger wiesen demnach ein nahezu zweifach erhöhtes KHK-Risiko auf. Bei Definition des KHK-Schweregrades nach Gensini konnte ebenfalls eine Assoziation in der Nichtrauchergruppe festgestellt werden ($p = 0,03$) (Abb. 12). Bei G-Allelträgern wurde also ein signifikant höherer Gensini Score als bei AA-Homozygoten beobachtet.

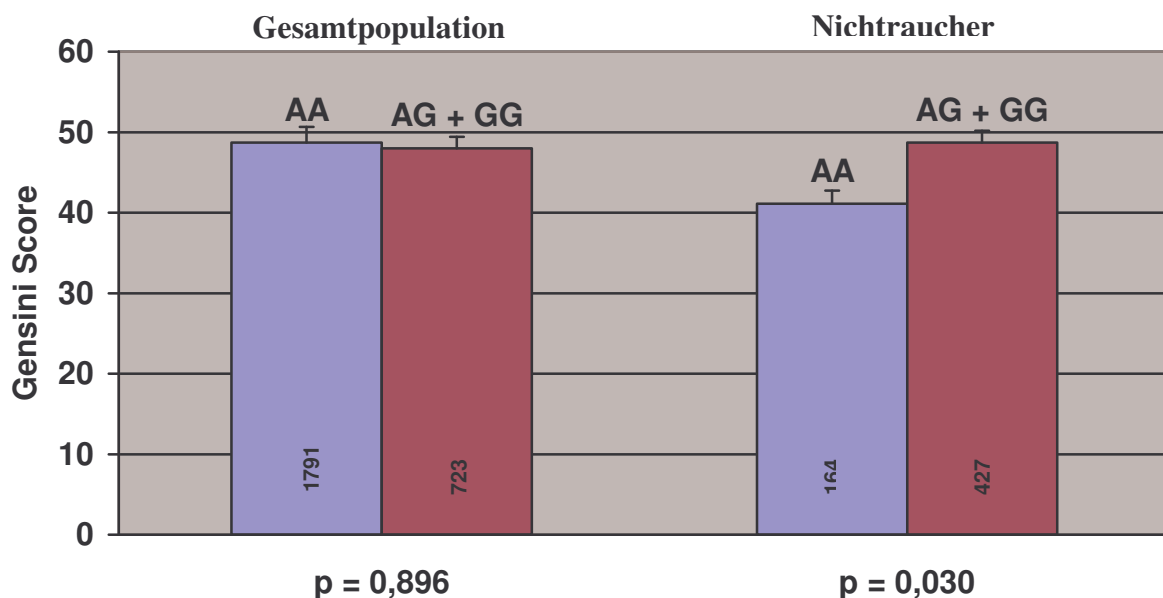


Abbildung 12: Vergleich der durchschnittlichen Gensini Scores zwischen den Chymase G-Allel-Trägern und Chymase AA-Homozygoten in der Gesamtpopulation und in der Population der Nichtraucher

Der Gensini Score wurde nach Lokalisation und Schweregrad der Koronarstenosen wie beschrieben berechnet und als Durchschnittswert $\pm$ Standardabweichung angegeben. Die durchschnittlichen Gensini Scores wurden nach Adjustierung für koronare Risikofaktoren mittels multipler Regressionsanalyse verglichen. Die Zahl der Individuen ist in den Balken angegeben. Abkürzungen: „AG + GG“, Chymase G-Allel-Träger; „AA“, Chymase AA-Homozygote.

3.3.4 Potentielle Interaktionen zwischen der CMA A₍₋₁₉₀₃₎G Genvariation und Genpolymorphismen des Renin-Angiotensin-Systems in Bezug auf Risiko und Schweregrad der KHK

Die Analyse hinsichtlich potentieller Interaktionen zwischen der CMA A₍₋₁₉₀₃₎G Genvariation und anderen RAAS-Genpolymorphismen auf das Risiko bzw. das Ausmaß der Koronaren Herzkrankheit deckte keine derartigen Wechselwirkungen auf (Ergebnisse nicht dargestellt). Dabei wurden alle möglichen Genotyp-Variationen zwischen A- und G-Allelen der Chymase-Genvariation und den Allelen der anderen RAAS-Genpolymorphismen (Angiotensinogen- (AGT T₁₇₄M und AGT M₂₃₅T), Angiotensin Converting Enzym- (ACE I/D) und Angiotensin II Typ 1 Rezeptor- (AT₁R A₁₁₆₆C) Genpolymorphismen) in der gesamten Studienpopulation und in den Niedrig- bzw. Hochrisikogruppen berücksichtigt.

3.4 *Verhältnis zwischen dem Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G Genpolymorphismus und Myokardinfarkt*

Die Studienpopulation wurde hinsichtlich eines Zusammenhangs zwischen den Chymase-Allelfrequenzen und dem Myokardinfarktrisiko untersucht. Dabei zeigte sich, daß die relative Häufigkeit des Chymase A-Allels in der Gruppe der Myokardinfarktpatienten 0,54, in der Kontrollgruppe ohne Myokardinfarkt 0,53 betrug (Tabelle 10). In bezug auf die G-Allelfrequenzen konnten Werte zwischen 0,46 in der Myokardinfarktgruppe und 0,47 in der Kontrollgruppe festgestellt werden (Tabelle 10). Demnach konnte in der vorliegenden Studienpopulation keine Assoziation zwischen dem Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G Genotyp und dem Myokardinfarktrisiko nachgewiesen werden.

Tabelle 10: Verteilung der Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G Genotypen bei Patienten mit und ohne Myokardinfarkt

	N	Verteilung				
		Chymase A ₍₋₁₉₀₃₎ G Genotyp			Chymase A ₍₋₁₉₀₃₎ G Allele	
		n (AA)	n (AG)	n (GG)	A	G
kein MI	1332	375	669	288	0,53 (95 % KI)	0,47 (95 % KI)
≥ 1 MI	1182	348	584	250	0,54 (95 % KI)	0,46 (95 % KI)

Bei 2514 Patienten der Studienpopulation wurden die Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G Genotypen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion und der danach angeschlossenen Elektrophorese ermittelt. Die Population konnte in eine Kontrollgruppe ohne Myokardinfarkt und eine Gruppe von Patienten mit bereits mindestens einem Myokardinfarkt unterteilt werden konnte. Die statistische Beziehung zwischen dem Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G Genpolymorphismus und dem Myokardinfarktrisiko wurde mit Hilfe der multiplen logistischen Regression analysiert. Abkürzungen: kein MI, kein Myokardinfarkt; ≥ 1 MI, mindestens ein Myokardinfarkt; KI, Konfidenzintervall.

3.4.1 Verhältnis zwischen CMA A₍₋₁₉₀₃₎G Genpolymorphismus und Myokardinfarkt in Hoch- und Niedrig-Risikogruppen

Sowohl in den Hoch- als auch in den Niedrigrisiko-Gruppen wurde kein statistischer Zusammenhang zwischen dem CMA A₍₋₁₉₀₃₎G Genpolymorphismus und dem Myokardinfarktrisiko gefunden (Ergebnisse nicht dargestellt).

3.4.2 Potentielle Interaktionen zwischen CMA A₍₋₁₉₀₃₎G Genpolymorphismus und anderen Genpolymorphismen des RAAS auf das Myokardinfarktrisiko

Eine Analyse hinsichtlich einer potentiellen Interaktion zwischen der CMA A₍₋₁₉₀₃₎G Genvariation und anderen Genpolymorphismen des RAAS (Angiotensinogen- (AGT T₁₇₄M und AGT M₂₃₅T), Angiotensin Converting Enzym- (ACE I/D) und Angiotensin II Typ 1 Rezeptor- (AT₁R A₁₁₆₆C) Genpolymorphismus) umfaßte alle möglichen Genotyp-Kombinationen zwischen A- und G-Allelen der CMA A₍₋₁₉₀₃₎G Genvariation und denen der RAAS-Genvariationen. Die Ergebnisse zeigen, daß die Chymase-Genvariation und sämtliche RAAS-Genpolymorphismen im Hinblick auf das Myokardinfarktrisiko nicht interagierten (Ergebnisse nicht dargestellt). In Hoch- und Niedrig-Risiko-Gruppen wurden ebenfalls keine Interaktionen hinsichtlich des Myokardinfarktrisikos festgestellt (Ergebnisse nicht dargestellt).

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Studienergebnisse

Eine Studienpopulation von 2514 Patienten wurde hinsichtlich eines möglichen Zusammenhangs zwischen dem CMA A₍₋₁₉₀₃₎G Genpolymorphismus und dem Risiko bzw. dem Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit, sowie dem Risiko des Myokardinfarktes untersucht.

In der Gesamtpopulation konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der CMA A₍₋₁₉₀₃₎G Genvariation und dem Risiko und dem Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit bzw. dem Risiko des Myokardinfarktes beobachtet werden. Es fand sich lediglich eine Assoziation zwischen dem CMA G-Allel und dem KHK-Risiko in der Subpopulation der Nichtraucher. Eine Assoziation zwischen dem CMA G Allel und dem Schweregrad der KHK wurde in der Subpopulation der Nichtraucher beobachtet, wenn der KHK-Schweregrad nach Gensini definiert wurde. In allen anderen Niedrig- und Hochrisikopopulationen fand sich keine Assoziation zwischen CMA A₍₋₁₉₀₃₎G Genvariation und der Koronaren Herzkrankheit [22]. Interaktionen zwischen dem CMA A₍₋₁₉₀₃₎G Genpolymorphismus und anderen Genvariationen des Renin-Angiotensin-Systems auf das Risiko und das Ausmaß der ischämischen Herzerkrankung wurden ebenfalls nicht beobachtet.

4.2 Herz-Chymase: Publikationen, die sich mit der Entdeckung und Charakterisierung der Chymase befassen

In den letzten Jahren konnten zahlreiche Studien die Beteiligung des Renin-Angiotensin-Systems an der Pathogenese der Koronaren Herzkrankheit nachweisen [1,2,12,63,66,94]. In zentraler Position des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems fand sich das Angiotensin Converting Enzym (ACE), welches zum einen die Konversion von Angiotensin I in Angiotensin II, zum anderen aber auch die Inaktivierung des vasodilatatorisch wirkenden Bradykinins katalysiert. In vitro-Studien zeigten, daß Angiotensin II eine Hyperplasie und Hypertrophie von menschlichen glatten Muskelzellen induziert [11], die Expression des platelet-derived growth factors steigert [57], die Expression der Protoonkogene c-fos und c-myc aktivierte [43] und eine Neovaskularisierung verursachte [19]. Die ACE-Spiegel im Serum des Menschen sind genetisch determiniert. Es folgten erste Studien, die über einen Zusammenhang zwischen dem Insertions-/De-letionspolymorphismus des ACE-Gens (ACE DD-Genotyp) und dem Serum-ACE-Spiegel berichteten [70]. Zudem beobachteten Cambien et al. in einer Studie von 1992 einen

Zusammenhang zwischen dem ACE DD-Genotyp und einem erhöhten Myokardinfarktrisiko [10].

Urata et al. hatten bereits 1990 erkannt, daß sich mehr als 75 % der Angiotensin II-formenden Enzymaktivität nur durch Verwendung von Serin-Proteinasen hemmen ließen; lediglich 25 % der gesamten Enzymaktivität konnten durch konventionelle ACE-Hemmer-Gabe inhibiert werden [90]. Im gleichen Jahr demonstrierten sie, daß nicht nur ACE zur Angiotensin II-Bildung befähigt ist [91]; in ihrer Studie beschrieben sie die Isolierung und Charakterisierung eines Enzyms, welches die kardiale Angiotensin II-Bildung mit weit höherer Effektivität und Spezifität katalysierte als ACE. Dieses Enzym wies starke Ähnlichkeit mit Enzymen aus der seit längerem bekannten Chymase-Familie hinsichtlich immunologischer Reaktivität, Hemmbarkeit durch Serin-Proteinase-Inhibitoren und der N-terminalen Aminosäuresequenz auf, so daß seine Zugehörigkeit zu dieser Enzym-Familie angenommen werden konnte [91]. Chymasen gehören zu einer Subklasse von Serin-Proteinasen, die von Mastzellen, neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und zytotoxischen T-Zellen des menschlichen Immunsystems exprimiert werden [102]. Chymase-ähnliche Enzyme waren bereits in den Mastzellen menschlicher Haut [77] und der Lunge [101] gefunden worden. Im Unterschied zu den übrigen Säugetier-Chymasen verfügt die Herz-Chymase über eine hohe katalytische Aktivität und Substrat-Spezifität. Die Erklärung für diese Tatsache lieferten Kinoshita et al. im Jahre 1990; sie publizierten eine Studie, die demonstrierte, daß die Herz-Chymase zur Umwandlung von Angiotensin I zu Angiotensin II die Anwesenheit zahlreicher Bindungs determinanten in der Primärstruktur des Substrats benötigte. Eine spätere Untersuchung zeigte, daß die Herz-Chymase im kardialen Interstitium, in Mastzellen, Endothelzellen und einigen mesenchymalen Interstitiumzellen des Myokardgewebes aufzufinden war [89]. Mittels elektronenmikroskopischer Immunhistochemie zeigte sich jedoch kein Unterschied zwischen der Chymase-Verteilung in gesundem und ischämisch geschädigtem Herzmuskelgewebe. Dabei fanden sich doppelt so hohe Chymase-Spiegel in den Ventrikeln wie in den Vorhöfen.

Ziel darauf folgender Arbeiten war die Beantwortung der Frage, ob die Herz-Chymase ähnlich wie ACE Einfluß auf die Koronare Herzkrankheit und dem Myokardinfarkt hat [89].

Neue Studien beschäftigen sich mit der Rolle der Herz-Chymase nach einem Myokardinfarkt [41,42]. Jin et al. zeigten 2003 bei der Untersuchung von 210 Hamsterherzen, daß deutlich erhöhte Chymase-Aktivitäten im linken Ventrikel nach zuvor induziertem Myokardinfarkt auftraten [42]. Wurde den Hamstern jedoch zuvor ein Chymase-Inhibitor zugeführt und damit der Anstieg der Chymase-Aktivität nach induziertem Myokardinfarkt verringert, kam es zu einer signifikanten Verringerung der Mortalitätsrate. Sie folgerten daraus, daß die Herz-Chymase eine

wichtige Rolle nach einem Myokardinfarkt spielen könnte. In einer nachfolgenden Studie an Hundeherzen konnten sie im Jahre 2004 nachweisen, daß die Chymase-Inhibition nach induziertem Myokardinfarkt einen antiarrhythmischen Effekt hat. Sowohl die Häufigkeit ventrikulärer Arrhythmien als auch die Mortalitätsrate waren bei diesen Hunden deutlich reduziert [41].

4.3 *Publizierte Untersuchungen zur potentiellen Assoziation des ACE I/D Genpolymorphismus zur ischämischen Herzerkrankung*

Nachdem 1990 ein I/D Polymorphismus im Intron 16 des ACE-Gens gefunden worden war [70], beschäftigten sich mehrere Studien mit der Frage, ob eine mögliche Beziehung zwischen der ACE-Genvariation und der ischämischen Herzkrankheit besteht. Diese Untersuchungen kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Einige Studien identifizierten diesen Genpolymorphismus als unabhängigen Risikoindikator der KHK [21,26,52,58,73,82] und des akuten Myokardinfarktes [10,26,49,80], andere wiederum konnten einen solchen Zusammenhang nicht nachweisen [48,74]. Beispielhaft sei hier die ECTIM-Studie von Cambien et al. erwähnt, in welcher zum ersten Mal über eine Assoziation zwischen dem Insertions-/Deletionspolymorphismus des ACE-Gens und einem erhöhten Myokardinfarktrisiko berichtet wurde; es wurde beobachtet, daß der ACE DD-Genotyp bei Myokardinfarktpatienten häufiger vorkam als bei gesunden Kontrollpersonen [10]. Lindpainter et al. hingegen konnten keinen Zusammenhang zwischen dem ACE I/D Genpolymorphismus und der Koronaren Herzkrankheit beziehungsweise dem Myokardinfarkt feststellen [48]. Die zum Teil voneinander abweichenden Ergebnisse lassen sich zum einen durch die unterschiedliche Zusammensetzung der jeweiligen Studienpopulationen, durch rassische Unterschiede, durch die Größe der Studienpopulation und das retro- bzw. prospektive Studiendesign erklären. In der dieser Untersuchung zugrundeliegenden Studienpopulation war eine Assoziation zwischen dem ACE-D-Allel und dem Risiko beziehungsweise dem Ausmaß der KHK in der Subpopulation der jüngeren Patienten (< 61.7 Jahre) gefunden worden [21].

4.4 CMA A₍₋₁₉₀₃₎G Genpolymorphismus: Darstellung der bisherigen Ergebnisse anderer Publikationen

In verschiedenen in vitro Studien konnte gezeigt werden, daß das ACE-System einen bedeutenden Einfluß auf die Pathogenese der Koronaren Herzkrankheit und des Myokardinfarktes hat [2,12]. Eine entscheidende Rolle scheinen dabei erhöhte Serumkonzentrationen von Angiotensin II zu spielen, die wiederum genetisch determiniert sind [70]. Nachdem das ACE-Gen bereits hinsichtlich funktioneller Genpolymorphismen untersucht worden war, bestand nach Entdeckung der humanen Angiotensin II-bildenden Herz-Chymase das Bestreben, auch hier nach entsprechenden Genvarianten zu forschen. Nachdem Urata et al. im Jahre 1990 die Isolierung und Charakterisierung der humanen Herz-Chymase gelungen war [91], erfolgte 1991 die Identifizierung des Chymase-kodierenden Gens [92]. Dabei konnte die Sequenz des entsprechenden Gens komplett aufgedeckt werden. Ein weiterer Grund für das Interesse an der Chymase-Gen-Forschung bestand darin, daß im Jahre 1994 über eine zum Teil unzureichende Supprimierbarkeit von Angiotensin II bei Patienten mit Herzversagen und eine hohe Rezidivrate von Gefäßstenosierungen nach perkutaner Angioplastie trotz ACE-Hemmer-Therapie berichtet worden war [60,72]. Dies ließ die Frage aufkommen, ob erhöhte Angiotensin II-Spiegel durch Verwendung spezieller Chymase-Inhibitoren bei fehlgeschlagener ACE-Hemmer-Therapie gesenkt werden können. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß in einer Studie von Urabe et al. der Serin-Proteinase-Inhibitor Nafamostat die periphere Zirkulation bei Patienten mit peripherer vaskulärer Erkrankung durch Hemmung des ACE-unabhängigen Angiotensin II-Bildungsweges verbesserte [88].

Grundlage der vorliegenden Studie waren die im Jahre 1996 vorliegenden Publikationen von Pfeufer et al., die einen Genpolymorphismus in Form eines Basenaustausches (A→G) in der untranskribierten 5'-Region im Chymase-Gen gefunden hatten [65]. Ihre Studienpopulation setzte sich aus 50 Patienten mit der echokardiographisch erhobenen Diagnose einer hypertrophen Kardiomyopathie und 50 gesunden Kontrollpersonen zusammen. Während ein signifikanter Zusammenhang zwischen ACE DD-Genotyp und hypertropher Kardiomyopathie in dieser Studienpopulation nachgewiesen werden konnte (95% KI: 1,04-5,44, $p < 0,039$), zeigte sich der CMA A₍₋₁₉₀₃₎G Genpolymorphismus nicht als unabhängiger Risikoindikator für die hypertrophe Kardiomyopathie. Desweiteren untersuchten Pfeufer et al. mögliche Interaktionen zwischen ACE I/D- und CMA A₍₋₁₉₀₃₎G Genpolymorphismen und kamen zu dem Ergebnis, daß die Chymase AA- und AG-Genotypen mit einem erhöhten Auftreten des ACE DD-Genotyps verknüpft waren (95% KI: 1,19-8,70, $p < 0,02$). Sie stellten daher die Hypothese auf, daß Chymase-Genvarianten

durch Interaktion mit dem ACE-Gen möglicherweise an der Entstehung der hypertrophen Kardiomyopathie beteiligt sind. Zwei Jahre später wurde von Pfeufer und Mitarbeitern eine weitere Untersuchung zum Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G Genpolymorphismus veröffentlicht [64]. Die Studienpopulation setzte sich aus 394 Patienten zusammen, wobei 229 Kontrollpersonen mit Hilfe klinischer und echokardiographischer Kriterien als herzgesund definiert werden konnten und 165 Patienten einen Myokardinfarkt erlitten hatten. Die Forschungsgruppe kam zu dem Ergebnis, daß der CMA A₍₋₁₉₀₃₎G Genpolymorphismus weder mit der hypertrophen Kardiomyopathie noch mit dem Myokardinfarktrisiko statistisch in Verbindung stand.

Die vorliegende Studie geht mit letzterem Ergebniss konform, erweitert aber die vergangenen Beobachtungen durch folgende Befunde: (1) Lediglich in einer Niedrig-Risikogruppe von Nichtrauchern konnte ein Zusammenhang zwischen dem CMA-G-Allel und dem Risiko beziehungsweise Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit aufgedeckt werden. (2) Es wurden keine Interaktionen zwischen der Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G Genvariation oder anderen Genpolymorphismen des Renin-Angiotensin-Systems auf das Risiko bzw. dem Schweregrad der KHK oder dem akuten Myokardinfarkt entdeckt.

In diesem Zusammenhang muß jedoch diskutiert werden, daß die hier vorliegende Studie sicherlich nicht direkt mit den Daten aus der Studie von Pfeufer et al. vergleichbar ist, da es sich hier nicht um Fall-Kontroll-Studie im klassischen Sinne handelt. Dies liegt zum einen daran, daß es sich bei den Kontrollen auch um Personen handelt, die zum großen Teil leichte Stenosen der Koronargefäße aufwiesen. Zudem hatten wenige Probanden dieser Gruppe bereits einen Herzinfarkt erlitten. Allerdings konnten in der untersuchten Population nahezu alle relevanten koronaren Risikofaktoren nachgewiesen werden. Dieser Befund kann als Hinweis darauf gewertet werden, daß sich die vorliegende Population nicht grundlegend von denen aus klassischen Fall-Kontroll-Studien unterscheidet. Zudem besteht bei klassischen Kontrollgruppen immer das Problem, Probanden einzuschliessen, die unter Umständen schon über erhebliche Stenosen der Koronargefäße verfügen, ohne symptomatisch geworden zu sein. Selbst die Durchführung eines Belastungs-EKG's als Ausschlußkriterium innerhalb dieser Kontrollpopulation hätte etwa 15 % falsch positive Befunde erbracht. Eine Koronarangiographie anstelle des Belastungs-EKG's ist aus ethischen Gründen nicht vertretbar. Insofern verfügt die vorliegende Studie zwar nicht über das Design einer klassischen Fall-Kontroll-Studie, hat aber sämtliche Teilnehmer der Studie über die Koronarangiographie eindeutig definiert.

2002 ist eine weitere Studie publiziert worden, die sich mit der Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G Genvariariation befaßt. Diese untersuchte mögliche Interaktionen zwischen dem ACE I/D Genpolymorphismus und der Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G Genvariariation auf die Entwicklung einer

hypertrophen Kardiomyopathie bei Patienten mit Typ II Diabetes. Die Autoren beschrieben in einer Studienpopulation von 154 Patienten mit Typ II Diabetes ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer linksventrikulären Hypertrophie, wenn der Chymase AA- und der ACE DD-Genotyp gleichzeitig vorlagen [71]. Dieses Ergebnis geht mit der von Pfeufer et al. 1996 aufgestellten Hypothese [34], daß Chymase-Genvarianten durch Interaktion mit dem ACE-Gen möglicherweise an der Entstehung der hypertrophen Kardiomyopathie beteiligt sind, konform. Die Autoren räumen jedoch ein, daß eine größere Studienpopulation notwendig sei, um diese Hypothese zu überprüfen. Man kann zusammenfassend folgern, daß derzeit (Stand 2005) 4 Studien zur Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G Genvariation vorliegen [22,31,91,92], von denen sich lediglich drei mit der möglichen Assoziation dieser Genvariation und der ischämischen Herzerkrankung befassen.

5 Zusammenfassung

Das Renin-Angiotensin-System spielt bei der Entstehung und Progression der Koronaren Herzkrankheit (KHK) eine wichtige Rolle. Als pathogenetisch wirksame Substanz konnte das Angiotensin II nachgewiesen werden, das nicht nur durch das Angiotensin I-Converting Enzym, sondern auch durch die Serinprotease Chymase (CMA) gebildet wird. Es sollte daher der Zusammenhang zwischen dem CMA A₍₋₁₉₀₃₎G Genpolymorphismus und dem Risiko und Schweregrad der KHK sowie dem Risiko des Myokardinfarktes an einer Studienpopulation von 2514 männlichen Patienten, deren Koronarstatus mit Hilfe der Koronarangiographie bestimmt worden war, untersucht werden.

Beziehung zwischen dem Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G Genpolymorphismus und dem Risiko und Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit:

In der Gesamtpopulation ergab sich kein statistischer Zusammenhang zwischen den A- bzw. G-Allelfrequenzen und dem Risiko und Schweregrad der KHK. Nur in der Niedrigrisiko-Gruppe der Nichtraucher hatten die G-Allelträger ein signifikant höheres Risiko als die AA-Homozygoten, an einer KHK zu erkranken.

Beziehung zwischen Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G Genpolymorphismus und dem Myokardinfarktrisiko:

Es wurde keine Assoziationen zwischen den Genotypen des Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G Genpolymorphismus und dem Myokardinfarktrisiko gefunden. Diese Beobachtung wurde in der Gesamtpopulation und in Niedrig- und Hochrisiko-Gruppen gemacht.

Schlußfolgerung:

Da eine Assoziation zwischen dem Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G Genpolymorphismus und der ischämischen Herzerkrankung nur in einer Niedrigrisiko-Gruppe beobachtet werden konnte, ist die Schlußfolgerung nahe liegend, daß diese Genvariation für die Koronare Herzkrankheit und deren Komplikationen keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielt.

6 Abstract

The renin-angiotensin system (RAS) has been shown to be involved in the pathogenesis of coronary artery disease (CAD) and myocardial infarction (AMI). Besides angiotensin I-converting enzyme, the serine proteinase chymase (CMA) is capable of angiotensin II formation. Since evidence has been presented that the RAS-dependent pathogenesis of coronary heart disease is mediated by angiotensin II, we analysed the relation of the CMA A₍₋₁₉₀₃₎G gene polymorphism to CAD and AMI in a population of 2514 patients who underwent coronary angiography for diagnostic purposes.

Relation of chymase A₍₋₁₉₀₃₎G gene variation and the risk and extent of the coronary heart disease

In the total sample, no association was detected between the CMA A₍₋₁₉₀₃₎G gene variation and the risk and extent of the CAD. In the population of non-smokers, the CMA G allele was associated with the presence of CAD.

Relation of chymase A₍₋₁₉₀₃₎G gene variation to myocardial infarction

In the total sample, an association of the CMA A₍₋₁₉₀₃₎G gene variation with nonfatal myocardial infarction was not detected. The same findings were made in low- and high-risk subpopulations.

Conclusion

In spite of having found an association between CMA G allele with the risk and extent of CAD in a low risk group of non-smokers, the present data indicate that the CMA A₍₋₁₉₀₃₎G gene variation has no significant impact in the risk and extent of coronary heart disease.

7 Literaturverzeichnis

1. Aberg G, Ferrer P. Effects of captopril on atherosclerosis in cynomolgus monkeys. *Cardiovascular Pharmacol* 1990; 15 Suppl 5: 65-72.
2. Arbor A, Nicklas JM, Pitt B, Timmis G. Effect of Enalapril on Survival in Patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive Heart Failure. *New Engl J Med* 1991; 325: 293-302.
3. Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A. Hypertriglyceridemia and elevated lipoprotein (a) are risk factors for major coronary events in middle-aged men. *Am J Cardiol* 1996; 77: 1179-1184.
4. Beta-Blocker Heart Attack Trial (B-HAT). A randomized trial of propranolol in patients with acute myocardial infarction. Mortality results. *J Am Med Ass* 1982; 247:1707-1714.
5. Bigger JT, Fleiss JL, Kleiger R, Miller JP, Rolnitzky LM, Multicenter Postinfarction Research Group. The relationships among ventricular arrhythmias, left ventricular dysfunction and mortality in the 2 years after myocardial infarction. *Circulation* 1984; 69:250-258.
6. Boerwinkle E, Leffert CC, Lin J, Lackner C, Chiesa G, Hobbs HH. Apolipoprotein (a) Gene Accounts for Greater Than 90 % of the Variation in Plasma Lipoprotein (a) Concentrations. *J Clin Invest* 1992; 90: 52-60.
7. Borgia MC, Medici F. Perspectives in the Treatment of Dyslipidemias in the Prevention of Coronary Heart Disease. *Angiology* 1998; 49: 339-348.
8. Brissot P., Moirand R., Guyader D., Loreal O., Turlin B., Deugnier Y. Haemochromatosis after the gene discovery: revisiting the diagnostic strategy. *J Hepatol* 1998; 28 Suppl. Nr.1: 14-8.
9. Brown MS, Goldstein JL. A Receptor-Mediated Pathway for Cholesterol Homeostasis. *Science* 1986; 232: 34-47.
10. 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: 641-644.
11. Campbell-Boswell M, Robertson AL. Effects of angiotensin II and vasopressin on human smooth muscle in vitro. *Exp Mol Pathol* 1981; 35: 265-267.
12. Chobanian AV, Haudenschild CC, Nickerson C, Drago R. Antiatherogenic effect of captopril in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Hypertension* 1990; 15: 327-331.
13. Davies M, Thomas A. Plaque fissuring – the cause of acute myocardial infarction, sudden ischemic death and crescendo angina. *British Heart Journal* 1985; 53:173-177.
14. De Vreede JJ, Gorgels AP, Verstraaten GM, Vermeer F, Dassen WR, Wellens HJ. Did Prognosis After Acute Myocardial Infarction Change During the Past 30 Years? A meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 1991; 18: 698-706.

15. Ebrahim S, Smith GD. Systematic review of randomised controlled trials of multiple risk factor interventions for preventing coronary heart disease. *BMJ* 1997; 314: 1666-1674.
16. Eisenberg D. The Importance of Lowering Cholesterol in Patients with Coronary Heart Disease. *Clin Cardiol* 1997; 21: 81-84.
17. Eisenstein BI. The Polymerase Chain Reaction. *New Engl J Med* 1990; 322: 178-183.
18. El-Sherif N, Denes P, Katz R, Capone R, Mitchell B, Carlson M, Reynolds-Haertle. Definition of the best prediction criteria of the time domain signal-averaged electrocardiogram for serious arrhythmic events in the postinfarction period. *J Am Coll Card* 1995; 25: 908-914.
19. Fernandez LA, Twickler J, Mead A. Neovascularization produced by angiotensin II. *Lab Clin Med* 1985; 105: 141-145.
20. Fink PC, Römer M, Haeckel R. Measurement of Proteins with the Behring Nephelometer. A Multicentre Evaluation. *J Clin Chem Clin Biochem* 1989; 27: 261-276.
21. Gardemann A, Fink M, Stricker J. 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.
22. Gardemann A, Hamami M, Katz N. The Chymase A₍₋₁₉₀₃₎G gene polymorphism is not associated with the risk and extent of coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2000; 150: 445-446.
23. Gardemann A, Nguyen QD, Humme J, Stricker J, Katz N, Tillmanns H, Hehrlein FW, Rau M, Haberbosch W. Angiotensin II type I receptor A1166C gene polymorphism. Absence of an association with the risk of coronary artery disease and myocardial and of a synergistic effect with angiotensin-converting enzyme gene polymorphism on the risk of these diseases. *Eur Heart J* 1998; 19: 1657-1665.
24. Gardemann A, Schwartz O, Haberbosch W, Katz N, Weiß T, Tillmanns H, Hehrlein FW, Waas W, Eberbach A. Positive association of the fibrinogen H1/H2 gene variation to basal fibrinogen levels and to the increase in fibrinogen concentration during acute phase reaction but not to coronary artery disease and myocardial infarction. *Thrombosis and Haemostasis* 1997; 77:1120-1126.
25. Gardemann A, Stricker J, Humme J, Nguyen QD, Katz N, Philipp M, Tillmanns H, Hehrlein FW, Haberbosch W. Angiotensinogen T174M and M235T gene polymorphisms are associated with the extent of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1999; 145: 309-314.
26. 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.
27. Geil S, Nowak B, Lieberich A, Przibille O, Himmrich E, Treese N. Die Spätpotentialanalyse in der Diagnostik nach dem akuten Myokardinfarkt: Risikomarker für

- den Arrhythmiegefährdeten und klinisch symptomatischen Patienten. *Zeitschrift für Kardiologie* 1997; 86: 883-890.
28. Gensini GG. A More Meaningful Scoring System for Determining the Severity of Coronary Heart Disease. *Am J. Cardiol* 1983; 51: 606.
 29. Godsland IF, Leyva F, Walton C, Worthington M, Stevenson JC. Associations of smoking, alcohol and physical activity with risk factors for coronary heart disease and diabetes in the first follow-up cohort of the Heart Disease and Diabetes Risk Indicators in a Screened Cohort Study. *J Intern Med* 1998; 244: 33-41.
 30. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med* 1977; 62: 707-714.
 31. Gumprecht J, Zychma M, Grzesczak W, Lacka B, Burak W, Mosur M, Kaczmaski J, Otulski I, Stoklosa T, Czank P. Angiotensin I-converting enzyme and chymase gene polymorphisms- relationship to left ventricular mass in type 2 diabetes patients. *Med Sci Monit* 2002; 8: CR603-606.
 32. Hoefler G, Harnoncourt F, Paschke E, Mirtl W, Pfeiffer KH, Kostner GM. Lipoprotein Lp(a). A risk factor for myocardial infarction. *Atherosclerosis* 1989; 8: 398-401.
 33. Hoffmeister H, Mensink GBM, Stolzenberg H, Hoeltz J, Kreuter H, Laaser U, Nüssel E, Hüllemann KD, Troschke J. Reduction of Coronary Heart Disease Risk Factors in the German Cardiovascular Prevention Study. *Prev Med* 1996; 25: 135-145.
 34. Hokanson JE, Austin MA: Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a metaanalysis of population-based prospective studies. *J Cardiovascular Risk* 1996; 3: 231-219.
 35. Houlston RS, Snowden C, Green F, Alberti G, Humphries SE. Apolipoprotein E genotypes by polymerase chain reaction and allele specific oligonucleide probes: no detectable linkage disequilibrium between apoE and apo CII. *Hum Genet* 1989; 83: 364-368.
 36. Houlston RS, Wenham PR, Humphries SE. Detection of apolipoprotein E polymorphisms using PCR/ASO probes and southern transfer: application for routine use. *Clin Chim Acta* 1990; 189: 153-158.
 37. Humphries SE. The application of molecular biology techniques to the diagnosis of hyperlipidaemia and other risk factors for cardiovascular disease. *Clin Chim Acta* 1993; 216: 5-18.
 38. Husain A, Kinoshita A, Sung SS, Urata H, Bumpus FM. Human heart chymase, in the cardiac renin-angiotensin system, edited by Lindpainter K, Ganten D, New York, Futura Publishing 1994: 309-331.
 39. ISIS-2 Collaborative Group. Randomized trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither among 17.187 cases of suspected myocardial infarction. *Lancet* 1988; 2:349-360.

40. ISIS-4 Collaborative Group. ISIS-4: A randomized factorial trial assessing early oral captopril, oral mononitrate, and intravenous magnesium sulphate in 58,050 patients with suspected acute myocardial infarction. *Lancet* 1995; 345: 669-685.
41. Jin D, Takai S, Sakaguchi M, Okamoto Y, Muramatsu M, Miyazaki M. An antiarrhythmic effect of a chymase inhibitor after myocardial infarction. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 309: 490-497.
42. Jin D, Takai S, Yamada M, Sakaguchi M, Kamoshita K, Ishida K, Sukenaga Y, Miyazaki M. Impact of chymase inhibitor on cardiac function and survival after myocardial infarction. *Cardiovascular Research* 2003; 60: 413-420.
43. 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.
44. Kinoshita A, Urata H, Bumpus M, Husain A. Multiple Determinants for the High Substrate Specificity of an Angiotensin II-forming chymase from the Human Heart. *J Biol Chem* 1991; 266: 19192-19197.
45. Kjeldhus J, Pederson TR. Reducing the risk of coronary events: Evidence from the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4 S). *Am J Cardiol* 1995; 76: 64-68.
46. Kupper W, Bleifeld W. Koronarangiographie und Ventrikulographie. *Der Internist* 1990; 31: 341-349.
47. Lindpainter K, Ganten D. The Cardiac Renin-Angiotensin System. *Circ Res* 1990; 68: 905-921.
48. Lindpainter K, Pfeffer MA, Kreutz R, Stampfer M, Grodstein F, LaMotte F, Buring J, Hennekens CH. A prospective evaluation of an angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease. *N Engl J Med* 1995; 332: 706-711.
49. Ludwig EH, Comeli PS, Anderson JL, Marshall HW, Lalouel JM, Ward RH. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism is associated with myocardial infarction but not with development of coronary stenosis. *Circulation* 1995; 91: 2120-2124.
50. Marcovina SM, Albers JJ, Dati F, Ledue TB, Richie RF. International Federation of Clinical Chemistry Standardization Project for Measurements of Apolipoprotein A-I and -B. *Clin Chem* 1991; 37: 1676-1682.
51. Marian AJ, Yu Q, Workman R, Greve G, Roberts R. Angiotensin-converting enzyme polymorphism in hypertrophic cardiomyopathy and sudden cardiac death. *Lancet* 1993; 342: 1085-1086.
52. Mattu RK, Needham EWA, Galton DJ, Frangos E, Clark AJL, Caulfield M. A DNA variation at the angiotensin-converting enzyme gene locus associates with coronary artery disease in the Caerphilly heart study. *Circulation* 1995; 91: 270-274.
53. Miki Y, Swenen J, Shattuck-Eidens D et al: A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994; 266: 66-71.

54. Mullis KB. Eine Nachtfahrt und die Polymerase-Kettenreaktion. Spektrum der Wissenschaft 1990; 6: 60-67.
55. Mullis KB, Faloona FA. Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalysed Chain Reaction. Meth Enzymol 1987; 55: 335-350.
56. Multicenter Postinfarction Research Group. Risk stratification after acute myocardial infarction. New Engl J Med 1983; 309: 331-336.
57. 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.
58. Nakai K, Itoh C, Miura Y, Hotta K, Musha T, Itoh T, Miyakawa T, Iwasaki R, Hiramori K. Deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with serum ACE concentration and increased risk for CAD in the Japanese. Circulation 1994; 90: 2199-2202.
59. Nelkin D., Tancredi L. Dangerous Diagnostics: The Social Power of Biological Information University of Chicago Press. 1994.
60. Nishimura H, Hoffmann S, Baltatu O, Sugimura K, Ganten D, Urata H. Angiotensin I converting enzyme and chymase in cardiovascular tissues. Kidney Int 1996; 49 (Supl 55): 18-23.
61. Passarge E. Taschenatlas der Genetik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1994; 1. Auflage: 67.
62. Pederson TR, Olsson AG, Færgemann O, Berg K, Miettinen T, Wedel H for the 4S Group: Simvastatin-induces Reduction in Risk of Major Coronary Events is Related to Both Reduction in LDL-Cholesterol and Increase in HDL-Cholesterol. Circulation 1995; 92: I-198.
63. Pfeffer MA, Braunwald E, Lemuel AM, Basta L, Brown EJ, Cuddy TE, Davis BR, Geltman EM, Goldman S, Flaker GC, Klein M, Lamas GA, Packer M, Rouleau J, Rouleau JL, Rutherford J, Wertheimer JH, Hawkins CM. Effect of Captopril on Mortality and Morbidity in Patients with left ventricular Dysfunction after myocardial infarction. New Engl J Med 1992; 327: 669-677.
64. Pfeufer A, Busjahn A, Vergopoulos A, Knoblauch H, Urata H, Osterziel KJ, Menz M, Wienker TF, Faulhaber HD, Steinmetz A, Schuster H, Dietz R, Luft F. Chymase Gene Locus Is Not Associated With Myocardial Infarction and Is not Linked to Heart Size or Blood Pressure. Am J Cardiol 1998; 82: 979-981.
65. Pfeufer A, Osterziel KJ, Urata H, Borck G, Schuster H, Wienker T, Dietz R, Luft FC. Angiotensin-converting Enzyme and Heart Chymase Gene Polymorphisms in Hypertrophic Cardiomyopathy. Am J Cardiol 1996; 78: 362-364.
66. 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.

67. Raynolds MV, Bristow MR, Bush EW, Abraham WT, Lowes BD, Zisman LS, Taft CS, Perryman MP. Angiotensin-converting enzyme DD genotype in patients with Ischaemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Lancet* 1993; 342: 1073-1075.
68. Riesen WF, Mordasini R, Salzmann C, Theler A, Gurtner HP. Apoproteins and lipids as discriminators of severity of coronary heart disease. *Atherosclerosis* 1980; 37: 157-162.
69. Rifai N, Chapman JF, Silverman LM, Gwynnes JT. Review of serum lipids and apolipoproteins in risk-assessment of coronary heart disease. *Ann Clin Lab Sci* 1988; 18: 429-439.
70. Rigat B, Hubert C, Francois Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An Insertion/Deletion Polymorphism in the Angiotensin I-converting Enzyme Gene Accounting for Half the Variance of Serum Enzyme Levels. *J Clin Invest* 1990; 86: 1343-1346.
71. Rosengren A, Wilhelmsen L, Eriksson E, Risberg B, Wedel H. Lipoprotein (a) and coronary heart disease: a prospective case-control study in a general population sample of middle aged men. *Br Med J* 1990; 301: 1248-1251.
72. Rousseau MF, Konstani MA, Benedict CR, Donckier J, Galanti L, Melin J, Kinan D, Ahn S, Ketelslegers JM, Pouleur H. Progression of left ventricular dysfunction secondary to coronary artery disease, sustained neurohormonal activation and effects of ibopamine therapy during long-term therapy with angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Am J Cardiol* 1994; 73: 488-493.
73. Ruiz J, Blanché H, James RW, Blatter Garin MC, Vaisse C, Charpentier G, Cohen N, Morabia A, Passa P, Froguel P. Gln-Arg192 polymorphism of paraoxonase and coronary heart disease in type 2 diabetes. *Lancet* 1995; 346: 869-872.
74. Saha N, Talmud PJ, Tay JSH, Humphries SE, Basair J. Lack of association of angiotensin converting enzyme (ACE) gene insertion/deletion polymorphism with CAD in two asian populations. *Clinical Genetics* 1996; 50: 121-125.
75. Sandkamp M, Funke H, Schulte H, Kohler E, Assmann G. Lipoprotein(a) is an independant risk factor for myocardial infarction at a young age. *Clin Chem* 1990; 36: 20-23.
76. Savard P, Rouleau, Ferguson J, Poitras N, Morel P, Davies RF, Stewart DJ, Talajic, Gardner M, Dupuis R, Lauzon C, Sussex B, Potvin L, Warnica. Risk stratification after myocardial infarction using signal-averaged electrocardiographic criteria adjusted for sex, age and myocardial infarction location. *Circulation* 1997; 96: 202-213.
77. Schechter NM, Fraki JE, Geesin JC, Lazarus GS. *J Biol Chem* 1983; 258: 2973-2978.
78. Schunkert H, Dzau VJ, Tang SS, Hirsch AT, Apstein CS, Lorell BH. Increased Rat Cardiac Angiotensin Converting Enzyme activity and mRNA Expression in Overload Left Ventricular Hypertrophy. *J Clin Invest* 1990; 86: 1913-1920.
79. Schunkert H. Polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and cardiovascular disease. *J Mol Med* 1997; 75: 867-875.

80. Schuster H, Wienker TF, Stremmler U, Noll B, Steinmetz A, Luft FC. An Angiotensin-Converting Enzyme Gene Variant is Associated With Acute Myocardial Infarction in Women But not in Men. *Am J Cardiol* 1995; 76: 601-603.
81. Sheu WHH, Lee WJ, Jeng CY, Young MS, Ding JA, Chen YT. Angiotensinogen gene polymorphism is associated with insulin resistance in nondiabetic men with or without coronary heart disease. *Am Heart J* 1998; 136: 125-131.
82. Sigush HH, Vogt S, Gruber U, Reinhardt D, Lang K, Surber R, Farker K, Muller S, Hoffmann A. Angiotensin I converting enzyme DD genotype is a risk factor of coronary artery disease. *Scandinavian Journal of clinical and laboratory investigation* 1997; 57: 127-132.
83. Smeets HJM, Poddighe J, Stuyt PMJ, Stalenhoef AFH, Ropers HH, Wieringa B. Identification of apolipoprotein E polymorphism by using synthetic oligonucleids. *J Lipid Res* 1998; 29: 1231-1237.
84. Steinberg J, Regan A, Sciacca R, Bigger T, Fleiss J, Salvatore D, Fosnia M, Rolnitzky. Predicting arrhythmic events after acute myocardial infarction using the signal-averaged electrocardiogram. *Am J Card* 1992; 69:13-21.
85. Studer R, Reinecke H, Müller B, Holtz J, Just H, Drexler H. Increased Angiotensin-I Converting Enzyme Gene Expression in the Failing Human Heart. *J Clin Invest* 1994; 94: 301-310.
86. Thomas AE, Green FR, Kelleher CH et al. Variation in the promotor region of the fibrinogen gene is associated with plasma fibrinogen levels in smokers and non-smokers. *Thromb and Haemost* 1991; 65: 487-490.
87. Truett J, Cornfield J, Kannel W. A multivariate analysis of the risk of coronary heart disease in Framingham. *J Chron Dis* 1967; 20: 511-524.
88. Urabe Y, Ideishi M, Sasaguri M, Ikeda M, Arakawa K. Beneficial effects of a serine protease inhibitor in peripheral vascular disease. *Am J Cardiol* 1993; 72: 218-222.
89. Urata H, Boehm KD, Philip A, Kinoshita A, Gabrovsek J, Bumpus FM, Husain A. Cellular Localisation and Regional Distribution of an Angiotensin II-forming Chymase in the Heart. *J Clin Invest* 1993; 91: 1269-1281.
90. Urata H, Healy B, Stewart RW, Bumpus FM, Husain A. Angiotensin II-Forming Pathways in Normal and Failing Human Hearts. *J Clin Endocrin Metabol* 1990; 69: 54-66.
91. Urata H, Kinoshita A, Misono KS, Bumpus FM, Husain A. Identification of a Highly Specific Chymase as the Major Angiotensin II-forming Enzyme in the Human Heart. *J Biol Chem* 1990; 265: 22348-22357.
92. Urata H, Kinoshita A, Perez DM, Misono KS, Bumpus FM, Graham RM, Husain A. Cloning of the Gene and cDNA for Human Heart Chymase. *J Biol Chem* 1991; 266: 17173-17179.
93. Waldecker B, Waas W, Haberbosch W, Voß R, Heizmann H, Tillmanns H. Long-term follow-up after direct percutaneous transluminal coronary angioplasty for acute myocardial infarction. *J Am Coll Card* 1998; 32: 1320-1325.

94. Wang DH, Prewitt RL. Captopril reduces aortic and microvascular growth in hypertensive and normotensive rats. *Hypertension* 1990; 15: 68-77.
95. Weiss EJ, Bray PF, Tayback M, Schulman SP, Kickler TS, Becker LC, Weiss JL, Gerstenblith G, Goldschmidt-Clermont PJ. A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis *N Engl J Med* 1996; 334: 1090-1094.
96. Wenham PR, Price WH, Blundell G. Apolipoprotein E genotyping by one-stage PCR. *Lancet* 1991; 337: 1158-1159.
97. WHO MONICA Project. Myocardial infarction and coronary deaths in the World Health Organization MONICA Project. *Circulation* 1994; 90: 583-612.
98. Widdershoven JWMGm Gorgels APM, Vermeer F, Dijkman WN, Verstraaten GMP, Dassen WRM, Wellens HJ. Changing characteristics and in-hospital outcome in patients admitted with acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 1997; 18: 1073-1080.
99. Wiklund O, Angelin B, Olofsson SO, Eriksson M, Fager G, Berglund L, Bondjers G. Apolipoprotein (a) and ischaemic heart disease in familial hypercholesterinaemia. *Lancet* 1990; 335: 1360-1363.
100. Wilson PWF, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of Coronary Heart Disease Using Risk Factor Categories. *Circulation* 1998; 97: 1837-1847.
101. Wintroub BU, Kaempfer CE, Schechter NM, Proud D. *J Clin Invest* 1986; 77: 196-201.
102. Woodbury RG, Neurath H. *FEBS Lett.* 1980; 114: 189-196.
103. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, et al: Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 1995; 378: 789-792.
104. Zimmermann M, Sentici A, Adamec R, Metzger J, Mermillod B, Rutishauser W. Long-term prognostic significance of ventricular late potentials after a first acute myocardial infarction. *Am Heart J* 1997; 134: 1019-1028.

Lebenslauf

Name: Monia Hamami

Geburtsdatum: 24.02.1974

Geburtsort: Siegen

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet

Wohnort: Dortmund

Schulbildung:

1980-1984 Spandauer Schule am Häusling, Siegen

1984-1993 Gymnasium und Abitur, Siegen

Studium:

1993-2000 Medizinstudium an der Justus-Liebig-Universität Gießen

Mai 2000 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Berufstätigkeit:

2000-2001 ÄiP im Evangelischen Krankenhaus in Dortmund-Lütgendortmund

2002 ÄiP im Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie
an der Universitätsklinik in Essen im Rahmen der Weiterbildung
zur Medizininformatikerin

2002-2003 Assistenzärztin in der Kardiologischen Gemeinschaftspraxis Dr.
Cordes et al.

seit 12.2003 Betriebsärztin in der Gesundheitsteam gGmbH

Februar 2006 Anerkennung zur Fachärztin für Arbeitsmedizin

Danksagung

Ausdrücklich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Gardemann für die Überlassung des Arbeitsthemas, zahlreiche Anregungen und seine stets hoch engagierte und zuverlässige Betreuung der Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Katz danke ich für die freundliche Unterstützung meiner Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei Monika Philipp und Jana Lohre für die Hilfsbereitschaft und sehr gute Zusammenarbeit in labortechnischen und organisatorischen Angelegenheiten ganz herzlich bedanken.

Darüber hinaus möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Instituts für Klinische Chemie, der Klinik für Kardiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen und der kardiologischen Abteilung der Kerckhoff Klinik, Bad Nauheim, bedanken. Sie haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Meinen Eltern möchte ich dafür danken, dass sie mir das Studium der Humanmedizin ermöglicht und mich auf meinem Weg immer unterstützt haben.

Meinem Ehemann Elmar gebührt mein Dank dafür, dass er mich trotz meiner Launen während der Erstellung der Arbeit stets verständnisvoll ertragen und unterstützt hat.