

Medizinische Klinik und Poliklinik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Abteilung für Nephrologie

Direktor: Prof. Dr. med. L. C. Rump

**Genetische Polymorphismen des Renin-Angiotensin-Systems als
kardiovaskuläre Risikofaktoren bei Patienten mit terminaler
Niereninsuffizienz**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Philip Reis

2009

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referentin: Prof. Dr. med. Katrin Ivens

Korreferentin: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Brigitte Royer-Pokora

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	6
1. Einleitung	7
1.1. Terminale Niereninsuffizienz und kardiovaskuläre Erkrankungen.....	7
1.2. Das Renin-Angiotensin-System	8
1.3. Polymorphismen.....	9
1.3.1. Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus.....	9
1.3.2. Angiotensin I-Konversionsenzym-Gen I/D Polymorphismus	10
1.3.3. Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus.....	10
1.4. Zielsetzung und Fragestellung	11
1.4.1. Erste Hypothese.....	11
1.4.2. Zweite Hypothese	12
1.4.3. Dritte Hypothese	12
2. Patienten und Methoden.....	12
2.1. Beschreibung der Patienten und der Kontrollprobanden.....	12
2.2. Kardiovaskuläre Risikofaktoren.....	13
2.3. Kontrollgruppe	14
2.4. Laborbestimmungen.....	14
2.4.1. Allgemeine Laborbestimmungen.....	14
2.4.2. Bestimmung der genetischen Polymorphismen des Renin-Angiotensin- Systems	14
2.5. Statistik.....	26

2.6.	Ethische Aspekte.....	27
3.	Ergebnisse.....	27
3.1.	Charakteristika der Studienpopulation.....	27
3.1.1.	Allgemeine Charakteristika der Studienpopulation.....	27
3.1.2.	Studienpopulation und koronare Herzkrankheit	28
3.1.3.	Charakteristika der Patienten im Hinblick auf eine nachgewiesene bzw. ausgeschlossene KHK.....	29
3.1.4.	Charakteristika der Patienten im Hinblick auf die Mortalität	30
3.1.5.	Verteilung der Genotypen des Angiotensin I-Konversionsenzym-Gen I/D Polymorphismus (ACE I/D), des Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus (AGT M235T) und des Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus (AT ₁ R A1166C) in der Patienten- und der Kontrollgruppe	32
3.1.6.	Genotypen des Angiotensin I-Konversionsenzym-Gen I/D Polymorphismus (ACE I/D) und Charakteristika der Patienten	33
3.1.7.	Genotypen des Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus (AGT M235T) und Charakteristika der Patienten	34
3.1.8.	Genotypen des Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus (AT ₁ R A1166C) und Charakteristika der Patienten	35
3.1.9.	Verteilung der Genotypen des ACE I/D Polymorphismus in Relation zu nachgewiesener KHK, Koronarintervention/Revaskularisation, Myokardinfarkt und Tod	36
3.1.10.	Verteilung der Genotypen des ACE I/D Polymorphismus in Relation zu KHK, Koronarrevaskularisation/Intervention, Myokardinfarkt und Tod bei allen Patienten und in Untergruppen	37
3.1.11.	Verteilung der Genotypen des AGT M235T Polymorphismus in Relation zu nachgewiesener KHK, Koronarintervention/Revaskularisation, Myokardinfarkt und Tod	38

3.1.12. Verteilung der Genotypen des AT ₁ R A1166C Polymorphismus in Relation zu nachgewiesener KHK, Koronarintervention/Revaskularisation, Myokardinfarkt und Tod	39
3.1.13. Zusammenfassung der Ergebnisse	40
4. Diskussion	41
4.1. Hauptresultate	42
4.2. Angiotensin-Konversionsenzym (ACE)-Gen Insertion/Deletion (I/D) Polymorphismus	43
4.3. Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus (AGT M235T)	48
4.4. Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus (AT1R A1166C).....	50
4.5. Synergistische Effekte der Polymorphismen	52
4.6. Weitere mögliche Einflussfaktoren	53
5. Zusammenfassung und Schlussbetrachtung	55
6. Literatur.....	57
7. Verwendete Abkürzungen	65
8. Danksagung.....	66
9. Lebenslauf	67
10. Kurzfassung.....	69

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1 : Angiotensin I-Konversionsenzym-Gen I/D Polymorphismus: Darstellung der PCR-Produkte in der Elektrophorese	18
Abbildung 2 : Angiotensin I-Konversionsenzym-Gen I/D-Polymorphismus: I-spezifische PCR zur Identifizierung von DI-Heterozygoten bei unterdrückter Amplifikation des I-Allels.....	20
Abbildung 3 : Angiotensin-Gen M235T Polymorphismus: Elektrophorese der PCR-Produkte nach der Restriktionsphase.	23
Abbildung 4 : Angiotensin II-Typ 1-Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus: Elektrophorese der PCR-Produkte nach der Restriktionsphase.....	26

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1 : Charakteristika der Studienpopulation.....	28
Tabelle 2 : Studienpopulation und KHK.....	29
Tabelle 3 : Charakteristika der Population mit Nachweis bzw. Ausschluss einer KHK.....	30
Tabelle 4 : Charakteristika verstorbener und lebender Patienten	31
Tabelle 5 : ACE, AGT und AT ₁ R Genotypenverteilung in der Patienten- und in der Kontrollgruppe ...	32
Tabelle 6 : ACE I/D Polymorphismus und Charakteristika der Population.....	33
Tabelle 7 : AGT M235T Genotypen und Charakteristika der Patienten.....	34
Tabelle 8 : AT ₁ R A1166C Genotypen and Charakteristika der Patienten.....	35
Tabelle 9 : Verteilung der Genotypen des ACE I/D Polymorphismus in Relation zu nachgewiesener KHK, Koronarintervention/Revaskularisation, Myokardinfarkt und Tod	36
Tabelle 10 : Verteilung der Genotypen des ACE I/D Polymorphismus in Relation zu KHK, Koronarrevaskularisation/Intervention, Myokardinfarkt und Tod bei allen Patienten	37
Tabelle 11 : Verteilung der Genotypen des AGT M235T Polymorphismus in Relation zu nachgewiesener KHK, Koronarintervention/Revaskularisation, Myokardinfarkt und Tod.....	39
Tabelle 12 : Verteilung der Genotypen des AT ₁ R A1166C Polymorphismus in Relation zu nachgewiesener KHK, Koronarintervention/Revaskularisation, Myokardinfarkt und Tod.....	39
Tabelle 13 : Literaturübersicht zum Angiotensin-Konversionsenzym (ACE)-Gen Insertion/Deletion (I/D) Polymorphismus und dessen Einfluss auf KHK, Myokardinfarktinzidenz und Mortalität	48
Tabelle 14 : Literaturübersicht zum Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus und dessen Einfluss auf KHK, Myokardinfarktinzidenz und Mortalität.....	50
Tabelle 15 : Literaturübersicht zum Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus	51
Tabelle 16 : Literaturübersicht zu den synergistischen Effekten der Polymorphismen.....	52

1. EINLEITUNG

1.1. Terminale Niereninsuffizienz und kardiovaskuläre Erkrankungen

Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz haben ein erhöhtes Risiko, eine koronare Herzkrankheit zu entwickeln. Tödliche kardiale Ereignisse sind für ca. 40-50% der Todesfälle bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz verantwortlich und stellen damit die häufigste Todesursache in dieser Patientengruppe dar. Im Vergleich zur Normalbevölkerung ist die kardiovaskuläre Mortalität für Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz 10-15-mal höher^{1, 2, 3, 4}. Etwa 22% dieser Todesfälle sind auf den akuten Myokardinfarkt zurückzuführen⁵. Eine koronare Herzkrankheit kann bei 30-60% der Patienten dieser Gruppe angiographisch nachgewiesen werden^{4, 6}. Wegen eines Myokardinfarktes oder wegen Angina pectoris müssen jährlich etwa 10 % der Hämodialysepatienten stationär behandelt werden⁷.

Eine klinisch nicht auffällige (asymptomatische) Koronararterienverkalkung fanden Goodman et al. bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz schon ab einem Alter von 20 Jahren. Bei den untersuchten 20-30 jährigen Patienten war eine Verkalkung der Koronararterien häufiger nachweisbar und hatte eine höhere Progressionsrate als bei gleichaltrigen oder älteren nierengesunden Personen. Unter den Dialysepatienten wiesen diejenigen mit Koronararterienverkalkung eine längere Dialysedauer auf als die Patienten ohne eine Koronarsklerose⁸. Dies spricht für eine Zunahme der Koronarsklerose in Abhängigkeit von der Dialysedauer.

Auch das Langzeitüberleben der dialysepflichtigen Patienten, die einen akuten Myokardinfarkt erlitten haben, ist signifikant schlechter als es den Erwartungswerten entspricht, wenn man Literaturmitteilungen über Patienten mit akutem Myokardinfarkt ohne terminale Niereninsuffizienz als Grundlage betrachtet⁹.

Des Weiteren zeigen Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz nach einer perkutanen transluminalen Angioplastie (PTCA) neben einer reduzierten primären Erfolgsrate auch eine höhere Restenoserate gegenüber einem Vergleichskollektiv nierengesunder Patienten. Im Vergleich zu nierengesunden Patienten besteht auch eine erhöhte perioperative Mortalität nach einer aorto-koronaren Bypass-Operation (ACB-Operation)^{4, 1}.

Für die Entstehung einer Arteriosklerose in der Normalbevölkerung werden multifaktorielle Ursachen und genetische Faktoren verantwortlich gemacht. Bei terminal niereninsuffizienten Patienten müssen diesbezüglich ähnliche Mechanismen angenommen werden³.

Terminal niereninsuffiziente Patienten weisen eine hohe Prävalenz der bekannten kardiovaskulären Risikofaktoren auf, die zu einem exzessiv erhöhten KHK-Risiko beitragen, dieses jedoch nicht vollständig erklären.

Neben den kardiovaskulären Risikofaktoren wie Nikotinabusus, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Dyslipoproteinämie, Störungen im Kalzium-Phosphat-Haushalt durch einen sekundären Hyperparathyreoidismus, C-reaktivem Protein (CRP), Alter, genetischen Faktoren und weiteren spielt das Renin-Angiotensin-System eine wichtige weitere Rolle in der Entstehung der koronaren Herzkrankheit.

1.2. Das Renin-Angiotensin-System

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) ist als zentraler Modulator von Blutdruck und Volumenhomöostase bekannt. Aus diesem Grund wurde dem RAS schon frühzeitig eine pathophysiologische Rolle bei Hypertonie und anderen kardiovaskulären Krankheiten (wie koronare Herzkrankheit, Arteriosklerose und kardiale Hypertrophie) zugeschrieben¹¹.

Das RAS vermag den Blutdruck wirkungsvoll anzuheben. Angiotensin II beeinflusst dabei verschiedene physiologische Größen im Sinne einer Blutdrucksteigerung.

Angiotensin II entsteht als Folge der Freisetzung von Renin in der Niere. Renin ist ein Glykoprotein, welches im Bereich des juxtaglomerulären Apparates der Niere von spezialisierten Zellen der zuführenden Arteriole in die Blutbahn abgegeben wird. Eine Reninfreisetzung erfolgt bei Abfall des renalen Perfusionsdruckes, bei Abfall des Natrium-Bestandes des Organismus sowie infolge sympathischer Innervation über β_1 -Rezeptoren.

Renin wirkt im Blut als Protease und spaltet von dem α_2 -Globulin Angiotensinogen, welches in der Leber synthetisiert wird, das Decapeptid Angiotensin I ab. Unter Einwirkung des Angiotensin-Konversions-Enzyms (ACE) entsteht das Octapeptid Angiotensin II.

Angiotensin II wirkt außerordentlich stark vasokonstriktorisch. Außerdem fördert Angiotensin II die Aldosteron-Inkretion aus der Nebennierenrinde; dieses Mineralokortikoid hält in der Niere Natrium-Chlorid und Wasser zurück und vermehrt auf diese Weise das extrazelluläre Flüssigkeitsvolumen und damit Blutvolumen bzw. venöses Angebot. Des Weiteren stimuliert Angiotensin II auch den Sympathikus als weiteres Blutdruck steigerndes System. Schließlich kann Angiotensin II bei chronischer Einwirkung offenbar eine direkte trophische Wirkung auf Herz und Gefäße durch Wachstumsförderung glatter Muskelzellen entfalten und zu einer Hypertrophie von Myokard und Gefäßmuskulatur beitragen¹⁰.

Für nahezu alle Komponenten des RAS wurden Genpolymorphismen beschrieben und untersucht. Besonders eingegangen werden soll hier auf den Angiotensinogen-Gen (M235T) Polymorphismus, den Angiotensin-Konversionsenzym (ACE)-Gen Insertion/Deletion (I/D) Polymorphismus und den Angiotensin II-Typ 1 (AT₁) Rezeptor A/C Polymorphismus.

1.3. Polymorphismen

1.3.1. Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus

Angiotensinogen ist das einzige bekannte Substrat für Renin und direkte Vorstufe von Angiotensin I. Verschiedene Studien legen eine Beziehung zwischen den Angiotensinogenkonzentrationen im Plasma und dem arteriellen Blutdruck nahe^{11, 12}. Hierbei wurde von Jeunemaitre et al. eine Punktmutation des Angiotensinogen-Gens beschrieben, bei der Thymin durch Cytosin substituiert wird und im Endeffekt bei der Translation im Bereich der Aminosäure 235 zu einem Austausch von Methionin gegen Threonin des produzierten Angiotensinogens führt¹². Träger des T235 Allels haben signifikant erhöhte Plasma-Angiotensinogenspiegel, die möglicherweise zu einer gesteigerten Angiotensin-II-Bildung führen^{11, 13}. Verschiedene Autoren bringen das T235 Allel in Zusammenhang mit der Hypertonie^{11, 14}. Es gibt diesbezüglich allerdings auch negative Befunde^{13, 15}, wobei kein Zusammenhang zwischen diesem Polymorphismus und der Hypertonie gefunden wurde.

Erklärungsmöglichkeiten für diese Diskrepanz sind z.B. das sehr unterschiedliche Vorhandensein des T235 Allels in verschiedenen ethnischen Gruppen¹¹, bzw. die mit dem T235 Allel assoziierten unterschiedlich erniedrigten Reninspiegel¹³.

Außerdem wurde der Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus mit einem erhöhten Risiko für KHK und Myokardinfarkt in Zusammenhang gebracht^{16, 17, 18, 19}.

1.3.2. Angiotensin I-Konversionsenzym-Gen I/D Polymorphismus

Das Angiotensin I-Konversionsenzym (ACE) ist eine Dipeptidylkarboxypeptidase, die einerseits Angiotensin-I in Angiotensin-II konvertiert und andererseits Bradykinin inaktiviert.

Durch Rigat et al.²⁰ wurde am Intron 16 des ACE-Gens ein Polymorphismus festgestellt, bei dem eine 287 Basenpaare lange Sequenz entweder anwesend („Insertion“, I-Allel) oder abwesend („Deletion“, D-Allel) ist.

Der I/D Polymorphismus des ACE Gens wird in Zusammenhang gebracht mit 14-50% einer interindividuellen Varianz der Serumaktivität des ACE²¹, wobei Patienten, die homozygot für das D-Allel waren, signifikant höhere ACE-Plasmakonzentrationen aufwiesen^{11, 13, 21, 22}. In anderen Studien konnte kein direkter Zusammenhang zwischen Plasma-ACE-Spiegeln und dem ACE-Genotyp nachgewiesen werden¹¹. Für die Pathogenese des arteriellen Hypertonus scheint der ACE (I/D) Polymorphismus möglicherweise eine Rolle zu spielen, ebenso wie in der Pathogenese anderer kardiovaskulärer Störungen, eingeschlossen KHK, Myokardinfarkt, linksventrikuläre Hypertrophie und Hirninfarkt^{11, 21, 23, 24, 25}. Auch hierzu existieren kontroverse Studien, die keinen oder einen widersprüchlichen Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus und den genannten pathologischen Erscheinungen finden^{11, 13, 21, 22}. Darüber hinaus war die Assoziation zwischen linksventrikulärer Hypertrophie und homozygoten Trägern des D-Allels eher bei männlichen als bei weiblichen Patienten nachweisbar²³.

1.3.3. Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus

Angiotensin II bindet an eigene Rezeptoren, den AT₁- und den AT₂-Rezeptor, wobei beim gesunden Menschen hauptsächlich der AT₁ Rezeptor vorkommt.

Beim A1166C Polymorphismus des Angiotensin II-Typ1 Rezeptor (AT₁R) Gens ist im Kodon 1166 Adenin durch Cytosin ersetzt. Das C-Allel trat dabei vermehrt unter Patienten mit arterieller Hypertonie auf²⁶. Darüber hinaus wurde eine gesteigerte vasokonstriktive Reaktion von Arterien auf Angiotensin II bei Trägern des C-Allels festgestellt²⁷, wobei der AT₁R-A1166C Polymorphismus weder die Komponenten des

RAS noch die Anzahl oder Affinität der AT₁Rezeptoren auf Thrombozyten beeinflusste^{28,29}. Der AT₁R-A1166C Polymorphismus wurde mit der Entwicklung und dem Schweregrad der KHK assoziiert^{30, 31}, außerdem wurde ein synergistischer Effekt des ACE-I/D und des AT₁R-A1166C Polymorphismus im Hinblick auf das Myokardinfarktrisiko³² und die Entwicklung einer KHK beschrieben^{33, 30}. Gardemann et al. konnten diese Zusammenhänge jedoch nicht nachweisen³⁴.

Der AT₁ Rezeptor Genotyp scheint den Grad der linksventrikulären Hypertrophie bei Patienten mit hypertrophischer Kardiomyopathie zu beeinflussen. Die Masse des linken Ventrikels (LVM) und der linksventrikuläre Massenindex (left ventricular mass index - LVMI) waren bei Trägern des C-Allels deutlich höher als bei AA-Homozygoten²². Wieder existieren zu dem Thema Arbeiten, die dieses Ergebnis nicht feststellten^{35, 36, 37}. Weiter beschrieben Osterop et al.²² einen erhöhten Plasmaprenin Spiegel bei Trägern des C-Allels, wobei allerdings kein unabhängiger Effekt des Renins auf die linksventrikuläre Hypertrophie nachgewiesen werden konnte. Auch wurden weder Plasmaprenin und ACE durch den AT₁ Rezeptor A/C Polymorphismus beeinflusst, noch wurde eine Interaktion mit dem ACE I/D Polymorphismus nachgewiesen. Dies legt den Schluss nahe, dass das AT₁ Rezeptor C-Allel die phänotypische Ausprägung der Hypertrophie bei hypertrophischer Kardiomyopathie unabhängig von Plasmaprenin und ACE I/D Polymorphismus moduliert.

1.4. Zielsetzung und Fragestellung

Zur weiteren Klärung der hohen kardialen Mortalität bei terminal niereninsuffizienten Patienten wird in dieser Studie der Zusammenhang der drei genannten Genpolymorphismen des RAS mit der KHK bei diesen Patienten untersucht.

1.4.1. Erste Hypothese

Es besteht zwischen den Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz und der Kontrollgruppe kein Unterschied in der Verteilung der Genotypenkonstellation der o.g. Polymorphismen

1.4.2. Zweite Hypothese

Die vermeintlich ungünstigen Allele der genannten Polymorphismen werden häufiger bei der Patientengruppe mit koronarer Herzkrankheit (KHK) gefunden als bei den Patienten ohne eine solche.

Dies bedeutet konkret, dass das T-Allel des Angiotensinogen (M235T) Polymorphismus, das D-Allel des ACE I/D Polymorphismus und das C-Allel des AT₁ A/C¹¹⁶⁶ Polymorphismus häufiger bei terminal Niereninsuffizienten Patienten mit KHK gefunden wird als bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz ohne KHK.

1.4.3. Dritte Hypothese

Patienten mit den ungünstigen Allelen zeigen häufiger und in einem früheren Lebensalter eine KHK.

Die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen hatten das Ziel, weitere Informationen zu den drei Hypothesen zu erhalten.

2. PATIENTEN UND METHODEN

2.1. Beschreibung der Patienten und der Kontrollprobanden

Die Studienpopulation schloss 281 Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz ein, von denen 69% Männer und 31% Frauen waren. Die Patienten wurden zwischen Januar 1997 und Juni 2004 in der Universitätsklinik Düsseldorf behandelt. Nur Patienten mit koronarangiographisch nachgewiesener (n=140) oder ausgeschlossener (n=141) KHK wurden in die Studie aufgenommen.

Die KHK wurde definiert als eine oder mehr Stenosen über 50% in mindestens einer Hauptarterie oder als Stenose des linken Hauptstammes über 30%.

Die Patienten wurden in der Klinik überwiegend zur Vorbereitung auf eine Nierentransplantation behandelt; die Koronarangiographie war ein Bestandteil der diesbezüglich durchgeführten Routineuntersuchungen.

Bei allen in die Studie aufgenommenen Patienten wurden neben der körperlichen Untersuchung eine komplette Anamnese erhoben, die u.a. Alter, Geschlecht, Dialyseart und –dauer, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie, Nikotinabusus und medikamentöse Behandlung (ACE-Hemmer, AT1-Rezeptorantagonisten und Cholesterin-Synthese-Enzym-Hemmer) erfasst.

2.2. Kardiovaskuläre Risikofaktoren

Neben Alter, Geschlecht, Grunderkrankung, Dialyseverfahren und –dauer wurden kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Nikotinkonsum, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Lipidstoffwechsel (Triglyzeride, HDL, LDL, Cholesterin), Body-Maß-Index und serologisch Entzündungsmarker (CRP, Fibrinogen) erfasst.

Des Weiteren wurde eine medikamentöse Behandlung mit ACE-Hemmern, AT1-Rezeptor Antagonisten und Cholesterin-Synthese-Enzym-Hemmern (Statine) berücksichtigt.

Die Blutproben wurden zum Zeitpunkt der Koronarangiographie entnommen. Eine Verlaufsbeobachtung nach Koronarangiographie wurde für 35+/-29 Monate durchgeführt. Die Art der Koronarintervention (Perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) mit oder ohne Stenteinlage, koronare Bypassoperation), Myokardinfarkt, Tod und Todesursache wurden festgehalten.

Der Body-Maß-Index dient der Erfassung der Körpermasse und wird angegeben in Körpergewicht (kg) dividiert durch das Quadrat der Körpergröße in Metern (kg/m^2).

Als arterielle Hypertonie wurden Blutdruckwerte >140 mmHg systolisch oder >90 mmHg diastolisch bei nicht therapierten Patienten definiert. Bereits mit Antihypertensiva behandelte Patienten wurden der hypertensiven Gruppe zugeteilt.

Diabetes mellitus wurde definiert durch eine Medikation mit Insulin oder oralen Antidiabetika. Neben Nüchternblutzucker wurde des Weiteren das HbA_{1c} berücksichtigt.

Zur Beurteilung des Risikofaktors Hyperlipidämie wurden die Triglyceride und das Serumcholesterin, einschließlich HDL- und LDL-Cholesterin erfasst. Eine Hypercholesterinämie wurde mit einem Serumcholesterinwert von >200 mg/dl festgelegt. Der Normbereich für das LDL-Cholesterin liegt <150 mg/dl, der für das

HDL-Cholesterin >40 mg/dl. Mit Lipidsenkern vorbehandelte Patienten wurden der Gruppe mit Hyperlipidämie zugeteilt.

Die erfassten Laborparameter stammten ausschließlich aus einem Zeitraum von 12 Monaten vor bzw. nach dem Zeitpunkt der Koronarangiographie.

2.3. Kontrollgruppe

Als Kontrollgruppe fungierten 100 Freiwillige (44 Männer, 56 Frauen), deren mittleres Lebensalter (40+/-16 Jahre) unter dem der Patienten (54.7±10.7) lag.

Die Wahl der Kontrollgruppe war problematisch. Es mussten Begleiterkrankungen wie KHK, Niereninsuffizienz, Diabetes mellitus und arterielle Hypertonie ausgeschlossen sein, in einer altersgleichen Kontrollgruppe war dies aber kaum erreichbar.

Bei den Kontrollprobanden, überwiegend Mitarbeiter der Klinik, lagen weder anamnestisch noch klinisch Hinweise auf eine KHK, Nierenerkrankungen, Diabetes mellitus und arterielle Hypertonie vor. Altersbedingte Selektionsfaktoren sind im Vergleich mit dieser Kontrollgruppe wegen des unterschiedlichen mittleren Lebensalters im Vergleich zum Patientenkollektiv nicht vollständig auszuschließen.

2.4. Laborbestimmungen

2.4.1. Allgemeine Laborbestimmungen

Blutzucker, HbA1c, Gesamtcholesterin, Triglyceride, LDL, HDL, Fibrinogen, CRP, anorganisches Phosphat, Serumkalzium und Parathormon wurden aus den Patientenakten entnommen oder im Labor der MNR-Klinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf nach den dortigen Standardmethoden bestimmt.

2.4.2. Bestimmung der genetischen Polymorphismen des Renin-Angiotensin-Systems

2.4.2.1. Materialgewinnung

Für die molekularbiologischen Bestimmungen wurde venöses Blut mit ACD als Zusatz verwendet (Acid Citrat Dextrose; Acidum citricum purum 2,5%, Dextrose

2,5%, Natrium citricum 2,16%, BD Vakutainer Systems, UK). Die Proben wurden in sterilen 1,5ml Eppendorf-Cups (Fa. Eppendorf, Hamburg) portioniert (400 µl pro Cup) und bei -20°C asserviert.

2.4.2.2. DNA-Extraktion

Um die DNA aus Leukozyten im ACD-Vollblut zu extrahieren, wurde das QIAGEN-QIAmp DNA Blood Mini Kit (Fa. QIAGEN, Hilden Deutschland, Januar 1999) angewandt. Das Verfahren bestand aus folgenden Schritten:

Lyse

Die Lyse der Leukozyten erfolgte durch die QIAGEN Protease. Auf den Boden von 1,5ml Eppendorf-Cups wurden 0,4mg aufgelöste Protease pipettiert. 200µl aufgetautes Probenmaterial und 200µl AL-Puffer wurden hinzugegeben. Die beiden Komponenten wurden sofort durch vortexen gemischt und bei 56°C 10 min inkubiert. Anschließend wurden 200µl Ethanol (96-100%) hinzugefügt und die Lösung wurde erneut durch vortexen gemischt. Dieser Schritt diente der Zelllyse und Freisetzung der DNA.

DNA-Bindung

Das Gemisch wurde in die mitgelieferten Säulen pipettiert und 1min bei 6000 x g (8000 rpm) bei Raumtemperatur zentrifugiert (Fa. Eppendorf 5417 R). Die DNA wurde dabei von der QIAmp Silica-Gel-Membran, die in den Säulen eingebaut war, absorbiert. Proteine und andere potentielle Störfaktoren durchliefen die Membran und wurden mit dem Filtrat verworfen.

Waschung

Um die DNA-Reinheit zu optimieren, wurden zwei Waschschrte durchgeführt. 500µl des Waschpuffers 1 (AW1) wurden auf die Säulen gegeben. Die Säulen wurden 1 min bei 6000 x g (8000 rpm) zentrifugiert, das Eluat wurde verworfen. Der gleiche Ablauf wurde mit dem Waschpuffer 2 (AW2) wiederholt. Danach wurde dann 2 min bei 20000 x g (14000 rpm) zentrifugiert, um auch die letzten Flüssigkeitsreste von den Membranen zu entfernen.

DNA-Freisetzung

Die QIAGEN-Säulen wurden in 1,5ml Eppendorf-Cups umgelagert und mit 50µl Puffer AE versetzt. Der Puffer AE setzte die an der Säulenmembran gebundene reine DNA frei. Diese wurde nach 5 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur durch anschließende Zentrifugation (1 min bei 6000 x g (8000 rpm)) eluiert, die Säulen wurden entsorgt.

Messung der DNA-Konzentration und der DNA-Reinheit

Im Spektrophotometer (Gene Quant, Pharmacia Biotech, Cambridge, UK) wurde die Absorption der extrahierten DNA gegen einen Leerwert bei 260nm und 280nm Wellenlänge gemessen. Zur Messung wurde die DNA mit Aqua dest. verdünnt. Die DNA-Konzentration wurde aus der Absorption bei 260 nm berechnet. Es wurden durchschnittlich 4-12µg DNA aus 200µl Vollblut gewonnen. Um die DNA-Reinheit zu evaluieren, wurde die Relation A_{260}/A_{280} verwendet (reine DNA hat ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm, Proteine bei 280nm). Gut gereinigte DNA weist Werte im Bereich 1,7-1,9 auf.

DNA-Verdünnung

Da für die Bestimmung des ACE-Gen I/D Polymorphismus vorzugsweise Proben mit einer sehr geringen DNA-Menge von ca. 15ng benötigt wurden, wurde ein Teil des gewonnenen Materials entsprechend mit Puffer AE verdünnt.

DNA-Lagerung

Sowohl verdünnte als auch unverdünnte DNA wurde bis zur Weiterverarbeitung kurzfristig bei +4°C und langfristig bei -20°C gelagert.

2.4.2.3. Angiotensin I-Konversionsenzym-Gen I/D Polymorphismus

Das Angiotensin I-Konversionsenzym (ACE) entfernt als Peptidase karboxterminale Dipeptide von Substraten wie Angiotensin I oder Bradykinin und nimmt eine bedeutende Rolle in der vaskulären Homöostase ein, indem es die Umwandlung von Angiotensin I in Angiotensin II, einen potenten Vasokonstriktor, und die Inaktivierung von Bradykinin, einen Vasodilatator, katalysiert.

Das ACE-Gen liegt im Chromosom 17 in q23, ist ca. 21kb lang und enthält 26 Exone^{38, 39, 40}. Rigat et al. stellten fest, dass eine 287 Basenpaare lange Sequenz

innerhalb des Intron 16 entweder anwesend (= „Insertion“, I-Allel) oder abwesend (= „Deletion“, D-Allel) sein kann. Drei Genotypen des ACE-Gens wurden definiert: II, DI und DD. Dieser Polymorphismus wurde für 47% der interindividuellen Schwankungen des ACE-Serumspiegels in der gesunden Bevölkerung verantwortlich gemacht²⁰. Personen mit dem DD-Genotyp wiesen durchschnittlich den doppelten ACE-Serumspiegel im Vergleich zum II-Genotypen auf. Heterozygote (DI-Genotyp) zeigten Werte im mittleren Bereich, was darauf hinweist, dass D- und I-Allel kodominant sind.

Laborbestimmung

Die Bestimmung des ACE I/D Polymorphismus erfolgte durch Amplifikation mittels PCR (Polymerase chain reaction - Polymerasekettenreaktion)⁴¹ eines 597 bp langen Fragmentes des ACE-Gens, das die beim D-Allel nicht vorhandenen 287 Basenpaare umfasste. Beim D-Allel war das Amplifikationsprodukt aus diesem Grunde nur 310bp statt wie beim I-Allel 597bp lang.

PCR-Protokoll

Der Reaktionsansatz für die Amplifikation einer Probe setzte sich wie folgt zusammen:

DNA: 15ng, Tris-HCL (pH 8,4): 20 mM, KCL: 50mM, MgCl₂: 1,5mM, dNTP-Mix (Mischung aus den Desoxynukleotidtriphosphaten dTTP, dCTP, dGPT und dATP (Roche Diagnostics, Mannheim)): 0,2 mM, Primer sense (5' GCC CTG CAG GTG TCT GCA GCA TGT 3'): 20mM, Primer antisense (5' GGA TGG CTC TCC CCG CCT TGT CTC 3' (MWG Biotech AG, Ebersberg): 20mM, Taq-Polymerase (thermostabile DNA-Polymerase, gewonnen aus *Thermus aquaticus* (Life Technologies, Karlsruhe)): 1,2 Units.

Die Polymerasekettenreaktion wurde in einem Thermocycler (Personal cycler, Biometra, Göttingen) wie folgt ausgeführt:

Zu Beginn wurden die DNA-Stränge für 5 min bei 94°C vordenaturiert. Es folgten 31 Zyklen, die jeweils aus einem 30 sec dauernden Denaturierungsschritt bei 94°C, einem Hybridisierungsschritt (Primeranlagerung) von 25 sec bei 64°C und dem 2 min dauernden Syntheseschritt (Polymerisierung) bei 70°C bestanden. Im letzten Zyklus wurde der Syntheseschritt um 7 min verlängert, um alle Stränge vollständig zu synthetisieren (Endamplifikation).

Gelelektrophorese

Die Produkte der Amplifikation wurden elektrophoretisch in 1,5%-Agarose-Gelen (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim) entsprechend ihrer Länge aufgetrennt und durch Zusatz von Ethidiumbromid (Roche Diagnostics, Mannheim, 0,05 µg/ml pro Gel), einem Fluoreszenzfarbstoff, und UV-Anregung sichtbar gemacht. Die PCR-Produkte wurden mit einem Ladepuffer aus Xylencyanol, Ficoll 400, Glycerin und TAE-Puffer (Tris 0,04 M, Essigsäure 0,04 M, EDTA 0,05 M pH 8.0) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 5V/cm in TAE-Puffer. Anschließend wurden die entstandenen Banden unter UV-Licht (312 nm, Herolab, Wiesloch) photographisch festgehalten. Die theoretisch erwartete Länge der amplifizierten Fragmente (I-Allel: 597 bp, D-Allel: 310 bp) wurde mit einem mitgeführten so genannten Längenstandard (DNA-Marker IX (Roche Diagnostics, Mannheim)) verglichen (Abb.1). Der Längenmarker zeigt in der Agarose-Gelelektrophorese ein typisches Muster mit zehn Banden, u.a. mit Banden bei 603 und 310 bp, die dem gesuchten Deletions-Allel mit 310 bp und dem Insertions-Allel mit 597 bp sehr nahe liegen.

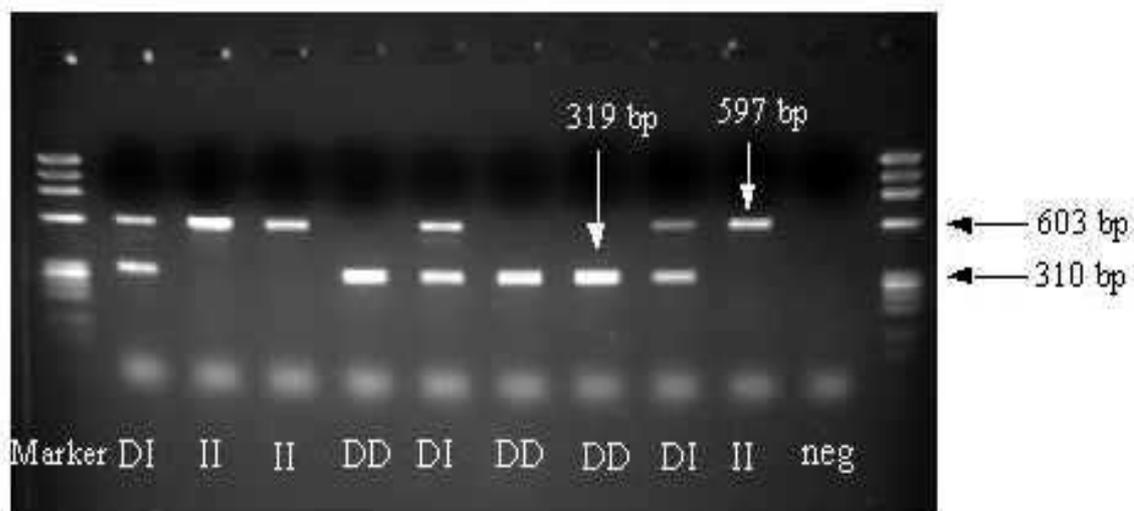


Abbildung 1 : Angiotensin I-Konversionsenzym-Gen I/D Polymorphismus: Darstellung der PCR-Produkte in der Elektrophorese, I-Allel bei 597 und D-Allel bei 310 Basenpaaren

II: Insertion/Insertion, DI: Deletion/Insertion, DD: Deletion/Deletion, M: Marker IX Fa. Roche, neg: Negativkontrolle

Durch einen den PCR-Proben vor dem Auftragen auf das Gel zugegebenen Blaumarker konnte die Wanderung der Probe im Gel optisch verfolgt werden – die

negativ geladenen Moleküle wandern in einem neutralen bis alkalischen Milieu zur Anode. Die Deletions- und Insertions-Allele unterscheiden sich durch unterschiedliche Laufgeschwindigkeiten in einem elektrischen Feld. Die Laufgeschwindigkeit hängt von der Größe der unterschiedlichen PCR-Produkte ab. Das aus 310 bp bestehende Deletions-Allel läuft im elektrischen Feld schneller als das aus 597 bp bestehende Insertions-Allel.

Durch Zugabe von Ethidiumbromid wurden die Banden unter UV-Licht durch Fluoreszenz sichtbar gemacht.

Insertionsspezifische PCR

Da in der oben beschriebenen PCR zur Bestimmung des ACE-I/D Genotyps oft die Amplifikation des I-Allels bei DI-Heterozygoten unterdrückt wird⁴² und diese deswegen fälschlicherweise als DD-Homozygote gedeutet werden, wurde für alle Proben mit einem DD-Ergebnis eine I(Insertions)-spezifische Kontroll-PCR durchgeführt.

PCR-Protokoll

Benutzt wurde ein PCR-Ansatz mit folgenden Reaktionskomponenten: DNA: 15ng, Tris-HCl(pH 8,4): 20 mM, KCl: 50 mM, MgCl₂: 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, Primer sense: 20 pM, Primer antisense: 20 pM, Taq-Polymerase 0,6 units. Die Insertionsspezifischen Primersequenzen lauteten: Sense: 5' TGG GAC CAC AGC GCC CGC CAC TAC 3', antisense: 5' TCG CCA GCC CTC CCA TGC CCA TAA 3' (MWG Biotech AG, Ebersberg).

Im Thermoblock wurden folgende Schritte für 33 Zyklen durchgeführt:

Vordenaturierung:	5 min bei 94°C
1. Schritt: Denaturierung:	30 sec bei 94°C
2. Schritt: Hybridisierung (Primeranlagerung):	25 sec bei 64°C
3. Schritt: Amplifikation (Polymerisierung):	2 min bei 72°C
Endamplifikation:	7 min bei 72°C

Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden mittels Elektrophorese in einem 1,5%igen Agarosegels aufgetrennt und sichtbar gemacht (Prozedere s.o.). Bei Vorhandensein mindestens

eines Insertions-Allels (ID-Heterozygote und II-Kontrollen) war eine Bande von 335 bp sichtbar. Bei den DD-Homozygoten war kein Amplifikationsprodukt sichtbar (Abb. 2).

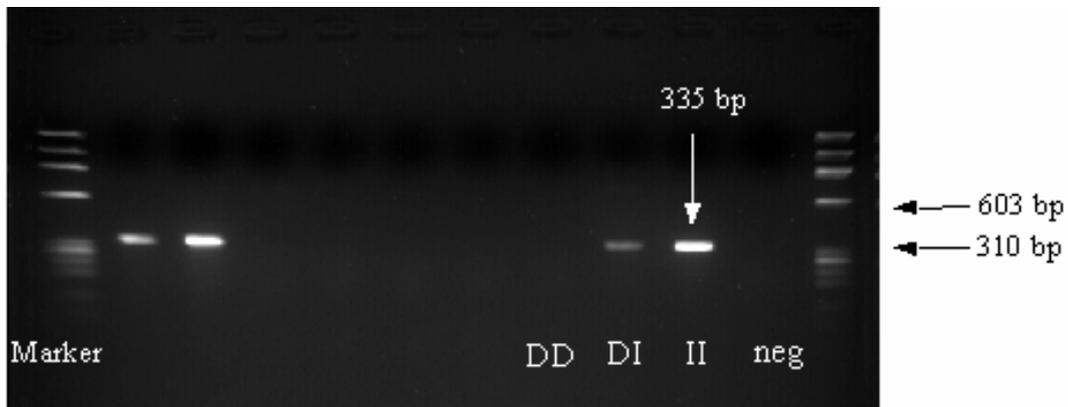


Abbildung 2: Angiotensin I-Konversionsenzym-Gen I/D-Polymorphismus: I-spezifische PCR zur Identifizierung von DI-Heterozygoten bei unterdrückter Amplifikation des I-Allels. Bei den zwei ersten Proben kommt bei 335 Basenpaaren ein I-Allel zum Vorschein, obwohl sie in der primären PCR als DD-Homozygote erschienen. Die vier letzten Proben sind Kontrollen.

II: Insertion/Insertion, DI: Deletion/Insertion, DD: Deletion/Deletion, M: Marker IX Fa. Roche, neg: Negativkontrolle

2.4.2.4. Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus

Angiotensinogen (AGT) ist ein aus 452 Aminosäuren bestehendes Glykoprotein⁴³. Das im peripheren Blut zirkulierende AGT wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert. AGT wird aber auch in anderen Geweben, zumindest im Rahmen lokaler Renin-Angiotensin-Systeme, exprimiert.

Renin spaltet aus dem karboxyterminalen Ende des AGT das Dekapeptid Angiotensin-I ab.

Das menschliche AGT-Gen befindet sich im Chromosom 1 in q42-43⁴⁴, ist 12000 bp lang und setzt sich aus 5 Exonen und 4 Intronen zusammen⁴⁵. Jeunemaitre et al. beschrieben 15 Polymorphismen des AGT-Gens innerhalb der 5 Exone und in der 5“flanking“ Region, stellten aber nur für den M235T Polymorphismus eine klinische Relevanz fest. Es handelt sich um eine Substitution von Thymin durch Cytosin am Kodon 702 im zweiten Exon. Diese Punktmutation führt bei der Translation zu einer

Änderung der Primärstruktur des produzierten Angiotensinogens: Bei der Aminosäure 235 wird Methionin (M) gegen Threonin (T) ausgetauscht.

Laborbestimmung

Zur Genotypisierung des AGT-M235T Polymorphismus wurde zuerst eine PCR durchgeführt, bei der eine 104 bp lange Sequenz des Angiotensinogen-Gens amplifiziert wurde. Das durch eine Elektrophorese dokumentierte PCR-Produkt wurde anschließend mit der Endonuklease MSP I versetzt. Durch die Punktmutation entstand beim T-Allel in Erkennungssequenz für dieses Restriktionsenzym, welches das 104 bp lange PCR-Produkt in zwei Teile (jeweils 73 bp und 31 bp lang) spaltete. Das Endergebnis wurde mit einer weiteren Gelelektrophorese dargestellt.

PCR Protokoll

Benutzt wurde ein PCR-Ansatz mit folgenden Reaktionspartnern:

Unverdünnte DNA: 0,1-0,5 µg

Tris-HCL (pH 8,4): 20 mM

KCL : 50 mM

MgCL₂: 1,5 mM

DMSO: 5% (Dimethyl Sulphoxid, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)

dNTP-Mix: 0,2 mM

Primer sense: 30pM

Primer antisense: 30 pM

Taq-Polymerase: 1,2 Units

Die benutzten Primersequenzen lauteten: Sense: 5' TGA CAG GAT GGA AGA CTG GCT GCT CCC TGC 3', antisense: 5' AGC AGA GAG GTT TGC CTT ACC TTG 3' (MWG Biotech AG, Elbersberg).

Folgendes PCR-Programm wurde für 30 Zyklen durchgeführt:

Vordenaturierung: 5 min bei 94°C

1. Schritt: Denaturierung: 1 min bei 94°C

2. Schritt: Hybridisierung (Primeranlagerung): 40 sec bei 63°C

3. Schritt: Amplifikation (Polymerisierung): 40 sec bei 72°C

Endamplifikation: 5 min bei 72°C

Gelelektrophorese

Zur Darstellung des PCR-Produktes wurde eine Elektrophorese mit 1,5% Agarose-Gelen (s. 2.4.2.3) durchgeführt. Zum Längenvergleich wurde ein 50 bp DNA-Marker (Life Technologies, Karlsruhe) eingesetzt.

Restriktion

Das PCR-Produkt wurde über Nacht (16h) mit der Restriktionsendonuklease MSP I (Promega, Mannheim; Erkennungssequenz: 5' C/CGG 3') bei 37°C inkubiert. Das Reaktionsgemisch setzte sich aus folgenden Materialien zusammen:

PCR-Produkt

Tris HCL (pH 7,5): 6 mM

NaCl : 50 mM

MgCl₂: 6 mM

DTT: 1 mM

BSA: 0,1 µg

MSP I: 12 Units

Gelelektrophorese

Da es sich um relativ kleine Fragmente handelte (vgl. ACE-Gen Polymorphismus 597 und 319 bp) wurde bei der Elektrophorese der Restriktionsprodukte ein dazu besser geeignetes 2,5% Metaphor-Agarose-Gel (BMA, Rockland, USA) mit TBE-Puffer (89 mM Tris-borate pH 8,3, 2 mM Na₂EDTA) verwendet. Zum Längenvergleich wurde ein 25 bp DNA-Marker (Life Technologies, Karlsruhe) benutzt. Beim MM-Genotyp war nur die ursprüngliche 104 bp Bande nachweisbar. Beim TT-Genotyp entstanden durch die Spaltung (Restriktion) des 104 bp PCR-Produktes zwei Banden, jeweils 73 und 31 bp lang. Bei den Heterozygoten (MT-Genotyp) wurden sowohl die ursprüngliche 104 bp Bande (M-Allel) als auch die Spaltprodukte (73 und 31 bp, T-Allel) nachgewiesen (Abb. 3).

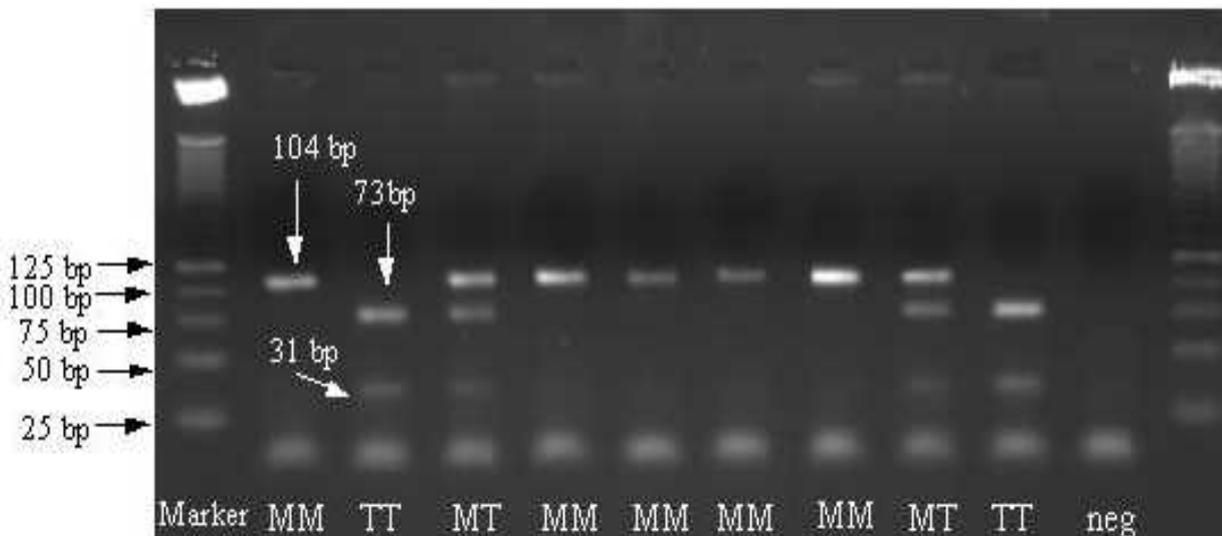


Abbildung 3: Angiotensin-Gen M235T Polymorphismus: Elektrophorese der PCR-Produkte nach der Restriktionsphase. Beim T-Allel wurde das 104 bp lange PCR-Produkt vom Restriktionsenzym in zwei Teile (73 und 31 bp) gespalten, daraus resultieren die entsprechenden zwei Banden. Beim MM-Genotyp wurde nur das PCR-Produkt nicht gespalten, es resultiert eine Bande bei 104 bp. Bei den Heterozygoten (MT-Genotyp) entsprechend Darstellung aller 3 Banden.

2.4.2.5. Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus

Angiotensin-II (Ang-II) ist ein Oktapeptid mit mehreren Funktionen: Vasokonstriktion, Steuerung der Aldosteronproduktion, Freisetzung von Noradrenalin, hypertrophische und hyperplastische Wirkung auf glatte Muskelzellen und Kardiomyozyten, Synthese von extrazellulärer Kollagenmatrix. Eine erste Klassifizierung der Ang-II Rezeptoren in Typ 1 und Typ 2 wurde 1989 mit Hilfe der ersten selektiven Ang-II-Rezeptorantagonisten gezeigt⁴⁶. Beim Erwachsenen werden die Wirkungen von Ang-II größtenteils über den Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor (AT₁R) ausgeübt. AT₁R wird in verschiedenen Zellarten exprimiert, unter anderem in den glatten Muskelzellen der Gefäße, in Kardiomyozyten und in den Nieren.

Das Gen, das für den aus 359 Aminosäuren bestehenden AT₁Rezeptor kodiert, befindet sich im Chromosom 3 in q21-q25^{47,48}. Es ist 5 kbp lang und enthält fünf Exone und vier Introne.

Beim A1166C Polymorphismus wird durch eine Punktmutation **A**denin durch **C**ytosin im Kodon 1166 in der 3' "untranslated" Region des fünften Exons ersetzt²⁶.

Laborbestimmung

Für die Bestimmung des AT₁R-Gen A1166C Polymorphismus wurde mittels PCR ein aus 856 bp bestehendes Fragment vervielfältigt. Das PCR-Produkt wurde anschließend mit der Endonuklease Dde I versetzt. In der amplifizierten Sequenz existierte bei allen Proben eine Erkennungssequenz für dieses Restriktionsenzym welches das PCR-Produkt zunächst in zwei Teile (601 und 255 bp) spaltete. Durch die Punktmutation entstand beim C-Allel eine zusätzliche Erkennungssequenz bzw. Schnittstelle, so dass die 255 bp Bande in weitere zwei Teile (143 und 112 bp) aufgetrennt wurde.

Die Restriktionsprodukte wurden wieder mittels Elektrophorese dargestellt.

PCR Protokoll

Das Reaktionsgemisch enthielt:

Unverdünnte DNA: 0,1-0,5 µg

Tris-HCL (pH 8,4): 20 mM

KCL: 50 mM

MgCl₂: 1,5 mM

dNTP-Mix: 0,2 mM

Primer sense: 40 pM

Primer antisense: 40 pM

Taq-Polymerase: 1,2 Units

Benutzt wurden folgende Primersequenzen : Sense: 5' AAT GCT TGT AGC CAA AGT CAC CT 3', antisense: 5' GGC TTT GCT TTG TCT TGT TG 3' (MWG Biotech AG, Ebersberg).

Im Thermocycler wurden folgende Schritte für 34 Zyklen durchgeführt:

Vordenaturierung: 5 min bei 94°C

1. Schritt: Denaturierung: 1 min bei 94°C

2. Schritt: Hybridisierung (Primeranlagerung): 1 min bei 60°C

3. Schritt: Amplifikation (Polymerisierung): 1 min bei 72°C

Endamplifikation:

7 min bei 72°C

Gelelektrophorese

Das 856 bp lange Amplifikationsprodukt wurde mit einer Elektrophorese in einem 1,5% Agarose-Gel dargestellt (Ladepuffer: Bromphenolblau, Ficoll 400, Glycerin, TAE-Puffer). Als Längenstandard wurden zwei DNA-Marker verwendet: 100 bp (Peglab-Biotechnologie, Erlangen) und IX (Roche Diagnostics, Mannheim).

Restriktion

Das PCR-Produkt wurde über Nacht (16h) bei 37°C mit der Restriktionsendonuklease Dde I (Promega, Mannheim, USA; Erkennungssequenz: 5' C/TNAG 3') inkubiert.

Für die Reaktion wurden eingesetzt:

PCR-Produkt

Tris-HCL (pH 7,9): 6 mM

NaCl : 0,15 mM

MgCl₂: 6mM

DTT: 1 mM

BSA: 0,1 µg

Dde I: 5 Units

Gelelektrophorese

Die Fragmente wurden in 2% Metaphor-Agarose-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt (Ladepuffer: Bromphenolblau, Ficoll 400, Glycerin, TBE-Puffer) und konnten durch Ethidiumbromidfärbung nachgewiesen werden. Zum Längenvergleich wurde ein 50 bp DNA-Marker (Life Technologies, Karlsruhe) verwendet.

Beim AA-Genotyp waren zwei Banden nachweisbar (601 und 255 bp).

Beim CC-Genotyp war die 255 bp Bande in zwei weitere kleinere Spaltprodukte geschnitten worden, es resultierten also drei Banden: 601, 143 und 112 bp.

Beim AC-Heterozygoten waren schließlich alle vier Banden erkennbar: 601, 255, 143 und 112bp (Abb.4).

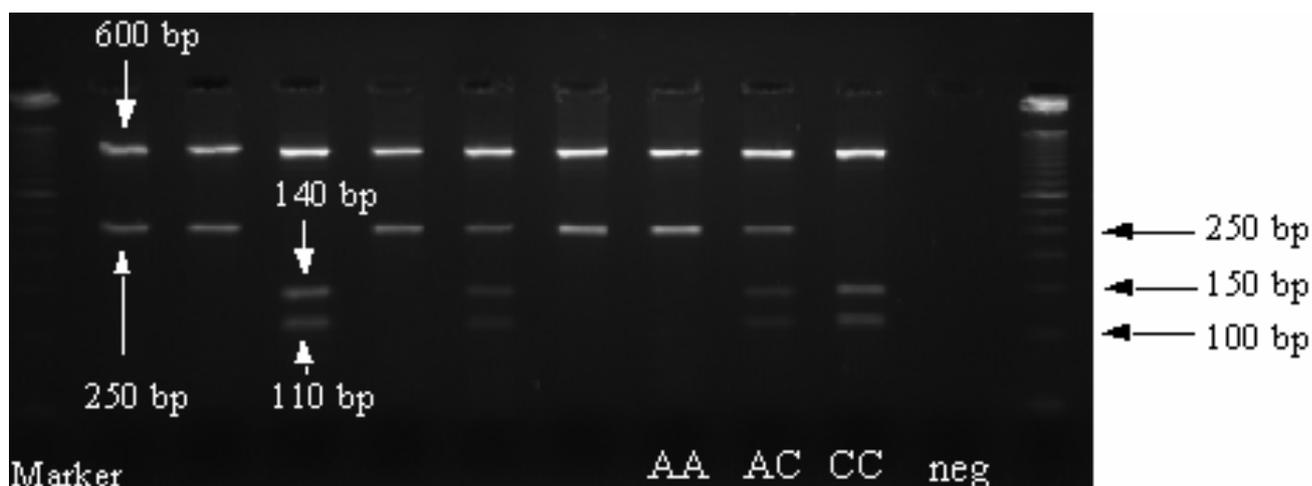


Abbildung 4: Angiotensin II-Typ 1-Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus: Elektrophorese der PCR-Produkte nach der Restriktionsphase. Beim C-Allel wurde die 255 bp Bande vom Restriktionsenzym in zwei kleinere (143 und 112 bp) geschnitten.

2.4.2.6. Qualitätssicherung

Die Elektrophoresefotos wurden von zwei Untersuchern bewertet. Bei unterschiedlicher Bewertung der Genotypisierung einer Probe wurde die Bestimmung wiederholt. In jeder PCR bzw. Restriktion liefen interne Kontrollen mit allen Allelkombinationen mit.

Um Kontaminationen zu verhindern wurden folgende Maßnahmen eingeleitet: Die Asservierung erfolgte mittels Vacutainersystem nach gründlicher Hautdesinfektion.

Während der Blutentnahme und der gesamten Aufarbeitung bestand Handschuhpflicht. Es gab je einen Arbeitsplatz für die DNA-Extraktion, DNA-Messung und Verdünnung, PCR und Elektrophorese. Für jeden Bereich standen separate Pipetten und Pipettenspitzen zur Verfügung. Benutzt wurden nur sterile Pipettenspitzen mit Filter (bis auf die bei der Elektrophorese benutzten; Biozym, Oldendorf). Um eine potentielle Kontamination frühzeitig zu erkennen wurde in jeder PCR bzw. Restriktion eine negative Kontrolle eingesetzt.

2.5. Statistik

Zur Datenverarbeitung und statistischen Analyse das Programm SPSS 11.5 (Statistical Package for Social Sciences, SPSS GmbH, München) verwendet. Die Daten wurden in Prozent oder Mittelwert \pm Standardabweichung (SA) angegeben.

Vergleiche nichtnumerischer Variablen wurden mit dem Chi-Quadrat-Test, Vergleiche zweier Gruppen mit kontinuierlichen Variablen mittels Studenten T-Test

berechnet. Der Mann-Whitney U-Test wurde für nicht normalverteilte Variablen benutzt.

Zuvor wurden kontinuierliche Variablen in jeder Gruppe auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test für eine Variable getestet.

Die Überlebenskurven wurden mit der Kaplan-Meier-Methode errechnet und durch den log-Rank-Test verglichen. Das approximierte relative Risiko (odds ratio) wurde mit einem 95% Konfidenzintervall kalkuliert. Der Einfluss kardiovaskulärer Risikofaktoren wurde mittels des Cox-Regressionsmodells als Multivarianzanalyse berücksichtigt.

Mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz wurden die Konstanz und das Gleichgewicht der Allele untersucht. Mit Hilfe des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes kann die Heterozygotenhäufigkeit errechnet werden, wenn die Zahl der Homozygoten bekannt ist.

Das Signifikanzniveau wurde bei allen Untersuchungen bei $p < 0,05$ festgelegt.

2.6. Ethische Aspekte

Das Studienprotokoll (Protokoll-Nr. 9772184) wurde der Ethikkommission der Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf zur Genehmigung vorgelegt. Alle Patienten wurden vorab über die Untersuchung detailliert aufgeklärt und erteilten ihr Einverständnis.

3. ERGEBNISSE

3.1. Charakteristika der Studienpopulation

3.1.1. Allgemeine Charakteristika der Studienpopulation

Die Gesamte Studienpopulation bestand aus $n=281$ kaukasischen Dialysepatienten. 194 dieser Pat waren männlich (69%), 87 (31%) weiblich. 81,5% der Patienten wurden hämodialysiert, 18,5% waren Peritonealdialysepatienten. Die mittlere Dialysezeit betrug 61 ± 44 Monate zum Ende des Beobachtungszeitraumes.

Bei den kardiovaskulären Risikofaktoren lag die arterielle Hypertonie mit einer Prävalenz von 93,2% vor, bei 22,8% der Patienten bestand ein Diabetes mellitus. Der Anteil der Raucher an der Studienpopulation betrug 33,8%.

Nahezu die Hälfte der Patienten (45.9%) wurde mit einem ACE-Hemmer oder einem AT1-Rezeptor Antagonisten behandelt, ca. ein Drittel (33,8) der Patienten mit einem Cholesterin-Synthese-Enzym Inhibitor (Tabelle 1).

Anzahl der Patienten (n)	281
Männer/Frauen (%)	69/31
Dialyseart: Hämodialyse/Peritonealdialyse (%)	81.5/18.5
Dialysezeit in Monaten (Mittelwert±SA)	61±44
Diabetes mellitus (%)	22.8
Arterielle Hypertonie (%)	93.2
ACE-Hemmer oder AT1-Rezeptor Antagonisten (%)	45.9
Cholesterin-Synthese-Enzym Inhibitoren (%)	33.8
Nikotinabusus (%)	33.8
Tabelle 1 : Charakteristika der Studienpopulation	

SA= Standardabweichung

3.1.2. Studienpopulation und koronare Herzkrankheit

Eine koronare Herzkrankheit (KHK) wurde angiographisch bei n=140 Patienten nachgewiesen und bei n=141 Patienten ausgeschlossen. Das mittlere Lebensalter zum Zeitpunkt der Koronarangiographie betrug 54,7±10,7 Jahre. Hierbei zeigte sich bei n=45 Patienten eine Ein-Gefäß-KHK, bei n=36 Patienten eine Zwei-Gefäß-KHK und bei n=59 Patienten eine Drei-Gefäß-KHK. Von diesen Patienten hatten n=38 Patienten bereits vor der Koronarangiographie einen Myokardinfarkt erlitten.

Die KHK wurde bei n=39 Patienten durch eine perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) mit oder ohne Stentimplantation behandelt, bei n=51 Patienten wurde eine aorto-koronare-Bypass (ACB) Operation durchgeführt. Der letzteren Gruppe wurden auch Patienten mit PTCA vor Bypassoperation zugeordnet. Bei den übrigen 50 Patienten mit nachgewiesener KHK erfolgte die Behandlung konservativ medikamentös.

Während des mittleren Nachbeobachtungszeitraumes von 35±29 Monaten nach der Koronarangiographie starben n=23 der 281 Patienten (8%), überwiegend aus kardiovaskulären Gründen (Myokardinfarkt, Herzinsuffizienz, maligne Herzrhythmusstörungen, plötzlicher Herztod, zerebrale Ischämie, intrazerebrale Blutung) sowie Infektionen und onkologische Erkrankungen (Tabelle 2).

Anzahl der Patienten (n)	281
Mittleres Alter bei Koronarangiographie (Mittelwert±SA, in Jahren)	54.7±10.7
Koronare Herzerkrankung (KHK) (n)	140
1-Gefäß-KHK (n)	45
2-Gefäß-KHK (n)	36
3-Gefäß-KHK (n)	59
Myokardinfarkt (n)	38
PTCA±Stent (n)	39
ACB (n) (mit PTCA vor ACB)	51
Tod (n)	23
Follow up nach Koronarangiographie (Monate)	35±29
Tabelle 2: Studienpopulation und KHK	

PTCA±Stent= Perkutane Koronarangioplastie mit oder ohne Stentimplantation,
ACB= Aorto-koronarer Bypass

3.1.3. Charakteristika der Patienten im Hinblick auf eine nachgewiesene bzw. ausgeschlossene KHK

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich Alter, Prävalenz einer arteriellen Hypertonie, Nikotinabusus, Cholesterin, HDL-Cholesterin und LDL-Cholesterin, C-reaktiven Protein (CRP), body mass index (BMI) und der Behandlung mit ACE-Hemmern/AT1-Rezeptor Antagonisten bei Patienten mit und ohne nachgewiesene KHK. In der Patientengruppe mit nachgewiesener KHK waren signifikant mehr Männer und Diabetiker. Außerdem wiesen die Patienten mit KHK signifikant längere Dialysezeiten zum Zeitpunkt der Koronarangiographie auf und zeigten zudem höhere Triglyzerid- und Fibrinogenspiegel. Darüber hinaus wurden die Patienten mit nachgewiesener KHK signifikant häufiger mit einem Cholesterin-Synthese-Enzym Inhibitor behandelt als Patienten ohne nachgewiesene KHK. Entsprechend lag die Todesrate bei den Patienten mit nachgewiesener KHK hochsignifikant über der Todesrate der Patienten ohne Nachweis einer KHK (14,3% vs. 2,1%, $p < 0,0001$) (Tabelle 3).

Parameter	KHK (n=140)	Ausschluß KHK (n=141)	p
Alter zum Zeitpunkt der Koronarangiographie (Jahre)	55±11	54±11	n.s. [†]
Männer/Frauen (%)	80.7/19.3	57.4/42.6	<0.001*
Arterielle Hypertonie (%)	95	91	n.s.*
Diabetes Mellitus (%)	30.1	16.8	<0.01*
Tod (%)	14.3	2.1	<0.0001*
Dialysezeit (in Monaten)	66±46	56±41	n.s. [†]
Dialysezeit zum Zeitpunkt der Koronarangiographie (in Monaten)	45±37	33±30	<0.05 [†]
Nikotinabusus (%)	38.6	29.1	n.s.*
Triglyzeride (mg/dl)	217±131	178±111	<0.01 [†]
Cholesterin (mg/dl)	215±56	204±53	n.s. [†]
LDL-Cholesterin (mg/dl)	136±47	130±48	n.s. [†]
HDL-Cholesterin (mg/dl)	45±17	48±21	n.s. [†]
CRP (mg/dl)	1.10±1.06	1.06±1.3	n.s. [†]
Fibrinogen (mg/dl)	461±141	406±118	<0.05 [†]
BMI (mg/dl)	25±3.7	24±3.7	n.s. [†]
Therapie mit ACE-Hemmer/AT1R-Antagonisten (%)	47.9	44	n.s. [†]
Therapie mit CSE-Hemmern (%)	47.1	20.6	<0.001*

Tabelle 3: Charakteristika der Population mit Nachweis bzw. Ausschluss einer KHK

BMI= body mass index, **ACE**= Angiotensin converting enzyme, **AT1R**= AT1-Rezeptor, **CSE**= Cholesterin-Synthese-Enzym, [†]Mann-Whitney-U-Test, *Chi-Quadrat Test, [†]Student T-Test

3.1.4. Charakteristika der Patienten im Hinblick auf die Mortalität

Bei den verstorbenen Patienten waren signifikant häufiger eine KHK ($p < 0,001$) und koronare Interventionen (PTCA±Stent und/oder ACB) als bei den lebenden Patienten nachzuweisen. Zudem waren bei der Gruppe der verstorbenen Patienten die Fibrinogenspiegel signifikant höher als bei der Gruppe der lebenden Patienten ($p < 0,01$). Dagegen zeigte sich kein Unterschied der beiden Gruppen im Hinblick auf CRP- und Triglyceridspiegel.

Die signifikante Häufung ($p < 0,01$) der Therapie mit CSE-Inhibitoren in der Gruppe der verstorbenen Patienten betont die Bedeutung der Risikofaktorkonstellation Cholesterin- und LDL-Erhöhung sowie HDL-Erniedrigung bei den Verstorbenen.

Eine Assoziation der Mortalität mit dem Geschlecht, mit erlittenem Myokardinfarkt und Nikotinabusus ließ sich mit den vorliegenden Zahlen nicht signifikant nachweisen (Tabelle 4).

Parameter	Verstorbene (n=23)	Lebende (n=258)	p
Mittleres Lebensalter zum Zeitpunkt der Koronarangiographie (Jahre)	57±6	54±11	n.s. ⁺
Männer/Frauen (%)	78.3/21.7	68.2/31.8	n.s.*
KHK (%)	87	46.5	<0.001*
Myokardinfarkt (%)	21.7	12.8	n.s.*
PTCA±Stent und/oder ACB (%)	56.5	29.8	<0.05*
Diabetes Mellitus (%)	13.0	23.6	n.s.*
Dialysezeit (Monate)	60±42	61±44	n.s. ⁺
Nikotinabusus (%)	50	35	n.s.*
Triglyceride (mg/dl)	196±135	199±122	n.s. ⁺
Cholesterin (mg/dl)	215±54	209±55	n.s. ⁺
LDL-Cholesterin (mg/dl)	142±42	132±48	n.s. ⁺
HDL-Cholesterin (mg/dl)	43±15	47±19	n.s. ⁺
CRP (mg/dl)	1.10±0.73	1.08±1.19	n.s. ⁺
Fibrinogen (mg/dl)	523±177	424±123	<0.01 ⁺
BMI (mg/dl)	23.5±3.3	24.8±3.7	n.s. ⁺
Therapie mit ACE-Hemmer/AT1R-Antagonisten (%)	60.9	49.8	n.s. ⁺
Therapie mit CSE-Hemmern (%)	65.2	34.8	<0.01*

Tabelle 4: Charakteristika verstorbener und lebender Patienten

PTCA±Stent= Perkutane Koronarangioplastie mit oder ohne Stentimplantation, **ACB**= Aorto-koronarer Bypass, **BMI**= body mass index, **ACE**= Angiotensin Konversionsenzym, **AT1R**= AT1-Rezeptor, **CSE**= Cholesterin-Synthese-Enzym, ⁺Mann-Whitney-U-Test, *Chi-Quadrat test

3.1.5. Verteilung der Genotypen des Angiotensin I-Konversionsenzym-Gen I/D Polymorphismus (ACE I/D), des Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus (AGT M235T) und des Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus (AT₁R A1166C) in der Patienten- und der Kontrollgruppe

Wie aus Tabelle 5 ersichtlich, unterschieden sich die Patienten- und die Kontrollgruppe im Hinblick auf die Verteilung der Genotypen nicht signifikant voneinander. Die Verteilung der Genotypen sowohl des ACE I/D Polymorphismus, des AGT M235T Polymorphismus als auch des AT₁R A1166C Polymorphismus war in beiden Gruppen vergleichbar.

	Genotypen	Patienten (n=281)	Kontrollgruppe (n=100)
ACE I/D	DD	72 (25.6%)	27 (27%)
	DI	131 (46.6%)	53 (53%)
	II	78 (27.8%)	20 (20%)
AGT M235T	MM	100 (35.6%)	33 (33%)
	MT	129 (45.9%)	51 (51%)
	TT	52 (18.5%)	16 (16%)
AT₁R A1166C	AA	136 (48.4%)	49 (49%)
	AC	115 (40.9%)	38 (38%)
	CC	30 (10.7%)	13 (13%)

Tabelle 5: ACE, AGT und AT1R Genotypenverteilung in der Patienten- und in der Kontrollgruppe

3.1.6. Genotypen des Angiotensin I-Konversionsenzym-Gen I/D Polymorphismus (ACE I/D) und Charakteristika der Patienten

Im nächsten Kapitel und Tabelle 6 sind die verschiedenen Genotypen des ACE I/D Polymorphismus (DD, DI und II) den Häufigkeiten bestimmter Charakteristika der untersuchten Patienten gegenübergestellt. Es zeigte sich weder ein signifikanter Unterschied im Hinblick auf Lebensalter, Geschlecht, Prävalenz eines Diabetes mellitus und einer arteriellen Hypertonie, Dialysezeit, Nikotinabusus, Triglyzerid-, Cholesterin-, LDL- und HDL-Spiegeln, CRP, Fibrinogen und BMI bei den verschiedenen Genotypen des ACE-Gen I/D Polymorphismus, noch konnte ein signifikanter Unterschied bei der Behandlung mit ACE-Hemmern/AT1R-Antagonisten nachgewiesen werden. Auch in der Therapie mit Cholesterin-Synthese-Enzym-Hemmern fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Genotyp-Gruppen (Tabelle 6).

Parameter	DD (n=72)	DI (n=131)	II (n=78)	p^x
Alter zum Zeitpunkt der Koronarangiographie	56±10	54±11	54±11	n.s. ⁺
Männer/Frauen (%)	63.9/36.1	67.9/32.1	75.6/24.4	n.s.*
Diabetes Mellitus (%)	20.8	25.2	20.5	n.s.*
Arterielle Hypertonie	94.4	93.1	92.3	n.s.*
Dialysezeit (Monate)	58±42	62±44	61±46	n.s. ⁺
Nikotinabusus (%)	29.9	36.6	40	n.s.*
Triglyzeride (mg/dl)	184±104	204±137	205±117	n.s. ⁺
Cholesterin (mg/dl)	213±54	203±52	217±58	n.s. ⁺
LDL-Cholesterin (mg/dl)	139±51	127±46	139±47	n.s. ⁺
HDL-Cholesterin (mg/dl)	44±15	47±21	46±16	n.s. ⁺
CRP (mg/dl)	1.15±1.41	1.02±1.07	1.10±1.03	n.s. ⁺
Fibrinogen (mg/dl)	416±106	439±138	446±148	n.s. ⁺
BMI (mg/dl)	24.6±3.7	24.8±3.6	24.5±3.73	n.s. ⁺
Therapie mit ACE-Hemmern/AT1R-Antagonisten (%)	51.5	50.9	50	n.s. ⁺
Therapie mit CSE-Hemmern (%)	36.8	37.9	37.7	n.s. ⁺

Tabelle 6: ACE I/D Polymorphismus und Charakteristika der Population

ACE = Angiotensin Konversionsenzym, **AT1R** = AT1-Rezeptor, **CSE**= Cholesterin-Synthese-Enzym, ⁺Mann-Whitney-U-Test, *Chi-Quadrat Test, ^xVergleiche jeweils DD vs. DI, DI vs. II und DD vs. II.

3.1.7. Genotypen des Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus (AGT M235T) und Charakteristika der Patienten

Im nächsten Abschnitt und Tabelle 7 sind die verschiedenen Genotypen des AGT M235T Polymorphismus (MM, MT und TT) den Häufigkeiten bestimmter Charakteristika der untersuchten Patienten gegenübergestellt. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Hinblick auf Lebensalter, Geschlecht, Prävalenz eines Diabetes mellitus und einer arteriellen Hypertonie, Dialysezeit, Nikotinabusus, Triglyzerid-, Cholesterin-, LDL- und HDL-Spiegeln, CRP, Fibrinogen und BMI bei den verschiedenen Genotypen des Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus, allerdings wurden Patienten mit dem MT- oder TT-Genotyp im Vergleich zum MM-Genotyp signifikant häufiger mit ACE-Hemmern oder AT1-Rezeptor-Antagonisten behandelt (MT 56% bzw. TT 60% vs. MM 39,8%, jeweils $p < 0,01$). Dies deutet auf unterschiedliche Ausprägung der arteriellen Hypertonie in diesen Gruppen hin. Bei der Therapie mit Cholesterin-Synthese-Enzym-Hemmern konnte kein Unterschied dargestellt werden (Tabelle 7).

Parameter	MM (n=100)	MT (n=129)	TT (n=52)	p^x
Alter zum Zeitpunkt der Koronarangiographie	54.1±10.5	55±11	54±11	n.s. ⁺
Männer/Frauen (%)	66/34	70.5/29.5	71.2/28.8	n.s.*
Diabetes Mellitus (%)	28	19.4	21.2	n.s.*
Arterielle Hypertonie	88	96.9	94.2	n.s.*
Dialysezeit (Monate)	60±41	61±45	60±46	n.s. ⁺
Nikotinabusus (%)	34	39.3	30.6	n.s.*
Triglyzeride (mg/dl)	214±145	185±98	203±128	n.s. ⁺
Cholesterin (mg/dl)	212±53	211±56	201±57	n.s. ⁺
LDL-Cholesterin (mg/dl)	134±45	139±51	121±45	n.s. ⁺
HDL-Cholesterin (mg/dl)	47±23	47±16	44±12	n.s. ⁺
CRP (mg/dl)	1.28±1.43	0.98±0.98	0.92±0.85	n.s. ⁺
Fibrinogen (mg/dl)	457±136	425±132	415±133	n.s. ⁺
BMI (mg/dl)	24.7±3.75	24.7±3.6	24.4±3.97	n.s. ⁺
Therapie mit ACE-Hemmer/AT1R-Antagonisten (%)	39.8	56	60	<0.01 ⁺ s. Text
Therapie mit CSE-Hemmern (%)	38.7	37.4	35.6	n.s. ⁺

Tabelle 7: AGT M235T Genotypen und Charakteristika der Patienten

ACE = Angiotensin Konversionsenzym, **AT1R** = AT1-Rezeptor, **CSE**= Cholesterin-Synthese-Enzym, ⁺Mann-Whitney-U-Test, *Chi-Quadrat Test, ^xVergleiche jeweils MM vs. MT, MT vs. TT und MM vs. TT.

3.1.8. Genotypen des Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus (AT₁R A1166C) und Charakteristika der Patienten

Im nächsten Kapitel und Tabelle 8 sind die verschiedenen Genotypen des AT₁R A1166C Polymorphismus (AA, AC und CC) den Häufigkeiten bestimmter Charakteristika der untersuchten Patienten gegenübergestellt. Wieder zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Hinblick auf Lebensalter, Geschlecht, Prävalenz eines Diabetes mellitus und einer arteriellen Hypertonie, Dialysezeit, Nikotinabusus, Triglyzerid-, Cholesterin-, LDL- und HDL-Spiegeln, CRP, Fibrinogen und BMI bei den verschiedenen Genotypen des Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus. Auch fand sich kein Unterschied zwischen den einzelnen Genotypen bezüglich der Therapie mit ACE-Hemmern und AT₁-Rezeptor-Antagonisten. Patienten mit einem AA- oder AC-Genotyp wurden jedoch signifikant häufiger mit Cholesterin-Synthese-Enzym-Hemmern behandelt als Patienten mit dem CC-Genotyp (AA 43% bzw. AC 36,9% vs. CC 17,2%, jeweils p<0,05) Dies kann als Hinweis auf eine bestehende Cholesterinerhöhung gedeutet werden (Tabelle 8).

Parameter	AA (n=136)	AC (n=115)	CC (n=30)	p^x
Alter zum Zeitpunkt der Koronarangiographie	53±12	55±10	58±7	n.s. ⁺
Männer/Frauen (%)	69.1/30.9	69.6/30.4	66.7/33.3	n.s.*
Diabetes Mellitus (%)	22.8	23.5	20	n.s.*
Arterielle Hypertonie	94.9	90.4	94.9	n.s.*
Dialysezeit (Monate)	60±46	59±41	70±44	n.s. ⁺
Nikotinabusus (%)	34	39.3	30.6	n.s.*
Triglyzeride (mg/dl)	203±129	192±107	205±153	n.s. ⁺
Cholesterin (mg/dl)	210±54	207±55	219±60	n.s. ⁺
LDL-Cholesterin (mg/dl)	134±50	133±44	135±52	n.s. ⁺
HDL-Cholesterin (mg/dl)	49±21	43±15	44±16	n.s. ⁺
CRP (mg/dl)	1.28±1.32	0.82±0.79	1.15±1.36	n.s. ⁺
Fibrinogen (mg/dl)	437±143	436±132	430±99	n.s. ⁺
BMI (mg/dl)	24.55±3.59	25.2±3.9	23±2.96	n.s. ⁺
Therapie mit ACE-Hemmern/AT ₁ R-Antagonisten (%)	54.9	48.5	41.4	n.s. ⁺
Therapie mit CSE-Hemmern (%)	43	36.9	17.2	<0.05 ⁺ s. Text

Tabelle 8: AT₁R A1166C Genotypen and Charakteristika der Patienten

ACE = Angiotensin Konversionsenzym, **AT₁R** = AT₁-Rezeptor, **CSE**= Cholesterin-Synthese-Enzym, ⁺Mann-Whitney-U-Test, *Chi-Quadrat Test, ^xVergleich jeweils AA vs. AC, AC vs. CC, AA vs. CC.

3.1.9. Verteilung der Genotypen des ACE I/D Polymorphismus in Relation zu nachgewiesener KHK, Koronarintervention/Revaskularisation, Myokardinfarkt und Tod

Im folgenden Abschnitt sind die Genotypen des ACE I/D Polymorphismus (DD, DI und II) zu nachgewiesener KHK, den invasiven Therapieformen, erlittenem Myokardinfarkt und Tod in Beziehung gesetzt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied bei der Verteilung der ACE I/D Genotypen zwischen Patienten mit nachgewiesener und ausgeschlossener KHK. Auch im Ausprägungsgrad der KHK (0-1- vs. 2-3-Gefäß KHK) bestand kein signifikanter Unterschied im Hinblick auf die Genotypenverteilung des ACE I/D-Polymorphismus. Des Weiteren konnte kein signifikanter Unterschied beim Vergleich zwischen Patienten mit durchgeführter Koronarrevaskularisation (PTCA±Stentimplantation und oder aotokoronarer Bypass) und Patienten ohne die Notwendigkeit einer solchen Revaskularisationsmaßnahme bei der Genotypenverteilung dargestellt werden. Auch ein erlittener Myokardinfarkt war nicht mit der Genotypenverteilung des ACE I/D-Polymorphismus assoziiert.

Im Gegensatz dazu zeigte sich eine signifikante Assoziation der Mortalität zum II-Genotyp (II:52,2% vs. DD:13% vs. DI:34,8%; $p < 0,05$, Tabelle 6).

	DD	DI	II	p ⁺
KHK	22,9	47,9	29,3	
vs. keine KHK (%)	28,4	45,4	26,2	n.s.
0-1-Gefäß KHK	24,7	48,9	26,3	
vs. 2-3 –Gefäß KHK (%)	27,4	42,1	30,5	n.s.
PTCA±Stent und/oder ACB	26,7	46,7	26,7	
vs. keine Revaskularisation (%)	25,1	46,6	28,3	n.s.
Keine Revaskularisation/PTCA±Stent	24,8	48,7	26,5	
vs. ACB (%)	29,4	37,3	33,3	n.s.
Myokardinfarkt	34,2	47,4	18,4	
vs. kein Myokardinfarkt (%)	24,3	46,5	29,2	n.s.
Tod	13	34,8	52,2	
vs. lebend (%)	26,7	47,7	25,6	<0.05

Tabelle 9: Verteilung der Genotypen des ACE I/D Polymorphismus in Relation zu nachgewiesener KHK, Koronarintervention/Revaskularisation, Myokardinfarkt und Tod

⁺Chi quadrat test

3.1.10. Verteilung der Genotypen des ACE I/D Polymorphismus in Relation zu KHK, Koronarrevaskularisation/Intervention, Myokardinfarkt und Tod bei allen Patienten und in Untergruppen

In diesem Abschnitt werden die einzelnen Untergruppen genauer dargestellt. Wie bereits oben beschrieben, ist der der Angiotensin I-Konversionsenzym (ACE)-Gen I/D Polymorphismus nicht mit dem Auftreten einer KHK bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz assoziiert. Auch im Hinblick auf den Ausprägungsgrad der KHK, erlittenen Myokardinfarkt und Revaskularisation zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen des ACE I/D Polymorphismus.

Betrachtet man hier allerdings die Untergruppen der Raucher und Männer, so weisen die Ergebnisse auf einen Zusammenhang zwischen dem DD-Genotyp und dem Auftreten von Myokardinfarkten bei Männern ($p < 0,01$) und Rauchern ($p < 0,05$) hin.

Die Mortalität war, wie unter 3.1.9. erwähnt, in unserer Population signifikant mit dem II-Genotyp assoziiert ($p < 0,05$). Diese Assoziation war in den Untergruppen Männer, Diabetiker und Patienten mit einem Lebensalter von 55 Jahren und älter sogar noch deutlicher ausgeprägt (p jeweils $< 0,05$). Bei Frauen, Nicht-Diabetikern und Patienten mit einem Lebensalter von unter 55 Jahren konnte kein Zusammenhang zwischen dem ACE I/D Polymorphismus und der Mortalität nachgewiesen werden.

(Tabelle 10: Alle Patienten. Tabelle 10a: Untergruppen)

	DD	DI	II	p^+
Alle Patienten				
KHK	22,9	47,9	29,3	
vs. keine KHK (%)	28,4	45,4	26,2	n.s.
Alle Patienten				
0-1 Gefäß-KHK	24,7	48,9	26,3	
vs. 2-3 Gefäß-KHK	27,4	42,1	30,5	n.s.
Alle Patienten				
Revaskularisation (PTCA±Stent/ACB)	26,7	46,7	26,7	
vs. keine Revaskularisation (%)	25,1	46,6	28,3	n.s.
Alle Patienten				
Keine Revaskularisation/PTCA±Stent	24,8	48,7	26,5	
vs. ACB (%)	29,4	37,3	33,3	n.s.
Alle Patienten				
MI	34,2	47,4	18,4	
vs. kein MI (%)	24,3	46,5	29,2	n.s.
Alle Patienten				
Tod	13	34,8	52,2	
vs. lebend (%)	26,7	47,7	25,6	<0.05

Tabelle 10: Verteilung der Genotypen des ACE I/D Polymorphismus in Relation zu KHK, Koronarrevaskularisation/Intervention, Myokardinfarkt und Tod bei allen Patienten

	DD	DI	II	p ⁺
Männer				
MI	37,1	48,6	14,3	
vs. kein MI (%)	20,8	45,3	34	<0.01
Frauen				
MI	0	33,3	66,7	
vs. kein MI (%)	31	48,8	20,2	n.s.
Rauchen				
MI	42,9	42,9	14,2	
vs. kein MI (%)	17,3	48,1	34,6	<0.05
Alter ≥ 55 Jahre				
Tod	12,5	31,3	56,3	
vs. lebend (%)	29,9	47,4	22,6	<0.05
Alter < 55 Jahre				
Tod	14,3	42,9	42,9	
vs. lebend (%)	23,1	47,9	28,9	n.s.
Männer				
Tod	11,1	33,3	55,6	
vs. lebend (%)	25	47,2	27,8	<0.05
Frauen				
Tod	20	40	40	
vs. lebend (%)	30,5	48,8	20,7	n.s.
DM				
Tod	15	25	60	
vs. lebend (%)	27,4	47,2	25,4	<0.05
Raucher				
Tod	21,4	36,4	45,5	
vs. lebend (%)	18,2	48,8	29,8	n.s.

Tabelle 10a: Verteilung der Genotypen des ACE I/D Polymorphismus in Relation zu KHK, Koronarrevaskularisation/Intervention, Myokardinfarkt und Tod in Untergruppen

3.1.11. Verteilung der Genotypen des AGT M235T Polymorphismus in Relation zu nachgewiesener KHK, Koronarintervention/Revaskularisation, Myokardinfarkt und Tod

Beim AGT M235T Polymorphismus zeigte sich hinsichtlich der Genotypenverteilung (MM, MT und TT) keine signifikante Assoziation zu den analysierten Parametern: KHK, Ausprägung der KHK, Revaskularisationsmaßnahmen, Myokardinfarkt und Tod (Tabelle 11).

	MM	MT	TT	p⁺
KHK	38,6	40,7	20,7	
vs. keine KHK (%)	32,6	51,1	16,3	n.s.
0-1-Gefäß KHK	33,9	50	16,1	
vs. 2-3-Gefäß KHK	38,9	37,9	23,2	n.s.
PTCA±Stent und/oder ACB	36,7	42,2	21,1	
vs. keine Revaskularisation (%)	35,1	47,6	17,3	n.s.
Keine Revaskularisation/PTCA±Stent	34,3	47,4	18,3	
vs. ACB (%)	41,2	39,2	19,6	n.s.
Myokardinfarkt	31,6	47,4	21,1	
vs. kein Myokardinfarkt (%)	36,2	45,7	18,1	n.s.
Tod	39,1	46,1	18,6	
vs. lebend (%)	35,3	43,5	17,4	n.s.

Tabelle 11: Verteilung der Genotypen des AGT M235T Polymorphismus in Relation zu nachgewiesener KHK, Koronarintervention/Revaskularisation, Myokardinfarkt und Tod

⁺Chi Quadrat test

3.1.12. Verteilung der Genotypen des AT₁R A1166C Polymorphismus in Relation zu nachgewiesener KHK, Koronarintervention/Revaskularisation, Myokardinfarkt und Tod

Auch beim AT₁R A1166C Polymorphismus zeigte sich hinsichtlich der Genotypenverteilung (AA, AC und CC) ebenfalls keine signifikante Assoziation zu den analysierten Parametern: KHK, Ausprägung der KHK, Revaskularisationsmaßnahmen, Myokardinfarkt und Tod (Tabelle 12).

	AA	AC	CC	p⁺
KHK	49,3	40	10,7	
vs. keine KHK (%)	47,5	41,8	10,6	n.s.
0-1-Gefäß KHK	46,2	43	10,8	
vs. 2-3-Gefäß KHK	52,6	36,8	10,5	n.s.
PTCA±Stent und/oder ACB	47,8	42,2	10	
vs. keine Revaskularisation (%)	48,7	40,3	11	n.s.
Keine Revaskularisation/PTCA±Stent	48,3	40,4	11,3	
vs. ACB (%)	49	43,1	7,8	n.s.
Myokardinfarkt	47,4	44,7	7,9	
vs. kein Myokardinfarkt (%)	48,6	40,3	11,1	n.s.
Tod	43,5	39,1	17,4	
vs. lebend (%)	48,8	41,1	10,1	n.s.

Tabelle 12: Verteilung der Genotypen des AT₁R A1166C Polymorphismus in Relation zu nachgewiesener KHK, Koronarintervention/Revaskularisation, Myokardinfarkt und Tod

⁺Chi Quadrat test

3.1.13. Zusammenfassung der Ergebnisse

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich Alter, Prävalenz einer arteriellen Hypertonie, Nikotinabusus, Cholesterin, HDL-Cholesterin und LDL-Cholesterin, C-reaktiven Protein (CRP), body mass index (BMI) und der Behandlung mit ACE-Hemmern/AT1-Rezeptor Antagonisten bei Patienten mit und ohne nachgewiesene KHK. In der Patientengruppe mit nachgewiesener KHK fanden sich signifikant häufiger Männer ($p < 0,001$) und Diabetiker ($p < 0,01$). Außerdem wiesen die Patienten mit KHK signifikant längere Dialysezeiten zum Zeitpunkt der Koronarangiographie auf und zeigten zudem höhere Triglyzerid- und Fibrinogenspiegel. Die Mortalität bei den Patienten mit nachgewiesener KHK lag deutlich über der Mortalität der Patienten ohne Nachweis einer KHK (14,3% vs. 2,1%, $p < 0,0001$).

Hinsichtlich der Verteilung der Genotypen des AGT M235T, des ACE I/D und des AT₁R A1166C Polymorphismus bei Patienten mit und ohne KHK konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen dargestellt werden.

Der ACE-DD-Genotyp war signifikant mit dem Auftreten von Myokardinfarkten (MI) bei Männern (MI=37.1%, kein MI=20.8%; $p < 0.05$) und Rauchern (MI=42.9%, kein MI=17.3%; $p < 0.05$) assoziiert.

Im Beobachtungszeitraum zeigte sich jedoch eine signifikant höhere Mortalitätsrate für den ACE-II-Genotypen im Vergleich zum DD/DI Genotyp ($p < 0.05$); dies trat sowohl bei Auswertung aller Patienten, als auch in der Untergruppe Männer, Diabetiker und der über 55jährigen auf. Eine ähnliche Assoziation zwischen Mortalität und den verschiedenen Genotypen des AGT M235T und des AT₁R A1166C Polymorphismus fand sich nicht.

4. DISKUSSION

Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz haben ein erhöhtes Risiko, eine Koronare Herzerkrankung zu entwickeln. Tödliche kardiale Ereignisse sind für ca. 40 – 50 % der Todesfälle bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz verantwortlich und stellen damit die häufigste Todesursache in dieser Patientengruppe dar. Im Vergleich zur Normalbevölkerung ist die kardiovaskuläre Mortalität bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz um das 10 – 15 fache erhöht^{1, 2, 3, 4}. Trotz erfolgreicher Behandlung der terminalen Niereninsuffizienz mit Dialyse und Transplantation stellen kardiovaskuläre Komplikationen die führende Todesursache in dieser Patientengruppe dar³.

Sowohl das Langzeitüberleben nach Myokardinfarkt als auch der Erfolg nach perkutaner Koronarintervention, sowie die perioperative Mortalität nach aorto-koronarer Bypassoperation stellen sich bei dialysepflichtigen Patienten ungünstiger dar, als bei Patienten ohne eine terminale Niereninsuffizienz.

Terminal niereninsuffiziente Patienten weisen eine hohe Prävalenz der bekannten kardiovaskulären Risikofaktoren auf, die zu einem exzessiv erhöhten KHK-Risiko beitragen, dieses jedoch nicht vollständig erklären. Neben den klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren spielt das Renin-Angiotensin-System eine wichtige Rolle in der Entstehung der koronaren Herzkrankheit.

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) ist als zentraler Modulator von Blutdruck und Volumenhomöostase bekannt. Schon früh wurde dem RAS eine pathophysiologische Rolle bei der Hypertonie und anderen kardiovaskulären Erkrankungen (z.B. Koronare Herzkrankheit, Arteriosklerose und kardiale Hypertrophie) zugeschrieben¹¹.

Hinsichtlich einer genetischen Disposition kommt dem Renin-Angiotensin-System eine wichtige Bedeutung zu. Für nahezu alle Komponenten des RAS wurden Genpolymorphismen beschrieben und untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde im Zusammenhang mit den in der Einleitung gestellten Fragen besonders auf den Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus (AGT M235T), den Angiotensin-Konversionsenzym (ACE)-Gen Insertion/Deletion (I/D) Polymorphismus und den

Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus (AT₁R A1166C) eingegangen.

Ziel dieser Studie war es, den Zusammenhang zwischen den drei wichtigsten genetischen Polymorphismen des Renin-Angiotensin-Systems und dem Auftreten einer koronaren Herzkrankheit und der durch diese hervorgerufene kardiovaskuläre Komplikationen und dem Überleben bei terminal niereninsuffizienten Patienten zu klären.

Grundlage hierfür sind verschiedene Studien, die eine zentrale Rolle des Renin-Angiotensin-Systems in der Pathophysiologie der Hochdruckentstehung sowie der Entwicklung von renalen und kardiovaskulären Erkrankungen beschreiben^{11, 49}. Weitere Daten zeigen einen Zusammenhang zwischen den genannten Polymorphismen des Renin-Angiotensin-Systems und klinischen Parametern wie Hypertonie, linksventrikuläre Hypertrophie, KHK und Myokardinfarkt.

4.1. Hauptresultate

Die Hauptresultate dieser Studie waren:

- 1.:** In der Patientengruppe mit koronarangiographisch nachgewiesener KHK zeigte sich, trotz Behandlung der klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren, eine deutlich erhöhte Mortalität im Vergleich zur Patientengruppe ohne nachgewiesene KHK.
- 2.:** Der Angiotensin I-Konversionsenzym (ACE)-Gen I/D Polymorphismus ist nicht mit dem Auftreten einer KHK bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz assoziiert. Dennoch weisen die Ergebnisse auf einen Zusammenhang zwischen dem DD-Genotyp und dem Auftreten von Myokardinfarkten bei Männern und Rauchern hin, sowie auf eine Assoziation zwischen dem II-Genotyp und der Mortalität in der Gruppe der Dialysepatienten und hier speziell in den Subgruppen der Diabetiker, der Männer und der Patienten mit einem Lebensalter von mehr als 55 Jahren .
- 3.:** Der Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus und der Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus waren weder mit dem Vorhandensein einer KHK noch mit dem Überleben bei den untersuchten Dialysepatienten assoziiert.

4.2. Angiotensin-Konversionsenzym (ACE)-Gen Insertion/Deletion (I/D) Polymorphismus

1992 wurde über eine Assoziation zwischen der Inzidenz von Myokardinfarkten und dem Vorhandensein des D-Allels des ACE I/D Polymorphismus in einer nierengesunden Studienpopulation berichtet.⁵⁰ Seit dieser Zeit ist der ACE I/D Polymorphismus extensiv bei verschiedenen Patientenkollektiven (diese waren hinsichtlich einer Niereninsuffizienz nicht vorselektiert) untersucht worden, die erhaltenen Resultate waren dabei allerdings widersprüchlich.

Möglicherweise können die widersprüchlichen Ergebnisse teilweise durch methodische Probleme dieser Studien erklärt werden: So waren die meisten dieser Studien retrospektiv angelegt, es könnten sich Probleme beim akkuraten „matching“ von Fällen und Kontrollen und zudem eine Schieflage (Bias) durch Überlebenseffekte ergeben haben. In der vorliegenden Studie wurde bei allen eingeschlossenen Patienten eine KHK koronarangiographisch nachgewiesen bzw. ausgeschlossen. Außerdem wurden patientenbasierte Kontrollen verwendet. Darüber hinaus wurden die Patienten prospektiv beobachtet. Zusätzlich war das Vorhandensein der klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren in der Gruppe mit nachgewiesener KHK und der Gruppe mit ausgeschlossener relevanter KHK vergleichbar, abgesehen von Diabetes mellitus, Geschlecht und Fibrinogen.

Das Problem des Mangels an prospektiven Studien adäquater Größe versuchten Staessen et al. 1997 durch eine Meta-Analyse (145 Berichte mit einem Gesamtumfang von 49959 Probanden) anzugehen. Darin wurde im Vergleich zum II-Genotyp beim DD-Genotyp ein 32% höheres Risiko für eine KHK und ein 45% höheres Risiko für einen Myokardinfarkt gefunden⁵¹.

In einer Studie von Ruiz et al. 1994 konnte der DD-Genotyp als unabhängiger Risikofaktor für eine KHK bei Patienten mit einem nicht-Insulin-abhängigen Diabetes mellitus dargestellt werden⁵², bei Insulin-abhängigem Diabetes mellitus zeigte sich dagegen der II-Genotyp als unabhängiger protektiver Faktor gegen KHK (Tarnow et al. 1995)⁵³.

Dagegen wurde von anderen Gruppen bei Dialysepatienten keine Assoziation zwischen dem ACE I/D Polymorphismus und der KHK gefunden (Losito et al. 2002,

Wang et al. 2003 und Aucella et al. 2003)^{54, 55, 56}. In diesen Studien war die KHK allerdings nicht bei allen Patienten angiographisch nachgewiesen worden.

In unserem koronarangiographisch untersuchten Patientekollektiv konnte der Einfluss des ACE-Gen I/D Genotyps als Risikofaktor für die Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit bei Dialysepatienten nicht nachgewiesen werden.

Dies steht in Einklang mit den Resultaten einiger Studien, die bei koronarangiographisch untersuchten, allerdings nicht bezüglich renalen Erkrankungen vorselektierten Studienpopulationen durchgeführt wurden (Jeunemaitre et al. 1997, Berge et al. 1997, Nakauchi et al. 1996, Winkelmann et al. 1996, Eichner et al. 2001, Pfohl et al. 1999, Rodriguez-Perez et al. 2001, Olivieri et al. 2002, Arca et al. 1998, Ferrieres et al. 1999)^{57, 58, 31, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65}. In einigen dieser Studien wurde auch die Kontrollgruppe koronarangiographisch untersucht (Winkelmann et al. 1996, Jeunemaitre et al. 1997, Eichner et al. 2001)^{59, 57, 60}. Darüber hinaus bestimmten einige Autoren auch noch das Ausmaß und den Schweregrad der koronaren Läsionen. Auch hierbei zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen Ausmaß und Schweregrad der KHK und dem ACE I/D Polymorphismus (Nair et al. 2003, Jeunemaitre et al. 1997, Eichner et al. 2001)^{66, 57, 60}. Ebenso korrelierte auch in dem Krankengut unserer Studie die Anzahl der stenosierten Koronararterien oder die Methode der Revaskularisierung nicht mit dem Genotyp des ACE I/D Polymorphismus.

Aucella et al. 2003 konnten in einer prospektiven Studie an Dialysepatienten keinen Zusammenhang zwischen dem ACE I/D Polymorphismus und der Gesamtmortalität sowie dem Auftreten tödlicher oder nicht-tödlicher Myokardinfarkte zeigen⁵⁶.

Obwohl das Auftreten von Myokardinfarkten in der Gesamtpopulation der hier vorliegenden Studie nicht signifikant mit dem ACE I/D Genotyp in Zusammenhang stand, konnte in den Untergruppen Männer und Raucher eine signifikante Assoziation zwischen dem Auftreten von Myokardinfarkten mit dem DD-Genotyp gezeigt werden.

Verschiedene Arbeiten berichteten über einen Zusammenhang des D-Allels mit dem Auftreten von Myokardinfarkten bei nicht im Hinblick auf eine Niereninsuffizienz vorselektierten Patientenkollektiven (Nakauchi et al. 1996, Fatini et al. 2000, Eichner et al. 2001, Bautista et al. 2004, Petrovic et al. 2004, Evans et al. 1994, Sobstyl et al. 2002)^{31, 30, 60, 67, 68, 69, 70}.

Diese Ergebnisse konnten allerdings in vielen anderen Studien nicht bestätigt werden (Fernandez-Arcas et al. 2001, Jeunemaitre et al. 1997, Winkelmann et al. 1996, Samani et al. 1996, Holmer et al. 2003, Arca et al. 1998, Ferrieres et al. 1999, Canavy et al. 2000)^{71, 57, 59, 72, 73, 64, 65, 74}. In die meisten der oben genannten Studien gingen Patienten ein, die einen Myokardinfarkt überlebt hatten. Sie enthielten daher möglicherweise eine „selection bias“. (Selektionsverschiebung).

Samani et. al. 1996⁷² evaluierten prospektiv die Myokardinfarktinzidenz im Zusammenhang mit den Genotypen des ACE I/D Polymorphismus und konnten dabei keine Assoziation finden. Evans et al.1994⁶⁹ untersuchten bei 213 Fällen tödlicher definitiver oder möglicher Myokardinfarkte, die im MONICA Projekt in Belfast durch Autopsie gesichert worden waren, die Frequenz der ACE I/D Polymorphismus Genotypen. Sie fanden bei diesen, der Autopsie zugeführten Fällen, eine Überrepräsentation des D-Allels im ACE I/D Polymorphismus bei definitiven und möglichen Myokardinfarkt. Evans et al. stellten daher die Hypothese auf, dass der ACE I/D Polymorphismus einen Risikofaktor für die Entwicklung eines tödlichen Myokardinfarktes bzw. den plötzlichen Herztod darstellt.

Übereinstimmend mit unseren Resultaten fanden auch Petrovic et al 2004⁶⁸ einen Unterschied bezüglich des Geschlechts beim Einfluss des DD-Genotypen auf das Myokardinfarkttrisiko: Bei Frauen konnte keine Assoziation zwischen dem DD-Genotyp und Myokardinfarkten gezeigt werden, wogegen bei Männern der DD-Genotyp mit einem zweifach erhöhtem unabhängigen Risiko für einen frühen Herzinfarkt einherging. Eine Assoziation des DD-Genotyps mit dem Auftreten von Myokardinfarkten bei Rauchern konnte in Übereinstimmung mit den Ergebnissen unserer Studie auch von Sobstyl et al. 2002 nachgewiesen werden⁷⁰. Darüber hinaus konnte ein Zusammenhang zwischen dem DD-Genotyp und endothelialen Dysfunktionen bei Normalpersonen nachgewiesen werden, mit einem verstärkten Effekt bei gleichzeitig vorliegenden Nikotinabusus (Buttler et al.1999)⁷⁵.

Im Gegensatz zu der in der vorliegenden Studie gefundenen Assoziation zwischen dem DD-Genotyp und dem Auftreten von Myokardinfarkten in den Untergruppen Raucher und Männer war die Mortalität in unserer Population im Trend mit dem II-Genotyp assoziiert. Diese Assoziation war in den Untergruppen Männer, Diabetiker und Patienten mit einem Lebensalter von 55 Jahren und älter sogar noch deutlicher ausgeprägt. Bei Frauen, Nicht-Diabetikern und Patienten mit einem Lebensalter von

unter 55 Jahren konnte kein Zusammenhang zwischen dem ACE I/D Polymorphismus und der Mortalität nachgewiesen werden. Die Patienten dieser Studie wurden zu einem großen Teil mit einem ACE-Hemmer bzw. einem AT₁-Antagonisten behandelt. Als mögliche Schlussfolgerung wäre ein geringerer protektiver Effekt dieser Substanzen beim II-Genotyp als beim DD-Genotyp denkbar.

Nach unserem Wissen gab es bisher noch keine Studie, in der eine Assoziation zwischen dem II-Genotyp und der Mortalität nachgewiesen werden konnte. Studien von Samani et al. 1996 und Filippi-Codacchioni et al. 2004 zeigen, dass die Mortalität nach Myokardinfarkt nicht mit dem ACE I/D Polymorphismus in Zusammenhang zu stehen scheint^{72, 76, 77}. Eine Erklärung, warum in unserer Population der II-Genotyp mit der Mortalität assoziiert ist, gibt es bisher nicht. Allerdings konnte bei einer selektierten Population japanischer Patienten eine Assoziation des DD-Genotyps mit einer signifikant niedrigeren kardialen Mortalität nach dem Erstereignis eines Myokardinfarktes während einer mittleren Verlaufsbeobachtung über 9,4 Monate gezeigt werden (Tokunaga et al. 2001)⁷⁸. Dies könnte erklären, warum der DD-Genotyp trotz höherer Infarktraten, wie in unseren Ergebnissen beschrieben, nicht unbedingt mit einer höheren Mortalität einherzugehen braucht. Einschränkend muss allerdings bemerkt werden, dass unsere Studienpopulation, die zwar sehr sorgfältig analysiert und untersucht wurde, im Vergleich zu den Populationen weiterer Studien kleiner war (Samani et al. 1996: n = 1221, Filippi-Codacchioni et al. 2004: n = 970).

Bei Dialysepatienten konnte kein Einfluss des ACE I/D Polymorphismus auf die Mortalität nachgewiesen werden (Aucella 2003, Higashiusato et al. 2002, Ishimitsu et al. 2000)^{56, 79, 80}, allerdings beschreiben Ishimitsu et al. 2000, dass das D-Allel bei Dialysepatienten möglicherweise einen Risikofaktor für kardiovaskuläre Komplikationen darstellt^{80, 81}. Bei Patienten mit einer Nierenarterienstenose konnten Losito et al. 2000 zeigen, dass der DD-Genotyp ein Risikofaktor für die Mortalität darstellt⁸².

Die nachfolgenden Tabelle 13 zeigt eine Übersicht der zitierten Literatur zum Angiotensin-Konversionsenzym (ACE)-Gen Insertion/Deletion (I/D) Polymorphismus und dessen Einfluss auf KHK, Myokardinfarktinzidenz und Mortalität.

Autor	Ausschließlich Patienten mit NI	Zielgruppe	Studiengröße	Ergebnisse/Zusammenhang
Cambien et al. 1992	Nein	MI/KHK	n = 1343	Assoziation DD-Genotyp mit MI
Staessen et al. 1997	Nein	KHK/MI	n = 49.959 (Metaanalyse)	Assoziation DD-Genotyp mit KHK und MI
Ruiz et al. 1994	Nein	KHK	n = 316	Assoziation D-Allel mit KHK bei Patienten mit NIDDM
Tarnow et al. 1995	Nein	KHK	n = 388	Assoziation II-Genotyp als protektiver Faktor gegen KHK bei Patienten mit IDDM
Losito et al. 2002	Ja	KHK	n = 329	Keine Assoziation des ACE-I/D Polymorphismus mit KHK
Wang et al. 2003	Ja	KHK	n = 429	Keine Assoziation des ACE-I/D Polymorphismus mit KHK
Aucella et al. 2003	Ja	MI	n = 1768	Keine Assoziation des ACE-I/D Polymorphismus mit MI/Mortalität
Jeunemaitre et al. 1997	Nein	KHK/MI	n = 463	Keine Assoziation des ACE-I/D Polymorphismus mit KHK/MI (Patienten koronarangiographiert)
Berge et al. 1997	Nein	MI	n = 619	Keine Assoziation des ACE-I/D Polymorphismus mit MI (Patienten koronarangiographiert)
Nakauchi et al. 1996	Nein	KHK/MI	n = 391	Keine Assoziation des ACE-I/D Polymorphismus mit KHK aber Assoziation DD-Genotyp mit MI (Patienten koronarangiographiert)
Winkelmann et al. 1996	Nein	KHK/MI	n = 301	Keine Assoziation des ACE-I/D Polymorphismus mit KHK/MI (Patienten koronarangiographiert)
Eichner et al. 2001	Nein	KHK/MI	n = 700	Keine Assoziation des ACE-I/D Polymorphismus mit KHK aber Assoziation D-Allel mit MI (Patienten koronarangiographiert)
Pfohl et al. 1999	Nein	KHK/MI	n = 1310	Keine Assoziation des ACE-I/D Polymorphismus mit KHK/MI (Patienten koronarangiographiert)
Rodriguez-Perez et al. 2001	Nein	KHK	n = 629	Keine Assoziation des ACE-I/D Polymorphismus mit KHK (Patienten koronarangiographiert)
Olivieri et al. 2002	Nein	KHK	n = 942	Keine Assoziation des ACE-I/D Polymorphismus mit KHK (Patienten koronarangiographiert)
Arca et al. 1998	Nein	KHK/MI	n = 394	Keine Assoziation des ACE-I/D Polymorphismus mit KHK/MI (Patienten koronarangiographiert)
Ferrieres et al. 1999	Nein	KHK/MI	n = 762	Keine Assoziation des ACE-I/D Polymorphismus mit KHK/MI (Patienten koronarangiographiert)

Fatini et al. 2000	Nein	KHK/MI	n = 411	Assoziation des ACE-I/D Polymorphismus mit KHK/MI
Bautista et al. 2004	Nein	MI	n = 202	Assoziation des ACE-I/D Polymorphismus mit MI
Petrovic et al. 2004	Nein	MI	n = 738	Assoziation des DD-Genotyps mit MI bei Männern
Evans et al. 1994	Nein	MI	n = 213	Assoziation des D-Allels mit MI
Sobstyl et al. 2002	Nein	MI	n = 314	Assoziation des DD-Genotyps mit MI bei Rauchern
Fernandez-Arcas et al. 2001	Nein	MI	n = 392	Keine Assoziation des ACE-I/D Polymorphismus mit MI
Samani et al. 1996	Nein	MI/Mortalität	n = 1221	Keine Assoziation des ACE-I/D Polymorphismus mit MI/Mortalität
Holmer et al. 2003	Nein	MI	n = 3700	Keine Assoziation des D-Allels mit MI
Canavy et al. 2000	Nein	MI	n = 408	Keine Assoziation des ACE-I/D Polymorphismus mit MI
Filippi-Codacchioni et al. 2004	Nein	Morbidität/Mortalität nach MI	n = 970	Kein Effekt des ACE I/D-Polymorphismus auf Mortalität nach MI
Tokunaga et al. 2001	Nein	Mortalität nach MI	n = 441	Assoziation DD-Genotyp mit niedrigerer kardialen Mortalität nach Myokardinfarkt
Higashiusato et al. 2002	Ja	Mortalität bei Dialysepatienten	n = 727	Keine Assoziation mit der Mortalität bei Dialysepatienten
Ishimitsu et al. 2000	Ja	Kardiovaskuläre Erkrankungen/Mortalität	n = 218	Keine Assoziation mit der Mortalität bei Dialysepatienten. Assoziation zu kardiovaskulären Erkrankungen

NI: Niereninsuffizienz; MI: Myokardinfarkt; KHK: Koronare Herzkrankheit; (N)IDDM: (Non-)Insulin-Dependent Diabetes Mellitus

Tabelle 13: Literaturübersicht zum Angiotensin-Konversionsenzym (ACE)-Gen Insertion/Deletion (I/D) Polymorphismus und dessen Einfluss auf KHK, Myokardinfarktinzidenz und Mortalität

4.3. Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus (AGT M235T)

Es existieren mehrere Studien, die die Relation des Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus (AGT M235T) zu KHK bzw. Myokardinfarkt untersucht haben. Einige dieser Studien konnten eine Assoziation des T-Allels oder des TT-Genotyps mit einer KHK (Katsuya et al. 1995, Winkelmann et al. 1999, Rodriguez-Perez et al. 2001)^{16, 18, 62} und Myokardinfarkt (Jeunemaitre et al. 1997, Fernandez-Arcas 2001)^{57, 71} in der Normalbevölkerung zeigen. Interessanterweise konnten Fernandez-Arcas et al. beobachten, dass die T-Allel-Frequenz bei Patienten mit Myokardinfarkt dann signifikant erhöht war, wenn gleichzeitig ein Hypertonus, eine Hypercholesterinämie

und Nikotinabusus als kardiovaskuläre Risikofaktoren bei den gleichen Patienten vorlagen. Im Gegensatz dazu war die Frequenz des M-Allels höher bei Patienten mit Myokardinfarkt, bei denen diese Risikofaktoren nicht vorlagen (Fernandez-Arcas 2001)⁷¹. Auch hier gibt es wieder Autoren, die keine Assoziation zwischen dem AGT M235T Polymorphismus und der KHK (Fatini et al. 2000, Sethi et al. 2003, Nair et al. 2003)^{30, 83, 66} oder Myokardinfarkt (Formicheva et al.2000)⁸⁴ darstellen konnten. In der letztgenannten Studie von Fomicheva et al. konnte allerdings festgestellt werden, dass bei Patienten mit Myokardinfarkt signifikant häufiger die Kombination des II-Genotyps des ACE I/D Polymorphismus mit dem TT-Genotyp des AGT M235T Polymorphismus vorlag, was möglicherweise auf einen synergistischen Effekt dieser beiden Polymorphismen schließen lässt⁸⁴. Auf eventuelle synergistische Effekte der hier untersuchten Polymorphismen soll jedoch später noch eingegangen werden.

Sethi et al. 2003 untersuchten in einer Meta-Analyse mit 45267 Individuen die Assoziation des Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus mit Plasma-Angiotensinogenspiegeln, Hypertonie, KHK und Myokardinfarkt in drei verschiedenen ethnischen Gruppen stratifiziert nach dem Geschlecht (Sethi et al 2003)⁸³. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass der M235T Genotyp bei weißen Individuen mit einer schrittweisen Erhöhung der Plasma-Angiotensinogenspiegel (T-Allel) assoziiert war (MT-Genotyp 5% und TT-Genotyp 11% höher verglichen mit dem MM-Genotyp). In gleicher Weise war der Genotyp des AGT M235T Polymorphismus mit dem Hypertonierisiko assoziiert, hier sowohl bei weißen als auch asiatischen Patienten. Es konnte aber weder bei weißen noch bei asiatischen Patienten eine Vorhersage des KHK-Risikos oder des Myokardinfarkt-Risikos mittels AGT M235T Polymorphismus erfolgen. Dies steht mit den Ergebnissen einer Meta-Analyse durch Staessen et al. 1999 in Einklang, in der sowohl asiatische als auch weiße Patienten eingeschlossen waren und in der keine Korrelation des AGT M235T Polymorphismus mit KHK bzw. arteriosklerotischen Komplikationen gefunden werden konnten (Staessen et al. 1999)⁸⁵.

Auch unsere Studie zeigte keine Korrelation zwischen KHK, Myokardinfarkt und Überleben und dem AGT M235T Polymorphismus. Dies lässt schließen, dass der M235T Polymorphismus keinen Einfluss auf KHK, Myokardinfarkt und Überleben bei chronisch dialysepflichtigen Patienten hat. Gleiches bestätigen auch Losito et al. 2002 und Wang et al.2003, die ebenfalls keine Assoziation zwischen dem M235T Polymorphismus und der KHK bei Dialysepatienten fanden^{54, 55}.

Die nachfolgenden Tabelle 14 zeigt eine Übersicht der zitierten Literatur zum Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus und dessen Einfluss auf KHK, Myokardinfarktinzidenz und Mortalität.

Autor	Ausschließlich Patienten mit NI	Zielgruppe	Studiengröße	Ergebniss/Zusammenhang
Katsuya et al. 1995	Nein	KHK	n = 828	Assoziation T-Allel mit KHK
Winkelmann et al. 1999	Nein	KHK	n = 301	Assoziation T-Allel mit KHK
Rodriguez-Perez et al. 2001	Nein	KHK	n = 629	Assoziation T-Allel mit KHK
Jeunemaitre et al. 1997	Nein	KHK/MI	n = 463	Assoziation T-Allel mit MI
Fernandez-Arcas 2001	Nein	MI	n = 392	Assoziation M-Allel mit MI. Assoziation T-Allel mit MI bei gleichzeitigem Vorliegen von RF
Fatini et al. 2000	Nein	KHK/MI	n = 414	Keine Assoziation des M235T Polymorphismus mit KHK
Sethi et al. 2003	Nein	KHK/MI	n = 45267 (Metaanalyse)	Keine Assoziation des M235T Polymorphismus mit KHK/MI
Nair et al. 2003	Nein	KHK	n = 431	Keine Assoziation des M235T Polymorphismus mit KHK
Formicheva et al. 2000	Nein	MI	n = 350	Keine Assoziation des M235T Polymorphismus mit MI
Staessen et al. 1999	Nein	KHK	n = 27.906 (Metaanalyse)	Keine Assoziation des M235T Polymorphismus mit KHK
Losito et al. 2002	Ja	KHK	n = 329	Keine Assoziation des M235T Polymorphismus mit KHK
Wang et al. 2003	Ja	KHK/LVH	n = 429	Keine Assoziation des M235T Polymorphismus mit KHK
NI: Niereninsuffizienz; MI: Myokardinfarkt; KHK: Koronare Herzkrankheit; RF: Risikofaktoren				

Tabelle 14: Literaturübersicht zum Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus und dessen Einfluss auf KHK, Myokardinfarktinzidenz und Mortalität

4.4. Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus (AT₁R A1166C)

In unserer Studie zeigte der AT₁R A1166C Polymorphismus keinerlei Einfluss auf das Risiko der Entwicklung einer KHK, eines Myokardinfarktes oder die Entwicklung der Mortalität bei terminal niereninsuffizienten Patienten. Auch die Analyse verschiedener Untergruppen brachte dabei keine anderen Resultate.

Diese Ergebnisse stehen teilweise im Widerspruch zu einigen vorangegangenen Arbeiten, die eine Assoziation zwischen dem AT₁R C-Allel sowohl mit der KHK als

auch dem Myokardinfarkt beschrieben (Nakauchi et al. 1996, Berge et al. 1997, Canavy et al. 2000, Jones et al. 2003)^{74, 58, 86, 31}. Berge et al fanden dabei heraus, dass der CC-Genotyp bei norwegischen Männern mit Myokardinfarkten, insbesondere in einer bezüglich BMI, Apolipoprotein B und lipidsenkender Medikation „Niedrig-Risiko“-Gruppe, korreliert. Andere Studien konnten diese Ergebnisse, in Einklang mit unserer Untersuchung, wiederum nicht bestätigen (Fernandez-Arcas et al. 2001, Jeunemaitre et al.1997, Kee et al. 2000, Hindorff et al. 2002, Losito et al. 2002)^{71, 57, 87, 88, 54}. Diese fehlende Assoziation war sowohl in prospektiven Studien (Hindorff et al. 2002)⁸⁸ als auch bei Dialysepatienten gezeigt worden (Losito et al. 2002)⁵⁴.

Die nachfolgenden Tabelle 15 zeigt eine Übersicht der zitierten Literatur zum Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus und dessen Einfluss auf KHK, Myokardinfarktinzidenz und Mortalität.

Autor	Ausschließlich Patienten mit NI	Zielgruppe	Studiengröße	Ergebniss/Zusammenhang
Nakauchi et al. 1996	Nein	KHK/MI	n = 391	Assoziation C-Allel mit KHK
Berge et al. 1997	Nein	MI	n = 619	Assoziation C-Allel mit MI
Canavy et al. 2000	Nein	MI	n = 408	Assoziation C-Allel mit MI
Fernandez-Arcas et al. 2001	Nein	MI	n = 392	Keine Assoziation C-Allel mit MI
Jeunemaitre et al.1997	Nein	KHK/MI	n = 463	Keine Assoziation C-Allel mit KHK/MI
Kee et al. 2000	Nein	MI	n = 1343	Keine Assoziation C-Allel mit MI
Hindorff et al. 2002,	Nein	KHK/MI	n = 2171	Keine Assoziation C-Allel mit KHK/MI
Losito et al. 2002	Ja	KHK	n = 329	Keine Assoziation C-Allel mit KHK/MI

NI: Niereninsuffizienz; MI: Myokardinfarkt; KHK: Koronare Herzkrankheit

Tabelle 15: Literaturübersicht zum Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus und dessen Einfluss auf KHK, Myokardinfarktinzidenz und Mortalität

4.5. Synergistische Effekte der Polymorphismen

Ein synergistischer Effekt des ACE I/D und des AT₁R A1166C Polymorphismus bzw. des ACE I/D und des AGT M235T Polymorphismus hinsichtlich des Myokardinfarkttrisikos (Tiret et al. 1994, Kamitani et al. 1995, Formicheva et al. 2000, Fatini et al. 2000)^{32, 89, 84, 30} und koronarer Herzkrankheit (Alvarez et al. 1998)⁹⁰ wurde von einigen Autoren vermutet, wobei diese Befunde von anderen Untersuchern wieder nicht bestätigt werden konnten (Gardemann et al. 1998)³⁴. Zudem fanden in den oben genannten Arbeiten Formicheva et al. 2000⁸⁴ dabei eine Assoziation des IITT-Genotyps des ACE I/D und des AGT M235T Polymorphismus mit Myokardinfarkten, dagegen zeigte sich in der Studie von Kamitani et al. 1995⁸⁹ bei den selben Polymorphismen eine Assoziation des DDTT-Genotyps mit dem Auftreten von Myokardinfarkten.

Auch in unserer Studie wurde in der kombinierten Analyse kein Hinweis auf einen synergistischen Effekt der drei Polymorphismen auf KHK, Myokardinfarkt oder Mortalität gefunden.

Die nachfolgenden Tabelle 16 zeigt eine Übersicht der zitierten Literatur zu den synergistischen Effekten der Polymorphismen.

Autor	Ausschließlich Patienten mit NI	Zielgruppe	Studiengröße	Ergebniss/Zusammenhang
Tiret et al. 1994	Nein	MI	n = 1336	Assoziation des DDCC-Genotyps mit MI (ACE I/D und AT1R A1166C Polymorphismus)
Kamitani et al. 1995	Nein	MI	n = 206	Assoziation des DDTT-Genotyps mit MI (ACE I/D und AGT M235T Polymorphismus)
Formicheva et al. 2000	Nein	MI	n = 350	Assoziation des IITT-Genotyps mit MI (ACE I/D und AGT M235T Polymorphismus)
Fatini et al. 2000	Nein	KHK/MI	n = 414	Assoziation des DDCC-Genotyps mit KHK und MI (ACE I/D und AT1R A1166C Polymorphismus)
Alvarez et al. 1998	Nein	KHK	n = 421	Assoziation des DDCC-Genotyps mit KHK (ACE I/D und AT1R A1166C Polymorphismus)
Gardemann et al. 1998	Nein	KHK/MI	n = 2244	Keine Interaktion von ACE I/D und AT1R A1166C Polymorphismus bei KHK und MI. Keine Assoziation der einzelnen Polymorphismen mit KHK und MI (Patienten koronarangiographiert)

NI: Niereninsuffizienz; MI: Myokardinfarkt; KHK: Koronare Herzkrankheit

Tabelle 16: Literaturübersicht zu den synergistischen Effekten der Polymorphismen

4.6. Weitere mögliche Einflussfaktoren

Zusammengefasst ergeben die Studien neuerer Zeit und unsere Ergebnisse divergierende Resultate über die Assoziation der Polymorphismen des Renin-Angiotensin-Systems (ACE I/D, Angiotensinogen-Gen M235T und AT₁R A1166C Polymorphismus) mit dem Auftreten spezifischer kardiovaskulärer Erkrankungen und der Mortalität.

Abgesehen von der inadäquaten Aussagekraft kleiner Studienkollektive, einer möglicherweise inkonstanten Populationsstruktur und eines unzureichenden Studiendesigns könnten zu den kontroversen Resultaten in vielen Studien verschiedene nichtgenomische und umweltbedingte Einflüsse, auf dem Weg vom Genotyp bis zur endgültigen phänotypisch/physiologischen Ausprägung, beigetragen haben.

Die Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen wie KHK und Myokardinfarkt ist letztlich, speziell bei terminal niereninsuffizienten Patienten, komplex und multifaktoriell. Bei dieser Gruppe terminal niereninsuffizienter Patienten könnten weitere Risikofaktoren die teilweise widersprüchlichen Ergebnisse zusätzlich beeinflussen. Darunter sind die Dialysetherapie selbst, metabolische und endokrine Faktoren, hämodynamische Besonderheiten, toxische Komplikationen und die primären renalen Erkrankungen als mögliche Einflussfaktoren auf die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen bei chronischer Niereninsuffizienz in erster Linie zu diskutieren. Darüber hinaus sind die meisten Dialysepatienten chronisch einer komplexen Stimulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems ausgesetzt (Doulton et al. 2004)⁹¹.

Ein nicht unerheblicher Anteil der Patienten unserer Studie wurde mit ACE-Hemmern oder AT₁-Rezeptor Antagonisten und/oder CSE-Inhibitoren behandelt. Auch dieser Faktor sollte in die Überlegung bezüglich eines Einflusses auf die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen mit eingehen. In den Arbeiten von Marian et al. 2000 und Niu et al. 2002 wurden jeweils Interaktionen zwischen dem ACE I/D Polymorphismus und dem Ansprechen auf eine ACE-Hemmer-Therapie bzw. eine Therapie mit Fluvastatin und den daraus resultierenden Effekten auf das kardiovaskuläre System bzw. den Progress der KHK beschrieben^{92, 93}.

Die funktionelle Signifikanz und die biochemischen Wege, durch die das Renin-Angiotensin System mit der Entwicklung von koronarer Herzkrankheit, Myokardinfarkten und der Mortalität interagiert, sind noch nicht vollständig geklärt. Nicht in allen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen dem ACE I/D bzw. dem Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus und den Angiotensinogen-, ACE- und Angiotensin II-Spiegeln gezeigt werden (Bloem et al. 1997, Katsuya et al. 1995, Danser et al. 1999, Winkelmann et al. 1996, Sethi et al. 2003, Winkelmann et al. 1999, Paillard et al. 1999)^{94, 16, 95, 59, 83, 18, 96}. Zudem wurde kein Effekt von Genotypen des AT₁R A1166C Polymorphismus auf die Zahl der Angiotensin II Bindungsstellen beim Angiotensin II-Typ 1 (AT₁) Rezeptor auf Thrombozyten gefunden (Paillard et al. 1999)⁹⁶. Einige der oben zitierten Autoren fanden zwar eine Assoziation des ACE I/D Polymorphismus bzw. des Angiotensinogen M235T Polymorphismus mit den ACE- bzw. den Angiotensinogenspiegeln, allerdings zeigte sich dabei keine Assoziation mit KHK oder Myokardinfarkt (Winkelmann et al. 1996, Sethi et al. 2003)^{59, 83}.

In die Betrachtung der Faktoren, die einen Effekt der untersuchten Polymorphismen des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems auf das Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen beeinflussen könnten, sollten deshalb weitere mit dem Renin-Angiotensin-Aldosteron System interagierende Faktoren einbezogen werden. Zu nennen wären hier beispielsweise die Fibrinolyse (Vaughan et al. 1997)⁹⁷, das Bradykinin und das Stickstoffmonoxyd (NO) System (Butler 1999)⁷⁵. Ein weiterer möglicher Grund für die Inkonsistenzen zwischen kardiovaskulären Krankheiten und den Genotypen der verschiedenen hier untersuchten Polymorphismen des Renin-Angiotensin Systems ist der variable Anteil des gewebegebundenen lokalen Renin-Angiotensin Systems, insbesondere im Bereich der Gefäßwände, und ob oder nicht ACE- und Angiotensin II-Bildung primär vom Renin-Angiotensin-System abhängig ist (Muller et al. 1998)⁹⁸.

Verschiedene Punkte limitieren unsere Studie. Die von uns untersuchte Patientenpopulation ist insofern selektiert, als sie sich überwiegend aus Dialysepatienten rekrutiert, die sich in der nephrologischen Abteilung der Universitätsklinik Düsseldorf zur Vorbereitung auf eine Nierentransplantation vorstellten. Diese Population repräsentiert möglicherweise nicht die Gesamtheit aller Dialysepatienten, weshalb ein entsprechender Einfluss durch diesen Selektionsfaktor und ein Einfluss auf das Überleben nicht sicher ausgeschlossen werden können.

Die verfügbare Probandenzahl der Studienpopulation und die Tatsache, dass der überwiegende Teil der Patienten mit ACE-Inhibitoren, AT₁-Rezeptor Antagonisten und Cholesterinsynthese-Enzym-Inhibitoren behandelt werden musste, stellen weitere Aspekte dar, die kritisch betrachtet werden sollten, wie dies ja bei der Untersuchung jeder multimorbiden Patientengruppierung zu geschehen hat .

5. ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSBETRACHTUNG

Zusammengefasst ergeben sich folgende Resultate unserer Studie:

1. Es besteht kein Hinweis darauf, dass der Angiotensin I-Konversionsenzym-Gen I/D Polymorphismus, der Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus und der Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus Risikofaktoren in klassischem Sinne für eine koronare Herzkrankheit bei terminal niereninsuffizienten Patienten darstellen.
2. Die drei Polymorphismen stehen ebenso weder mit dem Auftreten von Myokardinfarkten noch mit der Mortalität bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz in Zusammenhang.
3. Im Trend ist der ACE DD-Genotyp in unserem Patientenkollektiv bei den Subgruppen der Raucher und Männern mit Myokardinfarkten assoziiert. Außerdem scheint der ACE II-Genotyp mit einer erhöhten Mortalität bei den Subgruppen der Männern, Diabetiker und Patienten mit einem Lebensalter von 55 Jahren und älter, verbunden zu sein.

Um die Rolle der Polymorphismen des Renin-Angiotensin Systems weiter zu klären, scheinen zusätzliche größere klinische Studien nötig. Diese sollten einhergehen mit einer Klärung der molekularbiologischen Zusammenhänge auf dem Weg von den entsprechenden Genotypen bis zur Ausprägung der physiologisch effektiven Phänotypen der untersuchten Polymorphismen des Renin-Angiotensin Systems.

Wie bereits erwähnt ist die Pathogenese der KHK sowie das damit verbundene Auftreten von Myokardinfarkten und die resultierende Mortalität, insbesondere bei Patienten mit einer terminalen Niereninsuffizienz, multifaktoriell. Hierbei werden

genetische Einflüsse durch weitere Faktoren, wie zum Beispiel die klassischen Risikofaktoren, wesentlich überlagert. Vorstellbar ist, dass die bekannten Risikofaktoren das genetische Risiko modulieren.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die genetischen Einflüsse der drei untersuchten Polymorphismen des Renin-Angiotensin Systems auf die Entwicklung einer KHK bei terminal niereninsuffizienten Patienten im Vergleich zu den bekannten Risikofaktoren keine signifikante Rolle zu spielen scheinen. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen vieler der oben genannten Studien.

6. LITERATUR

- ¹ United States Renal Data System. Patient mortality and survival. *Am J Kidney Dis* 1997; 30: 86-106
- ² Brown JH, Hunt LP, Vites NP, Short CD, Gokal R, Mallick NP. Comparative mortality from cardiovascular disease in patients with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 1994;9:1136-1142
- ³ Raine AEG, Margreiter R, Brunner FP et al. Report on management of renal failure in Europe, XXII. *Nephrol Dial Transplant* 1992; 7 (Suppl. 2): 7-35
- ⁴ Leschke M. et al. Koronare Herzkrankheit bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz. *Dtsch. Med. Wschr.* 1997;122:976-982
- ⁵ Herzog CA, Ma JZ, Collins AJ. Poor long-term survival after acute myocardial infarction among patients on long-term dialysis. *N Engl J Med* 1998;339:799-805
- ⁶ Braun WE, Phillips D, Vidt DG et al. Coronary arteriography and coronary artery disease in 99 diabetic and nondiabetic patients on chronic hemodialysis or renal transplantation programs. *Transplant Proc* 1981; 13: 128-135
- ⁷ Sean W. Murphy, Patrick S. Parfrey. Screening for cardiovascular disease in dialysis patients. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension.* 1996;5:532-540
- ⁸ Goodman WG, Goldin J, Kuizon BD et al. Coronary-Artery Calcification In Young Adults With End-Stage Renal Disease Who Are Undergoing Dialysis. *N Engl J Med* 2000;342:1478-1483
- ⁹ Charles A. et al. Poor long-term survival after acute myocardial infarction among patients on long-term dialysis. *N Engl J Med* 1998;339:799-805
- ¹⁰ Griendling KK, Murphy TJ, Alexander RW. Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Circulation* 1993; 87: 1816-1828
- ¹¹ Paul M. Das Renin-Angiotensin-System als Grundlage für Hypertonie und koronare Herzkrankheit – Rolle genetischer Faktoren. *Z Kardiol.* 2000;89:264-268.
- ¹² Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevstev Y, Lifton R, Williaams C, Charru A, Hunt S, Hopkins S, Williams R, Laouel J, Corvol P. Molecular basis of human hypertension: The role of angiotensinogen. *Cell* 1992; 71: 169-180
- ¹³ Danser Jan A.H. et al. Angiotensinogen (M235T) and angiotensin-converting enzyme (I/D) polymorphisms in association with plasma renin and prorenin levels. *J-hypertens.* 1998 Dec; 16(12 Pt 2) :1879-83.
- ¹⁴ Corvol P. et al. Molecular genetics of the renin-angiotensin-aldosterone system in human hypertension. *Pathol Biol Paris* 1997;45:229-239.
- ¹⁵ Barley J. et al. Angitensinogen Met235-Thr Polymorphism in a London normotensive and hypertensive black and white Population. *J Hum Hypertens.* 1994;8:639-640.
- ¹⁶ Katsuya T, Koike G, Yee T, Sharpe N, Jaskson R, Norton R, Horiuchi M, Pratt R, Dzau V, MacMahon S. Association of angiotensinogen gene T235 variant with increased risk of coronary heart disease. *Lancet* 1995; 345: 1600-1603

- ¹⁷ Ishigami T, Umemura S, Iwamoto T, Tamura K, Hibi K, Yamaguchi S, Nyui N, Kimura K, Miyazaki N, Ishii M. Molecular variant of angiotensinogen gene is associated with coronary atherosclerosis. *Circulation* 1995; 91: 951-954.
- ¹⁸ Winkelmann BR, Russ AP, Nauck M, Klein B, Bohm BO, Maier V, Zoth R, Matheis G, Wolf A, Wieland H, Groß W, Galton D. Angiotensinogen M235T polymorphism is associated with plasma angiotensinogen and cardiovascular disease. *Am Heart J* 1999; 137: 698-705.
- ¹⁹ Kamitani A, Rakugi H, Higaki J, Ohishi M, Shi SJ, Takami S, Nakata Y, Higashino Y, Fujii K, Mikami H, Miki T, Ogihara T. Enhanced predictability of myocardial infarction in Japanese by combined genotype analysis. *Hypertension* 1995; 25: 950-953.
- ²⁰ Rigat B, Hubert C, 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
- ²¹ Schunkert H. Polymorphism of the angiotensinogen-converting Enzyme gene and cardiovascular disease. *J Mol Med.* 1997;75:867-875.
- ²² Osterop Arthur P.R.M. et al. AT₁ receptor A/C¹¹⁶⁶ Polymorphism contributes to cardiac hypertrophy in subjects with hypertrophic cardiomyopathy. *Hypertension.* 1998;32:825-830.
- ²³ Schunkert H. et al. Association between a deletion Polymorphism of the angiotensin-converting-enzyme gene and left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med.* 1994;330:1634-8
- ²⁴ Markus HS, Barley J, Lunt R, Bland JM, Jeffrey S, Carter ND, Brown MM. Angiotensin-converting enzyme gene deletion polymorphism: A new risk factor for lacunar stroke but not carotid atheroma. *Stroke* 1995; 26:1329-1333
- ²⁵ Kario K, Kanai N, Saito K, Nago N, Takefumi M, Shimada K. Ischemic stroke and the gene for angiotensin-converting enzyme in Japanese hypertensives. *Circulation* 1996; 93: 1630-1633
- ²⁶ Bonnardeaux A, Davies E, Jeunemaitre X, Fery I, Charru A, Clauser E, Tiret L, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. *Hypertension* 1994 ; 24 (1) :63-69
- ²⁷ van Geel P, Pinto Y, Voors A, Buikema H, Oosterga M, Crijns H, van Gilst W. Angiotensin II type 1 receptor A1166C gene polymorphism is associated with an increased response to angiotensin II in human arteries. *Hypertension* 2000; 35: 717-721
- ²⁸ Pailard F, Chansel D, Brand E, Benetos A, Thomas F, Czekalski S, Ardaillou R, Soubrier F. Genotype phenotype relationships of the RAS in a normal population. *Hypertension* 1999; 34: 423-429
- ²⁹ Miller JA, Thai K, Scholey JW. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism predicts response to losartan and angiotensin II. *Kidney Int* 1999; 56: 2173-2180
- ³⁰ Fatini C, Abbate R, Pepe G, Battaglini B, Gensin F, Ruggiano G, Gensini GF, Guazzelli R. Searching for a better assessment of the individual coronary risk profile. The role of angiotensin-converting enzyme, angiotensin II type 1 receptor and angiotensinogen polymorphisms. *Eur Heart* 2000; 21: 633-638

- ³¹ Nakauchi Y, Suehiro T, Yamamoto M, Yasuoka N, Ari K, Kumon Y, Hamashige N, Hashimoto K. Significance of angiotensin converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism as a risk factor for coronary heart disease. *Atherosclerosis* 1996 ; 125 : 161-169
- ³² Tiret L, Bonnardeaux A, Poirier O, Ricard S, Marques-Vidal P, Evans A, Arveiler D, Luc G, Kee F, Ducimetiere P, Soubrier F, Cambien F. Synergistic effects of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms on risk of myocardial infarction. *Lancet* 1994; 344(8927): 910-913
- ³³ Alvarez R, Reguero JR, Batalla A, Iglesias-Cubero G, Cortina A, Alvarey V, Coto E. Angiotensin-converting enzyme and angiotensin II receptor 1 polymorphisms: Association with early coronary disease. *Cardiovasc Res* 1998; 40: 375-379
- ³⁴ Gardemann A, Nguyen QD, Humme J, Stricker J, Katz N, Tillmanns H, Hehrlein FW, Rau M, Haberbosch W. Angiotensin II type 1 receptor A1166C gene polymorphism: Absence of an association with the risk of coronary artery disease and myocardial infarction and of a synergistic effect with angiotensin-converting enzyme gene polymorphism on the risk of these diseases. *Eur Heart J* 1998; 19: 1657-1665
- ³⁵ Brugada R. et al. Role of candidate modifier genes on the phenotypic expression of hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Invest Med.* 1997;45:542-551.
- ³⁶ Hamon M, Amant C, Bauters C, Richard J, Helbecque N, McFadden E, Lablanche J, Bertrand B, Amouyel P. Association of angiotensin converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor genotypes with left ventricular function and mass in patients with angiographically normal coronary arteries. *Heart* 1997; 77: 502-505
- ³⁷ Castellano M, Muiesan M, Beschi M, Rizzoni D, Cinelli A, Salvetti M, Pasini G, Porteri E, Bettoni G, Zulli R, Agabiti-Rosei E. Angiotensin II type 1 receptor A/C¹¹⁶⁶ polymorphism: Relationships with blood pressure and cardiovascular structure. *Hypertension* 1996; 28: 1076-1080
- ³⁸ Mattei MG, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Roeckel N, Corvol P, Soubrier F. Angiotensin I converting enzyme gene is on chromosome 17. *Cytogenet Cell Genet* 1989; 51: 1041
- ³⁹ Soubrier F, Alhenc-Gelas F, Hubert C, Allegrini J, John M, Tregear G, Corvol P. Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 9386-9390
- ⁴⁰ Hubert C, Houot AM, Corvol P, Soubrier F. Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. *J Biol Chem* 1991; 266: 15377-15383
- ⁴¹ Mullis KB, Fallona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155: 335-350
- ⁴² Shanmugam V, Sell K, Saha B. Mistyping ACE Heterozygotes. *PCR Methods and Applications* 1993; 3: 120-121
- ⁴³ Kageyama R, Ohkubo H, Nakanishi S. Primary structure of human preangiotensinogen deduced from the cloned cDNA sequence. *Biochemistry* 1984; 23: 3603-3609

- ⁴⁴ Isa MN, Boyd E, Morrison N, Harrap S, Clauser E, Connor JM. Assignment of the human angiotensinogen gene to chromosome band 1q42-43 by non-isotopic in situ hybridization. *Genomics* 1990; 8: 598-600
- ⁴⁵ Gailard I, Mattei MG, Clauser E, Corvol P. Structure of Human Angiotensinogen Gene. *DNA* 1989; 8: 87-99
- ⁴⁶ Chiu T, Herblin W, Mc Call D, Ardecky R, Carini D, Duncia J, Pease L, Wong P, Wexler R, Johnson A, Timmermanns P. Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Bioch Biophys Res Commun* 1989; 165: 196-203
- ⁴⁷ Curnow KM, Pascoe L, White PC. Genetic analysis of the human type-1 angiotensin II receptor. *Mol Endocrinol* 1992; 6: 113-118
- ⁴⁸ Szpirer C, Riviere M, Szpirer J, Levan G, Guo DF, Iwai N, Inagami T. Chromosomal assignment of human and rat hypertension candidate genes: type 1 angiotensin II receptor genes and A5 gene. *J Hypertens* 1993; 11: 919-925
- ⁴⁹ Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of Angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacological Reviews* 2001; 52: 11-34
- ⁵⁰ Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D, Luc G, Bard JM, Bara L, Ricard S, et al. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 1992; 359(6396):588-9
- ⁵¹ Staessen JA, Wang JG, Ginocchio G, Petrov V, et al. The deletion/insertion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and cardiovascular-renal risk. *J Hypertens* 1997; 15:1579-1592
- ⁵² Ruiz J, Blanche H, Cohen N, Velho G, Cambien F, Cohen D, Passa P, Froguel P. Insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting gene is strongly associated with coronary heart disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 3662-3665
- ⁵³ Tarnow L, Cambien F, Rossing P, Nielsen FS, Hansen BV, Lecerf L, Poirier O, Danilov S, Boelskifte S, Borch-Johansen K. Insertion/deletion polymorphism in the angiotensin-I-converting enzyme gene is associated with coronary heart disease in IDDM patients with diabetic nephropathy. *Diabetologia* 1995; 38(7): 798-803
- ⁵⁴ Losito A, Kalidas K, Santoni S, Ceccarelli L, Jeffery S. Polymorphism of renin-angiotensin system genes in dialysis patients – association with cerebrovascular disease. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17:2184 - 2188
- ⁵⁵ Wang AY, Chan JC, Wang M, Poon E, Lui SF, Li PK, Sanderson J. Cardiac hypertrophy and remodeling in relation to ACE and angiotensinogen genes genotypes in Chinese dialysis patients. *Kidney Int* 2003; 63(5): 1899 - 907
- ⁵⁶ Aucella F, Margaglione M, Vigilante M, Gatta G, Grandone E, Forcella M, Ktena M, Min A, Salatino G, Procaccini D, Stallone C. PAI-1 4G/5G and ACE I/D gene polymorphisms and the occurrence of myocardial infarction in patients on intermittent dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 1142 - 1146
- ⁵⁷ Jeunemaitre X, Ledru F, Battaglia S, Guillauneuf MT, Courbon D, Dumont C, Darmon O, Guize L, Gueronprez JL, Diebold B, Ducimetiere P. Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system and angiographic extent and severity of coronary artery disease: The CORGENE study. *Hum Genet.* 1997; 99(1): 66-73

- ⁵⁸ Berge KE, Bakken A, Bohn M, Erikssen J, Berg K. A DNA polymorphism at the angiotensin II type 1 receptor (AT1R) locus and myocardial infarction. *Clin Genet*. 1997; 52(2): 71-6
- ⁵⁹ Winkelmann BR, Nauck M, Klein B, Russ AP, Bohm BO, Siekmeier R, Ihnken K, Verho M, Gross W, Marz W. Deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with increased plasma angiotensin-converting enzyme activity but not with increased risk for myocardial infarction and coronary artery disease. *Ann Intern Med*. 1996;125(1):19-25
- ⁶⁰ Eichner JE, Christiansen VJ, Moore WE, Dunn ST, Schechter E. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in a cohort of coronary angiography patients. *Atherosclerosis* 2001; 154(3): 673-9
- ⁶¹ Pfohl M, Koch M, Prescod S, Haase KK, Haring HU, Karsch KR. Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism, coronary artery disease and myocardial infarction. An angiographically controlled study. *Eur Heart J*. 1999; 20(18): 1318-25
- ⁶² Rodriguez-Perez JC, Rodriguez-Esparragon F, Hernandez-Perera O, Anabitarte A, Losada A, Medina A, Hernandez E, Fiuza D, Avalos O, Yunis C, Ferrario CM. Association of angiotensinogen M235T and A(-6)G gene polymorphisms with coronary heart disease with independence of essential hypertension: the PROCAGENE study. *Prospective Cardiac Gene*. *J Am Coll Cardiol*. 2001; 37(6): 1536-42
- ⁶³ Olivieri O, Grazioli S, Pizzolo F, Stranieri C, Trabetti E, Beltrame F, Girelli D, Pignatti PF, Corrocher R. Different impact of deletion polymorphism of gene on the risk of renal and coronary artery disease. *J Hypertens*. 2002; 20(1):37-43
- ⁶⁴ Arca M, Pannitteri G, Campagna F, Candeloro A, Montali A, Cantini R, Seccareccia F, Campa PP, Marino B, Ricci G. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism is not associated with coronary atherosclerosis and myocardial infarction in a sample of Italian patients. *Eur J Clin Invest*. 1998; 28(6): 485-90
- ⁶⁵ Ferrieres J, Ruidavets JB, Fauvel J, Perret B, Taraszkiwicz D, Fourcade J, Nieto M, Chap H, Puel J. Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism in a low-risk European population for coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1999; 142(1): 211-6
- ⁶⁶ Nair KG, Shalia KK, Ashavaid TF, Dalal JJ. Coronary heart disease, hypertension and angiotensinogen gene variants in Indian population. *J Clin Lab Anal* 2003; 17(5): 141-6
- ⁶⁷ Bautista LE, Ardila ME, Gamarra G, Vargas CI, Arenas IA. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and risk of myocardial infarction in Colombia. *Med Sci Monit* 2004; 10(8): CR 473-9
- ⁶⁸ Petrovic D, Bregar D, Guzic-Salobir B, Skof E, Span M, Terzic R, Petrovic MG, Keber I, Letonja M, Zorc M, Podbregar M, Peterlin B. Sex difference in the effect of ACE-DD genotype on the risk of premature myocardial infarction. *Angiology* 2004; 55(2): 155-8
- ⁶⁹ Evans AE, Poirier O, Kee F, Lecerf L, McCrum E, Falconer T, Crane J, O'Rourke DF, Cambien F. Polymorphisms of the angiotensin-converting-enzyme gene in subjects who die from coronary heart disease. *Q J Med* 1994; 87(4): 211-4

- ⁷⁰ Sobstyl J, Dzida G, Puzniak A, Mosiewicz J, Hanzlik J. Angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism in Polish patients with myocardial infarction. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska* 2002; 57(2): 21-8
- ⁷¹ Fernandez-Arcas N, Dieguez-Lucena JL, Munoz-Moran E, Ruiz-Galdon M, Espinosa-Caliani S, Aranda-Lara P, Rius-Dias F, Gaitan-Arroyo MJ, De Teresa-Galvan E, Reyes-Engel A. Both alleles of the M235T polymorphism of the angiotensinogen gene can be a risk factor for myocardial infarction. *Clin Genet* 2001; 60(1): 50-7
- ⁷² Samani NJ, O'Toole L, Martin D, Rai H, Fletcher S, Lodwick D, Thompson JR, Morice AH, Channer K, Woods KL. Insertion/deletion polymorphism in the angiotensin-converting enzyme gene and risk of and prognosis after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28(2): 338-44
- ⁷³ Holmer SR, Bickeboller H, Hengstenberg C, Rohlmann F, Engel S, Lowel H, Mayer B, Erdmann J, Baier C, Klein G, Riegger GA, Schunkert H. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism and myocardial infarction a large association and linkage study. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35(6): 955-62
- ⁷⁴ Canavy I, Henry M, Morange PE, Tiret L, Poirier O, Ebagosti A, Bory M, Juhan-Vague I. Genetic polymorphisms and coronary artery disease in the south of france. *Thromb Haemost* 2000; 83(2): 212-6
- ⁷⁵ Butler R, Morris AD, Burchell B, Struthers AD. DD angiotensin-converting enzyme gene polymorphism is associated with endothelial dysfunction in normal humans. *Hypertension* 1999; 33(5): 1164-8
- ⁷⁶ Filippi-Codaccioni E, Denizet A, Fradin S, Grollier G, Morello R, Hamon M. Genetic polymorphism of the angiotensin I converting enzyme and morbi-mortality after myocardial infarction. *Arch Mal Coeur Vaiss* 2004; 97(1): 15-9
- ⁷⁷ Hamon M, Fradin S, Denizet A, Filippi-Codaccioni E, Grollier G, Morello R. Prospective evaluation of the effect of an angiotensin I converting enzyme gene polymorphism on the long term risk of major adverse cardiac events after percutaneous coronary intervention. *Heart* 2003; 89(3): 321-5
- ⁷⁸ Tokunaga S, Tsuji H, Nishiue T, Yamada K, Miasaka Y, Saitou D, Iwasaka T. Lower mortality in patients with the DD genotype of the angiotensin-converting enzyme gene after acute myocardial infarction. *Acta Cardiol* 2001; 56(6): 351-5
- ⁷⁹ Higashiesato Y, Tana T, Tozawa M, Iseki C, Iseki K, Fukiyama K, Takishita S. Angiotensin-converting enzyme (ACE) insertion/deletion polymorphism and survival in a cohort of chronic hemodialysis patients. *Clin Nephrol* 2002; 58(5): 370-5
- ⁸⁰ Ishimitsu T, Hosoya K, Matsuoka H. The deletion allele of angiotensin-converting enzyme gene polymorphism as a cardiovascular risk factor in patients undergoing long-term hemodialysis. *Ann Intern Med* 2000 133(11): 924
- ⁸¹ Ishimitsu T, Tsukada K, Ohta S, Inada H, Minami J, Ono H, Matsuoka H. Increased cardiovascular risk in long-term hemodialysis patients carrying deletion allele of ACE gene polymorphism. *Am J Kidney Dis* 2004; 44(3): 466-75
- ⁸² Losito A, Parente B, Cao BG, Jeffrey S, Afzal AR. ACE gene polymorphism and survival in atherosclerotic renovascular disease. *Am J Kidney Dis* 2000; 35(2): 211-5

- ⁸³ Sethi AA, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. Angiotensinogen gene polymorphism, plasma angiotensinogen, and risk of hypertension and ischemic heart disease: a meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23(7): 1269-75
- ⁸⁴ Fomicheva EV, Gukova SP, Larionova-Vasina VI, Kovalev YR, Schwartz EI. Gene-gene interaction in the RAS system in the predisposition to myocardial infarction in elder population of St. Petersburg (Russia). *Mol Genet Metab* 2000; 69(1): 76-80
- ⁸⁵ Staessen JA, Kuznetsova T, Wang JG, Emelianov D, Vlietinck R, Fagard R. M235T angiotensinogen gene polymorphism and cardiovascular renal risk. *J Hypertens* 1999; 17(1): 9-17
- ⁸⁶ Jones A, Dhamrait SS, Payne JR, Hawe E, Li P, Toor IS, Luong L, Wootton PT, Miller GJ, Humphries SE, Montgomery HE. Genetic variants of angiotensin II receptors and cardiovascular risk in hypertension. *Hypertension* 2003; 42(4): 500-6
- ⁸⁷ Kee F, Morrison C, Poirier O, McCrum E, Mallet C, Nicaud V, McMaster D, Dallongeville J, Fruchart JC, Evans AE. Angiotensin II type-I receptor and ACE polymorphisms and risk of myocardial infarction in men and women. *Eur J Clin Invest* 2000; 30(12): 1076-82
- ⁸⁸ Hindorff LA, Heckbert SR, Tracy R, Tang Z, Psaty BM, Edwards KL, Siscovick DS, Kronmal RA, Nazar-Stewart V. Angiotensin II type 1 receptor polymorphisms in the cardiovascular health study: relation to blood pressure, ethnicity, and cardiovascular events. *Am J Hypertens* 2002;15(12): 1050-6
- ⁸⁹ Kamitani A, Rakugi H, Higaki J, Ohishi M, Shi SJ, Takami S, Nakata Y, Higashino Y, Fujii K, Mikami H, et al. Enhanced predictability of myocardial infarction in Japanese by combined genotype analysis. *Hypertension* 1995; 25(5): 950-3
- ⁹⁰ Alvarez R, Reguero JR, Batalla A, Iglesias-Cubero G, Cortina A, Alvarez V, Coto E. Angiotensin-converting enzyme and angiotensin II receptor 1 polymorphisms: association with early coronary disease. *Cardiovasc Res* 1998; 40(2): 375-9
- ⁹¹ Doulton TW, MacGregor GA. Blood Pressure in haemodialysis patients: the importance of the relationship between the renin-angiotensin-aldosterone system, salt intake and extracellular volume. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2004; 5(1): 14-22
- ⁹² Niu T, Chen X, Xu X. Angiotensin converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and cardiovascular disease: therapeutic implications. *Drugs* 2002; 62(7): 977-93
- ⁹³ Marian AJ, Safavi F, Ferlic L, Dunn JK, Gotto AM, Ballantyne CM. Interactions between angiotensin-I converting enzyme insertion/deletion polymorphism and response of plasma lipids and coronary atherosclerosis to treatment with fluvastatin: the lipoprotein and coronary atherosclerosis study. *J Am Coll Cardiol*; 2000; 35(1): 89-96
- ⁹⁴ Bloem LJ, Foroud TM, Ambrosius WT, Hanna MP, Tewksbury DA, Pratt JH. Association of the angiotensinogen gene to serum angiotensinogen in blacks and whites. *Hypertension* 1997; 29(5): 1078-82
- ⁹⁵ Danser AH, Deinum J, Osterop AP, Admiraal PJ, Schalekamp MA. Angiotensin I to angiotensin II conversion in the human forearm and leg. Effect of the angiotensin converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism. *J Hypertension* 1999; 17 (12 Pt 2): 1867-72

⁹⁶ Paillard F, Chansel D, Brand E, Benetos A, Thomas F, Czekalski S, Ardaillou R, Soubrier F. Genotype-phenotype relationships for the renin-angiotensin-aldosterone system in a normal population. *Hypertension* 1999; 34(3): 423-9

⁹⁷ Vaughan DE. The renin-angiotensin system and fibrinolysis. *Am J Cardiol* 1997; 79(5A): 12-6

⁹⁸ Muller DN, Luft FC. The renin-angiotensin system in the vessel wall. *Basic Res Cardiol* 1998; 93 Suppl 2: 7-14

7. VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

ACB	Aorto-koronarer Bypass
ACE	Angiotensin I – Konversionsenzym
AGT	Angiotensinogen
Ang-I	Angiotensin I
Ang-II	Angiotensin II
AT ₁ R	Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor
CSE	Cholesterin – Synthese - Enzym
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
h	Stunde
I/D	Insertion/Deletion
Kb	Kilobasenpaare
KHK	Koronare Herzkrankheit
1-G-KHK	Ein-Gefäß-KHK
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
PCR	Polymerasekettenreaktion
RAS	Renin – Angiotensin – System
Rpm	Umdrehungen pro Minute
SD	Standardabweichung
SE	Standardfehler
UV	Ultraviolett

8. DANKSAGUNG

Ich bedanke mich herzlich bei Frau Prof. Dr. med. Katrin Ivens für die freundliche und hilfreiche Betreuung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Nicola Kuhr, Herrn Prof. Dr. med. Peter Heering, Herrn Dr. med. Sendogan Aker und Herrn Dr. med. Christos Bantis für ihre nette, hilfsbereite und engagierte Unterstützung.

Mein weiterer Dank für ihre Hilfe, Unterstützung und Motivation gilt Frau Katja Hilden und meiner Familie.

9. LEBENS LAUF

Persönliche Angaben

Name und Anschrift	Philip Reis Kirchfeldstr. 145 40215 Düsseldorf
Geboren am	11.10.1976 in Düsseldorf
Eltern	Prof. Dr. med. Hans Edgar und Gisela Reis
Nationalität	Deutsch
Konfession	Römisch-katholisch

Schulbildung

1983 – 1987	Gemeinschaftsgrundschule Windberg, Mönchengladbach
1987 – 1996	Stiftisch humanistisches Gymnasium, Mönchengladbach
06/1996	Schulabschluß: Abitur

Wehrdienst

09/1996 –06/1997	Frontnachrichtenbearbeiter Luftwaffe, Frontnachrichtenausbildungszentrum Luftwaffe, Köln-Wahn
------------------	--

Studium

10/1997	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
08/2000	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note: Gut (2,0)
03/2003	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note: Gut (2,0)
05/2004	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note: Sehr gut (1,0)

Praktisches Jahr

04/2003-08/2003	1. Terial: Frauenklinik, evangelisches Krankenhaus Düsseldorf
08/2003-11/2003	2. Terial: Innere Medizin, evangelisches Krankenhaus Düsseldorf
12/2003-03/2004	3. Terial: Chirurgische Klinik, Oberwalliser Kreisspital Brig, Schweiz

Beruflicher Werdegang

Seit 01.08.2004	Assistenzarzt der Medizinischen Klinik, Sanakrankenhaus Benrath, Düsseldorf
	Chefarzt: Prof. Dr. med. W.-D. Schoppe
April 2009	Zusatzbezeichnung Notfallmedizin

10. KURZFASSUNG

Einleitung: Das Renin-Angiotensin-System spielt eine wichtige Rolle in der Entstehung und Progression der Arteriosklerose und bei Nierenerkrankungen. In dieser Arbeit wurden drei Genpolymorphismen des Renin-Angiotensin-Systems, der Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus (AGT M235T), der Angiotensin-Konversionsenzym (ACE)-Gen Insertion/Deletion (I/D) Polymorphismus, der Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus (AT₁R A1166C) und deren Einfluss auf das Auftreten einer KHK und die Mortalität bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz untersucht.

Methoden: Bei 281 Patienten (194 Männer und 87 Frauen) mit terminaler Niereninsuffizienz wurde eine KHK koronarangiographisch nachgewiesen (n=140) oder ausgeschlossen (n=141) und der Verlauf über 35±29 Monate beobachtet. Bekannte kardiovaskuläre Risikofaktoren wie u.a. arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Hyperlipoproteinämie, Nikotinabusus, BMI und CRP wurden untersucht. Die Bestimmung der Genpolymorphismen erfolgte mittels Polymerasekettenreaktion (PCR).

Ergebnisse: Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich Alter, Prävalenz einer arteriellen Hypertonie, Nikotinabusus, Cholesterin, HDL-Cholesterin und LDL-Cholesterin, C-reaktiven Protein (CRP), body mass index (BMI) und der Behandlung mit ACE-Hemmern/AT₁-Rezeptor Antagonisten bei Patienten mit und ohne nachgewiesene KHK. In der Patientengruppe mit nachgewiesener KHK fanden sich signifikant häufiger Männer (p<0,001) und Diabetiker (p<0,01). Außerdem wiesen die Patienten mit KHK signifikant längere Dialysezeiten zum Zeitpunkt der Koronarangiographie auf und zeigten zudem höhere Triglyzerid- und Fibrinogenspiegel. Die Mortalität bei den Patienten mit nachgewiesener KHK lag deutlich über der Mortalität der Patienten ohne Nachweis einer KHK (14,3% vs. 2,1%, p<0,0001).

Hinsichtlich der Verteilung der Genotypen des AGT M235T, des ACE I/D und des AT₁R A1166C Polymorphismus bei Patienten mit und ohne KHK konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen dargestellt werden.

Der ACE-DD-Genotyp war signifikant mit dem Auftreten von Myokardinfarkten (MI) bei Männern (MI=37.1%, kein MI=20.8%; p<0.05) und Rauchern (MI=42.9%, kein MI=17.3%; p<0.05) assoziiert.

Im Beobachtungszeitraum zeigte sich im Trend eine höhere Mortalitätsrate für den ACE-II-Genotypen im Vergleich zum DD/DI Genotyp; dies trat sowohl bei Auswertung aller Patienten, als auch in der Untergruppe Männer, Diabetiker und der über 55jährigen auf. Eine ähnliche Assoziation zwischen Mortalität und den verschiedenen Genotypen des AGT M235T und des AT₁R A1166C Polymorphismus fand sich nicht.

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus, der Angiotensin-Konversionsenzym (ACE)-Gen Insertion/Deletion Polymorphismus und der Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus keinen signifikanten Einfluss auf das Auftreten einer KHK bei terminal niereninsuffizienten Patienten haben. Der ACE-DD-Genotyp steht mit dem Auftreten von Myokardinfarkten bei Rauchern und Männer in Zusammenhang. Außerdem weisen die Ergebnisse im Trend auf eine Assoziation zwischen ACE-II-Genotyp und Mortalität, speziell bei Männern, Diabetikern und über 55 Jahre alten Patienten, hin.

Letztlich scheint es, dass bei der multifaktoriellen Pathogenese der KHK, insbesondere bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz, genetische Einflüsse des Renin-Angiotensin Systems durch weitere Faktoren, wie zum Beispiel die klassischen Risikofaktoren, wesentlich überlagert werden.