Aus der 1. Medizinischen Klinik
des Universitätsklinikums Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. med. G. Baumann

Digitale Dissertation

Dissertation

PDF-Version

"DNA-Polymorphismus des endothelialen leukozytären Adhäsionsmoleküls bei Patienten älter als 50 Jahre mit interventionsbedürftigen Koronararterienstenosen"

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Herrn **Ralf Brachold**
geb. am **12.04.1970** in **Charkow**

Dekan: **Prof. Dr. med. M. Dietel**

Gutachter:
1. **Prof. Felix**
2. **Prof. Speer**
3. **Prof. Weber**

eingereicht: **16.01.1998**

Datum der Promotion: **27.10.98**

Einleitung

1.Pathogenese der Atherosklerose

Die Atherosklerose und ihre Folgen sind für ca. 50% der Todesfälle in den USA, Europa und Japan verantwortlich (71). Sie ist nicht nur eine eigenständige Krankheit, sondern ein Prozeß, der die Hauptursache bei der Entwicklung der koronaren Herzkrankheit, des ischämischen Zerebralinsultes und der peripheren arteriellen Verschlußkrankheit darstellt (81). Die Erforschung der Kausal- und Formalpathogenese der Atherosklerose ist seit den Anfängen der wissenschaftlichen Medizin ein Feld für umfangreiche Untersuchungen gewesen.

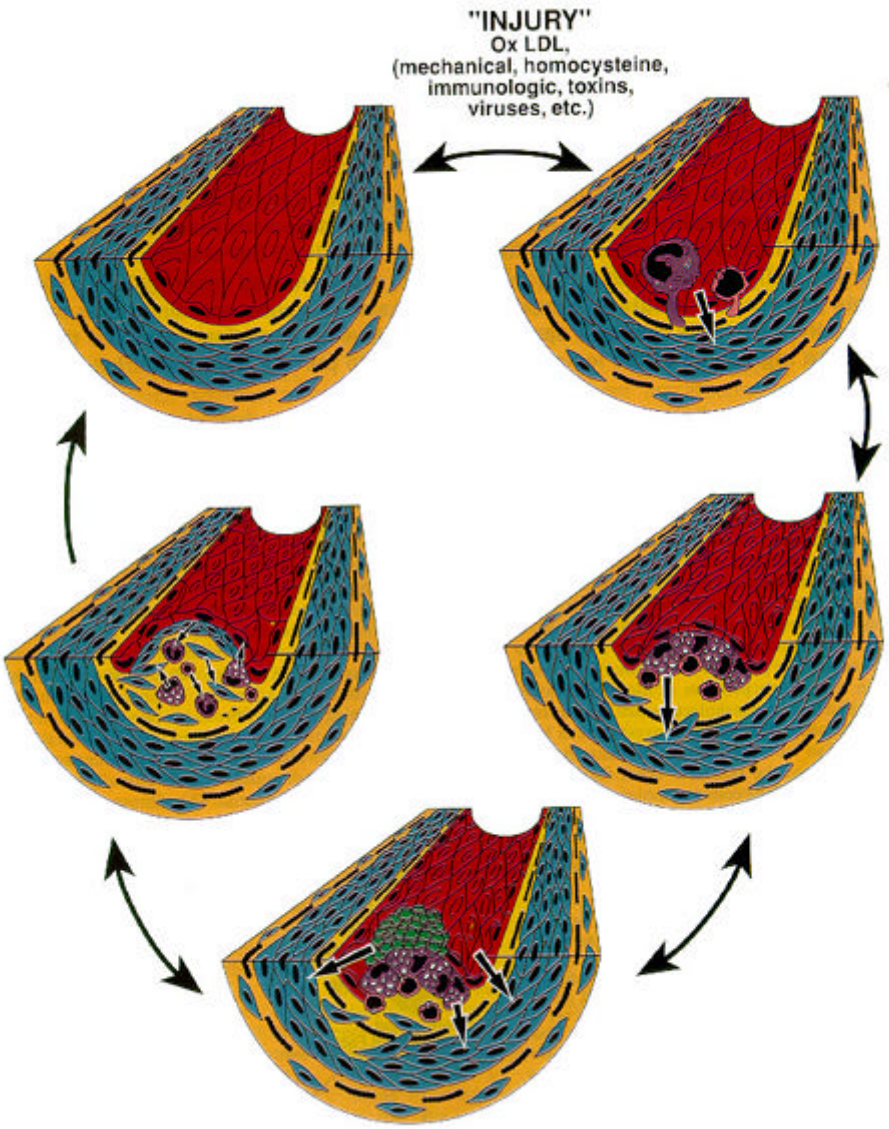
Mitte des 19. Jahrhunderts wurden zwei Hypothesen für die Entstehung der Atherosklerose postuliert. Von Rokitansky erklärte in seiner Inkrustations-hypothese, 1852 erstmals publiziert, die Intimaverdickungen, welche bereits makroskopisch sichtbar sind und ein Hauptcharakteristikum der Atherosklerose darstellen, durch Fibrinablagerungen, die im weiteren Verlauf von Fibroblasten organisiert werden und durch sekundäre Lipidakkumulation expandieren (78). Einer der größten Kritiker dieser Theorie war Rudolf Virchow, der seine Auffassung von der Atherosklerose als eine Entzündung der Arterien 1856 erstmals veröffentlichte. Seine Hypothese von der arteriellen Verletzung schließt die konsequente Anwendung des von ihm weiterentwickelten Entzündungsbegriffes auf das Entstehen der atherosklerotischen Läsionen ein. „Späterhin habe ich meine Auffassung der Entzündung weiter entwickelt und gefunden, dass man jeden activen, pathologischen Ernährungsvorgang, der aus Reizung hervorgeht, jede irritative Ernährungsstörung .... als entzündlich bezeichnen müsse. Nach dieser Auffassung gehört ein Theil der sogenannten Entzündungssymptome, nämlich Röthe (Wallung oder Stase), Schmerz und dem grösseren Anteile nach auch die Hitze der Reizung an ..., den wirklichen Mittelpunkt der Entzündung dagegen bildet die Ernährungsstörung. Insofern diese letztere activ und nicht etwa bloss durch den Entzündungsreiz passiv zu Stande kommt, so ist jedesmal ein progressiver Gang zu constatiren ....Untersuchen wir nun, ob an den Gefässen ein solcher activer pathologischer Ernährungsvorgang stattfinden könne, so müssen wir entschieden mit ja antworten.” (105) Virchow sah die Lipidablagerungen in der arteriellen Wand als von den Blutlipiden herrührende Veränderungen, welche nach seiner Auffassung durch Transduktion der Lipide und Komplexbildung mit sauren Mukopolysacchariden entstehen. Durch eine solche „Verletzung“ der Arterien erklärte er die Akkumulation von Lipiden und die Entwicklung der atherosklerotischen Läsionen in der Intima und Media der Arterien (105).

Die von Ross 1973 entwickelte und 1986 bzw. 1993 modifizierte und weiterentwickelte „Response-to-injury“-Hypothese stellt nicht nur den heutigen Erkenntnisstand, sondern auch die Integration der Lipidhypothese Virchows mit der Inkrustationstheorie von Rokitanskys dar (37, 80, 82).

Demnach handelt es sich bei der Entstehung der Atherosklerose um einen komplexen Vorgang, der durch eine vielgestaltige Wechselwirkung zwischen Endothel, glatten Muskelzellen der Tunica media der Arterien, Blutplättchen, Monozyten bzw. Makrophagen, aktivierten T-Lymphozyten sowie Wachstumsfaktoren und Zytokinen charakterisiert ist (81). Der Prozeß beeinhaltet die Formation der atherosklerotischen Läsionen, beginnend mit dem Auftreten von isolierten Schaumzellen (Stadium #1 nach Stary), über deren Entwicklung zu den „Fatty streaks“ (Stadium #2) und das Fortschreiten dieser Läsionen zu Präatheromen (Stadium #3) und Atheromen (Stadium #4) bis hin zu den Fibroatheromen (Stadium #5) (81, 94). Im Verlauf der Evolution und Progression der atherosklerotischen Läsionen kommt es zur Proliferation von glatten Muskelzellen, Makrophagen und Lymphozyten; zur Formation einer extrazellulären Matrix bestehend aus Kollagen, Proteoglykanen und elastischen Fasern sowie zur Akkumulation von Lipiden und freiem bzw. verestertem Cholesterin in den beteiligten Zellen und der umgebenden Matrix (81).

Das initiale Ereignis der Atherogenese besteht nach dem Paradigma der „Response-to-injury“-Hypothese in einer „Verletzung“ des Endothels durch verschiedene Risikofaktoren, welche zu einer endothelialen Dysfunktion führt, die eine Kette von zellulären Interaktionen triggert, welche in der Ausbildung der atherosklerotischen Läsionen kulminiert (81). Eine Schlüsselkomponente dieser „Verletzung“ ist mit großer Wahrscheinlichkeit oxidiertes LDL-Cholesterin (23). Die endotheliale Dysfunktion manifestiert sich insbesondere an den Aufzweigungen des arteriellen Baumes und führt zum Erscheinen von spezifischen Adhäsionsmolekülen an der Oberfläche der Endothelzellen (33, 57, 81, 92). Monozyten und T-Lymphozyten binden an diese Rezeptoren und wandern unter dem Einfluß von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die durch das alterierte Endothel freigesetzt werden, durch die endotheliale Barriere (9, 13, 57, 81). Nachdem die Monozyten die Intima der Arterienwand erreicht haben, führt die Aufnahme von oxidiertem LDL-Cholesterin über den LDL- und den Scavenger-Rezeptor der Monozyten zur Formierung von isolierten Schaumzellen, dem Stadium #1 der atherosklerotischen Läsionen nach Stary, und später zur Bildung der „Fatty streaks“ (Stadium #2), welche durch eine erhöhte Akkumulation von Makrophagen sowie dem Auftreten von Schichten von Schaumzellen und lipidbeladenen glatten Muskelzellen charakterisiert sind (64, 94, 109). Die kontinuierliche Einwanderung von diesen Zellen und deren Proliferation unter dem Einfluß der sezernierten Zytokine und Wachstumsfaktoren bewirkt die Progression zu der präatheromatösen Läsion (Stadium #3), in der sich zusätzlich zu den Komponenten der „Fatty streaks“ multiple extrazelluläre Lipidablagerungen in muskuloelastischen Schichten finden. Das Atherom im engeren Sinne (Stadium #4) ist zudem noch durch Ausbildung eines Lipidkerns gekennzeichnet, welcher durch Vergrößerung und Konfluieren der Lipidansammlungen aus dem Stadium #3 entsteht. Die Entwicklung einer kollagenösen Deckplatte durch Veränderung der oberen Intima unterscheidet das Fibroatherom (Stadium #5) vom vorhergehenden Atherom (94). (siehe Abbildung 1.1.)

Abbildung 1.1.:



Zusätzlich zu diesen Entwicklungen bewirken Plaqueruptur, konsekutive murale Thrombose und darauffolgende fibrotische Organisation die Progression der fortgeschrittenen Läsionen (Stadium #3-5 nach Stary) (37). Gleichzeitig kann eine tiefe Plaqueruptur oder Ulzeration zu thrombotischer Okklusion führen (37). Im Bereich der Herzkranzarterien kommt es dann zu den akuten Koronarsyndromen (37). Während die stabile Angina pectoris aus einem Mißverhältnis zwischen erhöhtem myokardialen Sauerstoffverbrauch und unzureichendem Sauerstoffangebot aufgrund der eingeschränkten Steigerung des Blutflusses über die stenosierten Koronararterien resultiert, präsentieren die akuten Koronarsyndrome, welche die instabile Angina pectoris, den Non-Q-wave-Infarkt und den transmuralen Myokardinfarkt sowie den plötzlichen ischämischen Herztod darstellen, Krankheitsprozesse, welche durch eine thrombotische Okklusion, die eine abrupte Reduktion des koronaren Blutflusses verursacht, charakterisiert sind (37).

2.Rolle der Adhäsionsmoleküle

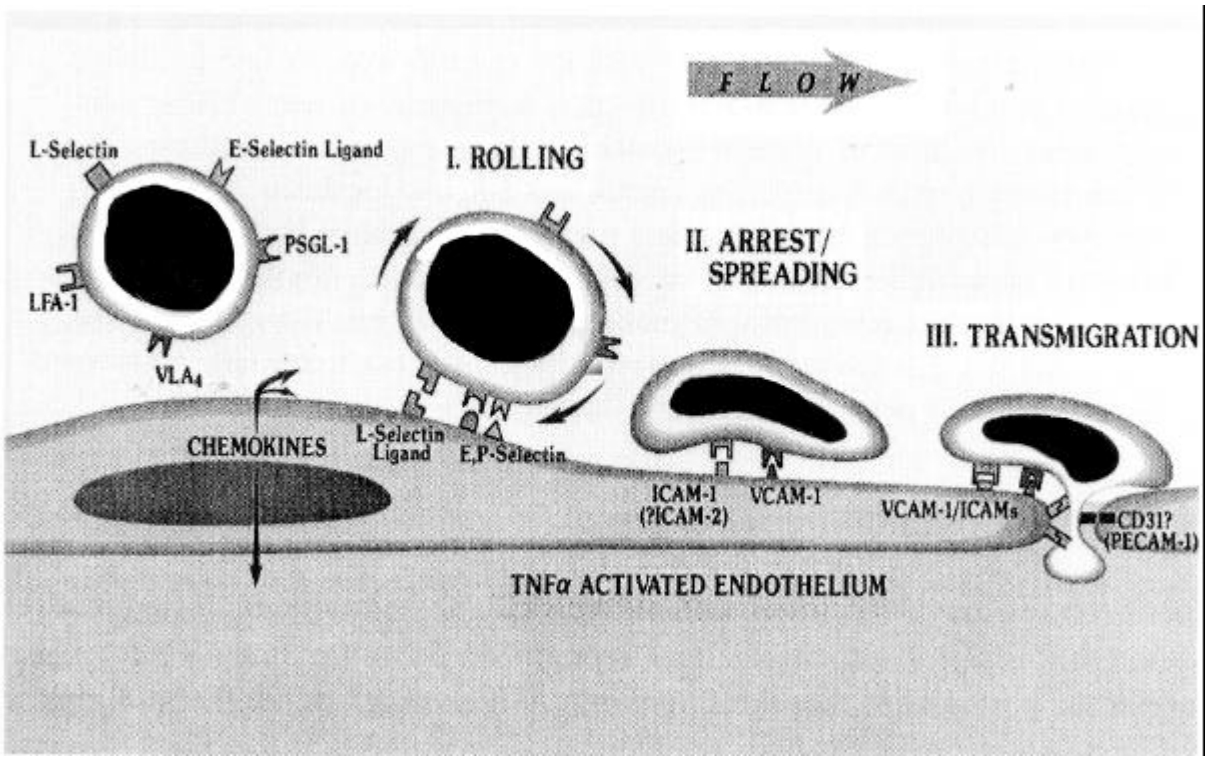
Die Entzündungsreaktion spielt eine wesentliche Rolle bei der Pathogenese menschlicher Krankheiten, welche von der bakteriellen Pneumonie, wo diese Antwort lebensrettend ist, bis zum Adult respiratory distress syndrome reichen, wo sie lebensbedrohlich werden kann (13). „Aus pathobiologischer Sicht stellt die Entzündung einen Adaptationsprozeß dar, dessen Sinn darin besteht, den Flurschaden von mechanischen, chemischen und physikalischen Noxen möglichst klein zu halten. Eine Entzündung ist folglich ein unter Einbindung des Immunsystems ablaufender Abwehrprozeß des Organismus, ohne den er seine Individualität gegenüber Fremd(mikro-)organismen verlieren würde.“ (74)
Dieser Vorgang besteht in einer komplexen Reaktion der Blutgefäße, bestimmter Blutplasmabestandteile und Blutzellen sowie zellulärer und struktureller Bestandteile des Bindegewebes auf eine lokale Gewebs-schädigung (74). An der Entzündungsreaktion sind neben zell- (Zytokine, Wachstumsfaktoren, Chemokine, Arachidonsäurederivate) und plasma-vermittelten Mediatoren (Komplement-, Bradykinin/Kallikrein-, Gerinnungs-system) die Gefäßendothelien, die Thrombozyten und die verschiedenen Typen der Leukozyten in unterschiedlicher Art und Weise beteiligt (74).

Einen wichtigen Bestandteil der Entzündungsprozesse repräsentieren leukozytär-endotheliale Interaktionen, welche in einer leukozytären Extravasation kulminieren (53). Die lokalisierte Akkumulation von Leukozyten im extravasalen Gewebe ist ein zelluläres Kennzeichen der Entzündung (27, 57). Obwohl dieses Phänomen seit über einem Jahrhundert bekannt ist, wird die aktive Rolle des Endothels bei der Rekrutierung von Leukozyten erst seit der letzten Dekade richtig beurteilt (57). Bis zum Beginn der achtziger Jahre schien das Endothel für viele Forscher nicht viel mehr als eine „nichthaftende Beschichtung“ der Blutgefäße zu sein, welche ausschließlich der Prävention der Blutgerinnung und der Separation des Gefäßlumens vom Gewebe dient (9). Seit dieser Zeit hat sich die Erforschung des Endothels dramatisch erweitert und eine neue Vorstellung von der innersten Schicht der Gefäße als aktivem Teilnehmer an einer Reihe von pathophysiologischen Prozessen einschließlich der Entzündung und der Immunität hervorgebracht (9).

Nach dem „Multistep“-Paradigma, welches den heutigen Wissensstand über die leukozytär-endothelialen Interaktionen repräsentiert, kommt es bei diesen Vorgängen zu verschiedenen Schritten während der Adhäsion der Leukozyten an das Endothel (16, 43, 93). Das initiale Ereignis der Adhäsionskaskade besteht in der Aktivierung des Endothels, welches an den Entzündungsherd angrenzt (19). Bei verschiedenen In-vitro-Studien lassen sich diese Aktivierung durch Entzündungsmediatoren wie IL-1 und TNF-α sowie durch Endotoxine der gramnegativen Bakterien (LPS) beobachten (10, 38). Daneben können auch Histamin, Thrombin, Leukotriene und Sauerstoffradikale diese Aktivatorfunktion übernehmen (19). Dabei kommt es zur Expression des E- und P-Selectins auf dem Endothel (9, 13, 19, 57).
Durch diese Selectine und ihre Liganden auf den Leukozyten, wie dem PSGL-1 und dem ESL-1 sowie dem L-Selectin wird der erste Schritt der leukozytär-endothelialen Adhäsionskaskade vermittelt (9, 13, 19, 57). Es resultiert ein Rollen der Leukozyten auf dem aktivierten Endothel (9, 13, 19, 57). Zusätzlich kommt es zu einer Wechselwirkung zwischen dem β1-Integrin VLA-4, das nur von Monozyten und Lymphozyten, aber nicht von neutrophilen Granulozyten exprimiert wird, und dem endothelialen, zur Superfamilie der Immunglobuline gehörenden Adhäsionsmolekül

VCAM-1 (13, 57). Diese initialen „Rolling“-Interaktionen sind jedoch nur schwach und reversibel, solange die Leukozyten nicht zu einer festen Adhäsion aktiviert werden (19, 57). Während des „Rolling“-Intervalls kommt es durch vom Endothel stammende Chemokine, wie MCP-1 und IL-8, zu einer Triggerung der β1- und β2-Integrin-Expression (19, 57). Hat diese Aktivierung erst einmal stattgefunden, ist die Fähigkeit zur Adhäsion deutlich gesteigert, mutmaßlich aus der Bindung dieser Integrine an deren endotheliale Liganden wie VCAM-1 und ICAM-1/2. Es resultiert ein stabiler „Arrest“ (19, 57). Die Leukozyten flachen rapide ab und strecken Pseudopodien in Richtung der Interzellularverbindungen der angrenzenden Endothelzellen aus. Schließlich wandern die Leukozyten in die Intima der Gefäßwand ein (19, 57). In diesem letzten Schritt der Adhäsionskaskade ist neben den β-Integrinen auch das zur Immunglobulin-Superfamilie gehörende Molekül PECAM-1 involviert, das neben Thrombozyten und Leukozyten auch vom Endothel exprimiert wird (19, 57). (siehe Abbildung 2.1.)

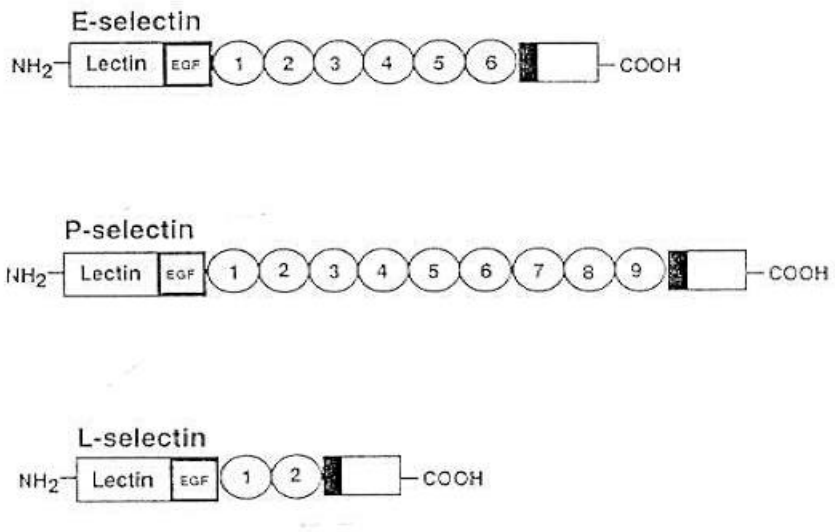
Abbildung 2.1.:



Sind die Leukozyten im interstitiellen Raum angelangt, können sie das Endothel, glatte Muskelzellen und sich selbst durch die Sekretion von Zytokinen (IL-4, IFN’s, IL-10, IL-2, IL-12), Wachstumsfaktoren (PGDF, bFGF, HB-EGF, IGF-1, IL-1, TNF-α/β, TGF-β) und chemotaktischen Substanzen (CSF’s, MCP-1) beeinflußen (19, 57, 63, 83, 91).
Die drei Moleküle der Selectinfamilie vermitteln den ersten Schritt der Adhäsionskaskade, das Rollen der Leukozyten auf dem aktivierten Endothel (9, 13, 19, 57, 93). Die Aufklärung der Proteinstruktur dieser Adhäsionsmoleküle

zeigt einen homologen Aufbau der Selectine (11, 48, 54, 87). Sie bestehen aus einer N-terminalen Lectin-like Domäne, einer Epidermal-growth-factor-(EGF)-like Domäne, einer variablen Anzahl von Complement-regulatory-like Modulen (auch als Short-consensus-repeats bezeichnet), einer Membrandomäne und einer zytoplasmatischen Domäne (11, 12, 18, 48, 54, 87, 97). (siehe Abbildung 2.2.) Die Selectine zeichnen sich durch eine große Gleichheit (40-60%) auf Protein- und Nukleotidniveau aus, sie beträgt 60-70% für die Lectin- bzw. die EGF-Domäne (11, 18, 48, 53, 54, 87, 97). Verschiedene Studien haben die entscheidende Rolle der Lectin- und der EGF-Domäne für die Selectin-vermittelte Adhäsion zeigen können. Die meisten adhäsionsblockierenden monoklonalen Antikörper erkennen Epitope innerhalb dieser Regionen (51, 66). Studien mit rekombinierten Fusionsproteinen, welche eine oder beide Domänen nicht enthalten, sowie mit Selectin-Chimären, bestehend aus verschiedenen Domänen der einzelnen Selectine, unterstützen die Wichtigkeit der beiden N-terminalen Domänen bei der Zelladhäsion (35, 51, 66).

Abbildung 2.2.:



Eine wichtige Schlußfolgerung aus der Erkenntnis von der Reihenfolge der Schritte während der Adhäsionskaskade ist, daß es zu einer großen Vielfalt von Kombinationsmöglichkeiten bei der Regulation der Rekrutierung der Leukozyten im Gewebe kommt (93). Unterschiede im Ablauf der Expression der einzelnen Komponenten der leukozytär-endothelialen Adhäsionskaskade sind im Zusammenhang von spezifischen Krankheitsprozessen, beispielsweise bei der Rheumatoid-Arthritis, akuter bzw. chronischer Transplantatabstoßung, verschiedenen Formen von Vaskulitiden, Ischämie-Reperfusionsschaden und der Atherosklerose beobachtet worden (19, 67, 93).

3.Risikofaktoren der Atherosklerose

Mit dem Begriff Risikofaktoren werden exogene und endogene Einflüsse bezeichnet, die statistisch signifikant mit der Atherosklerose korrelieren (73).

Dazu zählen Hypertonie, Dyslipidämie, Nikotinabusus, Diabetes mellitus und Adipositas (4, 73). Diese kausalpathogenetischen Faktoren führen über eine längerfristige Vorgeschichte durch metabolische, entzündliche und physikalische Gefäßschädigung zu den bereits beschriebenen atherosklerotischen Veränderungen (73). Obwohl der heutige Erkenntnisstand noch viele Fragen zur genauen Wirkungsweise offenläßt, ist die Rolle der Risikofaktoren unumstritten und soll daher in diesem Zusammenhang nicht weiter erläutert werden.

4.genetische Aspekte

Neben den genetischen Ursachen der einzelnen Risikofaktoren, insbesondere der Fettstoffwechselstörungen, scheint die Prädisposition zur Atherosklerose genetisch festgelegt zu sein (73). Die Atherosklerose als multifaktorielle Krankheit ist das Endprodukt vieler verschiedener Einflüsse, sowohl genetischer Art als auch von den Umweltbedingungen herrührend (24). Die Anhäufung von vorzeitiger Koronarsklerose in Familien kann hinreichend belegt werden (108). Die Arbeiten von Slack und Evans, die Verwandte ersten Grades von Patienten mit koronarer Herzkrankheit untersuchten, weisen ein fünf- bis siebenfach erhöhtes Risiko für den Tod infolge koronarer Herzkrankheit im Vergleich zu einer Kontrollgruppe aus (88). Weitere Studien können diesen Trend bestätigen (62, 77). Zusätzliche Beweise für den Zusammenhang einer genetischen Prädisposition mit der Atherosklerose stammen aus Zwillings-untersuchungen (5).

Allele, die von Nukleotidinsertionen,-deletionen und -rearrangements betroffen sind, weisen Veränderungen der DNA-Sequenz auf (24). Zu deren Erkennung kommen Typ-II-Restriktionsendonukleasen zur Anwendung. Diese Enzyme spalten die DNA nur an wenigen, spezifischen, von den Endonukleasen erkannten Stellen der Nukleotidsequenz; jedes Enzym erzeugt dabei sein eigenes unverwechselbares Schnittmuster (24, 98). Das Ergebnis der Einwirkung solcher Enzyme auf die extrahierte menschliche DNA besteht in einer Mischung von DNA-Bruchstücken unterschiedlicher Länge, sogenannten Restriktionsfragmenten, welche mittels Gel-Elektrophorese aufgrund ihrer Länge fraktioniert und anschließend nach Southern-Blotting mit einer Hybridisierungstechnik identifiziert werden können (24, 90). Diese Techniken ermöglichen es, Nukleotidinsertionen,-deletionen und -rearrangements aufzudecken, da sich aufgrund ihrer Effekte auf die DNA-Sequenz die Erkennungsstellen der Endonukleasen und somit die Länge der hervorgebrachten DNA-Fragmente verändern (24). Jene Allele, die von solchen Veränderungen betroffen sind, weisen sogenannte Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen (RFLP's) auf (24).
Die Suche nach den genetischen Ursachen der Atherosklerose konzentriert sich auf sogenannte Kandidatengene, deren Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen (RFLP's) zur Erforschung genutzt werden (24). In der folgenden Tabelle sind verschiedene Kandidatengene der Atherosklerose zusammengestellt (24).

Phänotyp	Protein	chromosomale Lokalisation
Lipoproteine	Apolipoproteine	
	AI-CIII-AIV	11q23-24
	E-CI-CII	19q13
	B	2p24-23
Rezeptoren	LDL-Rezeptor	19p13
	Remnant-Rezeptor	?
	Insulinrezeptor	19p13
Enzyme	Lecithin-Cholesteryl-Acyl-Transferase (LCAT)	16q22
	Lipoprotein-Lipase	8p22
Proteine der Gefäßwand	Fibronectin	2q34-36
	Kollagen	17q21-22
Wachstumsfaktoren	PDGF-B	22q12-13
	PDGF-A	7p21-22
	EGF	?
	Insulin	11p15
Gerinnungsfaktoren	Fibrinogen A	4q28
	Fibrinogen B	4q28
	Prothrombin	?
	Faktor VII	13q34

Der Großteil der Genprodukte dieser Kandidatengene ist eng mit dem Fettstoffwechsel verbunden (24). Veränderte Proteine bzw. Proteinaktivitäten, welche aus Polymorphismen der Kandidatengene resultieren, können Einfluß auf den Lipidmetabolismus nehmen und über alterierte Lipoproteinplasma-spiegel zur Atherogenese beitragen (15).
Der Polymorphismus des Apolipoproteins E wird von drei Allelen determiniert (E2, E3, E4) und hat einen deutlichen Einfluß auf den Cholesterinspiegel und die Apo-E-Konzentration (103). Das Allel E4 scheint eine Rolle für die Entstehung eines Myokardinfarktes zu haben (15).

In verschiedenen Studien läßt sich ein erhöhtes Risiko für den Myokardinfarkt bei erhöhten Lp(a)-spiegeln demonstrieren (24, 52). Es besteht ein genetisch bedingter Proteinpolymorphismus, der Einfluß auf den Lp(a)-spiegel hat (59). Für das im Lipoprotein(a) enthaltene Apolipoprotein(a) können bisher sieben verschiedene Isoformen beschrieben werden, deren Größe in umgekehrtem Verhältnis zur Plasmakonzentration des Lp(a) steht (24). Zudem existiert eine

auffällige Homologie zwischen Apo(a) und Plasminogen, was eine Rolle für Lp(a) bei der Beeinflussung des fibrinolytischen Systems nahelegt und so für thrombotische Prozesse prädisponieren kann (24).
Der Apolipoprotein AI-CIII-AIV-Gencluster weist mehr als zehn verschiedene RLFP's auf, welche in verschiedenen Studien mit dem Auftreten einer koronaren Herzkrankheit bzw. eines Myokardinfarktes assoziert werden (24). Für die verschiedenen beschriebenen RFLP's des Apolipoproteins B, welches ein wichtiger Bestandteil des LDL-Partikels ist, finden sich widersprüchliche Aussagen bezüglich deren Einfluß auf die Höhe der Lipid-, Lipoprotein- oder Apolipoproteinspiegel (24). Einige Arbeitsgruppen schlußfolgern aus ihren Ergebnissen, daß es sich bei mehreren dieser Polymorphismen um unabhängige Risikofaktoren für die koronare Herzkrankheit handelt (24). Andere Untersuchungen konzentrieren sich auf das LDL-Rezeptor-Gen. RLFP-Studien dieses Genlocus können die Bedeutung dieser Polymorphismen für den Defekt des Rezeptors bei bestimmten selteneren Formen der Hypercholesterinämie demonstrieren (44, 102). Auch für das Lipoprotein-Lipase-Gen findet sich ein Polymorphismus, welcher dieses zentrale Enzym des Lipidkatabolismus affektiert, mit einer Hypertriglyceridämie einhergeht und mit dem Auftreten einer vorzeitigen koronaren Herzkrankheit verbunden zu sein scheint (25, 101).

In verschiedenen Studien kann die Bedeutung des Polymorphismus des Angiotensin-I-converting-Enzyms (ACE) als unabhängiger Risikofaktor für die koronare Herzkrankheit und den Myokardinfarkt eindrucksvoll demonstriert werden (1, 17). Die Deletion (D) oder die Insertion (I) eines 250 Basenpaare langen DNA-Fragmentes im Genom, welches für das ACE kodiert, führt zu drei unterschiedlichen ACE-Genotypen (1, 76). Der Genotyp DD, der für höhere Serumkonzentrationen des ACE im Vergleich zu den beiden anderen Genotypen (II und ID) verantwortlich ist, erhöht das Risiko einer Koronarsklerose um den Faktor 7 und das des Myokardinfarktes um 3,5 (1). Indirekt weisen auch die Ergebnisse der SAVE- bzw. SOLVD-Studie, bei denen eine Reduktion des Reinfarktes und der Mortalität durch die Gabe eines ACE-Hemmers demonstriert werden können, auf die Bedeutung der ACE-Konzentration, welche durch den Genpolymorphismus determiniert wird, für die koronare Herzkrankheit hin (65, 89). Zusätzlich ist ein Polymorphismus des Angiotensinogen-Gens entdeckt worden, welcher ebenfalls ein unabhängiger Risikofaktor der Koronarsklerose zu sein scheint (47).

Andere Arbeiten betreffen die Adhäsionsmoleküle. Wenzel et al. haben zur Beschreibung des genetischen Hintergrundes der Atherosklerose, insbesondere der endothelialen Dysfunktion, die Gene auf DNA- und Proteinpolymorphismen untersucht, welche für die Selectine und zwei Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie (ICAM-1, VCAM-1) kodieren (106, 107). Insgesamt 17 Mutationen sind mittels Single-strand-conformation-polymorphism-(SSCP)-Analyse bzw. direkter Sequenzierung aufgedeckt

worden (106). Fünf davon führen zum Austausch von Aminosäuren in den Genprodukten. Im Falle des E-Selectins finden sich zwei derartige Mutationen, eine an der Position 128, Serin zu Arginin (S128R), die andere an Position 554, Leucin zu Phenylalanin (L554F) (106, 107). Gleichzeitig läßt sich ein Austausch von Guanin zu Thymin an der Position 98 nachweisen. Bei der weiteren Ermittlung zeigt sich eine Assoziation zwischen dem gehäuften Auftreten der S128R-Mutation, welche sich in dem für die EGF-Domäne kodierenden Abschnitt befindet, und der Inzidenz einer vorzeitigen Atherosklerose (107). Außerdem kann eine Korrelation des Auftretens der S128R-Mutation mit der Inzidenz des Basenaustausches an der Position 98 in der 5´-untranslated-Region nachgewiesen werden (106). In dieser Studie findet sich bei 97 Patienten unter fünfzig Jahre mit angiografisch nachgewiesener schwerer koronarer bzw. peripherer Gefäßkrankheit, welche ein interventionelles Verfahren in Form einer perkutanen Angioplastie oder einer Bypassoperation nötig werden läßt, eine erhöhte Frequenz dieser Mutation im Vergleich zu einer Kontrollgruppe aus 102 Freiwilligen ($p = 0,02$) (107). Eine noch höhere Frequenz der Mutation zeigt sich in einer Untergruppe, deren Probanden jünger als vierzig Jahre sind ($p = 0,0025$) (107). Beim Vergleich der Häufigkeiten des Auftretens der anderen untersuchten Mutationen mit der Inzidenz einer vorzeitigen Atherosklerose stellt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den erkrankten Personen und der Kontrollgruppe dar (107). Somit scheint der S128R-Polymorphismus der EGF-Domäne des E-Selectins ein unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung einer frühen Atherosklerose zu sein (107).

Die Mutationsanalysen können in der Zukunft neue Strategien der Prävention und Therapie der Atherosklerose ermöglichen.

Herleitung der Aufgabenstellung

Die Rolle der Adhäsionsmoleküle bei verschiedenen Krankheitsprozessen wurde bereits in der Einleitung erläutert. Die Bedeutung dieser Moleküle, welche die initialen Interaktionen zwischen dem Endothel und den Leukozyten vermitteln, bei Atherogenese ist erwiesen (13, 81). Von besonderem Interesse hierbei sind Beobachtungen, bei welchen sich eine erhöhte Expression von

verschiedenen Adhäsionsmolekülen in atherosklerotischen Läsionen zeigt. Cybulsky und Gimbrone haben vermehrt VCAM-1 in frühen atherosklerotischen Läsionen gefunden (28). Die Arbeiten von Davies, Li, Poston, Printseva und van der Wal demonstrieren neben der Häufung von VCAM-1 eine erhöhte Expression von ICAM-1, PECAM, E- und P-Selectin in atherosklerotischen Plaques (31, 55, 68, 69, 104). Diese Ergebnisse weisen auf die Rolle der Adhäsionsmoleküle bei der Pathogenese der Atherosklerose hin (13).

Zur Analyse des genetischen Hintergrundes der Atherosklerose haben Wenzel et al. nach DNA- und Proteinpolymorphismen bestimmter Adhäsionsmoleküle (E-, P-, L-Selectin, VCAM-1, ICAM-1) gesucht (106). Von den 17 mittels SSCP-Gel-Elektrophorese bzw. direkter Sequenzierung entdeckten Mutationen zeigt die S128R-Mutation der EGF-Domäne des E-Selectins eine vermehrte Häufung ($p = 0,02$) bei Patienten jünger als fünfzig Jahre ($n = 97$) mit angiografisch nachgewiesener schwerer arterieller Gefäßkrankheit im Vergleich zu einer Kontrollgruppe Freiwilliger ($n = 102$) (107). In der Untergruppe der Probanden unter vierzig Jahre findet sich eine stärkere Frequenz der Mutation ($p = 0,0025$) (107). Der beschriebene Polymorphismus scheint daher ein unabhängiger Risikofaktor einer vorzeitigen schweren Atherosklerose zu sein (107).
Zur weiteren Analyse dieses Phänomens soll die Häufigkeit der S128R-Mutation in einem Patientenkollektiv untersucht werden, dessen Probanden älter als fünfzig Jahre sind. Bei den gleichen Einschlußkriterien wie in der Arbeit von Wenzel et al. dient ein nahezu identischer Versuchsansatz zur Erforschung der aufgeworfenen Fragestellung. Dieser Versuchsansatz beeinhaltet neben einer Eigen- und Familienanamnese sowie einer klinisch-chemischen Bestimmung der Serumlipide zur Validierung der Risikofaktoren eine molekularbiologische Analyse der leukozytären DNA mittels SSCP-Gel-Elektrophorese zur Detektion der S128R-Mutation der EGF-Domäne des E-Selectins. Die Problemstellung hierbei ist sowohl ein Vergleich der Häufigkeiten der einzelnen Risikofaktoren mit dem Auftreten der Mutation als auch die Frequenz der Mutation an sich. Einerseits soll bei dieser Untersuchung abgeklärt werden, ob die Inzidenz der Mutation mit dem Auftreten eines oder mehrerer der konventionellen Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, Hypertension, Hyperlipidämie und Nikotinabusus korreliert bzw. keine Abhängigkeit davon vorhanden ist. Interessant ist hierbei, ob es eine Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Wenzel et al. gibt, die eine Korrelation zwischen normalen Cholesterinspiegeln (Chol < 6,2 mmol/l) und der Inzidenz der Mutation feststellen konnten (107).
Zum anderen stellt sich die Frage nach der absoluten Häufigkeit der Mutation innerhalb des gesamten Patientenkollektives. Die Bedeutung dieser Häufigkeit erklärt sich beim Vergleich mit den Ergebnissen der Untersuchungen von Wenzel et al., die in dem vermehrten Auftreten der S128R-Mutation bei vorzeitiger schwerer Atherosklerose einen unabhängigen Risikofaktor sehen. Ist eine annähernd gleiche Frequenz der Mutation in einem Kollektiv von Patienten über fünfzig Jahre zu beobachten, wäre die Mutation zumindestens kein Indikator für die Vor- bzw. Frühzeitigkeit des atherosklerotischen Prozesses. Ein umgekehrtes Ergebnis, d.h. eine deutlich geringere Häufigkeit

der Mutation in der gesamten zu untersuchenden Gruppe, ließe sich dann als indirekter Beweis für die Ergebnisse von Wenzel et al. nutzen. So soll die Untersuchung des DNA-Polymorphismus des endothelialen leukozytären Adhäsionsmoleküls bei Patienten älter als fünfzig Jahre mit interventions-bedürftigen Koronararterienstenosen zur Bereicherung des Wissensstandes über die genetischen Faktoren bei der Pathogenese der Atherosklerose beitragen.

Material und Methoden

1.Patienten

Zwischen September und Dezember 1995 unterzogen sich 53 Patienten (männlich = 45, weiblich = 8) mit koronarer Herzkrankheit den nachfolgend beschriebenen Untersuchungen. Das Alter der beobachteten Personen, bezogen auf den Untersuchungszeitraum, betrug mehr als fünfzig Jahre. (Durchschnitt:63,038; Median:63 Jahre). Die Symptomatik mit Angina pectoris-Beschwerden und die charakteristischen Veränderungen im Ruhe- bzw. Belastungselektrokardiogramm in Form von horizontalen oder

deszendierenden ST-Streckensenkungen, T-Negativierungen bzw. ST-Streckenhebungen führten zur Erkennung der koronaren Herzkrankheit bei den Beobachteten (4). 30 der Betrachteten (männlich = 24, weiblich = 6) erlitten vor ihrem Krankenhaus-aufenthalt einen Myokardinfarkt. Dieser konnte zusätzlich zum klinischen Befund und den schon genannten EKG-Veränderungen durch den typischen Anstieg der Serumenzyme Creatinkinase (CK), myokardspezifischer Creatin-kinase (CK-MB), der Aspartat-Aminotransferase (ASAT) und der Alanin-Amino-transferase (ALAT) sowie des Myoglobins (MYO) gesichert werden (4). Um die Diagnose koronare Herzkrankheit zu verifizieren und das weitere therapeutische Vorgehen festzulegen, erfolgte bei allen Patienten eine Herzkatheteruntersuchung mit Laevokardiografie (Ventrikulografie) und selektiver Koronarangiografie. Bei der Darstellung der Herzkranzarterien mittels Kontrastmittel zeigten sich bei allen Probanden hämodynamisch wirksame Stenosen von über fünfzig Prozent des Lumens mindestens einer Koronar-arterie aufgrund einer atherosklerotisch bedingten koronaren Herzkrankheit. Diese Befunde erforderten ein interventionelles Vorgehen zur Verbesserung der koronaren Durchblutung und somit Erhöhung der ventrikulären Pump-funktion, die zur Steigerung der Lebenserwartung und Senkung der Mortalität der betroffenen Personen beiträgt (4). Die Art der Behandlung wurde nach der Morphologie der Herzkranzarterien, der Lage der nachgewiesenen Verengung im koronaren Strombett und der allgemeinen Klinik der Patienten gewählt. Zur Anwendung kam entweder ein kardiologisch-interventionelles Verfahren, meist in Form einer perkutanen transluminalen Koronarangioplastie, oder ein kardiochirurgischer Eingriff in Form einer koronararteriellen Bypassoperation. Die **Einschlußkriterien** waren somit definiert als :

1). Alter > 50 Jahre

2). interventionsbedürftige KHK

Nach Erfüllung dieser Kriterien erfolgten die weiteren Erhebungen dieser Studie. Dazu gehörten:

a). Patienteninterview

b). spezifische Blutanalysen.

2.Patienteninterview

Während des anamnestischen Gespräches sollten folgende Punkte eruiert werden:

Eigenanamnese

Angina pectoris	Ja / Nein	Wenn ja, seit wann ?
Myokardinfarkt	Ja / Nein	Wenn ja, wann ?

Bypassoperation	Ja / Nein
PTCA	Ja / Nein

Familienanamnese

Hypertonus	Ja / Nein
Herzkrankheiten (Angina pectoris / Myokardinfarkt)	Ja / Nein

Des weiteren gaben die Befragten Auskunft über allgemeine Risikofaktoren der koronaren Herzkrankheit (4, 73), welche zur Komplettierung der Anamnese beitrugen.

Risikofaktoren

Nikotinabusus	Ja / Nein	Wenn ja, seit wann ? Wenn ja, wieviel ?
Arterielle Hypertonie	Ja / Nein	Wenn ja, seit wann ? Wenn ja, wie hoch ?
Body Mass Index (Körpergröße / Körpergewicht)		

Die Eintragung der erfragten Sachverhalte in das Studienprotokoll beendeten das Interview. Nach Abschluß des Patientengespräches, der Aufklärung über die Teilnahme an der Studie und der Einwilligung durch den Probanden erfolgte eine venöse Blutentnahme. Durch Punktion einer peripheren Vene konnten:

a). 10 ml Nativblut

b). 10 ml EDTA-Blut

gewonnen werden.

3.Blutanalyse

3.1.Biochemische Untersuchung

Das **Nativblut** wurde einer klinisch-chemischen Analyse zugeführt. Hierbei sollte in erster Linie eine Fettstoffwechselstörung aufgedeckt werden. Die Bedeutung dieser Stoffwechselstörungen bei der Entstehung der Atherosklerose konnten zahlreiche Studien hinreichend belegen (73). Zudem trug die Bestimmung des Nüchternblutzuckers zur Erkennung eines Diabetes

mellitus bei. Mit dem Gerät BM/Hitachi 747 der Firma Hitachi und den entsprechenden Reagenzien der Firma Boehringer/Mannheim ließen sich:

1. der **Cholesterin-,**
2. der **Triglycerid-,**
3. der **Glucose-,**
4. der **HDL-Cholesterin-** und
5. der **Lipoprotein(a)-spiegel**

ermitteln.
Bei der Bestimmung des Cholesteringehaltes kam die Cholesterinoxidase-PAP-Methode zur Anwendung (75). Zur Kontrolle des Triglyceridwertes diente die Glycerinphosphatoxidase-PAP-Methode (75). Die Höhe der Blutglucose ließ sich mit dem Hexokinase-Verfahren nachweisen (42). Mittels der Phosphorwolframsäure-Fällung und anschließender Cholesterinoxidase-PAP-Bestimmung ist der HDL-Cholesterinspiegel festgestellt worden (75). Die Bestimmung des Lipoproteins(a) war mit der Immunturbidimetrie durchfürbar (75, 99). Um die biochemische Analyse zu vervollständigen und das atherogene Potential zu quantifizieren, sollte auch die Bestimmung des **LDL-Cholesterinspiegels** erfolgen. LDL-Cholesterin ließ sich rechnerisch aus dem Gesamt-Cholesterin, den Triglyceriden und dem HDL-Cholesterinwert mit Hilfe der **Friedewald-Formel** :

LDL-Chol. = Chol. – HDL-Chol. – (TG : 2,2) (mmol/l)
LDL-Chol. = Chol. – HDL-Chol. – (TG : 5) (mg/dl)

ermitteln (36). Diese Näherungsformel durfte zur Anwendung kommen, wenn es sich um Nüchternserum ohne Chylomikronen handelte und die Triglyceride unter 5 mmol/l (500 mg/dl) lagen (36). Da bei dieser Studie die Friedewald-Formel angewandt wurde, lassen sich auch fehlende LDL-Werte erklären, da in diesen Fällen der Triglyceridspiegel über dem zulässigen Wert von 5 mmol/l (500 mg/dl) gelegen hat. Nach Abschluß der biochemischen Analyse wurden die Parameter zur weiteren Erfassung in das Studienprotokoll eingetragen.

3.2.Molekularbiologische Analyse

Das **EDTA-Blut** wurde einer genetischen Untersuchung unterzogen. Sie diente der Erkennung der S128R-Mutation der EGF-Domäne des E-Selectins, welcher kürzlich in einer klinischen Studie mit dem Auftreten einer vorzeitigen Atherosklerose assoziiert werden konnte (106, 107). Dazu gehörten:

1. **DNA-Präparation**
2. **Polymerasekettenreaktion**

3. **Single-strand-conformation-polymorphism-Gel-Elektrophorese**
4. **Silberfärbung** des **SSCP-Gels**.

Bei der **DNA-Präparation** kam das Genomic-Tip-Kit der Firma QUIAGEN zur Anwendung. „Blut ist eine komplexe Mischung aus Zellen, Proteinen, Metaboliten und vielen anderen Substanzen. Rund 45% des Blutvolumens besteht aus Zellen, davon sind 99% Erythrozyten. Erythrozyten und Thrombozyten (ca. 0,5% der zellulären Bestandteile) enthalten keine Zellkerne und sind somit für die Präparation der genomischen DNA unbrauchbar. Die einzigen Blutzellen, die Zellkerne besitzen und sich daher für die DNA-Präparation eignen, sind die Leukozyten (rund 0,3%).” (70)
Vor der Präparation mußten einige Puffer hergestellt werden, deren Zusammensetzung hier kurz dargelegt ist.

Puffer C1	Saccharose	320	mmol/l
(Zellyse-Puffer)	Magnesiumchlorid	5	mmol/l
ph 7,5	Tris-Base	10	mmol/l
	Triton X-100	1	%
Puffer G2	GuHCl	800	mmol/l
(Komplettlyse-Puffer)	EDTA	30	mmol/l
ph 8,0	Tris-Base	30	mmol/l
	Tween-20%	5	%
	Triton X-100	0,5	%
Puffer QBT	Natriumchlorid	750	mmol/l
(Equilibrationspuffer)	MOPS	50	mmol/l
ph 7,0	Ethanol	15	%
	Triton X-100	0,15	%
Puffer QC	Natriumchlorid	1	mol/l
(Waschpuffer)	MOPS	50	mmol/l
ph 7,0	Ethanol	15	%
Puffer QF	Natriumchlorid	1,25	mol/l
(Elutionspuffer)	Tris-Base	50	mmol/l
ph 8,5	Ethanol	15	%

Im ersten Schritt der Präparation erfolgte die Zellyse. Dazu mußte das Blut mit dem Puffer C1 und Aqua dest. gemischt und für zehn Minuten auf Eis inkubiert werden. Daran schloß sich eine Zentrifugation bei 1300 g und 4°C für eine Viertelstunde an. Nach Verwerfen des Überstandes und Resuspendieren des Zellkernpellets wiederholte sich der ganze Vorgang. Danach wurde das Pellet im Puffer G2 gelöst und Protease (QUIAGEN) hinzugefügt. Durch Inkubation der Probe für ca. eine Stunde ließen sich die Zellkerne lysieren und die Proteine in kleinere Fragmente spalten. Der Puffer QBT diente im folgenden Schritt zum Equilibrieren des QIAGEN Genomic-Tips. Die Probe mußte nun in das equilibrierte Genomic-Tip appliziert werden, woraufhin zweimaliges Waschen des Tips mit dem Puffer QC durchfürbar war. Nachdem ein

geeignetes Auffangröhrchen unter dem Genomic-Tip plaziert wurde, ließ sich die DNA durch den Puffer QF eluieren. „Das Prinzip des QUIAGEN Genomic-Tip-Kits basiert auf einem patentierten Anionenaustauscherharz, welches in einem speziellen Vorgang auf ein makroporöses Silikatgel mit einer Partikelgröße von annähernd 100 µm aufgetragen wird. Die hohe Dichte von Anionenaustauschergruppen auf dem QUIAGEN-Harz führt zu einem ausgedehnten Separationsbereich (bis zu einer 1,6 M NaCl-Lösung) für doppelsträngige DNA, bei einem Elutionspunkt von ph 7,0. Konventionelle Anionenaustauscher, die auf Zellulose, Dextran oder Agarose basieren, besitzen dagegen nur einen Separationsbereich bis ca. 0,4 M NaCl-Lösung, an welchem die doppelsträngige DNA eluiert. Die Bindung und Elution vieler Substanzen ist somit auf einen engen Bereich der NaCl-Konzentration begrenzt. Da sich die Elutionshöhepunkte von Proteinen, RNA und DNA weitgehend überlagern ist eine zufriedenstellende Trennung nicht erreichbar. Somit sind die Separations- und Reinheitsqualitäten des QUIAGEN-Harzes weitaus höher als bei konventionellen Anionenaustauscherharzen.” (70)
Für weitere Angaben sei hier auf das QUIAGEN Genomic DNA Handbook July 1995 S.14/15, S.33-35, S.42-44 verwiesen (70). Anschließend erfolgte die Zugabe von Isopropanol zur Präzipitation der DNA. Nach Ultrazentrifugation bei 5000 g über 15 Minuten und Verwerfen des Überstandes wurde das DNA-Pellet getrocknet und zur Konservierung in einem geeigneten Puffer (in diesem Fall SSC-Puffer) gelöst. Zur Konzentrationsbestimmung mußte die Probe im Verhältnis 1:20 verdünnt und die Extinktion bei 260 nm ermittelt werden. Daraus ergab sich das Volumen an DNA-Lösung, um die in der nachfolgenden PCR erforderliche Menge von 250 ng einsetzen zu können.

Die **Polymerasekettenreaktion** diente der Amplifikation der zu untersuchenden DNA. „Sie ist ein vielzyklischer Vorgang, der sich in drei Schritte pro Zyklus aufteilt. Im ersten Schritt (Denaturierung) wird die Ziel-DNA der Probe durch Hitzedenaturierung bei 95°C von doppelsträngiger nativer DNA in ihre zwei zueinander komplementären Einzelstränge gespalten. Der zweite Schritt (Annealing) ist die Hybridisierung der DNA-Einzelstränge mit zwei Oligonukleotiden (Primer), wovon jeweils eines zu einem der zu vermehrenden DNA-Einzelstränge komplementär sein muß. Dies geschieht bei Temperaturen von 37-65°C.” (98)
„Im dritten Schritt (Extension) dienen die zuvor gebildeten Hybride als Synthesestart für ein DNA-bildendes Enzym, die Taq-Polymerase. Bei ihrem Temperaturoptimum von 72°C verlängert sie in Anwesenheit von überschüssigen Desoxyribonukleotiden die angelagerten Primer. Jeder angelagerte Primer ergibt einen neuen DNA-Einzelstrang. Nach der Bildung neuer komplementärer Einzelstränge startet ein weiterer neuer Zyklus. Das Prinzip der PCR besteht darin, daß neu synthetisierte DNA nach der Spaltung sofort wieder Ziele für Primer-Anlagerungen und deren Verlängerung sind und somit eine Amplifikation gewährleistet ist. Voraussetzung dafür sind der Überschuß an Primer und Desoxyribonukleotiden im Ansatz sowie die Thermostabilität der Taq-Polymerase.” (98) Die PCR ließ sich mit dem PHC-3

Thermal Cycler der Firma Techne durchführen. Nach einer initialen Denaturierung für fünf Minuten bei 95°C, folgten 30 Zyklen:

Denaturierung	(30 Sekunden bei 95°C),
Annealing	(60 Sekunden bei 58°C) und
Extension	(60 Sekunden bei 72°C)

sowie eine abschließende Extension für fünf Minuten bei 72°C.
Im Reaktionsansatz (50 µl) waren enthalten:

DNA	250	ng	
Kaliumchlorid	50	mmol	
Tris-Puffer	10	mmol	ph 9,0
Magnesiumchlorid	1,5	mmol	
Desoxyribonukleotide (CTAG)	0,2	mol	
Primer (auf- und abwärts)	15	pmol	
Triton X-100	0,1	%	
Taq-Polymerase	2,5	U	

Die Primersequenzen der flankierenden Introns des Exons 4, welches für die EGF-Domäne des E-Selectins kodiert, sind die folgenden:

5´-Richtung : 5´-AGT AAT AGT CCT CCT CAT CAT G-3´

3´-Gegenrichtung : 5´-ACC ATC TCA AGT GAA GAA AGA G-3´ (106,107).

Die **SSCP-Gel-Elektrophorese** diente dem Nachweis der S128R-Mutation, indem die unterschiedliche Beweglichkeit der DNA-Einzelstränge von PCR-Produkten auf nicht denaturierenden Gelen ausgenutzt wurde. Das Prinzip erklärt sich wie folgt: Eine Einzelstrang-DNA hat in nicht denaturiertem Zustand eine gefaltete Struktur, die von ihrer Nukleotidsequenz abhängig ist. Bei Veränderungen in der Basenfolge, wie dies bei Punktmutationen der Fall ist, kann sich eine andere Faltung der DNA ergeben. Diese führt aufgrund variierter Beweglichkeit bei einer Gel-Elektrophorese zur Modifikation des Bandenmusters der DNA-Stränge. Durch ein Markierungsverfahren, wie zum Beispiel Silberfärbung, lassen sich die Banden sichtbar machen. Andere Methoden der Visualisierung sind radioaktive oder Fluoreszenz-Markierung der Primer.

Durchführung:

a) <u>Herstellung des 5%igen Polyacrylamid-Gels:</u>

1.) saubere Glasplatten mit 96%igem Ethanol abreiben
2.) Slot-Platte mit Dichlorsilan silikonisieren
3.) Gel-Support-Film (QUIAGEN) auf der hydrophoben Seite mit Aqua dest. anfeuchten, auf die andere Glasplatte legen und durch das angebrachte Papier fest anstreichen
4.) Papier entfernen und Spacer auf die Slot-Platte legen
5.) beide Platten so zusammenlegen, daß der Film zwischen beiden Glasplatten an der offenen Seite hervorsteht, mit Klammern befestigen
6.) Gießen des Gels
7.) Polymerisation über eine Stunde in waagerechter Lage

Zusammensetzung der Gellösung:

Acrylamid		2,475	g
Bisacrylamid		0,025	g
TBE-Puffer		4,5	ml
Glycerol		2,5	ml
Aqua dest.	auffüllen auf	50	ml
Ammoniumpersulfat		15	mg
TEMED (Tetramethyl-Ethylendiamin)		45	µl

Zusammensetzung des TBE-Puffers:

Tris		121,14	g
Borsäure		61,83	g
EDTA		7,5	g
Aqua dest.	auffüllen auf	100	ml

b) Gel-Elektrophorese:

1.) Kryostat auf gewünschte Temperatur einstellen (12 bzw. 20°C) und zum Kühlen der Keramikplatte einschalten
2.) 1000 ml Laufpuffer in die seitlichen Pufferkammern füllen
3.) polymerisiertes Gel (auf Supportfilm) aus den Glasplatten herausnehmen
4.) 1-2 ml von tausendfach verdünntem Triton X-100 auf die Keramikplatte der Apparatur geben und Supportfilm blasenfrei auflegen
5.) als Verbindung zwischen Gel und Laufpuffer Schwammtücher je 1 cm breit auf das Gel auflegen und mit der Glasplatte abdecken, Kammerdeckel schließen und bei 10 Watt (300 V) ca. 20-30 min vorlaufen lassen (Prä-Elektrophorese)
6.) 1 µl PCR-Ansatz und 9 µl Formamid/EDTA (1 ml FA/EDTA = 960 µl FA + 40 µl 0,5 M EDTA) vortexen, fünf Minuten bei 95°C inkubieren, danach auf Eis geben und kurz darauf bei 9300 g einige Sekunden zentrifugieren
7.) je 5 µl der vorbereiteten Probe auf das SSCP-Gel auftragen
8.) zur Kontrolle des Gellaufs in eine Gelbahn 3 µl Farbstoff (Xylen-Cyanol) geben
9.) Probeneinlauf bei 10 Watt (300 V) für 15-20 min
10.) dann Lauf auf 25 Watt (500 V) hochregulieren bis der Farbstoff das Gelende erreicht hat (ca.3-4 h)

Zusammensetzung des Laufpuffers:

TBE-Puffer		180	ml
Glycerol		100	ml
Aqua dest.	auffüllen auf	2000	ml

Die Visualisierung erfolgte mittels **Silberfärbung** des SSCP-Gels (106,107). Dazu wurde eine Ethanol-Essigsäurelösung (10% Ethanol; 0,5% Eisessig) auf das Gel gegeben und dieses auf einem Horizontal-Wipptisch drei Minuten geschüttelt. Der ganze Vorgang mußte nach Verwerfen der verbrauchten Lösung wiederholt werden. Der zweite Schritt bestand aus der Inkubation des Gels in einer Silbernitratlösung (0,1% $AgNO_3$) für zehn Minuten. Im dritten Teilabschnitt der Färbung ließ sich durch Zugabe einer Natriumhydroxid/ Natrium-Borhydrid/Formaldehyd-Lösung (1% NaOH; 0,01% $NaBH_4$; 0,15% Formaldehyd) das an die DNA gebundene Silber sichtbar machen. Zur Fixierung der Gelbanden kam eine Natriumbikarbonatlösung (0,75% Na_2CO_3) zur Anwendung. Zwischen den einzelnen Schritten folgte nach Verwerfen der Lösungen eine ausgiebige Spülung mit Aqua destillata. Danach wurde das Gel entweder getrocknet oder feucht in Folie geschweißt.

4.Statistische Auswertung

Die statistische Datenanalyse erfolgte mit dem Statistikpaketprogramm SPSS für PC, Version 4.1. Die absoluten und relativen Häufigkeiten der kategorialen Merkmale wurden bestimmt. Mit dem **U-Test** nach **Mann** und **Whitney** sowie dem Rangsummentest nach **Wilcoxon** ließen sich folgende Merkmale hinsichtlich der Häufigkeit des Auftretens untersuchen:

1. Lebensalter
2. Body Mass Index
3. Nikotinkonsum
4. Blutglucose
5. LDL-Cholesterin
6. HDL-Cholesterin
7. Lipoprotein(a)

Die Vergleiche bezüglich der Häufigkeit des Auftretens eines Merkmals ließen sich mit der **Chi^2-Kontingenztafel-Untersuchung** nach **Pearson** durchgeführen. Dies betraf die Parameter:

1. Geschlecht
2. Myokardinfarkt
3. Hypertonie
4. Cholesterin
5. Triglyceride
6. Familienanamnese

Hierbei erfolgte die Testung auf Unabhängigkeit bzw. Homogenität. Bei niedrigen Beobachtungswerten bzw. p-Werten im Grenzbereich (p = 0,05-0,1) diente zusätzlich der **Fisher´s Exact Test** (beidseitig geprüft) zur Kontrolle. Einheitlich wurde als Signifikanzniveau für die Irrtumswahrscheinlichkeit p = 0,05 festgelegt (39).

Ergebnisse

1.Befunde der gesamten Patienten

1.1.Alter

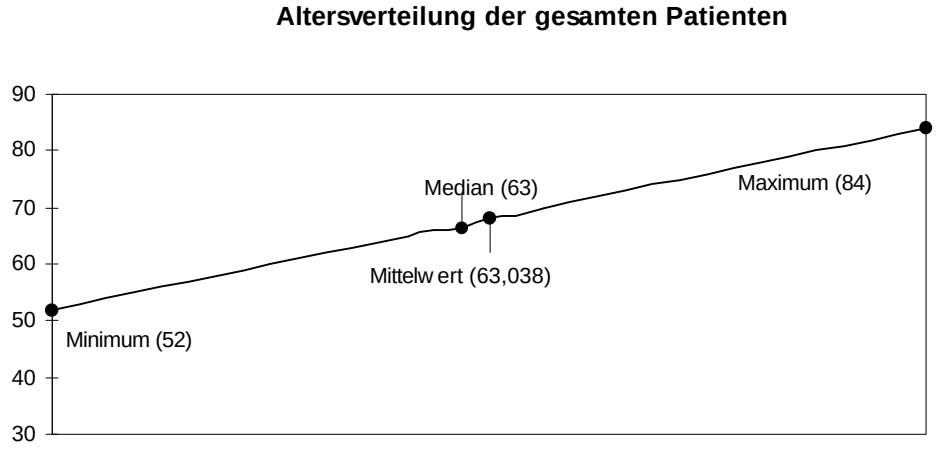
Das Alter der beobachteten Probanden liegt im Durchschnitt bei 63,038 Jahren, der Median bei 63,0. Der jüngste Patient ist 52 Jahre alt, der älteste 84. Die Anzahl der Untersuchten beträgt 53 Fälle, die Standardabweichung liegt bei 7,251. (siehe Tabelle und Abbildung 1.1.)

Tabelle 1.1.:

Alter der gesamten Patienten	
Minimum	52
Mittelwert	63,038
Median	63

Maximum	84

Abbildung 1.1.:



1.2.Nikotinkonsum

Zwischen einem Minimum von Null und einem Maximum von fünfzig Zigaretten täglich findet sich ein Mittelwert von 8,736; bei einem Median von vier Zigaretten pro Tag und einer Standardabweichung von 10,572. (siehe Tabelle 1.2.)

Tabelle 1.2.: Nikotinkonsum der gesamten Patienten

Minimum	0
Mittelwert	8,736
Median	4
Maximum	50

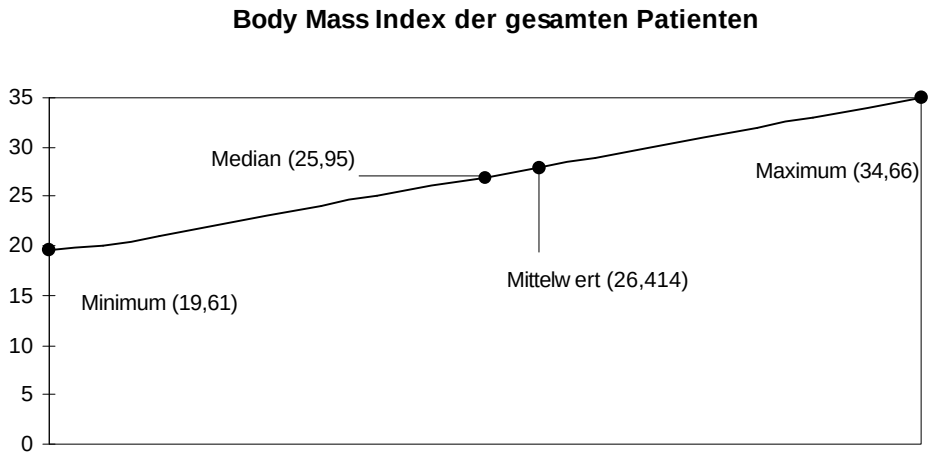
1.3.Body Mass Index

Der Body Mass Index ist nach der Formel: **Körpergewicht : Körpergröße²** errechnet worden. Der zugrundegelegte Normwert beträgt 27 kg/m². Der Mittelwert der 53 betrachteten Fälle liegt bei 26,414 kg/m², der Median bei 25,95 kg/m². Der leichteste Patient hat einen BMI von 19,61 kg/m², der schwerste einen von 34,66 kg/m². Die Standardabweichung beträgt 3,332. (siehe Tabelle und Abbildung 1.3.)

Tabelle 1.3.: BMI der gesamten Patienten

Minimum	19,61	kg/m²
Mittelwert	26,414	kg/m²
Median	25,95	kg/m²
Maximum	34,66	kg/m²

Abbildung 1.3.:



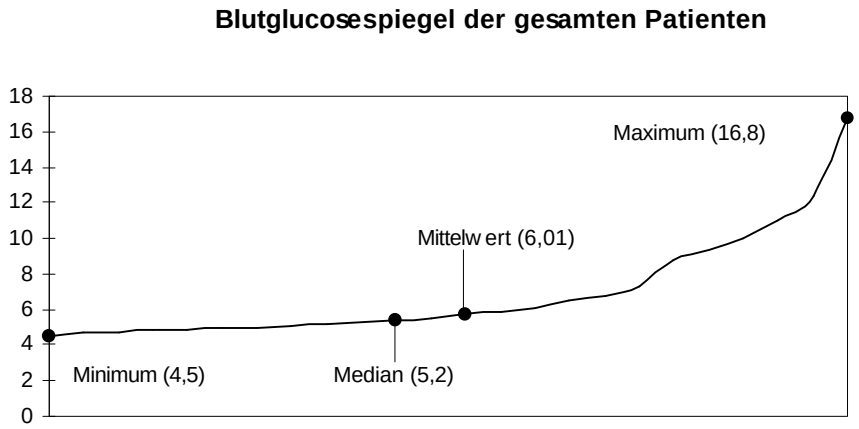
1.4.Blutglucose

Bei den 53 beobachteten Personen liegt der durchschnittliche Blutzuckerspiegel in Höhe von 6,015 mmol/l, der mediane bei 5,2 mmol/l. Der niedrigste gemessene Wert beträgt 4,5 mmol/l, der höchste 16,8 mmol/l, die Standardabweichung 2,308. Die Referenzwerte für eine normoglycämische Stoffwechsellage stellen Blutzuckerspiegel zwischen 3,5 und 5,5 mmol/l dar. (siehe Tabelle und Abbildung 1.4.)

Tabelle 1.4.

Blutglucose der gesamten Patienten		
Minimum	4,5	mmol/l
Mittelwert	6,015	mmol/l
Median	5,2	mmol/l
Maximum	16,8	mmol/l

Abbildung 1.4.:



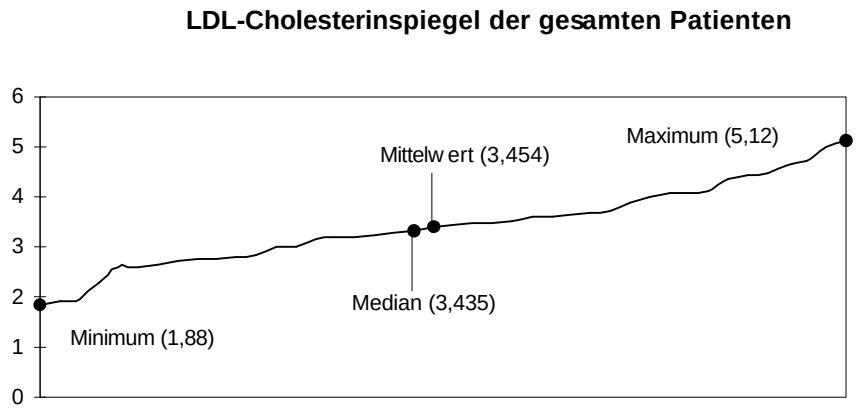
1.5.LDL-Cholesterin

Im Durchschnitt findet sich ein LDL-Cholesterinspiegel von 3,454 mmol/l und ein Median von 3,435 mmol/l. Kleinster Wert ist 1,88 mmol/l, größter gemessener Wert 5,12 mmol/l bei einer Standardabweichung von 0,787. Von den 53 beobachteten Patienten fehlt in einem Fall der LDL-Cholesterinwert. Als Referenzwert für ein hohes Risiko der Inzidenz einer koronaren Herzkrankheit gelten LDL-Cholesterinspiegel über 4,9 mmol/l, ein mäßiges Risiko besteht bei Werten zwischen 3,9 und 4,9 mmol/l. (siehe Tabelle und Abbildung 1.5.)

Tabelle 1.5.:

LDL-Cholesterin der gesamten Patienten		
Minimum	1,88	mmol/l
Mittelwert	3,454	mmol/l
Median	3,435	mmol/l
Maximum	5,12	mmol/l

Abbildung 1.5.:



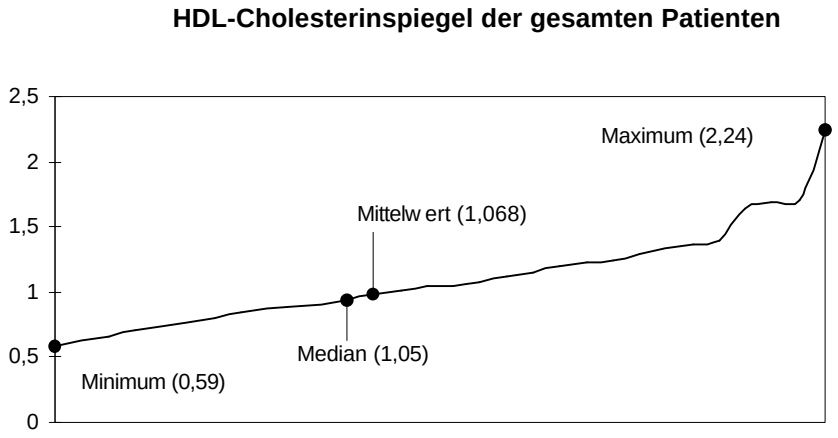
1.6.HDL-Cholesterin

Zwischen einem Minimum von 0,59 mmol/l und einem Maximum 2,24 mmol/l liegt der durchschnittliche HDL-Cholesterinspiegel bei 1,068 mmol/l, der Median in Höhe von 1,05 mmol/l. Die Standardabweichung beträgt hierbei 0,33. Für das HDL-Cholesterin gelten als Referenzbereich für ein mäßiges Risiko der Inzidenz einer koronaren Herzkrankheit Werte zwischen 1,45 und 0,9 mmol/l, ein hohes Risiko besteht unterhalb von 0,9 mmol/l. (siehe Tabelle und Abbildung 1.6.)

Tabelle 1.6.:

HDL-Cholesterin der gesamten Patienten		
Minimum	0,59	mmol/l
Mittelwert	1,068	mmol/l
Median	1,05	mmol/l
Maximum	2,24	mmol/l

Abbildung 1.6.:



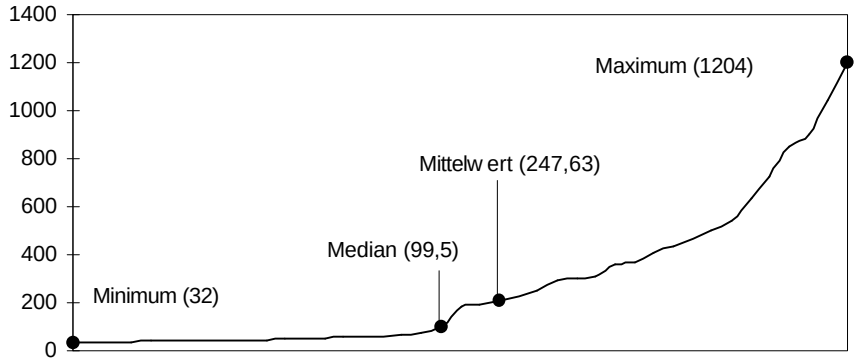
1.7.Lipoprotein(a)

Bei einem minimalen Lp(a)-wert von 32 mg/l und einem Maximalwert von 1204 mg/l findet sich der mittlere Lp(a)-spiegel in Höhe von 247,632 mg/l. Der mediane Lp(a)-wert beträgt 99,5 mg/l bei einer Standardabweichung von 295,16. Oberhalb eines Referenzwertes von 300 mg/l besteht ein erhöhtes Atheroskleroserisiko. (siehe Tabelle und Abbildung 1.7.)

Tabelle 1.7.:

Lipoprotein(a) der gesamten Patienten		
Minimum	32	mg/l
Mittelwert	247,632	mg/l
Median	99,5	mg/l
Maximum	1204	mg/l

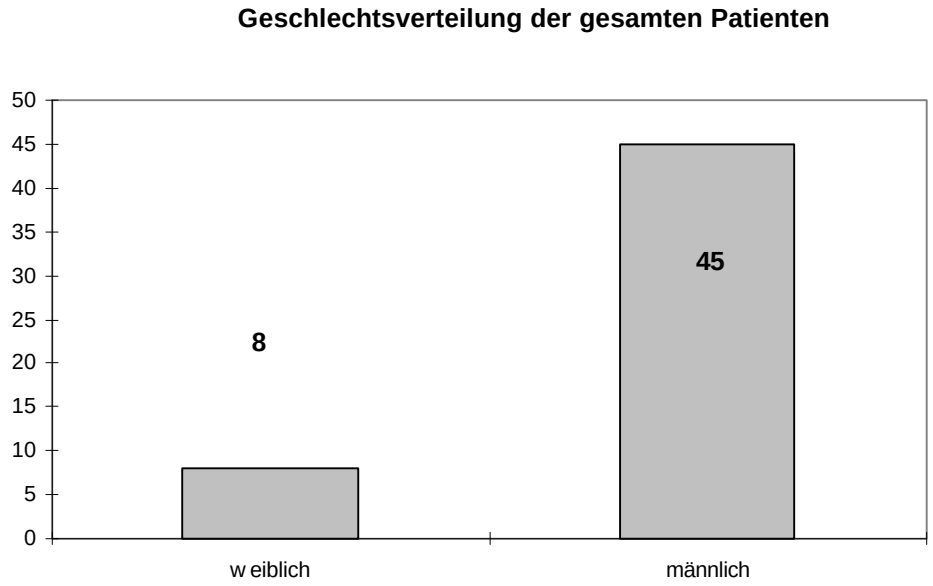
Abbildung 1.7.:



1.8.Geschlechtsverteilung der gesamten Patienten

Von den 53 untersuchten Personen sind acht weiblichen Geschlechts (15,1%), und 45 männlichen Geschlechts (84,9%). (siehe Abbildung 1.8.)

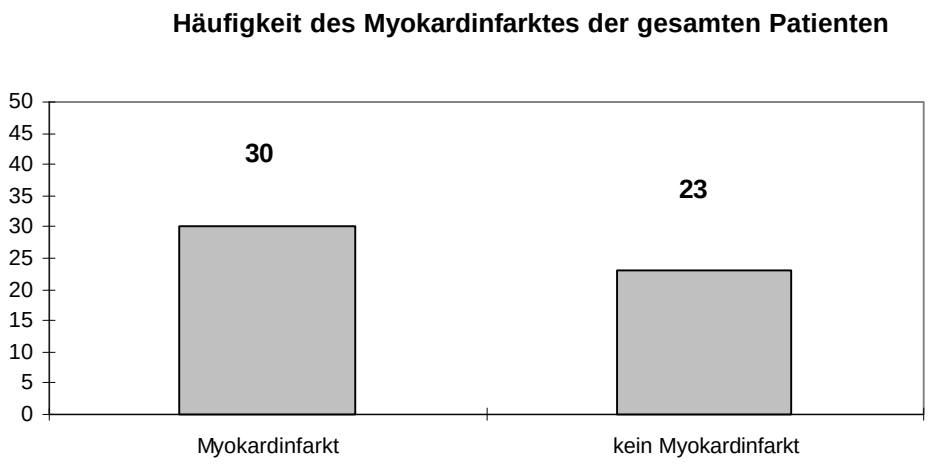
Abbildung 1.8.:



1.9.Häufigkeit des Myokardinfarktes

Dreißig der 53 beobachteten Probanden haben zum Zeitpunkt der Untersuchungen bereits einen Myokardinfarkt erlitten (56,6%), dreiundzwanzig (43,4%) nicht. (siehe Abbildung 1.9.)

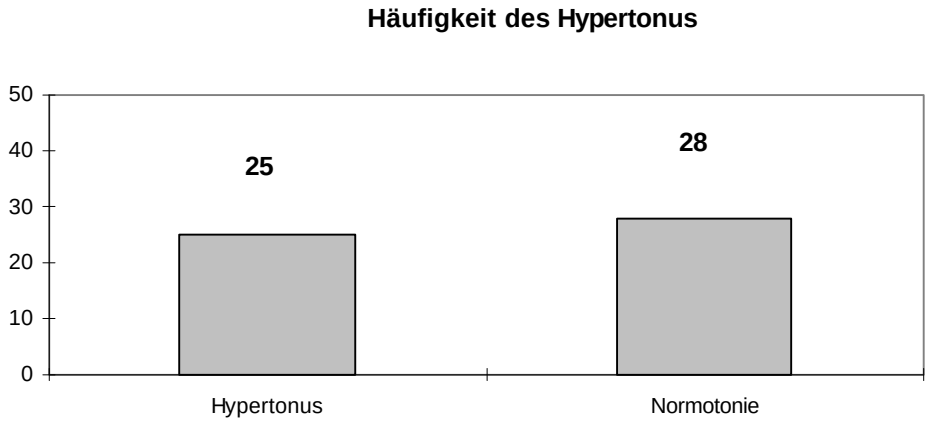
Abbildung 1.9.:



1.10.Häufigkeit der Hypertonie

Bei 25 der 53 untersuchten Patienten besteht ein Hypertonus (47,2%), die übrigen 28 Probanden (52,8%) haben normale Blutdruckverhältnisse. Von einer Hypertonie ist zu sprechen, wenn der systolische Blutdruck 160 mm Hg bzw. der diastolische Blutdruck 95 mm Hg überschreitet. (siehe Abbildung 1.10.)

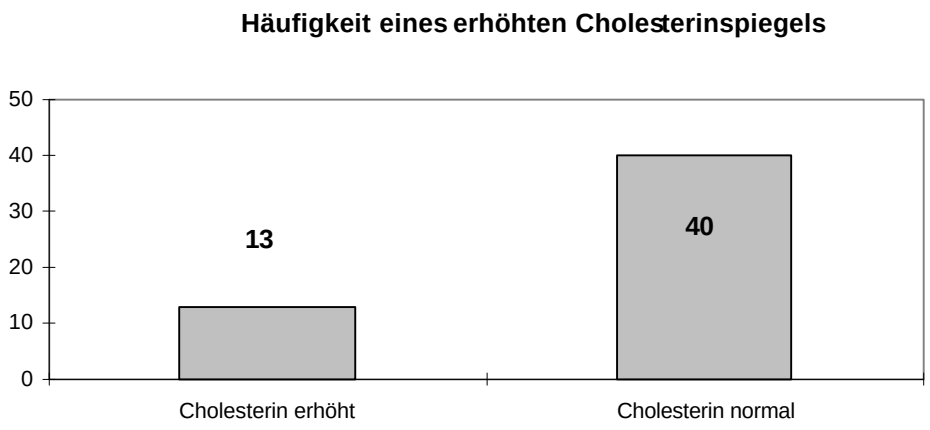
Abbildung 1.10.:



1.11.Häufigkeit eines erhöhten Cholesterinspiegels

Ein erhöhter Cholesterinspiegel findet sich bei 13 (24,5%) der 53 beobachteten Personen, 40 Patienten (75,5%) haben normale Cholesterinwerte. Als Referenzwert für einen erhöhten Cholesterinspiegel gilt 6,2 mmol/l. (siehe Abbildung 1.11.)

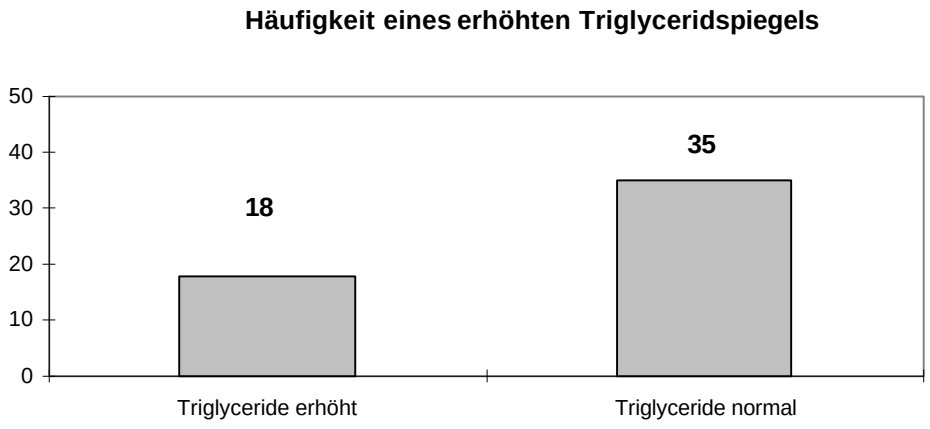
Abbildung 1.11.:



1.12.Häufigkeit eines erhöhten Triglyceridspiegels

Während 35 (66%) der Patienten einen normalen Triglyceridwert haben, ist bei 18 (34%) Probanden der Triglyceridspiegel erhöht. Der Referenzwert für einen erhöhten Triglyceridspiegel beträgt 2,3 mmol/l. (siehe Abbildung 1.12.)

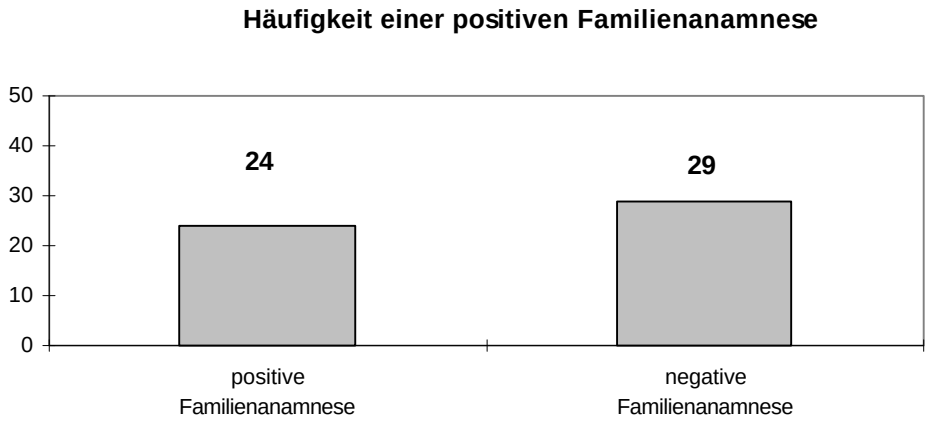
Abbildung 1.12.:



1.13.Häufigkeit einer positiven Familienanamnese

Von den 53 Untersuchten haben 24 (45,3%) eine positive Familienanamnese bezüglich einer Hypertonie bzw. einer koronaren Herzkrankheit, 29 (54,7%) hingegen nicht. (siehe Abbildung 1.13.)

Abbildung 1.13.:

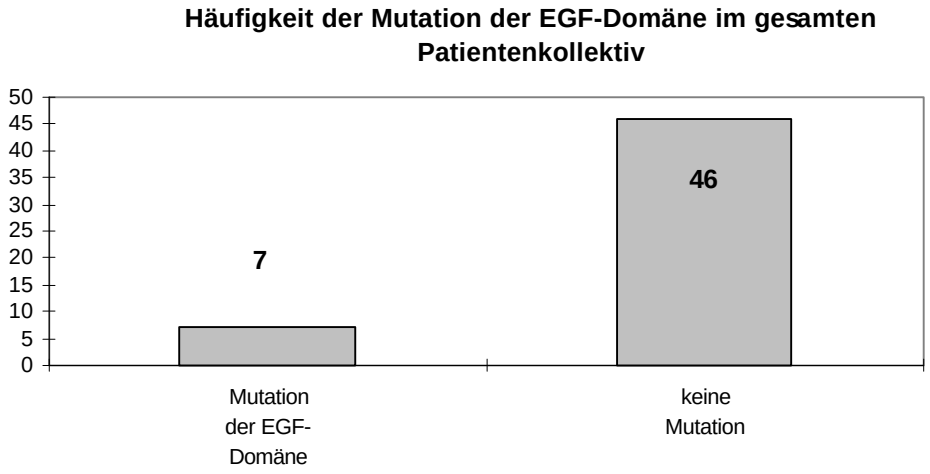


2.Befunde der beiden Patientenkollektive

2.1.Häufigkeit der S128R-Mutation

Sieben der 53 untersuchten Patienten weisen die S128R-Mutation der EGF-Domäne des E-Selectins auf (13,2%), die übrigen 46 hingegen nicht (86,8%). (siehe Abbildung 2.1.)

Abbildung 2.1.:



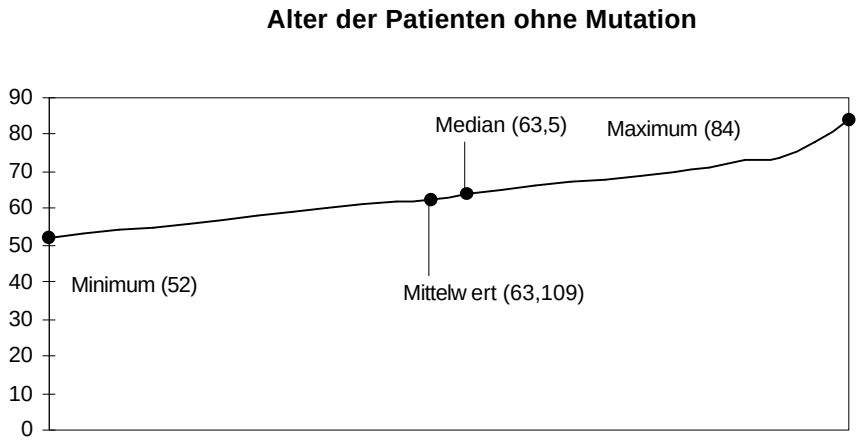
2.2.Alter

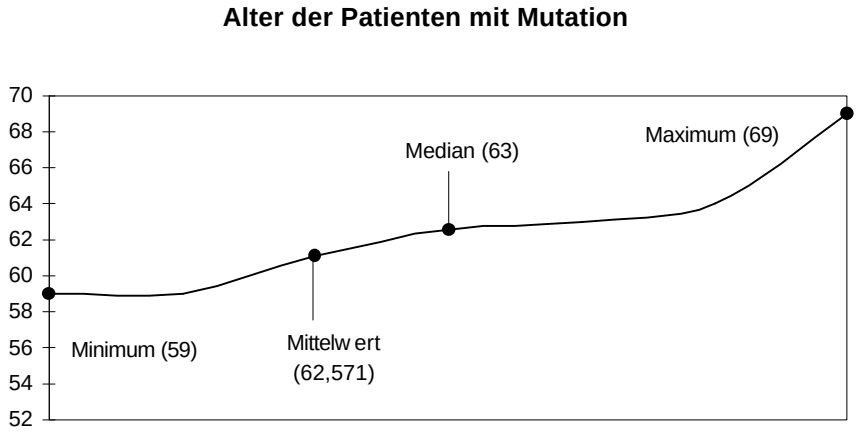
Das durchschnittliche Alter der Patienten ohne Mutation liegt bei 63,109 Jahren, der Median bei 63,5 Jahren. Die Standardabweichung beträgt 7,689. Der jüngste Proband dieses Kollektives ist 52 Jahre alt, der älteste 84 Jahre. Das mittlere Alter der Patienten mit Mutation beträgt 62,571 Jahre, der Median 63 Jahre. Die Standardabweichung liegt bei 3,457. Der jüngste Proband in diesem Kollektiv ist 59 Jahre, der älteste 69. (siehe Tabelle und Abbildung 2.2.)

Tabelle 2.2.:

Alter	Patienten ohne Mutation	Patienten mit Mutation
Minimum	52	59
Mittelwert	63,109	62,571
Median	63,5	63
Maximum	84	69

Abbildung 2.2.:





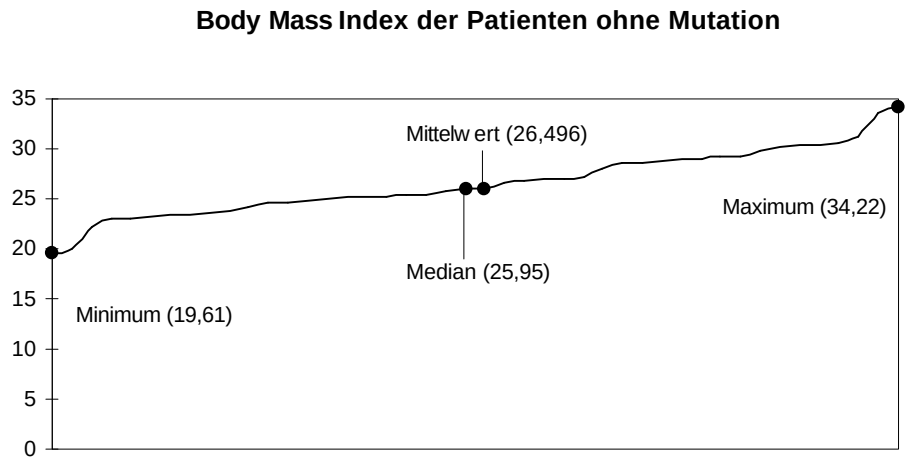
2.3.Body Mass Index

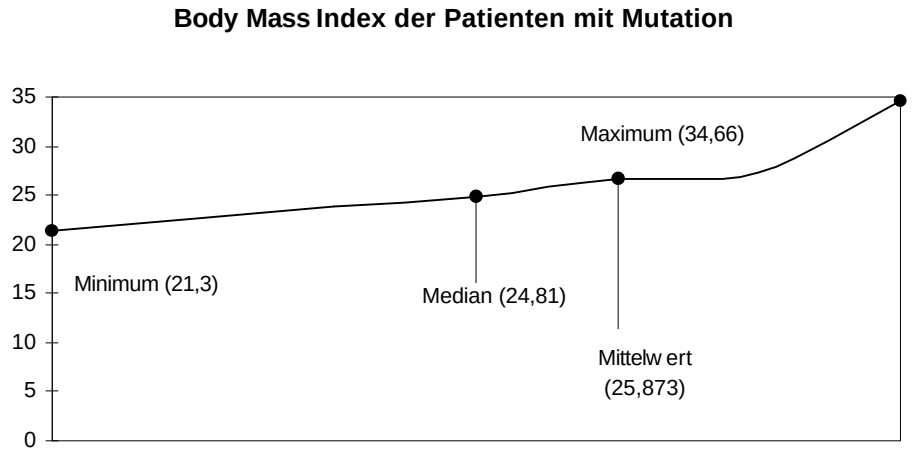
Bei einem Median von 25,95 kg/m² liegt der mittlere Body Mass Index der Probanden ohne Mutation in Höhe von 26,496 kg/m². Die Standardabweichung ist hierbei 3,192. Der leichteste Patient hat einen BMI von 19,61 kg/m², der schwerste beträgt 34,22 kg/m². Im Durchschnitt beträgt der Body Mass Index innerhalb des Kollektives der Patienten mit Mutation 25,873 kg/m², der Median 24,81 kg/m². Die Standardabweichung liegt bei 4,407. Der leichteste Patient hat einen BMI von 21,3 kg/m², der schwerste einen von 34,66 kg/m². Der zugrundegelegte Normwert beträgt 27 kg/m². (siehe Tabelle und Abbildung 2.3.)

Tabelle 2.3.:

Body Mass Index	Patienten ohne Mutation	Patienten mit Mutation
Minimum	19,61 kg/m²	21,3 kg/m²
Mittelwert	26,496 kg/m²	25,873 kg/m²
Median	25,95 kg/m²	24,81 kg/m²
Maximum	34,22 kg/m²	34,66 kg/m²

Abbildung 2.3.:





2.4.Blutglucose

Die Höhe des mittleren Blutzuckerspiegels der Personen ohne Mutation beträgt 6,15 mmol/l, der Median liegt bei 5,2 mmol/l. Der höchste gemessene Wert ist 16,8 mmol/l, der niedrigste 4,5 mmol/l bei einer Standardabweichung von 2,45. Der durchschnittliche Blutglucosewert der Patienten mit Mutation liegt bei 5,129 mmol/l, der Median bei 5,2 mmol/l. Die Standardabweichung ist hierbei 0,095. Der kleinste gemessene Wert liegt in Höhe von 5,0 mmol/l, der größte bei 5,2 mmol/l. Die Referenzwerte für eine normoglycämische Stoffwechsellage stellen Blutzuckerspiegel zwischen 3,5 und 5,5 mmol/l dar. (siehe Tabelle und Abbildung 2.4.)

Tabelle 2.4.:

Blutglucose	Patienten ohne Mutation	Patienten mit Mutation
Minimum	4,5 mmol/l	5,0 mmol/l
Mittelwert	6,15 mmol/l	5,129 mmol/l
Median	5,2 mmol/l	5,2 mmol/l
Maximum	16,8 mmol/l	5,2 mmol/l

Abbildung 2.4.1.:

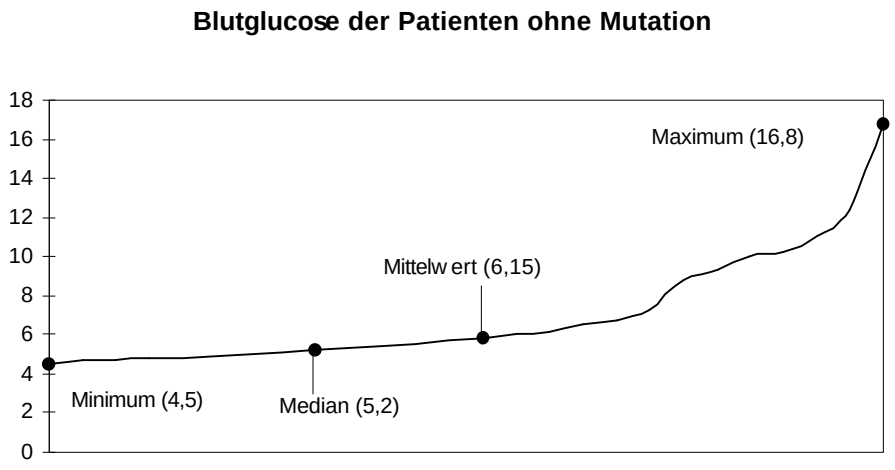
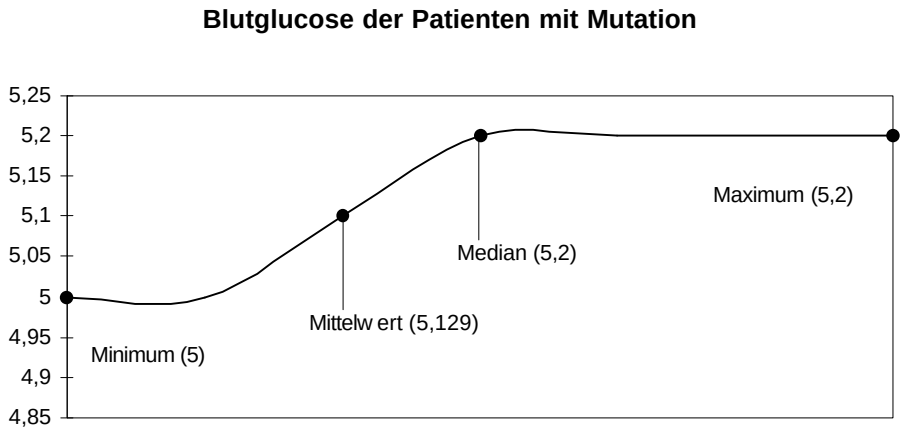


Abbildung 2.4.2.:



2.5.Nikotinkonsum

Zwischen Null und fünfzig Zigaretten täglich beträgt der durchschnittliche Nikotinkonsum der Patienten ohne Mutation 9,217 und der Median 4,5. Die Standardabweichung ist hierbei 10,962. Zwischen einem Minimum von Null und einem Maximum von zwanzig Zigaretten täglich liegt der durchschnittliche Nikotinabusus der Probanden mit Mutation bei 5,571 Zigaretten täglich. Der Median beträgt vier Zigaretten bei einer Standardabweichung von 7,345. (siehe Tabelle 2.5.)

Tabelle 2.5.:

Nikotinkonsum	Patienten ohne Mutation	Patienten mit Mutation
Minimum	0	0
Mittelwert	9,217	5,571
Median	4,5	4
Maximum	50	20

2.6.LDL-Cholesterin

Der mediane LDL-Cholesterinspiegel der Patienten ohne Mutation beträgt 3,46 mmol/l bei einer Standardabweichung von 0,796. Zwischen dem kleinsten gemessenen Wert von 1,88 mmol/l und dem Maximum von 5,12 mmol/l liegt der Durchschnitt bei 3,499 mmol/l. In einem der 46 untersuchten Fälle dieser Gruppe ist kein LDL-Cholesterinwert für die Analyse verfügbar. Der mittlere LDL-Cholesterinspiegel der Gruppe der Personen mit Mutation beträgt 3,16 mmol/l. Der Median ist 2,76 mmol/l bei einer Standardabweichung von 0,729. In Höhe von 2,52 mmol/l liegt der kleinste gemessene Wert, der größte bei 4,45 mmol/l. Als Referenzwert für ein hohes Risiko der Inzidenz einer koronaren Herzkrankheit gelten LDL-Cholesterinspiegel über 4,9 mmol/l, ein mäßiges Risiko besteht bei Werten zwischen 3,9 und 4,9 mmol/l. (siehe Tabelle und Abbildung 2.6.)

Tabelle 2.6.:

LDL-Cholesterin	Patienten ohne Mutation	Patienten mit Mutation
Minimum	1,88 mmol/l	2,52 mmol/l
Mittelwert	3,499 mmol/l	3,16 mmol/l
Median	3,46 mmol/l	2,76 mmol/l
Maximum	5,12 mmol/l	4,45 mmol/l

Abbildung 2.6.1.:

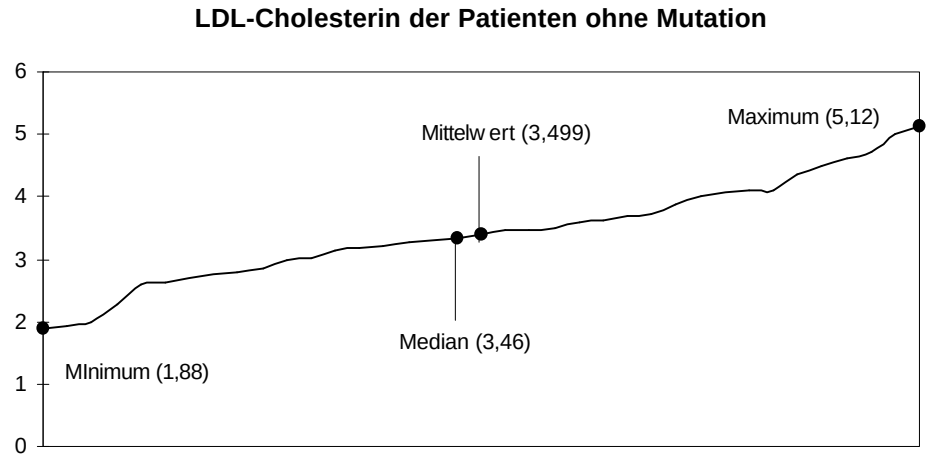
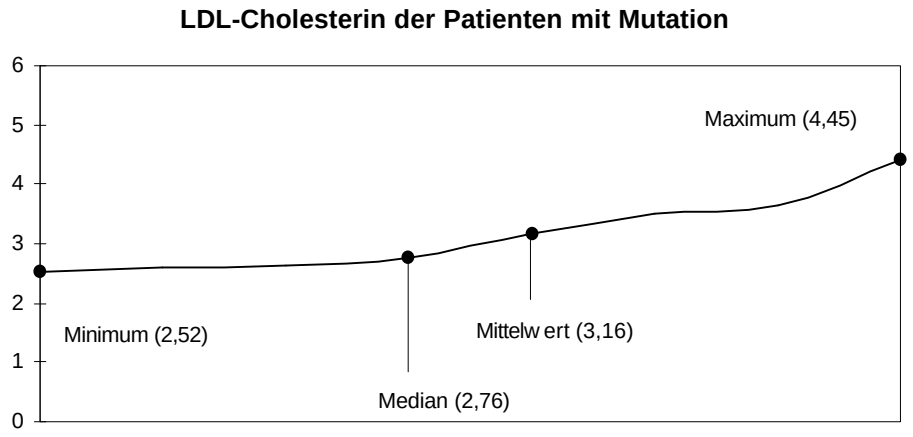


Abbildung 2.6.2.:



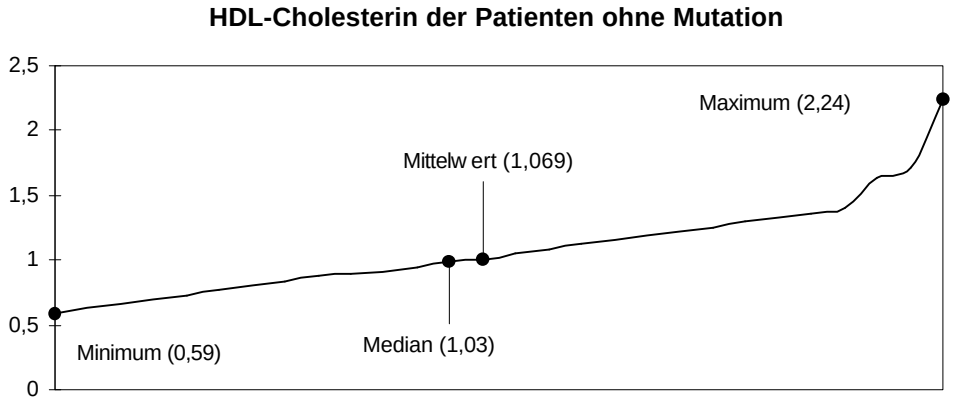
2.7.HDL-Cholesterin

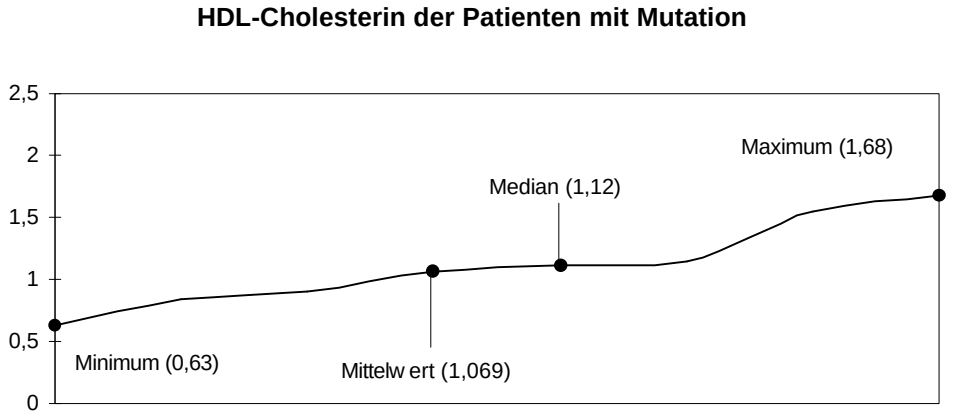
Der durchschnittliche HDL-Cholesterinspiegel des Kollektives ohne Mutation beträgt 1,069 mmol/l, der Median ist 1,03 mmol/l hoch. Der niedrigste Wert liegt bei 0,59 mmol/l, der größte in Höhe von 2,24 mmol/l. Die Standardabweichung ist 0,334. Zwischen einem Minimum von 0,63 mmol/l und einem Maximum von 1,68 mmol/l beträgt der durchschnittliche HDL-Cholesterinspiegel der Personen mit Mutation 1,069 mmol/l, der Median liegt bei 1,12 mmol/l. Die Standard-abweichung ist 0,729. Für das HDL-Cholesterin gelten als Referenzbereich für ein mäßiges Risiko der Inzidenz einer koronaren Herzkrankheit Werte zwischen 1,45 und 0,9 mmol/l, ein hohes Risiko besteht unterhalb von 0,9 mmol/l. (siehe Tabelle und Abbildung 2.7.)

Tabelle 2.7.:

HDL-Cholesterin	Patienten ohne Mutation	Patienten mit Mutation
Minimum	0,59 mmol/l	0,63 mmol/l
Mittelwert	1,069 mmol/l	1,069 mmol/l
Median	1,03 mmol/l	1,12 mmol/l
Maximum	2,24 mmol/l	1,68 mmol/l

Abbildung 2.7.:





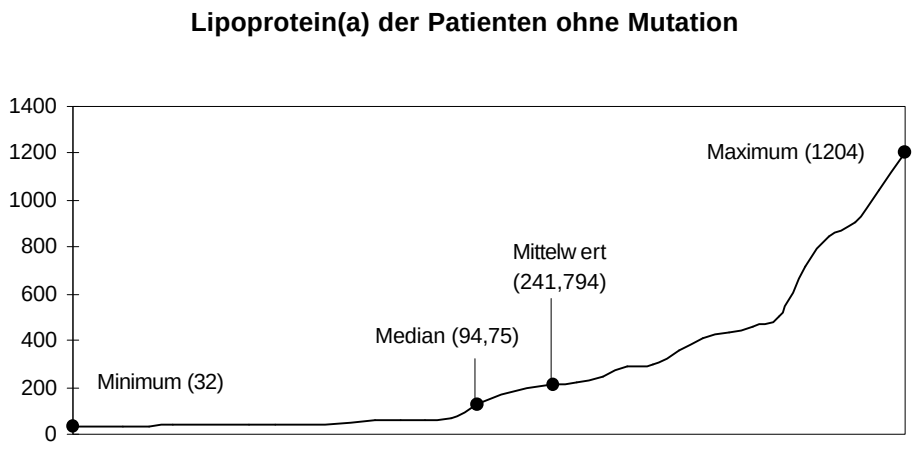
2.8.Lipoprotein(a)

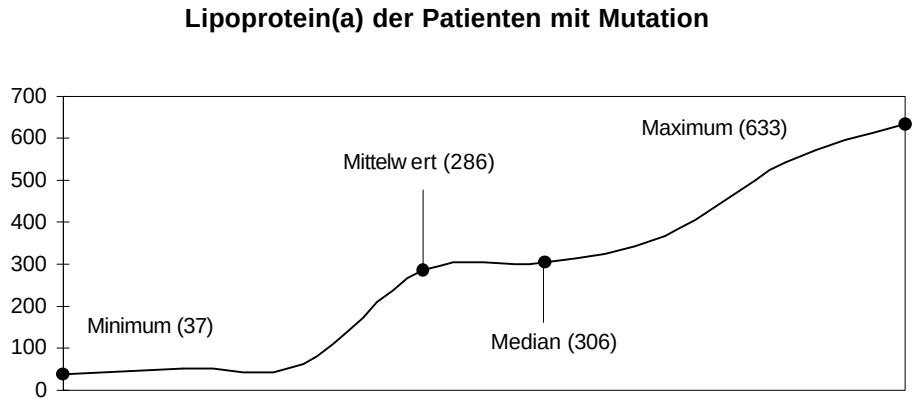
Der durchschnittliche Lipoprotein(a)-spiegel des Kollektives ohne Mutation beträgt 241,794 mmol/l, der Median ist 94,75 mmol/l hoch. Der niedrigste Wert liegt bei 32 mmol/l, der größte in Höhe von 1204 mmol/l. Die Standard-abweichung ist 305,484. Zwischen einem Minimum von 37 mmol/l und einem Maximum von 633 mmol/l liegt der mittlere Lp(a)-spiegel der Patienten mit Mutation in Höhe von 286 mmol/l. Der mediane Lp(a)-wert beträgt 306 mmol/l bei einer Standardabweichung von 244,758. Oberhalb eines Referenzwertes von 300 mg/l besteht ein erhöhtes Atheroskleroserisiko. (siehe Tabelle und Abbildung 2.8.)

Tabelle 2.8.:

Lipoprotein(a)	Patienten ohne Mutation	Patienten mit Mutation
Minimum	32 mmol/l	37 mmol/l
Mittelwert	241,794 mmol/l	286 mmol/l
Median	94,75 mmol/l	306 mmol/l
Maximum	1204 mmol/l	633 mmol/l

Abbildung 2.8.:

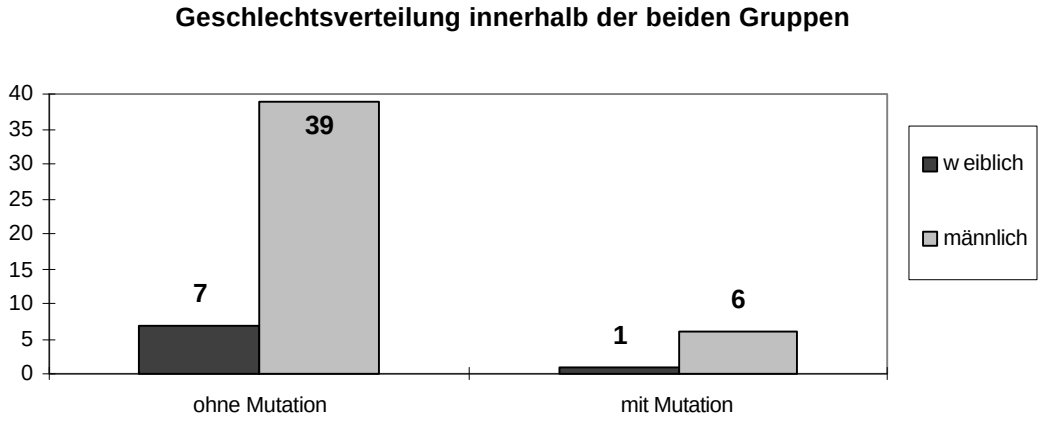




2.9.Geschlechtsverteilung

Von den 46 Personen des Patientenkollektives ohne Mutation sind sieben weiblichen Geschlechts (15,2%) und 39 männlichen Geschlechts (84,8%). Eine der sieben Personen der Gruppe der Patienten mit Mutation ist weiblichen Geschlechts (14,3%), die anderen sechs sind männlichen Geschlechts (85,7%). (siehe Abbildung 2.9.)

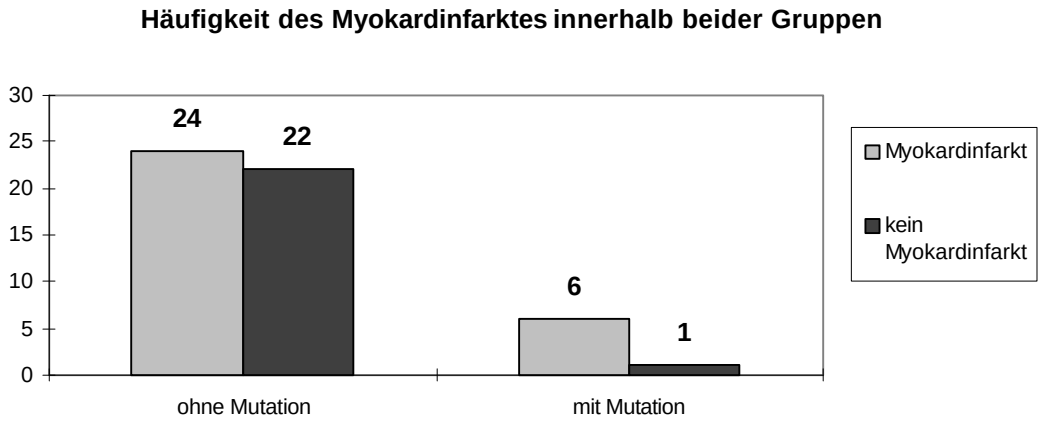
Abbildung 2.9.:



2.10.Häufigkeit des Myokardinfarktes

24 Probanden (52,2%) der Gruppe der Personen ohne Mutation haben zum Zeitpunkt der Untersuchungen bereits einen Myokardinfarkt erlitten, die übrigen 22 Patienten nicht (47,8%). Sechs der sieben Patienten mit Mutation haben vor den Untersuchungen bereits einen Myokardinfarkt erlitten (85,7%), eine Person nicht (14,3%). (siehe Abbildung 2.10.)

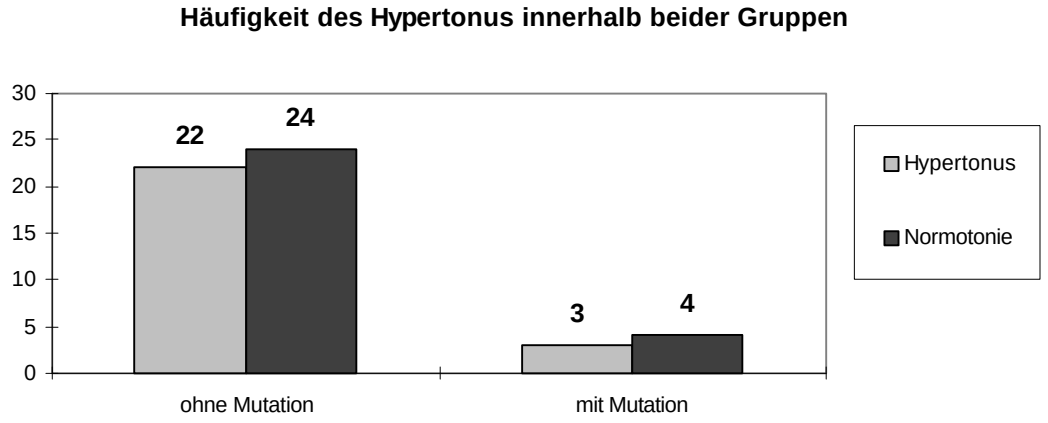
Abbildung 2.10.:



2.11.Häufigkeit der Hypertonie

Von den 46 Patienten des Kollektives ohne Mutation ist bei 22 Personen ein Bluthochdruck bekannt (47,8%). Die restlichen 24 Probanden (52,2%) haben normale Blutdruckverhältnisse. Drei von sieben Probanden mit Mutation (42,9%) leiden an einem Hypertonus, bei den übrigen vier Personen ist kein Bluthochdruck bekannt (57,1%). Von einer Hypertonie ist zu sprechen, wenn der systolische Blutdruck 160 mm Hg bzw. der diastolische Blutdruck 95 mm Hg überschreitet. (siehe Abbildung 2.11.)

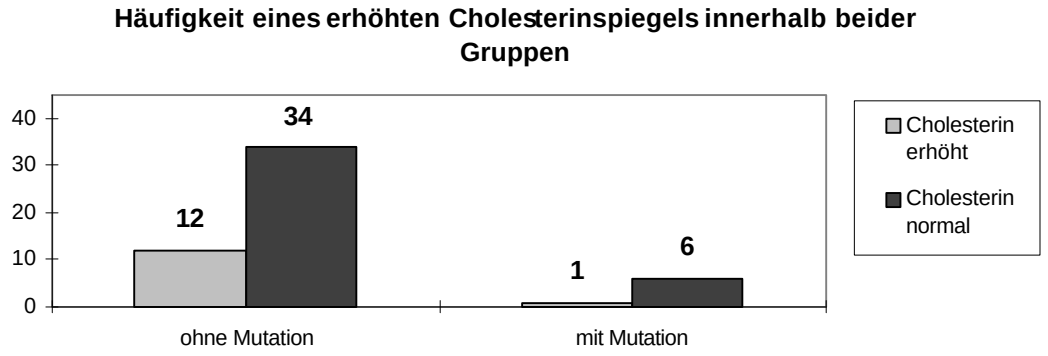
Abbildung 2.11.:



2.12.Häufigkeit eines erhöhten Cholesterinspiegels

Bei zwölf der 46 untersuchten Personen ohne Mutation findet sich ein erhöhter Cholesterinspiegel im Serum (26,1%), 34 Patienten haben normale Cholesterinwerte (73,9%). Ein Patient der Gruppe mit Mutation hat einen erhöhten Cholesterinspiegel (14,3%), bei den übrigen sechs Probanden liegen normale Cholesterinwerte vor (85,7%). Als Referenzwert für einen erhöhten Cholesterinspiegel gilt 6,2 mmol/l. (siehe Abbildung 2.12.)

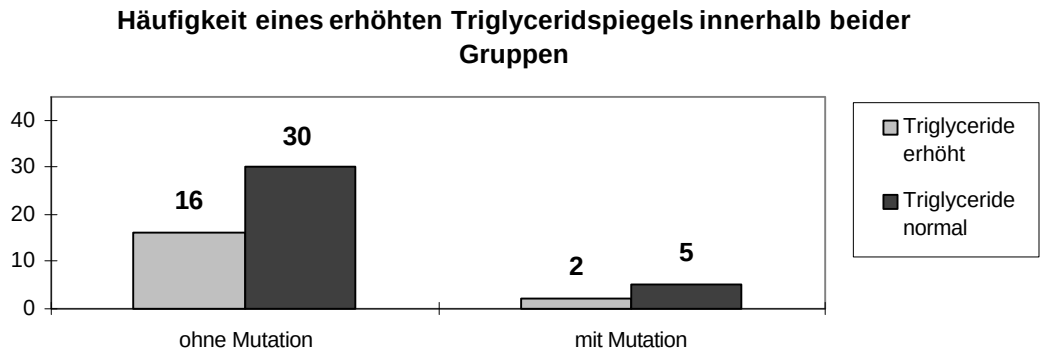
Abbildung 2.12.:



2.13.Häufigkeit eines erhöhten Triglyceridspiegels

Von den 46 untersuchten Patienten ohne Mutation liegen bei 16 Personen (34,8%) erhöhte Triglyceridwerte vor. 30 Probanden (65,2%) weisen normale Triglyceridspiegel auf. Bei zwei der sieben Personen des Kollektives mit Mutation finden sich erhöhte Triglyceridspiegel (28,6%), die restlichen fünf Personen haben normale Triglyceridwerte (71,4%). Der Referenzwert für einen erhöhten Triglyceridspiegel beträgt 2,3 mmol/l. (siehe Abbildung 2.13.)

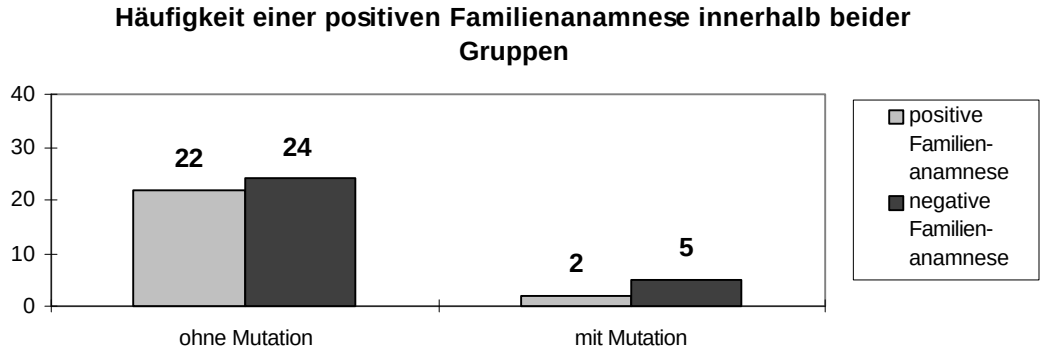
Abbildung 2.13.:



2.14.Häufigkeit einer positiven Familienanamnese

22 der 46 beobachteten Personen ohne Mutation haben eine positive Familienanamnese bezüglich einer Hypertonie bzw. einer koronaren Herzkrankheit (47,8%), 24 Patienten nicht (52,2%). Bei zwei der sieben Personen des Patientenkollektives mit Mutation findet sich eine positive Familienanamnese (28,6%), bei den übrigen fünf Probanden nicht (71,4%). (siehe Abbildung 2.14.)

Abbildung 2.14.:



3.Gruppenvergleich zwischen den Patienten mit bzw. ohne Mutation

3.1.Ergebnisse der mit dem **U-Test** verglichenen Parameter

Folgende Merkmale der beiden Patientengruppen sind mit dem **U-Test** nach **Mann** und **Whitney** und dem **Rangsummentest** nach **Wilcoxon** untersucht worden:

1. **Lebensalter**
2. **Body Mass Index**
3. **Nikotinkonsum**
4. **Blutglucose**
5. **LDL-Cholesterin**
6. **HDL-Cholesterin**
7. **Lipoprotein(a)**

3.1.1.Alter

Bezogen auf das Lebensalter findet sich im U-Test eine Irrtums-wahrscheinlichkeit von p = 0,8953. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen diesen Parameter betreffend. (siehe Tabelle 3.1.1.)

Tabelle 3.1.1.:

	Mutation ja	Mutation nein
mittlerer Rang	26,29	27,11
Summe der Ränge	184	1247
Anzahl der Fälle	7	46
U	156	
W	184	
p Irrtumswahrscheinlichkeit	**0,8953**	

3.1.2.Body Mass Index

Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von p = 0,4154 kann für dieses Merkmal keine bedeutsame Abweichung zwischen den Kollektiven festgestellt werden. (siehe Tabelle 3.1.2.)

Tabelle 3.1.2.:

	Mutation ja	Mutation nein
mittlerer Rang	22,57	27,67
Summe der Ränge	158	1273
Anzahl der Fälle	7	46
U	130	
W	158	
p Irrtumswahrscheinlichkeit	**0,4154**	

3.1.3.Nikotinkonsum

Für diesen Parameter läßt sich mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von p = 0,6248 keine bezeichnende Divergenz zwischen den beiden Patientenkollektiven nachweisen. (siehe Tabelle 3.1.3.)

Tabelle 3.1.3.:

	Mutation ja	Mutation nein
mittlerer Rang	24,5	27,38
Summe der Ränge	171,5	1260
Anzahl der Fälle	7	46
U	143,5	
W	171,5	
p Irrtumswahrscheinlichkeit	**0,6248**	

3.1.4.Blutglucose

Es liegt mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von p = 0,6163 kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen bezogen auf die Blutglucose vor. (siehe Tabelle 3.1.4.)

Tabelle 3.1.4.:

	Mutation ja	Mutation nein
mittlerer Rang	24,29	27,41
Summe der Ränge	170	1261
Anzahl der Fälle	7	46
U	142	
W	170	
p Irrtumswahrscheinlichkeit	**0,6163**	

3.1.5.LDL-Cholesterin

Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von p = 0,2669 läßt sich keine bedeutsame Differenz zwischen diesen Patientenkollektiven für das LDL-Cholesterin feststellen. (siehe Tabelle 3.1.5.)

Tabelle 3.1.5.:

	Mutation ja	Mutation nein
mittlerer Rang	19,07	25,43
Summe der Ränge	133,5	1144
Anzahl der Fälle	7	45
U	105,5	
W	133,5	
p Irrtumswahrscheinlichkeit	**0,2669**	

3.1.6.HDL-Cholesterin

Bezogen auf das HDL-Cholesterin ergibt sich im U-Test eine Irrtumswahrscheinlichkeit von p = 0,8525. Es kann keine bezeichnende Abweichung zwischen den beiden Gruppen für dieses Merkmal demonstriert werden. (siehe Tabelle 3.1.6.)

Tabelle 3.1.6.:

	Mutation ja	Mutation nein
mittlerer Rang	25,93	24,85
Summe der Ränge	181,5	1143
Anzahl der Fälle	7	46
U	140,5	
W	1143,1	
p Irrtumswahrscheinlichkeit	**0,8525**	

3.1.7.Lipoprotein(a)

Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von p = 0,4027 läßt sich kein signifikanter Unterschied für das Lipoprotein(a) bezogen auf die beiden Patientengruppen darstellen. (siehe Tabelle 3.1.7.)

Tabelle 3.1.7.:

	Mutation ja	Mutation nein
mittlerer Rang	28	23,3
Summe der Ränge	196	1072
Anzahl der Fälle	7	46
U	112	
W	1071,8	
p Irrtumswahrscheinlichkeit	**0,4027**	

3.2.Ergebnisse der mit dem **Chi²-Test** untersuchten Parameter

3.2.1.Geschlecht

Nach der Auswertung mit dem Chi²-Test ergibt sich für das Geschlecht der beiden Gruppen eine Irrtumswahrscheinlichkeit von p = 1,0. Es kann kein signifikanter Unterschied gezeigt werden. (siehe Tabelle 3.2.1.)

Tabelle 3.2.1.1.(Vierfelderkontingenztafel):

Anzahl Erwartungswert Reihenprozent Säulenprozent standardisierte Residuen	**Mutation** **nein**	**ja**	Reihe gesamt
männlich	39 39,1 86,7% 84,8% 0,0	6 5,9 13,3% 85,7% 0,0	45 84,9%
weiblich	7 6,9 87,5% 15,2% 0,0	1 1,1 12,5% 14,3% -0,1	8 15,1%
Säule gesamt	46 86,8%	7 13,2%	53 100%

Tabelle 3.2.1.2.(Chi²):

Chi²	Wert	**Signifikanz**
Pearson	0,00411	0,94885
Kontinuitätskorrektion	0,0	1,0
Wahrscheinlichkeits-verhältnis	0,00417	0,94853
Linearassoziation	0,00404	0,94934
Fisher		**1,0**

3.2.2.Myokardinfarkt

Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von p = 0,12304 im Chi²-Test läßt sich keine bedeutsame Divergenz zwischen den Patientenkollektiven den Myokardinfarkt betreffend demonstrieren. (siehe Tabelle 3.2.2.)

Tabelle 3.2.2.1.(Vierfelderkontingenztafel):

Anzahl Erwartungswert Reihenprozent Säulenprozent standardisierte Residuen	**Mutation** **nein**	**ja**	Reihe gesamt
kein Myokardinfarkt	22 20,0 95,7% 47,8% 0,5	1 3,0 4,3% 14,3% -1,2	23 43,4%
Myokardinfarkt	24 26,0 80,0% 52,2% -0,4	6 4,0 20,0% 85,7% 1,0	30 56,6%
Säule gesamt	46 86,8%	7 13,2%	53 100%

Tabelle 3.2.2.2.(Chi²):

Chi²	Wert	**Signifikanz**
Pearson	2,78239	0,09531
Kontinuitätskorrektion	1,58448	0,20812
Wahrscheinlichkeits-verhältnis	3,12218	0,07723
Linearassoziation	2,72989	0,09849
Fisher		**0,12304**

3.2.3.Hypertonus

Für den Parameter Bluthochdruck findet sich mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von p = 0,35314 keine bezeichnende Abweichung zwischen den beiden Gruppen. (siehe Tabelle 3.2.3.)

Tabelle 3.2.3.1.(Vierfelderkontingenztafel):

Anzahl Erwartungswert Reihenprozent Säulenprozent standardisierte Residuen	**Mutation** **nein**	**ja**	Reihe gesamt
Normotonie	24 24,3 85,7% 52,2% -0,1	4 3,7 14,3% 57,1% 0,2	28 52,8%
Hypertonus	22 21,7 88,0% 47,8% 0,3	3 3,3 12,0% 42,9% -0,8	25 47,2%
Säule gesamt	46 86,8%	7 13,2%	53 100%

Tabelle 3.2.3.2.(Chi²):

Chi²	Wert	**Signifikanz**
Pearson	4,41173	**0,35314**
Wahrscheinlichkeits-verhältnis	4,07015	0,39660
Linearassoziation	0,00243	0,96070

3.2.4.Cholesterin

Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von p = 1,0 stellt sich keine bedeutsame Differenz zwischen den Patientenkollektiven das Merkmal Cholesterin betreffend dar. (siehe Tabelle 3.2.4.)

Tabelle 3.2.4.1.(Vierfelderkontingenztafel):

Anzahl Erwartungswert Reihenprozent Säulenprozent standardisierte Residuen	**Mutation** **nein**	**ja**	Reihe gesamt
Cholesterin erhöht	12 11,7 92,3% 26,1% 0,2	1 1,3 7,7% 14,3% -0,5	13 24,5%
Cholesterin normal	34 34,3 85% 73,9% -0,1	6 5,7 15% 85,7% 0,2	40 75,5%
Säule gesamt	46 86,8%	7 13,2%	53 100%

Tabelle 3.2.4.2.(Chi²):

Chi²	Wert	**Signifikanz**
Pearson	0,31260	0,57609
Kontinuitätskorrektion	0,00488	0,94428
Wahrscheinlichkeits-verhältnis	0,34107	0,55921
Linearassoziation	0,30622	0,58001
Fisher		**1,0**

3.2.5.Triglyceride

Für den Parameter Triglyceride existiert mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von p = 0,31006 kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen. (siehe Tabelle 3.2.5.)

Tabelle 3.2.5.1.(Vierfelderkontingenztafel):

Anzahl Erwartungswert Reihenprozent Säulenprozent standardisierte Residuen	**Mutation** **nein**	**ja**	Reihe gesamt
Triglyceride erhöht	16 15,2 88,9% 34,8% -0,6	2 2,8 11,1% 28,6% -0,5	18 34%
Triglyceride normal	30 30,8 85,7% 65,2% 0,5	5 4,2 14,3% 71,4% 0,4	35 66%
Säule gesamt	46 86,8%	7 13,2%	53 100%

Tabelle 3.2.5.2.(Chi²):

Chi²	Wert	**Signifikanz**
Pearson	5,58365	0,01813
Kontinuitätskorrektion	3,71599	0,05389
Wahrscheinlichkeits-verhältnis	5,22693	0,02224
Linearassoziation	5,46970	0,01935
Fisher		**0,31006**

3.2.6.positive Familienanamnese

Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von p = 0,69017 zeigt sich keine bezeichnende Abweichung zwischen den beiden untersuchten

Patientenkollektiven eine positive Familienanamnese bezüglich einer Hypertonie bzw. einer koronaren Herzkrankheit betreffend. (siehe Tabelle 3.2.6.)

Tabelle 3.2.6.1.(Vierfelderkontingenztafel):

Anzahl Erwartungswert Reihenprozent Säulenprozent standardisierte Residuen	**Mutation** **nein**	**ja**	Reihe gesamt
positive Familien-anamnese	22 21,7 91,7% 47,8% 0,3	2 2,3 8,3% 28,6% -0,7	24 45,3%
negative Familien-anamnese	24 24,3 82,8% 52,2% -0,1	5 4,7 17,2% 71,4% 0,2	29 54,7%
Säule gesamt	46 86,8%	7 13,2%	53 100%

Tabelle 3.2.6.2.(Chi²):

Chi²	Wert	**Signifikanz**
Pearson	0,38565	0,53459
Kontinuitätskorrektion	0,04173	0,83814
Wahrscheinlichkeits-verhältnis	0,39966	0,52727
Linearassoziation	0,37809	0,53863
Fisher		**0,69017**

3.2.7.Zusammenfassung

Bei keinem der betrachteten Merkmale zeigt sich eine signifikante Abweichung zwischen den beiden Gruppen. (siehe Tabelle 3.2.7.)

Tabelle 3.2.7.:

Vergleichsparameter	**kritische Irrtumswahrscheinlichkeit p**	**Ergebnis**
Alter	0,8953	nicht signifikant
Body Mass Index	0,4154	nicht signifikant
Nikotinkonsum	0,6248	nicht signifikant
Blutglucose	0,6163	nicht signifikant
LDL-Cholesterin	0,2669	nicht signifikant
HDL-Cholesterin	0,8525	nicht signifikant
Lipoprotein(a)	0,4027	nicht signifikant
Geschlecht	1,0	nicht signifikant
Myokardinfarkt	0,12304	nicht signifikant
Hypertonus	0,35314	nicht signifikant
Cholesterin	1,0	nicht signifikant
Triglyceride	0,31006	nicht signifikant
positive Familien-anamnese	0,69017	nicht signifikant

Diskussion

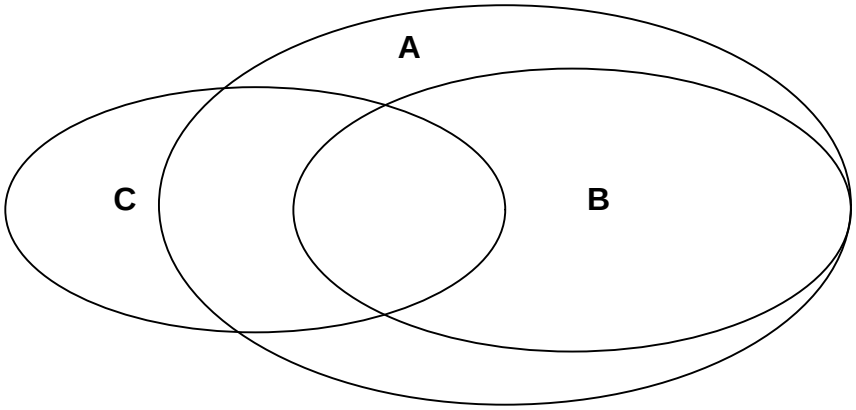
Die Atherosklerose und ihre Folgen sind für ca. 50% der Todesfälle in den USA, Europa und Japan verantwortlich (71). Sie ist die Hauptursache bei der Entwicklung der koronaren Herzkrankheit, des ischämischen Zerebralinsultes und der peripheren arteriellen Verschlußkrankheit (81). Bei der Atherogenese handelt es sich um einen komplexen Vorgang, der durch eine vielgestaltige Wechselwirkung zwischen Endothel, glatten Muskelzellen, Blutplättchen, Monozyten bzw. Makrophagen, aktivierten T-Lymphozyten sowie Wachstumsfaktoren und Zytokinen charakterisiert ist (81). Das initiale Ereignis der Atherogenese besteht nach dem Paradigma der „Response-to-injury"-Hypothese in einer „Verletzung" des Endothels durch verschiedene Risikofaktoren, welche eine endotheliale Dysfunktion bewirken (81). Die endotheliale Dysfunktion führt zum Erscheinen von spezifischen Adhäsionsmolekülen an der Oberfläche der Endothelzellen (33, 57, 81, 92). Monozyten und T-Lymphozyten binden an diese Rezeptoren und wandern unter dem Einfluß von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die durch das alterierte Endothel freigesetzt werden, durch die endotheliale Barriere (9, 13, 57, 81). Nachdem die Monozyten die Intima der Arterienwand erreicht haben, führt die Aufnahme von oxidiertem LDL-Cholesterin zur Formierung von isolierten Schaumzellen und später zur Bildung der „Fatty streaks". Die kontinuierliche Einwanderung von glatten Muskelzellen, Monozyten sowie Lymphozyten und deren Proliferation unter dem Einfluß der sezernierten Zytokine und Wachstumsfaktoren bewirkt die Progression der frühen Läsionen zu fibrösen Plaques (81, 94).

Die Entzündungsreaktion spielt eine wesentliche Rolle bei der Pathogenese menschlicher Krankheiten. An der Entzündungsreaktion sind neben zell- (Zytokine, Wachstumsfaktoren, Chemokine, Arachidonsäurederivate) und plasmavermittelten Mediatoren (Komplement-, Bradykinin/Kallikrein-, Gerinnungssystem) die Gefäßendothelien, die Thrombozyten und die verschiedenen Typen der Leukozyten in unterschiedlicher Art und Weise beteiligt (74). Einen wichtigen Bestandteil der Entzündungsprozesse repräsentieren leukozytär-endotheliale Interaktionen, welche in einer leukozytären Extravasation kulminieren (53). Die lokalisierte Akkumulation von Leukozyten im extravasalen Gewebe ist ein zelluläres Kennzeichen der Entzündung (27, 57). Nach dem „Multistep"-Paradigma, welches den heutigen Wissensstand über die leukozytär-endothelialen Interaktionen repräsentiert, kommt es bei diesen Vorgängen zu verschiedenen Schritten während der Adhäsion der Leukozyten an das Endothel (16, 43, 93). Das initiale Ereignis der Adhäsionskaskade besteht in der Aktivierung des Endothels durch Entzündungsmediatoren (19). Dabei kommt es zur Expression des E- und P-Selectins auf dem Endothel (9, 13, 19, 57). Durch die Selectine und ihre Liganden auf den Leukozyten wird der erste Schritt der leukozytär-endothelialen Adhäsionskaskade vermittelt (9, 13, 19, 57). Es resultiert ein Rollen der Leukozyten auf dem aktivierten Endothel (9, 13, 19, 57).

Während des „Rolling“-Intervalls kommt es durch vom Endothel stammende Chemokine zu einer Triggerung der β-Integrin-Expression auf den Leukozyten (19, 57). Durch Bindung dieser Integrine an deren endotheliale Liganden aus der Immunglobulin-Superfamilie resultiert ein stabiler „Arrest“ (19, 57). Die Leukozyten flachen ab, strecken Pseudopodien in Richtung der Interzellularverbindungen der angrenzenden Endothelzellen aus und wandern in die Intima der Gefäßwand ein (19, 57). Sind die Monozyten und die Lymphozyten im interstitiellen Raum angelangt, können sie das Endothel, glatte Muskelzellen und sich selbst durch die Sekretion von Zytokinen, Wachstums-faktoren und chemotaktischen Substanzen beeinflußen (19, 57, 63, 83, 91).
Die Mitglieder der Selectinfamilie sind für den ersten Schritt der leukozytär-endothelialen Interaktionen, dem „Rolling“, von großer Bedeutung (13). Verschiedene Studien haben die entscheidende Rolle der Lectin- und der EGF-like Domäne für die Selectin-vermittelten initialen „Rolling“-Interaktionen zeigen können. Die meisten adhäsionsblockierenden monoklonalen Antikörper erkennen Epitope innerhalb dieser Regionen (51, 66). Studien mit rekombinierten Fusionsproteinen, welche eine oder beide Domänen nicht enthalten, sowie mit Selectin-Chimären, bestehend aus verschiedenen Domänen der einzelnen Selectine, unterstützen die Wichtigkeit der beiden N-terminalen Domänen bei der Zelladhäsion (35, 51, 66).

Der Zusammenhang zwischen koronarer Herzkrankheit und genetischen Variationen ist eindeutig belegbar (24). Nachweise für die genetische Prädisposition zur koronaren Herzkrankheit stammen sowohl aus Familienuntersuchungen als auch aus Zwillingsstudien (5, 6, 62, 77, 88, 108). Bei der Betrachtung der Vererbbarkeit der koronaren Herzkrankheit darf die multifaktorielle Genese der Atherosklerose nicht außer acht gelassen werden (24). Zur Verdeutlichung dieser multifaktoriellen Entstehung läßt sich ein Venn-Modell anwenden (24). (Abb. 4.1.)

Abb. 4.1.:



Die einzelnen Ellipsen stellen Untergruppen der gesamten Population dar. Gruppe **A** faßt die Mitglieder der Population zusammen, die einer hohen atherogenen Umweltbelastung ausgesetzt sind. Gruppe **B** repräsentiert die Personen innerhalb der Gesamtpopulation, welche ein höheres atherogenes Risiko infolge einer Erkrankung haben, die zusätzlich für die Atherogenese prädisponiert (Hypertonus, Diabetes mellitus). Gruppe **C** schließt die Individuen ein, welche genetische Varianten besitzen, die eine Prädisposition zur Entwicklung einer Atherosklerose verleihen. Wenn diese genetische Anfälligkeit mit anderen Risikofaktoren zusammentrifft, beginnt die Atherogenese und die Betroffenen erkranken (24). Insbesondere die Verbindungen der genetischen Variationen der Lipoproteine und des Lipidmetabolismus zur peripheren arteriellen Verschlußkrankheit und zur koronaren Herzkrankheit sind gut bekannt und haben wertvolle Erkenntnisse über die Entstehung der Atherosklerose geliefert (24, 46). Andere genetische Risikofaktoren der KHK wie der ACE-bzw. Angiotensinogen-Polymorphismus werden zur Zeit intensiv analysiert und weisen diese Polymorphismen als unabhängige Risikofaktoren für die koronare Herzkrankheit und den Myokardinfarkt aus (1, 17, 47). Die Untersuchungen von Miettinen in einer Gruppe junger Patienten mit koronarer Herzkrankheit aus Nordkarelien zeigt jedoch keine signifikante Assoziation der betrachteten Kandidatengene (ACE; Apolipoproteine AI, B, CIII, E) mit dem Risiko an einer vorzeitigen KHK zu erkranken (60). Somit scheinen weitere genetische Loci für die Entstehung einer frühen Atherosklerose verantwortlich zu sein (106).

Der Einfluß weiterer genetischer Faktoren bei der Atherogenese wird durch die Entdeckung von DNA- und Proteinpolymorphismen der Selectine bzw. ihrer kodierenden Gene verdeutlicht (106,107). Wenzel et al. beschreiben in einer Studie die Assoziation der S128R-Mutation der EGF-Domäne des E-Selectins mit dem Auftreten einer schweren vorzeitigen Atherosklerose bei Patienten, die jünger als fünfzig Jahre sind (107). Die Inzidenz dieses Polymorphismus ist mit ca. 29% bei den Erkrankten deutlich höher als in einer Gruppe freiwilliger Probanden (15,7%) und zeigt eine statistische Signifikanz für das erhöhte Auftreten der Mutation ($p = 0,02$) im Kollektiv der Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe (107). In der Untergruppe der Probanden unter vierzig Jahre findet sich mit 40% eine noch höhere Frequenz der Mutation ($p = 0,0025$) (107). Die Autoren sehen darin einen unabhängigen Risikofaktor für die vorzeitige Atherosklerose (107). Es ergibt sich die Frage nach der Inzidenz der Mutation in einem Patientenkollektiv älter als fünfzig Jahre. Als Hypothese läßt sich im Analogieschluß zu den Ergebnissen von Wenzel et al. eine geringere Frequenz der Mutation in dieser Patientengruppe vermuten. Bei der Auswertung der Ergebnisse der Studie, welche die Grundlage dieser Arbeit darstellt, findet sich innerhalb eines Patientenkollektives mit einem durchschnittlichen Alter über fünfzig Jahre und interventionsbedürftigen Koronararterienstenosen eine Häufigkeit der Mutation mit ca. 13%. (siehe 2.1. Kap. Ergebnisse) Diese Häufigkeit liegt somit in Höhe der Frequenz der Mutation innerhalb der Kontrollgruppe der Studie von Wenzel et al (107).

Die Beobachtung einer geringeren Frequenz der Mutation in höherem Alter stützt die Schlußfolgerung der Arbeit von Wenzel et al., welche in der S128R-Mutation einen unabhängigen Risikofaktor für eine vorzeitige Atherosklerose sehen (107). Aufgrund des nahezu identischen Designs der beiden Untersuchungen mit analogen Einschlußkriterien (Alter der Patienten < bzw. > als fünfzig Jahre, interventionsbedürftige KHK) und gleichen Methoden (Anamnese und klinisch-chemische Bestimmung der Risikofaktoren sowie molekularbiologische Analyse) ist der Vergleich der Ergebnisse zulässig und beabsichtigt.

Die Mitglieder der Selectinfamilie sind für den ersten Schritt der leukozytär-endothelialen Interaktionen, dem „Rolling“, von großer Bedeutung (13). Verschiedene Studien haben die entscheidende Rolle der Lectin- und der EGF-like Domäne für die Selectin-vermittelten initialen „Rolling“-Interaktionen zeigen können. Die meisten adhäsionsblockierenden monoklonalen Antikörper erkennen Epitope innerhalb dieser Regionen (51, 66). Studien mit rekombinierten Fusionsproteinen, welche eine oder beide Domänen nicht enthalten, sowie mit Selectin-Chimären, bestehend aus verschiedenen Domänen der einzelnen Selectine, unterstützen die Wichtigkeit der beiden N-terminalen Domänen bei der Zelladhäsion (35, 51, 66). Die Funktion der Lectin-like Domäne scheint absolut abhängig von der EGF-Domäne zu sein (50, 66). Obwohl Graves et al. als Determinanten des Kontaktes mit der Lectin-like Domäne die Positionen 135-139 der EGF-Domäne postulieren, kann der Einfluß der S128R-Mutation für das Bindungsverhalten nicht ausgeschlossen werden (40, 106). Auch der von Wenzel et al. beschriebene Basenaustausch von Guanin zu Thymin an der Position 98 der 5´-untranslated-Region scheint durch seine Korrelation mit der S128R-Mutation eine eigene regulatorische Wirkung auf die Bindungsfähigkeit zu besitzen (106). Diese Wechsel-beziehungen können als hypothetische Erklärung für eine möglicherweise erhöhte Adhärenz von Leukozyten am Endothel dienen. Genauere Erkenntnisse über den Einfluß des Proteinpolymorphismus S128R der EGF-Domäne auf das Bindungsverhalten des mutierten bzw. unmutierten E-Selectins mit seinen Liganden auf den weißen Blutzellen dürften jedoch erst aus weiteren Untersuchungen, insbesondere aus In-vitro-Bindungsstudien, zu Tage kommen und zur Entwicklung eines pathophysiologischen Modells der Vorgänge in vivo beitragen (106, 107).

Die Rolle der Risikofaktoren bei der Entstehung der Atherosklerose ist unumstritten. Dazu gehören Dyslipidämie, Nikotinabusus, Hypertonus, Diabetes mellitus und Adipositas (4, 73). Obwohl der heutige Erkenntnisstand noch viele Fragen zur genauen Wirkungsweise offenläßt, scheinen die Risikofaktoren auf verschiedene Schritte während des atherogenetischen Prozesses Einfluß zu nehmen (61).

Die Adipositas besitzt wohl keine direkte atherogene Wirkung, hat jedoch im Rahmen des metabolischen Syndroms; eines gemeinsamen Auftretens von gestörter Glucosetoleranz infolge peripherer Insulinresistenz, Dyslipidämie und Hypertonus sowie eines erhöhten Body Mass Index; Einfluß auf die Entstehung einer Atherosklerose (4, 29, 33). Die Grenzen zwischen Übergewicht und Fettsucht sind fließend, jedoch besteht ab einem BMI > 27 kg/m² eine Fettsucht, welche mit einer erhöhten Morbidität aufgrund der gesteigerten Inzidenz des metabolischen Syndroms einhergeht. Dieser Wert entspricht einem Übergewicht von 20% des relativen Körpergewichtes, welches sich als Quotient von effektiver Körpermasse und Optimalgewicht multipliziert mit 100 errechnet (29). Beim Vergleich der Höhe des BMI tritt eine Divergenz zwischen den beiden Gruppen auf. (siehe Tab. und Abb. 2.3. Kap. Ergebnisse) Im Kollektiv der Patienten ohne Mutation haben ca. 40% der Probanden einen BMI über 27 kg/m². In der Gruppe der Patienten mit Mutation liegen nur ca. 14% oberhalb dieses Wertes. Es zeigt sich hier scheinbar ein Unterschied bezüglich des BMI und der daraus resultierenden Morbidität zwischen den beiden Kollektiven. Jedoch findet sich beim statistischen Vergleich mit dem U-Test nach Mann und Whitney keine signifikante Divergenz zwischen den beiden Patientenkollektiven bezüglich des BMI, desweiteren findet sich kein Beweis für ein erhöhtes Auftreten der Adipositas insgesamt. (siehe 2.3. und 3.1.2. Kap. Ergebnisse) Der BMI korreliert schlußfolgernd nicht mit der Inzidenz der Mutation, gleichzeitig stellt sich der Risikofaktor Fettsucht als unerheblich innerhalb des gesamten Patientenkollektives dar. Die Erklärung des letzteren Faktums liegt wohl hauptsächlich in der relativ geringen Fallzahl der Studie. Bei 53 Beobachteten ist die Größe der Stichprobe mit Sicherheit zu klein, um eine Aussage über die Korrelation der Adipositas mit der koronaren Herzkrankheit zu tätigen, was an sich auch nicht Motivation für diese Untersuchungen war. Diese Aufgabe bleibt den großen epidemiologischen Studien vorbehalten.

Die arterielle Hypertonie stellt einen wichtigen Risikofaktor der Atherosklerose dar. Über verschiedene Mechanismen wie Scherkräfte, Dehnungsreize und vasoaktive Substanzen führt die Hypertension zur Beschleunigung der dem atherogenetischen Prozeß zugrundeliegenden fibroproliferativen Reaktion der Gefäßwand auf eine endotheliale Verletzung (33). Zudem existieren profunde Wechselbeziehungen zwischen Hypertension und Lipidmetabolismus, über welche es zur Verstärkung einer Dyslipidämie kommen kann (26, 34, 84). Nach der Einteilung der WHO (1978) ist von einer Hypertonie zu sprechen, wenn der systolische Blutdruck 160 mm Hg bzw. der diastolische Blutdruck 95 mm Hg überschreitet (85). Für das Auftreten eines Bluthochdrucks zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen in der statistischen Auswertung. (siehe 2.11. und 3.2.3. Kap. Ergebnisse) Es stellt sich somit keine Abhängigkeit für das Auftreten der Mutation von der Häufigkeit eines Hypertonus dar. Ungefähr die Hälfte aller Patienten weist jedoch einen Hypertonus auf. Hier stellt sich die Übereinstimmung mit den Daten vieler Untersuchungen dar, welche die Hypertension als Risikofaktor der Atherosklerose ausweisen (32, 49, 58).

Ein weiterer wichtiger atherogenetischer Risikofaktor ist der Nikotinabusus. Er erhöht das Risiko einer kardiovaskulären Erkrankung um den Faktor zwei bis drei (4). Das eigentliche atherogene Agenz im Zigarettenrauch ist bislang nicht bekannt, jedoch existieren Beweise für die Beeinflussung der Thrombozyten-funktion, der Plasmaspiegel der Lipoproteine, der Makrophagentätigkeit und der hämodynamischen Regulation durch das inhalative Rauchen (41, 61). Außerdem wird es als kausaler Faktor der endothelialen Verletzung betrachtet, welche am Anfang des atherogenetischen Prozesses steht (86). Hierbei scheint das im Zigarettenrauch enthaltene Kohlenmonoxid von Bedeutung zu sein, da CO einen ischämischen Gewebsschaden bewirken kann (73). Gleichzeitig verursacht das Rauchen durch bestimmte mutagene Substanzen eine Veränderung des Proliferationsstoffwechsels der Gefäßwandzellen (73). In beiden Kollektiven liegt die Anzahl der Nichtraucher bei ca. 43% bzw. 48%. Die Anzahl der Patienten, deren Nikotinabusus 10 Zigaretten täglich überschreitet, beträgt für die Gruppe der Personen ohne Mutation ca. 48% und für die Patienten mit Mutation ca. 29%. Hier tritt eine gewisse Abweichung auf. Beim statistischen Vergleich findet sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. (siehe 3.1.3. Kap. Ergebnisse) Das Auftreten der Mutation scheint nicht durch den Nikotinkonsum der Patienten beeinflußt zu werden. Zudem läßt sich bei einer Standardabweichung von von ca. 10 innerhalb der Gruppe der Patienten ohne Mutation bzw. ca. 7 bei den Personen mit Mutation keine sinnvolle Aussage über den Nikotinkonsum treffen (39). (siehe 2.5. Kap. Ergebnisse) Die Bedeutung des inhalativen Rauchens für die Entwicklung der Atherosklerose darf jedoch keinesfalls in Abrede gestellt werden. Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen dieser Studie und den anderen Untersuchungen läßt sich wiederum durch die geringe Fallzahl erklären, zum anderen hat ein Großteil der Patienten vor Beginn der Krankheit Nikotinabusus betrieben, ihn jedoch seit längerer Zeit aufgegeben, wie aus den Patienteninterviews ersichtlich war. Somit kann die Rolle des Nikotinkonsums für die Entstehung der KHK bei diesen Personen nicht ausgeschlossen werden. Insofern läßt sich diese scheinbare Diskrepanz relativieren.

Ebenso wie die Adipositas hat auch der Diabetes mellitus keine unmittelbare atherogenetische Wirkung (4). Jedoch bestehen vielfältige synergistische Mechanismen zwischen Dyslipidämie, Hypertonus und gestörter Glucosetoleranz bei der Atherogenese (33). Endotheliale Dysfunktion, veränderte Thrombozytenfunktion und erhöhte Fibrinogenspiegel gehen ebenfalls mit dem Diabetes mellitus einher und weisen auf diese Wechselwirkungen der Risikofaktoren hin (95). In Bezug auf die Höhe des Blutzuckers läßt sich scheinbar eine Abweichung zwischen den Patientenkollektiven beobachten. Bei gleichen Medianen divergieren die Mittelwerte um ca. 1 mmol/l. (siehe 2.4. Kap. Ergebnisse) So liegt bei ca. 30% der Personen der Gruppe ohne Mutation der Blutglucosespiegel oberhalb des Referenzwertes für einen normalen BZ-wert von 5,5 mmol/l (42). Innerhalb des Kollektives der Patienten mit Mutation tritt kein Wert oberhalb von 5,5 mmol/l auf.

Als Schlußfolgerung ergäbe sich ein Hinweis auf eine erhöhte Inzidenz der gestörten Glucosetoleranz in der Gruppe der Patienten ohne Mutation. Zwei Gegenargumente sind hier anzubringen. Zum einen läßt sich aus einer einmaligen Bestimmung des Blutzuckers kein Rückschluß auf das Auftreten eines Diabetes mellitus schließen. Dazu müßten weitere Untersuchungen wie Blutglucose-Tagesprofil bzw. oraler Glucosetoleranztest erfolgen (29). Insofern weist der Studienaufbau hier einen gewissen systematischen Fehler auf. Zum anderen beschreibt die statistische Auswertung keine bedeutsame Abweichung der Kollektive bezüglich dieses Merkmales voneinander. (siehe 3.1.4. Kap. Ergebnisse) Es ist somit kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen zu verzeichnen. Die Inzidenz der Mutation zeigt somit keine Abhängigkeit von der Höhe der Blutglucose. Es darf jedoch kein Zweifel an der Rolle des Diabetes mellitus bei der Atherogenese bestehen, da diese Studie keinerlei Aussage zur Korrelation von KHK und Diabetes treffen kann.

Die Rolle der Hypercholesterinämie bei der Atherogenese ist erwiesen (4, 73). Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen im statistischen Vergleich keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Patientenkollektiven bezüglich eines erhöhten Cholesterinspiegels. Zugleich findet sich keine Abhängigkeit der Inzidenz der Mutation von der Häufigkeit eines erhöhten Cholesterinwertes. (siehe 2.12. und 3.2.4. Kap. Ergebnisse) Der größere Teil der Patienten beider Gruppen hat normale Cholesterinspiegel. Erklärbar ist dies durch die Wahl des Referenzwertes für das Cholesterin einerseits, zum anderen bleibt die Einnahme eines Lipidsenkers wie eines β-HMG-CoA-Hemmers unberücksichtigt. Entsprechend den Empfehlungen der „NIH Consensus Development Conference on Blood Cholesterol“ von 1984 wurde als Referenzwert für ein mäßiges Risiko der Inzidenz einer koronaren Herzkrankheit bei Patienten älter als vierzig Jahre ein Cholesterinspiegel von größer als 6,2 mmol/l festgelegt (75). Andere Autoren sehen in einem Cholesterinwert größer als 5,2 mmol/l ein mäßiges Risiko (96). Diese unterschiedliche Auffassung ist seit Jahren Streitpunkt wissenschaftlicher Diskussionen, dieser Disput soll an dieser Stelle nicht weiter aufgegriffen werden. Bei der Entwicklung der Kriterien dieser Studie wurde zugunsten des größeren Wertes entschieden, da unter anderem der Schwellenwert für ein erhöhtes Risiko einer koronaren Herzkrankheit dem für diese Studie gewählten Referenzwert näherliegt (75). Auch die Einnahme eines lipidsenkenden Medikamentes beeinflußt die Höhe des Cholesterinspiegels. Diese Angaben liegen jedoch nicht vor und so muß diese Tatsache als systematischer Fehler angesehen werden, da die Einnahme eines Lipidsenkers bezüglich des Cholesterinspiegels falsch negative Werte bedingen kann. Daher dürfen die Ergebnisse dieser Studie nicht als Argument gegen die Bedeutung des Cholesterins gewertet werden. Die Ergebnisse dieser Studie weichen zudem von den Resultaten der Untersuchungen von Wenzel et al. ab, die eine Korrelation von normalen Cholesterinwerten mit dem Auftreten der S128R-Mutation festgestellt haben (107).
Eine Erklärung dieses Faktums liegt wahrscheinlich in der relativ geringen Fallzahl der Probanden dieser Studie, wodurch sich eher zufällig dieses

Ergebnis präsentiert. Zugleich muß auch das Resultat von Wenzel et al. kritisch betrachtet werden, erst weitere Untersuchungen können deren Ergebnis bezüglich des Einflusses des Cholesterinwertes auf die Inzidenz der Mutation bestätigen.

Insbesondere die LDL-Fraktion des Cholesterins besitzt ein hohes atherogenes Potential (20, 56). Die genauen Mechanismen der atherogenen Wirkung des LDL-Cholesterins liegen zum einen in der Fähigkeit das Endothel direkt zu verletzen, zum anderen in der chemo- und zytokinetischen Wirkung von LDL-Cholesterin (23, 109). Bei der statistischen Untersuchung findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Patientenkollektiven die Höhe des LDL-Cholesterinwertes betreffend. (siehe 3.1.5. Kap. Ergebnisse) Zudem liegt in der Gruppe der Patienten ohne Mutation der LDL-Cholesterinspiegel bei nur ca. 5% der Beobachteten oberhalb des empfohlenen Referenzwertes von 4,9 mmol/l für ein hohes Risiko der Inzidenz einer koronaren Herzkrankheit (2, 75). Innerhalb des Kollektives der Personen mit Mutation tritt dieser Fall nicht auf. Auch für den Rahmen eines mäßigen Risikos (Referenzbereich: 3,9 bis 4,9 mmol/l) gelten ähnliche Verhältnisse für die beiden untersuchten Gruppen. (siehe 2.6. Kap. Ergebnisse) Somit ist auch für das Risiko der Inzidenz einer koronaren Herzkrankheit (bezüglich der Höhe des LDL-Cholesterins) kein Unterschied zwischen den Patientenkollektiven festzustellen. Schlußfolgernd stellt sich das Auftreten der Mutation als unabhängig vom LDL-Cholesterinspiegel dar. Hier treffen die zum Cholesterin getroffenen Aussagen bezüglich der Wertigkeit des betrachteten Parameters ebenso zu.

Dem HDL-Cholesterin wird eine protektive Wirkung zugeschrieben. In vielen epidemiologischen Studien zeigen HDL-Werte eine umgekehrte Relation zum Risiko einer koronaren Herzkrankheit (96). Der Mechanismus, der noch nicht vollends geklärt ist, liegt wahrscheinlich im Rücktransport von Cholesterin aus dem Gewebe zur Leber (96). Niedrige HDL-Cholesterinspiegel sind oft mit mangelnder körperlicher Betätigung, Adipositas und Nikotinabusus verbunden, Umweltfaktoren, die das Risiko einer KHK erhöhen (96). Für den HDL-Cholesterinspiegel gelten als Referenzbereich für ein mäßiges Risiko der Inzidenz einer koronaren Herzkrankheit Werte zwischen 1,45 bis 0,9 mmol/l (2, 75). In beiden Gruppen liegt das HDL-Cholesterin bei ca. 86% bzw. 90% der Patienten unterhalb von 1,45 mmol/l, also im Rahmen eines mäßigen Risikos. (siehe 2.7. Kap. Ergebnisse) Ein hohes Risiko besteht bei einem HDL-Cholesterinspiegels kleiner als 0,9 mmol/l (2, 75). Innerhalb der Gruppe der Patienten ohne Mutation ist dieser Wert bei ca. 36% der Beobachteten unterschritten, bei den Personen mit Mutation bei ca. 29%. Es läßt sich somit für die meisten Probanden ein mäßiges Risiko für die Inzidenz einer koronaren Herzkrankheit feststellen. Zusätzlich ergibt sich bei der statistischen Analyse kein signifkanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. (siehe 3.1.6. Kap. Ergebnisse)
Die Inzidenz der Mutation kann nicht durch eine Abhängigkeit vom HDL-Cholesterinspiegel erklärt werden. Zudem stellt sich hier eine Übereinstimmung

mit den Ergebnissen der Studien dar, welche die inverse Beziehung des HDL-Cholesterinspiegels mit dem Risiko der KHK aufzeigen konnten.

Die Rolle des Lipoproteins(a) als ein weiterer Risikofaktor der Atherosklerose konnte in mehreren Studien erwiesen werden (8, 72, 79). Die Höhe des Plasmaspiegels korreliert mit dem Risiko der koronaren Herzkrankheit (30, 72). Der Apolipoproteinanteil des Lp(a) hat eine auffällige Homologie zum Plasminogen, was eine Beeinflussung des fibrinolytischen Systems durch hohe Lp(a)-spiegel über kompetetive Inhibition des Plasminogens nahelegt (7, 15). Diese Verbindung wird als ein Indiz für den Zusammenhang von Atherogenese und Thrombogenese gewertet, den zwei grundlegenden pathogenetischen Prozessen des Myokardinfarktes (7, 37). Innerhalb der Gruppe der Patienten ohne Mutation liegt der Lipoprotein(a)-spiegel bei 25% oberhalb des Referenzwertes von 300 mg/l für ein erhöhtes Atheroskleroserisiko (75). Bei den Personen mit Mutation trifft dies in ca. 57% der Fälle zu. (siehe 2.8. Kap. Ergebnisse) Der scheinbare Unterschied erklärt sich zum einen aus der geringen Anzahl der Fälle in der Gruppe der Patienten mit Mutation. (siehe 2.1. Kap. Ergebnisse) Zum anderen widerlegt das Ergebnis der statistischen Analyse diese Abweichung. (siehe 3.1.7. Kap. Ergebnisse) Somit unterscheiden sich beide Gruppen bezogen auf dieses Merkmal nicht signifikant voneinander. Folglich läßt sich keine Abhängigkeit des Auftretens der Mutation aus der Höhe des Lipoprotein(a)-spiegels ableiten. Zudem ist es, statistisch gesehen, durch die große Streuung der Werte (Standard-abweichungen von ca. 245 bzw. ca. 305) sehr schwierig, sinnvolle Aussagen zur Häufigkeitsverteilung innerhalb der Gruppen zu treffen (39). Jedoch dürfen die Ergebnisse dieser Studie nicht als Argument gegen die Bedeutung des Lipoproteins(a) bei der Atherogenese verwendet werden.

Die Rolle der Hypertriglyceridämie als Risikofaktor der Atherosklerose wird unterschiedlich bewertet, obwohl viele Patienten erhöhte Triglyceridwerte aufweisen (4, 45, 73, 75). So stellen sich bei den follow-up-Ergebnissen der Stockholm Prospective Study (SPS) erhöhte Plasmaspiegel von Triglyceriden als unabhängiger Risikofaktor für die Inzidenz eines Myokardinfarktes dar, während die follow-up-Ergebnisse der Western Collaborative Group Study (WCGS) zwar die Hypercholesterinämie als unabhängigen Risikofaktor ausweist, jedoch nicht die Hypertriglyceridämie (22, 45). Diese unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich neben ethnischen und geografischen Unterschieden insbesondere durch die Auswahl der Endpunkte der Studien erklären, welcher zum einen als nachgewiesener Myokardinfarkt bzw. Tod infolge koronarer Herzkrankheit (SPS), zum anderen als klinisch manifeste koronare Herzkrankheit (WCGS) festgelegt wurde (21). Bei den dieser Arbeit zugrundeliegenden Untersuchungen fanden sich erhöhte Triglyceridwerte in 34,8% (Patienten ohne Mutation) bzw. 28,6% (Probanden mit Mutation) der Fälle innerhalb der beiden untersuchten Gruppen.
Als erhöhte Triglyceridspiegel wurden hierbei Werte von über 2,3 mmol/l angesehen (14, 29). Bei der statistischen Analyse zeigt sich kein signifikanter Unterschied bezüglich dieses Merkmals. (siehe 2.13. und 3.2.5. Kap.

Ergebnisse) Es kann keine Abhängigkeit des Auftretens der Mutation von der Häufigkeit eines erhöhten Triglyceridspiegels demonstriert werden. Hier findet sich eine Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Wenzel et al., die keinerlei Zusammenhang zwischen der Höhe des Triglyceridspiegels und der Inzidenz der Mutation feststellen konnten (107). Hier gelten die gleichen Anmerkungen bezüglich der Aussagekraft der beiden Untersuchungen, welche bereits zur Interpretation der Ergebnisse hinsichtlich des Cholesterins getroffen wurden. Ebenso kann diese Studie keine Auskunft bezüglich der Korrelation von Hypertriglyceridämie und koronarer Herzkrankheit geben.

Unabhängig vom Alter, jedoch insbesondere bei jungen Personen, ist das Risiko der koronaren Herzkrankheit für Männer größer als für Frauen (96). Als Erklärung dient zum einen die Beobachtung höherer HDL- und niedrigerer LDL-Cholesterinspiegel bei Frauen im Vergleich zu Männern. Dieses Faktum wird auf die noch wenig untersuchte Schutzwirkung der weiblichen Geschlechtshormone zurückgeführt (73). Die Ergebnisse dieser Studie weisen keinerlei Unterschied für die Geschlechtsverteilung zwischen beiden Patientenkollektiven aus. Desweiteren ist der Anteil der männlichen Patienten deutlich höher. (siehe 2.9. und 3.2.1. Kap. Ergebnisse) Somit stützen die Resultate dieser Untersuchung die Bedeutung des Geschlechts für das Risiko der koronaren Herzkrankheit.

Der Myokardinfarkt ist eine Manifestationsform der koronaren Herzkrankheit, bei dem es durch thrombotischen Verschluß einer Koronararterie zur ischämischen Gewebsnekrose des Herzmuskels kommt (4, 73). Er wird in die Reihe der akuten Koronarsyndrome eingeordnet (37). Der Großteil der gesamten Patienten dieser Studie hat zum Zeitpunkt der Untersuchungen bereits einen Myokardinfarkt erlitten. Es findet sich jedoch kein signifikanter Unterschied für die Häufigkeit des Infarktes zwischen beiden Patientenkollektiven und folglich keine Abhängigkeit der Inzidenz der Mutation vom Auftreten des Myokardinfarktes. (siehe 2.10. und 3.2.2. Kap. Ergebnisse) So scheint die Mutation keinen Einfluß auf den Verlauf der koronaren Herzkrankheit bei den Betroffenen zu haben.

Der Zusammenhang zwischen koronarer Herzkrankheit und genetischen Variationen ist eindeutig belegbar (24). Nachweise für die genetische Prädisposition zur koronaren Herzkrankheit stammen sowohl aus Familienuntersuchungen als auch aus Zwillingsstudien (5, 6, 62, 77, 88, 108). Zwischen beiden Patientengruppen findet sich keine bedeutsame Abweichung bezüglich einer positiven Familienanamnese. (siehe 2.14. und 3.2.6. Kap. Ergebnisse) Dieser scheinbare Widerspruch zu den Resultaten der großen epidemiologischen Arbeiten läßt sich durch die geringe Fallzahl innerhalb dieser Studie relativieren.

Diskussion der Fehlermöglichkeiten

1.Patientenrekrutierung

Als Einschlußkriterien waren definiert:

a.) Alter > 50 Jahre

b.) interventionsbedürftige KHK

1.1.systematische Fehler:
Das Alter der beobachteten Personen sollte gemäß den Einschlußkriterien dieser Studie mehr als fünfzig Jahre betragen. Die koronare Herzkrankheit kann sich jedoch bereits vor dem Erreichen des 50. Lebensjahres mit den typischen Angina pectoris-Beschwerden bzw. mit einem Myokardinfarkt manifestiert haben. Um diesem systematischen Fehler bei der Rekrutierung der Probanden zu begegnen, diente das Patienteninterview dazu, den Anfang und die Dauer der Symptomatik genau zu erfragen. Der Zeitpunkt, an dem die ersten Anzeichen der Krankheit auftraten, sollte somit nach Beginn des 50. Lebensjahres liegen. Zum 2. Einschlußkriterium ist eine interventionsbedürftige koronare Herzkrankheit bestimmt worden. Das bei der Herzkatheter-untersuchung festgelegte therapeutische Verfahren sollte einen Eingriff in Form einer perkutanen transluminalen Angioplastie bzw. einer koronararteriellen Bypassoperation beinhalten. (siehe 1.1. Kap. Material und Methoden) Generell kann es bei der Koronarangiografie zu Fehleinschätzungen der morphologischen Situation gekommen sein, im Sinne eines zu hoch bewerteten Grades bzw. hämodynamischen Wirksamkeit der jeweiligen Stenosen. Daraus resultierend ergäbe sich eine falsche Strategie bei der Behandlung. Somit wären Patienten interventionell therapiert worden, obwohl sie aufgrund der Schwere ihrer Erkrankung nicht mit einem Eingriff (s.o.) hätten behandelt werden müssen. Mehrere Studien haben jedoch eher eine Unterbewertung des Schweregrades der koronaren Atherosklerose durch die Angiografie nahegelegt (37). Daher ist eine solche angiografische Fehleinschätzung als systematischer Fehler eher unwahrscheinlich.

1.2.zufällige Fehler:
Bei der Auswahl der Probanden anhand ihres Alters kann es durch einen Fehleintrag in der Krankengeschichte, der das Alter nicht richtig ausweist, zu einem fälschlichen Einschluß in die Studie gekommen sein. In diesem Fall wären die betroffenen Patienten jünger als 50 Jahre. Die Wahrscheinlichkeit eines solchen zufälligen Fehlers ist jedoch als gering einzuschätzen, da bei der Aufnahme der Patienten in der Klinik die gespeicherten Daten (inklusive des Lebensalters) der Chipkarte der jeweiligen Krankenkasse bzw. dem Personalausweis entnommen werden.

Zusätzlich zu den unter 1.1. beschriebenen Fehleinschätzungen bei der Koronarangiografie und deren Konsequenzen bezüglich der Therapie der Patienten bzw. des Einschlusses in die Erhebungen dieser Studie sind diese auch durch Fehler bei der Befundung bzw. der Interpretation der Ergebnisse der Angiografie erklärbar. Da jedoch die Herzkatheteruntersuchungen durch mit diesen Methoden vertraute und erfahrene Kardiologen durchgeführt (bzw. im Falle der Ausbildung von Assistenten beaufsichtigt) wurde und danach in einer Besprechung mit dem Leiter des Herzkatheterlabors die Bestimmung des weiteren therapeutischen Vorgehens erfolgte, ist ein solcher zufälliger Fehler nicht sehr wahrscheinlich.

2.Patienteninterview

2.1.systematische Fehler:

Neben einem ausreichenden Erkenntnisstand des Patienten über seine Erkrankung ist eine adäquate Orientierung zu seiner Person, dem Ort und der Zeit Voraussetzung für die Erhebung einer Anamnese. In den meisten Fällen sind diese Personen sehr genau informiert und können präzise Angaben zum Beginn, der Dauer und der Charakteristik ihrer Beschwerden geben. Nur wenn Patienten aufgrund einer Bewußtseinsstörung nicht in der Lage gewesen sind, Auskunft über ihre Krankengeschichte zu erteilen, ist ein systematischer Fehler bei der Befragung möglich. Die Probanden sollten bei dem Patienteninterview Fragen zu den Risikofaktoren wie Bluthochdruck, Diabetes mellitus und Nikotinabusus beantworten. Zur Feststellung eines Hypertonus sind jedoch mindestens drei Bestimmungen an zwei verschiedenen Tagen oder besser eine Langzeit-Blutdruckmessung über 24 Stunden nötig (3). Ähnliches gilt für den Diabetes mellitus. Die Diagnose läßt sich nur durch den wiederholten Nachweis einer Hyperglycämie durch ein Blutglucose-Tagesprofil sichern (29). Zur Erfassung einer gestörten Glucosetoleranz bzw. eines manifesten Diabetes mellitus steht außerdem der orale Glucosetoleranztest zur Verfügung (29). Somit kann sich hier ein systematischer Fehler insofern ereignet haben, als daß durch die Anamnese die Risikofaktoren nur erfragt und nicht klinisch bzw. biochemisch nachgewiesen wurden.

2.2.zufällige Fehler:

Bei einzelnen Punkten der Familienanamnese können die Patienten zum Teil nur vage Aussagen über die Erkrankungen ihrer Blutsverwandten machen, da sie durch verschiedene Umstände nur unzureichend dazu informiert sind. Zum einen seien hier die zum Teil sehr komplexen verwandtschaftlichen und zwischenmenschlichen Verhältnisse als Grund für diesen mangelhaften Erkenntnisstand erwähnt, zum anderen aber auch die im Vergleich zu den heutigen diagnostischen Möglichkeiten beschränkten Verfahren der medizinischen Krankheitserkennung aus den vergangenen Jahrzehnten. So erklären sich die zufälligen Fehler bei der Familienanamnese größtenteils aus der Unkenntnis der Befragten.

3.biochemische Analyse

3.1.systematische Fehler:

Bei der Bestimmung der einzelnen klinisch-chemischen Laborparameter können sich systematische Fehler ereignet haben. Durch die vorgeschriebene Qualitätskontrolle in den Laboren sind falsche Werte und somit ein systematischer Fehler eher unwahrscheinlich (100). Des weiteren hat die Blutentnahme selbst einen Effekt auf die Höhe der Parameter. Bei den Triglyceriden und dem Cholesterin bewirkt eine dreiminütige Venenstauung eine Erhöhung der Werte um bis zu 10% (75). Zudem spielt der Zeitpunkt der Abnahme eine wichtige Rolle. Durch eine fett- bzw. kohlenhydratreiche Mahlzeit vor der Blutentnahme kann die Höhe der Triglyceride stark verändert sein (75). Innerhalb der Erhebungen dieser Studie war es zum Teil nicht möglich, den Zeitpunkt der Abnahme auf eine bestimmte Uhrzeit bzw. Zeitspanne festzulegen. Daher hat ein solcher Fehler eine gewisse Wahrscheinlichkeit und sollte in die kritische Bewertung der Ergebnisse eingehen.

3.2.zufällige Fehler:

Neben der trivialen Verwechselung von Blutproben sind in den einzelnen Fällen andere zufällige Fehler möglich. Durch zu starkes Aspirieren bei der Blutentnahme führt die konsekutive Hämolyse beispielsweise zu erhöhten Blutglucosespiegeln. Ein solcher Fehler ist nicht ganz ausgeschlossen.

4.molekularbiologische Analyse

4.1.systematische Fehler:

Aufgrund des patentierten QUIAGEN-Genomic-Tip-Kits ist ein systematischer Fehler bei der DNA-Präparation eher als unwahrscheinlich anzusehen (70). Durch eine Verunreinigung könnten die bei der Polymerasekettenreaktion amplifizierten Produkte nicht mehr der eingesetzten DNA entsprechen. Dies würde in den folgenden Schritten zu verfälschten Ergebnissen führen. Die Wahrscheinlichkeit eines solchen Fehlers läßt sich jedoch als gering einschätzen, da bei der Auswertung jede Abweichung sofort bemerkt und nötigenfalls der Versuchsansatz wiederholt worden wäre. Ähnliches gilt auch für die SSCP-Gel-Elektrophorese. Verunreinigungen bei der Herstellung des Gels bzw. der analytischen Untersuchung könnten auch hier die Resultate im Sinne einer Verfälschung verändern.

4.2.zufällige Fehler:

Bei jedem der genannten Schritte konnte es aufgrund der Benutzung von Pipetten, Meßzylindern etc. zu zufälligen Fehlern im Sinne einer Streuung um einen Mittelwert beim Abmessen der Reagenzien bzw. des Probenmaterials kommen. Diese sind nahezu unvermeidbar und aufgrund der Gaußschen Normalverteilung unerheblich (39).

Zusammenfassung

In einem Kollektiv von 53 Patienten mit interventionsbedürftiger koronarer Herz-krankheit, deren durchschnittliches Alter fünfzig Jahre überschreitet, finden sich folgende Resultate:

Die Häufigkeit der S128R-Mutation der EGF-Domäne des E-Selectins ist mit 13,2% ebenso hoch wie in einer Vergleichsgruppe freiwilliger Probanden (n = 102, Häufigkeit der Mutation: 15,7%) bei den Untersuchungen von Wenzel et al., die eine statistisch signifikante Erhöhung (p = 0,02) der Frequenz dieser Mutation (Häufigkeit 29,2%) in einem Kollektiv von 97 Personen unter fünfzig Jahre mit angiografisch nachgewiesener schwerer peripherer bzw. koronarer Gefäßkrankheit zeigen können und darin einen unabhängigen Risikofaktor für die vorzeitige Atherosklerose sehen (106, 107). In der Untergruppe der Probanden unter vierzig Jahre findet sich eine höhere Inzidenz der Mutation (n = 40, Häufigkeit der Mutation: 40%) (p = 0,0025) (107). Hypothetisch läßt sich im Analogieschluß zu den Ergebnissen von Wenzel et al. eine geringere Frequenz der Mutation in der Patientengruppe über fünfzig Jahre vermuten. Die beobachtete geringere Frequenz der Mutation in höherem Alter beweist die Richtigkeit der aufgestellten Arbeitshypothese und kann somit die Schlußfolgerung der Arbeit von Wenzel et al. unterstützen, welche in der S128R-Mutation einen unabhängigen Risikofaktor für eine vorzeitige Atherosklerose sehen (107). Aufgrund des nahezu identischen Designs der beiden Untersuchungen mit analogen Einschlußkriterien (Alter der Patienten < bzw. > als fünfzig Jahre, interventionsbedürftige KHK) und gleichen Methoden (Anamnese und klinisch-chemische Bestimmung der Risikofaktoren sowie molekularbiologische Analyse) ist der Vergleich der Ergebnisse zulässig.

Das Auftreten der einzelnen Risikofaktoren innerhalb des untersuchten Kollektives stimmt teilweise mit den Ergebnissen anderer Studien bezüglich der Rolle dieser Risikofaktoren für die Atherogenese ein. Abweichungen von den Resultaten dieser Untersuchungen lassen sich in erster Linie durch die relativ geringe Fallzahl bei der vorliegenden Arbeit erklären und dürfen nicht als Argument gegen die Bedeutung der einzelnen Risikofaktoren gesehen werden. Innerhalb dieser Studie findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten mit bzw. ohne S128R-Mutation bezüglich der Verteilung der Risikofaktoren. Die Ergebnisse dieser Studie weichen von den Resultaten der Untersuchungen von Wenzel et al. ab, die eine Korrelation von normalen Cholesterinwerten mit dem Auftreten der S128R-Mutation festgestellt haben (107). Eine Erklärung dieses Faktums liegt in der relativ geringen Fallzahl der Probanden dieser Studie, wodurch sich eher zufällig dieses Ergebnis präsentiert. Zugleich muß auch das Resultat von Wenzel et al. kritisch betrachtet werden, erst weitere Untersuchungen können deren Ergebnis bezüglich des Einflusses des Cholesterinwertes auf die Inzidenz der Mutation bestätigen.

Wichtigste Erkenntnis aus den Resultaten dieser Untersuchung ist der indirekte Beweis für die Bedeutung der S128R-Mutation der EGF-Domäne des E-Selectins bei der Entwicklung einer vorzeitigen Atherosklerose, der sich als Schlußfolgerung aus dem Vergleich der Inzidenz dieser Mutation in den betrachteten unterschiedlichen Kollektiven ergibt.

Literaturverzeichnis

1) Arbustini, E., Grasso, M., Fasani, R., Klersy, C., Diegoli, M., Porcu, E., Banchieri, N., Fortina, P., Danesino, C., Specchia, G. (1995) : Angiotensin converting enzyme gene deletion allele is independently and strongly associated with coronary atherosclerosis and myocardial infarction. British Heart Journal **74** : 584-591
2) Assmann, G. (1990) : At what levels of total low- or high-density lipoprotein cholesterol should diet/drug therapy be initiated? European guidelines. American Journal of Cardiology **65** : 11ff.
3) Baumann, G., Stangl, K.: Krankheiten des Herzens - Einführung. In: Stobbe, H. , Baumann, G. (Hrsg.), Innere Medizin - Grundlagen und Klinik innerer Krankheiten, S.127-168, siebte, überarbeitete und erweiterte Auflage, Ullstein Mosby, Berlin, Wiesbaden, 1996
4) Baumann, G., Stangl, K.: Krankheiten des Herzens-Koronare Herzkrankheit. In: Stobbe, H. , Baumann, G. (Hrsg.), Innere Medizin - Grundlagen und Klinik innerer Krankheiten, S.265-293, siebte, überarbeitete und erweiterte Auflage, Ullstein Mosby, Berlin, Wiesbaden, 1996
5) Berg, K. (1983) : Genetics of coronary heart disease. Prog. Med. Genet. **5** : 36ff.
6) Berg, K. (1984) : Twin studies of coronary heart disease and its risk factors. Acta Genet. Med. Gemell. **33** : 349ff.
7) Berg, K. (1992) : Molecular genetics and genetic epidemiology of cardiovascular disease and diabetes. introductory remarks: risk factor levels and variability. Annals of Medicine **24** : 343-347
8) Berg, K., Dahlén, G., Frick, M. H. (1974) : Lp(a)-lipoprotein and pre-β_1-lipoprotein in patients with coronary heart disease. Clinical Genetics **6** : 230-235
9) Bevilacqua, M. P. (1993) : Endothelial-leukocyte adhesion molecules. Annual Review of Immunology **11** : 767-804
10) Bevilacqua, M. P., Pober, J. S., Wheeler, M. E., Cotran, R. S., Gimbrone, M. A. Jr. (1985) : Interleukin-1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, related leukocyte cell lines. Journal of Clinical Investigation **76** : 2003-2011
11) Bevilacqua, M. P., Stengelin, S., Gimbrone, M. A. Jr., Seed, B. (1989) : Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. Science **243** : 1160-1165
12) Bevilacqua, M. P., Nelson, R. M. (1993) : Selectins. Journal of Clinical Investigation **91** : 379-387
13) Bevilacqua, M. P., Nelson, R. M., Mannori, G., Cecconi, O. (1994) : Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. Annual Review of Medicine **45** : 361-378

14)Brehme, S., Schulte, K.-L.: Krankheiten der Arterien. In: Stobbe, H. , Baumann, G. (Hrsg.), Innere Medizin - Grundlagen und Klinik innerer Krankheiten, S.311-338, siebte, überarbeitete und erweiterte Auflage, Ullstein Mosby, Berlin, Wiesbaden, 1996
15)Breslow, J. L. (1992) : Apolipoprotein genes and atheroslerosis. Clinical Investigator **70** : 377-384
16)Butcher, E. C. (1991) : Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specifity and diversity. Cell **67** : 1033-1037
17)Cambien, F., Poirier, O., Lecerf, L., Evans, A., Cambou, J. P., Arvelier, D., Luc, G., Bard, J.-M., Bara, L., Ricard, S., Tiret, L., Amouyel, P., Alhenc-Gelas, F., Soubrier, F. (1992) : Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor myocardial infarction. Nature **359** : 641-644
18)Camerini, D., James, S. P., Stamenkovic, I., Seed, B. (1989) : Leu-8/TQ1 is the human equivalent of the MEL-14 lymph node homing receptor. Nature **342** : 78-82
19)Carlos, T. M., Harlan, J. M. (1994) : Leukocyte-endothelial adhesion molecules. Blood **84** : 2068-2101
20)Carlson, L. A., Ericsson, M. (1975) : Quantitative and qualitative serum lipoprotein analysis. Part 2. Studies in male survivors of myocardial infarction. Atherosclerosis **21** : 435ff.
21)Carlson, L. A., Böttiger, L. E. (1981) : Serum triglycerides, to be or not to be a risk factor for ischaemic heart disease? Atherosclerosis **39** : 287-291
22)Carlson, L. A., Böttiger, L. E. (1985) : Risk factors for ischaemic heart disease in men and women. Results of the 19-year follow-up of the Stockholm Prospective Study. Acta Medica Scandinavia **218** : 207-211
23)Cathcart, M. K., Morel, D. W., Chimson, G. M. III (1985) : Monocytes and neutrophils oxidize low density lipoprotein making it cytotoxic. Journal of Leukocyte Biology **38** : 341-350
24)Chamberlain, J. C., Galton, D. J. (1990) : Genetic susceptibility to atherosclerosis. British Medical Bulletin **46** : 917-940
25)Chamberlain, J. C., Thorn, J. A., Oka, K., Galton, D. J., Stocks, J. (1989) : DNA polymorphisms at the lipoprotein lipase gene: associations in normal and hypertriglyceridaemic subjects. Atherosclerosis **79** : 85-93
26)Chobanian, A. V., Brecher, P. I., Haudenschild, C. C. (1986) : Effects of hypertension and of antihypertensive therapy on atherosclerosis. Hypertension **8 (suppl.I)** : I15-I21
27)Cotran, R. S., Kumar, V., Robbins, S. L. : Inflammation and repair. In: Saunders, W. B. (ed.), Robbins pathologic basis of disease, pp.39-86, Saunders, Philadelphia, 1989
28)Cybulsky, M. I., Gimbrone, M. A. (1991) : Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. Science **251** : 788-791

29)Dabels, J., Kaffarnik, H.: Krankheiten des Stoffwechsels. In: Stobbe, H. , Baumann, G. (Hrsg.), Innere Medizin - Grundlagen und Klinik innerer

Krankheiten, S.866-911, siebte, überarbeitete und erweiterte Auflage, Ullstein Mosby, Berlin, Wiesbaden, 1996
30)Dahlen, G. H., Guyton, J. R., Attar, M., Farmer,J. A., Kautz, J. A. et al. (1986) : Association of levels of lipoprotein Lp(a), plasma lipids, and other proteins with coronary artery disease documented by angiography. Circulation **74** : 758-765
31)Davies, M. J., Gordon, J. L., Gearing, A. J. H., Pigott, R., Woolf, N., Katz, D., Kyriakopoulos, A. (1993) : The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-Selectin in human atherosclerosis. Journal of Pathology **171** : 223-229
32)Dollery, C. T. (1987) : Risk predictors, risk indicators, and benefit factors in hypertension. American Journal of Medicine **82 (suppl.IA)** : 2-8
33)Dzau, V. J. (1990) : Atherosclerosis and hypertension: mechanisms and interrelationships. Journal of Cardiovascular Pharmacology **15 (suppl.5)** : S59-S64
34)Dzau V. J., Sacks, F. (1987) : Regulation of lipoprotein metabolism by adrenergic mechanisms. Journal of Cardiovascular Pharmacology **10 (suppl.9)** : S2-S6
35)Erbe, D. V., Wolitzky, B. A., Presta, L. G., Norton, C. R., Ramos, R. J., Burns, D. K., Rumberger, J. M., Narasinga Rao, B. N., Foxall, C., Brandley, B. K., Lasky, L: A. (1992) : Identification of an E-selectin region critical for carbohydrate recognition and cell adhesion. Journal of Cell Biology **119** : 215-227
36)Friedewald, W. T., Levy, R. I., Fredrickson, D. S. (1972) : Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clinical Chemistry **18** : 499-502
37)Fuster, V., Badimon, L., Badimon, J. J., Chesebro, J. H. (1992) : The pathogenesis of coronary artery disease and acute coronary syndromes. New England Journal of Medicine **326** : 242-250, 310-318
38)Gamble, J. R., Harlan, J. M., Klebanoff, S. J., Vadas, M. A. (1985) : Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A. **82** : 8667-8671
39)Gellert, W., Hellwich, M., Küstner, H. (Hrsg.), Kleine Enzyklopädie Mathematik, 2. Auflage, VEB Bibliographisches Institut, Leipzig, 1969
40)Graves, B. J., Crowther, R. L., Chandran, C., Rumberger, J. M., Li, S., Huang, K.-S., Presky, D. H., Familletti, Wolitzky, B. A., Burns, D. K. (1994) : Insight into E-selectin/ligand interaction from the crystal structure and mutagenesis of the lec/EGF domains. Nature **367** : 532-538
41)Hawkins, R. I. (1972) : Smoking, platelets and thrombosis. Nature **236** : 450
42)Heinrichs, H. R., Petzoldt, R., Thomas, L.: Kohlenhydrat-Stoffwechsel. In: Thomas, L. (Hrsg.), Labor und Diagnose: Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik, S.168/169, 4., überarbeitete und erweiterte Auflage, Die Medizinische Verlagsgesellschaft, Marburg, 1992
43)Hogg, N., Berlin, C. (1995) : Structure and function of adhesion receptors in leukocyte trafficking. Immunology Today **16** : 327-330

44)Horsthemke, B., Kessling, A. M., Seed, M., Wynn, V., Williamson, R., Humphries, S. E. (1985) : Identification of a deletion in the low density lipoprotein-(LDL)-receptor gene in a patient with familial hypercholesterolaemia. Human Genetics **71** : 75ff.
45)Hulley, S. B., Rosenman, R. H., Bawol, R. D., Brand, R. J. (1980) : The association between triglycerides and coronary heart disease. New England Journal of Medicine **302** : 1383
46)Humphries, S. E. (1993) : Life style, genetic factors and the risk of heart attack: the apolipoprotein B gene as an example. Biochemical Society Transactions **21** : 569-582
47)Ishigami, T., Umemura, S., Iwamoto, T., Tamura, K., Hibi, K., Yamaguchi, S., Nyuui, N., Kimura, K., Miyazaki, N., Ishii, M. (1995) : Molecular variant of angiotensinogen gene is associated with coronary atherosclerosis. Circulation **91** : 951-954
48)Johnston, G. I., Cook, R. G., McEver, R. P. (1989) : Cloning of GMP-140, a granule membrane protein of platelets and endothelium: sequence similarity to proteins involved in cell adhesion and inflammation. Cell **56** : 1033-1044
49)Kannel, W. B., Sorlie, P. (1975) : Hypertension in Framingham. In: Paul, O., Epidemiology and control of hypertension. Miami, Symposia Specialist, 553-592
50)Kansas, G. S. (1992) : Structure and function of L-selectin. APMIS **100** : 287-293
51)Kansas, G. S., Spertini, O., Stoolman, L. M., Tedder, T. F. (1991) : Molecular mapping of functional domains of the leukocyte receptor for endothelium, LAM-1. Journal of Cell Biology **114** : 351-358
52)Kostner, G. M., Avogaro, P., Gazzolato, G., Marth, E., Bittolobon, G. (1981) : Lipoprotein(a) and the risk of myocardial infarction. Atherosclerosis **38** : 51ff
53)Lasky, L. A. (1992) : Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. Science **258** : 964-969
54)Lasky, L. A, Singer, M. S., Yednock, T. A., Dowbenko, D., Fennie, C., Rodriguez, H., Nguyen T:, Stachel, S., Rosen, S. D. (1989) : Cloning of a lymphocyte homing receptor reveals a lectin domain. Cell **56** : 1045-1055
55)Li, H., Cybulsky, M. I., Gimbrone, M. A. Jr., Libby, P. (1993) : An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. Arteriosclerosis and Thrombosis **13** : 197-204
56)Lipid Research Clinics Programm (1984) : The lipid research clinics coronary primary prevention trial results. Journal of the American Medical Association **251** : 351-374
57)Luscinskas, F. W., Gimbrone, M. A. (1996) : Endothelial-dependent mechanisms in chronic inflammatory leukocyte recruitment. Annual Review of Medicine **47** : 413-421

58)McMahon, S. W., MacDonald, G. J. (1986) : Antihypertensive treatment and plasma lipoprotein levels: the association in data from a population study. American Journal of Medicine **80 (suppl.2A)** : 40-47
59)McLean, J. W., Tomlinson, J. E., Kuang, W. J. et. al. (1987) : cDNA sequence of human apolipoprotein(a) is homologous to plasminogen. Nature **330** : 132-137
60)Miettinen, H., Korpela, K., Hämäläinen, L., Kontula, K. (1994) : Polymorphisms of the apolipoprotein and angiotensin converting enzyme genes in young North Karelian patients with coronary heart disease. Human Genetics **94** : 189-192
61)Munro, J. M., Cotran, R. S. (1988) : The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation. Laboratory Investigation **58** : 249-261
62)Nora, J. J., Lortscher, R. M., Spangler, R. D., Kimberling, W. J. (1980) : Genetic epidemiology study of early onset ischaemic heart disease. Circulation **61** : 503ff.
63)Old, L. J. (1985) : Tumor necrosis factor (TNF). Science **230** : 630-632
64)Parthasarathy, S., Wieland, E., Steinberg, D. (1989) : A role for endothelial cell lipoxygenase in the oxidative modification of low density lipoprotein. Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A. **86** : 1046-1050
65)Pfeffer, M. A., Braunwald, E., Moyet, L. A., Basta, L., Brown, E. J., Cuddy, T. E. et al. (1992) : Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. New England Journal of Medicine **327** : 669-677
66)Pigott, R., Needham, L. A., Edwards, R. M., Walker, C., Power, C. (1991) : Stuctural and functional studies of the endothelial activation antigen endothelial leukocyte adhesion molecul-1 using a panel of monoclonal antibodies. Journal of Immunology **147** : 130-35
67)Pober, J. S., Cotran, R. S. (1990) : Cytokines and endothelial cell biology. Physiological Reviews **70** : 427-451
68)Poston, R. N., Haskard, D. O., Coucher, J. R., Gall, N. P., Johnson-Tidey, R. R. (1992) : Expression of intercellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques. American Journal of Pathology **140** : 665-673
69)Printseva, O. Y., Peclo, M. M., Gown, A. M. (1992) : Various cell types in human atherosclerotic lesions express ICAM-1. American Journal of Pathology **140** : 889-896
70)Quiagen Genomic DNA Handbook (1995), S.14/15, S.33-35, S.42-44
71)Report of the Working Group of Arteriosclerosis of the National Heart, Lung, and Blood Institute. Vol. 2 Washington, D. C.: Government Printing Office, 1981 (DHEW publication no. (NIH) 82-2035)
72)Rhoads, G. G., Dahlén, G., Berg,K., Morton, N. E., Dannenberg, A. L. (1986) : Lp(a) lipoprotein as a risk factor for myocardial infarction. Journal of the American Medical Association **256** : 2540-2544

73)Riede, U.-N., Müntefering, H., Drexler, H., Schaefer, H.-E.: Kardiovaskuläres System. In: Riede, U.-N., Schaefer, H.-E. (Hrsg.), Allgemeine und Spezielle Pathologie, S.435-524, 3., völlig neu bearbeitete und erweiterte Auflage, Georg Thieme, Stuttgart, New York, 1993
74)Riede, U.-N., Schaefer, H.-E.: Störungen der Individualitätswahrung. In: Riede, U.-N., Schaefer, H.-E. (Hrsg.), Allgemeine und Spezielle Pathologie, S.169-282, 3., völlig neu bearbeitete und erweiterte Auflage, Georg Thieme, Stuttgart, New York, 1993
75)Riesen, W. F.: Fettstoffwechsel. In: Thomas, L. (Hrsg.), Labor und Diagnose: Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik, S.199-229, 4., überarbeitete und erweiterte Auflage, Die Medizinische Verlagsgesellschaft, Marburg, 1992
76)Rigat, B., Hubert, C., Alhenc-Gelas, F., Cambien, F., Corval, P., Soubrier, F. (1990) : An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum levels. Journal of Clinical Investigation **86** : 1343-1346
77)Rissanen, A. M. (1979) : Familial aggregation of coronary heart disease in a high incidence area (North Karelia, Finland). British Heart Journal **42** : 294ff.
78)Rokitansky, C. v.: A manual of pathological anatomy. Vol. 4., Day G. E., Sydenham Society, London, 1852
79)Rosengren, A., Wilhelmsen, L:, Eriksson, E., Risberg, B., Wedel, H. (1990) : Lipoprotein(a) and coronary heart disease: a prospective case-control study in a general population sample of middle aged men. British Medical Journal **301** : 1248-1251
80)Ross, R. (1986) : The pathogenesis of atherosclerosis - an update. New England Journal of Medicine **314** : 488-500
81)Ross, R. (1993) : The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. Nature **362** : 801-809
82)Ross, R., Glomset, J. A. (1973) : Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell. Science **180** : 1332-1339
83)Ross, R., Raines, E. W., Bowen-Pope, D. F. (1986) : The biology of platelet-derived growth factor. Cell **46** : 155-169
84)Sacks, F. M., Dzau, V. J. (1986) : Adrenergic effects on plasma lipoprotein metabolism: speculation on mechanisms of action. American Journal of Medicine **80 (suppl.2A)** : 71-79
85)Schulte, K.-L.: Krankheiten des Herzens - Hypertonie. In: Stobbe, H. , Baumann, G. (Hrsg.), Innere Medizin - Grundlagen und Klinik innerer Krankheiten, S.298-308, siebte, überarbeitete und erweiterte Auflage, Ullstein Mosby, Berlin, Wiesbaden, 1996
86)Sieffert, R. A., Keown, K., Moore, S. W. (1981) : Pathologic effect of tobacco smoke inhalation on arterial intima. Surgical Forum **32** : 333ff.
87)Siegelman, M. H., van de Rijn, M., Weissman, I. L. (1989) : Mouse lymph node homing receptor cDNA cloning encodes a glycoprotein revealing tandem interaction domains. Sience **243** : 1165-1172

88)Slack, J., Evans, K.A. (1966) : The increased risk of death from ischaemic heart disease in first-degree relatives of 121 men and 96 women with ischaemic heart disease. Journal of Medical Genetics **3** : 239ff.
89)The SOLVD Investigators (1991) : Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. New England Journal of Medicine **325** : 293-302
90)Southern, I. M. (1975) : Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. Journal of Molecular Biology **98** : 503ff.
91)Sporn, M. B., Roberts, A. B., Wakefield, L. M., de Crombrugghe, B. (1987) : Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-β. Journal of Cell Biology **105** : 1039-1045
92)Springer, T. A. (1990) : Adhesion receptors of the immune system. Nature **346** : 425-434
93)Springer, T. A. (1994) : Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigma. Cell **76** : 301-314
94)Stary, H. C. (1989) : Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults. Arteriosclerosis **9 (suppl.I)** : I19-I32
95)Stout, R. W. (1985) : Overview of the association between insulin and atherosclerosis. Metabolism **34** : 7-12
96)Study Group, European Atherosclerosis Society (1987) : Strategies for the prevention of coronary heart disease: A policy statement of the European Atherosclerosis Society. European Heart Journal **8** : 77-88
97)Tedder, T. F., Isaacs, C. M., Ernst, T. J., Demetri, G. D., Adler, D. A., Disteche, C. M. (1989) : Isolation and microsomal localization of cDNAs encoding a novel human lymphocyte cell surface molecule, LAM-1. Journal of Experimental Medicine **170** : 123-133
98)Thomas, L.: Gentechnik in der medizinischen Diagnostik. In: Thomas, L. (Hrsg.), Labor und Diagnose: Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik, S.1836-1841, 4., überarbeitete und erweiterte Auflage, Die Medizinische Verlagsgesellschaft, Marburg, 1992
99)Thomas, L.: Immunchemische Labortechniken. In: Thomas, L. (Hrsg.), Labor und Diagnose: Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik, S.1811-1834, 4., überarbeitete und erweiterte Auflage, Die Medizinische Verlagsgesellschaft, Marburg, 1992
100)Thomas,L.: Laborbefund. In: Thomas, L. (Hrsg.), Labor und Diagnose: Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik, S.1842-1864, 4., überarbeitete und erweiterte Auflage, Die Medizinische Verlagsgesellschaft, Marburg, 1992
101)Thorn, J. A., Chamberlain, J. C., Stocks, J., Galton, D. J. (1989) : RFLP's at the lipoprotein lipase and hepatic lipase gene loci in coronary atherosclerosis. Atherosclerosis **79** : 94ff.

102)Tolleshaug, H:, Hobgood, K. K., Brown, M. S., Goldstein, J. L. (1983) : The LDL-receptor locus in familial hypercholesterolaemia. Multiple mutations disrupt the transport and processing of a membrane receptor. Cell **32** : 941ff.
103)Utermann, G. (1987) : Apolipoproteins, quantitative lipoprotein traits and multifactorial hyperlipidemia. CIBA Foundation Symposium **130** : 52ff.
104)Van der Wal, A. C., Das, P. K., Tigges, A. J., Becker, A. E. (1992) : Adhesion molecules on the endothelium and mononuclear cells in human atherosclerotic lesions. American Journal of Pathology **141** : 1427-1433
105)Virchow, R.: Phlogose und Thrombose im Gefäßsystem. In: Virchow, Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medicin, S.458-564 Meidinger Sohn, Berlin, Frankfurt am Main, 1856
106)Wenzel, K., Ernst, M., Rohde, K., Baumann, G., Speer, A. (1996) : DNA polymorphisms in adhesion molecule genes - a new risk factor for early atherosclerosis. Human Genetics **97** : 15-20
107)Wenzel, K., Felix, S., Kleber, F.-X., Brachold, R., Mencke, T., Schattke, S., Schulte, K.-L., Gläser, C., Rohde, K., Baumann, G., Speer, A. (1994) : E-selectin polymorphism and atherosclerosis: an association study. Human Molecular Genetics **3** : 1935-1937
108)Yater, W. M., Traum, A. H., Brown, W. G., Fitzgerald, R. P., Geisler, M. A., Wilcox, B. B. (1984) : Coronary artery disease in men eighteen to thirty-nine years of age. American Heart Journal **36** : 334ff.
109)Ylä-Herttuala, S., Palinski, W., Rosenfeld, M. E., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Butler, S., Witzum, J. L., Steinberg, D. (1989) : Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. Journal of Clinical Investigation **84** : 1086-1095

Potsdam, den 16.01.98

Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich, Ralf Brachold, an Eides Statt, die unter dem Titel:

DNA-Polymorphismus des endothelialen leukozytären Adhäsionsmoleküls bei Patienten älter als 50 Jahre mit interventionsbedürftigen Koronararterienstenosen

verfaßte Dissertation:

1. ausschließlich durch mich selbst geschrieben,
2. ohne unzulässige Hilfe Dritter verfaßt,
3. die benutzten Hilfsmittel und die zitierte Literatur vollständig angegeben

zu haben.
Des weiteren stellt die oben genannte Dissertation keine auch nur in Teilen wiedergegebene Kopie anderer Arbeiten dar.

Unterschrift

Curriculum Vitae

Persönliche Angaben:

Name:	**Brachold**
Vorname:	**Ralf**
Geburtstag:	**12. April 1970**
Geburtsort:	**Charkow**

Studium::

09/90-08/97 Besuch der Humboldt-Universität zu Berlin, Medizinische Fakultät
Abschluß der Ärztlichen Prüfung mit dem Prädikat „gut“

Tätigkeiten:

09/88-08/90 klinisches Praktikum im Bezirkskrankenhaus Potsdam
09/93-03/97 Beteiligung an einem Forschungsprojekt zu genetischen Ursachen der Atherosklerose, Promotion in Arbeit
02/98-02/99 Arzt im Praktikum (pre-registration house officer) in der Chirugischen Klinik des Walsall Manor Hospitals (England)

Veröffentlichungen:

E-Selectin polymorphism and atherosclerosis: an association study
in Human Molecular Genetics, Vol. 3, # 11 (1994), p. 1935-1937
Oxford University Press

Datum **Unterschrift**

Danksagung

Mein ganz persönlicher Dank gilt allen, die diese Arbeit haben Wirklichkeit werden lassen.

Insbesondere möchte ich mich bei Claudia für die Geduld und die Ausdauer bedanken, ich kann dieses Gefühl kaum in Worte fassen.
Weiterhin bedanke ich mich bei meinem Vater für die tatkräftige Unterstützung bei all diesen kleinen (großen) technischen Hindernissen.
Zudem sei hier noch Thomas erwähnt, ohne dessen anfängliche Hilfe diese Arbeit kaum möglich geworden wäre.
Des weiteren vielen Dank an PEARL JAM und AC/DC, deren Rock´n´Roll meine Laune immer wieder besserten und mir einen frischen Schwung gaben.
Nicht vergessen sei hier Bill Gates, ohne dessen geniale Software dieses Werk nicht zustande gekommen wäre.
Abschließend gilt mein Dank Herrn Professor Dr. S. Felix, der mir als Berater und Betreuer hilfreich zur Seite stand.