

4. Diskussion

4.1. Phänotypische Bedeutung der Varianten *CYP1B1*3* für die Entstehung der KHK

Die Atherosklerose ist eine multifaktorielle Erkrankung, die von einer Vielzahl verschiedener Risikofaktoren abhängt. Es ist zu vermuten, dass verschiedene Kandidatengene die individuell sehr unterschiedliche Suszeptibilität der Atherosklerose der Gefäßwand determinieren (Thiery J 1998). Laut Thiery et al. ist das Zusammentreffen mehrerer prädisponierender Allele, die für die Entstehung der Artherosklerose verantwortlich sind, durchaus wahrscheinlich. Dieses Zusammentreffen könnte die koronare Risikodisposition eines Individuums entscheidend bestimmen. Genetische Polymorphismen wirken sich jedoch meistens erst durch Interaktion mit Lebensstil, Umweltfaktoren und endogenen Stoffwechselstörungen aus (Thiery J 1998). Ebenso können Pleiotropie, d.h. die gleichzeitige Ausprägung mehrerer bis vieler Merkmale durch ein Gen (pleiotrope Mutationen können in Bezug auf ein Merkmal rezessiv und gleichzeitig in Bezug auf ein anderes dominant sein) und Epistase (Überdecken der phänotypischen Manifestation eines Gens durch ein anderes, das nicht zum gleichen Genpaar gehört) die phänotypische Bedeutung von Mutationen an Kandidatengenen erheblich beeinflussen und damit vermindern (Hegele RA 1997). Man muss zwischen monogenetisch bedingten Erkrankungen wie bei der familiär bedingten Hypercholesterinämie und der multigenetisch bedingten Prädisposition für Artherosklerose unterscheiden (Doevendans PA 2001). Das Verständnis der genetischen Komponente bei der Entstehung der Artherosklerose hängt von multiplen Faktoren ab, wie nicht-mendelsche Erbgänge, Gen-Gen-Interaktionen und Gen-Umwelt-Interaktionen. Umwelteinflüsse können anscheinend sogar über das genetisch bedingte eigentlich erhöhte Risiko dominieren (Hegele RA 1997).

Der direkte Zusammenhang zwischen Varianten in Genen der Cytochrome P450 und dem damit bedingten veränderten Risikoprofil bezüglich einer KHK und damit eines Myokardinfarktes ist bislang nicht für *CYP1B1* beschrieben worden.

Dagegen konnte für *CYP2C8* und *CYP2C9* gezeigt werden, dass Frauen mit varianten Genotypen von *CYP2C8* und *CYP2C9* – beide verantwortlich für die Biosynthese von vasoaktiven Substanzen der Arachidonsäure – ein erhöhtes Risiko für einen akuten

Myokardinfarkt aufweisen, als CYP2C8- und CYP2C9-Wildtypen, was auf eine möglicherweise veränderte Bildung von endogenen, vasoregulativen Eicosanoiden zurückgeführt wird (Yasar U 2003).

Es gibt zahlreiche Arbeiten, die die Beziehung zwischen den einzelnen Genotypen anderer Cytochrome P450 und den einzelnen Risikofaktoren der KHK untersuchen.

Ein Zusammenhang zwischen den Risikofaktoren – und im speziellen des Rauchens – und den Genvarianten von CYP1B1*3 wurde aufgrund bestimmter Erkenntnisse vermutet. Zum einen war bekannt, dass der Fremdstoff Zigarettenrauch durch Fremdstoffverstoffwechselnde Enzyme –kurz DME- wie z. B. das Cytochrom-P450-System der Leber- metabolisiert wird. Bekannt war auch, dass Nikotin Induktor der CYP4501A2 ist (Schrenk D 1998). Weiterhin fand man heraus, dass die Metabolisierungsrate von Nikotin durch CYP2D6 genotypenabhängig war (Cholerton S 1994). Savas Ü 1997 et al. zeigten 1997, dass CYP1B1, ein Metabolisierer von polyzyklischen Kohlenwasserstoffen, Inhaltsstoffe des Zigarettenrauchs, ist (Savas Ü 1997). Somit stellte sich die Frage, ob ein Polymorphismus an CYP1B1 in Zusammenhang mit dem Erleiden der Koronaren Herzerkrankung vor allem in Begleitung des Risikofaktors Rauchen gebracht werden konnte.

Daß die Substitution von Leucin durch Valin Einfluss auf die katalytische Funktion des Enzyms hat, wurde wie bereits im Einleitungsteil dieser Arbeit erwähnt – z.B. in einer Arbeit von Shimada et al. 1999 im Zusammenhang mit dem Metabolismus des 4-Hydroxyestradiol nachgewiesen. Bisher gibt es zahlreiche Fall-Kontroll-Studien zur Rolle von Leu432Val an CYP1B1 bei der Entstehung von Karzinomen, jedoch gibt es bis jetzt keine Untersuchung in Bezug auf die Entstehung der KHK.

4.2. Bedeutung von CYP1B1 für das Risiko der KHK

Die Verteilung der CYP1B1*3-Varianten zeigte in dieser Arbeit eine Allelfrequenz von 0,38 in der Kontroll-Gruppe; in der KHK –Gruppe betrug die Allelfrequenz ebenfalls 0,38. Die jeweiligen Allelfrequenzen in den zwei untersuchten Gruppen waren somit identisch. In einer geschlechtergetrennten Verteilung weichen die Frequenzen ebenfalls nur unwesentlich voneinander ab; in der Gruppe der Männer liegen die CYP1B1*3-Allelfrequenzen in der Kontrollgruppe bei 0,38, in der KHK-Gruppe bei 0,37. In der

Gruppe der Frauen sind sie ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich: die *3-Allelfrequenz in der Kontrollgruppe lag bei 0,40, in der KHK-Patientengruppe bei 0,37.

Auch bei Betrachtung der Genotypenhäufigkeit zeigt sich eine annähernd gleiche Verteilung der einzelnen Genotypen in der KHK- und in der Kontrollgruppe. In einer nach Geschlechtern getrennten Verteilung der Genotypen ließ sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied feststellen.

Die Häufigkeit der homozygoten G-Allelvariante liegt in der Gruppe der Gesunden bei 137, d.h. bei 14,2 % aller Kontrollpersonen. Unter den KHK-Kranken liegt die Anzahl dieser Variante bei 149, d.h. bei 15,2 % aller KHK-Patienten. Somit zeigt sich, dass es bei Betrachtung der Gesamtgruppen keinen signifikanten Unterschied im Anteil dieses Genotyps zwischen Gesunden und den Erkrankten gibt. Der Austausch von Leucin in Valin im Codon 432 scheint somit insgesamt betrachtet keine tragende Rolle bei der Entstehung der KHK zu spielen.

Die statistische Gleichverteilung der Allelen von CYP1B1*3 in den Gruppen der Gesunden und der KHK-Kranken könnte darauf zurückgeführt werden, dass, wie im Einleitungsteil erwähnt, die Aminosäuren Leucin und Valin sehr ähnliche Eigenschaften besitzen und dass –wie z.B. in der Arbeit von Shimada et al, 1999, vielleicht nur mehrere gleichzeitig vorkommende Polymorphismen zu veränderten Enzymaktivitäten führen.

Hier wird der Zusammenhang zwischen den ätiologisch wichtigen Kofaktoren für die Entstehung der Koronaren Herzkrankheit und den Varianten von CYP1B1*3 untersucht. Da es sich bei Cytochrom P4501B1 um ein Fremdstoffverstoffwechelndes Enzym handelt, wird der Risikofaktor Rauchen den anderen vorangestellt.

Die hier genannten Ergebnisse entsprechen hinsichtlich ihrer Allelfrequenz weitestgehend denen anderer Untersuchungen. Auch in Bezug auf die Genotypenverteilung zeigt sich kein statistisch relevanter Unterschied im Vergleich zu anderen Studien. Hierzu wird näher im Kapitel über interethnische Differenzen eingegangen (s.Tab 17 u. 18).

4.3. Bedeutung der CYP1B1*3-Varianten für die Entstehung einer KHK

Bisher gibt es in der Literatur keine Untersuchungen über die in dieser Arbeit untersuchten Genvarianten und ihre mögliche Auswirkung auf die Entstehung einer KHK. Das CYP1B1 gehört zu einer Gruppe von Enzymen, die am oxidativen Metabolismus beteiligt sind. Es ist bereits seit vielen Jahren bekannt, dass oxidativer Stress mit der Entwicklung endothelialer Dysfunktion, einer Arteriosklerose und einer KHK assoziiert wird (Munzel T 1997). Oxidativer Stress entsteht, wenn ein Ungleichgewicht zwischen dem Entstehen von freien Radikalen und der Effektivität von Antioxidantien entsteht. Drei Enzymsysteme sind sicher an der Entstehung von „Oxygen“-Radikalen beteiligt: NADH/NADPH-Oxidase, Xanthin-Oxidoreductase und die endotheliale Nitrit-Oxid-Synthase. Charakteristikum von freien Radikalen und somit auch von Oxygen-Radikalen ist die hohe Reaktionsfähigkeit, z.B. mit ungesättigten Fettsäuren und Halogenen. Zu den physiologischen Interaktionen gehören die mit Xenobiotica und Arachidonsäure. Auch bei der Phagozytose kommt diese Reaktion zum Tragen. Ebenso sehr kann die hohe Reaktivität zu unspezifischen Reaktionen mit kleinen Molekülen und zum Zellschaden führen, z.B. zur Fettperoxidation oder Oxidation von Thiol-Gruppen. Viele Untersuchungen gibt es darüber, wie diese Zellschäden zu Pathogenese von Herz- und Kreislauferkrankungen führen. Unter den vaskulären reaktiven Oxygenen spielen die Superoxid-Anionen als Quelle vieler anderer Radikale eine Rolle bei der Entstehung der endothelialen Dysfunktion, die in Begleitung der Risikofaktoren der KHK, nämlich Hypercholesterinämie, Hypertonus und Zigarettenrauchen auftritt. Untersuchungen über die Beziehung zwischen oxidativem Stress und den einzelnen Risikofaktoren zeigt uns z.B. eine Arbeit von Penckofer et al.: Personen mit Diabetes mellitus reagieren stärker auf oxidativen Stress, da eine Hyperglykämie natürliche Antioxidantien aufbraucht und die Produktion von freien Radikalen erleichtert (Penckofer S 2002). Homocystein, Insulinresistenz und Alter mögen miteinwirken. Andere Untersuchungen zeigten auch, dass bei Hypertonikern die Anzahl der freien Radikale erhöht sind (Manning RD jr 2003). Mugge et al. wiesen in einer Arbeit einen erhöhten Gehalt von Superoxiden bei Kanninchen mit Hypercholesterinämie nach (Mugge A 1994). Neuere Untersuchungen besagen, dass die endotheliale Dysfunktion, charakterisiert durch den Verlust der NO-Aktivität, ein frühzeitig eintretender Mechanismus bei der Entstehung der Arteriosklerose ist (Schulz E 2004). Endogenes NO wird nur aus

gesunden Endothelzellen freigesetzt; bei den vorher genannten Risikofaktoren sind die Gefäße vorgeschädigt und somit das NO herabgesetzt. NO kann laut Schulz durch freie Oxygen-Radikale direkt inaktiviert werden. Eine Dysfunktion der NO-Synthase und eine Steigerung der NADPH-Oxidase gehen mit dem Voranschreiten einer Arteriosklerose und Plaqueinstabilität einher.

Da die Toxizität von Fremdstoffen oft durch die Bildung von freien Radikalen wie Superperoxidanion, Hydroxyradikale und Lipidperoxide bestimmt ist, wäre zu überlegen, ob hier ein eventueller Zusammenhang zwischen dem Cytochrom P450-Enzymsystem und der Arteriosklerose zu sehen ist. Polymorphismen an diesen Enzymen können eventuell erstens zu einer unvollständigen Oxidation mit Entstehung von Radikalen und zweitens durch verminderten Abbau von Fremdstoffen deren Toxizität mit vermehrter Bildung von freien Radikalen und damit einhergehendem oxidativen Stress und den folgenden Gefäßschäden verursachen. Vielleicht spielen sie auch eine Rolle bei dem Abbau der natürlichen Antioxidantien.

In dieser Arbeit konnte unter Betrachtung der einzelnen Risikofaktoren der KHK und in der logistischen Regression kein Nachweis über die signifikante Bedeutung von Leu432Val an CYP1B1 bei der Entstehung einer KHK nachgewiesen werden.

Die Untersuchung in dieser Arbeit darüber, ob das Vorhandensein der inaktiven oder aktiven GSTM1 in Kombination mit einem bestimmten Genotyp eines ebenfalls Fremdstoffverstoffwechselnden Enzyms, nämlich dem CYP1B1, einen Einfluß auf ein erhöhtes Risiko für eine KHK darstellt, konnte hier nicht nachgewiesen werden. Die bisher in der Literatur beschriebenen Auswirkungen von gemeinsam auftretenden Mutationen an diesen Enzymen beziehen sich nur auf maligne Erkrankungen, z.B. (Hung RJ 2004).

Eine weiterer Weg, über den Polymorphismen des CYP1B1 Einfluss auf die Entstehung der Koronaren Herzerkrankung haben könnten, ist der über die Metabolisierung von Estrogen, bei der das Cytochrom CYP1B1 eine wichtige Rolle spielt. Wie bekannt ist, hemmt Estrogen die Proliferation von glatten Muskelzellen der Koronararterien. CYP 1A1 und CYP1B1 metabolisieren Estrogen zu 2- und 4-Hydroxyestradiol. 2-Hydroxyestradiol wiederum wird durch die Katechol-O-Methyltransferase (COMT) zu 2-Methoxyestradiol umgewandelt. Dubey et al. untersuchten 2003, ob dieser hemmende Effekt von Estrogen durch lokale Metabolisierung in Methoxyestradiol durch CYP1A1, CYP1B1 und COMT, die alle drei in den glatten Muskelzellen exprimiert werden, beeinflusst wird. Sie kamen zu folgenden Ergebnissen: 2-Methoxyestradiol und 2-

Hydroxyestradiol sind stärkere Inhibitoren der Aktivität der glatten Muskelzellen als Estrogen, so dass sich die hemmende Wirkung von Estradiol durch Applikation von Induktoren bzw. Inhibitoren von CYP 1A1 und CYP1B1 entsprechend steigern oder blockieren ließ (Dubey RK 2003). Diese Untersuchungsergebnisse können nicht nur richtungshinweisend auf die Therapie sein. Sie können auch vermuten lassen, dass eventuell Polymorphismen dieser Enzyme die kardiovaskuläre Protektion steigern bzw. senken können. Hanna et al. stellten fest, dass mehrere Genvarianten, unter anderem auch CYP1B1*3 eine deutlich erhöhte Hydroxylierungsaktivität aufwiesen als der Wildtyp (Hanna IH 2000). Untersucht wurde die Hydroxylierungsaktivität von Estrogen durch CYP1B1*1 und seinen Genvarianten vor allem im Zusammenhang mit der Brustkrebserkrankung und wird im folgenden Kapitel der Arbeit behandelt.

Richtungsweisend ist aber, dass die Zukunft in der Untersuchung von Mutationskombinationen, in Bezug auf multifaktorielle Erkrankungen wie die KHK mit polygen bedingten Risikofaktoren liegt. So wäre die Untersuchung von Mutationen anderer Atherogene in Kombination mit CYP1B1*3 zu erwägen.

4.4. Weitere Assoziationen von CYP1B1-Polymorphismen zu komplexen Erkrankungen

Wie oben erwähnt, gibt es bereits zahlreiche Untersuchungen zur Assoziation der Polymorphismen der Cytochrome und des CYP1B1 bezüglich kanzerogener Erkrankungen. Das CYP1B1 ist unter anderem an der Verstoffwechslung von Kanzerogenen wie Arylaminen, Nitrosaminen und polyzyklischen Kohlenwasserstoffen beteiligt. In einer Arbeit von Ko et al. zur Assoziation von CYP1B1*3 zu Karzinomen des Larynx und des Pharynx konnte nachgewiesen werden, dass Raucher, die homozygote *3-Träger waren, ein erhöhtes Risiko für diese Tumorerkrankung aufwiesen; weiterhin wurden für diesen Genotyp tabakinduzierte p53-Mutationen gefunden (Ko YK 2001).

Epidemiologische Studien zeigten, dass die meisten Risikofaktoren für Brustkrebs auf hormonelle Faktoren zurückzuführen sind. Estrogen wird auch über seinen Metabolit Katecholestrogen als Trigger für die Entwicklung eines Mamma-Ca angesehen. Kocabas et al untersuchten die Rolle von unterschiedlichen Genvarianten von CYP1B1 und COMT-2, wichtige Enzyme im Estrogen-Stoffwechsel- in Bezug auf das Risiko für

Brustkrebs. Sie gelangten unter anderem zu der Erkenntnis, dass der Genotyp CYP1B1*3 unter Krebspatientinnen häufiger vorkam als in der gesunden Kontrollgruppe und nach Adjustierung verschiedener Risikofaktoren die Suszeptibilität für die Erkrankung an Brustkrebs vor allem bei Frauen mit einem BMI über 24 kg/m² erhöht ist, da CYP1B1 eines der Hauptenzyme bei der Umformung von 17- β -Estradiol in 4- und 2-Hydroxyestradiol ist (Kocabas NA 2002). Letztere werden mit der Entstehung des Mamma-Ca in Verbindung gebracht. Auch Zheng et al. konnten ein erhöhtes Risiko für Frauen mit einem homozygoten Leu-Genotyp in allen Gruppen mit Frauen mit bekannten Hauptrisikofaktoren für Mamma-Ca feststellen (Zheng W 2000). Andere Arbeiten stellten hingegen fest, dass Frauen mit dem homozygoten Val-Genotyp ein erhöhtes Risiko aufweisen; allerdings waren hierbei weitere Kriterien herangezogen worden, wie z.B. dem gleichzeitigen Kontakt mit Pflanzenschutzmitteln (Saintot M 2004). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die estrogenabhängige CYP1B1-Expression auf den Estrogenspiegel und damit auf die estrogenbedingte Kanzerogenese auszuwirken scheint. Diesbezüglich könnten Polymorphismen an CYP1B1 möglicherweise unterschiedliche Auswirkungen auf die Kanzerogenese haben.

Allerdings weisen auch hier immer mehr Arbeiten darauf hin, dass einen wirklichen Aufschluss über eine pathogenetische Bedeutung von Polymorphismen eines Enzyms nur die Untersuchung des vollständigen Haplotypen geben kann, da häufig erst das gleichzeitige Vorkommen von zwei oder mehr Polymorphismen Auswirkungen auf die Funktion des Enzyms haben kann (Aklillu E 2002).

4.5. Interethnische Differenzen

Die CYP1B1-Polymorphismen weisen - wie in Tabelle 17 gezeigt - eine große Heterogenität in verschiedenen Ethnien auf. So zeigte sich in einer Arbeit von Stoilov et al. 1997 in einer Gruppe von 70 Kaukasiern überwiegend türkischer Abstammung eine Häufigkeit des CYP1B1*3-Genotyps nur bei 10%, während in einer Studie von Schoket et al. im Jahre 2001 dieser Genotyp in einer Gruppe von Ungarn bei 20,5% der Menschen vorkam.

Die interethnischen Differenzen, die sich in den unten genannten Studien darstellen, können hinweisend sein für ein gehäuftes Vorkommen zum Beispiel von bestimmten Krebsarten in bestimmten Ethnien, da die bisher beschriebenen Mutationen des CYP1B1 entweder in Zusammenhang mit dem primären kongenitalen Glaukom oder mit verschiedenen Krebsarten gebracht wurde. Auffällig sind bei der Untersuchung von Tang et al., hinsichtlich der Rolle des Leu432Val-Polymorphismus bezüglich der Kanzerogenese des Prostata-Ca die starken Unterschiede der G-Allel-Frequenz mit einem deutlich erhöhten Vorkommen bei den Afro-Amerikanern mit einer Frequenz von 0,75 und einem wesentlich selteneren Vorkommen bei den Chinesen (0,17) gegenüber den Kaukasiern mit 0,43 (Tang YM 2000).

Tab. 17: Häufigkeit von CYP1B1*3 in verschiedenen Populationen

Population	n	Frequenz G-Allel	CYP1B1* 3 *1/*1	CYP1B1* 3 *1/*3	CYP1B1 *3 *3/*3	Autoren
Deutsche	101	0,401	39	43	19	Fritsche
	M + F		(38,6%)	(42,6%)	(18,8%)	1999
Deutsche	300	0,402	110	139	51	Brüning 1999
	M + F		(36,7%)	(46,3%)	(17,0%)	
70 Kaukasier, über- wiegend türkischer Abstammun- g	70 M + F	0,357	27	36	7 (10%)	Stoilov 1997
50 Türken, 50 Briten	100 M + F	0,285	54%	35%	11%	Stoilov 1998
Weißer Amerikaner	189 M + F	0,43				Tang 2000
Afro- Amerikaner	52 M + F	0,75				Tang 2000
Chinesen	109 M + F	0,17				Tang 2000
Ungarn	161 M + F	0,440	52 (32,3%)	76 (47,2%)	33 (20,5%)	Schoket 2001
Äthiopier	150 M+F	0,39	33 (22%)	96 (64%)	21 (14,0%)	Aklillu 2002
Deutsche	1946 M+F	0,38	756 (38,84%)	904 (46,45%)	286 (14,7%)	Vorliegende Arbeit

Tab. 18: Allelverteilung im Vergleich

Alleltyp	Aktuelle Arbeit	Fritsche 1999 Kontrollgruppe	p-Wert
CYP1B1*3 *1/*1	362	39	p=0,37
CYP1B1*3 *1/*3	466	43	
CYP1B1*3 *3/*3	137	19	

Chi-Quadrat nach Pearson: 1,99

Wie Tabelle 18 zeigt, gibt es bezüglich der Allelverteilung der gesunden Personen dieser Arbeit und z.B. denen der Arbeit von Fritsche et al. keine signifikanten Unterschiede.

4.6. CYP 1B1*3 und die Risikofaktoren der KHK

4.6.1. Rauchen als Risikofaktor

Der pathogenetische Zusammenhang zwischen Rauchen und der Entstehung der koronaren Herzerkrankung wurde schon im einleitenden Teil dieser Arbeit beschrieben, ebenso, inwiefern Mutationen am fremdstoffverstoffwechelnden Enzym diesbezüglich eine größere oder geringere Bedeutung haben könnten.

Auch in dem in dieser Arbeit untersuchten Kollektiv bestätigt sich das Rauchen als eindeutiger Risikofaktor bei der Entstehung der KHK (Odds ratio 1,45, CI 1,2-1,7, p gleich<0,001). In der logistischen Regression zum Risiko einer KHK ging Rauchen mit einem Exponenten von 1,68 (KI:1,37-2,06, p=<0,001) ein. Kovariaten waren Diabetes mellitus, arterieller Hypertonus und Hypercholesteriämie.

Ob das Vorhandensein des G-Allels im Codon 432 des Cytochrom P450 1B1 bei gleichzeitig vorhandenem Nikotinabusus das Risiko einer koronaren Herzerkrankung verstärkt, konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Der p-Wert lag bei den hetero- und homozygoten G-Allelträgern im Vergleich zur homozygoten C-Allelvariante

bei 0,56, Odds ratio:0,92, KI:0,68-1,23; der p-Wert bei den homozygoten G-Allelträgern betrug 0,53, Odds ratio:0,87, KI: 0,56-1,35.

Zahlreiche Arbeiten haben bereits den Zusammenhang zwischen dem Risikofaktor Rauchen und dem Entstehen einer KHK untersucht.

Allerdings liegen, wie bereits erwähnt, zahlreiche Untersuchungen bezüglich anderer Cytochrom-Polymorphismen und dem damit genetisch bedingten Einfluss auf die veränderte Metabolisierung von Zigarettenrauch vor. Innerhalb der CYP1-Familie ist CYP1A1 eines der Schlüssel-Enzyme bei der Verstoffwechslung von Zigarettenrauch. Dass die Exprimierung von CYP1A1 durch Zigarettenrauch bei bestimmten Genotypen ein erhöhtes Risiko für eine KHK bedeuten kann, zeigte die Untersuchung von Shinozaki et al. über den Zusammenhang zwischen unterschiedlichen Genotypen von CYP1A1, Rauchen und dem Blutbild. Bei Rauchern mit einem bestimmten Genotyp (Val-Allele nicht vorhanden) ließ sich eine erhöhte weiße Blutkörperchenzahl nachweisen (Shinozaki S 1996). In Anbetracht der Ergebnisse von epidemiologischen Untersuchungen ergaben, dass viele Individuen mit erhöhter Leukozytenzahl an Krebs oder einer KHK leiden, könnte diese o.g. Untersuchung erstens einen weiteren Hinweis auf die Genotypenabhängigkeit von CYP1A1 in Bezug auf das Risiko einer KHK und zweitens eine Leukozytose einen neuen Risikofaktor darstellen.

Weiterhin gibt es Untersuchungen über den CYP1A1 MspI-Polymorphismus (CYP1A1*2) in Bezug auf die Entstehung der KHK mit vorhandenem Begleitrisikofaktor Diabetes mellitus Typ II. Wang et al beschreiben in einer Arbeit diesen Einfluss von CYP1A1-Varianten. In ihrer Arbeit untersuchten sie den Effekt der Interaktion zwischen dem CYP1A1 MspI-Varianten und Rauchen auf die Entstehung einer KHK. Gleichzeitig waren die Patienten Diabetiker und Hypertoniker. Nachgewiesen werden konnte in dieser Arbeit, dass die homozygoten Träger der wesentlich seltener vorkommenden C-Allel- Variante ein erhöhtes Risiko für eine koronare 3-Gefäßerkrankung aufwiesen. Gleichzeitig hatten die Raucher mit diesem Genotyp ein erhöhtes Risiko für Diabetes mellitus Typ II. Somit lassen die Ergebnisse dieser Arbeit vermuten, dass der CYP1A1 MspI-Varianten eine Rolle bei der Entstehung der Arteriosklerose und der Erkrankung am Diabetes mellitus Typ II spielt (Wang XL 2002). Der Zusammenhang wurde auch von Inoue et al. untersucht. Dabei ging es um CYP 2A6. 3 Genotypen wurden aus der Leber -DNA von 39 Japanern und 43 Kaukasiern isoliert. Dabei zeigten sich Unterschiede hinsichtlich des Aktivitätsgrades der Coumarin-7-Hydroxylierung und der Nikotin-C-Oxidation zwischen homozygoten und

heterozygoten, außerdem zwischen beiden Ethnien (Inoue K 2000). All diese Untersuchungen haben noch keinen direkten Zusammenhang zur KHK herausgearbeitet.

Weitere Arbeiten bezüglich Genvarianten bei Enzymen mit ihren Auswirkungen auf den Metabolismus von Zigarettenrauch und dem damit verbundenen erhöhten Risiko einer KHK gibt es in der Literatur, zum Beispiel von Salama et al. Untersucht wurden die Glutathion-S-Transferase M1 und T1 (GSTM1+ GSTT1), Cytochrom P450 2E1 (CYP2E1), die mikrosomale Epoxid-Hydroxylase (mEH), die Paraoxonase (PON1) und die Myeloperoxidase (MPO). Hier wurde gezeigt, dass das Vorhandensein der GSTT1-Null-Allele und das der schnellen Allele von mEH das Risiko für Atherosklerose steigern. Ebenso ließ sich dies für das kombinierte Vorhandensein der Genotypen GSTM1 Null/CYP2E1(*)5B und GSTM1 Null/mEHYY feststellen (Salama SA 2002). Diese Arbeit ist ein Beginn in der Untersuchung über die genetische Suszeptibilität bei Exposition mit Zigarettenrauch und der Entstehung der Artherosklerose.

4.6.2. Hypercholesterinämie als Risikofaktor

Die in dieser Arbeit untersuchten KHK-Patienten wiesen für den Risikofaktor Hypercholesterinämie die höchste Odds ratio aller untersuchten Risikofaktoren, nämlich 2,56 auf (KI:2,13-3,08, p-Wert=<0,001). Als Kofaktor in der logistischen Regression zum Risiko einer KHK lag der Exponent bei 1,68 (KI:1,37-2,06, p-Wert=<0,001).

Hinsichtlich der Untersuchung eines erhöhten Risikos für eine KHK bei zusätzlichem Vorhandensein der G-Allel-Variante von CYP1B1 im Codon 432 zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse. Die Gruppe der Hetero -und Homozygotie für das G-Allel wies kein signifikant häufigeres Vorkommen in der Gruppe der KHK-Patienten nach, die Odds ratio lag bei 0,95 (KI: 0,71-1,27, p-Wert=0,74), bei der Untersuchung der alleinigen Homozygoten für das G-Allel war die Odds ratio 1,16 (KI:0,73-1,84, p-Wert=0,54). Ein Zusammenhang zwischen den Varianten CYP1B1*3, Hypercholesterinämie und dem erhöhten Risiko für eine KHK konnte somit nicht erbracht werden.

Eine Untersuchung über Zusammenhänge zwischen einer Hypercholesterinämie und Genvarianten an Cytochrom P450-Enzymen in der Literatur fanden sich nicht. Die genauen Einwirkungen der Cytochrome P450 bezüglich eines Einflusses auf den

Cholesterinspiegel sind nur zum Teil beschrieben. Irizar et al. konnten bei einer Untersuchung von induzierter Hypercholesterinämie bei Kaninchen veränderte Expressionen von Cytochromen in Leber, Lunge und Nieren feststellen. So konnte in der Aorta eine Erhöhung von CYP2A und CYP3B –Apoproteinen festgestellt werden, der genaue Mechanismus ist noch zu klären (Irizar A 1998). Bezüglich der Rolle des CYP1B1 fanden sich bisher keine Untersuchungen.

In zahlreichen Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass die Hypercholesterinämie eine der Hauptrisikofaktoren für die Entstehung einer KHK ist. Was die Bestimmung der Kandidatengene für die Hypercholesterinämie angeht, so sind die wichtigsten das LDL-Rezeptor-Gen, das Apolipoprotein 100-Gen und das Gen für Apolipoprotein E.

Ein weiteres in diesem Zusammenhang beschriebenes Gen ist das FH3-Gen (Varrett M 1999). Mutationen an diesen Genen werden mit dem Risiko einer Hypercholesterinämie in Zusammenhang gebracht. Allein für das LDL-Rezeptor-Gen sind fünf Mutationsklassen beschrieben. Es ist davon auszugehen, dass ein nicht unerheblicher Anteil der Hypercholesterinämien polygen verursacht wird. Bertolini et al. beschrieben weitere Varianten, die Einfluss auf den Phänotyp der familiären heterozygoten Hypercholesterinämie hatten. So haben Genvarianten an FABP-2 (A54T) und an der Lipoproteinlipase (S447X) Einfluss auf das HDL-Cholesterin. Auch ein Einfluss von R219K an ABCA1 (ATP binding cassette transporter1) wurde untersucht (Bertolini S 2004). Patienten mit einer KHK wiesen eine höhere Prävalenz für den FABP-2 54TT- und eine niedrigere für die ABCA1 219RK- oder KK-Genotypen auf. Letzteres zeigte sich auch bei einer Untersuchung von Patienten mit der Tangier-Krankheit; hier zeigte sich ebenfalls ein signifikant erhöhtes Auftreten der K-Allele bei Patienten ohne KHK (Cenarro A 2003). Shimokata et al. zeigten, dass 994G->T des Plättchenaktivierenden Faktor –Acetyldehydrogensase-Gen, 242C->T des NADH/NADPH-Oxidase p22-Phox-Gens und 1100C->T am ApolipoproteinC-III-Gen bei Männern mit einer Hypercholesterinämie signifikant erhöht war. Es zeigt sich, dass verschiedene genetische Varianten Einfluss auf die phänotypische Expression und das Risiko für eine KHK haben.

4.6.3. Diabetes mellitus als Risikofaktor

Die KHK-Patienten wiesen für den Risikofaktor Diabetes mellitus eine signifikant höhere Frequenz als die Kontrollgruppe auf. Die Odds ratio lag in diesem Fall bei 2,3 (KI: 1,8-2,93, p-Wert<0,001). Als Kofaktor in der logistischen Regression für das Risiko einer KHK zeigt sich ein deutlicher Einfluss (Exponent <0,001, Odds ratio: 2,17, KI:1,67-2,83).

Ein Einfluss von CYP1B1*3 konnte jedoch auch hier nicht nachgewiesen werden. Sowohl im Vergleich der hetero- und homozygoten G-Allelvarianten als auch der homozygoten G-Allelträger zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen KHK-Patienten und den Kontroll-Individuen.

Der Diabetes mellitus ist eine multifaktorielle Erkrankung und zu seiner Pathogenese tragen sowohl genetisch bedingte als auch erworbene Faktoren bei.

Die Genetik des Diabetes mellitus ist komplex und vielschichtig. In den letzten Jahren wurden eine Reihe von Kandidatengenen und ihre Mutationen bestimmt. Bisher konnten allerdings kaum „dominierende“ Gene ausfindig gemacht werden. Beispiel für eine Erkrankung durch einen Gendefekt ist das Syndrom der Insulinresistenz durch einen Defekt des Insulinrezeptors. Die Gene, die aufgrund einer Mutation eine Anfälligkeit für eine Erkrankung am Diabetes bestimmen, sind diejenigen, die u.a. die Insulinsignaltransduktion, die Insulinsekretion, die Insulinresistenz und den Glucosemetabolismus betreffen. In diesem Zusammenhang benannte Kandidatengene sind das Amylin-Gen mit der S20G-Variante und das Pax4(Cho YM 2004)-Gen mit der R121W-Variante mit Veränderung der Insulinresistenz (Sanke T 2002), des weiteren die Gene Peroxisome proliferated-activated receptor gamma (PPAR gamma) und Calpain-10 (CAPN10) (McIntyre EA 2002), ADRB3 und ENPP1 (Busch CP 2001), PCG1alpha (Toye A 2003). Eine PCK1-Variante führt zu einer exzessiven hepatischen Gluconeogenese. Cho et al. wiesen nach, dass eine Gen-Gen- Interaktion zwischen den Ala55Val-Varianten des UCP2-Gens(uncoupling Protein2-Gen) und dem C161T-Varianten an PPARgamma ein signifikant höheres Risiko für den Typ2-Diabetes mit sich bringen (Cho YM 2004). Eine 5bp-Deletion am 3'Ende des PPP1R3)-Gens, das die glykogenassoziierte Untereinheit der PP1G (Protein-Phosphatase-1) kodiert, geht mit einer erhöhten Insulinresistenz einher. Außerdem können auch Mutationen an den Genen für die Glucokinase, den Hepatozyten-Nuclear-Faktor und dem Insulin Promoter-Faktor 1 Ursachen für eine Erkrankung sein (Elbein SC 2000). Auch bestimmte

Genvarianten des HSD11B1-Gens (11beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ1) erhöhen das Risiko für einen Typ2 –Diabetes. Bezüglich der Cytochrom p450-Enzyme gibt es Untersuchungen zu den CYP2J2-Varianten. Das CYP2J2 kodiert für ein Enzym, das am Metabolismus der Arachidonsäure zu Eicosanoiden beteiligt ist. Es konnte jedoch keine Assoziation zwischen der CYP2J2*6-Variante und dem Risiko für diabetogene Gefäßkomplikationen festgestellt werden (Pucci L 2003). Irizar et al. stellten eine erhöhte Expressierung von CYP4504A1 in der Niere und eine verminderte Expressierung von P4502E1 in der Lunge bei einer diabetischen Ratte fest (Irizar A 1995). Barnett et al. wiesen ein verändertes CytochromP450-Profil in der Leber bei länger bestehendem Diabetes bei Ratten nach. Diese Veränderungen schienen aber isoenzymspezifisch zu sein.

Anhand einer Arbeit über Ratten mit länger bestehendem Streptozozin- induzierten Diabetes, und über die Auswirkung letzteren auf den Fremdstoffmetabolismus und den oxidativen Stress, zeigte, dass es zu einer erhöhten Expression von Cytochromen P450, u.a. 1A1 mit nachfolgenden bestimmten erhöhten katalytischen Aktivitäten bezüglich kam (Raza H 2000). Anhand dieser Beobachtungen kommt man zu der Schlussfolgerung, dass veränderte endogene Substrate und Hormonspiegel sich auf den Fremdstoffmetabolismus und den oxidativen Stress auswirken. Untersuchungen bezüglich einzelner Mutationen und der KHK gibt es in der Literatur nicht.

4.6.4. Hypertonus als Risikofaktor

So wie die zuvor untersuchten Risikofaktoren zeigt auch die Hypertonie einen eindeutig signifikanten Zusammenhang mit dem Erkranken an einer KHK. In diesem Fall lag die Odds ratio bei 2.2 (KI: 1,84-2,63, p-Wert<0,001). In der Regressionsanalyse zum Risiko einer KHK-Erkrankung lag der Exponent bei 2,08 (KI:1,71-2,53, p<0,001).

Ein Einfluss der CYP1B*3-Varianten konnte auch in diesem Fall nicht signifikant nachgewiesen werden. Die Odds ratio des Vergleiches von heterozygoten- und homozygoten G-Allelträgern zwischen KHK-Patienten und Kontrollpersonen lag bei 0,97 (KI:0,74-1,28, p-Wert=0.84); bei dem Vergleich nur der Homozygoten für das G-Allel war die Odds ratio 1,08 (KI:0,72-1,62, p-Wert=0,71).

Der exakte pathogenetische Mechanismus der Hypertonie ist nicht geklärt. Welcher pathogenetische Faktor als hauptsächlicher Mechanismus für die Entstehung des Hypertonus angesehen werden muss, ist noch zu klären. Die Genese ist in den meisten

Fällen höchstwahrscheinlich multifaktoriell und abhängig von Erb- und Umweltfaktoren. Deshalb ist auch hier die Rolle der Cytochrom P450-Monooxygenasen weiter zu beachten und zu untersuchen. Wahrscheinlich ist die genetische Komponente polygen bedingt. Einzelgendefekte konnten bisher für das Angiotensinogen-Gen nachgewiesen werden (Jeunemaitre X 1992). Beteiligte Gene sind zum Beispiel das G-Protein beta3 subunit –Gen und das Chemokinin-Rezeptor-2 –Gen. Mutationen an diesen Genen zeigten eine signifikante Assoziation mit dem Hypertonus beim Mann. Bei der Frau konnte eine Mutation am Tumor-Nekrose-alpha-Faktor-Gen mit dem Hypertonus assoziiert werden (Izawa H 2004). Weiterhin wurden das PTGS2-Gen, außerdem das GSTM3- und das SLC12A1-Gen benannt (Iwai N 2004). 2003 konnte von Ono et al. eine Assoziation zwischen bestimmten Genvarianten des SLC6A2 (Norepinephrin-Rezeptor-Gen, solute carrier family 6, member 2) und hohem Blutdruck erstellt werden (Ono K 2003). Die Untersuchung von T344C an CYP11B2, verantwortlich für die Kodierung der Aldosteron-Synthase, lässt eine Korrelation vermuten (Connell JM 2004). Die viel selteneren monogen verursachten Hypertonien führten Guttmacher et al. auf. Dazu gehört der bereits erwähnte Aldosteron-Synthase-Defekt oder Mutationen an der ENaC β oder gamma-Untereinheit und zu dem seltenen Liddle's –Syndrom führen (Guttmacher AE 2003).

Anhand all dieser Arbeitsbeispiele wird aufgezeigt, wie komplex die Entstehung der Hauptrisikofaktoren und ihr Einwirken zusammen mit anderen Faktoren auf die Entstehung der Atherosklerose ist. Somit ist auch allein im Bereich der Cytochrome P450 mit ihren multiplen Substraten eine sehr hohe Zahl an Kandidatengenen für die Entstehung einer Atherosklerose und einer KHK zu erwarten und noch zu erforschen.

4.6.5. Der CYP1B1*3-Polymorphismus in Zusammenhang mit dem akuten Myokardinfarkt, Schweregrad der KHK, dem Auftreten des akute Koronarsyndroms und Komplikationen innerhalb der ersten 30 Tage nach Intervention

Die unterschiedlichen Untersuchungen hinsichtlich einer eventuellen Auswirkung der CYP1B1*3-Varianten auf die verschiedenen Ausprägungsformen der KHK erbrachten keine signifikanten Ergebnisse.

4.7. Einfluss der CYP1B1*3-Varianten in Kombination mit GSTM1

Die Untersuchung der Aktivität der GSTM1-Variante in Zusammenhang mit dem Vorkommen eines bestimmten CYP1B1-Genotyps zeigte keinerlei Signifikanz bezüglich einer Einflussnahme auf die Entstehung einer KHK. Bei inaktiver GSTM1 lag die Odds ratio bei 0,92 (KI:0,72-1,19, p-Wert=0,54), bei aktiver GSTM1 fand sich eine Odds ratio von 0,84 (KI:0,64-1,12, p-Wert=0,23). Die Untersuchung dieser verschiedenen Genotypen-Kombinationen geht auf die schon länger bekannte Assoziation der GSTM1 Null mit der Kanzerogenese zurück. Die Vermutung, dass dieses Entgiftungsenzym, das auch im Tabakrauch vorkommende Peroxide entfernt und diese wiederum genotoxische-atherogen wirken, ließ einen Einfluss auf die Entstehung der KHK, v.a. bei Rauchern erwarten. Die erste größere Kohorten-Studie bezüglich der Genotypen GSTM1 und GSTT1 wurde von Li et al. durchgeführt. Hier zeigte sich bei Rauchern mit einer inaktiven GSTM1 ein signifikant erhöhtes Risiko für eine KHK, Raucher mit einer inaktiven GSTM1 hatten gegenüber Rauchern mit einer aktiven GSTM1 ein 1,5-fach erhöhtes Risiko und ein 2-fach erhöhtes Risiko gegenüber Nichtrauchern mit inaktiver GSTM1 (Li R 2000).

Tamer et al. zeigten dass das Vorhandensein der inaktiven GSTM1 und GSTT1 alleine oder kombiniert zu einem erhöhte Risiko einer KHK führt, dass aber nur bei Rauchern dieses Risiko signifikant ist (Tamer L 2004).

In einer Arbeit von Massetti et al. zeigte sich ein signifikant erhöhtes Risiko für eine KHK bei Rauchern mit GSTM1 und GSTT1 Null-Genotypen im Vergleich zu Nichtrauchern; zusätzlich zeigte sich bei Rauchern mit inaktiven Enzymen häufiger eine Mehrgefäßerkrankung als bei Rauchern mit aktiven Enzymen. Gleichzeitig fand sich bei ihnen ein erhöhter Anteil an Chromosomen – Schäden (Massetti S 2003).

5.Zusammenfassung

Die koronare Herzkrankheit stellt eine multifaktorielle Erkrankung dar, die neben äußeren Einflussfaktoren einen komplexen genetischen Hintergrund aufweist. Da Inhaltstoffe des Zigarettenrauchs die Entstehung der Atherosklerose begünstigen, wurde in der vorliegenden Fall-Kontroll-Studie die Hypothese geprüft, ob zwischen dem polymorphen Cytochrom P4501B1 und dem Auftreten der Koronaren Herzerkrankung eine Assoziation besteht. Der Schwerpunkt dieser Untersuchung lag auf dem Risikofaktor Zigarettenrauchen, da das Cytochrom P450 1B1 zu den wichtigsten Aktivatoren aromatischer Kohlenwasserstoffe des Zigarettenrauchs gehört. Des weiteren wurde untersucht, inwiefern ein Zusammenhang zwischen dem kombinierten Auftreten bestimmter Allelvarianten von CYP1B1 und der Aktivität der Glutathion-S-Transferase besteht.

Zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit waren nur vier Allelvarianten, unter anderem 4326C>G an CYP1B1, das zum Austausch der Aminosäure Leucin in Valin führt, bekannt. Die pathogenetische Bedeutung von *CYP1B1*3* war zuvor in Untersuchungen mit malignen Erkrankungen, wie dem kolorektalen Karzinom und dem Brustkrebs beobachtet worden. Der Zusammenhang zwischen einer bestimmten Genvariante von CYP1B1 und dem Erleiden an der Koronaren Herzerkrankung war bisher nicht untersucht worden.

Für diese Arbeit wurde ein Kollektiv von 1000 deutschstämmigen Patienten ausgewählt, bei denen eine angiographisch gesicherte KHK vorlag. Die Kontrollgruppe setzte sich aus 1000 alters- und geschlechtsgematchten Patientengruppe zusammen, die keine klinischen oder anamnestischen Zeichen einer KHK aufwies. Die Genotypisierung von CYP1B1*3 erfolgte nach der DNA-Isolation mittels PCR/RFLP.

Die Allelfrequenzen zeigten mit 0,38 in der KHK- wie auch in der Kontrollgruppe eine Gleichverteilung. Auch die Verteilung der Genotypen war in beiden Gruppen nahezu identisch. Eine Stratifizierung nach Alter und Geschlecht zeigte ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede. Die gefundenen Häufigkeiten entsprachen den publizierten in der deutschen Bevölkerung und lagen im Hardy-Weinberg-Äquilibrium. Die Stratifizierung nach dem Risikofaktor Rauchen, Hypertonie, Hypercholesterinämie und Diabetes mellitus ergab keine Hinweise auf eine Assoziation zwischen der KHK und den Genvarianten Leu432Val des CYP1B1.

Auch hinsichtlich des Schweregrads der KHK (1-, 2- oder 3-Gefäßerkrankung), des Risikos eines Myokardinfarktes und hinsichtlich Komplikationen 30 Tage nach Intervention konnten keine statistischen Unterschiede nachgewiesen werden. Das Entstehen einer Koronaren Herzerkrankung ist darüber hinaus unabhängig vom kombinierten Auftreten der aktiven oder inaktiven Glutathion-S-Transferase mit den einzelnen CYP1B1-Genotypen. Eine logistische Regressionanalyse unter Berücksichtigung des Geschlechts, BMI, Manifestationsalter, Rauchen, Hypertonus, Diabetes mellitus und Hypercholesterinämie ergab ein relatives Risiko für Träger des CYP1B1*3-Allels von 0,94, $p=0,55$.

Zusammenfassend ergaben sich somit keine Hinweise auf eine Assoziation der funktionellen CYP1B1 Leu432Val-Varianten mit dem Risiko der koronaren Herzerkrankung. Die eingangs aufgestellte Hypothese musste somit zurückgewiesen werden.