

1 Einleitung

In der westlichen Welt steigt die Lebenserwartung der Menschen stetig an. Waren früher einmal Infektionskrankheiten die häufigste Todesursache, so liegt diese heute in kardiovaskulären Erkrankungen. Das statistische Bundesamt erfasste für das Jahr 2002 insgesamt 841.686 Todesfälle, knapp die Hälfte von ihnen aufgrund von Krankheiten des Kreislaufsystems und rund ein Viertel aufgrund von Tumorerkrankungen (s. Tab. 1.1).

Tabelle 1.1: Todesursachen in der BRD 2002 (Quelle: Statistisches Bundesamt)

Todesursache	Anzahl (gesamt)	Anzahl (in %)
Alle Todesursachen	841.686	100
Kardiovaskuläre Erkrankungen	393.778	47
davon: chronisch ischämische Herzkrankheit	davon: 94.166	davon: 24
akuter Myokardinfarkt	64.218	16
Herzinsuffizienz	56.955	14
Schlaganfall	39.433	10
Im Vergleich: Tumorerkrankungen	215.441	26

Physiologisch bildet das intakte Endothel eine Barriere gegen die Ausbildung arteriosklerotischer Plaques. Gefäßschädigende Einflüsse können diesen Schutz jedoch aufheben, wobei Bluthochdruck, Dyslipoproteinämie, Diabetes mellitus und Rauchen zu den wichtigsten Risikofaktoren zählen. Auch eine familiäre Vorbelastung wirkt krankheitsbegünstigend. Bei eingehenderer Betrachtung der Vorgänge am Endothel wird deutlich, inwiefern genetisch determinierte Faktoren bei der Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen eine Rolle spielen können, wenn beispielsweise genetische Polymorphismen in Substanzen auftreten, die zur Aufrechterhaltung der Homöostase am Gefäßbett benötigt werden.

1.1 Das Endothel

Als einschichtige Epithelschicht kleidet das Endothel sämtliche Blutgefäße aus und umfasst bei einer 70 kg schweren Person eine Fläche von ca. 700 m² (Lüscher und Barton, 1997). Seine Größe und die Lokalisation zwischen dem zirkulierenden Blut und den glatten Gefäßmuskelzellen ermöglichen ein entscheidendes Mitwirken an der Regulierung des Blutflusses durch Freisetzung endothelialer Mediatoren.

Pionierarbeit bei der Erforschung der Vorgänge am Endothel leisteten Furchgott und Zawadzki (1980). Sie beobachteten, dass intakte Endothelzellen die Voraussetzung dafür waren, dass Acetylcholin vasodilatierend wirken konnte. Durch Stimulation muscariner Acetylcholinrezeptoren bildet das Endothel eine oder mehrere Faktoren, die eine Vasodilatation durch Aktivierung der glatten Gefäßmuskelzellen auslösen – so schlussfolgerten sie. Der Auftakt zur weiteren Erforschung eines solchen Faktors, der „Endothelium-Derived Relaxing Factor“ (EDRF) genannt wurde, war gegeben.

1.1.1 Stickstoffmonoxid

In der Folge wurde der EDRF als Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert (Palmer et al., 1987). In einer enzymatischen Reaktion wird die Aminosäure L-Arginin in die um ein Stickstoffatom ärmere Aminosäure Citrullin und NO gespalten (Palmer et al., 1988). Die konstitutiv im Gefäßendothel exprimierte „konstitutive“ oder „endotheliale“ NO-Synthase (eNOS) katalysiert diese NADPH-vermittelte Reaktion (s. Abbildung 1.1).

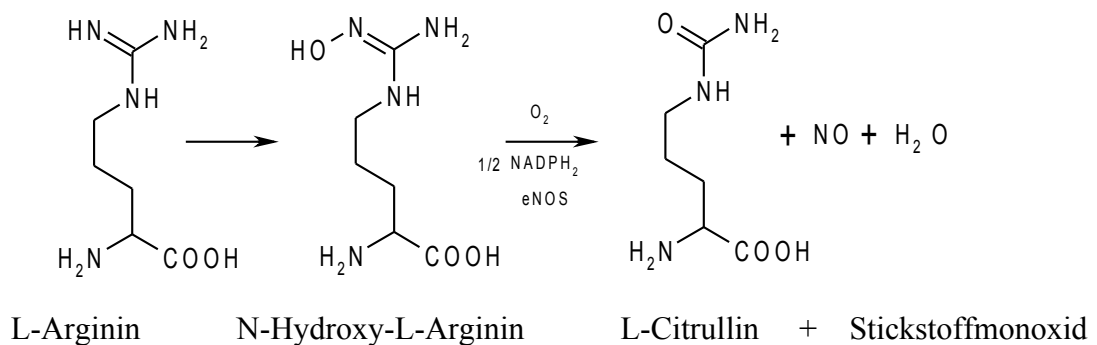


Abbildung 1.1: Aus der Aminosäure L-Arginin entstehen über eine Zwischenstufe die um ein Stickstoffatom ärmere Aminosäure L-Citrullin und NO. Die endotheliale NO-Synthase katalysiert die Reaktion und NADPH wirkt als second messenger mit.

Panza et al. (1990) stellten bei Hypertonikern eine im Vergleich zu Nichthypertonikern herabgesetzte endothelabhängige Vasodilatation fest. Manning et al. (1993) konnten nachweisen, dass eine L-NAME-induzierte mehrtägige Blockade der NO-Synthese zu Hypertonie führte. Daraus leiteten sie ab, dass NO im Normalfall kontinuierlich basal im Endothel freigesetzt wird und zu einem physiologischen NO-abhängigen Vasodilatator-Tonus führt.

Die Vasodilatation kommt durch Auslösung einer Signalkaskade zustande (s. Abb. 1.2). Rezeptorvermittelt durch Proteinkinasen, Neurotransmitter oder Hormone (wie Bradykinin, Acetylcholin, Substanz P, ATP, ADP, Histamin, Serotonin, Thrombin) oder nicht rezeptorvermittelt durch mechanischen Scherstress steigt der Kalziumgehalt der Endothelzelle. Es folgt eine Kalzium-Calmodulin-abhängige Reaktion, bei der die eNOS NO aus L-Arginin freisetzt. Das in der Endothelzelle entstandene NO diffundiert in die glatte Gefäßmuskelzelle und ruft dort eine Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase hervor. Diese wiederum katalysiert die Bildung von cGMP (cyclisches GuanodinMonoPhosphat) aus GTP. Der cGMP-Anstieg bewirkt die letztendlich folgende Senkung des Gefäßtonus' über eine Aktivierung von Proteinkinasen (Furchgott und Vanhoutte, 1989; Moncada und Higgs, 1993).

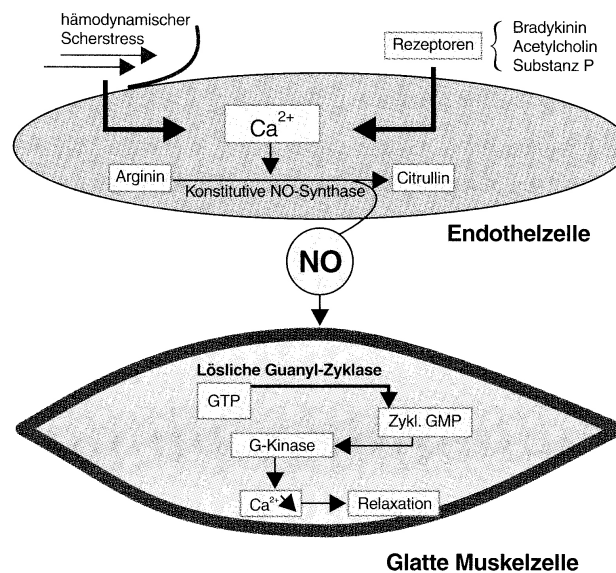


Abbildung 1.2: Scherstress oder Rezeptoragonisten wie Bradykinin bewirken einen intrazellulären Kalziumanstieg, und die eNOS setzt NO aus L-Arginin frei. NO löst cGMP-vermittelt in der Gefäßmuskulatur Relaxation aus. (modifiziert nach Drexler, 2000)

Das vielfältige Wirkungsspektrum des kleinen Moleküls NO umfasst nicht nur die Vasodilatation. Es inhibiert auch die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen, die Adhäsion von Leuko- und Thrombozyten an die Gefäßwand und die Thrombozytenaggregation und wirkt daher antiatherogen und antithrombotisch (Garg und Hassid, 1989; Radomski et al., 1987; Kubes et al., 1991).

NO ist ein frei diffundierendes, labiles Radikal mit einer Halbwertszeit von wenigen Sekunden. Es wird schnell an Moleküle gebunden, die wie die Guanylatzyklase oder Hämoglobin prosthetisches Häm-Eisen enthalten oder die schwefelhaltige Aminosäure Cystein (Nitrosylierungsreaktion). Zudem kann NO mit Superoxidanionen (O_2^-) reagieren und zur Bildung zytotoxischer Peroxide ($OONO^-$) führen (Furchgott und Vanhoutte, 1989; Mathews und Kerr, 1993).

1.1.2 Dilatation und Kontraktion im Gleichgewicht

Das Endothel reagiert durch Bereitstellung unterschiedlicher Mediatoren auf verschiedene Anforderungen. Dem endothelialen relaxierenden Faktor (EDRF/NO) ist die Existenz endothelialer kontrahierender Faktoren („Endothelium-Derived Contracting Factors“, EDCFs) gegenübergestellt. Dazu zählen ein aus 21 Aminosäuren aufgebautes Peptid, das Endothelin 1, vasokonstriktive Prostanoiden wie Thromboxan A_2 und Prostaglandin H_2 und Komponenten des Renin-Angiotensin Systems.

Die Endothelinfamilie besteht aus drei Isoformen, aber nur Endothelin 1 (ET-1) ist an der Gefäßtonusregulierung beteiligt. Das „Endothelin-Converting Enzyme“ (ECE) wirkt mit bei der Bildung von Endothelin aus mehreren Vorstufen. Endothelin bindet an Protein G-gekoppelte ET_A - und ET_B -Rezeptoren der glatten Muskelzelle und löst an beiden Rezeptoren Vasokontraktion aus. In einer niedrigen Konzentration stimuliert Endothelin an ET_B -Rezeptoren der Endothelzelle die Freisetzung von NO, und somit sind über negative Rückkopplung die kontrahierenden und dilatierenden Mechanismen miteinander verknüpft.

Das „Angiotensin-Converting Enzyme“ (ACE) wird in der endothelialen Zellmembran exprimiert und wandelt Angiotensin I in das biologisch aktive Angiotensin II um. Über Aktivierung von Angiotensinrezeptoren wird auch die ET-1 Produktion stimuliert. ACE ist identisch mit der Kinase II, die Bradykinin inaktiviert. Auf diese Weise wirkt ACE

nicht nur durch Angiotensinfreisetzung vasokonstriktorisch, sondern über eine Bradykinininaktivierung auch durch eine verminderte NO-Freisetzung.

Zur Vasodilatation tragen neben NO auch Prostazyklin und ein sogenannter „Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor“ (EDHF) bei. Prostazyklin wird durch verschiedene Auslöser wie Scherstress oder Hypoxie freigesetzt und bewirkt einen cAMP-Anstieg in glatten Muskelzellen und Thrombozyten. Die NO-synergistische Inhibition der Plättchenaggregation ist dabei ausgeprägter als die vasodilatierende Wirkung. EDHF wird in einer Cytochrom P450-abhängigen Reaktion synthetisiert und reagiert auf Stimuli wie Acetylcholin und Bradykinin (Lüscher und Barton, 1997; Fisslthaler et al., 1999). Abbildung 1.3 veranschaulicht die Vorgänge, die am gesunden Endothel zu einem empfindlichen Gleichgewicht von Vasodilatation und -kontraktion beitragen.

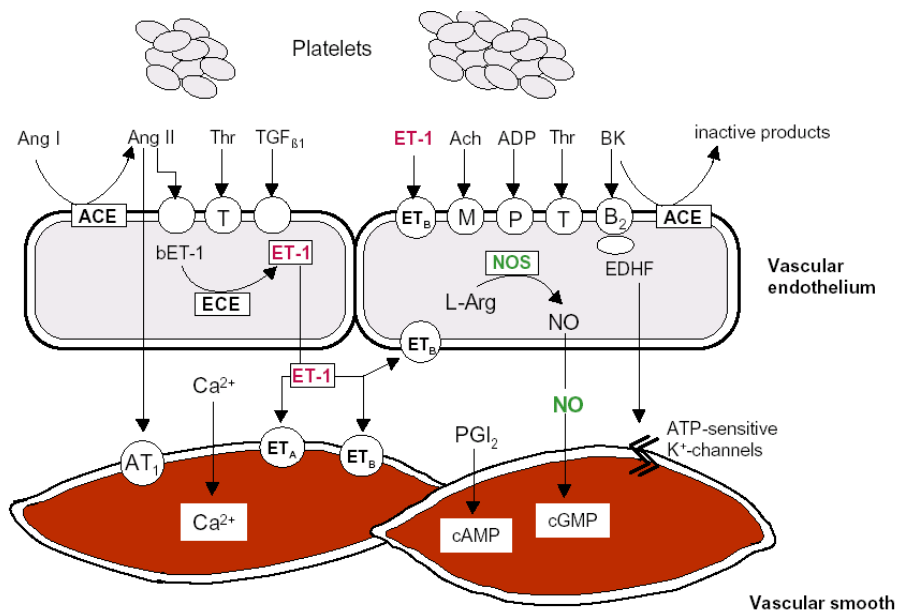


Abbildung 1.3: Zwischen dem zirkulierenden Blutvolumen und den glatten Gefäßmuskelzellen findet in den Endothelzellen die Endothelin- und NO-Synthese statt. Im linken Teil der Abbildung sind beispielhaft die Vorgänge bei Kontraktion, im rechten Teil diejenigen bei Dilatation aufgeführt.

Ang= Angiotensin, **ACE**= Angiotensin Converting Enzyme, **Ach**= Acetylcholin, **ADP**= Adenosin-diphosphat, **ATP**= Adenosin-triphosphat, **Bk**= Bradykinin, **cAMP/cGMP**= cyclisches Adenosin-/Guanosin-monophosphat, **ECE**= Endothelin Converting Enzyme, **EDHF**= Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor, **ET**= Endothelin, **L-Arg**= L-Arginin, **NO**= Stickstoffmonoxid, **NOS**= NO-Synthase, **PGI₂**= Prostacyclin, **TGFβ**= Transforming Growth Factor β, **Thr**= Thrombin, Rezeptoren (durch Kreise gekennzeichnet): **AT**= Angiotensin-R., **B**= Bradykinin-R., **ET**= Endothelin-R., **M**= muscarinischer R., **P**= purinischer R., **T**= Thrombin-R. (modifiziert nach Lüscher und Barton, 1997)

1.2 Isoformen der NO-Synthase

Wegen der kurzen Halbwertszeit wird die biologische Verfügbarkeit von NO vor allem durch die ständige enzymatische Neubildung gewährleistet. Die Enzymfamilie der NO-Synthasen umfasst drei Isoformen. Allen gemeinsam ist der Molekülaufbau mit Erkennungspunkten für die Kofaktoren Calmodulin, Flavinadeninmono- und dinucleotide (FMN, FAD), und NADPH. Zusätzlich enthalten sie neben dem für die Enzymaktivität essentiellen Tetrahydrobiopterin eine Phosphorylierungssequenz (s. Abb. 1.4).

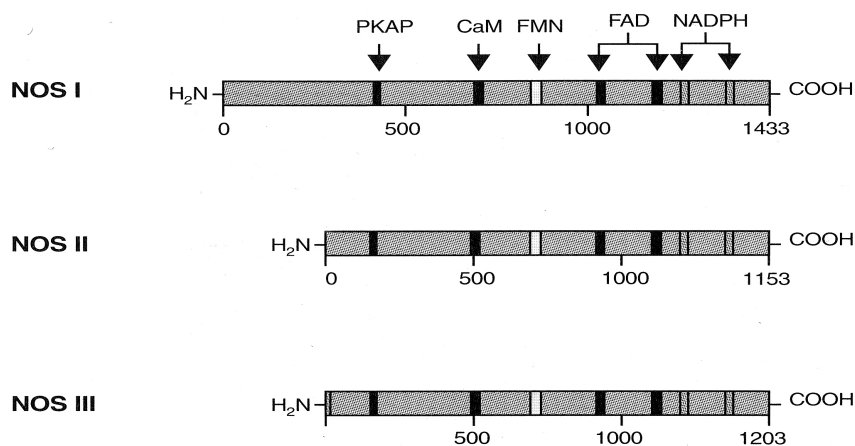


Abbildung 1.4: Isoformen der NO-Synthasen (modifiziert nach Drexler, 2000)
 Bindungssequenzen für CaM: Calmodulin und für FMN, FAD, NADPH
 PKAP: Phosphorylierungssequenz

NOS I (nNOS) wird konstitutiv in Neuronen und Skelettmuskeln exprimiert. Im zentralen Nervensystem wirkt NO als Neurotransmitter und ist dort an Vorgängen wie der Gedächtnisbildung beteiligt. In der Peripherie wirkt NO durch neurogene Vasodilatation im Gastrointestinal-, Respirations- und Urogenitaltrakt durch Stimulierung „nonadrenerger“ und „noncholinerg“ Nerven. Eine Kalzium-Calmodulin-abhängige Reaktion reguliert die Aktivität der neuronalen NO-Synthase.

NOS II (iNOS) wird unter physiologischen Bedingungen nicht oder gering exprimiert. Ihre Bildung in aktivierten Makrophagen wird jedoch während immunologischer Reaktionen induziert durch Lipopolysaccharide und Mediatoren wie Zytokine. Die iNOS ist beteiligt an der Pathogenese des septischen Schocks und möglicherweise auch bei hyperdynamem Status der Zirrhose und entzündlichen Prozessen. Unabhängig vom Ca^{2+} -Gehalt bindet sie fest an Calmodulin.

NOS III (eNOS) wird ebenso wie NOS I konstitutiv in einer Kalzium-Calmodulin-abhängigen Reaktion exprimiert. Sie wird hauptsächlich im Endothel gebildet, kommt aber auch in anderen Zellen wie Kardiomyozyten, Mono- und Thrombozyten vor (Moncada und Higgs, 1993; Förstermann et al., 1998; Hoit, 2001; Kelly et al., 1996).

1.3 Polymorphismen des eNOS-Gens

Das eNOS-Gen umspannt 21 Kilobasen, die 26 Exons und 25 Introns enthalten. Lokalisiert ist es auf dem Chromosom 7q35-36, und es liegt im haploiden Chromosomensatz als einzelne Kopie vor (Marsden et al., 1993).

Die wichtige Rolle der eNOS im kardiovaskulären System wird durch folgende Studien vielleicht am deutlichsten: Zum einen wurde im Tierversuch das eNOS-Gen ausgeschaltet („eNOS-Knockout-mice“), woraufhin die Tiere einen Hypertonus entwickelten (Huang et al., 1995). Zum anderen reagierten transgene Mäuse, die eNOS überexprimierten, mit Hypotonus (Ohashi et al., 1998).

Schon während der Erforschung der Struktur und Lokalisation des eNOS-Gens fielen Unterschiede in der Basenfolge auf, und es stellte sich die Frage, inwiefern diese mit einem Krankheitspotential verbunden waren. Das Interesse an der Beantwortung war groß, nicht zuletzt erwachsen neue therapeutische Interventionsmöglichkeiten aus dem Wissen und Verständnis von Zusammenhängen.

In der Folge wurden Assoziationen von polymorpher eNOS und kardiovaskulären Erkrankungen immer wieder festgestellt. Wang und Wang (2000) stellten eine Übersicht der bis Juni 2000 veröffentlichten über 40 Studien vor, die darüber berichteten. Zu den untersuchten Polymorphismen zählten in der Promoterregion Punktmutationen, die ein Nukleotid betrafen („Single Nucleotide Polymorphism“ = SNP): ein Basenaustausch T(-1468)A, A(-922)G und T(-786)C. Keiner von ihnen schien jedoch die Bindestelle des Transkriptionsfaktors zu beeinträchtigen.

Polymorphismen der Introns beinhalteten einen Basenaustausch in Intron 18 (A27C) und Intron 23 (G10T) und Wiederholungen von Nukleotid-Tandems („Variable Nucleotide Tandem Repeat“ = VNTR) in Intron 4 (27bp)_{4,5} und Intron 13 (CA)_n. Zwei Polymorphismen in Exons wurden durch Basenaustausch hervorgerufen: Exon 7 (G894T) und Exon 6 (C74T). Letzterer resultierte nicht im Einbau einer anderen Aminosäure. In der 3'-untranslatierten Region wurden keine Polymorphismen gefunden. Abbildung 1.5 zeigt die Struktur des eNOS-Gens mit eingezeichneten Polymorphismen.

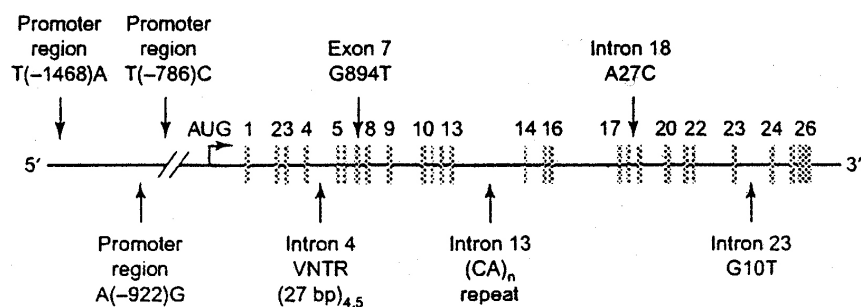


Abbildung 1.5: Polymorphismen des eNOS-Gens (modifiziert nach Wattanapitayakul et al., 2001) AUG: Startsequenz zur Transkription; Exons sind nummeriert

Der SNP im Exon 7 an Position 894 des eNOS-Gens wurde erstmalig 1993 von Marsden et al. beschrieben. Der Basenaustausch von Guanin zu Thymin in der DNA-Sequenz führt zur Entstehung eines veränderten Codons (statt GAG das Basentriplett GAT). Daher verursacht der Basenaustausch auch einen Aminosäureaustausch bei der Proteinbiosynthese, so dass statt Glutamat an Position 298 der eNOS Aspartat eingebaut wird. Obwohl dieser Austausch „konservativ“ ist, da sowohl Glutamat als auch Aspartat den sauren Aminosäuren angehören, wird dennoch durch den SNP die Primärstruktur des Enzyms verändert.

Tesauro et al. (2000) wiesen eine funktionelle Bedeutung des Aminosäureaustauschs nach, indem sie herausfanden, dass polymorphe eNOS intrazellulären, enzymatischen Spaltungsprozessen eher unterlag als rein Glutamathaltige eNOS. Möglicherweise hat der Aminosäureaustausch Einfluss auf die Enzymstabilität, und die Punktmutation verändert Interaktionen von Proteinen untereinander (Wattanapitayakul et al., 2001).

In Anbetracht der Funktionen, die NO im menschlichen Körper ausübt, und des Vorkommens der endothelialen NO-Synthase im gesamten Gefäßbett ebenso wie in zellulären Blutbestandteilen, könnte eine eNOS mit Glu298Asp-Polymorphismus mit weitreichenden Folgen verbunden sein.

Unabhängig vom Bestehen weiterer kardiovaskulärer Risikofaktoren trat der G894T-Polymorphismus im Exon 7 des eNOS-Gens in einer Studie von Lembo et al. (2001) als Risikofaktor für das Vorkommen arteriosklerotischer Plaques der Halsschlagadern auf. Auch unter gesunden Probanden war er mit frühen arteriosklerotischen Gefäßveränderungen assoziiert (Paradossi et al., 2004). Weitere Assoziationen zu Koronarer Herzkrankheit, Myokardinfarkt, Hypertonie, Niereninsuffizienz und zu einer entzündlichen Gefäßerkrankung, der Riesenzellerarteriitis, wurden beobachtet (Hingorani et al., 1999; Hibi et al., 1998; Miyamoto et al., 1998; Noiri et al., 2002; Salvarani et al., 2003).

1.4 Ziel der Studie

In der vorliegenden Arbeit soll die Assoziation von polymorpher eNOS am Beispiel des G894T-Polymorphismus' im Exon 7 des eNOS-Gens zu kardiovaskulären Erkrankungen untersucht werden.

Ein Zusammenhang zwischen Polymorphismus und Erkrankung wurde bisher vorwiegend in zahlreichen Fall/Kontroll-Studien nachgewiesen. Nun stellt sich die Frage, inwiefern ein solcher Zusammenhang in einem großen Probandenkollektiv aus einem repräsentativen Querschnitt durch die Bevölkerung besteht. Ein entsprechendes Kollektiv bietet die SHIP-Studie mit ihren 4.310 Probanden aus einer Region im Nordosten Mecklenburg-Vorpommerns.

Nach Genotypisierung der Probanden mittels TaqManTM-Verfahrens soll der eNOS-Polymorphismus hinsichtlich seiner Assoziation zu den Studienendpunkten Hypertonie und Myokardinfarkt unter Berücksichtigung von kardiovaskulären Risikofaktoren und Eigenschaften wie Geschlecht und Alter der Probanden beurteilt werden.