

**Untersuchungen zur Genetik und Biochemie inflammatorischer  
Risikofaktoren bei der Manifestation einer schweren koronaren  
Atherosklerose**



**DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades  
**doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**

vorgelegt der

**Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

von

**UNDRAGA SCHAGDARSURENGIN**

geb. am 11. April 1971 in Ulaanbaatar

**Halle (Saale)**

Gutachter:

1. Prof. Dr. Dr. I. Hansmann

2. Prof. Dr. G. Reuter

3. Prof. Dr. Dr. Herrmann

Datum der Verteidigung: 23. 10. 2003

**urn:nbn:de:gbv:3-000005779**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000005779>]

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>I-III</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>IV-V</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>VI</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Bedeutung der Atherosklerose bei kardiovaskulären Erkrankungen	1
1.2. Klinik der koronaren Herzkrankheit	2
1.3. Atherosklerose – ein inflammatorischer Prozess	4
1.3.1. Molekulare Mechanismen der Inflammation	4
1.3.2. Bedeutung der Zytokine bei Herzerkrankungen	5
1.3.2.1. Ursachen der Zytokinproduktion bei KHK	6
1.3.3. Tumornekrosefaktoren $\alpha$ und $\beta$ (TNF $\alpha$ und TNF $\beta$ )	7
1.3.3.1. Kardiale und extrakardiale Wirkungen des TNF $\alpha$	9
1.3.4. Fibroblasten Wachstumsfaktor-2 (FGF-2)	10
1.4. Weitere potentielle Risikofaktoren der Atherosklerose	10
1.4.1. Heparan-Sulfat-Proteoglykan-2 (HSPG-2)	11
1.4.2. Methylen tetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR)	11
1.4.3. Stickstoffmonoxid-Synthase-3 (NOS-3)	12
1.5. Zielsetzung der Arbeit	13
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>14</b>
2.1. Material	14
2.1.1. Chemikalien	14
2.1.2. Enzyme	14
2.1.3. Oligonukleotide	15
2.1.4. Geräte	16
2.2. Charakterisierung der Probanden	16
2.3. Molekularbiologische Untersuchungen	18
2.3.1. Untersuchung genomischer Varianten von 6 ausgewählten Kandidatengen der koronaren Atherosklerose	18
2.3.1.1. Isolierung genomischer DNA	18
2.3.1.2. PCR-Analysen	19
2.3.1.3. „Single strand conformation polymorphism“ (SSCP)-Analysen	20
2.3.1.4. Zyklische Sequenzierung	21
2.3.1.5. „Restriction fragment length polymorphism“ (RFLP)-Analysen	21
2.3.1.6. Genotypisierung untersuchter Polymorphismen	22
2.3.2. Quantitative Untersuchungen der TNF $\alpha$ - und FGF-2-Genexpression	24
2.3.2.1. Präparation von nativen Monozyten aus humanem Blut	24
2.3.2.2. Quantitative Präparation von RNA	25
2.3.2.3. Bestimmung der TNF $\alpha$ - und FGF-2-mRNA-Expression	25
2.3.2.3.1. Reverse Transkription (RT)	25

2.3.2.3.2.	Konstruktion des internen Standards	26
2.3.2.3.3.	Kompetitive PCR	27
2.3.2.3.4.	Elektrophorese, Fotodokumentation und densitometrische Auswertung	27
2.3.2.3.5.	Berechnung der mRNA-Menge von TNF $\alpha$ und FGF-2 pro Zelle	28
2.3.2.3.6.	Ermittlung der Genauigkeit der mRNA-Quantifizierung	28
2.3.2.4.	Untersuchung der tageszeitlichen Rhythmik der TNF $\alpha$ -Expression	29
2.3.2.5.	Bestimmung der FGF-2-Proteinmenge mittels ELISA	29
2.4.	Verwendete Computerprogramme und statistische Tests	29
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>31</b>
3.1.	Klinische und biochemische Charakterisierung der Untersuchungskollektive	31
3.1.1.	KHK-Patienten - klinische Charakterisierung in Bezug auf Manifestationsalter, Verlauf und Schwere des Myokardinfarkts	33
3.2.	Genetische Untersuchungen	35
3.2.1.	„Mutationsscreening“ im TNF $\alpha$ - und TNF $\beta$ -Gen	35
3.2.2.	Charakterisierung und Genotypisierung von Polymorphismen der 6 ausgewählten Kandidatengene für koronare Atherosklerose (TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , FGF-2, HSPG-2, MTHFR und NOS-3)	36
3.2.3.	Assoziation der Ergebnisse der Genotypisierung mit den klinischen und paraklinischen Parametern der Probanden	40
3.2.3.1.	TNF $\alpha$ -Gen	40
3.2.3.1.1.	Der GA-Genotyp des c.1-238G>A-Polymorphismus von TNF $\alpha$ erhöht in der KHK-Gruppe das Risiko eines frühzeitigen Myokardinfarkts (1.MI $\leq$ 45 Jahre)	40
3.2.3.1.2.	A-Allelträger des c.1-308G>A-Polymorphismus von TNF $\alpha$ sind prädisponierter eine koronare Herzkrankheit zu entwickeln	41
3.2.3.1.3.	Protektive Wirkung des A-Allels des c.1-863C>A-Polymorphismus von TNF $\alpha$ im atherosklerotischen Geschehen	42
3.2.3.1.4.	Zusammenhang des G-Allels des IVS3+51A>G-Polymorphismus von TNF $\alpha$ mit der Schwere der Gefäßerkrankung bei KHK-Patienten	42
3.2.3.1.5.	„cluster“-Analysen von TNF $\alpha$ -Polymorphismen für die Ermittlung der Risikokonstellation von KHK-Patienten	43
3.2.3.2.	TNF $\beta$ -Gen	
3.2.3.2.1.	Der AA-Genotyp des c.7G>A-Polymorphismus von TNF $\beta$ ist mit schlechteren Lipidwerten bzw. mit dem Vorkommen einer koronaren Herzkrankheit assoziiert	45
3.2.3.2.2.	Der AA-Genotyp des T60N-Polymorphismus von TNF $\beta$ ist bei männlichen Probanden mit erhöhten Fibrinogenwerten bzw. mit dem Vorkommen einer koronaren Herzkrankheit assoziiert	46
3.2.3.2.3.	Rolle der IVS1-13_12dupTC- und C13R-Polymorphismen im TNF $\beta$ -Gen bei der Risikokonstellation juveniler Myokardinfarkt-Patienten	47
3.2.3.3.	FGF-2-Gen	48
3.2.3.3.1.	Rolle des c.223C>T-Polymorphismus im FGF-2-Gen bei der Risikokonstellation der koronaren Atherosklerose	48

3.2.3.4.	HSPG-2-Gen	49
3.2.3.4.1.	Protektive Wirkung des TT-Genotyps des IVS6-86G>T-Polymorphismus von HSPG-2 im Lipidstoffwechsel bzw. bei der Risikokonstellation der Atherosklerose	49
3.2.3.5.	NOS-3-Gen	50
3.2.3.5.1.	Rolle des E298D-Polymorphismus im NOS-3-Gen bei der Risikokonstellation der Atherosklerose	50
3.2.3.6.	MTHFR-Gen	
3.2.3.6.1.	Rolle des A222V-Polymorphismus im MTHFR-Gen bei der Risikokonstellation der Atherosklerose	51
3.2.4.	Ermittlung der Abhängigkeit genetischer und klinischer Risikofaktoren	52
3.3.	Expressionsuntersuchungen zum TNF $\alpha$ - und FGF-2-Gen	52
3.3.1.	Einfluss der zirkadianen Rhythmik auf TNF $\alpha$ -mRNA-Expression	52
3.3.2.	TNF $\alpha$ - und FGF-2-mRNA-Bestimmung in Gruppen LBS, KOB und KHK; Geschlechts- und Altersabhängigkeit	53
3.3.3.	Assoziation der TNF $\alpha$ -mRNA und FGF-2-mRNA- bzw. Protein-Expression mit genetischen Daten der Probanden	55
3.3.3.1.	Funktionelle Auswirkungen der polymorphen Varianten des TNF $\alpha$ -Gens	55
3.3.3.1.1.	Das A-Allel des c.1-238G>A-Polymorphismus von TNF $\alpha$ ist bei männlichen KHK-Patienten mit höheren TNF $\alpha$ -mRNA-Werten assoziiert	55
3.3.3.1.2.	Das A-Allel des c.1-308G>A-Polymorphismus von TNF $\alpha$ ist in den KHK-Subgruppen mit schwerwiegenderen Merkmalen mit höheren TNF $\alpha$ -mRNA-Werten assoziiert	56
3.3.3.1.3.	Das A-Allel des c.1-863C>A-Polymorphismus von TNF $\alpha$ ist in der KHK-Gruppe mit höheren TNF $\alpha$ -mRNA-Werten assoziiert	57
3.3.3.2.	Funktionelle Auswirkungen des c.223C>T-Polymorphismus von FGF-2 bei den KOB- und KHK-Patienten	58
3.3.3.3.	Korrelation der TNF $\alpha$ - und FGF-2-mRNA-Expression	
3.3.3.3.	Assoziation des IVS6-86G>T-Polymorphismus von HSPG-2 mit FGF2-mRNA- und Protein-Expression	58
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>59</b>
4.1.	Differenzierung des Patientenkollektivs	59
4.2.	Charakterisierung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden	60
4.2.1.	Identifizierung von genomischen Varianten mittels SSCP-Analyse	60
4.2.2.	Quantifizierung der mRNA-Expression mittels kompetitiver PCR	61
4.2.3.	Quantifizierung der Proteinexpression mittels ELISA	61
4.3.	Inflammationsfaktoren TNF $\alpha$ , TNF $\beta$	62
4.3.1.	TNF $\alpha$ -Polymorphismen, TNF $\alpha$ -Transkription und Manifestation der Atherosklerose	63
4.3.1.1.	c.1-308G>A-Polymorphismus	64
4.3.1.2.	c.1-238G>A-Polymorphismus	65
4.3.1.3.	c.1-863C>A-Polymorphismus	66

4.3.1.4.	IVS3+51A>G und andere Polymorphsimen	67
4.3.2.	Zirkadiane Studie der TNF $\alpha$ -mRNA-Expression	68
4.3.3.	Alterungsprozess und Inflammation	68
4.3.4.	TNF $\beta$ und Atherosklerose	69
4.3.4.1.	TNF $\beta$ -Polymorphismen und Manifestation der Atherosklerose	70
4.4.	Risikofaktoren der Angiogenese	73
4.4.1.	Wachstumsfaktor FGF-2, dessen Co-Faktor HSPG-2 und Atherosklerose	73
4.5.	Endotheliale Dysfunktion	75
4.5.1.	E298D-Polymorphismus im NOS-3-Gen und Atherosklerose	75
4.6.	Homocystein-Stoffwechsel	76
4.6.1.	A222V-Polymorphismus im MTHFR-Gen und Atherosklerose	76
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>79-81</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>82-102</b>

## Abkürzungsverzeichnis

a	atto-
A. pectoris	Angina pectoris
Abb.	Abbildungen
ACE	<i>Angiotensin converting enzyme</i>
ACVB	Aorto-koronarer Venenbypass
AK	Antikörper
alpha-2MG	$\alpha$ 2-Makroglobulin
AMV	<i>Avian Myeloblastosis Virus</i>
Apo	Apolipoprotein
APP	Akut-Phase-Protein
<i>aq. dest.</i>	<i>Aqua destillata</i>
AS	Aminosäure
BMI	body mass index
bp	Basenpaare
BSA	bovine-serum-albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Vernetzungsgrad
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
CHI	chronische Herzinsuffizienz
CRP	C-reaktives-Protein
CSF	<i>colony stimulating factor</i>
Da	Dalton
DAPI	4',6'-Diamino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrokarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
f	femto-
FasL	Fas-Ligand
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
g	Gramm, Erdbeschleunigung
GE	Gefäßerkrankung
HDL	<i>high density lipoproteine</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HR-Gruppe	Hochrisikogruppe
HSPG-2	Heparan-Sulfat-Proteoglykan-2
IFN	Interferon
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IgG	Immunglobulin G

IL	Interleukin
k	kilo-
Kap.	Kapitel
KHK	koronare Herzkrankheit
KOB	koronar ohne Befund
LBS	Langzeitblutspender
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
Lp (a)	Lipoprotein (a)
LpL	Lipoprotein-Lipase
LPS	Lipopolysaccharid
LRP	<i>LDL Receptor-related Protein</i>
LT	Lymphotoxin
LZ	Langzeitüberlebende
m	milli-
M	Mol
MAP-kinase	<i>mitogen activated protein-kinase</i>
MHC	<i>major histokompatibility complex</i>
MI	Myokardinfarkt
MIF	Migration inhibierender Faktor
mRNA	messenger-RNA
MTHFR	Methylentetrahydrofolat
n	nano-
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NFκB	nukleärer Faktor kappa-B
NGF	<i>nerv growth factor</i>
NOS-3	Stickstoffmonoxid-Synthase
OD	optische Dichte
oxLDL	oxidierte „Low Density“ Lipoproteine
p	pico-
PAG	Polyakrylamid Gel
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PBS	phosphat buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PTCA	perkutane transluminale koronare Angioplastie
RFLP	<i>restriction fragment length polymorphism</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase PCR
SD	Standard deviation (Standardabweichung)
sog.	sogenannte
SSCP	<i>single strand conformation polymorphism</i>
T	Totalacrylamidkonzentration
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCGF	T-cell growth faktor

TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TGF- $\beta$ 1	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math>1</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Units
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
Vol.	Volumen
vs.	versus
w	Gewicht
WHO	<i>World Health Organisation</i>
z.B.	zum Beispiel

## Abbildungsverzeichnis

	Seite	
Abb. 1:	Darstellung der in der vorliegenden Arbeit untersuchten genetischen Risikofaktoren im atherosklerotischen Geschehen: TNF $\alpha$ und TNF $\beta$ , FGF-2, MTHFR, HSPG-2 und NOS-3 (nach Haber, 1995).	1
Abb. 2:	Entzündungsinitiation und dabei ablaufende lokale und systemische Reaktionen im menschlichen Organismus (nach Gemsa et al., 1984).	5
Abb. 3:	Bekannte und mögliche Signaltransduktionswege des TNF $\alpha$ bei kardialer Dysfunktion (nach Rauchhaus et al., 2001).	7
Abb. 4:	Schematische Darstellung der TNF $\alpha$ - und TNF $\beta$ -Gene mit bekannten polymorphen Stellen (1-14) (TNF $\alpha$ ,b,c,d,e sind die bekannten Mikrosatelliten-Polymorphismen).	8
Abb. 5:	Die biologischen Aktivitäten des TNF $\alpha$ (modifiziert nach Eigler et al. 2001).	9
Abb. 6a:	Genotypisierung der polymorphen Varianten des TNF $\alpha$ -Gens.	22
Abb. 6b:	Genotypisierung der polymorphen Varianten des TNF $\beta$ -Gens.	23
Abb. 6c:	Genotypisierung der polymorphen Varianten der Gene FGF-2, HSPG-2, MTHFR und NOS-3.	24
Abb. 7:	Konstruktion der internen Standards für TNF $\alpha$ - und FGF-2-quantitative PCR's.	26
Abb. 8:	Darstellung der Koamplifikation der zu vermessenden Target-DNA mit einer Standard-Verdünnungsreihe für Gene TNF $\alpha$ und FGF-2.	28
Abb. 9:	Darstellung der klinischen Auffälligkeiten der Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) und der Patienten ohne koronaren Befund (KOB).	32
Abb. 10:	Stammbaum-Analyse der erstmalig beschriebenen Polymorphismen in den Genen TNF $\alpha$ und TNF $\beta$ (1.: TNF $\alpha$ P84L; 2.: TNF $\alpha$ IVS3+51A>G; 3.: TNF $\beta$ c.1-729A>G; 4.: TNF $\beta$ c.7G>A).	36
Abb. 11:	Genotypverteilung des c.1-238G>A-Polymorphismus (TNF $\alpha$ ) in den Probandengruppen LBS, KHK und KOB bzw. bei den KHK-Patienten bezüglich des Manifestationsalters des 1.MI.	41
Abb. 12:	Genotypverteilung des c.1-308G>A-Polymorphismus (TNF $\alpha$ ) in den Gruppen LBS, KOB und KHK.	41
Abb. 13:	Genotypverteilung des c.1-863C>A-Polymorphismus (TNF $\alpha$ ) in den Gruppen LBS, KOB und KHK bzw. in den KHK-Subgruppen	42
Abb. 14:	Assoziation der Genotypverteilung des IVS3+51A>G-Polymorphismus (TNF $\alpha$ ) mit der Schwere der koronaren Herzkrankheit bei den KHK-Patienten.	43
Abb. 15:	a) „cluster“-Analyse: TNF $\alpha$ -Polymorphismen -863/-308/-238 in der Gruppe der LBS, der KHK- und der KOB-Patienten; b) „cluster“-Analyse -863/-308/-238 innerhalb der Gruppe der KHK-Patienten nach der Differenzierung in juvenile Patienten (1. MI $\leq$ 45 Jahre) und im höheren Lebensalter erkrankte Patienten (2. (1. MI > 45 Jahre); Verh.: Verhältnis (1.MI: $\leq$ 45J./>45J.).	44
Abb. 16:	Vergleich der KHK-Patienten bezüglich des Alters beim 1. MI unter Berücksichtigung verschiedener „cluster“-Varianten: a) -863/-238; b) -308/-238 und c) -863/-308; Verh.: Verhältnis (1.MI: $\leq$ 45J./>45J.).	45
Abb. 17:	Verteilung der AA-Genotypträger in untersuchten Probandengruppen LBS, KOB und KHK	46

Abb. 18:	Genotypverteilung des T60N-Polymorphismus (TNFβ) in den Gruppen LBS, KHK und KOB vor und nach der geschlechtlichen Differenzierung.	47
Abb. 19:	Darstellung der Genotypverteilungen des IVS1-13_12dupTC und des C13R-Polymorphismus im TNFβ-Gen bezüglich des Manifestationsalters der koronaren Herzkrankheit.	48
Abb. 20:	Genotypverteilung des c.223C>T-Polymorphismus des FGF-2-Gens in den Gruppen LBS, KHK und KOB.	48
Abb. 21:	Genotypverteilung des IVS6-86G>T-Polymorphismus in Probandengruppen LBS, KOB und KHK (kodominantes Modell).	49
Abb. 22:	Vergleich der Häufigkeiten der TT-Genotypträger des A222V-Polymorphismus im MTHFR-Gen bei männlichen Probanden in den Gruppen LBS, KOB und KHK.	51
Abb. 23:	Zirkadiane Schwankung der TNFα-mRNA-Expression bei 11 Kontrollprobanden (1. bis 5.: weibliche Probanden; 6. bis 11.: männliche Probanden).	52
Abb. 24:	Altersabhängige Darstellung der TNFα- und FGF-2-mRNA-Expressionswerte bei LBS	54
Abb. 25:	TNFα-mRNA-Expression bei männlichen KHK- und KOB-Patienten bzw. die Assoziation der Expression mit der Genotypverteilung des c.1-238G>A.	56
Abb. 26:	Darstellung der TNFα-mRNA-Expressionswerte bezüglich des c.-308G>A-Polymorphismus in den Subgruppen der KHK-Patienten.	57
Abb. 27:	Darstellung der Expressionswerte der TNFα-mRNA in den Gruppen LBS, KOB und KHK in Abhängigkeit vom c.1-863C>A-Polymorphismus.	57
Abb. 28:	Darstellung der FGF-2-mRNA- und Proteinexpression in Assoziation mit der Genotypverteilung des c.223C>T-Polymorphismus im FGF-2-Gen.	58
Abb. 29:	TNFβ-RNA-Faltung: a) Wildtyp c.7: Guanin; b) Mutation c.7: Adenin Pfeil: markiert die Stelle der polymorphen Variante c.7G>A.	72

## Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 1: Inflammationsmarker und Herzerkrankungen beim Menschen.	6
Tabelle 2: Extrakardiale TNF $\alpha$ -Wirkungen mit möglicher Relevanz bei Herzerkrankungen.	9
Tabelle 3: Zusammenfassung der verwendeten Chemikalien	14
Tabelle 4: Zusammenfassung der verwendeten Enzyme	14
Tabelle 5: Zusammenfassung der für TNF $\alpha$ - und TNF $\beta$ -Genotypisierung verwendeten Primer (NCBI, Acc. Nr. Z15026).	15
Tabelle 6: Primer für die mRNA-Expressionsuntersuchungen (NCBI, Acc. Nr. Z15026; Y13468).	15
Tabelle 7: Primer für die Untersuchung der Kandidatengene nach bekannten Polymorphismen (NCBI, Acc. Nr.: AL445798; G67549; D26607; Y13468).	16
Tabelle 8: Zusammenfassung der verwendeten Geräte	16
Tabelle 9: Verwendete PCR-, SSCP- und RFLP-Bedingungen zur Bestimmung genomischer Varianten der Gene TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , FGF-2, HSPG-2, MTHFR und NOS-3.	19
Tabelle 10: Übersicht über die verwendeten Restriktionsenzyme.	21
Tabelle 11: Biochemische Charakterisierung der KHK-Patienten und der KOB-Patienten im Vergleich zum methodenspezifischen Referenzbereich	32
Tabelle 12: Charakterisierung der KHK-Subgruppen	33
Tabelle 13: Biochemische und klinische Charakterisierung der KHK-Patienten unter Berücksichtigung des Manifestationsalters bei 1.MI ( $\leq$ 45J., $>$ 45J., sowie der Überlebenszeit nach einem MI ( $\leq$ 1J., $>$ 1J.)).	34
Tabelle 14: Klinische und paraklinische Beurteilung der KHK-Patienten unter Einbeziehung der Schwere des koronaren Ereignisses	35
Tabelle 15: Genetische Charakterisierung der in der vorliegenden Arbeit untersuchten polymorphen Varianten der Gene TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , FGF-2, HSPG-2, NOS-3 und MTHFR (Acc. Nr.: Accession Number).	37
Tabelle 16: Genotypisierung der Probandengruppen LBS, KOB und KHK; Ermittlung der Alters- und Geschlechtsabhängigkeit der untersuchten Polymorphismen; Test auf Normalverteilung (Hardy-Weinberg-Gleichgewicht).	38-39
Tabelle 17: Die Genotyp- und Allelverteilung des E298D-Polymorphismus (NOS-3) in den KHK-Subgruppen.	50
Tabelle 18: Darstellung der TNF $\alpha$ - und FGF-2-mRNA-Expressionswerte (ag/Zelle)	53
Tabelle 19: Darstellung der mRNA-Expressionswerte der TNF $\alpha$ - und FGF-2-mRNA (ag/Zelle) in verschiedenen Altersklassen (bis 30J., 30-39J., 40-49J., 50-59J. und 60-69J.).	54
Tabelle 20: Zusammensetzung der untersuchten Gruppen nach der geschlechts- und altersangleichender Paarung.	55
Tabelle 21: Häufigkeit der TT-Genotypträger (E/E) in verschiedenen Populationen (gesunde Kontrollprobanden dargestellt).	76
Tabelle 22: Häufigkeit der TT-Genotypträger in verschiedenen ethnischen Gruppen (gesunde Kontrollprobanden dargestellt).	77

## **1. Einleitung**

Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) verursachen kardiovaskuläre Erkrankungen weltweit jährlich ca. 15 Millionen Todesfälle (WHO, Genf 2000). Etwa 50 % davon ereignen sich in hochentwickelten Industrieländern. Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen hier die häufigste Haupttodesursache bei Erwachsenen dar. Diese Erkrankungen zählen insbesondere durch ihre lange Behandlungsdauer zu den kostenintensivsten Erkrankungen in den westlichen Ländern (50-150 Milliarden USD pro Jahr) (Nature Biotechnology, 2000).

Unter der Bezeichnung „kardiovaskuläre Erkrankungen“ werden eine Reihe von krankhaften Veränderungen im kardiovaskulären System zusammengefasst, die nach WHO-Klassifikation folgende Merkmale bzw. Ereignisse aufweisen: Hypertonie mit oder ohne Nierenerkrankung, Schlaganfall, Krankheiten von Arterien, Arteriolen, Kapillaren, Venen und Lymphgefäßen. Außerdem zählen dazu pathologische Veränderungen am Herzen: rheumatisches Fieber/rheumatische Herzerkrankung, chronische Herzinsuffizienz, akutes Koronarsyndrom mit akutem Myokardinfarkt und instabiler Angina Pectoris, stabile Angina Pectoris, Myokarditis, septische Kardiomyopathie, Ischämie und andere Herzerkrankungen (WHO, World Health Statistics, 1995; Rauchhaus et al., 2001).

### **1.1. Bedeutung der Atherosklerose bei kardiovaskulären Erkrankungen**

Häufig liegt kardiovaskulären Erkrankungen der Prozess der Atherosklerose zugrunde. Atherosklerose ist die häufigste, chronisch fortschreitende Systemerkrankung der Arterien mit degenerativen Veränderungen der Gefäßwand. Atherosklerose führt durch arteriosklerotische Plaques und sekundäre Thrombosen zu Wandverhärtung und -deformierung mit Elastizitätsverlust und Verengung des Gefäßlumens. Nekrosen, aber auch Durchbrüche in das Gefäßlumen (atheromatöse Geschwüre) werden ebenfalls festgestellt.

Als ursächlich bedeutsam gelten neben genetischen bzw. konstitutionellen und Altersfaktoren auch sog. umweltbedingte Faktoren wie die Lebensweise (z.B. lipidreiche Ernährung), toxische Einflüsse (Nikotin), Hypertonie, Stoffwechselleiden (z.B. Diabetes mellitus) und chronische, z.B. rheumatische Entzündungen. Entscheidend ist die Imbalance von Risikofaktoren, d.h. bei einer ungünstigeren genetischen Konstellation können schon wenige exogene Risikofaktoren zur Atheroskleroseentwicklung führen, wohingegen bei günstiger genetischer Disposition erst durch das Zusammenwirken einer Vielzahl von äußeren atherogenen Faktoren eine Atherosklerose ausgebildet wird (Schulz, 2001).

Die Entwicklung der Atherosklerose ist ein Vorgang, der Jahrzehnte lang dauern kann und der meist schon im zweiten oder dritten Lebensjahrzehnt beginnt, sich aber oft erst in der zweiten Lebenshälfte manifestiert. Die Atherosklerose stellt die Grundkrankheit ischämischer Folgeerkrankungen an Herz, Gehirn und anderen Organen, sowie an den Extremitäten dar (Robenek et al., 1995). Anhand von modernen morphologischen, zellbiologischen und molekularbiologischen Studien wurden Theorien über die Entstehung und das Fortschreiten der Atherosklerose entwickelt, auf die im weiteren kurz eingegangen wird.

Die sog. „Lipidtheorie“ basiert auf der Erkenntnis, dass zwischen Störungen im Fettstoffwechsel und der Atheroskleroseentstehung ein kausaler Zusammenhang besteht. Sie besagt, dass der Atheroskleroseentwicklung hauptsächlich der Prozess der Akkumulation von Plasmalipiden und Plasmalipoproteinen in die Intima der Gefäßwand durch Infiltration und Perfusion zugrunde liegt. Die zentrale Risikorolle übernimmt dabei die hohe Plasmakonzentration von Gesamtcholesterol und besonders von LDL (*Low Density Lipoprotein*)-Cholesterol (Severs et al., 1992; Ross et al., 1986). Durch zellbiologische und morphologische Methoden konnte gezeigt werden, dass bei der Atheroskleroseentstehung Monozyten des Blutstroms in die Intima der Arterienwand einwandern und sich zu

Makrophagen differenzieren (Robenek et al., 1995). Die Cholesterinakkumulation der Makrophagen in der Gefäßwand und ihre anschließende Differenzierung in Schaumzellen stellt den wesentlichen Mechanismus bei der Atherogenese dar (Severs et al., 1992).

Über Jahrzehnte hinweg galt die Lipidtheorie als dominierendes Modell der Atheroskleroseentstehung. Davon abgeleitete Änderungen im Lebensstil und die gezielte pharmakologische Reduktion erhöhter Cholesterolverwerte haben jedoch kardiovaskuläre Erkrankungen nicht von ihrer Spitzenposition als Todesursache in Deutschland, Europa, Asien und den USA verdrängt. Inzwischen wird davon ausgegangen, dass die klassischen Risikofaktoren nur ca. 50-60 % der Variabilität des absoluten atherosklerotischen Ereignisrisikos vorhersagen können (Ross et al., 1999).

Nach neueren Erkenntnissen wird den Indikatoren einer systemischen Entzündungsreaktion z.B. Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Akutphase-Proteinen (APP) wie C-reaktives Protein (CRP) (Lindahl et al., 2000) und Matrixkomponenten eine prognostische Aussagekraft in der Atherosklerose zugeschrieben (Sharma et al., 2000). Proinflammatorisch wirksame Zytokine sind zentrale Mediatoren der natürlichen Immunabwehr und werden bei einer Reihe von kardialen Erkrankungen z.B. chronischer Herzinsuffizienz und stabiler Angina pectoris (Ikonomidis et al., 1999) vermehrt im Blut gefunden (Torre-Amione et al., 1996). Aber auch bei plötzlich auftretenden Prozessen wie dem akuten Koronarsyndrom mit Herzinfarkt (Ridker et al., 2000) und instabiler Angina pectoris (Biasucci et al., 1996), der akuten Myokarditis (Matsumori et al., 1996) und der septischen Kardiomyopathie wurden erhöhte Konzentrationen von inflammatorischen Markern gemessen. Diese zweite Theorie der Atheroskleroseentstehung wird als „*Response-to Injury*“-Theorie bezeichnet.

Die „*Response-to-Injury*“-Theorie betrachtet als initialen Faktor einer Atheroskleroseentstehung die Beschädigung der Endothelschicht der Arterien durch Sauerstoffradikale, wie oxidiertes LDL, oder andere Faktoren. Die Präsenz von oxidiertem LDL beispielsweise führt nicht nur zur Verfettung der in der Intima befindlichen Zellen, sondern bewirkt die chemotaktische Rekrutierung von Monozyten aus dem Blut und von glatten Muskelzellen aus der Media. Sowohl Monozyten als auch Muskelzellen können verschiedene biologisch aktive Substanzen wie Zytokine, Wachstumsfaktoren und APP sezernieren und damit erheblich das Stoffwechselgeschehen in der Gefäßwand beeinflussen. Die anschließende Aggregation von Thrombozyten und thrombozytärer Faktoren an die Gefäßintima stimuliert die glatten Muskelzellen zur Proliferation und zur Produktion von Bindegewebssubstanzen (Proteoglycane, Kollagene, elastische Fasern) (Ross et al., 1986, 1999; Severs et al., 1992; Thie et al., 1992; Völker et al., 1992). Daraus resultiert eine Verdickung und Verhärtung der Arterienwand.

In der atherosklerotisch veränderten Gefäßwand konnten auch Bakterien der Spezies *Chlamydia pneumoniae* nachgewiesen werden. Tierexperimente liefern Hinweise auf eine mögliche Beteiligung dieser und anderer Bakterien bei der Entstehung der Atherosklerose. So konnten bei vielen Patienten mit koronarer Herzkrankheit serologisch Antikörper gegen *Helicobacter* gefunden werden (Pfeiffer et al., 2000). Alle diese Befunde legen den Schluss nahe, dass möglicherweise mit der Infektion verbundene, allgemein entzündliche Komponenten die Entstehung oder Progression der Atherosklerose befördern (Pfeiffer et al., 2000).

### **1.2. Klinik der koronaren Herzkrankheit**

Die koronare Herzkrankheit ist charakterisiert durch ein Missverhältnis von Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf im Herzmuskel. Die häufigste Ursache für eine Minderdurchblutung (95 %) ist die Atherosklerose der großen Herzkranzgefäße. Durch Ablagerungen von Lipiden, Fibrin und Kalk sowie durch Bindegewebebildung im Inneren der Gefäßwände entstehen Plaques, die sich weiterhin zu Stenosen (Einengungen) entwickeln. In ca. 5 % der Fälle von koronarer Minderdurchblutung stören

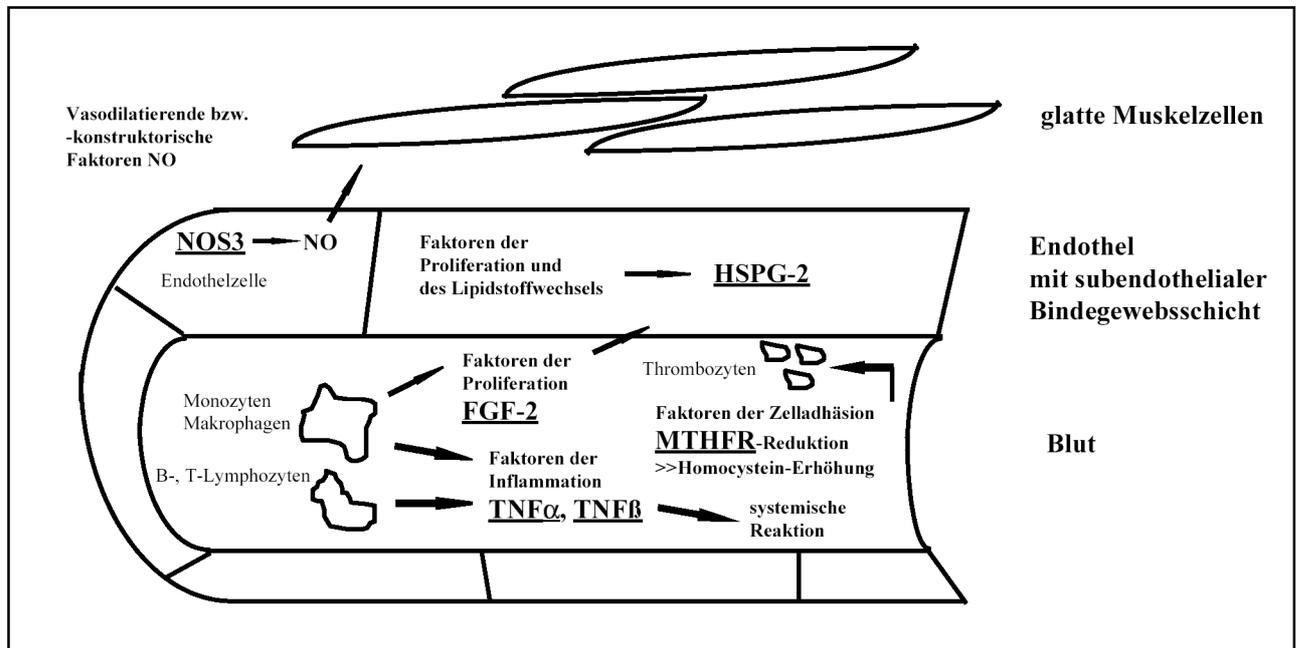
Wandveränderungen in den kleinen Endgefäßen die Regulierung der Blutzufuhr zum Myokard. Sie treten mehr als Folge des Bluthochdrucks, des Diabetes mellitus oder entzündlicher Erkrankungen der Gefäße auf. Auch Faktoren wie Herzfrequenz, Herzrhythmusstörungen, Herzklappenfehler und die Dicke des Herzmuskels beeinflussen die Sauerstoffzufuhr (Pfeiffer et al., 2000). Neben erwähnten Faktoren können Situationen des erhöhten Sauerstoffbedarfs (körperliche Arbeit, emotionale Stresssituationen, fieberhafte Erkrankungen oder Schilddrüsenüberfunktion) die Symptomatik der koronaren Herzkrankheit auslösen oder verstärken. Gleichmaßen kann sich ein erniedrigtes Sauerstoffangebot auswirken, z.B. bei Lungenerkrankungen, Anämien, erhöhter Blutviskosität, Höhengenaufenthalt oder Kohlenmonoxidvergiftung. Das Leitsymptom der koronaren Herzkrankheit ist die Angina pectoris (Krankheit mit Verengungs-, Beengungsgefühl), auch Stenokardie genannt. Es wird zwischen stabiler und instabiler A. pectoris unterschieden. Bei einer stabilen A. pectoris halten die Schmerzen für die Dauer der Belastungssituation an und klingen in Ruhe ab, oder es tritt eine Besserung nach Applikation von gefäßerweiternden Medikamenten (Nitropräparate) ein. Bei jeder erstmals auftretenden A. pectoris, bei zunehmender Häufigkeit, Dauer und Schmerzintensität, bei erhöhtem Bedarf an Medikamenten und dem Auftreten der Beschwerden in Ruhe wird über eine instabile A. pectoris gesprochen (Pfeiffer et al., 2000). Jeder fünfte Patient mit einer instabilen A. pectoris erleidet im Laufe eines Jahres einen Myokardinfarkt oder verstirbt an plötzlichem Herztod. Weitere Zeichen einer koronaren Herzkrankheit können Herzrhythmusstörungen und eine zunehmende Herzinsuffizienz sein.

Die bedrohlichste Form der koronaren Herzkrankheit ist der Herzinfarkt. Ursache dafür ist der Verschluss eines Herzkranzgefäßes durch ein Blutgerinnsel. Die Bildung der Blutgerinnsel wird durch verlangsamte oder verwirbelte Blutströmung in sklerotisierten Gefäßen gefördert. Aber nicht allein die veränderten Strömungsverhältnisse verursachen die Bildung von Blutgerinnsel. Meist führt ein plötzliches Aufquellen oder Aufplatzen eines arteriosklerotischen Plaques zu einem mikroskopisch kleinen Einriss der Gefäßinnenwand. Dabei werden gewebeeigene Substanzen freigesetzt, die zur Aggregation der Thrombozyten und zur nachfolgenden Gerinnselbildung führen. Ist die Durchblutung eines Myokardareals unterbrochen, beginnen die Herzmuskelzellen abzusterben. Nach ca. 6 Stunden sind keine überlebenden Herzmuskelzellen zu erwarten, auch wenn die Durchblutung wieder hergestellt ist. Die körpereigenen Reparaturmechanismen können die einmal abgestorbenen Herzmuskelzellen nur durch funktionslose Bindegewebszellen (Narbengewebe) ersetzen (Pfeiffer et al., 2000).

Angesichts der hohen Sterblichkeitsrate und der enormen Behandlungskosten der kardiovaskulären Erkrankungen wird in verschiedenen Bereichen der Biologie, Medizin und Pharmakologie bestrebt, die Ursachen dieser komplexen Erkrankung zu analysieren und erfolgreiche Therapieansätze zu entwickeln. Dabei stehen präventive und therapeutische Behandlungsziele im Vordergrund. Die Verbesserung des Gesundheitsverhaltens der Bevölkerung sowie die möglichst frühzeitige Erkennung prädisponierter Personen und deren gezielte Therapie nehmen dabei eine zentrale Rolle ein.

Das Hauptanliegen der vorliegenden Arbeit bestand in der Untersuchung ausgewählter genetischer Risikofaktoren bei kardiovaskulären Erkrankungen, insbesondere bei akuter koronarer Herzkrankheit. Da die Atherosklerose ein komplexes multifaktorielles Geschehen darstellt, wurden in der vorliegenden Arbeit mehrere im atherosklerotischen Geschehen involvierte Stoffwechselwege beleuchtet (Abb. 1). Im Vordergrund standen Untersuchungen zu inflammatorischen Prozessen der Atherosklerose bzw. zu den potentiellen Risikofaktoren der Inflammation wie Tumornekrosefaktor  $\alpha$  und  $\beta$  (TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ ). Weiterhin wurden Risikofaktoren untersucht, die eine pathophysiologisch wichtige Rolle bei Proliferations- (FGF-2),

Lipidstoffwechsel- (HSPG-2), Zelladhäsionsprozessen (MTHFR), sowie beim Modulieren des Gefäßtonus (NOS3) spielen und den inflammatorischen Stoffwechselvorgang bei der Atherosklerose mit beeinflussen können.



**Abb. 1:** Darstellung der in der vorliegenden Arbeit untersuchten genetischen Risikofaktoren im atherosklerotischen Geschehen: Tumornekrosefaktor  $\alpha$  und  $\beta$  (TNF $\alpha$  und TNF $\beta$ ), Fibroblastenwachstumsfaktor-2 (FGF-2), Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR), Heparan-Sulfat-Proteoglykan-2 (HSPG-2) und Stickstoffmonoxid-Synthase-3 (NOS-3) (nach Haber, 1995).

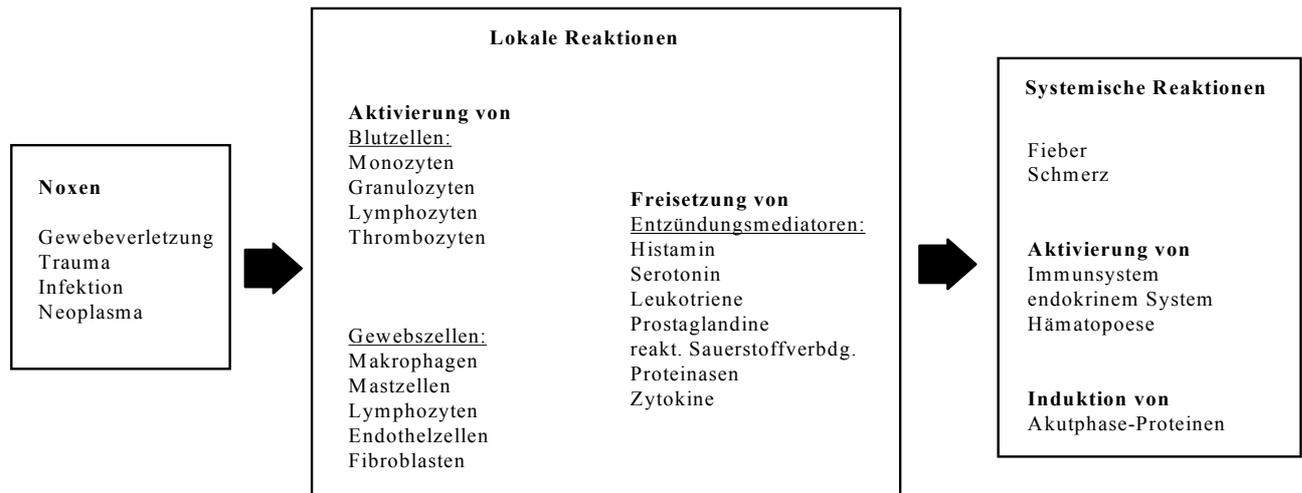
### 1.3. Atherosklerose – ein inflammatorischer Prozess

#### 1.3.1. Molekulare Mechanismen der Inflammation

Bei einer Entzündung handelt es sich um eine sehr komplexe Abwehrreaktion des Organismus auf eine Vielzahl von Schäden. An diesem streng regulierten Mechanismus sind verschiedene Zelltypen beteiligt, die sowohl untereinander kommunizieren, als auch mit Bestandteilen der Extrazellulärmatrix und dem entzündungsauslösenden Agens interagieren (Martens et al., 1998). Je nach Ausmaß der Schädigung beschränkt sich die Entzündung auf einen lokalen Bereich, oder es werden systemische Abwehrmechanismen des Organismus aktiviert. Die entzündungsauslösenden Reize lassen sich in biotische (Bakterien, Viren, Pilze oder größere Parasiten wie Würmer) und abiotische (mechanische Gewebsstörung, Kälte, Hitze, UV-Strahlung usw.) Noxen unterteilen.

An einer Entzündung sind unterschiedliche Zelltypen beteiligt, von denen die meisten im Blut zirkulieren. Es wird zwischen den primären phagozytotischen Zellen (Makrophagen und neutrophile Zellen) und den primär sekretorischen Zellen (eosinophile/ basophile Zellen und natürliche Killerzellen) unterschieden. Von großer Bedeutung sind die weißen Blutkörperchen (B- und T-Lymphozyten), die sowohl für das spezifische Erkennen fremder Bestandteile, als auch für deren Präsentation oder Markierung mit Antikörpern im Organismus verantwortlich sind. Die zytotoxischen T-Zellen sind in der Lage, die vom Erreger befallenen körpereigenen Zellen abzutöten (Dargel et al., 1995; Heinrich et al., 1998; Janeway et al., 1995). Zusätzlich sind am Entzündungsgeschehen noch Zellen der Blutgefäßendothelien beteiligt.

Die Entzündungsmediatoren werden von den Entzündungszellen freigesetzt und sind genauso vielfältig. Durch Aktivierung der Oberflächenrezeptoren setzen die Entzündungszellen schon synthetisierte und gespeicherte Stoffe frei, oder es erfolgt eine *de novo* Synthese. Mediatoren können in unmittelbarer Umgebung der sekretorischen Zelle eine lokale Entzündung hervorrufen, oder sie gelangen ins Blut und können durch ihre Verteilung im ganzen Organismus systemische Abwehrreaktionen einleiten. Zu den Entzündungsmediatoren gehören die Arachidonsäurederivate Prostaglandine und Leukotriene, Histamin bzw. Serotonin (bei Ratten und Mäusen), sowie die Zytokine, eine Gruppe strukturell sehr verschiedener hormonähnlicher Proteine (Abb. 2).



**Abb. 2:** Entzündungsinitiation und dabei ablaufende lokale und systemische Reaktionen im menschlichen Organismus (nach Gemsa et al., 1984).

### 1.3.2. Bedeutung der Zytokine bei Herzerkrankungen

Biologisch gesehen sind Zytokine hormonähnliche regulatorische Mediatoren, die meist erst nach Stimulierung u.a. von Leukozyten produziert werden und an ihrem Zielort mannigfaltige Funktionen ausüben (Balkwill et al., 1989). In der Regel sind sie hochaktiv (minimale Konzentration: pg bis ng), binden an hochaffine Rezeptoren und sind meist in kurzer Distanz aktiv (Ausnahme: IL-1 oder TNF). Es handelt sich in der Regel um einfache 5-100 kDa große Polypeptide. Diese Substanzen sind an der Regulierung der Ontogenese, der Gewebereparatur, der Immunabwehr, der Entzündung, der Kontraktilität von Herz und Gefäßen, der Aufrechterhaltung der Körperprozesse und des Zelltods beteiligt (Thompson et al., 1998; Mire-Sluis et al., 1998; Meager et al., 1999).

Nach der funktionellen Einteilung lassen sich folgende Klassen der Zytokine unterscheiden: Interferone (IFN), Interleukine (IL-1 bis IL-23), Tumornekrosefaktoren (TNF $\alpha$  und  $\beta$ ), Kolonie-stimulierende Faktoren (CSF), Wachstumsfaktoren (EGF, IGF, PDGF, VEGF, FGF, NGF oder TGF), Chemokine und Virokine.

Proinflammatorisch wirksame Zytokine sind zentrale Mediatoren der natürlichen Immunabwehr und werden bei einer Reihe von kardialen Erkrankungen erhöht im Blut vorgefunden. Sowohl bei chronischen Herzleiden wie der chronischen Herzinsuffizienz (CHI) und der chronischen A. pectoris als auch bei plötzlich auftretenden Prozessen wie akutes Koronarsyndrom mit Herzinfarkt (Ridker et al., 2000), instabiler Angina pectoris (Biasucci et al., 1996), akuter Myokarditis und septischer Kardiomyopathie wird eine erhöhte Konzentrationen von inflammatorischen Markern beobachtet (Tab. 1).

**Tabelle 1:** Inflammationsmarker und Herzerkrankungen beim Menschen (nach Rauchhaus et al., 2001).

Herzerkrankung	CRP	TNF	IL-6
Chronische Herzinsuffizienz	erhöht	erhöht	erhöht
Akutes Koronarsyndrom			
- Akuter Myokardinfarkt	erhöht	erhöht	erhöht
- Instabile A. pectoris	erhöht		erhöht
Stabile A. pectoris	erhöht		erhöht
Myokarditis		erhöht	
Kawasaki-Syndrom	erhöht	erhöht	
Septische Kardiomyopathie		erhöht	erhöht

### 1.3.2.1. Ursachen der Zytokinproduktion bei KHK

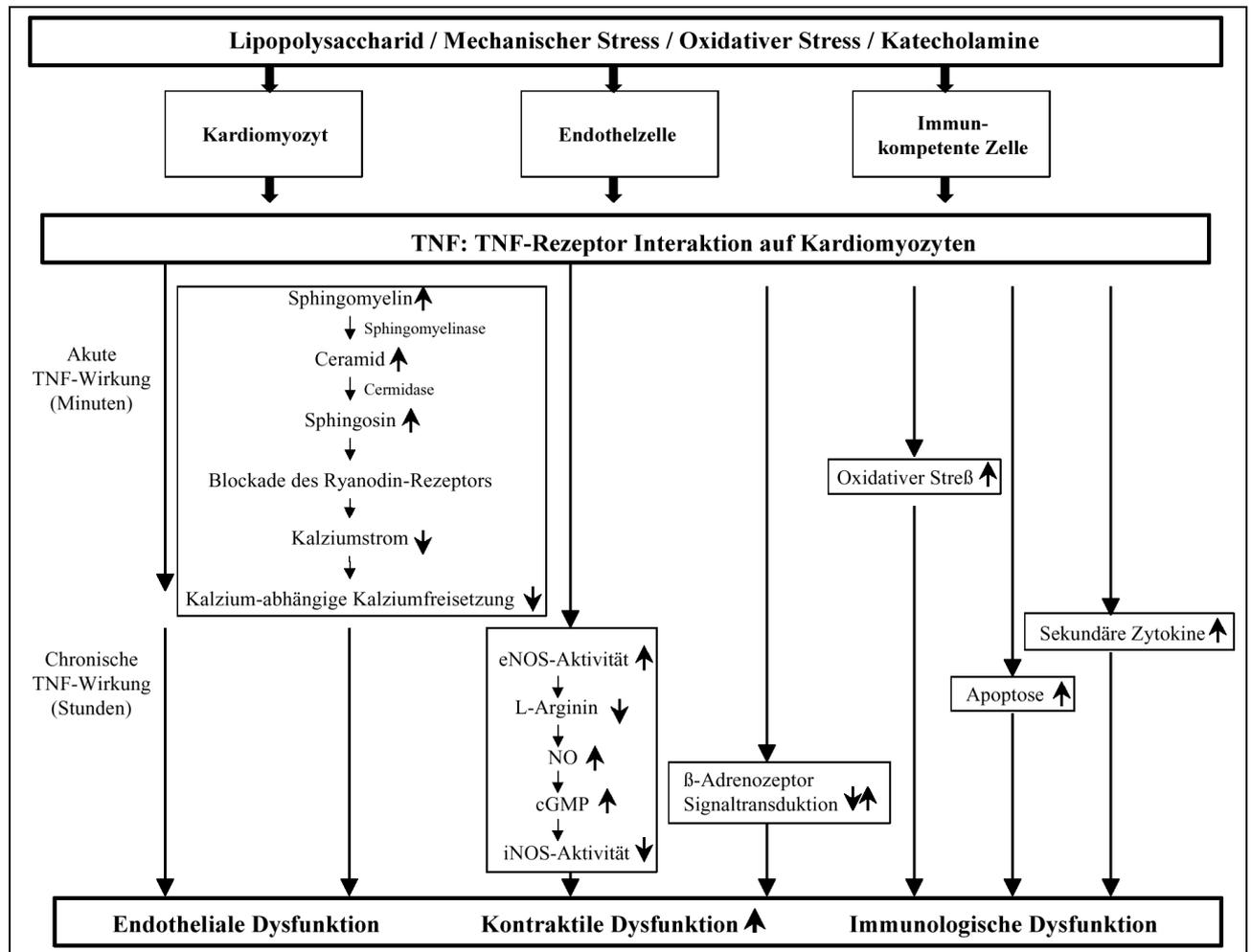
Die Ursachen der Produktion proinflammatorischer Zytokine bei koronaren Herzerkrankungen (KHK) und deren pathophysiologischer Stellenwert werden bis heute kontrovers diskutiert. Im folgenden wird kurz auf die möglichen Auslöser der erhöhten Zytokinproduktion bei KHK eingegangen (Abb. 3).

Die Endotoxinhypothese postuliert, dass es bei KHK verursacht durch eine Störung der intestinalen Endothel- und Barrierefunktion zur bakteriellen Translokation über die Darmwand kommt. Die daraus resultierende Endotoxämie stimuliert die Produktion von Zytokinen aus peripheren immunkompetenten Zellen (Anker et al., 1997). Auch für die Entwicklung atherosklerotischer Gefäßveränderungen in der Peripherie könnte bakterielles LPS (Lipopolysaccharid) eine Rolle spielen (Wiedermann et al., 1999).

Kardiale Myozyten können unter verschiedenen pathophysiologischen Bedingungen selbst TNF $\alpha$  synthetisieren. TNF-Protein und TNF-mRNA sind im Myokard von Patienten mit CHI nachgewiesen worden (Doyama et al., 1996; Torre-Amione et al., 1996; Habib et al., 1996), wobei die Produktion von TNF-Protein und -mRNA bei kardialer Drucküberlast sowohl in den Herzmuskelzellen als auch in Nichtmuskelzellen des Herzens erfolgt (Kapadia et al., 1997).

Ein anderer denkbarer Triggermechanismus für eine erhöhte Zytokinproduktion könnte der oxidative Stress sein. Bei Patienten mit CHI stehen die Parameter des oxidativen Stresses in enger Verbindung zur Konzentration löslicher TNF-Rezeptoren (Keith et al., 1998). Die bei der CHI verminderte vasodilatatorische Kapazität, die eng mit dem TNF-Spiegel im Plasma korreliert (Anker et al., 1997), kann zur Gewebshypoxie beitragen und so die Inflammation verstärken. Andererseits kann die chronisch erhöhte Persistenz von freien Sauerstoffradikalen durch Ischämie und Hyperperfusion in metabolisch aktiven Geweben zur Aktivierung der P<sub>38</sub>-MAP-Kinase (mitogen-activated-protein-kinase) und des nukleären Faktors kappa-B (NF $\kappa$ B) führen, welche die Schlüsselemente der intrazellulären Signaltransduktion sind und die Zytokin-Genexpression und -Freisetzung beeinflussen (Barners et al., 1997).

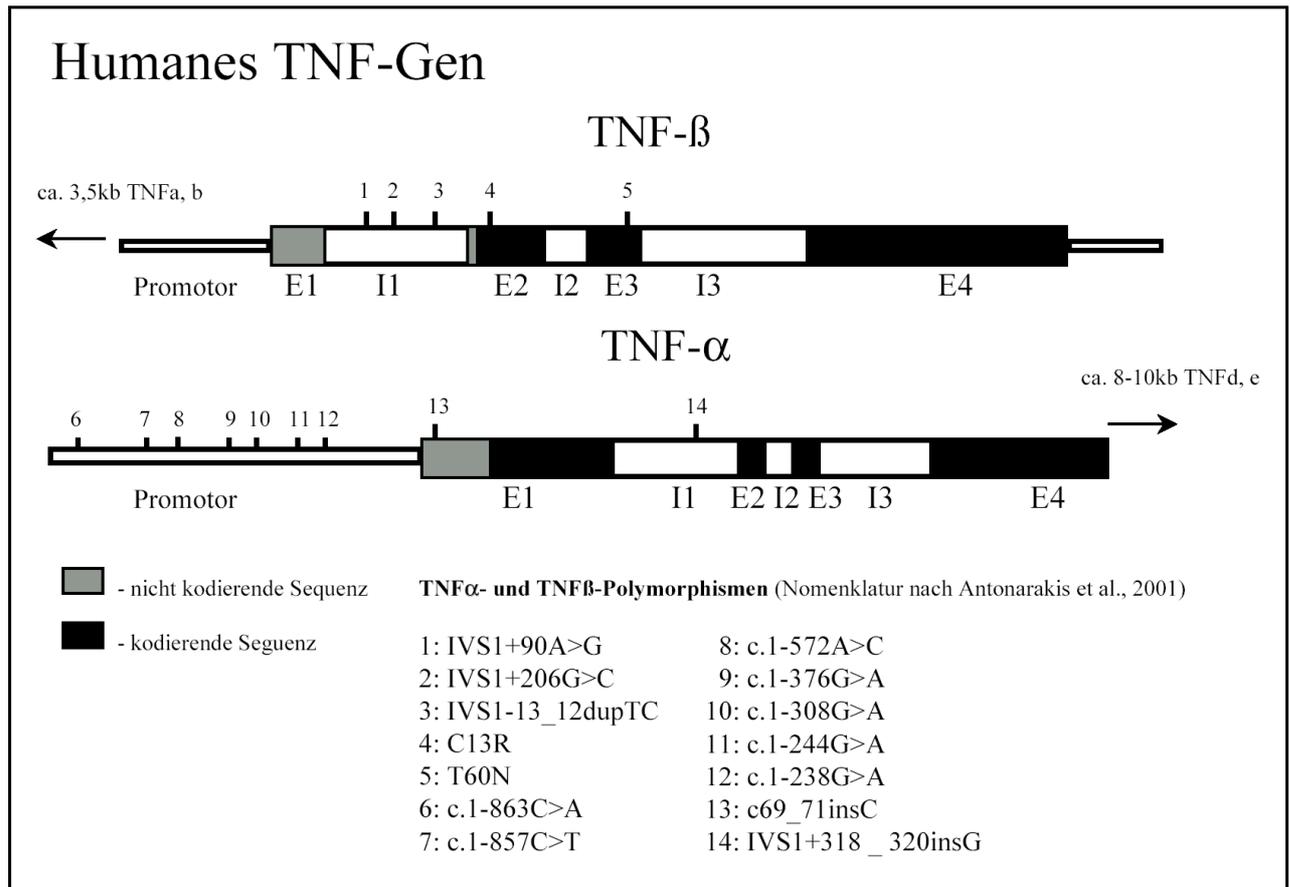
Eine wachsende Anzahl von Studien belegen den funktionellen Kontakt von Nervenfasern mit immunologischen Zellen und Geweben, die im Sinne eines neuroimmunologischen Regelkreises mit Hilfe von Zytokinen und Hormonen immunologische Funktionen beeinflussen (Rauchhaus et al., 2001). Acetylcholin, der vagale Neurotransmitter, reduziert die Freisetzung von TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-18 aus LPS-stimulierten humanen Makrophagenkulturen. Die direkte elektrische Stimulierung des peripheren Vagus *in vivo* während einer LPS-Administration mit tödlicher Dosis hemmte die TNF-Synthese in der Leber, reduzierte die Spitzenwerte von TNF im Serum und verhinderte die Entwicklung des Schocks (Munger et al., 1996). Auch adrenerge Signale haben immunmodulatorische Eigenschaften (Keith et al., 1998). So induziert Noradrenalin in Kardiomyozyten das IL-6 (Anker et al., 1997).



**Abb. 3:** Bekannte und mögliche Signaltransduktionswege des TNF $\alpha$  bei kardialer Dysfunktion (nach Rauchhaus et al., 2001).

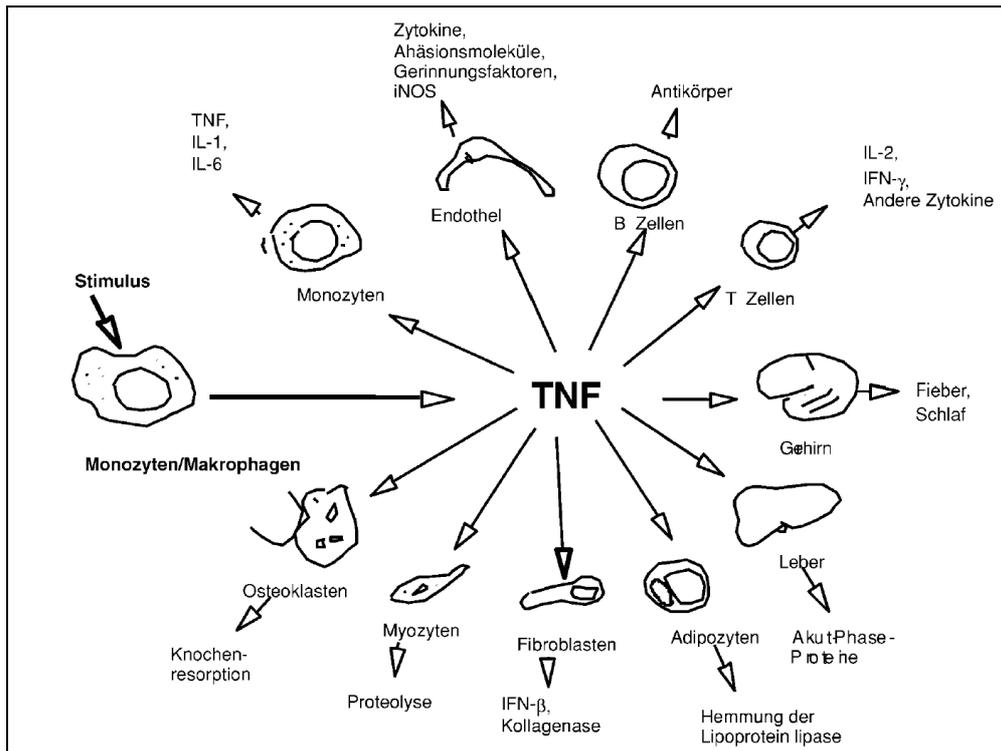
### 1.3.3. Tumornekrosefaktoren $\alpha$ und $\beta$ (TNF $\alpha$ und TNF $\beta$ )

Zu der Familie der Tumornekrosefaktoren zählen zwei strukturell und funktionell ähnliche Proteine, TNF $\alpha$  (Cachectin) (Carswell et al., 1975; Beutler et al., 1985) und TNF $\beta$  (Lymphotoxin) (Williams et al., 1969; Ruddle et al., 1987). TNF $\alpha$  wird hauptsächlich von Monozyten und/oder Makrophagen, und TNF $\beta$  von lymphoiden Zellen produziert. Die TNF $\alpha$ - und TNF $\beta$ -Gene weisen auf Aminosäureebene (cDNA-Klonierung) 30 % Homologie auf (Gray et al., 1987; Pennica et al., 1984). Die cDNA vom TNF $\alpha$  kodiert für 157 AS und die vom TNF $\beta$  für 171 AS (Fiers et al., 1991). TNF $\alpha$  und TNF $\beta$  sind *single copy* Gene, die dicht beieinander im MHC (*Major Histocompatibility Complex*)-Gencluster auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 (6p21.3) lokalisiert sind (Nedwin et al., 1985; Spies et al., 1986). In allen untersuchten Spezies befindet sich das TNF $\beta$ -Gen in 5'-Richtung vom TNF $\alpha$ -Gen. Beide Gene sind ca. 3 kb lang und bestehen aus vier Exons und drei Introns (Spriggs et al., 1991; Turetskaya et al., 1992). TNF $\alpha$  und TNF $\beta$  besitzen zahlreiche polymorphe Stellen, die im Zusammenhang mit verschiedenen autoimmunen, infektiösen aber auch kardiovaskulären Erkrankungen untersucht worden sind (Mira et al., 1999; Knight et al., 1999; Herrmann et al., 1998; Zinman et al., 1999; Norman et al., 1995). In Abb. 4 sind das TNF $\alpha$ - und - $\beta$ -Gen mit den bekannten Polymorphismen schematisch dargestellt.



**Abb. 4:** Schematische Darstellung der TNF $\alpha$ - und TNF $\beta$ -Gene mit bekannten polymorphen Stellen (1-14) (Wilson et al., 1992; D'Alfonso und Richardi, 1994; Hamann et al., 1995; Fanning et al., 1997; Herrmann et al., 1998; Ugliarolo et al., 1998); (TNFa,b,c,d,e sind die bekannten Mikrosatelliten-Polymorphismen).

Die TNF-Wirkungen werden durch Quervernetzung membrangebundener Rezeptormoleküle vermittelt (TNF-Rezeptoren I und II) (Bazzoni et al., 1996). Die extrazellulären Anteile beider TNF-Rezeptoren liegen auch als lösliche Form im Serum vor, können weiterhin TNF binden und damit die akuten Wirkungen der TNF abschwächen (Engelmann et al., 1989, 1990). TNF induziert eine Reihe von proinflammatorischen Veränderungen in Endothelzellen, wie die Produktion weiterer proinflammatorischer Zytokine, die Expression von Adhäsionsmolekülen, die Freisetzung prokoagulatorischer Substanzen und die Induktion der Stickoxid-Synthase (iNOS). Diese Wirkungen tragen bei extremer Ausprägung zum septischen Schock bei. TNF stimuliert außerdem B- und T-Lymphozyten, induziert Fieber, hemmt die Lipoproteinlipase in Adipozyten und stimuliert Hepatozyten zur Produktion von Akut-Phase-Proteinen. Bei der chronischen Polyarthritiden bilden Fibroblasten und Osteoklasten Ziele für TNF (Eigler et al., 2001). In der Abb. 5 sind unterschiedliche Wirkungen des TNF $\alpha$  dargestellt.



**Abb. 5:** Die biologischen Aktivitäten des TNF $\alpha$  (modifiziert nach Eigler et al. 2001).

### 1.3.3.1. Kardiale und extrakardiale Wirkungen des TNF $\alpha$

*In vivo* und *in vitro* Experimente am Tiermodell zeigen, dass TNF $\alpha$  sowohl als Immunzellmodulator mit endokriner Wirkung, als auch über para- oder autokrine Mechanismen kardiodepressive Wirkungen entfaltet (Ponikowski et al., 1999). Die Effekte von TNF $\alpha$  auf das Herz variieren hinsichtlich ihrer Kinetik, der Dosis und der sekundären Mediatoren. Die Wirkung beschränkt sich jedoch nicht allein auf Kardiodepression: experimentelle Daten belegen ein potentiell günstiges, antiarrhythmisches (Müller-Werdan et al., 1998) und trophisches Potential des TNF am Kardiomyozyten, sowie eine protektive Wirkung bei Ischämie (Kurrelmeyer et al., 2000).

TNF-Rezeptoren werden von den meisten somatischen Zellen des Organismus einschließlich Kardiomyozyten exprimiert (außer auf Erythrozyten und ruhenden T-Lymphozyten). Daher vermitteln erhöhte TNF-Spiegel auch bei Herzkrankheiten neben der kardialen Wirkung eine Reihe von anderen Effekten auf periphere Organe (Tab. 2). TNF $\alpha$  hat einerseits ausgeprägte katabole Wirkungen am Fettgewebe und Skelettmuskel, wird andererseits auch für Insulinresistenz im Rahmen eines metabolischen Syndroms bei Adipositas verantwortlich gemacht (Hotamisligil et al., 1999).

**Tabelle 2:** Extrakardiale TNF $\alpha$ -Wirkungen mit möglicher Relevanz bei Herzerkrankungen (nach Rauchhaus et al., 2001).

---

Lungenödem beim Menschen
Reduzierter Blutfluss beim Menschen
Anorexie/ Kachexie, experimentell
Störung der Mitochondrienfunktion, experimentell
Aktivierung fetaler Gene, experimentell
Metabolische Störungen (Insulinresistenz), experimentell und beim Tier
Einflüsse auf Thermogenese, experimentell

---

#### **1.3.4. Fibroblasten Wachstumsfaktor-2 (FGF-2)**

Zur Familie der FGF gehören mindestens 23 strukturell verwandte Polypeptide, die durch ihre hohe Affinität zu Heparin charakterisiert sind (Ornitz und Itoh, 2001). Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem FGF-2, einem Zytokin, welches aufgrund seiner mitogenen Eigenschaften bei der Proliferation von Gefäßmuskelzellen eine bedeutende Rolle in der Plaque-Bildung bzw. Sklerose der Gefäßwand spielt und somit die Atherosklerose begünstigt. FGF-2 ist in einer Reihe von Zellwachstums- und -differenzierungsprozessen involviert. So stimuliert er die Proliferation, Migration und Differenzierung von mesodermalem Gewebe und ist in die Gefäßneubildung während der Embryonalentwicklung und Wundheilung involviert. FGF-2 wird in einer Vielzahl von Geweben insbesondere im Endothel exprimiert (Schulze-Osthoff et al., 1990). Aufgrund seiner Beteiligung bei der Gefäßneubildung konnte eine verstärkte Expression in einer Reihe von soliden Tumoren nachgewiesen werden (Takahashi et al., 1990; Motoo et al., 1991; Shirashi et al., 1995; Mise et al., 1996). Wegen seiner mitogenen Eigenschaften wird angenommen, dass er bei der Restenose nach mechanischer Verletzung der Gefäße bzw. nach einer Ballondilatation (sog. PTCA „Percutane Transluminare Koronarangioplastie“) verengter Gefäßregionen beteiligt ist (Lindner et al., 1990; 1991).

FGF-2 weist vier Isoformen auf, ein kurzes Protein von 18 kDa, welches im Zytosol lokalisiert ist und von dort exportiert wird (Brigstock et al., 1991; Bugler et al., 1991), und drei längere Proteine von 21, 21,5 und 22,5 kDa, die durch ein und dieselbe mRNA kodiert werden und im Zellkern vorzufinden sind (Renko et al., 1990; Bugler et al., 1991).

Das FGF-2-Gen ist auf Chromosom 4q25-q27 lokalisiert (Lafage-Pochitaloff et al., 1990). Es besteht aus 3 Exons und umfasst 34 kb (Abraham et al., 1986).

Die Regulationsmechanismen des FGF-2 sind sehr komplex und verlaufen auf verschiedenen Ebenen. Zum einen kann seine Verfügbarkeit durch Bindung an Rezeptoren, durch limitierte Proteolyse und durch strukturelle Modifikationen reguliert werden. Andererseits postulierte Kozak et al. (1991) aufgrund der sehr GC-reichen und hochstrukturierten „leader“-Region eine durch Translationsinitiation regulierte Expression des FGF-2. Im Fall einer Fehlregulation des FGF-2 sind gravierende Auswirkungen auf die Signaltransduktionskaskade zu erwarten, was zu proliferativen Veränderungen der Gefäße führen kann (Scharper et al., 1996; Cheng et al., 1997).

Anhand klinischer Studien und Versuche konnte vor kurzem demonstriert werden, dass FGF-2 durch seine Angiogenese stimulierende Eigenschaft u.a. eine Verlängerung der myokardialen Revaskularisation bewirkt bzw. die Formation von kollateralen Gefäßen nach einem Myokardinfarkt stimuliert und somit kardioprotektive Effekte aufweist (Azrin et al., 2001; Cuevas et al., 2001; Ruel et al., 2002; Lederman et al., 2002). Dies wird bei der Entwicklung therapeutischer Ansätze mit FGF-2 bei kardiovaskulären Erkrankungen ausgenutzt. Allerdings befindet man sich dabei erst in der klinischen Testphase.

#### **1.4. Weitere potentielle Risikofaktoren der Atherosklerose**

Die vorliegende Arbeit befasst sich neben dem inflammatorischen Aspekt der Atherosklerose bzw. den bedeutenden Entzündungsmediatoren  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{TNF}\beta$  und dem Wachstumsfaktor FGF-2 mit einer Reihe weiterer Gene, die im atherosklerotischen Geschehen als potentielle Risikofaktoren diskutiert werden: Heparan-Sulfat-Proteoglykan-2 (HSPG-2, auch Perlekan genannt), Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR) und Stickstoffmonoxid-Synthase-3 (NOS3).

#### **1.4.1. Heparan-Sulfat-Proteoglykan-2 (HSPG-2)**

Proteoglykane stellen eine Familie von großen, langgestreckten Makromolekülen dar, die unterschiedliche physikalische (Hydratisierung, Vernetzung, Filter) und physiologische Funktionen (Angiogenese, Blutkoagulation, Zelladhäsion, Ionenhaushalt, Kollagenfibrillenbildung, Bindung von Wachstumsfaktoren) ausüben. Die Sekretion und Anreicherung von Proteoglykanen in der extrazellulären Matrix ist charakteristisch für die Atherosklerose. Sie tragen zum Wachstum atherosklerotischer Plaques und zur Ablagerung von Lipiden durch Bindung von Lipoprotein-Lipasen (LpL) und Apo-B (Lindahl et al., 1998; Rosenberg et al., 1997), sowie mineralischem Kalzium in der Arterienwand bei (Noonan et al., 1991; Aviezer et al., 1994; Dolan et al., 1997). Immunhistochemische Studien zeigten auch, dass Proteoglykane in humanen koronaren atherosklerotischen Läsionen überexprimiert sind (Radhakrishnamurthy et al., 1998). Höhere Zellteilungsraten und das Wachstum von Stenosen könnten daher die Folge sein (Volker et al., 1995).

Ein für die Aktivierung von glatten Muskelzellen besonders wichtiges Proteoglykan der Arterienwand, ist das vor allem von Endothelzellen produzierte Heparan-Sulfat-Proteoglykan-2 (HSPG-2, auch Perlekan genannt). Änderungen in der HSPG-Expression wurden bei proliferierenden glatten Muskelzellen der Gefäßwand beobachtet (Evanko et al., 1998). Das ca. 460 kDa große HSPG-2-Protein besteht aus einem Proteinfilament, an das mehrere sulfatierte Kohlenhydrat-Seitenketten kovalent gebunden sind. Nennenswert sind im HSPG-2-Protein die Domänen I, IV und V, die die biologische Funktion dieses Proteins ermöglichen. Die N-terminale Domäne-I bindet Wachstumsfaktoren (u.a. auch FGF-2) und Acetylcholinesterase und enthält die putativen Bindungsstellen der Heparan-Sulfat-Seitenketten (Kallunki et al., 1992; Iozzo et al., 1994). Sie sind für die Präsentation des HSPG-2 in der Gefäßmembran wichtig und stellen daher eine Region mit potentiellen genetischen Markern für atherosklerotische Geschehnisse dar (Hansen et al., 1997). Die Domäne-IV ist für die Membran- und Typ-IV-Kollagen-Bindung verantwortlich (Hopf et al., 1999). An die Domäne-V binden solche Zelloberflächen-Rezeptoren wie  $\alpha$ -Dystroglykan und Integrin- $\beta$ 1 (Brown et al., 1997; Friedrich et al., 1999).

Das für HSPG-2 kodierende Gen ist auf Chromosom 1p36.1 lokalisiert, umfasst ca. 120 kb und besteht aus 97 Exons (Chakravarti et al., 1991; Nicole et al., 2000). Der BamHI-Polymorphismus in Domäne I des HSPG-2 (IVS6-86G>T) (Kallunki et al., 1991) wurde mit der Reduktion der Albuminurie bei *Diabetes mellitus* bzw. niedrigerer Menge des zirkulierenden Apo-B assoziiert (Hansen et al., 1997; Cai et al., 2000). Der Eingriff in den Apo-B-Stoffwechsel läßt vermuten, dass HSPG-2 einen Risikofaktor bei kardiovaskulären Erkrankungen darstellt.

#### **1.4.2. Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR)**

Die Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR) ist ein Enzym, das die Umwandlung von 5,10-Methylenetetrahydrofolat zu 5-Methyltetrahydrofolat katalysiert. Das 5-Methyltetrahydrofolat ist die Hauptform der im Blut zirkulierenden Folsäure und stellt ein Ko-Substrat der Remethylierung von Homocystein zu Methionin dar. Es ist bekannt, dass ein Mangel an MTHFR eine Erhöhung des Homocysteinspiegels im Blut zur Folge hat. Wie zahlreiche Studien beweisen, stellen erhöhte Plasmakonzentrationen von Homocystein einen unabhängigen Risikofaktor für Entstehung und Progression von atherosklerotischer Erkrankungen (Graham et al., 1997; Moghadasian et al., 1997; Nygard et al., 1997) wie Schlaganfall, Myokardinfarkt (Schmitz et al., 1996; Verhoef et al., 1994), Venenthrombose und Ischämie dar (den Heijer et al., 1996). Die Homocysteinmenge wird außerdem durch Vitamine B 6 und 12, aber auch durch erbliche Faktoren beeinflusst.

Das MTHFR-Protein ist ein Homodimer von 150 kDa. Es wurden 3 unterschiedliche Transkripte von je 2,8, 7,2 und 9 kb, die unterschiedliche Splice-Varianten darstellen, nachgewiesen (Gaughan et al., 2000).

Das MTHFR-Gen besteht aus 11 Exons (Goyette et al., 1998) und liegt auf dem Chromosom 1p36.3 (Gaughan et al., 2000).

Es sind zahlreiche Mutationen und Polymorphismen im MTHFR-Gen bekannt, u.a. A222V (Frosst et al., 1995), die eine Reduktion des MTHFR und eine Erhöhung der Homocysteinmenge bewirken, und so mit kardiovaskulären Erkrankungen in Zusammenhang gebracht werden konnten (Christensen et al., 1997; van der Put et al., 1997; Ma et al., 1996; Kluijtmans et al., 1996, 1997; Verhoef et al., 1997).

### **1.4.3. Stickstoffmonoxid-Synthase-3 (NOS-3)**

Mit Hilfe der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) wird unter Abspaltung von L-Citrullin aus der basischen Aminosäure L-Arginin Stickstoffmonoxid (NO) generiert (Moncada et al., 1991). NO ist eine vasodilatierende Substanz, die den Gefäßtonus moduliert. Stickstoffmonoxid führt über eine Erhöhung der cGMP zur Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur. Neben den vasodilatierenden Eigenschaften hemmt NO die Plättchenadhäsion und -aggregation, sowie Leukozytenadhäsion und wirkt antiproliferativ (Walther et al., 2001). Dieses Wirkprofil von NO ist ein wichtiger Bestandteil der endothelialen Schutzbarriere. Unter dem Einfluss von Hypertonie, Hypercholesterinämie, chronischem Nikotinkonsum und neuroendokriner Stimulation (Angiotensin II) als Folge einer Herzinsuffizienz wird die Verfügbarkeit von biologisch aktivem NO erniedrigt. In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung von eNOS3 und somit die Reduktion von NO zu Hypertension, abnormalen Kontraktionen bzw. Einengungen der Gefäße und zu Gewebshypoxie (Sauerstoffmangel) führt (Pohl et al., 1993).

Marsden et al. (1992) haben erstmals die endotheliale NOS kodierende cDNA isoliert. Das Protein umfasst 1203 AS. Das eNOS-Gen, das auf dem Chromosom 7q35-36 lokalisiert ist und aus 26 Exons besteht, umfaßt 21 kb genomischer DNA (Marsden et al., 1993). Yoshimura et al. (1998) ist es gelungen, einen Polymorphismus im NOS3-Gen zu detektieren (E298D, Exon 7), der mit dem Auftreten koronarer Spasmen korreliert wurde. Hingorani et al. (1999) haben weiterhin diesen Polymorphismus bei Patienten mit Myokardinfarkt untersucht und dabei eine erhöhte Frequenz der homozygoten Mutationsträger bei Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden festgestellt.

### 1.5. Zielsetzung der Arbeit

Folgende Schwerpunkte wurden im Rahmen des vorliegenden Projektes bearbeitet:

#### Genomische Untersuchungen:

- Screening funktionell und regulatorisch wichtiger Bereiche der Gene TNF $\alpha$  und - $\beta$  bezüglich neuer Mutationen/Polymorphismen mittels SSCP- und Sequenzier-Analyse;
- Bestimmung neu ermittelter bzw. bereits bekannter genomischer Varianten der Gene TNF $\alpha$  ( c.1-863C>A; c.1-857C>T; c.1-572A>C; c.1-376G>A; c.1-308G>A; c.1-244G>A; c.1-238G>A) und TNF $\beta$  (IVS1+90A>G; IVS1+206G>C; IVS1-13\_12dupTC; C13R; T60N) bzw. anderer Kandidatengene der koronaren Atherosklerose wie FGF-2 (c.223C>T), HSPG-2 (BamHI-Polymorphismus), NOS-3 (E298D) und MTHFR (A222V) bei folgenden drei metabolisch und angiographisch unterschiedlichen Probandengruppen (mitteldeutsche Kaukasier): 1. Langzeitblutspender, 2. Patienten mit angiographisch nachgewiesener koronarer Herzkrankheit und 3. Patienten mit angiographisch gesicherten unauffälligen Koronarien;
- Untersuchung möglicher Assoziationen dieser genetischen Varianten zur Inzidenz und Progredienz von Herz-Kreislauf-Erkrankungen unter Einbezug von klinischen (Geschlecht, Alter, Hypertonie, *Diabetes mellitus*, Raucherstatus) und biochemischen Parametern (u.a. „Body Mass Index“ BMI, Lipidwerte, Fibrinogen, Plasminogen) der Patienten bzw. unter Berücksichtigung des Manifestationsalters, des Verlaufs und der Schwere der koronaren Herzkrankheit;

#### Funktionelle Untersuchungen:

- Etablierung spezifischer und reproduzierbarer RT-PCR-Methoden für die Quantifizierung der zellulären humanen *ex vivo* TNF $\alpha$ - und FGF-2-mRNA-Expression von Patienten und Langzeitblutspendern (*ex vivo* Bestimmung an nativen humanen Monozyten, einem Zellsystem, das wesentlich an atherosklerotischen Veränderungen der Gefäßwand beteiligt ist); Untersuchungen zur tageszeitlichen Rhythmik der humanen TNF $\alpha$ -Gen-Expression bzw. ihrer Geschlechts- und –Altersabhängigkeit im Rahmen einer zirkadianen *ex vivo* Studie;
- Assoziationsstudien zu Genkonstellation bzw. Genexpression für TNF $\alpha$  und Genkonstellation, Gen- und Proteinexpression bei FGF-2.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Chemikalien

**Tabelle 3:** Zusammenfassung der verwendeten Chemikalien

Firmen	Verwendete Chemikalien
AGS (Heidelberg)	TriStar Reagent <sup>TM</sup>
Aldrich (Steinheim)	Isopropanol, Magnesiumchlorid
Amersham-Pharmacia (Freiburg)	Bromphenolblau, Desoxyribonukleotide, Ethidiumbromid
Biozym (Oldendorf)	Agarose, „Low-Melting-Point“-Agarose
Gibco BRL (Eggenstein)	100-Basenpaar-Leiter, DNA-Masseleiter, Nycoprep <sup>TM</sup> 1.068
ICN Biochemicals GmbH (Eschwege)	Diethylpyrokarbonat (DEPC)
Lachema (Brno, Tschechien)	Natriumhydroxid
LKB (Bromma, Schweden)	Repelsilan
Merck (Darmstadt)	Essigsäure, Dinatrium-Hydrogenphosphat, Formaldehyd, Kaliumchlorid, Kalium-Dihydrogenphosphat, Kaliumtartrat, Kupfersulfat, Natriumazid, Natriumcarbonat, Natrium-Dihydrogenphosphat, Natrium-Hydrogenkarbonat, Natriumperchlorat, Silbernitrat, Trichloressigsäure, Folin-Ciocalteus-Phenolreagens,
Oncor Appligene (Heidelberg)	Phenol
Perkin Elmer Cop. (Norwalk, USA)	Blue Dextran
Qiagen GmbH (Hilden)	QIAquick Gel Extraktion Kit
R&D Systems	Quantikine <sup>TM</sup> HS-Kit für human FGF basic
Roth (Karlsruhe)	Acrylamidlösung, Bisacrylamidlösung, Borsäure, Chloroform, Dextran 500, Ethanol, Glycerin, Natriumborhydrid, Natriumchlorid, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), Guanidinhydrochlorid
Seromed Biochrom KG (Berlin)	Natriumpyruvat,
Serva (Heidelberg)	Ammoniumpersulfat, Rinderserumalbumin (BSA), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Glyzin, Sodiumdodecylsulfat (SDS),
Sigma (Deisenhofen)	Formamid, Mineralöl, Natriumazetat, Saccharose, N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED), Xylenzyanol

#### 2.1.2. Enzyme

**Tabelle 4:** Zusammenfassung der verwendeten Enzyme

Firmen	verwendete Enzyme
Amersham-Pharmacia (Freiburg)	RNase-Inhibitor (RNAguard), „ThermoSequenase II Dye Terminator Cycle Sequencing Premix Kit
Biolabs New England Bioproducts (Schwalbach/T)	Restriktionsenzyme: <i>Nco</i> I, <i>Dde</i> I, <i>Mbo</i> I, <i>Ban</i> II; <i>Hinf</i> I
Invitak (Berlin)	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (für Untersuchung der genomischen Varianten)
Promega Deutschland GmbH (Mannheim)	AMV-Reverse-Transkriptase, <i>Taq</i> -DNA-Polymerase (für kompetitive Untersuchungen)

### 2.1.3. Oligonukleotide

Alle Primer wurden von der Firma GibcoBRL (Karlsruhe) bezogen.

**Tabelle 5:** Zusammenfassung der für TNF $\alpha$ - und TNF $\beta$ -Genotypisierung verwendeten Primer (NCBI, Acc. Nr. Z15026).

Untersuchung der genomischen Varianten des TNF $\alpha$ -Gens	
c.1-863C>A	„upper“ Primer (20mer): 5' - AGC AAT GGG TAG GAG AAT GT - 3' „lower“ Primer (20mer): 5' - CAG TGT GTG GCC ATA TCT TC - 3'
c.1-857C>T	„upper“ Primer (20mer): 5' - AGC AAT GGG TAG GAG AAT GT - 3' „lower“ Primer (20mer): 5' - CAG TGT GTG GCC ATA TCT TC - 3'
c.1-572A>C	„upper“ Primer (21mer): 5' - GAA TGA AAG AAG AGG GCC TGC - 3' „lower“ Primer (22mer): 5' - GAG TCC TGA GGC CTG TGT TTG G - 3'
c.1-376G>A	„upper“ Primer (20mer): 5' - GCC TCA GGA CTC AAC ACA GC - 3' „lower“ Primer (20mer): 5' - TTC TTT TGG GGA CCA GGT CT - 3'
c.1-308G>A	„upper“ Primer (20mer): 5' - TAT CTT TTT CCT GCA TCC TG - 3' „lower“ Primer (20mer): 5' - CTG ATT TGT GTG TAG GAC CC - 3'
c.1-244G>A	„upper“ Primer (20mer): 5' - TTG GAA AGT TGG GGA CAC AC - 3' „lower“ Primer (20mer): 5' - ATC AGT CAG TGG CCC AGA AG - 3'
c.1-238G>A	„upper“ Primer (20mer): 5' - TTG GAA AGT TGG GGA CAC AC - 3' „lower“ Primer (20mer): 5' - ATC AGT CAG TGG CCC AGA AG - 3'
P84L	„upper“ Primer (20mer): 5' - GGT CTC AGC TTT TTC TTT TC - 3' „lower“ Primer (20mer): 5' - CAA GTT CCA AGA CAC ATC CT - 3'
IVS3+51A>G	„upper“ Primer (20mer): 5' - GCT CTG AGG ATG TGT CTT GG - 3' „lower“ Primer (20mer): 5' - CTC AGC GAG TCC TTC TCA CA - 3'
Untersuchung der genomischen Varianten des TNF $\beta$ -Gens	
c.1-729A>G	„upper“ Primer (20mer): 5' - TTG ATC CTG GAA TGT GTG TT - 3' „lower“ Primer (20mer): 5' - ATT CTG GTG TTT GCC TCT TG - 3'
c.7G>A	„upper“ Primer (20mer): 5' - GCT GCT CAA CTG CCT CCT CT - 3' „lower“ Primer (20mer): 5' - AGT CCA AAG CAC GAA GCA CG - 3'
IVS1+90A>G	„upper“ Primer (20mer): 5' - GCC TGG GCC TTG GTG GGT TT - 3' „lower“ Primer (20mer): 5' - CAT CTT GGG GTG CTG ACG GG - 3'
IVS1+206G>C	„upper“ Primer (20mer): 5' - CCT CTC TGT TCC CTT CCT GT - 3' „lower“ Primer (20mer): 5' - AGA GAG AGA CAG TGA GCG GG - 3'
IVS1-13_12dupTC	„upper“ Primer (20mer): 5' - GTC TGT CTT CCG CCG CGT GC - 3' „lower“ Primer (21mer): 5' - TGG TGT CAT GGG GAG AAC CTG - 3'
C13R	„upper“ Primer (21mer): 5' - TGC AGG TTC TCC CCA TGA CAC - 3' „lower“ Primer (20mer): 5' - CTC CTG CTG CCT CAC CTG GG - 3'
T60N	„upper“ Primer (20mer): 5' - CAC CTT CAG CTG CCC AGA CT - 3' „lower“ Primer (20mer): 5' - GAG AGC TGG TGG GGA CAT GT - 3'

**Tabelle 6:** Primer für die mRNA-Expressionsuntersuchungen (NCBI, Acc. Nr. Z15026; Y13468).

Kompetitive Untersuchungen zum TNF $\alpha$ -Gen	
RT-Primer	(25mer): 5' - CAA TGA TCC CAA AGT AGA CCT GCC C - 3'
Adapter-Primer	(28mer): 5' - AAG AAG ACA GTC CTG ATC GTG GCA GGC G - 3'
Kompetitive PCR	„upper“ Primer (24mer): 5' - GGC GCT CCC CAA GAA GAC AG - 3'
	„lower“ Primer (24mer): 5' - GGC CGA TTG ATC TCA GCG CT - 3'
Kompetitive Untersuchungen zum FGF-2-Gen	
RT-Primer	(25mer): 5' - TTT CGA ATA AAG CAA ATG CGT GAA A - 3'
Adapter-Primer	(28mer): 5' - CTG TAC TGC AGT CCG GGA GAA GAG CGA C - 3'
Kompetitive PCR	„upper“ Primer (20mer): 5' - CCA AGC GGC TGT ACT GCA - 3'
	„lower“ Primer (20mer): 5' - CAG CAG ATG CAA TAT AAA AGG G - 3'

**Tabelle 7:** Primer für die Untersuchung der Kandidatengene nach bekannten Polymorphismen (*NCBI, Acc. Nr.:* AL445798; G67549; D26607; Y13468).

Untersuchung des Genpolymorphismus im HSPG2-Gen	
HSPG2 (IVS6-86G>T)	„upper“ Primer (20mer): 5' - AGA AAC CGA GCT GCC TGA CA - 3' „lower“ Primer (20mer): 5' - CCG GTC ACA GCG ATA CTC CA - 3'
Untersuchung des Genpolymorphismus im MTHFR-Gen	
MTHFR (A222V)	„upper“ Primer (20mer): 5' - GAA GGT GCA AGA TCA GAG CC - 3' „lower“ Primer (20mer): 5' - TCA CCT GGA TGG GAA AGA TC - 3'
Untersuchung des Genpolymorphismus im NOS3-Gen	
NOS3 (E298D)	„upper“ Primer (20mer): 5' - CCC ACA GCT CTG CAT TCA G - 3' „lower“ Primer (20mer): 5' - CAG TCA ATC CCT TTG GTG CT - 3'
Untersuchung des Genpolymorphismus im FGF-2-Gen	
FGF-2 (c.223C>T)	„upper“ Primer (20mer): 5' - CGC GGT TGC AAC GGG ATC CC - 3' „lower“ Primer (18mer): 5' - GCC CCC CAG CCT CCC GCC - 3'

### 2.1.4. Geräte

**Tabelle 8:** Zusammenfassung der verwendeten Geräte

Firmen	Verwendete Geräte
AGS (Heidelberg)	UV-Transilluminator
Amersham-Pharmacia (Freiburg)	Horizontalelektrophorese Multiphor II, PVDF-Membran UV-Spektrometer Ultrospec III
Bender und Hobein AG (Bruchsal)	Vortex Genie2™
Biometra (Göttingen)	Thermozykler Personalzykler (ohne Heizdeckel)
Bioplex® Strehlau und Kruse GmbH (Freiburg)	Elektrophoresekammer für Agarosegele
Canon Euro-Photo GmbH (Willich)	Kamera Canon EOS 6000
Carl-Zeiss (Oberkochen)	Mikroskop Axioskop 20
Eppendorf (Hamburg)	Thermozykler Gradient (mit Heizdeckel)
Fein-Optik (Bad Blankenburg)	Neubauer-Zählkammer
Heraeus (Hanau)	Begasungsbrutschrank, Zentrifuge Biofuge 28 RS, Zentrifuge Fresco
Perkin Elmer Corp. (Norwalk, USA)	ABI PRISM™-System 373A
Molecular Dynamics GmbH (Krefeld)	LASER-Densitometer

## 2.2. Charakterisierung der Probanden

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten 3 Gruppen von Probanden (europäische Kaukasier) stammten alle aus der gleichen geographischen Region, dem Mitteldeutschen Raum: 1. Patienten mit angiographisch gesicherter schwerer koronaren Herzkrankheit (KHK-Patienten); 2. Patienten mit angiographisch gesichertem normalen Koronarstatus (KOB-Patienten) und 3. Langzeit-Blutspender (LBS). Alle Patienten wurden in der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Prof. K. Werdan) erfasst, wo auch die klinischen und laborbiochemischen Untersuchungen der Patienten erfolgten. Die Erfassung der Blutspender erfolgte im Institut für Transfusionale Medizin/Blutbank der MLU Halle-Wittenberg.

Das Einschlusskriterium der ersten Gruppe bildete die angiographisch nachgewiesene schwere koronare Herzkrankheit mit klinischer Manifestation vor dem 55.Lebensjahr. Es wurden 264 Patienten, 226 Männer und 38 Frauen, die anamnestisch oder akut einen Myokardinfarkt erlitten hatten, einbezogen. Die klinische Charakterisierung der Infarktpatienten umfasste die Bewertung infarkttypischer Veränderungen im EKG, eine positive infarktenzymatische Diagnostik und Beschwerdesymptomatik sowie Echokardiographie (gestörte Kinetik, akinetische Areale), Myokardszintigraphie (Kinetik, Vitalität) und Ventrikulographie

(Ventrikelkontraktionsstörungen). Nach Empfehlung der „American Heart Association“ wurde entschieden, ob Patienten mit koronarer Herzerkrankung einer perkutanen transluminalen koronaren Angioplastie (PTCA) oder einem aorto-koronaren Venenbypass (ACVB) unterzogen wurden (Bourassa et al., 1998).

Die Einteilung der Koronarstenosen erfolgte nach Stenosekategorien. Als hämodynamisch signifikant galten Stenosen der großen epikardialen Gefäße von mehr als 70 % und des linken Hauptstammes von mehr als 50%. Je nach Veränderung der koronaren Hauptgefäße durch signifikante Stenosen erfolgte die Einteilung mit zunehmender Schwere des koronaren Ereignisses in Ein-, Zwei- und Mehrgefäßerkrankung. Als sichere Indikation für eine PTCA galt das Vorliegen signifikanter Koronarstenosen eines oder zweier großer Koronararterien bei bestehender medikamentös nicht beeinflussbarer stabiler oder instabiler Angina pectoris und /oder nachgewiesener myokardialer Ischämie, normaler bis mittelgradig reduzierter linksventrikulärer Funktion und erneut auftretender myokardialer Ischämie nach Myokardinfarkt. 155 der Infarktpatienten wurden mittels PTCA behandelt.

Eine aorto-koronare Bypassoperation wurde bei Angina pectoris oder Ischämie, bei bestehender koronarer Mehrgefäßerkrankung mit proximalen Stenosen oder ventrikulärer Dysfunktion, bei Ostiumstenose oder Hauptstammstenose von mehr als 50 % und bei PTCA-ungeeigneten Koronarstenosen durchgeführt (Braunwald, 1992). Die ACVB erfolgte bei insgesamt 82 Infarktpatienten.

Die zweite Gruppe der Probanden stellten Patienten mit angiographisch gesichertem normalen Koronarstatus dar (sog. koronar glatte Patienten). Diese Patienten wurden charakterisiert durch Herzklappenvitien ohne Koronaratherosklerose, atypische Angina-pectoris-Beschwerden mit normalem Koronarangiogramm (X-Syndrom) sowie Kardiomyopathie ohne Koronarsklerose. Des Weiteren fanden sich in dieser Gruppe Patienten mit Hypertonie, sekundärer linksventrikulärer Hypertrophie mit Angina pectoris und normalem Koronarangiogramm sowie solche mit psychogenen Brustschmerzen ohne Nachweis einer Koronarsklerose. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 135 koronar glatte Patienten, 79 Männer und 56 Frauen, untersucht.

Sowohl koronar auffällige als auch koronar glatte Patienten erhielten Dauermedikationen mit einem oder mehreren Präparaten (Acetylsalicylsäure, Nitrate, ACE-Hemmer, Kalziumantagonisten, Betablocker oder Lipidsenker).

Neben der klinischen Befundung wurden sowohl die koronaren als auch die koronar glatten Patienten durch ein erweitertes Diagnostikspektrum charakterisiert. Dazu gehörten eine detaillierte anamnestiche Erfassung von familiären Risiken, bestehende oder durchgemachte Erkrankungen und externen Risikofaktoren (Rauchen, körperliche Bewegung, usw.) durch Interview nach halbstandardisiertem Fragebogen sowie eine erweiterte biochemische Laboranalytik (metabolische und hämostaseologische Parameter).

Die Langzeit-Blutspender bildeten die dritte Gruppe. Dieses Kollektiv bestand aus 313 gesunden ärztlich kontrollierten Probanden (212 Männer und 101 Frauen), die grundsätzlich beschwerdefrei waren und an keiner bekannten Herz-Kreislauf-Erkrankung litten. Neben der routinemäßigen serologischen und medizinischen Kontrolle im Rahmen der Blutspende wurden durch mündliche Befragung Alter, Geschlecht, sonstige Erkrankungen, Blutdruck, Einnahme von Medikamenten, Rauchen und familiäre Erkrankungen (Herzerkrankung, periphere Durchblutungsstörungen, Schlaganfall, Hypertonie, Diabetes mellitus, Adipositas) erfasst.

Eine Einverständniserklärung der Patienten zur Einbeziehung in die Studie und zur Durchführung von Genanalysen wurde eingeholt. Für die Studie lag ein positives Votum der Ethik-Kommission der MLU vor. Für die Untersuchungen wurde Nüchternblut verwendet, das sowohl bei den Patienten als auch bei den Blutspendern jeweils morgens gegen 8:00 Uhr abgenommen wurde.

### 2.3. Molekularbiologische Untersuchungen

Alle verwendeten molekularbiologischen Methoden wurden, wenn nicht anders angegeben, nach Ausubel et al. (1998) durchgeführt.

#### 2.3.1. Untersuchung genomischer Varianten von 6 ausgewählten Kandidatengen der koronaren Atherosklerose

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden bereits bekannte genomische Veränderungen in funktionell wichtigen Abschnitten der Gene TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , FGF-2, HSPG-2, MTHFR und NOS-3 untersucht.

Die Identifizierung von neuen genomischen Varianten, die sich in regulatorisch wichtigen Regionen der TNF $\alpha$ - und TNF $\beta$ -Gene befinden, stellte einen weiteren Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit dar. Deshalb wurden die Promotorregionen dieser beiden Gene, sowie die kodierenden Sequenzen nach neuen genomischen Varianten durchsucht. Neben den kodierenden Bereichen wurden zusätzlich die Introns untersucht, um mögliche „Splice“-relevante Varianten der Gene zu identifizieren.

##### 2.3.1.1. Isolierung genomischer DNA

Die Isolierung genomischer DNA aus 2,5 ml EDTA-Blut der zu untersuchenden Probanden stellte den Ausgangspunkt für die Suche nach Mutationen und Polymorphismen dar. Die Präparation erfolgte nach der Methode von Old (1986): Das EDTA-Blut wurde zur Lyse mit 5 Vol. Lysepuffer (5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,32 M Saccharose, 1 % Triton X-100) versetzt und bei 4°C für ca. 45 min inkubiert. Nach dem Pelletieren der Zellkerne (Zentrifugation: 400 rpm, 4°C, 15 min) und anschließendem Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet in einem möglichst kleinen Volumen physiologischer NaCl-Lösung (0,9 %) resuspendiert. Zur Suspension wurden nachfolgend das gleiche Volumen 0,5 M EDTA (pH 8,0), 10 % des Gesamtvolumens an 10 % SDS und 5 % des Gesamtvolumens an 5 M NaClO<sub>4</sub> hinzugegeben. Dies führte zur Lyse der Zellkerne und damit zur Freisetzung der genomischen DNA. Nach zweimaliger Phenolextraktion (Phenol pH 8,0 in TE-Puffer gesättigt) wurden zwei weitere Chloroform-Extraktionen der wässrigen Phase durchgeführt. Anschließend wurde die hochmolekulare, genomische DNA mittels Aufwickelns an einen sterilen Glasstab und tropfenweise Zugabe von Isopropanol schonend gefällt. Nach Waschen der DNA mit 70 %igem Ethanol und Trocknung wurde diese in sterilem *aq. dest.* gelöst und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Qualitative und quantitative Angaben über die Nukleinsäurelösung konnten durch Analyse von UV-Absorptionsspektren (220-320 nm) gewonnen werden (Ibelgaufts, 1990). Da das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei 260 nm und das von Proteinen bei 280 nm liegt, ließ sich über den Quotienten OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> ein Reinheitsfaktor bestimmen, der für DNA >1,7 und für RNA zwischen 1,7 - 2,0 liegen sollte. Die Konzentration der Nukleinsäure wurde nach folgender Formel berechnet:

$$C = OD_{260} * E * V$$

C	- Konzentration der DNA bzw. RNA (ng/ $\mu$ l)
OD <sub>260</sub>	- Absorption bei 260 nm
E	- Extinktionskoeffizient (dsDNA: 50 ng/ $\mu$ l; RNA: 40 ng/ $\mu$ l)
V	- Verdünnung der Meßlösung

### 2.3.1.2. PCR-Analysen

Die PCR-Reaktionen wurden unter Standard-Bedingungen im Thermocycler „Eppendorf gradient“ mit Heizdeckel durchgeführt. Das Gesamtvolumen eines PCR-Ansatzes betrug jeweils 25 µl und bestand aus: 0,2 mM dNTP's, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, je 0,2 µM des „upper“ und „lower“ Primers (Tab. 5 und 7), 16 mM (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>, 50 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % Tween, 0,5 U/25µl Taq-Polymerase (Invitek) und Zusätze wie Formamid in variablen Konzentrationen (Tab. 9). Zu jedem PCR-Ansatz wurde jeweils 50 ng genomischer DNA zugefügt. Nach anschließendem kurzen Vortexen und Anzentrifugieren der Proben wurde die PCR sofort gestartet. Nach einer ersten Denaturierung von 5 min bei 95°C wurde das spezifische Produkt in einer Folge von Denaturierung (92°C, 30 sec), „Annealing“ (primerspezifische Temperatur, 30 sec) und Elongation (72°C, 30 sec) in einer variablen Anzahl von Zyklen amplifiziert (Tab. 9). Nach einer letzten Elongation von 5 min bei 72°C wurde das PCR-Produkt auf 4°C heruntergekühlt. Bei Bedarf wurden die PCR-Produkte bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

**Tabelle 9:** Verwendete PCR-, SSCP- und RFLP-Bedingungen zur Bestimmung genomischer Varianten der Gene TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , FGF-2, HSPG-2, MTHFR und NOS-3.

genomische Varianten	Ansatz	Formamid	„Annealing“	Zykluszahl	Nachweismethode	Detektion	PCR-Produkt
c.1-863C>A (TNF $\alpha$ )	25 µl	5 %	50°C	22	SSCP (PAG; 15%)	Silberfärbg.	160 bp
c.1-857C>T (TNF $\alpha$ )	25 µl	5 %	50°C	22	SSCP (PAG; 15%)	Silberfärbg.	160 bp
c.1-572A>C (TNF $\alpha$ )	25 µl	5 %	56°C	25	SSCP (PAG; 10%)	Silberfärbg.	180 bp
c.1-376G>A (TNF $\alpha$ )	25 µl	2 %	55°C	23	SSCP (PAG; 10%)	Silberfärbg.	157 bp
c.1-308G>A (TNF $\alpha$ )	25 µl	3 %	48°C	24	SSCP (PAG; 10%)	Silberfärbg.	135 bp
c.1-244G>A (TNF $\alpha$ )	25µl	4 %	50°C	22	SSCP (PAG; 15%)	Silberfärbg.	98 bp
c.1-238G>A (TNF $\alpha$ )	25 µl	4 %	50°C	22	SSCP (PAG; 15%)	Silberfärbg.	98 bp
P84L (TNF $\alpha$ )	25 µl	1 %	46°C	30	RFLP ( <i>DdeI</i> ; PAG; 15%)	Silberfärbg.	114 bp
IVS3+51A>G (TNF $\alpha$ )	25 µl	2 %	51°C	23	SSCP (PAG; 10%)	Silberfärbg.	103 bp
c.1-729A>G (TNF $\beta$ )	25 µl	6 %	50°C	25	SSCP (PAG; 10%)	Silberfärbg.	240 bp
c.7G>A (TNF $\beta$ )	25 µl	6 %	53°C	25	SSCP (PAG; 10%)	Silberfärbg.	376 bp
IVS1+90A>G (TNF $\beta$ )	25 µl	4 %	59°C	28	RFLP ( <i>NcoI</i> ; Agarosegel 1,2%)	UV-Anregung	556 bp
IVS1+206G>C (TNF $\beta$ )	25 µl	5 %	53°C	23	SSCP (PAG; 10%)	Silberfärbg.	175 bp
IVS1-13_12dupTC (TNF $\beta$ )	25 µl	2 %	64°C	24	SSCP (PAG; 10%)	Silberfärbg.	83 bp
C13R (TNF $\beta$ )	25µl	3 %	60°C	24	SSCP (PAG; 10%)	Silberfärbg.	128 bp
T60N (TNF $\beta$ )	25 µl	4 %	55°C	22	SSCP (PAG; 10%)	Silberfärbg.	128 bp
c.223C>T (FGF-2)	25 µl	8 %	67°C	30	SSCP (PAG; 10%)	Silberfärbg.	227 bp
IVS-86G>T (HSPG-2)	25 µl	6 %	54°C	25	SSCP (PAG; 10%)	Silberfärbg.	207 bp
A222V (MTHFR)	25 µl	4 %	51°C	27	RFLP ( <i>HinfI</i> ; Agarosegel 1,2%)	UV-Anregung	320 bp
E298D (NOS-3)	25 µl	4 %	53°C	27	SSCP (PAG; 13%)	Silberfärbg.	170 bp

Die PCR-Produkte wurden zur Kontrolle mit Stopper (50 % Glycerin, 0,05 % Bromphenolblau, 0,05 % Xylenzanol in 0,5xTBE-Puffer: 45 mM Tris-HCl, 45 mM Borsäure, 0,5 mM EDTA, pH 8,3) in einem 1,2 % Agarosegel (0,5 µg/ml Ethidiumbromid) in 0,5xTBE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenstandard diente die 100-Basenpaar-Leiter. Die optische Auswertung der Gele erfolgte durch UV-Anregung.

Zur Identifikation von möglichen genomischen Varianten wurden die PCR-Produkte mittels „Single strand conformation polymorphism“ (SSCP)-Analyse und zyklischer Sequenzierung untersucht. Eine

Genotypisierung der Probandenkollektive erfolgte mittels „Restriction fragment length polymorphism“ (RFLP) oder SSCP.

### 2.3.1.3. „Single strand conformation polymorphism“ (SSCP)-Analysen

Die SSCP-Methode beruht auf der Tatsache, dass einzelsträngige DNA-Moleküle selbst bei Austausch nur einer Base intramolekulare, spezifische Faltungsstrukturen annehmen und aufgrund dessen eine unterschiedliche elektrophoretische Mobilität im nicht-denaturierenden PAG aufweisen können (Wink und Wehrle, 1994). Eine Punktmutation oder eine kleinere Deletion/Insertion können somit zu reproduzierbaren Bandenshifts führen.

Gelzubereitung: Für die SSCP-Untersuchungen wurde ein nicht-denaturierendes PAG (12x26 cm, 1xTBE-Puffer) mit einer Acrylamidkonzentration von T=10,4 % oder 15 % und einem Vernetzungsgrad von C=3,7 % gegossen. Die Oberfläche der Glasplatte mit den Slots und Spacern wurde zur besseren Trennung der Platten mit Repelsilan behandelt. Auf die andere Platte wurde mittels eines Wasserfilms als Adhäsionsflüssigkeit die Gelträgerfolie „Gel-Fix ® for PAG“ aufgebracht. Nach dem Zusammenbau des Glasplattensandwichs wurde die Gellösung (21 ml) mit 14,6 µl TEMED und 84 µl Ammoniumpersulfat (1 mg/ml) versetzt, gemischt und gegossen. Das Gel wurde mindestens 1 h bei RT polymerisiert. Anschließend wurden die Proben aufgetragen.

Probenvorbereitung: Die PCR-Produkte wurden mit 3 Vol. 100 %igem Ethanol und 1/10 Vol. 3 M Natriumazetat (pH 4,6) 5 min bei -20°C ausgefällt. Danach wurde die DNA abzentrifugiert (12000 g, 10 min, RT), mit 200 µl 75 %igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 2 µl *aq. dest.* und 6 µl SSCP-Auftragspuffer (95 % Formamid, 20 mM EDTA, 0,05 % Bromphenolblau, 0,05 % Xylenzyanol) aufgenommen. Die ankonzentrierten PCR-Produkte wurden 5 min bei 95°C denaturiert und bis zum Gelauftrag bei -20°C gelagert.

Probenauftrag: Das polymerisierte Gel wurde mit der Trägerfolie auf die horizontale Elektrophoresekammer „Multiphor II“ gebracht. Zur besseren Temperaturregulation wurde zwischen Trägerfolie und Elektrophoreseplatte n-Nonan gegossen. Zwei Elektrodenkartonstreifen wurden in 5xTBE (Laufpuffer) getränkt und beidseitig auf die Gelränder positioniert. Nach einem Vorlauf von 10 min (20 mA, 15 W) wurden 4 µl des denaturierten PCR-Produkts aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 40 mA und 15 W bei 15°C (Wasserkühlung) je nach Produktgröße ca. ein bis zwei Stunden.

Visualisierung der DNA-Banden mittels Silberfärbung: Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 10 min in 100 ml Fixierlösung (50 % Methanol, 10 % Essigsäure) inkubiert. Nach zwei je 5 minütigen Waschschritten (je 100 ml: 10 % Ethanol, 0,5 % Essigsäure) wurden die DNA-Banden mittels 100 ml 0,1 % Silbernitratlösung gefärbt und mit 100 ml Entwicklerlösung (1,5 % NaOH, 0,01 % NaBH<sub>4</sub>, 0,15 % Formaldehyd) visualisiert. Nach genügender Entwicklung wurde die Reaktion mit 100 ml 0,75 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> abgestoppt. Zur besseren Konservierung wurden die Gele anschließend für 20 min in einer 10 % Glycerinlösung inkubiert und danach mit einer speziellen Folie überzogen und luftgetrocknet.

Im Fall eines Bandenshifts auf dem SSCP-Gel wurden die Proben zur Sequenzidentifikation mittels zyklischer Sequenzierung weiter untersucht.

### 2.3.1.4. Zyklische Sequenzierung

Für die zyklische Sequenzierung wurden die Proben zunächst mittels einer Elution aufgereinigt. Um die Fehler bei der Sequenzierung zu minimieren, wurden für jedes zu sequenzierende DNA-Fragment 3 PCR-Ansätze „gepoolt“ und im 1 % „Low-Melting-Point“-Agarosegel aufgetrennt. Die gewünschte DNA-Bande wurde danach aus dem Gel unter UV-Licht ausgeschnitten und weiter mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraktion Kits“ entsprechend dem Herstellerprotokoll eluiert. Die DNA wurde anschließend in 30-50 µl *aq. dest.* aufgenommen. Zur Konzentrationsbestimmung wurden 2-5 µl der eluierten DNA neben einer DNA-Masseleiter im Agarosegel aufgetrennt.

Nach der Elution wurden die DNA-Fragmente mittels „ABI PRISM System“ sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977). Der Sequenzieransatz von 20 µl bestand aus 4 µl Premix (ThermoSequenase II), 1 µl spezifischen Primer (3 pmol/µl) sowie 30-90 ng entsprechendem DNA-Fragment. Für jedes zu sequenzierende DNA-Fragment wurden zwei Sequenzierreaktionen, mit dem „upper“ bzw. dem „lower“ Primer, durchgeführt. Die Sequenzier-PCR erfolgte im Thermozykler „Eppendorf gradient“ mit Heizdeckel. Nach einem ersten Denaturierungsschritt (2 min, 96°C) wurde die PCR in 26 Zyklen (30 sec, 96°C; 30 sec, primerspezifisches Annealing; 4 min, 60°C) durchgeführt. Danach folgte die Fällung der DNA mit 3 Vol. 100 % Ethanol, 1/10 Vol. 3 M Natriumazetat (pH 4,6) und die Zentrifugation für 30 min bei 12000 g. Anschließend wurde die DNA zweimal mit eisgekühltem 75 % Ethanol gewaschen, getrocknet, in 5 µl denaturierendem Formamid-Puffer aufgenommen, denaturiert (2 min, 95°C) und bis zum Gelauftrag bei -20°C gelagert.

Der Gellauf wurde im Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung der MLU Halle-Wittenberg (Prof. H.-D. Pauer) mit Hilfe des ABI PRISM™-Systems 373A durchgeführt. Die Sequenzierproben wurden in einem 5 % denaturierenden PAG (8 M Harnstoff) für 15 Stunden bei 15 W aufgetrennt und anschließend rechnerisch mit Hilfe der ABI-PRISM Softwareversion 2.1.1. ausgewertet.

### 2.3.1.5. „Restriction fragment length polymorphism“ (RFLP)-Analysen

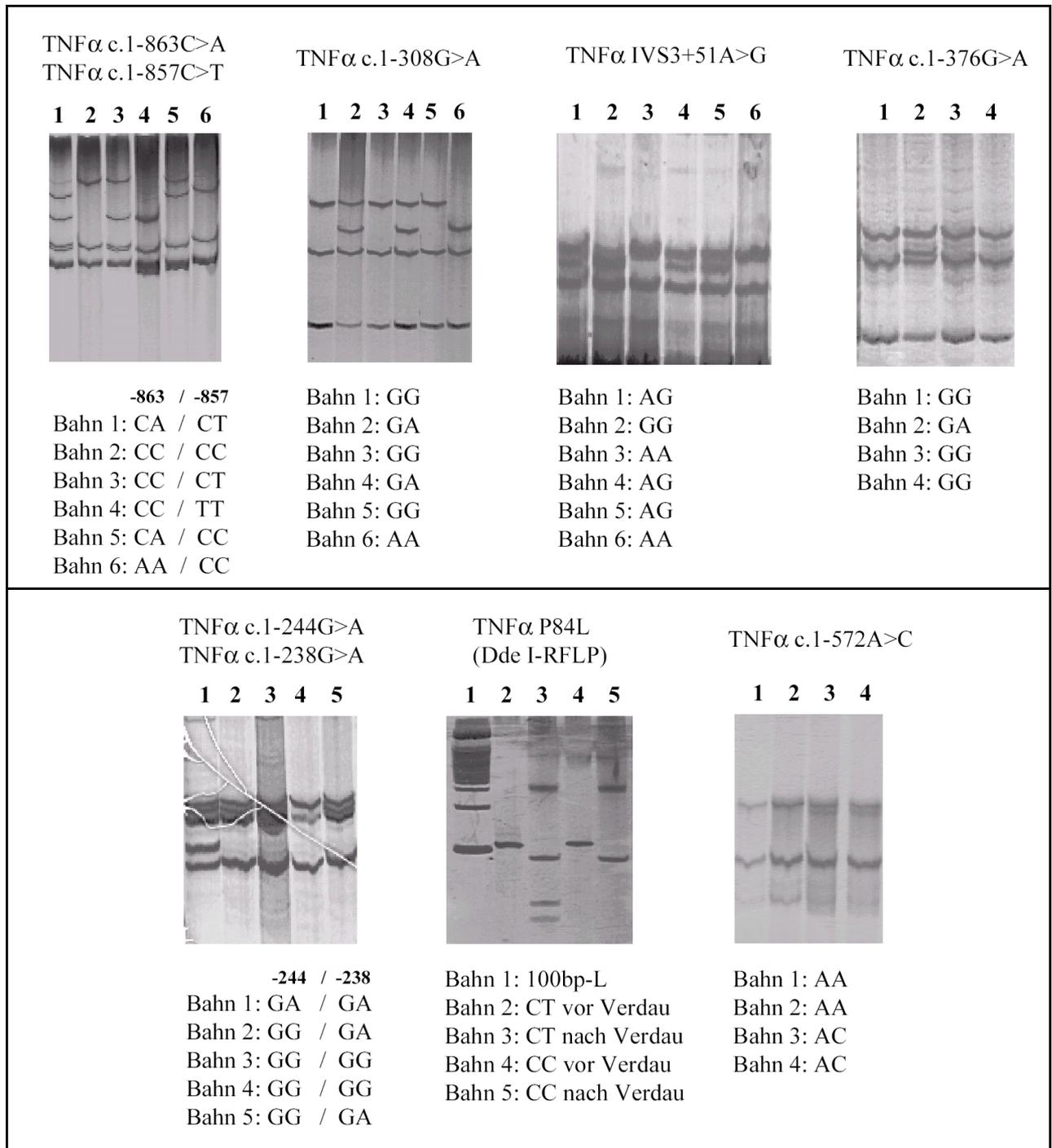
Nach der Identifikation der genomischen Veränderungen durch eine Sequenzierung konnten für einen Teil der Basensubstitutionen Restriktionsspaltungen etabliert werden. Die sequenzspezifischen Restriktionsenzyme ermöglichen eine effiziente Genotypisierung polymorpher Varianten. Zur Überprüfung der Enzymaktivität wurden die Primer so gewählt, dass eine sichere Schnittstelle für das jeweilige Enzym unabhängig von der polymorphen Stelle existierte. Nach der spezifischen PCR wurde die Spaltung in einem 25 µl Ansatz mit 5 U des entsprechenden Restriktionsenzym, 2,5 µl Enzympuffers und entsprechender Menge an zu spaltender DNA angesetzt. Die Reaktionsbedingungen der verwendeten Enzyme sind in der Tab. 10 aufgelistet.

**Tabelle 10:** Übersicht über die verwendeten Restriktionsenzyme.

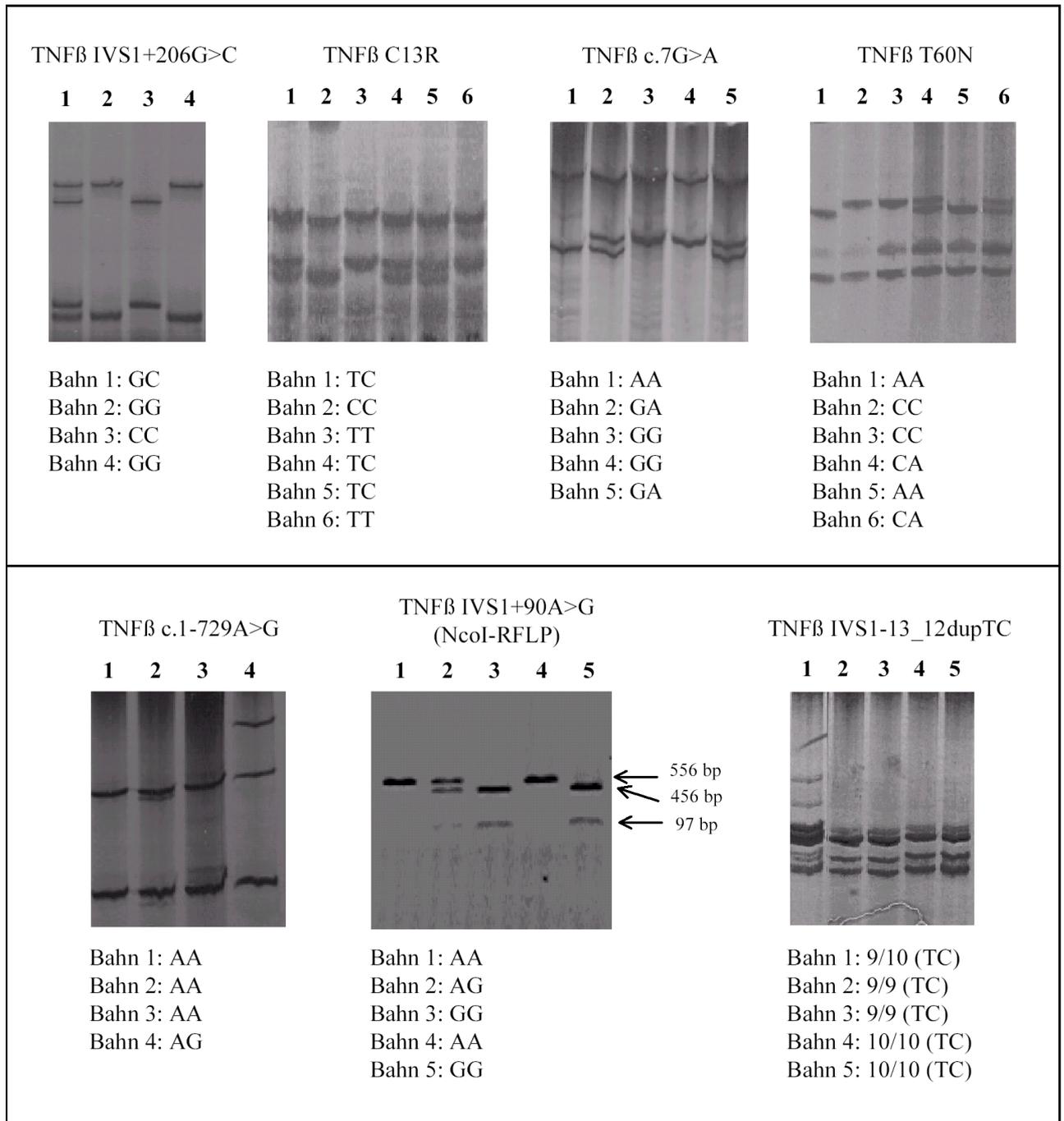
Enzym	Konzentration; Erkennungssequenz	Puffer	Verdau-Temperatur / Zeit
<i>NcoI</i>	50 000 U/ml; 5'...CA*TA TG...3' 3'...GT AT*AC...5'	50 mM potassium acetate, 20 mM Tris-acetate, 10 mM magnesium acetate, 1 mM dithiothreitol (pH 7,9)	37°C / 15 h
<i>Hinfl</i>	8 000 U/ml; 5'...G*ANTC...3' 3'...C TNAG...5'	50 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, 0,10 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol (pH 7,4)	37°C / 15 h
<i>DdeI</i>	10 000 U/ml; 5'...C*TNA G...3' 3'...G ANT*C...5'	100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM dithiothreitol (pH 7,9)	37°C / 2 h

### 2.3.1.6. Genotypisierung untersuchter Polymorphismen

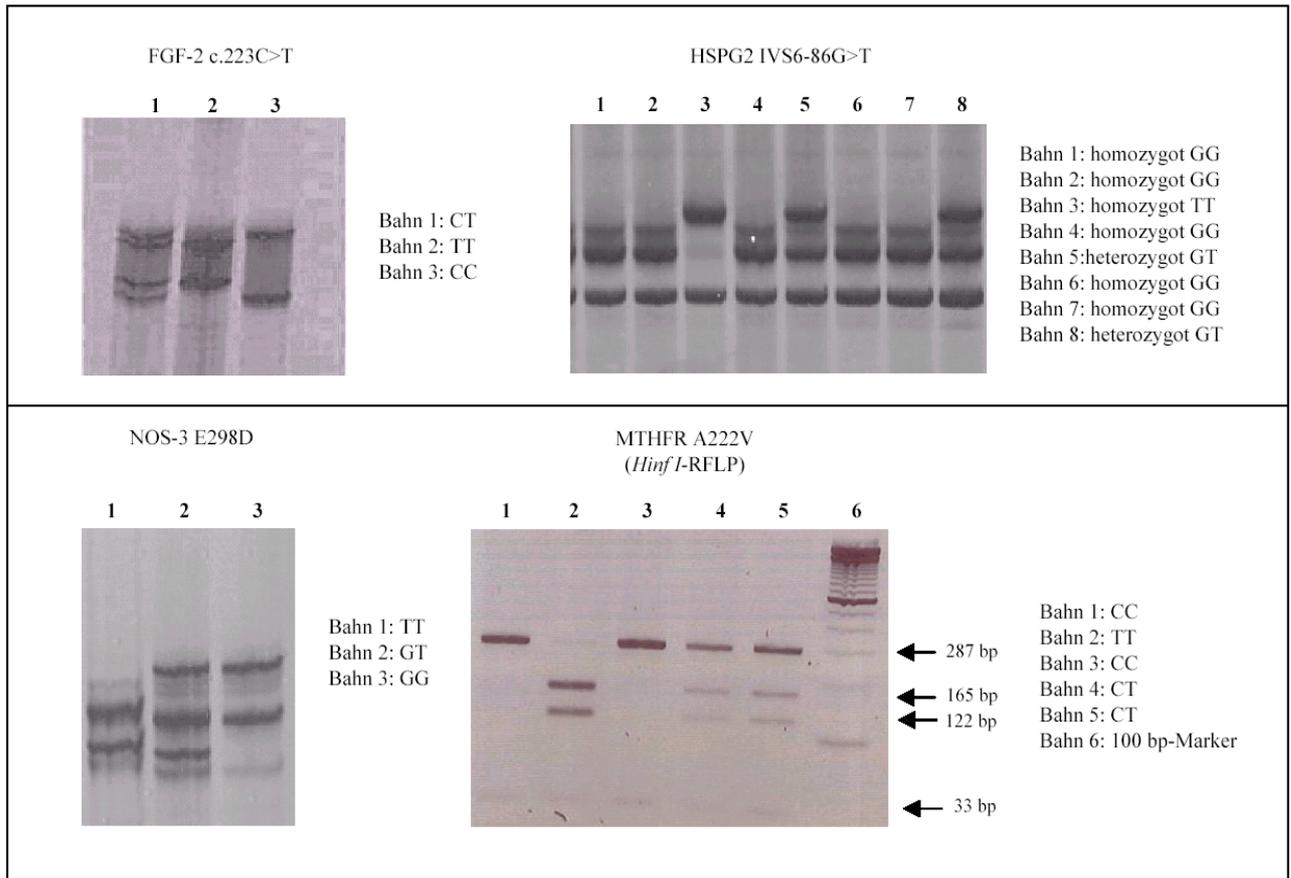
Mit Hilfe der oben genannten Methoden wurden die polymorphen Varianten der Gene TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , FGF-2, HSPG-2, MTHFR und NOS-3 identifiziert. In Abbildungen 6a, b und c sind die für Genotypisierung spezifischen Bandenmuster der SSCP- und der Agarosegele zusammen dargestellt.



**Abb. 6a:** Genotypisierung der polymorphen Varianten des TNF $\alpha$ -Gens.



**Abb. 6b:** Genotypisierung der polymorphen Varianten des TNFβ-Gens.



**Abb. 6c:** Genotypisierung der polymorphen Varianten der Gene FGF-2, HSPG-2, MTHFR und NOS-3.

### 2.3.2. Quantitative Untersuchungen der TNF $\alpha$ - und FGF-2-Genexpression

Die Expressionsuntersuchungen der TNF $\alpha$ - und FGF-2-mRNA erfolgten an nativen humanen Monozyten. Die Voraussetzung für kompetitive mRNA-Analysen war eine in Quantität und Qualität reproduzierbare RNA-Isolierung aus den nativen Zellen. Die Untersuchungen zur FGF-2-Proteinexpression erfolgten am Serum der Probanden mittels ELISA.

#### 2.3.2.1. Präparation von nativen Monozyten aus humanem Blut

Aus 9 ml peripherem Blut (EDTA-Blut) der nüchternen Probanden wurden die nativen Monozyten mittels NycoPrep™1.068-Dichtelösung präpariert. Die Lösung erlaubt es, die Monozyten und Lymphozyten nach ihrer Osmolarität zu trennen. Das frische EDTA-Blut wurde zunächst mit 1/10 Vol. 6 %igem Dextran 500 in physiologischer NaCl-Lösung (0,9 %) vermischt und 40 min bei RT für eine Sedimentation der Erythrozyten inkubiert. Danach wurde die leukozytenreiche Plasmaschicht mit Pasteurpipette abgenommen und auf die Dichtelösung geschichtet. Durch anschließende Dichtegradientenzentrifugation (600 g, 20°C, 15 min, Bremse: 0) im „Swing-Out“-Rotor wurden die Monozyten in der Dichtelösung ankonzentriert, während die Lymphozyten, Granulozyten und Erythrozyten sedimentierten. Die mit Monozyten angereicherte Dichtelösung wurde abgenommen und zweimal mit Waschlösung (physiologische NaCl, 0,13 % EDTA-Na<sub>4</sub>, 0,5 % BSA) gewaschen (Zentrifugation: jeweils 600 g, 4°C, 7 min). Nach Resuspension der Monozyten in einem genau bestimmten Volumen, wurde die Zellzahl durch dreifaches Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Anschließend wurde die Zellzahl nach der folgenden Formel ermittelt:

	Z	- Zellzahl pro ml
	G	- Anzahl der gezählten Zellen
$Z = G * K/Q * V$	K	- Verdünnungskoeffizient
	Q	- Anzahl der ausgezählten Großquadrate
	V	- Volumen ( $0,1 \text{ mm}^3 = 10^{-4} \text{ ml}$ )

Bis zur Präparation der RNA wurden die Monozyten in 1 ml TriStar<sup>TM</sup>-Reagens versetzt und in RNase-freien Tubes bei -80°C gelagert.

### 2.3.2.2. Quantitative Präparation von RNA

Das „*ready to use*“ Reagens TriStar<sup>TM</sup> erlaubt eine simultane und quantitative Präparation von RNA, DNA und Proteinen aus geringeren Mengen nativer Zellen sowie Zellkulturen. Es enthält Phenol und Guanidinthiocyanat in einphasiger Lösung und bildet nach Zusatz von Chloroform 3 Phasen aus: die obere wässrige Phase mit gelöster RNA, die Interphase mit gelöster DNA und die untere Protein-Phase. Voraussetzung für die Quantifizierung der einzelnen, zu isolierenden Komponenten war deren vollständige Isolierung ohne gegenseitige Kontamination.

Alle selbst hergestellten Lösungen und die nicht im Handel als RNase-frei verfügbaren Materialien wurden mit DEPC (Diethylpyrokarbonat) behandelt. Die RNA-Präparation erfolgte folgendermaßen:

Die in 1 ml TriStar<sup>TM</sup> Reagens eingefrorenen Monozyten bzw. andere Zellen (bereits im TriStar-Reagens lysiert und dissoziiert) wurden in 37°C Wasserbad kurz aufgetaut und mit Chloroform versetzt. Nach einminütigem starkem Mischen wurden die Proben 10 min bei RT inkubiert und anschließend zur Phasentrennung zentrifugiert (12000 g, 4°C, 15 min, Bremse: 0). Nach Abnahme von 550 µl der wässrigen Oberphase wurde die darin gelöste RNA mit 500 µl Isopropanol für 15 min bei 4°C ausgefällt. Nach einer Zentrifugation (12000 g, 4°C, 10 min) wurde die RNA zweimal mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Anschließend wurde die RNA je nach Pelletgröße in 20-100 µl *aq. dest.* aufgenommen, 10 min bei 60°C gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die Konzentration der RNA wurde mittels der in Kap. 2.3.1.1. angegebenen Formel ausgerechnet.

### 2.3.2.3. Bestimmung der TNFα- und FGF-2-mRNA-Expression

Die Bestimmung der TNFα- und FGF-2-mRNA-Expression erfolgte nach gleichem Prinzip (wie folgt dargestellt). Die jeweils verwendeten Primer sind in der Tabelle 6 zusammengefasst.

#### 2.3.2.3.1. Reverse Transkription (RT)

Die Umschreibung der mRNA in cDNA erfolgte jeweils mittels reverser Transkription mit einem spezifischen Antisense-Primer (Tab. 9). Der Reaktionsansatz von 20 µl enthielt: 50 mM Tris-HCl pH 8,3 bei 42°C, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 10 mM DTT, 0,5 mM Spermidin, 1 mM dTNP's, 0,5 µM vom jeweiligen RT-Primer und eine entsprechende Menge RNA. Die optimale Umschreibemenge an RNA wurde für jedes der untersuchten Gene (TNFα oder FGF-2) in Bezug auf die zelltypischen Expressionsraten in Abhängigkeit zur Gesamt-RNA-Menge vor der Quantifizierung einzeln ausgetestet. So ergab sich als optimal für TNFα-mRNA eine Umschreibung von 200 ng und für FGF-2 von 600 ng Total-RNA in cDNA.

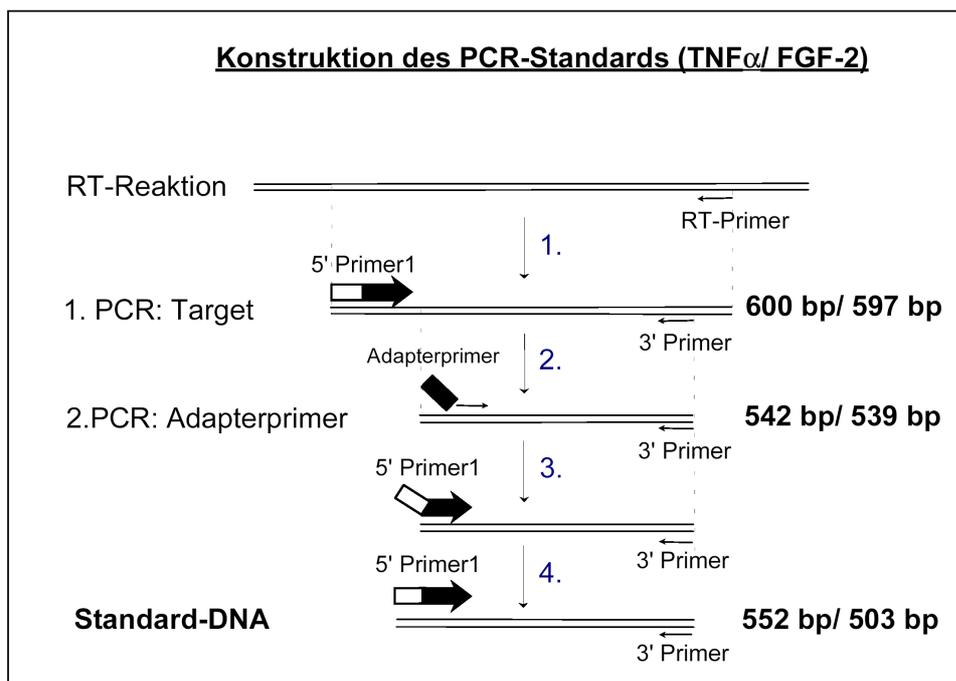
Die RT-Reaktionen wurden im Thermocycler durchgeführt. Nach einer 10 min langen Inkubation bei 62°C wurden die Proben auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 6,25 U AMV-Reverse-Transkriptase und 17 U RNase-Inhibitor (RNAGuard) wurde der Ansatz 1 h bei 42°C inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Erhitzen

auf 90°C (5 min) abgestoppt und auf 4°C abgekühlt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

Für die positive Kontrolle der RT-Reaktionen wurden laborinterne Kontroll-RNA's [gepoolte, auf 0,2 µg (TNFα) und auf 0,6 µg (FGF-2) aliquotierte RNA aus Monozyten gesunder Blutspender] parallel zu den zu untersuchenden Proben mit in cDNA umgeschrieben und anschließend ebenfalls mittels kompetitiver PCR quantifiziert.

### 2.3.2.3.2. Konstruktion des internen Standards

Das Prinzip der kompetitiven PCR beruht auf der Koamplifikation einer unbekanntem Menge der zu quantifizierenden cDNA (Target-DNA) und einer als Vergleichsgröße fungierenden Standard-DNA bekannter Konzentration. Aufgrund des Verhältnisses (Endmenge von Target-DNA + Endmenge von Standard-DNA = 100 %) und durch Kenntnis der eingesetzten Standard-DNA-Menge ist eine relative Bestimmung der Ausgangsmenge an Target-DNA möglich. Zur Erhöhung der Genauigkeit der Messung wurde eine Standard-Titrationsreihe eingesetzt. Im folgenden wird die Konstruktion des jeweiligen Standards näher beschrieben. Die Konstruktion der Standards erfolgte nach Celi et al. (1993) und Förster (1994) in drei Schritten (Abb. 7).



**Abb. 7:** Konstruktion der internen Standards für TNFα- und FGF-2-quantitative PCR's. Die Target-DNA's bilden Produkte von 600 bp (TNFα) und 597 bp (FGF-2). Die Standards ergeben Produkte von 552 bp (TNFα) und 503 bp (FGF-2).

Zur Herstellung der Standards wurde zuerst von einem gesunden Blutspender die mRNA in cDNA (jeweils für TNFα und FGF-2) umgeschrieben. Mit Hilfe eines Adapter-Primers (letzte 10 Basen entsprechen den ersten 10 Basen des 5'-Primers 1) und des 3'-Primers wurden Zwischenprodukte von 542 bp (TNFα) und 539 bp (FGF-2) amplifiziert, an deren 5'-Ende der 5'-Primer 1 binden konnte. Im letzten Schritt wurden diese Zwischenprodukte in einer PCR mit 5'-Primer 1 und 3'-Primer amplifiziert, so dass letztendlich die Standard-DNA's entstanden, die mit den kompetitiven Target-Primern (5'-Primer 1 und 3'-Primer) zu

vervielfältigen waren (TNF $\alpha$ : 552 bp Standard; FGF-2: 503 bp Standard). Das Produkt wurde aus einem „Low-Melting-Point“-Agarosegel eluiert, mit Target-Primern in ausreichender Menge vervielfältigt, vermessen und in gewünschter Konzentration (10 pg/ $\mu$ l für TNF $\alpha$ ; 100 pg/ $\mu$ l für FGF-2) aliquotiert. Bis zur Verwendung wurden die Standardaliquote bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für jede zu vermessende cDNA wurde jeweils eine Standard-Verdünnungsreihe (Titrationsreihe) von 8 Konzentrationsabstufungen (TNF $\alpha$ : 1,2; 2,1; 3,5; 5,8; 9,6; 15,9; 26,6 und 44,4 fg/ $\mu$ l und FGF-2: 3,9; 7,8; 15,6; 31,3; 62,5; 125; 250 und 500 fg/ $\mu$ l) frisch hergestellt (Abb. 8).

### 2.3.2.3.3. Kompetitive PCR

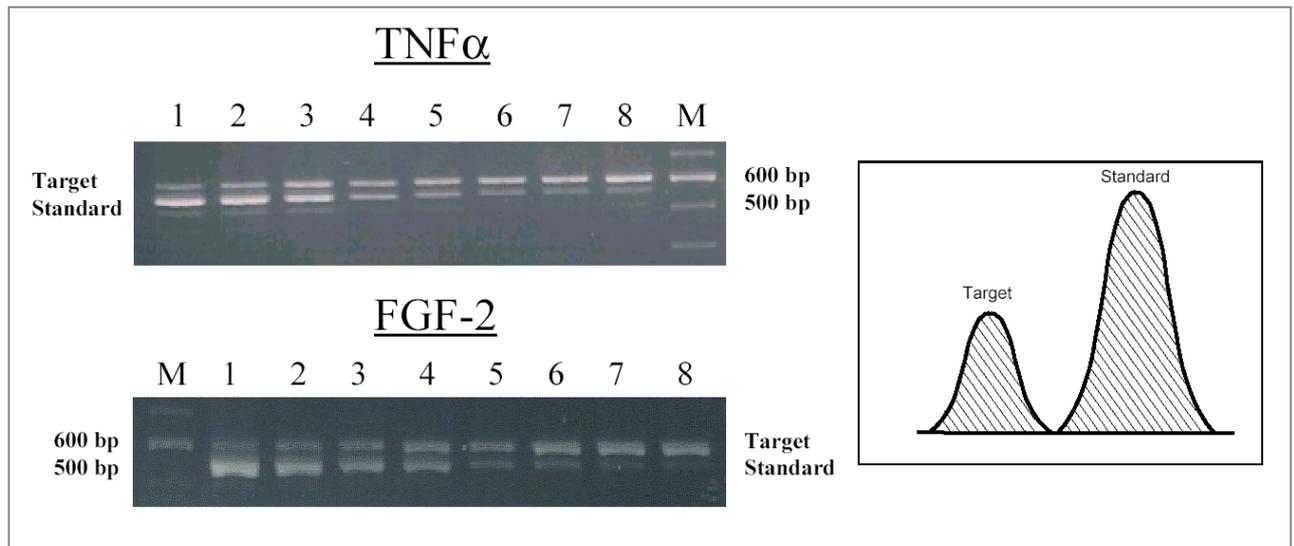
Für die kompetitive PCR wurden zur Bestimmung einer Target-DNA-Menge jeweils 8 Einzel-PCR's (Verdünnungsreihe) mit einer variierenden Menge an Standard-DNA (siehe oben) sowie eine Kontroll-PCR ohne DNA durchgeführt. Zu einem 50  $\mu$ l-PCR-Ansatz (0,2 mM dNTP's, 1,5 M MgCl<sub>2</sub>, je 0,5  $\mu$ M 5'-Primer 1 und 3'-Primer, siehe Tab. 6: Primer für kompetitive PCR, 3 % Formamid, 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8,4) wurden jeweils 1  $\mu$ l der transkribierten cDNA (TNF $\alpha$ : 200 ng, FGF-2: 600 ng) und 1  $\mu$ l der Standard-DNA (je eine Stufe der Verdünnungsreihe) pipettiert, der Ansatz gevortext, mit 50  $\mu$ l Mineralöl überschichtet und anzentrifugiert. Die PCR wurde mit einem „Hot-Start“ im Thermozykler (ohne Heizdeckel) gestartet. Nach dem ersten Denaturierungsschritt ( $95^{\circ}\text{C}$ , 5 min) wurden jeweils 1 U *Taq*-Polymerase zupipettiert. Es wurde insgesamt über 33 Zyklen amplifiziert ( $92^{\circ}\text{C}$  45 sec, „Annealing“:  $60^{\circ}\text{C}$  für TNF $\alpha$  und  $50^{\circ}\text{C}$  für FGF-2 45 sec,  $72^{\circ}\text{C}$  45 sec, „Delay“ 1 sec). Nach der letzten Extension von 10 min bei  $72^{\circ}\text{C}$  wurde auf  $4^{\circ}\text{C}$  abgekühlt.

### 2.3.2.3.4. Elektrophorese, Fotodokumentation und densitometrische Auswertung

Nach der kompetitiven PCR wurden jeweils 10  $\mu$ l der PCR-Produkte mit 2  $\mu$ l Stopper (50 % Glycerin, 0,05 % Bromphenolblau, 0,05 % Xylencyanol in 0,5xTBE) versetzt und im 1,2 % Agarosegel (500 ng/ml Ethidiumbromid) in 0,5xTBE Puffer 2 h bei 150 V elektrophoretisch aufgetrennt.

Nach der Elektrophorese wurden die DNA-Banden auf dem UV-Transilluminator (320 nm) visualisiert und photographisch dokumentiert (Film APX 100 AGFA, Kamera Canon 600, Rotfiltervorsatz, Belichtung 20 sec, Blende 4,5).

Die densitometrische Auswertung der Ergebnisse erfolgte im Institut für Pathophysiologie der MLU Halle-Wittenberg mittels LASER-Densitometers (Molecular Dynamics GmbH) unter Verwendung des Negativfilmmaterials. Das gesamte Negativ wurde eingescannt. Anschließend wurde entsprechend der Elektrophoresespur (Abb. 8) mit Hilfe des Computer-Auswerte-Systems Image Quant<sup>TM</sup> (Molecular Dynamics GmbH) eine Integration der Schwärzungskurve zur Berechnung der Bandenbreite und -intensität sowohl vom Target als auch vom Standard durchgeführt.



**Abb. 8:** Darstellung der Koamplifikation der zu vermessenden Target-DNA mit einer Standard-Verdünnungsreihe für Gene  $TNF\alpha$  und  $FGF-2$ .

### 2.3.2.3.5. Berechnung der mRNA-Menge von $TNF\alpha$ und $FGF-2$ pro Zelle

Durch Berechnung der Flächen der Extinktionskurven ergab sich die prozentuale Verteilung der Target- und Standard-Mengen im einzelnen PCR-Ansatz (Target + Standard = 100 %). Das Verhältnis von Target und Standard änderte sich aufgrund der abnehmenden Standard-Konzentration innerhalb einer PCR-Titrationsreihe. Ausgehend von den bekannten Standard-Konzentrationen wurde durch Regression die in die PCR eingesetzte Target-RNA-Konzentration (fg/ $\mu$ l) ermittelt. Am Äquivalenzpunkt von Target und Standard (beide 50 %) sind die eingesetzten Konzentrationen gleich. Zur Berechnung der Target-RNA-Menge im einzelnen RT-Ansatz wurde die ermittelte Konzentration mit 20  $\mu$ l (Gesamtvolumen vom RT-Ansatz) multipliziert. Die Anzahl der Zellen, die in eine RT-Reaktion eingesetzt wurde konnte man aus der präparierten Gesamtzellzahl an Monozyten berechnen. Bei der Endauswertung wurde ebenfalls der Faktor F berücksichtigt, der den Anteil der Target-DNA an der Gesamt-cDNA des jeweiligen Gens widerspiegelt ( $TNF\alpha$ :  $F = 702 \text{ bp Gesamt-cDNA} / 600 \text{ bp Fragment} = 1,2$ ;  $FGF-2$ :  $F = 1127 \text{ bp Gesamt-cDNA} / 597 \text{ bp Fragment} = 1,9$ ). Zusammengefasst ergibt sich folgende Gleichung, die die Ermittlung der mRNA-Menge in ag/Zelle erlaubt:

$$\text{mRNA pro Zelle} = \frac{\text{Target-Konzentration (fg/\mu l)} \times 20 \mu\text{l} \times F}{\text{Zellzahl}}$$

### 2.3.2.3.6. Ermittlung der Genauigkeit der mRNA-Quantifizierung

Um die möglichen Methodenfehler zu ermitteln wurden zum einen ausgehend aus der gleichen Zellzahl über RNA-Präparation, RT-Reaktion, kompetitive PCR und anschließender Auswertung mittels Fotodokumentation und Densitometrie parallel von 2 Probanden je 3 gleiche Zellproben untersucht. Zum anderen wurde die Tag-zu-Tag-Schwankung der RT-Reaktion ermittelt, indem eine aliquotierte RNA-Probe (10 x je gleiche Menge an RNA) an 10 verschiedenen Tagen untersucht wurde. Zusätzlich wurde anhand einer cDNA in 3 unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen getestet, ob die Endwerte vergleichbar mit den Anfangskonzentrationen sind.

### 2.3.2.4. Untersuchung der tageszeitlichen Rhythmik der TNF $\alpha$ -Expression

Untersuchungen zur zirkadianen Rhythmik der TNF $\alpha$ -Expression erfolgten an nativen Monozyten von 11 Personen (5 Frauen und 6 Männer). Es wurde an einem Tag zu drei verschiedenen Zeiten (8:00 Uhr, 12:00 Uhr, 16:00 Uhr) Venenblut entnommen und nach anschließender Monozytenpräparation die TNF $\alpha$ -mRNA-Menge ermittelt. Die erste Entnahme erfolgte nüchtern während die nachfolgenden den üblichen Ernährungsgewohnheiten der Probanden entsprachen.

### 2.3.2.5. Bestimmung der FGF-2-Proteinmenge mittels ELISA

Die FGF-2-Proteinmenge wurde mittels „Quantikine™ HS-Kit for human FGF basic“ am ELISA-Reader bestimmt.

Zunächst wurden 4 ml EDTA-Blut (Blutabnahme 8 Uhr, nüchtern) innerhalb von 30 min nach der Blutentnahme abzentrifugiert (10 min, 1000 rpm, 4°C). Danach wurden 500  $\mu$ l Plasma pro Tube (mindestens 2 Tubes pro Proband) abgenommen und bis zur Bearbeitung bei -20°C gelagert.

Am Vortag der ELISA-Messung wurden die Lösungen (Substrat- und Amplifizierlösung) entsprechend dem Hersteller-Protokoll vorbereitet und bis zum Gebrauch bei -20°C eingefroren.

Am Tag der Messung wurden als erstes 7 Standardverdünnungen (64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 pg/ml) aus kristallinem Standard und Calibrator-Diluent RD6X hergestellt. In jedes Well der Platte wurden 100  $\mu$ l Assay Diluent HD1-46 gegeben und anschließend jeweils 150  $\mu$ l des Standards bzw. der Plasmaprobe zupipettiert. Es folgte eine 3h-Inkubation der Platte bei Raumtemperatur (18-23°C) auf einem Schüttler. Nach der Inkubation wurde die Platte 6 mal mit je 400  $\mu$ l Waschlösung gewaschen. Anschließend wurde in jedes Well 200  $\mu$ l Conjugat gegeben, die Platte mit Klebestreifen verschlossen und 2 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurde wieder gewaschen, 50  $\mu$ l Substrat in jedes Well zugegeben und 45 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Bei nachfolgender Zugabe von 50  $\mu$ l Amplifizierlösung und 45 min Inkubation bei Raumtemperatur fand die Farbreaktion statt. Mit 50  $\mu$ l Stopplösung wurde die Reaktion beendet. Die optische Dichte wurde bei 490 nm am ELISA-Reader gemessen (Korrektur bei 650 nm oder 690 nm).

Für alle Proben und Standards wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Außerdem wurde bei jeder Reaktion der laborinterne Plasma-Standard mitbestimmt.

## 2.4. Verwendete Computerprogramme und statistische Tests

Die für PCR-Analysen verwendete Primer wurden mittels Computerprogramme „Oligo“ und „Generunner“ (Version 3.0) bestimmt und optimiert. Die densitometrische Auswertung der kompetitiven Untersuchungen erfolgte mittels Image Quant™ Version 5.0. Für die Genotyp-Phänotyp-Assoziationsuntersuchungen und statistische Auswertungen wurden die Programme Microsoft® EXCEL und SPSS für Windows Version 10.0 verwendet. Metrische Daten wurden mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung geprüft. Für die Untersuchung von unabhängigen Stichproben wurde im Fall einer Normalverteilung der t-Test nach Student und die einfaktorische Varianzanalyse (One-Way ANOVA) genutzt. Bei nicht normal verteilten Variablen wurde der U-Test nach Mann-Whitney und der Test nach Kruskal-Wallis verwendet. Für die Bestimmung von bivariaten Korrelationen von metrischen Größen wurden die Punkt-Moment-Korrelation nach Pearson (Normalverteilung) und die Rangkorrelation nach Spearman (keine Normalverteilung) berechnet. Mittels Post-Hoc-Tests (LSD) wurden nach Prüfung der Varianzhomogenität (Levene Test) der Zusammenhang von metrischen Variablen innerhalb von Gruppen bestimmt. Kategoriale Daten wurden in Kontingenztabellen mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson und des exakten Tests

nach Fisher analysiert. Alle Werte  $p < 0,05$  wurden als statistisch signifikant betrachtet. Mittels binärer logistischer Regressionsanalyse wurde die Abhängigkeit einer dichotomen Variablen von anderen unabhängigen Variablen, die ein beliebiges Skalenniveau aufweisen, ermittelt (odds ratio).

#### 3. Ergebnisse

Zunächst sollen nach klinischer und paraklinischer Charakterisierung der Probandenkollektive die Ergebnisse der Screening-Untersuchungen nach neuen polymorphen Varianten in funktionell und regulatorisch wichtigen Bereichen der 2 Gene  $TNF\alpha$  und  $TNF\beta$  dargestellt werden. Die neu gefundenen Polymorphismen dieser Gene wurden zusammen mit den bereits bekannten polymorphen Varianten der Gene  $TNF\alpha$  und  $TNF\beta$  und weiterer 4 Kandidatengene, die aus pathophysiologischer Hinsicht als Risikofaktoren der Atherosklerose anzunehmen sind (FGF-2, HSPG-2, NOS-3 und MTHFR), mittels einer deskriptiven Statistik im Rahmen einer Assoziationsstudie an 3 verschiedenen Probandengruppen (Langzeitblutspender, Patienten ohne koronaren Befund und Patienten mit koronarer Herzkrankheit) des Mitteldeutschen Raums auf ihre Bedeutung für koronare Atherosklerose getestet. Zusätzlich wurde bei den KHK-Patienten die mögliche Auswirkung des Genotyps auf das Manifestationsalter, den Verlauf und den Schweregrad der Herzkrankheit analysiert.

In einem weiteren Abschnitt sind zum einen die Resultate der Expressionsanalysen des  $TNF\alpha$ -Gens dargestellt. Bei der Ermittlung der funktionellen Auswirkungen der genetischen Varianten des  $TNF\alpha$ -Gens auf mRNA-Ebene wurde eine Adjustierung der Probanden nach Alter und Geschlecht durchgeführt, so dass zu jedem koronaren Patient ein vergleichbarer, gleichaltriger, koronar unauffälliger Patient und ein gesunder Blutspender zugeordnet wurde. Dies ermöglichte eine alters- und geschlechtsunabhängige Auswertung der  $TNF\alpha$ -Genexpressionsmeßwerte. Für das  $TNF\alpha$ -Gen konnte eine zirkadiane Studie ausgewertet werden.

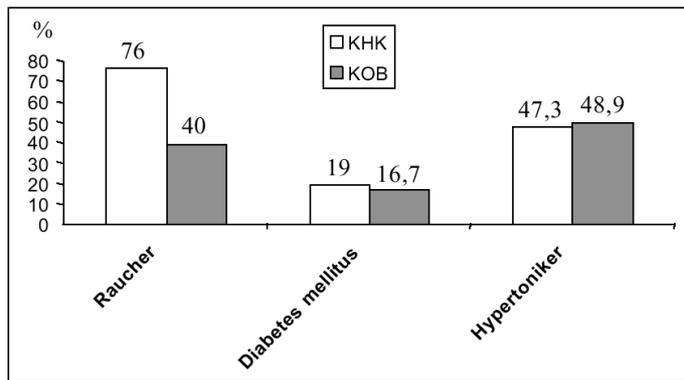
Zum anderen wurden Expressionsuntersuchungen zum FGF-2-Gen durchgeführt. Die genetischen Varianten des FGF-2-Polymorphismus c.223C>T (Handschug, 1998) wurden mit der mRNA- und Proteinexpression des FGF-2-Gens auf Assoziation untersucht. Da keine Alters- und Geschlechtsabhängigkeit der FGF-2-Expression vorlag, war hier eine Adjustierung der Probandengruppen nach Geschlecht und Alter nicht notwendig.

#### 3.1. Klinische und biochemische Charakterisierung der Untersuchungskollektive

In die vorliegende Studie wurden 313 gesunde Langzeitblutspender (LBS) (67,7 % Männer), 135 Patienten mit angiographisch gesichertem normalen Koronarstatus (koronar ohne Befund, KOB) (58,5 % Männer) und 264 Patienten mit angiographisch nachgewiesener schwerer koronaren Herzkrankheit (KHK) (85,6 % Männer) einbezogen. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen betrug das Durchschnittsalter der Blutspender  $43,2 \pm 11$  Jahre, der koronar unauffälligen Patienten  $51,3 \pm 9,6$  Jahre und der KHK-Patienten  $49,9 \pm 8$  Jahre.

Bei allen Patienten wurden sowohl klinische Auffälligkeiten (z.B. Hypertonie, Erkrankung an *Diabetes mellitus*) als auch biochemische Parameter („body mass index“ BMI, Faktoren des Lipidstoffwechsels und Fibrinolyse) registriert und für die Auswertung in der vorliegenden Arbeit zur Verfügung gestellt. Zusätzlich wurde der Raucherstatus ermittelt. In der Abbildung 9 und Tabelle 11 sind klinische und biochemische Parameter der Patienten mit KHK im Vergleich zu KOB dargestellt. In die Darstellung der biochemischen Werte sind die methodenspezifischen Referenzwerte (Normalwerte) mit einbezogen.

In der Gruppe der KHK-Patienten lag die Anzahl der Raucher deutlich höher als bei den KOB-Patienten (76 % vs. 40 %,  $p < 0,01$ ). Bezüglich der Erkrankung an Hypertonie oder *Diabetes mellitus* gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Patientengruppen (Abb. 9).



**Abb. 9:** Darstellung der klinischen Auffälligkeiten der Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) und der Patienten ohne koronaren Befund (KOB).

**Tabelle 11:** Biochemische Charakterisierung der KHK-Patienten und der KOB-Patienten im Vergleich zum methodenspezifischen Referenzbereich

biochemische Parameter	KHK	KOB	p (KHK vs. KOB)	Referenzbereich
„Body mass index“ (BMI) kg/m <sup>2</sup>	27,5 ± 4,0	27,1 ± 4,4	n.s.	< 24,9
Total-Cholesterin (mmol/l)	5,8 ± 1,3	5,4 ± 1,2	0,009	< 5,2
HDL männl. (mmol/l)	1,2 ± 0,4	1,2 ± 0,4	n.s.	> 0,9
HDL weibl. (mmol/l)	1,3 ± 0,4	1,5 ± 0,4	0,002	> 1,1
LDL (mmol/l)	3,6 ± 1,1	3,3 ± 0,9	0,03	< 3,9
Triglyceride (mmol/l)	2,3 ± 1,6	2,0 ± 1,7	0,000	< 2,3
Lp (a) (g/l)	0,31 ± 0,37	0,22 ± 0,26	0,042	< 0,2
Apo A1 männl. (g/l)	1,3 ± 0,3	1,3 ± 0,3	n.s.	0,8 - 1,75
Apo A1 weibl. (g/l)	1,4 ± 0,3	1,5 ± 0,3	0,002	0,9 - 1,9
Apo B (g/l)	1,2 ± 0,3	1,2 ± 0,3	n.s.	0,8 - 1,4
PAI (U/ml)	3,5 ± 2,5	3,5 ± 2,5	n.s.	< 3,5
Plasminogen (%)	120 ± 28	113 ± 23,4	n.s.	75 - 140
Fibrinogen (g/l)	3,8 ± 1,4	3,4 ± 1,0	0,011	1,5 - 4
Alpha-2MG (g/l)	1,9 ± 0,5	1,7 ± 0,6	n.s.	1,3 - 3

Die biochemischen Parameter der Patienten zeigten bezüglich der methodenspezifischen Referenzwerte im Durchschnitt grenzwertige Ergebnisse. Im pathogenen Bereich lag bei beiden Patienten-Gruppen der BMI mit  $27,5 \pm 4,0$  kg/m<sup>2</sup> bei KHK-Patienten und  $27,1 \pm 4,4$  bei KOB-Patienten (Referenz: < 24,9 kg/m<sup>2</sup>). Trotz der Behandlung der Patienten mit lipidsenkenden Medikamenten wiesen beide Patienten-Gruppen erhöhte Total-Cholesterin-Werte auf, wobei bei Patienten mit angiographisch gesicherter koronarer Herzerkrankung der Wert signifikant höher lag als bei Patienten mit glatten Koronargefäßen ( $5,8 \pm 1,3$  vs.  $5,4 \pm 1,2$  mmol/l;  $p < 0,01$ ). Auch andere atherogen wirkende Faktoren des Lipidstoffwechsels lagen bei den KHK-Patienten signifikant höher als bei den KOB-Patienten (LDL, Triglyceride, Lp (a);  $p < 0,05$ ). Im Unterschied zu männlichen Patienten, bei welchen die Apo A1-Werte in beiden Patienten-Gruppen vergleichbar waren (je  $1,3 \pm 0,3$  g/l), zeigten die weiblichen Patienten signifikante Unterschiede (KHK:  $1,4 \pm 0,3$  g/l, KOB:  $1,5 \pm 0,3$  g/l,  $p < 0,003$ ). Das protektiv wirkende HDL war bei den weiblichen Patienten ohne koronaren Befund signifikant höher als bei den weiblichen Patienten mit koronarer Herzerkrankung ( $p < 0,003$ ). Bei Männern gab es bezüglich der HDL-Werte keine Unterschiede. Der Gerinnungsparameter Fibrinogen lag bei den KHK-Patienten signifikant höher als bei den KOB-Patienten ( $p < 0,02$ ). Alle weiteren untersuchten Parameter zeigten keine signifikanten Verteilungsunterschiede (Tab. 11).

### 3.1.1. KHK-Patienten - klinische Charakterisierung in Bezug auf Manifestationsalter, Verlauf und Schwere des Myokardinfarkts

Bei den untersuchten KHK-Patienten variierte das Alter des ersten Myokardinfarkts (MI) von 29 bis 74 Jahre und betrug im Durchschnitt  $49,3 \pm 8,1$  Jahre. 117 der KHK-Patienten hatten ihren ersten MI bereits vor dem 46. Lebensjahr ( $\leq 45$  Jahre) und 147 erst im höheren Lebensalter ( $> 45$  Jahre). Bei 27 % der Patienten war ein erneuter Infarkt zu verzeichnen. Die KHK-Patienten zeigten eine unterschiedlich gute Adaptation an das koronare Ereignis, die durch die Dauer der bisherigen Überlebenszeit nach MI gekennzeichnet werden konnte. Von den 264 KHK-Patienten befanden sich 170 zum Zeitpunkt der Untersuchungen im ersten Jahr nach dem 1. MI. Die bisherige Überlebenszeit dieser Hochrisikogruppe (HR) betrug im Durchschnitt 2,8 Monate und variierte von 1 Woche bis zu 11 Monaten. 94 Patienten, die den MI bereits länger als ein Jahr überlebten, wurden in der Gruppe der Langzeitüberlebenden (LZ) zusammengefasst. Diese Patienten hatten ihren ersten MI im Durchschnitt 7,1 Jahre überlebt, wobei die Überlebenszeit von 1,8 Jahren bis zu 22 Jahren variierte. Entsprechend der Schwere des koronaren Ereignisses, welche sich in der Anzahl der durch Stenosen betroffenen koronaren Hauptgefäße äußerte, erfolgte eine Einteilung der KHK-Patienten in Ein-, Zwei- und Mehrgefäßerkrankung (Ein-, Zwei-, Mehr-GE). In der vorliegenden Studie wurden insgesamt 62 Patienten mit Ein-, 57 Patienten mit Zwei- und 136 mit Mehr-GE ausgewertet. In der Tabelle 12 wurden die untersuchten KHK-Subgruppen charakterisiert.

**Tabelle 12:** Charakterisierung der KHK-Subgruppen

	<b>KHK, n = 264</b>
Alter (Jahre)	$50 \pm 8,0$
Alter bei 1. MI (Jahre)	$49,3 \pm 8,1$
$\leq 45$ Jahre (%)	44,3
$> 45$ Jahre (%)	55,7
Überleben nach 1. MI	
Hochrisikogruppe, HR (%)	64,6
Langzeitüberlebende, LZ (%)	35,4
Schwere des koronaren Ereignisses	
Eingefäßerkrankung (%)	24,3
Zweigefäßerkrankung (%)	22,3
Mehrgefäßerkrankung (%)	53,4
Behandlung nach koronarem Ereignis	
Perkutane transluminale koronare Angioplastie, PTCA (%)	49,2
Aorto-koronarer Venenbypass, ACVB(%)	23,1

Unter Berücksichtigung des Manifestationsalters (Alter bei 1. MI:  $\leq 45$  Jahre vs.  $> 45$  Jahre) sowie der bisherigen Überlebenszeit (HR vs. LZ-Gruppe) erfolgte bei den KHK-Patienten eine differenzierte Charakterisierung bezüglich der klinischen und biochemischen Daten. Signifikante Unterschiede ergaben sich bezüglich des Durchschnittsalters der Patienten bei Eingang in die Studie, sowie der Reinfarkt-Häufigkeit. Patienten mit einer besseren Adaptation nach koronarem Ereignis (Gruppe der Langzeitüberlebenden) waren im Durchschnitt 5,3 Jahre älter bei der klinischen Manifestation der koronaren Herzkrankheit und hatten zu 60 % einen Reinfarkt erlitten (Tab. 13).

**Tabelle 13:** Biochemische und klinische Charakterisierung der KHK-Patienten unter Berücksichtigung des Manifestationsalters bei 1.MI (Alter beim 1. MI:  $\leq 45$  Jahre vs.  $> 45$  Jahre), sowie der Überlebenszeit nach einem MI (HR = Hochrisikogruppe vs. LZ = Langzeitüberlebenden).

	KHK-Patienten, n=264					
	Alter bei 1. MI			Überleben nach 1. MI		
	$\leq 45$ Jahre n = 117	$> 45$ Jahre n = 147	p	HR n = 170	LZ n = 94	p
Alter bei Eingang in die Studie (Jahre)	44,7 $\pm$ 7	54,2 $\pm$ 6,2	<b>&lt; 0,001</b>	47,7 $\pm$ 7,7	53,9 $\pm$ 6,8	<b>&lt; 0,001</b>
Alter bei 1. MI (Jahre)	40,7 $\pm$ 4,4	52,0 $\pm$ 5,6	<b>&lt; 0,001</b>	47,3 $\pm$ 4,8	46,6 $\pm$ 7,5	n.s.
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27,5 $\pm$ 4,1	27,5 $\pm$ 3,8	n.s.	27,5 $\pm$ 3,9	27,6 $\pm$ 3,9	n.s.
T-CHOL (mmol/l)	5,7 $\pm$ 1,3	5,7 $\pm$ 1,2	n.s.	5,6 $\pm$ 1,2	5,9 $\pm$ 1,4	n.s.
HDL (mmol/l)	1,2 $\pm$ 0,3	1,2 $\pm$ 0,4	n.s.	1,2 $\pm$ 0,36	1,2 $\pm$ 0,4	n.s.
LDL (mmol/l)	3,53 $\pm$ 1,2	3,5 $\pm$ 1	n.s.	3,5 $\pm$ 1	3,6 $\pm$ 1,2	n.s.
Triglyzeride (mmol/l)	2,2 $\pm$ 1,6	2,2 $\pm$ 1,5	n.s.	2,1 $\pm$ 1,2	2,3 $\pm$ 1,9	n.s.
Lp (a) (g/l)	0,36 $\pm$ 0,4	0,32 $\pm$ 0,36	n.s.	0,34 $\pm$ 0,38	0,33 $\pm$ 0,4	n.s.
Apo A1 (g/l)	1,3 $\pm$ 0,3	1,3 $\pm$ 0,2	n.s.	1,3 $\pm$ 0,2	1,3 $\pm$ 0,3	n.s.
Apo B (g/l)	1,2 $\pm$ 0,3	1,2 $\pm$ 0,3	n.s.	1,2 $\pm$ 0,3	1,2 $\pm$ 0,3	n.s.
PAI (U/ml)	3,5 $\pm$ 2,7	3,4 $\pm$ 2,4	n.s.	3,3 $\pm$ 2,6	3,6 $\pm$ 2,4	n.s.
Plasminogen (%)	118,7 $\pm$ 25,8	113,7 $\pm$ 26,1	n.s.	115,3 $\pm$ 24,8	117 $\pm$ 28,6	n.s.
Fibrinogen (g/l)	3,7 $\pm$ 1,4	3,8 $\pm$ 1,4	n.s.	3,8 $\pm$ 1,6	3,5 $\pm$ 0,9	n.s.
alpha-2MG (g/l)	2,5 $\pm$ 0,5	1,6 $\pm$ 0,5	n.s.	1,5 $\pm$ 0,5	2,9 $\pm$ 0,5	n.s.
Geschlecht männlich (%)	87,2	84,4	n.s.	73,3	87,5	n.s.
Hypertonie (%)	44,4	48,6	n.s.	46,5	46,5	n.s.
Diabetes Mellitus (%)	14,3	20,6	n.s.	13,9	22,9	n.s.
Reinfarkte (%)	33	22,4	n.s.	8	60	<b>&lt; 0,001</b>

Eine weitere Differenzierung der KHK-Patienten erfolgte unter Einbeziehung der Anzahl der durch Stenosen veränderten KoronargefäÙe in Ein-, Zwei- und Mehr-GE (Tab. 14).

Bezüglich der klinischen Daten konnten signifikante Veränderungen zwischen den Subgruppen (Ein-, Zwei- und Mehr-GE) analysiert werden: Beim Vergleich der Parameter des Lipidstoffwechsels wurden signifikante Unterschiede bezüglich des HDL- ( $p < 0,03$ ), des Lp (a)- ( $p < 0,05$ ) und des Apo A1-Wertes ( $p < 0,04$ ) ermittelt. In der Gruppe der Patienten mit EingefäÙerkrankungen wurden die höchsten Werte des protektiv wirkenden HDL gemessen. Beim atherogenen Lp (a) wurde die höchste Konzentration bei Patienten mit MehrgefäÙerkrankungen gefunden. Die Werte der Patienten mit Ein- und Zwei-GE waren signifikant niedriger, jedoch gegenüber dem Referenzbereich ebenfalls erhöht. Im Unterschied zu Patienten mit Zwei- oder MehrgefäÙerkrankung zeigten die Patienten mit Ein-GE signifikant erhöhte Apo A1-Werte. Verglichen mit den Referenzwerten lagen aber diese Werte im mittleren Referenzbereich. Die Werte des Gerinnungsparameters Fibrinogen, sowie des  $\alpha 2$ -Makroglobulins stiegen mit der Anzahl der durch Atherosklerose betroffenen KoronargefäÙe: die Patienten mit mehreren betroffenen KoronargefäÙen zeigten bezüglich des Fibrinogens ( $p < 0,02$ ) und  $\alpha 2$ -Makroglobulins ( $p < 0,003$ ) signifikant höhere Durchschnittswerte als die Patienten mit Ein- oder Zwei-GE. Der Anteil an Patienten mit *Diabetes mellitus* war auch in der Gruppe der Patienten mit Mehr-GE verglichen mit Ein- und Zwei-GE deutlich erhöht (23 % bei Mehr-GE vs. 14,9 % bei Zwei-GE und 10,2 % bei Ein-GE; n.s.). Alle weiteren untersuchten Parameter zeigten keine signifikanten Verteilungsunterschiede zwischen den gebildeten Subgruppen (Tab. 14).

**Tabelle 14:** Klinische und paraklinische Beurteilung der KHK-Patienten unter Einbeziehung der Schwere des koronaren Ereignisses (Ein-, Zwei- und Mehr-GE); GE: Gefäßerkrankung.

	Myokardinfarkt-Patienten			
	Ein-GE n = 62	Zwei-GE n = 57	Mehr-GE n = 136	p
Alter bei Eingang in die Studie (Jahre)	50,6 ± 4,7	53 ± 5,3	52,6 ± 7,8	n.s.
Alter bei 1. MI (Jahre)	45,7 ± 9,9	46,1 ± 12	47,1 ± 7,2	n.s.
„Body mass index“ (BMI) (kg/m <sup>2</sup> )	27,4 ± 3,5	28 ± 3,9	27,1 ± 4,1	n.s.
Total-Cholesterin (mmol/l)	5,6 ± 1,3	5,8 ± 1,3	5,7 ± 1,2	n.s.
HDL (mmol/l)	1,3 ± 0,4	1,1 ± 0,3	1,2 ± 0,4	<b>0,026</b>
LDL (mmol/l)	3,3 ± 1,1	3,6 ± 1,3	3,6 ± 1,1	n.s.
Triglyceride (mmol/l)	2,1 ± 1,5	2,5 ± 1,9	2,1 ± 1,4	n.s.
Lp (a) (g/l)	0,31 ± 0,39	0,27 ± 0,28	0,38 ± 0,39	<b>0,047</b>
Apo A 1 (g/l)	1,4 ± 0,2	1,3 ± 0,2	1,3 ± 0,3	<b>0,03</b>
Apo B (g/l)	1,2 ± 0,3	1,2 ± 0,3	1,2 ± 0,3	n.s.
PAI (U/ml)	3,5 ± 2,2	3,8 ± 2,3	3,3 ± 2,6	n.s.
Plasminogen (%)	117,5 ± 23,7	117,2 ± 23,2	115,6 ± 29,7	n.s.
Fibrinogen (g/l)	3,6 ± 1,5	3,8 ± 1,5	3,9 ± 1,3	<b>0,01</b>
Alpha – 2MG (g/l)	1,5 ± 0,4	1,6 ± 0,4	2,4 ± 9,2	<b>0,002</b>
Geschlecht männlich (%)	78,6	90	86,7	n.s.
Raucher (%)	69,2	77,5	80	n.s.
Hypertonie (%)	42,3	45,1	49,4	n.s.
Diabetes mellitus (%)	10,2	14,9	23	n.s.
Reinfarkte (%)	17,9	14,3	28,1	n.s.

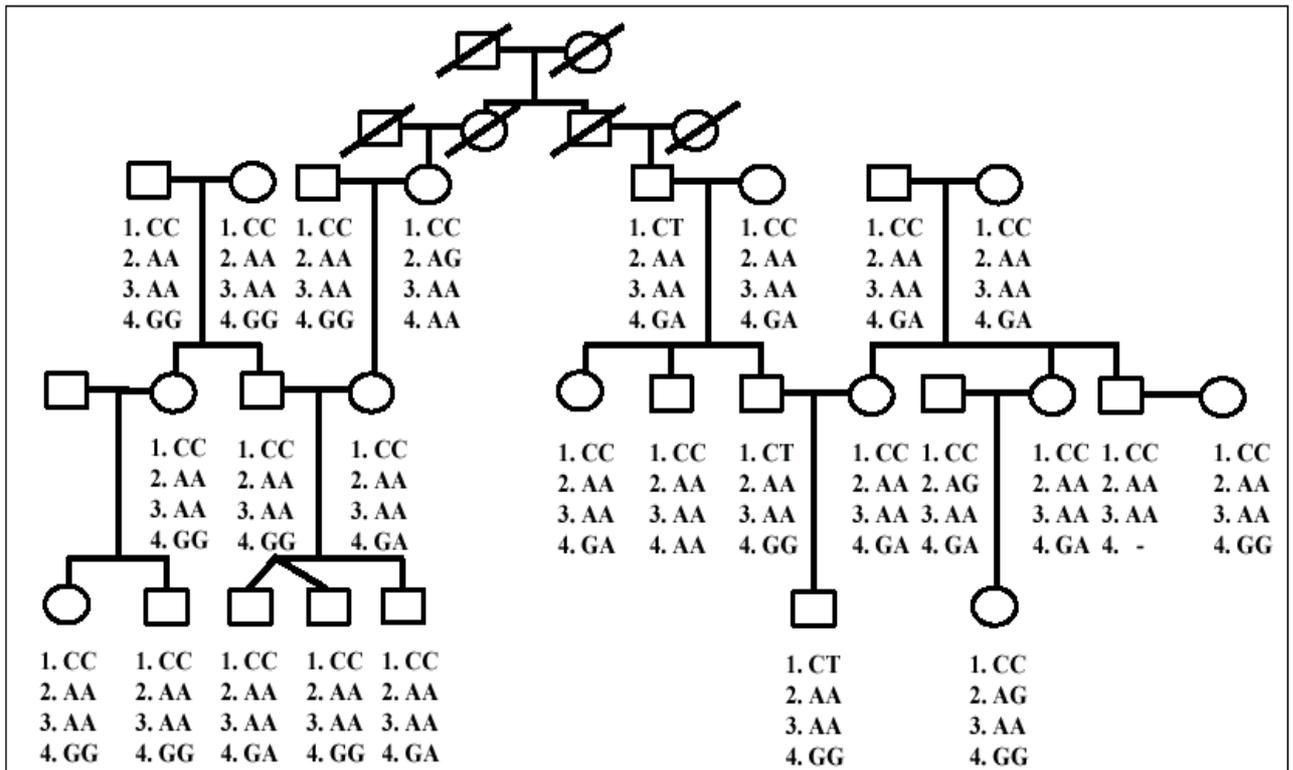
### 3.2. Genetische Untersuchungen

#### 3.2.1. „Mutationsscreening“ im TNF $\alpha$ - und TNF $\beta$ -Gen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Gene TNF $\alpha$  und TNF $\beta$  nach genomischen Veränderungen untersucht. Sowohl die Exonbereiche als auch die Intronsequenzen bzw. die Promotorbereiche wurden in die Untersuchung mit einbezogen.

Es wurden 4 bisher nicht beschriebene Polymorphismen in den Genen TNF $\alpha$  und TNF $\beta$  identifiziert: 1. Im Exon 3 des TNF $\alpha$ -Gens konnte eine Transition des Cytosins nach Thymin an der cDNA-Position 430 gefunden werden, die zu einem Pro84Leu-Austausch führt (P84L); 2. Im Intron 3 des TNF $\alpha$ -Gens wurde eine Transition des Adenins nach Guanin (IVS3+51A>G) detektiert; 3. In der Promotorregion des TNF $\beta$ -Gens wurde eine Transition von Adenin nach Guanin (c.1-729A>G) gefunden; 4. Im Exon 1 (5'-UTR) des TNF $\beta$ -Gens wurde eine Transition von Guanin nach Adenin (c.7G>A) identifiziert.

Die 4 neu ermittelten polymorphen Varianten der Gene TNF $\alpha$  und TNF $\beta$  wurden an einem Stammbaum bezüglich ihres Erbganges untersucht. In Abbildung 10 ist der untersuchte Stammbaum und die dazu ermittelten Genotypen dargestellt.



**Abb. 10:** Stammbaum-Analyse der erstmalig beschriebenen Polymorphismen in den Genen TNF $\alpha$  und TNF $\beta$  (1.: TNF $\alpha$  P84L; 2.: TNF $\alpha$  IVS3+51A>G; 3.: TNF $\beta$  c.1-729A>G; 4.: TNF $\beta$  c.7G>A).

Für beide Polymorphismen des TNF $\alpha$ -Gens (P84L, IVS3+51A>G) und einen Polymorphismus des TNF $\beta$ -Gens (c.7G>A) konnte ein Erbgang nach Mendel nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung des relativ selten vorkommenden Promotorpolymorphismus im TNF $\beta$ -Gen (c.1-729A>G) wurde für alle analysierten Probanden des Stammbaums der homozygote Wildtyp AA nachgewiesen.

### 3.2.2. Charakterisierung und Genotypisierung von Polymorphismen der 6 ausgewählten Kandidatengene für koronare Atherosklerose (TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , FGF-2, HSPG-2, MTHFR und NOS-3)

Für die Beurteilung der Risikokonstellation bei der Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen wurden neben den 4 im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmalig beschriebenen Polymorphismen der Gene TNF $\alpha$  und TNF $\beta$  die 12 bereits bekannten Polymorphismen von TNF $\alpha$  und TNF $\beta$  und 4 Polymorphismen weiterer 4 Kandidatengene der Atherosklerose (FGF-2, HSPG-2, NOS-3 und MTHFR) herangezogen. In der Tabelle 15 sind alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten 20 Polymorphismen zusammengefasst und genetisch charakterisiert.

**Tabelle 15:** Genetische Charakterisierung der in der vorliegenden Arbeit untersuchten polymorphen Varianten der Gene TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , FGF-2, HSPG-2, NOS-3 und MTHFR (*Acc. Nr.:* *Accession Number*).

Gen/ Acc. Nr.	Polymorphismen- Nomenklatur	Position	cDNA-Position/ Basenaustausch	Veränderung/ Bedeutung	Autor
TNF $\alpha$ / Z15026	c.1-863C>A	Promotor	-	Transversion	Ugialoro et al., 1998
	c.1-857C>T	Promotor	-	Transition	Herrmann et al., 1998
	c.1-572A>C	Promotor	-	Transversion	Ugialoro et al., 1998
	c.1-376G>A	Promotor	-	Transition	Hamann et al., 1995
	c.1-308G>A	Promotor	-	Transition	Wilson et al., 1992
	c.1-244G>A	Promotor	-	Transition	Zimmerman et al., 1996
	c.1-238G>A	Promotor	-	Transition	D'Alfonso et al., 1994
	P84L	Exon 3	430 / C>T	Transition/ missense	Vorliegende Arbeit
TNF $\beta$ / Z15026	IVS3+51A>G	Intron 3	-	Transition	Vorliegende Arbeit
	c.1-729A>G	Promotor	-	Transition	Vorliegende Arbeit
	c.7G>A	Exon 1	5'-UTR	Transition	Vorliegende Arbeit
	IVS1+90A>G	Intron 1	-	Transition	Badenhoop et al., 1989
	IVS1+206G>C	Intron 1	-	Transversion	Ferencik et al., 1992
	IVS1-13_12dupTC	Intron 1	-	Duplikation	Fanning et al., 1997
	C13R	Exon 2	205 / T>C	Transition/ missense	Fanning et al., 1997
FGF-2/ Y13468	T60N	Exon 3	347 / C>A	Transversion/ missense	Messer et al., 1991
	c.223C>T	Exon 1	5'-UTR	Transition	Handschug et al., 1998
HSPG-2/ AL445798	IVS6-86G>T (entspricht BamHI-PM)	Intron 6	-	Transversion	Kallunki et al., 1991
NOS-3/ D26607	E298D	Exon 7	894 / G>T	Transversion/ missense	Yoshimura et al., 1998
MTHFR/ G67549	A222V	Exon 3	677 / C>T	Transition/ missense	Frosst et al., 1995

Nach der Genotypisierung der Probanden wurde festgestellt, dass 4 Polymorphismen im TNF $\alpha$ -Gen (c.1-572A>C, c.1-376G>A, c.1-244G>A und P84L) und 1 Polymorphismus im TNF $\beta$ -Gen (c.1-729A>G) mit einer Häufigkeit von weniger als 1 % vorkommen. Wegen des seltenen Vorkommens wurden diese 5 polymorphe Varianten nicht in weitere Assoziationsuntersuchungen einbezogen.

Die anderen 15 Polymorphismen wurden nach der Genotypisierung der Probanden überprüft, ob deren Genotyp- und Allelverteilung in den einzelnen Probandengruppen LBS, KOB und KHK einer Normalverteilung entsprach (Hardy-Weinberg-Gleichgewicht) und einer Geschlechts- oder Altersabhängigkeit unterlag. Die Ergebnisse der Genotypisierung sind in der Tabelle 16 zusammengefasst.

**Tabelle 16:** Genotypisierung der Probandengruppen LBS, KOB und KHK; Ermittlung der Alters- und Geschlechtsabhängigkeit der untersuchten Polymorphismen; Test auf Normalverteilung (Hardy-Weinberg-Gleichgewicht).

Polymorphismus/ Nomenklatur, Gen	Genotypisierte Probanden (n)	Genotyp- Häufigkeit (%)	Allel- frequenz	Geschlecht			Alter p	Hardy- Weinberg
				m	w	p		
<b>c.1-863C&gt;A, TNF<math>\alpha</math></b>	LBS N=91	CC: 68,1 CA: 27,5 AA: 4,4	C: 81,8 A: 18,2	CC: 67,7 CA: 26,2 AA: 6,2	CC: 69,2 CA: 30,8 AA: -	n.s.	n.s.	>0,5
	KOB N=107	CC: 69,2 CA: 29,0 AA: 1,9	C: 83,7 A: 16,3	CC: 72,5 CA: 24,6 AA: 2,9	CC: 63,2 CA: 36,8 AA: -	n.s.	n.s.	>0,5
	KHK N=87	CC: 81,6 CA: 14,9 AA: 3,4	C: 89,1 A: 10,9	CC: 80,6 CA: 16,1 AA: 3,2	CC: 84,0 CA: 12,0 AA: 4,0	n.s.	n.s.	>0,5
<b>c.1-857C&gt;T, TNF<math>\alpha</math></b>	LBS N=91	CC: 77,2 CT: 20,6 TT: 2,2	C: 87,5 T: 12,5	CC: 81,5 CT: 15,9 TT: 2,6	CC: 68,8 CT: 29,9 TT: 1,3	<b>&lt;0,05</b>	n.s.	>0,9
	KOB N=107	CC: 79,7 CT: 18,6 TT: 1,7	C: 89,0 T: 11,0	CC: 81,2 CT: 17,4 TT: 1,4	CC: 89,5 CT: 10,5 TT: -	n.s.	n.s.	>0,9
	KHK N=87	CC: 73,6 CT: 24,1 TT: 2,3	C: 85,7 T: 14,3	CC: 72,6 CT: 24,2 TT: 3,2	CC: 76,0 CT: 24,0 TT: -	n.s.	n.s.	>0,9
<b>c.1-308G&gt;A, TNF<math>\alpha</math></b>	LBS N=89	GG: 79,8 GA: 19,1 AA: 1,1	G: 89,4 A: 10,6	GG: 79,7 GA: 18,8 AA: 1,6	GG: 80,0 GA: 20,0 AA: -	n.s.	n.s.	>0,9
	KOB N=115	GG: 72,2 GA: 27,0 AA: 0,9	G: 85,7 A: 14,3	GG: 76,6 GA: 23,4 AA: -	GG: 63,2 GA: 34,2 AA: 2,6	n.s.	n.s.	>0,9
	KHK N=102	GG: 67,6 GA: 26,5 AA: 5,9	G: 80,9 A: 19,1	GG: 70,0 GA: 25,7 AA: 4,3	GG: 62,5 GA: 28,1 AA: 9,4	n.s.	n.s.	>0,9
<b>c.1-238G&gt;A, TNF<math>\alpha</math></b>	LBS N=232	GG: 90,5 GA: 9,1 AA: 0,4	G: 95,1 A: 4,9	GG: 87,4 GA: 11,9 AA: 0,7	GG: 96,3 GA: 3,7 AA: -	n.s.	n.s.	>0,9
	KOB N=122	GG: 88,0 GA: 12,0 AA: -	G: 94,0 A: 6,0	GG: 88,9 GA: 11,1 AA: -	GG: 86,3 GA: 13,7 AA: -	n.s.	n.s.	>0,9
	KHK N=171	GG: 91,0 GA: 9,0 AA: -	G: 95,5 A: 4,5	GG: 91,4 GA: 8,6 AA: -	GG: 93,3 GA: 6,7 AA: -	n.s.	n.s.	>0,9
<b>IVS3+51A&gt;G, TNF<math>\alpha</math></b>	LBS N=282	AA: 82,9 AG: 17,0 GG: 1,1	A: 91,4 G: 8,6	AA: 81,3 AG: 17,1 GG: 1,6	AA: 83,2 AG: 16,8 GG: -	n.s.	n.s.	>0,9
	KOB N=134	AA: 79,1 AG: 20,1 GG: 0,7	A: 89,2 G: 10,8	AA: 78,5 AG: 21,5 GG: -	AA: 80,0 AG: 18,2 GG: 1,8	n.s.	n.s.	>0,9
	KHK N=243	AA: 83,5 AG: 16,0 GG: 0,4	A: 91,5 G: 8,5	AA: 82,8 AG: 16,7 GG: 0,5	AA: 87,2 AG: 12,8 GG: -	n.s.	n.s.	>0,9
<b>c.7G&gt;A, TNFB</b>	LBS N=207	GG: 53,9 GA: 39,6 AA: 6,8	G: 73,7 A: 26,3	GG: 51,0 GA: 42,0 AA: 7,0	GG: 59,4 GA: 34,4 AA: 6,3	n.s.	n.s.	>0,9
	KOB N=117	GG: 45,3 GA: 47,0 AA: 7,7	G: 68,8 A: 31,2	GG: 44,1 GA: 51,5 AA: 4,4	GG: 46,9 GA: 40,8 AA: 12,2	n.s.	n.s.	>0,9
	KHK N=292	GG: 46,1 GA: 40,6 AA: 13,3	G: 66,4 A: 33,6	GG: 46,4 GA: 40,3 AA: 13,3	GG: 45,5 GA: 40,9 AA: 13,6	n.s.	n.s.	>0,9
<b>IVS1+90A&gt;G, TNFB</b>	LBS N=304	AA: 51,0 AG: 39,5 GG: 9,5	A: 70,8 G: 29,2	AA: 48,5 AG: 41,7 GG: 9,8	AA: 56,0 AG: 35,0 GG: 9,0	n.s.	n.s.	>0,9
	KOB N=117	AA: 44,4 AG: 46,2 GG: 9,4	A: 67,5 G: 32,5	AA: 41,5 AG: 52,3 GG: 6,2	AA: 48,1 AG: 38,5 GG: 13,5	n.s.	n.s.	>0,9
	KHK N=294	AA: 46,3 AG: 41,2 GG: 12,6	A: 66,9 G: 33,1	AA: 46,2 AG: 41,4 GG: 12,4	AA: 45,5 AG: 40,9 GG: 13,6	n.s.	n.s.	>0,9
<b>IVS1+206G&gt;C, TNFB</b>	LBS N=259	GG: 34,0 GC: 48,6 CC: 17,4	G: 58,3 C: 41,7	GG: 37,4 GC: 45,0 CC: 17,5	GG: 27,3 GC: 55,7 CC: 17,0	n.s.	n.s.	>0,9

### 3. Ergebnisse

	KOB N=39	GG: 46,2 GC: 33,3 CC: 20,5	G: 62,9 C: 37,1	GG: 42,9 GC: 47,6 CC: 9,5	GG: 50,0 GC: 16,7 CC: 33,3	n.s.	n.s.	>0,9
	KHK N=186	GG: 38,2 GC: 45,2 CC: 16,7	G: 60,8 C: 39,2	GG: 39,6 GC: 43,4 CC: 17,0	GG: 30,8 GC: 53,8 CC: 15,4	n.s.	n.s.	>0,9
<b>IVS1-13_12dupTC, TNFB</b>	LBS N=313	9/9(TC): 51,4 9/10(TC): 38,3 10/10(TC): 10,2	9(TC): 70,6 10(TC): 29,4	50,0 38,2 11,8	54,5 38,6 6,9	n.s.	n.s.	>0,9
	KOB N=25	9/9(TC): 48 9/10(TC): 48 10/10(TC): 4	9(TC): 72,0 10(TC): 28,0	38,5 61,5 -	58,3 33,3 8,3	n.s.	n.s.	>0,9
	KHK N=203	9/9(TC): 50,7 9/10(TC): 41,4 10/10(TC): 7,9	9(TC): 71,4 10(TC): 28,6	49,1 42,1 8,8	59,4 37,5 3,1	n.s.	n.s.	>0,9
<b>C13R, TNFB</b>	LBS N=291	TT: 52,9 TC: 38,1 CC: 8,9	T: 72,0 C: 28,0	TT: 50,5 TC: 39,9 CC: 9,6	TT: 57,3 TC: 35,0 CC: 7,8	n.s.	n.s.	>0,8
	KOB N=111	TT: 42,3 TC: 51,4 CC: 6,3	T: 68,0 C: 32,0	TT: 42,6 TC: 52,9 CC: 4,4	TT: 41,9 TC: 48,8 CC: 9,3	n.s.	n.s.	>0,8
	KHK N=231	TT: 51,5 TC: 41,1 CC: 7,4	T: 72,1 C: 27,9	TT: 50,5 TC: 41,8 CC: 7,7	TT: 56,8 TC: 37,8 CC: 5,4	n.s.	n.s.	>0,8
<b>T60N, TNFB</b>	LBS N=252	CC: 51,6 CA: 36,5 AA: 11,9	C: 69,9 A: 30,1	CC: 50,0 CA: 36,3 AA: 13,8	CC: 54,3 CA: 37,0 AA: 8,7	n.s.	n.s.	>0,5
	KOB N=113	CC: 44,2 CA: 46 AA: 9,7	C: 67,2 A: 32,8	CC: 48,5 CA: 47,1 AA: 4,4	CC: 37,8 CA: 44,4 AA: 17,8	<0,05	n.s.	>0,5
	KHK N=224	CC: 50,4 CA: 34,8 AA: 14,7	C: 67,8 A: 32,2	CC: 51,6 CA: 34,6 AA: 13,8	CC: 44,4 CA: 36,1 AA: 19,4	n.s.	n.s.	>0,5
<b>c.223C&gt;T, FGF-2</b>	LBS N=385	CC: 84,1 CT: 15,2 TT: 0,2	C: 91,7 T: 8,3	CC: 83,0 CT: 15,0 TT: 2,0	CC: 87,1 CT: 12,9 TT: -	n.s.	n.s.	>0,9
	KOB N=118	CC: 84,3 CT: 15 TT: 0,7	C: 91,8 T: 8,2	CC: 86,6 CT: 12,2 TT: 1,2	CC: 81,0 CT: 19,0 TT: -	n.s.	n.s.	>0,9
	KHK N=298	CC: 83,2 CT: 15,7 TT: 1,1	C: 91,1 T: 8,9	CC: 81,8 CT: 16,9 TT: 1,3	CC: 90,9 CT: 9,1 TT: -	n.s.	n.s.	>0,9
<b>IVS6-86G&gt;T, HSPG-2</b>	LBS N=300	GG: 63,7 GT: 29,3 TT: 7,0	G: 78,4 T: 21,6	GG: 61,2 GT: 30,6 TT: 8,2	GG: 68,9 GT: 26,2 TT: 4,9	n.s.	n.s.	>0,9
	KOB N=126	GG: 59,5 GT: 36,5 TT: 4	G: 77,8 T: 22,2	GG: 56,9 GT: 40,3 TT: 2,8	GG: 63,0 GT: 31,5 TT: 5,6	n.s.	n.s.	>0,9
	KHK N=227	GG: 61,7 GT: 36,6 TT: 1,8	G: 80,0 T: 20,0	GG: 63,7 GT: 34,7 TT: 1,6	GG: 48,6 GT: 48,6 TT: 2,9	n.s.	n.s.	>0,9
<b>E298D, NOS-3</b>	LBS N=155	GG: 42,6 GT: 47,1 TT: 10,3	G: 66,2 T: 33,8	GG: 41,4 GT: 48,5 TT: 10,1	GG: 44,6 GT: 44,6 TT: 10,8	n.s.	n.s.	>0,7
	KOB N=32	GG: 28,1 GT: 65,7 TT: 6,2	G: 60,9 T: 39,1	GG: 31,2 GT: 62,5 TT: 6,3	GG: 24,9 GT: 68,8 TT: 6,3	n.s.	n.s.	>0,7
	KHK N=83	GG: 37,4 GT: 56 TT: 6,6	G: 65,4 T: 34,6	GG: 36,0 GT: 56,0 TT: 8	GG: 43,8 GT: 56,2 TT: -	n.s.	n.s.	>0,8
<b>A222V, MTHFR</b>	LBS N=162	CC: 40,1 CT: 46,3 TT: 13,6	C: 63,3 T: 36,7	CC: 43,3 CT: 43,3 TT: 13,4	CC: 34,5 CT: 51,7 TT: 13,8	n.s.	n.s.	>0,7
	KOB N=135	CC: 39,0 CT: 52,3 TT: 8,7	C: 65,2 T: 34,8	CC: 44,3 CT: 39,2 TT: 16,5	CC: 35,7 CT: 58,9 TT: 5,4	n.s.	n.s.	>0,8
	KHK N=264	CC: 40,7 CT: 47,4 TT: 11,9	C: 64,4 T: 35,6	CC: 38,9 CT: 52,4 TT: 8,7	CC: 38,8 CT: 53,1 TT: 8,1	n.s.	n.s.	>0,7

Alle 15 untersuchten Polymorphismen entsprachen in jeder Probandengruppe LBS, KOB und KHK dem Populationsgleichgewicht (Hardy-Weinberg, > 0,5). Bis auf 2 Ausnahmen (c.1-857C>T-Polymorphismus

des TNF $\alpha$ -Gens in der LBS-Gruppe und T60N-Polymorphismus des TNF $\beta$ -Gens in der KOB-Gruppe,  $p < 0,05$ ) zeigten alle Polymorphismen in den einzelnen Probandengruppen eine vom Geschlecht und Alter unabhängige Genotypverteilung (Tab. 16). Da sowohl in den beiden Patienten-Gruppen KHK und KOB als auch in der Gruppe der LBS der größere Teil der Probanden männlichen Geschlechts war, wurden deshalb für die 2 Polymorphismen c.1-857C>T und T60N nur die Männer in die Assoziationsstudie herangezogen.

#### **3.2.3. Assoziation der Ergebnisse der Genotypisierung mit den klinischen und paraklinischen Parametern der Probanden**

Mittels deskriptiver Statistik wurden die Genotyp- und Allelverteilungen der 5 TNF $\alpha$ -Polymorphismen (c.1-863C>A, c.1-857C>T, c.1-308G>A, c.1-238G>A und IVS3+51A>G), der 6 TNF $\beta$ -Polymorphismen (IVS1+90A>G, IVS1+206G>C, IVS1-13\_12dupTC, C13R, T60N und c.7G>A) und der 4 bekannten polymorphen Varianten der weiteren Kandidatengene der Atherosklerose (FGF-2: c.223C>T; HSPG-2: IVS6-86G>T; NOS-3: E298D und MTHFR: A222V) in den Probandengruppen LBS, KOB und KHK analysiert und verglichen.

Für die Ermittlung der Rolle einzelner Polymorphismen in der Atherosklerose wurde sowohl ein dominantes als auch ein kodominantes und rezessives genetisches Modell getestet und die genetische Risikokonstellation in den Patientengruppen abhängig von klassischen Risikofaktoren wie Hypertonie, *Diabetes mellitus* oder Rauchen bzw. von biochemischen Risikoparametern wie BMI, Lp (a), HDL, LDL, Triglyceride, Cholesterin, PAI, Plasminogen oder Fibrinogen ermittelt. Bei KHK-Patienten wurden in die Auswertungen zusätzlich Manifestationsalter (1.MI  $\leq$  45 Jahre oder  $>$  45 Jahre bzw. 1.MI  $\leq$  40 Jahre oder  $>$  40 Jahre), Verlauf der koronaren Herzkrankheit (Hochrisikopatienten: ÜL nach 1.MI  $\leq$  1Jahr; Langzeitüberlebende: ÜL nach 1. MI  $>$  1Jahr) und Schwere der Gefäßerkrankung (Ein-, Zwei- oder Mehr-GE) einbezogen.

##### **3.2.3.1. TNF $\alpha$ -Gen**

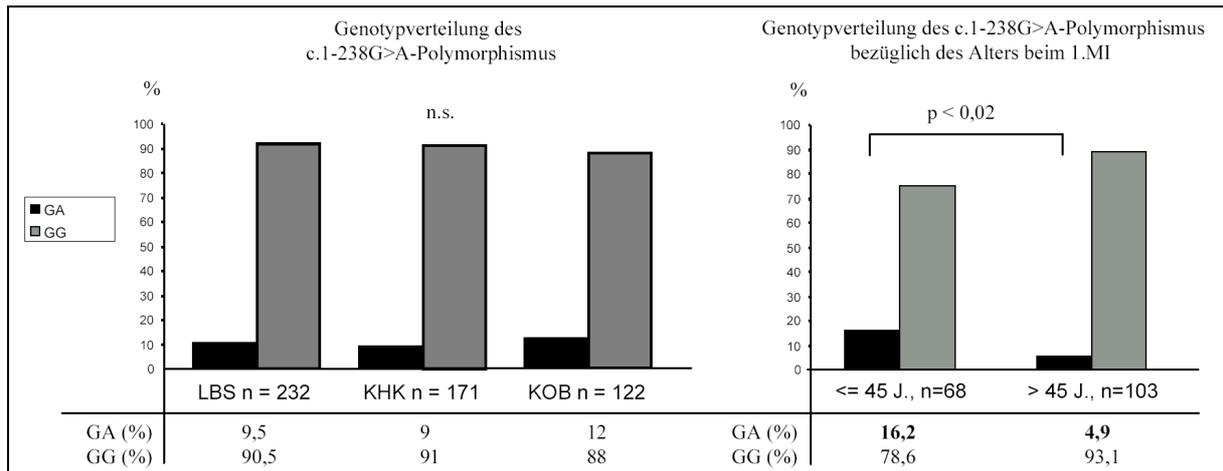
Bei der Untersuchung der Genotypverteilungen der 5 TNF $\alpha$ -Polymorphismen (siehe Tab. 16) in den Vergleichsgruppen LBS, KOB und KHK konnte für die 3 Promotorpolymorphismen c.1-238G>A, c.1-308G>A und c.1-863C>A bzw. den neu identifizierten IVS3+51A>G-Polymorphismus eine Assoziation mit der Atherosklerose festgestellt werden.

##### **3.2.3.1.1. Der GA-Genotyp des c.1-238G>A-Polymorphismus von TNF $\alpha$ erhöht in der KHK-Gruppe das Risiko eines frühzeitigen Myokardinfarkts (1.MI $\leq$ 45 Jahre)**

Für den c.1-238G>A-Polymorphismus konnten insgesamt nur 5 homozygote mutante AA-Genotypträger ermittelt werden. Wegen der niedrigen Anzahl wurden die AA-Genotypträger aus der Auswertung ausgeschlossen.

Es gab zwischen den Gruppen LBS, KOB und KHK keine signifikanten Unterschiede bezüglich des mutanten Genotyps GA (LBS: 9,5 % vs. KHK: 9 % vs. KOB: 12 %).

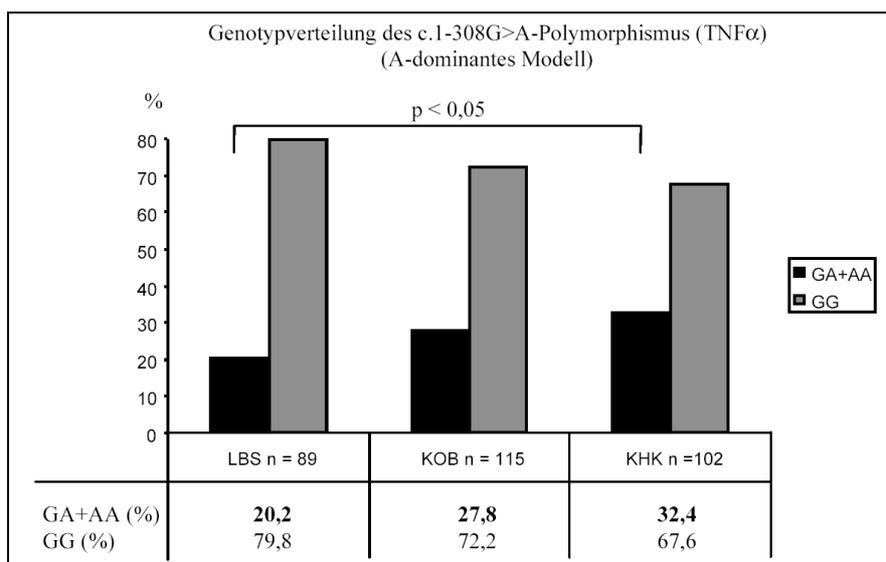
Bei Betrachtung der KHK-Patienten nach dem Manifestationsalter des koronaren Ereignisses (1. MI  $\leq$  45 Jahre vs.  $>$  45 Jahre) konnte ein signifikanter Unterschied in den GA-Frequenzen nachgewiesen werden. Die Gruppe der Patienten, die im jüngeren Lebensalter den 1. MI erlitten hatte, wies eine signifikant erhöhte Anzahl an GA-Trägern auf ( $\leq$  45 Jahre vs.  $>$  45 Jahre: 16,2 % vs. 4,9 %;  $p < 0,012$ ). Die Genotypverteilungen des c.1-238G>A-Polymorphismus sind in der Abb. 11 dargestellt.



**Abb. 11:** Genotypverteilung des c.1-238G>A-Polymorphismus (TNF $\alpha$ ) in den Probandengruppen LBS, KHK und KOB bzw. bei den KHK-Patienten bezüglich des Manifestationsalters des 1.MI.

### 3.2.3.1.2. A-Allelträger des c.1-308G>A-Polymorphismus von TNF $\alpha$ sind prädisponierter eine koronare Herzkrankheit zu entwickeln

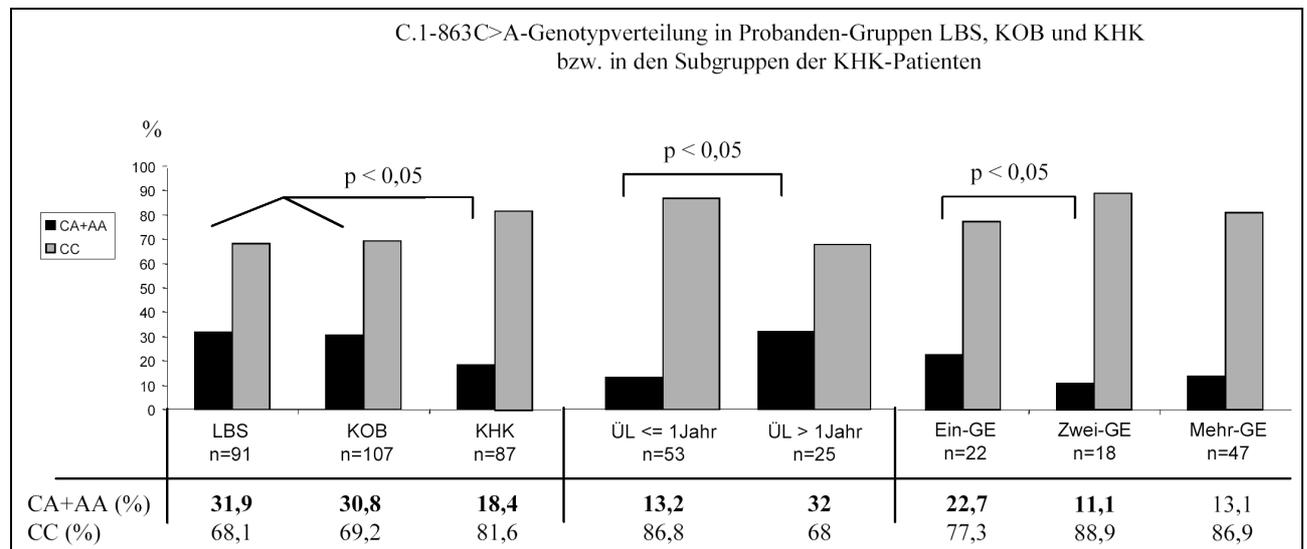
Mittels eines A-dominanten genetischen Modells wurde beim Vergleich der Probandengruppen in der Patientengruppe mit koronarer Herzkrankheit eine signifikant höhere Anzahl an mutanten A-Allelträgern als bei den gesunden LBS festgestellt (KHK vs. LBS: 32,4 % vs. 20,2 %;  $p < 0,05$ ; RR: 2; KI: 1,1-3,6). Die Häufigkeit der A-Allelträger in der Gruppe der Patienten ohne koronaren Befund lag bei 27,8 % (Abb. 12). Eine Differenzierung der KHK-Subgruppen nach dem Eintreten des 1.MI bzw. nach der Anzahl der betroffenen Koronargefäße oder der Überlebenszeit nach einem MI zeigte in allen untersuchten genetischen Modellen keine auffälligen Unterschiede in der Genotyp- und Allelverteilung des c.1-308G>A-Polymorphismus.



**Abb. 12:** Genotypverteilung des c.1-308G>A-Polymorphismus (TNF $\alpha$ ) in den Gruppen LBS, KOB und KHK.

### 3.2.3.1.3. Protektive Wirkung des A-Allels des c.1-863C>A-Polymorphismus von TNF $\alpha$ im atherosklerotischen Geschehen

Die genomischen Untersuchungen zeigten, dass der mutante A-Allel in der Gruppe der Patienten mit koronarer Herzkrankheit im Vergleich zu den gesunden LBS und Patienten ohne koronaren Befund signifikant seltener auftrat (KHK: 18,4 %; LBS: 31,9 % und KOB: 30,8 %; KHK vs. KOB  $p < 0,05$ ) (Abb. 13, links).



**Abb. 13:** Genotypverteilung des c.1-863C>A-Polymorphismus (TNF $\alpha$ ) in den Gruppen LBS, KOB und KHK bzw. in den KHK-Subgruppen (Differenzierung bezüglich der Überlebenszeit nach 1.MI und der Schwere der Gefäßerkrankung).

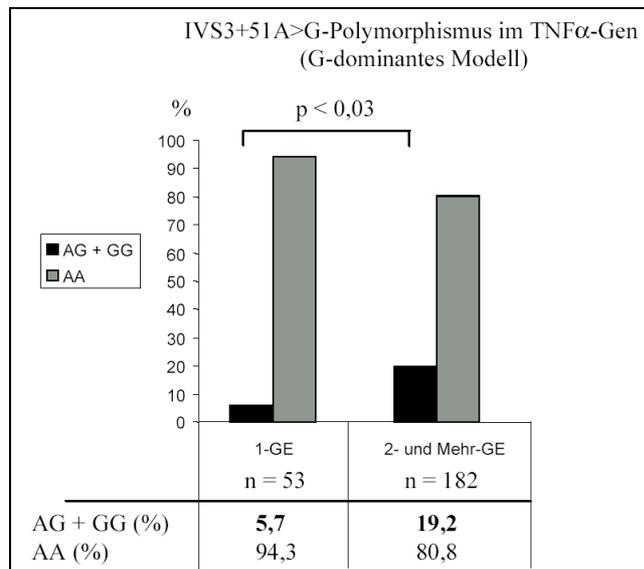
Nach der Einteilung der KHK-Patienten bezüglich der Überlebenszeit nach 1.MI wurde in der Hochrisiko-Gruppe (ÜL nach 1.MI  $\leq$  1Jahr) im Vergleich zu Langzeitüberlebenden (ÜL nach 1.MI  $>$  1Jahr) eine signifikant niedrigere Anzahl an mutanten A-Allelträgern festgestellt (13,2 % vs. 32 %;  $p < 0,05$ ; RR: 3; KI: 1,1-9,8) (Abb. 13, mitte).

Zusätzlich wurde der c.1-863C>A-Polymorphismus bei den KHK-Patienten bezüglich des Schweregrades der koronaren Gefäßerkrankung untersucht. In der Gruppe der Zwei- und Mehr-GE wurde im Vergleich zu den Patienten mit nur einem betroffenen Koronargefäß eine signifikante Erniedrigung des mutanten A-Allels (Verteilung der CA+AA-Genotypen: Ein-GE 22,7 %, Zwei-GE 11,1 % und Mehr-GE 13,1 %) gefunden (Abb. 13, rechts).

### 3.2.3.1.4. Zusammenhang des G-Allels des IVS3+51A>G-Polymorphismus von TNF $\alpha$ mit der Schwere der Gefäßerkrankung bei KHK-Patienten

Bei der Untersuchung des IVS3+51A>G-Polymorphismus konnte mittels eines G-dominanten genetischen Modells (AG+GG vs. AA) nachgewiesen werden, dass in der Gruppe der Patienten mit zwei und mehreren betroffenen Koronargefäßen im Vergleich zu Patienten mit nur einem betroffenen Koronargefäß eine signifikant höhere Anzahl an mutanten G-Allelträgern vorlag (19,2 % bei Zwei- und Mehr-GE vs. 5,7 % bei Ein-GE;  $p < 0,02$ ). Das bedeutete für die G-Allelträger ein 4fach erhöhtes relatives Risiko, eine schwerwiegendere Form der KHK mit zwei oder mehreren atherosklerotisierten Koronargefäßen zu entwickeln (RR: 4,1; KI: 1,07-15,6).

In Abbildung 14 sind die Allelverteilungen des IVS3+51A>G-Polymorphismus in den KHK-Patienten bezüglich der Anzahl der betroffenen Koronargefäße dargestellt.



**Abb. 14:** Assoziation der Genotypverteilung des IVS3+51A>G-Polymorphismus (TNF $\alpha$ ) mit der Schwere der koronaren Herzkrankheit bei den KHK-Patienten.

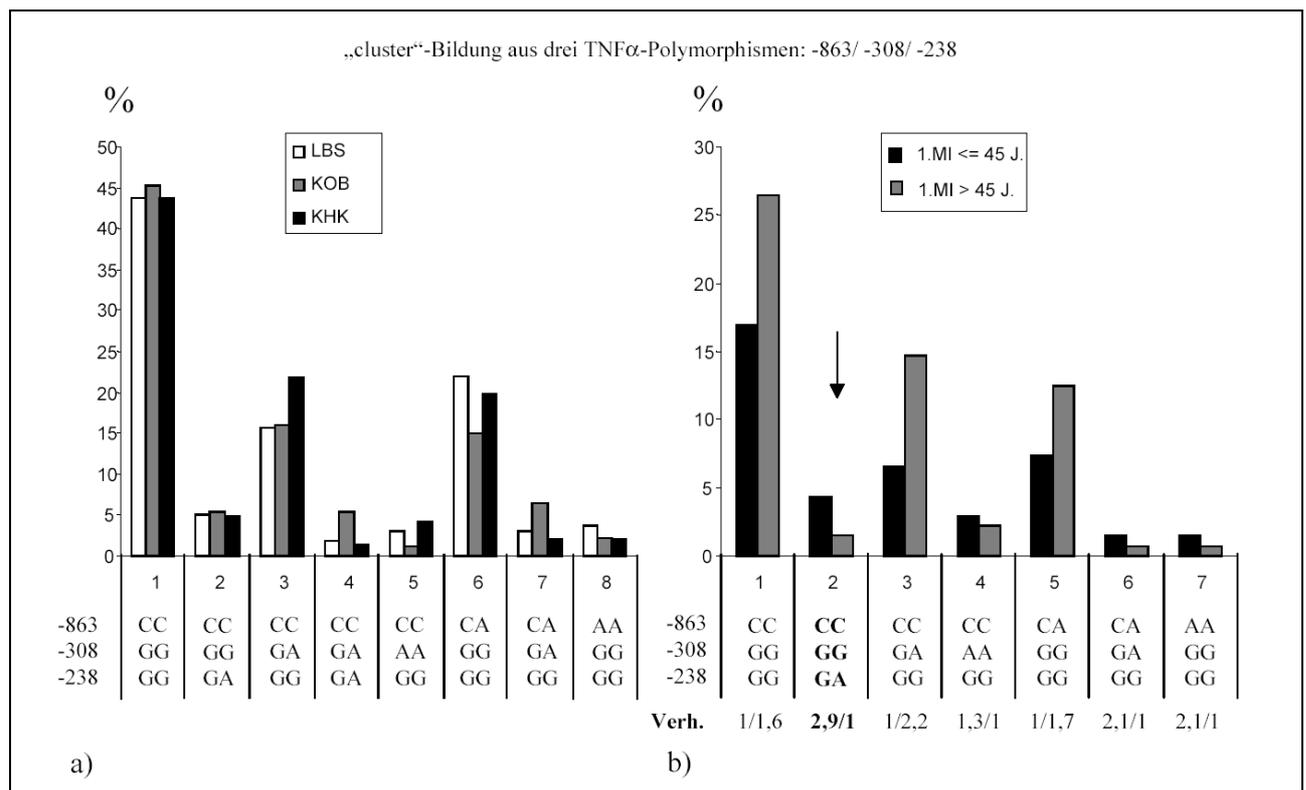
### 3.2.3.1.5. „cluster“-Analysen von TNF $\alpha$ -Polymorphismen für die Ermittlung der Risikokonstellation von KHK-Patienten

Mittels sog. „cluster“-Analysen ist es möglich die Zusammenwirkung mehrerer genetischer Faktoren, Polymorphismen, bei der Risikokonstellation der Patienten zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurden 3 bekannte polymorphe Varianten der Promotorregion des TNF $\alpha$ -Gens (c.1-863C>A, c.1-308G>A und c.1-238G>A) in die „cluster“-Analyse einbezogen.

Die „cluster“-Analyse wurde an insgesamt 443 Probanden durchgeführt. 160 der Probanden waren Langzeitblutspender (108 Männer und 52 Frauen; Durchschnittsalter: 41,8 Jahre), 141 KHK-Patienten (121 Männer und 20 Frauen; Durchschnittsalter 50,3 Jahre) und 142 KOB-Patienten (84 Männer und 58 Frauen; Durchschnittsalter: 50,7 Jahre).

Die Genotypen wurden als -863/-308/-238 „cluster“ untersucht. Von 27 theoretisch möglichen „cluster“-Varianten wurden tatsächlich nur 8 vorgefunden. Die häufigsten 4 Varianten (86,0 %) waren der Wildtyp CC/GG/GG (44,2 %) und die 3 heterozygoten Mutanten, erstens an der Position -863 CA/GG/GG (18,9 %), zweitens an der Position -308 CC/GA/GG (17,8 %) und drittens an der Position -238 CC/GG/GA (5,1 %). Die restlichen Varianten hatten jeweils eine durchschnittliche Häufigkeit von 1 % (Abb. 15a). Beim Vergleich der Häufigkeiten der „cluster“-Varianten innerhalb der drei Gruppen LBS, KHK und KOB konnte eine ähnliche Verteilung der „cluster“ beobachtet werden (Abb. 15a).

Bei der Differenzierung der KHK-Patienten nach dem Manifestationsalter der koronaren Herzkrankheit konnte allerdings festgestellt werden, dass die Anzahl des „clusters“ mit heterozygotem c.1-238G>A-Polymorphismus (CC/GG/GA) in der Gruppe der juvenilen KHK-Patienten (Alter beim 1.MI  $\leq$  45 Jahre) im Unterschied zu KHK-Patienten, die später als 45 Jahre ihren ersten MI hatten, um das 2,9-fache erhöht war (4,4 % vs. 1,5 %; n.s.) (Abb. 15b). Im Gegensatz dazu unterschieden sich die Häufigkeiten der übrigen „cluster“-Varianten (1,3,4,5,6 und 7) zwischen diesen zwei KHK-Subgruppen deutlich weniger.

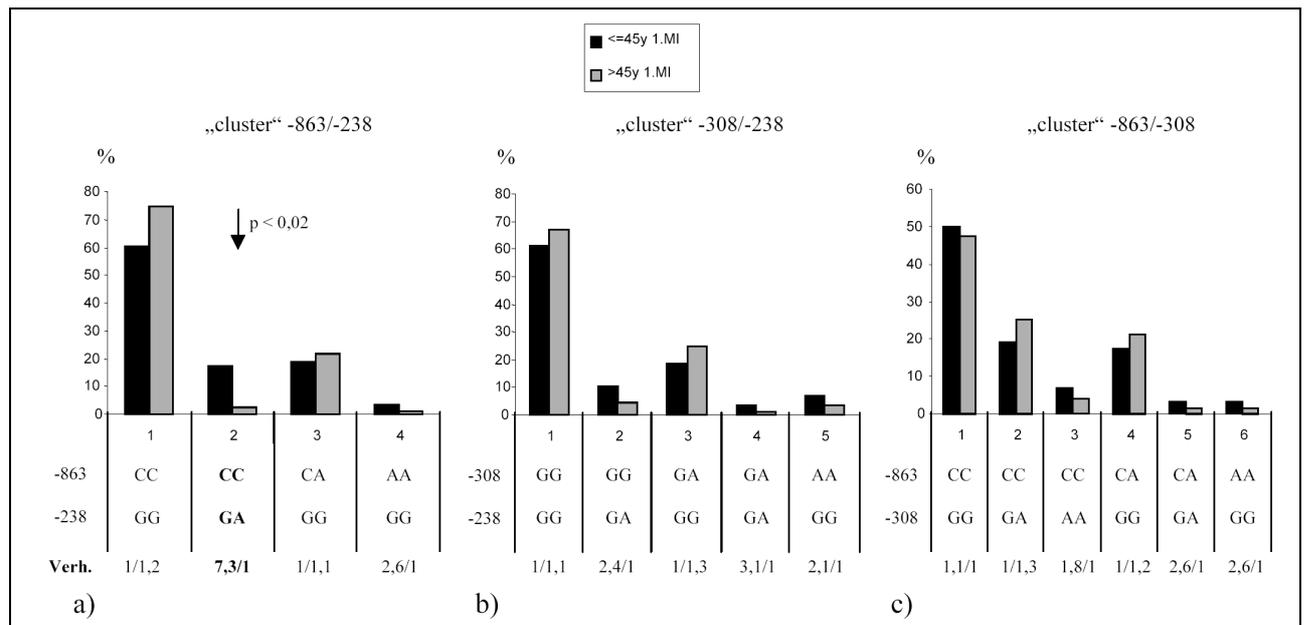


**Abb. 15:** a) „cluster“-Analyse: TNF $\alpha$ -Polymorphismen -863/-308/-238 in der Gruppe der LBS, der KHK- und der KOB-Patienten; b) „cluster“-Analyse -863/-308/-238 innerhalb der Gruppe der KHK-Patienten nach der Differenzierung in juvenile Patienten (1. MI  $\leq$  45 Jahre) und im höheren Lebensalter erkrankte Patienten (1. MI  $>$  45 Jahre); Verh.: Verhältnis (1. MI:  $\leq$ 45J./ $>$ 45J.).

Weiterhin wurden bei den KHK-Patienten „cluster“ berechnet, die aus zwei Polymorphismen bestanden (-863/-238, -308/-238 und -863/-308) und deren Verteilung bezüglich des Manifestationsalters der KHK untersucht. Für die Kombination -863/-238 konnten 4 verschiedene „cluster“-Varianten nachgewiesen werden (Abb. 21a). Bei den anderen zwei „cluster“-Typen -308/-238 und -863/-308 wurden 5 und 6 verschiedene Varianten identifiziert (Abb. 21b und c). Der Genotyp CC/GA (-863/-238 „cluster“) war aufgrund der hohen Anzahl der GA-Mutationsträger des c.1-238G>A-Polymorphismus in der Gruppe der juvenilen KHK-Patienten im Vergleich zu den Patienten, die im höheren Lebensalter ihren 1. MI erlitten hatten, signifikant erhöht (17,5 % vs. 2,4 %;  $p < 0,02$ ) (Abb. 16a).

Bei der Untersuchung der Verteilung des „clusters“ -308/-238 konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den KHK-Subgruppen nachgewiesen werden, allerdings blieb die Tendenz erhalten, dass die Träger des heterozygoten GA-Genotyps im c.1-238G>A-Polymorphismus (GG/GA und GA/GA) in der Gruppe der juvenilen Patienten häufiger waren als in der Gruppe der Patienten, die nach ihrem 45. Lebensjahr ihren 1. MI erlitten hatten („cluster“ GG/GA: 10,2 % vs. 4,3 %, n.s.; „cluster“ GA/GA: 3,4 % vs. 1,1 %, n.s.) (Abb. 16b).

Die Kombination der Polymorphismen c.1-863C>A und c.1-308G>A zeigte beim Vergleich der KHK-Subgruppen keine Auffälligkeiten ( $p > 0,05$ , n.s.) (Abb. 16c).



**Abb. 16:** Vergleich der KHK-Patienten bezüglich des Alters beim 1. MI unter Berücksichtigung verschiedener „cluster“-Varianten: a) -863/-238; b) -308/-238 und c) -863/-308; Verh.: Verhältnis (1.MI: ≤45J./>45J.).

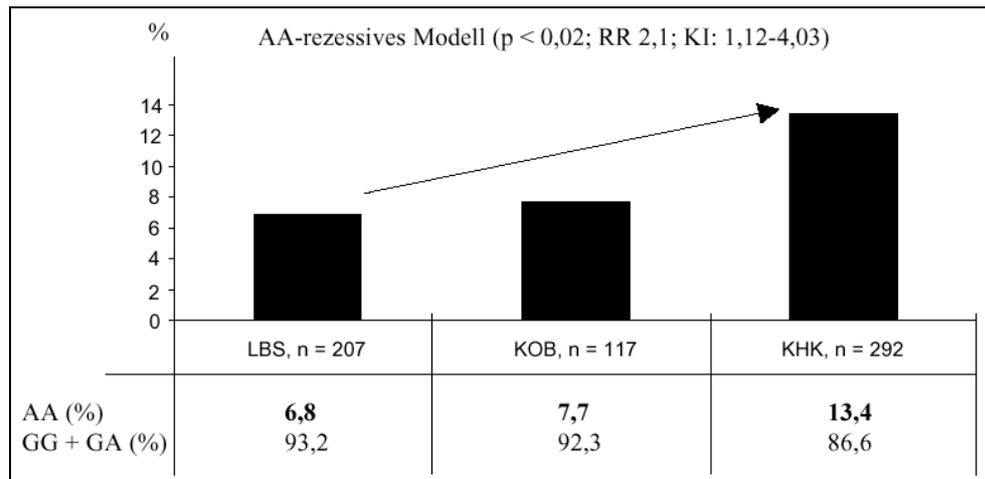
Eine singuläre Auswertung der 3 Polymorphismen c.1-863C>A, c.1-308G>A und c.1-238G>A bezüglich des Erkrankungsalters ergab nur beim c.1-238G>A-Polymorphismus einen Zusammenhang der Genotypverteilung mit dem Manifestationsalter des Myokardinfarkts: die juvenilen MI-Patienten hatten eine signifikant erhöhte Anzahl an heterozygoten GA-Mutationsträgern (siehe Kapitel 3.2.3.1.1., Abb. 11).

### 3.2.3.2. TNFβ-Gen

Beim Vergleich der Probandengruppen nach genetischen Daten konnte für 4 polymorphe Varianten des TNFβ-Gens (c.7G>A, T60N, IVS1-13\_12dupTC und C13R) ein Zusammenhang mit dem atherosklerotischen Geschehen festgestellt werden. Die 2 anderen Polymorphismen IVS1+90A>G und IVS1+206G>C des TNFβ-Gens zeigten in allen untersuchten Gruppen gleiche Genotypverteilungen und konnten nicht mit den Krankheitsmerkmalen der Atherosklerose assoziiert werden.

#### 3.2.3.2.1. Der AA-Genotyp des c.7G>A-Polymorphismus von TNFβ ist mit schlechteren Lipidwerten bzw. mit dem Vorkommen einer koronaren Herzkrankheit assoziiert

Bei der Untersuchung des neu beschriebenen c.7G>A-Polymorphismus in der 5'-UTR des TNFβ-Gens konnte mittels A-rezessivem genetischen Modell festgestellt werden, dass die koronar betroffenen Patienten (KHK-Gruppe) im Vergleich zu den gesunden Langzeitblutspendern (LBS) und den Patienten ohne Koronarstenose (KOB) signifikant häufiger den homozygoten mutanten AA-Typ aufwiesen (13,4 % vs. 6,8 % bei LBS und 7,7 % bei KOB;  $p < 0,02$ ). Daraus ergab sich für die AA-Träger im Vergleich zu den Probanden mit (GG+GA)-Genotyp ein 2fach erhöhtes Risiko eine koronare Herzkrankheit zu entwickeln (RR: 2,1; KI: 1,12-4,03) (Abb. 17). Bei Betrachtung der biochemischen Werte der Patienten konnte für AA-Träger im Vergleich zu GG- + GA-Trägern eine pathologische Erhöhung einiger Lipidwerte, wie totales Cholesterin (6,1 mmol/l bei AA-Genotyp vs. 5,6 mmol/l bei (GG + GA)-Genotyp;  $p < 0,02$ ) und LDL (3,8 mmol/l bei AA-Genotyp vs. 3,4 mmol/l bei (GG + GA)-Genotyp;  $p < 0,04$ ) nachgewiesen werden.



**Abb. 17:** Verteilung der AA-Genotypträger in untersuchten Probandengruppen LBS, KOB und KHK (AA-rezessives Modell; RR: relatives Risiko; KI: Konfidenz Intervall).

Die Unterteilung der KHK-Patienten nach dem Alter beim 1.MI, dem Schweregrad der Gefäßerkrankung bzw. der Überlebensdauer nach 1.MI zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Subgruppen bezüglich der Genotypverteilung des c.7G>A-Polymorphismus.

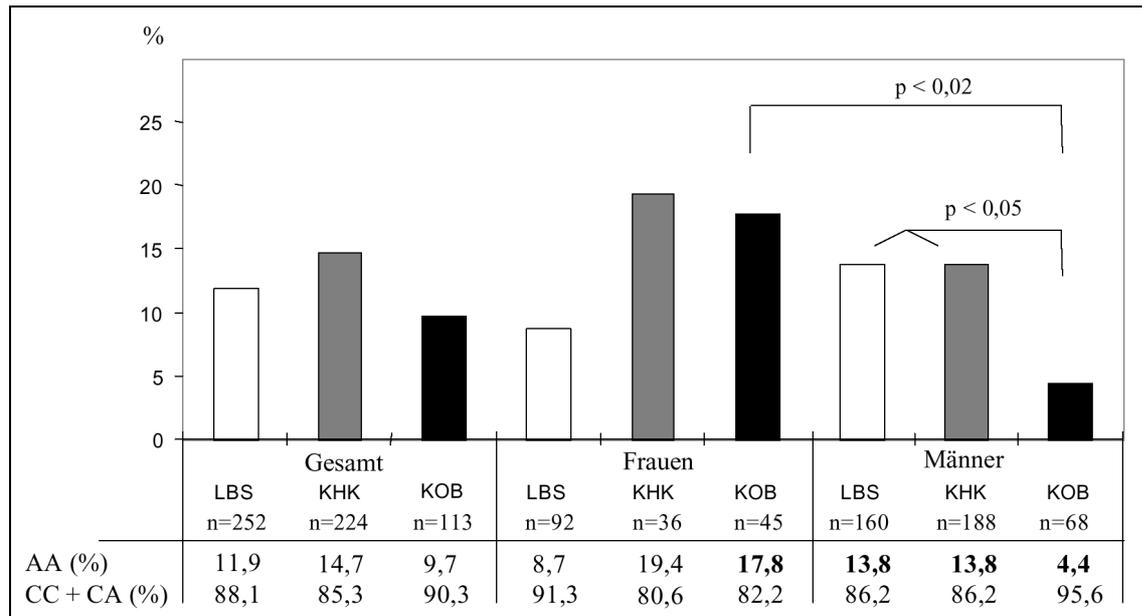
### 3.2.3.2.2. Der AA-Genotyp des T60N-Polymorphismus von TNFB ist bei männlichen Probanden mit erhöhten Fibrinogenwerten bzw. mit dem Vorkommen einer koronaren Herzkrankheit assoziiert

Die Genotyp- und Allelverteilung des T60N-Polymorphismus zeigte beim Vergleich der 3 Probandengruppen LBS, KOB und KHK keine signifikanten Unterschiede bezüglich aller drei untersuchten genetischen Modelle (A-dominant, -kodominant und -rezessiv). Bei den KOB-Patienten wurde jedoch eine geschlechtsabhängige Verteilung des homozygoten mutanten AA-Genotyps festgestellt (17,8 % bei KOB-Frauen vs. 4,4 % bei KOB-Männern;  $p < 0,02$ ).

Bei der Untersuchung männlicher Probanden konnten mit Hilfe des A-rezessiven genetischen Modells (AA vs. CC+CA) signifikant häufiger homozygote mutante AA-Träger bei den koronar betroffenen KHK-Patienten im Vergleich zu den koronar glatten KOB-Patienten nachgewiesen werden (13,8 % vs. 4,4 %;  $p < 0,05$ ). Der Vergleich der klinischen und biochemischen Parameter der AA- und CC + CA-Genotypträger zeigte eine Assoziation des AA-Genotyps mit signifikant höheren Fibrinogenwerten (3,9 g/l vs. 3,4 g/l;  $p < 0,05$ ). Andere biochemische Parameter zeigten keine auffälligen Unterschiede.

Die Analyse der gesunden Langzeitblutspender ergab, dass homozygote AA-Mutationsträger in dieser Gruppe genauso häufig vorkamen wie in der Gruppe der KHK (13,8 %). Verglichen mit der Gruppe der KOB-Patienten ergab sich jedoch ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ).

In Abbildung 18 sind die Häufigkeiten der AA-Träger in den Gruppen der LBS, KHK und KOB vor und nach der geschlechtlichen Differenzierung dargestellt.



**Abb. 18:** Genotypverteilung des T60N-Polymorphismus (TNF $\beta$ ) in den Gruppen LBS, KHK und KOB vor und nach der geschlechtlichen Differenzierung (A-rezessives Modell).

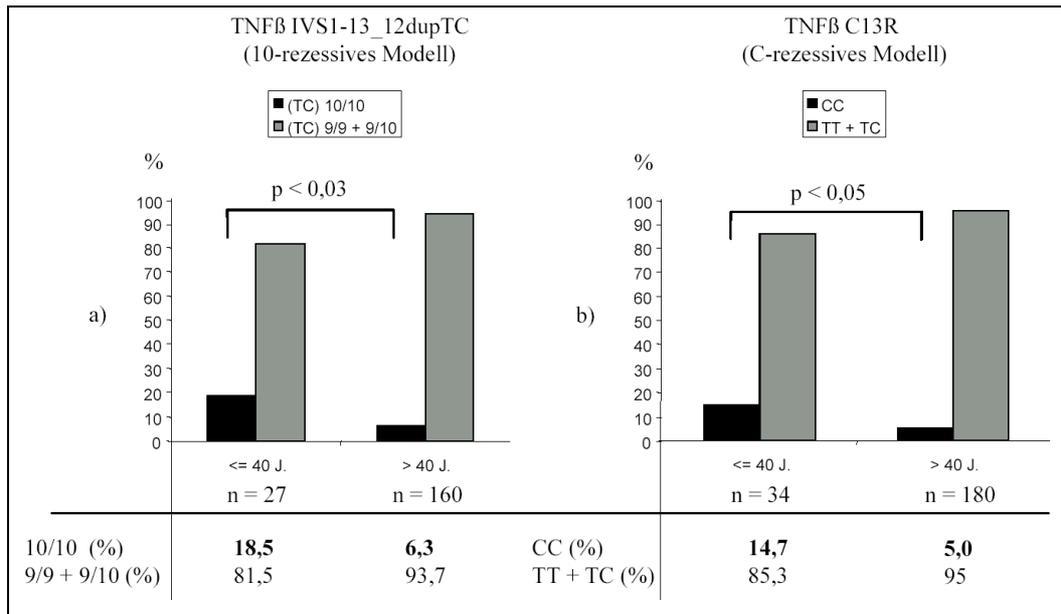
Der T60N-Polymorphismus zeigte innerhalb der KHK-Gruppe mit akutem Myokardinfarkt keine Assoziation zum Manifestationsalter der KHK, Schweregrad der Gefäßerkrankung oder zur Überlebensdauer nach einem MI.

### 3.2.3.2.3. Rolle der IVS1-13\_12dupTC- und C13R-Polymorphismen im TNF $\beta$ -Gen bei der Risikokonstellation juveniler Myokardinfarkt-Patienten

Für 2 Polymorphismen des TNF $\beta$ -Gens (IVS1-13\_12dupTC und C13R) konnte ein Zusammenhang mit der Frühmanifestation der koronaren Herzkrankheit (1.MI  $\leq$  40 Jahre) festgestellt werden.

Bei der Auswertung des Mikrosatelliten-Polymorphismus IVS1-13\_12dupTC mittels eines 10-rezessiven genetischen Modells (10/10- vs. (9/9+9/10)-Genotypträger) konnte für die juvenilen KHK-Patienten (1.MI  $\leq$  40 Jahre) im Unterschied zu später erkrankten Patienten eine signifikante Erhöhung des Auftretens der homozygoten Mutationsträger nachgewiesen werden (18,5 % vs. 6,3 %;  $p < 0,03$ ). Daraus ergab sich für die 10/10-Genotypträger ein 3,4-fach erhöhtes relatives Risiko, vor dem 41. Lebensjahr einen Myokardinfarkt zu erleiden (RR: 3,4; KI: 1,07-10,91) (Abb. 19a). Die gleiche Tendenz war für die 10/10-Träger bereits bei Festlegung der 1.MI-Altersgrenze auf 45 Jahre zu sehen (1.MI  $\leq$  45 Jahre vs.  $>$  45 Jahre: 10 % vs. 6,8 %; n.s.).

Die Analyse des C13R-Polymorphismus im TNF $\beta$ -Gen zeigte ebenfalls bei den KHK-Patienten, die ihren ersten MI vor dem 41. Lebensjahr erlitten haben, signifikant mehr homozygote Mutationsträger (CC) im Unterschied zu später erkrankten Patienten (14,7 % vs. 5,0 %;  $p < 0,05$ ). Für die CC-Träger ergab sich ein 2,9fach erhöhtes relatives Risiko im früheren Lebensalter einen MI zu erleiden (RR: 2,9; KI: 1,1-9,2) (Abb. 19b). Die gleiche Tendenz war für die CC-Träger bereits bei Festlegung der 1.MI-Altersgrenze auf 45 Jahre zu sehen (1.MI  $\leq$  45 Jahre vs.  $>$  45 Jahre: 9,9 % vs. 5,3 %; n.s.).

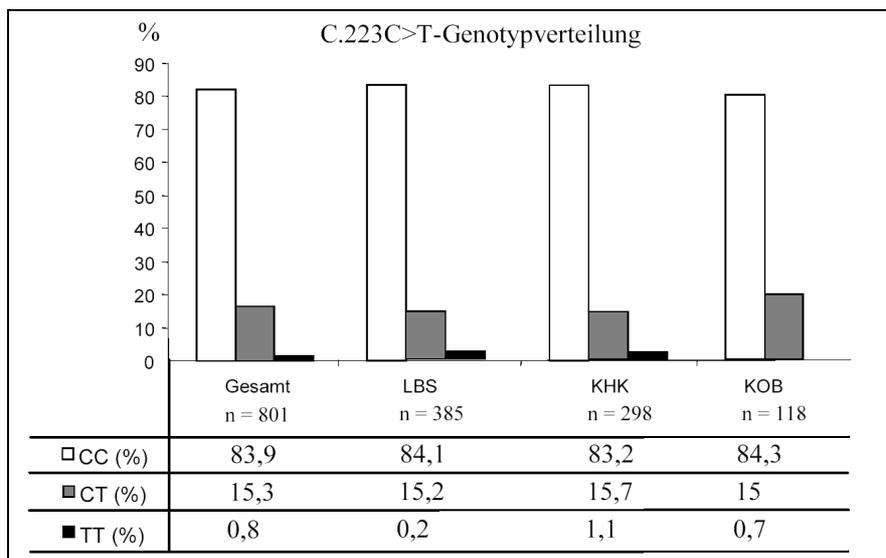


**Abb. 19:** Darstellung der Genotypverteilungen des IVS1-13\_12dupTC und des C13R-Polymorphismus im TNFβ-Gen bezüglich des Manifestationsalters der koronaren Herzkrankheit.

### 3.2.3.3. FGF-2-Gen

#### 3.2.3.3.1. Rolle des c.223C>T-Polymorphismus im FGF-2-Gen bei der Risikokonstellation der koronaren Atherosklerose

Mit Hilfe eines kodominanten genetischen Modells wurde eine gleichmäßige Verteilung der Genotypen in allen drei Probandengruppen LBS, KOB und KHK festgestellt. Am häufigsten kamen die homozygoten CC-Wildtypträger vor (83,9 %), die zweithäufigsten waren die heterozygoten CT-Träger (15,3 %) und die seltensten waren die homozygoten TT-Mutationsträger (0,8 %) (Abb. 20). Es konnte keine Assoziation des c.223C>T-Polymorphismus sowohl mit klinischen (Raucherstatus, Diabetes mellitus, Hypertension) als auch mit biochemischen Parametern (BMI, Lp (a), TCHOL, HDL, LDL und Triglyceride) der Probanden nachgewiesen werden.



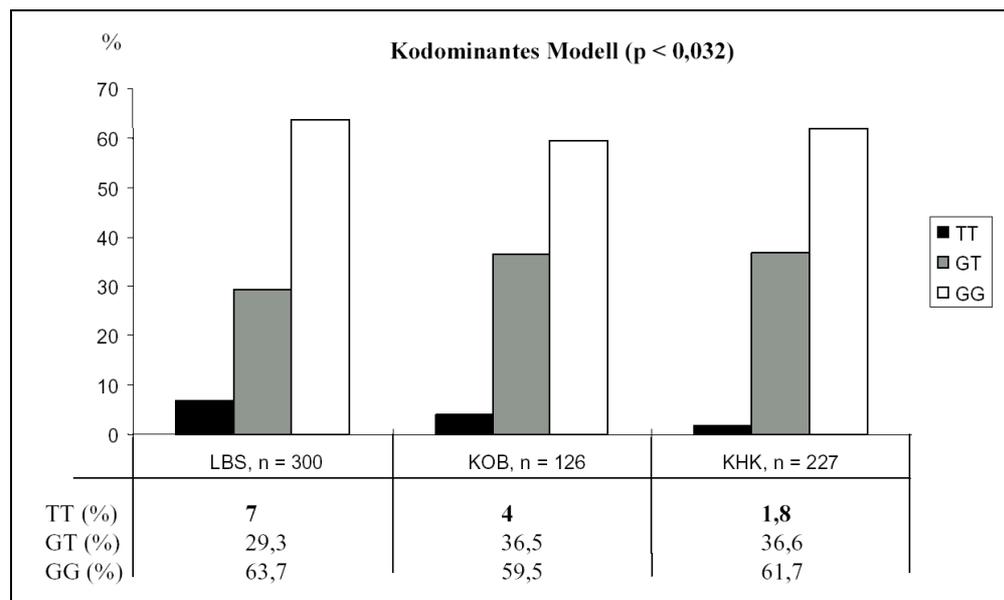
**Abb. 20:** Genotypverteilung des c.223C>T-Polymorphismus des FGF-2-Gens in den Gruppen LBS, KHK und KOB.

### 3.2.3.4. HSPG-2-Gen

#### 3.2.3.4.1. Protektive Wirkung des TT-Genotyps des IVS6-86G>T-Polymorphismus von HSPG-2 im Lipidstoffwechsel bzw. bei der Risikokonstellation der Atherosklerose

Zur Beurteilung der Rolle des IVS6-86G>T-Polymorphismus im HSPG-2-Gen bei der Risikokonstellation atherosklerotischer Erkrankungen wurden insgesamt 300 gesunde Blutspender, 126 KOB-Patienten und 227 KHK-Patienten analysiert. Mittels Assoziationsstudien der IVS6-86G>T-Genotypen mit biochemischen Risikofaktoren der Atherosklerose (BMI, Lp (a), HDL, LDL, Triglyceride, Cholesterin, PAI, Plasminogen und Fibrinogen) konnten bis auf Lp (a) keine Abhängigkeiten nachgewiesen werden. Innerhalb der KOB-Gruppe hatten die TT-Träger im Vergleich zu den G-Allelträgern signifikant niedrigere Lp (a)-Werte ( $p < 0,05$ ). Bei den KHK-Patienten blieb diese Tendenz erhalten, jedoch waren die Unterschiede nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

Mittels eines kodominanten genetischen Modells wurde festgestellt, dass die LBS-Gruppe im Gegensatz zu den beiden Patientengruppen KOB und KHK signifikant mehr homozygote TT-Mutationsträger aufwies (KHK: 2 %; KOB: 4 %; LBS: 7 %;  $p < 0,032$ ) (Abb. 21). Anhand des T-rezessiven genetischen Modells konnte für die TT-Genotypträger ein 4,2fach niedrigeres Risiko berechnet werden, einen gestörten Lipidstoffwechsel bzw. eine koronare Herzkrankheit zu entwickeln ( $p < 0,006$ ; 95 % Konfidenzintervall: 1,42-12,4).



**Abb. 21:** Genotypverteilung des IVS6-86G>T-Polymorphismus in Probandengruppen LBS, KOB und KHK (kodominantes Modell).

Bei der weiteren Auswertung der Daten von KHK-Patienten konnten keine signifikanten Unterschiede in der Genotypverteilung bezüglich des Alters der klinischen Manifestation (1. MI:  $\leq 45$  Jahre vs.  $> 45$  Jahre) zwischen den beiden Subgruppen nachgewiesen werden ( $p > 0,8$ ). Eine Einteilung der KHK-Patienten in Langzeitüberlebende ( $\text{ÜL} > 1$ Jahr) und Hochrisikogruppe ( $\text{ÜL} \leq 1$ Jahr) zeigte ebenfalls keine signifikanten Verschiebungen ( $p > 0,8$ ). Die Genotypverteilung war außerdem unabhängig vom Schweregrad der koronaren Herzkrankheit (Ein- oder Zweigefäßerkrankung vs. Mehrgefäßerkrankung,  $p > 0,1$ ).

### 3.2.3.5. NOS-3-Gen

#### 3.2.3.5.1. Rolle des E298D-Polymorphismus im NOS-3-Gen bei der Risikokonstellation der Atherosklerose

Die Genotypverteilung des E298D-Polymorphismus des NOS-3-Gens wurde an 155 gesunden Langzeitblutspendern, 83 Patienten mit angiographisch nachgewiesener Herzkrankheit und 32 Patienten mit unauffälligen Koronarien mittels der drei genetischen Modelle untersucht. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Genotyp- und Allelverteilung des E298D-Polymorphismus zwischen den drei untersuchten Probandengruppen festgestellt werden. Beim Vergleich der mutanten TT-Träger fiel auf, dass die gesunden Langzeitblutspender am häufigsten diesen Genotyp aufwiesen (KOB: 6,2 %; KHK: 6,6 % und LBS: 10,3 %; n.s.).

Außerdem war keine Abhängigkeit des E298D-Polymorphismus von klinischen und biochemischen Risikofaktoren der Atherosklerose zu verzeichnen. Einzige Ausnahme waren die Fibrinogenwerte bei KHK-Patienten: Die homozygoten GG- und TT-Träger hatten im Vergleich zu den heterozygoten GT-Trägern signifikant niedrigere Werte des Gerinnungsfaktors Fibrinogen (3,2 g/l vs. 2,9 und 2,8 g/l;  $p < 0,04$ ).

Die KHK-Patienten wurden nach dem Alter beim 1.MI ( $\leq 45$  Jahre und  $> 45$  Jahre), nach der Überlebenszeit nach einem MI (HR:  $\leq 1$  Jahr, LZ:  $> 1$  Jahr) und nach dem Schweregrad des koronaren Ereignisses (Ein-, Zwei- und Mehr-GE) differenziert analysiert. Unter den gebildeten Subgruppen konnten keine signifikanten Unterschiede in der Genotyp- bzw. Allelverteilung des E298D-Polymorphismus nachgewiesen werden. Beim Vergleich der homozygoten mutanten TT-Typen fiel auf, dass die Patienten mit Ein-GE eine mit gesunden Blutspendern vergleichbare Verteilung dieses Genotyps aufwiesen (11,3 %). In anderen KHK-Subgruppen kam der TT-Typ eher seltener vor. Am wenigsten besaßen Patienten mit mehreren erkrankten Koronargefäßen (2,8 %,  $n = 36$ ) diesen Genotyp. Beim Vergleich der Allel-Verteilungen wurde festgestellt, dass das mutante T-Allel in der Gruppe der Langzeitüberlebenden am häufigsten vertreten war (43,9 %). In Tabelle 17 sind alle untersuchten KHK-Subgruppen mit den jeweiligen Genotyp- bzw. Allel-Verteilungen zusammengefasst.

**Tabelle 17:** Die Genotyp- und Allelverteilung des E298D-Polymorphismus (NOS-3) in den KHK-Subgruppen.

KHK-Patienten											
E298D	gesamt	Manifestationsalter			Überleben nach MI			Schweregrad der KHK			
	n = 83	$\leq 45$ J. n = 34	$> 45$ J. n = 49	p	HR n = 49	LZ n = 34	p	1-GE n = 27	2-GE n = 19	Mehr-GE n = 36	p
Genotyp											
GG (%)	37,3	41,2	34,7	n.s.	44,9	26,5	n.s.	40,7	31,6	38,9	n.s.
GT (%)	56,7	52,9	59,2	n.s.	49	67,6	n.s.	48,1	63,2	58,3	n.s.
TT (%)	6	5,9	6,1	n.s.	6,1	5,9	n.s.	11,1	5,3	2,8	n.s.
Allel											
G (%)	60	61,5	61,7	n.s.	63	56,1	n.s.	60,4	58,1	61,4	n.s.
T (%)	40	38,5	38,3	n.s.	37	43,9	n.s.	39,6	41,9	38,6	n.s.

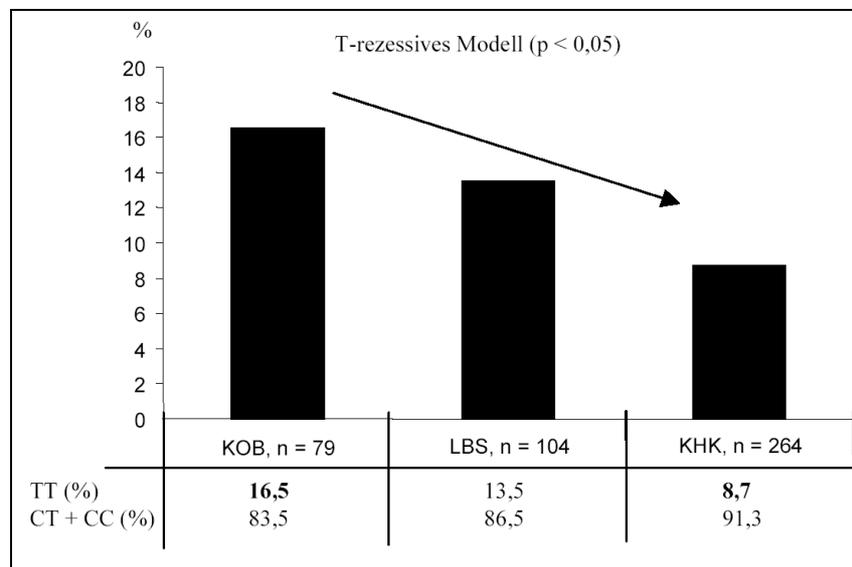
### 3.2.3.6. MTHFR-Gen

#### 3.2.3.6.1. Rolle des A222V-Polymorphismus im MTHFR-Gen bei der Risikokonstellation der Atherosklerose

Zur weiteren Beurteilung des individuellen Risikos wurde die Genotypverteilung des A222V-Polymorphismus im MTHFR-Gen in der Gruppe der Langzeitblutspender (n = 162) und in den beiden Patienten-Gruppen KOB (n = 162) und KHK (n = 264) untersucht. In der KOB-Gruppe konnte für den homozygoten mutanten TT-Genotyp eine Geschlechtsabhängigkeit nachgewiesen werden. Die weiblichen KOB-Probanden (n = 56) hatten dreimal seltener den TT-Genotyp als die Männer der gleichen Gruppe (5,4 % vs. 16,5 %;  $p < 0,05$ ; KI: 0,078-1,061). Weiterhin wurde ermittelt, dass dieser Polymorphismus zu keinem der untersuchten klinischen Risikofaktoren der Atherosklerose wie Rauchen, Hypertonie bzw. *Diabetes mellitus* und zu keinem der biochemischen Risikoparametern des Lipidstoffwechsels und der Fibrinolyse in Assoziation stand.

Beim Vergleich der Genotypverteilung in verschiedenen Probandengruppen konnten in keinem der untersuchten Modelle signifikante Unterschiede zwischen den gesunden Blutspendern und Patienten nachgewiesen werden. Alle drei Probandengruppen zeigten vergleichbare Genotyp- und Allelhäufigkeiten (n.s.).

Bei Betrachtung der Geschlechter konnte mittels T-rezessivem genetischen Modells festgestellt werden, dass bei männlichen KHK-Patienten homozygote TT-Mutationsträger signifikant seltener auftraten als bei männlichen KOB-Patienten (8,8 % vs. 16,5 %;  $p < 0,05$ ). Die männlichen Langzeitblutspender hatten zu 13,5 % den homozygoten mutanten TT-Genotyp (Abb. 22). Die weiblichen Probanden zeigten zwischen den untersuchten Gruppen in der Verteilung der TT-Träger keine signifikanten Unterschiede.



**Abb. 22:** Vergleich der Häufigkeiten der TT-Genotypträger des A222V-Polymorphismus im MTHFR-Gen bei männlichen Probanden in den Gruppen LBS, KOB und KHK.

Die KHK-Patienten wurden auch hier bezüglich des Manifestationsalters der koronaren Herzkrankheit, der Überlebenschance nach dem 1.MI und der Anzahl der betroffenen Hauptkoronarien analysiert. Sowohl beim kodominanten als auch beim T-dominanten und T-rezessiven genetischen Modell konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Subgruppen der KHK-Patienten nachgewiesen werden ( $p > 0,05$ ).

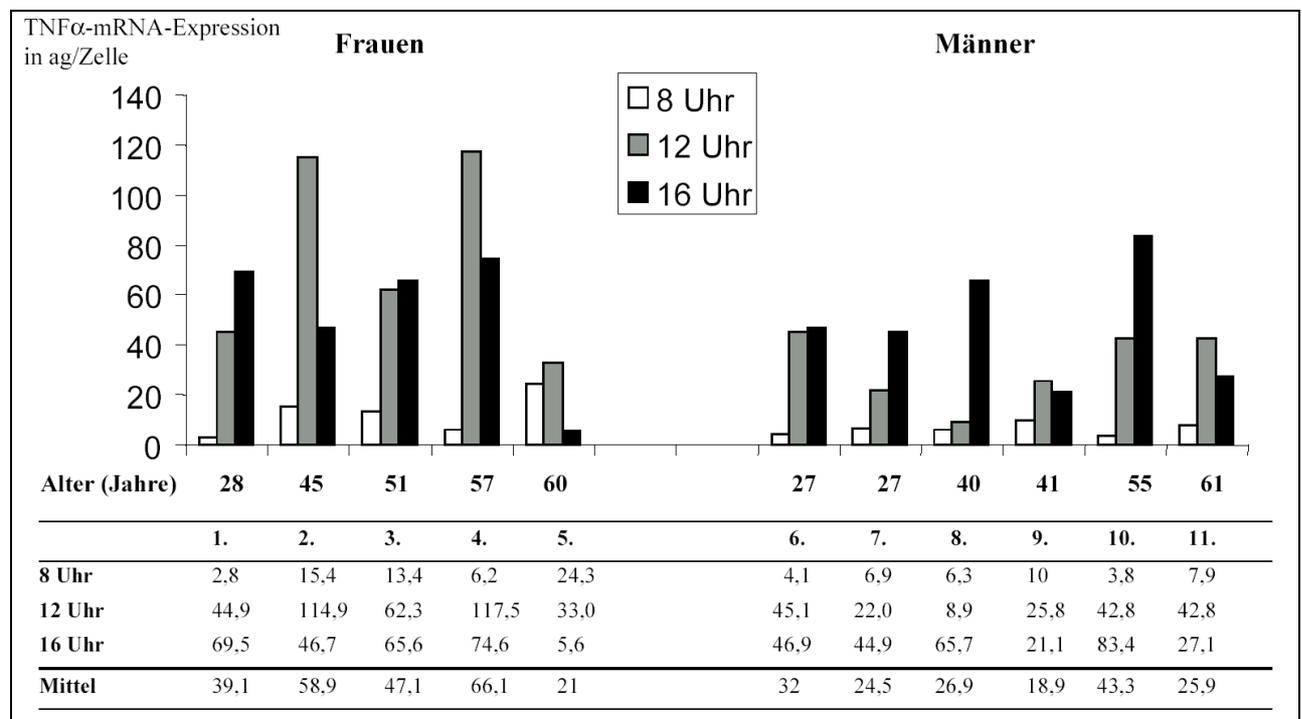
### 3.2.4. Ermittlung der Abhängigkeit genetischer und klinischer Risikofaktoren

Mittels binärer logistischer Regressionsanalyse (*odds ratio*) wurden die Polymorphismen der Gene TNF $\alpha$  (c.1-863C>A, c.1-308G>A, c.1-238G>A und IVS3+51A>G), TNFB (c.7G>A, T60N, C13R, IVS1-13\_12dupTC), FGF-2 (c.223C>T), HSPG-2 (IVS6-86G>T), NOS-3 (E298D) und MTHFR (A222V) einzeln auf ihre Abhängigkeit von den etablierten Risikofaktoren der Atherosklerose (Raucherstatus, Hypertonie und *Diabetes mellitus*) untersucht.

### 3.3. Expressionsuntersuchungen zum TNF $\alpha$ - und FGF-2-Gen

#### 3.3.1. Einfluss der zirkadianen Rhythmik auf TNF $\alpha$ -mRNA-Expression

Zur Untersuchung des Einflusses der zirkadianen Rhythmik auf die TNF $\alpha$ -mRNA-Expression wurden 11 Probanden (6 Männer und 5 Frauen) aus verschiedenen Altersklassen in die Studie einbezogen. Die erste Blutabnahme mit nachfolgender mRNA-Messung fand um 8 Uhr statt. Der dabei ermittelte Durchschnittswert lag bei Männern und Frauen insgesamt bei 9,2 ag/Zelle. Die weiteren Blutentnahmen zur zirkadianen Studie fanden jeweils um 12 und um 16 Uhr statt.



**Abb. 23:** Zirkadiane Schwankung der TNF $\alpha$ -mRNA-Expression bei 11 Kontrollprobanden (1. bis 5.: weibliche Probanden; 6. bis 11.: männliche Probanden).

Es konnte festgestellt werden, dass Männer und Frauen ein gleiches Muster der TNF $\alpha$ -mRNA-Expression aufwiesen. Bis auf eine Ausnahme (Proband 5) war bei allen Probanden eine niedrige Expression am frühen Morgen und ein erheblicher Anstieg im Laufe des Tages zu verzeichnen. Während bei den Probanden 1, 3, 6, 7, 8, und 10 die Expressionswerte um 16 Uhr die höchsten waren, konnte bei den Probanden 2, 4, 5, 9 und 11 schon um 16 Uhr eine Abnahme der mRNA-Expression nachgewiesen werden (Abb. 23).

Innerhalb der zirkadianen Studie konnten keine deutlichen altersabhängigen Unterschiede in der TNF $\alpha$ -mRNA-Expression nachgewiesen werden. In allen untersuchten Altersklassen wurden sowohl Probanden mit höherer als auch mit niedriger Expression beobachtet.

Die weiblichen Probanden exprimierten morgens (8 Uhr) durchschnittlich 12,4 ag/Zelle und die männlichen 6,5 ag/Zelle TNF $\alpha$ -mRNA, wobei bei den Frauen eine größere Schwankungsbreite zu verzeichnen war (von 2,8 bis 24,3 ag/Zelle, Abb. 23). Im Laufe des Tages erreichten die weiblichen Probanden höhere TNF $\alpha$ -mRNA-Werte (bis zu 117,5 ag/Zelle) als die männlichen (bis zu 83,4 ag/Zelle).

### 3.3.2. TNF $\alpha$ - und FGF-2-mRNA-Bestimmung in Gruppen LBS, KOB und KHK; Geschlechts- und Altersabhängigkeit

Um zirkadiane Schwankungen der TNF $\alpha$ -mRNA-Expression auszuschließen wurden bei den Probanden alle weiteren Expressionsmessungen an der um 8 Uhr gewonnenen Blutprobe durchgeführt. Die TNF $\alpha$ -mRNA-Expression wurde insgesamt bei 288 (94 LBS, 99 KOB und 95 KHK) und die FGF-2-mRNA-Expression bei 237 Probanden (41 LBS, 98 KOB und 98 KHK) gemessen. Sowohl für die TNF $\alpha$ - als auch für die FGF-2-mRNA-Expression konnte keine Geschlechtsabhängigkeit nachgewiesen werden (LBS, KOB, KHK: Männer vs. Frauen, n.s.).

Bei den LBS lag der durchschnittliche TNF $\alpha$ -mRNA-Wert bei 9,3 ag/Zelle, was vergleichbar mit dem 8 Uhr-Durchschnittswert in der zirkadianen Studie (9,2 ag/Zelle) war. Bei den KOB- und KHK-Patienten lag die TNF $\alpha$ -mRNA-Expressionsrate signifikant niedriger als bei den LBS (LBS vs. KOB; LBS vs. KHK;  $p < 0,001$ ). Dieses Verhältnis blieb auch bei getrennter Betrachtung der Männer und Frauen erhalten: Die KOB- und KHK-Männer bzw. -Frauen hatten signifikant niedrigere TNF $\alpha$ -mRNA-Expression als die Männer bzw. Frauen der LBS-Gruppe.

Die höchste FGF-2-mRNA-Expressionsrate hatten die KHK-Patienten mit durchschnittlich 13,1 ag/Zelle. Die KOB-Patienten zeigten mit durchschnittlich 8,1 ag/Zelle die niedrigste FGF-2-mRNA-Expression (KHK vs. KOB;  $p < 0,001$ ). Bei den LBS lagen die FGF-mRNA-Expressionswerte dazwischen (11,9 ag/Zelle). Bei getrennter Auswertung der männlichen und weiblichen Probanden blieb dieses Verhältnis bestehen, bei Frauen besaß es jedoch keinen Signifikanzcharakter.

In der folgenden Tabelle 18 sind die ermittelten mRNA-Expressionswerte zusammengefaßt.

**Tabelle 18:** Darstellung der TNF $\alpha$ - und FGF-2-mRNA-Expressionswerte (ag/Zelle);  
n: Anzahl; m: männlich; w: weiblich.

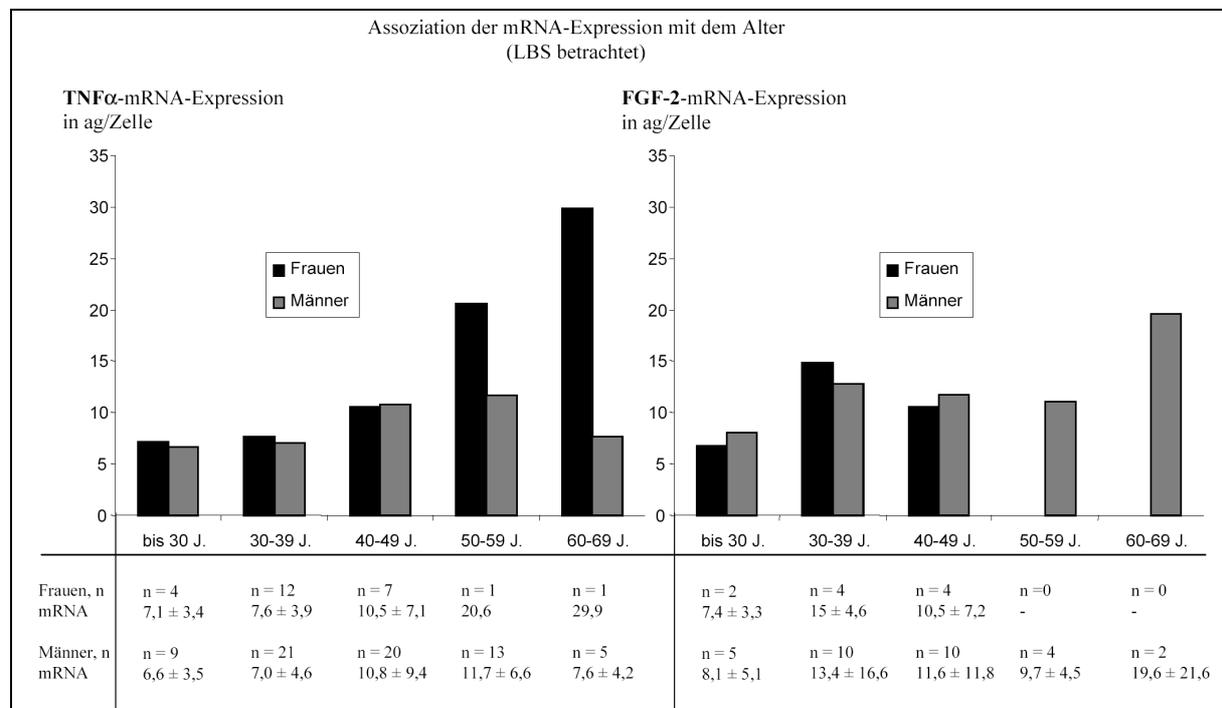
Gen (m+w)-Anzahl	mRNA- Gesamt (ag/Zelle)	Geschlecht		
		m	w	p (m vs. w)
<u>TNF<math>\alpha</math>:</u>				
Alle (208+80)	7,4 $\pm$ 6,3	7,5 $\pm$ 6,6	7,1 $\pm$ 4,7	n.s.
LBS (69+25)	9,3 $\pm$ 6,7	9,1 $\pm$ 6,7	9,7 $\pm$ 6,8	n.s.
KHK (84+11)	6,9 $\pm$ 6,2	7,1 $\pm$ 6,6	5,8 $\pm$ 2,0	n.s.
KOB (55+44)	6,2 $\pm$ 6,0	6,4 $\pm$ 6,4	5,8 $\pm$ 5,4	n.s.
p (LBS vs. KOB vs. KHK)	< 0,001	< 0,003	< 0,03	
<u>FGF-2:</u>				
Alle (179+58)	11,0 $\pm$ 10,6	10,7 $\pm$ 10,2	11,7 $\pm$ 11,4	n.s.
KHK (87+14)	13,1 $\pm$ 12,3	13 $\pm$ 11,2	14,2 $\pm$ 18,2	n.s.
LBS (31+10)	11,9 $\pm$ 11,1	11,9 $\pm$ 12,4	11,7 $\pm$ 5,9	n.s.
KOB (61+37)	8,1 $\pm$ 8,3	7,3 $\pm$ 6,9	9,4 $\pm$ 10,2	n.s.
p (LBS vs. KOB vs. KHK)	< 0,001	< 0,001	n.s.	

Weiterhin wurden die TNF $\alpha$ - und FGF-2-mRNA-Expressionen in Abhängigkeit vom Alter der Probanden untersucht. Dazu wurden die Probanden in 5 Altersklassen (1: bis 30 J., 2: 30-39 J., 3: 40-49 J., 4: 50-59 J. und 5: 60-69 J.) unterteilt und die Mittelwerte der TNF $\alpha$ - und FGF-2-mRNA-Expression berechnet. In allen untersuchten Probandengruppen wurde sowohl für die TNF $\alpha$ - als auch für FGF-2-mRNA-Expression keine signifikante Altersabhängigkeit beobachtet. Allerdings wurde in den LBS- und KOB-Gruppen eine Zunahme der TNF $\alpha$ -mRNA-Expressionswerte festgestellt, die aber keinen Signifikanzcharakter aufwies (Tab. 19).

**Tabelle 19:** Darstellung der mRNA-Expressionswerte der TNF $\alpha$ - und FGF-2-mRNA (ag/Zelle) in verschiedenen Altersklassen (bis 30J., 30-39J., 40-49J., 50-59J. und 60-69J.).

Gen	Altersklassen					p
	bis 30J.	30-40J.	41-50J.	51-60J.	61-70J.	
<b>TNF<math>\alpha</math>:</b>						
Alle (n=288)	7,3 $\pm$ 3,3	6,6 $\pm$ 4,2	7,9 $\pm$ 7,3	7,3 $\pm$ 6,7	8,8 $\pm$ 7,8	n.s.
LBS (n=94)	7,5 $\pm$ 3,4	7,2 $\pm$ 4,3	10,7 $\pm$ 8,8	12,3 $\pm$ 6,8	11,3 $\pm$ 9,9	n.s. (0,065)
KOB (n=99)	4,1	4,5 $\pm$ 2,6	3,8 $\pm$ 1,9	7,0 $\pm$ 6,6	9,4 $\pm$ 9,2	n.s. (0,068)
KHK (n=95)	7,9	7,3 $\pm$ 5,2	8,4 $\pm$ 7,3	5,9 $\pm$ 6,3	7,2 $\pm$ 5,2	n.s.
<b>FGF-2:</b>						
Alle (n=237)	10,9 $\pm$ 7,2	12,6 $\pm$ 14,3	10,0 $\pm$ 9,0	11,4 $\pm$ 12,7	10,6 $\pm$ 7,3	n.s.
LBS (n=41)	7,9 $\pm$ 4,4	13,9 $\pm$ 13,9	11,3 $\pm$ 10,4	9,7 $\pm$ 4,5	19,7 $\pm$ 21,6	n.s.
KOB (n=98)	13,6 $\pm$ 3,1	7,9 $\pm$ 9,2	6,7 $\pm$ 5,9	9,4 $\pm$ 10,7	6,9 $\pm$ 4,2	n.s.
KHK (n=98)	27,1	16,5 $\pm$ 18,5	11,1 $\pm$ 7,8	13,7 $\pm$ 14,7	13,0 $\pm$ 6,2	n.s.

Bei den LBS-Probanden wurde weiterhin die TNF $\alpha$ - und FGF-2-mRNA-Expression in den Altersklassen nach einer geschlechtlichen Trennung untersucht (Abb. 24).



**Abb. 24:** Altersabhängige Darstellung der TNF $\alpha$ - und FGF-2-mRNA-Expressionswerte bei LBS

Sowohl bei den weiblichen als auch bei den männlichen Probanden war eine Erhöhung der TNF $\alpha$ -mRNA-Expression mit dem Alter zu verzeichnen. Bei den Frauen war der Anstieg besonders deutlich nach Eintritt der Menopause (> 50 J.) ( $\leq$  50 J. vs. > 50 J.:  $8,4 \pm 5$  vs.  $25,3 \pm 6$  ag/Zelle;  $p < 0,03$ ) (Abb. 24).

Die TNF $\alpha$ - und FGF-2-mRNA-Expression wurde bei den KHK-Patienten zusätzlich unter Berücksichtigung der Schwere der Gefäßerkrankung, der Überlebenszeit nach einem MI und des Alters beim 1.MI untersucht. Es konnte keine Assoziation der mRNA-Expressionswerte zu den o.g. Kriterien festgestellt werden. Es konnten lediglich bei den Patienten mit Zwei- und Mehrgefäßerkrankung im Unterschied zu Patienten mit nur einem erkrankten Koronargefäß tendenziell höhere TNF $\alpha$ -mRNA-Expressionswerte gemessen werden (5 ag/Zelle bei Ein-GE vs. 7,8 und 7,3 ag/Zelle bei Zwei- und Mehr-GE; n.s.).

### 3.3.3. Assoziation der TNF $\alpha$ -mRNA und FGF-2-mRNA- bzw. Protein-Expression mit genetischen Daten der Probanden

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die TNF $\alpha$ - und FGF-2-mRNA-Expressionen mit genetischen Daten assoziiert. Für das FGF-2-Gen konnte zusätzlich die Proteinexpression gemessen und in die Auswertung mit einbezogen werden.

Bei der Untersuchung der funktionellen Auswirkungen der polymorphen Varianten des TNF $\alpha$ -Gens auf die TNF $\alpha$ -mRNA-Expression wurden die Probanden der drei Vergleichsgruppen LBS, KOB und KHK nach Geschlecht und Alter adjustiert. Es entstanden gleichgroße Gruppen von je 127 Probanden (81 Männer und 46 Frauen). Das Durchschnittsalter betrug bei den LBS 49,1 Jahre, bei den KOB-Patienten 50,3 Jahre und bei den KHK-Patienten 50,2 Jahre (Tab. 20). Dadurch konnten geschlechts- und altersabhängigen Verschiebungen zwischen den Untersuchungsgruppen in den weiteren Assoziationsuntersuchungen der Expressionswerte mit den Polymorphismen ausgeschlossen werden.

**Tabelle 20:** Zusammensetzung der untersuchten Gruppen nach der geschlechts- und altersangleichender Paarung.

Gruppen	n (gesamt)	n (Männer)	n (Frauen)	Durchschnittsalter		
				Gesamt	Männer	Frauen
LBS	127	81	46	49,1	47,9	51,2
KOB	127	81	46	50,2	48,9	52,5
KHK	127	81	46	50,3	49,5	51,6

Für die 2 TNF $\alpha$ -Polymorphismen c.1-857C>T und IVS3+51A>G konnte kein Zusammenhang mit der Genexpression nachgewiesen werden, die verschiedenen Genotypen hatten in den untersuchten Gruppen ähnliche Expressionswerte ( $p > 0,05$ ). Dagegen zeigten die 3 Promotorpolymorphismen c.1-238G>A, c.1-308G>A und c.1-863C>A eine deutliche Assoziation zur TNF $\alpha$ -mRNA-Expression. Im folgenden werden diese Ergebnisse dargestellt.

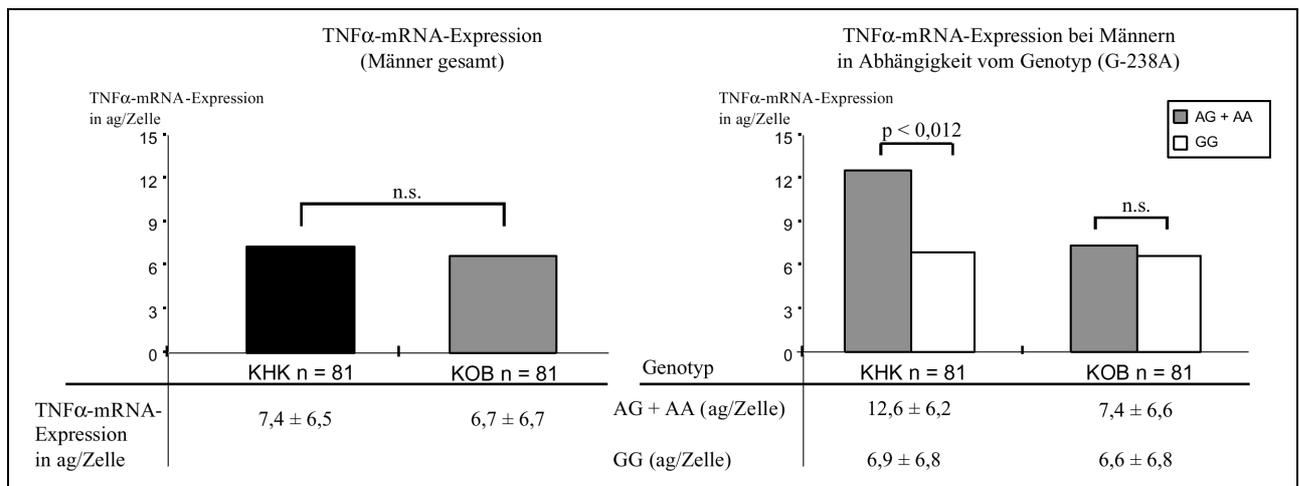
#### 3.3.3.1. Funktionelle Auswirkungen der polymorphen Varianten des TNF $\alpha$ -Gens

##### 3.3.3.1.1. Das A-Allel des c.1-238G>A-Polymorphismus von TNF $\alpha$ ist bei männlichen KHK-Patienten mit höheren TNF $\alpha$ -mRNA-Werten assoziiert

Untersucht wurde die Interaktion der c.1-238G>A-Genotypen mit der TNF $\alpha$ -mRNA-Expression bzw. mit der Risikokonstellation der Patienten mit koronarer Herzkrankheit. In die Studie wurden die beiden Patientengruppen mit angiographisch nachgewiesenem Koronarbefund, KOB und KHK, einbezogen. Die

weiblichen Probanden zeigten bezüglich des c.1-238G>A-Polymorphismus keinerlei mRNA-Expressionsunterschiede zwischen den Vergleichsgruppen KOB und KHK.

Die männlichen KHK-Patienten (n = 81) zeigten eine leicht höhere Expression als die männlichen KOB-Patienten (n = 81) (7,4 vs. 6,7 ag /Zelle; n.s.). Zur Überprüfung der Rolle des genetischen Hintergrunds wurden die Patientengruppen auf Assoziation der TNF $\alpha$ -mRNA-Expressionswerte mit der c.1-238G>A-Genotypverteilung untersucht. In beiden Gruppen hatten die mutanten A-Allelträger (AG + AA) im Vergleich zum Wildtyp GG höhere Expressionswerte. Bei den KOB-Patienten war der Unterschied in den mRNA-Werten bezüglich des Genotyps nicht groß (AG + AA: 7,4 vs GG: 6,6 ag/Zelle; n.s.). Dagegen wurde bei den KHK-Patienten eine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression bei den Trägern des mutanten A-Allels nachgewiesen (GA + AA: 12,6 vs. GG: 6,9 ag/Zelle; p < 0,012) (Abb. 25).



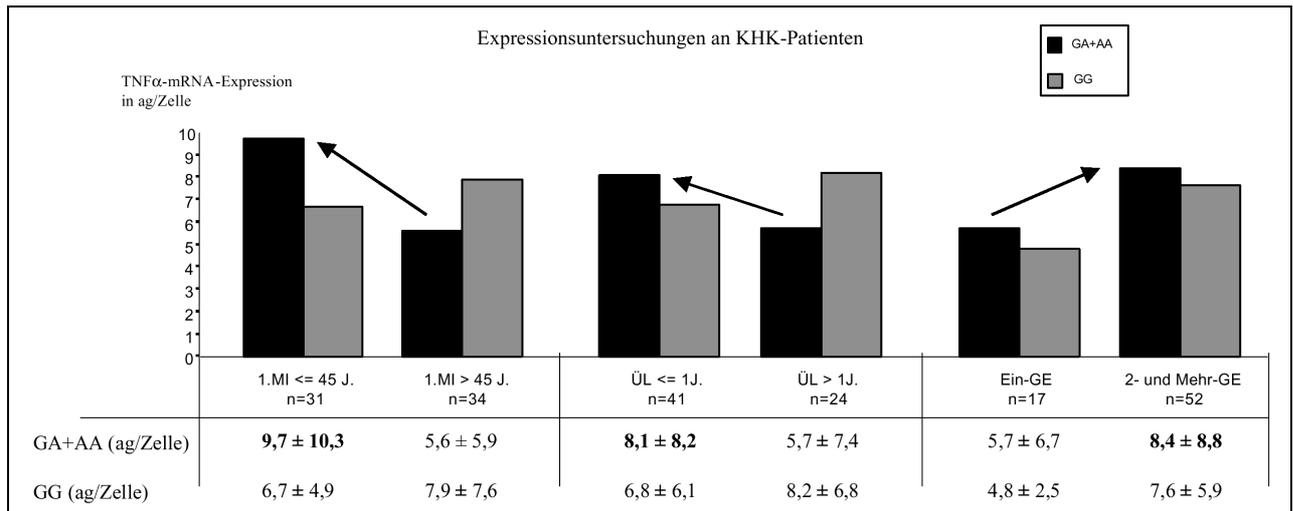
**Abb. 25:** TNF $\alpha$ -mRNA-Expression bei männlichen KHK- und KOB-Patienten bzw. die Assoziation der Expression mit der Genotypverteilung des c.1-238G>A-Polymorphismus.

### 3.3.3.1.2. Das A-Allel des c.1-308G>A-Polymorphismus von TNF $\alpha$ ist in den KHK-Subgruppen mit schwerwiegenderen Merkmalen mit höheren TNF $\alpha$ -mRNA-Werten assoziiert

Zur Untersuchung der Rolle des c.1-308G>A-Polymorphismus in der Risikokonstellation der koronaren Herzkrankheit wurden die Expressionswerte der TNF $\alpha$ -mRNA mit der Genotypverteilung assoziiert. In die Studie wurden die beiden Patienten-Gruppen mit angiographisch gesichertem Koronarbefund, KOB (77 Männer und 38 Frauen) und KHK (70 Männer und 32 Frauen), einbezogen.

Zur Überprüfung der Rolle des c.1-308G>A-Polymorphismus wurde innerhalb der Gruppen KHK und KOB die TNF $\alpha$ -mRNA-Expression in Abhängigkeit vom Genotyp gemessen (GG-Wildtyp vs. A-Allelträger). Die Unterschiede waren in beiden Gruppen minimal (GG vs. GA+AA in KHK: 7,4 vs. 7,1 ag/Zelle, n.s.; in KOB: 6,3 vs. 6,4 ag/Zelle, n.s.).

Zur näheren Untersuchung wurde die KHK-Gruppe weiter differenziert: nach dem Manifestationsalter der KHK, nach der Überlebensdauer nach einem MI und nach der Anzahl der sklerotisierten Herzgefäße. Es wurde ermittelt, dass die A-Allelträger in den Subgruppen mit schwerwiegenderen Merkmalen (1.MI  $\leq$  45 Jahre,  $\ddot{U}L \leq$  1Jahre, 2- und Mehrgefäßerkrankung) eine höhere Expression der TNF $\alpha$ -mRNA aufwiesen als die A-Allelträger in den Vergleichsgruppen (1.MI > 45 Jahre,  $\ddot{U}L >$  1Jahre, Eingefäßerkrankungen), bzw. höhere Expression aufwiesen als die GG-Träger der gleichen Subgruppe (tendenziell) (Abb. 26).

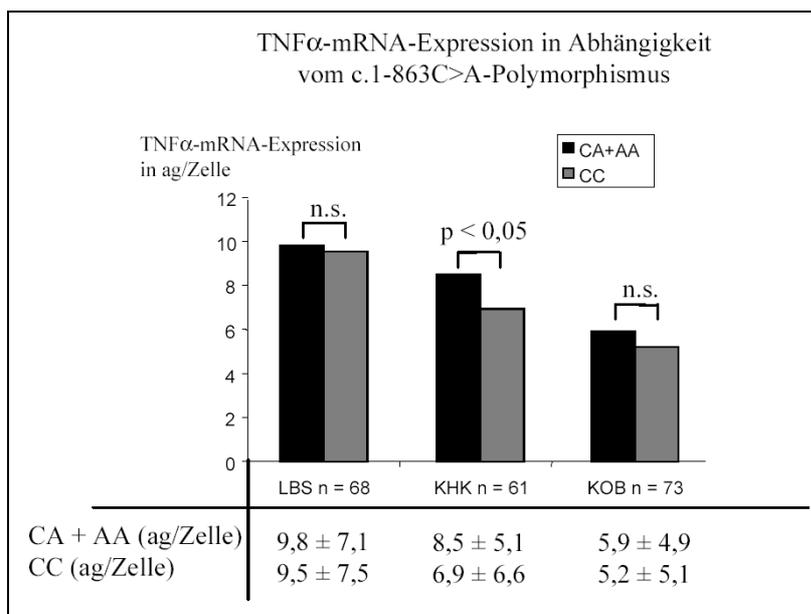


**Abb. 26:** Darstellung der TNF $\alpha$ -mRNA-Expressionswerte bezüglich des c.-308G>A-Polymorphismus in den Subgruppen der KHK-Patienten.

### 3.3.3.1.3. Das A-Allel des c.1-863C>A-Polymorphismus von TNF $\alpha$ ist in der KHK-Gruppe mit höheren TNF $\alpha$ -mRNA-Werten assoziiert

Die Assoziation der TNF $\alpha$ -mRNA mit dem Promotorpolymorphismus c.1-863C>A konnte an 68 Blutspendern, 61 KOB-Patienten und 73 KHK-Patienten untersucht werden.

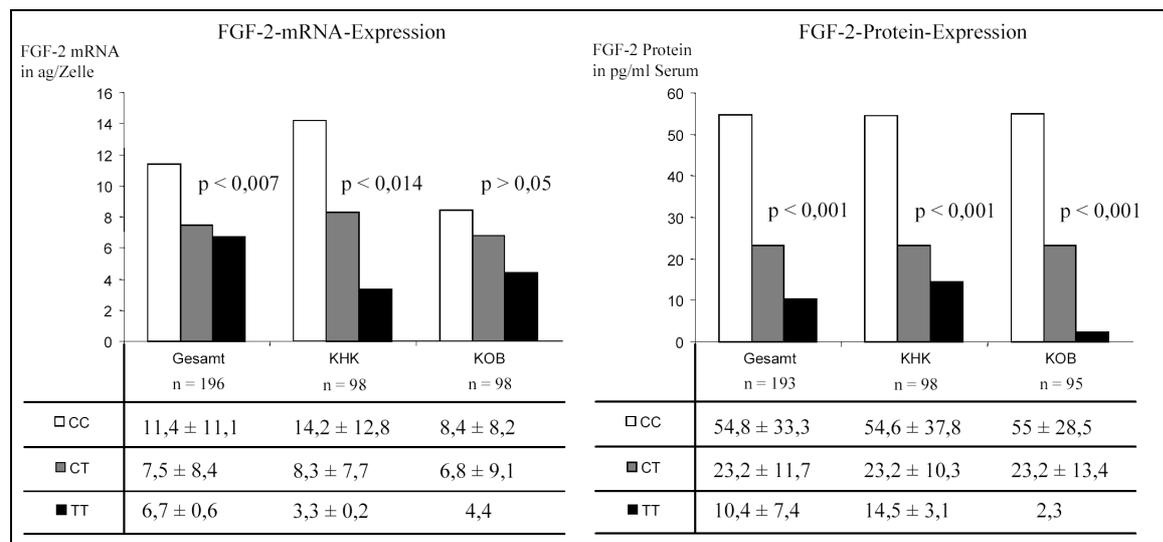
Beim Vergleich der Expressionswerte der mutanten A-Allelträger (CA+AA) mit den homozygoten Wildtypträgern (CC) konnte in allen untersuchten Gruppen (LBS, KOB und KHK) eine Erhöhung der mRNA-Expression bei den (CA+AA)-Trägern beobachtet werden. In der Gruppe der KHK-Patienten war diese Differenz signifikant (KHK: 8,5 vs. 6,9 ag/Zelle,  $p < 0,05$ ; LBS: 9,8 vs. 9,5 ag/Zelle, n.s.; KOB: 5,9 vs. 5,2 ag/Zelle, n.s.) (Abb. 27).



**Abb. 27:** Darstellung der Expressionswerte der TNF $\alpha$ -mRNA in den Gruppen LBS, KOB und KHK in Abhängigkeit vom c.1-863C>A-Polymorphismus.

### 3.3.3.2. Funktionelle Auswirkungen des c.223C>T-Polymorphismus von FGF-2 bei den KOB- und KHK-Patienten

Bei den KHK- und KOB-Patienten wurde die FGF-2-mRNA und -Proteinexpression in Abhängigkeit vom c.223C>T-Polymorphismus untersucht. Sowohl bei der Betrachtung aller Patienten, als auch in den einzelnen Gruppen wurde eine strenge Assoziation der mRNA- und der Proteinexpression des FGF-2-Gens mit Genotypverteilung des c.223C>T-Polymorphismus nachgewiesen. Die homozygoten Wildtypträger CC hatten in allen Gruppen die höchste FGF-2-mRNA- und Proteinexpression. Bei den homozygoten Mutanten TT wurde die niedrigste FGF-2-mRNA- und Proteinexpression gemessen. Mittels Assoziationsstudie wurde für die FGF-2-mRNA- und Proteinexpression bei den KHK-Patienten eine positive Assoziation ermittelt ( $p < 0,001$ ) (Abb. 28).



**Abb. 28:** Darstellung der FGF-2-mRNA- und Proteinexpression in Assoziation mit der Genotypverteilung des c.223C>T-Polymorphismus im FGF-2-Gen.

### 3.3.3.3. Korrelation der TNF $\alpha$ - und FGF-2-mRNA-Expression

Mittels Korrelationsanalysen wurde überprüft, ob die mRNA-Expressionen der funktionell gekoppelten Gene TNF $\alpha$  (Initialzytokin) und FGF-2 voneinander abhängig seien. Die mRNA-Expressionen der einzelnen Probandengruppen LBS, KOB und KHK wurden in Beziehung gesetzt. Zusätzlich wurde untersucht, ob eine Korrelation bei den Männern oder Frauen zu beobachten sei. Alle analysierten Daten zeigten, dass es keine Abhängigkeit zwischen FGF-2-mRNA- und TNF $\alpha$ -mRNA-Expression bestand.

### 3.3.3.4. Assoziation des IVS6-86G>T-Polymorphismus von HSPG-2 mit FGF2-mRNA- und Protein-Expression

Da HSPG-2 einen Co-Faktor des FGF-2-Stoffwechsels darstellt, wurden die IVS6-86G>T-Genotypen in Patientengruppen KOB und KHK bezüglich ihrer Auswirkung auf die FGF-2-Expression untersucht. Die TT-Genotypträger zeigten in beiden untersuchten Gruppen im Vergleich zu den GG+GT-Trägern leicht erniedrigte FGF-2-mRNA- und Protein-Expressionswerte, die jedoch keinen Signifikanzcharakter aufwiesen (FGF-2-mRNA-Expression: 6,7 ag/Zelle bei TT- vs. 10,5 ag/Zelle bei GG+GT-Trägern,  $p > 0,1$ ; FGF-2-Protein-Expression: 44,8 pg/ml bei TT- vs. 50,5 pg/ml bei GG+GT-Trägern,  $p > 0,5$ ). Wegen unzureichender Anzahl an phänotypisierten Fällen wurden die LBS-Probanden aus dieser Untersuchung ausgeschlossen.

### 4. Diskussion

Kardiovaskuläre Erkrankungen gehören zu den chronischen degenerativen Erkrankungen, die durch ihren komplexen und multifaktoriellen Charakter gekennzeichnet sind. In letzter Zeit wird neben den klassischen Risikofaktoren wie Rauchen, ungesunde Ernährung, Stress, Hypertonie, *Diabetes mellitus* oder männliches Geschlecht den genetischen Risikofaktoren, die die genetische Prädisposition eines Individuums für Atherosklerose ausmachen, erhöhte Aufmerksamkeit beigemessen (Braun et al., 1998; Schulz, 2000; Wang et al., 2000; King et al., 2002; Nicaud et al., 2002). Am Prozess der Atherosklerose sind zahlreiche Gene bzw. Genprodukte beteiligt, die u.a. solche Vorgänge wie Inflammation, Zellproliferation, Zellmigration, Zellkoagulation, Lipidakkumulation, Endotheldysfunktion verursachen oder mit beeinflussen. Die Untersuchung solcher Kandidatengene bzw. die Assoziation der genetischen Daten mit den klinischen stellt in neuster Zeit einen wichtigen Schwerpunkt vieler medizinisch-genetischer Studien in der Atheroskleroseforschung dar.

In der vorliegenden Arbeit wurden an gesunden Kontrollprobanden (n = 313) und an Patienten mit schweren kardiovaskulären Erkrankungen (KHK-Patienten: n = 264; KOB-Patienten: n = 135) einer Mitteldeutschen Population wichtige Faktoren der Inflammation (TNF $\alpha$  und TNF $\beta$ ), des Zellwachstums bzw. der Angiogenese (FGF-2, HSPG-2), des Homocysteinstoffwechsels (MTHFR) und des NO-Stoffwechsels (NOS-3) untersucht.

#### 4.1. Differenzierung des Patientenkollektivs

In der vorliegenden Studie wurden genomische und funktionelle Untersuchungen an gesunden Langzeitblutspendern und an zwei Patientenkollektiven mit koronarangiographischem Befund durchgeführt. Zum einen waren das Patienten mit angiographisch gesicherter koronaren Herzkrankheit (KHK). Diese Gruppe wurde weiterhin für die Ermittlung des individuellen, genetischen Risikoprofils der Patienten in klinisch relevante Subgruppen eingeteilt. Die Entwicklung der Atherosklerose ist als ein stark altersabhängiger Prozess zu betrachten (Ross et al., 1999). Bei Patienten, die im juvenilen Lebensalter erkranken, ist der mögliche Einfluss von genetischen Risikomarkern im atherosklerotischen Geschehen deutlich größer zu vermuten. Aus diesem Grund wurde die gesamte KHK-Gruppe nach dem Manifestationsalter bei erstem Myokardinfarkt ( $\leq 45$ ,  $>45$  Jahre) entsprechend klinischer Erfahrungswerte unterteilt. Eine weitere Differenzierung der KHK-Patienten wurde hinsichtlich ihres Adaptationsvermögens nach erlittenem MI vorgenommen. Als Marker hierfür wurde zum einen die Überlebenschance der Patienten nach koronarem Ereignis herangezogen. Die durchschnittliche Mortalität der hospitalisierten Patienten ist im ersten Jahr nach koronarem Ereignis ca. 10 %, in allen weiteren Jahren bei ca. 3 % (Siegentahler et al., 1992). Unter Berücksichtigung dieser Daten wurde die KHK-Gruppe in eine Hochrisikogruppe (Patienten, die den MI bisher bis zu einem Jahr überlebt hatten) und in eine Gruppe der Langzeitüberlebenden (Patienten, die den MI länger als ein Jahr überlebt hatten) unterteilt. Die Patienten der Hochrisikogruppe hatten den MI durchschnittlich 2,8 Monate überlebt. Die Gruppe der Langzeitüberlebenden (1.MI bereits durchschnittlich 7,1 Jahre überlebt), stellte im Gegensatz zur Hochrisikogruppe eine positive Selektion der Patienten mit einem besseren Adaptationsvermögen nach stattgefundenem MI dar. Nach Siegentahler et al. (1992) wären demnach nach diesen 7,1 Jahren durchschnittlich 75 % der Patienten mit guter Überlebenschance anzutreffen, während bereits ca. 25 % der nach MI klinisch versorgten Patienten vor diesem Zeitpunkt aufgrund ungünstiger individueller Konstellation verstorben wären. Die KHK-Gruppe wurde außerdem nach der Schwere des koronaren Ereignisses in Patienten mit ein, zwei oder mehreren durch signifikante Stenosen betroffenen Gefäße unterteilt. Die in der vorliegenden Studie untersuchten Patienten

mit Mehrgefäßerkrankung zeigten bessere Überlebenschance nach MI als die Patienten mit 1- oder 2-Gefäßerkrankung.

Zum anderen wurden Patienten untersucht, die einen angiographisch gesicherten normalen Koronarstatus aufwiesen (KOB-Gruppe). Diese Patienten wurden wegen psychogenen Brustschmerzen, Herzklappenvitien, atypische Angina pectoris Beschwerden oder Kardiomyopathie einer Angiographie unterzogen, zeigten aber keinerlei atherosklerotisch veränderte Koronarien. Im Vergleich zu den KHK-Patienten zeigten die KOB-Patienten gleich hohe BMI-Werte, waren im Durchschnitt um etwa 2 Jahre älter und zeigten ähnlich hohen Anteil an Hypertonikern und Personen mit *Diabetes mellitus*. Im Unterschied zu den KHK-Patienten hatten die KOB-Patienten signifikant niedrigeren Anteil an Rauchern und zeigten bessere Werte des Lipidstoffwechsels (LDL, Triglyceride, Lp (a)) bzw. des Gerinnungsparameters Fibrinogen. Die KOB-Gruppe wurde neben den Langzeitblutspendern als zweite Kontrollgruppe in die Auswertungen herangezogen. Als koronar glatte Patienten mit intakten Herzgefäßen dienten die KOB-Probanden bei den Untersuchungen als „Organ-bezogene“ Kontrollgruppe.

Die LBS-Gruppe stellte im Vergleich zu den KOB-Probanden bei den Auswertungen die „metabolische“ Kontrollgruppe dar, die mindestens 3 Jahre unter ärztlicher Kontrolle keine klinischen Auffälligkeiten aufwies. Somit konnten die bei den KHK-Patienten ermittelten klinischen und genetischen Risikoparameter der Atherosklerose in Kontrast zu den beiden Referenzgruppen diskutiert werden. Da die LBS-Gruppe keiner Angiographie unterzogen wurde, ist nicht auszuschließen, dass darunter auch Personen waren, die bereits atherosklerotische Läsionen im frühen beschwerdefreien Stadium besaßen oder im späteren Lebensalter eine koronare Atherosklerose entwickeln würden.

## **4.2. Charakterisierung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden**

### **4.2.1. Identifizierung von genomischen Varianten mittels SSCP-Analyse**

Es gibt eine Reihe von verschiedenen zytogenetischen und molekularbiologischen Methoden, die Identifizierung von unbekanntem polymorphen Strukturen im humanen Genom ermöglichen. Die von Orita et al., (1989a; 1989b) etablierte SSCP-Analyse stellt eine spezifische und reproduzierbare Methode dar, welche zur Suche nach kleineren genomischen Veränderungen wie Insertion, Deletion bis hin zur Substitution nur einer Base bestens geeignet ist. Im Vergleich zu anderen „Screening“-Methoden bietet die SSCP-Analyse sowohl gerätespezifische als auch methodische Vorteile. Es müssen keine speziellen gerätetechnischen Anforderungen beachtet werden wie z.B. bei der Anwendung von Temperaturgradienten-Gelelektrophoresen. Es werden keine optimierten chemischen Gradientengele wie z.B. bei der denaturierenden Gradientengelelektrophorese benötigt (Myers et al., 1985; Fernandez et al., 1993). Mit Hilfe der SSCP-Analyse können sowohl heterozygote als auch homozygote Genotypträger identifiziert werden, während dies z.B. bei der vielpraktizierten Heteroduplexanalyse nicht der Fall ist (White et al., 1992). Der methodisch komplizierte Umgang mit RNA wie bei der „RNase A Cleavage“-Methode (Goldrick et al., 1996) entfällt bei der SSCP-Analyse. Diese Methode ermöglicht ohne großen Material-, Zeit- und Arbeitsaufwand größere Probandengruppen zu untersuchen. Die Sensitivität der SSCP-Methode läßt sich durch variieren der PCR-Produktgrößen (150-300 bp), der Temperatur (4 bis 20 °C) oder durch Zusätze wie Glycerin verbessern. Die Visualisierung der zu untersuchenden DNA-Fragmente kann mittels einfach auszuführender Markierungsmethoden, wie z.B. Silberfärbung, erfolgen. Dadurch wird die Arbeit mit radioaktiven Markern oder die apparativ aufwendige Fluoreszenz-Detektion vermieden.

Die SSCP-Methode konnte bereits erfolgreich bei klinischen Fragestellungen, unter anderem bei der Suche nach Onkogen-Veränderungen (Katagiri et al., 1998) oder bei der Identifizierung von Polymorphismen in

Kandidatengenese bei kardiovaskulären Erkrankungen (Foy et al., 1997; Herrmann et al., 1998; Schulz et al., 2002) angewandt werden.

### 4.2.2. Quantifizierung der mRNA-Expression mittels kompetitiver PCR

Für die Bestimmung der *ex vivo* mRNA-Expression der Gene TNF $\alpha$  und FGF-2 in nativen zirkulierenden humanen Monozyten aus Armvenenblut wurde im Rahmen der vorliegenden klinischen Studie die kompetitive PCR, eine hoch sensitive Methode zur Quantifizierung spezifischer Nukleinsäure-Sequenzen, angewandt (Clementi et al., 1993). Die kompetitive PCR erlaubt aufgrund der Koamplifikation der Target-DNA mit einer bekannten Standard-DNA-Menge eine im Vergleich zu alternativen Methoden (Northernblot-Hybridisierung, Einsatz von gewebspezifischen „housekeeping“ Genen) eine genauere Bestimmung der mRNA-Expression des jeweiligen Gens in den untersuchten Zellen. Für die Gene TNF $\alpha$  und FGF-2 wurden spezifische RT- und PCR-Primer ausgewählt und die Reaktionsbedingungen optimiert. Die Quantifizierung der TNF $\alpha$ - und FGF-2-mRNA wurde durch aliquotierte, laborinterne Standard-RNA (gepoolt von gesunden Langzeitblutspendern) unter Einsatz um 48bp (TNF $\alpha$ ) bzw. um 94bp (FGF-2) gegenüber den Targets verkürzter Standard-Fragmente kontrolliert. Die Wahl der Targetgrößen von 600bp (TNF $\alpha$ ) bzw. 597bp (FGF-2) erfolgte in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Rolfs et al. (1992) so, dass von einer gleichen Amplifikations-Effizienz von Target und Standard ausgegangen werden konnte. Der optimale messbare RNA-Bereich für die untersuchten Gene (200ng für TNF $\alpha$ - und 600 ng für FGF-2-mRNA-Quantifizierung) wurde mit Hilfe einer Standardverdünnungsreihe mit dem Verdünnungsfaktor 10 eingegrenzt. Um möglichst exakte Ergebnisse zu erzielen wurde bei jeder quantitativen PCR-Reaktion eine Standard-Verdünnungsreihe (8 verschiedene Konzentrationen) zur unbekanntem Menge an Target zugesetzt. Der ermittelte methodische Fehler dieser spezifischen kompetitiven PCR's (von der Zellisolierung über RNA-Präparation, reverse Transkription, kompetitive PCR bis zur Agarose-Elektrophorese und anschließender densitometrischer Auswertung des Gels) lag bei weniger als 10 %. Die Tag zu Tag-Schwankungen dieser Methode von ca. 7 % wurden mit Hilfe einer aliquotierten laborinternen Standard-RNA aus quantitativen Messungen an 10 Tagen ermittelt. Im Vergleich zu in der vorliegenden Arbeit eingesetzten quantitativen PCR-Methode ist bei der Northernblot-Hybridisierung eine Mindestzahl von  $10^5$ - $10^6$  Molekülen pro Probe nötig. Deshalb ist hier nur eine semiquantitative Anwendung zum Nachweis größerer Expressionsunterschiede möglich (Köhler et al., 1995). Ebenso ist die Koamplifikation eines gewebspezifischen oder ubiquitären Gens bei der Quantifizierung mittels PCR als eine nur semiquantitative Methode anzusehen. Der Grund dafür ist die ungleiche Effizienz der unterschiedlichen Primer und eine möglicherweise stattfindende Koregulation des zu untersuchenden Gens mit den eingesetzten Vergleichsgenen (Dukas et al., 1993).

### 4.2.3. Quantifizierung der Proteinexpression mittels ELISA

Die ELISA-Technik (*enzyme-linked immuno-stimulated assay*) beruht auf einem Enzym-gebundenen Immunoassay. Im Fall einer einfachen kompetitiven ELISA-Anwendung, wie in der vorliegenden Arbeit dargestellt, wird der Antikörper an eine Unterlage (z.B. Polystyrol) in Mikrotiterplatten adsorbiert und mit entsprechendem Antigen gemischt. Die weitere Zugabe eines Enzym-beladenen (z.B. alkalische Phosphatase) Antigens bekannter Konzentration mit entsprechendem Enzymsubstrat (z.B. p-Nitrophenylphosphat) ermöglicht eine kompetitive Bindungsreaktion am Antikörper. Die Konzentration des umgesetzten Enzymsubstrates entspricht der Menge des Enzym-beladenen Antigens und steht in inverser

Beziehung zum Antigengehalt der Probe (Häder und Häder, 1993). Mit Hilfe einer Eichkurve wird die unbekannte Antigenkonzentration ermittelt. Neben ELISA gibt es zahlreiche andere Methoden der Proteinmessung, wie Dot- oder Western-Blotting-Analyse, HPLC (*high performance liquid chromatography*, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) und Proteinbestimmung nach Lowry oder Bradford. Die Dot- oder Western-Blotting-Analyse gehören zu den indirekten immunologischen Protein-Nachweismethoden. Die Sensivität der indirekten Methoden ist abhängig vom Titer der Primär- bzw. Sekundär-Antikörper sowie vom Verstärkereffekt und der Empfindlichkeit des Detektionssystems (Ramlau, 1987). Die HPLC-Methode zeichnet sich gegenüber anderen Methoden durch hohe Auflösung (Proteinmengenangaben in ng-fg/ml-Bereich möglich) und Automation aus (Mant und Hodges, 1991; Meyer, 1988). Allerdings wird bei einer HPLC-Methode jede Probe separat untersucht, was einen größeren Zeitaufwand als die ELISA-Methode mit sich bringt. Außerdem bedarf es bei einer HPLC einer kostenaufwendigeren Apparatur. Photometrische Proteinbestimmungen nach Lowry (1951) oder nach Bradford (1976) zählen ebenfalls zu häufig eingesetzten Methoden. Manche Reduktionsmittel wie EDTA, Tris oder Tannine, die bei photometrischen Methoden eingesetzt werden, können Störungen bei der chemischen Reaktion bewirken und zu falschen Messergebnissen führen (Häder und Häder, 1993). Diese beiden photometrischen Tests eignen sich für Proteinkonzentrationen zwischen 5 und 50 µg (Häder und Häder, 1993) und sind damit weniger sensitiver als die ELISA-Methode (Messungen im pg/ml Serum möglich).

Zur Ermittlung der FGF-2-Proteinexpression wurde ein kommerziell hergestellter ELISA-Kit für humanes FGF-2 verwendet. Die Reaktion wurde nach dem Hersteller-Protokoll durchgeführt. Um die Fehlerquote der Messungen zu minimieren wurde für alle Proben eine Doppelbestimmung durchgeführt. Um die Schwankungen der Methode zu berücksichtigen wurde bei jeder Reaktion ein laborinterner Standard mit bekannter Konzentration mitgeführt. Zusätzlich wurde die Tag zu Tag-Schwankung anhand von Expressionsmessungen eines Standards mit bekannter Konzentration an 8 verschiedenen Tagen ermittelt. Der methodische Fehler der ELISA-FGF-2-Proteinmessung lag bei 10,8 %.

### **4.3. Inflammationsfaktoren TNF $\alpha$ , TNF $\beta$**

Atherosklerose stellt eine Krankheit dar, bei der von ihrem Ursprung bis hin zu den Komplikationen inflammatorische Zellen (Monozyten, Makrophagen, T-Lymphozyten), inflammatorische Proteine (Zytokine, Chemokine) und inflammatorische Prozesse (Expression der Adhäsionsmoleküle von Endothelzellen der Gefäßwand) nachweisbar sind (Wallsh et al., 1986; Alexander et al., 1994; van der Wall et al., 1994; Fuster et al., 1997; Mehta et al., 1998; Ross et al., 1999).

Primäre Zytokine (TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , IL-1), Chemokine (IL-8, MCP-1), Wachstumsfaktoren (FGF-2, HSPG-2) und Adhäsionsmoleküle (Selektine, ICAM-1, VCAM-1) werden während des Atheroskleroseprozesses von den aktivierten inflammatorischen Zellen, glatten Muskelzellen und Endothelzellen als Antwort auf solche proinflammatorische Stimuli wie oxidiertes LDL, freie Radikale, Rauchen, erhöhte Konzentrationen an Homocystein und infektiöse Organismen kontinuierlich produziert (Alexander et al., 1994, Liao et al., 1998, Mehta et al., 1998, Kinlay et al., 1998, Ross 1999). Proinflammatorische Risikofaktoren verursachen lokal in den Gefäßen oder systemisch im ganzen Organismus eine entzündliche Reaktion, welche mit der weiteren Produktion sekundärer Zytokine (IL-6) und Akut-Phase-Proteine (CRP, SAA, Fibrinogen) verbunden ist (Gabay et al., 1999; Castell et al., Montavi et al., 1997; Kinlay et al., 1998; Bochner et al., 1991; Aggaval et al.).

Die pathogene Erhöhung der Zytokinproduktion wird als Ursache oder Merkmal vieler autoimmuner (rheumatische Arthritis, Morbus-Crohn-Krankheit), infektiöser (cerebrale Malaria), aber auch

kardiovaskulärer Erkrankungen diskutiert (u.a. Fettsucht bzw. damit verbundene Insulinresistenz, Atherosklerose, Myokardinfarkt, Herzinsuffizienz, ischämische Herzerkrankung) (Elliot et al., 1994; Jakob et al., 1990; van Dullemen et al., 1995; McGuire et al., 1994; Cabrera et al., 1995; Hotamisligil et al., 1993, 1994; Jovinge et al., 1998). Messung dieser Inflammationsmediatoren bei einer Person ermöglicht eine Aussage über deren Inflamationsstatus (Libby et al., 1999; Montavi et al., 1997).

Es gibt zahlreiche Hinweise, dass die Expression mancher Zytokine, wie z.B. TNF $\alpha$ , genetisch determiniert ist, d.h. dass polymorphe genetische Varianten des kodierenden Gens die Transkription bzw. die zelluläre Sekretion beeinflussen könnten (Bendzen et al., 1988; Pociot et al., 1993; Jakob et al., 1990). Außerdem gibt es Anhaltspunkte dafür, dass TNF $\alpha$ -Produktion vorwiegend transkriptionell reguliert wird (Sariban et al., 1988; Horiguchi et al., 1989; Collart et al., 1990; Goldfeld et al., 1990; Raabe et al., 1998), was ebenso vermuten läßt, dass Promotorpolymorphismen eine besondere Rolle bei der TNF $\alpha$ -Expression spielen könnten (Skoog et al., 1999). Die Untersuchung polymorpher Varianten eines inflammatorischen Risikofaktors und die Assoziation dieser genetischen Daten mit den medizinischen Befunden stellt deshalb einen essentiellen Schritt bei der Ermittlung der Risikokonstellation eines Individuums mit kardiovaskulärer Erkrankung dar.

#### **4.3.1. TNF $\alpha$ -Polymorphismen, TNF $\alpha$ -Transkription und Manifestation der Atherosklerose**

Das am meisten und am besten untersuchte Zytokin bei kardiovaskulären Erkrankungen ist das TNF $\alpha$ . Mittlerweile gibt es ausreichend Anhaltspunkte, die dafür sprechen, dass TNF $\alpha$  einer der Hauptmoderatoren der entzündlichen Prozesse bei Atherosklerose ist und einen bedeutenden Risikofaktor darstellt. Frühere Experimente an kultivierten Adipozyten zeigten, dass erhöhte Mengen an TNF $\alpha$  die Lipoproteinlipase- und die 7 $\alpha$ -Hydrolase-Aktivität hemmen und dadurch zur Hypertriglyceridämie führen bzw. die Erhöhung der Fettsäure-*de novo*-Synthese in der Leber induzieren (Morin et al., 1995; Starnes et al., 1988; Feingold et al., 1992, 1996). Außerdem scheint TNF $\alpha$  eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung einer Insulinresistenz bei adipösen Personen zu spielen, indem es die Insulin-Rezeptor-Signalvermittlung durch Reduktion der Insulin-stimulierten Autophosphorylierung bzw. der Tyrosin-Kinase-Aktivität abschwächt (Hotamisligil et al., 1994, 1996). Weitere Studien belegen, dass TNF $\alpha$  über die Stimulation der Wachstumsfaktoren und Chemokine bzw. über die Teilnahme an der Synthese und Stimulation der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin direkt an der Endothelfunktion beteiligt ist (Lopez-Virella et al., 1994; Paleolog et al., 1994; Munker et al., 1986; Pober et al., 1986; Couffinhal et al., 1994; Thorne et al., 1996; Krishnaswamy et al., 1999). Nawroth et al. (1986) wiesen darauf hin, dass TNF $\alpha$  die Aktivität der prokoagulatorischer Faktoren wie PAI-1 verstärkt bzw. in den antithrombotischen Stoffwechselweg des C-Proteins in Endothelzellen störend eingreift und damit den Thromboseprozess beschleunigt. Barath et al. (1990) fanden TNF $\alpha$  in 88 % der atherosklerotische Läsionen, wobei das normale Gewebe völlig frei von TNF $\alpha$  war. Mehrere Studien berichten über eine nachweisbare Erhöhung der Anzahl der T-Zellen (10fach) bzw. ihrer Aktivität (um 70 %) und eine damit verbundener Erhöhung der Zytokinproduktion beim Vorliegen einer Atherosklerose (Wick et al., 1995; Xu et al., 1990; Ross et al., 1993).

Mittlerweile konnten einige der TNF $\alpha$ -Polymorphismen mit der Manifestation kardiovaskulärer Erkrankungen assoziiert werden.

#### 4.3.1.1. c.1-308G>A-Polymorphismus

Der erstmalig von Wilson et al. (1992) beschriebene Promotorpolymorphismus c.1-308G>A des TNF $\alpha$  wurde bei kardiovaskulären Erkrankungen am häufigsten untersucht. Viele Indizien sprechen dafür, dass dieser Polymorphismus an der Regulation der TNF $\alpha$ -Expression und damit an der Risikokonstellation der Atherosklerose stark beteiligt ist. Zahlreiche Studien belegen die Assoziation des mutanten A-Allels mit der Erhöhung der TNF $\alpha$ -Produktion bzw. mit der Erhöhung des Atheroskleroserisikos.

Kroeger et al. (1996) haben als erste bei humanem TNF $\alpha$  eine Region im Promotor (-323 bis -285) identifiziert, welche die transkriptionelle Aktivität dieses Gens beeinflussen kann. Diese Region beinhaltet eine 10 bp-lange Sequenzhomologie zur „consensus“-Bindungsstelle des Transkriptionsaktivator-Proteins AP-2, welche den c.1-308G>A-Polymorphismus umschließt. Im gleichen Jahr beschrieben Brinkman et al. (1996) eine Enhancer-Region im TNF $\alpha$ -Promotor (-519 bis +108), welche ebenfalls den c.1-308G>A-Polymorphismus beinhaltet, und stellten fest, dass die A-Allelträger größere Malaria-Anfälligkeit aufwiesen. Beide Studien lassen vermuten, dass die polymorphen Strukturen eine Änderung der Bindungsfähigkeit der Transkriptionsaktivatoren bzw. Reportergene verursachen und dadurch die gesamte Expression des Gens beeinflussen könnten. Wilson et al. (1997) versuchten den TNF $\alpha$ -c.1-308G>A-Polymorphismus mit der Expression des TNF $\alpha$  zu assoziieren. Sie konnten mittels „*footprint*“-Analysen feststellen, dass das mutante A-Allel in humanen B-Zelllinien ein stärkerer Transkriptionsaktivator als das G-Wildtyp-Allel sowohl bei der konstitutiven als auch bei der induzierbaren TNF $\alpha$ -Expression ist. Herrmann et al. (1998) ist es erstmals gelungen, in einer großen Assoziationsstudie an Myokardinfarktpatienten (n=641) und gesunden Kontrollen (n=170) zu zeigen, dass A-Allelträger häufiger einen Reinfarkt erlitten und einen schlechteren BMI (>26,3) aufwiesen. Damit ist es ihnen gelungen, den c.1-308G>A-Polymorphismus mit Herzkreislaufkrankungen zu assoziieren. Die nachfolgenden Arbeiten von Padovani et al. (2000), Wang et al. (2000), Keso et al. (2001), Nicaud et al. (2002) und King et al. (2002), welche sich u.a. mit der Assoziation des c.1-308G>A-Polymorphismus mit pathogenen Merkmalen der kardiovaskulären Erkrankungen beschäftigen, bestätigen die Vermutung, dass das -308/A-Allel mit einer höheren Prädisposition zur Fettleibigkeit, zur Insulinresistenz, zur Entwicklung fibröser Läsionen oder Verkalkungen der koronaren Gefäße bzw. zum Myokardinfarkt und zur Atherosklerose im allgemeinen assoziiert seien.

Die vorliegenden Ergebnisse der Mitteldeutschen humanen *ex vivo* Untersuchung bestätigen zum Teil Resultate der erwähnten Studien. Im Einklang mit vorhergehenden Arbeiten konnte einerseits festgestellt werden, dass das mutante A-Allel in der Gruppe der Patienten mit angiographisch gesicherter koronarer Herzkrankheit im Vergleich zur Gruppe der gesunden Blutspender signifikant häufiger vorkommt (32,4 % vs. 20,2 %; p<0,05). Außerdem zeigten die Expressionsanalysen an der TNF $\alpha$ -mRNA, dass unter den A-Allel tragenden KHK-Patienten diejenigen mit schwerwiegenderen Merkmalen, wie frühzeitige MI-Manifestation ( $\leq$  45 Jahre), kurze Überlebenszeit nach einem MI ( $\leq$  1 Jahr) und 2-bis Mehrgefäßerkrankungen eine höhere TNF $\alpha$ -mRNA-Expression aufwiesen (tendenziell, p>0,05) als die Patienten mit besserer Adaptation nach einem koronaren Ereignis bzw. späterer Manifestation der Krankheit. Dass das mutante A-Allel generell mit höheren TNF $\alpha$ -mRNA-Expressionen assoziiert sei, war in der untersuchten Mitteldeutschen Population nicht nachweisbar. Sowohl in der Gesamtgruppe gesunder Blutspender als auch in den beiden Patientengesamtgruppen, KOB und KHK, unterschieden sich die verschiedenen Allelträger nicht in ihrer TNF $\alpha$ -mRNA-Expression. In der Allelverteilung der KHK-Subgruppen (1.MI  $\leq$  1 Jahr oder > 1 Jahr; ÜL  $\leq$  1 Jahr oder > 1 Jahr; 1-GE oder 2-Mehr-GE) waren ebenfalls keine Unterschiede festzustellen. Auch die Assoziation des A-Allels mit höheren BMI-Werten war

in den Patientengruppen nicht nachzuweisen. Interessanterweise wurde innerhalb der einzelnen Hochrisikogruppen (1. MI  $\leq$  45 Jahre;  $\ddot{U}L \leq$  1 Jahr und Mehr-GE) jedoch eine Abhängigkeit der mRNA-Expression vom Genotyp festgestellt. Die A-Allelträger exprimierten höhere TNF $\alpha$ -mRNA-Mengen als die GG-Träger. Es ist denkbar, dass das mutante A-Allel an der Promotorposition -308 erst nach einem koronaren Ereignis zur Geltung kommt, d. h. die A-Allelträger haben bei ungünstiger Konstellation pathogener Faktoren der KHK bzw. nach einem akuten MI wegen der danach anhaltenden viel zu hohen TNF $\alpha$ -Produktion schlechtere Adaptationschancen. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass Personen mit -308/A-Allel eine Prädisposition zur Entwicklung koronarer Herzkrankheiten haben und im Fall der Manifestation einer schwerwiegenderen Form der KHK (1. MI im früheren Lebensalter, schlechtere Adaptation nach einem MI, Entwicklung einer Mehrgefäßerkrankung) im Vergleich zu GG-Trägern eine über einen längeren Zeitraum anhaltende, höhere TNF $\alpha$ -Expression haben könnten. Es ist bekannt, dass anhaltende höhere TNF $\alpha$ -Spiegel einen septischen Schock oder multiples Organversagen mit sogar letalem Ausgang verursachen können (Stuber et al., 1995). Aber auch häufigere Gefäßrupturen an den Plaquestellen kommen als Folge anhaltender höherer Konzentrationen an TNF $\alpha$  (King et al., 2002) in Betracht.

An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass viele ähnliche Studien an Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen keine Assoziation zwischen den c.1-308G>A-Genotypen, der TNF $\alpha$ -Expression und dem Atheroskleroserisiko nachweisen konnten (Herrmann et al., 1998; Allen et al., 2001; Koch et al., 2001; Turner et al., 1995; Kaluza et al., 1997; Mizia-Stec et al., 2001). Die Ursache dafür könnte an der Heterogenität der untersuchten Probanden bezüglich der Einschlusskriterien bzw. der Krankheitsmerkmale oder der untersuchten ethnischen Population liegen. Auch in Studien an verschiedenen Zellsystemen, bei denen u.a. mittels Lipopolysaccharide (LPS) die TNF $\alpha$ -Expression stimuliert wurde, zeigten die verschiedenen Genotypen wesentliche Unterschiede in der Bindung der eingesetzten Reporter-Gene (bei TNF $\alpha$  wird meist Chloramphenicol-Acetyltransferase, CAT, oder Luciferase als Reporter-Gen benutzt) (Brinkman et al., 1996; Uglialoro et al., 1998). Die Ursache der nicht übereinstimmenden Ergebnisse könnte hier die Verwendung verschiedener Zelllinien, Konstrukte bzw. stimulierender Faktoren sein.

#### **4.3.1.2. c.1-238G>A-Polymorphismus**

Die physiologische Rolle des c.1-238G>A-Promotorpolymorphismus im TNF $\alpha$ -Gen (D'Alfonso et al., 1994) wurde bisher nicht im Detail in Verbindung zu kardiovaskulären Erkrankungen untersucht. Es ist bekannt, dass sich diese polymorphe Variante in einer sog. Y-Box befindet (Shakhov et al., 1990; Drouet et al., 1991). Die Y-Box stellt ein „CGGAATCGGAGC“-Motiv dar, welches den spezifischen nukleären Faktor Y (NF-Y) bindet und damit essentiell für die transkriptionelle Aktivität des MHC-Klasse II-Promotors ist (Benoist und Mathis, 1990). Es wurde ermittelt, dass ein Basenaustausch in der Y-Box des HLA-DQA1-Promotors eine signifikant geringere Transkription verursachen kann (Haas et al., 1993). Außerdem wurde in mehreren Studien beobachtet, dass die Allelvariationen an der Position -238 deutliche Unterschiede in der Sekundärstruktur der DNA-Superhelix aufweisen, bzw. dass die durch die G>A-Mutation entstandene „DNA-Beugung“ die Bindung der Aktivatorproteine und damit die Genexpression beeinflusst (De Santis et al., 1988; Travers et al., 1990; Perez-Martin et al., 1993). Fong et al. (1994) beschrieben zusätzlich eine 25 bp lange TNF $\alpha$ -Repressorstelle (-254 bis -230), die ebenfalls den c.1-238G>A-Polymorphismus umschließt. Sie spekulierten, dass das mutante A-Allel zur transkriptionellen Repression führt.

Die Auswirkungen der c.1-238G>A-Genotypen auf die TNF $\alpha$ -Expression wurden weiterhin in verschiedenen Zellsystemen unter Anwendung von LPS als Stimulator von Pociot et al. (1995), Huizinga et

al. (1997) und Skoog et al. (1999) untersucht. Dabei konnte keine Auswirkung des Genotyps auf die Expression nachgewiesen werden. Von Pociot et al. konnte lediglich festgestellt werden, dass das A-Allel mit dem MHC-Haplotyp DR3 positiv assoziiert, was wiederum mit einer höheren TNF $\alpha$ -Expression verbunden war (Jakob et al., 1990; Abraham et al., 1993).

Bisher gibt es nur sehr wenige Arbeiten, die sich mit Risikokonstellationen von Probanden bezüglich des c.1-238G>A-Genotyps befassen. Die Assoziationsstudie von Herrmann et al. (1998) (MI-Patienten) und von Allen et al. (2001) (Patienten mit einem negativen bzw. positiven koronaren Befund und gesunde Blutspender), konnten kein Beweis dafür erbringen, dass der c.1-238G>A-Polymorphismus einen genetischen Risikofaktor bei koronaren Herzkrankheiten darstellt. Die einzige Studie, die eine positive Assoziation des mutanten A-Allels mit der Erhöhung des Atheroskleroserisikos zeigt, ist die von King et al. (2002).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Mitteldeutschen Probanden ebenfalls wie bei der Allen-Studie in 3 Gruppen (KHK, KOB und LBS) unterteilt. Beim Vergleich dieser Gruppen konnte zunächst kein signifikanter Unterschied in der Genotypverteilung festgestellt werden (A-Allel: 9 % bei KHK, 12 % bei KOB und 9,5 % bei LBS). Nach der Differenzierung der KHK-Patienten in frühzeitig Erkrankte (1.MI  $\leq$  45 Jahre) und Späterkrankte (1.MI  $>$  45 Jahre) konnte allerdings ein signifikanter Unterschied in der A-Allelverteilung nachgewiesen werden ( $\leq$ 45 Jahre vs.  $>$  45 Jahre: 16,2 % vs. 4,9 %;  $p < 0,012$ ), was für einen erhöhten Risiko der A-Allelträger spricht, in jüngeren Jahren einen MI zu erleiden. Bei der Untersuchung einer möglichen Assoziation der TNF $\alpha$ -mRNA-Expression mit dem c.1-238G>A-Polymorphismus konnte eine Geschlechtsabhängigkeit festgestellt. Entsprechend der Tatsache, dass die meisten Patienten männlichen Geschlechts waren, wurden die Genotyp-Expression-Assoziationsuntersuchungen deshalb nur bei männlichen Probanden durchgeführt. Die Expressionsanalysen waren konform mit der genetischen Analyse: in der Gruppe der KHK-Patienten hatten die A-Allelträger signifikant erhöhte TNF $\alpha$ -Expressionswerte als die GG-Träger (12,6 ag/Zelle vs. 6,9 ag/Zelle;  $p < 0,012$ ). Diese Ergebnisse zeigten, dass das mutante A-Allel stark mit einem MI im früheren Lebensalter bzw. mit einer signifikanten Erhöhung der TNF $\alpha$ -mRNA-Expression nach einem koronaren Ereignis assoziiert. Diese Ergebnisse unterstreichen erneut, dass für derartige klinische Fall-Kontroll-Studien Kriterien wie eine gute Selektion der Probanden nach klaren Einschlusskriterien, eine Differenzierung der Probanden in Subgruppen bezüglich des Manifestationsalters der KHK und die Berücksichtigung der Geschlechtsabhängigkeit im konstruierten genetischen Modell essentielle Voraussetzung sind.

#### **4.3.1.3. c.1-863C>A-Polymorphismus**

Bei der Untersuchung des bereits von Ugliarolo et al. (1998) beschriebenen c.1-863C>A-Polymorphismus in der Promotorregion vom TNF $\alpha$ -Gen konnte für die untersuchte Mitteldeutsche Population festgestellt werden, dass das mutante A-Allel in der Gruppe der gesunden Langzeitblutspender und der Gruppe der Patienten ohne koronaren Befund signifikant häufiger vorlag als in der Gruppe der Patienten mit angiographisch gesicherter koronarer Herzkrankheit (A-Allelhäufigkeit bei LBS: 31,9 %; bei KOB: 30,8 % vs. bei KHK: 18,4 %;  $p < 0,05$ ). Dies lässt vermuten, dass die A-Allelträger im Vergleich zu den CC-Trägern seltener an einer koronaren Herzkrankheit erkranken. Eine weitere Differenzierung der KHK-Patienten in Subgruppen bestätigt die Annahme, dass das A-Allel protektiv wirken könnte. Unter den KHK-Patienten hatten diejenigen, die ihren ersten MI mehr als ein Jahr überlebt hatten und dadurch bessere Adaptationschancen zeigten, signifikant häufiger das A-Allel als diejenigen, die ihren ersten MI weniger als ein Jahr überlebten (A-Allelhäufigkeit bei  $\ddot{U}L > 1$  Jahr: 32 % vs. bei  $\ddot{U}L \leq 1$  Jahr: 13,2 %;  $p < 0,05$ ).

Außerdem hatten die KHK-Patienten mit Eingefäßerkrankung im Unterschied zu den KHK-Patienten mit zwei oder mehreren sklerotisierten Koronargefäßen signifikant häufiger das mutante A-Allel (A-Allelhäufigkeit bei 1-GE: 22,7 % vs. bei 2-GE: 11,1 % und bei Mehr-GE: 13,1 %;  $p < 0,05$ ).

Der c.1-863C>A-Polymorphismus wurde in Bezug auf kardiovaskuläre Erkrankungen bisher kaum untersucht. Eine Studie von Skoog et al. (1999) befaßte sich mit der Assoziation dieses Polymorphismus und der TNF $\alpha$ -Expression. Mittels „*elektromobility shift assays*“ (EMSA)-Studien an nukleären Extrakten aus humanen Monozyten- und Hepatozyten-Zelllinien (U937 und HepG2) ist es Skoog et al. gelungen zu zeigen, dass der c.1-863C>A-Polymorphismus die Bindung der nukleären Faktoren stark beeinflusst. Sie konnten nachweisen, dass das A-Allel mit signifikant niedriger TNF $\alpha$ -Konzentration im Serum assoziiert war. Skoog et al. erklären die unterschiedlichen TNF $\alpha$ -Expressionsraten der verschiedenen Genotypen folgendermaßen: der c.1-863C>A-Polymorphismus liegt am Rand einer 10 bp langen Sequenz „GGGGACCCCC“, welche eine große Ähnlichkeit mit der „consensus“-Bindungsstelle des nukleären Faktors- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) aufweist. Die Unterschiede in der Bindungsaffinität des NF- $\kappa$ B, verursacht durch den Basenaustausch an Position -863, könnten die daraus resultierenden Expressionsschwankungen erklären. Es ist zu vermerken, dass die Skoog-Studie an Zelllinien gesunder Männer im Alter von 35-50 Jahren durchgeführt wurde.

Die vorliegende humane *ex vivo* TNF $\alpha$ -mRNA-Expressionsstudie an der Mitteldeutschen Population bezüglich des c.1-863C>A-Polymorphismus zeigte widersprüchliche Ergebnisse. Die A-Allelträger hatten in allen drei untersuchten Gruppen (LBS, KOB und KHK) im Vergleich zu CC-Trägern eine erhöhte mRNA-Expression. In der Gruppe der KHK-Patienten war der Unterschied signifikant (TNF $\alpha$ -mRNA-Expression: A-Allelträger 8,5 ag/Zelle vs. CC-Trägern 6,9 ag/Zelle;  $p < 0,05$ ). Diese höhere Transkriptionsmenge der A-Allelträger könnte auf ein besseres Regulationsvermögen der A-Allelträger hindeuten, da nach Skoog et al. (1999) TNF $\alpha$ -Gen- und Proteinexpression invers korreliert sind. Es wäre denkbar, dass die erkrankten A-Allelträger posttranskriptionell besser reguliert sind und deshalb letztendlich bessere TNF $\alpha$ -Serumwerte aufweisen als die erkrankten CC-Träger. Diese Betrachtung würde auch die Ergebnisse unserer genetischen Untersuchungen unterstützen, dass die A-Allelträger seltener an einer KHK litten bzw. im Fall der Manifestation einer KHK bessere Adaptationschancen hatten und seltener eine Mehrgefäßerkrankung entwickelten.

#### **4.3.1.4. IVS3+51A>G und andere Polymorphsimen**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei neue genomischen Varianten detektiert: 1. eine Transition C>T im Exon 3, welche zu einem Aminosäureaustausch Prolin nach Leucin führt (P84L); 2. eine Transition A>G im Intron 3 des TNF $\alpha$ -Gens (IVS3+51A>G). Die Variante P84L wurde nur bei zwei Blutspendern gefunden. Wegen dieses seltenen Vorkommens wurde sie nicht in die Assoziationsstudie einbezogen.

Der IVS3+51A>G-Polymorphismus des TNF $\alpha$ -Gens konnte mit der Schwere der koronaren Gefäßerkrankung assoziiert werden. Aus den Assoziationsuntersuchungen ging hervor, dass das mutante G-Allel signifikant mit 2- bzw. Mehr-Gefäßerkrankungen assoziiert war. Die Häufigkeit der mutanten G-Allelträger war signifikant erhöht in der Gruppe der KHK-Patienten mit 2- bzw. Mehr-Gefäßerkrankungen (19,2 %) im Vergleich zu den KHK-Patienten mit 1-Gefäßerkrankung (5,7 %). Daraus ergab sich für die G-Allelträger ein 4-fach erhöhtes Risiko eine 2- bzw. Mehrgefäßerkrankung zu entwickeln (KI: 1,07-15,6). Die Expressionsuntersuchungen ergaben keine Assoziation dieses Polymorphismus mit dem TNF $\alpha$ -mRNA-

Level. Es wäre sinnvoll, in weiterführenden Studien Genotypen und Proteinexpression zu untersuchen, um eventuelle Unterschiede in der posttranskriptionellen Regulation zu ermitteln.

Wegen ihres seltenen Vorkommens (Genotypfrequenz der Mutationsträger weniger als 0,02) wurden die bereits beschriebenen TNF $\alpha$ -Polymorphismen c.1-572A>C (Ugliero et al., 1998), c.1-376G>A (Hamann et al., 1995) und c.1-244G>A (Zimmerman et al., 1996) nicht auf Assoziation zur TNF $\alpha$ -Genexpression geprüft.

Bei der Untersuchung des häufig vorkommenden Promotorpolymorphismus c.1-857C>T im TNF $\alpha$ -Gen (Herrmann et al., 1998) konnten keine Unterschiede in der Genotyp- und Allelverteilung zwischen den LBS, KOB und KHK gefunden werden. Die Analyse der KHK-Subgruppen ergab keine Assoziation der Genotypen zum Manifestationsalter des 1.MI, zur Überlebenszeit nach einem MI bzw. zur Schwere der KHK.

#### **4.3.2. Zirkadiane Studie der TNF $\alpha$ -mRNA-Expression**

Mittels einer zirkadianen Studie an 11 Probanden (6 Männer und 5 Frauen, Mitteldeutsche Population) aus verschiedenen Altersklassen (27 bis 28, 40 bis 51 und 55 bis 61) wurde festgestellt, dass die TNF $\alpha$ -mRNA-Expression sowohl bei Frauen als auch bei Männern unabhängig vom Alter einer tageszeitlichen Schwankung unterliegt. Bis auf eine Ausnahme (Proband 5, weiblich) wiesen alle Probanden morgens (8 Uhr) die niedrigsten TNF $\alpha$ -mRNA-Werte (durchschnittlich 9,3 ag/Zelle) auf, welche im Laufe des Vormittags bei allen Probanden erheblich anstiegen (durchschnittlicher Wert von 12 Uhr: 50,9 ag/Zelle). Die Messungen am Nachmittag (16 Uhr) zeigten bei 5 Probanden (3 Frauen und 2 Männer) bereits eine Abnahme der TNF $\alpha$ -mRNA-Expression im Vergleich zu den 12-Uhr-Messungen, wohingegen bei den restlichen Probanden eine weitere Erhöhung der Werte (durchschnittlich bis zu 62,6 ag/Zelle) zu verzeichnen war. Die Frauen exprimierten morgens (8 Uhr) im Durchschnitt 2-mal höher TNF $\alpha$ -mRNA (12,4 ag/Zelle) als die Männer (6,5 ag/Zelle) und erreichten im Laufe des Tages höhere TNF $\alpha$ -mRNA-Spiegel (bis zu 117,5 ag/Zelle).

Die Tatsache, dass bei den untersuchten Frauen tagsüber die höchsten TNF $\alpha$ -mRNA-Level erreicht wurden, die sich morgens wieder normalisierten, deutet auf ihre bessere Regulationsfähigkeit bezüglich der TNF $\alpha$ -mRNA-Expression hin. Dies könnte protektive Auswirkungen auf entzündliche Stoffwechselprozesse, wie u.a. atherosklerotische Gefäßveränderungen, haben.

#### **4.3.3. Alterungsprozess und Inflammation**

Ross et al. (1999) charakterisierten die Atherosklerose als eine altersabhängige inflammatorische Erkrankung. Es ist bekannt, dass der Prozess der Alterung mit einer Erhöhung der inflammatorischen Aktivität im Blut bzw. mit einer Erhöhung der Menge der zirkulierenden Zytokine TNF $\alpha$  (Bruunsgard et al., 1999; Paolisso et al., 1998) und IL-6 (Cohen et al., 1997; Wei et al., 1992; Hager et al., 1994; Ershler et al., 1993), Zytokinantagonisten (Bruunsgard et al., 1999; Catania et al., 1997) und Akut-Phase-Proteinen (Ballou et al., 1996; Caswell et al., 1999) assoziiert ist. Ältere Probanden zeigten erhöhte Mengen an TNF $\alpha$ , CRP, Total-Cholesterolemie, LDL und niedrigere Werte des protektiv wirkenden HDL (Bruunsgard et al., 1999). All das sind Risikofaktoren, die die Atherogenese bzw. das Thromboserisiko stark steigern können. Es wurde vermutet, dass die Alterung das Atheroskleroserisiko erhöht (Bruunsgard et al., 1999).

Die vorliegenden Expressionsuntersuchungen an gesunden Blutspendern des Mitteldeutschen Raums bestätigen die Vermutung, dass mit dem Alter die TNF $\alpha$ -Expression ansteigt. Es wurden 5 Altersgruppen

gebildet (1. bis 30 J.; 2. 30-39 Jahre; 3. 40-49 Jahre; 4. 50-59 Jahre und 5. 60-69 Jahre) und deren TNF $\alpha$ -mRNA-Expressionen bei Männern und Frauen verglichen. Sowohl bei den Männern als auch bei den Frauen war eine allmähliche Steigerung der TNF $\alpha$ -mRNA-Expression bis zum 50. Lebensjahr zu verzeichnen. Bei männlichen Probanden wurden die höchsten mRNA-Werte bei 50 bis 59-Jährigen gemessen (11,7 ag/Zelle); bei den 60 bis 69-Jährigen nahm der Wert wieder ab (7,6 ag/Zelle). Bei den Frauen war dagegen ab dem 50. Lebensjahr eine signifikante Steigerung der TNF $\alpha$ -mRNA zu verzeichnen (bis zu 29,9 ag/Zelle). An dieser Stelle ist zu vermerken, dass in der vorliegenden Studie die Anzahl der zur Verfügung stehenden älteren gesunden weiblichen Blutspender viel kleiner war als die der männlichen. Diese Ergebnisse sollten an einem größeren Probandenkollektiv bestätigt werden.

Bei den weiblichen Probanden kommt mit der Alterung ein weiterer wichtiger Aspekt hinzu, welcher die Erhöhung der Zytokinproduktion katalysieren und damit einen Risikofaktor der Atherosklerose darstellen könnte. Es gibt Anhaltspunkte dafür, dass die Menopause bzw. die Einstellung der Ovarienfunktion und die damit verbundene Reduktion des Östrogens mit einer spontanen Erhöhung der Zytokinwerte assoziiert ist und Stoffwechselstörungen in den Knochen (Osteoporose), Blutgefäßen und im Fettgewebe verursachen kann (Farhat et al., 1996; Mendelsohn et al., 1999; Prince et al., 1994; Pfeilschifter et al., 2002).

#### 4.3.4. TNF $\beta$ und Atherosklerose

TNF $\beta$ , auch Lymphotoxin- $\alpha$  genannt, ist ein weiteres Mitglied der Tumornekrosefaktor-Familie. TNF $\beta$  zeigt auf der Aminosäureebene 50 % Homologie zum TNF $\alpha$  und wird im Unterschied zum TNF $\alpha$  von aktivierten T- und B-Lymphozyten produziert (Ware et al., 1995; 1996; Browning et al., 1997). Sowohl T- als auch B-Lymphozyten wurden im Tiermodell in atherosklerotischen Läsionen gefunden (Zhou et al., 1999; De Boeur et al., 1999; Reoselaar et al., 1996). TNF $\beta$  fördert die Inflammation, besitzt chemokine Wirkung und spielt bei der Lymphozytenaktivierung und -proliferation eine signifikante Rolle (Suen et al., 1997; Cuff et al., 1998, 1999; Kulmburg et al., 1998). Dies sind Indizien, die auf eine Involvierung des TNF $\beta$  in proatherogene Prozesse hindeuten.

Das TNF $\beta$ -Gen bzw. TNF $\beta$ -Protein wurde bisher kaum in Bezug auf Atherosklerose und koronare Herzerkrankungen bzw. im Zusammenhang mit dem Wachstum atherosklerotischer Läsionen untersucht. Eine kürzlich erschienene Arbeit von Schreyer et al. (2002) geht auf die Bedeutung des TNF $\beta$ -Proteins beim Wachstum von sog. „*fatty streaks*“ ein. Schreyer et al. ist es erstmalig gelungen, am Mausmodell zu zeigen, dass TNF $\beta$  innerhalb atherosklerotischer Läsionen exprimiert wird. Damit konnten sie beweisen, dass TNF $\beta$  direkt am Wachstum atherosklerotischer Läsionen beteiligt ist. Außerdem konnten sie feststellen, dass bei den Mäusen interessanterweise die Abwesenheit des TNF $\beta$ - und nicht des TNF $\alpha$ -Proteins zur Abnahme der Größe von atherosklerotischen Läsionen führte (Reduktion um 62 %). Schreyer et al. schließen nicht aus, dass TNF $\beta$  und nicht TNF $\alpha$  der primär-induzierende Mediator einer entzündlichen Reaktion ist, welcher später zu sklerotischen Veränderungen in der Gefäßintima führt. Der TNF $\beta$ -Verlust hatte außerdem eine Verbesserung der Gesamt-Cholesterin- und Lipoproteinwerte zur Folge (Schreyer et al., 2002). Diese Tatsache deutet darauf hin, dass die TNF $\beta$ -Sekretion und der Lipidstoffwechsel eng ineinander greifende Prozesse sind. Inwieweit höhere TNF $\beta$ -Mengen den Lipidstoffwechsel beeinflussen und womöglich dadurch den atherosklerotischen Prozess begünstigen ist noch unklar.

Es ist bekannt, dass TNF $\alpha$  und TNF $\beta$  gleiche Rezeptoren benutzen (p55 und p75) (Ware et al., 1995; 1996). Dabei vermittelt p55 die meisten TNF $\alpha$ -assoziierten Prozesse wie Induktion der Adhäsionsmolekülexpression (Neuman et al., 1996; Mackay et al., 1993), Apoptose (Liu et al., 1996;

Tartaglia et al., 1993) und Leukozyten-Chemotaxis (Neuman et al., 1996). Dagegen vermittelt p75 u.a. solche Prozesse wie die T-Zellproliferation (Tartaglia et al., 1993; Grell et al., 1995), die Induktion TNF $\alpha$ -vermittelter Nekrose von Hautgewebe (Erickson et al., 1994) und die Repression TNF $\alpha$ -vermittelter inflammatorischer Reaktionen (Peschon et al., 1998). Der Verlust des p55 bewirkt eine Erhöhung des Wachstums atherosklerotischer Läsionen, wohingegen der Verlust des p75 ohne Auswirkungen bleibt (Schreyer et al., 1996; 2002). Dies deutet darauf hin, dass p55 den primären Rezeptor bei der Vermittlung der Funktion vieler TNF-Liganden in atherosklerotischen Prozessen darstellt (Schreyer et al., 2002). In diesem Zusammenhang müssten in weiterführenden klinischen Studien, die zur Aufklärung der Rolle des TNF $\beta$  bei kardiovaskulären Erkrankungen dienen, auch die Rezeptoren von TNF $\alpha$  und  $\beta$  und die dafür kodierenden Gene einbezogen werden.

##### **4.3.4.1. TNF $\beta$ -Polymorphismen und Manifestation der Atherosklerose**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die bereits beschriebenen polymorphen Varianten des TNF $\beta$ -Gens: IVS1+90A>G (NcoI-Polymorphismus) (Badenhoop et al., 1989; Dawkins et al., 1989; Fugger et al., 1989), IVS1+206G>A (Ferencik et al., 1992), IVS1-13\_12dupTC (TNF $\beta$ -Mikrosatelliten-Polymorphismus), C13R (Fanning et al., 1997) und T60N (Messer et al., 1991) bzw. die neu identifizierten Varianten, c.1-729A>G und c.7G>A, bezüglich ihrer Rolle bei kardiovaskulären Erkrankungen im Mitteldeutschen Untersuchungskollektiv analysiert.

Wegen seines seltenen Vorkommens wurde der Basenaustausch c.1-729A>G (Genotypfrequenz der Mutationsträger 0,04) aus der Assoziationsstudie ausgeschlossen.

Für die Polymorphismen IVS1+90A>G und IVS1+206G>C im Intron 1 des TNF $\beta$ -Gens wurden keine Unterschiede in der Genotyp- und Allelhäufigkeit zwischen den untersuchten Gruppen LBS, KOB und KHK festgestellt. Die Differenzierung der KHK-Patienten in Subgruppen zeigte keine Assoziation zwischen den beiden Polymorphismen und dem Manifestationsalter des 1. MI, der Überlebenschance nach einem MI und der Schwere der Gefäßerkrankung.

Bei der Untersuchung des T60N-Polymorphismus im Exon 3 des TNF $\beta$ -Gens wurde in der Gruppe der KOB eine Geschlechtsabhängigkeit für den homozygoten mutanten AA-Typ festgestellt. Die KOB-Frauen waren im Vergleich zu KOB-Männern signifikant häufiger AA-Genotypträger. Da in allen drei Vergleichsgruppen der überwiegende Teil der Probanden männlich war, wurden deshalb in die weiterführenden Assoziationsstudien nur Männer einbezogen. Bei der Untersuchung männlicher Probanden konnte mit Hilfe des A-rezessiven genetischen Modells (AA vs. CC+CA) in der Gruppe der Patienten mit koronarer Herzkrankheit eine signifikante Erhöhung des homozygoten mutanten AA-Genotyps im Vergleich zu den Patienten mit glatten Koronarien festgestellt werden (13,8 % vs. 4,4 %;  $p < 0,05$ ). Der Vergleich der klinischen und biochemischen Parameter der AA- und CC+CA-Träger zeigte eine signifikante Assoziation des AA-Genotyps mit höheren Fibrinogenwerten (bei AA: 3,9 g/l vs. bei CC+CA: 3,4 g/l;  $p < 0,05$ ). Fibrinogen stellt ein Akut-Phase-Protein (APP) dar, welches bei entzündlichen Prozessen durch Stimulation von primären Zytokinen wie TNF $\alpha$  und IL-6 in der Leber produziert wird (Castell et al., 1989). Es ist bekannt, dass höhere Plasmakonzentrationen an Fibrinogen ein Zeichen für eine fortschreitende Inflammation sind bzw. mit erhöhter Atheroskleroseanfälligkeit assoziiert sind (de Maat et al., 1996). Diese Ergebnisse der Mitteldeutschen Population lassen darauf schließen, dass die homozygoten AA-Mutationsträger zur erhöhten Fibrinogen-Sekretion neigen und deshalb eine höhere Prädisposition zu Entwicklung koronarer Herzkrankheit haben. Interessanterweise zeigten die gesunden männlichen

Blutspender eine ähnliche Verteilung der AA-Träger wie die männlichen KHK's (13,8 %). Bei den LBS wurden allerdings keine Fibrinogenwerte gemessen und auch keine Koronarangiographie durchgeführt. Daher kann nicht angegeben werden, ob die AA-Träger der LBS-Gruppe bereits erhöhte Fibrinogenwerte hatten oder schon Ansätze von atherosklerotisch veränderten Koronarien aufwiesen. Es ist auch zu vermerken, dass die LBS-Gruppe jünger als die KOB- und die KHK-Gruppe war. Deshalb könnten unter den LBS auch falsch-negative Probanden sein, die erst später die klinisch auffälligen Symptome einer koronaren Atherosklerose entwickeln könnten.

Der T60N-Polymorphismus wurde bis jetzt bezüglich der koronaren Herzkrankheit beim Menschen nur von Braun et al. (1998) untersucht. Sie hatten festgestellt, dass unter den KHK-Patienten diejenigen mit erhöhtem CRP-Level (ein Akut-Phase-Protein) und mit erhöhtem Insulinspiegel signifikant häufiger heterozygote CA-Genotypträger waren als die Patienten mit normalem Insulinspiegel bzw. niedrigen CRP-Mengen. Erhöhte Insulinkonzentrationen sind typisch beim Vorliegen einer koronaren Herzerkrankung. Die KHK-Patienten sind oft charakterisiert durch mäßig bis starke Insulinresistenz und Hypoglykämie (Bressler et al., 1993). Dies stellt einen unabhängigen Risikofaktor der Atherosklerose dar (Depres et al., 1996). Die CRP-Produktion weist auf eine fortschreitende Inflammation hin. Die Assoziation des CA-Genotyps mit erhöhtem CRP- und Insulin-Spiegel spricht dafür, dass bei den CA-Trägern der Inflammationsprozess in der Gefäßintima entweder durch APP's direkt beschleunigt wurde oder die Gefäße indirekt durch Insulinerhöhung betroffen sind (Braun et al., 1998). Die Tatsache, dass Braun et al. (1998) den CA- und nicht den AA-Genotyp wie in der vorliegenden Studie als krankheitsassoziiierenden Genotyp diskutieren, könnte am Geschlecht der untersuchten Probanden liegen. In der vorliegenden Studie wurden wegen der Geschlechtsabhängigkeit des T60N-Polymorphismus in der KOB-Gruppe nur die männlichen Probanden einbezogen, während in der Braun-Studie keine geschlechtliche Differenzierung einbezogen wurde.

Im Einklang mit der vorliegenden Mitteldeutschen Studie haben Braun et al. keine Assoziation der T60N-Allele mit weiteren klinischen Parametern wie TG, HDL, Diabetes mellitus oder Hypertension feststellen können.

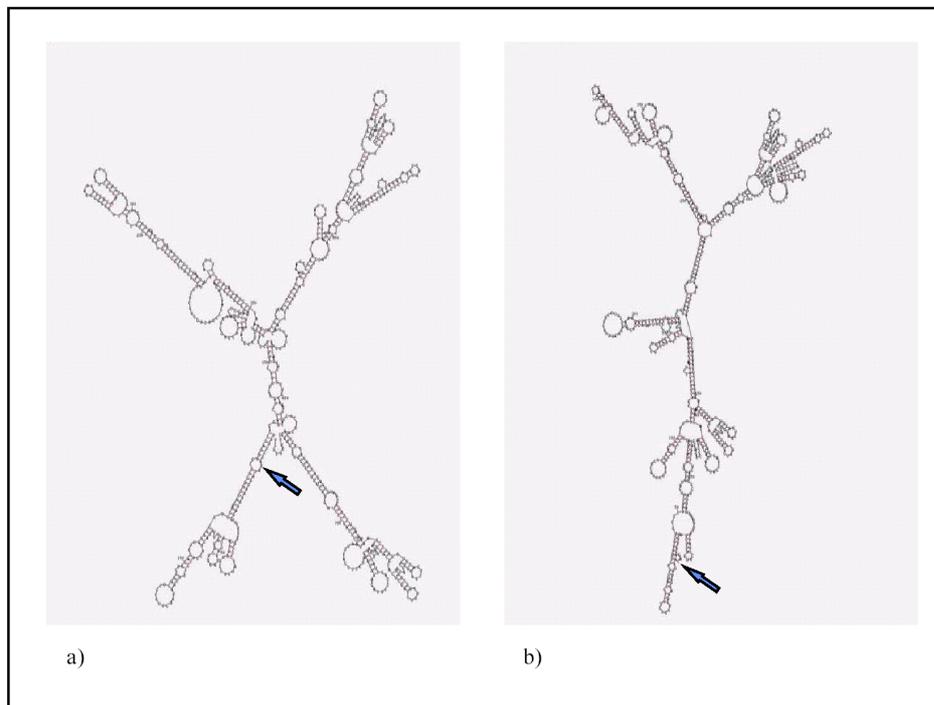
Eine Unterteilung der KHK-Gruppe nach dem Manifestationsalter des 1. MI, der Schwere der Gefäßerkrankung oder der Überlebenszeit nach einem koronaren Ereignis ergab zwischen den KHK-Subgruppen keine Verteilungsunterschiede bezüglich der T60N-Genotypen.

Neben dem T60N-Polymorphismus konnten in der vorliegenden Mitteldeutschen Studie für weitere drei polymorphen Varianten im TNF $\beta$ -Gen Assoziationen zur Atherosklerose nachgewiesen werden, für den IVS1-13\_12dupTC-Mikrosatelliten-Polymorphismus, den C13R-Polymorphismus im Exon 2 und dem neu identifizierten Polymorphismus c.7G>A im untranslatierten Bereich des Exons 1, für die bisher noch keine Assoziation zu kardiovaskulären Erkrankungen beschrieben wurde.

Sowohl der IVS1-13\_12dupTC- als auch der C13R-Polymorphismus scheint in der vorliegenden Studie eine signifikante Rolle bei der Frühmanifestation des Myokardinfarkts zu spielen. Die homozygoten mutanten Genotypen 10/10 (für IVS1-13\_12dupTC) und CC (für C13R) traten in der Gruppe der KHK-Patienten, die im extrem frühen Lebensalter ihren ersten MI erlitten haben (1.MI  $\leq$  40 Jahre), im Vergleich zu Patienten, die den 1.MI im höheren Alter ( $>$  40 Jahre) erlitten, signifikant häufiger auf. Daraus ergab sich für die homozygoten 10/10- und CC-Träger ein 3fach erhöhtes Risiko vor ihrem 41. Lebensjahr einen MI zu erleiden. Bei den 10/10- und CC-Trägern wurden keine deutlichen Unterschiede im Lipidprofil, in Fibrinogen- und HDL-Werten im Vergleich zu den Wildtypträgern festgestellt. Auch der Anteil an Patienten mit Hypertension, *Diabetes mellitus* und an Rauchern war in beiden Subgruppen (1.MI  $\leq$  40 Jahre vs. 1.MI

> 40 Jahre) ähnlich. Um die funktionelle Bedeutung dieser Polymorphismen zu ermitteln, sollten die verschiedenen Genotypen in weiteren Studien auf transkriptionischer und translatorischer Ebene untersucht werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte eine neue polymorphe Variante c.7G>A in der 5'-UTR-Region vom TNF $\beta$ -Gen detektiert werden, die eine signifikante Assoziation zu pathogenen Lipidwerten und zum Vorkommen einer KHK aufweist. Die homozygoten mutanten AA-Träger waren in der Gruppe der Patienten mit koronarer Herzerkrankung signifikant häufiger als in den Vergleichsgruppen LBS und KOB (AA bei LBS: 6,8 %; bei KOB: 7,7 %; KHK: 13,4 %,  $p < 0,05$ ). Bei Betrachtung der biochemischen Werte der verschiedenen Genotypen wurde deutlich, dass die AA- im Gegensatz zu den GA+GG-Genotypträgern signifikant erhöhte TCHOL- und LDL-Werte hatten. Daraus lässt sich schließen, dass die AA-Träger mit ihren schlechteren Lipidwerten eine höhere Prädisposition zu koronaren Herzerkrankungen besitzen könnten. Um eine mögliche Konsequenz des neu detektierten Basenaustausches c.7G>A im TNF $\beta$ -Gen zu ermitteln, wurde die Faltungsstruktur der TNF $\beta$ -RNA mit Hilfe des Programms „*RNAfold Vers. 3.0*“ (Zuker und Turner, 1999) untersucht. Im Bereich der markierten Struktur (Abb. 29a) befindet sich der detektierte Polymorphismus. Der Austausch der Base c.7G>A kann zu einer Änderung der 3-dimensionalen RNA-Faltungsstruktur im umliegenden Bereich führen (Abb. 29b) und sich möglicherweise auf die Transkription und damit auf die Proteinexpression der TNF $\beta$ -RNA auswirken. Auch hier wäre es sinnvoll, in weiteren Studien die TNF $\beta$ -mRNA- und Proteinexpression zu untersuchen, um weitere Details über die funktionellen Auswirkungen des c.7G>A-Polymorphismus zu ermitteln.



**Abb. 29:** TNF $\beta$ -RNA-Faltung: a) Wildtyp c.7: Guanin (freie Energie = -277,2 kcal/mol); b) Mutation c.7: Adenin (freie Energie = 270,0 kcal/mol); Pfeil: markiert die Stelle der polymorphen Variante c.7G>A.

#### 4.4. Risikofaktoren der Angiogenese

##### 4.4.1. Wachstumsfaktor FGF-2, dessen Co-Faktor HSPG-2 und Atherosklerose

Die Makrophagen durchlaufen während des Prozesses der Rekrutierung aus der Blutbahn einen Differenzierungsprozess, so dass sie sich am Ende zu gewebsspezifischen Makrophagen mit charakteristischer Oberflächenstruktur umwandeln. Sie sind dann in der Lage, Antigene zu exprimieren, Zytokine und Wachstumsfaktoren zu synthetisieren und haben eine erhöhte phagozytotische Aktivität (Werb et al., 1992). FGF-2 stellt neben VEGF und EGF einen wichtigen Wachstumsfaktor dar, der von aktivierten Monozyten/Makrophagen zur Regulation des Gewebswachstums bzw. der Angiogenese freigesetzt wird (Auger et al., 1992; Werb et al., 1992). FGF-2 ist normalerweise in solche physiologische Prozesse wie Wundheilung (Rappolee et al., 1988) und Inflammation (Baird et al., 1985) involviert. Außerdem fördert FGF-2 das Wachstum von mesenchymalem Gewebe, löst die Proliferation von Fibroblasten, Gefäßendothel- und glatten Muskelzellen aus und begünstigt dadurch die Angiogenese bzw. die Arteriogenese (Burgess et al., 1989; Leung et al. 1989; Besner et al., 1990; Polverini et al., 1984; Sunderkotter et al., 1994; Arras et al., 1998). In letzter Zeit wurden mehrere Versuche gestartet, therapeutische Ansätze mit Einsatz von exogenem FGF-2 zu entwickeln. Sowohl an Tiermodellen als auch in klinischen Studien konnte bereits erfolgreich der positive Effekt des FGF-2 bei der Koordination der Angiogenese demonstriert werden (Ruel et al., 2002; Epstein et al., 2001; Bauters et al., 1997; Pieper et al., 2002). Auch exogen induzierte Modifikationen an FGF-2 scheinen *in vivo* einen biologischen Effekt auf diesen Wachstumsfaktor auszuüben (Facchiano et al., 2002). Es muss noch geklärt werden, ob FGF-2 direkt die Entwicklung des kollateralen Blutflusses beeinflussen kann oder nur eine sekundäre Rolle bei der Gefäßformation ausübt. Ebenfalls wird noch diskutiert, ob es im Fall einer FGF-2-Überexpression oder einer exogenen FGF-2-Zufuhr zu einer Beschleunigung bzw. im Fall der Zerstörung des FGF-2-Gens oder Neutralisation des FGF-2-Proteins durch Antikörper zu einer Verzögerung der Angiogenese kommen würde (Scholz et al., 2002). Die FGF-2-Therapie könnte solche ungünstige Nebenwirkungen wie Neovaskularisierung von Nicht-Target-Gewebe, Induktion der Proliferation von glatten Muskelzellen bzw. Induktion und Expansion der Instabilität atherosklerotischer Plaques hervorrufen (Eppstein et al., 2001). Inwieweit die genetische Prädisposition einzelner Individuen bezüglich der FGF-2-Expression diese Gentherapie beeinflussen könnte, wurde bisher nicht untersucht.

In der vorliegenden Mitteldeutschen Studie wurde eine polymorphe Variante des FGF-2, der c.223C>T-Polymorphismus (Handschug; 1998) im untranslatierten Bereich des Exons 1, untersucht. Der Basenaustausch C > T ändert wie beschrieben die Sekundärstruktur der FGF-2-mRNA und bewirkt möglicherweise eine geringere Bindung von Translationsfaktoren (Handschug; 1998). Es konnte keine Assoziation dieses Polymorphismus mit klassischen Risikofaktoren der Atherosklerose wie Alter, Geschlecht, Raucherstatus, BMI, Hypertension, *Diabetes mellitus*, Lp (a), TCHOL, HDL-Cholesterol, LDL-Cholesterol oder Triglyceride festgestellt werden. Die Analyse der Daten der Genotypverteilungen des c.223C>T-Polymorphismus sowohl nach einem kodominanten als auch einem dominanten bzw. rezessiven Modell ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patientengruppen KOB und KHK. Um eine Auswirkung des c.223C>T-Polymorphismus auf die FGF-2-Expression zu untersuchen, wurden in den Probandengruppen KOB und KHK die FGF-2-mRNA- und Proteinexpressionen ermittelt und anschließend zu den c.223C>T-Genotypen assoziiert. Um mögliche bereits beschriebene zirkadiane Schwankungen der FGF-2-Expression (Liu et al., 2002) zu vermeiden, wurde die Blutabnahme bei allen untersuchten Probanden einheitlich morgens um 8 Uhr und unmittelbar danach die mRNA- und Proteinpräparation durchgeführt. In beiden untersuchten Gruppen KOB und KHK zeigten die homozygoten CC-Wildtypträger des c.223C>T-

Polymorphismus unabhängig vom Koronarstatus die höchste Expression sowohl auf der mRNA- als auch auf der Protein-Ebene. Die TT-Genotypträger hatten dagegen die niedrigste FGF-2-mRNA und -Proteinexpression. Damit ist es erstmalig gelungen eine genetische Variation im FGF-2-Gen zu finden, die sich direkt auf die mRNA- und Protein-Expression dieses Gens auswirkt. Diese strenge intraindividuelle FGF-2-Genotyp-Phenotyp-Assoziation sollte in weiteren klinischen Studien als mögliche Ursache für eine unterschiedliche Ansprechbarkeit der Probanden bei FGF-2-Applikation berücksichtigt werden. Der Gebrauch des FGF-2 als Therapeutikum müsste auf jeden Fall sorgfältig auf die Zielperson adjustiert werden.

Die biologische Aktivität der meisten Wachstumsfaktoren, darunter auch vom FGF-2, wird durch ihre Interaktion mit HSPG's reguliert (Auger et al., 1992). Die HSPG's werden von Fibroblasten und Myofibroblasten exprimiert (Aviezer et al., 1994). Die HSPG's, welche an der Zelloberfläche benachbarter Zellen oder in der extrazellulären Matrix vorkommen, begrenzen die Diffusion von Wachstumsfaktoren ins Gewebe und verhindern ihre Degradation durch proteolytische Enzyme (Saksela et al., 1988). Außerdem schützen sie die Wachstumsfaktoren vor Hitzeinaktivierung und vor extremen pH-Schwankungen (Klagsbrun et al., 1992). Die wichtigste Funktion der Zelloberflächen-HSPG's ist die Aufrechterhaltung der Bindung zwischen Wachstumsfaktoren und ihren Rezeptoren (FGFR's, Tyrosin-Kinasen) (Yayon et al., 1991; Ornitz et al., 1992; Mason et al., 1994). Li et al. (1994) konnten in *in vitro*-Experimenten zeigen, dass die Hemmung der FGF-2/HSPG-Bindung eine geringere FGF/Rezeptor-Bindung zur Folge hat und weiterhin zur Erhöhung der Mitogenese, Induktion des Plasminogenaktivators und zur Angiogenese führt. Auch die HSPG-Mengen haben eine Auswirkung auf die FGF-Funktion. So konnten Zhao et al. (1994) und Nakahama et al. (2000) zeigen, dass reduzierte Mengen an HSPG-2 die Proliferation der glatten Muskelzellen inhibieren und eine HSPG-2-Erhöhung die Mitogenese bzw. die Angiogenese steigert. Erhöhte Mengen an HSPG-2 wurden in Arealen des Myokardinfarkts beobachtet (Nakahama et al., 2000).

Kallunki et al. (1991) beschrieben einen Polymorphismus im HSPG-2-Gen (BamHI-Polymorphismus, IVS6-86G>T), der mit reduzierten Apo-B-Mengen assoziiert war (Hansen et al., 1997; Cai et al., 2000). Diese Beziehung zum Apo-B-Stoffwechsel läßt vermuten, dass dieser Polymorphismus einen weiteren Risikofaktor des Lipidstoffwechsels darstellt.

In der vorliegenden Mitteldeutschen Studie wurde der BamHI-Polymorphismus des HSPG-2 auf Assoziation zur koronaren Herzkrankheit untersucht bzw. eine mögliche Auswirkung der verschiedenen BamHI-Genotypen auf die FGF-2-Expression analysiert.

Im Vergleich zur Studie von Cai et al. (2000), die eine Assoziation des homozygoten mutanten TT-Genotyps mit erniedrigten Apo-B-Werten fanden, wurde in der Mitteldeutschen KOB-Gruppe eine signifikante Assoziation des TT-Genotyps mit erniedrigten Lp (a)-Werten festgestellt. In der KHK-Gruppe blieb diese Tendenz erhalten. Die Vermutung, dass der mutante TT-Genotyp mit besseren Lp(a)-Werten auch protektive Auswirkung beim Vorkommen einer koronaren Herzerkrankung hat, wurde durch Assoziationsstudien in der vorliegenden Arbeit belegt. Demzufolge hatten die gesunden Blutspender die größte Häufigkeit an TT-Trägern, was im Vergleich zu den KHK-Patienten signifikant war (7% bei LBS vs. 1,8 % bei KHK;  $p < 0,05$ ). Daraus ergab sich für die TT-Träger ein 4-fach erniedrigtes Risiko, eine KHK zu entwickeln (RR: 4,2; KI: 1,42-12,4). Im Vergleich dazu betrug der TT-Anteil in der Gruppe der KOB-Patienten 4 %. Weiterhin wurde untersucht, ob der TT-Typ mit der FGF-2-Expression assoziiert. Es konnte festgestellt werden, dass die TT-Träger in den Gruppen KHK und KOB sowohl auf der mRNA-Ebene als auch auf der Protein-Ebene niedrigere FGF-2-Expressionen aufwiesen als die GT + GG-Träger, was auf eine niedrigere FGF-2-Aktivität

hindeutet. Ob eine höhere oder eine niedrigere FGF-2-Expression direkt vom HSPG-2-Genotyp beeinflusst werden oder indirekt über Regulationsmechanismen zustande kommen, muss in weiteren Studien detaillierter untersucht werden.

### 4.5. Endotheliale Dysfunktion

#### 4.5.1. E298D-Polymorphismus im NOS-3-Gen und Atherosklerose

Das Endothelium der Blutgefäße ist für die Regulation des vasomotorischen Tonus und des Blutdruckes verantwortlich (Rankinen et al., 2000). Im Regulationsprozess der endothelabhängigen Gefäßerweiterung und der Entspannung der glatten Gefäßmuskelzellen (*vascular smooth muscle cell*, VSMC) spielt das Stickstoffmonoxid (NO) eine der Schlüsselrollen. NO reduziert die Proliferation der VSMC, die Adhäsion der Thrombozyten (*platelets*) und Leukozyten. Außerdem verringert das NO die Permeabilität des Endothels und die Synthese des extrazellulären Matrixkollagens (Moncada et al., 1993; Draijer et al., 1995; Myers et al., 1998).

Das NO wird aus L-Arginin durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) permanent produziert. Von Cayatte et al. (1994) und Aji et al. (1997) wurde bereits an Tiermodellen beobachtet, dass eNOS-Hemmung den Prozess der Atherosklerose beschleunigt und eNOS-Zugabe die Atheroskleroseentstehung verhindert. eNOS-knockout Mäuse zeigten einen signifikant höheren Blutdruck (Hypertoniker) als die Wildtyp-Mäuse (Stauss et al., 1999), wohingegen die Mäuse mit eNOS-Überexpression Hypotoniker (niedriger Blutdruck) waren (Ohashi et al., 1998). Später wurde festgestellt, dass eine solche endotheliale Dysfunktion für Patienten mit Atherosklerose charakteristisch ist (Wever et al., 1998). Die Inhibierung der eNOS führt auch bei Menschen zur Erhöhung des Blutdruckes (Sander et al., 1999; Zatz et al., 1998).

Störungen im NO-Stoffwechsel im Fall einer Atherosklerose, eines MI oder im Fall koronarer Spasmen können genetisch bedingt sein (Kugiyama et al., 1996; Wang et al., 1996; Ichihara et al., 1998; Shimasaki et al., 1998; Nakayama et al., 1999). Ein Transfer mit dem NOS-3-Gen verbesserte in *in vitro* die endotheliale Funktion und förderte die Gefäßerweiterung (Lake-Bruse et al., 1999; Varenne et al., 1998). Wang et al. (1997), Adachi et al. (1998) und Tsukada et al. (1998) demonstrierten die Abhängigkeit der humanen NO-Metabolit-Menge im Plasma vom jeweiligen Genotyp.

Yoshimura et al. (1998) beschrieben erstmalig einen Polymorphismus im NOS-3-Gen, E298D (Transversion G>T, Glu>Asp), der mit dem Auftreten koronarer Spasmen assoziiert war. Weiterhin konnte das T-Allel mit Hypertension (Miyamoto et al., 1998), mit erhöhtem Atherosklerose-Risiko (Hingorani et al., 1999), mit MI (Hibi et al., 1998; Shimasaki et al., 1998) und Schlaganfall (Elbaz et al., 1999; 2000) assoziiert werden. Philip et al. (1999) stellten bei T-Allelträgern eine verminderte Reaktionsfähigkeit der Gefäße auf Druckschwankungen fest und vermuteten bei T-Allelträgern eine Reduktion der NO-Produktion. Das Kodon 298 ist innerhalb der „*amino-terminal oxygenase domain*“ der eNOS lokalisiert, welche Bindungsstellen für Häm, Tetrahydrobiopterin und L-Arginin beinhaltet (Raman et al., 1998). Ob der E298D-Polymorphismus eine Auswirkung auf die Bindungsfähigkeit oder andere Funktionen der Oxygenase-Domäne hat, ist noch unklar.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der E298D-Polymorphismus am Mitteldeutschen Patientenkollektiv bezüglich der Risikokonstellation bei Atherosklerose untersucht. Unsere Ergebnisse widersprechen der Annahme, dass Personen mit mutantem T-Allel bzw. mit dem homozygoten TT-Genotyp eine höhere Prädisposition zu einer kardiovaskulären Erkrankung oder zu einer koronaren Herzerkrankung haben. Im Gegensatz zu vielen Studien zeigten unsere Kontrollprobanden (LBS-Gruppe) die höchste Häufigkeit an TT-Genotypträgern (10,3 %). Die KOB- und die KHK-Patienten zeigten seltener den

homozygoten mutanten Typ (6,2 % und 6,6 %). Eine Analyse der KHK-Patienten bezüglich des Alters bei 1.MI und der Überlebenszeit nach 1.MI deutete auf eine eher geringere Rolle dieses Polymorphismus bei der frühzeitigen Manifestation der KHK und der Prognose nach einem MI hin. Lediglich die KHK-Patienten mit Ein-Gefäßerkrankung (Ein-GE) hatten im Vergleich zu denen mit Zwei- oder Mehr-GE eine größere Häufigkeit an TT-Genotypträgern (11,3 % bei Ein-GE vs. 5,3 % bei Zwei-GE und 2,8 % bei Mehr-GE; n.s.). Damit hatten die Ein-GE-Patienten zusammen mit den LBS die höchste Anzahl an TT-Trägern. Es ist schwierig bei solchen widersprüchlichen Resultaten Schlußfolgerungen über die Rolle dieses Polymorphismus bei der Atherosklerose zu ziehen. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die Studien von Liyou et al. (1998), Cai et al. (1999), Kato et al. (1999), Akar et al., (1999) und MacLeod et al. (2000), die ebenfalls keine Assoziation des E298D-Polymorphismus mit kardiovaskulären Erkrankungen wie koronare Herzkrankheit, Schlaganfall oder Hypertonie gefunden hatten.

Sanchez-Guerra et al. (2001), die den E298D-Polymorphismus bei Alzheimer Erkrankung untersuchten und im Gegensatz zu mehreren anderen Studien keine Assoziation zwischen den E298D-Genotypen und dieser Erkrankung gefunden hatten, erklärten die Unstimmigkeiten verschiedener Studien durch eine unterschiedliche Funktion des E298D-Polymorphismus in verschiedenen Populationen. Bei der Risikokonstellation der Atherosklerose bzw. koronarer Herzerkrankung könnte der E298D-Polymorphismus auch wie im Fall der Patienten mit Alzheimer Erkrankung (Sanchez-Guerra et al., 2001) in der deutschen Bevölkerung eine geringere Rolle spielen als z.B. in der japanischen Bevölkerung, in der der E298D-Genotyp mit der Entwicklung einer KHK assoziiert wurde (Hibi et al., 1998; Shimasaki et al., 1998). Die Zusammenstellung der TT-Häufigkeiten aus verschiedenen Studien zeigt eine deutliche Variation der TT-Häufigkeit zwischen den Populationen (Tab. 21).

**Tabelle 21:** Häufigkeit der TT-Genotypträger (E/E) in verschiedenen Populationen (gesunde Kontrollprobanden dargestellt).

TT-Häufigkeit (%) Kontrollprobanden	TT-Häufigkeit (%) Patienten	Population	Referenz
8,3	10,1 (Asthma)	Tschechien	Holla et al., 2002
9	21,2 (koronare Spasmen)	Japan	Yoshimura et al., 1998
10,2	35,9 (KHK)	England	Hingorani et al., 1999
8,7	18,1 (MI)	England	Hingorani et al., 1999
10,3	6,6 (KHK)	Deutschland	vorliegende Studie
10,3	6 (MI)	Deutschland	vorliegende Studie
13,9	12,4 (KHK)	Australien	Cai et al., 1999
14,1	13,3 (Schlaganfall)	Frankreich	Elbaz et al., 2000
15,1	-	Amerika, weiß	Rankinen et al., 2000

#### 4.6. Homocystein-Stoffwechsel

##### 4.6.1. A222V-Polymorphismus im MTHFR-Gen und Atherosklerose

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls die Methylentetrahydrofolat-Reduktase als potentieller Risikofaktor für die Atherosklerose untersucht.

MTHFR spielt eine bedeutende Rolle im Homocystein-Stoffwechsel. Dieses Enzym katalysiert die Umwandlung von 5,10-Methylentetrahydrofolat zu 5-Methyltetrahydrofolat, welches seinerseits den Methylgruppen-Donator in der B12-abhängigen Remethylierung von Homocystein zu Methionin darstellt. Es ist bekannt, dass reduzierte Mengen an MTHFR mit einer Hyperhomocysteinämie oder einer Homocystinurie (seltene angeborene Stoffwechselkrankheit, charakterisiert durch stark erhöhten Homocystein-Spiegel) assoziiert sind (Hanson et al., 2001). Erhöhte Mengen an Homocystein stellen einen

Risikofaktor für occlusive Gefäßerkrankungen (Boers et al., 1985; Clarke et al., 1991) bzw. für Venenthrombosen dar (den Heijer et al., 1996; D'Angelo et al., 1997). Viele Studien ergaben, dass ein Anstieg der totalen Homocysteinmenge das Risiko für koronare Herzerkrankungen erheblich erhöhen kann (Stampfer et al., 1992; Arnesen et al., 1995; Boushey et al., 1995; Bostom et al., 1995; Graham et al., 1997). Frosst et al. (1995) beschrieben im MTHFR-Gen einen Polymorphismus (A222V), der möglicherweise die Enzymaktivität beeinflusst. Kang et al. (1991) zeigten, dass die Transition C nach T (Ala > Val) mit der thermolabilen Form dieses Enzyms assoziiert ist und die Enzymaktivität reduziert. Eine Reduktion der MTHFR-Aktivität führt bekanntlich zum pathogenen Anstieg der Homocysteinwerte. Weitere Studien haben gezeigt, dass der homozygote mutante TT-Typ mit erhöhten Homocysteinmengen assoziiert ist, was sich besonders deutlich bei Folat-Mangel ausprägen kann (Jacques et al., 1996; Togooglu et al., 1999). Parallel dazu konnte durch andere Studien belegt werden, dass der TT-Genotyp mit einem höheren MI- bzw. Atheroskleroserisiko assoziiert ist (Kluijtmans et al., 1996; Morita et al., 1997; Gardemann et al., 1999; Gulec et al., 2001).

Neben den Studien, die auf einen Zusammenhang des A222V-Genotyps im MTHFR-Gen mit dem Vorkommen atherosklerotischer Erkrankungen hindeuten, gibt es zahlreiche Arbeiten, die dem widersprechen bzw. keine Assoziation dieses Polymorphismus mit dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen finden konnten (Ma et al., 1996; van Bockxmeer et al., 1997; Christensen et al., 1997; Verhoef et al., 1997; Meisel et al., 2001; Nishio et al., 1996; Muckherjee et al., 2002). Diese widersprüchlichen Ergebnisse sind wahrscheinlich die Folge großer ethnischer Unterschiede in der Genotypverteilung des A222V-Polymorphismus. Von Todesco et al. (1999) wurden die Ergebnisse mehrerer Studien verglichen. Daraus ist es ersichtlich, dass schon in der gesunden Kontrollpopulation verschiedener ethnischer Gruppen signifikante Unterschiede in der TT-Verteilung vorliegen können (Tab. 22). Die TT-Häufigkeit kann, wie es aus der Tabelle zu ersehen ist, von 0 bis 30 % variieren.

**Tabelle 22:** Häufigkeit der TT-Genotypträger in verschiedenen ethnischen Gruppen (gesunde Kontrollprobanden dargestellt) (modifiziert nach Todesco et al., 1999).

TT-Häufigkeit (%)	Population	Bemerkung	Referenz
0	Amerika, schwarz	Neugeborene	Stevenson et al., 1997
5	Dänemark		van der Put et al., 1995; Kluijtmans et al., 1996
6	Irland		Whitehead et al., 1995
8	Schweiz	ältere Kontrollgruppe	Todesco et al., 1999
12	Amerika, weiß	Neugeborene	Frosst et al., 1995; Stevenson et al., 1997
13,6	Deutschland		vorliegende Studie
16	Schweiz	jüngere Kontrollgruppe	Todesco et al., 1999
17	Kanada		Jacques et al., 1996
30	Italien		Abbate et al., 1998

Die Ergebnisse der Mitteldeutschen Population sprechen eher dafür, dass der TT-Genotyp bei koronarer Herzkrankheit eine geringere Rolle spielt. Im Gegensatz zu den Resultaten von Kluijtmans et al. (1996), Morita et al. (1997), Gardemann et al. (1999) und Gulec et al. (2001) zeigten die mitteldeutschen KHK-Patienten die niedrigste TT-Häufigkeit (8,7 %) innerhalb der 3 Vergleichsgruppen. Den höchsten Anteil an homozygoten TT-Mutationsträgern zeigten die Patienten mit glatten Koronarien (16,5 %). Die TT-Häufigkeit bei den gesunden Blutspendern (13,6 %) war vergleichbar mit der TT-Häufigkeit in einer jüngeren Schweizer und in einer weiß-amerikanischen Kontrollgruppe (Tab. 26). Die weiblichen Probanden wurden aus den Auswertungen ausgeschlossen, da in der KOB-Gruppe eine Geschlechtsabhängigkeit des A222V-Polymorphismus beobachtet wurde (KOB-Frauen waren 3 mal häufiger TT-Träger als die Männer).

Der A222V-Polymorphismus war auch nicht mit klinischen und biochemischen Parametern assoziiert. Es gab keine Unterschiede zwischen den TT-Trägern und CC+CT-Trägern. Die Aufteilung der KHK-Gruppe in Subgruppen (1. MI  $\leq$  45 Jahre vs.  $>$  45 Jahre; ÜL  $\leq$  1 Jahr vs.  $>$  1 Jahr und Ein-GE vs. 2- oder Mehr-GE) ergab keinen Hinweis darauf, dass dieser MTHFR-Polymorphismus mit der Manifestation, Verlauf und Schwere des MI assoziiert wäre.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Charakterisierung der Assoziation der polymorphen Varianten von 6 ausgewählten Kandidatengen der Atherosklerose (TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , FGF-2, HSPG-2, NOS-3 und MTHFR) mit der Initiation, Progredienz und der klinischen Manifestation der Atherosklerose eine klinische Fall-Kontroll-Studie an gesunden Langzeitblutspendern und an zwei angiographisch untersuchten Patientengruppen KOB (koronar ohne Befund) und KHK (koronare Herzkrankheit) einer Mitteldeutschen Population durchgeführt. Für TNF $\alpha$  und FGF-2 wurden darüber hinaus Expressionsstudien auf der mRNA- bzw. Protein-Ebene durchgeführt und auf Assoziation zu den genetischen Daten bzw. klinischen und paraklinischen Werten der Patienten untersucht.

Daraus ergaben sich folgende Resultate:

1. Die KOB-Patienten hatten im Vergleich zu den KHK-Patienten signifikant bessere Werte des Lipidstoffwechsels (TCHOL, LDL, Triglyceride, Lp (a) und HDL) sowie der Fibrinolyse (Fibrinogen) und waren signifikant seltener Raucher. Ob das Befinden der KOB-Patienten, die u.a. wegen psychogenen Brustschmerzen und atypischen A. pectoris Beschwerden einer Angiographie unterzogen wurden, die „Vorstufe“ einer koronaren Herzkrankheit bzw. Atherosklerose darstellt, ist unklar. Deshalb wäre es informativ die KOB-Patienten prospektiv zu beobachten, ob sie im weiteren Verlauf eine Atherosklerose entwickeln.
2. 4 neue polymorphe Varianten wurden mittels „SSCP-screening“-Methode in den Genen TNF $\alpha$  und TNF $\beta$  identifiziert (TNF $\alpha$ : P84L und IVS3+51A>G; TNF $\beta$ : c.1-729A>G und c.7G>A), wobei P84L und c.1-729A>G selten vorkamen (Frequenz < 0,02).
  - a) IVS3+51A>G-Polymorphismus im TNF $\alpha$ -Gen konnte mit der Schwere der koronaren Gefäßerkrankung (GE) assoziiert werden: die G-Allelträger entwickelten signifikant häufiger eine Mehr-GE als die AA-Genotypträger (p < 0,05). Auf mRNA-Ebene zeigten die verschiedenen Genotypen keine auffälligen Unterschiede. Weitere Untersuchungen einschließlich Proteinexpression sollten durchgeführt werden um mögliche Genotyp-Genprodukt-Assoziationen näher zu charakterisieren.
  - b) c.7G>A-Polymorphismus im TNF $\beta$ -Gen scheint mit den Lipidwerten der Probanden in Zusammenhang zu stehen. Die AA-Genotypträger hatten signifikant erhöhte Lipidwerte wie TCHOL und LDL und entwickelten signifikant häufiger eine KHK als die GA+GG-Genotypträger (p < 0,05).
3. Mittels neu etablierter quantitativer PCR-Methoden wurden in den LBS-, KOB- und KHK-Gruppen die TNF $\alpha$ - und FGF-2-mRNA-Expressionen ermittelt (methodischer Fehler < 10 %). Der methodischer Fehler der ELISA-Analysen zur Ermittlung der FGF-2-Proteinexpression betrug 10,8 %.
4. Mittels einer zirkadianen Studie wurde unabhängig vom Geschlecht und Alter der untersuchten Probanden morgens die niedrigsten TNF $\alpha$ -mRNA-Spiegel gemessen, die im Laufe des Tages signifikant anstiegen. Zum Abend hin nahm die Expression sowohl bei Männern als auch bei Frauen wieder ab. Die Frauen erreichten am Tag die höchsten TNF $\alpha$ -mRNA-Werte. Die Tatsache, dass die weiblichen Probanden im Laufe des Tages höhere TNF $\alpha$ -mRNA-Werte als die männlichen erreichten, welche sich aber alle bis zur morgentlichen Messung wieder normalisierten, deutet auf bessere Regulationsfähigkeit der TNF $\alpha$ -Expression bei den Frauen hin. Mit dieser Studie wurde erstmalig bewiesen, dass die humane *ex vivo* TNF $\alpha$ -mRNA-Expression einer tageszeitlichen Rhythmik unterliegt.
5. Um beschriebene tageszeitliche Schwankungen der FGF-2-mRNA- und Proteinexpression (Liu et al., 2002) und die in der vorliegenden Arbeit ermittelten tageszeitlichen Veränderungen der TNF $\alpha$ -mRNA-

Expression zu berücksichtigen wurden für die klinischen Assoziationsuntersuchungen nur morgendlich abgenommene Blutproben analysiert.

6. Eine altersabhängige Erhöhung der TNF $\alpha$ -mRNA-Expression wurde bei gesunden Langzeitblutspendern festgestellt. Während bei den Männern die TNF $\alpha$ -mRNA-Expression allmählich anstieg, zeigten die Frauen ab dem 50. Lebensjahr eine drastische Erhöhung der Werte. Dies bestätigt die Vermutung, dass die Einstellung der Ovarienfunktion in der Menopause bzw. die Reduktion des Östrogens mit Erhöhung der Zytokinproduktion verbunden ist.
7. Die Zunahme der Zytokinproduktion stellt einen bedeutenden Risikofaktor bei der Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit bzw. Atherosklerose dar. Die mRNA-Expression des TNF $\alpha$ -Gens ist mit der individuellen genetischen Konstellation assoziiert. Dabei spielen 3 TNF $\alpha$ -Promotorpolymorphismen eine determinierende Rolle:
  - a) c.1-308G>A-Polymorphismus liegt in einer Region, welche Homologie zur „consensus“-Bindungsstelle des Transkriptionsaktivator-Proteins AP-2 zeigt. Ein Basenaustausch G>A beeinflusst die Bindungsaffinität des AP-2 und führt zu unterschiedlicher Expression der mRNA. Die GA+AA-Genotypträger zeigten eine höhere Prädisposition zur KHK-Entwicklung. Im Fall einer KHK zeigen die GA+AA-Genotypträger im Vergleich zu den GG-Trägern ein früheres Manifestationsalter und eine schlechtere Prognose (1.MI  $\leq$  45 Jahre; ÜL  $\leq$  1Jahr und Mehr-GE), was vermutlich mit einer anhaltend höheren Zytokinproduktion nach einem koronaren Ereignis zusammenhängt. Anhaltend hohe Zytokinmengen sind als Risikofaktor nicht nur für Multiorganversagen und septischen Schockzustand sondern auch für schwerwiegende Komplikationen nach einem Myokardinfarkt anzusehen.
  - b) c.1-238G>A-Polymorphismus liegt in der sog. Y-Box, die den spezifischen nukläeren Faktor Y (NF-Y) bindet, und dadurch die transkriptionelle Aktivität des MHC-KlasseII-Promotors mitbestimmt. In der KHK-Gruppe wurde für die GA+AA-Genotypträger im Vergleich zu den GG-Genotypträgern ein signifikant erhöhtes Risiko, im juvenilen Alter ( $\leq$  45 Jahre) einen Myokardinfarkt zu erleiden, ermittelt. Diese Hochrisikopatienten zeigten signifikant erhöhte TNF $\alpha$ -mRNA-Werte.
  - c) Für den c.1-863C>A-Polymorphismus konnte gezeigt werden, dass das mutante A-Allel protektiv gegen die Manifestation einer KHK wirkt. Im Fall der Manifestation einer KHK hatten die A-Allelträger bessere Überlebenschance und entwickelten seltener eine Mehr-GE. Die vorliegenden Ergebnisse, die für A-Allelträger eine höhere TNF $\alpha$ -mRNA-Expression zeigten, sowie die Studie von Skoog et al. (1999), die eine Verminderung der TNF $\alpha$ -Proteinmenge bei den A-Allelträgern feststellte, lassen vermuten, dass A-Allelträger posttranskriptionell besser „down“-reguliert werden und letztendlich bessere TNF $\alpha$ -Werte aufweisen. Der Mechanismus der posttranskriptionelle Regulation bedarf weiterer Forschung.
8. Im TNF $\beta$ -Gen wurde für weitere 3 Polymorphismen eine Assoziation zur Atherosklerose festgestellt:
  - a) Bei den männlichen Probanden war der AA-Genotyp (T60N) mit pathogen erhöhten Fibrinogenwerten assoziiert. Erhöhte Mengen an Fibrinogen, einem Akut-Phase-Protein, kennzeichnen eine fortschreitende Inflammation. Die KHK-Patienten waren im Vergleich KOB-Patienten signifikant häufiger AA-Genotypträger. Damit kann der AA-Genotyp als ein Risikofaktor des Fibrinogenstoffwechsels angesehen werden, der die Atheroskleroseanfälligkeit erhöht.
  - b) Bei den KHK-Probanden wurde festgestellt, dass die homozygoten mutanten Genotypträger des IVS1-13\_12dupTC- und des C13R-Polymorphismus im Vergleich zu Wildtyp-Allelträgern ein signifikant höheres Risiko haben, sehr frühzeitig (1.MI  $\leq$  40 Jahre) einen MI zu erleiden. Es wurde keine

Assoziation dieser polymorphen Varianten zu weiteren klinischen und biochemischen Parametern der Patienten gefunden.

9. Die Expressionsuntersuchungen am FGF-2-Gen haben gezeigt, dass die KHK-Patienten im Vergleich zu den KOB-Patienten eine höhere FGF-2-mRNA und -Proteinexpression besitzen. Dies bestätigt die Annahme, dass FGF-2 bei inflammatorischen Prozessen aktiviert wird und in die Prozesse der Atherogenese involviert ist.
  - a) Die FGF-2-Expression konnte erstmalig in direkten Zusammenhang mit dem c.223C>T-Polymorphismus im FGF-2-Gen (Handschug, 1998) gebracht werden. Die quantitativen Expressionsuntersuchungen am FGF-2 zeigten, dass die CC-Genotypträger in den Gruppen KOB und KHK unabhängig vom Koronarstatus der Patienten die höchste FGF-2-Expression sowohl auf der mRNA- als auch Protein-Ebene besitzen. Die TT-Genotypträger hatten die niedrigste FGF-mRNA und -Proteinexpression. Diese strenge intraindividuelle Genotyp-Phänotyp-Assoziation sollte in der Entwicklung exogener FGF-2-Therapeutika berücksichtigt werden. Eine sorgfältige Adjustierung der einzusetzenden FGF-2-Mengen auf die Zielperson ist daher notwendig.
10. Bei der Untersuchung des IVS6-86G>T (BamHI)-Polymorphismus im HSPG-2-Gen, dessen Genprodukt einen regulierenden Cofaktor des FGF-2 im Prozess der Angiogenese darstellt, konnte festgestellt werden, dass die TT-Genotypträger niedrigere Lp (a)-Werte besaßen und ein signifikant niedrigeres Risiko für KHK aufwiesen. Außerdem konnte der TT-Genotyp mit einer niedrigeren FGF-2-Expression korreliert werden, was zusätzlich auf die protektive Rolle des TT-Genotyps hindeutet.
11. Das Vorkommen des A222V-Polymorphismus im MTHFR-Gen und des E298D-Polymorphismus im NOS-3-Gen unterscheidet sich deutlich in verschiedenen ethnischen Gruppen. Es konnte keine Assoziation zwischen den beiden Polymorphismen und kardiovaskulären Erkrankungen gefunden werden. Es wurden weder ein Zusammenhang bezüglich der klinischen und paraklinischen Daten der Patienten noch bezüglich des Schweregrades der KHK, des Manifestationsalter der KHK und der Überlebenszeit nach einem MI ermittelt werden.

Die erzielten Resultate unterstreichen die Bedeutung einer differenzierten Betrachtung der Risikogene und deren Polymorphismen bezüglich der Auswirkung auf Initiation, Progredienz oder klinische Manifestation einer koronaren Herzerkrankung. Wichtig erscheint dabei auch die Berücksichtigung des Alters, des Geschlechts und der Abstammung (gleiche geographische Region) der zu untersuchenden Probanden.

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Assoziationen für die 4 Polymorphismen im TNF $\alpha$ -Gen (c.1-238G>A, c.1-308G>A, c.1-863C>A und IVS3+51A>G), 4 Polymorphismen im TNF $\beta$ -Gen (T60N, C13R, IVS-13\_12dupTC und c.7G>A) und für den IVS6-86G>T-Polymorphismus im HSPG-2-Gen zum Vorkommen einer Atherosklerose sollten weiterhin im größeren Probandenkollektiv aus anderen ethnischen Population überprüft werden. Im Fall der Bestätigung der vorliegenden Ergebnisse wäre der Einsatz dieser Polymorphismen als Risikomarker bei Erstellung des Risikoprofils eines Individuums im Rahmen einer Frühdiagnose oder Therapie denkbar.

## 6. Literaturverzeichnis

Aarden L, Corley RB, Soderberg A, Lefkovits I.: Limiting dilution analysis of the suppressive effect mediated by alloantigen-primed cells. *Immunology*. 1980 Oct;41(2):399-406.

Abbate R, Sardi I, Pepe G, Marcucci R, Brunelli T, Prisco D, Fatini C, Capanni M, Simonetti I, Gensini GF.: The high prevalence of thermolabile 5-10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) in Italians is not associated to an increased risk for coronary artery disease (CAD). *Thromb Haemost*. 1998 Apr;79(4):727-30.

Abraham JA, Whang JL, Tumolo A, Mergia A, Friedman J, Gospodarowicz D, Fiddes JC.: Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence and genomic organization. *EMBO J*. 1986 Oct;5(10):2523-8.

Abraham LJ, French MA, Dawkins RL.: Polymorphic MHC ancestral haplotypes affect the activity of tumour necrosis factor-alpha. *Clin Exp Immunol*. 1993 Apr; 92(1):14-8.

Adachi T, Wang XL.: Association of extracellular-superoxide dismutase phenotype with the endothelial constitutive nitric oxide synthase polymorphism. *FEBS Lett*. 1998 Aug 14;433(1-2):166-8.

Aggawal B, Puri R et al.: *Human cytokines: their role in disease and therapy*. Cambridge MA: Blackwell Science, 1995.

Aji W, Ravalli S, Szabolcs M, Jiang XC, Sciacca RR, Michler RE, Cannon PJ.: L-arginine prevents xanthoma development and inhibits atherosclerosis in LDL receptor knockout mice. *Circulation*. 1997 Jan 21;95(2):430-7.

Alexander RW: Inflammation and coronary artery disease. *New Engl J Med*, 1994; 31: 468-469.

Allen RA, Lee EM, Roberts DH, Park BK, Pirmohamed M.: Polymorphisms in the TNF-alpha and TNF-receptor genes in patients with coronary artery disease. *Eur J Clin Invest*. 2001 Oct;31(10):843-51.

Angchaisuksiri P, Pingsuthiwong S, Sura T, Aryuchai K, Busabaratana M, Atichartakarn V.: Prevalence of the C677T methylenetetra- hydrofolate reductase mutation in Thai patients with deep vein thrombosis. *Acta Haematol.*,2000;103(4):191-6.

Anker SD, Clark AL, Kemp M, Salsbury C, Teixeira MM, Hellewell PG, Coats AJ.: Tumor necrosis factor and steroid metabolism in chronic heart failure: possible relation to muscle wasting. *J Am Coll Cardiol*. 1997 Oct;30(4):997-1001.

Anthes JC, Zhan Z, Gilchrest H, Egan RW, Siegel MI, Billah MM.: Interferon-alpha down-regulates the interleukin-6 receptor in a human multiple myeloma cell line, U266. *Biochem J*. 1995 Jul 1;309 ( Pt 1):175-80.

Arend WP, Malyak M, Smith MF Jr, Whisenand TD, Slack JL, Sims JE, Giri JG, Dower SK.: Binding of IL-1 alpha, IL-1 beta, and IL-1 receptor antagonist by soluble IL-1 receptors and levels of soluble IL-1 receptors in synovial fluids. *J Immunol*. 1994 Nov 15;153(10):4766-74.

Arnesen E, Refsum H, Bonna KH, Ueland PM, Forde OH, Nordrehaug JE.: Serum total homocysteine and coronary heart disease. *Int J Epidemiol*. 1995 Aug;24(4):704-9.

Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J, Schaper W.: Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J Clin Invest*. 1998 Jan 1;101(1):40-50.

Arruda VR, Siqueira LH, Goncalves MS, von Zuben PM, Soares MC, Menezes R, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF.: Prevalence of the mutation C677 --> T in the methylene tetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. *Am J Med Genet*. 1998 Jul 24;78(4):332-5.

Auger MJ, Ross JA: *The Makrophage*. 1992. Oxford University Press, Oxford, UK

Aviezer D, Hecht D, Safran M, Eisinger M, David G, Yayon A.: Perlecan, basal lamina proteoglycan, promotes basic fibroblast growth factor-receptor binding, mitogenesis, and angiogenesis. *Cell*. 1994 Dec 16;79(6):1005-13.

Aviezer D, Hecht D, Safran M, Eisinger M, David G, Yayon A.: Perlecan, basal lamina proteoglycan, promotes basic fibroblast growth factor-receptor binding, mitogenesis, and angiogenesis. *Cell*. 1994 Dec 16;79(6):1005-13.

- Azrin M: Angiogenesis, protein and gene delivery. *Br Med Bull* 59: 211-225.
- Badenhoop K, Schwarz G, Trowsdale J, Lewis V, Usadel KH, Gale EA, Bottazzo GF.: TNF-alpha gene polymorphisms in type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1989 Jul;32(7):445-8.
- Baird A, Mormede P, Bohlen P.: Immunoreactive fibroblast growth factor in cells of peritoneal exudate suggests its identity with macrophage-derived growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1985 Jan 16;126(1):358-64.
- Balkwill FR, Burke F.: The cytokine network. *Immunol Today*. 1989 Sep;10(9):299-304. Review.
- Balkwill FR.: Tumour necrosis factor. *Br Med Bull*. 1989 Apr;45(2):389-400. Review.
- Ballou SP, Lozanski FB, Hodder S, Rzewnicki DL, Mion LC, Sipe JD, Ford AB, Kushner I.: Quantitative and qualitative alterations of acute-phase proteins in healthy elderly persons. *Age Ageing*. 1996 May;25(3):224-30.
- Barath P, Fishbein MC, Cao J, Berenson J, Helfant RH, Forrester JS.: Detection and localization of tumor necrosis factor in human atheroma. *Am J Cardiol*. 1990 Feb 1;65(5):297-302.
- Bauters C: Growth factors as a potential new treatment for ischemic heart disease. *Clin Cardiol* 20: 52-57.
- Bazzoni F, Beutler B.: The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med*. 1996 Jun 27;334(26):1717-25. Review.
- Bendtsen K, Morling N, Fomsgaard A, Svenson M, Jakobsen B, Odum N, Svejgaard A.: Association between HLA-DR2 and production of tumour necrosis factor alpha and interleukin 1 by mononuclear cells activated by lipopolysaccharide. *Scand J Immunol*. 1988 Nov;28(5):599-606.
- Benoist C, Mathis D.: Regulation of major histocompatibility complex class-II genes: X, Y and other letters of the alphabet. *Annu Rev Immunol*. 1990;8:681-715. Review.
- Besner G, Higashiyama S, Klagsbrun M.: Isolation and characterization of a macrophage-derived heparin-binding growth factor. *Cell Regul*. 1990 Oct;1(11):811-9.
- Beutler B, Cerami A.: The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol*. 1989;7:625-55. Review.
- Beutler BA, Milsark IW, Cerami A.: Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution, and metabolic fate in vivo. *J Immunol*. 1985 Dec;135(6):3972-7.
- Biasucci LM, Vitelli A, Liuzzo G, Altamura S, Caligiuri G, Monaco C, Rebuzzi AG, Ciliberto G, Maseri A.: Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. *Circulation*. 1996 Sep 1;94(5):874-7.
- Bird AP, Wolffe AP.: Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell*. 1999 Nov 24;99(5):451-4.
- Boers GH, Smals AG, Trijbels FJ, Fowler B, Bakkeren JA, Schoonderwaldt HC, Kleijer WJ, Kloppenborg PW.: Heterozygosity for homocystinuria in premature peripheral and cerebral occlusive arterial disease. *N Engl J Med*. 1985 Sep 19;313(12):709-15
- Bouma G, Crusius JB, Oudkerk Pool M, Kolkman JJ, von Blomberg BM, Kostense PJ, Giphart MJ, Schreuder GM, Meuwissen SG, Pena AS.: Secretion of tumour necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha in relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-DR alleles. Relevance for inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol*. 1996 Apr;43(4):456-63.
- Bourassa MG, Alderman EL, Bertrand M, de la Fuente L, Gratsianski A, Kaltenbach M, King SB, Nobuyoshi M, Romaniuk P, Ryan TJ (1988): Report of the joint ISFC/WHO task force on coronary angioplasty. The international Society and federation of cardiology and the world health organization. *Circulation*. 78(3): 780-789.
- Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG.: A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA*. 1995 Oct 4;274(13):1049-57.

- Braun J, Marz W, Winkelmann BR, Donner H, Henning Usadel K, Badenhoop K.: Tumour necrosis factor beta alleles and hyperinsulinaemia in coronary artery disease. *Eur J Clin Invest.* 1998 Jul;28(7):538-42.
- Braunwald E: Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine. 4. Aufl., WB Saunders Comp. Philadelphia 1992, S. 1316, 1341, 1367.
- Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72, 248-254, 1976.
- Bressler P, Bailey SR, Matsuda M, DeFronzo RA.: Insulin resistance and coronary artery disease. *Diabetologia.* 1996 Nov;39(11):1345-50.
- Brigstock DR, Klagsbrun M.: Subcellular distribution of multiple molecular weight forms of bFGF in hepatoma cells. *Ann N Y Acad Sci.* 1991;638:427-30.
- Brinkman BM, Zuijdest D, Kaijzel EL, Breedveld FC, Verweij CL.: Relevance of the tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) -308 promoter polymorphism in TNF alpha gene regulation. *J Inflamm.* 1995-96;46(1):32-41.
- Brown JC, Sasaki T, Gohring W, Yamada Y, Timpl R.: The C-terminal domain V of perlecan promotes beta1 integrin-mediated cell adhesion, binds heparin, nidogen and fibulin-2 and can be modified by glycosaminoglycans. *Eur J Biochem.* 1997 Nov 15;250(1):39-46.
- Browning JL, Sizing ID, Lawton P, Bourdon PR, Rennert PD, Majeau GR, Ambrose CM, Hession C, Miatkowski K, Griffiths DA, Ngam-ek A, Meier W, Benjamin CD, Hochman PS.: Characterization of lymphotoxin-alpha beta complexes on the surface of mouse lymphocytes. *J Immunol.* 1997 Oct 1;159(7):3288-98.
- Brunnsgaard H, Andersen-Ranberg K, Jeune B, Pedersen AN, Skinhoj P, Pedersen BK.: A high plasma concentration of TNF-alpha is associated with dementia in centenarians. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 1999 Jul;54(7):M357-64.
- Brunnsgaard H, Skinhoj P, Pedersen AN, Schroll M, Pedersen BK.: Ageing, tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and atherosclerosis. *Clin Exp Immunol.* 2000 Aug;121(2):255-60.
- Bugler B, Amalric F, Prats H.: Alternative initiation of translation determines cytoplasmic or nuclear localization of basic fibroblast growth factor. *Mol Cell Biol.* 1991 Jan;11(1):573-7.
- Burgess WH, Maciag T.: The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem.* 1989;58:575-606. Review.
- Cai H, Wang XL, Wilcken DE.: Genetic polymorphism of heparan sulfate proteoglycan (perlecan, HSPG2), lipid profiles and coronary artery disease in the Australian population. *Atherosclerosis.* 2000 Jan;148(1):125-9.
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B.: An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975 Sep;72(9):3666-70.
- Castell JV, Andus T, Kunz D, Heinrich PC.: Interleukin-6. The major regulator of acute-phase protein synthesis in man and rat. *Ann N Y Acad Sci.* 1989;557:87-99; discussion 100-1.
- Casu B, Guerrini M, Naggi A, Perez M, Torri G, Ribatti D, Carminati P, Giannini G, Penco S, Pisano C, Belleri M, Rusnati M, Presta M.: Short heparin sequences spaced by glycol-split uronate residues are antagonists of fibroblast growth factor 2 and angiogenesis inhibitors. *Biochemistry.* 2002 Aug 20;41(33):10519-28.
- Caswell M, Pike LA, Bull BS, Stuart J.: Effect of patient age on tests of the acute-phase response. *Arch Pathol Lab Med.* 1993 Sep;117(9):906-10.
- Cattaneo M, Tsai MY, Bucciarelli P, Taioli E, Zighetti ML, Bignell M, Mannucci PM.: A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene (C677T) increases the risk for deep-vein thrombosis in patients with mutant factor V (factor V:Q506). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997 Sep;17(9):1662-6.
- Cayatte AJ, Palacino JJ, Horten K, Cohen RA.: Chronic inhibition of nitric oxide production accelerates neointima formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb.* 1994 May;14(5):753-

9.

Chakravarti S, Phillips SL, Hassell JR.: Assignment of the perlecan (heparan sulfate proteoglycan) gene to mouse chromosome 4. *Mamm Genome*. 1991;1(4):270-2.

Chambers JC, Ireland H, Thompson E, Reilly P, Obeid OA, Refsum H, Ueland P, Lane DA, Kooner JS.: Methylenetetrahydrofolate reductase 677 C-->T mutation and coronary heart disease risk in UK Indian Asians. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 Nov;20(11):2448-52.

Chambers JC, Obeid OA, Refsum H, Ueland P, Hackett D, Hooper J, Turner RM, Thompson SG, Kooner JS.: Plasma homocysteine concentrations and risk of coronary heart disease in UK Indian Asian and European men. *Lancet*. 2000 Feb 12;355(9203):523-7.

Cheng GC, Briggs WH, Gerson DS, Libby P, Grodzinsky AJ, Gray ML, Lee RT.: Mechanical strain tightly controls fibroblast growth factor-2 release from cultured human vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1997 Jan;80(1):28-36.

Christensen B, Frosst P, Lussier-Cacan S, Selhub J, Goyette P, Rosenblatt DS, Genest J Jr, Rozen R.: Correlation of a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene with plasma homocysteine in patients with premature coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997 Mar;17(3):569-73.

Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, Fowler B, Graham I.: Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med*. 1991 Apr 25;324(17):1149-55.

Cohen HJ, Pieper CF, Harris T, Rao KM, Currie MS.: The association of plasma IL-6 levels with functional disability in community-dwelling elderly. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 1997 Jul;52(4):M201-8.

Couffinhal T, Duplaa C, Moreau C, Lamaziere JM, Bonnet J.: Regulation of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1994 Feb;74(2):225-34.

Cuevas P, Carceller F, Gimenez-Gallego G: Fibroblast growth factors in myocardial ischemia/reperfusion injury and ischemic precondition. *J Cell Mol Med* 5: 132-142.

Cuff CA, Sacca R, Ruddle NH.: Differential induction of adhesion molecule and chemokine expression by LTalpha3 and LTalpha3beta in inflammation elucidates potential mechanisms of mesenteric and peripheral lymph node development. *J Immunol*. 1999 May 15;162(10):5965-72.

Cuff CA, Schwartz J, Bergman CM, Russell KS, Bender JR, Ruddle NH.: Lymphotoxin alpha3 induces chemokines and adhesion molecules: insight into the role of LT alpha in inflammation and lymphoid organ development. *J Immunol*. 1998 Dec 15;161(12):6853-60.

D'Alfonso S, Richiardi PM.: A polymorphic variation in a putative regulation box of the TNFA promoter region. *Immunogenetics*. 1994;39(2):150-4.

D'Alfonso S, Richiardi PM.: An intragenic polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha (TNFA) chain-encoding gene. *Immunogenetics*. 1996;44(4):321-2.

D'Angelo A, Mazzola G, Crippa L, Fermo I, Vigano D'Angelo S.: Hyperhomocysteinemia and venous thromboembolic disease. *Haematologica*. 1997 Mar-Apr;82(2):211-9. Review.

Dargel R.: Metabolism of leukotrienes is impaired in hepatocytes from rats with thioacetamide-induced liver cirrhosis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1995 Oct;53(4):309-14.

Dawkins RL, Leaver A, Cameron PU, Martin E, Kay PH, Christiansen FT.: Some disease-associated ancestral haplotypes carry a polymorphism of TNF. *Hum Immunol*. 1989 Oct;26(2):91-7.

de Boer OJ, van der Wal AC, Verhagen CE, Becker AE.: Cytokine secretion profiles of cloned T cells from human aortic atherosclerotic plaques. *J Pathol*. 1999 Jun;188(2):174-9.

den Heijer M, Koster T, Blom HJ, Bos GM, Briet E, Reitsma PH, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR.: Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis. *N Engl J Med*. 1996 Mar 21;334(12):759-62.

- DeSantis P, Palleschi A, Savino M, Scipioni A.: A theoretical model of DNA curvature. *Biophys Chem* 32: 305-317, 1998.
- Despres JP, Lamarche B, Mauriege P, Cantin B, Dagenais GR, Moorjani S, Lupien PJ.: Hyperinsulinemia as an independent risk factor for ischemic heart disease. *N Engl J Med.* 1996 Apr 11;334(15):952-7.
- Dinareello CA.: Interleukin-1 in disease. *Keio J Med.* 1994 Sep;43(3):131-6. Review.
- Dolan M, Horchar T, Rigatti B, Hassell JR.: Identification of sites in domain I of perlecan that regulate heparan sulfate synthesis. *J Biol Chem.* 1997 Feb 14;272(7):4316-22.
- Doyama K, Fujiwara H, Fukumoto M, Tanaka M, Fujiwara Y, Oda T, Inada T, Ohtani S, Hasegawa K, Fujiwara T, Sasayama S.: Tumour necrosis factor is expressed in cardiac tissues of patients with heart failure. *Int J Cardiol.* 1996 Jun;54(3):217-25.
- Draijer R, Atsma DE, van der Laarse A, van Hinsbergh VW.: cGMP and nitric oxide modulate thrombin-induced endothelial permeability. Regulation via different pathways in human aortic and umbilical vein endothelial cells. *Circ Res.* 1995 Feb;76(2):199-208.
- Drouet C, Shakhov AN, Jongeneel CV.: Enhancers and transcription factors controlling the inducibility of the tumor necrosis factor-alpha promoter in primary macrophages. *J Immunol.* 1991 Sep 1;147(5):1694-700.
- Eigler A, Loher F, Endres S.: Suppression of synthesis of tumor necrosis factor. *Internist (Berl).* 2001 Jan;42(1):28-34. Review.
- Elbaz A, Amarenco P.: Genetic susceptibility and ischaemic stroke. *Curr Opin Neurol.* 1999 Feb;12(1):47-55.
- Engelmann H, Aderka D, Rubinstein M, Rotman D, Wallach D.: A tumor necrosis factor-binding protein purified to homogeneity from human urine protects cells from tumor necrosis factor toxicity. *J Biol Chem.* 1989 Jul 15;264(20):11974-80.
- Engelmann H, Holtmann H, Brakebusch C, Avni YS, Sarov I, Nophar Y, Hadas E, Leitner O, Wallach D.: Antibodies to a soluble form of a tumor necrosis factor (TNF) receptor have TNF-like activity. *J Biol Chem.* 1990 Aug 25;265(24):14497-504.
- Eppstein SE, Fuchs S, Zhou YF, Baffour R, Kornowsky R: Therapeutic interventions for enhancing collateral development by administration of growth factors: basic principles, early results and potential hazards. *Cardiovasc Res* 49: 532-542.
- Erickson SL, de Sauvage FJ, Kikly K, Carver-Moore K, Pitts-Meek S, Gillett N, Sheehan KC, Schreiber RD, Goeddel DV, Moore MW.: Decreased sensitivity to tumour-necrosis factor but normal T-cell development in TNF receptor-2-deficient mice. *Nature.* 1994 Dec 8;372(6506):560-3.
- Evanko SP, Raines EW, Ross R, Gold LI, Wight TN.: Proteoglycan distribution in lesions of atherosclerosis depends on lesion severity, structural characteristics, and the proximity of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta. *Am J Pathol.* 1998 Feb;152(2):533-46.
- Facchiano F, Lentini A, Fogliano V: Sugar-induced modification of fibroblast growth factor 2 reduces angiogenic activity in vivo. *Am J Pathol* 161: 531-541.
- Falk W, Mannel DN, Darjes H, Krammer PH.: IL-1 induces high affinity IL-2 receptor expression of CD4-8-thymocytes. *J Immunol.* 1989 Jul 15;143(2):513-7.
- Fanning GC, Bunce M, Black CM, Welsh KI.: Polymerase chain reaction haplotyping using 3' mismatches in the forward and reverse primers: application to the biallelic polymorphisms of tumor necrosis factor and lymphotoxin alpha. *Tissue Antigens.* 1997 Jul;50(1):23-31.
- Farhat MY, Lavigne MC, Ramwell PW.: The vascular protective effects of estrogen. *FASEB J.* 1996 Apr;10(5):615-24. Review.
- Feinberg AP.: Methylation meets genomics. *Nat Genet.* 2001 Jan;27(1):9-10.

- Feingold KR, Grunfeld C.: Role of cytokines in inducing hyperlipidemia. *Diabetes*. 1992 Oct;41 Suppl 2:97-101.
- Ferencik S, Lindemann M, Horsthemke B, Grosse-Wilde H.: A new restriction fragment length polymorphism of the human TNF-B gene detected by *AspHI* digest. *Eur J Immunogenet*. 1992 Dec;19(6):425-30.
- Fernandez E, Bienvenu T, Desclaux-Arramond F, Beldjrod K, Beldjrod C: *PCR Methods*. 1993 Appl.3: 122.
- Fiers W.: Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. *FEBS Lett*. 1991 Jul 22;285(2):199-212. Review.
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A.: IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol*. 1991 Dec 1;147(11):3815-22.
- Flad HD, Loppnow H, Feist W, Wang MH, Brade H, Kusumoto S, Rietschel ET, Ulmer AJ.: Interleukin 1 and tumor necrosis factor: studies on the induction by lipopolysaccharide partial structures. *Lymphokine Res*. 1989 Fall;8(3):235-8.
- Fong CL, Siddiqui AH, Mark DF.: Identification and characterization of a novel repressor site in the human tumor necrosis factor alpha gene. *Nucleic Acids Res*. 1994 Mar 25;22(6):1108-14.
- Foy CA, Rice GI, Ossei-Gerning N, Mansfield MW, Grant PJ: Angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphisms in patients characterised by coronary angiography, *Hum Genet*, 1997, 100: 420-425.
- Franco RF, Araujo AG, Guerreiro JF, Elion J, Zago MA.: Analysis of the 677 C-->T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in different ethnic groups. *Thromb Haemost*. 1998 Jan;79(1):119-21.
- Friedrich MV, Gohring W, Morgelin M, Brancaccio A, David G, Timpl R.: Structural basis of lycosaminoglycan modification and of heterotypic interactions of perlecan domain V. *J Mol Biol*. 1999 Nov 19;294(1):259-70.
- Friso S, Choi SW, Girelli D, Mason JB, Dolnikowski GG, Bagley PJ, Olivieri O, Jacques PF, Rosenberg IH, Corrocher R, Selhub J.: A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Apr 16;99(8):5606-11.
- Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, et al.: A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*. 1995 May;10(1):111-3.
- Fugger L, Morling N, Ryder LP, Platz P, Georgsen J, Jakobsen BK, Svejgaard A, Dalhoff K, Ranek L.: *NcoI* restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the tumour necrosis factor (TNF alpha) region in primary biliary cirrhosis and in healthy Danes. *Scand J Immunol*. 1989 Aug;30(2):185-9.
- Fuster V.: Human lesion studies. *Ann N Y Acad Sci*. 1997 Apr 15;811:207-24; discussion 224-5. Review.
- Gabay C, Kushner I.: Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med*. 1999 Feb 11;340(6):448-54. Review.
- Gardemann A, Weidemann H, Philipp M, Katz N, Tillmanns H, Hehrlein FW, Haberbosch W.: The TT genotype of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism is associated with the extent of coronary atherosclerosis in patients at high risk for coronary artery disease. *Eur Heart J*. 1999 Apr;20(8):584-92.
- Gaughan DJ, Barbaux S, Kluijtmans LA, Whitehead AS.: The human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genes: genomic organization, mRNA structure and linkage to the CLCN6 gene. *Gene*. 2000 Oct 31;257(2):279-89.
- Gemmati D, Serino ML, Trivellato C, Fiorini S, Scapoli GL.: C677T substitution in the methylenetetrahydrofolate reductase gene as a risk factor for venous thrombosis and arterial disease in selected patients. *Haematologica*. 1999 Sep;84(9):824-8.
- Gemsa D, Kozan B: Entzündungszellen. *Allergologie* 7, 1984: 183-194.

- Gery I, Gershon RK, Waksman BH.: Potentiation of cultured mouse thymocyte responses by factors released by peripheral leucocytes. *J Immunol.* 1971 Dec;107(6):1778-80.
- Gessner A, Rollinghoff M.: Biologic functions and signaling of the interleukin-4 receptor complexes. *Immunobiology.* 2000 Jan;201(3-4):285-307. Review.
- Goldrick MM, Kimball GR, Liu Q, Martin LA, Sommer SS, Tseng JYH: NIRCA: a rapid robust method for screening for unknown point mutations. *BioTechniques*, 1996, 21: 106-112.
- Goyette P, Pai A, Milos R, Frosst P, Tran P, Chen Z, Chan M, Rozen R.: Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mamm Genome.* 1998 Aug;9(8):652-6.
- Graham IM, Daly LE, Refsum HM, Robinson K, Brattstrom LE, Ueland PM, Palma-Reis RJ, Boers GH, Sheahan RG, Israelsson B, Uiterwaal CS, Meleady R, McMaster D, Verhoef P, Witteman J, Rubba P, Bellet H, Wautrecht JC, de Valk HW, Sales Luis AC, Parrot-Rouland FM, Tan KS, Higgins I, Garcon D, Andria G, et al.: Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project. *JAMA.* 1997 Jun 11;277(22):1775-81.
- Gray PW, Chen E, Li CB, Tang WL, Ruddle N.: The murine tumor necrosis factor-beta (lymphotoxin) gene sequence. *Nucleic Acids Res.* 1987 May 11;15(9):3937.
- Grell M, Douni E, Wajant H, Lohden M, Clauss M, Maxeiner B, Georgopoulos S, Lesslauer W, Kollias G, Pfizenmaier K, et al.: The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell.* 1995 Dec 1;83(5):793-802.
- Haber: *Molecular Cardiovascular medicine.* Sci American Inc. NY, USA, 1995.
- Habib FM, Springall DR, Davies GJ, Oakley CM, Yacoub MH, Polak JM.: Tumour necrosis factor and inducible nitric oxide synthase in dilated cardiomyopathy. *Lancet.* 1996 Apr 27;347(9009):1151-5.
- Hager K, Machein U, Krieger S, Platt D, Seefried G, Bauer J.: Interleukin-6 and selected plasma proteins in healthy persons of different ages. *Neurobiol Aging.* 1994 Nov-Dec;15(6):771-2.
- Hamann A, Mantzoros C, Vidal-Puig A, Flier JS.: Genetic variability in the TNF-alpha promoter is not associated with type II diabetes mellitus (NIDDM). *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 Jun 26;211(3):833-9.
- Handschug K (1998): *Molekularbiologische Untersuchungen zur genetischen Risikokonstellation atherosklerotischer Gefäßerkrankungen bei Patienten mit Koronarstenose.* Promotionsarbeit.
- Hansen PM, Chowdhury T, Deckert T, Hellgren A, Bain SC, Pociot F.: Genetic variation of the heparan sulfate proteoglycan gene (perlecan gene). Association with urinary albumin excretion in IDDM patients. *Diabetes.* 1997 Oct;46(10):1658-9.
- Hanson NQ, Aras O, Yang F, Tsai MY.: C677T and A1298C polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase gene: incidence and effect of combined genotypes on plasma fasting and post-methionine load homocysteine in vascular disease. *Clin Chem.* 2001 Apr;47(4):661-6.
- Heidenreich F, Vincent A.: Antibodies to ion-channel proteins in thymoma with myasthenia, neuromyotonia, and peripheral neuropathy. *Neurology.* 1998 May;50(5):1483-5.
- Herrmann SM, Ricard S, Nicaud V, Mallet C, Arveiler D, Evans A, Ruidavets JB, Luc G, Bara L, Parra HJ, Poirier O, Cambien F.: Polymorphisms of the tumour necrosis factor-alpha gene, coronary heart disease and obesity. *Eur J Clin Invest.* 1998 Jan;28(1):59-66.
- Hibi K, Ishigami T, Tamura K, Mizushima S, Nyui N, Fujita T, Ochiai H, Kosuge M, Watanabe Y, Yoshii Y, Kihara M, Kimura K, Ishii M, Umemura S.: Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. *Hypertension.* 1998 Sep;32(3):521-6.
- Higuchi S, Ohta S, Matsushita S, Matsui T, Yuzuriha T, Urakami K, Arai H.: NOS3 polymorphism not associated with Alzheimer's disease in Japanese. *Ann Neurol.* 2000 Oct;48(4):685.
- Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A, Haydock S, Hopper RV, Stephens NG,

- O'Shaughnessy KM, Brown MJ.: A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298-->Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation*. 1999 Oct 5;100(14):1515-20.
- Holla LI, Buckova D, Kuhrova V, Stejskalova A, Francova H, Znojil V, Vacha J.: Prevalence of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in patients with atopic asthma. *Clin Exp Allergy*. 2002 Aug;32(8):1193-8.
- Hopf M, Gohring W, Kohfeldt E, Yamada Y, Timpl R.: Recombinant domain IV of perlecan binds to nidogens, laminin-nidogen complex, fibronectin, fibulin-2 and heparin. *Eur J Biochem*. 1999 Feb;259(3):917-25.
- Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM.: Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*. 1995 May;95(5):2409-15.
- Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM.: Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 May 24;91(11):4854-8.
- Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM.: IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science*. 1996 Feb 2;271(5249):665-8.
- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM.: Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993 Jan 1;259(5091):87-91.
- Hotamisligil GS.: The role of TNFalpha and TNF receptors in obesity and insulin resistance. *J Intern Med*. 1999 Jun;245(6):621-5. Review.
- Huizinga TW, Westendorp RG, Bollen EL, Keijsers V, Brinkman BM, Langermans JA, Breedveld FC, Verweij CL, van de Gaer L, Dams L, Crusius JB, Garcia-Gonzalez A, van Oosten BW, Polman CH, Pena AS.: TNF-alpha promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients. *J Neuroimmunol*. 1997 Feb;72(2):149-53.
- Ichihara S, Yamada Y, Fujimura T, Nakashima N, Yokota M.: Association of a polymorphism of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene with myocardial infarction in the Japanese population. *Am J Cardiol*. 1998 Jan 1;81(1):83-6.
- Ikonomidis I, Andreotti F, Economou E, Stefanadis C, Toutouzas P, Nihoyannopoulos P.: Increased proinflammatory cytokines in patients with chronic stable angina and their reduction by aspirin. *Circulation*. 1999 Aug 24;100(8):793-8.
- Iozzo RV, Cohen IR, Grassel S, Murdoch AD.: The biology of perlecan: the multifaceted heparan sulphate proteoglycan of basement membranes and pericellular matrices. *Biochem J*. 1994 Sep 15;302 ( Pt 3):625-39. Review.
- Irwin MW, Mak S, Mann DL, Qu R, Penninger JM, Yan A, Dawood F, Wen WH, Shou Z, Liu P.: Tissue expression and immunolocalization of tumor necrosis factor-alpha in postinfarction dysfunctional myocardium. *Circulation*. 1999 Mar 23;99(11):1492-8.
- Jacob CO, Fronck Z, Lewis GD, Koo M, Hansen JA, McDevitt HO.: Heritable major histocompatibility complex class II-associated differences in production of tumor necrosis factor alpha: relevance to genetic predisposition to systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Feb;87(3):1233-7.
- Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, Selhub J, Rozen R.: Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation*. 1996 Jan 1;93(1):7-9.
- Janeway CA Jr.: Ligands for the T-cell receptor: hard times for avidity models. *Immunol Today*. 1995 May;16(5):223-5. Review.
- Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK.: Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis*. 1986 Mar-Apr;6(2):131-8.
- Jones PA, Gonzalgo ML.: Altered DNA methylation and genome instability: a new pathway to cancer? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Mar 18;94(6):2103-5. Review.

- Jones PA, Takai D.: The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*. 2001 Aug 10;293(5532):1068-70.
- Kaartinen M, Penttila A, Kovanen PT.: Mast cells in rupture-prone areas of human coronary atheromas produce and store TNF-alpha. *Circulation*. 1996 Dec 1;94(11):2787-92.
- Kallunki P, Eddy RL, Byers MG, Kestila M, Shows TB, Tryggvason K.: Cloning of human heparan sulfate proteoglycan core protein, assignment of the gene (HSPG2) to 1p36.1----p35 and identification of a BamHI restriction fragment length polymorphism. *Genomics*. 1991 Oct;11(2):389-96.
- Kallunki P, Tryggvason K.: Human basement membrane heparan sulfate proteoglycan core protein: a 467-kD protein containing multiple domains resembling elements of the low density lipoprotein receptor, laminin, neural cell adhesion molecules, and epidermal growth factor. *J Cell Biol*. 1992 Jan;116(2):559-71.
- Kaluza W, Reuss E, Grossmann S, Hug R, Schopf RE, Galle PR, Maerker-Hermann E, Hoehler T.: Different transcriptional activity and in vitro TNF-alpha production in psoriasis patients carrying the TNF-alpha 238A promoter polymorphism. *J Invest Dermatol*. 2000 Jun;114(6):1180-3.
- Kang SS, Wong PW, Susmano A, Sora J, Norusis M, Ruggie N.: Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease. *Am J Hum Genet*. 1991 Mar;48(3):536-45.
- Kapadia SR, Oral H, Lee J, Nakano M, Taffet GE, Mann DL.: Hemodynamic regulation of tumor necrosis factor-alpha gene and protein expression in adult feline myocardium. *Circ Res*. 1997 Aug;81(2):187-95.
- Katagiri T, Kasumi F, Yoshimoto M, Nomizu T, Asaishi K, et al.: High proportion of missense mutations of the BRCA1 and BRCA2 genes in Japanese breast cancer families. *J Hum Genet*, 1998, 43 (1): 42-48.
- Keith M, Geranmayegan A, Sole MJ, Kurian R, Robinson A, Omran AS, Jeejeebhoy KN.: Increased oxidative stress in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1998 May;31(6):1352-6.
- Kekule AS, Lauer U, Meyer M, Caselmann WH, Hofschneider PH, Koshy R.: The preS2/S region of integrated hepatitis B virus DNA encodes a transcriptional transactivator. *Nature*. 1990 Feb 1;343(6257):457-61.
- Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB.: The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest*. 1995 May;95(5):2111-9.
- Keso T, Perola M, Laippala P, Ilveskoski E, Kunnas TA, Mikkelsen J, Penttila A, Hurme M, Karhunen PJ.: Polymorphisms within the tumor necrosis factor locus and prevalence of coronary artery disease in middle-aged men. *Atherosclerosis*. 2001 Feb 15;154(3):691-7.
- Kinlay S, Selwyn AP, Libby P, Ganz P.: Inflammation, the endothelium, and the acute coronary syndromes. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1998;32 Suppl 3:S62-6. Review.
- Klagsbrun M.: Mediators of angiogenesis: the biological significance of basic fibroblast growth factor (bFGF)-heparin and heparan sulfate interactions. *Semin Cancer Biol*. 1992 Apr;3(2):81-7. Review.
- Kluijtmans LA, den Heijer M, Reitsma PH, Heil SG, Blom HJ, Rosendaal FR.: Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase and factor V Leiden in the risk of deep-vein thrombosis. *Thromb Haemost*. 1998 Feb;79(2):254-8.
- Kluijtmans LA, Kastelein JJ, Lindemans J, Boers GH, Heil SG, Brusckhe AV, Jukema JW, van den Heuvel LP, Trijbels FJ, Boerma GJ, Verheugt FW, Willems F, Blom HJ.: Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in coronary artery disease. *Circulation*. 1997 Oct 21;96(8):2573-7.
- Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, Boers GH, Frosst P, Stevens EM, van Oost BA, den Heijer M, Trijbels FJ, Rozen R, Blom HJ.: Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease. *Am J Hum Genet*. 1996 Jan;58(1):35-41.
- Knight JC, Kwiatkowski D.: Inherited variability of tumor necrosis factor production and susceptibility to infectious disease. *Proc Assoc Am Physicians*. 1999 Jul-Aug;111(4):290-8. Review.

- Koch W, Kastrati A, Bottiger C, Mehilli J, von Beckerath N, Schomig A.: Interleukin-10 and tumor necrosis factor gene polymorphisms and risk of coronary artery disease and myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 2001 Nov;159(1):137-44.
- Kotwal GJ.: Virokines: mediators of virus-host interaction and future immunomodulators in medicine. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 1999;47(3):135-8. Review.
- Kozak M.: Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J Biol Chem*. 1991 Oct 25;266(30):19867-70. Review.
- Köhler T, Laßner D, Rost AK, Thamm B, Pustowitz B, Remke H: Quantification of mRNA by polymerase chain reaction. Springer-Verlag Berlin heidelberg New York, 1995.
- Kroder G, Bossenmaier B, Kellerer M, Capp E, Stoyanov B, Muhlhofer A, Berti L, Horikoshi H, Ullrich A, Haring H.: Tumor necrosis factor-alpha- and hyperglycemia-induced insulin resistance. Evidence for different mechanisms and different effects on insulin signaling. *J Clin Invest*. 1996 Mar 15;97(6):1471-7.
- Kroeger KM, Abraham LJ.: Identification of an AP-2 element in the -323 to -285 region of the TNF-alpha gene. *Biochem Mol Biol Int*. 1996 Sep;40(1):43-51.
- Kugiyama K, Yasue H, Okumura K, Ogawa H, Fujimoto K, Nakao K, Yoshimura M, Motoyama T, Inobe Y, Kawano H.: Nitric oxide activity is deficient in spasm arteries of patients with coronary spastic angina. *Circulation*. 1996 Aug 1;94(3):266-71.
- Kullo IJ, Edwards WD, Schwartz RS.: Vulnerable plaque: pathobiology and clinical implications. *Ann Intern Med*. 1998 Dec 15;129(12):1050-60. Review.
- Kulmburg P, Radke M, Digel W.: Lymphotoxin-alpha is an autocrine growth factor for chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia*. 1998 Apr;12(4):493-8.
- Kurrelmeyer KM, Michael LH, Baumgarten G, Taffet GE, Peschon JJ, Sivasubramanian N, Entman ML, Mann DL.: Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 May 9;97(10):5456-61.
- Lafage-Pochitaloff M, Galland F, Simonetti J, Prats H, Mattei MG, Birnbaum D.: The human basic fibroblast growth factor gene is located on the long arm of chromosome 4 at bands q26-q27. *Oncogene Res*. 1990;5(3):241-4.
- Lagrاند WK, Niessen HW, Wolbink GJ, Jaspars LH, Visser CA, Verheugt FW, Meijer CJ, Hack CE.: C-reactive protein colocalizes with complement in human hearts during acute myocardial infarction. *Circulation*. 1997 Jan 7;95(1):97-103.
- Lederman RJ, Mendelson FO, Anderson RD: Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication: a randomized trial. *Lancet* 9323: 2053-2058.
- Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N.: Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. 1989 Dec 8;246(4935):1306-9.
- Li LY, Safran M, Aviezer D, Bohlen P, Seddon AP, Yayon A.: Diminished heparin binding of a basic fibroblast growth factor mutant is associated with reduced receptor binding, mitogenesis, plasminogen activator induction, and in vitro angiogenesis. *Biochemistry*. 1994 Sep 13;33(36):10999-1007.
- Liao JK.: Endothelium and acute coronary syndromes. *Clin Chem*. 1998 Aug;44(8 Pt 2):1799-808. Review.
- Lindahl B, Toss H, Siegbahn A, Venge P, Wallentin L.: Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. FRISC Study Group. Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease. *N Engl J Med*. 2000 Oct 19;343(16):1139-47.
- Lindahl U, Kusche-Gullberg M, Kjellen L.: Regulated diversity of heparan sulfate. *J Biol Chem*. 1998 Sep 25;273(39):24979-82. Review.

- Lindmark E, Tenno T, Chen J, Siegbahn A.: IL-10 inhibits LPS-induced human monocyte tissue factor expression in whole blood. *Br J Haematol.* 1998 Jul;102(2):597-604.
- Lindner V, Lappi DA, Baird A, Majack RA, Reidy MA.: Role of basic fibroblast growth factor in vascular lesion formation. *Circ Res.* 1991 Jan;68(1):106-13.
- Lindner V, Majack RA, Reidy MA.: Basic fibroblast growth factor stimulates endothelial regrowth and proliferation in denuded arteries. *J Clin Invest.* 1990 Jun;85(6):2004-8.
- Liu J: Circadian variations of transforming growth factor-beta2 and basic fibroblast growth factor in the rabbit aqueous humor. *Curr Eye res* 24: 75-80.
- Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV, Karin M.: Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell.* 1996 Nov 1;87(3):565-76.
- Liyou N, Simons L, Friedlander Y, Simons J, McCallum J, O'Shaughnessy K, Davis D, Johnson A.: Coronary artery disease is not associated with the E298-->D variant of the constitutive, endothelial nitric oxide synthase gene. *Clin Genet.* 1998 Dec;54(6):528-9.
- Lopes-Virella MF, Virella G.: Atherosclerosis and autoimmunity. *Clin Immunol Immunopathol.* 1994 Nov;73(2):155-67. Review.
- Loppnow H, Werdan K, Reuter G, Flad HD.: The interleukin-1 and interleukin-1 converting enzyme families in the cardiovascular system. *Eur Cytokine Netw.* 1998 Dec;9(4):675-80. Review.
- Loppnow H.: Cytokines: classification, receptors, mechanisms of action. *Internist (Berl).* 2001 Jan;42(1):13-4, 17-27. Review.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol. Chem.* 193, 265-275, 1951.
- Ma J, Stampfer MJ, Christensen B, Giovannucci E, Hunter DJ, Chen J, Willett WC, Selhub J, Hennekens CH, Gravel R, Rozen R.: A polymorphism of the methionine synthase gene: association with plasma folate, vitamin B12, homocyst(e)ine, and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999 Sep;8(9):825-9.
- Ma J, Stampfer MJ, Hennekens CH, Frosst P, Selhub J, Horsford J, Malinow MR, Willett WC, Rozen R.: Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, plasma folate, homocysteine, and risk of myocardial infarction in US physicians. *Circulation.* 1996 Nov 15;94(10):2410-6.
- Mackay F, Loetscher H, Stueber D, Gehr G, Lesslauer W.: Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF receptor type, TNF-R55. *J Exp Med.* 1993 May 1;177(5):1277-86.
- MacLeod MJ, Dahiyat MT, Cumming A, Meiklejohn D, Shaw D, St Clair D.: No association between Glu/Asp polymorphism of NOS3 gene and ischemic stroke. *Neurology.* 1999 Jul 22;53(2):418-20.
- Mager A, Lalezari S, Shohat T, Birnbaum Y, Adler Y, Magal N, Shohat M.: Methylenetetrahydrofolate reductase genotypes and early-onset coronary artery disease. *Circulation.* 1999 Dec 14;100(24):2406-10.
- Mant CT, Hodges RS: High-performance liquid chromatography of peptides and proteins: separation, analysis and conformation. CRC Press, Boca Raton, 1991.
- Margaglione M, D'Andrea G, d'Addetta M, Giuliani N, Cappucci G, Iannaccone L, Vecchione G, Grandone E, Brancaccio V, Di Minno G.: The methylenetetrahydrofolate reductase TT677 genotype is associated with venous thrombosis independently of the coexistence of the FV Leiden and the prothrombin A20210 mutation. *Thromb Haemost.* 1998 May;79(5):907-11.
- Markus HS, Ruigrok Y, Ali N, Powell JF.: Endothelial nitric oxide synthase exon 7 polymorphism, ischemic cerebrovascular disease, and carotid atheroma. *Stroke.* 1998 Sep;29(9):1908-11.

- Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT.: Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem.* 1993 Aug 15;268(23):17478-88.
- Marsden PA, Schappert KT, Chen HS, Flowers M, Sundell CL, Wilcox JN, Lamas S, Michel T.: Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett.* 1992 Aug 3;307(3):287-93.
- Martinez A, Fernandez-Arquero M, Pascual-Salcedo D, Conejero L, Alves H, Balsa A, de la Concha EG.: Primary association of tumor necrosis factor-region genetic markers with susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000 Jun;43(6):1366-70.
- Mason I (1994) *Cell* 78: 547-552.
- Matsumori A.: Cytokines in myocarditis and cardiomyopathies. *Curr Opin Cardiol.* 1996 May;11(3):302-9. Review.
- Matsuyama N, Okawa N, Tsukii Y, Endo T, Kaji A.: Nucleotide sequence of a cDNA encoding human tumor necrosis factor beta from B lymphoblastoid cell RPMI 1788. *FEBS Lett.* 1992 May 11;302(2):141-4.
- McGuire W, Hill AV, Allsopp CE, Greenwood BM, Kwiatkowski D.: Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature.* 1994 Oct 6;371(6497):508-10.
- Meager A.: Cytokine regulation of cellular adhesion molecule expression in inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1999 Mar;10(1):27-39. Review.
- Mendelsohn ME, Karas RH.: The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med.* 1999 Jun 10;340(23):1801-11. Review.
- Messer G, Spengler U, Jung MC, Honold G, Blomer K, Pape GR, Riethmuller G, Weiss EH.: Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an NcoI polymorphism in the first intron of the human TNF-beta gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF-beta production. *J Exp Med.* 1991 Jan 1;173(1):209-19.
- Meyer VR: *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie.* Laborbücher Chemie. Frankfurt/Main, 1988.
- Meyer CG, May J, Luty AJ, Lell B, Kremsner PG.: TNFalpha-308A associated with shorter intervals of *Plasmodium falciparum* reinfections. *Tissue Antigens.* 2002 Apr;59(4):287-92.
- Mira JP, Cariou A, Grall F, Delclaux C, Losser MR, Heshmati F, Cheval C, Monchi M, Teboul JL, Riche F, Leleu G, Arbibe L, Mignon A, Delpech M, Dhainaut JF.: Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *JAMA.* 1999 Aug 11;282(6):561-8.
- Mire-Sluis AR, Das RG, Padilla A.: WHO cytokine standardization: facilitating the development of cytokines in research, diagnosis and as therapeutic agents. *J Immunol Methods.* 1998 Jul 1;216(1-2):103-16. Review.
- Mise M, Arai S, Higashitani H, Furutani M, Niwano M, Harada T, Ishigami S, Toda Y, Nakayama H, Fukumoto M, Fujita J, Imamura M.: Clinical significance of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor gene expression in liver tumor. *Hepatology.* 1996 Mar;23(3):455-64.
- Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, Kamitani S, Harada M, Ishikawa M, Kuwahara K, Ogawa E, Hamanaka I, Takahashi N, Kaneshige T, Teraoka H, Akamizu T, Azuma N, Yoshimasa Y, Yoshimasa T, Itoh H, Masuda I, Yasue H, Nakao K.: Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension.* 1998 Jul;32(1):3-8.
- Moghadasian MH, McManus BM, Frohlich JJ.: Homocyst(e)ine and coronary artery disease. Clinical evidence and genetic and metabolic background. *Arch Intern Med.* 1997 Nov 10;157(20):2299-308. Review.
- Moncada S, Higgs A.: The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993 Dec 30;329(27):2002-12. Review.
- Moncada S.: The 1991 Ulf von Euler Lecture. The L-arginine: nitric oxide pathway. *Acta Physiol Scand.* 1992 Jul;145(3):201-27. Review.

- Morin CL, Schlaepfer IR, Eckel RH.: Tumor necrosis factor-alpha eliminates binding of NF-Y and an octamer-binding protein to the lipoprotein lipase promoter in 3T3-L1 adipocytes. *J Clin Invest.* 1995 Apr;95(4):1684-9.
- Motoo Y, Sawabu N, Nakanuma Y.: Expression of epidermal growth factor and fibroblast growth factor in human hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical study. *Liver.* 1991 Oct;11(5):272-7.
- Mulcahy B, Waldron-Lynch F, McDermott MF, Adams C, Amos CI, Zhu DK, Ward RH, Clegg DO, Shanahan F, Molloy MG, O'Gara F.: Genetic variability in the tumor necrosis factor-lymphotoxin region influences susceptibility to rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet.* 1996 Sep;59(3):676-83.
- Muller-Werdan U, Engelmann H, Werdan K.: Cardiodepression by tumor necrosis factor-alpha. *Eur Cytokine Netw.* 1998 Dec;9(4):689-91. Review.
- Munger MA, Furniss SM.: Angiotensin II receptor blockers: novel therapy for heart failure? *Pharmacotherapy.* 1996 Mar-Apr;16(2 Pt 2):59S-68S. Review.
- Munker R, Gasson J, Ogawa M, Koeffler HP.: Recombinant human TNF induces production of granulocyte-monocyte colony-stimulating factor. *Nature.* 1986 Sep 4-10;323(6083):79-82.
- Myers RM, Lumelsky N, Lerman LS, Maniatis T: Detection of single base substitutions in total genomic DNA. *Nature* 313: 495-498.
- Myers PR, Tanner MA.: Vascular endothelial cell regulation of extracellular matrix collagen: role of nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998 May;18(5):717-22.
- Nakahama M, Murakami T, Kusachi S, Naito I, Takeda K, Ohnishi H, Komatsubara I, Oka T, Ninomiya Y, Tsuji T.: Expression of perlecan proteoglycan in the infarct zone of mouse myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 2000 Jun;32(6):1087-100.
- Narumi S, Finke JH, Hamilton TA.: Interferon gamma and interleukin 2 synergize to induce selective monokine expression in murine peritoneal macrophages. *J Biol Chem.* 1990 Apr 25;265(12):7036-41.
- Nawroth PP, Stern DM.: Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. *J Exp Med.* 1986 Mar 1;163(3):740-5.
- Nedwin GE, Naylor SL, Sakaguchi AY, Smith D, Jarrett-Nedwin J, Pennica D, Goeddel DV, Gray PW.: Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic Acids Res.* 1985 Sep 11;13(17):6361-73.
- Neumann B, Machleidt T, Lifka A, Pfeffer K, Vestweber D, Mak TW, Holzmann B, Kronke M.: Crucial role of 55-kilodalton TNF receptor in TNF-induced adhesion molecule expression and leukocyte organ infiltration. *J Immunol.* 1996 Feb 15;156(4):1587-93.
- Nicaud V, Raoux S, Poirier O, Cambien F, O'Reilly DS, Tiret L.: The TNF alpha/G-308A polymorphism influences insulin sensitivity in offspring of patients with coronary heart disease: the European Atherosclerosis Research Study II. *Atherosclerosis.* 2002 Apr;161(2):317-25.
- Nicholas J, Ruvolo VR, Burns WH, Sandford G, Wan X, Ciuffo D, Hendrickson SB, Guo HG, Hayward GS, Reitz MS.: Kaposi's sarcoma-associated human herpesvirus-8 encodes homologues of macrophage inflammatory protein-1 and interleukin-6. *Nat Med.* 1997 Mar;3(3):287-92.
- Nicole S, Davoine CS, Topaloglu H, Cattolico L, Barral D, Beighton P, Hamida CB, Hammouda H, Cruaud C, White PS, Samson D, Urtizberea JA, Lehmann-Horn F, Weissenbach J, Hentati F, Fontaine B.: Perlecan, the major proteoglycan of basement membranes, is altered in patients with Schwartz-Jampel syndrome (chondrodystrophic myotonia). *Nat Genet.* 2000 Dec;26(4):480-3.
- Noonan DM, Fulle A, Valente P, Cai S, Horigan E, Sasaki M, Yamada Y, Hassell JR.: The complete sequence of perlecan, a basement membrane heparan sulfate proteoglycan, reveals extensive similarity with laminin A chain, low density lipoprotein-receptor, and the neural cell adhesion molecule. *J Biol Chem.* 1991 Dec;266(34):22939-47.
- Norman JG, Fink GW, Franz MG.: Acute pancreatitis induces intrapancreatic tumor necrosis factor gene expression.

- Arch Surg. 1995 Sep;130(9):966-70.
- Nugent MA, Iozzo RV. Fibroblast growth factor-2. *Int J Biochem Cell Biol.* 2000 Feb;32(2):115-20. Review.
- Nygaard O, Nordrehaug JE, Refsum H, Ueland PM, Farstad M, Vollset SE.: Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med.* 1997 Jul 24;337(4):230-6.
- Orita M, Iwahana H, Kanawaza H, Hayashi K, Sekiya T.: Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA,* 1989, 86: 2766-2770.
- Ornitz DM, Itoh N.: Fibroblast growth factors. *Genome Biol.* 2001;2(3):REVIEWS3005. Review.
- Ornitz DM, Yayon A, Flanagan JG, Svahn CM, Levi E, Leder P.: Heparin is required for cell-free binding of basic fibroblast growth factor to a soluble receptor and for mitogenesis in whole cells. *Mol Cell Biol.* 1992 Jan;12(1):240-7.
- Ornitz DM.: FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *Bioessays.* 2000 Feb;22(2):108-12. Review.
- Padovani JC, Pazin-Filho A, Simoes MV, Marin-Neto JA, Zago MA, Franco RF.: Gene polymorphisms in the TNF locus and the risk of myocardial infarction. *Thromb Res.* 2000 Nov 15;100(4):263-9.
- Paleolog EM, Delasalle SA, Buurman WA, Feldmann M.: Functional activities of receptors for tumor necrosis factor-alpha on human vascular endothelial cells. *Blood.* 1994 Oct 15;84(8):2578-90.
- Pannitteri G, Marino B, Campa PP, Martucci R, Testa U, Peschle C.: Interleukins 6 and 8 as mediators of acute phase response in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 1997 Sep 1;80(5):622-5.
- Pantelidis P, Fanning GC, Wells AU, Welsh KI, Du Bois RM.: Analysis of tumor necrosis factor-alpha, lymphotoxin-alpha, tumor necrosis factor receptor II, and interleukin-6 polymorphisms in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 May;163(6):1432-6.
- Paolisso G, Rizzo MR, Mazziotti G, Tagliamonte MR, Gambardella A, Rotondi M, Carella C, Giugliano D, Varricchio M, D'Onofrio F.: Advancing age and insulin resistance: role of plasma tumor necrosis factor-alpha. *Am J Physiol.* 1998 Aug;275(2 Pt 1):E294-9.
- Payne DA, Chamoun AJ, Seifert SL, Stouffer GA.: MTHFR 677 C-->T mutation: a predictor of early-onset coronary artery disease risk. *Thromb Res.* 2001 Aug 15;103(4):275-9.
- Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, Kohr WJ, Aggarwal BB, Goeddel DV.: Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature.* 1984 Dec 20-1985 Jan 2;312(5996):724-9.
- Perez-Martin J, Espinosa M.: Protein-induced bending as a transcriptional switch. *Science.* 1993 May 7;260(5109):805-7.
- Peschon JJ, Torrance DS, Stocking KL, Glaccum MB, Otten C, Willis CR, Charrier K, Morrissey PJ, Ware CB, Mohler KM.: TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation. *J Immunol.* 1998 Jan 15;160(2):943-52.
- Pezzini A, Del Zotto E, Archetti S, Negrini R, Bani P, Albertini A, Grassi M, Assanelli D, Gasparotti R, Vignolo LA, Magoni M, Padovani A.: Plasma homocysteine concentration, C677T MTHFR genotype, and 844ins68bp CBS genotype in young adults with spontaneous cervical artery dissection and atherothrombotic stroke. *Stroke.* 2002 Mar;33(3):664-9.
- Pfeffer K, Matsuyama T, Kundig TM, Wakeham A, Kishihara K, Shahinian A, Wiegmann K, Ohashi PS, Kronke M, Mak TW.: Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell.* 1993 May 7;73(3):457-67.
- Pfeilschifter J, Koditz R, Pfohl M, Schatz H.: Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. *Endocr Rev.* 2002 Feb;23(1):90-119. Review.

- Philip I, Plantefevre G, Vuillaumier-Barrot S, Vicaut E, LeMarie C, Henrion D, Poirier O, Levy BI, Desmots JM, Durand G, Benessiano J.: G894T polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with an enhanced vascular responsiveness to phenylephrine. *Circulation*. 1999 Jun 22;99(24):3096-8.
- Plaetinck G, Combe MC, Corthesy P, Sperisen P, Kanamori H, Honjo T, Nabholz M.: Control of IL-2 receptor-alpha expression by IL-1, tumor necrosis factor, and IL-2. Complex regulation via elements in the 5' flanking region. *J Immunol*. 1990 Nov 15;145(10):3340-7.
- Plutzky J.: Inflammatory pathways in atherosclerosis and acute coronary syndromes. *Am J Cardiol*. 2001 Oct 18;88(8A):10K-15K. Review.
- Pober JS, Bevilacqua MP, Mendrick DL, Lapierre LA, Fiers W, Gimbrone MA Jr.: Two distinct monokines, interleukin 1 and tumor necrosis factor, each independently induce biosynthesis and transient expression of the same antigen on the surface of cultured human vascular endothelial cells. *J Immunol*. 1986 Mar 1;136(5):1680-7.
- Pociot F, D'Alfonso S, Compasso S, Scorza R, Richiardi PM.: Functional analysis of a new polymorphism in the human TNF alpha gene promoter. *Scand J Immunol*. 1995 Oct;42(4):501-4.
- Pociot F, Molvig J, Wogensen L, Worsaae H, Dalboge H, Baek L, Nerup J.: A tumour necrosis factor beta gene polymorphism in relation to monokine secretion and insulin-dependent diabetes mellitus. *Scand J Immunol*. 1991 Jan;33(1):37-49.
- Pociot F, Wilson AG, Nerup J, Duff GW.: No independent association between a tumor necrosis factor-alpha promoter region polymorphism and insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Immunol*. 1993 Nov;23(11):3050-3.
- Polverini PJ, Leibovich SJ.: Induction of neovascularization in vivo and endothelial proliferation in vitro by tumor-associated macrophages. *Lab Invest*. 1984 Dec;51(6):635-42.
- Ponikowski P, Piepoli M, Chua TP, Banasiak W, Francis D, Anker SD, Coats AJ.: The impact of cachexia on cardiorespiratory reflex control in chronic heart failure. *Eur Heart J*. 1999 Nov;20(22):1667-75.
- Prince RL.: Counterpoint: estrogen effects on calcitropic hormones and calcium homeostasis. *Endocr Rev*. 1994 Jun;15(3):301-9. Review.
- Radhakrishnamurthy B, Tracy RE, Dalferes ER Jr, Berenson GS.: Proteoglycans in human coronary arteriosclerotic lesions. *Exp Mol Pathol*. 1998;65(1):1-8.
- Rady PL, Tying SK, Hudnall SD, Vargas T, Kellner LH, Nitowsky H, Matalon RK.: Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR): the incidence of mutations C677T and A1298C in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Med Genet*. 1999 Oct 8;86(4):380-4.
- Ramlau J: Protein binding to charge-derivatized membranes in blotting procedures-a critical study. *CRC handbook of immunoblotting of proteins*. CRC USA. Vol I: 109-111.
- Rankinen T, Rice T, Perusse L, Chagnon YC, Gagnon J, Leon AS, Skinner JS, Wilmore JH, Rao DC, Bouchard C.: NOS3 Glu298Asp genotype and blood pressure response to endurance training: the HERITAGE family study. *Hypertension*. 2000 Nov;36(5):885-9.
- Rappolee DA, Mark D, Banda MJ, Werb Z.: Wound macrophages express TGF-alpha and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping. *Science*. 1988 Aug 5;241(4866):708-12.
- Razin A, Riggs AD.: DNA methylation and gene function. *Science*. 1980 Nov 7;210(4470):604-10. Review.
- Rauchhaus M, Muller-Werdan U.: Cytokines in heart diseases. *Internist (Berl)*. 2001 Jan;42(1):75-84. Review.
- Reckless J, Rubin EM, Verstuyft JB, Metcalfe JC, Grainger DJ.: Monocyte chemoattractant protein-1 but not tumor necrosis factor-alpha is correlated with monocyte infiltration in mouse lipid lesions. *Circulation*. 1999 May 4;99(17):2310-6.
- Renko M, Quarto N, Morimoto T, Rifkin DB.: Nuclear and cytoplasmic localization of different basic fibroblast growth

factor species. *J Cell Physiol.* 1990 Jul;144(1):108-14.

Ridker PM.: Novel risk factors and markers for coronary disease. *Adv Intern Med.* 2000;45:391-418. Review.

Riemann CD, Massey CV, McCarron DL, Borkowski P, Johnson PC, Ziskind AA.: Ionic contrast agent-mediated endothelial injury causes increased platelet deposition to vascular surfaces. *Am Heart J.* 1993 Jan;125(1):71-8.

Riemann D, Kehlen A, Langner J.: Stimulation of the expression and the enzyme activity of aminopeptidase N/CD13 and dipeptidylpeptidase IV/CD26 on human renal cell carcinoma cells and renal tubular epithelial cells by T cell-derived cytokines, such as IL-4 and IL-13. *Clin Exp Immunol.* 1995 May;100(2):277-83.

Rietschel ET, Brade H, Holst O, Brade L, Muller-Loennies S, Mamat U, Zahringer U, Beckmann F, Seydel U, Brandenburg K, Ulmer AJ, Mattern T, Heine H, Schletter J, Loppnow H, Schonbeck U, Flad HD, Hauschildt S, Schade UF, Di Padova F, Kusumoto S, Schumann RR.: Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996;216:39-81. Review.

Robertson KD, Wolffe AP.: DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet.* 2000 Oct;1(1):11-9. Review.

Roselaar SE, Kakkanathu PX, Daugherty A.: Lymphocyte populations in atherosclerotic lesions of apoE <sup>-/-</sup> and LDL receptor <sup>-/-</sup> mice. Decreasing density with disease progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996 Aug;16(8):1013-8.

Rosenberg RD, Shworak NW, Liu J, Schwartz JJ, Zhang L.: Heparan sulfate proteoglycans of the cardiovascular system. Specific structures emerge but how is synthesis regulated? *J Clin Invest.* 1997 Dec 1;100(11 Suppl):S67-75. Review.

Ross R.: Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J.* 1999 Nov;138(5 Pt 2):S419-20. Review.

Ross R.: Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999 Jan 14;340(2):115-26. Review.

Ross R.: The pathogenesis of atherosclerosis-an update. *N Engl J Med.* 1986 Feb 20;314(8):488-500. Review.

Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801-9.

Rothe J, Lesslauer W, Lotscher H, Lang Y, Koebel P, Kontgen F, Althage A, Zinkernagel R, Steinmetz M, Bluethmann H.: Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature.* 1993 Aug 26;364(6440):798-802.

Ruel M, Laham RJ, Parker JA, Post MJ, Ware JA: Long-term effects of surgical angiogenic therapy with fibroblast growth factor 2 protein. *J Thorac Cardiovasc Surg* 124: 28-34.

Ruddle NH, Li CB, Tang WL, Gray PW, McGrath KM.: Lymphotoxin: cloning, regulation and mechanism of killing. *Ciba Found Symp.* 1987;131:64-82.

Saksela O, Moscatelli D, Sommer A, Rifkin DB.: Endothelial cell-derived heparan sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation. *J Cell Biol.* 1988 Aug;107(2):743-51.

Samanta AK, Oppenheim JJ, Matsushima K.: Interleukin 8 (monocyte-derived neutrophil chemotactic factor) dynamically regulates its own receptor expression on human neutrophils. *J Biol Chem.* 1990 Jan 5;265(1):183-9.

Sanchez-Guerra M, Combarros O, Alvarez-Arcaya A, Mateo I, Berciano J, Gonzalez-Garcia J, Llorca J.: The Glu298Asp polymorphism in the NOS3 gene is not associated with sporadic Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2001 Apr;70(4):566-7.

Sariban E, Imamura K, Luebbers R, Kufe D.: Transcriptional and posttranscriptional regulation of tumor necrosis factor gene expression in human monocytes. *J Clin Invest.* 1988 May;81(5):1506-10.

Schreyer SA, Vick CM, LeBoeuf RC.: Loss of lymphotoxin-alpha but not tumor necrosis factor-alpha reduces atherosclerosis in mice. *J Biol Chem.* 2002 Apr 5;277(14):12364-8.

Schmitz C, Lindpaintner K, Verhoef P, Gaziano JM, Buring J.: Genetic polymorphism of methylenetetrahydrofolate

reductase and myocardial infarction. A case-control study. *Circulation*. 1996 Oct 15;94(8):1812-4.

Scholz D, Cai W-J, Schaper W: Arteriogenesis, a new concept of vascular adaptation in occlusive disease. *Angiogenesis* 4: 247-257.

Schulz S: Proteinbiochemische und molekulargenetische Untersuchungen zu metabolischen Risikofaktoren bei Myokardinfarkt. Dissertation 2000.

Schulze-Osthoff K, Goerdts S, Sorg C.: Expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) in Kaposi's sarcoma: an immunohistologic study. *J Invest Dermatol*. 1990 Aug;95(2):238-40.

Severs NJ.: Low serum cholesterol and suicide. *Lancet*. 1992 Apr 18;339(8799):1001.

Shakhov AN, Collart MA, Vassalli P, Nedospasov SA, Jongeneel CV.: Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene in primary macrophages. *J Exp Med*. 1990 Jan 1;171(1):35-47.

Sharma SB, Dwivedi S, Kumar N, Prabhu KM, Madan N.: Studies on oxidative stress, serum iron and iron binding capacity in subjects prone to the risk of coronary artery disease. *Indian Heart J*. 2000 Sep-Oct;52(5):583-6.

Shimasaki Y, Yasue H, Yoshimura M, Nakayama M, Kugiyama K, Ogawa H, Harada E, Masuda T, Koyama W, Saito Y, Miyamoto Y, Ogawa Y, Nakao K.: Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 1998 Jun;31(7):1506-10.

Siegenthaler W, Kaufmann W, Hornborstel W, Waller HD.: *Lehrbuch der Inneren Medizin*. Georg-Thieme-Verlag Stuttgart/New York, 1992, 3.Auflage: 13-24.

Simons M, Annex BH, Laham RJ: Pharmacological treatment of coronary artery disease with recombinant fibroblast growth factor 2: double blind, randomized, controlled clinical trial. *Circulation* 105: 788-793.

Simons M, Bonow RO, Chrons NA, Cohen DJ, Giordano FJ, Hammond HK, Laham RJ: Clinical trials in coronary angiogenesis: Issues, Problems, Consensus. *Circulation* 102: E73-86.

Skoog T, van't Hooft FM, Kallin B, Jovinge S, Boquist S, Nilsson J, Eriksson P, Hamsten A.: A common functional polymorphism (C-->A substitution at position -863) in the promoter region of the tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene associated with reduced circulating levels of TNF-alpha. *Hum Mol Genet*. 1999 Aug;8(8):1443-9.

Spiegelman BM, Hotamisligil GS.: Through thick and thin: wasting, obesity, and TNF alpha. *Cell*. 1993 May 21;73(4):625-7. Review.

Spies T, Morton CC, Nedospasov SA, Fiers W, Pious D, Strominger JL.: Genes for the tumor necrosis factors alpha and beta are linked to the human major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Nov;83(22):8699-702.

Spriggs DR, Deutsch S, Kufe DW.: Genomic structure, induction, and production of TNF-alpha. *Immunol Ser*. 1992;56:3-34. Review.

Stampfer MJ, Malinow MR, Willett WC, Newcomer LM, Upson B, Ullmann D, Tishler PV, Hennekens CH.: A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians. *JAMA*. 1992 Aug 19;268(7):877-81.

Starnes HF Jr, Warren RS, Jeevanandam M, Gabilove JL, Larchian W, Oettgen HF, Brennan MF.: Tumor necrosis factor and the acute metabolic response to tissue injury in man. *J Clin Invest*. 1988 Oct;82(4):1321-5.

Stauss HM, Godecke A, Mrowka R, Schrader J, Persson PB. Enhanced blood pressure variability in eNOS knockout mice. *Hypertension*. 1999 Jun;33(6):1359-63.

Stuber F, Udalova IA, Book M, Drutskaya LN, Kuprash DV, Turetskaya RL, Schade FU, Nedospasov SA.: -308 tumor necrosis factor (TNF) polymorphism is not associated with survival in severe sepsis and is unrelated to lipopolysaccharide inducibility of the human TNF promoter. *J Inflamm*. 1995-96;46(1):42-50.

- Suen WE, Bergman CM, Hjelmstrom P, Ruddle NH.: A critical role for lymphotoxin in experimental allergic encephalomyelitis. *J Exp Med.* 1997 Oct 20;186(8):1233-40.
- Symons JA, Eastgate JA, Duff GW.: Purification and characterization of a novel soluble receptor for interleukin 1. *J Exp Med.* 1991 Nov 1;174(5):1251-4.
- Takahashi JA, Mori H, Fukumoto M, Igarashi K, Jaye M, Oda Y, Kikuchi H, Hatanaka M.: Gene expression of fibroblast growth factors in human gliomas and meningiomas: demonstration of cellular source of basic fibroblast growth factor mRNA and peptide in tumor tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Aug;87(15):5710-4.
- Takeyama H, Wakamiya N, O'Hara C, Arthur K, Niloff J, Kufe D, Sakurai K, Spriggs D.: Tumor necrosis factor expression by human ovarian carcinoma in vivo. *Cancer Res.* 1991 Aug 15;51(16):4476-80.
- Takii T, Hayashi H, Marunouchi T, Onozaki K.: Interleukin-1 down-regulates type I interleukin 1 receptor mRNA expression in a human fibroblast cell line TIG-1 in the absence of prostaglandin E2 synthesis. *Lymphokine Cytokine Res.* 1994 Jun;13(3):213-9.
- Tartaglia LA, Goeddel DV, Reynolds C, Figari IS, Weber RF, Fendly BM, Palladino MA Jr.: Stimulation of human T-cell proliferation by specific activation of the 75-kDa tumor necrosis factor receptor. *J Immunol.* 1993 Nov 1;151(9):4637-41.
- Tartaglia LA, Rothe M, Hu YF, Goeddel DV.: Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF receptor. *Cell.* 1993 Apr 23;73(2):213-6. Review.
- Thie A, Freitag J, Spitzer K, Zeumer H, Kunze K.: Vertebrobasilar ischemia. Value of Doppler ultrasound in the acute phase. *Nervenarzt.* 1992 Jun;63(6):341-6.
- Thomas PS.: Tumour necrosis factor-alpha: the role of this multifunctional cytokine in asthma. *Immunol Cell Biol.* 2001 Apr;79(2):132-40. Review.
- Thompson GR.: Serum cytokines and cardiovascular risk factors. *Heart.* 1998 Apr;79(4):422.
- Todesco L, Angst C, Litynski P, Loehrer F, Fowler B, Haefeli WE.: Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, plasma homocysteine and age. *Eur J Clin Invest.* 1999 Dec;29(12):1003-9.
- Tokgozoglu SL, Alikasifoglu M, Unsal, Atalar E, Aytemir K, Ozer N, Ovunc K, Usal O, Kes S, Tuncbilek E.: Methylene tetrahydrofolate reductase genotype and the risk and extent of coronary artery disease in a population with low plasma folate. *Heart.* 1999 May;81(5):518-22.
- Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Durand JB, Bies RD, Young JB, Mann DL.: Tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. *Circulation.* 1996 Feb 15;93(4):704-11.
- Travers AA.: Why bend DNA? *Cell.* 1990 Jan 26;60(2):177-80. Review.
- Turetskaya RL, Fashena SJ, Paul NL, Ruddle NH.: Genomic structure, induction, and production of TNF-beta. *Immunol Ser.* 1992;56:35-60. Review.
- Udalova IA, Nedospasov SA, Webb GC, Chaplin DD, Turetskaya RL.: Highly informative typing of the human TNF locus using six adjacent polymorphic markers. *Genomics.* 1993 Apr;16(1):180-6.
- Uglieroro AM, Turbay D, Pesavento PA, Delgado JC, McKenzie FE, Gribben JG, Hartl D, Yunis EJ, Goldfeld AE.: Identification of three new single nucleotide polymorphisms in the human tumor necrosis factor-alpha gene promoter. *Tissue Antigens.* 1998 Oct;52(4):359-67.
- Vaddi K, Nicolini FA, Mehta P, Mehta JL.: Increased secretion of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma by mononuclear leukocytes in patients with ischemic heart disease. Relevance in superoxide anion generation. *Circulation.* 1994 Aug;90(2):694-9.
- van Bockxmeer FM, Mamotte CD, Vasikaran SD, Taylor RR.: Methylenetetrahydrofolate reductase gene and coronary artery disease. *Circulation.* 1997 Jan 7;95(1):21-3.

- van der Put NM, Eskes TK, Blom HJ.: Is the common 677C-->T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene a risk factor for neural tube defects? A meta-analysis. *QJM*. 1997 Feb;90(2):111-5.
- Vassalli P.: The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol*. 1992;10:411-52. Review.
- Vendrell J, Gutierrez C, Pastor R, Richart C.: A tumor necrosis factor-beta polymorphism associated with hypertriglyceridemia in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*. 1995 Jun;44(6):691-4.
- Verhoef P, Hennekens CH, Malinow MR, Kok FJ, Willett WC, Stampfer MJ.: A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of ischemic stroke. *Stroke*. 1994 Oct;25(10):1924-30.
- Verhoef P, Kok FJ, Kluijtmans LA, Blom HJ, Refsum H, Ueland PM, Kruyssen DA.: The 677C-->T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: associations with plasma total homocysteine levels and risk of coronary atherosclerotic disease. *Atherosclerosis*. 1997 Jul 11;132(1):105-13.
- Verhoef P, Kok FJ, Kruyssen DA, Schouten EG, Witteman JC, Grobbee DE, Ueland PM, Refsum H.: Plasma total homocysteine, B vitamins, and risk of coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997 May;17(5):989-95.
- Vilcek JT.: Cytokines in 1995. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1996 Jun;7(1):103-6.
- Voelker W, Reul H, Stelzer T, Schmidt A, Karsch KR.: Pressure recovery in aortic stenosis: an in vitro study in a pulsatile flow model. *J Am Coll Cardiol*. 1992 Dec;20(7):1585-93.
- Volker W, Bohm A, Schmidt A, Svahn CM, Gellerbring AK, Mattsson C, Ekvarn S, Robenek H, Buddecke E.: Inhibition of smooth muscle cell proliferation and neointimal growth by low-anticoagulant heparin. *Arzneimittelforschung*. 1995 May;45(5):546-50.
- Wagner DR, Kubota T, Sanders VJ, McTiernan CF, Feldman AM.: Differential regulation of cardiac expression of IL-6 and TNF-alpha by A2- and A3-adenosine receptors. *Am J Physiol*. 1999 Jun;276(6 Pt 2):H2141-7.
- Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP.: Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:331-67. Review.
- Wallsh E, Weinstein GS, Franzone A et al.: Inflammation of the coronary arteries in patients with unstable angina. *Tex Heart Inst J*, 1986; 13: 105-108.
- Wang XL, Sim AS, Badenhop RF, McCredie RM, Wilcken DE.: A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Nat Med*. 1996 Jan;2(1):41-5.
- Ware CF, VanArsdale S, VanArsdale TL.: Apoptosis mediated by the TNF-related cytokine and receptor families. *J Cell Biochem*. 1996 Jan;60(1):47-55. Review.
- Ware CF, VanArsdale TL, Crowe PD, Browning JL.: The ligands and receptors of the lymphotoxin system. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1995;198:175-218. Review.
- Warner SJ, Libby P.: Human vascular smooth muscle cells. Target for and source of tumor necrosis factor. *J Immunol*. 1989 Jan 1;142(1):100-9.
- Webb GC, Chaplin DD.: Genetic variability at the human tumor necrosis factor loci. *J Immunol*. 1990 Aug 15;145(4):1278-85.
- Wei J, Xu H, Davies JL, Hemmings GP.: Increase of plasma IL-6 concentration with age in healthy subjects. *Life Sci*. 1992;51(25):1953-6.
- Wellinghausen N, Martin M, Rink L.: Zinc inhibits interleukin-1-dependent T cell stimulation. *Eur J Immunol*. 1997 Oct;27(10):2529-35.
- Wellstein A, Czubayko F.: Inhibition of fibroblast growth factors. *Breast Cancer Res Treat*. 1996;38(1):109-19.
- Werb Z, Underwood JL, Rappolee DA: Mononuclear Phagocytes. 1992 (Van Furtch, R., ed), pp 404-409, Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA.

- Wever R, Stroes E, Rabelink TJ.: Nitric oxide and hypercholesterolemia: a matter of oxidation and reduction? *Atherosclerosis*. 1998 Apr;137 Suppl:S51-60. Review.
- Wheelock EF, Edelman R.: Specific role of each human leukocyte type in viral infections. 3. 17D yellow fever virus replication and interferon production in homogeneous leukocyte cultures treated with phytohemagglutinin. *J Immunol*. 1969 Sep;103(3):429-36.
- White MB, Carvalho M, Derse D, O'Brien SJ, Dean M: Detection of single base substitution as heteroduplex polymorphisms. *Genomics* 1992, 12: 301-306.
- Whitehead AS, Gallagher P, Mills JL, Kirke PN, Burke H, Molloy AM, Weir DG, Shields DC, Scott JM.: A genetic defect in 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase in neural tube defects. *QJM*. 1995 Nov;88(11):763-6.
- Wick G, Schett G, Amberger A, Kleindienst R, Xu Q.: Is atherosclerosis an immunologically mediated disease? *Immunol Today*. 1995 Jan;16(1):27-33. Review.
- Wiedermann CJ, Kiechl S, Dunzendorfer S, Schratzberger P, Egger G, Oberhollenzer F, Willeit J.: Association of endotoxemia with carotid atherosclerosis and cardiovascular disease: prospective results from the Bruneck Study. *J Am Coll Cardiol*. 1999 Dec;34(7):1975-81.
- Williams TW, Granger GA.: Lymphocyte in vitro cytotoxicity: mechanism of lymphotoxin-induced target cell destruction. *J Immunol*. 1969 Apr;102(4):911-8.
- Wilson AG, de Vries N, Pociot F, di Giovine FS, van der Putte LB, Duff GW.: An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor alpha promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles. *J Exp Med*. 1993 Feb 1;177(2):557-60.
- Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AI, Duff GW.: Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet*. 1992 Aug;1(5):353.
- Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW.: Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Apr 1;94(7):3195-9.
- Woiciechowsky C, Schoning B, Daberkow N, Asche K, Stoltenburg G, Lanksch WR, Volk HD.: Brain-IL-1beta induces local inflammation but systemic anti-inflammatory response through stimulation of both hypothalamic-pituitary-adrenal axis and sympathetic nervous system. *Brain Res*. 1999 Jan 23;816(2):563-71.
- Xu QB, Oberhuber G, Gruschwitz M, Wick G.: Immunology of atherosclerosis: cellular composition and major histocompatibility complex class II antigen expression in aortic intima, fatty streaks, and atherosclerotic plaques in young and aged human specimens. *Clin Immunol Immunopathol*. 1990 Sep;56(3):344-59.
- Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM.: Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell*. 1991 Feb 22;64(4):841-8.
- Yen JH, Chen CJ, Tsai WC, Lin CH, Ou TT, Wu CC, Liu HW.: Tumor necrosis factor promoter polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis in Taiwan. *J Rheumatol*. 2001 Aug;28(8):1788-92.
- Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, Shimasaki Y, Sumida H, Sugiyama S, Kugiyama K, Ogawa H, Ogawa Y, Saito Y, Miyamoto Y, Nakao K.: A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese. *Hum Genet*. 1998 Jul;103(1):65-9.
- Zatz R, Baylis C.: Chronic nitric oxide inhibition model six years on. *Hypertension*. 1998 Dec;32(6):958-64.
- Zhao PZ, Deng ZL, Zhang ZS, Zhang HY, Wang HY, Zhu XQ, Kun-xong L, Ying L, Zhong C, Rui-biao Y, et al.: The influence of age and location of arterial lesion on the pathogenesis and development of early atherosclerotic lesions in youth. *Chin Med J (Engl)*. 1994 Mar;107(3):171-5.
- Zheng YZ, Tong J, Do XP, Pu XQ, Zhou BT.: Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase C677T and its association with arterial and venous thrombosis in the Chinese population. *Br J Haematol*. 2000 Jun;109(4):870-4.

Zhou X, Hansson GK.: Detection of B cells and proinflammatory cytokines in atherosclerotic plaques of hypercholesterolaemic apolipoprotein E knockout mice. *Scand J Immunol.* 1999 Jul;50(1):25-30.

Zimmerman P, Hunter J, Bailey E, Nielson J, Nutman T: Tumor necrosis factor alpha promoter mutation frequencies among four North American racial groups. *Hum Immunol* 1996; 46 (S1): 52.

Zinman B, Hanley AJ, Harris SB, Kwan J, Fantus IG.: Circulating tumor necrosis factor-alpha concentrations in a native Canadian population with high rates of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Jan;84(1):272-8.

Zohlhofer D, Graeve L, Rose-John S, Schooltink H, Dittrich E, Heinrich PC.: The hepatic interleukin-6 receptor. Down-regulation of the interleukin-6 binding subunit (gp80) by its ligand. *FEBS Lett.* 1992 Jul 20;306(2-3):219-22.

## **Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich mich mit der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe. Die Arbeit wurde selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst. Es wurden nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt. Die den verwendeten Werken wörtlich und inhaltlich entnommene Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Halle, im April 2003

Undraga Schagdarsurengin

## Curriculum vitae

Name: Undraga Schagdarsurengin  
Geburtsdatum: 11.04.1971  
Geburtsort: Ulaanbaatar, Mongolei  
Familienstand: verheiratet, ein Kind: Tamir Temuschin, geboren am 15.01.1994

### Schulbildung:

1978-1988 Besuch der Oberschule Nr.3 in Ulaanbaatar mit Abschluß der allgemeinen Hochschulreife

### Studienzeiten:

1988-1989 Deutsch-Sprachkurs an der Mongolischen National Universität in Ulaanbaatar  
1989-1990 Deutsch-Fachsprachkurs am Herder-Institut in Leipzig  
1990-1996 Studium der Biologie an der MLU Halle-Wittenberg, Fachbereich Biologie, Hauptfach: Genetik, 1. Nebenfach: Mikrobiologie, 2. Nebenfach: Biochemie, 3. Nebenfach: Pflanzenphysiologie  
1996-1997 Diplomarbeit am Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Titel der Arbeit: "Charakterisierung der malignen fibrösen Histiozytome mit Hilfe von comparativer genomischer Hybridisierung (CGH) "  
Betreuer: Dr. Hinze, Dr. Schmidt  
1997 Diplom im Fachbereich Biologie, Prädikat: „gut“  
1997-2001 wissenschaftliche Mitarbeiterin im Rahmen des umweltmedizinischen Forschungsschwerpunktes der MLU Halle-Wittenberg im Drittmittelprojekt T5 am Institut für Humangenetik und Medizinische Biologie, Thema: „Genetische Risikokonstellation bei Patienten mit koronarer Atherosklerose“  
(Leiterin Dr. Gläser)  
Seit Sept. 2001 wissenschaftliche Mitarbeiterin im Rahmen des NBL3-Projekts der MLU Halle-Wittenberg in der AG Tumorgenetik am Institut für Humangenetik und Medizinische Biologie, Thema: „Epigenetische Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen in Tumoren“  
(Leiter Dr. Dammann)

Halle, im April 2003