

Aus dem Zentrum für Kardiologie  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Längenpolymorphismus des Hämoxygenase-1-Promotors und sein Zusammenhang mit  
kardiovaskulären Erkrankungen

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Canan Simsek  
Geboren am 01.01.1988 in Offenbach am Main

Mainz, 2021

Tag der Promotion:



# Inhaltsverzeichnis

|                                                                                                                                       |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Abkürzungsverzeichnis.....                                                                                                            | I   |
| Abbildungsverzeichnis.....                                                                                                            | III |
| Tabellenverzeichnis.....                                                                                                              | IV  |
| 1 Einleitung / Ziel der Dissertation.....                                                                                             | 1   |
| 1.1 Abstract.....                                                                                                                     | 1   |
| 2 Wissenschaftlicher Hintergrund.....                                                                                                 | 2   |
| 2.1 Herz-Kreislauf-Erkrankungen und ihre Bedeutung für die Mortalität und Morbidität in der modernen Gesellschaft.....                | 2   |
| 2.2 Zusammenhänge zwischen vaskulärer Funktion und Herz-Kreislauf-Erkrankungen....                                                    | 5   |
| 2.3 Hämoxxygenase-1 und ihre Bedeutung für kardiovaskuläre Erkrankungen.....                                                          | 9   |
| 2.3.1 Die Funktion der Hämoxxygenase .....                                                                                            | 9   |
| 2.3.2 Bedeutung des HO-1 Promotors und seiner Längenpolymorphismen tierexperimentell und klinisch .....                               | 11  |
| 3 Material und Methoden .....                                                                                                         | 17  |
| 3.1 Rekrutierung von Probanden und Genotypisierung aus dem A2- Kollektiv der GHS 17                                                   |     |
| 3.1.1 Geräte.....                                                                                                                     | 19  |
| 3.1.2 Chemikalien .....                                                                                                               | 19  |
| 3.1.3 Vorgefertigte Kits.....                                                                                                         | 20  |
| 3.1.4 Software.....                                                                                                                   | 20  |
| 3.1.5 Puffer und Lösungen .....                                                                                                       | 20  |
| 3.2 Essayetablierung.....                                                                                                             | 22  |
| 3.2.1 PCR und Auswahl der PCR- Primer .....                                                                                           | 22  |
| 3.3 Klonierung.....                                                                                                                   | 24  |
| 3.3.1 Prinzipien der DNA-Klonierung mithilfe eines TOPO-Vektors.....                                                                  | 24  |
| 3.3.2 Klonierung.....                                                                                                                 | 27  |
| 3.3.3 Transformation .....                                                                                                            | 28  |
| 3.4 Blau-Weiß-Selektion, DNA-Minipräparation, Sequenzierung der PCR-Produkte und Kalibration des Assays für die Fragmentanalyse ..... | 28  |
| 3.5 Sequenzierung.....                                                                                                                | 34  |
| 3.6 Auswertung der Sequenzierungsergebnisse.....                                                                                      | 37  |
| 4 Ergebnisse .....                                                                                                                    | 37  |
| 4.1 Qualitätskontrolle der Ergebnisse der Fragmentanalyse .....                                                                       | 37  |
| 4.1.1 Verteilung der Genotypen bezüglich der Fluoreszenzfarbstoffe.....                                                               | 37  |
| 4.1.2 Überprüfung des Ergebnisses mittels Hardy-Weinberg-Äquilibrium.....                                                             | 39  |
| 4.2 Statistische Auswertung der Ergebnisse .....                                                                                      | 43  |
| 4.3 Betrachtung des Zusammenhangs zwischen (GT) <sub>n</sub> -Allellängen und FMD.....                                                | 45  |
| 4.4 Betrachtung des Zusammenhangs zwischen (GT) <sub>n</sub> -Allellängen und Bilirubin.....                                          | 48  |
| 5 Diskussion.....                                                                                                                     | 51  |
| 5.1 Verteilung der Patientendaten und Studiendesign .....                                                                             | 52  |
| 5.1.1 Datenverteilung und Studienaufbau in vergleichbaren Studien.....                                                                | 52  |

|       |                                                                    |    |
|-------|--------------------------------------------------------------------|----|
| 5.1.2 | Schlussfolgerung und Ausblick auf zukünftige Forschungsziele ..... | 57 |
| 6     | Zusammenfassung .....                                              | 58 |
| 7     | Literaturverzeichnis.....                                          | 60 |
| 8     | Danksagung .....                                                   | 67 |
| 9     | Tabellarischer Lebenslauf .....                                    | 68 |

## Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung | Bedeutung                                   |
|-----------|---------------------------------------------|
| HMOX-1    | Hämoxygenase-1                              |
| FMD       | Flussmedierte Dilatation                    |
| GHS       | Gutenberg Gesundheitsstudie                 |
| PCR       | Polymerase Chain Reaction                   |
| WHO       | World Health Organisation                   |
| NCD       | Non communicable disease                    |
| KHK       | Koronre Herzkrankheit                       |
| BMI       | Body- Mass-Index                            |
| ACh       | Acetylcholin                                |
| NO        | Stickstoffmonoxid                           |
| NOS       | Stickstoffmonoxidsynthase                   |
| eNOS      | Endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase      |
| cGMP      | zyklisches Guanosinmonophosphat             |
| ROS       | reaktive Sauerstoffradikale                 |
| ACE       | angiotensin converting enzyme               |
| mRNA      | messenger Ribonukleinsäure                  |
| EDTA      | Ethylendiamintetraacetat                    |
| DNA       | Desoxyribonucleinsäure                      |
| ddNTP     | Didesoxynukleosidtriphosphat                |
| CAD       | Coronary artery disease                     |
| VNTR      | variable number tandem repeats              |
| PTCA      | Perkutane transluminale Koronarangioplastie |
| pAVK      | Periphere arterielle Verschlusskrankheit    |
|           |                                             |
|           |                                             |
|           |                                             |
|           |                                             |
|           |                                             |
|           |                                             |



## Abbildungsverzeichnis

|                                                                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 1 Ablaufschema der GHS .....                                                                                                                                                                        | 18 |
| Abbildung 2 <i>Produkt mit D4 (blauer) Markierung</i> .....                                                                                                                                                   | 23 |
| Abbildung 3 Prinzip/Schema der Klonierung und Insert-Markierung auf dem bakteriellen Vektor.....                                                                                                              | 26 |
| Abbildung 4 Ergebnis der Sequenzierung der Klonen mit M13/M13R.....                                                                                                                                           | 30 |
| Abbildung 5 Ergebniss der Gelelektrophorese .....                                                                                                                                                             | 30 |
| Abbildung 6 a, b, c Bestimmung der zu erwarteten Längen der GT-Repeats durch Extrapolation. Die ermittelten Gleichungen wurden nach x aufgelöst und gegen die Fragmentlänge auf der y-Achse eingetragen. .... | 31 |
| Abbildung 7 Zuordnungstabelle: Tabellarische Auflistung der per Extrapolation ermittelten(GT)n-Repeats .....                                                                                                  | 32 |
| Abbildung 8 Beispiel für einen Genotypisierungslauf.....                                                                                                                                                      | 37 |
| Abbildung 9 a,b,c,d Aufteilung der Häufigkeiten nach Farbstoffmarkierung.....                                                                                                                                 | 39 |
| Abbildung 11 Darstellung des Hardy-Weinberg-Äquilibrium.....                                                                                                                                                  | 40 |
| Abbildung 12 Darstellung des Hardy-Weinberg-Äquilibrium.....                                                                                                                                                  | 40 |
| Abbildung 13 Darstellung des Hardy-Weinberg-Äquilibrium.....                                                                                                                                                  | 40 |
| Abbildung 14 Modifizierung des Hardy-Weinberg-Äquilibrium.....                                                                                                                                                | 41 |
| Abbildung 15 Vergleich der beobachteten Genotypverteilung und der nach Hardy-Weinberg-Äquilibrium erwarteten Genotypverteilung (GenePop 4.2).....                                                             | 42 |
| Abbildung 16 Vergleich der beobachteten Genotypverteilung und der nach Hardy-Weinberg-Äquilibrium erwarteten Genotypverteilung nach Repeat-Kategorien (kurz = S $\leq$ 25, lang = L > 25) (GenePop 4.2).....  | 43 |

## Tabellenverzeichnis

|                                                                                                                                                                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabelle 1 Verwendete Geräte mit Produkt- und Herstellername .....                                                                                                                                                                                                      | 19 |
| Tabelle 2 Verwendete Chemikalien mit Produkt- und Herstellernamen.....                                                                                                                                                                                                 | 20 |
| Tabelle 3 Verwendete Kits mit Produkt- und Herstellernamen.....                                                                                                                                                                                                        | 20 |
| Tabelle 4 Verwendete Software mit Produkt- und Herstellernamen .....                                                                                                                                                                                                   | 20 |
| Tabelle 5 Patientendaten mit der Verteilung relevanter Parameter: stetige Variablen werden mit Median (Q1/Q3) dargestellt; kategoriale Variablen werden mit absoluter und relativen Häufigkeiten beschrieben.....                                                      | 44 |
| Tabelle 6 Populationsmerkmale und ihre Ausprägungen.....                                                                                                                                                                                                               | 44 |
| Tabelle 7 Einflussgröße: (GT)n-repeats: betrachtet getrennt nach Allelen (d.h. Allel1, Allel2 und Interaktion zwischen beiden Allelen), so wird auch der Fall betrachtet: Maximum über beide Allele, da $\text{Allel 2} = \max(\text{Allel1}, \text{Allel2})$ ist..... | 45 |
| Tabelle 8 Ergebnisse der multivariaten linearen Regressionsanalyse, unter Miteinbeziehung der Standardabweichung. ....                                                                                                                                                 | 46 |
| Tabelle 9 Ergebnisse des multivariaten Regressionsmodells zum Nachweis eines nicht-linearen Zusammenhangs zwischen Allellängen und FMD.....                                                                                                                            | 46 |
| Tabelle 10 Ergebnisse des multivariate Regressionsmodell und Erzeugung eines 95%-Konfidenzintervall und p-Wert zum Nachweis eines Zusammenhanges zwischen der Summe der Allele 1 und 2 und der FMD.....                                                                | 46 |
| Tabelle 11 Einflussgrösse (GT)n-Repeats 30/30 vs. 23/23.....                                                                                                                                                                                                           | 47 |
| Tabelle 12 Zusammenhang zwischen Allelklassen und FMD. ....                                                                                                                                                                                                            | 47 |
| Tabelle 13 Interpretation: Die Ergebnisse lassen auf einen Zusammenhang zwischen (GT)n-Repeats und FMD bei Individuen mit arterieller Hypertonie schließen ( $p=0.027$ ). Pro steigende Einheit der Summe über beide Allele steigt das FMD im Mittel um 0.036 an. .... | 47 |
| Tabelle 14 : Lineare Regressionsanalyse für den Zusammenhang zwischen Allellänge und FMD bei Studienteilnehmern mit KHK. ....                                                                                                                                          | 48 |

|                                                                                                                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabelle 15 Regressionsanalyse mit Einflussgröße (GT)n-repeats aufgeteilt nach Klassen: short-short, short-long, long-long (Cut-off-point: 27).....                                      | 48 |
| Tabelle 16 Lineare Regressionsanalyse: Einflussgröße Summe der GT-Repeats aus Allel 1 und 2 und abhängiger Variable FMD bei Diabetikern. ....                                           | 48 |
| Tabelle 17 Regressionsanalyse: Regressionsanalyse mit Einflussgröße (GT)n-repeats aufgeteilt nach Klassen: short-short, short-long, long-long (Cut-off-point: 27) bei Diabetikern. .... | 48 |
| Tabelle 18 Ergebnisse des linearen Regressionsmodell zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Allellängen und Bilirubin. ....                                                        | 49 |
| Tabelle 19 Lineare Regressionsanalyse mit Einflussgröße (GT)n-Repeats, dividiert durch die Standardabweichung. ....                                                                     | 49 |
| Tabelle 20 Multivariates Regressionsmodell für den Nachweis eines nicht-linearen Zusammenhangs zwischen Allellängen und Bilirubin. ....                                                 | 49 |
| Tabelle 21 Lineare Regressionsanalyse mit der Einflussgröße: (GT)n-repeats: Summe über beiden Allele.....                                                                               | 50 |
| Tabelle 22 : Lineare Regressionsanalyse mit der Einflussgröße: (GT)n-repeats: 30/30 vs 23/23.....                                                                                       | 50 |
| Tabelle 23 Lineare Regressionsanalyse mit der Einflussgröße: (GT)n-repeats: „Allel-Gruppen“ mit Häufigkeit $\geq 120$ . ....                                                            | 50 |
| Tabelle 24 Lineare Regressionsanalyse mit der Einflussgröße: (GT)n-repeats: „Allel-Gruppen“ mit Häufigkeit $\geq 200$ . ....                                                            | 50 |
| Tabelle 25 Lineares Regressionsmodell mit der Einflussgröße: (GT)n-repeats: short-short, short-long, long-long (Cut-off-point: 27). ....                                                | 50 |
| Tabelle 26 Zusammenhang von Allellänge und Bilirubin bei Teilnehmern mit einer Hypertonie.....                                                                                          | 51 |
| Tabelle 27 Regressionsanalyse: Einflussgröße (GT)n-repeats aufgeteilt nach Klassen: short-short, short-long, long-long (Cut-off-point: 27) bei Teilnehmern mit Hypertonie.....          | 51 |

|                                                                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabelle 28 Regressionsanalyse: Einflussgrösse (GT)n-Repeats, als Summe von Allel1 und Allel 2) und Zusammenhang mit Bilirubin bei Teilnehmern mit KHK.....                    | 51 |
| Tabelle 29 Regressionsanalyse: Einflussgröße (GT)n-repeats aufgeteilt nach Klassen: short-short, short-long, long-long (Cut-off-point: 27) bei Teilnehmern mit KHK.....       | 51 |
| Tabelle 30 Regressionsanalyse: Einflussgrösse (GT)n-Repeats, als Summe von Allel1 und Allel 2 und Zusammenhang mit Bilirubin bei Teilnehmern mit Diabetes. ....               | 51 |
| Tabelle 31 Regressionsanalyse: Einflussgröße (GT)n-repeats aufgeteilt nach Klassen: short-short, short-long, long-long (Cut-off-point: 27) bei Teilnehmern mit Diabetes. .... | 51 |

# 1 Einleitung / Ziel der Dissertation

## 1.1 Abstract

Die Hämoxxygenase-1 ist ein induzierbares anti-inflammatorisches Enzym, das die Zellen des menschlichen Organismus vor oxidativem Stress schützt, unter anderem auch das Gefäßendothel, und die proinflammatorische Aktivität von Monozyten und Makrophagen unterdrückt.

**Ziele:** Im Rahmen meiner wissenschaftlichen Arbeit habe ich mich mit dem Längenpolymorphismus des Hämoxxygenase-1-Promotors bei unterschiedlichen Individuen mit und ohne Koronarer Herzkrankheit, Arterieller Hypertonie und Diabetes mellitus und dem Zusammenhang mit der Endothelfunktion (gemessen anhand der Flussmediierten Dilatation) beschäftigt.

**Methoden und Ergebnisse:** Die Patienten-DNA wurde im Rahmen der Gutenberg Gesundheitsstudie (GHS) isoliert. Die GHS ist eine populationsbasierte, prospektive, monozentrische Kohortenstudie zur Untersuchung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Krebserkrankungen, Augenerkrankungen, metabolischen Erkrankungen, Erkrankungen des Immunsystems und der Psyche in der Bevölkerung. Für unsere Untersuchungen wurde DNA des ca. 5000 Probanden umfassenden A2-Unterkollektivs der GHS benutzt. Für die Analyse des HOMX1-Promotor – (GT)<sub>n</sub> - Repeat-Längenpolymorphismus wurden DNA-Proben mittels Polymerase Chain Reaction (PCR) vermehrt. Hierfür wurde ein mit Fluoreszenzfarbstoff markierter Forward – Primer 5'-CTTTCTGGAACCTTCTGGGAC-3' und ein Backward-Primer 5'-ACAAAGTCTGGCCATAGGAC-3' zur Amplifizierung der Zielsequenzen verwendet, die in ihrer Basensequenz den gesuchten Sequenzen entsprechen. Die Längen der Microsatelliten-DNA wurden mit Hilfe eines Kapillarsequencers bestimmt. Die Ergebnisse des Sequencers wurden durch ein Programm und optisch ausgewertet. Dabei war in der Verteilung der Allele die Kombination 23/30 die häufigste Länge der untersuchten (GT)<sub>n</sub>-Dinucleotidrepeats. In Signifikanztests und im Hardy-Weinsteinberg-Äquilibrium waren die ausgewerteten Daten mit signifikanten p-Werten <0,05 im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

In der statistischen Analyse der bimodalen Verteilung der Allel-Längen-Frequenzen wurden die Längen der (GT)<sub>n</sub>-Dinucleotid-Repeats mit der FMD oder Serumspiegeln des Bilirubin, einem Surrogatparameter der HO-1-Aktivität, korreliert. In unserer Analyse konnte kein Zusammenhang zwischen den Längen der Repeats und der FMD gefunden werden. Wir analysierten die Subgruppen der Individuen mit einer arteriellen Hypertension, Diabetes mellitus und einer positiven Familiengeschichte für Koronare Herzerkrankung. Nur in der Gruppe der Teilnehmer mit arterieller Hypertension fand sich eine grenzwertig signifikante Assoziation der Längen der HO-1-Promoterlängenpolymorphismen und der FMD (95% -KI: 0,0040-0,068; p= 0,027) nach multivariater Adjustierung.

Schlussfolgerung: Der Längenpolymorphismus in der Promoterregion des HMOX-1 Gens ist in der GHS in der Untergruppe der Hypertoniker signifikant mit FMD assoziiert.

## **2 Wissenschaftlicher Hintergrund**

### **2.1 Herzkreislauf-Erkrankungen und ihre Bedeutung für die Mortalität und Morbidität in der modernen Gesellschaft**

Heutzutage repräsentieren nicht übertragbare Krankheiten (Englisch: non-communicable diseases, NCDs), eine ernsthafte Bedrohung für die weltweite Gesundheit und Entwicklung. NCDs sind Erkrankungen die nicht infektiös und nicht zwischen Individuen übertragbar sind und chronisch, jedoch unterschiedlich schnell verlaufen. Die WHO hat eine Liste mit NCDs veröffentlicht, zu deren wichtigsten Mitgliedern Diabetes, kardiovaskuläre Erkrankungen, chronische Nierenerkrankungen und Krebserkrankungen gehören (1) . Diese Erkrankungen sind für 63 % d.h. für 36 Millionen von 57 Millionen Todesfällen weltweit verantwortlich. Eine führende Rolle nahmen hierbei allein im Jahr 2008 kardiovaskuläre Erkrankungen ein (17 Millionen Tote, 48% der durch NCDs verursachten Todesfälle, weltweit insgesamt 29 % aller Todesfälle ) und auch Diabetes trug zu weiteren 1,3 Millionen Todesfällen bei. Bis zum Jahr 2020 werden kardiovaskuläre Erkrankungen 25 Millionen Todesfälle jährlich verursachen und weltweit führende Ursache für Tod und Behinderung bleiben.(2)

In den letzten Jahrzehnten waren kardiovaskuläre Erkrankungen und Diabetes vor allem in westlichen Industrienationen ein Problem. Es kam in den letzten zwei bis drei Jahrzehnten jedoch zu einem bemerkenswerten Anstieg der Mortalität und Morbidität durch kardiovaskuläre Erkrankungen und Diabetes in Ländern mit niedrigem und mittlerem Einkommen. Mittlerweile findet man 88% der Todesfälle durch kardiovaskuläre Erkrankungen in diesen Ländern. Aktuell tragen Entwicklungsländer mehr zur globalen Bürde durch kardiovaskuläre Erkrankungen bei und dieser Entwicklung wurde bis jetzt noch nicht genug Aufmerksamkeit geschenkt, selbst innerhalb der betroffenen Länder. Im Gegensatz dazu wurden die Inzidenz, Prävalenz und die Belastung durch kardiovaskuläre Krankheiten in Industrienationen in den vergangenen Jahrzehnten studiert und gut dokumentiert, in Entwicklungsländern gibt es wenige Untersuchungen zu Mortalitätsraten von chronischen Erkrankungen.(3) Durch Studien und Beobachtungen in den letzten Jahrzehnten konnte gezeigt werden, dass eine Reihe von Risikofaktoren, oder besser gesagt bestimmtes Risikoverhalten hauptsächlich Schuld an der Zunahme von kardiovaskulären Erkrankungen sind. Vor allem mit Hilfe großer epidemiologischer Studien wie der Framingham Heart Study konnten Nikotinabusus, Hyperlipoproteinämie, Diabetes mellitus und arterielle Hypertonie als wichtigste Risikofaktoren identifiziert werden. In den 1940er bis 1950er Jahren, als die Zahl der kardiovaskulären Erkrankungen in Staaten mit hohem Einkommen zunahmen und immer mehr zu einem gesundheitlichem Problem wurden, waren diese Zusammenhänge noch nicht bekannt. Angesichts dieser steigenden Belastung sah man die Notwendigkeit für eine Studie, um die Ursachen zu ermitteln. So startete der Public Health Service der USA 1948 eine Kohortenstudie in Framingham, Massachusetts. Diese erste ursprüngliche randomisierte Kohorte bestand aus 5209 Patienten beider Geschlechter zwischen 30 und 62 Jahren, zufällig ausgewählt aus 2/3 der erwachsenen Bevölkerung der Stadt (4). Ziel war es herauszufinden, wieso die Koronare Herzerkrankung (KHK) die häufigste Todesursache in den USA

ist, und vor allem welche Risikofaktoren und Umwelteinflüsse eine Rolle in der Pathogenese von KHK und Artherosklerose spielen. Um die genauen Zusammenhänge zwischen Expositionen und Krankheitsauftreten bestimmen zu können, wurden nur Patienten in die Studie aufgenommen, die zum Eintrittszeitpunkt keine kardiovaskulären Erkrankungen aufwiesen. Diese Patienten wurden regelmäßig untersucht und Risikofaktoren für die Entwicklung der Koronaren Herzerkrankung wurden durch regelmäßige Nachfolgeuntersuchungen identifiziert. Die Framingham Heart Study konnte erhöhte Cholesterol-Werte, Bluthochdruck und Rauchen als Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung der Koronaren Herzerkrankung identifizieren, später wurden Adipositas, körperliche Inaktivität, Diabetes, psychosoziale Faktoren und einige andere Faktoren auf die Liste der Risikofaktoren gesetzt und Erkenntnisse über die Entstehung und die Risikofaktoren für zerebrovaskuläre Erkrankungen kamen hinzu. (5) Somit wurde das Konzept des kardiovaskulären Risikos entscheidend mitgeprägt.

Seit den 70er Jahren wurden die Kinder der ersten Probanden mit einbezogen und auch später wurden Studien an den Nachfahren und nächsten Generationen der ersten Framingham Kohorte weitergeführt und werden auch in Zukunft Einblicke in den Zusammenhang zwischen genetischen Faktoren und der Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen gewähren. Im Rahmen dieser Untersuchungen an Framingham-Nachkommen und im Rahmen von anderen Studien konnte gezeigt werden, dass eine positive Familienanamnese für das vorzeitige Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen ein unabhängiger Riskofaktor ist (6). In zwei Studien an Patienten der zweiten und dritten Generation aus Framingham konnten Parikh et al (7) nachweisen, dass ein vorzeitiges Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen in der Elterngeneration mit einem höheren Risiko und Vorkommen für das Auftreten von Koronararterien- und Bauchorten-Kalzifikationen bei den Nachkommen assoziiert ist, also einem höheren Auftreten für Arteriosklerose.

In der Reykjavik Cohort Study konnte nachgewiesen werden, dass 15 % der Myokardinfarkte und koronaren Revaskularisationen bei Patienten der Studie unabhängig von konventionellen Risikofaktoren mit einer positiven Familienanamnese assoziiert werden konnten (6). Die Familienanamnese sollte und hat deswegen ihren Einzug gefunden in die Risikostratifizierung von Patienten anhand von Scores, wie dem Framingham Risiko Score oder vergleichbaren europäischen Scores, wie PROCAM. Die Framingham Studie hat als erste ihrer Art auch Frauen integriert und wertvolle Informationen über die Prävalenz, Inzidenz, Prognose und prädisponierenden Risikofaktoren für kardiovaskuläre Krankheiten bei Frauen geliefert. Bisher wurden Erkenntnisse aus Studien mit männlichen Probanden auch für Frauen angewendet, und kardiovaskuläre Erkrankungen bei Frauen galten als ein kleines Problem. In der Studie zeigten sich bei Frauen weniger kardiovaskuläre Ereignisse, insgesamt hinkte die Inzidenz für kardiovaskuläre Erkrankungen bei Frauen derjenigen bei Männern um 10 bis 20 Jahre hinterher. Diese Lücke schloss sich im höheren Alter, bei älteren Patienten waren unabhängig vom Geschlecht, kardiovaskuläre Erkrankungen die führende Todesursache. Beim Vergleich des Lebenszeit-Risikos für KHK und Brustkrebs in der Framingham-Kohorte zeigte sich bei Frauen ein dreimal höheres Risiko für Koronar-Ereignisse als für Brustkrebs (8).

Die Ergebnisse der Framingham Heart Study schufen ein neues Verständnis für die Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen, und führten international zu weiteren Studien, die die Unterschiede in kardiovaskulärer Mortalität und die Ursachen in verschiedenen Ländern untersuchten, wie z. Bsp. die Seven Countries Studie in den späten 1960er Jahren (9). Die Studie zeigte, dass die klassischen Risikofaktoren der Framingham Kohorte in den sieben Teilnehmerstaaten variablen aber wichtigen Einfluss auf das kardiovaskuläre Risiko haben.

In den späten 1970er Jahren startete die WHO das Projekt „MONItoring of Trends and Determinants in CArdiovascular Disease (MONICA)“. (10), die bei der Durchführung durch Personal der Framingham-Studie beraten wurde. Insgesamt wurden 38 Populationen in 21 Ländern über 10 Jahre untersucht, um neue Trends und Entwicklungen zu erfassen. Insgesamt unterstützte die MONICA-Studie die Ergebnisse und Ansichten, die aus den Ergebnissen der Framingham-Studie gewonnen wurde und unterstrich die Wichtigkeit von Präventionsprogrammen bei Patienten mit oder Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen, um die Krankheitsbelastung zu senken. 2002 publizierte die WHO eine globale Studie, die quantifizieren sollte welche Risiken die weltweite Gesundheit am meisten bedrohen, und um die weltweite Kosteneffektivität von Maßnahmen gegen diese Erkrankungen zu beurteilen. (11) Auf der Liste der 26 Risikofaktoren die betrachtet wurden, standen natürlich auch kardiovaskuläre Risikofaktoren. Die Ergebnisse der Studie zeigten, dass insgesamt mehr als drei Viertel der globalen Belastung durch kardiovaskuläre Erkrankungen auf drei bereits bekannte Risikofaktoren zurückzuführen war: Nikotinkonsum, hoher Blutdruck, ein pathologischer Cholesterin-Serumspiegel oder eine Kombination der drei Faktoren.

Laut der WHO zeigen sich 80% der kardiovaskulären Erkrankungsfälle in Ländern mit niedrigem oder mittlerem Einkommen, jedoch stammen Erkenntnisse über Risikofaktoren und ihren Einfluss aus Untersuchungen in entwickelten Ländern (1).

Der Einfluss von solchen Faktoren auf das kardiovaskuläre Risiko war in vielen Ländern unerforscht und Unterschiede unbekannt. Aus diesem Grund wurde Anfang der 2000er die INTERHEART-Studie durchgeführt. An der standardisierten Fall-Kontroll-Studie nahmen 52 Länder (Länder aus allen bewohnten Kontinenten des Globus) teil, in denen der Zusammenhang zwischen Myokardinfarkten und bestimmten Risikofaktoren betrachtet wurde. Die Untersuchung zeigte, dass mehrere Risikofaktoren für 90% des Risikos für Myokardinfarkte verantwortlich sind: Rauchen, ein erhöhtes ApoB/ApoA1-Verhältnis, Bluthochdruck, Diabetes, ein erhöhter Taillenumfang, psychosoziale Faktoren und täglicher Alkoholkonsum.

Diese Zusammenhänge bestanden für alle Faktoren bei Männern und Frauen, bei alten und Jungen und Patienten in allen Teilen der Welt. Das zeigt sehr deutlich, dass Konzepte zur Prävention von kardiovaskulären Erkrankungen nach gleichen Prinzipien weltweit eingesetzt werden können und auch das Potential besitzen effektiv vor Myokardinfarkten zu schützen.

Durch die zunehmende Urbanisation und Industrialisierung weltweit sind Risikofaktoren nicht mehr nur Variablen auf individuellem Level, sondern Umweltfaktoren, soziale als auch ökonomische Faktoren.

In einer Untersuchung von Zahra et. al. (3) wurden die Zusammenhänge zwischen der Mortalitätsrate von kardiovaskulären Erkrankungen und Diabetes, ihrem Zusammenhang mit verschiedenen Faktoren, wie der Krankenversorgung, gesundheitsschädigendem Verhalten, sozio-ökonomische Unterschiede und Risikofaktoren für die Gesundheit in 72 Ländern in der ganzen Welt betrachtet. Es wurden nur nicht Länder mit hohem, sondern auch mit mittlerem und niedrigem Einkommen betrachtet.

In Ländern mit einem niedrigen Bruttonationaleinkommen war die Mortalitätsrate für Diabetes und kardiovaskuläre Erkrankungen bei beiden Geschlechtern höher, jedoch ist die Prävalenz für Risikofaktoren, wie der Nüchternblutglukosespiegel, BMI etc. in Ländern mit hohem Einkommen höher als in Ländern mit niedrigem und mittlerem Einkommen. In Ländern in denen in einem höheren Ausmaß eine westliche Ernährung konsumiert wurde, war die Mortalitätsrate höher, als in Staaten, mit einer gesünderen Ernährung. Diese inverse Assoziation kann erklärt werden durch ein besseres Gesundheitssystem und mehr präventive Maßnahmen durch die Regierung, ein höheres Gesundheitsbewusstsein und Alphabetisierungsgrad, frühere Diagnosestellung und Behandlung von Erkrankungen, was schließlich zu einer niedrigeren Morbidität und resultierend zu einer niedrigeren Mortalität führt. (12)

Unter den bekannten Risikofaktoren gab es eine starke Korrelation zwischen hohem Blutdruck und erhöhter Mortalität. In der Studie zeigte sich eine Abnahme der Erkrankungshäufigkeit an hohem Blutdruck in Ländern mit hohem Einkommen, was auch ein Grund für die niedrigere Mortalitätsrate ist. Daraus kann man schließen, dass eine bessere Prävention, frühere Diagnose und Behandlung von Bluthochdruck

in Entwicklungsländern zu einer Abnahme der kardiovaskulären Mortalität führen könnte. Diese Ergebnisse unterstreichen die Wichtigkeit für ein effektiv funktionierendes und für jeden finanzierbare und erreichbare Präventionsmaßnahmen, Tests und rechtzeitigen Zugang zu medizinischer Versorgung. Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse könnte es gelingen, die weltweite Last durch nicht übertragbare Erkrankungen, ganz speziell kardiovaskulären Erkrankungen, zu senken und die Lebensqualität weltweit zu steigern, als auch frühzeitige Todesfälle zu vermeiden.

## **2.2 Zusammenhänge zwischen vaskulärer Funktion und Herz-Kreislauf-Erkrankungen**

Das Gefäßendothel ist nicht nur eine passive Barriere zwischen dem Blut und der Gefäßwand, sondern hält die vaskuläre Homöostase aufrecht. Das Endothel moduliert den Tonus, den Durchmesser, Kaliber und Blutfluss, abhängig von humoralen, neuronalen, und mechanischen Stimuli und schüttet vasoaktive Substanzen aus (13). Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass ein intaktes Endothel essentiell für eine physiologische Gefäßreaktion ist. Bei tierexperimentellen Versuchen zeigte sich bei intaktem Endothel eine normale Reaktion auf Acetylcholin (ACh) mit einer Vasodilatation, bei entferntem Endothel kam es zu einer paradoxen Konstriktion der Gefäße, durch die direkte Wirkung von ACh auf die glatte Gefäßmuskulatur (14). Studien in der Vergangenheit zeigten, dass ACh für die Freisetzung eines potenten Vasodilators aus dem Endothel sorgt, Stickstoffmonoxid (nitric oxide, NO) (15). NO entsteht durch die Umwandlung der Aminosäure L-Arginin zu NO und L-Citrullin (16) durch das Enzym Stickstoffmonoxidsynthase (NO synthase, NOS), dessen Isoform

NOSIII (endothelial NOS, eNOS) konstitutiv im Endothel exprimiert wird. NO aktiviert die Guanylatcyclase, was zu einer erhöhten Produktion von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) und einer intrazellulären Erhöhung von Calcium führt (13). Das Endothel reguliert nicht nur den Tonus und die vasomotorische Funktion der Blutgefäße, sondern auch Entzündungsgeschehen, die Plättchenaktivierung und Thrombolyse und verhindert die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen. NO ist nicht nur ein wirksamer Vasodilator, sondern verhindert die Adhäsion von Leukozyten ans Endothel, die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen und die Plättchenaggregation. Diese biologischen Eigenschaften des Endothels und von diesem gebildeten NO machen sie zu wichtigen Mediatoren für den Schutz der Gefäße vor artherosklerotischen Veränderungen (17) (18) (19) .

Die Störung der physiologischen Endothelfunktion spielt eine entscheidende Rolle in allen Stadien der Arterogenese, von der Läsionsentstehung bis hin zur Plaqueruptur. Entzündungsprozesse spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung und dem Fortschreiten der Artherosklerose (20). Endotheliale Dysfunktion unterstützt die Entzündungsprozesse in den Gefäßwänden und fördert somit die Entstehung und das Voranschreiten von Läsionen. Lokale Entzündungen tragen erheblich zur Plaque-Instabilität und Rupturen von diesen Plaques bei, was zum Auftreten von akuten klinischen Syndromen wie dem akuten Koronarsyndrom führt. Diese proinflammatorische Wirkung von defektem Endothel spielt eine wichtige Rolle bei der Umwandlung von stabilen artheromatösen Plaques in instabile Plaques. Im Falle einer Ruptur muss eine Thrombose, die zu einem akuten Koronarsyndrom führen könnte, durch Inhibition der Plättchenaggregation, und Aktivierung der Fibrinolyse verhindert werden. Da NO ein wichtiger Mediator für diese Abwehrmaßnahmen ist, kann eine reduzierte Bioverfügbarkeit an NO die Thrombusbildung vereinfachen. Dysfunktionales Endothel führt auch zu einer vermehrten Produktion von Plasminogen Aktivator-Inhibitor-1, einem Inhibitor der Fibrinolyse (13). Dadurch wird weniger fibrinolytischer Plasminogen Aktivator gebildet, das Risiko für Thrombosen steigt. Eine gestörte Endothelfunktion trägt nicht nur zur Entstehung der Artherosklerose bei, sondern vereinfacht auch das Entstehen von Gefäßthromben.

Die Endothelfunktion und somit die Bioverfügbarkeit von NO wird indirekt an der vasomotorischen Antwort auf pharmakologische oder physiologische Stimuli, wie ACh, Bradykinin, Metacholin, Serotonin, Substanz P und Schubspannung gemessen.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten die Funktion des Endothels in peripheren Arterien und auch in den Koronararterien zu messen. Eine bewährte Methode zur Erfassung der koronaren Endothelfunktion ist die koronarangiografische Erfassung von Änderungen des epikardialen Koronararteriendurchmessers auf unterschiedliche Konzentrationen an intrakoronar verabreichtem ACh (21) (22). Ludmer et al (21) haben als erste gezeigt, dass in die Koronararterien verabreichtes ACh bei angiografisch glattem Endothel zu einer Dilatation führt. Bei Patienten mit einer angiografisch gesicherten Koronararterienerkrankung kam es jedoch dosisabhängig zu einer Vasokonstriktion. Kardiovaskuläre Risikofaktoren prädisponieren für eine Funktionsstörung des Endothels auch ohne sichtbare artherosklerotische Läsionen. Das Auftreten einer Dysfunktion ist assoziiert mit dem Vorhandensein von kardiovaskulären Risikofaktoren, (22) und kann auftreten ohne strukturelle Manifestationen einer Artherosklerose. Das präklinische Stadium der Arteriosklerose mit einer abnehmenden

Bioverfügbarkeit von NO kann Jahrzehnte dauern, in denen es zur stetigen langsamen Veränderungen und letztendlich zu Läsionen und zur Stenose der Gefäße mit dem Auftreten von Symptomen kommt (23). Mit invasiven Methoden ist es möglich aber auch sehr aufwändig und problematisch erste pathologische Veränderungen der vom Gefäßendothel gesteuerten vaskulären Regulationsmechanismen bei jungen und asymptomatischen Individuen zu erfassen. Untersuchungen an diesen Individuen müssen über längere Zeiträume hinweg und auch problemlos immer wieder wiederholt werden können.

Eine nicht-invasive Methode zur Messung der endothelialen Funktion bietet die Feststellung der Flow-mediated dilation (FMD). Bei diesem Verfahren wird mit Ultraschall die flussvermittelte Veränderung des Arterienradius in relativ oberflächlichen Leitungsgefäßen wie der Brachial-, Radial- oder Femoralarterie gemessen. Für die Messung der Endothelfunktion von Widerstandsgefäßen ist diese Methode nicht geeignet. Der Radius der jeweiligen Arterie wird unblutig transdermal als Antwort auf eine Strömungszunahme des Blutes und daraus resultierend auch der Schubspannung erfasst. Die Strömungszunahme wird durch das Aufpumpen und Ablassen einer aufblasbaren Manschette distal des ultraschalltechnisch untersuchten Gefäßabschnittes, und der dadurch erzielten reaktiven Hyperämie erzeugt. (23) Der Gefäßradius wird dabei drei Mal gemessen: im Ruhezustand, während der reaktiven Hyperämie und nach der sublingualen Gabe von Nitroglycerin und der darauffolgenden endothel-unabhängigen Vasodilation, die als Vergleich dient. Die gemessenen Veränderungen im Gefäßradius werden durch die Schubspannung, und die dadurch ausgelöste Freisetzung von Mediatoren verursacht, allen voran von NO. Die so erfassten Ergebnisse zur Endothelfunktion korrelieren signifikant mit den Ergebnissen der invasiven Messmethoden (24) (25) und auch mit dem Ausmaß und der Schwere einer bestehenden Koronararteriosklerose (26).

Nach Betrachtung der zahlreichen protektiven Effekte eines gesunden und normal funktionierenden Endothels ist es nicht verwunderlich, dass eine Verschlechterung der Endothel- und auch vasomotorischen Funktion wichtige prognostische Bedeutsamkeit besitzt. Dieser Zusammenhang konnte auch bereits in vielen Studien gezeigt werden. In einer prospektiven Studie haben Schächinger et. al. (27) bei 147 Patienten die endotheliale Funktion auf verschiedene Stimuli gemessen. In den nächsten 6,7 Jahre wurde die gesundheitliche Entwicklung der Patienten nachverfolgt. Patienten bei denen eine endotheliale Dysfunktion messbar war, hatten eine signifikant höhere Rate an kardiovaskulären Erkrankungen. Auch nach statistischer Adjustierung für die klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren und der angiografischen Wahrscheinlichkeit für Artherosklerose, blieb die koronare Endotheldysfunktion ein unabhängiger Prädiktor für das Fortschreiten der Artherosklerose und kardiovaskuläre Ereignisraten. Neunteufl et al (28) untersuchten 73 Patienten, die eine Herzkatheteruntersuchung auf Grund von Brustschmerzen erhalten hatten und ermittelten die FMD gemessen an der Arteria brachialis für die folgenden fünf Jahre. Kardiovaskuläre Ereignisse, perkutane und chirurgische Revaskularisationen der Koronargefäße eingeschlossen, zeigten sich viel öfter bei Patienten mit einer reduzierten FMD (<10%) als bei Patienten mit noch erhaltener FMD (>10%). Celermajer et. al. zeigten, dass kardiovaskuläre Risikofaktoren bei asymptomatischen Individuen interagieren und zu einer endothelialen Funktionsstörung führen, die als Frühzeichen von vaskulären Erkrankungen in ihrer Frühphase dienen kann (29). Davor schon wurden Messungen der

FMD bei Kindern und Erwachsenen mit einer Hypercholesterinämie, Kindern mit homozygoter Homozystinurie, Rauchern und KHK-Patienten durchgeführt, die alle eine verschlechterte FMD zeigten (30). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass es wahrscheinlich zu einer systemischen endothelialen Dysfunktion bei Menschen mit Risikofaktoren und ohne manifeste vaskuläre Erkrankung kommt. Weitere Studien zeigten auch, dass die reduzierte FMD, gemessen an der Arteria brachialis, invers mit dem Ausmaß der Koronaren Herzerkrankung bei den an der Studie teilnehmenden Patienten korrelierte, und dass dieser Zusammenhang unabhängig von Alter, Geschlecht und Cholesterin-Spiegel waren (26).

Bei Betrachtung der Ursachen für die reduzierte Bioverfügbarkeit von NO, geht aus Studien und Untersuchungen der letzten Jahre und Jahrzehnte deutlich oxidativer Stress und die Erzeugung von reaktiven Sauerstoffspezies, die zu einem schnelleren Abbau von NO führen können, als Hauptverdächtige hervor. Es kommt zur vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstofradikalen (ROS), wie Superoxid-Anionen, die nach ihrer Umwandlung in Peroxinitrit, einem weitaus stärkerem und stabilerem Radikal, NO inaktivieren (31). In experimentellen und in vivo Untersuchungen zeigte sich bei vermehrter Produktion von Superoxid-Anionen eine verringerte NO-Bioverfügbarkeit und daraus resultierend eine endotheliale Dysfunktion und eine Verschlechterung der NO-vermittelten Vasodilatation (32). Zusätzlich ist bei Patienten mit einer KHK die Aktivität der endothelialen Superoxid-Dismutase, einem antioxidativen Enzym der Gefäßwand, reduziert, was zur koronaren Gefäßdysfunktion beiträgt (33).

Eine reduzierte Bildung von NO trägt ebenso zur endothelialen Dysfunktion bei. Das NO-produzierende Enzym eNOS wird zwar konstitutiv in Endothelzellen exprimiert, jedoch wird die Aktivität durch verschiedene Faktoren, wie Schubspannung (34), artherogene Lipoproteine, oxidierte Lipoproteine (35) und Zytokine (36) (37) vor allem über spezifische Phosphorylierungen auf posttranslationaler Ebene moduliert. Durch Interaktion mit Caveolin-1, einem Mantelprotein für Caveolae, welche Vesikelproteine der Plasmamembran sind, wird z.B. eNOS posttranslational inhibiert (38). Es gibt Erkenntnisse aus experimentellen Studien, die darauf hinweisen, dass Hypercholesterinämie die Menge an Caveolin hochreguliert, damit die eNOS und Caveolin-Interaktion steigert und somit die NO-Produktion verringert (39). Die Zunahme von solchen Inhibitoren und das Fehlen von wichtigen Kofaktoren für die eNOS beeinflussen auch die eNOS-Aktivität posttranslational. Ein solcher Kofaktor ist Tetrahydrobiopterin, er wird benötigt um aus L-Arginin NO zu bilden. Bei einem Fehlen von L-Arginin oder Tetrahydrobiopterin, ist eNOS frei und ungebunden und produziert Superoxide und Hydrogenperoxid-Radikale (40). Bei einem Mangel an Kofaktoren trägt die eNOS selber zur Erhöhung des oxidativen Stress und endothelialer Dysfunktion bei.

Die Synthese von NO ist ein komplexer und langer Prozess und kann durch viele Faktoren und auch pathologische Vorgänge und Zustände im Körper beeinflusst werden, was in einer systemischen Dysfunktion des Endothels endet. Obwohl die genauen zellulären Mechanismen noch nicht ganz verstanden sind, auf die verschiedene Medikamente positiv auf diese Dysfunktion wirken, werden ACE-Hemmer und Statine erfolgreich bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen eingesetzt. In

Studien zeigte sich durch Einnahme von Statinen eine Verbesserung der koronaren Endothelfunktion bei Patienten mit einer Hypercholesterinämie, oder KHK (13). Die Verbesserung der Endothelfunktion und daraus resultierend der vasomotorischen Funktion zeigte sich bereits kurze Zeit nach Einleiten der Therapie und hielt sich auch für die darauf folgenden Wochen in Widerstands- und Kapazitätsgefäßen in den Koronarien und war auch messbar in den Gefäßen des Unterarmes. Die Gefäßfunktion durch Erniedrigung des LDL-Cholesterols verbesserte sich auch deutlich durch Umstellung der Ernährung, (41) Einnahme von Cholestyramin (42) und LDL-Apharese (43). Die Erniedrigung von erhöhten Blutfettwerten mit Statinen, und ihre zahlreichen pleiotropen Effekte haben wichtige positive Effekte auf die endotheliale Funktion und die NO-Bioverfügbarkeit. In experimentellen Studien konnte nachgewiesen werden, dass Statine die eNOS-Expression und Aktivität in vivo und in vitro durch Stabilisierung der eNOS-mRNA hochregulieren können (44). Wilson et. al. konnten zeigen, dass Simvastatin bei Hypercholesterinämie die Endotheliale Funktion aufrechterhält. Es kam zur Zunahme der koronaren eNOS-Level bei gleichzeitiger Abnahme des oxidativen Stress, unabhängig von den gemessenen Plasmalipidspiegeln (45).

Auch ACE-Hemmer zeichnen sich durch ihre protektiven und positiven Effekte auf die Gefäßfunktion aus. Durch Hemmung der Bildung von Angiotensin II, verringern sie die Aktivierung der NADPH-Oxidase und regulieren so das Level an oxidativem Stress herunter. ACE-Inhibitoren führen zu einem Anstieg an Bradykinin, welches die Freisetzung von NO stimuliert (46). ACE-Inhibitoren verbesserten in Studien bei Patienten mit Artherosklerose und ihren Folgeerkrankungen oder Risikofaktoren die vasomotorische Funktion. So verbesserte eine sechsmonatige Behandlung mit Quinapril bei Patienten mit einer KHK in der TREND-Studie die abnormale epikardiale Reaktion auf ACh (47). Diese positiven Effekte der ACE-Hemmer auf die Funktion der koronaren und peripheren Gefäße könnten erklären, wieso Patienten einen größeren Nutzen für das kardiovaskuläre Outcome durch Behandlung mit diesen Medikamenten beziehen, trotz des gering blutdruckerniedrigenden Effektes der Medikamente. Ein besseres Verständnis der Gründe und genauen Mechanismen hinter diesen Effekten der Statine und ACE-Hemmer könnte in Zukunft die Entwicklung von effektiveren Therapien ermöglichen.

## **2.3 Hämoxygenase-1 und ihre Bedeutung für kardiovaskuläre Erkrankungen**

Insgesamt zeigt der heutige Wissensstand sehr deutlich, dass das Endothel eine sehr wichtige Rolle für die vaskuläre Funktion spielt, und dass der Verlust der normalen Funktion des Endothels den Beginn von pathologischen Gefäßveränderungen bis hin zur manifesten Artherosklerose bedeutet. Bei der Aufrechterhaltung einer gesunden Endothelfunktion und Reduktion von destruktivem oxidativem Stress spielen neben der NO-erzeugenden eNOS auch verschiedenste andere Mediatoren und auch Enzyme eine wichtige Rolle, darunter die Hämoxygenase.

### **2.3.1 Die Funktion der Hämoxygenase**

Die Hämoxygenase (HO) ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym des Hämabbaus, das Häm zu dreiwertigem Eisen, Biliverdin und Kohlenstoffmonoxid oxidiert. Das Biliverdin wird durch die Biliverdin-Reduktase zu Bilirubin reduziert (48). HO-1 ist die induzierbare Isoform der HO, die in Leber, Pankreas, Milz, Darm, Nieren, Herz, Retina, Prostata, Lunge, Haut, Gehirn, Rückenmark, glatten Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen vorkommt. Die Expression der HO-1 wird durch verschiedene

Stimuli hochreguliert: Häm und andere Porphyrine, oxidierte LDL, Hydrogenperoxid, Zytokine, Endotoxine, Schwermetalle, UV-Strahlung, Stickoxid, und Stickoxid-Donoren, Hyperoxie, Hypoxie und Wachstumsfaktoren (wie PDGF, TGF- $\beta$ ) (49). Die Aktivität der Hämoxigenase ist bei Individuen unterschiedlich und kann quantitativ gesteigert werden im Rahmen der physiologischen Reaktion auf oxidativen Stress. In den letzten Jahren gab es zunehmend Forschungsergebnisse, die darauf hinweisen dass HO-1 ein wichtiges zytoprotektives Enzym ist und die Gefäßfunktion moduliert (50). Die Reaktionsprodukte der HO-1 wirken antinflammatorisch und dadurch gefäßprotektiv.

Wie wichtig HO-1 in verschiedenen Zelllinien, Geweben und Organen ist zeigt sich bei Tieren und Menschen mit HO-1 Defizienz. Yachie et. al. (51) berichteten 1999 über den Fall eines HO-1 defizienten sechsjährigen Jungen. Der Junge litt an Wachstumsretardierung, Anämie, Eiseneinlagerungen und einer erhöhten Anfälligkeit für stressbedingte Schäden. Eppstein-Barr-Virus-transformierte lymphoblastoide Zelllinien des Patienten zeigten eine geringere Belastbarkeit durch oxidativen Stress, als Kontrollzellen (51).

Die HO-1 moduliert bei Induktion die Gefäßfunktion, durch Freisetzung von CO, welches in die glatte Muskelzelle diffundiert und dort die lösliche Guanylcyclase aktiviert. Der Prozess resultiert im Anstieg des intrazellulären cGMP und in der Freisetzung von NO und Vasodilation (52) (53). Zudem inhibiert cGMP die Plättchenaggregation und erniedrigt die Expression von Endothelin-1 und Platelet-derived growth factor in Endothelzellen (54). Diese Proteine stimulieren die Vasokonstriktion und tragen zur Entstehung von Arteriosklerose bei.

Bilirubin ist in hohen Konzentrationen ein Zytotoxin, in niedrigen Konzentrationen jedoch antioxidativ. Es schützt LDL vor oxidativer Veränderung und potenziert den antioxidativen Effekt von exogenen Antioxidantien, wie Tocopherol und Ascorbinsäure (55) (56). Außerdem inhibiert Bilirubin die Proteinkinase C in menschlichen Fibroblasten, welche einen proatherogenen Effekt hat (57). Bilirubin verhindert die Migration von Monozyten und die Adhäsion von Leukozyten und wirkt im Gefäßendothel so antinflammatorisch (50). In neueren Studien schützen mild erhöhte Bilirubinspiegel durch ihren antioxidativen Effekt und reduzierten nachweislich das Risiko für die Entstehung bzw. das Fortschreiten der Koronaren Herzerkrankungen (58). Besonders gut konnten diese Effekte des Bilirubin bei Vergleichsstudien mit Patienten, die am Gilbert-Syndrom erkrankt waren nachweisen. Diese Patienten haben eine milde unkonjugierte nicht-hämolytische Hyperbilirubinämie. Die Inzidenz des Syndroms beträgt in der Gesamtbevölkerung 5-10% (59). In einer Studie mit diesen Patienten haben Inoguchi et. al. gezeigt, dass Marker für oxidativen Stress bei Patienten mit Diabetes mellitus und Gilbert Syndrom im Vergleich zu Diabetikern ohne Gilbert Syndrom erniedrigt waren. Insofern waren Patienten mit diesem Syndrom gut geeignet, um zu untersuchen inwiefern oxidativer Stress die Endothelfunktion beeinflusst (60). Laborchemische Marker für oxidativen Stress waren bei erhöhten Bilirubinspiegeln im Blut niedriger, außerdem fand sich eine signifikante Korrelation zwischen besseren FMD-Werten und den Bilirubinspiegeln. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Bilirubin oxidativen Stress erniedrigt, durch Beseitigung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), Erhöhung der Vasodilatation durch NO und Inhibition der Membranlipidperoxidation. Verschiedene Studien zum Verständnis der Artherosklerose haben durch Untersuchungen an Tieren und Menschen gezeigt, dass

endotheliale Dysfunktion mit einem Anstieg an ROS assoziiert ist (61) ((62). Es ist bekannt, dass die Hauptquelle für ROS in der Vaskulatur die Aktivierung der NADPH-Oxidase durch verschiedene Stimuli ist (63, 64). Die Endothelfunktion kann durch Inhibition der Angiotensin-II-induzierten NADPH-Oxidase wieder verbessert werden (65). Die Aktivität dieser NADPH-Oxidase kann wiederum durch Bilirubin in vivo und in vitro gehemmt werden. (66), was darauf hinweist, dass Bilirubin die Bildung von ROS hemmt. Klinische Studien haben bereits gezeigt, dass die Serumkonzentration von Bilirubin invers mit dem Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und PAVK korreliert (58) (67). Die Prävalenz für ischämische Herzerkrankungen bei Patienten mit Gilbert-Meulengracht-Syndrom lag nur bei 2%, im Vergleich zur Prävalenz von 12% in der Allgemeinbevölkerung (68). Diese Ergebnisse unterstreichen die protektive Rolle von Bilirubin in der Entstehung von Gefäßdysfunktionen.

Die bei der Oxidation des Häms frei werdenden Eisenionen inhibieren die Häm-Synthese, indem sie die Aktivität der Delta-Aminolaevulin-Synthase regulieren. Sie induzieren außerdem die Bildung von Ferritin, welches mit seinen zytoprotektiven Eigenschaften vor oxidativer Schädigung durch Häm, Hydrogenperoxid, osmotischem Stress und ultravioletter Strahlung schützt (69) (70).

### 2.3.2 Bedeutung des HO-1 Promotors und seiner Längenpolymorphismen tierexperimentell und klinisch

Das humane HO-1-Gen befindet sich auf dem Chromosom 22q12 (71). Menschen können die Aktivität, also die Expression der HO-1, auf entsprechende Stimuli hin unterschiedlich stark quantitativ steigern. Verantwortlich für diese Steigerung sind Dinucleotid-Polymorphismen in der Promotorregion des Gens. Bis jetzt sind zwei funktionell bedeutsame Polymorphismen in der Promotorregion bekannt, die die HO-1-Aktivität modulieren (72) (73). Der Polymorphismus hat eine große funktionelle Bedeutung, denn er beeinflusst das Ausmaß der HO-1-Expression in verschiedenen Organsystemen und senkt oder steigert so die Vulnerabilität für die Entwicklung von bestimmten Erkrankungen. Bis jetzt sind zwei Polymorphismen der 5'-flankierenden Region des HO-1-Gens beschrieben worden: ein (GT)<sub>n</sub> –Dinukleotid-Längenpolymorphismus (73) (74) und zwei Einzelnucleotid-Polymorphismen (SNP), G(-1135)A und T(-413)A (72) (75). Diese Polymorphismen zeigten bis jetzt bedeutende funktionelle Einflüsse auf die Genexpression und können auf Grund ihrer von Individuum zu Individuum unterschiedlichen Länge der Nucleotid-Repeats (Variable Number of Tandem Repeats, VNTR) für die Erfassung von genetischen Varianten und Vielfalt in menschlichen Populationen genutzt werden. SNPs und Dinucleotid-Polymorphismen sind geerbte und vererbte genetische Varianten, bei denen es sich um eine Variation eines einzelnen Basenpaares oder von mehreren Basenpaaren handelt. Diese genetischen Variationen müssen nicht immer zu veränderten Genprodukten führen, sie beschränken sich manchmal auch nur auf den Genotyp. Die Wiederholung kurzer Basenpaar-Muster hintereinander in einem DNA-Strang werden als Tandem Repeats bezeichnet und befinden sich meistens in den nicht-codierenden Bereichen der DNA. Diese repetitiven DNA-Regionen werden auch als Mikrosatelliten bezeichnet und sind sehr polymorph in Bezug auf die Anzahl der Wiederholungen, sodass zwei Individuen sich höchstwahrscheinlich in der Länge dieser Repeats unterscheiden. Im Fall der Repeats im HO-1-Promotor haben diese Purin-Pyrimidin alternierenden Sequenzen das Potential eine Z-DNA-Konformation anzunehmen. Dies ist eine linksdrehende Doppelhelix-Struktur, die im Vergleich zur B-DNA-Konstellation unvorteilhaft ist, da

sie mehrfach als negativ für die Transkriptionsaktivität beschrieben wurde (76) (77). Sie wird immer wieder als Ursache für die individuellen Unterschiede in der Transkriptionsaktivität des HO-1-Promotors mit seinem (GT)<sub>n</sub>-Repeat-Polymorphismus genannt. Die HO-1-Expression wird durch viele Stimuli induziert, aber die Regulierung der Expressionsaktivität unterscheidet sich je nach Zelltyp, Gewebeart und Spezies. Wasserperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) induzierte im Tierexperiment die HO-1 in Maus-Fibroblasten (78), konnte jedoch die humane HO-1-Expression in Zelllinien nicht induzieren (79).

Um die Länge dieses Längenpolymorphismus zu ermitteln, können zwei Verfahren genutzt werden: beim ersten Verfahren wird die Promotorregion mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten Primers und PCR vervielfältigt, um die Fragmente dann einer automatisierten Laser-Sequenzierung zu unterziehen. Bei der zweiten Methode wird die DNA nach Vermehrung durch eine PCR einer elektrophoretischen Auftrennung auf hochauflösenden Polyacrylamid-Gelen unterzogen. Jede Methode hat Vor- und Nachteile, jedoch gilt für beide, dass die Resultate unabhängig vom Können des Auswerter, oder technischem Equipment, vor allem von den benutzten Größenmarkern abhängig sind. Die Größenmarker müssen geklont werden und die GT-Repeat-Länge muss durch eine Sequenzanalyse abgesichert werden.

Die ermittelten Längen der GT-Repeats reichen von 12 bis 40 Wiederholungen, wobei die Verteilung in den untersuchten Populationen meist zweipiglig ist. In unterschiedlichen Populationen (73) (80) (81) (82) (83) waren die häufigsten Allele solche mit einer Länge von 23 und 30 Repeats. Die Auswirkungen der unterschiedlichen Repeat-Längen auf die Transkriptionsaktivität des HO-1-Promotors wurde bereits in Studien untersucht. Kürzere Allele mit weniger als 25 Repeats zeigten im Unterschied zu längeren Allelen mit über 25 Repeats, eine erhöhte basale HO-1-Promotor-Aktivität und eine gesteigerte Transkription als Antwort auf verschiedene Stimuli (50). In einer experimentellen Studie wurden lymphoblastoide Zelllinien von Patienten mit bekannten Repeat-Längen (84) oxidativem Stress ausgesetzt. Die gemessene HO-1-mRNA – Expression war in Zelllinien mit kurzen Repeats deutlich höher, als in solchen mit längeren Repeats, und diese Zellen waren auch resistenter gegenüber durch oxidative Stoffe induzierter Apoptose.

Seit der Erstbeschreibung eines (GT)<sub>n</sub>-Dinucleotid-Repeats durch Kimpara et. al. 1997 (74), wurde der Einfluss des HO-1-Promotorpolymorphismus auf verschiedenste Krankheiten untersucht, wie z.B. die Assoziation zwischen dem Polymorphismus und Lungenkrankheiten, neurologischen, hämatologischen, gynäkologischen und nephrologischen Erkrankungen. Vor allem bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen konnte in verschiedenen Studien ein wichtiger Zusammenhang zwischen dem HO-1-Promotorgenotyp und dem Outcome dieser Patienten nachgewiesen werden.

Chen et. al. haben in ihrer Studie den Zusammenhang zwischen der Länge des Mikrosatelliten-Polymorphismus und dem Risiko für die Entwicklung einer KHK bei chinesischen Patienten mit Typ 2 Diabetes und in einer Kontrollgruppe untersucht (50). Die Allelfrequenzen und die Verteilung der Allellängen des (GT)<sub>n</sub>-Repeats im HO-1-Promotor wurden in der Studiengruppe untersucht. Auch in dieser Population waren 23 und 30 Repeats die zwei häufigsten Allellängen. Um herauszufinden, ob

die ermittelten Längenpolymorphismen im Zusammenhang mit dem Level an oxidativem Stress bei den untersuchten Patienten stehen, wurden serologische Parameter des oxidativen Stress, Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBARs), zusätzlich bei allen Patienten gemessen. Diese Parameter waren bei Patienten mit KHK erhöht, im Vergleich zu Patienten ohne KHK. Um diese Messwerte mit einem bestimmtem Genotyp assoziieren zu können wurden die Allele in drei Subgruppen unterteilt: Allele mit mehr als 32 Repeats wurden als Klasse L (long), solche mit weniger als 23 Repeats als Klasse S (short) und alle dazwischen als Klasse M (middle) eingeteilt. Die Werte für TBARs waren bei allen Patienten mit einem L/L-Genotyp erhöht und auch bei Typ-2-Diabetikern erhöht. Die Verteilung des L/L-Genotyp war bei Patienten ohne Diabetes mit und ohne KHK gleich, jedoch fand sich bei Patienten mit Diabetes und KHK häufiger ein L/L-Genotyp. Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, dass das oxidative Stresslevel bei Diabetikern erhöht ist. Dieser erhöhte oxidative Stress führt zu einer Induktion von HO-1: Diese verstärkte Enzymaktivität konnte in einer Untersuchung von Paredi et.al. (85), durch Messungen von erhöhten CO-Werten in der Ausatemluft, die gleichzeitig mit erhöhten Blutglukosewerten korrelierten, nachgewiesen werden. Experimente an Ratten mit Diabetes zeigten auch, dass erhöhter oxidativer Stress zu einer HO-1-Induktion in Herzzellen und glomerulären Nierenzellen der Tiere führt. Die geringere Expression von HO-1 durch das L-Allel könnte synergistisch mit anderen Risikofaktoren zusammenwirken und, um die Vulnerabilität des Organismus für oxidative Schäden und die Inzidenz von KHK bei Diabetikern zu erhöhen. Dadurch, dass der Mikrosatelliten-Polymorphismus im HO-1-Promotor einen Einfluss auf die Gen-Expression der gefäßprotektiven HO-1 hat, könnte abhängig vom Genotyp zur Entstehung einer Artherosklerose beitragen.

Exner et. al. (86) untersuchten einen möglichen Einfluss der Länge des HO-1-Promotor-Längenpolymorphismus auf die Restenoserate nach einer Perkutanen Transluminalen Angioplastie. Dabei zeigte sich bei Teilnehmern mit kürzeren Allele (<25 GT-Repeats) sechs Monate nach der Angioplastie weniger oft eine Restenose.

Yamada et. al. (73) haben in einer Studie einen Zusammenhang zwischen der Länge der (GT) n-Repeats der HO-1 und der Entwicklung eines Lungenemphysems bei Rauchern gezeigt. Bei diesem Zusammenhang spielte, wie oben bereits erläutert, oxidativer Stress eine wichtige Rolle in der Pathogenese (73). In dieser Untersuchung zeigten Zellen mit kürzeren Repeats bei Exposition gegenüber oxidativem Stress eine Zunahme der HO-1-Induktion, die bei Zellen mit längeren Repeats bei gleicher Exposition schwächer ausfiel. Kürzere Mikrosatelliten-DNA im HO-1-Promotor erwies sich auch hier als protektiv. Längere Repeats reduzieren offensichtlich die Induktion von HO-1 und tragen so zur Entstehung von Lungenemphysemen bei.

Kaneda et. al. untersuchten bei Patienten mit und ohne KHK die Allel-Frequenzen der (GT)n-Repeats im HO-1-Promotor und den Zusammenhang dieser Längenunterschiede mit der Entwicklung von einer KHK (87). In dieser Studienpopulation zeigten sich in der Verteilung der Repeat-Längen zwei Spitzen: bei 22 und bei 27 GT-Repeats. Auch hier erfolgte eine Einteilung der Allele in unterschiedliche Klassen: weniger als 26 Repeats galten als S-Allele, mehr als 27 als L-Allele. In multivariaten Regressionsmodellen zeigte sich nach wiederholter Auswertung kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Genotypen und dem Vorhandensein einer KHK bei den untersuchten Patienten. Als

nächstes wurde der Zusammenhang zwischen verschiedenen kardiovaskulären Risikofaktoren und den Genotypen durch Regressions-Analysen untersucht. Nur bei drei Risikofaktoren zeigte sich ein Zusammenhang mit dem Genotyp und dem Vorhandensein einer KHK: Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus und Rauchen. Patienten die diese Risikofaktoren erfüllten und eine KHK-hatten, hatten einen L/L-Genotyp. Weitere Analysen zeigten, dass der S/S-Genotyp bei Patienten, die einen der drei Risikofaktoren haben, vor der Entwicklung einer KHK schützt.

Alle diese Risikofaktoren gehen mit einer Erhöhung des oxidativen Stresses einher. Hypercholesterinämie ist mit einer Erhöhung des oxidativen Stress assoziiert, der zu einer Steigerung der Oxidation von Lipiden und auch LDL führt (88). Oxidiertes LDL stimuliert in den Gefäßen die Zytokinproduktion (89), Inhibieren die endothel-induzierte Vasodilatation (90), und stimulieren die Wachstumsfaktorproduktion (91).

Hyperglykämie und erhöhter oxidativer Stress sind Ursachen für das vermehrte Vorkommen von vaskulären Erkrankungen bei Diabetikern. Plasma von Diabetikern hat einen höheren Spiegel an TBARs und Lipid-Peroxiden, zwei Marker für Lipidperoxidation und oxidativen Stress.(92)

Auch bei Rauchern ist oxidativer Stress eine der Hauptquellen für eine gesteigerte Lipid-Peroxidation (92). Verschiedenste Studien haben bei Rauchern höhere Spiegel an oxidiertem LDL und eine erhöhte Oxidationsempfindlichkeit der LDL nachgewiesen (93). Angesichts der gefährlichen, proinflammatorischen und proatherogenen Effekte von oxidierten LDL besteht ein großer Zusammenhang zwischen dem Nikotinkonsum und der Entwicklung von Artherosklerose und daraus resultierend kardiovaskulären Erkrankungen (94). Die HO-1 spielt bei Individuen mit diesen Risikofaktoren eine wichtige protektive und antiatherogene Rolle. Die Bestimmung des HO-1-Genotyps kann dabei helfen das kardiovaskuläre Risiko einzuschätzen.

Endler et. al. (48) waren nicht in der Lage solch positive Ergebnisse in einer Studie mit 649 Patienten kaukasischer Herkunft zu reproduzieren. Individuen mit Myokardinfarkt, stabiler KHK und Kontrollpatienten hatten eine ähnliche Genotyp-Verteilung. Es konnte lediglich ein Zusammenhang zwischen leicht erhöhten Bilirubin-Spiegeln und dem HO-1-Klasse-S-Allel nachgewiesen werden. Bei diesem Genotyp fielen auch leicht erhöhte HDL-Spiegel und erniedrigte Serum-Triglyzeride auf, das Gesamt-Cholesterol und LDL-Spiegel waren unverändert. Bekannterweise haben erhöhte Bilirubin-Spiegel einen positiven Effekt und wirken der Entstehung von vaskulären Schäden und Erkrankungen entgegen. Jedoch war der nachgewiesene Anstieg des Bilirubin-Spiegels und die Veränderungen des Lipidprofils bei Trägern des Klasse-S-Allels zu gering, um einen Effekt auf das Gesamtrisiko dieser Patienten für KHK und Myokardinfarkt zu haben. Aber auch diese Studie war auf eine ausgewählte Anzahl von Patienten beschränkt, die wie die Patienten in den zuvor besprochenen Studien eine Koronarangiografie bekommen hatten, eine KHK, Periphere arterielle Verschlusskrankheit oder einen Myokardinfarkt hatten.

Pechlaner et. al. (95) führten als erste eine prospektive Studie mit Teilnehmern aus der Allgemeinbevölkerung durch, in der sie den Zusammenhang zwischen dem HO-1 (GT)n-Polymorphismus und kardiovaskulären Erkrankungen betrachteten (95). In dieser Studie waren bei

der Allelverteilung in der Studienpopulation drei Peaks messbar: bei 23,30 und 37 Repeats. Die häufigsten Allelkombinationen waren hierbei 30/30 und 23/30 Repeats. Bei Individuen mit längeren Allelen, die auch noch homozygot für dieses waren, konnte ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen während den 15 Jahre dauernden Follow-ups festgestellt werden. Patienten mit zwei L-Allelen hatten höhere Blutspiegel an oxidierten Phospholipiden und entwickelten schneller eine Artherosklerose. Diese Patienten hatten ein deutlich erhöhtes Risiko für die Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen, was durch die verminderte Induktion von HO-1 bei Anstieg des oxidativen Stress durch die längeren Dinucleotid-Repeats im Promotor zu erklären ist. Besonders deutlich wird die protektive Bedeutung der HO-1 bei Betrachtung der Gefäßschäden bei ihrem Fehlen (51). Erkenntnisse über den protektiven Effekt der HO-1 auf die Gefäße stammen auch aus Versuchen an Tieren, in denen gezeigt worden ist, dass HO-1 die Bildung von Artherosklerose und Thromben verhindert (96) (97) (98).

Im Tiermodell untersuchten Ishikawa et.al. die HO-1-Expression bei LDL-Rezeptor- und Apolipoprotein-E-defizienten Mäusen (96). Dafür wurde die HO-Aktivität und Expression in diesen Mäusen moduliert und die Auswirkungen auf die Entwicklung von artherosklerotischen Läsionen, bei gleichzeitiger Gabe von fettreicher Nahrung („western type diet“) auf die Tiere immunhistochemisch und mit Hilfe von Northern Blots untersucht. Ein Teil der Mäuse wurde mit einem HO-Inhibitor behandelt und entwickelten im Vergleich zu Tieren der Kontrollgruppe artherosklerotische Veränderungen. Gegenteilige Ergebnisse wurden bei Gabe eines HO-Induktors beobachtet. HO-1 wurde in normalen Arterien der LDL-Rezeptor-Knockout-Mäuse nicht exprimiert, dafür aber in artherosklerotisch veränderten Gefäßen. In Vitro-Studien hatten gezeigt, dass HO-1 kaum in Makrophagen, vaskulären Endothelzellen und glatten Muskelzellen exprimiert wird ohne einen Stimulus. Eine Expression fand sich bei Kontakt mit nativem LDL und wurde bei Kontakt mit oxidierten Lipiden, wie oxidiertem LDL gesteigert (99). Ein stark inflammatorisch wirkender hyperlipidämischer serologischer Status mit hoher Exposition an oxidierten Lipiden hat in dieser tierexperimentellen Studie auch zu einer gesteigerten HO-1-Induktion geführt. In der immunhistochemischen Aufarbeitung zeigten HO-1 exprimierende Zellen eine räumliche Nähe zu oxidierten Phospholipiden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die antiarteriogenen Effekte der HO-1 teilweise durch Unterdrückung der Lipid-Peroxidation erklärt werden können.

Ein weiterer Mechanismus, der die Folgen der HO-1-Aktivität erklären kann, ist der NO Signalweg. In Studien zeigte sich eine Abnahme der artherosklerotischen Läsionsbildung bei LDL-Rezeptor-Knockout-Mäusen und Hasen auf Cholesterin-Diät, die mit L-Arginin, dem Substrat der Nitrat-Oxid-Synthase (NOS), gefüttert wurden, oder bei denen ein Transfer des neuronalen NOS-Gens stattgefunden hatte (100). (101)

Tulis et al.(97) untersuchten in ihrer Studie den Einfluss der HO-1 auf Ratten, die eine Ballonangioplastie der Karotis bekommen hatten, um das Endothel dieser Ratten zu schädigen. Die Ratten hatten zwei Tage vor, bis zum Tag des Eingriffs den HO-1-Induktor Häm bekommen, oder Häm und einen HO-1-Inhibitor. Nach dem Eingriff erhielten die Tiere ihrer Gruppenzugehörigkeit nach den Induktor oder Inhibitor für 14 Tage, bis sie am 14 Tag getötet wurden, um Gewebeproben zu gewinnen. Die Induktion von HO-1 führte bei den entsprechenden Ratten zu einer reduzierten Bildung

einer Neointima als Reaktion auf die Verletzung des Gefäßes. Ratten, die den HO-Inhibitor bekommen hatten zeigten ein stärkeres vaskuläres Remodeling, mit Bildung einer Neointima und Verdickung der Gefäßwand. Durch Immunlokalisation konnten das Endothel und die Adventitia als die Bereiche mit der stärksten HO-1-Induktion identifizieren. Das kann dadurch erklärt werden, dass das Häm zuerst durch das Lumen und die Vasa Vasorum in die Gefäßwände aufgenommen wird. Bei den Ratten, die durchweg das Häm bekommen hatten zeigte sich eine abgemilderte Verdickung der Intima und der Gefäßwand und eine verminderte Bildung einer vaskulären Narbe, der Neointima, die zu einer Abnahme der Elastizität und normalen Schutzmechanismen des Gefäßes geführte hätten. Bei Tieren die Häm und gleichzeitig den HO-1-Inhibitor erhalten hatten, war dieser positive Effekt viel schwächer ausgebildet.

Normalerweise wirkt HO-1 nicht nur protektiv und antiinflammatorisch auf das Gefäßsystem und andere Organsysteme im Körper, sondern unterdrückt auch inflammatorische Eigenschaften von Monozyten und Makrophagen. In vorangehenden Versuchen zeigten HO-1 defiziente Mäuse eine starke Gewebeschädigung durch systemische Eiseneinlagerungen (102), eine gesteigerte Apoptose (103) und eine vermehrte Bildung von Reaktiven Sauerstoffspezies in Makrophagen (104).

Anders sieht es bei vermehrter Expression von HO-1 und einem genügenden Angebot an CO aus. Eine Überexpression von HO-1 in Kardiomyozyten schützte in einem anderen Tierexperiment Mäuse vor Reperfusionsschäden nach einer Ischämie, durch Reduktion einer proinflammatorisch wirkenden Zellinvasion durch Phagozyten und oxidativem Stress (105).

Die Hochregulierung der HO-1-Aktivität und ihrer Reaktionsprodukte Bilirubin, Biliverdin, NO und CO, ist eine Anpassungsreaktion zum Schutz von Zellen vor oxidativen Schäden und Verletzungen in vivo und in vitro. Dieses Schutzsystem kann genutzt werden für die Entwicklung von neuen vasoprotektiven Behandlungsmöglichkeiten, die die Morbidität und Mortalität von kardiovaskulären Erkrankungen erniedrigen.

Wie bereits in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben, induziert Angiotensin-II die HO-1 und wirkt so den oxidativen Schäden durch vermehrte NADPH-Oxidase-Aktivität, die auch durch Angiotensin-II aktiviert wird, entgegen (46). Über diesen Mechanismus wirkt die HO-1 dem durch Angiotensin-II-induzierten Blutdruckanstieg, beim Menschen und auch im Tiermodell, entgegen (106) (107). Auch in Mainz konnte im Tierexperiment gezeigt werden, dass eine gesteigerte HO-1-Aktivität, abhängig vom Ausmaß der HO-Expression, die vaskuläre Funktion verbessert, und die schädliche Aktivität der NADPH-Oxidase verringert. HO-1 defiziente ( $Hmox^{-/-}$ ;  $Hmox^{-/-}$ ) Mäuse bekamen Angiotensin-II, um eine Hypertonie zu erzeugen, Streptozotocin um Diabetes mellitus zu induzieren und wurden einem Alterungsprozess ausgesetzt. Diese Mäuse zeigten eine geringere HO-1-Aktivität und daraus resultierend eine stärkere vaskuläre Dysfunktion, als Mäuse mit intakter HO-1-Aktivität. Interessant war, dass Mäuse mit dem Genotyp  $Hmox^{-/-}$  eine gesteigerte Expression des Chemokin-Rezeptors CCR2 in Monozyten und Gefäßen zeigten. Dieser Rezeptor ist wichtig für die Angiotensin-II-vermittelte Aktivierung von Monozyten, er wirkt also proinflammatorisch und nicht gefäßprotektiv.

Mäuse mit dem Genotyp  $Hmox^{-/-}$ , die Angiotensin II bekamen wiesen eine deutlich erhöhte Infiltration der Gefäße mit proinflammatorischen Monozyten und Neutrophilen auf, und hatten gleichzeitig eine erhöhte Anzahl von proinflammatorischen Monozyten im Blutkreislauf. Die Funktion und Aktivität der Monozyten scheint also abhängig zu sein von der HO-1-Expression.

HO-1-defiziente Mäuse schienen ein höheres Ausmaß oxidativer Schädigung zu zeigen. Hierbei spielt wohl Phagozyten und die in Phagozyten vorkommende NADPH-Oxidase 2 (Nox2) eine zentrale Rolle. Die HO-1 reduziert durch ihre Aktivität das Level an verfügbarem Häm, welches für die Synthese und Funktion der Nox2 benötigt wird und schützt so vor vaskulären Schäden . (108)

Im Rahmen meiner Arbeit habe ich in einer großen prospektiv angelegten Studie die Allelfrequenzen des HO-1-Promotor-Polymorphismus an einem Kollektiv aus der Allgemeinbevölkerung betrachtet, und diese Allellängen und ihre Verteilung auf eine mögliche Assoziation mit FMD, Diabetes mellitus, KHK und arterieller Hypertonie untersucht. Ziel war das Herstellen einer Verbindung zwischen der Ausprägung des Promotor-Polymorphismus, also bestimmter Genotypen, und ihr positiver oder negativer Einfluss auf das Kardiovaskuläre Risiko und Erkrankungsprofil dieser Individuen.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Rekrutierung von Probanden und Genotypisierung aus dem A2- Kollektiv der GHS**

Die Patienten-DNA wurde im Rahmen der Gutenberg Gesundheitsstudie (GHS) (109) isoliert. Die GHS ist eine populationsbasierte, prospektive, monozentrische Kohortenstudie zur Untersuchung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Krebserkrankungen, Augenerkrankungen, metabolischen Erkrankungen, Erkrankungen des Immunsystems und der Psyche in der Bevölkerung. Primäres Ziel der Studie ist es, die Risikovorhersage für den Einzelnen mit Blick auf diese Erkrankungen zu verbessern. Hierzu werden verschiedene Einflussfaktoren wie Umwelt- und psychosoziale Faktoren, der Lebensstil sowie laborchemische Parameter und Parameter für die intermediäre, subklinische Erkrankung untersucht.

Für die Studie wurden Männer und Frauen der Stadt Mainz und des Landkreises Mainz-Bingen im Alter von 35 bis 74 Jahren rekrutiert. Die Zufallsstichprobe wurde 1:1 für Geschlecht stratifiziert, 1:1 für den Wohnort (städtischer und ländlicher Bereich) sowie zu gleichen Teilen für die vier Altersdekaden. Während der Rekrutierungsphase der Studie wurden repräsentative Teilstichproben mit denselben Stratifikationskriterien wie die Stichprobe aus den Einwohnermeldeämtern in Wellen aus der Stichprobe gezogen. Personen, die psychisch oder physisch nicht in der Lage sind, das Studienzentrum für die Untersuchungen aufzusuchen, sowie Personen mit unzureichenden Kenntnissen der deutschen Sprache wurden gemäß Studienprotokoll ausgeschlossen. Als primärer Endpunkt wurde ein kombinierter Endpunkt aus dem primären, also dem erstmalig aufgetretenen Myokardinfarkt, sowie dem kardialen Tod, also dem Tod kardialer oder kardiovaskulärer Ursache, gewählt. Sekundäre

Endpunkte sind das Auftreten von Schlaganfall, Diabetes mellitus, Herzinsuffizienz, Vorhofflimmern sowie der Tod jeglicher Ursache (einschließlich kardialer Tod). Es gibt zahlreiche tertiäre Endpunkte aus den Bereichen der Krebserkrankungen, Augenerkrankungen, Stoffwechselerkrankungen, Erkrankungen des Immunsystems und der Psyche.

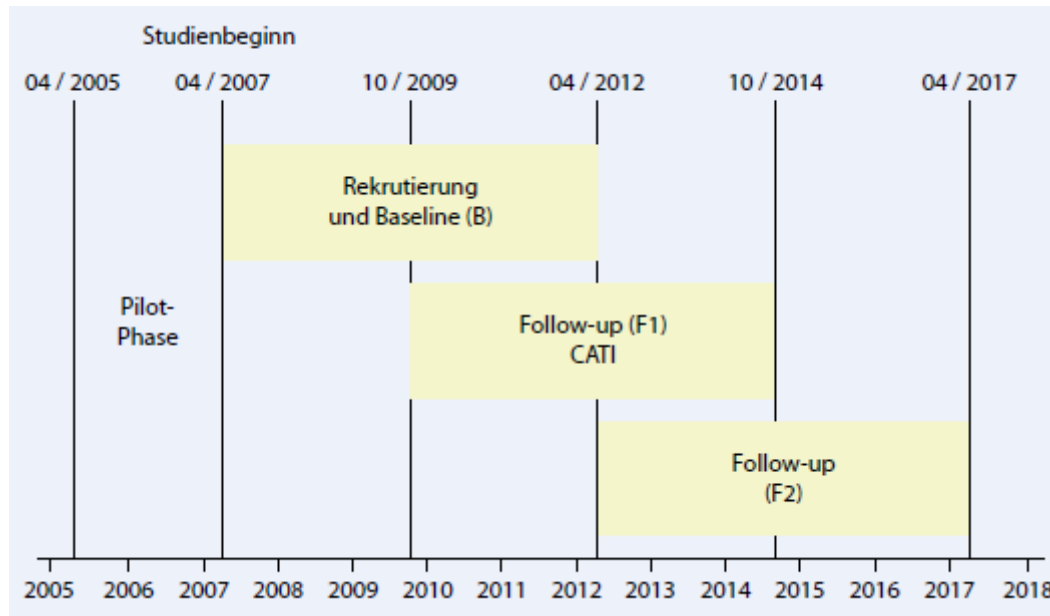


Abbildung 1 Ablaufschema der GHS

Eine informierte, schriftliche Einwilligungserklärung wurde von allen Studienteilnehmern eingeholt. Die Studienteilnehmer werden anlässlich der Basisuntersuchung zu einer fünfstündigen Untersuchung ins Studienzentrum eingeladen. Um vergleichbare Untersuchungsbedingungen zu schaffen, werden die Studienteilnehmer um Einhaltung einer definierten Vorbereitung gebeten, so zum Beispiel um eine Nüchternzeit von acht Stunden vor der Untersuchung. Die standardisierten Untersuchungen werden vom Teilnehmer in einer definierten Reihenfolge durchlaufen. Diese gliedert sich in ein computerassistiertes persönliches Interview, zahlreiche medizinisch technische Untersuchungen, eine Befragung mit standardisierten Fragebögen sowie ein umfassendes Biobanking. Die Biomaterialien werden unmittelbar nach der Entnahme in Laboren im Studienzentrum verarbeitet und für die Einlagerung vorbereitet. Genomische DNA wird aus dem Buffy Coat zweier EDTA-Blutproben eines Probanden mittels der Methode nach Miller isoliert. Der DNA-Gehalt sowie die Qualität und Reinheit der Probe werden vor der Einlagerung spektralphotometrisch bestimmt; ein Teil der DNA-Proben wird mittels Agarosegelen hinsichtlich der Integrität überprüft.

2,5 Jahre nach Beginn der Studienteilnahme wird ein computerassistiertes Telefoninterview (CATI) mit einem standardisierten Interview und der Erhebung von Endpunkten durchgeführt. Nach fünf Jahren findet erneut eine ausführliche Follow-up-Untersuchung im Studienzentrum statt, ähnlich der Eingangsuntersuchung bei Studieneinschluss. Weitere Untersuchungen zur Nachverfolgung der Kohorte sind geplant. Gemäß der Fallzahlberechnung für den primären

Endpunkt wurde eine Kohortengröße von etwa 15.000 Individuen als Rekrutierungsziel für die Basisuntersuchung definiert.

Für unsere Untersuchungen wurde DNA des ca. 5000 Probanden umfassenden A2-Unterkollektivs der GHS benutzt.

Die Genotypisierung der Repeat-Region des HMOX1 Promotors erfolgte aus der im Rahmen der GHS Studie gewonnenen Leukozyten-DNA (s.o.). Die isolierte DNA wurde in 96-Well-Platten bereitgestellt.

### 3.1.1 Geräte

| <b><u>Produkt</u></b>                                                            | <b><u>Hersteller</u></b>    |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| Laser-Sequencer                                                                  | Beckmann                    |
| Beckmann CEQ 8000                                                                | Coulter                     |
| Bakterienschüttler Unimax 1010 mit Inkubator 1000                                | Heidolph                    |
| Sterilbank                                                                       | Thermo Elektron Corporation |
| Thermocycler Gene Amp 9700 und 2720                                              | Applied Biosystems          |
| Wasserbad Modell SW23                                                            | Julabo                      |
| Kühlzentrifuge MIKRO 22R                                                         | Hettich Zentrifugen         |
| Gelelektrophoresegel, Gelkammer und – Dokumentationssystem BIO RAD POWER PAC 300 | BIO RAD                     |
| Sequencer Biomek NX p                                                            | Beckman Coulter             |
| Glasgeräte                                                                       | SCHOTT                      |
| PCR-Platten                                                                      | Greiner                     |
| PCR-Tubes                                                                        | Saarstedt                   |

**Tabelle 1** Verwendete Geräte mit Produkt- und Herstellername

### 3.1.2 Chemikalien

| <b><u>Produkt</u></b>    | <b><u>Hersteller</u></b> |
|--------------------------|--------------------------|
| LB- Agar-Lennox          | Roth                     |
| Trichlormethanchloroform | Roth                     |
| Ethanol absolut          | AppliChem                |

|                                    |                 |
|------------------------------------|-----------------|
| dd H <sub>2</sub> O                | Braun           |
| DMSO – Dimethylsulfid              | Roth            |
| SLS-Formamid aus dem Sequenzierkit | Beckman Coulter |

Tabelle 2 Verwendete Chemikalien mit Produkt- und Herstellernamen

## 3.1.3 Vorgefertigte Kits

| <b><u>Produkt</u></b>                 | <b><u>Hersteller</u></b> |
|---------------------------------------|--------------------------|
| Qiaquick PCR Purification KIT         | Qiagen                   |
| TOPO TA Cloning KIT                   | Life Technologies        |
| Qiagen Plasmid Maxi Kit (10)          | Qiagen                   |
| ECO - I – Enzym                       | New England Biolabs      |
| Genome LAB Methods Development KIT    | Beckman Coulter          |
| Agencourt CleanSEQ (Clean Sec Beads)  | Beckmann Coulter         |
| Desoxynucleoside Triphosphate SET PCR | Roche                    |
| Qiagen Taq DNA Polymerase Kit 250 U   | Qiagen                   |

Tabelle 3 Verwendete Kits mit Produkt- und Herstellernamen

## 3.1.4 Software

| <b><u>Produkt</u></b>                | <b><u>Hersteller</u></b> |
|--------------------------------------|--------------------------|
| Endnote X7                           | Thomson Reuters          |
| Adobe Photoshop CS2 1.1.2            | Adobe Systems            |
| Perl-Script (Auswertungsprogramm)    | Stefan Neuwirth          |
| GenomeLab GeXP Software Version 10.2 | Beckman Coulter          |
| GenePop Version 4.2                  | Francois Rousset         |
| SPSS, Version 21.0                   | SPSS Inc., Chicago, IL   |

Tabelle 4 Verwendete Software mit Produkt- und Herstellernamen

## 3.1.5 Puffer und Lösungen

**LB-Agar nach Lennox**

- 10 g/l Tryptan
- 5g/l Hefeextrakt
- 5 g/l NaCl
- 15 g/l Agar mit einem pH- Wert von 7,0 ±2

**LB-Platten-Zusammensetzung:**

- 100 µl LB- Agar
- 25 µl Kanamycin
- 40 µl Xgal – Stammlösung (4%)
- 50 µL IPTG Stammlösung (20 mM)
- $\Sigma$  215 µl der Mischung pro Platte

**Reaktionsansatz für die Ligation:**

- 2,5µl Insert
- 1µl Salt-Solution
- 1,5µl Aqua Dest
- 1µl TOPO Vektor
- $\Sigma$  6µl Puffer für die DNA-Präparation

**Puffer 1**

TE-Puffer mit RNase A:

- 50mM Tris-HCl, pH 8,0
- 10mM EDTA
- 100 µg/ml RNase A

**Puffer 2**

NaOH /SDS-Lösung :

- 0,2 N NaOH
- 1% SDS

Die Lösung wird vor Gebrauch aus 2 ml 1 N NaOH, 1 ml 10% SDS und 7 ml dd H<sub>2</sub> O frisch hergestellt.

**Puffer 3**

Kaliumacetat/Essigsäure-Lösung:

- 60% 5M Kaliumacetat
- 11,5% Essigsäure
- 28,5 % dd H<sub>2</sub>O

Ethanol absolut

70 % Ethanol, eiskalt

Restriktionsmix:

15,1 µl Aqua dest.

2 µl NEBuffer EcoRI

0,4 µl Eco RI-Enzym (10 Units/µl)

Σ 17,5 µl

### 3.2 Essayetablierung

#### 3.2.1 PCR und Auswahl der PCR- Primer

Für die Analyse des HOMX1-Promotor – (GT)<sub>n</sub> - Repeat- Längenpolymorphismus wurden DNA-Proben mittels PCR vermehrt. Die PCR dient der selektiven Amplifizierung von bestimmten DNA –Sequenzen in einer heterogenen Mischung von DNA-Sequenzen. Hierfür wurde ein mit Fluoreszenzfarbstoff markierter Forward-Primer 5'-CTTTCTGGAACCTTCTGGGAC-3' und ein Reverse-Primer 5'-ACAAAGTCTGGCCATAGGAC-3' zur Amplifizierung der Zielsequenzen verwendet, die in ihrer Basensequenz den gesuchten Sequenzen entsprechen und bereits im Protokoll von Walther et.al. (110) beschrieben und angewandt wurden zur Amplifizierung der HMOX1 – (GT)<sub>n</sub> - Repeats. Die Längen der Microsatelliten-DNA wurden mit Hilfe eines Kapillarsequencers bestimmt.

Die PCR wurde zunächst an Proben aus dem Archiv des Zentrallabors durchgeführt. Die D4 markierten PCR-Produkte wurden mittels Kapillarsequencer einer Fragmentanalyse unterzogen: Hierzu wurden die im Walther- Protokoll beschriebenen Primer mit einem blauen (D4) Fluoreszenzfarbstoff markiert. Für die Analyse der Patienten-DNA muss der Sequencer die Größe der Fragmente sicher erfassen können. Zusammen mit der Patienten-DNA lief deshalb gleichzeitig ein D1-(rot)-fluoreszenzmarkierter Standard der Firma Beckman Coulter mit. Anhand des Standards, der DNA-Fragmente bekannter Größe enthält, und den gemessenen Kontrollpeaks wird vom Sequencer eine Kalibrierung erstellt und eine genaue Messung der Patienten-DNA-Fragmente ermöglicht.



Abbildung 2 Produkt mit D4 (blauer) Markierung

In Abbildung Nr. 2 sieht man das Ergebnis eines solchen Sequenzierdurchlaufs mit DNA aus dem Zentrallaborarchiv. Blau markiert ist die Patienten-DNA, die roten Peaks sind die Kontrollpeaks, die sich aus der Sequenzierung einer Standardlösung ergibt. Auch zu erkennen sind sogenannte Stutter-Peaks, die für die sichere Auswertung der Ergebnisse ein Problem darstellen. Die Abbildung zeigt die Notwendigkeit einer Kalibration anhand von klonierten Kontrollen mit bekannter GT-Repeat-Länge.

Die von uns betrachteten DNA –Fragmente sind (GT) $n$ -Basenrepeats, also Mikrosatelliten-DNA der HMOX1-Promotor-Region, die von Individuum zu Individuum unterschiedlich ist. Dieser Polymorphismus wurde bestimmt, da mit ihm auch unterschiedliche Expression der Hämoxygenase-1 einhergeht. Die Länge dieser Mikrosatelliten-DNA wurde mit Hilfe der Kapillarelektrophorese durch Auftrennung bestimmt, nachdem die Fragmente mittels PCR amplifiziert und fluoreszenzmarkiert worden waren. Es entstehen hierbei auch Peaks, die einige Basenpaare (Vielfache von zwei) kürzer sind als die ursprünglichen Repeats: Diese sogenannten „Stutter-Peaks“ (englisch: to stutter: stottern) sind das Ergebnis eines fehlerhaften Ablesens der DNA-Fragmente durch die DNA-Polymerase, die Teile der Repeatsequenzen überspringt. Dies ist vor allem ein Problem bei Patienten-DNA von Heterozygoten, bei denen sich Stutter-Peaks und erwartete Peaks überlagern. In einer großen Menge von DNA mit

vielen unterschiedlichen Fragmentlängen kommt es zu Überlagerungen dieser Artefakte mit benachbarten Peaks, was eine direkte automatisierte Bestimmung der Allel-Frequenzen und auch Häufigkeiten aus der Kapillarelektrophorese unmöglich machen. (111) Um die Ergebnisse der Elektrophorese und Sequenzierung zu korrigieren und Stottertefakte zu minimieren, ist eine Genotypisierung eines kleineren Kollektivs nötig. Hierfür werden die gleichen Marker wie für das große Kollektiv verwendet, die Artefakthäufigkeiten reduziert, die Marker so optimiert und dann für das gesamte Studienkollektiv verwendet. Aus diesem Grund wurden die ausgewählten Primer zuerst an dem kleineren Zentrallaborkollektiv in einem Vortest ausprobiert und die PCR-Bedingungen und auch die Einstellungen für die Kapillarelektrophorese optimiert, und neben der automatisierten Auswertung durch ein Computerprogramm (PERL-Script) eine optische Auswertung durchgeführt.

Erst danach wurden für die qualitativ hochwertig genug befundenen Forward-Primer mit drei verschiedene Farbstoffen gekoppelt bestellt: D4 (blau), D2 (schwarz) und D3 (grün) Well Red Marker.

Ein weiteres Problem war auch die Zusammensetzung der Genotypen im untersuchten A2-Kollektiv: die meisten Patienten sind heterozygot. Bei der Sequenzierung würde dies zu Überlagerungen der Allele kommen. Deswegen wurden interessante und häufige Genotypen bei der optischen Auswertung der Ergebnisse am Sequencer für eine Klonierung ausgewählt. Durch Isolation von Proben mit möglichst unterschiedlichen GT-Längen und Klonierung (siehe Absatz 1.3.2) dieser wurde die wahre Länge der vermessenen Allele bestimmt. Denn durch Vermessung einzelner Fragmente konnte eine individuellere Genotypisierung durchgeführt und somit eine Korrektur der Fehler durch Stotterartefakte vorgenommen werden. Durch die Messung von ausgesuchter Patienten-DNA wurde eine Kontrolle für alle noch nicht klonierten und sequenzierten Allele generiert.

Vor der Klonierung wurden PCR-Reste mittels Qiagen Purification Kit entfernt (nach Anleitung des Herstellers). Nach Aufreinigung der Fragmente war eine Klonierung zur genauen Längenbestimmung möglich.

### **3.3 Klonierung**

#### **3.3.1 Prinzipien der DNA-Klonierung mithilfe eines TOPO-Vektors**

Bei der Klonierung wird ein gewünschtes DNA-Fragment in einen Vektor, wie ein Plasmid, integriert. Ziel ist die Vermehrung eines DNA-Fragmentes um die Eigenschaften zu untersuchen, oder in weiteren Prozessen weiterzuverwenden. Nach der Vervielfältigung kann die Plasmid-DNA isoliert werden, somit ist die Gewinnung von einem Vielfachen der ursprünglich eingesetzten DNA-Menge möglich.

Benutzt wurde ein TOPO-TA-Cloning Kit, welches das Enzym Topoisomerase I enthält, welches als Restriktionsenzym und als Ligase dient. Es kann DNA spalten und wieder zusammenfügen, es bindet sich an die Phosphatgruppe von 3'-Thymin, spaltet einen DNA-Strang, öffnet so den DNA-Doppelstrang, verbindet den gespaltenen DNA-Strang wieder und löst sich von der DNA. Um diese religierende Eigenschaft der Topoisomerase zu nutzen, ist das Enzym kovalent an jedes 3'-Ende des TOPO-Vektors gebunden. Die Vektoren können so passende DNA-Sequenzen mit kompatiblen Enden leichter ligieren. Verstärkt wird der Vorgang durch die Taq-Polymerase. Die Taq-Polymerase erzeugt während der PCR sticky ends, durch Erzeugung eines freien 3'-Adenosin-Endes. Diese werden an einen Vektor mit 3'-Thymin-Überhang annealt. Auf diese Weise werden ohne Einsatz von Restriktionsendonukleasen komplementäre Enden erzeugt.

### **Transformation**

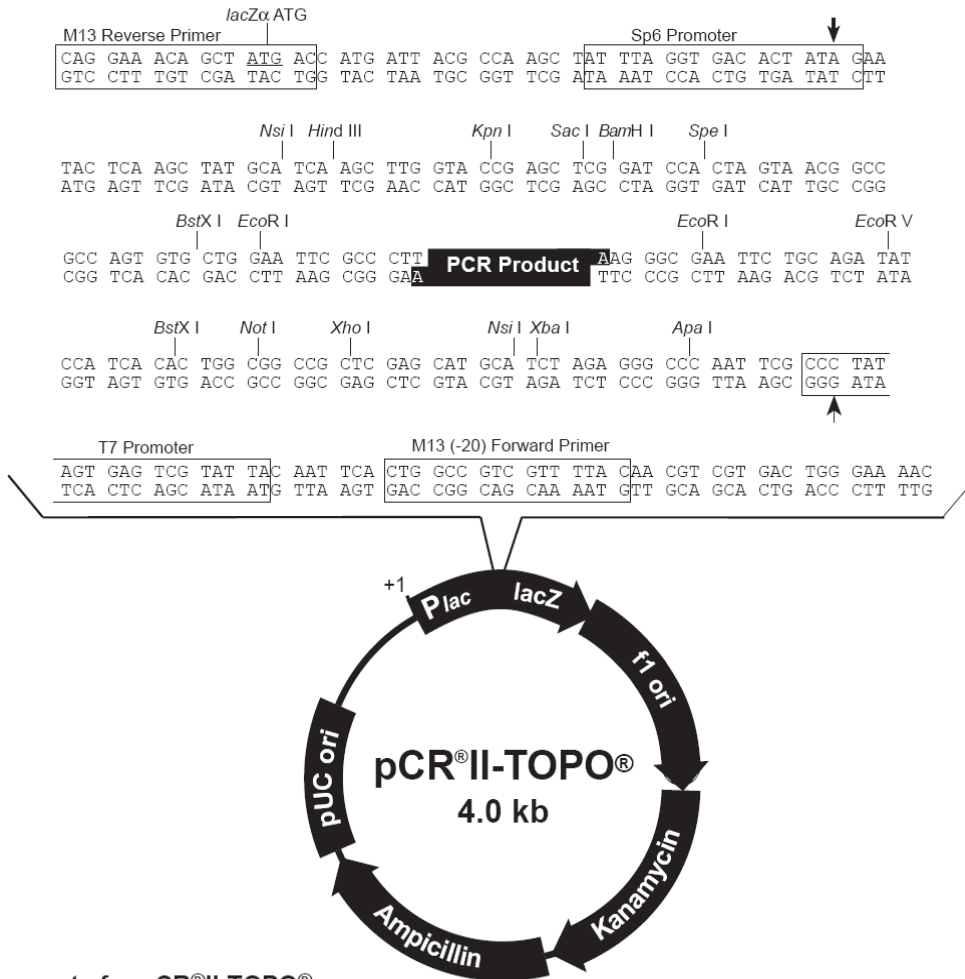
Die rekombinante DNA wird auf Wirtszellen übertragen (meistens Bakterien oder Hefezellen). In diesen Wirtszellen kann der Vektor unabhängig vom Wirtsgenom repliziert werden.

### **Selektive Vermehrung der Zellklone**

Zuerst werden die transformierten Zellen auf einem Nährmedium, z. Bsp. Agar, ausplattiert. Es bilden sich voneinander getrennte Zellkolonien, die aus komplett identischen Zellen bestehen. Einzelne Zellkolonien werden nun von der Platte entnommen und in einer Flüssigkeitskultur weitervermehrt.

## Isolierung von rekombinanten DNA-Klonen

Zellen werden aus dem flüssigen Nährmedium geerntet und Zellen, die rekombinante DNA enthalten, werden durch bestimmte Selektionsverfahren isoliert.



ents for pCR®II-TOPO®

Abbildung 3 Prinzip/Schema der Klonierung und Insert-Markierung auf dem bakteriellen Vektor

Für unsere Ziel-DNA wurde die Klonierung mit dem TOPO TA Cloning Kit durchgeführt.

### ***Vorbereitung der Klonierung***

- 1) Wasserbad auf 42 Grad Celsius vorheizen
- 2) Kompetente Bakterien (Invitrogen TOP10; Bestandteil des Kits) langsam auf Eis auftauen lassen (wichtig, um die Membranen der E.coli zu schonen)
- 3) Inkubator auf 37 Grad Celsius vorheizen
- 4) Bakterienschüttler auf 37 Grad Celsius vorheizen
- 5) LB-Agar- Platten gießen und mit Kanamycin und XGAL und IPTG beschichten. Der LB – Agar ist ein komplexes Nährmedium v.a. für die Anzucht von E.coli. Für unsere Platten wurde der LB-Agar nach Lennox verwendet, der sich folgendermaßen zusammensetzt:

- 10 g/l Tryptan
- 5g/l Hefeextrakt
- 5 g/l NaCl
- 15 g/l Agar mit einem pH- Wert von  $7,0 \pm 2$

35 g Trockenmedium werden in 1l dd H<sub>2</sub>O aufgelöst und für 15 Minuten bei 121 Grad autoklaviert.

- 6) Die LB-Platten werden in folgender Zusammensetzung vorbereitet:
  - 100 µl LB- Agar
  - 25 µl Kanamycin (Konzentration : 00 mg Kanamycin/ ml dd H<sub>2</sub>O)
  - 40 µl Xgal – Stocklösung (4%)
  - 50 µL IPTG Stock Solution (20 mM)
  - $\Sigma$  215 µl der Mischung pro Platte

Wichtig ist das TOPO TA Cloning Kit nicht auftauen zu lassen, da sonst kompetente E-coli- Zellen kaputt gehen.

### **3.3.2 Klonierung**

Im ersten Schritt wird der Vektor für die Klonierung an das PCR- Produkt (Insert) legiert. Für die Ligation wird folgender Reaktionsansatz in Eppis zusammenpipettiert:

2,5µl Insert  
1µl Salt-Solution  
1,5µl Aqua Dest  
1µl TOPO Vektor  
 $\Sigma$  6µl

Ansatz fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubieren und danach auf Eis lagern.

### 3.3.3 Transformation

Für die Transformation wurden Mach1-T1-chemisch kompetente E.coli –Zellen aus dem TOPO TA Cloning Set benutzt.

- 1) Die Bakterien langsam auf Eis auftauen lassen.
- 2) Jeweils 2µl Ligation zu den Bakterien geben und mit Fingern dagegen schnippen und Mischung danach für exakt 30 Minuten auf Eis inkubieren.
- 3) Eine geeignete Anzahl von LB- Platten zum Anwärmen in die Sterilbank stellen.
- 4) Eppis mit den Bakterien in einen Schwimmer setzen und dann vom Eis direkt für 30 Sekunden (zeitkritisch!!) in das auf 42 Grad Celsius vortemperierte Wasserbad setzen (sogennanter „Heat Shock“)
- 5) Proben aus dem Wasserbad direkt wieder auf Eis legen.
- 6) Zu den TOP10-chemisch kompetenten E.coli-Zellen und der Ligationsmischung jeweils 250µl S.O.C-Medium pipettieren. Das S.O.C.- Medium rechtzeitig anfangen aufzutauen.
- 7) Eppis gut verschließen, Tubes mit der Mischung horizontal auf Inkubator befestigen und bei 37 Grad Celsius und bei 200 Umdrehungen pro Minute für eine Stunde schütteln lassen.
- 8) Währenddessen die angewärmten LB- Platten vorbereiten und mit Datum, Insert, Vektor, Antibiotikum und E.coli-Stamm beschriften. Für jeden Transformationsansatz werden 2 Platten beimpft:
  1. Platte: 50 µl der Bakteriensuspension mit ausgeglühter Platinöse gründlich auf der Platte verteilen.
  2. Platte: 100 µl der Bakteriensuspension mit ausgeglühter Platinöse gründlich auf der Platte verteilen
- 9) Platten über Nacht inkubieren bei 37 Grad Celsius (mind. 16 Stunden).

### 3.4 Blau-Weiß-Selektion, DNA-Minipräparation, Sequenzierung der PCR-Produkte und Kalibration des Assays für die Fragmentanalyse

Nachdem die Kolonien über Nacht auf den Platten gewachsen sind werden die gewünschten Klone, die die Zielsequenz enthalten, mit Hilfe der Blau-Weiß-Selektion isoliert. Nach der Transformation wachsen auf den LB-Platten nur die Bakterienklone, die auf ihren Plasmiden Resistenzgene gegen Kanamycin enthalten.

Die bakteriellen Plasmide besitzen eine Klonierungsstelle. Diese Klonierungsstelle erlaubt die Aufnahme von Fremd-DNA in das Wirtsplasmid. Hierfür hat die Klonierungsstelle des linearisierten Vektors einen T-Überhang. Die sogenannten „multiple cloning site“ (MCS) enthält zudem eine Reihe von Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen, um das klonierte PCR Produkt ggf. auch wieder aus dem Vektor ausschneiden zu können. Durch Aufnahme der Ziel-DNA-Fragmente an den MCS werden bakterielle Gene deaktiviert.

Die verwendeten Plasmide der E.coli –Bakterien besitzen außer den Resistenzgenen gegen Ampicillin und Kanamycin das lacZ Gen, ein Markergen, das zur  $\alpha$ -Komplementation notwendig ist: dieses Markergen enthält die kodierende Sequenz für das N-terminale  $\alpha$ -Fragment der  $\beta$ -Galaktosidase.  $\beta$ -Galaktosidasen sind Enzyme, die endständige Zuckerreste ( $\beta$ -Galactose) von Polysacchariden abbauen. Diese Markergene auf den bakteriellen Plasmiden sind aber inaktiv, um diese zu aktivieren benötigen die Plasmide die Sequenzen für das C-terminale Fragment der  $\beta$ -Galaktosidase. Durch Zugabe eines Induktors, der Isopropyl-1- thio- $\beta$ -D-Galaktosidase kommt es zur Transkription des lacZ-Gens und zur Produktion von  $\beta$ -Galaktosidase. Bei Zugabe des Indikators 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Galaktosid (X-Gal) der auch auf den Nährplatten ausplattiert wird, kommt es zur Spaltung des Indikators bei Vorhandensein einer funktionierenden  $\beta$ -Galaktosidase unter Freisetzung eines blauen Farbstoffs.

Enthalten die Zellen einer Kolonie ein Plasmid ohne Insert, also Fremd-DNA, dann können sie eine funktionsfähige  $\beta$ -Galaktosidase exprimieren und wachsen auf den LB-Platten blau.

Wenn die Plasmide jedoch ein Insert enthalten, dann wird das lacZ Gen durch eine Fremdsequenz unterbrochen, es wird keine funktionstüchtige  $\beta$ -Galaktosidase exprimiert und die Kolonien wachsen auf den LB–Agar–IPTG–X-Gal–Platten weiß. Bei der DNA-Minipräparation werden nur einige der weißen Kolonien auf das Vorhandensein des richtigen Inserts überprüft. Es werden Restriktionsenzyme beigemischt, die das gewünschte Insert ausschneiden, um danach eine Gelelektrophorese durchzuführen. Anhand der Bandenlängen in der Elektrophorese, konnte bestimmt werden, welche Kolonien das gewünschte Insert enthalten, um eine Sequenzierung der geeigneten Klone durchzuführen.



den mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe eines Lasers zur Fluoreszenz angeregt. Die ddNTPs am Ende jedes DNA-Fragmentes zeigen eine Fluoreszenz unterschiedlicher Farbe und können so von einem Detektor erkannt werden.

Die mittels Sequenzierung ermittelten Repeatlängen wurden in ein Diagramm eingetragen und mit den Ergebnissen der Fragmentanalyse verglichen. Aus der ermittelten Gerade, die sich für jeden Farbstoff ergab, konnte mittels der Gradengleichung die Länge der nicht Klonierten Fragmente durch Extrapolation bestimmt werden. Mittels Hochrechnung wurden für jeden der drei Farbstoffe und alle (GT)*n*- Längen die zugehörigen Fragmentlängen ermittelt (Abbildungen 3 a und 3 b).

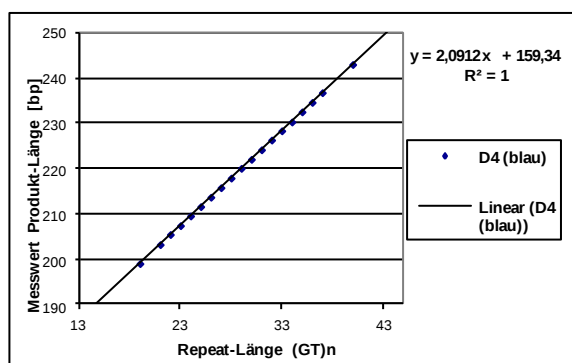


Abb. 6 a

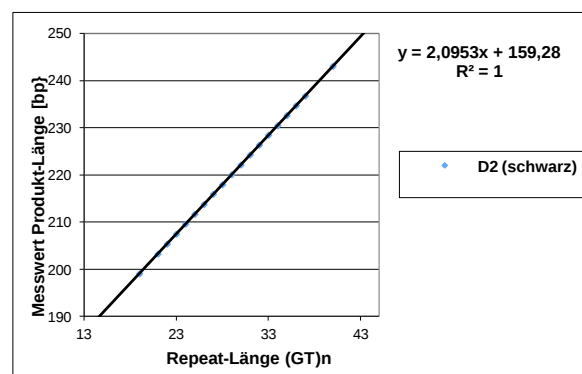


Abb. 6 b

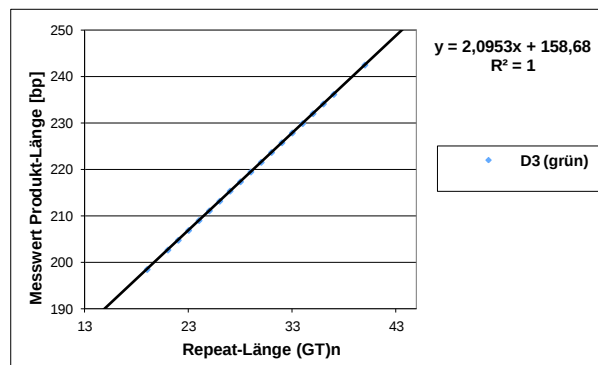


Abb. 6c

Abbildung 6 a, b, c Bestimmung der zu erwarteten Längen der GT-Repeats durch Extrapolation. Die ermittelten Gleichungen wurden nach x aufgelöst und gegen die Fragmentlänge auf der y-Achse eingetragen.

Die rechnerisch ermittelten Längen der unterschiedlichen (GT)*n*-Repeats wurden aufgetrennt nach Farbstoffen in eine Tabelle eingetragen, die die Basis der optischen Auswertung durch mich und der automatisierten Auswertung durch ein Computerprogramm bildete (Export von Längen und Flächen unter den Kurven in eine Komma-getrennte Textdatei, Perl-Script [Stefan Neuwirth]).

| Produktlänge<br>(erwartet) | Anzahl der GT | Produktlänge (tatsächlich) |              |           |
|----------------------------|---------------|----------------------------|--------------|-----------|
|                            |               | D4 (blau)                  | D2 (schwarz) | D3 (grün) |
| 186                        | 13            | 186,53                     | 186,52       | 185,92    |
| 188                        | 14            | 188,62                     | 188,62       | 188,02    |
| 190                        | 15            | 190,71                     | 190,71       | 190,11    |
| 192                        | 16            | 192,80                     | 192,81       | 192,21    |
| 194                        | 17            | 194,90                     | 194,90       | 194,30    |
| 196                        | 18            | 196,98                     | 197,00       | 196,40    |
| 198                        | 19            | 199,03                     | 199,06       | 198,46    |
| 200                        | 20            | 201,16                     | 201,19       | 200,59    |
| 202                        | 21            | 203,22                     | 203,25       | 202,65    |
| 204                        | 22            | 205,45                     | 205,35       | 204,75    |
| 206                        | 23            | 207,41                     | 207,47       | 206,87    |
| 208                        | 24            | 209,55                     | 209,60       | 209,00    |
| 210                        | 25            | 211,61                     | 211,69       | 211,09    |
| 212                        | 26            | 213,69                     | 213,77       | 213,17    |
| 214                        | 27            | 215,79                     | 215,94       | 215,34    |
| 216                        | 28            | 217,91                     | 217,95       | 217,35    |
| 218                        | 29            | 220,06                     | 220,06       | 219,46    |
| 220                        | 30            | 222,05                     | 222,14       | 221,54    |
| 222                        | 31            | 224,16                     | 224,26       | 223,66    |
| 224                        | 32            | 226,31                     | 226,35       | 225,75    |
| 226                        | 33            | 228,35                     | 228,46       | 227,86    |
| 228                        | 34            | 230,30                     | 230,48       | 229,88    |
| 230                        | 35            | 232,53                     | 232,62       | 232,02    |
| 232                        | 36            | 234,62                     | 234,71       | 234,11    |
| 234                        | 37            | 236,77                     | 236,77       | 236,17    |
| 236                        | 38            | 238,81                     | 238,91       | 238,31    |
| 238                        | 39            | 240,90                     | 241,00       | 240,40    |
| 240                        | 40            | 242,99                     | 243,09       | 242,49    |
| 242                        | 41            | 245,08                     | 245,19       | 244,59    |
| 244                        | 42            | 247,17                     | 247,29       | 246,69    |
| 246                        | 43            | 249,26                     | 249,83       | 249,23    |
| 248                        | 44            | 251,35                     | 251,48       | 250,88    |
| 250                        | 45            | 253,44                     | 253,57       | 252,97    |

Abbildung 7 Zuordnungstabelle: Tabellarische Auflistung der per Extrapolation ermittelten(GT)n-Repeats

Durch Klonierung und Sequenzierung ausgesuchter Repeats und die Erstellung der Zuordnungstabelle konnte die Klonierung des gesamten Kollektivs vermieden werden. Der gesamte DNA- Pool musste nach Erstellung der Zuordnungstabelle nur noch im Sequencer nach der PCR durch Kapillarelektrophorese aufgetrennt und Längenbestimmt werden. Aus den gemessenen Fragmentlängen konnten die Repeatlängen anhand der Tabelle abgelesen werden (siehe Abschnitt 1.4).

### **Materialien für die DNA-Minipräparation**

Es werden drei verschiedene Puffer für die DNA-Präparation benötigt; benutzt wurden Puffer-Lösungen 1-3 von Qiagen, Bestandteil des Plasmid-Maxi-Kits. Die Puffer werden nach Anleitung des Herstellers vorbereitet.

#### **Puffer 1**

TE-Puffer mit RNase A:

- 50mM Tris-HCl, pH 8,0
- 10mM EDTA
- 100 µg/ml RNase A

#### **Puffer 2**

NaOH /SDS-Lösung :

- 0,2 N NaOH
- 1% SDS

Die Lösung wird vor Gebrauch aus 2 ml 1 N NaOH , 1 ml 10% SDS und 7 ml dd H<sub>2</sub> O frisch hergestellt.

#### **Puffer 3**

Kaliumacetat/Essigsäure-Lösung:

- 60% 5M Kaliumacetat
- 11,5% Essigsäure
- 28,5 % dd H<sub>2</sub>O

Ethanol absolut

70 % Ethanol, eiskalt

### **Vorgehen**

- 1) Weiß wachsende Kolonien aufnehmen und in 2 ml flüssigem (ohne Agar) LB-Kanamycin-Medium unter Schütteln 16 Stunden bei 37 °C kultivieren. Das LB-Kanamycin-Medium enthält 250 µl Kanamycin/ 500 ml LB-Medium (Kanamycin-Konzentration von 50 µl Kanamycin/ ml LB-Medium).
- 2) Von jeder dieser Anreicherungen ca. 1,5 ml (so viel wie möglich) in ein 1,5 ml Eppendorfpipettieren und fünf Minuten lang bei >8000xg und 4 °C zentrifugieren.
- 3) Der Überstand wird vollständig abgenommen , das Pellet wird in 200 µl RNase haltigem TE-Puffer (Puffer 1) aufgenommen und die Suspension 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
- 4) 200 µl NaOH/SDS-Lösung (Puffer 2) werden hinzugegeben, der Inhalt des Reagenzglas durch wenden (ca. 5x) gemischt und genau fünf Minuten auf Eis inkubiert.

- 5) Das Lysat wird mit 200 µl kalter Kaliumacetat/Essigsäure-Lösung (Puffer 3) neutralisiert, sofort durch Wenden gemischt und auf Eis inkubiert.
- 6) Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 1800xg und 4°C wird der klare Überstand in ein 1,5 ml Eppendorf-Cup überführt.
- 7) Es wird 600 µl Chloroform zugegeben, das ganze gevortext und anschließend bei max. Geschwindigkeit und Raumtemperatur drei Minuten lang zentrifugiert.
- 8) Die obere wässrige Phase wird nach der Zentrifugation entnommen und in ein Eppi überführt.
- 9) Die Chloroform-Ausschüttelung aus Schritt 7 wird wiederholt und genauso zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wird danach vorsichtig abgenommen. Jetzt darf kein Chloroform mehr ins neue Eppi gelangen, falls das doch geschieht: erneute Zentrifugation und abnehmen der wässrigen Phase.
- 10) 500 – 900 µl Ethanol hinzugeben und die Plasmid-DNA 15 Minuten auf Eis fällen.
- 11) Die DNA 15 Minuten bei 1800xg und 4°C zentrifugieren, den Überstand abnehmen und das Pellet mit 500 µl 70% eiskaltem (-20 °C) Ethanol waschen. Das Ethanol wird nur auf das Pellet pipettiert, nicht gemischt, und sofort bei 1800xg für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert.
- 12) Absaugen des Überstandes nach der Zentrifugation.
- 13) Das Pellet wird 10 Minuten bei 37 °C mit geöffneter Kappe getrocknet und anschließend in 30 µl dd H<sub>2</sub>O aufgenommen.
- 14) Um festzustellen, ob die gewonnene Plasmid-DNA das gewünschte Insert enthält, werden jeweils 5 µl der Präparation mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten und in einem Agarosegel getrennt. Hierfür wird ein Restriktionsmix hergestellt:
  - 15,1 µl Aqua dest.
  - 2 µl NEBuffer EcoRI
  - 0,4 µl Eco RI-Enzym (10 Units/µl)
  - $\Sigma$  17,5 µl
- 15) ECO I-Enzym und Puffer (ECO –RI\* WITH BSA) der Firma New England Biolabs wurden verwendet.
- 16) Zu den 17,5 µl jeweils 2,5 µl Mini-DNA-Präparation geben und für 2h bei 37 °C verdauen.
- 17) Nach dem Verdau wird die Lösung auf ein Agarose-Gel aufgetragen und kontrolliert, ob die präparierte DNA ein Insert enthält und die Fragmentlängen werden überprüft.

### 3.5 Sequenzierung

Nach dem DNA-Mini-Insert wird nun eine Kontrollsequenzierung mit einem GC-Mix (2,5 µl) durchgeführt. Hierfür wurde das Genome Lab Methods Development Kit benutzt.

Das Kit enthält Nucleotide als GC- Mix, die selbst zusammengemischt werden nach Anleitung des Herstellers.

- 1) Als erstes werden 2 µl einer 5 molaren Arbeitslösung mit Forward MI3- und Reverse MI3-Primer, aus dem TOPO TA Cloning Kit, mit 7,5 µl ddH<sub>2</sub>O, 2,5 µl Minipräp und 8 µl des GC-Mixes vermischt. Die Proben werden für 3 Stunden in den Thermocycler gegeben.
- 2) Die Sequenzierung läuft mit folgendem Programm:
  - Vordenaturieren: eine Minute bei 96 Grad Celsius, dann 30 Zyklen :
  - Denaturierung: 30 Sekunden bei 96 Grad Celsius
  - Annealing: 30 Sekunden bei 50 Grad Celsius
  - Elongation: 4 Minuten bei 60 Grad Celsius
  - Nach 30 Zyklen runterkühlen auf 4 Grad Celsius im Thermocycler.
  - Nach der Sequenzierreaktion nach Sanger erfolgt am Biomek (Beckman Coulter) die Aufreinigung der DNA mit Hilfe von Beads, sodass die Dye-Terminatoren entfernt werden.
- 3) Danach erfolgte die Kapillarelektrophorese zur Überprüfung und Längenbestimmung der zur Kontrolle ausgewählten Fragmente und die Erstellung einer Zuordnungstabelle.

Ausgewählte Kontrollfragmente mit jeweils A5 30; A11 24; B12 41 bp Fragmentlänge liefen bei der späteren PCR des A2-Kollektivs auf Plattenposition H12 mit.

*Nach der Längenbestimmung von DNA des Zentrallaborarchivs wurde eine PCR von ausgesuchten Klonen als Kontrolle und des A2 Kollektivs durchgeführt.*

- 1) Die DNA- Minipräp-Kontrollen werden separat im Verhältnis 1: 300 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt und jede der drei Klone mit einem verschiedenen Farbstoff markiert.
- 2) Die angelieferten Proben der GHS-Patienten werden zuerst auf 10 - 20 ng verdünnt, in jeweils zwei Schritten mit Hilfe von sterilem Wasser. Ausgangskonzentration pro Proband waren 400 – 100 ng.
- 3) Die PCR des A2- Kollektivs wird mit drei verschiedenen Forward-Primern, die unterschiedlich Fluoreszenzfarbstoff markiert sind durchgeführt, um anstelle von drei Platten nur eine laufen lassen zu müssen. Für alle Platten wurde der gleiche Reverse Primer verwendet. Für die PCRs (auf je drei Platten) werden drei Mastermix-Lösungen angesetzt, die dNTPs, Primer, Taq-Polymerase und Magnesium-Chlorid (aus einem Kit) enthalten. Pro Patient ergibt das 20 µl Mastermix und 5 µl verdünnte DNA in folgender Zusammensetzung:
  - 10,6 µl Aqua dest.
  - 2,0 µl DMSO (Detergenz für GC-Nukleotide)
  - 10x KIT Puffer
  - 2,0 µl markierter Forward-Primer

- 2,0 µl Reverse-Primer
  - 0,7 µl dNTPs aus einer 10 mM-Lösung
  - 0,2 µl Taq-Polymerase (5 U/µl) KIT
- 4) Für eine 96 Well-Platte wird das 100fache der Mastermixmenge, die für einen Patienten benötigt werden würde, hergestellt.
  - 5) In jedes Well werden jeweils 20 µl Mastermix und 5 µl der verdünnten Patienten-DNA gegeben, in Position H12 wird hier jeweils eine der Kontrollen mitaufgetragen. Danach werden die Platten in den Thermocycler gegeben, jeweils eine Platte gleichzeitig pro Gerät. Die DNA einer Platte ist jeweils mit nur einem Farbstoff markiert. Danach folgt die Amplifizierung im Thermocycler.
  - 6) Amplifizierungsprogramm :
    1. 1 Minute Vordenaturierung bei 96 Grad
    2. 30 Sekunden Denaturierung bei 96 Grad
    3. 30 Sekunden Annealing bei 58 Grad
    4. 3 Minuten Elongation bei 72 Grad
    5. Von Schritt 2 bis 4 laufen jeweils 30 Zyklen, danach kühlen die Platten auf 4 Grad runter.

Danach müssen die Platten sofort weiterbearbeitet, oder kühlgestellt werden.

Im nächsten Schritt wird mit D4-Farbstoff markierte DNA im Verhältnis 1:5 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt, mit D2- Farbstoff markierte Proben werden im Verhältnis 1:2 verdünnt und mit D3 – Farbstoff markierte Proben werden unverdünnt in den Sequencer gegeben. Die Verdünnung ist erforderlich, weil die unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe eine unterschiedliche Signalstärke haben. Aus jeder der drei Platten wird jeweils PCR-Produkt eines Patienten in ein Well pipettiert, A1 in A1 usw. zwecks besserer Zuordnung, sodass am Ende jedes Well PCR-Produkt von drei verschiedenen Patienten aus drei verschiedenen Platten enthält. Die PCR-Produkte werden auf die Sequenzierplatten pipettiert, die pro Well bereits 40 µl SLS-Formamid (versetzt zur Stabilisierung der Farbstoffe.) und 0,5 µl 400er Standard von Beckman Coulter enthalten.

Im Sequencer verläuft die Auftrennung mit Hilfe der Kapillarelektrophorese bei einer Kapillartemperatur von 40 Grad.

Programm:

- 1) Denaturierung für 120 Sekunden bei 90 Grad.
- 2) Injection mit einer Spannung von 2,5 V und anziehen für 30 Sekunden.
- 3) Auftrennung bei 7,5 V für 35 Minuten ohne Pause.

Zum Schluss erfolgt die optische Auswertung am Sequencer.

### 3.6 Auswertung der Sequenzierergebnisse

Insgesamt wurde DNA von 4939 Probanden in 52 Platten sequenziert, wobei jeweils Material von drei Probanden in einem Well sequenziert wurde. Verwendet wurden drei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe: D2 (schwarz), D3 (grün) und D4 (blau). Auf der Position H12 lief auf jeder Platte eine klonierte Kontrolle mit.

Die Sequenzierzeit betrug für jede der Platten 12 Stunden, insgesamt waren 17 Durchläufe nötig und ein zusätzlicher Lauf mit den auf Position H12 gesammelten Kontrollen.

Allerdings mussten einige der Proben erneut sequenziert werden, da das Signal beim ersten Durchlauf zu schwach war, oder es zu Standardfehlzuordnungen gekommen war. Bei Wiederholung waren jedoch alle Proben eindeutig genotypisierbar.

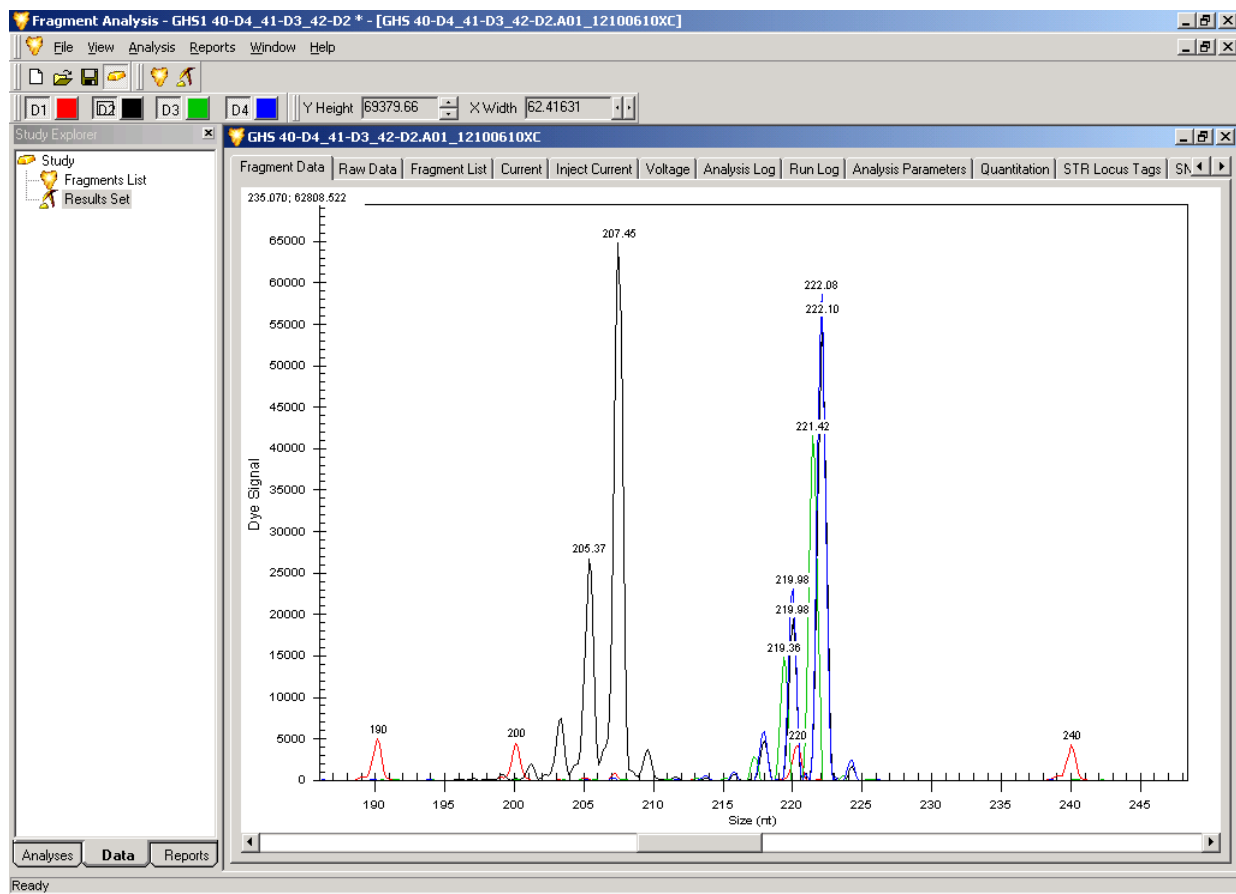


Abbildung 8 Beispiel für einen Genotypisierungslauf

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Qualitätskontrolle der Ergebnisse der Fragmentanalyse

#### 4.1.1 Verteilung der Genotypen bezüglich der Fluoreszenzfarbstoffe

Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden durch ein Programm, also automatisiert und auch optisch ausgewertet. Diese Vorgehensweise dient dazu, potentielle Fehlzusordnungen zu vermeiden. Insgesamt zeigten beide Auswertemethoden eine Fehlerquote von 1 %.

Nach dem Abgleich der Ergebnisse beider Auswertemethoden und der Elimination von Fehlern wurden als zweiter Schritt der Qualitätskontrolle die Ergebnisse nicht nur bezüglich des ganzen Kollektivs (Abb. 12a) aufgetragen, sondern zudem nach dem zur Genotypisierung verwendeten Fluoreszenzfarbstoff getrennt (Abb. 12b-d). Es ergab sich folgendes Ergebnis für die HMOX1-Allelverteilung im A2-Kollektiv der GHS:

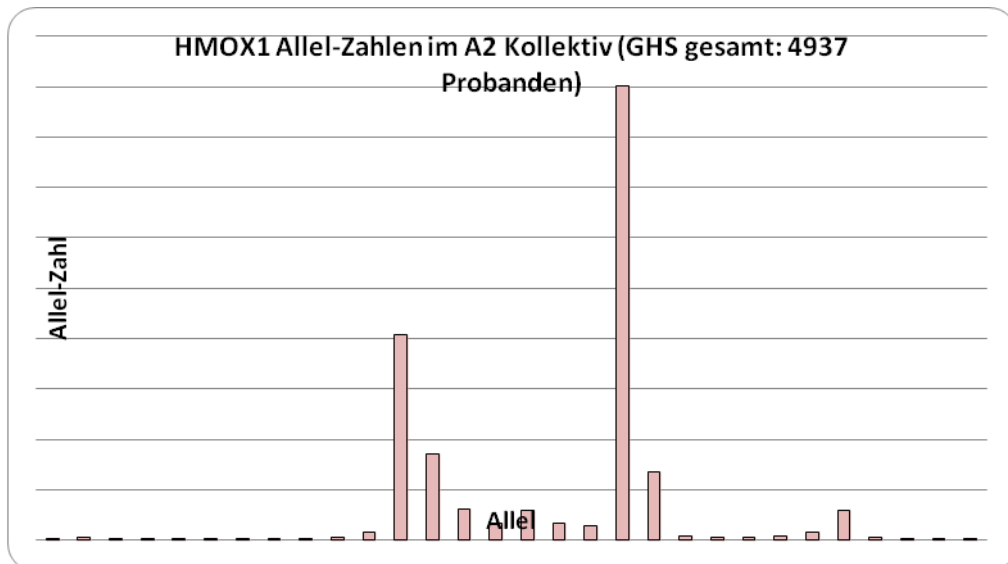


Abbildung 9 a Verteilung der Allelhäufigkeiten im A2- Kollektiv

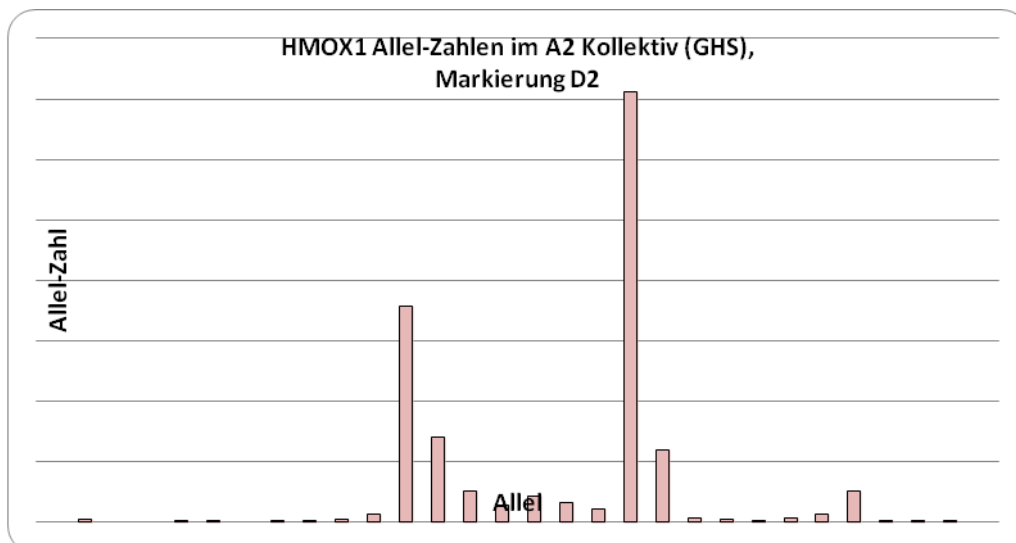


Abbildung 9 b

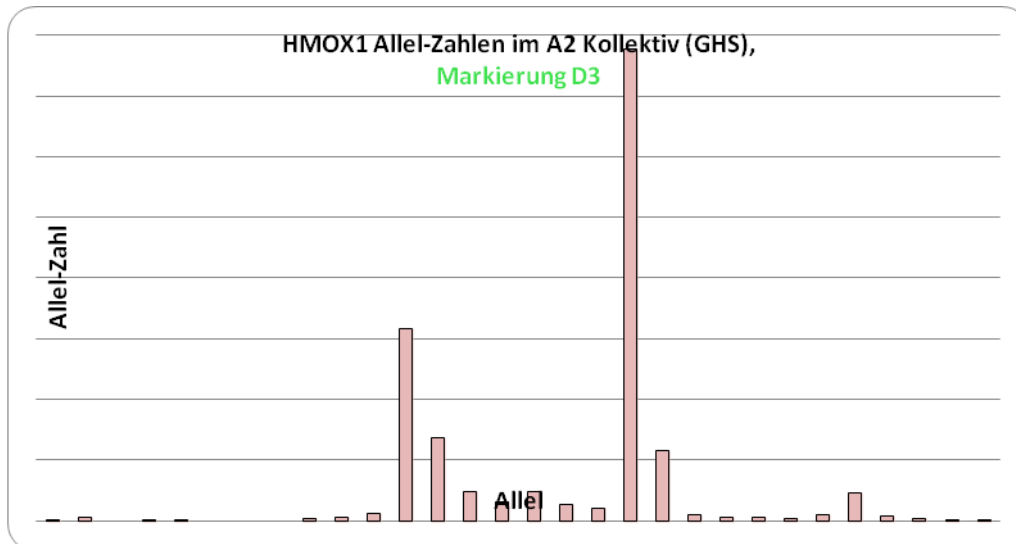


Abbildung 9 c (oben) 9 d (unten)

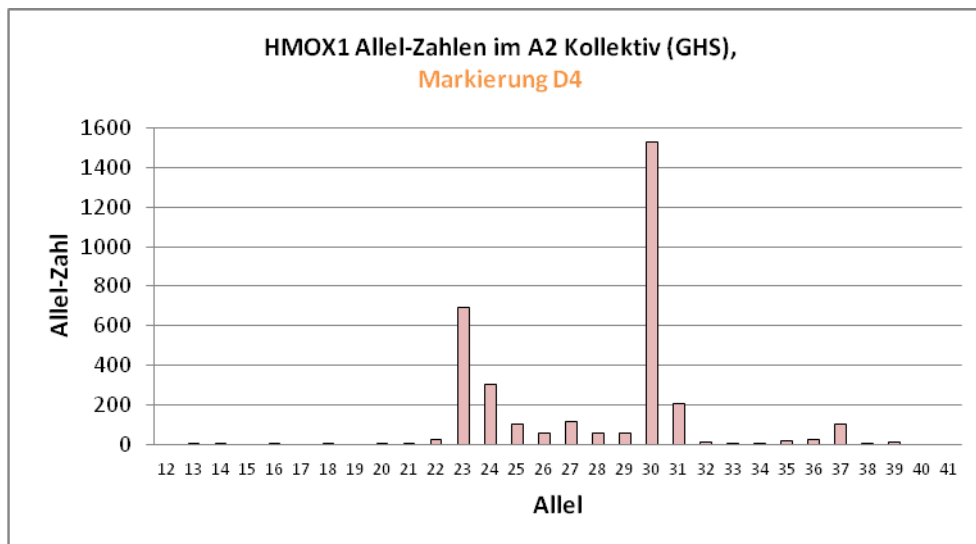


Abbildung 9 a,b,c,d Aufteilung der Häufigkeiten nach Farbstoffmarkierung

Der Vergleich der nach Fluoreszenzfarbstoff aufgetragenen Ergebnisse miteinander bestätigte die uniforme Performance der Genotypisierung mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen.

#### 4.1.2 Überprüfung des Ergebnisses mittels Hardy-Weinberg-Äquilibrium

Im dritten Schritt der Qualitätskontrolle wurden aus den für die einzelnen Allele  $((GT)_n)$  ermittelten Frequenzen mittels Hardy-Weinberg-Gesetz die erwarteten Genotypfrequenzen ermittelt und diese mit den tatsächlich beobachteten Genotypfrequenzen verglichen.

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ist ein mathematisches Modell, mit dem sich die Häufigkeit bestimmter Allele in einer idealen Population berechnen lassen. Das Gleichgewicht besagt, dass die genetische Variation in einer Population bei Abwesenheit von Störfaktoren von

Generation zu Generation konstant bleibt. In einer solchen idealen Population bleibt die Allel- und Genotypfrequenz von Generation zu Generation unverändert; sie stehen im Gleichgewicht.

So ergibt sich bei Betrachtung des Hardy-Weinberg-Äquilibrium für nur zwei Allele für Genotyp- und Allelfrequenz:

**Hardy-Weinberg-Gesetz:**  $p^2 + 2pq + q^2 = (p + q)^2 = 1$

$\swarrow$                        $\downarrow$                        $\searrow$   
 Zahl der              Zahl der              Zahl der  
 erwarteten AA#    erwarteten Aa#    erwarteten aa#

Abbildung 10 Darstellung des Hardy-Weinberg-Äquilibrium

**Genotypenfrequenz:**

Homozygote AA / alle untersuchten Individuen  
 Heterozygote Aa / alle untersuchten Individuen  
 Homozygote aa / alle untersuchten Individuen  
 $AA + Aa + aa = 1$

Abbildung 11 Darstellung des Hardy-Weinberg-Äquilibrium.

**Allelfrequenzen:**

p: Allelfrequenz für A:  
 $(AA \times 2 + Aa) / \text{alle Allele}$   
 q: Allelfrequenz für a:  
 $(aa \times 2 + Aa) / \text{alle Allele}$   
 dabei: alle Allele = alle untersuchten Individuen x 2

Abbildung 12 Darstellung des Hardy-Weinberg-Äquilibrium

Mittels Hardy-Weinberg-Gesetz können die erwarteten Genotypfrequenzen ermittelt werden. Mit den rechnerisch bestimmten Werten ist nun ein Vergleich mit den Ergebnissen der Fragmentanalyse möglich.

In unserem Fall betrachten wir nicht die Genotyp- und Allelfrequenzen von zwei, sondern 30 Allelen. Also muss das Gleichgewicht etwas modifiziert angewandt werden:

**Hardy Weinberg Gesetz für Loci, die in i allelischen Zuständen vorkommen können:**  $A_1, A_2, A_3, \dots, A_i$ ; in unserem Fall:  $i = 30$

|       | $A_1$    | $A_2$    | $A_3$    | ... | $A_i$    |
|-------|----------|----------|----------|-----|----------|
| $A_1$ | $A_1A_1$ |          |          |     |          |
| $A_2$ | $A_1A_2$ | $A_2A_2$ | $A_2A_3$ |     |          |
| $A_3$ | $A_1A_3$ | $A_2A_3$ | $A_3A_3$ |     |          |
| .     |          |          |          |     |          |
| $A_i$ | $A_1A_i$ | $A_2A_i$ | $A_3A_i$ |     | $A_iA_i$ |

$(p_1 + \dots + p_i)^2$

**Abbildung 13 Modifizierung des Hardy-Weinberg-Äquilibriums**

Zur Überprüfung bzw. dem Vergleich der Ergebnisse wird ein Hypothesentest mit  $\chi^2$ -verteilter Testprüfgröße durchgeführt. Die Wahl fällt hier auf den Exakten Test nach Fischer, einer Modifikation des Chi-Quadrattestes, ein Signifikanztest zur Überprüfung der Unabhängigkeit von beobachteten und erwarteten Merkmalsfrequenzen. Der Fisher Test ist jedoch nur bis zu einem Wert von  $i=4$  zuverlässig berechenbar, sodass eine Modellierung nötig ist, die in Form der Markov – oder Monte Carlo-Methode angewandt wurde.

Nach der Wahrscheinlichkeitstestung der Ergebnisse mit Bestimmung des p-Wertes nach der Markov-Methode ergab sich folgendes Ergebnis:

## Genotyp-Zahlen für die Major-Allele im GHS-Kollektiv und Betrachtung zum Hardy-Weinberg-Äquilibrium

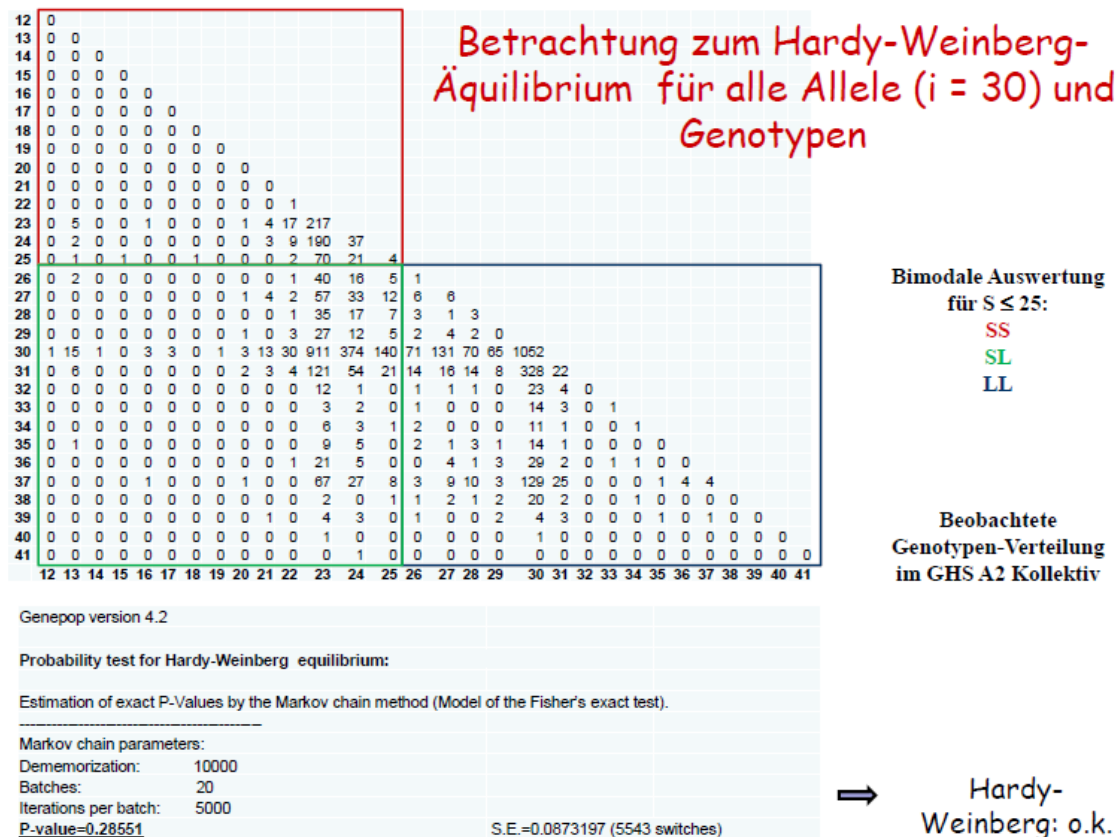
| Beobachtete Genotypenverteilung |     |     |      |     |        |
|---------------------------------|-----|-----|------|-----|--------|
|                                 | 23  | 24  | 30   | 31  | andere |
| 23                              | 217 |     |      |     |        |
| 24                              | 190 | 37  |      |     |        |
| 30                              | 911 | 374 | 1052 |     |        |
| 31                              | 121 | 54  | 328  | 22  |        |
| andere                          | 382 | 160 | 792  | 129 | 168    |
| Erwartete Genotypenverteilung*  |     |     |      |     |        |
|                                 | 23  | 24  | 30   | 31  | andere |
| 23                              | 212 |     |      |     |        |
| 24                              | 176 | 37  |      |     |        |
| 30                              | 934 | 388 | 1031 |     |        |
| 31                              | 139 | 58  | 307  | 23  |        |
| andere                          | 372 | 155 | 821  | 122 | 162    |

\*Errechnet aus den beobachteten  
Allel-Frequenzen nach dem  
Hardy-Weinberg Gesetz

|                                                                                             |                                 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| Genepop version 4.2                                                                         |                                 |
| Probability test for Hardy-Weinberg equilibrium:                                            |                                 |
| Estimation of exact P-Values by the Markov chain method (Model of the Fisher's exact test). |                                 |
| Markov chain parameters:                                                                    |                                 |
| Dememorization:                                                                             | 10000                           |
| Batches:                                                                                    | 20                              |
| Iterations per batch:                                                                       | 5000                            |
| P-value=0.49021                                                                             | S.E.=0.0299607 (83876 switches) |

⇒ Hardy-Weinberg:  
o.k.

Abbildung 14 Vergleich der beobachteten Genotypverteilung und der nach Hardy-Weinberg-Äquilibrium erwarteten Genotypverteilung (GenePop 4.2)



**Abbildung 15 Vergleich der beobachteten Genotypverteilung und der nach Hardy-Weinberg-Äquilibrium erwarteten Genotypverteilung nach Repeat-Kategorien (kurz =  $S \leq 25$ , lang =  $L > 25$ ) (GenePop 4.2)**

Die p-Werte waren dieser Auswertung nach bei  $p > 0,05$ , und die Genotypen somit im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Dies wurde als weiterer Hinweis auf korrekte Genotypisierung gewertet.

## 4.2 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Insgesamt wurden die Querschnitts-Daten und Allelfrequenzen von 4939 Studienteilnehmern aus dem A2-Unterkollektiv benutzt und in die statistische Auswertung miteinbezogen. Das A2 –Unterkollektiv wurde extra für die Untersuchung von kardiovaskulären Erkrankungen im Rahmen der GHS zusammengestellt. Die Auswahl und das Studiendesign wurden oben schon im Abschnitt 3.1 beschrieben.

Eine mögliche Assoziation der (GT) $n$ -Repeats mit dem Alter, Geschlecht, BMI, Bilirubin, FMD, Diabetes, Bluthochdruck, Rauchen, Dyslipidämie, Familienanamnee für Myokardinfarkt und Koronare Herzerkrankung wurde analysiert. Für die Analyse wurde die Summe der Repeats auf beiden Allelen wurde für jeden Studienteilnehmer berechnet. Eine Länge von  $>26$  GT-Repeats wurden als lange Allele, und eine Länge von  $<26$  Repeats wurden als kurze Allele definiert. Die Verteilung der Allelfrequenzen ist bimodal.

Die absoluten Häufigkeiten und Merkmale der Studienpopulation des A2-Kollektivs sind in Tabelle 5 und 6 dargestellt.

| Variablen                 | n=4939              |
|---------------------------|---------------------|
| Alter                     | 56 (46/65)          |
| BMI                       | 26.52 (23.90/29.80) |
| Bilirubin                 | 0.62 (0.47, 0.84)   |
| FMD                       | 7.15 (4.42/10.71)   |
| Geschlecht (Frauen)       | 2460 (49.2%)        |
| Diabetes                  | 374 (7.5%)          |
| Hypertonie                | 2564 (51.3%)        |
| Rauchen (zur Zeit)        | 959 (19.2%)         |
| Dyslipidämie              | 1483 (29.7%)        |
| Familiengeschichte von MI | 867 (17.3%)         |
| CAD                       | 226 (4.5%)          |

Tabelle 5 Patientendaten mit der Verteilung relevanter Parameter: stetige Variablen werden mit Median (Q1/Q3) dargestellt; kategoriale Variablen werden mit absoluter und relativen Häufigkeiten beschrieben.

| Variable     | Ausprägungen d. Variablen | Bilirubin        | FMD               |
|--------------|---------------------------|------------------|-------------------|
| Geschlecht   | Männer                    | 0.70 (0.52/0.93) | 5.99 (3.76/8.83)  |
|              | Frauen                    | 0.55 (0.42/0.74) | 8.97 (5.58/13.04) |
| Diabetes     | ja                        | 0.59 (0.45/0.78) | 5.28 (3.29/8.84)  |
|              | nein                      | 0.63 (0.47/0.85) | 7.29 (4.58/10.87) |
| Hypertonie   | ja                        | 0.63 (0.47/0.84) | 6.46 (4.02/9.45)  |
|              | nein                      | 0.62 (0.46/0.84) | 8.12 (4.98/12.04) |
| Rauchen      | ja                        | 0.55 (0.42/0.73) | 7.58 (4.79/11.06) |
|              | nein                      | 0.64 (0.48/0.87) | 7.07 (4.35/10.64) |
| Dyslipidämie | ja                        | 0.62 (0.47/0.84) | 6.58 (4.06/9.53)  |
|              | nein                      | 0.63 (0.47/0.84) | 7.46 (4.59/11.23) |
| Fam. MI      | ja                        | 0.62 (0.45/0.85) | 7.28 (4.69/10.70) |
|              | nein                      | 0.63 (0.47/0.84) | 7.12 (4.38/10.72) |
| CAD          | ja                        | 0.64 (0.47/0.84) | 6.33 (3.95/9.41)  |
|              | nein                      | 0.62 (0.47/0.84) | 7.24 (4.48/10.82) |

Tabelle 6 Populationsmerkmale und ihre Ausprägungen

### 4.3 Betrachtung des Zusammenhangs zwischen (GT)n-Allellängen und FMD

Der Zusammenhang zwischen den Allellängen und der FMD, gemessen in Prozent, wurde mit Hilfe eines multivariablen linearen Regressionsmodells betrachtet.

Es wurde nicht nur untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen diesen beiden Variablen bestehen, sondern auch wie dieser Zusammenhang genau aussieht, und inwiefern die Länge von Allel 1, Allel 2, oder Interaktion zwischen Allel 1 und 2, also mehrere Variablen gemeinsam, Einfluss auf die FMD nehmen. Die Repeats wurden also stetig, aber auch kategorial betrachtet und auf ihren Zusammenhang mit der FMD untersucht: Hierbei wurden die Allele eingeteilt in Klassen, je nach Längen der Repeats, Kombinationen die häufiger als 120- oder mehr als 200-mal im Patientenkollektiv vorkamen untersucht. Als sogenannte Confounder, also Störvariablen, wurde die Analyse für mehrere Variablen adjustiert. Diese Variablen sind Faktoren, die mit den Allellängen und der FMD zusammenhängen und diese Werte beeinflussen können. In diesem Fall gilt das für folgende Variablen: Geschlecht, Alter, Diabetes, Hypertonie, Rauchen, Dyslipidämie, BMI, Familiengeschichte von MI und CAD. Zusätzlich wurden zur Untersuchung einer Korrelation und der Signifikanz der Ergebnisse das 95%-Konfidenzintervall und die p-Werte bestimmt. Die Ergebnisse der Analyse sind in Tabelle 3 zu sehen.

| Variable                     | Regressionskoeffizient | 95%-Konfidenzintervall | p-Wert |
|------------------------------|------------------------|------------------------|--------|
| gt-repeats Allel1            | -0.317                 | [-0.714, 0.080]        | 0.117  |
| gt-repeats Allel2            | -0.189                 | [-0.516, 0.137]        | 0.255  |
| Interaktion zw Allel1*Allel2 | 0.010                  | [-0.003, 0.023]        | 0.139  |

**Tabelle 7 Einflussgröße: (GT)n-repeats: betrachtet getrennt nach Allelen (d.h. Allel1, Allel2 und Interaktion zwischen beiden Allelen), so wird auch der Fall betrachtet: Maximum über beide Allele, da Allel 2=max(Allel1,Allel2) ist.**

In diesem Regressionsmodell ließ sich kein linearer Zusammenhang zwischen den Längen der Allele und der FMD nachweisen, der Regressionskoeffizient lag sehr nahe bei null, oder war sogar negativ. Die 95%-Konfidenzintervalle beinhalten in allen drei beobachteten Gruppen die Null und die p-Werte lagen bei  $> 0,05$ , d.h. die Ergebnisse waren nicht signifikant.

Um die Signifikanz der ermittelten Werte zu überprüfen wurde die Analyse nochmals verfeinert. Es wurde wieder mittels eines multivariaten Regressionsmodells der Zusammenhang zwischen den Allellängen und der FMD betrachtet. Als unabhängige Variablen dienten die Längen von Allel 1, die Längen von Allel 2 und die Interaktion von Allel 1 und Allel 2, Dieses Mal jedoch wurden die Quotienten dieser unabhängigen Variablen und der Standardabweichung gebildet. Durch diese Vorgehensweise können Unterschiede oder Zusammenhänge eher sichtbar gemacht werden im Rahmen der statistischen Auswertung. Es wird nicht die potentielle Änderung der FMD pro Einheit (GT)n-Repeats, sondern pro Standardabweichung der untersuchten Datenreihe dargestellt. Die Zuverlässigkeit der betrachteten Messwerte hängt von ihrer Streuung, gemessen an der

Standardabweichung, und dem Stichprobenumfang ab. Genauso wie oben, wurde das Regressionsmodell für die gleichen Störvariablen adjustiert.

| Variable                            | Regressionskoeffizient | 95%-Konfidenzintervall | p-Wert |
|-------------------------------------|------------------------|------------------------|--------|
| gt-repeats Allel1/stdabw            | -1.088                 | [-2.450, 0.274]        | 0.117  |
| gt-repeats Allel2/stdabw            | -0.595                 | [-1.621, 0.430]        | 0.255  |
| Interaktion zw Allel1*Allel2/stdabw | 1.493                  | [-0.486, 3.472]        | 0.139  |

**Tabelle 8 Ergebnisse der multivariaten linearen Regressionsanalyse, unter Miteinbeziehung der Standardabweichung.**

Die Werte der Regressionskoeffizienten, der zentralen Kennzahl zur Bewertung der Güte des Regressionsmodells, zeigten in dieser Auswertung auch keinen linearen Zusammenhang zwischen der Anzahl der Repeats und der FMD. Auch die Werte für das 95%-Konfidenzintervall und die p-Werte sprechen dafür, dass die gemessenen Werte nicht signifikant sind.

Da kein linearer Zusammenhang eindeutig nachweisbar war, wurde die Analyse angepasst. Betrachtet wurden nochmals der Zusammenhang zwischen den Längen von Allel 1, Allel 2, der Interaktion zwischen Allel 1 und Allel 2 und der FMD. Dieses Mal wurde jedoch der Quotient mit dem Quadrat der Standardabweichung gebildet, um einen nicht linearen, u-/parabelförmigen Zusammenhang nachzuweisen.

Auch hier erfolgte eine Anpassung durch Adjustierung für die gleichen Störvariablen, wie in den obigen Analysen.

| Variable                                                    | Regressionskoeffizient | 95%-Konfidenzintervall | p-Wert |
|-------------------------------------------------------------|------------------------|------------------------|--------|
| (gt-repeats Allel1/stdabw) <sup>2</sup>                     | -0.036                 | [-0.080, 0.008]        | 0.111  |
| (gt-repeats Allel2/stdabw) <sup>2</sup>                     | -0.009                 | [-0.036, 0.017]        | 0.485  |
| (Interaktion zw Allel1/stdabw * Allel2/stdabw) <sup>2</sup> | 0.707                  | [-0.249, 1.663]        | 0.147  |

**Tabelle 9 Ergebnisse des multivariaten Regressionsmodells zum Nachweis eines nicht-linearen Zusammenhangs zwischen Allellängen und FMD.**

Auch hier zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang.

Betrachtet wurde auch der Zusammenhang zwischen den Summen von Allel 1 und 2 und der FMD (gemessen in Prozent), mittels multivariatem Regressionsmodell und Erzeugung eines 95%-Konfidenzintervall und p-Wert. Auch hier zeigte sich keine Signifikanz, bei einem p= 0,229 (Tabelle 10):

| Variable                              | Regressionskoeffizient | 95%-Konfidenzintervall | p-Wert |
|---------------------------------------|------------------------|------------------------|--------|
| gt-repeats Allel1 + gt-repeats Allel2 | 0.015                  | [-0.010, 0.40]         | 0.229  |

**Tabelle 10 Ergebnisse des multivariaten Regressionsmodell und Erzeugung eines 95%-Konfidenzintervall und p-Wert zum Nachweis eines Zusammenhanges zwischen der Summe der Allele 1 und 2 und der FMD**

Ausgewertet wurde auch der Zusammenhang zwischen den häufigsten Längen der (GT)n-Repeats 23 und 30 und der FMD (Tabelle 11). Jedoch war auch hier kein signifikanter Zusammenhang nachweisbar.

| Variable                  | Regressionskoeffizient | 95%-Konfidenzintervall | p-Wert |
|---------------------------|------------------------|------------------------|--------|
| 30/30<br>(Referenz:23/23) | -0.200                 | [-0.902, 0.503]        | 0.577  |

Tabelle 11 Einflussgrösse (GT)n-Repeats 30/30 vs. 23/23.

Die Allele wurden ihrer Länge nach in Gruppen eingeteilt: short-short, short-long und long-long. Als short wurden alle Allele mit einer Anzahl von weniger als 27 Repeats eingeteilt, als long alle mit einer Länge über 27 Repeats. Der Cut-off-point in unseren Analysen lag bei 27.

Confounder/Adjustiervariablen waren die gleichen, wie in den vorangehenden Analysen. Auch hier zeigte sich keine linearer Zusammenhang und eine fehlende Signifikanz ( $p=0,550$ , Tabelle 12).

| Variable          | Regressionskoeffizient | 95%-Konfidenzintervall | p-Wert |
|-------------------|------------------------|------------------------|--------|
| Allel_kategorial* | 0.060                  | [-0.137, 0.257]        | 0.550  |

Tabelle 12 Zusammenhang zwischen Allelklassen und FMD.

Diese Analysen wurden an Messwerten des gesamten Patientenkollektivs durchgeführt. Um eventuell doch bestehende Zusammenhänge zu bestimmen, wurden Subgruppenanalysen durchgeführt.

Betrachtet wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen den (GT)n-Repeats, als Summe von Allel 1 und 2, und der FMD, bei Patienten aus dem Kollektiv mit einer Hypertonie ( $n= 2397$  Patienten) Nach Adjustierung für die oben eingeführten Störvariablen, zeigte sich im Regressionsmodell ein signifikanter Zusammenhang ( $p= 0,027$ , Tabelle 13).

| Variable                                 | Regressionskoeffizient | 95%-Konfidenzintervall | p-Wert       |
|------------------------------------------|------------------------|------------------------|--------------|
| gt-repeats Allel1 +<br>gt-repeats Allel2 | 0.036                  | [0.004, 0.068]         | <b>0.027</b> |

Tabelle 13 Interpretation: Die Ergebnisse lassen auf einen Zusammenhang zwischen (GT)n-Repeats und FMD bei Individuen mit arterieller Hypertonie schließen ( $p=0.027$ ). Pro steigende Einheit der Summe über beide Allele steigt das FMD im Mittel um 0.036 an.

Betrachtet wurde auch ein Zusammenhang zwischen den Längen der (GT)n-Repeats und der FMD bei GHS-Teilnehmern mit einer Koronaren Herzerkrankung ( $n= 216$ ).

GT-Repeats gingen als Summe (Allel1+Allel2) in die Analyse ein, die jedoch keinen signifikanten Zusammenhang zeigte.

| Variable                                 | Regressionskoeffizient | 95%-<br>Konfidenzintervall | p-Wert |
|------------------------------------------|------------------------|----------------------------|--------|
| gt-repeats Allel1 +<br>gt-repeats Allel2 | 0.058                  | [-0.056, 0.173]            | 0.318  |

**Tabelle 14 : Lineare Regressionsanalyse für den Zusammenhang zwischen Allellänge und FMD bei Studienteilnehmern mit KHK.**

Auch die Analyse eines möglichen Zusammenhangs bei kategorialer Betrachtung der Allelverteilung, durch Einteilung in Allelklassen anhand der Längen mit dem Cut-off-point bei 27 Repeats, erbrachte im Regressionsmodell keinen signifikanten Nachweis eines Zusammenhangs (Tabelle 15).

| Variable   | Regressionskoeffizient | 95%-Konfidenzintervall | p-Wert |
|------------|------------------------|------------------------|--------|
| short-long | -0.149                 | [-1.020, 2.659]        | 0.873  |
| long-long  | 0.820                  | [-1.979, 1.682]        | 0.382  |

**Tabelle 15 Regressionsanalyse mit Einflussgröße (GT)n-repeats aufgeteilt nach Klassen: short-short, short-long, long-long (Cut-off-point: 27).**

Auch bei GHS-Teilnehmern mit Diabetes (n=335) ließ sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Längen der Allele, die Summe von beiden Allelen in dieser Analyse, und FMD nachweisen (Tabelle 16).

| Variable                                 | Regressionskoeffizient | 95%-Konfidenzintervall | p-Wert |
|------------------------------------------|------------------------|------------------------|--------|
| gt-repeats Allel1 +<br>gt-repeats Allel2 | -0.013                 | [-0.289, 0.773]        | 0.773  |

**Tabelle 16 Lineare Regressionsanalyse: Einflussgröße Summe der GT-Repeats aus Allel 1 und 2 und abhängiger Variable FMD bei Diabetikern.**

Auch bei diesen Patienten fand sich in der kategorialen Betrachtung der Einflussgröße (GT)n-Repeats, durch Aufteilung in Allelklassen mit dem Cut-off-point bei 27 Repeats, bei p-Werten >0.05 kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Repeats-Längen und der FMD. (Tabelle 17)

| Variable   | Regressionskoeffizient | 95%-Konfidenzintervall | p-Wert |
|------------|------------------------|------------------------|--------|
| short-long | -0.987                 | [-1.417, 1.392]        | 0.158  |
| long-long  | -0.012                 | [-1.417, 1.392]        | 0.986  |

**Tabelle 17 Regressionsanalyse: Regressionsanalyse mit Einflussgröße (GT)n-repeats aufgeteilt nach Klassen: short-short, short-long, long-long (Cut-off-point: 27) bei Diabetikern.**

#### 4.4 Betrachtung des Zusammenhangs zwischen (GT)n-Allellängen und Bilirubin

Da die Messdaten für Bilirubin nicht normalverteilt waren wurden die Daten logarithmiert. Die abhängige Variable muss bei einer linearen Regressionsanalyse, wie sie hier auch wieder zum Nachweis eines Zusammenhangs durchgeführt wurde, stets normalverteilt sein. Die berechneten Effekte sind daher pro Einheit log(Bilirubin). Alle Analysen wurden auch hier für die gleichen Störvariablen adjustiert.

Es ließ sich auch hier kein Zusammenhang mit den Bilirubinwerten nachweisen, weder bei stetiger, noch kategorialer Betrachtung der (GT)n-Repeats.

Untersucht wurde auch hier der Zusammenhang zwischen den Allelen 1 und 2 getrennt, und der Interaktion zwischen beiden Allelen und den Bilirubinwerten.

Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang, bei p-Werten über 0,5. (Tabelle 18)

| Variable                     | Regressionskoeffizient | 95%-Konfidenzintervall | p-Wert |
|------------------------------|------------------------|------------------------|--------|
| gt-repeats Allel1            | -0.010                 | [-0.046, 0.027]        | 0.610  |
| gt-repeats Allel2            | -0.008                 | [-0.038, 0.022]        | 0.595  |
| Interaktion zw Allel1*Allel2 | 0.00001475             | [-0.001, 0.002]        | 0.521  |

**Tabelle 18 Ergebnisse des linearen Regressionsmodell zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Allellängen und Bilirubin.**

Um doch bestehende Zusammenhänge oder Unterschiede sichtbar zu machen, wurde für die Auswertung die Quotienten der Allellängen und der Standardabweichung gebildet, um so Änderungen pro Standardabweichung sichtbar zu machen. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang. (Tabelle 19)

| Variable                                    | Regressionskoeffizient | 95%-Konfidenzintervall | p-Wert |
|---------------------------------------------|------------------------|------------------------|--------|
| gt-repeats Allel1/stdabw                    | -0.033                 | [-0.158, 0.093]        | 0.610  |
| gt-repeats Allel2/stdabw                    | -0.026                 | [-0.120, 0.069]        | 0.595  |
| Interaktion zw Allel1/stdabw *Allel2/stdabw | 0.06                   | [-0.123, 0.242]        | 0.521  |

**Tabelle 19 Lineare Regressionsanalyse mit Einflussgröße (GT)n-Repeats, dividiert durch die Standardabweichung.**

Da kein linearer Zusammenhang eindeutig nachweisbar war, wurde die Analyse angepasst. Betrachtet wurden nochmals der Zusammenhang zwischen den Längen von Allel 1, Allel 2, der Interaktion zwischen Allel 1 und Allel 2 und Bilirubinwerten. Dieses Mal wurde jedoch der Quotient mit dem Quadrat der Standardabweichung gebildet, um einen nicht linearen, u-/parabelförmigen Zusammenhang nachzuweisen.

Jedoch zeigte sich auch hier kein signifikanter Zusammenhang.

| Variable                                                   | Regressionskoeffizient | 95%-Konfidenzintervall | p-Wert |
|------------------------------------------------------------|------------------------|------------------------|--------|
| (gt-repeats Allel1/stdabw) <sup>2</sup>                    | -0.001                 | [-0.005, 0.003]        | 0.709  |
| (gt-repeats Allel2/stdabw) <sup>2</sup>                    | -0.001                 | [-0.003, 0.003]        | 0.644  |
| (Interaktion zw Allel1/stdabw *Allel2/stdabw) <sup>2</sup> | 0.031                  | [-0.058, 0.119]        | 0.497  |

**Tabelle 20 Multivariates Regressionsmodell für den Nachweis eines nicht-linearen Zusammenhangs zwischen Allellängen und Bilirubin.**

Untersucht wurden auch Zusammenhänge der Summe beider Allele (Tabelle 17), der Allelpaae 30/30 und 23/23 (Tabelle 18), der häufigsten 120 (Tabelle 19) und der 200 (Tabelle 20) Allellängen in der

Studienpopulation, der Allellängen aufgeteilt in drei Allelklassen (Tabelle 21) und den gemessenen Bilirubinwerten. In allen Analysen zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang.

| Variable                                     | Regressionskoeffizient | 95%-Konfidenzintervall | p-Wert |
|----------------------------------------------|------------------------|------------------------|--------|
| gt-repeats<br>Allel1 + gt-<br>repeats Allel2 | 0.002                  | [0.000182, 0.004]      | 0.082  |

Tabelle 21 Lineare Regressionsanalyse mit der Einflussgröße: (GT)n-repeats: Summe über beiden Allele.

| Variable                  | Regressionskoeffizient | 95%-Konfidenzintervall | p-Wert |
|---------------------------|------------------------|------------------------|--------|
| 30/30<br>(Referenz:23/23) | 0.008                  | [-0.060, 0.076]        | 0.820  |

Tabelle 22 : Lineare Regressionsanalyse mit der Einflussgröße: (GT)n-repeats: 30/30 vs 23/23.

| Variable               | Regressionskoeffizient | 95%-Konfidenzintervall | p-Wert |
|------------------------|------------------------|------------------------|--------|
| Allel-Gruppen<br>(120) | 0.002                  | [-0.003, 0.007]        | 0.497  |

Tabelle 23 Lineare Regressionsanalyse mit der Einflussgröße: (GT)n-repeats: „Allel-Gruppen“ mit Häufigkeit  $\geq 120$ .

| Variable               | Regressionskoeffizient | 95%-Konfidenzintervall | p-Wert |
|------------------------|------------------------|------------------------|--------|
| Allel-Gruppen<br>(200) | -0.002                 | [-0.024, 0.019]        | 0.833  |

Tabelle 24 Lineare Regressionsanalyse mit der Einflussgröße: (GT)n-repeats: „Allel-Gruppen“ mit Häufigkeit  $\geq 200$ .

| Variable          | Regressionskoeffizient | 95%-Konfidenzintervall | p-Wert |
|-------------------|------------------------|------------------------|--------|
| Allel_kategorial* | 0.015                  | [-0.003, 0.031]        | 0.10   |

Tabelle 25 Lineares Regressionsmodell mit der Einflussgröße: (GT)n-repeats: short-short, short-long, long-long (Cut-off-point: 27).

Auch hier wurde eine Subgruppenanalyse durchgeführt, um einen Zusammenhang zwischen den Längen der (GT)n-Repeats und Bilirubin, einem Surrogatparameter für die Expression und Aktivität der HO-1, bei bestimmten Patientengruppen nachzuweisen.

Bei Teilnehmern mit einer Hypertonie (n= 2470) war ein Zusammenhang zwischen (GT)n-Repeats und Bilirubin nicht nachweisbar, weder bei stetiger (Tabelle 26), noch bei kategorialer Betrachtung der Einflussgröße (GT)n-Repeats, durch Aufteilung in Allelklassen.

| Variable                                 | Regressionskoeffizient | 95%-Konfidenzintervall | p-Wert |
|------------------------------------------|------------------------|------------------------|--------|
| gt-repeats Allel1 +<br>gt-repeats Allel2 | 0.002                  | [-0.001, 0.005]        | 0.172  |

Tabelle 26 Zusammenhang von Allellänge und Bilirubin bei Teilnehmern mit einer Hypertonie.

| Variable   | Regressionskoeffizient | 95%-Konfidenzintervall | p-Wert |
|------------|------------------------|------------------------|--------|
| short-long | 0.013                  | [-0.04, 0.066]         | 0.629  |
| long-long  | 0.023                  | [-0.030, 0.077]        | 0.392  |

Tabelle 27 Regressionsanalyse: Einflussgröße (GT)n-repeats aufgeteilt nach Klassen: short-short, short-long, long-long (Cut-off-point: 27) bei Teilnehmern mit Hypertonie.

Die Subgruppenanalyse der Teilnehmer mit einer koronaren Herzerkrankung (n=225) ergab bezüglich eines möglichen Zusammenhangs zwischen Längen der (GT)n-Repeats und Bilirubin auch keine signifikanten Werte ( $p > 0.05$ ).

Dies gilt bei stetiger (Tabelle 28) kategorialer Betrachtung der unabhängigen Variable (Tabelle 29).

| Variable                                 | Regressionskoeffizient | 95%-Konfidenzintervall | p-Wert |
|------------------------------------------|------------------------|------------------------|--------|
| gt-repeats Allel1 +<br>gt-repeats Allel2 | 0.002                  | [-0.009, 0.013]        | 0.710  |

Tabelle 28 Regressionsanalyse: Einflussgröße (GT)n-Repeats, als Summe von Allel1 und Allel 2) und Zusammenhang mit Bilirubin bei Teilnehmern mit KHK.

| Variable   | Regressionskoeffizient | 95%-Konfidenzintervall | p-Wert |
|------------|------------------------|------------------------|--------|
| short-long | -0.037                 | [-0.211, 0.136]        | 0.673  |
| long-long  | -0.026                 | [-0.202, 0.149]        | 0.769  |

Tabelle 29 Regressionsanalyse: Einflussgröße (GT)n-repeats aufgeteilt nach Klassen: short-short, short-long, long-long (Cut-off-point: 27) bei Teilnehmern mit KHK.

Als letztes wurden die Zusammenhänge zwischen (GT)n-Repeats und Bilirubin bei Teilnehmern mit Diabetes (n=350) untersucht. Auch hier ergab eine multivariate Regressionsanalyse keine signifikanten Werte ( $p > 0.05$ ). Dies gilt bei stetiger (Tabelle 30) kategorialer Betrachtung der unabhängigen Variable (Tabelle 31).

| Variable                                 | Regressionskoeffizient | 95%-Konfidenzintervall | p-Wert |
|------------------------------------------|------------------------|------------------------|--------|
| gt-repeats Allel1 +<br>gt-repeats Allel2 | 0.005                  | [-0.004, 0.014]        | 0.279  |

Tabelle 30 Regressionsanalyse: Einflussgröße (GT)n-Repeats, als Summe von Allel1 und Allel 2 und Zusammenhang mit Bilirubin bei Teilnehmern mit Diabetes.

| Variable   | Regressionskoeffizient | 95%-Konfidenzintervall | p-Wert |
|------------|------------------------|------------------------|--------|
| short-long | -0.007                 | [-0.143, 0.130]        | 0.923  |
| long-long  | 0.035                  | [-0.104, 0.174]        | 0.623  |

Tabelle 31 Regressionsanalyse: Einflussgröße (GT)n-repeats aufgeteilt nach Klassen: short-short, short-long, long-long (Cut-off-point: 27) bei Teilnehmern mit Diabetes.

## 5 Diskussion

Insgesamt wurden die Querschnitts-Daten und Allelfrequenzen von 4939 Studienteilnehmern aus dem A2-Unterkollektiv benutzt und in die statistische Auswertung miteinbezogen und eine mögliche Assoziation der (GT)n-Repeats mit dem Alter, Geschlecht, BMI, Bilirubin, FMD, Diabetes, Bluthochdruck, Rauchen, Dyslipidämie, Familienanamnee für Myokardinfarkt und Koronare

Herzerkrankung wurde analysiert. Bei der Betrachtung des Zusammenhanges zwischen den (GT)<sub>n</sub>-Repeats, als Summe von Allel 1 und 2, und der FMD, bei Patienten aus dem Kollektiv mit einer Hypertonie (n= 2397 Patienten) konnte ein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden. Die Existenz eines arteriellen Hypertonus scheint einen statistisch signifikanten Zusammenhang über die Länge des HMOX-1-Promotors auf die Endothelfunktion, für die die FMD als Surrogatparameter dient, zu haben. Bis auf die Subgruppe der Studienteilnehmer mit arteriellem Hypertonus lässt sich am Gesamtkollektiv kein Zusammenhang zwischen Genotyp und anderen kardiovaskulären Erkrankungen nachweisen.

## **5.1 Verteilung der Patientendaten und Studiendesign**

### **5.1.1 Datenverteilung und Studienaufbau in vergleichbaren Studien**

Um zu überprüfen, wie repräsentativ das im Rahmen dieser Arbeit ausgewertete Kollektiv von Patienten ist, wurden die Ergebnisse und die Verteilung von Schlüsseldaten mit der Datenverteilung in anderen Quellen und Studienkollektiven, in denen der Zusammenhang zwischen dem HO-1-Promotorpolymorphismus und kardiovaskulären Endpunkten bei Menschen untersucht wurde, verglichen.

In unserer statistischen Analyse mit einer bimodalen Verteilung der der Allel-Längen-Frequenzen wurden die Längen der (GT)<sub>n</sub>-Dinucleotid-Repeats mit der FMD oder Bilirubin, einem Surrogatparameter der HO-1-Aktivität, korreliert. In unserer Analyse konnte kein Zusammenhang zwischen den Längen der Repeats und der FMD gefunden werden. Da die FMD mit dem Geschlecht, Alter, BMI und Blutdruck assoziiert ist (112), analysierten wir die Subgruppen der Individuen mit einer arteriellen Hypertension, Diabetes mellitus und einer positiven Familiengeschichte für Koronare Herzerkrankung. Wir fanden nur in der Gruppe der Teilnehmer mit arterieller Hypertension eine grenzwertig signifikante Assoziation der Längen der HO-1-Promotorlängenpolymorphismen und der FMD (95% -KI: 0,0040-0,068; p= 0,027) nach multivariater Adjustierung.

Es gab keinen Zusammenhang zwischen den Längen der GT-Repeats und der FMD in der Subgruppe der Individuen mit einer KHK, oder bei Individuen mit Diabetes mellitus.

Wir fanden auch keinen Zusammenhang zwischen den Längen des (GT)<sub>n</sub>-Promotorpolymorphismus und den Serum-Bilirubin-Levels. Es bestand auch kein Zusammenhang zwischen dem Serum-Bilirubin und der FMD bei allen Studienteilnehmern. In der multivariaten Analyse zeigte sich kein Zusammenhang zwischen dem (GT)<sub>n</sub>-Längenpolymorphismus und den Bilirubin-Levels bei Individuen mit arterieller Hypertension, Diabetes oder KHK.

Insgesamt wurden zwischen den Jahren 2001 und 2013 20 Studien an Menschen durchgeführt, von denen lediglich in fünf kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Längen der (GT)<sub>n</sub>-Repeats und den gewählten primären Endpunkten aufgezeigt werden konnte. In den restlichen 15 Studien zeigte sich jedoch ein signifikanter Zusammenhang. Von den untersuchten Studienpopulationen

waren neun Populationen asiatische, in den restlichen wurden kaukasische Populationen untersucht, wie z.B. die Studienpopulation der GHS.

Meistens fand sich bei der Längenanalyse der HO-1-VNTR (variable number tandem Repeats) eine breite Streuung von 12 bis 44 Repeats, mit Peaks bei 23 und 30 Repeats in den meisten Populationen. Die häufigsten Allelkombinationen waren meist 30/30 oder 23/30. Diese Beobachtungen decken sich sehr gut mit der Allelverteilung in unserem GHS-Kollektiv. Die Verteilung der Allelfrequenzen aus einem deutschen, also kaukasischen Kollektiv einer Parkinson-Studie von Funke et. al. (113) stimmte auch sehr gut mit unseren Daten überein.

Als VNTR cut-off-point wurden in den meisten Studien Werte von 25 bis 27 gewählt, in unserem Design wurde 27 als cut-off-point gewählt.

Das Studiendesign war ganz unterschiedlich, neben Fall-Kontroll-Studien und Querschnittsstudien, erfolgten meist ein oder mehrere Follow-ups über eine Zeitspanne von weniger als einem Jahr. Die Studienpopulationen bestanden meist aus kleinen Gruppen von Patienten, die meist schon eine manifeste kardiovaskuläre Erkrankung aufwiesen, oder Symptome einer solchen zeigten und deswegen in Behandlung waren, wie beispielsweise eine Herzkatheteruntersuchung erhalten hatten, oder noch erhalten sollten. Die Größen der Studiengruppen waren deswegen entweder eher klein, mit weniger als 100 Teilnehmern, oder in wenigen Fällen große Gruppen mit bis zu 8000 Teilnehmern.

Chen et. al. (114) führten als einige der wenigen eine Fall-Kontroll-Studie mit Studienteilnehmern aus der Allgemeinbevölkerung durch, mit einer Anzahl von 4569 untersuchten Probanden. Das Studiendesign aller anderen Studien in diesem Zeitraum umfasste meist viel kleinere Populationen von einigen Hundert Teilnehmern aus einer Hochrisiko-Population. In diesen kleineren Studien an Hochrisiko-Patienten mit einer bereits bestehenden kardiovaskulären Erkrankung, oder Symptomatik konnte ein Zusammenhang zwischen den Längen der (GT)<sub>n</sub>-Repeats und den gewählten primären Endpunkt, wie Restenose nach PTCA, Herzinfarkt etc., beobachtet werden. (86) (50) (82) (115) Exner et. al. (86) versuchten eine Assoziation zwischen Restenosen nach femoropoplitealen transkutanen Angioplastien bei einer Kohorte von 69 pAVK-Patienten und der HO-1 herzustellen, welche durch die Ballonangioplastie und die dadurch verursachten Schäden induziert wird und die Bildung einer Neointima durch vermehrte Bildung von CO verhindert.

45% der Patienten aus der Kohorte waren Raucher, 77% hatten eine Hypercholesterinämie, 76% hatte eine arterielle Hypertension, 40% Störungen des Zuckerstoffwechsels oder Diabetes mellitus und fast die Hälfte der Patienten hatte begleitend Veränderungen und Erkrankungen der Koronararterien oder der Karotis.

Mindestens 82% der Patienten hatte eine Fortgeschrittene pAVK ab Stadium Fontaine IIb: Das Studienkollektiv war also auch hier ein Risikokollektiv. Sechs Monate nach Therapie und regelmäßigen Kontrollen nach der Intervention, zeigte sich bei 24% der Population eine Restenose oder ein Wiederverschluss des Gefäßes. Patienten mit einem kurzen (GT)<sub>n</sub>-Dinucleotidlängenpolymorphismus (<25 Repeats) auf mindestens einem Allel des HO-1-

Genpromotors hatten weniger oft eine Restenose. Bei Patienten mit längeren Allelen fand sich weitaus häufiger eine Restenose, ein Verschluss nach Angioplastie und längere Stenosenlänge.

Nach einer multivariaten Analyse der Daten zeigte sich ein signifikant erniedrigtes Restenose-Risiko für Patienten mit mindestens einem Allel mit kurzen (GT)<sub>n</sub>-Repeats des HO—Promotors, verglichen mit Patienten ohne kurze Allele (Odds-Ratio 0,2, 95%-KI: 0,06-0,70,  $p=0,007$ ). Der hierfür verantwortliche Mechanismus ist am Wahrscheinlichsten die Hochregulierung der HO-1-Aktivität, die die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen nach Verletzung des Gefäßes durch die Ballonangioplastie hemmt. Auch hier konnte bei einem kleinen Kollektiv mit einem hohen kardiovaskulären Risikoprofil ein Zusammenhang nachgewiesen werden.

In größeren Studienkollektiven sah das anders aus. In drei Studien, mit einer Populationsgröße von 1800 bis 3000 Teilnehmern, konnte im Gegensatz zu den kleineren Studiengruppen, kein Zusammenhang zwischen den Längen der Nucleotid-Repeats des HO-1-Promotors und den festgelegten primären Endpunkten Restenose (116) (117), oder KHK (118) nachgewiesen werden.

Die Studie von Pechlaner et. al. aus dem Jahr 2015 (95) ist eine der wenigen großen prospektiven Studien zu diesem Thema, die an der kaukasischen Allgemeinbevölkerung durchgeführt wurde, mit einer Populationsgröße von 7878 Teilnehmern. Auch hier wurden die Genotypen je nach der Länge der VNTR in Klassen von S bis L unterteilt. Auffällig war hier, dass 55% der Patienten mit einem L/L-Genotyp während der 15 Jahre lang durchgeführten Follow-ups kardiovaskuläre Erkrankungen entwickelten. Auch nach statistischer Adjustierung für Geschlecht und Alter, hatten Teilnehmer die homozygot waren und zwei sehr lange Allele (>32 Repeats) besaßen, im Vergleich zum Rest der Studienpopulation ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko.

In unserer Studie wurde unter anderem auch eine Unterteilung in Allelklassen nach Länge der VNTR vorgenommen, und statistisch ausgewertet, ob ein Zusammenhang zwischen dem Genotyp und Veränderungen der FMD oder dem gemessenen Bilirubinspiegel besteht. Es zeigte sich jedoch kein Zusammenhang in der Bewertung des gesamten A2-Kollektivs. Ähnlich negative Ergebnisse ergab eine andere Populationsbasierte Studie an einem kaukasischen Kollektiv. Endler et.al. (48) konnten im Rahmen einer österreichischen Studie mit 649 Teilnehmern keinen Zusammenhang nachweisen. Die Population setzte sich aus Patienten mit Z.n. Herzinfarkt, stabiler KHK und einer Kontrollgruppe ohne KHK zusammen. Träger von kürzeren Allelen (<25 (GT)<sub>n</sub>-Repeats) hatten höhere Bilirubin-Spiegel und ein besseres Lipidprofil verglichen mit Trägern längerer Allele. Jedoch hatte der Genotyp in dieser kaukasischen Studienpopulation keinen Zusammenhang mit dem Bestehen oder nicht Bestehen einer KHK. Die Genotyp/Allelfrequenzen-Verteilung unterschied sich nicht zwischen diesen drei Gruppen. Auch bei Risikountergruppen, wie Diabetikern, fand sich keine Assoziation zwischen dem HO-1-Genotyp und einer Koronaren Herzerkrankung.

Im Rahmen der GHS als ein prospektives langjährig angelegtes Projekt, konnte nur in den Subgruppenanalysen, nicht jedoch im Gesamtkollektiv des A2-Unterkollektivs ein Zusammenhang nachgewiesen werden.

Bei der Subgruppe der 2397 Teilnehmer mit Hypertonie zeigte sich ein Zusammenhang zwischen den Längen der HO-1-VNTR und der FMD, als Surrogatparameter der Gefäßfunktion.

Allerdings sind die von Pechlaner et.al. vorgestellten Daten Ergebnis einer 15 Jahre langen Untersuchung ihres Kollektivs. Die GHS läuft erst seit 2007, erste Follow-up Untersuchungen erfolgten erst Ende 2009/Anfang 2010. Es bleibt abzuwarten, inwieweit sich noch mit dem Fortschreiten oder der Neuentwicklung von pathologischen Veränderungen vielleicht Zusammenhänge nachweisen lassen. Anhand unserer Ergebnisse lässt sich am Gesamtkollektiv kein Zusammenhang zwischen Genotyp und Kardiovaskulären Erkrankungen nachweisen. Eine Datenerhebung und Auswertung nach zukünftigen Follow-ups könnte andere Ergebnisse erbringen.

Die Ergebnisse der Subgruppenanalyse, vor allem der hypertonen Studienteilnehmer, zeigte ganz ähnlich wie bei anderen Studiengruppen mit einem positiven kardiovaskulären Risikoprofil, einen Zusammenhang zwischen der Summe der Längen des polymorphen HO-1-Promotors und der Gefäßfunktion. Wir konnten keine bestimmte Allellänge als protektiven Cut-off-point bestimmen, aber in anderen Studien erwiesen sich vor allem kürzere Allellängen mit weniger als 25 (GT)n-Dinucleotid-Repeats als protektiv bei Risikopatienten mit einem erhöhten Level an oxidativem Stress.

Bei Patienten mit Risikofaktoren und einem erhöhten Level an vaskulären Schäden und oxidativem Stress reicht anscheinend ein geringes Defizit der HO-1 durch längere (GT)n-Dinucleotidpolymorphismen aus, um statistisch signifikante Zusammenhänge zu erzeugen. In den Kollektiven aus der Allgemeinbevölkerung ohne ein spezifisches Risikoprofil muss, wie im Kollektiv von Pechlaner et. al. (95), ein größeres Defizit bestehen, um statistisch signifikante Zusammenhänge zu erzeugen.

Die Betrachtung der Ergebnisse unserer Studie und von anderen kleineren oder größeren, legt nahe, dass die HO-1-Induktion vor allem bei Stresszuständen erhöht ist. Die Studie von Chen et. al. (80), veröffentlicht 2002, zeigte bereits, dass die Länge des Mikrosatelliten-Polymorphismus bei Patienten mit Typ 2 Diabetes assoziiert ist mit der Anfälligkeit für die Entwicklung einer Koronaren Herzerkrankung. Wie in der Einleitung bereits erläutert, sind Patienten mit Diabetes durch ihre Stoffwechselerkrankung einem höheren Level an oxidativem Stress ausgesetzt und entwickeln im Laufe ihrer Erkrankung Mikro- und Makrovaskuläre Folgeerkrankungen. Die Ergebnisse unserer Studie zeigen auch nur Zusammenhänge bei Patienten mit Hypertonie, also bei einer Risikogruppe, die ein höheres Maß an endothelialer Dysfunktion und oxidativem Stress aufweist.

Diese Zusammenhänge bei Risikogruppen wiesen auch Kaneda et. al. (87) bei japanischen Studienteilnehmern mit kardiovaskulären Risikofaktoren nach. In dieser Studie wurden die Allelfrequenzen bei 577 Patienten, die eine Koronarangiografie erhalten untersucht. Die Allelfrequenzen in dieser Studienpopulation unterschieden sich nicht von denen der japanischen Allgemeinbevölkerung, jedoch fand sich eine positive Korrelation zwischen dem Längenpolymorphismus des HO-1-Promotors und dem Vorkommen einer KHK bei Individuen, die rauchen, Diabetiker sind oder eine Hypercholesterinämie haben. Die Tatsache, dass in klinischen Studien meistens ein Zusammenhang zwischen HO-1-VNTR-Längen und vaskulären Endpunkten nur bei Hochrisiko-Subgruppen gefunden werden konnte, übereinstimmt mit den Ergebnissen unserer

Untersuchung und denen von anderen Studien, wie die oben erwähnte von Chen et. al. (50) und Yamada et.al (73)., die bei Rauchern mit längeren VNTR ein häufigeres Auftreten von Lungenemphysemen dokumentieren konnten.

Yamada et.al. stellten fest, dass die individuelle HO-1-Antwort genetisch durch den (GT)<sub>n</sub>-Repeatpolymorphismus in der Promotorregion des HO-1-Gens bestimmt wird. In vitro zeigte sich bei kürzeren Allelen (<25 Repeats) eine höhere HO-1-Expression als Antwort auf oxidativen Stress, als bei Trägern von längeren Allelen. Um den Einfluss der Länge des HO-1-Promotors auf die Genexpression der HO-1 zu bestimmen wurden Zellen oxidativem Stress ausgesetzt, im Rahmen eines Transient-Transfection Assays. Eine signifikante Induktion des HO-1 Promotor/Luciferase Fusionsgens durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konnte nur bei Fusionsgenen mit einer Länge von <20 Repeats gemessen werden. Bei Fusionsgenen mit einer GT-Repeat-Länge von >29 Repeats zeigte sich keine gesteigerte HO-1-Expression bei H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- Exposition. Die basale Genexpression war bei (GT)<sub>n</sub>-Dinucleotid-Repeats mit Längen von < 20 Wiederholungen 2,5 Mal höher als bei Fusionsgenen mit einer Promotor-Repeat-Länge > 29 Wiederholungen. Durch die geringere Expression des zellprotektiv und antioxidativ wirkenden HO-1 sind die Zellen und dementsprechend die Individuen mit kürzeren HO-1-Promotors weniger geschützt vor oxidativem Stress und seinen Folgeschäden.

Diese Ergebnisse könnten erklären, weshalb in der Studie Raucher mit COPD und kürzeren Promotorlängenpolymorphismen weitaus weniger oft Lungenemphyseme aufwiesen, als Raucher mit COPD und längeren Längenpolymorphismen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der (GT)<sub>n</sub>-Dinucleotidpolymorphismus des HO-1-Promotors sowohl die basale Expression der HO-1, als auch durch Stimuli moduliert.

Es besteht wohl ein starker Zusammenhang zwischen der HO-1-Proteinexpression und der Länge des HO-1-Promotor-Längenpolymorphismus, vor allem bei Vorhandensein von Risikofaktoren und Bestehen von kardiovaskulären Erkrankungen. Diese Abhängigkeit und ihre Auswirkung auf die HO-1-Genexpression wurde bis jetzt in erster Linie an Zellen erforscht (119). Im Zellversuch nahmen die Expression und die Produktion von HO-1-Protein im Normalzustand und unter Einfluss von oxidativem Stress, parallel zum Anstieg der VNTR-Längen ab.

Die Verhinderung einer Restenose nach Ballonangioplastie, oder nach einer Herzkatheter-Intervention kann nicht nur durch die Aktivität der HO-1 und ihre stärkere Hochregulierung bei Patienten mit kürzeren Allelen erklärt werden. Diese Krankheitsprozesse und Reparaturprozesse im Körper unterliegen einem multifaktoriellen Geschehen. Der Längenpolymorphismus des HO-1-Genpromotors spielt darin nur eine der entscheidenden Rollen. Außerdem kann ein Einfluss von anderen genetischen Variationen an einem anderen Ort als dem 5'-Ende des HO-1-Promotors nicht ausgeschlossen werden. Der Aufbau des Promotors muss zum besseren Verständnis seiner Funktion noch eingehender untersucht werden. Es müssen mehr langfristig angelegte, prospektive Studien mit großen Teilnehmerkollektiven aus der Allgemeinbevölkerung und Risikogruppen untersucht werden, um die Bedeutung des Längenpolymorphismus ausreichend zu erfassen.

In den bisher durchgeführten Studien ergaben sich auch Unterschiede zwischen ethnischen Gruppen. Zum Beispiel fanden Endler et.al. (48) in einer kaukasischen Population keine Zusammenhänge zwischen kardiovaskulären Erkrankungen und den HO-1-Genotyp, in chinesischen (50) oder Japanischen Studienpopulationen (87) fand sich eine deutliche Assoziation. Um diese Unterschiede zu verstehen, werden neben Untersuchungen zum Aufbau und der Funktion des Promotorpolymorphismus vermehrt Vergleichsstudien und auch internationale Studien benötigt.

### 5.1.2 Schlussfolgerung und Ausblick auf zukünftige Forschungsziele

Die Genexpression und ihre Induktion, also welche Faktoren genau eine Rolle spielen bei der Induktion der HO-1, muss in Zukunft auch besser erforscht werden, um die Regulationsmechanismen der HO-1 besser zu entschlüsseln und Pathologien beziehungsweise Änderungen dieser Regulationsmechanismen im Hinblick auf die Entstehung von Krankheiten besser zu verstehen.

Dazu könnte, wie bereits im Zell- und auch Tiermodell geschehen, die HO-1-mRNA auf ihre Basalexpression und Expression als Reaktion auf verschiedene Stimuli, in Studienkollektiven, die sich durch ihre ethnische Herkunft, oder unterschiedliche Risikoprofile oder Vorerkrankungen unterscheiden, betrachtet werden. Die Gewinnung und auch Messung der HO-1-mRNA kann aus unterschiedlichen Geweben und Zelltypen geschehen, um auch einen Blick auf die Bedeutung und Zusammenhänge zwischen der HO-1-Promotor gesteuerten Genexpression von HO-1 und den Auswirkungen auf Zellen und Gewebetypen zu bestimmen, die an pathologischen krankheitsverursachenden Prozessen im Körper beteiligt sind, vor allem im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen.

Durchaus sinnvoll wäre die Untersuchung kleinerer Gruppen, wie zum Beispiel von Studiensubgruppen mit Risikofaktoren oder Erkrankungen. Dazu bietet sich im Rahmen unseres Studienkollektivs die Gruppe der Teilnehmer mit arterieller Hypertonie an. Man könnte bei diesen Individuen verschiedene Gewebe-und Zelltypen, die eine Rolle in der Pathogenese der Arteriosklerose und daraus resultierendem Bluthochdruck spielen, auf ihre Genexpression untersuchen. Dafür wäre eine Gewinnung von HO-1-mRNA aus Phagozyten (Monozyten, Neutrophilen) sinnvoll. Diese Zellen spielen im Rahmen der Entzündungsprozesse des Gefäßsystems und der Arteriosklerose eine wichtige Rolle. Eine Korrelation mit der gemessenen FMD als Surrogatparameter der intakten Endothel- und Gefäßfunktion, oder anderen wichtigen Werten könnte vorgenommen werden. Eine solche Untersuchung kann wichtige Einblicke in die Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen und die Funktionsweise und Auswirkungen des (GT)n-Dinucleotidlängenpolymorphismus des HO-1-Promotors liefern.

Auch die Betrachtung der Genexpression in Abhängigkeit der Länge des Promotors bei Patienten, die eine medikamentöse Behandlung erhalten, könnte Hinweise zum genaueren Verständnis der Wirkweise von diesen Medikamenten liefern. Für viele der bei kardiovaskulären Erkrankungen eingesetzten Medikamente, lässt sich deren positive Wirkung nicht nur durch deren primäre Wirkung an Rezeptoren etc. erklären.

Eine Betrachtung der Genexpression und Messung der HO-1-mRNA erscheint aus diesen Gründen sinnvoll und wäre der nächste Schritt in der Forschung zur Bedeutung der HO-1 für kardiovaskuläre Erkrankungen im Rahmen der GHS.

## 6 Zusammenfassung

Für unsere Untersuchungen wurde DNA des ca. 5000 Probanden umfassenden A2-Unterkollektivs der GHS benutzt. Für die Analyse des HOMX1-Promotor – (GT) $n$  - Repeat-Längenpolymorphismus wurden DNA-Proben mittels Polymerase Chain Reaction (PCR) vermehrt. Hierfür wurde ein mit Fluoreszenzfarbstoff markierter Forward – Primer *und ein* Backward-Primer *zur* Amplifizierung der Zielsequenzen verwendet, die in ihrer Basensequenz den gesuchten Sequenzen entsprechen. Die Längen der Microsatelliten-DNA wurden mit Hilfe eines Kapillarsequencers bestimmt. Die Ergebnisse des Sequencers wurden durch ein Programm und optisch ausgewertet. Dabei war in der Verteilung der Allele die Kombination 23/30 die häufigste Lage der untersuchten (GT) $n$ -Dinucleotidrepeats. In Signifikanztests waren die ausgewerteten Daten mit signifikanten p-Werten  $<0,05$  im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

In der statistischen Analyse der bimodalen Verteilung der Allel-Längen-Frequenzen wurden die Längen der (GT) $n$ -Dinucleotid-Repeats mit der FMD oder Serumspiegeln des Bilirubin, einem Surrogatparameter der HO-1-Aktivität, korreliert. In unserer Analyse konnte kein Zusammenhang zwischen den Längen der Repeats und der FMD gefunden werden. Wir analysierten die Subgruppen der Individuen mit einer arteriellen Hypertension, Diabetes mellitus und einer positiven Familiengeschichte für Koronare Herzerkrankung. Nur in der Gruppe der Teilnehmer mit arterieller Hypertension fand sich eine grenzwertig signifikante Assoziation der Längen der HO-1-Promoterlängenpolymorphismen und der FMD (95% -KI: 0,0040-0,068;  $p=0,027$ ) nach multivariater Adjustierung, woraus sich ableiten lässt dass der Längenpolymorphismus in der Promoterregion des HMOX-1 Gens in der GHS in der Untergruppe der Hypertoniker signifikant mit FMD assoziiert.

Die Ergebnisse der Subgruppenanalyse, vor allem der hypertonen Studienteilnehmer, zeigte ganz ähnlich wie bei anderen kleineren Studiengruppen (siehe Diskussion) mit einem positiven kardiovaskulären Risikoprofil, einen Zusammenhang zwischen der Summe der Längen des polymorphen HO-1-Promotors und der Gefäßfunktion. Wie in anderen kleineren Studienkollektiven erwiesen sich vor allem kürzere Allellängen mit weniger als 25 (GT) $n$ -Dinucleotid-Repeats als protektiv bei Risikopatienten mit einem erhöhten Level an oxidativem Stress.

Bei Patienten mit Risikofaktoren und einem erhöhten Level an vaskulären Schäden und oxidativem Stress reicht anscheinend eine geringes Defizit der HO-1 durch längere (GT) $n$ -Dinucleotidpolymorphismen aus, um statistisch signifikante Zusammenhänge zu erzeugen. In den

Kollektiven aus der Allgemeinbevölkerung ohne ein spezifisches Risikoprofil muss, ein größeres Defizit bestehen, um statistisch signifikante Zusammenhänge zu erzeugen.

Die GHS läuft erst seit 2007, es bleibt abzuwarten, inwieweit sich noch mit dem Fortschreiten oder der Neuentwicklung von pathologischen Veränderungen in Zukunft Zusammenhänge nachweisen lassen. Anhand unserer Ergebnisse lässt sich am Gesamtkollektiv kein Zusammenhang zwischen Genotyp und Kardiovaskulären Erkrankungen nachweisen. Eine Datenerhebung und Auswertung nach zukünftigen Follow-ups könnte neue Ergebnisse erbringen.

Der Nachweis von Faktoren die bei der Induktion der HO-1 eine wichtige Rolle spielen, könnte ein Forschungsziel für zukünftige Studien sein, um die Regulationsmechanismen der HO-1 besser zu verstehen und Änderungen dieser Mechanismen im Rahmen der Pathogenese von Krankheiten besser zu verstehen und daraus zukünftig auch spezifische Therapieansätze abzuleiten.

## 7 Literaturverzeichnis

1. WHO. World Health Organization. Facts about non communicable diseases WHO report [updated März 2013]. Available from: [http://www.who.int/features/factfiles/noncommunicable\\_diseases/en/](http://www.who.int/features/factfiles/noncommunicable_diseases/en/).
2. WHO. Global status report on noncommunicable diseases 2010. Description of the global burden of NCDs, their risk factors and determinants. 2011. Available from: [http://www.who.int/nmh/publications/ncd\\_report2010/en/](http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report2010/en/).
3. Zahra A, Lee EW, Sun LY, Park JH. Cardiovascular disease and diabetes mortality, and their relation to socio-economical, environmental, and health behavioural factors in worldwide view. *Public health*. 2015;129(4):385-95.
4. Mendis S. The Contribution of the Framingham Heart Study to the Prevention of Cardiovascular Disease: A Global Perspective. *Progress in Cardiovascular Diseases*. 2010;53(1):10-4.
5. Kannel WB, Dawber TR, Kagan A, Revotskie N, Stokes J, 3rd. Factors of risk in the development of coronary heart disease--six year follow-up experience. The Framingham Study. *Ann Intern Med*. 1961;55:33-50.
6. Andresdottir MB, Sigurdsson G, Sigvaldason H, Gudnason V, Reykjavik Cohort S. Fifteen percent of myocardial infarctions and coronary revascularizations explained by family history unrelated to conventional risk factors. The Reykjavik Cohort Study. *European heart journal*. 2002;23(21):1655-63.
7. Parikh NI, Hwang SJ, Larson MG, Cupples LA, Fox CS, Manders ES, et al. Parental occurrence of premature cardiovascular disease predicts increased coronary artery and abdominal aortic calcification in the Framingham Offspring and Third Generation cohorts. *Circulation*. 2007;116(13):1473-81.
8. Haynes SG, Feinleib M. Women, work and coronary heart disease: prospective findings from the Framingham heart study. *Am J Public Health*. 1980;70(2):133-41.
9. Keys A. Wine, garlic, and CHD in seven countries. *Lancet*. 1980;1(8160):145-6.
10. Tunstall-Pedoe H. MONICA's quarter century. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2003;10(6):409-10.
11. World Health O. The World Health report 2002. Midwifery. 2003;19(1):72-3.
12. Danaei G, Singh GM, Paciorek CJ, Lin JK, Cowan MJ, Finucane MM, et al. The global cardiovascular risk transition: associations of four metabolic risk factors with national income, urbanization, and Western diet in 1980 and 2008. *Circulation*. 2013;127(14):1493-502, 502e1-8.
13. Behrendt D, Ganz P. Endothelial function. From vascular biology to clinical applications. *The American journal of cardiology*. 2002;90(10C):40L-8L.
14. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288(5789):373-6.
15. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987;84(24):9265-9.
16. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988;333(6174):664-6.
17. Gauthier TW, Scalia R, Murohara T, Guo JP, Lefer AM. Nitric oxide protects against leukocyte-endothelium interactions in the early stages of hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1995;15(10):1652-9.
18. Cornwell TL, Arnold E, Boerth NJ, Lincoln TM. Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. *Am J Physiol*. 1994;267(5 Pt 1):C1405-13.
19. de Graaf JC, Banga JD, Moncada S, Palmer RM, de Groot PG, Sixma JJ. Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions. *Circulation*. 1992;85(6):2284-90.
20. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J*. 1999;138(5 Pt 2):S419-20.

21. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. 1986;315(17):1046-51.
22. Vita JA, Treasure CB, Nabel EG, McLenachan JM, Fish RD, Yeung AC, et al. Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. *Circulation*. 1990;81(2):491-7.
23. Raitakari OT, Celermajer DS. Flow-mediated dilatation. *Br J Clin Pharmacol*. 2000;50(5):397-404.
24. Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, et al. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*. 1995;91(5):1314-9.
25. Takase B, Uehata A, Akima T, Nagai T, Nishioka T, Hamabe A, et al. Endothelium-dependent flow-mediated vasodilation in coronary and brachial arteries in suspected coronary artery disease. *The American journal of cardiology*. 1998;82(12):1535-9, A7-8.
26. Neunteufl T, Katzenschlager R, Hassan A, Klaar U, Schwarzbacher S, Glogar D, et al. Systemic endothelial dysfunction is related to the extent and severity of coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 1997;129(1):111-8.
27. Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation*. 2000;101(16):1899-906.
28. Neunteufl T, Heher S, Katzenschlager R, Wolf G, Kostner K, Maurer G, et al. Late prognostic value of flow-mediated dilation in the brachial artery of patients with chest pain. *The American journal of cardiology*. 2000;86(2):207-10.
29. Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, Robinson J, Deanfield JE. Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. *Journal of the American College of Cardiology*. 1994;24(6):1468-74.
30. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*. 1992;340(8828):1111-5.
31. Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*. 1986;320(6061):454-6.
32. Guzik TJ, West NE, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, et al. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circulation research*. 2000;86(9):E85-90.
33. Landmesser U, Merten R, Spiekermann S, Buttner K, Drexler H, Hornig B. Vascular extracellular superoxide dismutase activity in patients with coronary artery disease: relation to endothelium-dependent vasodilation. *Circulation*. 2000;101(19):2264-70.
34. Uematsu M, Ohara Y, Navas JP, Nishida K, Murphy TJ, Alexander RW, et al. Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am J Physiol*. 1995;269(6 Pt 1):C1371-8.
35. Hirata K, Miki N, Kuroda Y, Sakoda T, Kawashima S, Yokoyama M. Low concentration of oxidized low-density lipoprotein and lysophosphatidylcholine upregulate constitutive nitric oxide synthase mRNA expression in bovine aortic endothelial cells. *Circulation research*. 1995;76(6):958-62.
36. Inoue N, Venema RC, Sayegh HS, Ohara Y, Murphy TJ, Harrison DG. Molecular regulation of the bovine endothelial cell nitric oxide synthase by transforming growth factor-beta 1. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1995;15(8):1255-61.
37. Yoshizumi M, Perrella MA, Burnett JC, Jr., Lee ME. Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circulation research*. 1993;73(1):205-9.
38. Garcia-Cardena G, Martasek P, Masters BS, Skidd PM, Couet J, Li S, et al. Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(41):25437-40.

39. Feron O, Dessy C, Moniotte S, Desager JP, Balligand JL. Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase. *The Journal of clinical investigation*. 1999;103(6):897-905.
40. Pou S, Pou WS, Bredt DS, Snyder SH, Rosen GM. Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(34):24173-6.
41. Harrison DG, Armstrong ML, Freiman PC, Heistad DD. Restoration of endothelium-dependent relaxation by dietary treatment of atherosclerosis. *The Journal of clinical investigation*. 1987;80(6):1808-11.
42. Leung WH, Lau CP, Wong CK. Beneficial effect of cholesterol-lowering therapy on coronary endothelium-dependent relaxation in hypercholesterolaemic patients. *Lancet*. 1993;341(8859):1496-500.
43. Tamai O, Matsuoka H, Itabe H, Wada Y, Kohno K, Imaizumi T. Single LDL apheresis improves endothelium-dependent vasodilatation in hypercholesterolemic humans. *Circulation*. 1997;95(1):76-82.
44. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation*. 1998;97(12):1129-35.
45. Wilson SH, Simari RD, Best PJ, Peterson TE, Lerman LO, Aviram M, et al. Simvastatin preserves coronary endothelial function in hypercholesterolemia in the absence of lipid lowering. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2001;21(1):122-8.
46. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation research*. 1994;74(6):1141-8.
47. Mancini GB, Henry GC, Macaya C, O'Neill BJ, Pucillo AL, Carere RG, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. The TREND (Trial on Reversing ENdothelial Dysfunction) Study. *Circulation*. 1996;94(3):258-65.
48. Endler G, Exner M, Schillinger M, Marculescu R, Sunder-Plassmann R, Raith M, et al. A microsatellite polymorphism in the heme oxygenase – 1 gene promoter is associated with increased bilirubin and HDL levels but not with coronary artery disease. *Thrombosis and Haemostasis*. 2003.
49. Exner M, Minar E, Wagner O, Schillinger M. The role of heme oxygenase-1 promoter polymorphisms in human disease. *Free radical biology & medicine*. 2004;37(8):1097-104.
50. Chen YH, Lin SJ, Lin MW, Tsai HL, Kuo SS, Chen JW, et al. Microsatellite polymorphism in promoter of heme oxygenase-1 gene is associated with susceptibility to coronary artery disease in type 2 diabetic patients. *Human genetics*. 2002;111(1):1-8.
51. Yachie A, Niida Y, Wada T, Igarashi N, Kaneda H, Toma T, et al. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *The Journal of clinical investigation*. 1999;103(1):129-35.
52. Schmidt HH, Lohmann SM, Walter U. The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta*. 1993;1178(2):153-75.
53. Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1997;37:517-54.
54. Brune B, Ullrich V. Inhibition of platelet aggregation by carbon monoxide is mediated by activation of guanylate cyclase. *Molecular pharmacology*. 1987;32(4):497-504.
55. Yamaguchi T, Horio F, Hashizume T, Tanaka M, Ikeda S, Kakinuma A, et al. Bilirubin is oxidized in rats treated with endotoxin and acts as a physiological antioxidant synergistically with ascorbic acid in vivo. *Biochemical and biophysical research communications*. 1995;214(1):11-9.
56. Neuzil J, Stocker R. Free and albumin-bound bilirubin are efficient co-antioxidants for alpha-tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(24):16712-9.
57. Amit Y, Boneh A. Bilirubin inhibits protein kinase C activity and protein kinase C-mediated phosphorylation of endogenous substrates in human skin fibroblasts. *Clin Chim Acta*. 1993;223(1-2):103-11.

58. Schwertner HA, Jackson WG, Tolan G. Association of low serum concentration of bilirubin with increased risk of coronary artery disease. *Clinical chemistry*. 1994;40(1):18-23.
59. Sieg A, Arab L, Schlierf G, Stiehl A, Kommerell B. [Prevalence of Gilbert's syndrome in Germany]. *Deutsche medizinische Wochenschrift*. 1987;112(31-32):1206-8.
60. Inoguchi T, Sasaki S, Kobayashi K, Takayanagi R, Yamada T. Relationship between Gilbert syndrome and prevalence of vascular complications in patients with diabetes. *Jama*. 2007;298(12):1398-400.
61. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. *Circulation*. 1998;97(22):2222-9.
62. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circulation research*. 2000;87(10):840-4.
63. Reckelhoff JF, Romero JC. Role of oxidative stress in angiotensin-induced hypertension. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2003;284(4):R893-912.
64. Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griendling KK, et al. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *The Journal of clinical investigation*. 1996;97(8):1916-23.
65. Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*. 2009;73(3):411-8.
66. Lanone S, Bloc S, Foresti R, Almolki A, Taille C, Callebort J, et al. Bilirubin decreases nos2 expression via inhibition of NAD(P)H oxidase: implications for protection against endotoxic shock in rats. *FASEB J*. 2005;19(13):1890-2.
67. Perlstein TS, Pande RL, Beckman JA, Creager MA. Serum total bilirubin level and prevalent lower-extremity peripheral arterial disease: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999 to 2004. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2008;28(1):166-72.
68. Vitek L, Jirsa M, Brodanova M, Kalab M, Marecek Z, Danzig V, et al. Gilbert syndrome and ischemic heart disease: a protective effect of elevated bilirubin levels. *Atherosclerosis*. 2002;160(2):449-56.
69. Maines MD, Kappas A. Prematurely evoked synthesis and induction of delta-aminolevulinate synthetase in neonatal liver. Evidence for metal ion repression of enzyme formation. *The Journal of biological chemistry*. 1978;253(7):2321-6.
70. Vogt BA, Alam J, Croatt AJ, Vercellotti GM, Nath KA. Acquired-Resistance to Acute Oxidative Stress - Possible Role of Heme Oxygenase and Ferritin. *Lab Invest*. 1995;72(4):474-83.
71. Kutty RK, Kutty G, Rodriguez IR, Chader GJ, Wiggert B. Chromosomal localization of the human heme oxygenase genes: heme oxygenase-1 (HMOX1) maps to chromosome 22q12 and heme oxygenase-2 (HMOX2) maps to chromosome 16p13.3. *Genomics*. 1994;20(3):513-6.
72. Ono K, Mannami T, Iwai N. Association of a promoter variant of the haeme oxygenase-1 gene with hypertension in women. *J Hypertens*. 2003;21(8):1497-503.
73. Yamada N, Yamaya M, Okinaga S, Nakayama K, Sekizawa K, Shibahara S, et al. Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to emphysema. *Am J Hum Genet*. 2000;66(1):187-95.
74. Kimpara T, Takeda A, Watanabe K, Itoyama Y, Ikawa S, Watanabe M, et al. Microsatellite polymorphism in the human heme oxygenase-1 gene promoter and its application in association studies with Alzheimer and Parkinson disease. *Human genetics*. 1997;100(1):145-7.
75. Ono K, Goto Y, Takagi S, Baba S, Tago N, Nonogi H, et al. A promoter variant of the heme oxygenase-1 gene may reduce the incidence of ischemic heart disease in Japanese. *Atherosclerosis*. 2004;173(2):315-9.
76. Naylor LH, Clark EM. d(TG)n.d(CA)n sequences upstream of the rat prolactin gene form Z-DNA and inhibit gene transcription. *Nucleic Acids Res*. 1990;18(6):1595-601.

77. Delic J, Onclercq R, Moisan-Coppey M. Inhibition and enhancement of eukaryotic gene expression by potential non-B DNA sequences. *Biochemical and biophysical research communications*. 1991;181(2):818-26.
78. Alam J, Camhi S, Choi AM. Identification of a second region upstream of the mouse heme oxygenase-1 gene that functions as a basal level and inducer-dependent transcription enhancer. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(20):11977-84.
79. Lu TH, Pepe JA, Gildemeister OS, Tyrrell RM, Bonkovsky HL. Regulation of expression of the human heme oxygenase-1 gene in transfected chick embryo liver cell cultures. *Biochim Biophys Acta*. 1997;1352(3):293-302.
80. Chen YH, Chau LY, Lin MW, Chen LC, Yo MH, Chen JW, et al. Heme oxygenase-1 gene promotor microsatellite polymorphism is associated with angiographic restenosis after coronary stenting. *European heart journal*. 2004;25(1):39-47.
81. Baan C, Peeters A, Lemos F, Uitterlinden A, Doxiadis I, Claas F, et al. Fundamental role for HO-1 in the self-protection of renal allografts. *Am J Transplant*. 2004;4(5):811-8.
82. Schillinger M, Exner M, Mlekusch W, Ahmadi R, Rumpold H, Mannhalter C, et al. Heme oxygenase-1 genotype is a vascular anti-inflammatory factor following balloon angioplasty. *Journal of endovascular therapy : an official journal of the International Society of Endovascular Specialists*. 2002;9(4):385-94.
83. Exner M, Bohmig GA, Schillinger M, Regele H, Watschinger B, Horl WH, et al. Donor heme oxygenase-1 genotype is associated with renal allograft function. *Transplantation*. 2004;77(4):538-42.
84. Hirai H, Kubo H, Yamaya M, Nakayama K, Numasaki M, Kobayashi S, et al. Microsatellite polymorphism in heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to oxidant-induced apoptosis in lymphoblastoid cell lines. *Blood*. 2003;102(5):1619-21.
85. Paredi P, Biernacki W, Invernizzi G, Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled carbon monoxide levels elevated in diabetes and correlated with glucose concentration in blood: a new test for monitoring the disease? *Chest*. 1999;116(4):1007-11.
86. Exner M, Schillinger M, Minar E, Mlekusch W, Schlerka G, Haumer M, et al. Heme oxygenase-1 gene promoter microsatellite polymorphism is associated with restenosis after percutaneous transluminal angioplasty. *Journal of endovascular therapy : an official journal of the International Society of Endovascular Specialists*. 2001;8(5):433-40.
87. Kaneda H. Heme Oxygenase-1 Gene Promoter Polymorphism Is Associated With Coronary Artery Disease in Japanese Patients With Coronary Risk Factors. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2002;22(10):1680-5.
88. Cox DA, Cohen ML. Effects of oxidized low-density lipoprotein on vascular contraction and relaxation: clinical and pharmacological implications in atherosclerosis. *Pharmacological reviews*. 1996;48(1):3-19.
89. Parhami F, Fang ZT, Fogelman AM, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA. Minimally modified low density lipoprotein-induced inflammatory responses in endothelial cells are mediated by cyclic adenosine monophosphate. *The Journal of clinical investigation*. 1993;92(1):471-8.
90. Tanner FC, Noll G, Boulanger CM, Luscher TF. Oxidized low density lipoproteins inhibit relaxations of porcine coronary arteries. Role of scavenger receptor and endothelium-derived nitric oxide. *Circulation*. 1991;83(6):2012-20.
91. Malden LT, Chait A, Raines EW, Ross R. The influence of oxidatively modified low density lipoproteins on expression of platelet-derived growth factor by human monocyte-derived macrophages. *The Journal of biological chemistry*. 1991;266(21):13901-7.
92. Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes*. 1999;48(1):1-9.
93. Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, Shyr Y, et al. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. *N Engl J Med*. 1995;332(18):1198-203.
94. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, et al. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation*. 1995;91(9):2488-96.

95. Pechlaner R, Willeit P, Summerer M, Santer P, Egger G, Kronenberg F, et al. Heme oxygenase-1 gene promoter microsatellite polymorphism is associated with progressive atherosclerosis and incident cardiovascular disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2015;35(1):229-36.
96. Ishikawa K, Sugawara D, Wang X, Suzuki K, Itabe H, Maruyama Y, et al. Heme oxygenase-1 inhibits atherosclerotic lesion formation in *ldl*-receptor knockout mice. *Circulation research*. 2001;88(5):506-12.
97. Tulis DA, Durante W, Peyton KJ, Evans AJ, Schafer AI. Heme oxygenase-1 attenuates vascular remodeling following balloon injury in rat carotid arteries. *Atherosclerosis*. 2001;155(1):113-22.
98. Lindenblatt N, Bordel R, Schareck W, Menger MD, Vollmar B. Vascular heme oxygenase-1 induction suppresses microvascular thrombus formation in vivo. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004;24(3):601-6.
99. Ishikawa K, Navab M, Leitinger N, Fogelman AM, Lusis AJ. Induction of heme oxygenase-1 inhibits the monocyte transmigration induced by mildly oxidized LDL. *The Journal of clinical investigation*. 1997;100(5):1209-16.
100. Aji W, Ravalli S, Szabolcs M, Jiang XC, Sciacca RR, Michler RE, et al. L-arginine prevents xanthoma development and inhibits atherosclerosis in *LDL* receptor knockout mice. *Circulation*. 1997;95(2):430-7.
101. Qian H, Neplioueva V, Shetty GA, Channon KM, George SE. Nitric oxide synthase gene therapy rapidly reduces adhesion molecule expression and inflammatory cell infiltration in carotid arteries of cholesterol-fed rabbits. *Circulation*. 1999;99(23):2979-82.
102. Poss KD, Tonegawa S. Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(20):10919-24.
103. Brouard S, Otterbein LE, Anrather J, Tobiasch E, Bach FH, Choi AM, et al. Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J Exp Med*. 2000;192(7):1015-26.
104. Orozco LD, Kapturczak MH, Barajas B, Wang X, Weinstein MM, Wong J, et al. Heme oxygenase-1 expression in macrophages plays a beneficial role in atherosclerosis. *Circulation research*. 2007;100(12):1703-11.
105. Yet SF, Tian R, Layne MD, Wang ZY, Maemura K, Solovyeva M, et al. Cardiac-specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice. *Circulation research*. 2001;89(2):168-73.
106. Yang L, Quan S, Nasjletti A, Laniado-Schwartzman M, Abraham NG. Heme oxygenase-1 gene expression modulates angiotensin II-induced increase in blood pressure. *Hypertension*. 2004;43(6):1221-6.
107. Ishizaka N, de Leon H, Laursen JB, Fukui T, Wilcox JN, De Keulenaer G, et al. Angiotensin II-induced hypertension increases heme oxygenase-1 expression in rat aorta. *Circulation*. 1997;96(6):1923-9.
108. Wenzel P, Rossmann H, Muller C, Kossmann S, Oelze M, Schulz A, et al. Heme oxygenase-1 suppresses a pro-inflammatory phenotype in monocytes and determines endothelial function and arterial hypertension in mice and humans. *European heart journal*. 2015;36(48):3437-46.
109. Wild PS, Zeller T, Beutel M, Blettner M, Dugi KA, Lackner KJ, et al. [The Gutenberg Health Study]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2012;55(6-7):824-9.
110. Walther M, De Caul A, Aka P, Njie M, Amambua-Ngwa A, Walther B, et al. *HMOX1* gene promoter alleles and high *HO-1* levels are associated with severe malaria in Gambian children. *PLoS Pathog*. 2012;8(3):e1002579.
111. Seo SB, Ge J, King JL, Budowle B. Reduction of stutter ratios in short tandem repeat loci typing of low copy number DNA samples. *Forensic Sci Int Genet*. 2014;8(1):213-8.
112. Schnabel RB, Schulz A, Wild PS, Sinning CR, Wilde S, Eleftheriadis M, et al. Noninvasive vascular function measurement in the community: cross-sectional relations and comparison of methods. *Circulation Cardiovascular imaging*. 2011;4(4):371-80.

113. Funke C, Tomiuk J, Riess O, Berg D, Soehn AS. Genetic analysis of heme oxygenase-1 (HO-1) in German Parkinson's disease patients. *J Neural Transm.* 2009;116(7):853-9.
114. Chen M, Zhou L, Ding H, Huang S, He M, Zhang X, et al. Short (GT) ( n ) repeats in heme oxygenase-1 gene promoter are associated with lower risk of coronary heart disease in subjects with high levels of oxidative stress. *Cell Stress Chaperones.* 2012;17(3):329-38.
115. Schillinger M, Exner M, Mlekusch W, Domanovits H, Huber K, Mannhalter C, et al. Heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism is associated with abdominal aortic aneurysm. *Thrombosis research.* 2002;106(2):131-6.
116. Tiroch K, Koch W, von Beckerath N, Kastrati A, Schomig A. Heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism and restenosis following coronary stenting. *European heart journal.* 2007;28(8):968-73.
117. Wijpkema JS, van Haelst PL, Monraats PS, Bruinenberg M, Zwinderman AH, Zijlstra F, et al. Restenosis after percutaneous coronary intervention is associated with the angiotensin-II type-1 receptor 1166A/C polymorphism but not with polymorphisms of angiotensin-converting enzyme, angiotensin-II receptor, angiotensinogen or heme oxygenase-1. *Pharmacogenet Genomics.* 2006;16(5):331-7.
118. Lublinghoff N, Winkler K, Winkelmann BR, Seelhorst U, Wellnitz B, Boehm BO, et al. Genetic variants of the promoter of the heme oxygenase-1 gene and their influence on cardiovascular disease (the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study). *BMC Med Genet.* 2009;10:36.
119. Taha H, Skrzypek K, Guevara I, Nigisch A, Mustafa S, Grochot-Przeczek A, et al. Role of heme oxygenase-1 in human endothelial cells: lesson from the promoter allelic variants. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2010;30(8):1634-41.

## 8 Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei meinem Doktorvater und meiner Betreuerin sehr herzlich für die gute Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung des experimentellen Teiles und später bei der Verschriftlichung der Ergebnisse danken. Ganz besonderer Dank geht an Frau [REDACTED] für die hervorragende Unterstützung bei der Durchführung der Experimente im Labor.

Für die Unterstützung beim Formatieren und Korrigieren der schriftlichen Arbeit gebührt grosser Dank Herr [REDACTED], der mit Geduld und Wissen immer beratend zur Verfügung stand.

Als letztes geht grosser Dank an meine Familie und meine Freunde, die mich jederzeit motiviert, inspiriert und unterstützt haben.

## 9 Tabellarischer Lebenslauf

### Persönliche Daten

**Name, Vorname:** Simsek, Canan, geboren am 01.01.1988 in Offenbach a.M.  
**Email:** csimsek@web.de  
**Geburtsdatum:** 01.01.1988  
**Geburtsort:** Offenbach am Main  
**Familienstand:** ledig  
**Staatsangehörigkeit:** Deutsch

### Schulausbildung

**Schulabschluss:** Herbst '98: Besuch des Gymnasialen Zweigs der Heinrich-Mann-Schule/Dietzenbach  
2007 Abitur an der Heinrich-Mann-Schule

**Sprachkenntnisse:** Englisch/Französisch/Spanisch  
Muttersprachen: Deutsch und Türkisch  
Seit der 6. Klasse Bilingualer Unterricht: Sozialkunde, Politik  
Wirtschaft und Geschichtsunterricht auf Englisch  
First Cambridge Certificate im Juni '05, Grade B  
Certificate in Advanced English im Juni '06, Grade B

### Studium und beruflicher Werdegang

**Herbst 2007:** Beginn des Studiums der Wirtschaftswissenschaften an der  
Johann-Wolfgang-Goethe-Universität/ Frankfurt a.M.  
Aufnahme in die Heinrich-Böll-Stiftung, Förderung als  
Stipendiatin der Stiftung bis November 2014

**Sommer 2008:** Beendigung des Studiums der Wirtschaftswissenschaften und  
Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Johannes-  
Gutenberg – Universität

**Seit 2012:** Experimentelle Doktorarbeit am Institut für Kardiologie und  
Angiologie/ II. Med. Klinik der Universitätsmedizin Mainz im  
Rahmen der Gutenberg-Gesundheitsstudie zur Bedeutung des  
Hämoxygenase-1-Promotor-Polymorphismus

|                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>November 2014:</b>     | Abschluss des Studiums der Humanmedizin, Abschlussnote: 1,85                                                                                                                                                                                                                    |
| <b>August 2015:</b>       | Beginn der Tätigkeit als Assistenzärztin an der Klinik für Anästhesiologie, operative Intensivmedizin und Schmerztherapie am Klinikum Hanau                                                                                                                                     |
| <b>Dezember 2015:</b>     | Veröffentlichung des Papers: <i>Heme oxygenase-1 suppresses a pro-inflammatory phenotype in monocytes and determines endothelial function and arterial hypertension in mice and humans</i> , <b>Autoren:</b> [REDACTED]<br>[REDACTED]<br>[REDACTED]<br>[REDACTED]<br>[REDACTED] |
| <b>Juni 2016:</b>         | Teilnahme am Kurs Anästhesie Fokussierte Sonografie/ Module 1,2.3, Worms                                                                                                                                                                                                        |
| <b>September 2016:</b>    | Teilnahme am Emergency Pediatric Care Provider Kurs, Hanau                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>Dezember 2016 -</b>    |                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| <b>Februar 2018:</b>      | Intensivmedizinische Rotation auf der operativen Intensivstation des Klinikum Hanau                                                                                                                                                                                             |
| <b>Oktober 2017:</b>      | Teilnahme am Einführungskurs Intensivmedizin, Arnsberg                                                                                                                                                                                                                          |
| <b>März 2018:</b>         | Teilnahme am Seminarkongress Notfallmedizin, Arnsberg                                                                                                                                                                                                                           |
| <b>Februar 2019:</b>      | Teilnahme am DEGUM-Basiskurs Notfallsonografie Teil I und II und thorakoabdominelle Sonografie E-FAST plus(AFS-Modul 5)                                                                                                                                                         |
| <b>September 2019:</b>    | Erwerb der Zusatzbezeichnung Notfallmedizin                                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>Mai-November 2020:</b> | Rotation in das Palliative Care Team Hanau                                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>September 2020:</b>    | Teilnahme am Basiskurs Palliativmedizin                                                                                                                                                                                                                                         |

### **Schulisches und außerschulisches Engagement**

|                   |                                                                                                          |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>2002-2007:</b> | Stipendiatin des Stipendien-Programms „START“ der Hertie-Stiftung für begabte und engagierte Jugendliche |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Hinweis: die Namen der Koautoren sowie weiterer Dritter in der vorliegenden Arbeit wurden auf Grund des Datenschutzes nachträglich geschwärzt.